

Entwicklung einer enzymatischen Reaktionskaskade zur Darstellung von Fettsäure-Hydroperoxiden aus Distelöl

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Valentin Gala Marti
aus Mönchengladbach

Düsseldorf, Oktober 2022

Aus der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften
der TH Köln in Kooperation mit der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. rer. Nat. Karl-Erich Jaeger
2. Prof. Dr. rer. Nat. Ulrich Schörken

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2023

Zusammenfassung

Linolsäurehydroperoxide sind vielseitige Zwischenprodukte für die Herstellung von Aromastoffen mit grüner Note und bifunktionellen ω -Oxosäuren als Koppelprodukt. Im Fokus der vorliegenden Arbeit lag die Prozessentwicklung einer enzymatischen Kaskade mit Lipase und Lipoxygenase zur Synthese von Linolsäurehydroperoxiden aus Distelöl gekoppelt mit einer *in situ* Sauerstofferzeugung durch Katalase. Die Herausforderung bei der Entwicklung der Reaktionskaskade bestand in der Zusammenführung der Enzyme und Optimierung der Reaktionsbedingungen, um möglichst hohe Reaktorausbeuten zu generieren. Optimierungsarbeiten zur Hydroperoxidierung mit 13S-spezifischer Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen (LOX-1) zeigten, dass insbesondere die Zugabe des biobasierten Tensids Triton CG-110 die Ausbeute der Reaktion um mehr als das Doppelte verbesserte. Zur Kombination von Lipase und LOX-1 eigneten sich die Lipasen aus *Candida rugosa* und *Pseudomonas fluorescens*, die in der Lage waren, Distelöl innerhalb von 5 Stunden bei einem pH-Wert von 8,0 zu >75 % zu hydrolysieren. Im Gegensatz zur Lipase aus *C. rugosa* wies das Enzym aus *P. fluorescens* keine Lag-Phase auf. Bei Kombination von *P. fluorescens*-Lipase mit LOX-1 wurde ein synergistischer Effekt beobachtet, der zu Ausbeuten von >80 % Hydroperoxide führte. Katalase aus *Micrococcus lysodeikticus* wurde für die *in situ* Sauerstoffproduktion mit kontinuierlicher H₂O₂-Dosierung im LOX-1/Lipase-Reaktionssystem verwendet. Die Schaumbildung wurde in der 3-Enzym-Kaskade im Vergleich zum belüfteten Reaktionssystem deutlich reduziert. In diesem System konnten bis zu 300 mM Linolsäure als Distelöl-Äquivalent mit einer Ausbeute von 70 g/L (\pm)13-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiensäure (13-HPODE) und einer Regioselektivität von 90% innerhalb von 7 Stunden umgesetzt werden.

Um eine wiederholbare Reaktionsführung zu untersuchen, wurden die verwendeten Enzyme auf verschiedene Trägermaterialien Co-immobilisiert und hinsichtlich ihrer Stabilität über mehrere Zyklen getestet. Eine Immobilisierung von LOX auf Immobead 150 P erlaubte bis zu acht Reaktionszyklen. Co-immobilisierte LOX mit Katalase konnte dagegen in bis zu sechs Reaktionszyklen eingesetzt werden. Der entwickelte Prozess erlaubte die Umsetzung von Distelöl über fünf wiederholten Anwendungen mit einer Ausbeute von maximal 45 % an 13-HPODE bei 30 mM Linolsäure. Eine Co-Immobilisierung von Lipase, LOX und Katalase auf Immobead war aufgrund einer Deaktivierung der Lipase durch HPODE Produkte nicht möglich. Um dieses Problem zu umgehen, wird ein 2-Reaktor Konzept mit getrennten Immobilisaten (LOX + Katalase getrennt von Lipase) vorgeschlagen. Dieser Ansatz würde eine kontinuierliche Hydrolyse mit getrennter Hydroperoxidierung erlauben. Auf dem Weg zu einem kombinierten chemo-enzymatischen Reaktionsprozess zur Synthese von Duftstoffen mit grüner Note wurde die Spaltung mit Hilfe von Lewis-Säuren gezeigt und über GC nachgewiesen.

Abstract

Linoleic acid hydroperoxides are versatile intermediates for the production of aroma compounds with a green note and bifunctional ω -oxoacids as a co-product. The focus of the present work was the development of an enzymatic cascade with lipase and lipoxygenase for the synthesis of linoleic acid hydroperoxides from safflower oil coupled with *in situ* oxygen generation by catalase. The challenge in developing the reaction cascade was to combine the enzymes and optimize the reaction conditions in order to generate the highest possible reactor yields. Optimization work on hydroperoxidation with 13S-specific lipoxygenase-1 from soybeans (LOX-1) showed that the addition of the biobased surfactant Triton CG-110 in particular improved the yield of the reaction by more than double. The lipases from *Candida rugosa* and *Pseudomonas fluorescens* were suitable for the combination of lipase and LOX-1 and were able to hydrolyse safflower oil to >75 % within 5 hours at a pH of 8.0. In contrast to the lipase from *C. rugosa*, the enzyme from *P. fluorescens* did not show a lag phase. When *P. fluorescens* lipase was combined with LOX-1, a synergistic effect was observed, leading to yields of >80 % hydroperoxides. Catalase from *Micrococcus lysodeikticus* was used for *in situ* oxygen production with continuous H₂O₂ dosing in the LOX-1/lipase reaction system. Foam formation was significantly reduced in the 3-enzyme cascade compared to the aerated reaction system. In this system, up to 300 mM linoleic acid as safflower oil equivalent could be converted within 7 h with a yield of 70 g/L (\pm)13-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid (13-HPODE) and a regioselectivity of 90%.

In order to investigate a repeatable reaction procedure, the enzymes used were co-immobilised onto different support materials and tested with regard to their stability over several cycles. Immobilization of LOX on Immobead 150 P allowed up to eight reaction cycles while co-immobilized LOX with catalase, on the other hand, could be used in up to six reaction cycles. The developed process allowed the conversion of linoleic acid over six repeated applications with a maximum yield of 45 % of 13-HPODE at 30 mM. Co-immobilisation of lipase, LOX and catalase on Immobead was not possible due to deactivation of lipase by HPODE product. To circumvent this problem, a 2-reactor approach with separate immobilisates (LOX + catalase and separated lipase) is proposed. This approach would allow continuous hydrolysis with separate hydroperoxidation. Towards a combined chemo-enzymatic reaction process for the synthesis of green-flavoured fragrances, cleavage was demonstrated using Lewis acids and detected via GC.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Einsatz von Biokatalysatoren und Prozessdesign für industrielle Anwendungen	1
1.1.1 Biokatalytische Transformation von Lipiden	1
1.1.2 Anwendungen und Potentiale von Enzymkaskaden für die chemische Industrie	2
1.1.3 Einsatz immobilisierter Enzyme.....	4
1.2 Struktur und Funktion der verwendeten Enzymklassen	6
1.2.1 Lipoxygenase.....	6
1.2.2 Lipase	12
1.2.3 Katalase	15
1.3 Der Oxylipin-Stoffwechsel und Anwendungspotentiale von Lipoxygenasen ..	17
1.3.1 Der Oxylipin-Stoffwechsel	17
1.3.2 Anwendung von Lipoxygenasen.....	19
2 Material & Methoden	21
2.1 Chemikalien, Enzyme und Geräte	21
2.2 Präparative Methoden	27
2.2.1 Isolierung und Anreicherung von Linolsäure aus Distelöl	27
2.2.2 Herstellung einer Lipoxygenasezubereitung aus Sojamehl	27
2.2.3 Funktionalisierung von Kohlenstoff-Nanoröhrchen und Immobead P	28
2.2.4 Alginat-Einschluss von LOX-1 und Katalase	29
2.2.5 Adsorption auf verschiedene Trägermaterialien	30
2.2.6 Immobilisierung auf funktionalisierten Kohlenstoff-Nanoröhrchen	31
2.2.7 Co-Immobilisierung von LOX-1 mit Katalase oder Lipase.....	33

2.3 Synthetische Methoden	34
2.3.1 Hydroperoxidierungsreaktionen mit LOX-1	34
2.3.2 Hydroperoxidierung mit <i>in situ</i> Sauerstofferzeugung	35
2.3.3 Hydrolyse von Distelöl mit Lipasen	35
2.3.4 Enzymkaskade aus Lipase und LOX-1	35
2.3.5 Kaskadenreaktion mit LOX-1, Lipase und Katalase	36
2.3.6 Biokatalytische Umsetzungen mit immobilisierten Enzymen	36
2.3.7 Umsetzung von Linolsäure mit co-immobilisierter LOX-1 und Katalase	37
2.3.8 Umsetzung von Distelöl mit co-immobilisierter LOX-1 und Lipase	38
2.3.9 Aufbau eines Reaktors für eine kontinuierliche Prozessführung	38
2.3.10 Kontinuierlicher Reaktorbetrieb mit immobilisierter LOX-1	39
2.3.11 Chemokatalytische Spaltung von HPODE mit Lewis-Säuren	39
2.4 Analytische Methoden	40
2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration über Biuret	40
2.4.2 Messung der Enzymaktivität von LOX-1	40
2.4.3 Aktivitätsbestimmung von Katalase	41
2.4.4 Bestimmung der Enzymaktivität von Lipase	41
2.4.5 Photometrische Bestimmung des Gehaltes an Hydroperoxiden	42
2.4.6 Gaschromatographische Analytik	43
2.4.7 HPLC Analyse von Hydroperoxyfettsäuren	45
2.4.8 Titrimetrische Bestimmung der Säurezahl	46
2.4.9 Mizellgrößenanalyse über dynamische Lichtstreuung	46
3 Ergebnisse	47
3.1 Untersuchungen zur LOX-1 katalysierten Hydroperoxidierung	47
3.1.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen für LOX-1	48
3.1.2 Untersuchung des Einflusses von Lösungsmitteln und Detergenzien	52
3.1.3 LOX-1 Hydroperoxidierung mit Tensid Triton CG-110	55
3.1.4 Scale-up zur Musterherstellung von Fettsäure-Hydroperoxiden	58
3.2 Entwicklung einer Enzymkaskade mit LOX-1, Lipase und Katalase	59
3.2.1 LOX-1 Hydroperoxidierung mit gekoppelter <i>in situ</i> Sauerstofferzeugung	59

3.2.2	Selektion einer geeigneten Lipase	61
3.2.3	Kombinierte Hydrolyse und Peroxidierung mit Lipase und LOX-1	63
3.2.4	Enzymkaskade mit LOX-1, Katalase und Lipase	68
3.3	Entwicklung einer Kaskade mit immobilisierten Enzymen	71
3.3.1	Herstellung von Trägermaterialien und Immobilisierung von LOX	71
3.3.2	Untersuchung zur Hydroperoxidierung mit immobilisierter LOX-1	75
3.3.3	Verwendung von LOX-1 unter kontinuierlichen Bedingungen	78
3.3.4	Co-Immobilisierung von Katalase und LOX-1	79
3.3.5	Co-Immobilisierung von Lipase und LOX-1	82
3.4	Chemokatalytische 13-HPODE Spaltung mit Lewis Säuren	88
4	Diskussion	92
4.1	Optimierung der Lipoxygenase-Reaktion	92
4.2	Enzymkaskade mit LOX-1, Lipase und Katalase	94
4.3	Reaktionskaskade mit immobilisierten Enzymen	97
4.3.1	Immobilisierung und Recycling von LOX-1	97
4.3.2	Co-Immobilisierung der verschiedenen Enzyme	100
4.4	Chemokatalytische Spaltung der Hydroperoxide	102
	Literaturverzeichnis	104
	Abbildungsverzeichnis	131
	Tabellenverzeichnis	134
	Danksagung	136
	Lebenslauf	137
	Publikationsliste	138
	Eidesstattliche Erklärung	140
	Erklärung Nutzungsrechte	141

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Ø	Durchmesser
Å	Angström
α	Alpha
β	Beta
p	Druck
μ	Mikro
ω	Omega
AOC	Allen-oxid-Cyclase
AOS	Allen-oxid-Synthase
Asn	Asparaginsäure
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Einheit Druck
BSA	Bovines Serum Albumin
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
C	Kohlenstoff
CalB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
cm	Centimeter
Da	Dalton
DES	Lipid-Desaturase
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAS	Epoxy-Alkohol-Synthase
EC	Enzyme Class
EDA	Ethylendiamin

ELSD	Verdampfungs-Lichtstreuendetektor
F	Phenylalanin
Fe	Eisen
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
Glu	Glutamin
H	Histidin
h	Stunde
His	Histidin
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure
HOTE	Hydroxyoctadecatriensäure
HPL	Hydroperoxid-Lyase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPODE	Hydroperoxyoctadecadiensäure
HPOTE	Hydroperoxyoctadecatriensäure
Ile	Isoleucin
Kg	Kilogramm
l	Liter
Linolsäure	Linolsäure
LOX	Lipoxygenase
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mol	Mol
MTBE	Methyl-tert-butylether
MWNT	Multi walled nanotubes

nm	Nanometer
OPDA	12-oxo-Phytodienonsäure
PDA	Photodiodenarray (Detektor)
PDB	Protein Datenbank
pH	Potential des Wasserstoffs
pNP	Laurinsäure-4-nitrophenylester
POX	Peroxygenase
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUFA	Poly unsaturated fatty acids
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Ser	Serin
t ₀	Startzeit
THF	Tetrahydrofuran
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMMS	Chlor(trimethyl)silan
TMOS	Tetramethylorthosilicat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Valin
v/v	Volumen/Volumen
VE	Voll entsalzt
w/w	Gewicht/Gewicht

1 Einleitung

Nachhaltigkeit als Trend im Kontext von Wissenschaft und Industrie ist in den letzten Jahren nicht nur ein Schlagwort geblieben, sondern beschreibt zunehmend eine tiefgreifende Transformation von Wirtschaft und Gesellschaft. Unternehmen sind deshalb immer mehr im Begriff neue, nachhaltigere Produktlinien und Herstellungsverfahren zu entwickeln und auf den Markt zu bringen. In Anbetracht dieser Entwicklung, nimmt die Herstellung von Polymeren mit einer jährlichen Produktion von über 400 Millionen Tonnen eine überaus prominente Stellung unter den Märkten der chemischen Industrie ein, wobei der Großteil der Polymere noch aus Erdöl gewonnen wird.

Die TH Köln hat sich mit dem Projekt Linopol das Ziel gesetzt, petrochemische Rohstoffe durch Pflanzenöle wie Distelöl zu ersetzen und so zur Verbesserung der Nachhaltigkeit in der chemischen Industrie beizutragen. Ziel dieses Projektes war es, aus Linolsäure bio-basierte Polymerintermediate und Aromastoffe mit grüner Note zu synthetisieren. Unter der Leitung von Prof. Schörken und Prof. Eisenacher forschten die Doktoranden Anna Coenen, Jan Dröner und Valentin Gala Marti an einer kombinierten bio- und chemokatalytischen Reaktionskaskade, um aus Distelöl Vorstufen für die Synthese von Polyamid 12 herzustellen.

Ziel dieser Arbeit war die Bereitstellung von Hydroperoxiden für eine anschließende Spaltung und weitergehende Verarbeitung. Polyamid ist zwar ein Spezialtensid, die benötigte 12-Aminododecansäure aber trotzdem recht preisgünstig. Daher ist die Entwicklung eines sehr effizienten Prozesses zur Bereitstellung der Hydroperoxide notwendig. Mit diesem Fokus bieten sich zum einen der Einsatz von Enzymkaskaden wie auch der von immobilisierten Enzymen an. Als Teil von diesem interdisziplinären Projekt fokussiert sich diese Arbeit auf die ersten Reaktionsschritte der Hydrolyse der Linolsäure aus Distelöl mit Hilfe von Lipase und der anschließenden Hydroperoxidierung mit Lipoxygenase. Durch Zugabe von Katalase und kontinuierlicher Zugabe von H_2O_2 wurde ein System zur *in situ* Sauerstoffgenerierung entwickelt und die kombinierte Reaktionskaskade in einem Eintopfverfahren realisiert.

1.1 Einsatz von Biokatalysatoren und Prozessdesign für industrielle Anwendungen

1.1.1 Biokatalytische Transformation von Lipiden

Lipide sind als Grundbausteine biologischer Lebensformen allgegenwärtig. Schon vor tausenden von Jahren entwickelten die Sumerer die erste chemische Transformation von Lipiden, indem sie Pflanzenasche und Öle vermengten und dadurch Seifen herstellten [1]. Im 19. Jahrhundert erfolgte dann mit dem Beginn der modernen Oleochemie eine systematische Untersuchung der Eigenschaften und der Reaktionen von Ölen und Fetten [2]. Heutzutage

nimmt die oleochemische Industrie einen wichtigen Teil in der Produktionskette von Nahrungsmitteln, pharmazeutischen Produkten, Kosmetika, Grund- und Feinchemikalien ein [3]. Auch im Energiesektor sind oleochemische Prozesse bei der Herstellung biogener Kraftstoffe wie Biodiesel vertreten [4]. Mit einem immer stärkeren Fokus auf nachhaltigen Prozessen, wird ein wachsender Teil dieser Herstellungsverfahren heutzutage biokatalytisch mit Enzymen als Einzelreaktion oder in einer Reaktionskaskade oder Mikroorganismen durchgeführt [5]. Zu den am häufigsten verwendeten Enzymen zur Modifikation von Lipiden gehören in erster Linie Lipasen, die sowohl zur Veresterung als auch zur Hydrolyse von Fettsäuren und Lipiden eingesetzt werden. Die Lipase B aus *Candida antarctica* hat sich dabei als außergewöhnlich stabiler und versatiler Biokatalysator unter extremen Bedingungen erwiesen [6]. Daneben werden Phospholipasen seit Jahrzehnten in großem Umfang zur Degumminierung von Pflanzenölen eingesetzt. Neben der Hydrolyse und Veresterung von Lipiden werden auch Oxidoreduktasen wie Lipoxygenasen (LOX) und P450 Monooxygenasen wie die Hydroperoxid Lyase (HPL) für die Transformation von Lipiden eingesetzt. LOX, als zentraler Baustein des Oxylipin-Stoffwechsels (Lipoxygenase-Weg) in Pflanzen, eröffnet in Kombination mit weiteren Enzymen den Weg zu Oxo-funktionalisierten Fettsäurederivaten [7,8]. Schon heute wird bei der großtechnischen Herstellung von Duftstoffen eine Enzymkaskade aus LOX und HPL eingesetzt [9,10]. In den letzten Jahren ist das Interesse von an der Biosynthese von Lipiden beteiligten Genen und Enzymen angewachsen. In diesem Kontext ermöglicht Metabolic Engineering dabei die Veränderung von Speicherlipiden in Mikroorganismen und Pflanzen [11-15]. Einsatz findet diese Technik bei der Herstellung von Ölen mit einem hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA).

1.1.2 Anwendungen und Potentiale von Enzymkaskaden für die chemische Industrie

Von Massenprodukten wie Polymeren bis hin zu hochkomplexen Arzneimitteln liefern die chemische und pharmazeutische Industrie Produkte, die Grundlagen des Alltags einer modernen Gesellschaft sind. Die bisher genutzten organo-chemischen Syntheserouten weisen oft mehrere Nachteile wie toxische Abfälle, schlechte Atomökonomie und übermäßige Kohlendioxidemissionen, die einer anhaltenden Umweltverschmutzung und Klimawandel Vorschub leisten. Aus diesem Grund gab es in den letzten Jahren einen Richtungswechsel hin zu „grünere“, nachhaltigeren Syntheseprozessen, die den Prinzipien der grünen Chemie folgen [16]. Unter diesem Trend fällt die Nutzung von regenerativen Rohstoffen, die Verwendung geeigneter Katalysatoren und die Rationalisierung von Herstellungsverfahren.

In diesem Kontext erfahren Enzyme aufgrund ihrer vielfältigen Vorteile wie hoher Selektivität, Nicht-Toxizität und milden Reaktionsbedingungen, neues Interesse aus Wissenschaft und Industrie [17]. Schon heute sind Enzyme zur Durchführung einzelner Syntheseschritte in der Industrie etabliert. Prominente Beispiele finden sich in der Produktion von hochpreisigen

pharmazeutischen Produkten und auch von günstigen Massenprodukten wie Glukose-Fruktose-Sirup [18-21]. In jüngerer Zeit wird der Fokus auf ganze Kaskaden von Enzymen gesetzt, um sowohl metabolische Wege von Mikroorganismen zur Produktion von Chemikalien als auch *in vitro* Enzymkaskaden zu nutzen [22,23]. Durch den Einsatz von gentechnischen Methoden sind neue in der Natur nicht vorkommende Pfade von Reaktionskaskaden darstellbar. Die Kombination von Enzymen kann dabei sowohl linear wie auch orthogonal oder parallel durchgeführt werden, wobei Hilfsenzyme, etwa bei einer redoxneutralen Katalyse, zum Einsatz kommen können [24]. Einer der Bereiche, in denen Kaskadenreaktionen eine zentrale Rolle einnehmen, ist die Synthese von Oleo-Verbindungen aus Lipiden und Fettsäuren sowie der Herstellung von Naturprodukten [25,26]. Im Vergleich zu klassischen Einzelreaktionen, können Kaskadenprozesse eine bessere Atom-Ökonomie erreichen. Darüber hinaus ist die Reaktionsführung aufgrund der Einsparung mehrerer Zwischenschritte erleichtert. Dadurch sind Kaskadenreaktion bei hohen Produktausbeuten ökonomisch sehr effiziente Prozesse [27,28]. In der Folge ist es möglich, sehr nachhaltige und umweltfreundliche Prozesse zu gestalten bei gleichzeitig hohen Selektivitäten. Nachteile einer Verwendung von Enzymen kann die Einstellung geeigneter Reaktionsbedingungen sein, da die Katalysatoren oft unterschiedliche pH- und Temperaturoptima aufweisen wie auch unterschiedliche Stabilitäten gegenüber Lösungsmitteln oder Substrat/Produktinhibition zeigen können [29-31].

Pflanzenöle als Rohstoff für chemische Umsetzungen bieten ein vielversprechendes Produktspektrum. Für die Synthese von 1-Alkenen und Alkanen für die Verwendung als Biotreibstoffe, wurde ein System bestehend aus einer Lipase und P450 Decarboxylase erfolgreich getestet und publiziert [32,33]. Eine bekannte Reaktionskaskade, die auch im großtechnischen Maßstab eingesetzt wird, ist die Oxidation von Fettsäuren zu α , ω -Disäuren mit Hilfe eines optimierten *Candida tropicalis* Stamm, der schon heute Produkttiter von über 200 g/l erreicht [16,34,35]. Weitere Publikationen beschreiben die erfolgreiche Synthese von α , ω -Alkendiol und Cyclopenten, ω -Hydroxyfettsäuren, Hydroxylaurinsäure und Ölsäure [36-39]. Neben der Verwendung der Fettsäuren wird auch Anschlussverwendung von Hydrolyse-Nebenprodukten wie Ethanol und Glycerol ins Auge gefasst [39,40]. Im Bereich der Polymersynthese wurde die Modifikation von L-Lysin zu 5-Aminovalerat als Vorstufe von Nylon erfolgreich getestet und in einem *E. coli* Ganzzellsystem bis zu einem Titer von 103 g/l optimiert) [41,42].

1.1.3 Einsatz immobilisierter Enzyme

Mit steigendem Interesse an nachhaltiger Prozessführung unter Einsatz von Enzymen werden verschiedene Wege wie Enzymkaskaden und Enzymimmobilisierung verstärkt untersucht, um diese Prozesse entsprechend ökonomischer zu gestalten [43,44]. Für einen ökonomischen Prozess ist dabei eine Produktivität von ca. 2.000 – 10.000 kg Produkt pro kg immobilisiertes Enzym für Grundprodukte notwendig. Hingegen kann für Feinchemikalien und pharmazeutische Produkte bereits ein Verhältnis von ca. 50 – 100 kg Produkt pro kg immobilisiertes Enzym ausreichend sein [45,46]. In diesem Kontext kann die Immobilisierung von Enzymen ein Weg sein, um entsprechende Prozesse zu realisieren und industriell anwendbar zu gestalten. Durch die Immobilisierung kommt es dabei zu einer Änderung der spezifischen chemischen, biochemischen, kinetischen und mechanischen Eigenschaften des Enzyms. Diese hängen sowohl vom Enzym, seiner Größe und der Konzentration ab, wie auch vom Trägermaterial und seiner Funktionalisierung [47-49].

In Anbetracht der genannten Anforderungen an die Produktivität von Enzymen ist bei der Entwicklung von neuen immobilisierten Präparaten einer der wichtigsten Aspekte die potentielle Wiederverwendung in wiederholten Chargenzyklen oder in kontinuierlichen Prozessen [50-53]. Dazu müssen die Träger möglichst resilient gegenüber harschen Bedingungen in industriellen Prozessen sein, in denen oft hohe Scherkräfte oder Temperaturen herrschen oder unter Lösungsmiteleinsetz gearbeitet wird [54-56]. Darüber hinaus sollten die Träger eine möglichst große Oberfläche und/oder eine hohe Anzahl funktioneller Gruppen aufweisen [57-59]. Um die genannten Eigenschaften zu erreichen, sind beim Design neuer Trägermaterialien oder der Immobilisierung von Enzymen einige Aspekte zu beachten. Zu diesen Aspekten gehören zum einen physikalisch-chemische Eigenschaften wie Hydrophobizität, aber auch strukturelle Eigenschaften wie Porenvolumen und Porengröße [60,61]. Aufgrund dieser potenziellen Vielfalt an möglichen Trägermaterialien existieren eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Immobilisierung von Enzymen. Wichtige Methoden sind unter anderem die Immobilisierung durch kovalente Bindung, Adsorption, Einschluss und durch Quervernetzung [62].

Schon heute werden viele Produkte des alltäglichen Bedarfs unter Einsatz von immobilisierten Enzymen hergestellt. Ein großer Markt für den Einsatz von immobilisierten Enzymen ist dabei die Nahrungsmittelindustrie. Die Fettchemie stellt neben der Zuckerchemie einen der wichtigsten Bereiche in der Nahrungsmittelindustrie dar. In der Fettchemie spielen Lipasen als Enzyme, die sowohl die Hydrolyse als auch die Veresterung von Lipidsubstraten katalysieren, eine herausragende Rolle, wobei das Enzym CalB dabei eine besonders prominente Position einnimmt. So verdrängt der Einsatz von CalB über die Jahre den chemischen Prozess zur Produktion von Vitamin-C Fettsäureester immer weiter [63,64]. CalB findet als vielseitiges

Enzym auch Anwendung in der Synthese von Omega-3-Fettsäureestern. So berichtet Ocean Nutrition Canada Ltd. von einem Prozess, bei dem in einer Reaktionskaskade Fischöle mithilfe einer Lipase aus *Thermomyces lanuginosus* zuerst hydrolysiert, und in einem weiteren Schritt von CalB verestert zu werden [65]. Ein anderer Prozess wird von Pronova BioPharma Norge AS eingesetzt, bei dem Fischöl mit Ethanol unter Einsatz von CalB verestert wird [66].

Neben der Anwendung in der Nahrungsmittelindustrie nimmt CalB auch in der chemischen Industrie eine herausragende Stellung als immobilisiertes Enzym (Novozyme 435) ein. Durch ihr breites Substratprofil, findet diese Lipase Eingang in verschiedenste Herstellungsverfahren für Polymerbestandteilen Eingang. Zu diesen Produkten zählen chirale Amine (BASF), Acrylate (Sumitomo, BASF), Organosiliconester (Dow Corning) und Oleamide [67-73]. Neben ihrem Einsatz in der Polymersynthese, wird die Lipase CalB auch in der Herstellung des Herbizids Dimethenamid-P (BASF) sowie bei der Produktion von kosmetischen Estern wie Myristylmyristat (Evonik, Eastman Chemical Company) genutzt [74-77].

Immobilisierte Enzyme, als hochspezifische Biokatalysatoren, spielen auch in der pharmazeutischen Industrie eine wichtige Rolle. So wird CalB bei der Herstellung von Sofosbuvir (Gilead), ein Mittel gegen Hepatitis C sowie Odanacatib (Merck), einem Cathepsin-K-Inhibitor, eingesetzt [78-82]. Neben Lipasen finden auch Penicillin-G-Amidasen und Transaminasen Verwendung bei der Produktion von Beta-Lactam-Antibiotika [83-86] und dem Antidiabetikum Sitagliptin (Merck) [87,88]. Über den Einsatz in der Synthese pharmazeutischer Produkte hinaus finden immobilisierte Enzyme auch in anderen Bereichen der medizinnahen Industrie wie etwa in medizinischen Geräten und in Biosensoren Anwendung. Beispielhaft genannt ist etwa der Einsatz von gelösten Lipasen zur Unterstützung der Fetthydrolyse bei Patienten mit cystischer Fibrose und immobilisiert bei der Detektion und Quantifizierung von Pestizidrückständen [89,90]. In der Dialyse etwa wird Urease eingesetzt um überschüssigen Harnstoff zu entfernen [91-93]. Biosensoren spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Bereichen von klinischer Diagnostik über Nahrungsmittelsicherheit, Agrarindustrie bis zur Umwelt-Diagnostik [94-99]. Ein bekanntes Beispiel ist der Einsatz von immobilisierten Enzymen wie Glukoseoxidase und Glukosedehydrogenase in Blutzuckermessstreifen, die alleine schon einen Umsatz von 18,5 Milliarden US-Dollar im Jahre 2020 generierten [100].

1.2 Struktur und Funktion der verwendeten Enzymklassen

1.2.1 Lipoxygenase

Fettsäuren sind als Bestandteile von Phospholipiden essenzielle Komponenten von Zellmembranen und auch als Triglyceride wichtig zur Energiegewinnung [101]. Nach hydrolytischer Freisetzung mehrfach ungesättigter Fettsäuren stellt die Hydroperoxidierung den ersten Schritt im Lipoxygenase-Weg dar, der zu verschiedenen Signalmolekülen wie Leukotrienen führt [102, 103]. Lipoxygenasen sind Lipid-peroxidierende Enzyme und gehören zur Klasse der Dioxygenasen EC 1.13.11). Lipoxygenasen katalysieren die Oxidation von Fettsäuren wie Arachidonsäure, Linolsäure oder Linolensäure, die eine (Z,Z)-1,4-Pentadien-Einheit enthalten, und generieren konjugierte Hydroperoxydien-Fettsäuren [104, 105].

LOX, als Bestandteil des Oxylin-Stoffwechsels, kommen ubiquitär in Pflanzen und Säugetieren vor und wurden auch in Pilzen, Moosen, Korallen und Bakterien nachgewiesen [106, 107]. LOX verschiedener Organismen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität. So favorisieren Säugetier-Lipoxygenasen freie Polyenfettsäuren wie Arachidonsäure, während pflanzliche LOX-Linolsäure und Linolensäure bevorzugen [108]. Da die Konzentration dieser freien Fettsäuren im zellulären Medium gering ist, müssen sie aus dem zellulären Speicher durch Lipid spaltende Enzyme freigesetzt werden. Einige LOX-Isoformen sind allerdings im Stande auch Fettsäureester wie sie in Biomembranen oder Lipoproteinen enthalten sind, mit Sauerstoff zu oxidieren [109, 110].

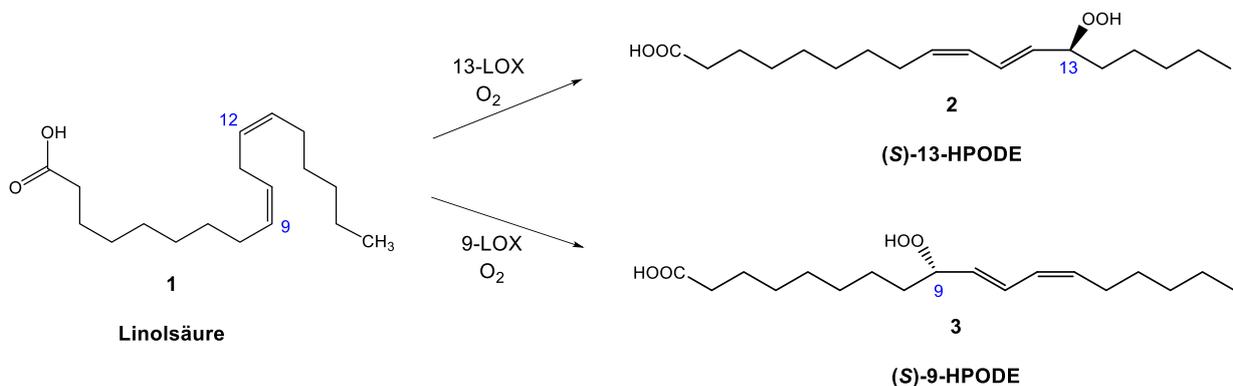


Abbildung 1: LOX-katalysierte Reaktion von Linolsäure ((Z,Z)-Octadeca-9,12-diensäure) zu den korrespondierenden Hydroperoxiden (S)-13-HPODE und (S)-9-HPODE.

Pflanzen enthalten mehrere LOX-Isoformen, die sich mit Hinsicht auf Regiospezifität, Stabilität, Substratpräferenz und optimalen pH-Wert unterscheiden [111]. Die Hydroperoxidgruppen können bei der Hydroperoxidierung von Linol- und Linolensäure sowohl an Position 9 wie auch an Position 13 gebildet werden, weswegen bei pflanzlichen LOX zwischen 9-LOX oder 13-LOX unterschieden wird [112]. Die hohe Regiospezifität der Lipoxygenasen bei der Hydroperoxidierung von Linolsäure ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Zurzeit werden zwei

Modelle diskutiert: die "space-related-theory" (Platz-Modell) und die "substrate-orientation-theory" (Substrat-Orientierungs-Modell) (Abbildung 2) [101]. Nach dem zweiten Modell wird die Position der Dioxygenierung durch die Seite, mit der die Linolsäure ins aktive Zentrum der LOX eintritt, entschieden. Im Falle der 13-LOX dringt das unpolare Methyl-Ende zuerst ein, während bei der 9-LOX das Molekül gezwungen ist, mit inverser Orientierung mit der Carboxy-Funktionalität zuerst einzutreten. Während es Argumente für das Substrat-Orientierungs-Modell gibt, wurden in den letzten Jahren das katalytische Zentrum verschiedener LOX-Isozyme näher untersucht und dabei kritische Aminosäuren gefunden, die auch das Platz-Modell unterstützen. Es konnte gezeigt werden, dass bei 13-LOX Isozymen am Boden der Bindungstasche voluminöse Aminosäurereste von Histidin (H) und Phenylalanin (F) vorliegen, die ein tieferes Eindringen der Linolsäure in die Kavität verhindern. Bei der 9-LOX finden sich an gleicher Stelle dagegen kleinere Valin-Reste (V), wodurch das Substrat tiefer ins Zentrum eindringen kann. Folgearbeiten konnten die Umwandlung einer 13-LOX in eine 9-LOX durch Substitution der voluminösen Aminosäuren der 13-LOX mit kleineren Aminosäuren zeigen [102]. Ein weiterer wichtiger Parameter, der die Regiospezifität beeinflusst, ist der pH-Wert. So wurde hinsichtlich der LOX-1 aus Sojabohnen gezeigt, dass bei alkalischen Bedingungen (pH 9-10) beinahe ausschließlich das 13-HPODE gebildet wird, während bei neutralem pH (pH 6-7) das 9-HPODE entsteht [103, 104]. Neben den bisher genannten Einflussfaktoren (verfügbarer Platz in der aktiven Tasche, Substratorientierung und pH-Wert) spielen auch die Substrat-Konzentration, Temperatur und Modifikationen des Substrats eine wichtige Rolle [101].

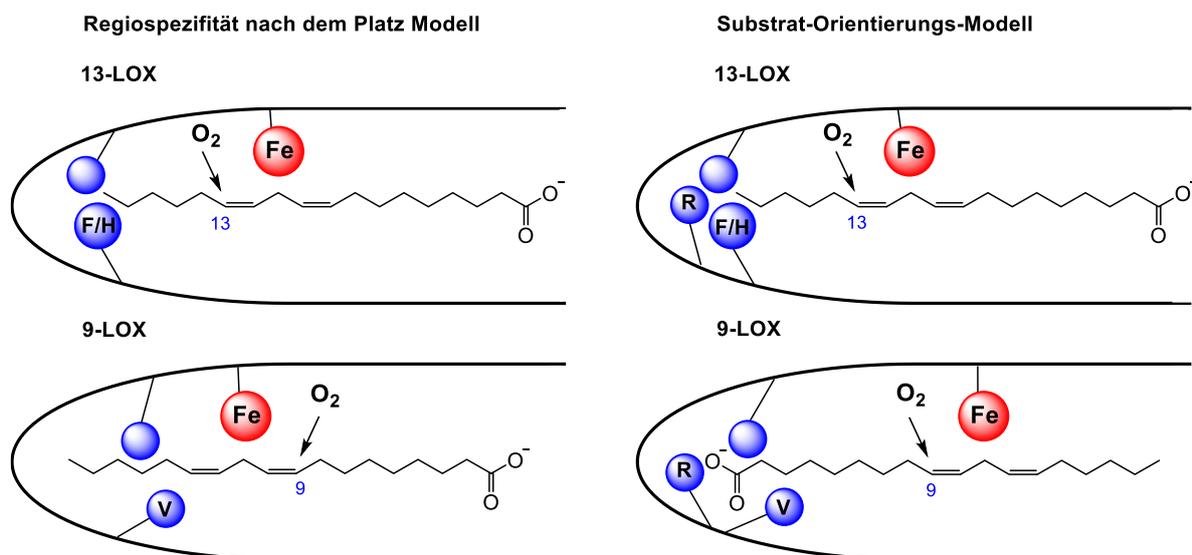


Abbildung 2: Darstellung der zwei Modelle zur Erklärung der Regiospezifität bei der LOX-katalysierten Hydroperoxidierung. Links: Platz-Modell, Rechts: Substrat-Orientierungs-Modell.

Pflanzliche LOX lassen sich über verschiedene Merkmale in unterschiedliche Klassen und Familien einteilen. In Bezug auf Sequenzähnlichkeit werden pflanzliche LOX in zwei

Genunterfamilien eingeteilt. LOX-1 werden Enzyme genannt ohne chloroplastidäres Transitpeptid, die eine Sequenzähnlichkeit von >75 % ausweisen. Enzyme, die der Gruppe LOX-2 zugeordnet werden, weisen eine 35 %ige Sequenzähnlichkeit zueinander auf und enthalten darüber hinaus ein chloroplastidäres Transitpeptid [113]. LOX-2 Enzyme werden hinsichtlich ihrer Regiospezifität als 13-LOX kategorisiert [114]. Im Vergleich zu Tieren, enthalten Pflanzen allgemein mehr LOX-Isoformen. Bisher wurden in Sojabohnen 13 und im Reisgenom mehr als 20 LOX-Isoformen identifiziert. Das menschliche Genom enthält dagegen sechs funktionelle LOX-Gene und das der Maus 7 [115,116]. Durch die funktionelle Heterogenität und die hohe Anzahl an Isoformen in Pflanzen, die sowohl als lösliche Enzyme als auch membranassoziiert vorkommen, eröffnet sich eine große Bandbreite an Anwendungsmöglichkeiten [117]. Die hohe Anzahl an LOX-Isoformen kann aber, aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zueinander, zu Schwierigkeiten bei der Isolierung und Untersuchung führen. So sind pflanzliche lösliche LOX im Cytosol lokalisiert und werden in Keimlingen und reifenden Samen in bestimmten Phasen des Wachstums in großen Mengen gebildet. Darüber hinaus wurden mehrere Isoformen in Sojabohnen in verschiedenen Entwicklungsstadien und Organellen wie in den Chloroplasten, der Vakuole, den Mitochondrien und im Zellkern nachgewiesen [118-120].

Lipoxygenasen sind monomere Enzyme, die ein nicht hämgebundenes Eisenion als Cofaktor im aktiven Zentrum aufweisen [121]. Pflanzliche und pilzliche LOX haben ein Molekulargewicht von etwa 95 bis 100 kDa und enthalten etwa 25 % mehr Aminosäurereste als tierische LOX (75-80 kDa) und bakterielle LOX (49-75 kDa) [122-124]. Lipoxygenasen sind in eine 2-Domänen Sekundärstruktur unterteilt: Eine katalytisch aktive C-terminale Domäne, die für die Substratbindung verantwortlich ist, und eine N-terminale Domäne, die entscheidend für die Membranbindung ist [125,126]. Die dreidimensionale Struktur der LOX-1 aus Sojabohnen zeigt eine Ellipsoidform (Abbildung 3) [127,128].

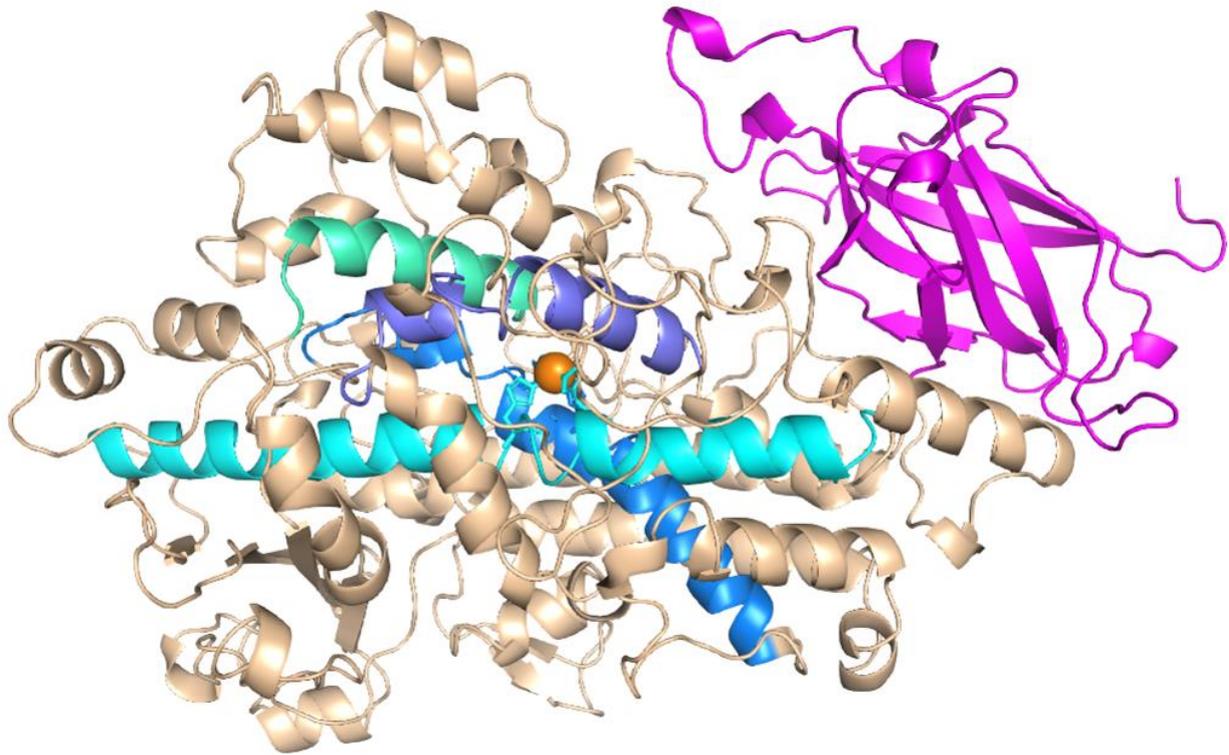


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen. Das Enzym besteht aus 839 Aminosäureresten und weist ein Molekulargewicht von 94,54 kDa auf. Blaue Helices bilden einen Kanal zum aktiven Zentrum, während die Faltblattstruktur mit der Membranbindung assoziiert wird. Das Eisen im aktiven Zentrum ist hier orange dargestellt. Die Struktur wurde mittels Röntgenkristallographie mit einer Auflösung von 1,4 Å bestimmt. PDB: 1YGE [127].

Lipoxygenasen verfügen in der Regel über bis zu drei Eisenionen, die in dem aktiven Zentrum als Cofaktor dienen und daher für die katalytische Aktivität des Enzyms essenziell sind [129]. Dagegen enthalten einige pilzliche Lipoxygenasen Mangan-Ionen als Cofaktoren im aktiven Zentrum, die über Histidin- und Asparaginresten verknüpft sind [107]. Im Ruhezustand liegt das sechsfach koordinierte Eisen mit leicht verzerrter oktaedrischer Anordnung als Eisen (II) vor, während es im Verlauf der Reaktion zu einer Oxidation zum Eisen (III) kommt (Abbildung 4). Dabei wird es überwiegend über Histidinreste komplexiert und liegt als high-spin-Fe-Komplex vor. Bei Säugetier-LOXs wird das Eisen im aktiven Zentrum von vier Histidinen und einem C-terminalen Isoleucin koordiniert [102]. In pflanzlichen LOXs hingegen dienen als Eisen-Liganden die drei Aminosäuren Histidin 499, 504 und 690, wobei die Proteinkette des Carboxy- Terminus der Aminosäure Isoleucin 839 den vierten Liganden bildet. Als weiterer Ligand drängt sich, aufgrund ihrer Ausrichtung und räumlicher Nähe zur Koordinationssphäre des Eisenions, die Aminosäure Asp694, auf. Jedoch ist der Abstand größer als bei den übrigen Liganden, sodass es nur sehr schwach mit dem Eisen interagiert. Er ist somit an polaren Wechselwirkungen mit anderen Aminosäureresten und einer Wasserstoffbrücke beteiligt [127].

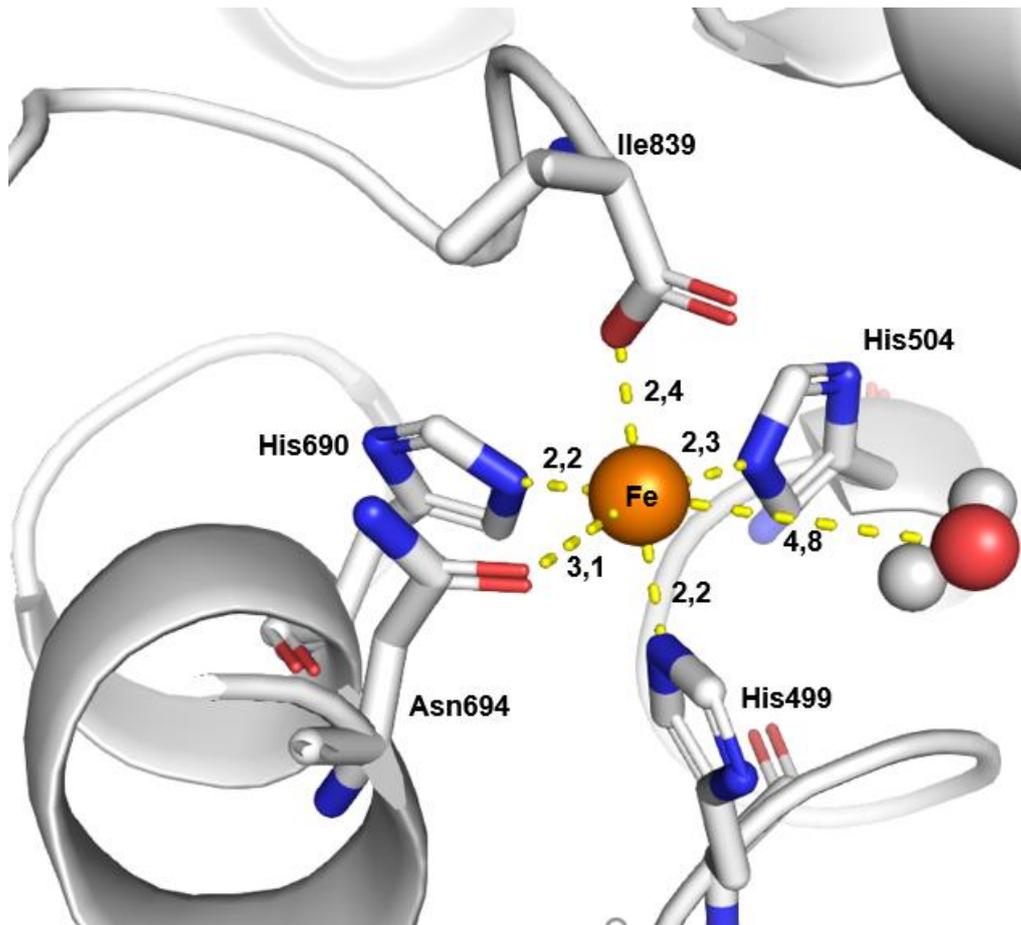


Abbildung 4: Dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums der Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen. In der Mitte des aktiven Zentrums ist das Eisen (III) Ion (orangene Kugel) zu sehen, welches als high-spin-Fe- Komplex vorliegt. Die oktaedrische Koordinationssphäre des Eisens umfasst die Seitenketten von His499, His504, His690 und Asn694 sowie das terminale Carboxylat von Ile839. Wasser ist hier rot (Sauerstoff) und weiß (Wasserstoff) dargestellt. Die Distanzen sind in Angström (Å) gezeichnet. PDB: 1YGE [127].

Pflanzliche LOXs sind vielseitige Katalysatoren und sind in der Lage neben der regioselektiven Hydroperoxidierung von Lipidsubstraten, noch die Sekundärumwandlung von Hydroperoxy-Fettsäuren zu Linoleatdimeren oder Ketodienfettsäuren (Hydroperoxidase-Reaktion), sowie die Bildung von Epoxy-Leukotrienen (Leukotrienen-Synthase-Reaktion) zu katalysieren [130]. Diese Stoffwechselreaktionen sind wichtige Reaktionen in biologischen Systemen, wobei die dabei entstehenden Produkte als Oxylipine bezeichnet werden. Daneben wurde auch die Umsetzung von Fettsäureestern und komplexen Substraten wie Phospholipiden sowie die Oxidation von Fettsäureamiden durch Lipoxygenasen untersucht [131,132]. Alle diese Nebenreaktionen weisen jedoch eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit als die Dioxygenierungs-Reaktion auf, die bei Pflanzen am häufigsten stattfindet [101,104]. Die Nebenreaktionen sind außerdem nur unter besonderen Bedingungen wie Sauerstoffmangel und sauren pH-Wert nachzuweisen.

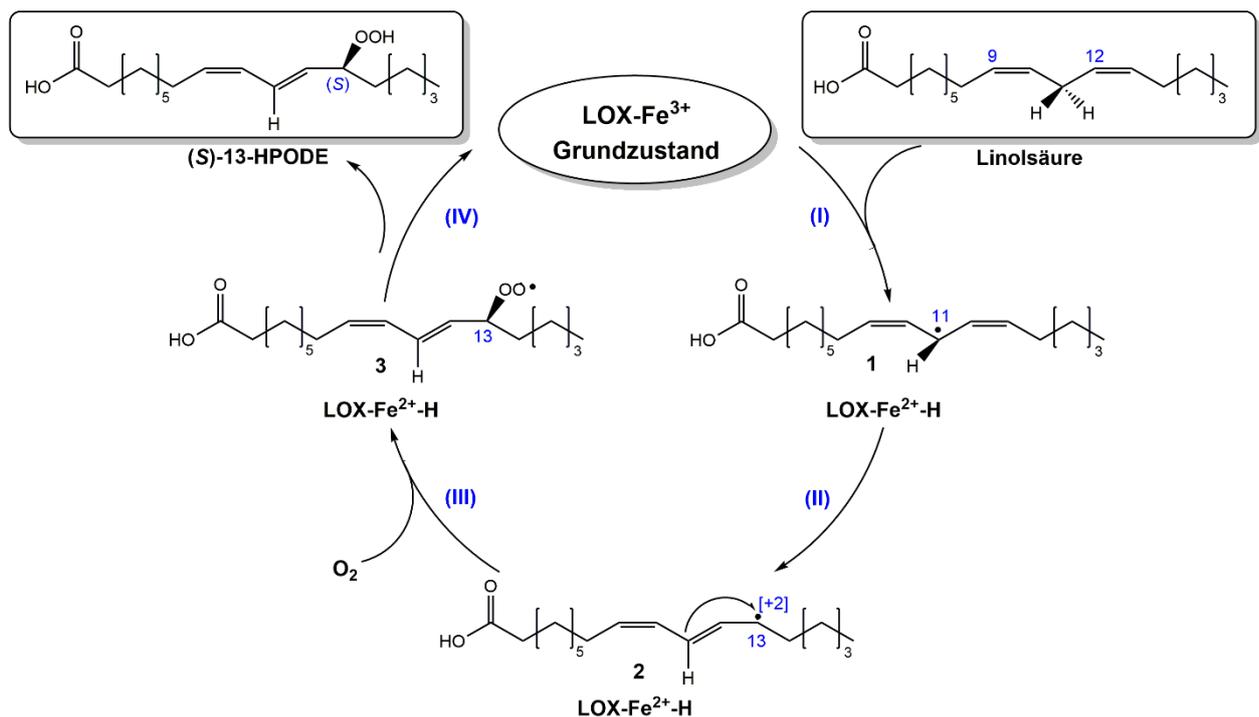


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der LOX-katalysierten Oxidation von Linolsäure zu (S)-13-HPODE. In der schematischen Darstellung sind die vier Hauptschritte der Lipoxygenase-Reaktion zu sehen: (I) Wasserstoffabstraktion bei gleichzeitiger Reduktion des dreiwertigen Eisens im katalytischen Zentrum der Lipoxygenase; (II) Radikalumlagerung; (III) die stereoselektive Sauerstoffinsertion; (IV) die Peroxyradikalreduktion bei gleichzeitiger Rückgewinnung des zweiwertigen Eisens.

Lipoxygenasen katalysieren die Oxidation von Fettsäuren, über einen vierstufigen Mechanismus. In einem ersten Reaktionsschritt erfolgt die stereoselektive Wasserstoffabstraktion eines doppelallylständigen Methylens des Eduktes (Abbildung 5, Reaktionsschritt I). Bei Arachidonsäure gibt es drei doppelallylständige Methylengruppen, bei Linolsäure hingegen nur eine. Das Wasserstoffatom wird abgespalten und es entsteht ein mesomeriestabilisiertes Fettsäure-Radikal. Das daraus korrespondierende Elektron wird dann vom Eisen (III) aufgenommen, welches daraufhin zum Eisen (II) reduziert wird. Darüber hinaus wird immer entweder nur das pro-*S* oder nur das pro-*R* Wasserstoffatom abstrahiert. Anschließend folgt die Umlagerung des Radikals, welches nun über das gesamte Doppelbindungssystem delokalisiert ist (Abbildung 5, Reaktionsschritt II). Das Radikalelektron kann entweder in Richtung des Methylendes der Fettsäure ([+2]-Umlagerung) oder in Richtung des Carboxylats ([2]-Umlagerung) verschoben werden. Welche von den beiden Richtungen letztendlich von dem Enzym gewählt wird, wird durch seine Regiospezifität bestimmt. In beiden Fällen entstehen aus den *cis*-Doppelbindungen des Eduktes *cis-trans*-konjugierte Systeme [104]. Danach folgt die antarafaciale Sauerstoffinsertion, in Transstellung zur Position der Wasserstoffabstraktion (Abbildung 5, Reaktionsschritt III). Während der Reaktionsschritt der

Wasserstoffabstraktion irreversibel ist, handelt es sich bei der Sauerstoffinsertion um eine reversible Reaktion. Der genaue Mechanismus der antarafacialen Oxygenierung ist noch unklar, wobei mehrere Theorien in Diskussion sind. Die erste Theorie ist die sterische Abschirmung wonach das Substrat so gebunden vorliegt, dass nur eines der reaktiven Kohlenstoffe des Pentadienradikals für Sauerstoff zugänglich ist. Ein weiterer Grund könnte ein separater Sauerstoff-Kanal durch das Protein sein, durch den molekularer Sauerstoff zum gewünschten Ort der Sauerstoffanreicherung auf dem aktivierten Fettsäurederivat geleitet und wodurch die Stereospezifität bestimmt wird. Die dritte Überlegung ist das selektive Einfangen von Peroxyradikalen, d.h. dass die Stereospezifität nicht von der Sauerstoffinsertion abhängt, sondern vom Einfangen des Peroxyradikals, welches zum entsprechenden Produkt führt. Die letzte Theorie ist die radikale Lokalisierung, in der das Radikal-Intermediat in einer bestimmten Konformation stabilisiert wird und somit nur einen möglichen Angriffspunkt hat [104].

Zuletzt erfolgt die Peroxyradikal-Reduktion (Abbildung 5, Reaktionsschritt IV). Das durch Sauerstoffinsertion gebildete Peroxyradikal wird durch ein Elektron aus dem nicht-Häm-Eisen zu seinem entsprechenden Anion reduziert. Dadurch wird das Eisen zu Eisen (III) oxidiert, ist somit wieder katalytisch aktiv und bereit für einen neuen Katalysezyklus. Durch die darauffolgende Protonierung des Peroxyanion entsteht das Reaktionsprodukt der Lipoxygenase-Reaktionen, die Hydroperoxyfettsäure [104]. Eine Besonderheit der LOX ist ein autokatalytisches Verhalten, das bei Sauerstoffmangel auftritt. Dabei wird vorher gebildetes Hydroperoxid genutzt, um weitere Fettsäuren umzusetzen [133].

1.2.2 Lipase

Lipasen (EC 3.1.1.3) sind als Triacylglycerolesterhydrolasen eine Unterklasse der Esterasen [134] und katalysieren sowohl die Hydrolyse als auch die Veresterung von Fettsäureglyceriden [135, 136]. Lipasen kommen in vielen Organismen sowohl extra- als auch intrazellulär vor und übernehmen Aufgaben im Metabolismus und Transport von Lipiden [137].

Lipasen gehören zur Familie der Proteine mit α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv und besitzen eine katalytische Triade im aktiven Zentrum [138-142]. Neben der katalytischen Triade bestehend aus Histidin, Serin und Glutamin- oder Asparaginsäure, weisen Lipasen ein typisches Oxyanion-Loch auf, welches die negative Ladung im Übergangszustand auf einen deprotonierten Sauerstoff oder Alkoholat stabilisiert (Abbildung 6) [143-145]. Im Verlauf der Reaktion kommt es nach (I) zu einem tetraedischen Übergangszustand in dessen Folge das Serin im katalytischen Zentrum deprotoniert wird (Acylierung). Während der Deacylierung wird wiederum ein tetraedischer Übergangszustand gebildet, um nach Abspaltung des Esters den Grundzustand zu erreichen. Diese Reaktion ist reversibel und kann somit in beide Richtungen ablaufen.

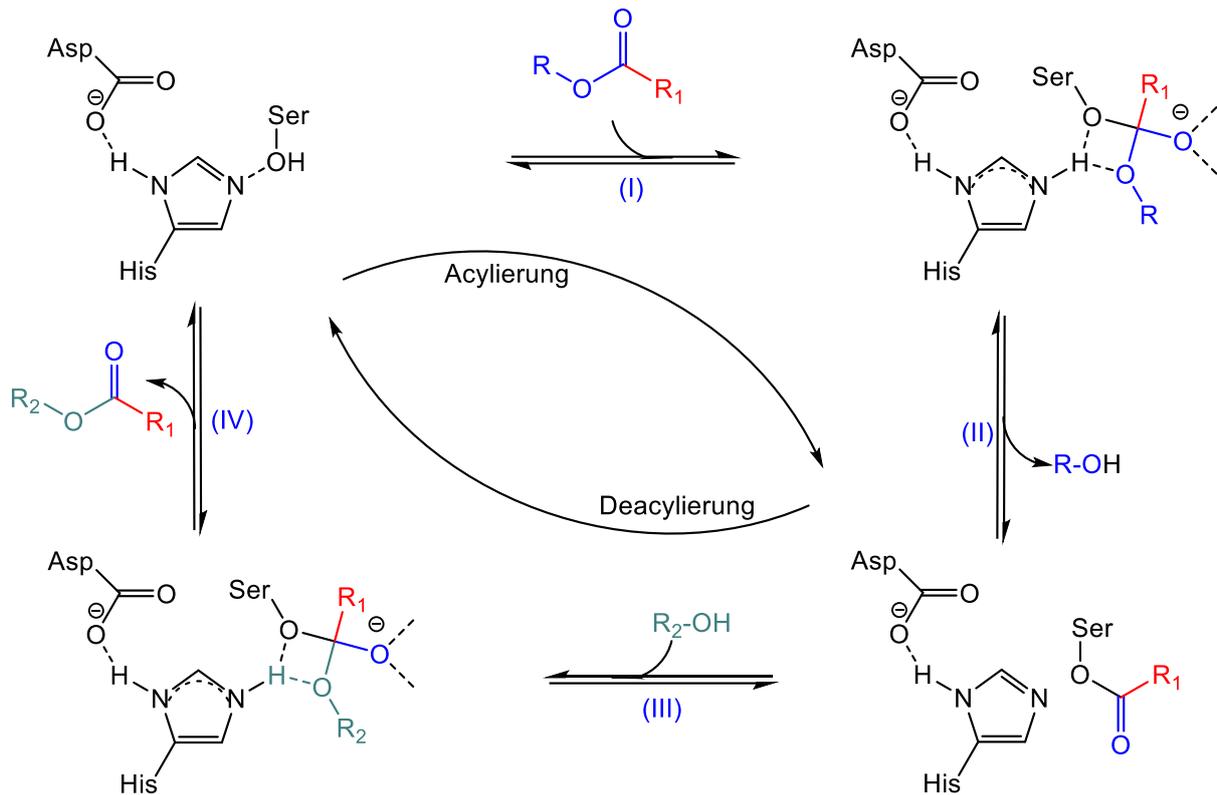


Abbildung 6: Katalytischer Mechanismus von Lipasen. I) Es erfolgt eine Bindung von Fettsäure oder Ester an die katalytische Triade im aktiven Zentrum. Im Anschluss erfolgt die Bildung eines tetraedischen Übergangszustandes mit stabilisiertem Oxyanion-Loch. II) Im zweiten Schritt erfolgt die Abspaltung des Alkohols und eine Bindung des Fettsäurerestes an Serin. III) Im dritten Schritt erfolgt ein nucleophiler Angriff des Alkohols an die Carboxylgruppe mit anschließender Bildung eines tetraedischen Übergangszustands mit stabilisiertem Oxyanion-Loch wie in (I). IV) Im vierten Schritt erfolgen die Bildung und Freigabe des Esters. Der Grundzustand wird wiederhergestellt.

Da Lipasen selbst zwar in Wasser löslich sind, ihre Substrate aber in den meisten Fällen nicht, arbeiten diese Enzyme an der Grenzfläche zwischen hydrophilen und lipophilen Phasen. Ein charakteristisches Merkmal bei biokatalytischen Reaktionen ist das oft beobachtete Phänomen einer Grenzflächenaktivierung in Emulsionen und bei Überschreiten der kritischen Mizellkonzentration eines Reaktionspartners [146]. Ursache für dieses Verhalten ist die amphiphile Struktur des „Deckels“, welcher eine hydrophile und eine lipophile Seite aufweist. Bei geschlossenem Deckel wird das aktive Zentrum verdeckt, und die hydrophile Seite ist nach außen gerichtet (Abbildung 7) [147]. Dadurch wird eine Substratbindung verhindert. Bei Kontakt mit mizellaren Substrat ändert der Deckel seine Konformation, sodass die lipophile Seite nach außen zeigt und das aktive Zentrum für Substrate zugänglich wird [134,148,149].

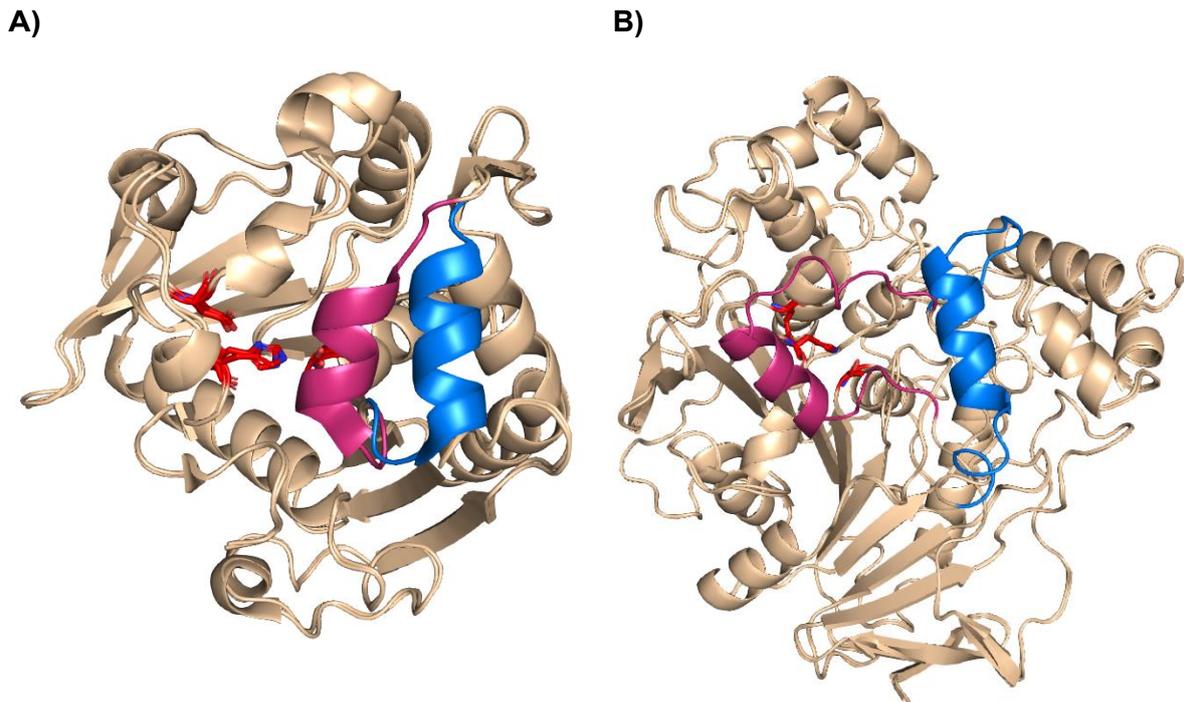


Abbildung 7: (A) Offene (PDB: 4TGL) und geschlossene Konformation (PDB: 3TGL) der Lipase aus *Rhizomucor miehei* [142,149]. Der Deckel erstreckt sich über die Aminosäuren 82 – 94. Die katalytische Triade wird gebildet aus den Aminosäuren Ser144, Asp203 und His257. B) Offene (PDB: 1CRL) und geschlossene Konformation (PDB: 1TRH) der Lipase aus *Candida rugosa* [150,151]. Der Deckel wird von den Aminosäuren 66-89 gebildet. Die katalytische Triade besteht aus den Aminosäuren Ser209, Glu341 und His449. Bei (A) und (B) wurde der geschlossene Deckel magenta, der offene Deckel dagegen blau und die katalytische Triade rot markiert.

Lipasen sind durch ihre Esterase- und Hydrolase-Aktivität vielseitig einsetzbar. Darüber hinaus sind Lipasen aufgrund der Möglichkeit zur einfachen Massenproduktion und einer hohen Stabilität gegenüber Temperaturen und Lösungsmitteln, gefragte Katalysatoren für verschiedene Anwendungen etwa in der Waschmittel-, Leder-, Textil-, Kosmetik und Papierindustrie [152-155]. Durch ihre Esteraseaktivität werden Lipasen seit einiger Zeit in der Produktion von Biodiesel genutzt [156-158]. Darüber hinaus finden Lipasen in der Lebensmittel-, in der Pharmaindustrie und bei der Produktion von Feinchemikalien, in der Agrochemie, im Bereich der Biosensoren und in der Bioremediation Anwendung [159-163]. Neben der großen Anwendungsbreite in der Lebensmittel- und Konsumgüterindustrie finden Lipasen auch Eingang in der organischen Synthese etwa bei der Herstellung von Detergenzien oder von chiralen Hydroxyestern. Die Produktion von sekundären Aminen erfolgt als eine nicht natürliche Nebenreaktion der Lipase über eine Michael Addition [164-166].

Tabelle 1: Beispiele für Anwendungsgebiete der in dieser Arbeit untersuchten Lipasen.

Lipase	Beispiele für durchgeführte Synthesen
Amano <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Umesterung von p-hydro-benzoesäure-estern [167]
Amano A <i>Aspergillus niger</i>	Synthese von Naphtophyran Derivaten [168]
Amano AY 30 <i>Candida rugosa</i>	Synthese von Sitagliptin [169]
Amano F-AP 15 <i>Rhizopus oryzae</i>	Synthese von Benzoin und Biodiesel [170, 171]
Amano G <i>Penicillium camemberti</i>	Biodiesel Produktion [172]
Amano M <i>Mucor javanicus</i>	Synthese von Schmierstoffen [173], Michael Addition von Pyrimidin und Disaccharidacrylaten [174]
Amano PS <i>Burkholderia cepacia</i>	Synthese von acetylierten acyclischen Pyrimidin Nucleosiden [175]
CCL <i>Candida rugosa</i>	Synthese von Lactat Estern [176]
Novozymes CalB L <i>Candida antarctica</i>	Synthese von Lactonen, Organosilikone, Acrylaten, Oleamiden, Omega-3-Fettsäuren, Vitamin-C-Estern und weitere [177]
Novozymes Eversa Transform 2.0 <i>Aspergillus oryzae</i>	Produktion von Ethyl- Methyl-Estern und Biodiesel [178]
Novozymes Lipolase 100 L <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Synthese von Pregabalin [177]
Palatase 20000 L <i>Rhizomucor miehei</i>	Produktion von Fettreduzierter Milch, Produktion von Duftstoffen in Käse [178, 179]

1.2.3 Katalase

Katalasen (1.11.1.6) sind Oxidoreduktasen, die mit Hilfe von Metallionen (vornehmlich Häm gebundenes Eisen) die Umsetzung von zwei Molekülen Wasserstoffperoxid in einer zwei-Schritt Reaktion zu Sauerstoff und zwei Molekülen Wasser katalysieren (Gesamtreaktion) [180-182].



Wasserstoffperoxid fällt als Nebenprodukt beim Abbau von Hyperoxiden durch Enzyme wie Superoxid Dismutase sowie beim Abbau von Purinen und bei der Oxidation von Fettsäuren an und ist durch sein oxidatives Potential im hohen Maße schädigend für Genom und Proteine [183-185]. Katalasen entfernen das Wasserstoffperoxid aus dem Stoffwechsel und sind somit essenziell für das Überleben von aeroben Organismen, wobei die Katalase-Aktivität bei

Säugetieren in der Leber und den Erythrozyten am höchsten ist [185] In anaerob lebenden Bakterien dagegen werden keine Katalasen exprimiert. Als wichtigste H_2O_2 -Fänger spielen Katalasen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress und der Aufrechterhaltung der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration in Bakterien [186,187]. Es ist üblich, dass mehrere Katalasen in einem Bakterium kodiert werden, die zu verschiedenen Wachstumsphasen exprimiert werden und unterschiedlich bei oxidativem Stress reagieren [188-193].

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens und der katalytischen Eigenschaften (hohe Wechselzahl, breiter pH-Wert Bereich), findet Katalase in vielen Bereichen wie der Nahrungsmittel-, Textil-, Papier- und Pharmaindustrie Anwendung. Daneben werden Katalasen auf dem Feld der Bioremediation sowie als Konservierungsmittel, im Bleichprozess und bei der Prozesswasseraufbereitung eingesetzt [194-201].

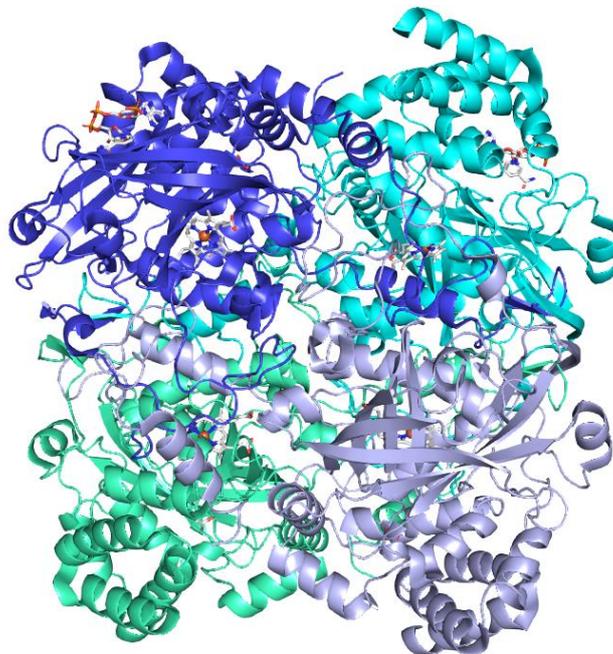


Abbildung 8: Struktur der humanen Erythrocyten-Katalase. Die Katalase ist ein Homotetramer, welches die vier Häm-Gruppen mit jeweils einem Eisen-Zentralion als prosthetische Gruppe enthält. Das molekulare Masse dieser Katalase beträgt ca. 231 kDa, wobei eine Untereinheit ein Gewicht von ca. 58 kDa aufweist. PDB: 1DGF [202].

1.3 Der Oxylipin-Stoffwechsel und Anwendungspotentiale von Lipoxygenasen

1.3.1 Der Oxylipin-Stoffwechsel

Lipoxygenase und die von ihr synthetisierten Hydroperoxide nehmen eine zentrale Stelle im Oxylipin-Stoffwechsel ein. Im Verlauf mehrerer enzymatischen Umsetzungen werden die gebildeten Hydroperoxide durch Enzyme des Lipoxygenase-Wegs in bioaktive Mediatoren wie Ketonen, Aldehyden, Alkoholen und Jasmonaten umgesetzt [129]. Jasmonate wirken an der Regulation lebenswichtiger Prozesse wie der Wundheilung und Verteidigungsprozessen in Pflanzen mit und sind aufgrund ihrer hohen biologischen Aktivität von besonderer Wichtigkeit [203,204]. Bislang wurden vier wichtige Stoffwechselwege für die Umwandlung von Fettsäure-Hydroperoxiden beschrieben (Abbildung 9) [205,206]:

1. Peroxygenase-Weg (POX): Synthese von in Epoxy- oder Dihydrodiol-Polyenfettsäuren durch intramolekularen Sauerstofftransfer aus Fettsäure-Hydroperoxiden [207, 208].
2. Allenoxid-Synthase-Weg: Synthese von instabilen Alkenoxiden und Umwandlung durch nicht-enzymatische Hydrolyse zu β - und γ -Ketole [209] oder durch eine Allenoxid Cyclase (AOC) zu chiraler (9S,13S)-12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) [210].
3. Die Hydroperoxid-Lyase (HPL), katalysiert die oxidative Spaltung von Fettsäure-Hydroperoxiden über eine homolytische Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung und anschließender Bildung eines intermediären Epoxids [211]. Dies führt zur Bildung von kurzkettigen Aldehyden (C9- oder C6-Ketten), die als Aromastoffe mit grüner Note in der Parfümindustrie Anwendung finden und den entsprechenden C9- oder C12-Fettsäuren [212].
4. Durch Umsetzung der HPODE mit einer Divinylether-Synthase werden Divinylether wie Colnelensäure (CnA) oder Col-Neleinsäure gebildet [203].

Neben den hier vorgestellten vier Hauptstoffwechselwegen gibt es weitere Reaktionen, die dem Hydroperoxid-Stoffwechsel hinzugerechnet werden. Zum einen die LOX-katalysierte Hydroperoxidase-Reaktion (ketodienbildender Weg). Bei dieser Reaktion ist die LOX unter bestimmten Bedingungen (z. B. niedriger Sauerstoffdruck), in der Lage, die homolytische Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung zu katalysieren. Dabei werden Alkoxyradikale gebildet, die wiederum in der Lage sind, sich zu Ketodienen umzulagern [213]. Die Epoxyalkohol-Synthase (EAS) katalysiert die intramolekulare Umlagerung der Hydroperoxy-Fettsäuren zu Epoxy-Hydroxy-Fettsäuren [214]. Den auf diesem Weg produzierten Oxylipine werden Funktionen in der Pathogenabwehr bei Nachtschattengewächsen zugerechnet [215]. Die Produkte der POX und der EAS können regiochemisch identisch sein, unterscheiden sich jedoch in ihrer Stereochemie. Die Bildung von Hydroxy-Fettsäuren wird durch Einsatz einer

Reduktase erreicht. Bei diesem Reduktionsweg werden Hydroperoxide zu entsprechenden Hydroxy-Fettsäuren reduziert [101].

Die Oxidation von Linolsäure ist der erste Schritt einer weit verzweigten Enzymkaskade, an deren Ende die Bildung von Oxylipinen wie 12-OPDA und Jasmonsäure steht [216]. Diese Oxylipine sind an der Entwicklung von Pflanzenreaktionen gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren sowie an der Regulierung der Apoptose und Alterung beteiligt [203]. Jasmonsäure und Methyl-Jasmonsäure gehören zu den am besten untersuchten Oxylipinen des LOX-Signalsystems. Sie stimulieren die Produktion von Proteinase-Inhibitoren und sind an der Freisetzung und Akkumulation von Alkaloiden, was zu einer selektiven Hemmung der Polypeptidsynthese führt, beteiligt [203,217]. Durch die Bildung aktiver Sauerstoffspezies und Induzierung der Synthese einiger Abwehrstoffe, die mit der Pathogenese verbunden sind, stimuliert Jasmonsäure die Resistenz gegen Pflanzenkrankheiten [218].

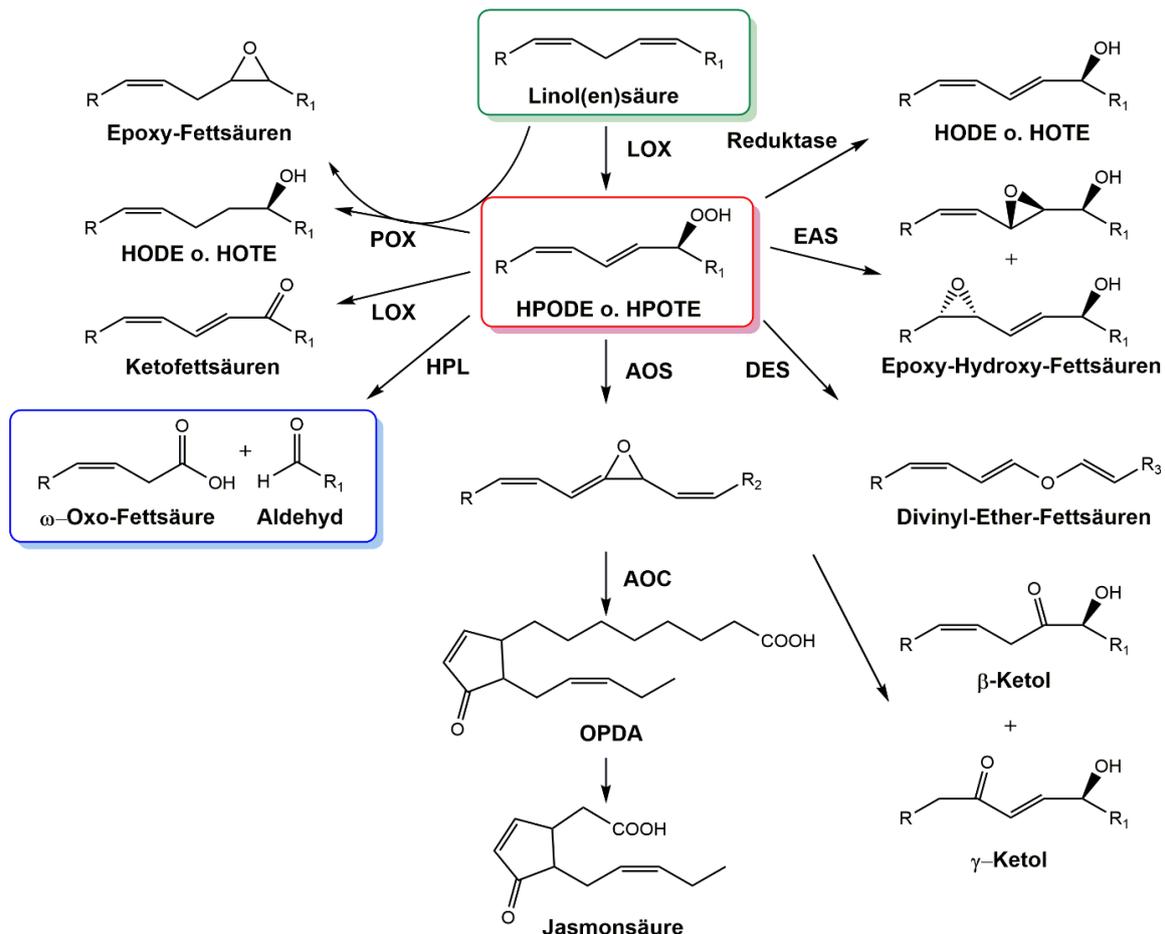


Abbildung 9: Übersicht des Oxylin-Stoffwechsels ausgehend von Linolsäure oder Linolensäure. (grün). Das Zielprodukt dieser Arbeit ist mit HPODE rot markiert und das Endprodukt des Projekts blau markiert. LOX: Lipoxygenase, POX: Peroxygenase, HODE: Hydroxyoctadecadiensäure, HOTE: Hydroxyoctadecatriensäure EAS: Epoxyalkohol Synthase, DES: Divinylether Synthase, HPL: Hydroperoxid Lyase, AOS: Allenoxid Synthase, AOC: Allenoxid Cyclase, OPDA: 12-OPDA.

1.3.2 Anwendung von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen katalysieren die Hydroperoxidierung von ungesättigten Fettsäuren wie Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure in Pflanzen und Tieren. 13-Linolsäurehydroperoxid nimmt dabei als vielseitiges Intermediat eine besonders prominente Stellung ein. Durch seine Hydroperoxy-Gruppe ist es hochreaktiv und bietet sich als Ausgangsstoff für verschiedenste Anwendungen an, um biogene Rohstoffe wie pflanzliche Öle in hochpreisige Produkte umzuwandeln [219]. Bei der Vernetzung von Trockenölen in Lacken spielen Fettsäure-Hydroperoxide wie 13-HPODE eine wichtige Rolle als Zwischenprodukte bei der oxidativen Polymerisierung von Fettsäuren [220,221]. Daneben sind Hydroperoxide Intermediate für die Herstellung zahlreicher Verbindungen wie Epoxide, Alkohole, Carbonyle sowie Diazide [222,223]. Zu den Anwendungen von 13-HPODE gehören die Synthese von sauerstoffhaltigen Lipidderivaten, das Bleichen von Farbstoffen oder die Verwendung als Backhilfsmittel [224-226].

Die wichtigste biokatalytische Anwendung von LOX aber ist die Herstellung von natürlichen Aromastoffen mit grüner Note für die Geschmack- und Duftstoffindustrie durch eine Reaktionskaskade in Kombination mit Hydroperoxid-Lyase zur Spaltung der Hydroperoxide [3,8,227]. Diese Hock-Umlagerung kann auch chemisch katalysiert werden und führt zu C12- ω -Oxosäuren und den entsprechenden flüchtigen C6-Aldehyden [228,229]. Die ω -Oxosäuren sind als mögliche bifunktionelle Monomervorstufen für die grüne Polymersynthese eine interessante Produktklasse [230]. In einem weiteren Ansatz als Teil einer enzymatischen Kaskade könnte Lipoxygenase bei der Produktion von Pflanzenmetaboliten wie 12-Oxophytodiensäure (12-OPDA) Anwendung finden [231]. Um das Anwendungsspektrum von LOX in der Industrie auch auf Polymeranwendungen zu erweitern, ist eine optimierte und preiswerte Herstellung der Hydroperoxide aus linolsäurereichen Ölen nötig. Pflanzliche LOX sind in verschiedenen Gemüse- und Obstsorten enthalten, insbesondere Sojabohnen besitzen eine hohe Konzentration verschiedener LOX-Isozyme. Dadurch sind Sojabohnen die kosteneffektivsten natürlichen Quelle für eine Isolierung und Anwendung der LOX als Biokatalysator [232]. In früheren Arbeiten wurde 13-S-spezifische LOX-1 aus Sojabohnen-Extrakt erfolgreich für die Synthese von 13-S-Hydroperoxiden in Ausbeuten bis zu 72 % aus Linolsäure (13-HPODE) [233,234] oder Linolensäure (13-HPOTE) eingesetzt [235,236]. Nachteilig bei der Verwendung von Sojabohnenextrakten ist die Anwesenheit mehrerer LOX-Isozyme mit entweder spezifischen 9S-, 13S- oder gemischten 9/13-Regioselektivitäten [237]. Da eine Trennung der LOX-Isozyme vor der Reaktion langwierig ist, werden die unterschiedlichen pH-Optima der Isozyme für eine Steuerung der Regioselektivität ausgenutzt. Es werden bevorzugt alkalische pH-Bedingungen in den Synthesen verwendet, um die LOX-1 gegenüber den anderen Isozymen zu begünstigen. Neben der Regioselektivität stellt auch die Löslichkeit der Fettsäuren ein Problem für eine

ertragreiche Herstellung von Hydroperoxiden mit LOX-1 aus Sojabohnen dar. Starkes Schäumen durch Hinzufügen von molekularem Sauerstoff unter alkalischen Bedingungen ist eine weitere zu überwindende Hürde, mit der in diesem Prozess umgegangen werden muss. Neben Lösungsmittel-Puffer-Systemen wurden auch Lösungsmittel-Tensid-Mikroemulsionen untersucht, um Löslichkeitsprobleme der Fettsäure zu überwinden, wobei jedoch die Nachhaltigkeit dieser Prozesse durch Zugabe organischer Lösungsmittel und Tensiden petrochemischen Ursprungs abnimmt und die Aufarbeitung der Produkte umfangreicher wird [233,236–239]. In früheren Versuchen wurde auch die Kombination von Lipasen und LOX zur kombinierten Ölhydrolyse und anschließender Hydroperoxidierung der freigesetzten Fettsäuren in einer Reaktionskaskade untersucht [240,241]. Allerdings war für eine ausreichende Fettsäurefreisetzung durch die Lipase Lösungsmittel-Puffer-Gemische erforderlich, wobei die Substratkonzentrationen zu niedrig waren, um ein technisches Verfahren zu ermöglichen. Kürzlich wurde ein selbstorganisiertes System aus immobilisierter Lipase und LOX vorgestellt, welches in der Lage war, Sojabohnenöl in Hydroperoxide umzuwandeln [242]. Während die HPODE-Ausbeute höher war als in früheren Arbeiten berichtet, waren die Substratkonzentrationen für eine technische Anwendung auch weiterhin zu niedrig.

2 Material & Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Geräte

LOX-1 und Katalase von *Micrococcus lysodeikticus* und Lipasen wurden von Sigma Aldrich erhalten. Sojabohnen wurden von Wildacker GmbH bezogen und Lösungsmittel wurden von Carl Roth (Ethanol, THF) und Fisher Scientific (Ethylacetat) erhalten. Andere Chemikalien wurden von VWR und Sigma Aldrich erworben. Referenzstandards von 13-Hydroxy-9(Z),11(E)-Octadecadiensäure, 9(R)-Hydroxy-10(E),12(Z)-Octadecadiensäure, 13-Hydroperoxy-9(Z),11(E)-Octadecadiensäure und 9-Hydroperoxy-10(E),12(Z)-Octadecadiensäure wurden von Larodan bezogen. Mono- und Dilinolein-Referenzstandards wurden von Sigma Aldrich bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle.

Chemikaliename	Bezugsquelle
1 % BSTFA in TMCS	Carl-Roth
1 % Phenolphthalein in Ethanol	Carl-Roth
1-Butanol	Carl-Roth
1-Octanol	Carl-Roth
Aceton	Fisher-Scientific
Acetonitril	Fisher-Scientific
Aluminiumchlorid	Carl-Roth
Ameisensäure	Carl-Roth
Borsäure	Carl-Roth
Bortrichlorid in Methanol (12 % w/w)	Carl-Roth
Calciumchlorid	Carl-Roth
Chloroform	Carl-Roth
Diethylether	Fisher-Scientific
Diisopropylether	Carl-Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl-Roth
Dimethylsulfoxid	Carl-Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Distelöl	Gefro GmbH

Ethanol (96 %)	Carl-Roth
Ethylacetat	Fisher-Scientific
Ethylendiamin	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
Glycerol	Carl-Roth
Gummi Arabicum	Sigma-Aldrich
Harnstoff	Carl-Roth
Heptan	Carl-Roth
Hexandiamin	Carl-Roth
Isopropanol	Carl-Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl-Roth
Kaliumhydroxid	Carl-Roth
Kaliumiodid	Carl-Roth
Kupfersulfat-Pentahydrat	Carl-Roth
Methanol	Carl-Roth
Methyl-tert-butylether	Fisher-scientific
Natriumalginat	Sigma-Aldrich
Natriumborhydrid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Carl-Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Carl-Roth
Natrium-Kalium-Tartrat	Carl-Roth
Octadecylamin	Sigma-Aldrich
P-Nitrophenyldodecanoat	Sigma-Aldrich
Polyethylenglycol 400	Sigma-Aldrich
Salpetersäure (65 %)	Carl-Roth
Salzsäure (37 %)	Carl-Roth
Schwefelsäure	Carl-Roth
Sojabohne	Wildacker GmbH
Tetrahydrofuran	Carl-Roth

Tetramethylorthosilikat	Sigma-Aldrich
Thionylchlorid	Sigma-Aldrich
Trimethoxymethylsilan	Sigma-Aldrich
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	Carl-Roth
Wasserstoffperoxid	Fisher-Scientific
Zirkoniumchlorid	Sigma-Aldrich

Tabelle 3: Verwendete Referenzsubstanzen.

Referenzsubstanz	Bezugsquelle
13-Hydroperoxy-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-Octadecadiensäure	Larodan
13-Hydroxy-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-Octadecadiensäure	Larodan
9(<i>R</i>)-Hydroxy-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-Octadecadiensäure	Larodan
9-Hydroperoxy-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-Octadecadiensäure	Larodan
Dilinolein	Sigma-Aldrich
Hexanal	Sigma-Aldrich
Laurinsäure	Carl-Roth
Linolensäure	Sigma-Aldrich
Linolsäure	Sigma-Aldrich
Monolinolein	Sigma-Aldrich
Ölsäure	Dakolub
Palmitinsäure	Carl-Roth
Pelargonsäure	Carl-Roth
Stearinsäure	Sigma-Aldrich

Tabelle 4: Verwendete Tenside.

Referenzsubstanz	Bezugsquelle
Brij 93	Sigma-Aldrich
Brij O10	Sigma-Aldrich
Ecosurf EH-9	Sigma-Aldrich
Ecosurf SA-9	Sigma-Aldrich
Sophorolipid18:2	Hergestellt Christian Zerhusen
Span 80	Sigma-Aldrich
Tergitol 15-S-20	Sigma-Aldrich
Tergitol 15-S-3	Sigma-Aldrich
Tergitol 15-S-40	Sigma-Aldrich
Tergitol 15-S-9	Sigma-Aldrich
Tergitol NP 10	Sigma-Aldrich
Tergitol NP 9	Sigma-Aldrich
Triton CG-110	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Tween 80	Sigma-Aldrich

Alle Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, in Glasgefäßen mit doppelt deionisiertem Reinstwasser (ddH₂O) angesetzt, wobei der pH-Wert entweder mit 4 M Natronlauge oder 5 M HCl Lösung eingestellt wurde.

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer	Substanz	Menge/Volumen
50 mM Borat-Puffer pH 8,5 – 10	Borsäure	3,09 g
	ddH ₂ O	Auf 1 l auffüllen
200 mM Borat-Puffer pH 8,5 – 10	Borsäure	12,36 g
	ddH ₂ O	Auf 1 l auffüllen
50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 – 8,5	Tris	6,06 g
	ddH ₂ O	Auf 1 l auffüllen

200 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 – 8,5	Tris	24,23 g
	ddH ₂ O	Auf 1 l auffüllen
50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5 – 7,5	50 mM Kaliumdihydrogenphosphat	50 mM Dikaliumhydrogenphosphat
1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7	1 M Kaliumdihydrogenphosphat	1 M Dikaliumhydrogenphosphat
50 ml Biuret-Lösung	Kupfersulfat-Pentahydrat	0,15 g
	Natrium-Kalium-Tartrat	0,45 g
	Kaliumiodid	0,25 g
	Natronlauge (0,2 M)	auf 50 ml auffüllen

Tabelle 6: Verwendete Enzyme und Enzympräparationen. Alle Enzyme wurden von Sigma Aldrich bezogen.

Name	Enzym	Organismus
Amano	Lipase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Amano A	Lipase	<i>Aspergillus niger</i>
Amano AY 30 (Type VII)	Lipase	<i>Candida rugosa</i>
Amano F-AP 15	Lipase	<i>Rhizopus oryzae</i>
Amano G	Lipase	<i>Penicillium camemberti</i>
Amano M	Lipase	<i>Muco javanicus</i>
Amano PS	Lipase	<i>Burkholderia cepacia</i>
CCL	Lipase	<i>Candida rugosa</i>
Novozymes CalB L	Lipase	<i>Candida antarctica</i>
Novozymes Eversa Transform 2.0	Lipase	<i>Aspergillus oryzae</i>
Novozymes Lipolase 100 L	Lipase	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
Palatase 20000 L	Lipase	<i>Rhizomucor miehie</i>
Katalase	Katalase	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>
LOX-1	Lipoxygenase	Sojabohne <i>Glycine Max</i>

Tabelle 7: Verwendete Trägermaterialien mit Bezugsquelle.

Name	Bezugsquelle
Accurel MP 1000	BASF
Calciumalginat	Sigma Aldrich
Immobead 150 A	Chiral Vision
Immobead 150 P	Chiral Vision
Lewatit VP OC 1600	Lanxess
Mehrwandige Kohlenstoff-Nanoröhren 50 – 95 nm ø	Sigma Aldrich

Tabelle 8: Verwendete Laborgeräte mit Angabe des Herstellers.

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Kern ABJ	Kern & Sohn GmbH
Dispergiergerät POLYTRON PT 2500 E	Kinematica AG
ERAcc-WAX-MS, 30 m, Filmdicke 0,25 µm, Innendurchmesser 0,25 mm	Isera
GC-2010 Gaschromatograph	Shimadzu
Heizrührer MR Hei-Standard	Heidolph
Hitachi LaChrom II, 250 mm x 4,6 mm Durchmesser, Reverse Phase C18	Hitachi High-Technologies Corporation
Karl-Fischer Titrator 870 KF Titrino plus	Metrohm
Laborwaage	VWR International
Magnetrührer IKA Combimag RCH	Janke & Kunkel GmbH
Magnetrührer Mix 15	2mag AG
Mikro 120 Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
Minichiller 600	Huber
MTX Biodiesel TG, 14 m, Filmdicke 0,16 µm, Innendurchmesser 0,53 mm	Restek GmbH
Multitron Standard	Infors HT
Nexera LC-20AD XR, Liquid Chromatograph	Shimadzu
Orbitalschüttler Trayster digital	IKA
pH/ORP Meter	Hanna Instruments
Pipetten	VWR International
Pumpstand PC 3001	Vacuubrand
Rotina 420R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
RW 20 DZM KPG Rührer	IKA

Sonopuls HD 2200 Homogenisator	Bandelin
SpectraMax 190 Microplate Reader	Molecular Devices
Titratortitrolin 7000	SI Analytics
UV-1600PC Spectrophotometer	VWR International
UV-3100PC Spectrophotometer	VWR International
Zetasizer Nano ZS	Malven

2.2 Präparative Methoden

2.2.1 Isolierung und Anreicherung von Linolsäure aus Distelöl

Die alkalische Hydrolyse von Distelöl erfolgte in einem 2,5 l Rundkolben mit angeschlossener Rückflusskühler. Es wurden 0,5 kg Distelöl, 125 g Kaliumhydroxid sowie 0,5 l Ethanol und 0,5 l Wasser eingewogen und die Reaktion bei 105 °C über 90 min durchgeführt (angelehnt an Wu et al. 2008). Nach Abkühlung auf Raumtemperatur über Nacht wurde das Reaktionsgemisch mithilfe rauchender Salzsäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt. Im Verlauf der Erniedrigung des pH-Wertes konnte die Ausbildung eines Zweiphasen-Systems beobachtet werden. Die Phasen wurden in einem 6 l Scheidetrichter separiert und die obere, gelblich/orange Ölphase dreifach mit 1 l VE-Wasser gewaschen und das restliche Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt ($p = 40 \text{ mbar}$, $T = 50 \text{ °C}$).

Die Anreicherung der ungesättigten Fettsäuren wurde in Anlehnung an Hayes et al. 1998 und Wu et al. 2008 durchgeführt. Zur Anreicherung von Linolsäure wurde die gesamte Fettsäuremischung (480 g) mit 480 g Harnstoff und 2,5 l Ethanol in einem 5 l Behälter versetzt und zur vollständigen Auflösung des Harnstoffes das Gemisch bei 70 °C für ca. 60 min gerührt. Die gelbliche Lösung wurde daraufhin bei 8 °C über Nacht kristallisiert. Der Niederschlag wurde mit Hilfe eines Büchner-Trichters und einer Saugflasche unter Vakuum vom Filtrat getrennt. Im Filtrat befand sich die Linolsäure, während im Niederschlag die Ölsäure im Harnstoff eingeschlossen vorlag. Das Filtrat wurde mit 2,5 l Wasser versetzt und mit 37 % Salzsäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt. Die beiden entstandenen Phasen wurden mithilfe eines Scheidetrichters getrennt und die Linolsäure mit 1 l VE-Wasser dreifach gewaschen bevor auch hier das restliche Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer bei 50 °C und 80 mbar entfernt wurde, Im Anschluss wurde die Linolsäure filtriert und die Reinheit über GC analysiert.

2.2.2 Herstellung einer Lipxygenasezubereitung aus Sojamehl

LOX wurde durch Einfrieren von Sojabohnen in flüssigem Stickstoff und Mahlen mit einer Bohnenmühle von Jupyter gewonnen. Die gemahlene Bohnen wurden dann 30 Minuten lang in 3 Volumina Aceton extrahiert. Die Extraktion wurde dreimal durchgeführt, bevor restliches

Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer im Vakuum bei Raumtemperatur entfernt wurde. Zur Extraktion von LOX aus Sojamehl wurde eine 10 %ige (w/v) Suspension von entfettetem Mehl in entsprechenden Puffer hergestellt. Das Präparat wurde 30 min mit einem Orbitalschüttler gemischt, über Filterwatte filtriert und die Aktivität photometrisch bestimmt (Abschnitt 2.4.2).

2.2.3 Funktionalisierung von Kohlenstoff-Nanoröhrchen und Immobead P

Bevor eine Funktionalisierung der Kohlenstoffnanoröhren (MWNT, *multi walled nano tubes*) erfolgen konnte, war eine vorherige Oxidation des Graphengerüsts nötig. Dazu wurden 0,1 g MWNTs in 16 ml Nitriersäure (3:1 (v/v) Schwefelsäure:Salpetersäure) in einem 250 ml Kolben mit angeschlossenem Rückflusskühler suspendiert und das Reaktionsgemisch unter konstantem Rühren für 30 min bei 120 °C zum Rückfluss erhitzt. Nach Runterkühlen der Mischung auf RT, wurden die oxidierten MWNTs über eine Nutsche mit einer PTFE-Membran von der Säure getrennt und die MWNTs mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat einen neutralen pH anzeigte. Im Anschluss wurden die oxidierten MWNTs über Nacht im Trockenschrank getrocknet und gewogen.

Nach der primären Funktionalisierung der MWNTs mit Carboxygruppen, wurden diese durch Umsetzung mit Thionylchlorid in die entsprechenden Säurechloride überführt. Dazu wurden 0,15 g der oxidierten MWNTs in 30 ml Thionylchlorid suspendiert und der Ansatz vorsichtig auf 65 °C erhitzt. Die Chlorierung erfolgte über 24 Stunden bei 65 °C bevor die chlorid-funktionalisierten MWNTs über einer PTFE Membran mit THF gewaschen und über Nacht bei RT getrocknet wurden. In einem letzten Funktionalisierungs-Schritt wurden die Acylchloride dann in 50 ml Polyethylenglycol-Lösung (400g/mol) bei 120 °C für 48 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Zum Schluss wurden die Hydroxy-funktionalisierten MWNTs mit THF über einer PTFE-Membran gewaschen und für 48 Stunden bei RT getrocknet.

Die Alkyl-Funktionalisierung der oxidierten MWNTs erfolgte durch Suspension von 0,1 g ox. MWNTs in 10 ml Octadecylamin und Erhitzen der Reaktionsmischung auf 100 °C für 4 Tage (96 Stunden). Im Anschluss wurden die funktionalisierten MWNTs über eine PTFE-Membran abgenutscht und mit 96 % Ethanol gewaschen, um restliches Octadecylamin zu entfernen. Die gewaschenen Alkyl-MWNTs wurden danach über Nacht bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet und gewogen.

Die Funktionalisierung mit Amingruppen erfolgte durch Suspension von 2 g oxidierten MWNTs in einem 50 ml Falcontube zusammen mit 45 ml Ethylendiamin und 12 mg HATU. Das Falcontube wurde fest verschlossen und mit Parafilm versiegelt und 4 Stunden lang bei 25 °C und 220 U/min in einem Schüttler inkubiert. Das entstandene Produkt wurde in 300 ml 96 %igem Ethanol suspendiert, mit einer PTFE-Membran abfiltriert und erneut mit 96 %igem

Ethanol gewaschen. Schließlich wurden die aminierten MWNTs über Nacht im Abzug bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Die Aktivierung der Amin-MWNTs erfolgte durch Suspendieren des Trägers in 290 ml 200 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 in einem 500 ml Becherglas. Die Suspension wurde unter ständigem Rühren mit einem Dispergiergerät homogenisiert. Der Suspension wurden 73 ml einer 50 %igen Glutaraldehydlösung (entspricht 1M Glutaraldehyd) zugesetzt, um eine Volumenkonzentration von 5 mg/ml zu erreichen. Die Suspension wurde 1 Stunde lang bei RT weitergerührt, um eine gleichmäßige Verteilung und Aktivierung zu erreichen. Anschließend wurde die Suspension 20 min lang bei 7000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Der Rückstand wurde auf einer Nutsche mit PTFE-Membran gründlich mit reichlich Wasser und anschließend mit 200 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 gewaschen. Die aktivierten Oxo-MWNTs wurden über Nacht an der Luft getrocknet.

Die Amin-Funktionalisierung von Immobead 150 P erfolgte in einem Becherglas mit 2 g Immobead P Trockengewicht (2,06 g Feuchtgewicht) und 10 ml einer 5 %igen (v/v) Ethylendiamin-Lösung (EDA-Lösung) für 4 Stunden bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die EDA-Lösung vom Träger über einen Faltenfilter getrennt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Zum Schluss wurde das Feuchtgewicht des Trägers bestimmt.

Die Aktivierung von Amin-funktionalisierten Immobead P, erfolgte durch Verlinkung mit Glutaraldehyd. Dazu wurden die aktivierten Träger in 50 %ige (w/w) Glutaraldehyd und Wasser mit einer Endkonzentration von 1 M suspendiert und für 30 min bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion erfolgte die Abtrennung des aktivierten Trägers durch Filtration über einen Faltenfilter und mehrmaligem Auswaschen des restlichen Glutaraldehyds mit Wasser. Im Anschluss wurde der feuchte Träger gewogen.

2.2.4 Alginat-Einschluss von LOX-1 und Katalase

Zur Untersuchung weiterer Immobilisierungsmethoden wurde LOX durch Einschluss in ein Alginat-Tetramethylorthosilicat (TMOS)-Copolymer und ein Alginat-Trimethoxymethylsilan-Copolymer immobilisiert. Hierzu wurden zunächst 2 ml Natrium-Alginat-Lösung 4 % (w/v) mit der gleichen Menge einer 5 mg/ml Enzymlösung versetzt. Das Gemisch wurde in eine eiskalte Calciumchlorid-Lösung (0,2 M) getropft und anschließend filtriert. Die festen Calcium-Alginat-Tropfen wurden anschließend in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit Hexan bedeckt (15 ml). Um die Polymerisation zu starten, wurden 4 ml TMOS bzw. Trimethoxymethylsilan (TMMS) hinzugegeben und das Gemisch über Nacht auf einem Magnetrührer bei RT und 250 rpm inkubiert. Das Immobilisat wurde anschließend mit Wasser über Filterwatte gewaschen und zur Wiederherstellung der Aktivität der Enzyme unmittelbar für 6 Stunden in 50 mM Borat-Puffer pH 9 inkubiert, da Trocknungsprozesse zu

Aktivitätsverlusten führten. Das Immobilisat wurde anschließend filtriert und feucht im Kühlschrank gelagert. Ebenfalls wurden je Enzym zwei weitere Einschluss-Immobilisierungen im Alginat-TMOS-Copolymer durchgeführt, bei der eine 1,25 bzw. 2,5 mg/ml Enzymlösung verwendet wurden.

Die Immobilisierung von Katalase über Einschluss in Alginatkugeln erfolgte weitgehend analog wie in 2.2.4 beschrieben. Es wurde 2 ml Natrium-Alginat-Lösung 4 % (w/v) mit einer äquivalenten Menge einer 1,25, 2,5 oder 5 mg/ml Enzymlösung versetzt. Das Gemisch wurde in eine eiskalte Calciumchlorid-Lösung (0,2 M) getropft und anschließend filtriert. Die festen Calcium-Alginat-Tropfen wurden anschließend in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und durch vorsichtiges Hinzugeben mit Hexan bedeckt (15 ml). Um die Polymerisation zu starten, wurden 4 ml TMOS bzw. Trimethoxymethylsilan (TMMS) hinzugegeben und das Gemisch über Nacht bei RT und 250 rpm inkubiert. Die immobilisierten Enzyme wurden anschließend über Filterwatte von der Reaktionslösung getrennt und mit 100 mM Kaliumphosphat Puffer pH 7 gewaschen. Das Immobilisat wurde anschließend filtriert und feucht im Kühlschrank gelagert.

2.2.5 Adsorption auf verschiedene Trägermaterialien

Zur Immobilisierung von Enzymen auf Immobead 150 A/P wurde eine entsprechende Menge Enzym eingewogen und in 10 ml 1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7 in einem Falcon Gefäß gelöst. Zu dem Ansatz wurde 1 g trockenen Immobilisats hinzugegeben (1,03 g Feuchtgewicht Immobead 150 P, 3,91 g Feuchtgewicht Immobead 150 A) und in der Enzymlösung suspendiert. Die Gefäße wurden dicht verschlossen und in einem Inkubationsschüttler bei RT und 150 rpm für maximal 6 Stunden inkubiert. Zur Reaktionsüberwachung wurde sowohl vor als auch während der Immobilisierung in periodischen Abständen 200 µl Überstand entnommen und die Proteinkonzentration wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben sowie die verbleibende Aktivität photometrisch (Abschnitt 2.4.2) bestimmt. Das immobilisierte Enzym wurde anschließend über einen Faltenfilter mit 200 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7 gewaschen und feucht im Kühlschrank gelagert. Der Enzymgehalt des getrockneten Immobilisats (mg Enzym/ g Immobilisat) wurde gemäß Gleichung (4) berechnet.

$$\text{Enzymgehalt} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{([E]_0 - [E]_1) * 50 \text{ ml}}{(m_{\text{Beads}} - m_{\text{Enzym}})} \quad (1)$$

[E]₀: Proteinkonzentration vor Beginn der Immobilisierung

[E]₁: Proteinkonzentration nach Reaktionsende

m_{Beads}: Trockengewicht des Immobilisats

m_{Enzym}: Gewicht des gebundenen Enzyms

Die Immobilisierung von Katalase auf Immobead Träger erfolgte durch Lösung von 10 mg reinem Enzym in 10 ml 1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7 in einem 15 ml Falcontube. Es wurden pro Ansatz 1 g Immobead 150 P (Feuchtgewicht) bzw. 4 g Immobead 150 A (Feuchtgewicht) eingewogen und in der jeweiligen Enzymlösung suspendiert. Die Falcontubes wurden in einem Inkubationsschüttler bei RT und 250 rpm inkubiert. Zur Reaktionsüberwachung wurde vor Zugabe der Immobeads bzw. jede Stunde nach Reaktionsstart die Proteinkonzentration und Aktivität des immobeadfreien Überstands gemessen. Das Immobilisat wurde über einen Faltenfilter mit 100 ml 100 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7 gewaschen und feucht im Kühlschrank gelagert.

Die Immobilisierung von Lipasen auf Immobead Träger und Lewatit VP OC 1600 erfolgte analog zu der Methode wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben. Dazu wurden jeweils eine feste Menge Träger eingewogen und mit unterschiedlichen Mengen einer 1 mg/ml Enzymlösung in 1 M Kaliumphosphat Puffer pH 7 versetzt. Die Immobilisierung erfolgte über 24 Stunden auf einem Schüttler bei 250 rpm und Raumtemperatur. Nach 10, 30, 60, 120, 180, 240, 300 min und 24 Stunden wurden Proben des trägerfreien Überstandes entnommen und die Aktivität gegenüber *p*-Nitrophenyldodecanoat bestimmt (Abschnitt 2.4.4). Nach der Immobilisierung wurde das Immobilisat über einen Faltenfilter mit 100 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7 gewaschen und feucht im Kühlschrank gelagert.

Bevor die Lipasen auf Accurel MP 1000 immobilisiert werden konnten, wurde der stark hydrophobe Träger für 30 – 60 min mit Ethanol benetzt. Nach Filtration des Trägers wurde eine feste Menge davon in ein 50 ml Falcontube eingewogen und mit unterschiedlichen Mengen einer 1 mg/ml Enzymlösung in 1 M Kaliumphosphat Puffer pH 7 versetzt. Die Immobilisierung erfolgte über 24 Stunden auf einem Schüttler bei 250 rpm und Raumtemperatur. Analog zu der Immobilisierung von Lipasen auf Immobead und Lewatit Trägern wurden periodisch Proben des trägerfreien Überstandes entnommen und die Aktivität gegenüber *p*-Nitrophenyldodecanoat als Substrat wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben ermittelt. Nach der Immobilisierung wurde das Immobilisat über einen Faltenfilter mit 100 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7 gewaschen und feucht im Kühlschrank gelagert.

2.2.6 Immobilisierung auf funktionalisierten Kohlenstoff-Nanoröhrchen

Zur Immobilisierung von LOX auf Amin-MWNTs war zunächst eine Oberflächenaktivierung mit Glutaraldehyd notwendig. Dazu wurden 5 mg/ml Amin-MWNTs in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8 für 30 min mit einem Dispergiergerät Polytron PT 2500 E von Kinematica AG homogenisiert, um eine möglichst homogene Dispersion zu erreichen. Die MWNT-Puffer Dispersion wurde anschließend mit einer äquivalenten Menge an 1 M Glutaraldehyd-Lösung versetzt und bei 25 °C für eine Stunde bei 250 rpm geschüttelt. Die so aktivierten MWNTs wurden durch

Zentrifugation bei 7000 rpm für 20 min von der restlichen Lösung getrennt und mindestens fünfmal mit 20 ml Wasser gewaschen, um das restliche Glutaraldehyd zu entfernen. Im Anschluss wurden die aktivierten MWNTs mit 50 mM Tris HCl-Puffer pH 8 gewaschen.

Die Immobilisierung von LOX auf aktivierten Oxo-MWNTs erfolgte durch Lösung von 5 – 20 mg Enzym in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8 und Hinzugabe des aktivierten Trägers (Endkonzentration 5 mg/ml). Die kovalente Kupplung erfolgte bei 25 °C in einem Inkubationsschüttler Multitron Standard von Infors HT bei 150 rpm über 10 Stunden. Das Immobilisat wurde dann über ein Filterpapier vom Überstand getrennt und nicht kovalent gebundenes Enzym wurde im Anschluss mit 1 M NaCl und mit Tris-HCl Puffer pH 8 aus dem immobilisierten Präparat gewaschen, bis keine weitere Enzymaktivität im Filtrat nachgewiesen werden konnte.

Die Immobilisierung von LOX auf Alkyl-MWNTs und Hydroxy-MWNTs erfolgten analog. Dazu wurden 5 mg LOX abgewogen und in 5 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7) in einem Falcontube gelöst, um eine Konzentration von 1 mg/ml herzustellen. Es wurden 50 mg hydroxylierte MWNTs hinzugegeben, um ein LOX-Immobilisat Verhältnis von 1:10 einzustellen. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur über 5 Stunden lang bei 250 rpm in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Dabei wurde periodisch jede Stunde eine Messung bei 234 nm durchgeführt und der Überstand auf Enzymaktivität überprüft. Dafür wurde der Stammsatz zuerst für 5 Minuten bei 7450 rpm zentrifugiert, um mögliche Schwebstoffe zu entfernen und anschließend 100 µl Überstand entnommen. Der Überstand wurde nochmals für 2,5 min bei 9500 rpm zentrifugiert, um einen möglichst trägerfreien Überstand zu erhalten. Die Messung der Enzymaktivität im Überstand erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben.

Die Immobilisierung von Lipase auf Amin-funktionalisierten Kohlenstoff-Nanoröhrchen wurde bei verschiedenen Enzym-Träger-Verhältnissen untersucht. Dazu wurde jeweils eine feste Menge Träger von 100 mg abgewogen und mit verschiedenen Mengen einer 1 mg/ml Enzymlösung hergestellt, bestehend aus Lipase in 200 mM Tris-HCl Puffer pH 8. Die Enzymbeladung wurde dabei von 20 mg/g Träger bis 200 mg/g Träger variiert. Die Immobilisierung erfolgte über 24 Stunden bei 250 rpm und RT. Nach der Immobilisierung wurden die Immobilisate durch einen Büchnertrichter filtriert, mit 1 M NaCl-Lösung und anschließend mit dem korrespondierenden Puffer gewaschen und danach feucht im Kühlschrank gelagert.

2.2.7 Co-Immobilisierung von LOX-1 mit Katalase oder Lipase

Zur Co-Immobilisierung wurden 10 mg LOX-1 aus Sojabohnen und 10 mg reiner Katalase (671 µl der flüssigen Präparation) aus *M. lysodeikticus* eingewogen und in 10 ml 1 M Kaliumphosphat Puffer pH 7 in einem 15 ml Falcontube gelöst. Anschließend wurden 1 g Immobead 150 P (Feuchtgewicht) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 1 Stunde bei RT und 150 rpm in inkubiert. Dabei wurde auf eine gute Durchmischung geachtet, da die Trägerkugeln zu Beginn aneinander haften blieben. Das Immobilisat wurde anschließend über Faltenfilter mit 200 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7 gewaschen und feucht im Kühlschrank gelagert, um Aktivitätsverluste durch Trocknungsprozesse zu vermeiden. Die Aktivität von LOX und Katalase wurde wie in Abschnitt 2.4.2 und 2.4.3 beschrieben ermittelt. Analag zur Co-Immobilisierung von LOX und Katalase erfolgte auch die Co-Immobilisierung von LOX und Lipase aus *P. fluorescens* in 1 M Kaliumphosphat Puffer pH 7. Dazu wurden zunächst 10 mg LOX-1 und 20 mg reiner Lipase (182 mg der festen Präparation) in einem 50 ml Falcontube vorgelegt und 40 ml Puffer hinzugeben. Im Anschluss wurde 1 g des feuchten Immobead 150 P Trägers hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für kurze Zeit kräftig geschüttelt, bevor es in einen Schüttler gestellt wurde. Die Immobilisierung erfolgte bei RT und 150 rpm für 24 Stunden, um die Lipase möglichst vollständig an den Träger binden zu können. Nach 24 Stunden wurde das Immobilisat über einen Faltenfilter mehrmals mit 200 ml Wasser gewaschen und die Aktivität von LOX und Lipase wie in den Abschnitten 2.4.2 und 2.4.4 ermittelt. Um Aktivitätsverluste zu vermeiden, wurde das Immobilisat bis zu seinem Einsatz feucht im Kühlschrank gelagert.

Die Co-Immobilisierung von Lipase aus *P. fluorescens* und LOX-1 auf funktionalisierten MWNTs erfolgte wie auch bei der Immobilisierung auf Immobead 150 P simultan. Die Immobilisierung wurde bei beiden Träger in zwei Puffern getestet, um zu überprüfen, ob der pH-Wert eine signifikante Rolle bei der effektiven Beladung der Träger spielt. Es wurden jeweils 20 mg/g Lipase und 10 mg/g LOX auf 250 mg des Trägers in 15 ml 1 M pH 7 Kaliumphosphat Puffer bzw. 200 mM pH 8 Tris-HCl Puffer immobilisiert. Die Ansätze wurden nach Hinzugabe der Enzyme für 24 Stunden, bei RT und 250 rpm in einem Inkubationschüttler Multitron Standard (Infors HT) inkubiert. Nach 5 Stunden und 24 Stunden wurden Proben für eine Proteinbestimmung über Biuret von LOX und Lipase und zur Untersuchung der Enzymaktivität beider Enzyme (Abschnitt 2.4.2 und 2.4.4) entnommen. Nach der Immobilisierung wurden die Immobilisate mit 1 M NaCl-Lösung und anschließend mit dem korrespondierenden Puffer des Ansatzes gewaschen. Die Aktivitäten der immobilisierten Enzyme wurden wie in den Abschnitten 2.4.2 und 2.4.4 beschrieben bestimmt.

2.3 Synthetische Methoden

2.3.1 Hydroperoxidierungsreaktionen mit LOX-1

Typische LOX-Experimente wurden in einem Volumen von 50 ml mit kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr mit einer Geschwindigkeit von 20 – 100 ml/min unter Rühren für 2 Stunden entweder mit LOX-angereichertem entfettetem Sojabohnenextrakt oder Sojabohnen-LOX-1-Präparat von Sigma durchgeführt. Zur UV-Überwachung der Peroxide wurden periodisch Proben entnommen, diese 1:10 in Ethanol gelöst und der Gehalt photometrisch bei 234 nm bestimmt (Abschnitt 2.4.2). Nach Beendigung der Reaktion wurde der pH auf 3,5 eingestellt und die Hydroperoxide mit Ethylacetat extrahiert und mit Wasser gewaschen. Das restliche Lösungsmittel wurde im Vakuum unter Verwendung eines Rotationsverdampfers bei Raumtemperatur abgedampft und das Produkt für die HPLC-Analyse verwendet.

In Optimierungsversuchen wurde eine Vielzahl von Parametern variiert und die Auswirkung auf die HPODE Ausbeute und Regioselektivität untersucht (Tabelle 9). Darüber hinaus wurde die Zugabe von LOX und Substrat über Zeit analysiert. Zur Herstellung von 13-HPODE für die weitere Umsetzung, wurden 1,5 l Boratpuffer pH 9 und Linolsäure vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von LOX von Sigma gestartet. Nach 2 Stunden Reaktion bei 20 °C und einer Sauerstoffzufuhr von 400 ml/min wurde die Reaktionslösung auf pH 3,5 angesäuert und das Produkt wie oben beschrieben extrahiert.

Tabelle 9: Übersicht der Optimierungsparameter und die getesteten Bedingungen.

Parameter	Bereich
Temperatur	20 bis 30 °C
pH-Wert	6,5 bis 10
Rührgeschwindigkeit	400 bis 1000 rpm
Lösungsmittel	Methanol, Ethanol, DMSO, MTBE, Aceton, Acetonitril, 1-Butanol, Heptan, 1-Octanol, Isopropanol
Detergenzien	Tween 20, Tween 80, Tergitol 15-S-3, Tergitol 15-S-7, Tergitol 15-S-9, Tergitol 15-S-20, Tergitol 15-S-40, Tergitol NP-9, Tergitol NP-10, Ecosurf SA-9, Ecosurf EH-9, Triton X-100, Triton CG-110, Sophorolipid C18:2 [30], Brij 93, Brij O 10, Span 80
Sauerstoffzufuhr	0 bis 100 ml/min
Substratkonzentration	1 bis 100 mM
Enzymkonzentration	LOX: 1000 bis 1.000.000 U
Enzym-Substrat Verhältnis	LOX: 20000 bis 200000 U/mmol

2.3.2 Hydroperoxidierung mit *in situ* Sauerstofferzeugung

Um ein kombiniertes LOX + Katalase System zu etablieren, erfolgte eine Anpassung der Katalase erfolgte nach Aktivitätsbestimmung bei pH 7 bis 9. Dazu wurde die Wasserstoffperoxidzufuhr von 500 mg/l/min (äquivalent zu 50 ml/min Sauerstoff) über 60 min in einen 50 ml Ansatz mit 50 mM Kaliumphosphat pH 7, 50 mM Tris-HCl pH 8 oder Boratpuffer pH 9 hinzugegeben und die Katalasemenge variiert. Periodisch wurden Proben der Reaktionslösung entnommen und die H₂O₂-Konzentration bei 240 nm unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von 44,3 M⁻¹ cm⁻¹ überwacht.

Zur Untersuchung eines kombinierten Systems aus Katalase und LOX mit *in situ* Sauerstoffgenerierung wurden 50 ml 200 mM Tris-HCl Puffer pH 8, 30 mM Linolsäure und 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110 vorgelegt. Es wurden 20.000 U/μmol H₂O₂ an Katalase eingewogen und die Reaktion durch Zugabe von 150.000 U LOX-1 von Sigma (5000 U/mM) gestartet. Die Wasserstoffperoxidzufuhr wurde zwischen 2 und 200 mg/(l*min) eingestellt und periodisch Proben entnommen und diese in Ethanol zur photometrischen Untersuchung bei 234 nm eingesetzt. Nach saurer Extraktion in Ethylacetat wurde die gereinigte Lipidphase über HPLC bei 234 nm untersucht.

2.3.3 Hydrolyse von Distelöl mit Lipasen

Die Selektion von geeigneten Lipasen erfolgte durch Hydrolyse von Distelöl im Verlauf von mehreren Stunden. Dazu wurde Distelöl äquivalent zu 30 mM Linolsäure zu 50 ml einer 200 mM Tris-HCl Pufferlösung bei pH 8 gegeben und 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110 hinzugegeben. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 % ((w/v) Substrat) Lipase gestartet und erfolgten bei Raumtemperatur über 5 Stunden unter ständiger pH Kontrolle über ein pH-Meter. Periodisch wurde Reaktionslösung entnommen und in Ethanol im Verhältnis 1:10 gelöst, um eine Weiterreaktion zu verhindern. Die entnommenen Proben wurden über GC wie in Abschnitt 2.4.6 beschrieben analysiert.

2.3.4 Enzymkaskade aus Lipase und LOX-1

Die Optimierung des kombinierten Lipase + Lipoxygenase Systems erfolgte bei einer Distelölkonzentration äquivalent zu 30 mM Linolsäure in 50 ml Ansätzen mit 200 mM Tris-HCl Puffer pH 8 mit 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110. Es wurden ein- und zweistufige Reaktionsführungen getestet und die Zugabe von verschiedenen Lipasen bei variierenden Konzentrationen untersucht. Die Zugabe von LOX-1 erfolgte dabei entweder zu Beginn der Reaktion oder über die Zeit. Die Sauerstoffzufuhr wurde auf 50 ml/min eingestellt und bei einer Dosierung von LOX wurde eine Rate von 500 U/mM Substrat pro Stunde eingestellt. Periodisch wurden Proben sowohl für die Analyse der Hydrolyseprodukte über GC als auch zur photometrischen Auswertung bei 234 nm entnommen. Nach 5 Stunden wurde die Reaktion

durch Ansäuern mit 5 M HCl gestoppt und die Lipidphase durch Extraktion mit Ethylacetat von der restlichen Reaktionslösung getrennt. Nach mehrmaligem Waschen mit ddH₂O wurde das restliche Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt und die Lipidphase in Ethanol gelöst, bevor diese über HPLC analysiert wurde.

2.3.5 Kaskadenreaktion mit LOX-1, Lipase und Katalase

Die 3-Enzym-Kaskade bestehend aus LOX, Lipase und Katalase wurde im 50 ml Maßstab bei pH 8 in Gegenwart von 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110 und Distelöl in einem Konzentrationsbereich von 30 – 300 mM Linolsäureäquivalent für 7 Stunden durchgeführt. Zu Beginn der Reaktion wurden Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* in einer Konzentration von 10 % (w/v Substrat) und 20000 U Katalase pro μmol Wasserstoffperoxid zugegeben. Die H₂O₂-Dosierung wurde auf 100 mg/(l*min) und die LOX-1-Dosierung auf 10.000 U/mmol Substrat pro Stunde eingestellt.

2.3.6 Biokatalytische Umsetzungen mit immobilisierten Enzymen

Die Umsetzung mit immobilisierten Enzymen wurde in 100 ml Reaktionsvolumen bei einem pH von 8 (Lipasen) und 9 (LOX + Katalase) bei Raumtemperatur unter konstantem Rühren mit einem Überkopfrührer durchgeführt. Die Substratmenge variierte zwischen 1 – 30 mM und die Reaktionszeit belief sich auf 2 bis 5 Stunden. Die Reaktionen für einen Recyclingtest mit LOX erfolgten für 2 Stunden. Nach 5 und 120 min wurden von jedem Ansatz drei Proben genommen. Nach Beendigung der Reaktion und der Probenentnahme wurde zunächst der Rührer ausgestellt und das Becherglas vom Laborboy runtergenommen. Die restlichen Immobileads wurden vom Rührer und den Glaswänden mit VE-Wasser gewaschen. Die Reaktionslösung wurde vorsichtig abdekantiert ohne den Träger am Boden des Glases aufzuwirbeln. Die Bechergläser wurden dann wieder auf dem Laborboy um die Rührer herum positioniert. Im Anschluss wurde 100 ml einer Substratlösung vorsichtig in das Becherglas gegeben, um kein Immobilisat an den Wänden haften zu lassen. Als letzter Schritt wurde der Rührer wieder angestellt und die Reaktion durchgeführt. Die obigen Schritte wurden so oft wiederholt, bis die Absorption ergo HPODE Konzentration nach 5 min nur noch halb so hoch ist wie beim ersten Zyklus. Ziel dieser Vorgehensweise war die Erhaltung und Sicherung von möglichst viel Immobilisat beim Übergang von einem Zyklus zum nächsten, ohne zu hohe Verluste zu erleiden.

Eine wiederholte Anwendung von immobilisierter LOX wurde in einem 100 ml Ansatz mithilfe eines RW 20 DZM-Rührers und konstanter Sauerstoffzufuhr untersucht. Hierzu wurden 1.000, 10000 oder 30000 U Immobilisat eingewogen und in 100 ml 50 mM Borat-Puffer pH 9 suspendiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 33, 330 und 1000 μl Linolsäure (Endkonzentration 1/10/30 mM) gestartet und bei 300 rpm und einer Sauerstoffzufuhr von 100 ml/min über 2 Stunden durchgeführt. Parallel dazu wurde eine Referenz mit dem freien

Enzym durchgeführt. Die Reaktion wurde bei 234 nm überwacht. Nach 2 Stunden wurde eine Probe für HPLC-Analyse entnommen und in Ethanol gelöst. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch vorsichtig abdekantiert, um das Immobilisat für den nächsten Zyklus zurückzugewinnen. Die Reaktion wurde so oft wiederholt, bis die spezifische Aktivität in den ersten 5 min nach Reaktionsstart weniger als 50 % betrug.

Der Recyclingtest mit immobilisierter Lipase erfolgte ähnlich zu den LOX-Versuchen. Dazu wurde 1 g Lipase Immobilisat in 100 ml Tris-HCl Puffer pH 8 mit 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110 suspendiert und die Reaktion durch Zugabe von Distelöl äquivalent zu 30 mM Linolsäure gestartet. Ein Zyklus dauerte 2 Stunden, während die Reaktionsmischung kontinuierlich mit einem Überkopfrührer bei 300 rpm agitiert wurde. Nach 10 min und am Ende der Reaktion wurden 100 µl Proben der Reaktionsmischung zur Analyse des Fettsäuregehaltes entnommen und wie beschrieben analysiert (2.4.6).

Zur Untersuchung der H₂O₂-Beständigkeit der Katalase wurden 200.000 U Immobilisat eingewogen und in 100 ml 50 mM Borat-Puffer pH 9 suspendiert. Mithilfe eines RW 20 Rührers wurde die Suspension bei 600 rpm und RT kontinuierlich gerührt, um Diffusionsprobleme zu verringern. Über eine Pumpe wurde der Suspension eine 0,33 M H₂O₂-Lösung mit einer Flussrate von 0,2 ml/min zugeführt (maximale Konzentrationszunahme im Reaktionsgefäß = 0,66 mM/min äquivalent zu 50 ml/min O₂ Zufuhr). In 10 min Intervallen wurden 2 ml Überstand entnommen und die Extinktion bei 234 nm gemessen ($\epsilon_{234}(\text{H}_2\text{O}_2) = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Parallel dazu wurde eine Referenz mit dem freien Enzym durchgeführt.

2.3.7 Umsetzung von Linolsäure mit co-immobilisierter LOX-1 und Katalase

Das Co-Immobilisat wurde im Hinblick auf die wiederholte Umsetzung von Linolsäure zu 13-HPODE untersucht, wobei der zur Reaktion benötigte Sauerstoff nicht direkt zugeführt wurde, sondern durch die Umsetzung von H₂O₂ mittels Katalase im Reaktionssystem produziert wurde. Hierzu wurden 1000 U LOX eingewogen, was im Co-Immobilisat 100000 U Katalase entsprach, und in 100 ml 50 mM Borat-Puffer pH 9 suspendiert. Zum Reaktionsstart wurden 33 µl Linolsäure (Endkonzentration 1 mM), sowie eine 0,33 M H₂O₂-Lösung mit einer Flussrate von 0,1 ml/min zugegeben. Die maximale Konzentrationszunahme an H₂O₂ im Reaktionsgefäß betrug dabei 0,33 mM/min äquivalent zu 25 ml/min O₂ Zufuhr. Die Reaktion wurde ähnlich zum LOX-Recycling bei 600 rpm und RT über 2 Stunden durchgeführt und bei 234 nm überwacht. Nach 2 Stunden wurden analog zum LOX-Recycling das Immobilisat zurückgewonnen und die Reaktionsprodukte extrahiert, sowie mittels HPLC analysiert. Die Reaktion wurde so oft wiederholt, bis die Aktivität in den ersten 5 min nach Reaktionsstart weniger als 50 % betrug.

2.3.8 Umsetzung von Distelöl mit co-immobilisierter LOX-1 und Lipase

Die Umsetzung von Distelöl zu Linolsäurehydroperoxiden mit Hilfe immobilisierter Lipase und LOX wurde in einem 400 ml Becherglas durchgeführt, in welchem 100 ml Co-Immobilisatsubstratlösung bestehend aus 200 mM Tris-HCl Puffer pH 8 mit Distelöl (äquivalent zu 10 mM Linolsäure) sowie 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110 vorgelegt wurden. Der Ansatz wurde dauerhaft gerührt, um eine optimale Verteilung zu gewährleisten. Hinzu wurden die auf Immobead 150P (1 g Träger) oder MWNT (250 mg Träger) co-immobilisierten Enzyme Lipase (20 mg/g aus *P. fluorescens*) und LOX (10 mg/g) vorgelegt. Die Reaktion wurde für 4,5 Stunden durchgeführt, während kontinuierlich 100 ml/min Sauerstoff hinzugeführt und die Lösung bei RT mit einem Überkopfrührer agitiert wurde. Nach 5 min und danach alle 30 min wurden dreimal 100 µl der Reaktionslösung entnommen und in jeweils drei 1,5 ml großen Eppendorf-Tubes in 900 µl Ethanol gelöst, um die Reaktion abubrechen und die Lipidbestandteile in Lösung zu überführen. Die entnommenen Proben wurden wie in Abschnitt 2.4.6 und 2.4.5 vermessen, um sowohl die Hydrolyse als auch die HPODE Synthese zu untersuchen. Die Reaktion erfolgte in Dreifachbestimmung und wurde so oft wiederholt, bis die spezifische Aktivität der LOX in den ersten 5 min nach Reaktionsstart weniger als 50 % betrug.

2.3.9 Aufbau eines Reaktors für eine kontinuierliche Prozessführung

Die Versuche im Reaktor erfolgten unter kontinuierlichen Bedingungen in einem 3-D gedruckten Reaktor mit einer Säulenlänge von 10 cm und einer Breite von 1 cm. Der Reaktor wurde in Autodesk Fusion entworfen und mit einem Prusa i3 MK3S Drucker und Polyaktid als Druckmaterial hergestellt. An beiden Enden befanden sich Anschlüsse für die Zufuhr von Substrat- oder Produktlösung und für die Zufuhr von Sauerstoff. Nachdem 1 g des Immobilisats (Beladung von 10 mg LOX / g Träger) in 1 M Kaliumphosphat Puffer immobilisiert und eingewogen wurde, wurde der Reaktorkörper mit den Schläuchen bestückt und die Apparatur großzügig mit Parafilm abgedichtet bis auch bei höheren Flussraten kein Gas oder Flüssigkeit austreten konnten. Im Verlauf der Untersuchung wurde die Sauerstoff Zuflussrate bei 50 ml/min konstant gehalten und die Flussrate der Substratlösung von 0,2 ml/min bis 1 ml/min variiert. Eine höhere Flussrate war aufgrund der Druckverhältnisse im Reaktor nicht möglich. Die Reaktionslösung bestand aus 50 ml Tris-HCl pH 8 in dem 30 mM Linolsäure und Triton CG-110, wie in Abschnitt 2.3.10 beschrieben, hinzugegeben wurden. Das System wurde über die gesamte Reaktionszeit im Kreis eingestellt. Das System wurde sowohl als Festbettreaktor als auch als Rieselbettreaktor eingestellt.

2.3.10 Kontinuierlicher Reaktorbetrieb mit immobilisierter LOX-1

Zur Untersuchung der Anwendbarkeit von immobilisierter LOX in einem Durchflussreaktor, wurde LOX auf Immobead 150 P zu einer Beladung von 10 mg/g Träger bzw. 100 mg/g Träger in 1 M Kaliumphosphat Puffer pH 7 immobilisiert. Der verwendete 3D gedruckte Reaktor bestand aus einem 10 cm Reaktorkörper und zwei Anschlussköpfen und wies an beiden Enden Anschlüsse sowohl für einen Schlauch zur Sauerstoffzufuhr wie auch für einen Schlauch für die Zugabe von Substratlösung. Vor der Einwaage des Immobilisats wurde der Reaktorboden mit Glaswolle ausgekleidet und 1 g des Immobilisats durch kontinuierliche Zugabe von Wasser in das Reaktorrohr gespült. Nach dem Einfüllen des Immobilisats wurde der Reaktor fest verschlossen und an den Gewinden mit Parafilm gut abgedichtet. Die Schläuche für die Sauerstoffzufuhr und Substratlösung wurden mit Parafilm abgedichtet, bis kein Gas mehr entweichen konnte. Die Substratlösung umfasste ein Volumen von 50 ml und bestand aus 30 mM Linolsäure mit 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110, die entweder in 200 mM Tris HCl-Puffer pH 8 oder 200 mM Borat-Puffer pH 9 emulgiert wurden. Die Reaktion erfolgte bei RT über 24 – 72 Stunden, wobei die Flussrate sowohl von Sauerstoff und der Substratmischung wie auch die Flussrichtung der Sauerstoffzufuhr variiert wurde. Periodisch wurden Proben der Substratmischung entnommen. Nach Verdünnung in Ethanol (Endverdünnung in Küvette = 1000) wurde der HPODE-Gehalt photometrisch bei 234 nm mit einem Spectrophotometer ermittelt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Fettsäuren aus der Reaktionslösung mit Hilfe von Ethylacetat extrahiert und die Regioisomeren-Verteilung der HPODE über HPLC wie in Abschnitt 2.4.7 beschrieben untersucht.

2.3.11 Chemokatalytische Spaltung von HPODE mit Lewis-Säuren

Die chemokatalytische Spaltung von 13-HPODE mit Lewis-Säuren wurde entweder bei Raumtemperatur oder bei 50 °C in einem Heizblock oder in einer Mikrowelle durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine 100 mM Stocklösung der Lewis-Säure (Aluminiumchlorid, Zirkoniumchlorid) im entsprechenden Lösungsmittel angesetzt und unterschiedliche Mengen davon zusammen mit Lösungsmittel auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 µl HPODE-Lösung (10 mM Endkonzentration) gestartet. Die Reaktionsmischungen wurden während der gesamten Reaktionszeit bei 1000 rpm geschüttelt. In regelmäßigen Abständen wurden 100 µl Proben entnommen und wie in Abschnitt 2.4.6 beschrieben reduziert und silyliert und über GC analysiert

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration über Biuret

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Biuret wurde eine Kalibriergerade mit BSA (bovine serum albumin) erstellt. Dazu wurde eine BSA-Stocklösung von 10 mg/ml in einer 0,9 % Natriumchlorid Lösung angesetzt. Es wurden jeweils 100 µl der Biuret-Lösung (Abschnitt 2.4.1) in eine Kammer einer 96-Well Platte vorgelegt und 100 µl von unterschiedlich verdünnter BSA-Stocklösung (1, 2, 3, 4, 5 mg/ml Endkonzentration) auf ein Endvolumen von 200 µl hinzupipettiert. Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Platte bei einer Wellenlänge von 540 nm mit einem SpectraMax 190 Microplate Reader von Molecular Devices ermittelt. Die zu testende Enzymlösung wurde mit 0,9 % Natriumchlorid Lösung auf eine geeignete Verdünnung eingestellt und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach Messung der Absorption in der Mikrotiterplatte wurde die Proteinkonzentration mithilfe der Albumin-Kalibriergeraden bestimmt.

2.4.2 Messung der Enzymaktivität von LOX-1

Die Lipoxygenase-Aktivität wurde photometrisch in unterschiedlichen 50 mM Puffer bei verschiedenen pH-Werten mit 1 mM Linolsäure bei RT bestimmt. Es wurden 850 µl des Puffers vorgelegt und 100 µl einer 10 mM Linolsäureemulsion in Wasser vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Enzymlösung in die Küvette gestartet und die Zunahme der Extinktion bei 234 nm über 5 min mit einem UV-3100 PC Spectrophotometer von VWR gemessen. Die Steigung des linearen Bereiches der Kurve wurde berechnet und die Enzymaktivität (1 µmol/min = 1 U) wurde mit einem Extinktionskoeffizienten von 25000 M⁻¹ cm⁻¹ über das Lambert-Beersche Gesetz berechnet:

$$\text{vol. Aktivität} \left[\frac{U}{l} \right] = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Absorption}}{\text{min}} \right) * \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Extinktionskoeffizient} \left[\frac{l}{\text{mol}} \right] * \text{Schichtdicke} [cm]} \quad (2)$$

Die Messung der Aktivität immobilisierter LOX erfolgte über den Umsatz von Linolsäure. Zu diesem Zweck wurden ca. 30 – 50 mg Immobilisat in 1,8 ml des entsprechenden Puffers suspendiert und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl einer 10 mM Linolsäureemulsion in Wasser gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 10 min bei RT und 80 rpm in einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach der Reaktion wurde die Zunahme der Absorption bei 234 nm in einem Spectrophotometer gemessen. Die Berechnung des Umsatzes erfolgte über das Lambert-Beersche Gesetz (Gleichung 2), wobei mit einem HPODE Extinktionskoeffizienten von 25000 M⁻¹ cm⁻¹ gearbeitet wurde.

2.4.3 Aktivitätsbestimmung von Katalase

Die Katalaseaktivität wurde photometrisch in 50 mM Kaliumphosphat Puffer pH 7, 50 mM Tris-HCl pH 8 und 50 mM Boratpuffer pH 9 mit 15 mM Wasserstoffperoxid bestimmt. Es wurden 850 µl Puffer und 100 µl Wasserstoffperoxid Lösung in Wasser vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Enzymlösung gestartet und der Verbrauch von Wasserstoffperoxid wurde bei 240 nm unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $44,3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ über 5 min gemessen. Die Steigung des linearen Bereichs der Kurve wurde berechnet und die Aktivität über das Lambert-Beersche Gesetz ermittelt (Gleichung 2).

Die Bestimmung der Aktivität von immobilisierter Katalase erfolgte durch Suspension von 30 – 50 mg immobilisiertem Enzym in 1,92 ml des entsprechenden Puffers. Die Reaktion wurde gestartet, indem 80 µl einer 0,5 M H_2O_2 -Lösung hinzugegeben (Endkonzentration 20 mM) und das Reaktionsgemisch für 5 min bei RT und 80 rpm in einem Orbitalschüttler inkubiert wurde. Nach Abbruch der Reaktion wurde die Absorption bei 240 nm in einem Spectrophotometer gemessen. Die Berechnung erfolgte nach Lambert-Beer, wobei ein Extinktionskoeffizient von $44,3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angesetzt wurde (Gleichung 2).

2.4.4 Bestimmung der Enzymaktivität von Lipase

Zur Aktivitätsmessung des Überstandes während der Immobilisierung von Lipasen wurde das Modellsubstrat *p*-Nitrophenyldodecanoat (*p*NP) verwendet. Dazu wurden 34 mg *p*NP in 10 ml DMSO gelöst (10,6 mmol/l) und das Falcontube mit Alufolie umwickelt und im Dunkeln gelagert. Es wurde eine weitere Puffer Stocklösung angesetzt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammensetzung der Puffer Stocklösung zur Bestimmung der Enzymaktivität von Lipase während der Immobilisierung.

Bestandteil	Menge
Gummi Arabicum	10 mg
Triton CG-110	10 µl
200 mM Tris HCl pH 8	Auf 10 ml

Um den Reaktionsmix anzusetzen, wurden 0,5 ml der *p*NP Lösung zu 10 ml Puffer-Stocklösung hinzugegeben. Die Messungen wurden jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt. Dazu wurden 180 µl des Reaktionsstocks in der Kammer einer 96-Well Platte mit 20 µl einer verdünnten Enzymprobe (2000-fach verdünnt in der Kammer) versetzt und mit einer Multikanal Pipette gut vermischt. Mittels Microplate Reader wurde das Programm auf Endpunktbestimmung eingestellt und vor dem Start der Messung ein Pre-read durchgeführt, um dann nach 0, 5, 10 und 20 min ein Messwert zu nehmen. Die Messung der Absorption

erfolgte bei 410 nm. Der Extinktionskoeffizient betrug $15,548 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und die Aktivität wurde über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt (Gleichung 2).

Zur Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von Lipasen nach der Immobilisierung, wurden zunächst 30 – 50 mg des entsprechenden Immobilisats in ein 2 ml Eppendorf Gefäß eingewogen. Die Reaktion erfolgte in 2 ml eines Reaktionsmixes bestehend aus 0,5 ml einer pNP Lösung in DMSO und 10 ml einer Pufferlösung bestehend aus 200 mM Tris HCl Puffer pH 8 in dem 10 mg Gummi Arabicum und 10 μl Triton CG-110 gelöst vorlagen. Nach fünf Minuten wurden 100 μl des trägerfreien Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt und verdünnt bevor die Absorption bei 410 nm in einem Platerader bestimmt wurde.

2.4.5 Photometrische Bestimmung des Gehaltes an Hydroperoxiden

Während einer Reaktion im Kolben wurden periodisch 100 μl Proben der Reaktionslösung entnommen und in ein Eppendorfgefäß mit 900 μl Ethanol überführt, um eine Weiterreaktion zu unterbinden. Von diesem Eppendorfgefäß wurde dann eine definierte Menge an Lösung in eine Küvette überführt und gemischt. Die Messung der Absorption erfolgte in einem Spectrophotometer bei 234 nm, bei der das konjugierte Pentadienyl-System des Hydroperoxids ein Absorptionsmaximum aufweist. Die Berechnung der Hydroperoxidkonzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 2) und einem Extinktionskoeffizienten von $25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die folgende Tabelle gibt die Verdünnungen in der Küvette an:

Tabelle 11: Schema der finalen Verdünnung in der Küvette für die Bestimmung der Hydroperoxidreaktion während einer biokatalytischen Umsetzung von Linolsäure mit LOX-1.

Eingesetzte Linolsäurekonzentration (mM)	Verdünnung in Küvette
1	50
3	100
10	400
30	1000
60	2000
100	4000
300	10000

2.4.6 Gaschromatographische Analytik

Die Methylierung der Lipidkomponenten erfolgte durch Vorlegen von 20 µl Lipidphase und Zugabe von 500 µl Bortrichlorid in Methanol (12 % (w/w)). Nach zweistündiger Inkubation bei 60 °C und 1500 U/min wurden 500 µl Wasser zugegeben. Die methylierten Komponenten wurden in 1 ml Heptan extrahiert, mit Natriumsulfat getrocknet und über GC analysiert.

Die Fettsäurezusammensetzung wurde über ein Shimadzu GC-2010-Gaschromatographiesystem unter Verwendung einer ErAcc-WAX-MS-Säule (Länge 30 m, Filmdicke 0,25 µm, Innendurchmesser 0,25 mm) mit einem Injektionsvolumen von 1 µl und einem Splitverhältnis von 1:10 untersucht. Die Temperatur des FID-Detektors und des Injektors wurde auf 250 °C eingestellt. Als Ergänzungsgas wurde Helium mit einer Fließgeschwindigkeit von 30 ml/min verwendet, während Wasserstoff und Luft auf 40 ml/min bzw. 400 ml/min eingestellt wurden. Gesteuert wurde das Gerät über die Software GC-Solutions.

Tabelle 12: Übersicht über die GC-Methode zur Untersuchung der Distelölbestandteile über eine ErAcc-WAX-MS-Säule. Es wurde eine einfache Rampe von 100 bis 250 °C eingestellt, wobei die Probe vorher methyliert und mit einem Split von 1:10 injiziert wurde.

Parameter	
Säule	ErAcc-WAX-MS-Säule (30 m, Ø 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm)
Trärgas	Helium
Flussrate	30 ml/min
H ₂ -Flussrate	40 ml/min
Synthetische Luft Flussrate FID	400 ml/min
Basis Temperatur FID	250 °C
Basis Temperatur Injektor	250 °C
Probenvolumen	1
Split	10
Start Temperatur	100
Gradient Rampe 1	Halten 100 °C 5 min
Gradient Rampe 2	5 °C/min bis 250 °C
Gradient Rampe 3	Halten 250 °C 10 min

Proben für die GC-Analyse von Hydroperoxydierungs-Produkten oder Hydrolyse wurden entweder durch Silylierung der extrahierten Lipidphase (1:10 Lipid:BSTFA + TMCS) oder Verdünnung der Lipidphase in Ethanol direkt hergestellt.

Vor der Analyse von Hydroperoxidierungs-Produkten mittels GC war eine Reduktion der Probe mit Natriumborhydrid notwendig. Die Reduktion wurde durch Mischen von 25 µl Lipidprobe in 500 µl Boratpuffer pH 9 mit 500 µl Natriumborhydrid in Borat in 1 M NaOH (4 mg/ml) durchgeführt. Die Mischung wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ansäuerung mit 100 µl 5 M HCl wurden die Lipide in 500 µl MTBE extrahiert. Diese wurden dann für 1 Stunde bei 80 °C im Trockenschrank inkubiert, um eine vollständige Silylierung der Fettsäuren zu erreichen.

Im Anschluss wurden die Proben mit Hilfe eines Shimadzu GC-2010 Gas Chromatographen und einer MTX-Biodiesel TG Säule (Länge 14 m, Film Dicke 0,16 µm innerer Durchmesser 0,53 mm) analysiert. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl, wobei die Injektor-Temperatur 410 °C betrug. Die Temperatur des Detektors betrug 415 °C, während Helium mit einer Flussrate von 30 ml/min als Trägergas verwendet wurde und Wasserstoff mit 40 ml/min eingesetzt wurde. Die Luftzufuhr betrug 400 ml/min. Die gesamte Flussrate betrug 57,7 ml/min mit einer Säulenflussrate von 4,21 ml/min. Es erfolgte eine Split Injektion (Verhältnis 1:12).

Tabelle 13: Übersicht über die GC-Methode zur Untersuchung der Hydroperoxyfettsäuren über eine MTX-Biodiesel TG Säule. Es wurde eine einfache Rampe von 40 bis 330 °C eingestellt, wobei die Probe vorher reduziert und silyliert und mit einem Split von 1:10 injiziert wurde.

Parameter	Hydroperoxidierung	Hydrolyse
Säule	MTX-Biodiesel TG (14 m, Ø 0,53 mm, Filmdicke 0,16 µm)	MTX-Biodiesel TG (14 m, Ø 0,53 mm, Filmdicke 0,16 µm)
Trägergas	Helium	Helium
Flussrate	30 ml/min	30 ml/min
H ₂ -Flussrate	40 ml/min	40 ml/min
Synthetische Luft Flussrate FID	400 ml/min	400 ml/min
Basis Temperatur FID	410 °C	410 °C
Basis Temperatur Injektor	415 °C	415 °C
Probenvolumen	1	1
Split	10	12
Start Temperatur	40 °C	75 °C
Gradient Rampe 1	12 °C/min bis 175 °C	25 °C/min bis 145 °C
Gradient Rampe 2	5 °C/min bis 210 °C	12 °C/min bis 175 °C
Gradient Rampe 3	25 °C/min bis 330 °C und halten 2 min	5 °C/min bis 205 °C
Gradient Rampe 4		20 °C/min bis 250 °C
Gradient Rampe 5		25 °C/min bis 390 °C und halten 1,6 min

Proben der Hydrolysereaktionen für die GC-Analyse wurden entweder durch Silylierung der extrahierten Lipidphase (1:10 Lipid:BSTFA + TMCS) oder Aufbringen der Lipidphase in Ethanol hergestellt. Diese wurden dann für 1 Stunde bei 80 °C im Trockenschrank inkubiert, um eine vollständige Silylierung der Fettsäuren zu erreichen. Im Anschluss erfolgte die Messung der Proben weitgehend analog zur Messung von Hydroperoxidierungs-Produkten mit unterschiedlichen Gradientenverlauf und Split.

2.4.7 HPLC-Analyse von Hydroperoxyfettsäuren

Die qualitative und quantitative Analyse des Regioisomerenverhältnisses und der Ausbeute von Hydroperoxyfettsäuren wurde über HPLC (Nexera LC-20AD XR, Liquid Chromatograph von Shimadzu) unter Verwendung einer Hitachi LaChrom II C18 RP 250 mm x 4,6 mm Säule durchgeführt (Tabelle 14). Das Injektionsvolumen betrug 10 µl und die Trennung der Verbindungen wurde mit einem isokratischen Fluss mit 48 % Acetonitril:THF:Ameisensäure (67,5:32,5:0,1) und 52 % Wasser:Ameisensäure (100:0,1) über einen Zeitraum von 90 min erreicht. Eine zusätzliche Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 234 nm in einer Küvette (Gleichung 1, Extinktionskoeffizient: 25000 M⁻¹ cm⁻¹).

Tabelle 14: Schema der HPLC-Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Linolsäurehydroperoxiden über eine LaChrom II C18 RP Säule von Hitachi.

Parameter	
Säule	LaChrom II C18 RP 250 mm x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße, Hitachi
Eluent A	100:0,01 Wasser:Ameisensäure
Eluent B	67,5:32,5:0,01 Acetonitril:THF:Ameisensäure
Flussrate	1 ml/min
Temperatur Autosampler	20 °C
Temperatur Säule	30 °C
Injektionsvolumen	10 µl
Detektor	PDA
Wellenlänge	234 nm
Isokratischer Fluss	52 % Eluent A, 48 % Eluent B

2.4.8 Titrimetrische Bestimmung der Säurezahl

Zur Bestimmung von freien Fettsäuren vor und nach der Umsetzung wurde die Säurezahl der Lipidlösung mit einem Titroline® 7000 von SI Analytics bestimmt. Dazu wurden 0,1 – 0,5 g der Probe in einem Becherglas eingewogen, in 20 ml wasserfreiem Ethanol gelöst und mit zwei Tropfen einer ethanolischen Phenolphthalein-Lösung versetzt. Unter konstantem Rühren wurde mit Hilfe einer 0,1 M Kaliumhydroxid-Lösung bis zum Farbumschlag von farblos nach rosa titriert.

$$\text{Säurezahl} = \frac{V_{\text{KOH}}[\text{ml}] \cdot c_{\text{KOH}} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] \cdot M_{\text{KOH}} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}}[\text{g}]} \quad (3)$$

Der Hydrolysegrad von Hydroperoxidproben aus Distelöl wurde über folgende Formel ermittelt. Die theoretische Säurezahl entspricht dabei der Säurezahl einer reinen Fettsäure.

$$\text{Hydrolysegrad} = \frac{\text{Säurezahl} \cdot 100}{\text{Theoretische Säurezahl}} \quad (4)$$

2.4.9 Mizellgrößenanalyse über dynamische Lichtstreuung

Die Messung der Mizellgröße von Linolsäure bei pH 9 wurde über dynamische Lichtstreuung (DLS) ermittelt. Es wurden verschiedene Lösungen unterschiedlicher Linolsäurekonzentrationen in 50 mM Borat Puffer pH 9 angesetzt und diese für 30 min entweder mit Ultraschall, Ultra Turrax oder durch Rühren bei 800 rpm mit einem Rührfisch homogenisiert. Die Konzentration an Linolsäure wurde zwischen 1 und 100 mM variiert. Vor und nach der Homogenisierung wurde der pH-Wert der Lösung auf 9 angepasst. Gemessen wurde die Größe mit Hilfe eines Zetasizer Nano ZS von Malven. Dazu wurde ein Brechungsindex von 1,467 für Linolsäure und 1,330 für Wasser angenommen. Die Grundabsorption wurde auf 0,01 bei 632 nm bestimmt. Es wurde 1,5 ml Gesamtvolumen in eine Küvette überführt und 180 s bei 25 °C äquilibriert. Die Messung erfolgte jeweils in Dreifachbestimmung mit jeweils 15 Messpunkten pro Bestimmung. In der folgenden Tabelle ist das Pipettierschema der Proben zu finden.

Tabelle 15: Pipettierschema zur Bestimmung der Mizellgröße von Linolsäure bei verschiedenen Konzentrationen nach Homogenisierung.

Konzentration Linolsäure (mM)	homogenisierte Probe (µl)	Wasser (µl)
1	1500	0
3	600	900
10	200	1300
30	100	1400
100	50	1450

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur LOX-1 katalysierten Hydroperoxidierung

Lipoxygenasen katalysieren die Hydroperoxidierung von Linolsäure mit molekularem Sauerstoff, welche zu 9- oder 13-Hydroperoxiden führen. Diese Hydroperoxide sind interessante Vorstufen für eine weitere Umsetzung zu Aromastoffen mit grüner Note oder Polymeren. Zur Optimierung der LOX-Reaktion wurden zum einen der pH-Wert, die Substratkonzentration, Rührgeschwindigkeit und verschiedene Homogenisierungsmethoden untersucht. Darüber hinaus wurde die Reaktionstemperatur variiert, der Einfluss von Lösungsmitteln und Detergenzien getestet sowie die Enzymkonzentration untersucht.

Als Substrat zur biokatalytischen Umsetzung durch LOX wurde Linolsäure über alkalische Hydrolyse und anschließende Harnstoff Fraktionierung (Abschnitt 2.2.1) hergestellt. Die gaschromatographische Analyse des Distelöls (2.4.6) zeigte neben einen Gehalt von 77,5 % Linolsäure, 13,4 % Ölsäure, 2,4 % Stearinsäure sowie 6,7 % Palmitinsäure an (Abbildung 10A). Nach Aufarbeitung über Harnstoffkristallisation wies die gereinigte Linolsäure einen Gehalt von 93,7 % auf während Ölsäure mit 6,2 % und Palmitinsäure einen Anteil von 0,1 % am Gemisch hatten (Abbildung 10B). Die Gesamtausbeute an Linolsäure betrug 57 % vom eingesetzten Öl und 74 % im Vergleich zur im Öl enthaltenen Linolsäure.

Tabelle 16: Fettsäureprofil von Distelöl und gereinigter Linolsäure nach Harnstoff Fraktionierung.

Fettsäure	Distelöl (%)	Linolsäure nach Harnstoff Einschluss (%)
Palmitinsäure C16:0	6,7	0,1
Stearinsäure C18:0	2,4	0
Ölsäure C18:1	13,4	6,2
Linolsäure C18:2	77,5	93,7

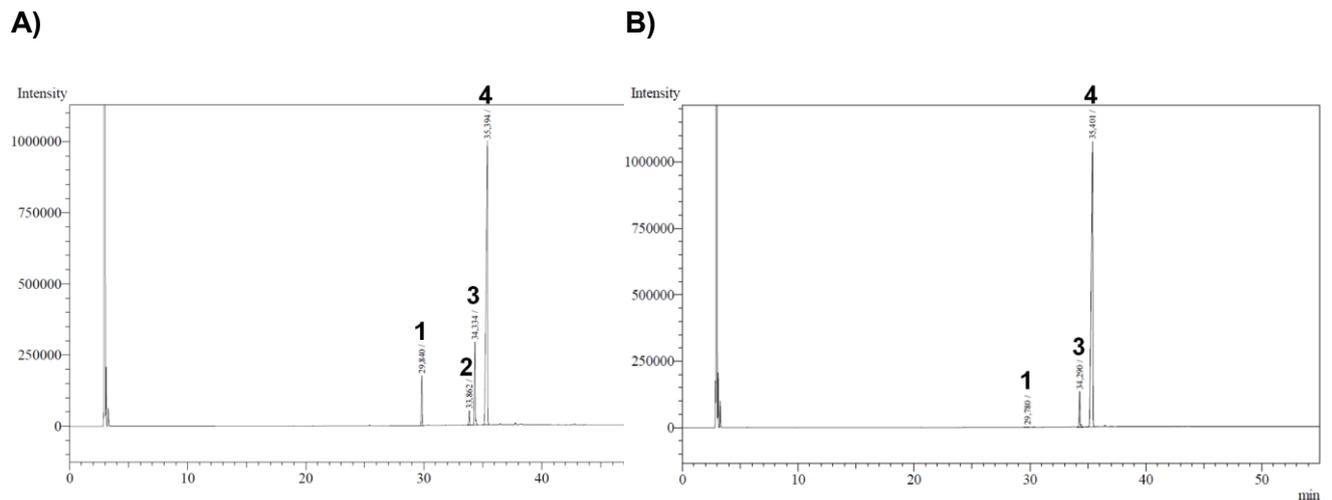


Abbildung 10: Vergleichende GC-Analyse von LOX-Substraten nach Methylierung von Distelöl (A) und Harnstoffeinschluss angereicherte Linolsäure (B). Peaks wurden durch Vergleich mit Referenzsubstanzen zugeordnet: (1) Palmitinsäure, (2) Stearinsäure, (3) Ölsäure, (4) Linolsäure.

3.1.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen für LOX-1

LOX-Zubereitungen wurde aus Sojabohnen durch Extraktion von entfettetem Mehl hergestellt. Die Sojabohnenextrakte wiesen Aktivitäten von 45 ± 4 U/mg (4.500 ± 395 U/ml) mit Heptan und $51 \pm 5,1$ U/mg (5.100 ± 506 U/ml) mit Aceton als Entfettungsmittel auf. Aufgrund der höheren Aktivität wurde der Acetonextrakt für weitere Studien verwendet und mit einer im Handel erhältlichen LOX-1-Zubereitung von Sigma Aldrich hinsichtlich Aktivität und Regioselektivität in Abhängigkeit des pH-Wertes verglichen. Dazu wurden Linolsäure (1 mM Endkonzentration) und 1000 U der entsprechenden LOX-Präparation in 50 ml des entsprechenden Puffers (Tabelle 17) eingewogen und für 2 Stunden mit 50 ml/min Sauerstoffzufuhr inkubiert.

Tabelle 17: Verwendete Puffer für die Messung der LOX-1 Aktivität aus verschiedenen Quellen bei unterschiedlichen pH-Werten.

pH-Wert	Verwendeter Puffer
6,5	Kaliumphosphat
7,0	Kaliumphosphat
7,5	Tris-HCl
8,0	Tris-HCl
8,5	Borat-Puffer
9,0	Borat-Puffer
9,5	Borat-Puffer
10,0	Borat-Puffer

Die kommerziell erhältliche LOX-1 zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Aktivität von pH 6,5 bis 9 mit einem stabilen Niveau bis pH 10 (Abbildung 11A). Das pH-Optimum in Bezug auf die Aktivität lag bei 9 mit einer Gesamtaktivität von 21080 ± 818 U/mg und bei > 9 in Bezug auf die Regioselektivität 13-HPODE-Isomers (Abbildung 11B). Das Sojabohnenextrakt wies ein pH-Optimum von 8 auf und es konnte eine Abnahme der Regioselektivität im neutralen und sauren Bereich beobachtet werden. Unterschiede in Aktivität und Selektivität sind auf die LOX-Isozyme 2 und 3 in den Sojabohnenpräparaten zurückzuführen, die bekanntermaßen eine 9- oder gemischte Regioselektivität, sowie eine höhere Aktivität bei niedrigeren pH-Werten aufweisen. Bei beiden Präparaten wurde der pH-Bereich von 8 – 10 als akzeptabel für die Entwicklung der Enzymkaskade mit ausreichender Aktivität und Regioselektivität beurteilt.

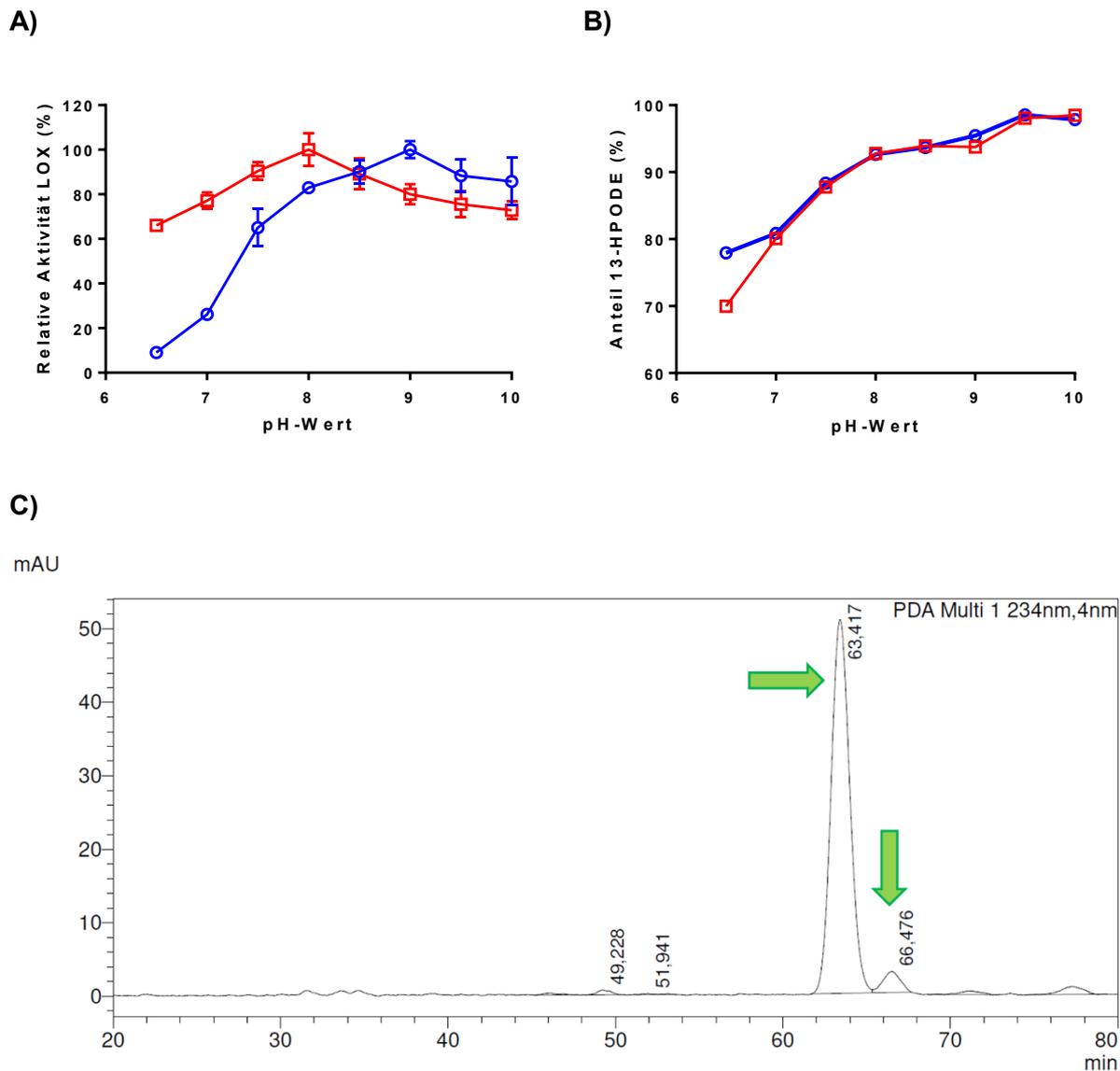


Abbildung 11: Aktivität (A) und Regioselektivität (B) von LOX-1 von Sigma Aldrich und einer Suspension aus Aceton-extrahiertem Mehl. ○ = LOX-1 von Sigma, □ = Sojamehlsuspension. C) Beispielchromatogramm der HPLC-Analyse von Hydroperoxidationsprodukten. Peaks wurden nach Abgleich mit Referenzstandards von Larodan zugeordnet. Elution von 13-Hydroxyoctadecadiensäure (13-HODE) erfolgte nach 49,2 min, 9-Hydroxyoctadecadiensäure (9-HODE) nach 51,9 min, 13-Hydroperoxyoctadecadiensäure (13-HPODE) nach 63,4 min (grüner Pfeil) und die Elution von 9-Hydroperoxyoctadecadiensäure (9-HPODE) nach 66,4 min (grüner Pfeil).

Als Ausgangspunkt der Optimierung der LOX-1 Hydroperoxidierung wurde der Effekt der Sauerstoffzufuhr und der Linolsäurekonzentration auf die Ausbeute an HPODE untersucht. Dazu wurde in 50 ml Ansätzen mit 50 mM Boratpuffer pH 9 die Sauerstoffzufuhr zwischen 0 und 100 ml/min und die Linolsäurekonzentration zwischen 1 und 100 mM variiert. Zu Beginn der Reaktion wurde der pH-Wert angepasst, und es wurden 1000 U/mM Substrat LOX-1 hinzugegeben. Periodisch wurde die Ausbeute photometrisch bestimmt und die Regioselektivität am Ende der zweistündigen Reaktion über HPLC-Analyse ermittelt.

Mit steigender Linolsäurekonzentration zeigte sich ein starker Abfall der HPODE Ausbeute nach 2 Stunden. Während bei Linolsäurekonzentrationen bis 3 mM noch beinahe quantitative Umsätze erreicht wurden, konnte bei 100 mM Substrat eine Ausbeute von nur 13 % erreicht werden (Abbildung 12A). Eine Erhöhung der Sauerstoffzufuhr auf 50 und 100 ml/min zeigte einen positiven Effekt bei niedrigen Substratmengen, welcher allerdings bei höherer Konzentration verschwand. Mit erhöhter Sauerstoffzufuhr blieb der Anteil an 13-HPODE im Produktgemisch konstant bei >80 % (Abbildung 12B). Ohne Sauerstoffzufuhr dagegen sank der Anteil mit steigender Substratkonzentration sukzessive ab von 94 % bei 1 mM auf 50 % bei 100 mM.

Die Tendenz zeigte deutlich eine schlechte Zugänglichkeit der Linolsäure mit steigender Konzentration des Substrates. Während der Reaktion ließen sich Stücke verseifeter Fettsäure erkennen, die den Zugang des Enzyms auf einen Großteil des Substrats verhinderten. Der Fokus der nächsten Schritte lag daher auf der Verbesserung der Zugänglichkeit des Substrates in einem alkalischen System. Schnell stellte sich auch heraus, dass sich die Schaumentwicklung in diesem Zweiphasensystem zu einem Problem entwickelte. Im Verlauf der Reaktion konnte bei einer Sauerstoffzufuhr von 100 ml/min eine große Menge an Reaktionslösung verloren gehen, weswegen die Flussrate auf 50 ml/min begrenzt wurde.

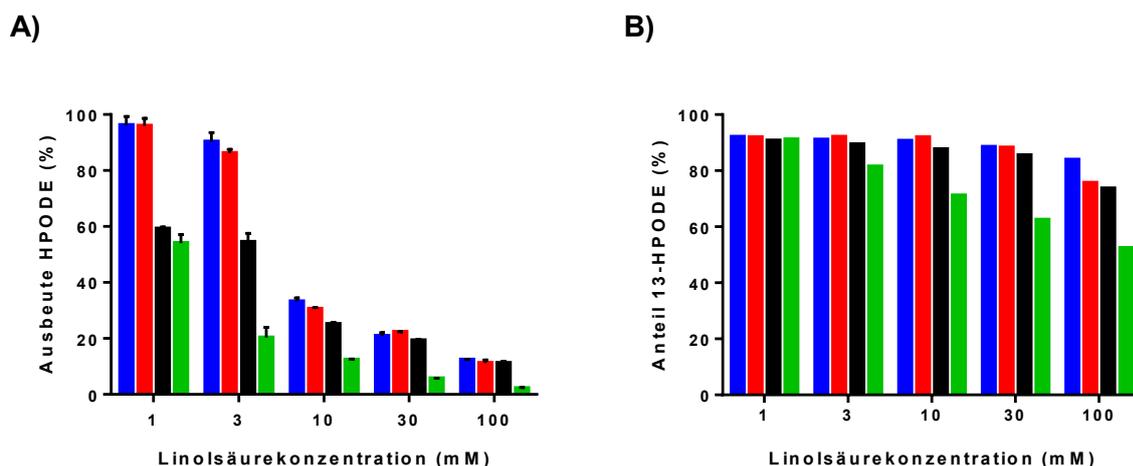


Abbildung 12: Effekte der Linolsäurekonzentration bei einer Sauerstoffflussrate von 0 – 100 ml/min auf die Produktbildung (A) und Regioisomerenverhältnis von 13-HPODE (B). ■ = Zufuhr von 100 ml/min Sauerstoff. ■ = Zufuhr von 50 ml/min Sauerstoff ■ = Zufuhr von 20 ml/min Sauerstoff ■ = Ohne Zufuhr von Sauerstoff.

Zur Verbesserung der HPODE-Ausbeute bei höheren Substratkonzentrationen wurden verschiedene Homogenisierungsmethoden getestet. Die Homogenisierung erfolgte vor der Biokatalyse für unterschiedliche Zeiträume entweder mit Ultra Turrax, Ultraschall oder durch Rühren mit einem Rührfisch bei 800 rpm. Die anschließende Reaktion erfolgte bei pH 9 mit 1.000 U/mM LOX-1 und einer Flussrate von 50 ml/min Sauerstoff für 2 Stunden.

Die Zeit der Homogenisierung wurde zwischen 30 min und 24 Stunden variiert, wobei nach 30 min keine Verbesserung der Ausbeute erzielt werden konnte. Somit wurde die Vorbehandlungszeit für alle weiteren Versuche auf 30 min begrenzt und die Substratmenge variiert. Die Ultraschallsonde wurde auf ca. 40 % Leistung eingestellt, um ein Überhitzen des Geräts zu vermeiden, während der Ultra Turrax auf ca. 12.000 rpm eingestellt wurde, um exzessives Schäumen zu vermeiden. Dabei zeigte sich eine verbesserte Umsetzung bei Substratkonzentrationen zwischen 10 und 30 mM bei beiden Homogenisierungsmethoden (Abbildung 13A). Bei 100 mM Linolsäure allerdings schien die Wahl der Homogenisierungsmethode keinen Effekt auf die Ausbeute an HPODE zu haben. Auch konnte in Abhängigkeit der Methode kein Effekt auf die Regioselektivität beobachtet werden. Auch in diesem Fall sank der Anteil an 13-HPODE von ca. 94 % bei 1 mM auf 80 % bei 100 mM Linolsäure.

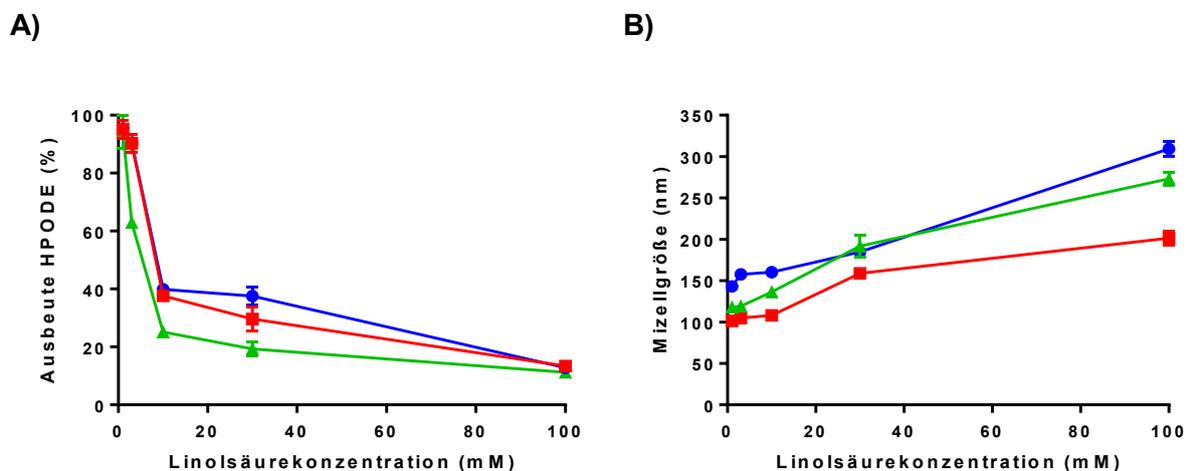


Abbildung 13: A) Einfluss von Ultraturax (●), Ultraschall (■) und Rühren (▲) auf die HPODE-Ausbeute. Die Reaktionen erfolgten nach 30 min Homogenisierung im 50 ml Maßstab bei pH 9. Die Rührgeschwindigkeit betrug 800 rpm. B) Mizellgröße in Abhängigkeit von Homogenisierung und Substratkonzentration mit Ultraturax (●), Ultraschall (■) und Rühren (▲). Die Messungen erfolgten nach 30 min Homogenisierung im 50 ml Maßstab bei pH 9 mit einem Zetasizer Nano ZS von Malven.

Zur näheren Untersuchung des Systems wurde die Mizellgröße mittels eines Zetasizers untersucht. Dabei zeigte sich allerdings keine Korrelation zwischen der Mizellgröße und der unterschiedlichen Umsätze bei Verwendung verschiedener Homogenisierungsmethoden (Abbildung 13B). Es lässt sich also kein Zusammenhang zwischen Mizellgröße und dem Gehalt freier Linolsäure, welche als Substrate für die Peroxidierung in Frage kommt, ersehen.

3.1.2 Untersuchung des Einflusses von Lösungsmitteln und Detergenzien

Zur Erhöhung der Zugänglichkeit des Substrates wurde in einem weiteren Optimierungsschritt der Einsatz von Lösungsmitteln verschiedener Polarität untersucht. Dazu wurde 5 % (v/v) des Lösungsmittels zu einem Reaktionsansatz bei pH 9 und 20.000 U/mmol LOX-1 gegeben. Die

Substratmenge belief sich auf 100 mM, und es wurde kontinuierlich 50 ml/min Sauerstoff hinzugepumpt. Die Aktivität wurde über die Konzentration an HPODE nach 5 min Reaktionszeit ermittelt, und die Reaktion wurde photometrisch bei 234 nm verfolgt. Obwohl DMSO, Heptan und 2-Propanol zu einer höheren anfänglichen LOX-Aktivität von bis zu 150 % führten, war die Ausbeute nach 2 Stunden bei allen Lösungsmitteln niedriger als unter lösungsmittelfreien Bedingungen (Abbildung 14). Das beste Lösungsmittel war DMSO mit einer relativen Ausbeute von 96 % im Vergleich zur Referenz ohne Lösungsmittel. Im Verlauf der Reaktion scheint es zu einer Deaktivierung des Enzyms, insbesondere in Anwesenheit von polaren organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, zu kommen.

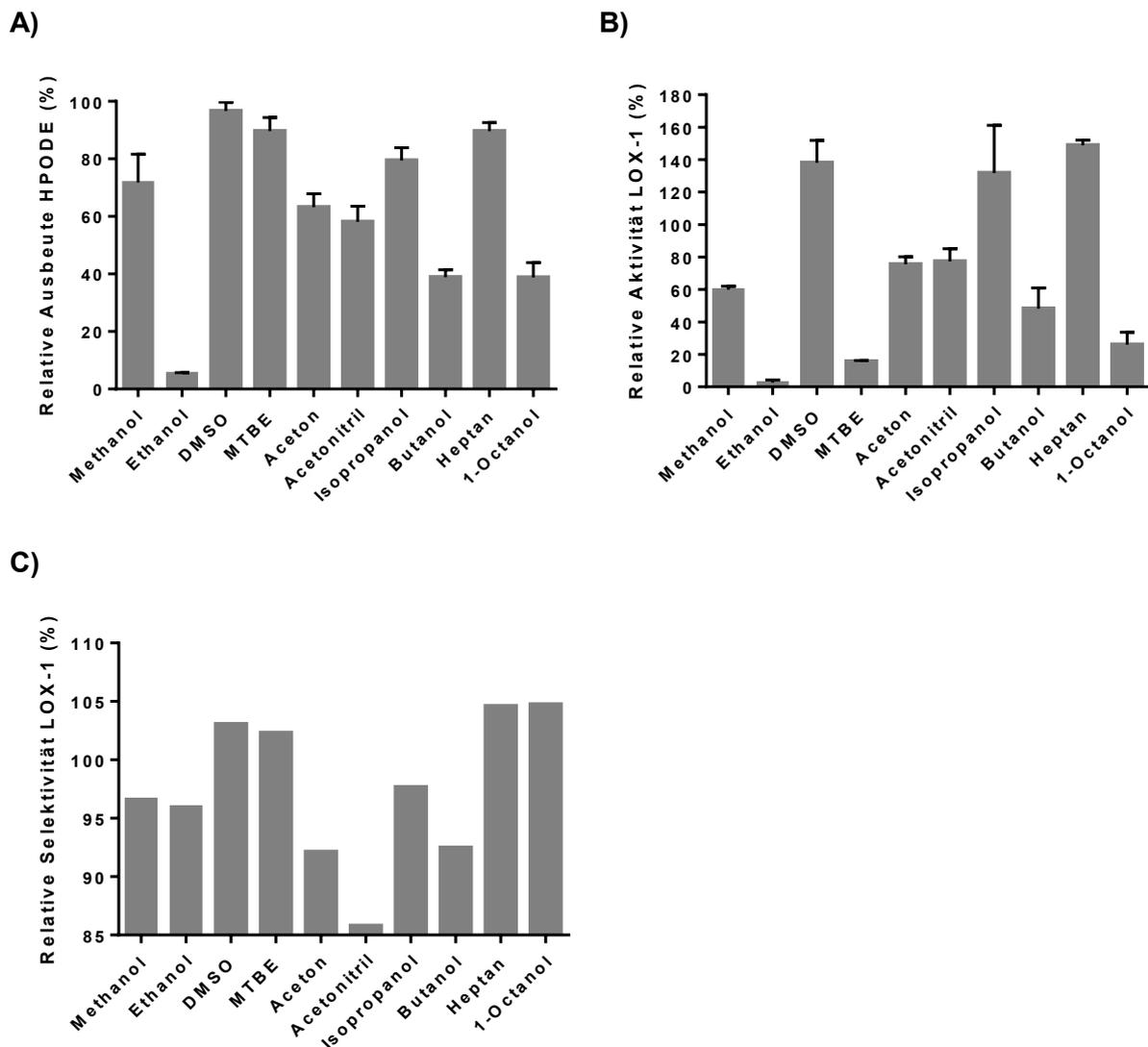


Abbildung 14: Einfluss von Lösungsmittel auf die HPODE-Ausbeute (A), LOX-1 Aktivität (B) und Regioselektivität (C). Die Aktivität wurde über Probennahme und photometrischer Messung nach 5 min Reaktionszeit ermittelt und die Gesamtausbeute nach 2 Stunden photometrisch und das Regioisomerenverhältnis über HPLC ermittelt. Ausbeuten und Aktivität wurden auf einem Ansatz ohne Lösungsmittel unter gleichen Bedingungen normiert.

Bei Vergleich der Abbildung 14A und 14C fällt eine Korrelation von 13:9 HPODE Verhältnis und Ausbeute auf. Je höher die gemessene Ausbeute an HPODE gewesen ist, desto höher war auch der Anteil von 13-HPODE am Produktgemisch. Es zeigte sich, dass der Anteil an 13-HPODE in der Produktlösung in Anwesenheit von DMSO, MTBE, Heptan und 1-Octanol höher war. Der höchste 13-HPODE-Anteil wurde bei Zugabe von Heptan mit ca. 87 % ermittelt. Ausnahme bildet in diesem Fall die Zugabe von 1-Octanol, bei der es im Verlauf der Reaktion zu einer starken Inaktivierung des Enzyms führte, während die Regioselektivität im Vergleich zur Referenz ohne Lösungsmittelzugabe sogar verbessert wurde.

Zur Erhöhung der Zugänglichkeit des Substrates wurde darüber hinaus der Einsatz von Detergenzien untersucht. Es wurden 16 Detergenzien, die einen Bereich von HLB-Werten (hydrophilic-liphophilic-balance) zwischen 5 – 18 abdeckten, getestet [33]. Dazu wurden in 50 ml 50 mM Boratpuffer pH 9 mit 100.000 U LOX-1 und 100 mM Linolsäure (1000 U/mM Substrat) 3 bis 12 % ((v/v) Substrat, (w/v) bei Feststoffen) Detergens hinzugegeben und die Reaktion mit 50 ml/min Sauerstoff für 2 Stunden und unter konstantem Rühren bei 800 rpm durchgeführt. Für die Untersuchung wurden sowohl petrochemisch hergestellte Detergenzien wie Tergitol NP-9/10 als auch biobasierte Detergenzien wie das Sorbitanmonooleat Span 80 oder das Alkylpolyglucosid Triton CG-110 verwendet. Detergenzien mit HLB-Werten zwischen 10 und 13 führten zu den höchsten Ausbeuten. Im Allgemeinen konnte eine starke Verbesserung der HPODE-Umsätze um bis zu 250 % für Triton CG-110 erreicht werden (Abbildung 15).

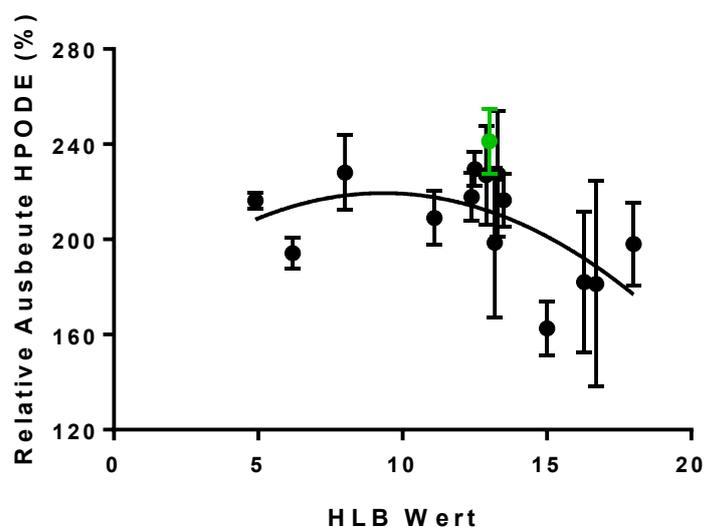


Abbildung 15: Gemittelte relative Ausbeute von Hydroperoxiden bei Zugabe von Detergenzien unterschiedlicher HLB-Werte. Grün markiert ist der Messwert für Triton CG-110. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen. Große Fehlerbalken resultieren aus der Schaumentwicklung die zu einem Verlust der Reaktionslösung führte.

Eine genaue Aufschlüsselung der Ausbeuten in Abhängigkeit der Tensidmenge zeigte, dass insbesondere die Anwesenheit der Tenside Tergitol 15-S-9, Triton CG-110, Tergitol NP-9 und Tergitol 15-S-3 die höchsten Ausbeuten an HPODE ermöglichten (Tabelle 18). Für weitere biokatalytische Umsetzungen wurde das Tensid Triton CG-110 in einer Konzentration von 3 % ((v/v) Substrat) gewählt. Dieses Tensid erlaubte mit minimaler Menge hohe Ausbeuten und entspricht als biobasiertes Tensid den Prinzipien der grünen Chemie. Es konnte gezeigt werden, dass Tenside im Gegensatz zu dem Einsatz von Lösungsmitteln und verschiedener Homogenisierungsmethoden verbesserte Ausbeuten auch bei höheren Substratkonzentration erlaubten.

Tabelle 18: Liste der Tenside nach HLB-Werten geordnet. Schwarz = nicht biobasiert, blau = teilweise biobasiert und grün = vollständig biobasierte Tenside. HPODE-Ausbeute in Anwesenheit von Detergenzien nach 2 Stunden Reaktionszeit mit 1.000 U LOX-1 pro mM Linolsäure. Referenz ohne Detergens erreichte eine Ausbeute von 13,7 %.

Tensid	HLB	Struktur	Tensid Konzentration:			
			3 %	6 %	9 %	12 %
			Ausbeute (%)			
Brij 93	4	Polyethylenglykol-oleylether	28,7	29,6	30,0	30,2
Span 80	4,3	Sorbitanmonooleat	25,5	24,7	30,5	31,9
Sophorolipid18:2	~ 6	Linolsäureglukosid	26,2	28,4	26,4	25,5
Tergitol 15-S-3	8,0	Sekundäre Alkoholethoxylate	28,5	29,7	35,4	31,5
Ecosurf SA-9	11,1	Saatölalkohole ethoxyliert propoxyliert	26,0	28,3	28,5	31,8
Brij O10	12,4	Polyoxyethylen-10-oleylether	27,1	27,8	30,5	31,9
Ecosurf EH-9	12,5	Ethylhexanol ethoxyliert propoxyliert	33,3	29,9	31,6	31,1
Tergitol NP 9	12,9	Alkylphenoethoxylat (APE)	26,2	30,3	31,5	36,4
Triton CG-110	~ 13	Alkylpolyglucosid	36,8	32,6	32,3	30,6
Tergitol 15-S-9	13,3	Sekundäre Alkoholethoxylate	27,6	28,3	25,3	38,4
Tergitol NP 10	13,3	Alkylphenoethoxylate (APE)	21,9	24,9	26,2	35,8
Triton X-100	13,4	Octylphenoethoxylat	28,5	27,8	31,6	30,8
Tween 80	15	Polyoxyethylen (20) sorbitanmonooleat	23,9	23,7	20,7	20,7
Tergitol 15-S-20	15,6	Sekundäre Alkoholethoxylate	31,5	20,9	20,8	26,6
Tween 20	16,7	Polyoxyethylen (20) sorbitanmonolaurat	16,5	30,8	30,7	21,4
Tergitol 15-S-40	18,0	Sekundäre Alkoholethoxylate	23,0	26,5	28,8	30,3

3.1.3 LOX-1 Hydroperoxidierung mit Tensid Triton CG-110

In vergleichenden Untersuchungen wurde die Enzymkonzentration in Anwesenheit von 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110 als auch ohne Tensidzugabe zwischen 20.000 U und 200.000

U LOX-1 pro mmol Substrat variiert. Die eingesetzten Linolsäurekonzentrationen lagen zwischen 1 und 100 mM. Die Reaktion erfolgte für 2 Stunden bei 50 ml/min Sauerstoffflussrate. Auch bei Einsatz von Detergens wurde eine Reduktion der Ausbeute in Abhängigkeit des Umsatzes bei höheren Substratkonzentration beobachtet (Abbildung 16). Bei Zugabe von 100.000 U/mmol Linolsäure konnte eine Ausbeute zwischen 60 und 50 % bei einer Linolsäurekonzentration von 10 bis 100 mM erreicht werden. Der positive Effekt der höheren Enzymmenge hat bei allen Enzymkonzentrationen einen positiven Effekt. Die größte Wirkung wurde bei mittleren Substratkonzentrationen beobachtet, wobei allerdings bei hohen LOX Mengen keine Steigerung der Ausbeute mehr erreicht wurde. Der Anteil von 13-HPODE am Produktgemisch erreichte bei niedrigen Linolsäurekonzentrationen und ohne Additiv ein Maximum von 95 % und sank im Verlauf auf bis zu 50 % ab. Der Anteil konnte durch Zugabe von Triton CG-110 und höherer Enzymzugabe bei 100 mM Linolsäure auf bis zu 91 % erhöht werden. Im Laufe der Experimente war eine Korrelation zwischen Ausbeute und Regioselektivität zu beobachten. Dies erlaubte den alleinigen Fokus auf die Verbesserung der Ausbeute an Hydroperoxiden.

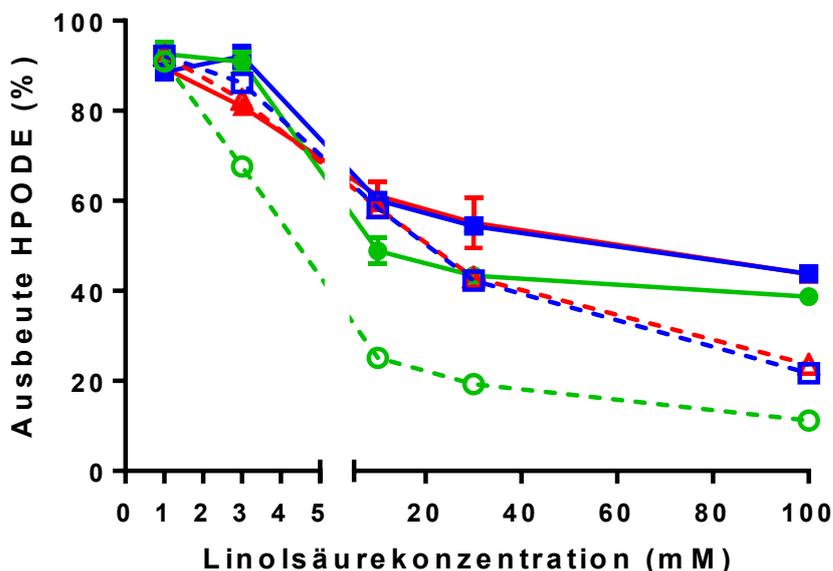


Abbildung 16: HPODE Ausbeute als Funktion der Linolsäurekonzentration und des Enzym-Substrat-Verhältnisses mit 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110 mit 20.000 U/mmol (○, ●), 100.000 U/mmol (□, ■) und 200.000 U/mmol (△, ▲). Die vollen Markierungen sind mit Detergens, während die leeren Symbole Ausbeuten ohne Detergens beschreiben.

Nach Verbesserung der Zugänglichkeit des Substrats durch Zugabe von Tensiden und der Optimierung der Enzymmenge wurde in einem weiteren Schritt der Einfluss der Rührgeschwindigkeit während der Reaktion untersucht. Dazu wurden in 50 ml 50 mM Borat Puffer pH 9 mit 100.000 U LOX-1 und 100 mM Linolsäure (20.000 U/mmol) 3 % ((v/v) Substrat)

Triton CG-110 hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit 50 ml/min Sauerstoff für 2 Stunden und unter konstantem Rühren bei 400 - 1000 rpm durchgeführt.

Es zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des Linolsäure-Umsatzes mit steigender Umdrehungszahl des Rührers bis zu einem Maximum von 42 % bei 800 rpm (Abbildung 17A). Bei einer weiteren Erhöhung der Umdrehungszahl sank die Ausbeute an Hydroperoxiden wieder auf unter 40 % ab. Zu beobachten war eine bessere Durchmischung des Reaktionsgemisches mit steigender Rührgeschwindigkeit. Bei 1.000 rpm kam es in einem 50 ml Ansatz jedoch zu einem größeren Verlust an Reaktionslösung, so dass in den folgenden Experimenten mit einer Rührgeschwindigkeit von 800 rpm weitergearbeitet wurde.

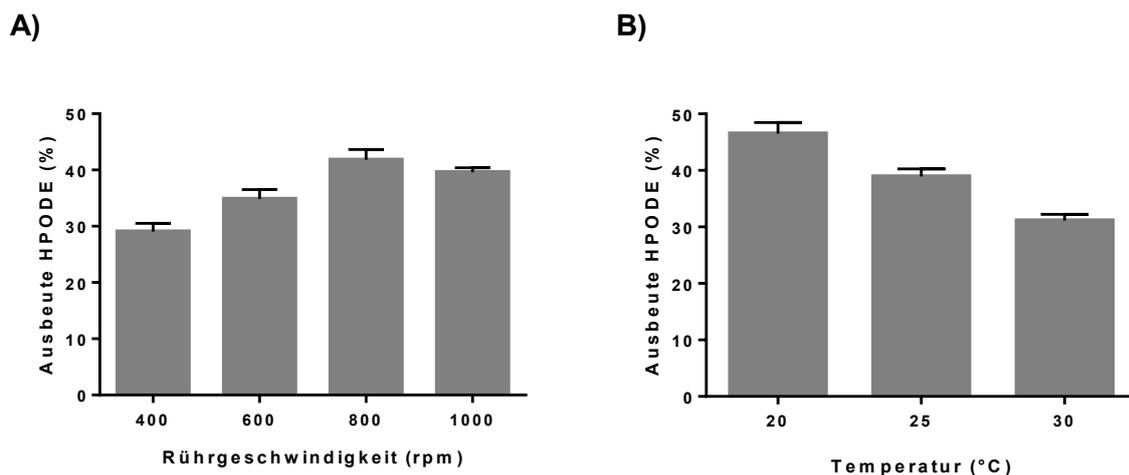


Abbildung 17: A) Ausbeute von Hydroperoxiden bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten nach 2 Stunden in einem 50 ml Ansatz mit einer Sauerstoffzufuhr von 50 ml/min und einer Enzymkonzentration von 20.000 U/mmol. B) Ausbeute HPODE nach 2 Stunden bei verschiedenen Reaktionstemperaturen. Eingesetzt wurden 30 mM Linolsäure und 30.000 U LOX-1.

Zur späteren Kopplung der Lipoxygenase mit einer geeigneten Lipase wurde überprüft, ob die LOX-1 katalysierte Hydroperoxidierung auch bei Temperaturen von bis zu 30 °C abläuft (Abbildung 17B). Dazu wurden 30 mM Linolsäure in Borat Puffer pH 9 vorgelegt, Triton CG-110 (3 % (v/v) Substrat) hinzugegeben und der pH vor Reaktionsstart angepasst. Die Reaktionsgefäße wurden auf Heizrührplatten gestellt und die gewünschte Temperatur eingestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30.000 U LOX Präparation gestartet und während der Reaktion 50 ml/min Sauerstoff zugeführt bei 800 rpm. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Reaktionstemperatur mit einer kontinuierlichen Abnahme des Umsatzes einherging. Dieser sank bei Erhöhung der Temperatur von 45 % auf 31 % bei 30 °C. Auch die Regioselektivität nahm durch die Erhöhung der Temperatur von 92 % auf ca. 78 % ab.

3.1.4 Scale-up zur Musterherstellung von Fettsäure-Hydroperoxiden

Zur Bereitstellung von 13-HPODE Mustern für die Folgearbeiten im Projekt Linopol wurde die HPODE-Synthese in einem Volumen von 1,5 l mit 30 mM Linolsäure (12,6 g) als Substrat mit einem angeschlossenen Überkopfrührer und kontinuierlicher Zugabe von Sauerstoff durchgeführt.

Verschiedene Mengen (0,3 - 1,5 l) einer 10 %igen (w/v) Sojamehlsuspension in einem großen Becherglas mit kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr und Linolsäure wurden im Hinblick auf HPODE-Ausbeute und Regiospezifität getestet. Es zeigte sich, dass mit zunehmendem Volumen der Sojamehlsuspension die Hydroperoxidausbeute von 60 % auf 80 % anstieg (Abbildung 18A). Im Gegensatz dazu nahm der Anteil an 13-HPODE mit der Menge an Sojamehl ab (Abbildung 18B). Ausgehend von 92 % 13-HPODE bei 30 g Sojamehl (0,3 l Suspension) sank der Anteil an 13-HPODE schrittweise auf 75 % bei 150 g Mehl (1,5 l Suspension). Trotz des alkalischen pH-Werts von 9,5, der LOX-1 begünstigt, konnten sich 9-HPODE und andere Nebenprodukte wie Hydroxysäuren bei höherer Konzentration der Mehlsuspension anreichern. Diese Beobachtung deutet auf mehrere Nebenreaktionen hin, die von anderen im Mehl vorhandenen Enzymen katalysiert werden. Mit zunehmender Konzentration der Sojabohnensuspension treten die Nebenreaktionen häufiger auf, was zu einem geringeren 13-HPODE-Anteil führt. In diesem Sinne wurde die anschließende 13-HPODE-Synthese für chemokatalytische Umsetzungen mit 30 g Sojabohnenmehl oder 300 ml Sojabohnenmehlsuspension in Höhe von 1.500.000 U Enzym in einem 1,5-l-Batch-System durchgeführt, was zu einer durchschnittlichen HPODE-Ausbeute von 60 % mit einem Verhältnis der Regioisomere von 92 % 13-HPODE führte.

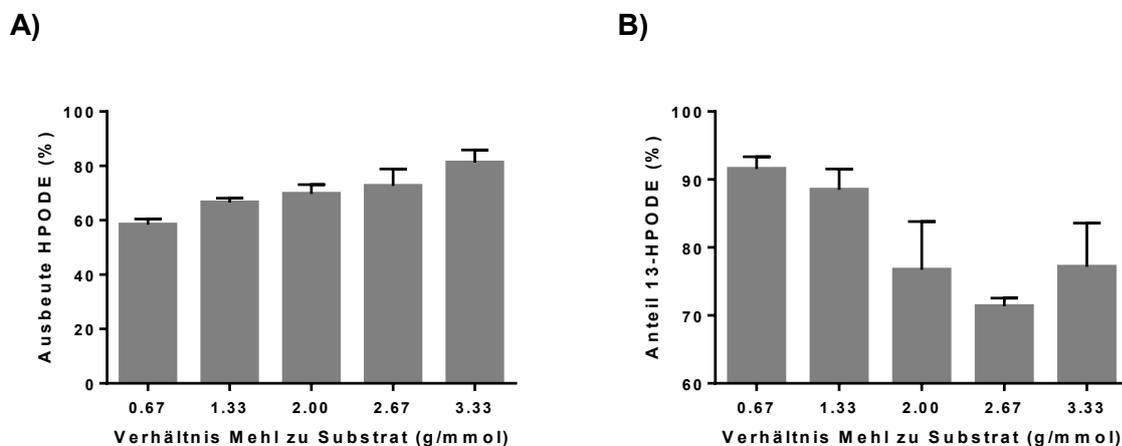


Abbildung 18: Ausbeute (A) und Anteil von 13-HPODE (B) im Produktgemisch nach der Extraktion. Die Ausbeute und das Regioisomerenverhältnis wurden photometrisch und mittels HPLC bestimmt. Die Menge an Sojamehl wurde zwischen 30 und 150 g (0,3 - 1,5 l Suspension) variiert.

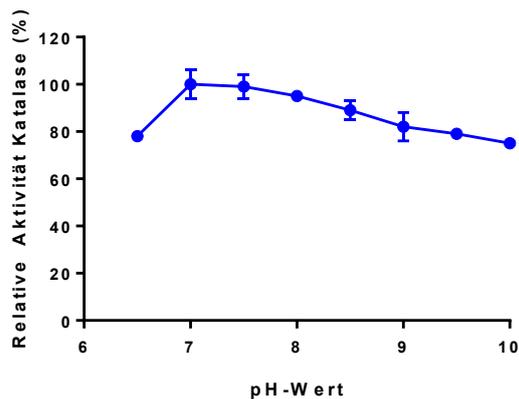
3.2 Entwicklung einer Enzymkaskade mit LOX-1, Lipase und Katalase

Nach Optimierung der Hydroperoxidierungsreaktion wurden 12 Lipasen unter optimierten LOX-Bedingungen auf ihre Hydrolyseaktivität hin getestet und die Konzentration der Katalase an die Wasserstoffperoxid Zufuhr angepasst. Schrittweise wurde dann ein LOX + Katalase System und ein LOX + Lipase System untersucht, bevor die komplette Kaskade aus LOX + Katalase + Lipase implementiert wurde.

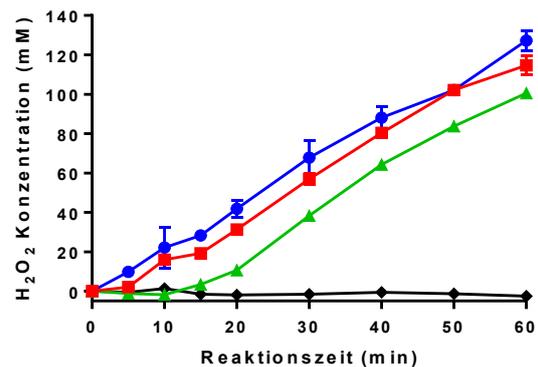
3.2.1 LOX-1 Hydroperoxidierung mit gekoppelter *in situ* Sauerstofferzeugung

Im gekoppeltem Reaktionssystem war eine doppelte Verwendung der Katalase vorgesehen: Neben der Erzeugung von gelöstem oder fein verteiltem Sauerstoff für die LOX-1-katalysierte Hydroperoxidation war die Schaumreduktion ein wichtiges Thema im mehrphasigen Reaktionssystem. In dem optimierten Reaktionssystem macht die Zugabe des Tensids Triton CG-110 und die intermediäre Bildung von Partialglyceriden während der Distelöl-Hydrolyse die Schaumkontrolle für eine Anwendung im größeren Maßstab unerlässlich. Für die *in situ* Sauerstoffproduktion wurde Katalase aus *Micrococcus lysodeikticus* ausgewählt, ein kostengünstiges Enzym mit hoher enzymatischer Aktivität über einen breiten pH-Bereich [243]. Zunächst wurde die Aktivität der Katalase in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht (Abbildung 19A). Es zeigte sich eine hohe Aktivität bei allen getesteten pH-Werten, die ein Maximum von 6.500.000 U/mg bei pH 7 aufwies. Bei pH 8 – 9 zeigte die Katalase immer noch 95 – 82 % ihrer maximalen Aktivität.

A)



B)



C)

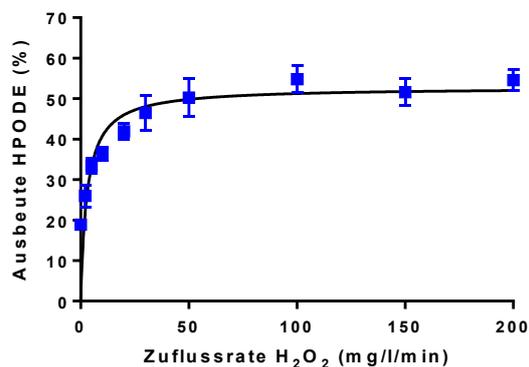


Abbildung 19: A) Aktivität der getesteten Katalase aus *M. lysodeikticus* in einem pH-Bereich von 6,5 bis 10. Die Maximale spezifische Aktivität wurde bei pH 7 mit 6.500.000 U/mg Enzym ermittelt. Bei pH 8 zeigte das Enzym noch 95 % und bei pH 9 82 % Aktivität. B) Evaluierung der Mindestmenge an Katalase aus *M. lysodeikticus* nötig zur kontinuierlichen Umsetzung von H₂O₂ bei einer Flussrate equivalent zu 50 ml/min Sauerstoffzufuhr über 60 min. ● = keine Katalase, ■ = 100 U/μmol, ▲ = 300 U/μmol und ◆ = 1000 U/μmol. C) Ausbeute an HPODE bei Variation der H₂O₂-Zufussrate nach 3 Stunden bei pH 8. Es wurden 30 mM Linolsäure und 3 % (w/v) Triton CG-110 sowie 20.000 U Katalase pro μmol Wasserstoffperoxid in Puffer pH 8 vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150.000 U LOX-1 gestartet.

Bei einem pH-Wert von 9 wurde die Enzymkonzentration auf einen Wert angepasst, der die sofortige Hydrolyse von H₂O₂ garantierte, um eine unselektive Oxidation der Lipide und einen oxidativen Enzymabbau zu verhindern. Die folgenden Untersuchungen zeigten, dass mindestens 1.000 U Katalase pro μmol Gesamtzugabe an Wasserstoffperoxid für eine kontinuierliche Substratumsetzung im Reaktionsverlauf benötigt wurden (Abbildung 19B).

Nach Anpassung der Katalasemenge wurde die Dosierung von Wasserstoffperoxid in Präsenz von LOX-1 variiert. Durch Tests konnte gezeigt werden, dass LOX-1 schon bei niedrigen H₂O₂

Konzentrationen deaktiviert wird (hier nicht gezeigt). Aus diesem Grund ist es wichtig das hinzugegebene Wasserstoffperoxid sofort umzusetzen. Um eine etwaige Akkumulation zu unterbinden, wurde die Katalasemenge von den mindestens notwendigen 1.000 U pro μmol H_2O_2 auf 20.000 U pro μmol H_2O_2 erhöht, die H_2O_2 Zuflussrate zwischen 0 und 200 mg//min bei optimierten LOX-Bedingungen variiert und die Ausbeute nach 3 Stunden bei pH 8 untersucht. Um den pH-Wert während der Reaktion konstant zu halten, wurde die 30 %ige H_2O_2 Lösung in 200 mM Tris-HCl Puffer pH 8 gelöst. Der pH wurde mit einem pH-Meter überwacht und bei Abweichungen von $>0,05$ durch Zugabe von 3 M NaOH Lösung angepasst. Die Linolsäure Konzentration lag bei 30 mM, und es wurden 150.000 U LOX-1 eingesetzt. Mit steigender H_2O_2 -Zuflussrate stieg die Ausbeute an HPODE steil an bis ein Plateau bei ca. 50 mg//min H_2O_2 erreicht wurde (Abbildung 19C). Es wurde eine maximale Umsetzung von ca. 55 % erreicht, die auch durch weitere Erhöhung der Zuflussrate nicht verbessert werden konnte. Die Regioselektivität lag mit ca. 90:10 13:9 HPODE unter der Selektivität von 95 % 13-HPODE bei pH 9. Ein Referenzversuch bei pH 8 mit kontinuierlicher Begasung von 50 ml/min Sauerstoff bestätigte die schlechtere Selektivität der LOX-1 bei pH 8. Es konnte somit gezeigt werden, dass die *in situ* Sauerstofferzeugung zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Begasung mit Sauerstoff in Bezug auf 13-HPODE Ausbeute und Selektivität führte. Die Schaumbildung war bei allen untersuchten H_2O_2 -Zuflussraten im Vergleich zu einer Begasung mit Sauerstoff wesentlich (Reduktion um 80 – 90 %) verringert.

3.2.2 Selektion einer geeigneten Lipase

Die Selektion einer geeigneten Lipase für die Hydrolyse von Distelöl erfolgte unter optimierten LOX-Bedingungen bei pH 9 mit einer Distelölkonzentration äquivalent zu 30 mM Linolsäure. Um einen konstanten pH-Wert auch nach Freisetzung der Fettsäuren zu gewährleisten, wurde ein 200 mM Puffer eingesetzt und periodisch über eine pH-Sonde der pH-Wert angepasst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 % ((w/v) Substrat) Enzym gestartet. Es zeigte sich bald, dass die Ausbeute an freien Fettsäuren nach GC-Analyse ein Maximum von 18 % erreichte (Abbildung 20A). Zur Verbesserung der Ausbeute konnte, ohne die LOX-Reaktion zu sehr zu beeinflussen, nur der pH-Wert variiert werden. Eine Erhöhung des pH-Werts auf 10 führte zu einer frühen Deaktivierung der Lipase, sodass kein Enzym hydrolytische Aktivität zeigte. Für möglichst hohe Ausbeuten, ohne zu sehr an der Regioselektivität der LOX einzubüßen, wurde der pH-Wert deshalb auf 8 verringert. Bei diesem pH-Wert konnte eine hohe Selektivität von ca. 90 % der LOX gewährleistet werden bei gleichzeitiger hoher hydrolytischer Aktivität der Lipasen (Abbildung 20B).

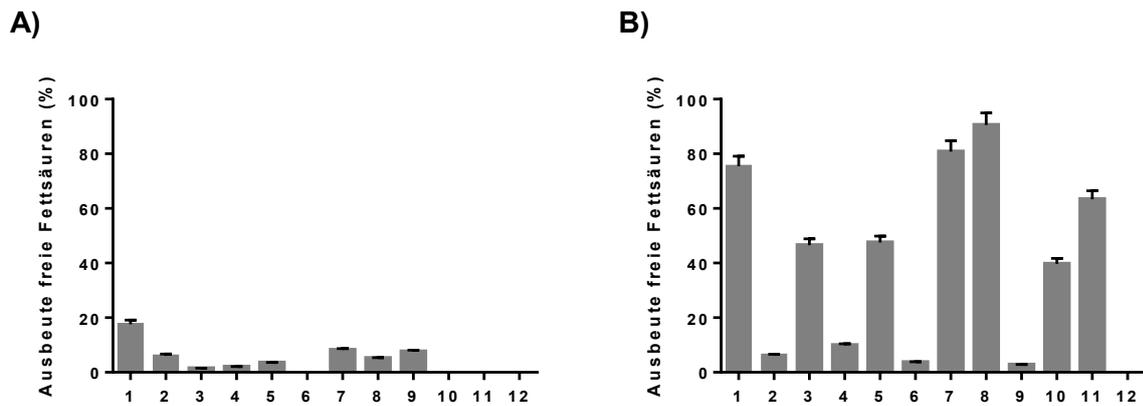


Abbildung 20: Ausbeute an freien Fettsäuren bei der Hydrolyse von Distelöl mit Lipasen bei pH 9 (A) und pH 8 (B). Die Reaktion wurde nach 5 Stunden durch Zugabe von HCl gestoppt und die Lipidphase anschließend in Ethylacetat extrahiert und die Ausbeute mittels GC bestimmt. 1) Amano (*P. fluorescens*). 2) Amano G (*P. camemberti*). 3) Amano PS (*B. cepacia*). 4) Novozymes Lipolase 100 L (*T. lanuginosis*). 5) Novozymes Eversa Transform 2.0. 6) Novozymes CalB L (*P. antarctica*). 7) Amano AY 30 (*C. rugosa*). 8) Lipase CCL (*C. rugosa*). 9) Palatase 20000 L. 10) Amano F-AP 15. 11) Amano M (*M. javanicus*). 12) Amano A (*A. niger*)

Parallel dazu durchgeführte Untersuchungen der zeitabhängigen Hydrolyse zeigten, dass Lipasen eine *Lag*-Phase aufweisen (Abbildung 21A). Bis auf die Lipase von Amano aus *P. fluorescens* zeigten alle untersuchten Enzyme diese *Lag* Phase, die sich im Fall von Amano AY 30 aus *C. rugosa* auf eine Stunde ausdehnen konnte. Die Lipasen aus *C. rugosa* setzten nach 5 Stunden 80 – 90 % der Fettsäuren frei, während die Lipase aus *P. fluorescens* einen Hydrolysegrad von 75 % erreichte (Abbildung 21A). Für die kombinierte Kaskade aus Lipase und LOX-1 wurde die Lipase aus *P. fluorescens* gewählt. Sie war im Vergleich zu den anderen Lipasen in der Lage, das Distelöl schneller umzusetzen und schon nach 3 Stunden einen relativ hohen Hydrolysegrad von 75 % zu erreichen.

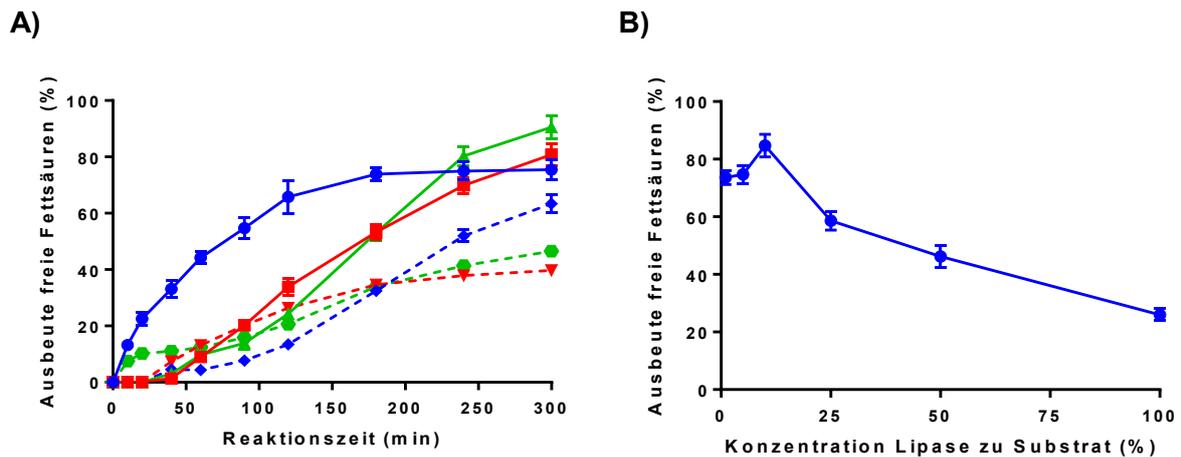


Abbildung 21: Zeitverlauf der Hydrolyse von Distelöl mit Lipasen bei pH 8 (A) und Ausbeute an freien Fettsäuren bei der Hydrolyse von Distelöl mit Lipase aus *P. fluorescens* bei pH 8 (B). Die Reaktion wurde nach 5 Stunden durch Zugabe von HCl gestoppt und die Lipidphase anschließend in Ethylacetat extrahiert und mittels GC analysiert. ● = Amano Lipase *P. fluorescens*, ▲ = Lipase CCL, ■ = Lipase AY, ◆ = Lipase M, ▼ = Lipase F-AP 15 und ● = Lipase PS.

Zur weiteren Erhöhung der Ausbeute an freien Fettsäuren wurde die Menge an Lipase aus *P. fluorescens* zwischen 1 und 100 % (w/v) vom Substrat variiert. Bei höheren Enzymmengen fand eine kontinuierliche Verbesserung des Hydrolysegrades statt, wobei das Maximum mit 85 % bei einem Enzym-Substratverhältnis von 10 % (w/v) erreicht wurde (Abbildung 21B). Bei weiterer Erhöhung der Enzymmenge sank die Ausbeute an freien Fettsäuren dagegen kontinuierlich ab bis diese bei einem Verhältnis von 100 % (w/v) bei 25 % lag.

3.2.3 Kombinierte Hydrolyse und Peroxidierung mit Lipase und LOX-1

Die Kombinierte Hydrolyse und Peroxidierung wurde mit *P. fluorescens* Lipase unter optimierten Bedingungen mit Distelöl äquivalent zu 30 mM Linolsäure und 150.000 U LOX-1 durchgeführt. Es zeigte sich, dass ein solches System nur geringe Ausbeuten von ca. 20 % HPODE erreichte (Abbildung 22A). Die geringe HPODE Ausbeute ist auf eine geringe Hydrolyse zurückzuführen (Abbildung 22B). Als Grund wurde eine Deaktivierung der Lipase vermutet. Mit dem Ziel einen möglichst hohen Hydrolysegrad zu erreichen, wurde die LOX mit einer Rate von 10.000 U/Stunde/mmol Substrat hinzugegossen. Dazu wurde die LOX in Tris-HCl Puffer pH 8 gelöst und alle 10 min mit einer Pipette eine definierte Menge hinzugegeben. Abbildung 22A zeigt den Unterschied zwischen Dosierung und Vorlegen von LOX mit 10 % (w/v) *P. fluorescens* Lipase. In Vergleichsversuchen wurde die LOX mit 30 mM Linolsäure als Substrat und ohne Lipase entweder kontinuierlich zu getropft oder zu Beginn vorgelegt. Die maximal hinzu getropfte Menge an LOX bei kontinuierlicher Zugabe belief sich auf 30.000 U/mmol Substrat, während bei der einmaligen Zugabe 100.000 U/mmol hinzugegeben wurden. Bei Vergleich der Ansätze fällt auf, dass bei Einsatz von Linolsäure als Substrat, die Art der Zugabe keine Rolle für die Ausbeute an HPODE nach 3 Stunden spielt.

Sowohl bei kontinuierlicher als auch einmaliger Zugabe erreicht die Ausbeute bei ca. 60 % ein Plateau. Bei den Ansätzen, in denen die Hydrolyse und die Peroxidierung in einer Eintopfreaktion gekoppelt vorlagen, machte die Art der Zugabe allerdings einen großen Unterschied aus. Während bei der Einmalzugabe von LOX nur eine Ausbeute von 20 % HPODE erreicht wurde, konnte bei LOX-Dosierung eine HPODE-Konzentration von etwa 80 % nach 3 Stunden ermittelt werden und übertraf damit überraschend die Kontrollreaktion mit LOX-1-Dosierung ausgehend von Linolsäure. Zur näheren Untersuchung dieses Verhaltens wurde die Säurezahl der unterschiedlichen Ansätze wie in Abschnitt 2.4.8 beschrieben ermittelt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der nur Lipase und Distelöl enthielt (Abbildung 22B).

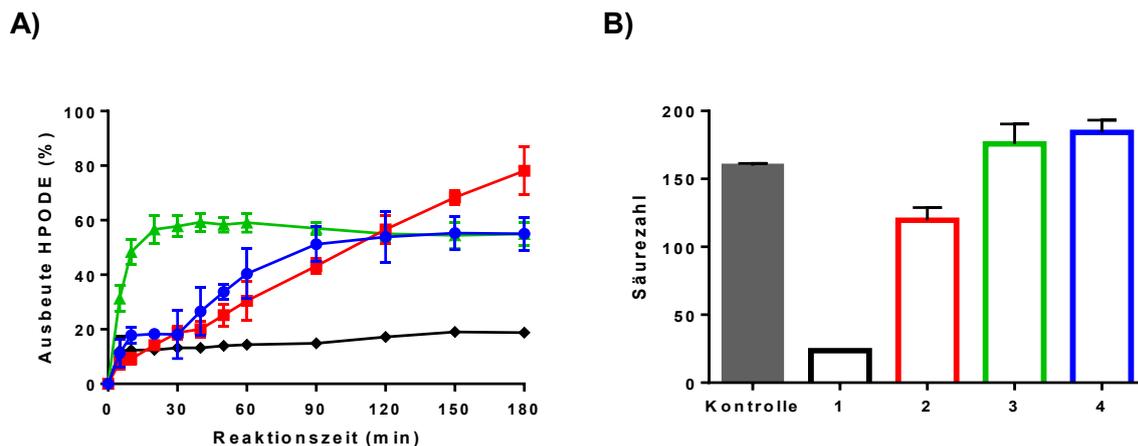


Abbildung 22: (A) Hydroperoxidierung von Distelöl ausgehend mit *P. fluorescens* Lipase und LOX: ◆ = LOX-Zugabe zu Beginn, ■ = LOX-Dosierung, ▲ und ● = Vergleich der Hydroperoxidierung von Linolsäure mit LOX-Zugabe zu Beginn der Reaktion ▲ und Dosierung ●, (B) Säurezahl nach 3 Stunden Reaktion. Die Kontrolle enthielt nur Lipase und Distelöl.

Zur Überprüfung der UV-234-nm-Messungen wurde eine GC-basierte Quantifizierung etabliert (Abbildung 23). Nach Hydrierung der Hydroperoxide mit Natriumborhydrid war eine Analyse von Hydroxiden und restlicher Linolsäure in Gegenwart von Glyceriden mit einer Hochtemperatur-GC-Säule möglich. Das Verhältnis von Hydroperoxid zu Linolsäure der Reaktion mit kombinierter Lipasehydrolyse und LOX-1-Dosierung betrug 84:16 im Vergleich zu 64:36 ausgehend von Linolsäure (Tabelle 19).

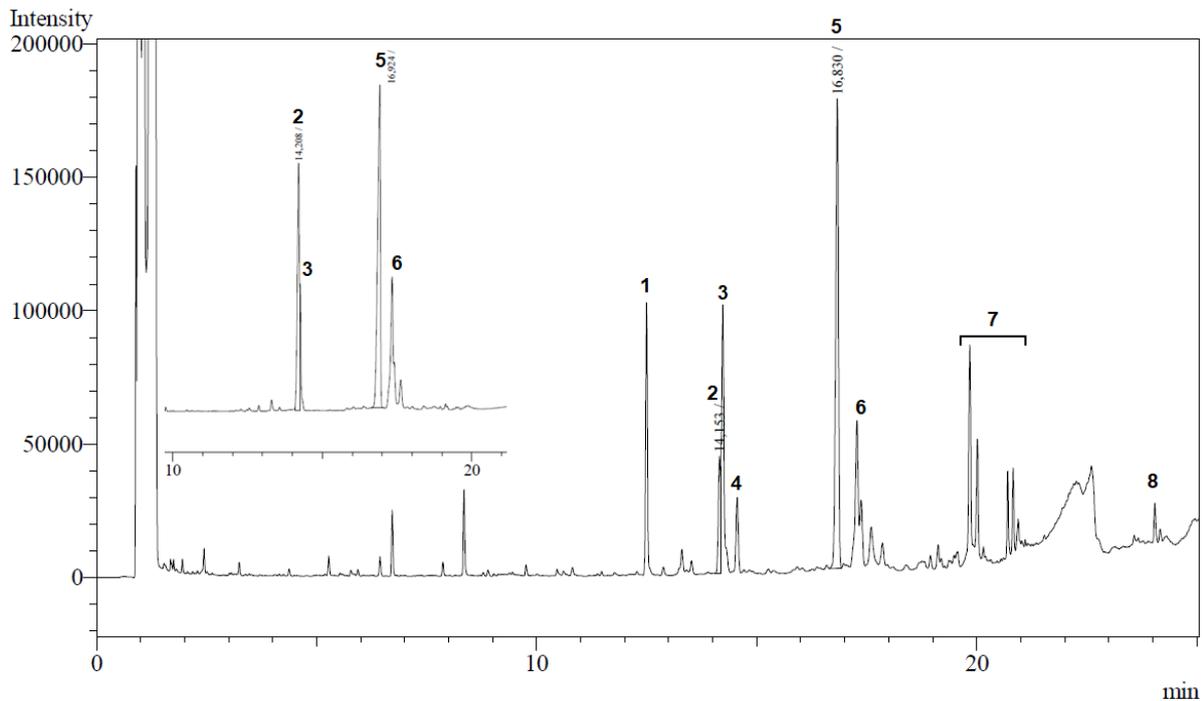


Abbildung 23: Vergleichende Hochtemperatur-GC-Analyse der Hydroperoxidationsprodukte nach Hydrierung und Silylierung ausgehend von Distelöl und Linolsäure (kleiner Ausschnitt) – Bedingungen mit LOX-1-Dosierung wie in Abbildung 22A gezeigt. Die Peakzuordnung erfolgte mit Referenzverbindungen: (1) Palmitinsäure, (2) Linolsäure, (3) Ölsäure, (4) Stearinsäure, (5) Hydroxyoctadecadiensäure (HODE), (6) sauerstoffhaltige Nebenprodukte, (7) Monoglyceride, (8) Diglyceride.

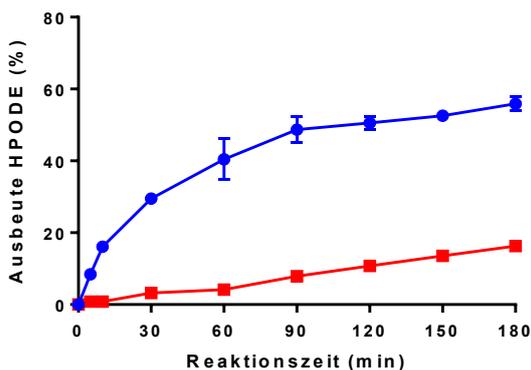
Tabelle 19: Analyse der HPODE-Bildung und Hydrolysegrad der Experimente aus Abbildung 22. Säurezahlbestimmung erfolgte durch Titration der Lipidphase mit KOH-Lösung. HPODE zu Linolsäure Verhältnis wurde durch GC-Analyse bestimmt. Hydrolysegrad wurde bestimmt aus durchschnittlichem Molgewicht nach Hydroperoxidierung und der Säurezahl.

Substrat	Linolsäure	Linolsäure	Distelöl	Distelöl	Distelöl
Enzymzugabe	LOX direkt	LOX dosiert	LOX direkt	LOX dosiert	Nur Lipase
Säurezahl	176 ± 15	184 ± 9	23,5 ± 0,2	134 ± 9	160 ± 2
HPODE/Linolsäure	67 : 33	64 : 36	61 : 39	84 : 16	-
Hydrolysegrad	-	-	12 ± 0,1	72 ± 5	80 ± 1

Zur Untersuchung, ob die höhere Ausbeute an HPODE durch Umsetzung der Fettsäureglyceride zustande kam, wurde die Reaktion von LOX mit Linolsäure und Linolsäuremonoglycerid verglichen. Es zeigte sich dabei eine um vielfach bessere Umsetzung der Linolsäure im Vergleich zum Monoglycerid. Das Enzym zeigte dabei eine Aktivität von maximal 339 ± 26 U/mg gegenüber Linolsäure und 32 ± 8 U/mg mit Monolinoleat als Substrat. Entsprechend verhielt sich die Ausbeute an HPODE und peroxidierten Glyceriden, die bei

Einsatz von Linolsäure wesentlich höher war als bei Einsatz von Monolinoleat (Abbildung 24A). Neben einer Umsetzung von Fettsäureglyceriden, könnte die Anwesenheit von Glycerol in der Reaktionslösung eine Auswirkung auf die HPODE-Ausbeute haben. Es zeigte sich ein positiver Einfluss des Glycerols als Löslichkeitsvermittler, insbesondere in einem Zeitintervall von 30 bis 150 min der Reaktion (Abbildung 24B). Der Einsatz von Glycerol hatte einen positiven Einfluss auf die Substratzugänglichkeit. Allerdings schien auch noch ein anderer Mechanismus zu wirken, da am Ende nach 3 Stunden Reaktionszeit, die Kurven aller Ansätze sich wieder einander näherten. Dieser positive Effekt ist also nur temporär begrenzt (Abbildung 24B).

A)



B)

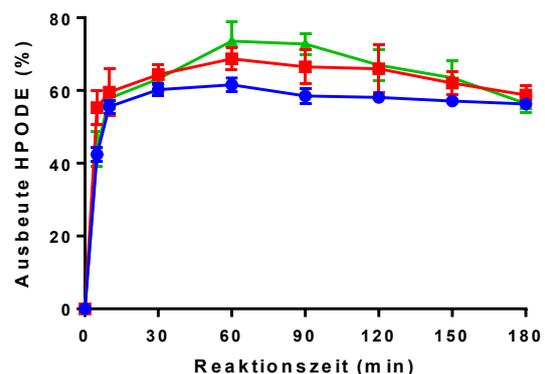


Abbildung 24: A) Vergleich der HPODE-Ausbeuten bei Verwendung von Linolsäure (●) und Linolsäuremonoglycerid (■) bei pH 8. Die Reaktion fand unter optimierten Bedingungen bei 1 mM Substratkonzentration und 1.000 U LOX statt. B) Vergleich der Umsetzung von Linolsäure ohne Glycerol (●) und in der Präsenz von 30 (■) und 100 mM Glycerol (▲). Die Reaktionen wurden mit 100.000 U LOX-1 pro mmol Substrat und 30 mM Linolsäure mit 3 % Triton CG-110 ((w/v) Substrat) bei pH 8 durchgeführt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde nun unter optimierten Bedingungen die LOX-Dosierung variiert. Die Reaktion erfolgte über 5 Stunden und es wurde Distelöl äquivalent zu 30 mM Linolsäure vorgelegt. Es wurden 3.000, 7.500 oder 15.000 U LOX-1 pro Stunde hinzugegeben. Dabei zeigte sich mit steigender LOX-Zufuhr eine schnellere Umsetzung bis zu einer Ausbeute von >80 % (Abbildung 25A). Bei einer Dosierung von 15.000 U/Stunde zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Hydrolysekurve und der HPODE-Ausbeute, weswegen diese Dosierung auch für weitere Versuche beibehalten wurde.

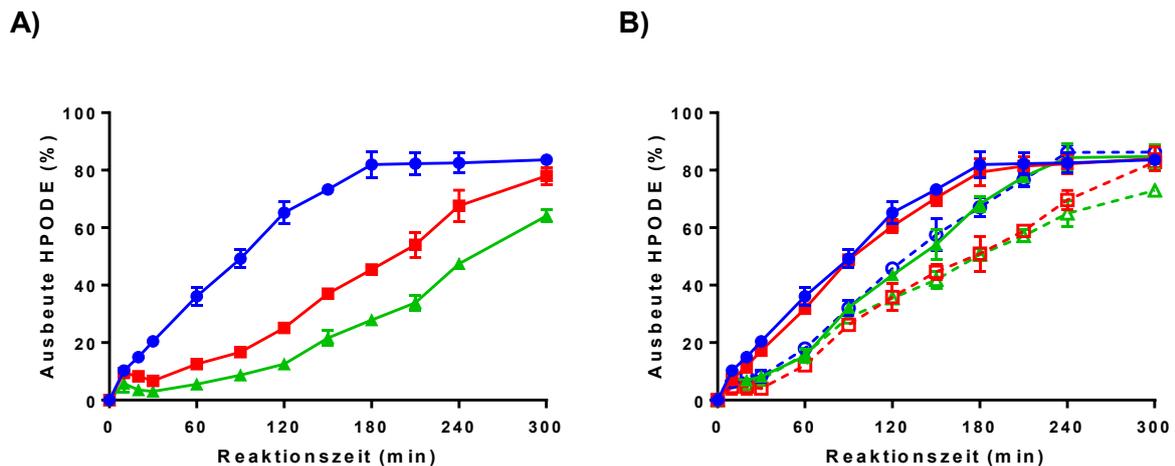


Abbildung 25: A) Analyse der HPODE-Ausbeute bei verschiedenen LOX-Dosierungen ausgehend von Distelöl. Distelöl äquivalent zu 30 mM Linolsäure wurde mit *P. fluorescens* Lipase hydrolysiert während entweder 3.000 (▲), 7.500 (■) oder 15.000 U/Stunde (●) hinzugegeben wurden. Reaktionen erfolgten unter optimierten Bedingungen. B) Analyse der HPODE-Ausbeuten basierend auf dem Gehalt an Linolsäure mit Sojamehl Suspension und LOX-1 ausgehend von Distelöl mit Lipase aus *P. fluorescens*. ●,○ = HPODE-Ausbeute bei einer Distelölkonzentration äquivalent zu 30 mM Linolsäure mit LOX-1/Sojamehlsuspension. ■,□ = HPODE-Ausbeute bei Verwendung von LOX-1/Sojamehlsuspension und einer Distelölkonzentration äquivalent zu 60 mM und 100 mM Linolsäure (▲,△).

Nach Anpassung der LOX-Zugabe an die Lipase-katalysierte Hydrolyse wurde die Menge an Distelöl äquivalent zu 30 bis 100 mM Linolsäure variiert, sowie die Verwendung von Sojamehl Suspension als LOX-Quelle untersucht. Das eingesetzte Volumen an Distelöl wurde auf das Startvolumen von 50 ml eingestellt. Die Reaktionen liefen unter optimierten Bedingungen, wie in Tabelle 20 dargestellt, ab. Die Reaktionsansätze mit der käuflichen LOX-Präparation hatten ein Endvolumen von ca. 51 ml. Aufgrund der geringen Aktivität in der Sojamehlsuspension (5.100 U/ml) stieg das Volumen in diesen Ansätzen auf etwa das Doppelte an. Die Endkonzentration des Substrats betrug nach 5 Stunden also nur die Hälfte.

Tabelle 20: Optimierte Parameter für die Enzymkaskade mit Lipase und LOX.

Parameter	Einstellung
Volumen	50 ml 200 mM Tris-HCl Puffer
pH-Wert	8
Agitation	800
Temperatur	20 °C
Lösungsmittel	nein
Sauerstoff	50 ml/min
Reaktionszeit	5 Stunden
Lipase	<i>P. fluorescens</i> 10 % ((w/v) Substrat) zu Beginn
LOX	500 U/mM als LOX-1/Mehlsuspension
Distelöl	Äquivalent zu 30 – 100 mM Linolsäure
Tensid	Triton CG-110 3 % ((v/v) Substrat)

Mit steigender Substratkonzentration zeigte sich eine verlängerte *Lag*-Phase, die bei Verwendung von Mehlsuspension auch schon bei 30 mM Linolsäure auftritt. Grund dafür könnte eine schlechtere Zugänglichkeit des Substrats oder eine langsamer ablaufende Aktivierung der Enzyme sein. Nach 5 Stunden wurde eine maximale Ausbeute von >80 % für die meisten Ansätze ermittelt (Abbildung 25B). Die Hydrolyse von Distelöl durch die Lipase erreichte einen maximalen Hydrolysegrad von 85 %. Es konnten also HPODE-Ausbeuten von >94 % der freien Linolsäure erreicht werden bei einer Regioselektivität von 90:10 13:9 HPODE. Die Aufarbeitung der Produkte erfolgte durch Ansäuern und Extraktion in Ethylacetat. Bei Verwendung größerer Mengen Mehlsuspension erfolgte die Phasentrennung entweder sehr langsam oder gar nicht. Aufgrund dessen wurde für diese Ansätze MTBE als Extraktionsmittel gewählt, wodurch eine bessere Trennung der Phasen ermöglicht wurde.

3.2.4 Enzymkaskade mit LOX-1, Katalase und Lipase

Die Produktion von Schaum war auch in den LOX+Lipase Ansätzen ein Problem. In diesem Reaktionssystem lagen zum einen tensidische Fettsäuren und Partialglyceride mit tensidischen Eigenschaften bei basischem pH vor, zum anderen wurde noch Detergens in Form von Triton CG-110 zur besseren Zugänglichkeit des Substrats hinzugefügt während darüber hinaus kontinuierlich Sauerstoff in die Reaktionslösung dosiert wurde. All diese Faktoren führten zu einer starken Schaumentwicklung. Da diese Schaumentwicklung für Anlagen im industriellen Maßstab problematisch ist, wurde die *in situ* Sauerstoffgenerierung

mit Hilfe von H_2O_2 und Katalase aus *M. lysodeikticus* implementiert. Bei einer Flussrate von 100 mg/l/min H_2O_2 konnte sowohl die Schaumentwicklung verringert werden, wie auch eine gute Reaktion der LOX sichergestellt werden. Im folgenden Bild lässt sich vergleichsweise die Schaumentwicklung der Kaskade aus LOX + Lipase mit Sauerstoffzufuhr und der Kaskade aus LOX + Lipase + Katalase erkennen (Abbildung 26). Bei ersterer Kaskade wird das komplette Becherglas mit Schaum bedeckt, während bei der Kaskade mit *in situ* Sauerstoffzeugung eine vergleichsweise kleine Schaumkrone auftritt. Diese kann durch periodische Anpassung der H_2O_2 Flussrate an die Umsatzrate der LOX angepasst werden, um eine mögliche Schaumentwicklung noch weiter zu reduzieren.

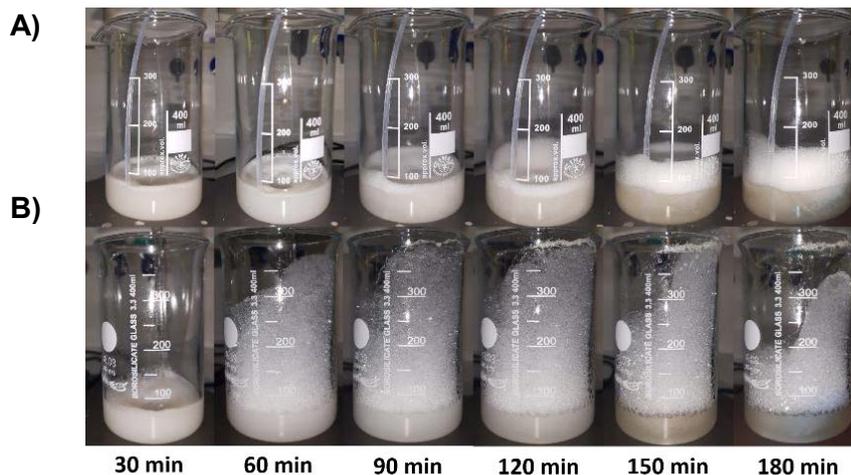
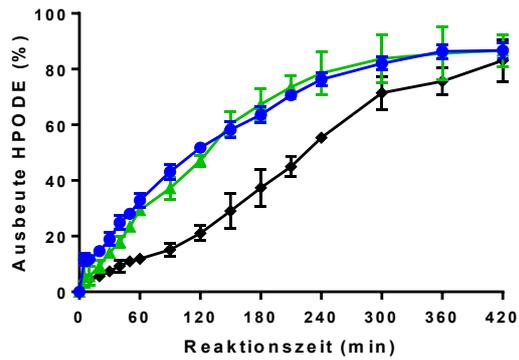


Abbildung 26: Vergleich der Schaumentwicklung während der Enzymkaskade mit *in situ* Sauerstoffzeugung (A) und 100 ml/min Sauerstoff-Flussrate (B). Die Reaktion erfolgte über 3 Stunden bei optimierten Bedingungen und Distelöl äquivalent zu 30 mM Linolsäure.

Die Kaskade aus LOX, Katalase und Lipase erreichte wie die Kaskade mit LOX und Lipase Ausbeuten von $>80 \%$ und somit eine Umsetzung von $>94 \%$ der durch Hydrolyse freigesetzten Linolsäure (Abbildung 27A). Die Verteilung der Regioisomere lag bei $\text{pH } 8$ bei konstant $90:10$ ($13:9$) (Abbildung 27B). Mit diesem System konnte im 50 ml Ansatz eine 13-HPODE Ausbeute von 70 g/l und eine Gesamt-HPODE-Ausbeute von 77 g/l erreicht werden.

A)



B)

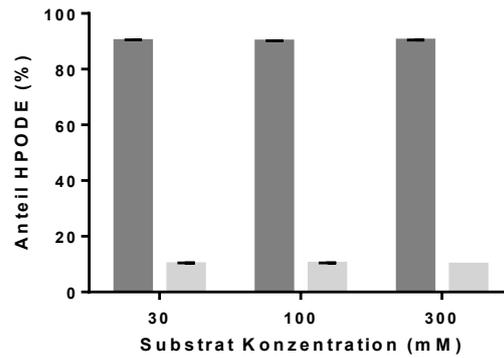


Abbildung 27: A) HPODE-Ausbeuten bei Einsatz der Kaskade mit LOX-1, Lipase und Katalase in Tris-HCl Puffer pH 8 mit ● = HPODE-Ausbeute bei einer Distelölkonzentration äquivalent zu 30 mM Linolsäure. ▲ = Ausbeute bei einer Distelölkonzentration äquivalent zu 100 mM und ◆ = 300 mM Linolsäure. B) Analyse der Regioisomeren-Verteilung (13:9) der Reaktionsprodukte aus A) mit ■ = Anteil von 13-HPODE und 9-HPODE (■).

3.3 Entwicklung einer Kaskade mit immobilisierten Enzymen

Im vorherigen Kapitel wurde eine Enzymkaskade mit freier LOX-1 aus Sojabohnen, Lipase und Katalase für die Herstellung von 13-HPODE aus Distelöl entwickelt. Die Verwendung immobilisierter Enzyme bietet dabei die Möglichkeit, die nachgeschaltete Verarbeitung und die Gesamtverarbeitungskosten durch einfache Biokatalysatorabtrennung und -recycling zu verbessern.

3.3.1 Herstellung von Trägermaterialien und Immobilisierung von LOX

Zur Entwicklung einer Kaskade mit immobilisierten Enzymen wurde initial die Immobilisierung von LOX untersucht. Dazu wurde LOX auf verschiedene Träger über verschiedene Bindungsarten immobilisiert (Tabelle 21). Zur Identifizierung geeigneter Immobilisierungsträger für LOX-1 wurden kommerziell erhältliche Materialien ausgewählt und zusätzlich weitere modifizierte Träger synthetisiert sowie siliciumdioxidbeschichtete Alginatperlen untersucht. Dazu wurden Kohlenstoff-Nanoröhren mit Nitriersäure oxidiert und entweder mit PEG 400 (Hydroxy-MWNTs), Dodecylamin (Alkyl-MWNTs) oder Ethylendiamin und Glutaraldehyd (Oxo-MWNTs) funktionalisiert (Abbildung 28). Immobead 150 P auf Oxiranbasis wurde ebenfalls mit Ethylendiamin und Glutaraldehyd modifiziert, um einen oxo-funktionalisierten Träger zu erhalten. Die Alginatperlen wurden entweder mit TMOS oder TMMS in einem Konzentrationsbereich von 0,625 – 2,5 mg/ml hergestellt.

Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Trägermaterialien.

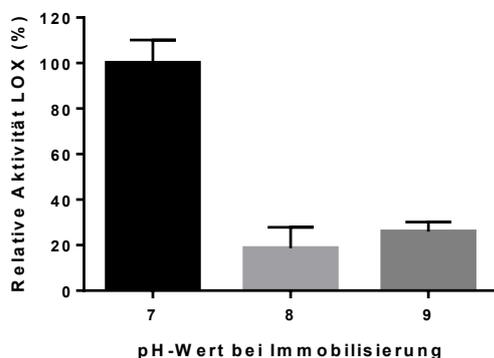
Trägermaterial	Matrix	Funktionelle Gruppe	Bindung
Alginat-TMOS	Alginat-TMOS	-	Einschluss
Alginat-TMMS	Alginat-TMMS	-	Einschluss
Immobead 150 A	Polyacryl	Oxiran, Butyl	Kovalent + adsorptiv
Immobead 150 P	Polyacryl	Oxiran	Kovalent
Immobead 150 P-GA	Polyacryl	Aldehyde	Kovalent
Accurel MP 1000	Polypropylen	-	Adsorptiv
Lewatit VP OC 1600	Polymethylacryl-divinylbenzol	-	Adsorptiv
Amin-MWNT-GA	Graphen	Aldehyde	Kovalent
Hydroxy-MWNT	Graphen	Hydroxy	Adsorptiv
Alkyl-MWNT	Graphen	Alkyl	Adsorptiv



Abbildung 28: Oxidierte Kohlenstoffnanoröhren nach Behandlung mit Nitriersäure. Hydroxy- und Oxo-funktionalisierte MWNTs zeigten die gleiche Struktur. Alky-MWNTs lagen als Suspension vor.

In einem ersten Schritt wurden die Immobilisierungsbedingungen unter Verwendung von Immobead 150 P hinsichtlich pH, Pufferstärke und Reaktionszeit untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein höher konzentrierter Puffer mit neutralem pH-Wert (1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7) zu einer höheren Aktivität des Enzyms führte (Abbildung 29). So betrug die Aktivität nach der Immobilisierung in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7 nur 30 % verglichen mit einem Immobilisat nach einer Inkubation in 1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7.

A)



B)

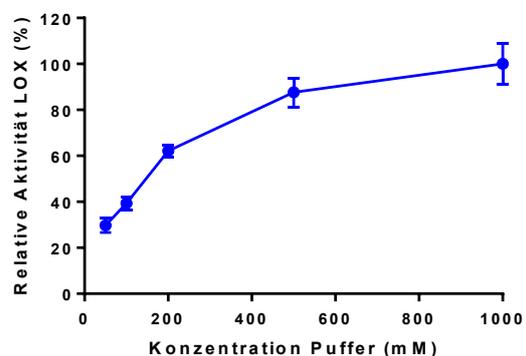


Abbildung 29: Optimierung der Immobilisierung von LOX auf Immobead 150 P. A) Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes bei der Immobilisierung. Die Immobilisierung erfolgte bei 100 mM Puffer (Kaliumphosphat-Puffer pH 7, Tris-HCl pH 8 und Boratpuffer pH 9). B) Untersuchung des Einflusses der Pufferkonzentration von Kaliumphosphat-Puffer Puffer pH 7 auf die Aktivität von immobilisierter LOX nach erfolgter Immobilisierung.

Die Immobilisierung von LOX auf Immobead 150 P lief sehr schnell ab, wobei die Reaktionszeit mit steigender Enzymbeladung von 1 Stunde auf 5 Stunden anstieg (Abbildung 30A). Nach 5 Stunden konnte aber auch bei einer Enzymbeladung von 200 mg/g Träger keine Aktivität im Überstand detektiert werden. Die Enzymaktivität und Proteinkonzentration zeigten einen vergleichbaren Kurvenverlauf, sodass sicher gesagt werden kann, dass eine Bindung an den Immobead Träger erfolgte. In einem weiteren Schritt wurde die Aktivität des immobilisierten Enzyms bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zum freien Enzym, die immobilisierte LOX ihr Aktivitätsmaximum in einem engeren pH Bereich hatte (Abbildung 30B). Während das freie Enzym schon bei einem pH-Wert von 7,5 etwa 65 % der maximalen Aktivität zeigte, erreichte das immobilisierte Enzym nur 10 % der maximalen Aktivität. Beide Enzyme, frei und immobilisiert, hatten ihr Aktivitätsmaximum im Bereich von pH 9.

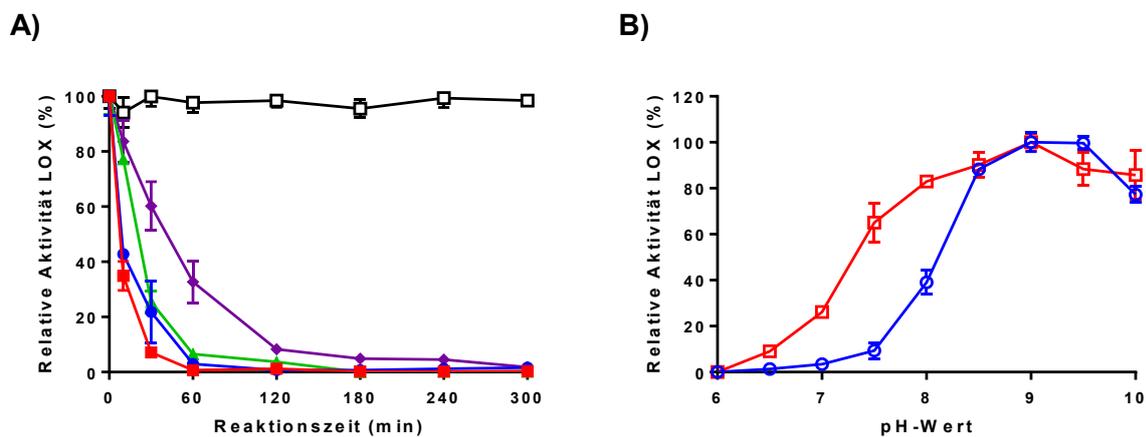


Abbildung 30: A) Verlauf der spezifischen Enzymaktivität im Überstand während der Immobilisierung von LOX-1 auf Immobead 150 P bei verschiedenen Enzymbeladungen. ■ = Enzymbeladung 10 mg/g, ● = 50 mg/g, ▲ = 100 mg/g, ◆ = 200 mg/g, □ = Kontrolle freies Enzym. B) Relative spezifische Aktivität bei verschiedenen pH-Werten von 6 bis 10. □ = freies Enzym, ○ = auf Immobead 150 P immobilisiert.

Die Aktivität der freien LOX war mit 21.000 U/mg bedeutend größer als die maximal erreichten 225 U/mg der immobilisierten LOX (Tabelle 22). Ein Immobilisat mit einer Beladung von 100 mg/g erreichte eine Aktivität von >22.000 U/g, die für biokatalytische Umsetzungen ausreichend war. Durch Funktionalisierung des Trägers mit Ethylendiamin (EDA) und Aktivierung durch Verknüpfung mit Glutaraldehyd (GA) zeigte die immobilisierte LOX keine Aktivität. Bei Verwendung von EDA funktionalisierten und mit GA aktivierten Trägern wurde ebenfalls eine Bindung beobachtet. Allerdings konnte keine Aktivität der LOX beobachtet werden. Die Untersuchung der Enzymbeladung zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der spezifischen Aktivität der LOX bis zu einer Beladung von 100 mg/g an, während es bei einer weiteren Erhöhung des Verhältnisses von Enzym zu Träger zu einer geringeren spezifischen Aktivität kam.

Tabelle 22: Ergebnisse der Immobilisierung von LOX aus Sojabohnen auf Immobead 150 P.

Enzymbeladung (mg/g)	5	10	20	50	100	150	200
Gebunden nach 1 Stunde (%)	99,2 ± 0,1	99,3 ± 1	99 ± 0,2	97 ± 1	93,4 ± 0,9	78,4 ± 5,3	67,3 ± 7,6
Gebunden nach 5 Stunden (%)	99,6 ± 0,1	99,6 ± 0,6	99,6 ± 0,2	98,4 ± 1,2	99,9 ± 0,1	99 ± 1,4	98,2 ± 0,3
Aktivität immo. LOX (U/mg Enzym)	100,7 ± 24,8	110 ± 25	121,6 ± 23,8	186,5 ± 17,8	224,7 ± 30,9	109 ± 6	56,9 ± 5,6
Gesamtakt. Immobilisat (U/g)	503 ± 124	1.100 ± 250	2.432 ± 475	9.324 ± 890	22.470 ± 3.090	16.357 ± 895	11.380 ± 1120

Die Immobilisierung durch Einschluss von Enzymen ist als nicht-denaturierende und effiziente Immobilisierungsmethode bekannt [50]. Aus diesem Grund wurde der Einschluss von LOX in Calciumalginatperlen untersucht. Dabei wurde die Verwendung verschiedener Co-Polymer Agenzien wie Trimethoxymethylsilan (TMMS) und Tetramethylorthosilikat (TMOS) in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Es zeigte sich, dass die Aktivität des immobilisierten Enzyms mit maximal 153,7 U/mg geringer war als nach der Immobilisierung auf Immobead 150 P (Tabelle 23). Bei Verwendung von Immobead 150 A wurde trotz Bindung keine Aktivität der LOX beobachtet.

Tabelle 23: Einfluss der verschiedenen Co-Polymer-Agenzien auf die Aktivität der eingeschlossenen Lipoxygenase in Alginatperlen. Das freie Enzym wies eine Aktivität von 20.000 U/mg bei pH 9 auf.

Co-Polymer	TMOS	TMOS	TMOS	TMMS
Polymeragenz (mg/ml)	0,625	1,25	2,5	2,5
Aktivität Immobilisat (U/mg)	63,1 ± 15,9	70,4 ± 14,5	74 ± 10,4	153,7 ± 20,2

Als besonders hydrophobe Träger wurden Lewatit VP OC 1600 und Accurel MP 1000 untersucht. Dabei zeigte sich allerdings nur eine schwache Aktivität nach der Immobilisierung auf Lewatit VP OC 1600. Beide Träger wurden aus diesem Grund für weitere Untersuchungen verworfen. Kohlenstoffnanoröhren bieten aufgrund ihrer großen Oberfläche großes Potential für die Anwendung als Trägermaterial für immobilisierte Enzyme. Im Rahmen der Untersuchungen wurden Alkyl-, Hydroxy- und Oxo-funktionalisierte MWNTs auf ihre Anwendungsmöglichkeiten bei der Immobilisierung von LOX untersucht. Dabei zeigte die immobilisierte LOX nur auf Oxo-funktionalisierten MWNTs eine schwache Aktivität.

Um eine möglichst effiziente Verwendung des Enzyms zu erreichen, wurden die Träger hinsichtlich ihrer Bindungskapazitäten bei verschiedenen LOX-Beladungen untersucht (Tabelle 24). Dabei zeigte sich, dass Immobead 150 P eine ungewöhnlich hohe Enzymbeladung von 100 mg/g komplett binden kann und mit Abstand die höchste Aktivität erhalten wird (Tabelle 22).

Tabelle 24: Biokatalysatorbeladung, Bindungskapazität und spezifische Aktivität der getesteten Trägermaterialien nach Immobilisierung von LOX-1 aus Sojabohnen. Die beste Beladung wurde nach Auswertung verschiedener Beladungen für jeden Träger ausgewählt. nd = Aktivität nicht detektiert.

Immobilisierungsträger	LOX-1 Beladung (mg/g)	LOX-1 gebunden (%)	Spez. Aktivität (U/g)
Alginate – TMOS 0.625 mg/ml	10	> 99	630 ± 160
Alginate – TMOS 1.25 mg/ml	10	> 99	700 ± 150
Alginate – TMOS 2.5 mg/ml	10	> 99	740 ± 100
Alginate – TMMS 2.5 mg/ml	10	> 99	1.540 ± 200
Immobead 150 A	10	60	nd
Immobead 150 P	100	> 99	22.470 ± 309
Immobead 150 P - GA	(100)	> 99	nd
Accurel MP 1000	(20)	89	nd
Lewatit V POC 1600	20	87	< 1
Oxo-MWNT	20	> 99	< 1
Hydroxy-MWNT	(20)	> 99	nd
Alkyl-MWNT	(20)	> 99	nd

3.3.2 Untersuchung zur Hydroperoxidierung mit immobilisierter LOX-1

Die Wiederverwendbarkeit von LOX-1 auf Immobead 150 P wurde im 100 ml Ansatz wie in Abschnitt 2.3.6 in wiederholten Zyklen von 2 Stunden unter Sauerstoffbelüftung mit entweder 1, 10 oder 30 mM Linolsäure in Gegenwart des Tensids Triton CG-110 durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, nach jedem Zyklus nach der Probennahme die Reaktionslösung abzudekantieren, ohne das Immobilisat am Boden anzutasten. So konnte ein möglicher Verlust der Perlen verhindert werden und die Menge konstant gehalten werden. Als neue Reaktionslösung diente eine Stocklösung, die während der laufenden Reaktion parallel gerührt wurde, um eine gute Durchmischung der Komponenten zu erreichen. Die Reaktion wurde wiederholt, bis die spezifische Aktivität des Enzyms unter 50 % fiel.

Als Vorversuch wurde zunächst eine Zeit-Umsatz Kurve bei Verwendung der immobilisierten LOX auf Immobead 150 P und eingeschlossen in Alginatperlen erstellt (Abbildung 31). Der Umsatz zeigte bei Einsatz der Alginatperlen einen linearen Anstieg von HPODE im Ansatz an und folgte damit nicht einer typischen Zeit-Umsatz-Kurve von Enzymen.

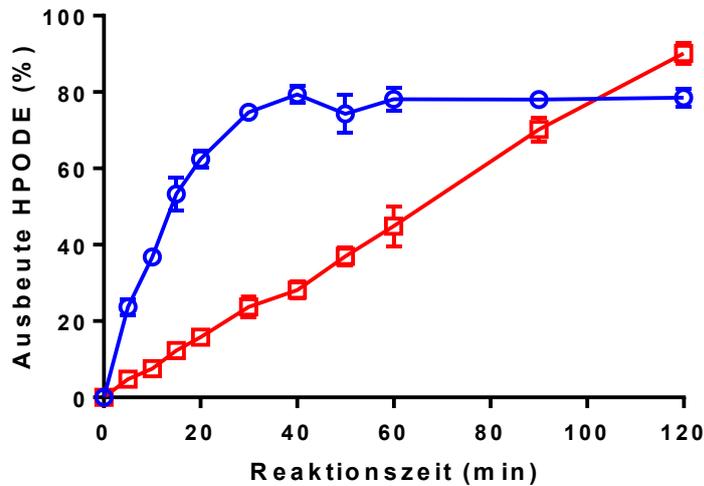
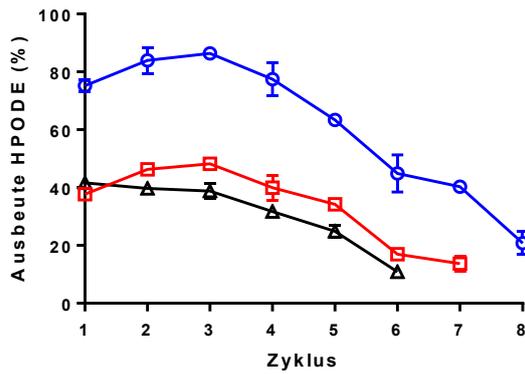


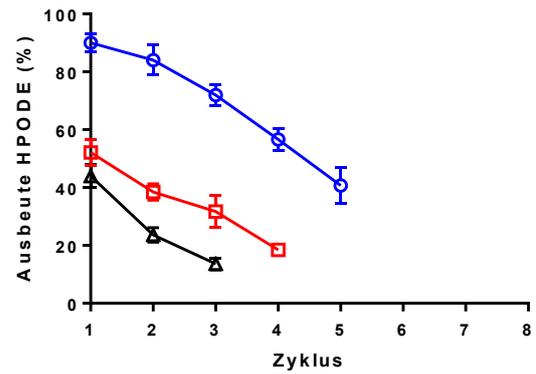
Abbildung 31: Zeit-Umsatz Kurven der Hydroperoxidierung von Linolsäure bei 1 mM Substratkonzentration bei Verwendung LOX immobilisiert auf Immobead 150 P (○) und eingeschlossen in Alginatperlen (□).

Im Recyclingtest erreichten die mit Immobead 150 P immobilisierte LOX nach 2 Stunden Reaktionszeit 75 % HPODE-Ausbeute bei 1 mM und etwa 42 % bei 10 und 30 mM Substratkonzentration (Abbildung 32A). Die Ausbeute mit dem in Alginat-TMMS eingeschlossenen LOX-1 war etwas höher und erreichte 90, 52 und 44 % HPODE bei Konzentrationen von 1, 10 und 30 mM Linolsäure (Abbildung 32B). Das Recycling von LOX-1 war mit Immobead 150 P und mit den Alginat-TMMS-Perlen möglich. Mit Immobead 150 P wurden bis zu 8 Zyklen bei einer Linolsäure-Konzentration von 1 mM durchgeführt. Die Ausbeute stieg leicht auf 86 % im dritten Zyklus an und fiel dann auf 40 % in Zyklus 7. Bei 10 mM Linolsäure verhielt sich das Immobilisat ähnlich, und es wurde ein leichter Anstieg der Ausbeute in Zyklus 3 und ein Rückgang auf 50 % HPODE-Ausbeute in Zyklus 7 beobachtet. (Abbildung 32B). Bei 30 mM Linolsäure sank die HPODE-Ausbeute schneller, und der Aktivierungseffekt wurde nicht beobachtet. Dennoch konnten sechs Reaktionszyklen durchgeführt werden. Parallel zur Ausbeute zeigte auch die Aktivität von LOX-1 auf Immobead 150 P einen Anstieg bis zum dritten Zyklus (Abbildung 32C) Bei Analyse von LOX-1, welches in Alginatperlen eingeschlossen war, konnte eine schnellere Deaktivierung nach vier Zyklen bei 1 mM Linolsäure (Abbildung 32D) konnte. Im Gegensatz zu LOX auf Immobeads wurde bei der eingeschlossenen LOX kein aktivierendes Verhalten gesehen. Zudem konnte im trägerfreien Überstand Aktivität nachgewiesen werden.

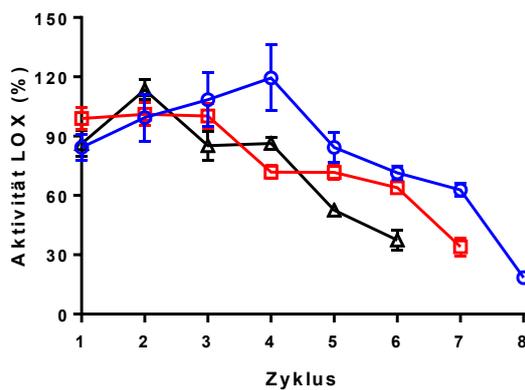
A)



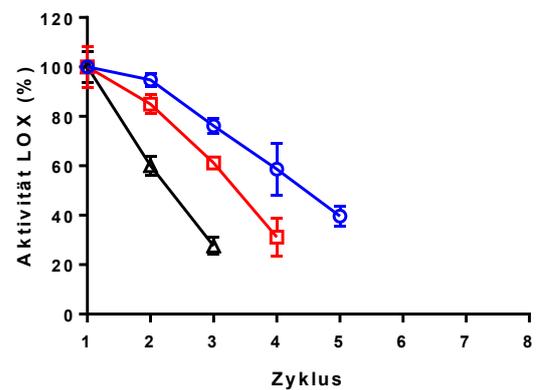
B)



C)



D)



E)

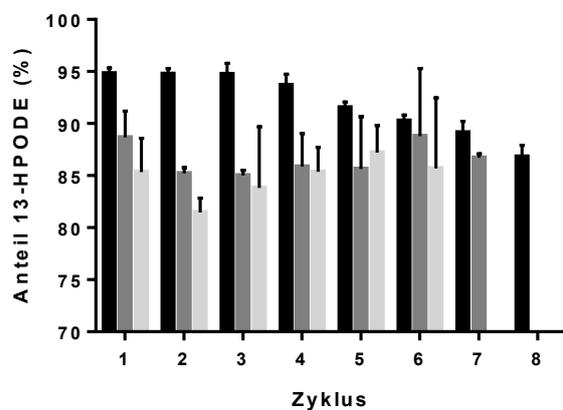


Abbildung 32: Ausbeute an HPODE während des Recyclings von LOX auf Immobead 150 P (A) und Alginateperlen mit 2,5 mg/ml TMMS (B). C) Aktivität von LOX auf Immobead 150 P während des Recyclings. D) Aktivität von LOX in Alginateperlen während des Recyclings. ○ = 1 mM, ◻ = 10 mM und △ = 30 mM Linolsäure. E) Anteil von 13-HPODE während des Recyclings von LOX auf Immobead 150 P mit ■ = 1 mM Linolsäure, ■ = 10 mM Linolsäure and ■ = 30 mM Linolsäure.

Während die Aktivität und die Ausbeute kontinuierlich mit höherer Zyklenzahl absanken, blieb die Regiospezifität des Enzyms weitgehend konstant, wobei auch hier eine negative Korrelation zwischen Zykluszahl und 13:9 HPODE Verhältnis bestand. Der Anteil von 13-HPODE an der Produktmischung schwankte zwischen 92 (Zyklus 1 – 3) und 86 % (Zyklus 4 – 7) bei höheren Substratkonzentrationen, während die Regiospezifität bei 1 mM Linolsäure in der Lösung wesentlich höher war und ein Maximum von 95 % 13-HPODE Anteil erreichte (Abbildung 32E).

3.3.3 Verwendung von LOX-1 unter kontinuierlichen Bedingungen

Die Versuche im Reaktor unter kontinuierlichen Bedingungen erfolgten in einem 3-D gedruckten Reaktor mit einer Säulenlänge von 10 cm und einer Breite von 1 cm. An beiden Enden befanden sich Anschlüsse für die Zufuhr von Substrat- oder Produktlösung und für die Zufuhr von Sauerstoff (Abbildung 33A). Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym in einem Festbettreaktor bei einer Substratflussrate von 0,5 ml/min (0,0625 ml/min pro ml Reaktorvolumen) über einen Zeitraum von 16 Stunden keine Aktivitätsverluste zeigte (Abbildung 33B). Im Gegenteil konnte ein aktivierender Effekt nachgewiesen werden, der auch schon bei den Versuchen im Batchansatz (Abschnitt 3.3.2) zu beobachten war. Wie auch im Recycling im Batchansatz konnte in den ersten 6 – 8 Stunden (Zyklus 3 – 4) die höchste Enzymaktivität ermittelt werden.

A)



B)

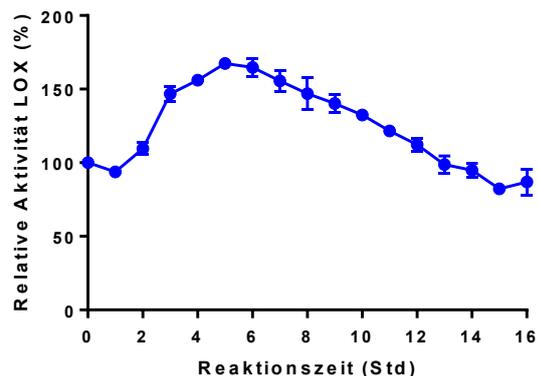


Abbildung 33: A) Verwendeter 3D-gedruckter Reaktor mit Anschlüssen an beiden Seiten. Die Anschlüsse und Gewinde wurden mit Parafilm abgedichtet, bis ein Austritt von Gas oder Reaktionslösung unterbunden wurde. B) Verlauf der Aktivität von auf Immobead 150 P immobilisierter LOX-1 in einem Zeitraum von 16 Stunden bei kontinuierlichem Durchfluss von 30 mM Linolsäurelösung pH 8 mit einer Flussrate von 0,5 ml/min.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss verschiedener Flussraten auf die HPODE-Ausbeute untersucht. Dabei zeigte sich als klarer Trend, dass höhere Flussraten zu einem schnelleren Umsatz führten (Abbildung 34A).

Der Umsatz dagegen ist weitgehend unabhängig von der Flussrate und erreicht ein Maximum von 25 %. In allen Fällen reichte die Ausbeute allerdings nicht aus, um an die in Abschnitt 3.1.3 ermittelten Ausbeuten von ca. 55 % heranzureichen (Abbildung 16). Auch die Regiospezifität war mit 80 % 13-HPODE Anteil am Produktgemisch wesentlich geringer als die 90 %, die bei dem verwendeten pH 8 zu erwarten gewesen wären. Diese Ergebnisse deuten auf eine mangelhafte Versorgung mit Sauerstoff und verschlechterter Zugänglichkeit der Linolsäure hin. Die Verwendung von Rieselbettreaktoren erreicht hierbei durch einige Vorteile gegenüber einem Festbettreaktor, wie einer verbesserten Katalysatorbenetzung und der Erhöhung der volumenspezifischen Oberfläche, mit ca. 28 % höhere Ausbeuten. Auch war der Anteil von 13-HPODE im Produktgemisch mit 88 % im Vergleich zum Festbettreaktor erhöht.

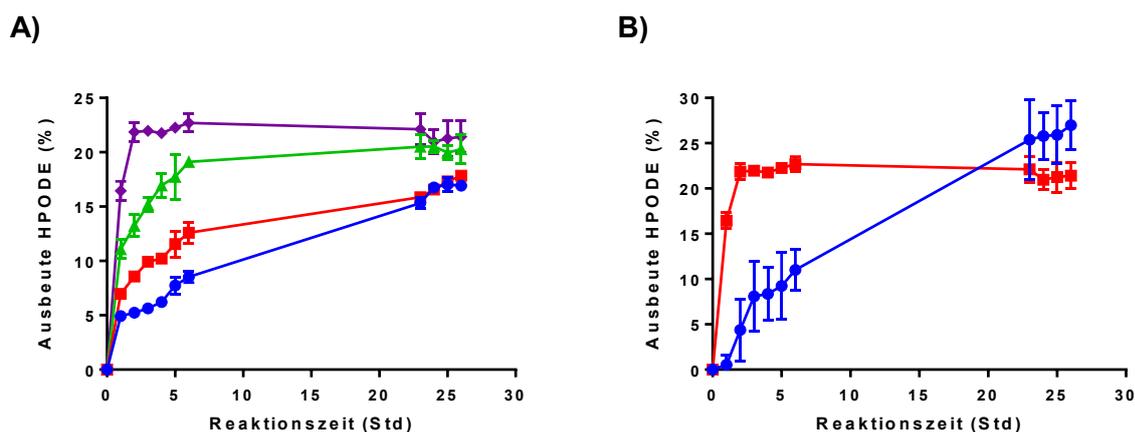


Abbildung 34: Untersuchung der HPODE-Ausbeute bei Umsetzung von Linolsäure mit immobilisierter LOX unter kontinuierlichen Bedingungen A) Verlauf der Ausbeuten von HPODE im Verlauf der Zeit in einem Festbettreaktor bei verschiedenen Substrat-Flussraten. Die Substratlösung enthielt 30 mM Linolsäure in Tris-HCl pH 8 mit Triton CG-110 (Abschnitt 2.3.10). ● = 0,4 ml/min Flussrate, ■ = 0,6 ml/min Flussrate, ▲ = 0,8 ml/min Flussrate und ◆ = 1 ml/min Flussrate. B) Ausbeuten bei Vergleich von Fest- und Rieselbettreaktor bei einer Substratflussrate von 1 ml/min. ● = Rieselbettreaktor, ■ = Festbettreaktor.

3.3.4 Co-Immobilisierung von Katalase und LOX-1

Zur *in situ* Erzeugung von Sauerstoff wurde Katalase aus *M. lysodeikticus* mit Hilfe eines in dieser Arbeit optimierten Immobilisierungsprotokolls auf Immobead 150 P und Alginatperlen immobilisiert. Zunächst wurde Katalase auf Immobead 150 P und in Alginatperlen immobilisiert. Zu Beginn der Versuche wurden die Alginatperlen noch als ganze Perlen in den entsprechenden Reaktionsansätzen untersucht. Die Aktivität des unzerkleinerten Immobilisates war deutlich niedriger als die Aktivität des gemörserten Immobilisates. Aus diesem Grund wurden die Alginatperlen mit Mörser und Pistill möglichst zerkleinert, bevor diese untersucht wurden. Im Folgenden werden aus diesem Grund nur die Ergebnisse von pulverisierten Alginatperlen dargestellt. Das TMMS-Immobilisat wies eine höhere Aktivität als das TMOS-Immobilisat auf und war zudem flexibler und stabiler.

Die höchste Restaktivität zeigte dabei die im TMMS-Copolymer eingeschlossene Katalase mit 12.135 ± 670 U/mg Enzym (Tabelle 25).

Tabelle 25: Einfluss der verschiedenen Co-Polymer Agenzien auf die Aktivität der eingeschlossenen Katalase in Alginatperlen. Aktivität der freien Katalase betrug 650.000 U/mg bei pH 7.

Co-Polymer (mg/ml)	TMOS 0,625	TMOS 1,25	TMOS 2,5	TMMS 2,5
Aktivität Immobilisat (U/mg)	504 ± 88	487 ± 90	533 ± 68	12.135 ± 670
Verhältnis zu Aktivität t_0 (%)	$0,08 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$1,82 \pm 0,1$

Eine Erhöhung der Enzymkonzentration hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der eingeschlossenen immobilisierten Katalase. Außerdem wurden während der Recyclingstudien große Mengen des Enzyms ausgewaschen, was auf eine zu große Porengröße des Copolymers hinweist. Als Alternative wurde Immobead 150 P als vielversprechenderer Träger für die Co-Immobilisierung ausgewählt. Um ein Auswaschen der Katalase vom Träger zu verhindern, wurde auch dieses Enzym auf Immobead 150 A und 150 P wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben immobilisiert. Dabei war zu beobachten, dass die Aktivität der Katalase schneller abnahm als die Konzentration im Überstand (Abbildung 35).

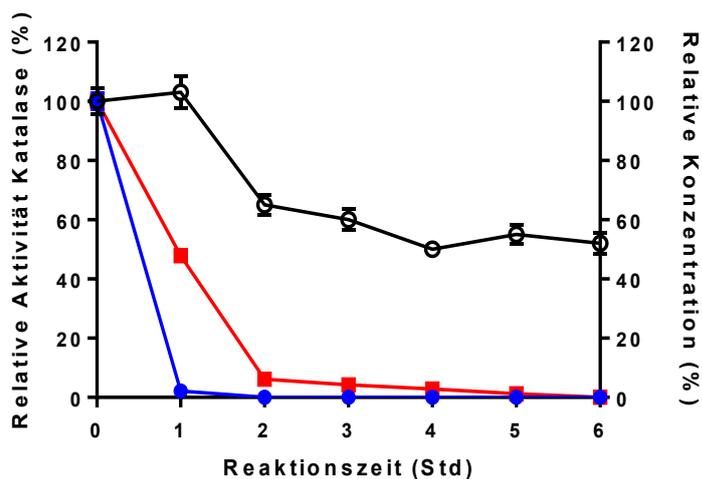


Abbildung 35: Verlauf der Aktivität und Konzentration im Überstand während der Immobilisierung von Katalase aus *M. lysodeikticus* auf Immobead 150 P mit ● = Aktivität im Überstand, ■ = Proteinkonzentration im Überstand und □ = Aktivität des freien Enzyms als Referenz.

Die Aktivität der immobilisierten Katalase war mit 902 U/mg wesentlich geringer als beim Einschluss in Alginatperlen. Da LOX als Hauptenzym in diesem System die Hydroperoxidierung katalysiert, wurde Immobead 150 P als gemeinsamer Träger gewählt. Diese Wahl stellte einen Mittelweg dar, um eine möglichst hohe Ausbeute an HPODE bei

gleichzeitiger reduzierter Schaumentwicklung durch *in situ* Sauerstoffgenerierung zu gewährleisten. Trotz der höheren Aktivität der Katalase in Alginatperlen, waren diese aufgrund schlechterer Stabilität der LOX nicht so gut für eine wiederholbare Anwendung geeignet. In einem weiteren Schritt wurde die Enzymbeladung der Katalase auf Immobead 150 P in einem Bereich von 10 – 200 mg/g Träger untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein Großteil des Enzyms bei allen Beladungen gebunden vorlag (Tabelle 26). Nach Immobilisierung der Katalase auf Immobead 150 A, konnte keine Aktivität ermittelt werden.

Tabelle 26: Immobilisierung von Katalase aus *M. lysodeikticus* auf Immobead 150 P. Immobilisierung wurde durchgeführt in 1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7 und 150 rpm über 24 Stunden.

Enzymbeladung (mg/g)	10	20	50	100	200
Gebunden nach 1 Stunde (%)	52,2 ± 2,4	50,1 ± 1,7	45,5 ± 1,9	40,6 ± 1,6	30,1 ± 2,3
Gebunden nach 24 Stunden (%)	99,8 ± 0,1	99,2 ± 0,5	98,3 ± 0,6	98,4 ± 1	98,2 ± 1,2
Spezifische Aktivität Enzym (U/mg)	902 ± 158	553 ± 65	197 ± 18	91 ± 11	56 ± 5
Gesamtakt. Immobilisat (U/g)	9.020 ± 1580	11.067 ± 1300	9.876 ± 913	9.055 ± 1112	11.101 ± 1020

Die Co-Immobilisierung von Katalase aus *M. lysodeikticus* und LOX-1 erfolgte auf Immobead 150 P mit 10 - 100 mg/g LOX/Träger und 10 mg/g Katalase pro Träger. Es wurde 20.000 U LOX pro mmol Substrat für den Ansatz verwendet. Dieses Co-Immobilisat konnte bis zu sechsmal wiederverwendet werden (1 und 30 mM Linolsäure) (Abbildung 36A). Diese Beobachtung konnte durch die ermittelten Regioselektivitäten bestätigt werden, die mit fortschreitender Zykluszahl von anfänglichen 95 % auf 82 % 13-HPODE herabsank (Abbildung 36C). Im direkten Vergleich zwischen LOX + Katalase und LOX + Sauerstoffzufuhr konnte kein Unterschied in der Ausbeute und Regioselektivität festgestellt werden. Beide Systeme zeigten einen maximalen Umsatz von >43 % mit einem Verhältnis von 90 % 13-HPODE (Abbildung 36B). Bei Verwendung dieses Co-Immobilisats, konnte Schaumbildung während der Reaktion stark reduziert werden (hier nicht gezeigt).

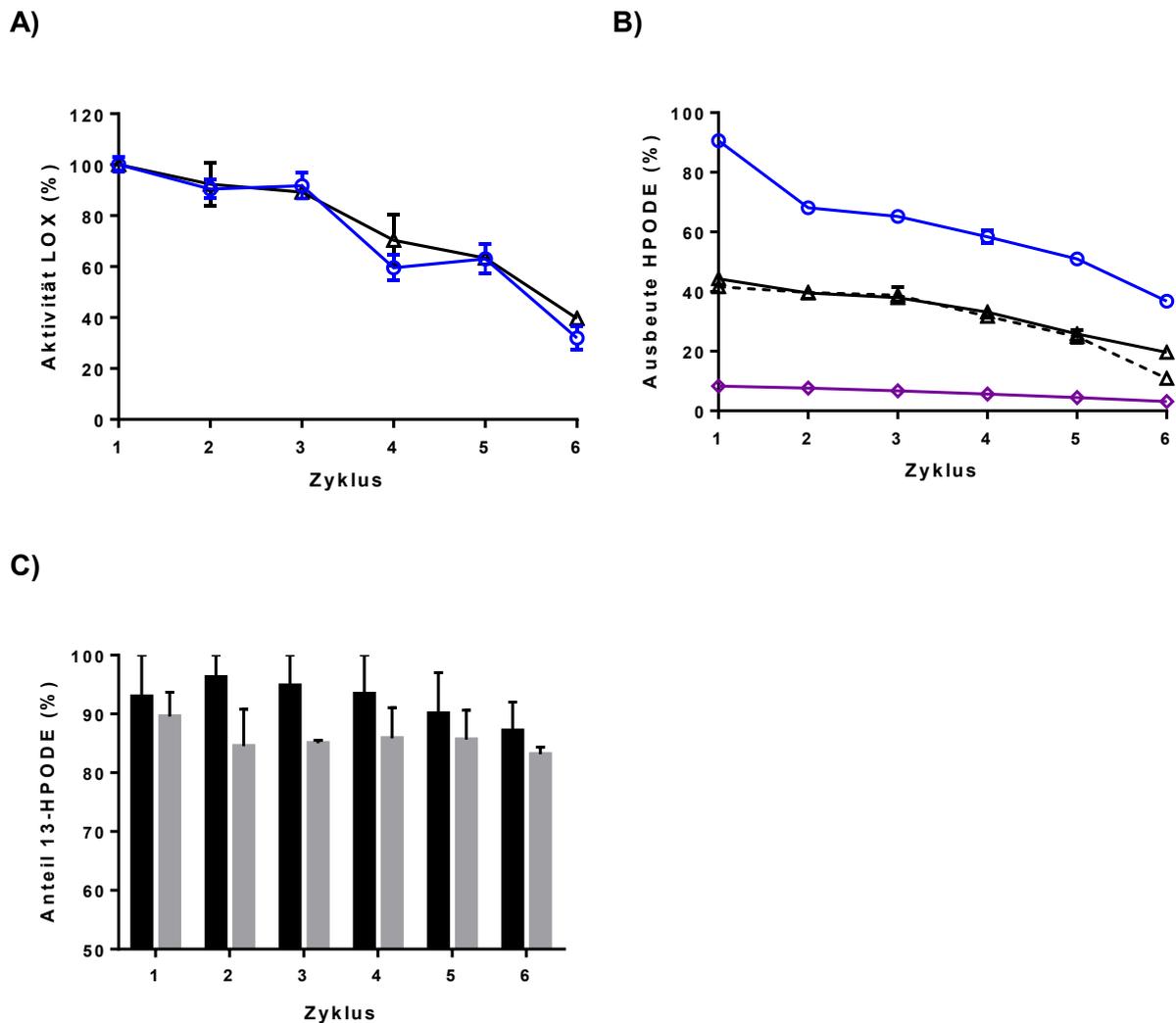


Abbildung 36: Untersuchung von LOX und Katalase, die gemeinsam auf Immobead 150 P bei 1 mM und 30 mM Linolsäure-Konzentration bei pH 9 mit 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110 immobilisiert wurden. Im Verlauf von 2 Stunden pro Zyklus wurden 100 mg/l/min H_2O_2 in das Reaktionsgemisch gepumpt. A) Aktivitätsverlauf von LOX in wiederholten Zyklen von 2 Stunden mit ○ = 1 mM Linolsäure und △ = 30 mM Linolsäure. ■ = Anteil von 13-HPODE bei 1 mM Linolsäure, ■ = Anteil von 13-HPODE bei 30 mM Linolsäure. B) Ausbeute von HPODE bei Umsetzung von Linolsäure mit LOX + Katalase mit ○ = 1 mM Linolsäure und △ = 30 mM Linolsäure (durchgängig) = LOX + Katalase, (gestrichelt) = LOX als Vergleich, ◇ = 30 mM Linolsäure keine H_2O_2 Zufuhr. C) Verlauf des 13-HPODE-Gehalts in der Produktmischung in Abhängigkeit der Anzahl der Zyklen.

3.3.5 Co-Immobilisierung von Lipase und LOX-1

Für die Immobilisierungsstudien wurden Lipasen aus *P. fluorescens* und *C. rugosa*, Typ VII und CCL, ausgewählt. Diese Enzyme hatten sich bereits für die Hydrolyse von Distelöl als geeignet erwiesen, obwohl die *C. rugosa*-Enzyme eine Lag-Phase aufwiesen. Aufgrund der positiven Ergebnisse der Reaktionskaskade mit freien Enzymen, wurde zunächst die Immobilisierung von Amano Lipase aus *P. fluorescens* auf Immobead 150 P untersucht.

Dabei wurde die Enzymbeladung von 20 – 200 mg/g Träger untersucht und die Aktivität und Proteinkonzentration sowohl im Träger wie auch die Aktivität des Immobilisats nach 24 Stunden ermittelt. Es zeigte sich, dass ein Großteil des Enzyms schon nach 1 Stunde auf dem Träger gebunden wurde und im weiteren Verlauf der Inkubation nur eine geringe Restmenge immobilisiert wurde (Abbildung 37A). Die Ergebnisse der Immobilisierung auf Immobead 150 P sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 27: Ergebnisse der Immobilisierung von Amano Lipase aus *P. fluorescens* auf Immobead 150 P.

Enzymbeladung (mg/g)	20	50	100	200
Gebunden nach 1 Stunde (%)	91,1 ± 1,9	87,4 ± 2,0	80,8 ± 2,1	77,9 ± 2,2
Gebunden nach 24 Stunden (%)	95,1 ± 0,8	97,3 ± 0,7	93,1 ± 1,3	91,6 ± 1,6
Aktivität Immobilisat (U/mg)	147,9 ± 25,2	46 ± 7,2	48,5 ± 1,5	19,8 ± 2,4

Es zeigte sich, dass bei einer niedrigeren Enzymbeladung von 20 mg/g die spezifische Aktivität des immobilisierten Enzyms mit 148 U/mg ein Vielfaches der Aktivität beträgt, die bei einer Beladung von 200 mg/g ermittelt werden konnte. Auf den gesamten Träger + Enzym gerechnet konnte so auch gegenüber den höchsten Enzymbeladungen noch 60 % der Aktivität erhalten werden (Abbildung 37B). Im Vergleich zum freien Enzym allerdings betrug die Aktivität des immobilisierten Enzyms maximal 1 %. Mit dem Ziel ein möglichst effizientes immobilisiertes Enzym einzusetzen, wurde für weitergehende Versuche mit einer Beladung von 20 mg/g Träger gearbeitet.

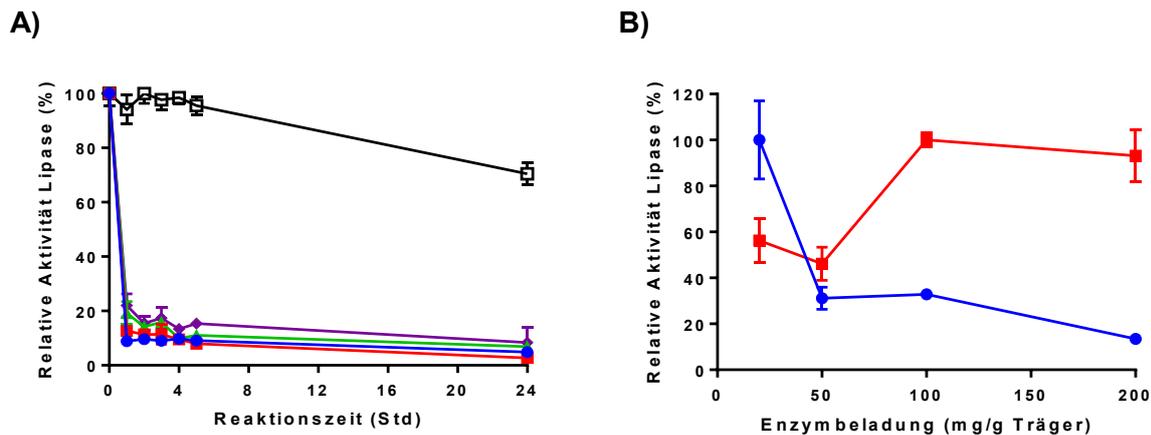


Abbildung 37: Übersicht der Immobilisierung von Amano Lipase aus *P. fluorescens* auf Immobead 150 P. A) Verlauf der Aktivität im Überstand während der Immobilisierung von Amano Lipase aus *P. fluorescens* auf Immobead 150 P mit ● = 20 mg/g Träger, ■ = 50 mg/g Träger, ▲ = 100 mg/g Träger, ◆ = 200 mg/g Träger und □ = freies Enzym als Referenz. B) Relative Aktivität der immobilisierten Lipase auf Immobead 150 P und gesamte Aktivität des Immobilisats mit ● = relative spezifische Aktivität der Lipase und ■ = relative Gesamtaktivität der Lipase auf 1 g Träger.

Als zweiter Träger aus der Immobead Familie wurde die Immobilisierung der Lipasen auf den unpolaren Immobead 150 A Träger untersucht. Durch den hydrophoben Deckel der Lipase stellte dieser Träger eine vielversprechende Alternative zu dem polaren Trägermaterial von Immobead 150 P dar. Während der Inkubation von Träger und Lipase konnte auch eine Bindung an den Träger nachgewiesen werden, allerdings zeigte das immobilisierte Enzym keine Aktivität nach dem Waschen. In weiteren Versuchsreihen wurden beide Träger nach Funktionalisierung mit Ethylendiamin mit und ohne anschließender Aktivierung mit Glutaraldehyd untersucht. Beide Verfahren führten allerdings wie auch bei der Verwendung von Immobead 150 A Trägern zu keinem aktiven Protein (hier nicht dargestellt).

Neben der Immobilisierung der Lipasen auf Immobead Träger über kovalente Bindung bietet sich die Immobilisierung auf hydrophobe Träger an. Lewatit VP OC 1600 und Accurel MP 1000 sind als hydrophobe Adsorber für Lipasen besonders geeignet [244]. Bei der Immobilisierung von Lipasen aus *P. fluorescens* und *C. rugosa* (VII, CCL) zeigte sich eine maximale Beladung von ca. 18 mg Enzym pro g Träger. Die maximale Aktivität betrug bei allen Lipasen auf diesem Träger ca. 230 – 240 U/mg gegenüber dem Modellsubstrat *p*-Nitrophenyldodecanoat (Tabelle 28).

Tabelle 28: Ergebnisse der Immobilisierung von Lipasen aus *P. fluorescens* (*P. flu*) und *C. rugosa* (CCL, VII) auf Lewatit VP OC 1600 und Accurel MP 1000 nach 24 Stunden.

Beladung (mg/g)	Lewatit VP OC 1600			Accurel MP 1000		
	<i>P. flu</i> (U/mg)	CCL (U/mg)	VII (U/mg)	<i>P. flu</i> (U/mg)	CCL (U/mg)	VII (U/mg)
10	189,2 ± 6,4	247,9 ± 35	169,0 ± 34,4	197,6 ± 46	410,2 ± 57,9	388,8 ± 69,1
20	243,7 ± 60,5	227,3 ± 15	240,1 ± 50,7	157,5 ± 27,3	376,2 ± 25	330,2 ± 57,5
50	80,8 ± 14,4	69,5 ± 5,7	67,8 ± 11,9	42,6 ± 11,6	113,5 ± 9,3	220,3 ± 51,8
100	32,4 ± 3,2	44,6 ± 5,7	34,1 ± 4,0	54,6 ± 17,4	72,8 ± 9,3	73,5 ± 15,6
200	28,5 ± 3,2	31,8 ± 4,1	24,5 ± 3,9	29,7 ± 3,9	53,7 ± 7	51,7 ± 6,2

Im Vergleich zum Träger Lewatit VP OC 1600 erreichten die Lipasen CCL und VII aus *C. rugosa* auf Accurel MP 1000 mit ca. 400 U/mg eine 65 % höhere Aktivität gegenüber dem Modells substrat. Auch bei diesem Träger betrug die theoretische Beladungskapazität 17 mg/g. Im direkten Vergleich zeigte sich eine allgemein höhere Bindungskapazität von Immobead 150 P im Vergleich zu den hydrophoben Absorbentien Accurel MP 1000 und Lewatit VP OC 1600 (Tabelle 29). Die Lipasen aus *C. rugosa* zeigten die höchsten Aktivitäten auf Immobead 150 P und Accurel MP 1000. Die Lipase aus *P. fluorescens* erreichte nur auf Lewatit VP OC 1600 eine vergleichbare Aktivität.

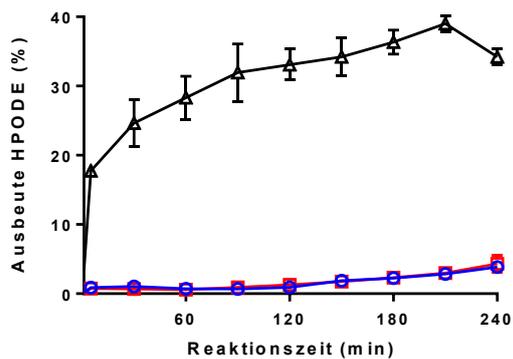
Tabelle 29: Bindungskapazitäten (%) und maximale Aktivitäten (U/g Immobilisat) der Lipasen aus *P. fluorescens* und *C. rugosa* (CCL, VII) bei einer Enzymbeladung von 20 mg/g nach 24 Stunden inkubation.

Trägermaterial	<i>P. fluorescens</i>	<i>C. rugosa</i> CCL	<i>C. rugosa</i> VII
Immobead 150 P	95 % / 2958 ± 504 U/g	96 % / 5480 ± 800 U/g	95 % / 5340 ± 440 U/g
Accurel MP 1000	89 % / 3960 ± 520 U/g	90 % / 8200 ± 1160 U/g	89 % / 7780 ± 1380 U/g
Lewatit VP OC 1600	88 % / 4880 ± 1220 U/g	88 % / 4960 ± 700 U/g	89 % / 4800 ± 1020 U/g

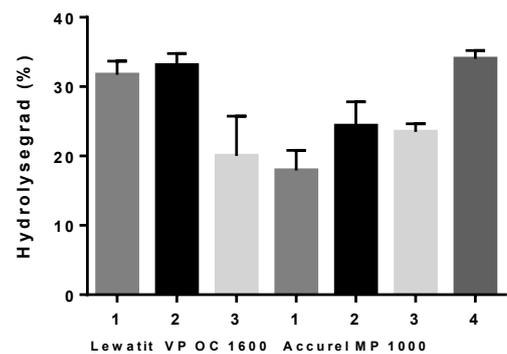
Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse mit dem LOX Immobilisat wurden 10 – 100 mg/g LOX und 20 mg/g Lipase aus *P. fluorescens* auf Immobead 150 P immobilisiert. Das Recycling erfolgte in einem 100 ml Ansatz bei pH 8 mit Triton CG-110 mit 30 mM Linolsäure als Distelöl und 100 ml/min Sauerstoffzufuhr für 2 Stunden. Mit diesem System wurde eine Umsetzung von bis zu 33 % HPODE mit 90 % 13-HPODE nach 4 Stunden erreicht (Abbildung 38A). Während der Reaktion wurde eine Linolsäurekonzentration von < 1 mM detektiert, die LOX setzte also zeitnah die freigewordenen Fettsäuren um. Nach dem ersten Einsatz des Co-Immobilisats war jedoch kein Recycling mehr möglich. Neben der Lipase aus *P. fluorescens* wurden *C. rugosa* Lipasen (VII, CCL) unter den gleichen Reaktionsbedingungen verwendet. Distelöl wurde von jedem Immobilisat erfolgreich hydrolysiert, allerdings waren für eine vollständige Hydrolyse längere Reaktionszeiten als 4 Stunden erforderlich (Abbildung 38B). Bei Verwendung einer dieser *C. rugosa* Lipasen zusammen mit LOX in einem Ansatz wurde eine Ausbeute von <5 % HPODE erzielt.

In der Vermutung, dass eine getrennte Immobilisierung von LOX und Lipase auf verschiedenen Trägern eine Verbesserung der Reaktion zur Folge haben könnte, wurden Lewatit VP OC 1600 sowie Accurel MP 1000 als bewährte adsorptive Träger für die Lipase-Immobilisierung getestet. In einem wiederholten Batch-Verfahren zeigten beide Enzyme nach 10 aufeinanderfolgenden Chargen keinen Aktivitätsverlust (Abbildung 38C). Bei gleichzeitiger Verwendung beider Immobilisate (LOX auf Immobead 150 P + Lipase auf Lewatit VP OC 1600) in einem Zyklus blieb die HPODE-Ausbeute mit <5 % jedoch gering.

A)



B)



C)

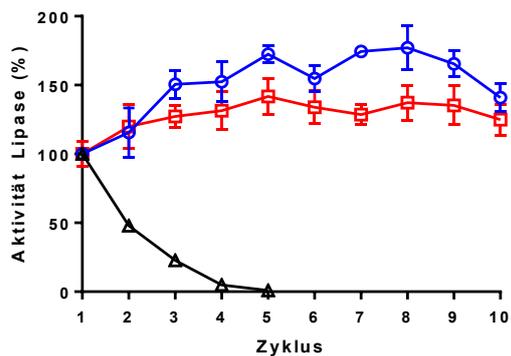


Abbildung 38: A) Vergleich von LOX + Lipase, die gemeinsam auf Immobead 150 P über 4 Stunden immobilisiert wurden. Die Reaktionen wurden bei pH 8 mit Triton CG-110 und Distelöl, äquivalent zu 30 mM Linolsäure durchgeführt. Die Analyse wurde mittels GC, HPLC und photometrisch durchgeführt. Δ = LOX + *P. fluorescens* Lipase, \circ = LOX + *C. rugosa* VII Lipase, \square = LOX + *C. rugosa* CCL Lipase; B) Ausbeute an freien Fettsäuren nach 4 Stunden bei Verwendung verschiedener Lipase-Immobilisate bei pH 8 mit Distelöl äquivalent zu 30 mM Linolsäure. 1 = *C. rugosa* VII, 2 = *C. rugosa* CCL, 3 = *P. fluorescens* Lipase und 4 = *P. fluorescens* Lipase auf Immobead 150 P. C) Recycling von *C. rugosa* Lipase VII (\circ) and CCL (\square) immobilisiert auf Lewatit VP OC 1600 und Amano Lipase aus *P. fluorescens* auf Immobead 150 P (Δ). Die Enzymbeladung betrug 20 mg/g und die Reaktionen dauerten 2 Stunden bei pH 8 mit Triton CG-110 und Distelöl, das 30 mM Linolsäure entspricht. Die Analyse wurde mittels GC durchgeführt.

3.4 Chemokatalytische 13-HPODE Spaltung mit Lewis Säuren

Neben der biokatalytischen Spaltung der Hydroperoxide mit Hilfe einer Hydroperoxid-Lyase, konnte von Gardner & Plattner 1984 eine chemokatalytische Spaltung von Hydroperoxiden durch den Einsatz von Lewis-Säuren im analytischen Maßstab gezeigt werden [228]. Dieser vielversprechende Ansatz wurde unter Verwendung verschiedener Lösemittel und Lewis-Säuren-Kombinationen näher verfolgt, um perspektivisch eine kombinierte chemo-enzymatische Syntheseroute von Distelöl zu Duftstoffen mit grüner Note aufzubauen. Dabei soll in einem zweistufigen Ansatz die chemokatalytische Spaltung im Extraktionsgemisch, welches während der Aufreinigung der HPODs anfällt, erfolgen, um einen weiteren Prozessschritt zu sparen. Als Chemokatalysatoren bieten sich dabei Bor-Halogene wie Bortrichlorid und Bortriflourid an, wie auch ungiftigere Verbindungen wie Aluminiumchlorid und „grünen“ Lewis-Säuren wie Zirkonium-(IV)-chlorid und Zirkoniumoxidchlorid. Aufgrund ihrer geringeren Toxizität wurde der Fokus auf die Lewis-Säuren Aluminiumchlorid und Zirkoniumchlorid gesetzt.

Die Spaltung von 13-HPODE mit AlCl_3 wurde mit 10 mM 13-HPODE bei verschiedenen Temperaturen und Lösungsmittelkombinationen getestet. Es zeigte sich, dass die Spaltung mit einer maximalen Ausbeute von 23 % Hexanal möglich ist (Tabelle 30). Während der Untersuchung zeigte sich, dass mit zunehmender Katalysatorkonzentration, die Ausbeute an Hexanal kontinuierlich zunahm. Dabei verdoppelte sich die Hexanal-Ausbeute mit einer Verzehnfachung der Katalysatormenge nach der Spaltung in MTBE. In anderen Lösungsmitteln konnte eine ähnlich positive Korrelation zwischen Katalysatorkonzentration und Umsatz beobachtet werden, wenn auch auf niedrigerem Niveau und mit geringeren Ausbeuten. Bei Verwendung von Methanol als Lösungsmittel ist eine gleichzeitige Veresterung der Produkte möglich, die zu Fettsäuremethylester und Hemiacetalen führt. Es wurde gezeigt, dass die Spaltung von HPODE mit Lewis-Säuren AlCl_3 und ZrCl_4 mit einer maximalen Ausbeute von 23 % Hexanal möglich ist (Tabelle 30). Die Umsatzzahl war bei niedrigen Katalysatorkonzentrationen am höchsten und erreichte ein Maximum von $2,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Während Linolsäure und HPODE mittels GC nachgewiesen wurden, konnten keine anderen Spaltprodukte wie 12-Oxododecensäure oder 12-Oxododecansäure nachgewiesen werden. Die Variation von Lösungsmitteln, Lewis-Säuren und Temperatur zeigte das gleiche Phänomen, was auf eine weitere Umwandlung durch bisher unbekannte Nebenreaktionen hindeutet.

Tabelle 30: Untersuchung der Hexansynthese nach Spaltung von 13-HPODE mit AlCl_3 in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Reaktionen wurden entweder bei Raumtemperatur oder bei 50 °C durchgeführt. Die Katalysatorkonzentration wurde zwischen 0,1 und 100 mM bei einer HPODE-Substratkonzentration von 10 mM variiert. Die Ausbeute wurde mittels GC-Analyse wie beschrieben bestimmt. Die Reaktion mit der höchsten Ausbeute an Hexanal ist grün markiert. Als Referenzlösungsmittel wurde Wasser verwendet, was zu keiner Synthese von Hexanal führte.

Lösungs- mittel	Kat. Konzentration (mM)				Kat. Konzentration (mM)			
	Ausbeute Hexanal (%)				Wechselzahl k_{cat} (s^{-1})			
	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100
MTBE	2,4 ± 0,4	3,5 ± 0,3	11,4 ± 0,2	22,9 ± 0,7	2,7*10 ⁻³	3,9*10 ⁻⁴	1,3*10 ⁻⁴	2,5*10 ⁻⁵
MTBE 50 °C				10,5 ± 1,8				1,2*10 ⁻⁵
THF			4,6 ± 0,8	10,3 ± 1,1			5,1*10 ⁻⁵	1,1*10 ⁻⁵
THF 50 °C				10,5 ± 1,2				1,2*10 ⁻⁵
Diethylether			3,1 ± 0,1	3,8 ± 0,5			3,4*10 ⁻⁵	4,2*10 ⁻⁶
Diisopropy- lether				4,9 ± 0,5				5,4*10 ⁻⁶
Methanol		7,3 ± 2,0	7,3 ± 2,0	8,7 ± 0,2			8,1*10 ⁻⁵	9,7*10 ⁻⁶
Ethylacetat	-	-	-	-	-	-	-	-
Chloroform	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	5,9 ± 0,1	13,0 ± 2,1	1,4*10 ⁻³	1,4*10 ⁻⁴	6,6*10 ⁻⁵	1,4*10 ⁻⁵
Heptan	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	2,8 ± 1,1	3,8 ± 1,3	5,6*10 ⁻⁴	4,4*10 ⁻⁵	3,1*10 ⁻⁵	4,2*10 ⁻⁶

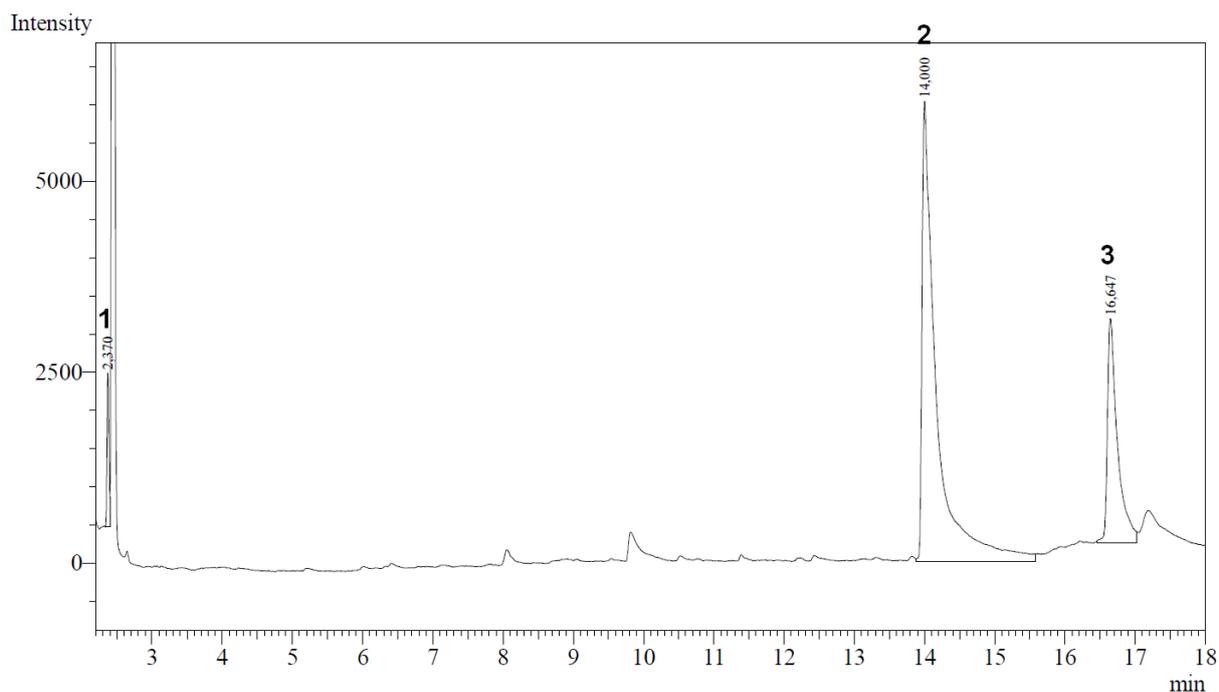


Abbildung 39: Beispielchromatogramm einer Spaltung von 13-HPODE mit AlCl_3 in MTBE. Proben wurden vor Analyse über GC mit Natriumborhydrid reduziert und anschließend silyliert. 1) = Hexanol (reduziert von Hexanal). 2) = Linolsäure und 3) = HODE-Peak (reduziert von HPODE). 12-Oxidodecensäure konnte nicht nachgewiesen werden.

Neben Versuchen mit AlCl_3 als Lewis-Säure wurde die Spaltung von 13-HPODE mit ZrCl_4 als Katalysator untersucht. Aus Sicht der grünen Chemie ist Zirkoniumchlorid aufgrund seiner fehlenden Toxizität besser geeignet. Da die Spaltung mit AlCl_3 in MTBE und THF mit hoher Katalysatorkonzentration besser war, wurden diese Bedingungen für die weitere Untersuchung von ZrCl_4 in einer Batch-Reaktion verwendet. Es zeigte sich, dass die Spaltung von 13-HPODE auch mit ZrCl_4 möglich war, allerdings mit geringerer Ausbeute als bei der Verwendung von AlCl_3 (Tabelle 31). Auch hier waren hohe Katalysatorbeladungen für maximalen Umsatz nötig.

Tabelle 31: Untersuchung der Hexanalsynthese nach Spaltung von 13-HPODE mit $ZrCl_4$ in MTBE und THF. Die Reaktionen wurden entweder bei Raumtemperatur oder bei 50 °C durchgeführt. Die Katalysatorkonzentration wurde zwischen 0,1 und 100 mM bei einer HPODE-Substratkonzentration von 10 mM variiert. Die Ausbeute wurde mittels GC-Analyse wie beschrieben bestimmt. Die Reaktion mit der höchsten Ausbeute ist grün markiert.

Lösungs- mittel	Kat. Konzentration (mM)				Kat. Konzentration (mM)			
	Ausbeute Hexanal (%)				Wechselzahl k_{cat} (s^{-1})			
	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100
MTBE	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,5	7,3 ± 0,8	11,9 ± 0,6	1,3*10 ⁻³	1,9*10 ⁻⁴	8,1*10 ⁻⁵	1,3*10 ⁻⁵
MTBE 50 °C	2,4 ± 0,5	6,7 ± 1,1	7,0 ± 0,4	13,8 ± 1,6	2,7*10 ⁻³	7,4*10 ⁻⁴	7,8*10 ⁻⁵	1,5*10 ⁻⁵
THF	2,3 ± 0,7	2,1 ± 0,4	2,1 ± 0,2	3,8 ± 0,1	2,6*10 ⁻³	2,3*10 ⁻⁴	2,3*10 ⁻⁵	4,2*10 ⁻⁶
THF 50 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethylacetat	-	-	-	-	-	-	-	-
Chloroform	0,8 ± 0,2	4,6 ± 0,6	2,9 ± 0,6	9,0 ± 0,7	8,9*10 ⁻⁴	5,1*10 ⁻⁴	3,2*10 ⁻⁵	1,0*10 ⁻⁵
Heptan	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	5,8 ± 1,7	7,5 ± 1,4	3,3*10 ⁻⁴	4,4*10 ⁻⁵	6,4*10 ⁻⁵	8,3*10 ⁻⁶

4 Diskussion

4.1 Optimierung der Lipoxygenase-Reaktion

Frühere Arbeiten, die sich mit der Hydroperoxidierung von Linolsäure durch LOX-1 beschäftigten, haben mit steigender Substratkonzentration eine Abnahme der HPODE-Ausbeute beobachten können [235,245]. Ausgehend von diesen Ergebnissen, ist eine Optimierung der Lipoxygenase Reaktion für eine Anwendung im industriellen Maßstab notwendig, um auch die Oxosäuren wirtschaftlich zur Synthese von Polymeren nutzen zu können. Neben der schlechteren Erreichbarkeit der Linolsäure bei höherer Konzentration, könnte auch eine Substratinhibition der LOX einen Einfluss ausüben [246]. So zeigte sich auch in dieser Arbeit mit steigender Linolsäurekonzentration ein starker Abfall der HPODE-Ausbeute nach 2 Stunden Reaktionszeit. Während bis 3 mM Linolsäure noch beinahe quantitative Umsätze erreicht wurden, konnte bei 100 mM Substrat eine Ausbeute von nur noch 13 % erreicht werden (Abschnitt 3.1.1). Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden anderer Gruppen überein [235,245,246], was auf eine unzureichende Zugänglichkeit des hydrophoben Lipidsubstrats hindeutet. Besonders in Experimenten im kleinen Maßstab war die Ausbeute der Hydroperoxidierung verringert im Vergleich zu Ansätzen mit größeren Volumina, in denen eine intensivere Durchmischung realisiert werden konnte [245]. Um das Problem der schlechten Zugänglichkeit des Substrats zu lösen, wurden zum einen Homogenisierungsmethoden angewendet und der Einfluss von Lösungsmittel auf die Ausbeute untersucht. Sowohl durch Einsatz eines Ultra Turrax als auch die Beschallung mit Ultraschall, konnte eine Verbesserung der Ausbeute erreicht werden. Im Gegensatz zur Arbeit von Kim et al. 2005 mit LOX aus *Nostoc sp.* war der Einsatz von Lösungsmitteln nicht für den Einsatz mit LOX-1 aus Sojabohnen geeignet [247]. Als dritte Option zur Erhöhung der Erreichbarkeit bot sich der Einsatz von Detergenzien an. Der Einsatz des grünen Tensids Triton CG-110 in geringer Konzentration führte dabei im Vergleich zu Versuchen ohne Tensid zu einer starken Verbesserung der Ausbeuten um bis zu 250 % und wurde für weitere Experimente ausgewählt (Abbildung 15). Triton CG-110 ist ein Alkylpolyglucosid und im Gegensatz zu vielen anderen Detergenzien mit Ethoxylat-Gruppen wie etwa Triton X-100 (Octylphenol Ethoxylat) oder Tergitol 15-S-9 (Sekundärer-alkohol-ethoxylat) sowohl ungiftig, abbaubar als auch aus regenerativen Quellen hergestellt [234,240,247]. Aufgrund seiner Eigenschaften ist Triton CG-110 geeignet, in einer Enzymkaskade mit dem Fokus auf nachhaltige Prozessführung eingesetzt zu werden.

LOX-1 aus Sojabohnen ist in der Lage auch bei niedrigen gelöst-Sauerstoffkonzentrationen das Substrat zu hydroperoxidieren, wobei die Umsatzrate, Regioselektivität und die Ausbeute am Ende der Reaktion stark reduziert sind. Aus diesem Grund wurde kontinuierlich Sauerstoff hinzugeführt. Der Einsatz von Luft führte auch zu besseren Ausbeuten im Vergleich zu den Versuchen ohne Gaszufuhr, allerdings zeigte die Zufuhr von reinem Sauerstoff den größten

Effekt. Eine Optimierung der Sauerstoffzufuhr ergab eine Korrelation zwischen Flussrate, Ausbeuten und Regioisomerenverhältnis bis zu einer Flussrate von 100 ml/min (2 ml O₂ / ml Lösung). Allerdings wurde eine geringere Flussrate von 50 ml/min gewählt, um möglichst wenig Reaktionslösung durch Schaumentwicklung im Verlauf der Reaktion zu verlieren. Aufgrund der tensidischen Eigenschaften des Substrates und des Detergenzes stellte die Luftzufuhr ein großes Problem dar, da die Schaumproduktion mit höheren Flussraten anstieg. Im Laufe der Optimierung konnte die Ausbeute von 13 % 13-HPODE bei 100 mM Linolsäurekonzentration auf >45 % 13-HPODE Substrat gesteigert werden (Tabelle 32). Dieser Wert lag im Rahmen früherer Arbeiten, die von Ausbeuten zwischen 50 und 60 % HPODE mit LOX-1 als Biokatalysator berichteten (55 % Ausbeute bei 30 mM Substrat) [245,246]. Eine Erhöhung der Enzymmenge stellte in diesem Rahmen einen weiteren Weg dar, die Ausbeute zu erhöhen. Allerdings konnte durch eine fünffache Erhöhung der Enzymmenge von 20.000 U/mmol auf 100.000 U/mmol nur eine Erhöhung der Ausbeute um 10 % von 40 auf 50 % bei 100 mM Substrat erreicht werden (Abbildung 16). Trotz der Zugabe von Detergenzien wie Triton CG-110, zeigte sich auch hier eine Barriere, die in der schlechten Zugänglichkeit der Fettsäure begründet ist.

Tabelle 32: Vergleich der LOX-Reaktionsbedingungen zu Beginn und am Ende der Optimierung.

Parameter	Start	Ende
Volumen	50 ml	50 ml
pH-Wert	9	9
Agitation	600	800
Temperatur	20 °C	20 °C
Lösungsmittel	Ohne	Ohne
Sauerstoff	20 ml/min	50 ml/min
Reaktionszeit	2 Stunden	2 Stunden
LOX	20.000 U/mmol	100.000 U/mmol
Homogenisierung	ohne	Ultra Turrax 30 min
Tensid	ohne	Triton CG-110 3 % (v/v)
HPODE-Ausbeute 30 mM Linolsäure	20 %	55 %
HPODE-Ausbeute 100 mM Linolsäure	13 %	45 %

4.2 Enzymkaskade mit LOX-1, Lipase und Katalase

Enzymkaskaden haben den Vorteil aufwendige Prozess- und Aufreinigungsschritte einzusparen, und so möglichst ökonomisch das Zielprodukt zu produzieren. Zur direkten Herstellung von 13-HPODE aus Öl Hydrolysat wurde zunächst die Hydrolyseaktivität der Lipasen aus *C. rugosa* und *P. fluorescens* gegenüber Distelöl untersucht. Die *C. rugosa* Lipasen hydrolysieren vornehmlich kurz- bis mittelkettige Ester und werden bei der Synthese von chiralen nicht-steroidalen Entzündungshemmern (NSAIDS) und der Modifizierung von Sterol eingesetzt [241,248,249]. Die Lipase aus *P. fluorescens* dagegen findet Einsatz bei der Herstellung des Insektizids S-2852 und in der Produktion von Biodiesel [248,249]. Insbesondere *C. rugosa* Lipasen boten sich durch ihre hohen Ausbeuten an FFA von 85 – 95 % nach 5 Stunden Reaktion als vorgelagerte Enzyme für die Lipoxygenasereaktion an (Abbildung 21A). Die ersten Versuche eines kombinierten Systems von LOX und *C. rugosa* Lipasen zeigten allerdings alle eine maximale Ausbeute von 20 % bei Distelöl einer Konzentration von 30 mM Linolsäureäquivalent an. Diese Ausbeute liegt weit unter der mit LOX allein erreichten Ausbeute an HPODE und auch weit unterhalb der theoretischen Ausbeute an freien Fettsäuren bei alleinigem Einsatz der Lipasen. Schon frühere Arbeiten hatten das Problem geringer Ausbeuten erkannt [240,247,250]. In einer weiteren Arbeit konnte dieses Phänomen einer Inhibition nicht beobachtet werden, da es nur bei höheren Substratkonzentrationen auftritt [248]. Untersuchungen einer 2-Schritt-Eintopf Reaktion, bei der die Lipase zuerst für 24 Stunden allein eingesetzt wurde, um die freigesetzten Fettsäuren im Anschluss mit Hilfe der LOX umzusetzen, zeigten Ausbeuten zwischen 50 und 70 % in Abhängigkeit der gewählten Lipase. Daher ist das Problem der verringerten Ausbeute an HPODE auf die Lipase zurückzuführen. Weitere Untersuchungen zeigten eine Deaktivierung der Lipasen bei einer HPODE-Konzentration zwischen 5 und 6 mM. Dafür könnten peroxidierte Partialglyceride und Fettsäuren verantwortlich sein, die zu einer Inaktivierung der Lipase führen. Diese Deaktivierung betraf alle getesteten Lipasen. Die Arbeitsgruppe von Marie Legoy konnte einen ähnlichen Effekt beobachten [250]. Diese Arbeitsgruppe hat durch drastische Erhöhung der Enzymmengen von sowohl Lipase als auch Lipoxygenase auf 120 bzw. 25 % (w/w) vom Substrat die Ausbeute erhöhen können. Nichtsdestotrotz hatte auch diese Arbeitsgruppe mit dem Phänomen abnehmender Ausbeuten umzugehen, das insbesondere bei höheren Substratkonzentrationen zum Tragen kam und auf die schlechte Substratzugänglichkeit zurückzuführen ist. Mit dem Ziel einen potenziell industriell anwendbaren Prozess zu entwickeln, stellte diese Lösung allerdings keinen Weg für diese Arbeit dar. Wie auch andere Arbeitsgruppen beschrieben, zeigt LOX-1 bei hohen Substratkonzentrationen wie auch viele Lipasen, eine *Lag*-Phase zu Beginn der Reaktion [248]. Diese Phase ist länger, je höher die Substratkonzentration in der Lösung ist [246]. Mit diesem Wissen wurde eine Lipase gewählt, die auch bei hohen Substratkonzentrationen eine schnelle Hydrolysetätigkeit zeigte. Die Untersuchung zur Selektion einer geeigneten Lipase offenbarte, dass die Amano Lipase aus *P. fluorescens* im Gegensatz zu

allen getesteten Lipasen nicht nur sehr gut auch bei höheren pH-Werten (8 – 9) arbeitet, sondern, dass die Hydrolyseaktivität auch wesentlich schneller durch eine stark verkürzte *Lag*-Phase erfolgte. Nach einer weiteren Optimierung konnten mit dieser Lipase 85 % an freien Fettsäuren nach 3 Stunden Distelölhydrolyse erreicht werden und somit schon nach beinahe der Hälfte der Zeit im Vergleich zu den Lipasen aus *C. rugosa*.

Durch Einsatz dieser Lipase konnte bei kontinuierlicher Zufuhr kleiner Mengen LOX die HPODE-Produktion verzögert werden, um der Lipase möglichst viel Zeit zu gewähren, das Distelöl möglichst weit umzusetzen. Es konnte ein synergistischer Effekt beobachtet werden, der nicht nur eine kontinuierliche Umsetzung der freigesetzten Linolsäure erlaubte, sondern auch wesentlich höhere Ausbeuten als in der Literatur beschrieben, ermöglichte. Dieser Effekt kann durch die emulgierende Wirkung der freigesetzten Di- und Monoglyceride in der Lösung erklärt werden, welche den Nebeneffekt hatten, die Linolsäure für die LOX besser zugänglich zu machen. Dadurch wurden bei einem pH-Wert von 8 Ausbeuten von 82 % HPODE mit einem Regioisomeren Verhältnis von 90:10 13:9 HPODE erreicht (Abbildung 25A). Da die Lipase nach 7 Stunden nur 85 % des Öls hydrolysiert hatte, wurden >96 % der freien Linolsäure zu Hydroperoxiden umgesetzt. Dies konnte bis zu einer getesteten Substratkonzentration von 300 mM Linolsäure in Distelöl gezeigt werden (Abbildung 27A). Diese Enzymkaskade erreichte eine Ausbeute von ca. 250 mM oder 70 g/l 13-HPODE nach 7 Stunden mit einer Produktivität von 10 g/l pro Stunde.

Die Anwendung von Katalase wurde bereits in biokatalytischen Reaktionen zusammen mit Oxidasen, wie etwa Pyranose-2-Oxidase, Aminosäure- und Glukoseoxidase oder Galaktoseoxidase, die molekularen Sauerstoff als Substrat verwenden und dabei Wasserstoffperoxid erzeugen, untersucht [251-253]. Die Katalase in diesen Systemen hat die Aufgabe, zum einen die H_2O_2 -Konzentration unter einem toxischen Niveau zu halten und gleichzeitig gelöstes O_2 zu erzeugen. In der Kaskade mit Lipase, LOX und Katalase war ebenfalls eine Doppelnutzung der Katalase beabsichtigt, allerdings mit einem anderen Schwerpunkt: Neben der Erzeugung von feindispersen Sauerstoff für die LOX-katalysierte Hydroperoxidierung war die Schaumreduktion in dem mehrphasigen Reaktionssystem ein wichtiges Thema. In früheren Studien konnte eine geringere Schaumbildung bei der Kombination von LOX und Katalase bei der Hydroperoxidierung ungesättigter Fettsäuren erreicht werden [254]. Auch in dem in dieser Arbeit untersuchten System konnte durch Katalase und kontinuierlicher Wasserstoffperoxid Zugabe das Schaumproblem sehr stark reduziert werden (Abbildung 26). Im Vergleich zu früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Legoy konnte mit diesem Prozess der Einsatz der kommerziellen Enzympräparationen von Lipase und LOX um einen Faktor 92 bzw. 17 reduziert werden und der Prozess so möglichst kosteneffizient gestaltet werden [240,241,250]. Der Einsatz von Sojamehlsuspension führte zwar zu einer Verdünnung der Produktlösung, war

aber ebenso möglich. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen (>300 mM) stellte sich allerdings eine Gelierung der Reaktionslösung ein, welche die Prozessführung erheblich erschwerte. Aufgrund der zahlreichen Schwebstoffe in der Suspension, die trotz Filtration weiterhin in der Lösung verblieben, wurde die Durchmischung durch die erhöhte Viskosität der Lösung erheblich verschlechtert. Dieses Problem war so im kleinen Maßstab nicht einfach überwindbar. Wie schon aus früherer Literatur bekannt ist, funktioniert die Hydroperoxidierung mit LOX in großen Reaktoren besser [245, 235]. Zurückzuführen lässt sich das auf die bessere Agitation und das bessere Monitoring von Reaktionsparametern wie pH-Wert, Sauerstoffsättigung und Zutropfrate. Die Durchmischung mit Hilfe eines Rührfisches erscheint aus diesem Grund für höhere Konzentrationen nicht praktikabel zu sein. Um größere Mengen Distelöl einzusetzen und dabei eine ausreichende Durchmischung der Reaktionslösung zu gewährleisten, sind ein Überkopfrührer sowie ein größeres Volumen nötig. Erste Scale-up Versuche mit Sojamehlsuspension als LOX-Quelle zeigten die Möglichkeit eines Einsatzes dieser Kaskade in größeren Ansätzen, diese erreichten bei Volumina zwischen 0,5 und 1,5 l jeweils >80 % Ausbeute an HPODE bei einer Distelölkonzentration äquivalent zu 300 mM.

Die in dieser Arbeit erreichte Effizienz des Prozesses liegt mit 70 – 280 kg HPODE pro kg Biokatalysator in einem Bereich, in dem eine Produktion von Bulkchemikalien zu teuer ist. Dieser Bereich ist allerdings ausreichend für die kosteneffiziente Herstellung von Feinchemikalien, welche größere Margen und auch ein weniger effizientes Produkt-Katalysator-Verhältnis erlaubt. Lipoxygenase wird seit Jahren in Kombination mit einer Hydroperoxid Lyase zur Herstellung von Duftstoffen mit grüner Note wie Hexanal eingesetzt [254]. Es liegt nahe, diesen Prozess mit dem Zielprodukt Hexanal neu auszurichten und im Nachgang in einem Eintopf-Verfahren oder Zwei-Schritt-Prozess mit einer Hydroperoxid Lyase oder einer selektiven chemischen Spaltung zu koppeln. Das Produkt kann durch die geringere Siedetemperatur im Anschluss durch einfache fraktionierte Destillation aufgearbeitet werden. Mit einem neuen Fokus auf den hochpreisigen Duftstoff Hexanal, könnte die Effizienz des Prozesses sicherlich ausreichend sein.

Eine weitere Optimierung kann nötig sein, wenn das Koppelprodukt als Polymerintermediat für die Synthese von Polyamid-12 eingesetzt werden soll. Polyamid-12 ist ein Spezialpolyamid, welches aufgrund seiner Resistenz gegenüber Chemikalien und wasserabweisendem Verhalten geeignet für den Einsatz in Kraftstoffleitungen von Motoren ist. Dennoch sind die Grundstoffe für eine Synthese dieses Polymers günstig. Mit dem Fokus diese Kaskade weiter zu optimieren und kosteneffizienter zu gestalten, lassen sich verschiedene Wege beschreiten. Zum einen ist die Wahl einer geeigneten Lipase entscheidend, die sowohl hohe Aktivität gegenüber dem Substrat zeigt als auch eine möglichst kurze *Lag*-Phase aufweist. Dadurch lässt sich die Ausbeute von 82 % auf ca. 95 % HPODE erhöhen (85 g/l). Ein vielversprechender Weg, um insbesondere die Katalysatoreffizienz des Prozesses zu verbessern, liegt in der verringerten Zugabe der

Lipoxygenase über die Zeit. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei einer halbierten Zugabe pro Stunde die Reaktionszeit nur um 2 Stunden erhöht, anstatt sich zu verdoppeln. Ein Viertel der Menge reicht aus, um die freigesetzte Linolsäure in ca. 11 – 12 Stunden komplett zu hydroperoxidieren. Theoretisch ließe sich die eingesetzte Menge der LOX bei einer Reaktionszeit von 24 Stunden um den Faktor 256 reduzieren und so ein Produkt zu LOX-Verhältnis von 17.920 kg pro kg Enzym erreichen. Dies würde den Prozess hocheffizient gestalten und eine Anwendung für die Synthese von Bulkchemikalien erlauben.

4.3 Reaktionskaskade mit immobilisierten Enzymen

4.3.1 Immobilisierung und Recycling von LOX-1

Kosteneffizienz ist einer der wichtigsten Parameter bei der Beurteilung, ob ein Prozess im industriellen Maßstab Anwendung finden kann. Die Immobilisierung von Enzymen auf Trägermaterialien ermöglicht eine Verbesserung der Stabilität der Enzyme gegenüber Temperatur, chemischen und mechanischen Einflüssen [43,45,61]. Darüber hinaus erlauben immobilisierte Enzyme eine Verwendung in mehreren Zyklen und eine einfache Abtrennung des Katalysators von der Reaktionslösung [254-256]. Diese Vorteile erlauben eine Reduktion der Prozesskosten und eine mögliche Anwendung von Enzymen im industriellen Kontext. Aus den oben genannten Vorteilen wurde LOX aus Sojabohnen auf verschiedene Materialien wie Calciumalginat, Immobead oder Kohlenstoffnanoröhren über verschiedene Immobilisierungsmethoden gebunden und untersucht. Der Einschluss von LOX in Calciumalginat-Perlen stellte sich bereits in vorherigen Arbeiten als vielversprechende Methode heraus [52,257]. Durch den Prozess des Einschlusses, bei dem das Enzym nur physikalisch in einem Polymergitter festgehalten wird, wurde ein geringerer Verlust der Enzymaktivität vermutet. Der Einschluss von LOX in ein Copolymer aus Calciumalginat und Tetramethylorthosilikat (5 Zyklen, insgesamt 10 Stunden) schien vielversprechend [52,257]. Allerdings konnten diese Ergebnisse in dieser Arbeit nicht repliziert werden. In jüngster Zeit wurde der Einschluss von LOX auch auf Polyacrylamidgel (7 Zyklen, insgesamt 21 Minuten) und vernetzten Schichtsilikaten (5 Zyklen, insgesamt 2,5 Stunden) untersucht [258,259]. Der Einschluss in Alginatperlen zeigte Erfolg, allerdings lag die Aktivität mit ca. 70 U/mg Enzym weit unterhalb der Aktivität von freier LOX-1 (21.000 U/mg) (Tabelle 22). Durch Variation verschiedener Parameter wie der Konzentration des Co-Polymeragens TMOS und der Enzymbeladung konnte allerdings keinerlei Verbesserung erreicht werden. Erst nach Einsatz des Co-Polymeragens TMMS war eine Erhöhung der Aktivität auf 157 U/mg möglich. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass der Einsatz von TMMS zu größeren, auch unpolaren Porenöffnungen im Polymer führt [52]. Da das Enzym weitgehend seine native Form beibehalten sollte, liegt der Schluss nahe, dass die geringe Aktivität mit Diffusionsproblemen der Linolsäure und oder des Sauerstoffs zusammenhängt.

Da die LOX im Polymer eingeschlossen und nicht auf der Oberfläche gebunden vorliegt, spielt die Porengröße und Polarität eine entscheidende Rolle für die Umsetzung von Linolsäure zu HPODE. Eine Untersuchung der Zeit-Umsatzkurve zeigte nicht wie üblich eine Umsetzung ähnlich einer Michaelis-Menten-Kurve an, sondern verlief über die gesamte Messzeit linear. Diese Beobachtung stützt die Annahme eines diffusionskontrollierten Prozesses.

Aufgrund dieser Limitierung wurde alternativ die kovalente Immobilisierung auf verschiedenen Trägern untersucht. Insbesondere Immobead 150 A und 150 P sind als Polyacrylate mit Oxiran/Butyl-Gruppen und Oxiran-Gruppen auch ohne zusätzliche Linker wie Ethylendiamin und Glutaraldehyd in der Lage Enzyme kovalent zu binden. Daneben wurden als drittes Trägermaterial Aldehyd-funktionalisierte Kohlenstoffnanoröhren untersucht. Eine kovalente Immobilisierung auf Immobead 150 P erreichte bei einer Beladung von 100 mg pro g Träger eine Aktivität von 225 U/mg (ca. 1 % Restaktivität) (Tabelle 22). Im Gegensatz zur Immobilisierung durch Einschluss kann die geringe Restaktivität an einer Änderung der Konformation des Enzyms durch die Bindung an den Träger liegen. Daneben kann es auch zu einer Bindung der Linolsäure/HPODE an den Träger kommen, wodurch beim abfiltrieren Produkt entfernt und eine Endpunktbestimmung verfälscht werden könnte.

Dieses Immobilisat konnte in einem Recyclingtest in bis zu acht Zyklen für insgesamt 16 Stunden eingesetzt werden, während die Aktivität > 50 % betrug (Abbildung 32). Andere Studien zur Immobilisierung von LOX untersuchten die Wiederverwendbarkeit auf Talk (10 Zyklen, insgesamt 50 Minuten), Polymerperlen und Ionenaustauscherträger sowie die kovalente Bindung an Agarose, oxiranhaltige Polyacrylate (7 Zyklen, insgesamt 7 Stunden) und andere Polymere [260-262]. In einem Festbettreaktor wurde die Oxygenierung von Linolsäure mit LOX, das auf vernetztem Schichtsilikat immobilisiert war, unter kontinuierlichen Bedingungen durchgeführt [263]. Kürzlich wurde über ein selbstorganisiertes Verbundsystem mit Lipase und LOX berichtet [242]. Dieses System konnte über 9 Zyklen mit jeweils einer Ausbeute von 3 % Sojabohnenöl zu HPODE umsetzen. Im Vergleich zu den bisherigen Arbeiten konnte mit dem hier etablierten System eine lange Enzymstabilität über mehrere Zyklen erreicht werden bei gleichzeitig guten Ausbeuten und Regioselektivitäten (Tabelle 33).

Tabelle 33: Vergleich der Immobilisierung von LOX auf unterschiedlichen Trägern.

Träger	Zyklen	Gesamtreaktionszeit	Quelle
Talk	10	50 min	[260]
Oxiranhaltige Polyacrylate	7	7 Stunden	[262]
Polyacrylamidgel	7	21 min	[258]
Schichtsilikat	5	2,5 Stunden	[259,263]
Alginat-TMOS	5	10 Stunden	[52,257]
Selbstorganisiertes System	9	18 Stunden	[242]
Immobead 150 P	kontinuierlich	16 Stunden	Diese Arbeit
Immobead 150 P	8	16 Stunden	Diese Arbeit
Alginat-TMMS	5	10 Stunden	Diese Arbeit

Die Immobilisierung auf Kohlenstoffnanoröhren ist eine neue Methode und wurde so noch nicht für die LOX untersucht. Von den untersuchten Funktionalisierungen zeigte der Versuch mit EDA aminierte und mit Glutaraldehyd aktivierte Träger die besten Eigenschaften in Bezug auf Aktivität und Wiederverwendbarkeit. Im Fall der Lipoxygenase konnte allerdings keine Aktivität nach der Immobilisierung ermittelt werden. Diese sind aufgrund ihrer geringen Dichte und Größe, nur sehr schwer vom umgebenden Reaktionsmedium zu trennen und können als Schwebstoffe die Messungen stören. Dieses Co-Immobilisat wurde auch im *Batch*-Ansatz recycelt, wobei die Enzyme nur über einen Zyklus stabil blieben (< 50 % Restaktivität zu Beginn des zweiten Zyklus'). Im Vergleich zu anderen in dieser Arbeit untersuchten LOX-Träger-Kombinationen ist die Wiederverwendbarkeit des Enzyms allerdings nur eingeschränkt gegeben. So war der Einsatz von LOX auf Nanoröhren nur über zwei Zyklen (2 Stunden pro Zyklus) möglich, bevor die Aktivität des Enzyms unter 50 % fiel. Andere Formen der Aktivierung des Trägers führten entweder zu inaktivem Enzym oder erlaubten nur einen einmaligen Einsatz. Den vorliegenden Ergebnissen nach sind Kohlenstoffnanoröhren in dieser Form als Träger für die Immobilisierung von LOX ungeeignet.

In einem Festbettreaktor unter kontinuierlicher Reaktionsführung konnte das getestete Immobead 150 P Immobilisat auch über 16 Stunden hinweg seine komplette Aktivität erhalten (Abbildung 33). Allerdings schien die Umsetzung von Linolsäure bei maximal 23 % Ausbeute ein Plateau zu erreichen. Dieses wurde mit steigender Substrat-Flussrate schneller erreicht und stoppte auf höherem Niveau. Der Trend zu höheren Flussraten deutet hierbei auf eine unvollständige Reaktion.

Ein wichtiger Faktor wäre hier die verringerte Substratzugänglichkeit durch die Bildung von Mizellen aufgrund fehlender Agitation im Reaktor, die so auch bei der Reaktion freier LOX mit Linolsäure beobachtet werden konnte. Auch die Sauerstoffzufuhr war in diesem System nur eingeschränkt im Reaktor kontrollierbar. Die Optimierung eines solchen Systems erfordert im besten Fall *inline Monitoring* und Simulationen der Fluidodynamik. Beides war mit dem zur Verfügung liegenden Reaktoren und Pumpensystem allerdings nicht so ohne weiteres möglich.

4.3.2 Co-Immobilisierung der verschiedenen Enzyme

Während die Immobilisierung von LOX schon in früheren Arbeiten mit verschiedenen Trägern beschrieben wurde, gibt es keine Literatur zur Co-Immobilisierung von Lipase oder Katalase mit LOX. Bevor eine Co-Immobilisierung erfolgen konnte, wurde die Immobilisierung von Lipasen und Katalase als einzelne Enzyme untersucht. Lipase aus *C. rugosa* VII und CCL wie auch Amano Lipase aus *P. fluorescens* wurden erfolgreich auf verschiedene Träger immobilisiert. Die Lipasen aus *C. rugosa* konnten immobilisiert auf Lewatit VP OC 1600 in 10 Zyklen wiederholt ohne Aktivitätsverlust eingesetzt werden und blieben insgesamt für 20 Stunden stabil (Abbildung 37). Die Lipase aus *P. fluorescens* zeigte auf verschiedenen Trägern Aktivität, allerdings konnte diese nur in 2 aufeinanderfolgenden Zyklen eingesetzt werden, bevor ihre Aktivität unter 50 % fiel. Generell schienen hydrophobe Trägermaterialien wie Accurel MP 1000 und Lewatit VP OC 1600 besser für die Immobilisierung von Lipasen zu eignen [264-267]. Im Gegensatz dazu konnte keine messbare Aktivität bei der Immobilisierung der Lipasen auf Oxo-MWNTs ermittelt werden. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, in der Amano Lipase aus *P. fluorescens* auf eben jenem Träger immobilisiert wiederholt in Zyklen eingesetzt wurde [268]. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit nicht repliziert werden, möglicherweise war die Derivatisierung der MWNTs nur unzureichend.

Die Immobilisierung von Katalase war erfolgreich auf Immobead 150 P und Alginat-Perlen. Das eingeschlossene Enzym zeigte in den Alginat-Perlen mit einer Aktivität von ca. 12.300 U/mg die höchste Aktivität (Tabelle 25). Allerdings kam es bei Verwendung dieses Trägers zum Auswaschen des Enzyms, was durch Messung von Katalase-Aktivität im trägerfreien Überstand bestätigt werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Immobilisierung auf Immobead 150 P bevorzugt, die ein Auswaschen durch kovalente Bindung an den Träger verhinderte.

In dieser Arbeit konnte die erstmalige Co-immobilisierung von LOX und Katalase auf Immobead 150 P beschrieben werden. Der Einsatz in wiederholten Zyklen war erfolgreich und das Co-Immobilisat konnte über fünf Zyklen eingesetzt werden (10 Stunden Gesamtzeit) (Abbildung 36). Während die Stabilität von LOX auf Immobead 150 bei geringen Linolsäurekonzentrationen besser war, so war dies bei der Verwendung des Co-Immobilisats mit Katalase nicht der Fall. Sowohl bei 1 mM Linolsäure als auch bei 30 mM Linolsäure war eine Verwendung des Co-Immobilisats über fünf Zyklen möglich.

Die geringere Stabilität des Co-Immobilisats bei niedrigen Substratkonzentrationen im Vergleich zur immobilisierten LOX lässt sich durch den schädlichen Einfluss des Wasserstoffperoxids zur *in situ* Sauerstoffgenerierung während der Reaktion erklären. Aufgrund der räumlichen Nähe der Katalase zur LOX auf dem Träger kann eine vollständige Entfernung des Wasserstoffperoxids, bevor es die LOX erreichen konnte, nicht sichergestellt werden. Eine zunehmende vermutete potenzielle zeitabhängige Denaturierung der Katalase wirkt sich unmittelbar negativ auf die LOX-Aktivität aus. Daher wäre eine höhere Enzymladung an Katalase oder eine Reduktion der Wasserstoffperoxid-Zufuhr erforderlich, um eine längere Aktivität zu gewährleisten.

Die Co-Immobilisierung von Lipase und LOX war erfolgreich und bis zu 33 % HPODE konnte nach 4 Stunden generiert werden (Abbildung 38). Auch bei Verwendung eines Co-Immobilisat aus LOX und Lipase aus *P. fluorescens* auf Oxo-MWNTS konnten HPODE-Ausbeuten von bis zu 33 % ermittelt werden. Allerdings wurden alle getesteten Lipasen aus *C. rugosa* und *P. fluorescens* auf verschiedenen Trägern nach dem ersten Zyklus deaktiviert. Diese könnte entweder durch die Anwesenheit von LOX oder eine Inaktivierung der Lipase durch das Hydroperoxid erfolgen. Aufgrund der räumlichen Nähe der LOX könnte das gebildete HPODE sofort die Lipasen deaktivieren. So könnte schon eine geringe Konzentration von HPODE für eine Inaktivierung der Lipasen ausreichend sein. Während die Lipase aus *P. fluorescens* durch ihre frühzeitige Hydrolyse des Distelöls eine größere Menge an freien Fettsäuren freisetzen konnte, wurden die Lipasen aus *C. rugosa* frühzeitig während der *Lag*-Phase deaktiviert. Dieser Effekt wurde im Rahmen dieser Arbeit auch bei der Verwendung von freien Enzymen beobachtet, wurde aber in früherer Literatur nicht erwähnt.

Die Wege zur Prozessoptimierung liegen zum einen in der Untersuchung neuer Trägermaterialien für die Immobilisierung der Enzyme und in einer veränderten Prozessführung. Während ein *Batch*-Prozess für das Katalase-LOX-Immobilisat funktioniert, wird die Lipase bei Anwesenheit von HPODE deaktiviert. Folgearbeiten könnten sich auf ein breites Lipase-Screening und die Stabilität von Lipasen in Gegenwart von HPODE-Spezies konzentrieren. Das Hauptaugenmerk weiterer Studien sollte auf der Minimierung des Kontaktes der Lipasen mit HPODE liegen. Dies könnte erreicht werden, indem zwei aufeinander folgende *Batch*-Ansätze, die entweder immobilisierte LOX oder Lipase enthalten, miteinander verbunden werden (Abbildung 40).

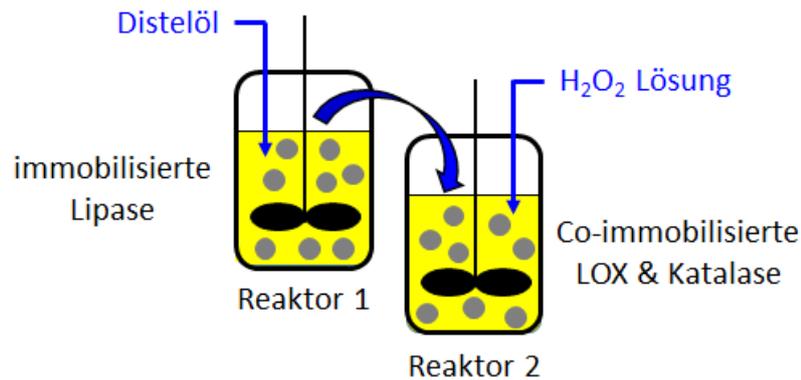


Abbildung 40: Kombiniertes Batch-Ansatz mit getrennten Immobilisaten. Im ersten Reaktor liegt die Lipase getrennt von der LOX und Katalase vor. Hydrolyse-Lösung wird kontinuierlich von Reaktor 1 in Reaktor 2 mit Co-immobilisierter LOX und Katalase gepumpt.

Durch Überführung der hydrolysierten Ölmischung vom Lipase-*Batch* zum LOX-*Batch* sollte es möglich sein, den positiven Effekt von Mono- und Diglyceriden in der Reaktionslösung auszunutzen. In der Kaskade mit freien Enzymen konnten dadurch beinahe quantitative Ausbeuten von HPODE erreicht werden. Neben einem Ansatz im *Batch*-Verfahren bietet sich ein Einsatz der Enzyme in einer gekoppelten Reaktorkaskade mit getrennten Immobilisaten an. Während im kleinen Maßstab die Zugänglichkeit des Substrates aufgrund fehlender Agitation eine große Rolle spielte, können diese Probleme im größeren Labormaßstab oder in einer Pilotanlage eliminiert werden. Wie beschrieben zeigte die LOX keinen Aktivitätsverlust über 16 Stunden hinweg, während auch die Lipasen aus *C. rugosa* auf Accurel MP 1000 und Lewatit VP OC über 10 Zyklen (à 2 Stunden), über 20 Stunden aktiv blieben. Nach weiterer Optimierung der Reaktorparameter könnte eine wesentliche Verbesserung der Umsätze bei gleichzeitiger verbesserter Stabilität der Enzyme erreicht werden.

4.4 Chemokatalytische Spaltung der Hydroperoxide

Aromastoffe, etwa kurzkettige Aldehyde, wie Hexanal und Hexenal sowie ihre korrespondierenden Alkohole Hexanol und Hexenol sind so genannte grüne Noten und verantwortlich für das Aroma von frisch geschnittenem Gras, Laub, Äpfeln und anderen Früchten [24]. Bislang erfolgt die Herstellung grüner Noten in der Regel durch enzymatische Katalyse mit Lipoxygenase (LOX) und Hydroperoxid Lyase (HPL) [253, 269-271]. In dieser Arbeit ist es gelungen die Spaltung der Hydroperoxide auch chemokatalytisch unter Einsatz von Lewis-Säuren durchzuführen. Die Ausbeute erreichte mit 23 % in den ersten Versuchen allerdings noch nicht die des industriell genutzten Systems mit HPL [253] (Tabelle 30). Nur wenige Arbeiten haben die Spaltung bisher chemisch untersucht [27,272]. Während im Vergleich zum etablierten biokatalytischen System Verbesserungspotential besteht, ist die in dieser Arbeit erreichte Ausbeute eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu früheren Arbeiten [228,272]. Im Verlauf

der Versuche wurde schnell deutlich, dass polare Lösungsmittel wie Wasser und Ethylacetat, aber auch gänzlich unpolare Lösungsmittel wie Heptan, eine Spaltung entweder verhindern oder erschweren. Die besten Umsätze konnten in Anwesenheit von Ethern wie THF und MTBE erreicht werden. Interessant ist hierbei auch, dass die Reaktion bei Raumtemperatur insbesondere in MTBE besser ablief als bei 30 °C. Ursächlich ist hier wohl die geringe Stabilität des Substrates, welches sich schon bei Temperaturen über 30 °C zersetzt und zu Hydroxy/Oxosäuren weiterreagiert. Das Spaltprodukt Oxododecensäure, konnte im Gegensatz zum Hexanal, nicht detektiert werden. Diese ist hochreaktiv und sehr instabil, weswegen ein Abbau während der Reaktion die wahrscheinliche Ursache für ein Fehlen der Oxododecensäure ist. Allgemein lässt sich festhalten, dass die Spaltung von HPODE zu Hexanal erfolgreich ablief, wenn auch bei geringen Ausbeuten. Weitere Optimierung der Reaktionsparameter wie Wahl des Katalysators und seiner Beladung, Lösungsmittel, Temperatur als auch Substratkonzentration ist deswegen für weitere Arbeiten von zentraler Bedeutung.

Literaturverzeichnis

- [1] Brown, H. Alex; Marnett, Lawrence J. (2011): Introduction to lipid biochemistry, metabolism, and signaling. In: *Chemical reviews* 111 (10), S. 5817–5820. DOI: 10.1021/cr200363s.
- [2] M. Bockisch (2015): Fats and Oils Handbook, Chapter 1, S. 1-52, Academic Press and AOCS press, Champaign, IL, USA, DOI: 10.1016/C2015-0-02417-0.
- [3] Schörken, Ulrich; Kempers, Peter (2009): Lipid biotechnology: Industrially relevant production processes. In: *European Journal of Lipid Science and Technology* 111 (7), S. 627–645. DOI: 10.1002/ejlt.200900057.
- [4] Pasha, Mustafa Kamal; Dai, Lingmei; Liu, Dehua; Guo, Miao; Du, Wei (2021): An overview to process design, simulation and sustainability evaluation of biodiesel production. In: *Biotechnology for biofuels* 14 (1), S. 129. DOI: 10.1186/s13068-021-01977-z.
- [5] Bornscheuer, Uwe T. (2018): Enzymes in Lipid Modification. In: *Annual review of food science and technology* 9, S. 85–103. DOI: 10.1146/annurev-food-030117-012336.
- [6] Lu, Yao; Lv, Qijun; Liu, Bo; Liu, Jie (2019): Immobilized *Candida antarctica* lipase B catalyzed synthesis of biodegradable polymers for biomedical applications. In: *Biomaterials science* 7 (12), S. 4963–4983. DOI: 10.1039/C9BM00716D.
- [7] Vincenti, Sophie; Mariani, Magali; Alberti, Jean-Christophe; Jacopini, Sabrina; Brunini-Bronzini de Caraffa, Virginie; Berti, Liliane; Maury, Jacques (2019): Biocatalytic Synthesis of Natural Green Leaf Volatiles Using the Lipoxygenase Metabolic Pathway. In: *Catalysts* 9 (10), S. 873. DOI: 10.3390/catal9100873.
- [8] Gao, Xiquan; Kolomiets, Michael V. (2009): Host-derived lipids and oxylipins are crucial signals in modulating mycotoxin production by fungi. In: *Toxin Reviews* 28 (2-3), S. 79–88. DOI: 10.1080/15569540802420584.
- [9] Noordermeer, Minke A.; Veldink, Gerrit A.; Vliegthart, Johannes F. G. (2001): Fatty Acid Hydroperoxide Lyase: A Plant Cytochrome P450 Enzyme Involved in Wound Healing and Pest Resistance. In: *ChemBioChem* 2 (7-8), S. 494–504. DOI: 10.1002/1439-7633(20010803)2:7/8<494: AID-CBIC494>3.0.CO;2-1.
- [10] Schwab, Wilfried; Davidovich-Rikanati, Rachel; Lewinsohn, Efraim (2008): Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. In: *The Plant journal: for cell and molecular biology* 54 (4), S. 712–732. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x.

- [11] Schrader, Jens. (2007): Microbial flavour production. In: *Flavours and Fragrances* (Berger, R.G., ed.). Berlin: Springer, S. 507–574
- [12] Nichols, Peter D.; Petrie, James; Singh, Surinder (2010): Long-chain omega-3 oils-an update on sustainable sources. In: *Nutrients* 2 (6), S. 572–585. DOI: 10.3390/nu2060572.
- [13] Warude, Dnyaneshwar; Joshi, Kalpana; Harsulkar, Abhay (2006): Polyunsaturated fatty acids: biotechnology. In: *Critical reviews in biotechnology* 26 (2), S. 83–93. DOI: 10.1080/07388550600697479.
- [14] Napier, Johnathan A. (2007): The production of unusual fatty acids in transgenic plants. In: *Annual review of plant biology* 58, S. 295–319. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103811.
- [15] Singh, Surinder P.; Zhou, Xue-Rong; Liu, Qing; Stymne, Sten; Green, Allan G. (2005): Metabolic engineering of new fatty acids in plants. In: *Current opinion in plant biology* 8 (2), S. 197–203. DOI: 10.1016/j.pbi.2005.01.012.
- [16] Zhou, Yi; Wu, Shuke; Bornscheuer, Uwe T. (2021): Recent advances in (chemo)enzymatic cascades for upgrading bio-based resources. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* 57 (82), S. 10661–10674. DOI: 10.1039/d1cc04243b.
- [17] Bell, Elizabeth L.; Finnigan, William; France, Scott P.; Green, Anthony P.; Hayes, Martin A.; Hepworth, Lorna J. et al. (2021): Biocatalysis. In: *Nature Reviews Methods Primers* 1 (1). DOI: 10.1038/s43586-021-00044-z.
- [18] Sheldon, Roger A.; Woodley, John M. (2018): Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. In: *Chemical reviews* 118 (2), S. 801–838. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00203.
- [19] Bilal, Muhammad; Iqbal, Hafiz M. N.; Guo, Shuqi; Hu, Hongbo; Wang, Wei; Zhang, Xuehong (2018): State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: A review from immobilization to implementation view point. In: *International journal of biological macromolecules* 108, S. 893–901. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.182.
- [20] Bornscheuer, Uwe. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, Romas J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. (2012): Engineering the third wave of biocatalysis. In: *Nature* 485 (7397), S. 185–194. DOI: 10.1038/nature11117.
- [21] Strohmeier, Gernot A.; Pichler, Harald; May, Oliver; Gruber-Khadjawi, Mandana (2011): Application of designed enzymes in organic synthesis. In: *Chemical reviews* 111 (7), S. 4141–4164. DOI: 10.1021/cr100386u.
- [22] Sanchez-Moreno, Israel; Oroz-Guinea, Isabel; Iturrate, Laura; Garcia-Junceda, Eduardo (2012): Multi-enzyme reactions. In: *Carreira EM*, Yamamoto, Hisashi, editors. Comprehensive

chirality. Cambridge, MA: Academic Press, ISBN: 978-0-08-095168-3, DOI: 10.1016/B978-0-08-095167-6.00725-4

[23] Sperl, Josef M.; Sieber, Volker (2018): Multienzyme Cascade Reactions—Status and Recent Advances. In: *ACS Catalysis* 8 (3), S. 2385–2396. DOI: 10.1021/acscatal.7b03440.

[24] Turner, Nancy J. (2012): Introduction and general concepts. Carreira, Erick M., Yamamoto, Hisashi, editors. *Comprehensive chirality*. Cambridge, MA: Academic Press, ISBN: 978-0-08-095168-3.

[25] Yeon, Young Joo; Park, Jin-Byung (2018): Regiospecific Conversion of Lipids and Fatty Acids through Enzymatic Cascade Reactions. In: *AOCS Press* (Hg.): Chapter 7 - Regiospecific Conversion of Lipids and Fatty Acids through Enzymatic Cascade Reactions. *Lipid Modification by Enzymes and Engineered Microbes*. Elsevier, S. 139–155. DOI: 10.1016/B978-0-12-813167-1.00007-4

[26] Lee, Da-Som; Song, Ji-Won; Voß, Moritz; Schuiten, Eva; Akula, Ravi Kumar; Kwon, Yong-Uk et al. (2019): Enzyme Cascade Reactions for the Biosynthesis of Long Chain Aliphatic Amines from Renewable Fatty Acids. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 361 (6), S. 1359–1367. DOI: 10.1002/adsc.201801501.

[27] Zhao, Chen; Lercher, Johannes A. (2012): Upgrading pyrolysis oil over Ni/HZSM-5 by cascade reactions. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 51 (24), S. 5935–5940. DOI: 10.1002/anie.201108306.

[28] Grondal, Christoph; Jeanty, Matthieu; Enders, Dieter (2010): Organocatalytic cascade reactions as a new tool in total synthesis. In: *Nature chemistry* 2 (3), S. 167–178. DOI: 10.1038/nchem.539.

[29] Muschiol, Jan; Peters, Christin; Oberleitner, Nikolin; Mihovilovic, Marko D.; Bornscheuer, Uwe T.; Rudroff, Florian (2015): Cascade catalysis—strategies and challenges en route to preparative synthetic biology. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* 51 (27), S. 5798–5811. DOI: 10.1039/C4CC08752F.

[30] Dvorak, Pavel; Kurumbang, Nagendra P.; Bendl, Jaroslav; Brezovsky, Jan; Prokop, Zbynek; Damborsky, Jiri (2014): Maximizing the efficiency of multienzyme process by stoichiometry optimization. In: *Chembiochem* 15 (13), S. 1891–1895. DOI: 10.1002/cbic.201402265.

[31] Zhang, Yifei; Hess, Henry (2017): Toward Rational Design of High-efficiency Enzyme Cascades. In: *ACS Catalysis* 7 (9), S. 6018–6027. DOI: 10.1021/acscatal.7b01766.

- [32] Yan, Jinyong; Liu, Yi; Wang, Cong; Han, Bingnan; Li, Shengying (2015): Assembly of lipase and P450 fatty acid decarboxylase to constitute a novel biosynthetic pathway for production of 1-alkenes from renewable triacylglycerols and oils. In: *Biotechnology for biofuels* 8, S. 34. DOI: 10.1186/s13068-015-0219-x.
- [33] Huijbers, Mieke M. E.; Zhang, Wuyuan; Tonin, Fabio; Hollmann, Frank (2018): Light-Driven Enzymatic Decarboxylation of Fatty Acids. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 57 (41), S. 13648–13651. DOI: 10.1002/anie.201807119.
- [34] Lu, Wenhua; Ness, Jon E.; Xie, Wenchun; Zhang, Xiaoyan; Minshull, Jeremy; Gross, Richard A. (2010): Biosynthesis of monomers for plastics from renewable oils. In: *Journal of the American Chemical Society* 132 (43), S. 15451–15455. DOI: 10.1021/ja107707v.
- [35] Wu, Shuke; Snajdrova, Radka; Moore, Jeffrey C.; Baldenius, Kai; Bornscheuer, Uwe T. (2021): Biokatalyse: Enzymatische Synthese für industrielle Anwendungen. In: *Angewandte Chemie* 133 (1), S. 89–123. DOI: 10.1002/ange.202006648.
- [36] Bojarra, Samiro; Reichert, Dennis; Grote, Marius; Baraibar, Álvaro Gómez; Dennig, Alexander; Nidetzky, Bernd et al. (2018): Bio-based α,ω -Functionalized Hydrocarbons from Multi-step Reaction Sequences with Bio- and Metallo-catalysts Based on the Fatty Acid Decarboxylase OleT JE. In: *ChemCatChem* 10 (5), S. 1192–1201. DOI: 10.1002/cctc.201701804.
- [37] Wu, Shuke; Zhou, Yi; Gerngross, Daniel; Jeschek, Markus; Ward, Thomas R. (2019): Chemo-enzymatic cascades to produce cycloalkenes from bio-based resources. In: *Nature communications* 10 (1), S. 5060. DOI: 10.1038/s41467-019-13071-y.
- [38] Song, Ji-Won; Jeon, Eun-Yeong; Song, Da-Hyun; Jang, Hyun-Young; Bornscheuer, Uwe T.; Oh, Deok-Kun; Park, Jin-Byung (2013): Multistep enzymatic synthesis of long-chain α,ω -dicarboxylic and ω -hydroxycarboxylic acids from renewable fatty acids and plant oils. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 52 (9), S. 2534–2537. DOI: 10.1002/anie.201209187.
- [39] Gao, Chao; Li, Zhong; Zhang, Lijie; Wang, Chao; Li, Kun; Ma, Cuiqing; Xu, Ping (2015): An artificial enzymatic reaction cascade for a cell-free bio-system based on glycerol. In: *Green Chemistry* 17 (2), S. 804–807. DOI: 10.1039/C4GC01685H.
- [40] Zhang, Liaoyuan; Singh, Raushan; D, Sivakumar; Guo, Zewang; Li, Jiahuan; Chen, Fanbing et al. (2018): An artificial synthetic pathway for acetoin, 2,3-butanediol, and 2-butanol production from ethanol using cell free multi-enzyme catalysis. In: *Green Chemistry* 20 (1), S. 230–242. DOI: 10.1039/C7GC02898A.

- [41] Silva, Marcus V. de M.; Costa, Ingrid C. R.; de Souza, Rodrigo O. M. A.; Bornscheuer, Uwe T. (2019): Biocatalytic Cascade Reaction for the Asymmetric Synthesis of L- and D-Homoalanine. In: *ChemCatChem* 11 (1), S. 407–411. DOI: 10.1002/cctc.201801413.
- [42] Wang, Xin; Cai, Peipei; Chen, Kequan; Ouyang, Pingkai (2016): Efficient production of 5-aminovalerate from L-lysine by engineered *Escherichia coli* whole-cell biocatalysts. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 134, S. 115–121. DOI: 10.1016/j.molcatb.2016.10.008.
- [43] DiCosimo, Robert; McAuliffe, Joseph; Poulou, Ayrookaran J.; Bohlmann, Gregory (2013): Industrial use of immobilized enzymes. In: *Chemical Society reviews* 42 (15), S. 6437–6474. DOI: 10.1039/C3CS35506C.
- [44] Tufvesson, Pär; Fu, Wenjing; Jensen, Jacob Skibsted; Woodley, John M. (2010): Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. In: *Food and Bioprocess Technology* 88 (1), S. 3–11. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.01.003.
- [45] Tufvesson, Pär; Lima-Ramos, Joana; Nordblad, Mathias; Woodley, John M. (2011): Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic Processes. In: *Organic Process Research & Development* 15 (1), S. 266–274. DOI: 10.1021/op1002165.
- [46] Homaei, Ahmad Abolpour; Sariri, Reyhaneh; Vianello, Fabio; Stevanato, Roberto (2013): Enzyme immobilization: an update. In: *Journal of chemical biology* 6 (4), S. 185–205. DOI: 10.1007/s12154-013-0102-9.
- [47] Secundo, Francesco (2013): Conformational changes of enzymes upon immobilisation. In: *Chemical Society reviews* 42 (15), S. 6250–6261. DOI: 10.1039/c3cs35495d.
- [48] Zhou, Zhou; Hartmann, Martin (2012): Recent Progress in Biocatalysis with Enzymes Immobilized on Mesoporous Hosts. In: *Top Catalysis* 55 (16-18), S. 1081–1100. DOI: 10.1007/s11244-012-9905-0.
- [49] Matte, Carla; Bordinhão, Carolina; Poppe, Jakeline; Benvenuti, Edilson; Costa, Tania; Rodrigues, Rafael et al. (2016): Physical-Chemical Properties of the Support Immobead 150 Before and After the Immobilization Process of Lipase. In: *Journal of the Brazilian Chemical Society*, DOI: 10.21577/0103-5053.20160319.
- [50] Li, Chunfang; Jiang, Shuhui; Zhao, Xinying; Liang, Hao (2017): Co-Immobilization of Enzymes and Magnetic Nanoparticles by Metal-Nucleotide Hydrogelnanofibers for Improving Stability and Recycling. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (1). DOI: 10.3390/molecules22010179.
- [51] Verma, Madan L.; Naebe, Minoo; Barrow, Colin J.; Puri, Munish (2013): Enzyme immobilisation on amino-functionalised multi-walled carbon nanotubes: structural and

biocatalytic characterisation. In: *Public Library of Science one* 8 (9), e73642. DOI: 10.1371/journal.pone.0073642.

[52] Hsu, An-Fei; Foglia, Thomas A.; Piazza, George J. (1997): Immobilization of lipoxygenase in an alginate-silicate solgel matrix: formation of fatty acid hydroperoxides. In: *Biotechnology Letters* 19 (1), S. 71–74. DOI: 10.1023/A:1018323205733.

[53] Thangaraj, Baskar; Solomon, Pravin Raj (2019): Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. In: *ChemBioEng Reviews* 6 (5), S. 157–166. DOI: 10.1002/cben.201900016.

[54] Limanto, John; Shafiee, Ali; Devine, Paul N.; Upadhyay, Veena; Desmond, Richard A.; Foster, Bruce R. et al. (2005): An efficient chemoenzymatic approach to (S)-gamma-fluoroleucine ethyl ester. In: *The Journal of organic chemistry* 70 (6), S. 2372–2375. DOI: 10.1021/jo047918j.

[55] Liese, Andreas; Hilterhaus, Lutz (2013): Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. In: *Chemical Society reviews* 42 (15), S. 6236–6249. DOI: 10.1039/c3cs35511j.

[56] Cao, Linqiu (2005): Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design, S. 1-52, Wiley-VHC, DOI: 10.1002/3527607668.

[57] Sheldon, Roger A.; van Pelt, Sander (2013): Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. In: *Chemical Society reviews* 42 (15), S. 6223–6235. DOI: 10.1039/c3cs60075k.

[58] Chen, Guosheng; Huang, Siming; Kou, Xiaoxue; Wei, Songbo; Huang, Shuyao; Jiang, Shuqi et al. (2019): A Convenient and Versatile Amino-Acid-Boosted Biomimetic Strategy for the Nondestructive Encapsulation of Biomacromolecules within Metal-Organic Frameworks. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 58 (5), S. 1463–1467. DOI: 10.1002/anie.201813060.

[59] Li, Peng; Moon, Su-Young; Guelta, Mark A.; Harvey, Steven P.; Hupp, Joseph T.; Farha, Omar K. (2016): Encapsulation of a Nerve Agent Detoxifying Enzyme by a Mesoporous Zirconium Metal-Organic Framework Engenders Thermal and Long-Term Stability. In: *Journal of the American Chemical Society* 138 (26), S. 8052–8055. DOI: 10.1021/jacs.6b03673.

[60] Galarneau, Anne; Mureseanu, Mihaela; Atger, Sophie; Renard, Gilbert; Fajula, François (2006): Immobilization of lipase on silicas. Relevance of textural and interfacial properties on activity and selectivity. In: *New Journal of Chemistry* 30 (4), S. 562. DOI: 10.1039/b517104k.

- [61] Hartmann, Martin; Kostrov, Xenia (2013): Immobilization of enzymes on porous silicas-- benefits and challenges. In: *Chemical Society reviews* 42 (15), S. 6277–6289. DOI: 10.1039/c3cs60021a.
- [62] Nouaimi-Bachmann, Meriem (2003): Immobilisierung von Enzymen auf Polyestervliesen und deren Anwendungen. Tübingen, Univ., Diss., 2003.
- [63] Ferreira-Dias, S.; Sandoval, G.; Plou, F.; Valero, Francisco (2013): The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. In: *Electronic Journal of Biotechnology* 16 (3). DOI: 10.2225/vol16-issue3-fulltext-5.
- [64] Villeneuve, Pierre (2007): Lipases in lipophilization reactions. In: *Biotechnology advances* 25 (6), S. 515–536. DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2007.06.001.
- [65] Kralovec, Jaroslav; Wang, Weijie: Immobilized enzymes and methods of using thereof, EP 2439268B1, 2006.
- [66] Gudmundur, G.; Halldorsson, Arnar; Thorstad, Olav: Lipase-catalysed esterification of marine oil, US 7491522B2, 2003.
- [67] Ditrich, Klaus; Balkenhohl, Friedhelm; Ladner, Wolfgang: Separation of optically active amides, WO 1997/10201A1, 1996.
- [68] ChiPros® Chiral Amines for Your Innovation - BASF Intermediates, (n.d.). <http://www.intermediates.basf.com/chemicals/chiral-intermediates/amines> (Accessed January 2022).
- [69] Ohroi, Tetsuya; Sakakibara, Yasuhito; Aono, Yukinaga; Kato, Michio; Takao, Hiroshi; Kawaguchi, Tsunejiro: Process for continuously synthesizing acrylic acid esters, US 3875212A, 1973.
- [70] Hauer, Bernhard; Branneby, Cecillia Kvarnström, Maurer, Steffen; Trodler, Peter; Müller, Monika: CALB muteins and their use, US 8206969B2, 2012.
- [71] van Rantwijk, Fred; Hacking, Michiel A. P. J.; Sheldon, Roger A. (2000): Lipase-Catalyzed Synthesis of Carboxylic Amides: Nitrogen Nucleophiles as Acyl Acceptor. In: *Monatshefte fuer Chemie/Chemical Monthly* 131 (6), S. 549–569. DOI: 10.1007/s007060070086.
- [72] Zoete, M. C. de; Kock-van Dalen, A. C.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. (1996): Lipase-catalysed ammoniolysis of lipids. A facile synthesis of fatty acid amides [J. Mol. Catal. B, 1 (1996) 109–113]. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2 (2-3), S. 141–145. DOI: 10.1016/S1381-1177(96)00025-2.
- [73] Brandstadt, Kurt F; Lane, Thomas H; Gross, Richard A: Enzyme catalyzed organosilicon esters and amides, US 2004/0082024A1, 2004.

[74] Nuebling, Christoph; Ditrich, Klaus; Dully, Christian: Optical resolution of primary amines by enantioselective acylation with a long-chain alkoxyalkanoate or phenoxyalkanoate ester in the presence of a lipase, DE 19837745A1, 1998.

[75] Nieguth, Rene; Eckstein, M.; Wiemann, L. O.; Thum, Oliver; Ansorge-Schumacher, M. B. (2011): Enabling Industrial Biocatalytic Processes by Application of Silicone-Coated Enzyme Preparations. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 353 (13), S. 2522–2528. DOI: 10.1002/adsc.201100421.

[76] S. Clendennen, J. Yuan (2015): An Enzymatic Approach to Sustainable Manufacturing of Personal Care Ingredients: Reducing the Traditional Environmental Impact of a Consumer Product's Life Cycle, Euro Cosmet. 9 334.

[77] Garcia, Tomás; Martinez, Mercedes; Aracil, José (1996): Enzymatic Synthesis of Myristyl Myristate. Estimation of Parameters and Optimization of the Process. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 14 (1), S. 67–85. DOI: 10.3109/10242429609106877.

[78] Truppo, Matthew D.; Hughes, Gregory (2011): Development of an Improved Immobilized CAL-B for the Enzymatic Resolution of a Key Intermediate to Odanacatib. In: *Organic Process Research & Development* 15 (5), S. 1033–1035. DOI: 10.1021/op200157c.

[79] Gauthier, Jacques Yves; Chauret, Nathalie; Cromlish, Wanda; Desmarais, Sylvie; Le Duong, T.; Falguyret, Jean-Pierre et al. (2008): The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18 (3), S. 923–928. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.12.047.

[80] Cagulada, Amy; Chan, Johann; Chan, Lina; Colby, Denise A.: Synthesis of an antiviral compound, US 2015/0175626A1, 2015.

[81] Bjornson, Kyla; Canales, Eda; Cottell, Jeromy J; Karki, Kapil Kumar: Inhibitors of Hepatitis C Virus, US 2016/9296782 B2, 2016.

[82] Yang, Cheng Yong: Hepatitis C treatments with Sofosbuvir, WO 2014/185995 A1, (2014).

[83] Borchert, Alex (1984): Biotechnology of industrial antibiotics. Hrsg. E. J. Vandamme. 832 S., zahlr. Abb., Marcel Dekker, Inc., New York 1984. Geb. SFr. 299, -. In: *Materials and Corrosion* 35 (12), S. 588. DOI: 10.1002/maco.19840351210.

[84] Vandamme, Erick J. (1983): Peptide antibiotic production through immobilized biocatalyst technology. In: *Enzyme and Microbial Technology* 5 (6), S. 403–416. DOI: 10.1016/0141-0229(83)90021-2.

- [85] Shewale, Jaiprakash G.; Sudhakaran, Vayalombroon K. (1997): Penicillin V acylase: Its potential in the production of 6-aminopenicillanic acid. In: *Enzyme and Microbial Technology* 20 (6), S. 402–410. DOI: 10.1016/S0141-0229(96)00176-7.
- [86] Parmar, Anupama; Kumar, Harish; Marwaha, S.S; Kennedy, J.F (2000): Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). In: *Biotechnology advances* 18 (4), S. 289–301. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00039-2.
- [87] A. Basso, W. Neto, S. Serban, B.D. Summers, (2018): How to optimise the immobilization of amino transaminases on synthetic enzyme carriers, to achieve up to a 13-fold increase in performances, In: *Chemistry Today* 36, S. 40–42.
- [88] Basso, Alessandra; Serban, Simona (2019): Industrial applications of immobilized enzymes—A review. In: *Molecular Catalysis* 479, S. 110607. DOI: 10.1016/j.mcat.2019.110607.
- [89] Gallotto, Robert; Loring, Greta L.; Gary, Kenneth; PARK, Edward S.; Brown, David J; Schoevaart, William Robert Klaas; Van Vliet, Michiel Christian Alexander van Vliet: Enteral feeding device and related methods of use, US 20170105903, 2017.
- [90] Pohanka, Miroslav (2019): Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (3). DOI: 10.3390/molecules24030616.
- [91] J.P. Chen, S.H. Chiu, (1999): Preparation and characterisation of urease immobilized onto porous chitosan beads for urea hydrolysis, In: *Bioprocess Engineering* 21, S. 323–330.
- [92] <http://awak.com/technology/> (Aufgerufen 27 Januar 2022), (n.d.).
- [93] Bluchel, Christian Gert; Haywood, Peter: Sorbent for a dialysis device and dialysis system, WO 2018/106185A2, 2018.
- [94] Hosu, Oana; Mirel, Simona; Săndulescu, Robert; Cristea, Cecilia (2019): Minireview: Smart tattoo, Microneedle, Point-Of-care, and Phone-Based Biosensors for Medical Screening, Diagnosis, and Monitoring. In: *Analytical Letters* 52 (1), S. 78–92. DOI: 10.1080/00032719.2017.1391826.
- [95] Habimana, Jean de Dieu; Ji, Jian; Sun, Xiulan (2018): Minireview: Trends in Optical-Based Biosensors for Point-Of-Care Bacterial Pathogen Detection for Food Safety and Clinical Diagnostics. In: *Analytical Letters* 51 (18), S. 2933–2966. DOI: 10.1080/00032719.2018.1458104.

- [96] Serban, Simona; Danet, Andrei F.; El Murr, Nabil (2004): Rapid and sensitive automated method for glucose monitoring in wine processing. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 52 (18), S. 5588–5592. DOI: 10.1021/JF0494229.
- [97] Gazel, Nilay; Yildiz, Huseyin B. (2017): Enzyme-Based Biosensors in Food Industry via Surface Modifications. In: Mehmet Gürsoy und Mustafa Karaman (Hg.): *Surface Treatments for Biological, Chemical, and Physical Applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S. 227–252.
- [98] Verma, Madan L. (2017): Nanobiotechnology advances in enzymatic biosensors for the agri-food industry. In: *Environmental Chemistry Letters* 15 (4), S. 555–560. DOI: 10.1007/s10311-017-0640-4.
- [99] Hart, John P.; Serban, Simona; Jones, L. J.; Biddle, N.; Pittson, R.; Drago, G. A. (2006): Selective and Rapid Biosensor Integrated into a Commercial Hand-Held Instrument for the Measurement of Ammonium Ion in Sewage Effluent. In: *Analytical Letters* 39 (8), S. 1657–1667. DOI: 10.1080/00032710600713545.
- [100] Global Test Strip Market Research Report-2021 | MRFR, (n.d.). <https://www.marketresearchfuture.com/reports/test-strip-market-672> (Accessed 28 January 2022).
- [101] Feussner, Ivo; Wasternack, Claus (2002): The lipoxygenase pathway. In: *Annual review of plant biology* 53, S. 275–297. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248.
- [102] Andreou, Alexandra; Feussner, Ivo (2009): Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. In: *Phytochemistry* 70 (13-14), S. 1504–1510. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.05.008.
- [103] Mosblech, Alina; Feussner, Ivo; Heilmann, Ingo (2009): Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. In: *Plant physiology and biochemistry* 47 (6), S. 511–517. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.12.011.
- [104] Ivanov, Igor; Heydeck, Dagmar; Hofheinz, Katharina; Roffeis, Jana; O'Donnell, Valerie B.; Kuhn, Hartmut; Walther, Matthias (2010): Molecular enzymology of lipoxygenases. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 503 (2), S. 161–174. DOI: 10.1016/j.abb.2010.08.016.
- [105] Haeggström, Jesper Z.; Funk, Colin D. (2011): Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. In: *Chemical reviews* 111 (10), S. 5866–5898. DOI: 10.1021/cr200246d.
- [106] Andreou, Alexandra; Brodhun, Florian; Feussner, Ivo (2009): Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. In: *Progress in lipid research* 48 (3-4), S. 148–170. DOI: 10.1016/j.plipres.2009.02.002.

- [107] Oliw, Ernst H. (2002): Plant and fungal lipoxygenases. In: *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69, S. 313–323. DOI: 10.1016/S0090-6980(02)00037-0.
- [108] Kuhn, Hartmut; Banthiya, Swathi; van Leyen, Klaus (2015): Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. In: *Biochimica et biophysica acta* 1851 (4), S. 308–330. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2014.10.002.
- [109] Belkner, J.; Stender, H.; Kühn, H. (1998): The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol esters, and this reaction does not require vitamin E. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (36), S. 23225–23232. DOI: 10.1074/jbc.273.36.23225.
- [110] Kozak, Kevin R.; Gupta, Rajnish A.; Moody, John S.; Ji, Chuan; Boeglin, William E.; DuBois, Raymond N. et al. (2002): 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (26), S. 23278–23286. DOI: 10.1074/jbc.M201084200.
- [111] Chedea, Veronica & Vicaş, Simona & Socaciu, Carmen. (2008). Kinetics of soybean lipoxygenases are related to pH, substrate availability and extraction procedures. In: *Journal of Food Biochemistry* 32 (2), S. 153–172. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2008.00169.x.
- [112] Siedow, James N. (1991): Plant Lipoxygenase: Structure and Function. In: *Annual Reviews of plant physiology and plant molecular biology* 42 (1), S. 145–188. DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.001045.
- [113] Shibata, Daisuke; Axelrod, Bernard (1995): Plant lipoxygenases. In: *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* 12 (2-3), S. 213–228. DOI: 10.1016/0929-7855(95)00020-Q.
- [114] Hamberg, Mats; Samuelsson, Bengt (1967): On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. In: *The Journal of biological chemistry* 242 (22), S. 5329–5335. PMID: 6070850.
- [115] (4) Ivanov, Igor; Heydeck, Dagmar; Hofheinz, Katharina; Roffeis, Jana; O'Donnell, Valerie B.; Kuhn, Hartmut; Walther, Matthias (2010): Molecular enzymology of lipoxygenases. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 503 (2), S. 161–174. DOI: 10.1016/j.abb.2010.08.016.
- [116] Mashima, Ryuichi; Okuyama, Torayuki (2015): The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. In: *Redox biology* 6, S. 297–310. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.006.
- [117] Viswanath, Kotapati Kasi; Varakumar, Panditi; Pamuru, Ramachandra Reddy; Basha, Shiak Jeelan; Mehta, Sahil; Rao, Ampasala Dinakara (2020): Plant Lipoxygenases and Their

Role in Plant Physiology. In: *Journal of Plant Biology* 63 (2), S. 83–95. DOI: 10.1007/s12374-020-09241-x.

[118] Rosahl, Sabine (1996): Lipoxygenases in plants--their role in development and stress response. In: *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* 51 (3-4), S. 123–138. DOI: 10.1515/znc-1996-3-401.

[119] Douillard, Roger; Bergeron, Edith (1981): Lipoxygenase activities of young wheat leaves. In: *Plant Physiology* 51 (4), S. 335–338. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1981.tb05564.x.

[120] Wardale, Dennis A.; Ambert, Eamon A. (1980): Lipoxygenase from cucumber fruit: Localization and properties. In: *Phytochemistry* 19 (6), S. 1013–1016. DOI: 10.1016/0031-9422(80)83049-4.

[121] Funk, Max O.; Carroll, Richard T.; Thompson, John F.; Sands, Richard H.; Dunham, William R. (1990): Role of iron in lipoxygenase catalysis. In: *Journal of the American Chemical Society* 112 (13), S. 5375–5376. DOI: 10.1021/ja00169a069.

[122] Teng, Linhong; Han, Wentao; Fan, Xiao; Xu, Dong; Zhang, Xiaowen; Dittami, Simon M.; Ye, Naihao (2017): Evolution and Expansion of the Prokaryote-Like Lipoxygenase Family in the Brown Alga *Saccharina japonica*. In: *Frontiers in plant science* 8, S. 2018. DOI: 10.3389/fpls.2017.02018.

[123] Feng, Bo; Dong, Zhenying; Xu, Zhibin; An, Xueli; Qin, Huanju; Wu, Ning et al. (2010): Molecular analysis of lipoxygenase (LOX) genes in common wheat and phylogenetic investigation of LOX proteins from model and crop plants. In: *Journal of Cereal Science* 52 (3), S. 387–394. DOI: 10.1016/j.jcs.2010.06.019.

[124] Garreta, Albert; Val-Moraes, Silvana P.; García-Fernández, Queralt; Busquets, Montserrat; Juan, Carlos; Oliver, Antonio et al. (2013): Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (12), S. 4811–4821. DOI: 10.1096/fj.13-235952.

[125] Schneider, Claus; Niisuke, Katrin; Boeglin, William E.; Voehler, Markus; Stec, Donald F.; Porter, Ned A.; Brash, Alan R. (2007): Enzymatic synthesis of a bicyclobutane fatty acid by a hemoprotein lipoxygenase fusion protein from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (48), S. 18941–18945. DOI: 10.1073/pnas.0707148104.

[126] May, Christian; Höhne, Michaela; Gnau, Petra; Schwennesen, Karsten; Kindl, Helmut (2000): The N-terminal beta-barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to

liposomes and lipid bodies. In: *European journal of biochemistry* 267 (4), S. 1100–1109. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01105.x.

[127] Minor, Wlodek; Steczko, Janusz; Stec, Boguslaw; Otwinowski, Zbyszek; Bolin, Jeffrey T.; Walter, Rick; Axelrod, Bernard (1996): Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. In: *Biochemistry* 35 (33), S. 10687–10701. DOI: 10.1021/bi960576u.

[128] Maccarrone, Mauro; Melino, G.; Finazzi-Agrò, Alessandro (2001): Lipoxygenases and their involvement in programmed cell death. In: *Cell death and differentiation* 8 (8), S. 776–784. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400908.

[129] Grechkin, Alexander (1998): Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. In: *Progress in lipid research* 37 (5), S. 317–352. DOI: 10.1016/S0163-7827(98)00014-9.

[130] Christopher, John; Axelrod, Bernard (1971): On the different positional specificities of peroxidation of linoleate shown by two isozymes of soybean lipoxygenase. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44 (3), S. 731–736. DOI: 10.1016/s0006-291x(71)80144-4.

[131] Pérez-Gilabert, M.; Veldink, Gerrit A.; Vliegthart, Johannes F. (1998): Oxidation of dilinoleoyl phosphatidylcholine by lipoxygenase 1 from soybeans. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 354 (1), S. 18–23. DOI: 10.1006/abbi.1998.0673.

[132] van der Stelt, Marcelis; Nieuwenhuizen, Willem F.; Veldink, Gerrit A.; Vliegthart, Johannes F.G (1997): Dioxygenation of N-linoleoyl amides by soybean lipoxygenase-1. In: *Federation of European Biochemical Societies Letters* 411 (2-3), S. 287–290. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00718-7.

[133] Schilstra, Maria J.; Veldink, Gerrit A.; Vliegthart, Johannes F. (1994): The dioxygenation rate in lipoxygenase catalysis is determined by the amount of iron (III) lipoxygenase in solution. In: *Biochemistry* 33 (13), S. 3974–3979. DOI: 10.1021/bi00179a025.

[134] Khan, Faez Iqbal; Lan, Dongming; Durrani, Rabia; Huan, Weiqian; Zhao, Zexin; Wang, Yonghua (2017): The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 5, S. 16. DOI: 10.3389/fbioe.2017.00016.

[135] Hasan, Fariha; Shah, Aamer Ali; Hameed, Abdul (2006): Industrial applications of microbial lipases. In: *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2), S. 235–251. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.

[136] Houde, Alain; Kademi, Ali; Leblanc, Danielle (2004): Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. In: *ABAB* 118 (1-3), S. 155–170. DOI: 10.1385/ABAB:118:1-3:155.

- [137] Lowe, Mark E. (2002): The triglyceride lipases of the pancreas. In: *Journal of lipid research* 43 (12), S. 2007–2016. DOI: 10.1194/jlr.R200012-JLR200.
- [138] Nardini, Marco; Dijkstra, Bauke W. (1999): α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. In: *Current Opinion in Structural Biology* 9 (6), S. 732–737. DOI: 10.1016/s0959-440x(99)00037-8.
- [139] Rehm, Sascha; Trodler, Peter; Pleiss, Jürgen (2010): Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study. In: *Protein science: a publication of the Protein Society* 19 (11), S. 2122–2130. DOI: 10.1002/pro.493.
- [140] Schrag, Joseph D.; Cygler, Mirosław (1997): Lipases and hydrolase fold. In: *Lipases, Part A: Biotechnology*, Bd. 284: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 85–107.
- [141] Schmid, Rolf D.; Verger, Robert (1998): Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. In: *Angewandte Chemie International Edition* 37 (12), S. 1608–1633. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V.
- [142] Grochulski, Paweł; Li, Y.; Schrag, Joseph D.; Bouthillier, F.; Smith, P.; Harrison, D. et al. (1993): Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. In: *Journal of Biological Chemistry* 268 (17), S. 12843–12847. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)31464-9.
- [143] Zhang, Yingkai; Kua, Jeremy; McCammon, J. Andrew (2002): Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study. In: *Journal of the American Chemical Society* 124 (35), S. 10572–10577. DOI: 10.1021/ja020243m.
- [144] Reis, Pedro; Holmberg, K.; Watzke, Heribert; Leser, Martin E.; Miller, R. (2009): Lipases at interfaces: a review. In: *Advances in colloid and interface science* 147-148, S. 237–250. DOI: 10.1016/j.cis.2008.06.001.
- [145] Hwang, Hyun Tae; Qi, Feng; Yuan, Chongli; Zhao, Xuebing; Ramkrishna, Doraiswami; Liu, Dehua; Varma, Arvind (2014): Lipase-catalyzed process for biodiesel production: protein engineering and lipase production. In: *Biotechnology and bioengineering* 111 (4), S. 639–653. DOI: 10.1002/bit.25162.
- [146] Barbe, Sophie; Lafaquière, Vincent; Guieysse, David; Monsan, Pierre; Remaud-Siméon, Magali; André, Isabelle (2009): Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. In: *Proteins* 77 (3), S. 509–523. DOI: 10.1002/prot.22462.

- [147] Grochulski, Pawel; Li, Yunge; Schrag, Joseph D.; Cygler, Miroslaw (1994): Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. In: *Protein science* 3 (1), S. 82–91. DOI: 10.1002/pro.5560030111.
- [148] Derewenda, Urszula; Brzozowski, Andrzej M.; Lawson, David M.; Derewenda, Zygmunt S. (1992): Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. In: *Biochemistry* 31 (5), S. 1532–1541. DOI: 10.1021/bi00120a034.
- [149] Brzozowski, Andrzej M.; Derewenda, Zygmunt S.; Dodson, Eleanor J.; Dodson, Guy G.; Turkenburg, Johan P. (1992): Structure and molecular model refinement of *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase: a case study of the use of simulated annealing in partial model refinement. In: *Acta Crystallographica Section B Structural Science* 48 (3), S. 307–319. DOI: 10.1107/S0108768191014647.
- [150] Chandra, Prem; Enespa; Singh, Ranjan; Arora, Pankaj Kumar (2020): Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. In: *Microbial cell factories* 19 (1), S. 169. DOI: 10.1186/s12934-020-01428-8.
- [151] Patel, Naveen; Rai, Dhananjai; Shivam; Shahane, Shraddha; Mishra, Umesh (2019): Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications. In: *Recent patents on biotechnology* 13 (1), S. 45–56. DOI: 10.2174/1872208312666181029093333.
- [152] Wang, Yongxiang; Srivastava, Kailash C.; Shen, Gwo-Jenn; Wang, Henry Y. (1995): Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79 (5), S. 433–438. DOI: 10.1016/0922-338X(95)91257-6.
- [153] Gandhi, Neena N. (1997): Applications of lipase. In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (6), S. 621–634. DOI: 10.1007/s11746-997-0194-x.
- [154] Joshi, Ritika; Kuila, Arindam (2019): Biofuel Production from Lipase and Its Biotechnological Application. In: Arindam Kuila (Hg.): *Sustainable Biofuel and Biomass*. Includes bibliographical references and index: Apple Academic Press, S. 1–18.
- [155] C Wancura, João H.; Tres, Marcus V.; Jahn, Sérgio L.; Oliveira, José Vladimir de (2020): Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. In: *Biotechnology and applied biochemistry* 67 (4), S. 648–667. DOI: 10.1002/bab.1835.
- [156] Lv, Yaping; Sun, Shangde; Liu, Jinming (2019): Biodiesel Production Catalyzed by a Methanol-Tolerant Lipase A from *Candida antarctica* in the Presence of Excess Water. In: *ACS omega* 4 (22), S. 20064–20071. DOI: 10.1021/acsomega.9b03249.

- [157] Rajendran, Aravindan; Palanisamy, Anbumathi; Thangavelu, Viruthagiri (2009): Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. In: *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52 (1), S. 207–219. DOI: 10.1590/S1516-89132009000100026.
- [158] Pinto, Gabrielle Barbosa; Mendes, Flávia Maria Lins; Antunes, Adelaide Maria de Souza (2020): Technological Profile of Lipases in the Pharmaceutical Industry. In: *Market Research Online-Community* 17 (6), S. 701–716. DOI: 10.2174/1570193X16666190913181530.
- [159] Badgujar, Kirtikumar C.; Bhanage, Bhalchandra M. (2016): Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of β -amino ester compounds. In: *Process Biochemistry* 51 (10), S. 1420–1433. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.07.008.
- [160] Zehani, Nedjla; Dzyadevych, Sergei V.; Kherrat, Rochdi; Jaffrezic-Renault, Nicole J. (2014): Sensitive impedimetric biosensor for direct detection of diazinon based on lipases. In: *Frontiers in chemistry* 2, S. 44. DOI: 10.3389/fchem.2014.00044.
- [161] Okino-Delgado, Clarissa Hamaio; Prado, Débora Zanoni do; Facanali, Roselaine; Marques, Márcia Mayo Ortiz; Nascimento, Augusto Santana; Fernandes, Célio Junior da Costa et al. (2017): Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. In: *Public Library of Science one* 12 (10), e0186246. DOI: 10.1371/journal.pone.0186246.
- [162] Saraswat, Rashmi; Verma, Vijeshwar; Sistla, Srinivas; Bhushan, Indu (2017): Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated *Bacillus* strain for detergent formulation. In: *Electronic Journal of Biotechnology* 30, S. 33–38. DOI: 10.1016/j.ejbt.2017.08.007.
- [163] Martínez-Ruiz, Antonio; García, Hugo Sergio; Saucedo-Castañeda, Gerardo; Favela-Torres, Ernesto (2008): Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151 (2-3), S. 393–401. DOI: 10.1007/s12010-008-8207-2.
- [164] Dwivedee, Bharat P.; Soni, Surbhi; Sharma, Misha; Bhaumik, Jayeeta; Laha, Joydev K.; Banerjee, Uttam C. (2018): Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. In: *Chemistry Select* 3 (9), S. 2441–2466. DOI: 10.1002/slct.201702954.
- [165] Wang, Lei; Liu, Tianzhen; Sun, Hongwen; Zhou, Qixing (2018): Transesterification of para-hydroxybenzoic acid esters (parabens) in the activated sludge. In: *Journal of hazardous materials* 354, S. 145–152. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.04.077.
- [166] Jiang, Ling; Yu, Hongwei (2014): Enzymatic promiscuity: “Amano” lipase AS-catalysed synthesis of naphthopyran derivatives in anhydrous media. In: *Chemical Research in Chinese Universities*. 30 (3), S. 396–399. DOI: 10.1007/s40242-014-3442-2.

- [167] Khobragade, Taresh P.; Sarak, Sharad; Pagar, Amol D.; Jeon, Hyunwoo; Giri, Pritam; Yun, Hyungdon (2021): Synthesis of Sitagliptin Intermediate by a Multi-Enzymatic Cascade System Using Lipase and Transaminase with Benzylamine as an Amino Donor. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 9, S. 757062. DOI: 10.3389/fbioe.2021.757062.
- [168] Songür, Rahime; Lurçi, Binnaz; Bayraktar, Emine; Mehmetoğlu, Ulkü; Demir, Ayhan S. (2011): Enantioselective production of benzoin from benzoin acetate via kinetic resolution and deracemization using *Rhizopus oryzae*. In: *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology* 39 (3), S. 162–168. DOI: 10.3109/10731199.2010.516261.
- [169] Su, Feng; Li, Guanlin; Zhang, Houjin; Yan, Yunjun (2014): Enhanced Performance of *Rhizopus oryzae* Lipase Immobilized on Hydrophobic Carriers and Its Application in Biorefinery of Rapeseed Oil Deodorizer Distillate. In: *Bioenergy Research* 7 (3), S. 935–945. DOI: 10.1007/s12155-014-9415-y.
- [170] Freitas, Larissa; Da Rós, Patricia C.M.; Santos, Julio C.; Castro, Heizir F. de (2009): An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya sp.*). In: *Process Biochemistry* 44 (10), S. 1068–1074. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.05.011.
- [171] Barbosa, Milson S.; Freire, Cintia C.C.; Brandão, Luma M.S.; Pereira, Ernandes B.; Mendes, Adriano A.; Pereira, Matheus M. et al. (2021): Biolubricant production under zero-waste *Moringa oleifera* Lam biorefinery approach for boosting circular economy. In: *Industrial Crops and Products* 167, S. 113542. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.113542.
- [172] Dai, Hong-Xia; Yao, Shi-Ping; Wang, Jian (2006): Michael addition of pyrimidine with disaccharide acrylates catalyzed in organic medium with lipase M from *Mucor javanicus*. In: *Biotechnology letters* 28 (18), S. 1503–1507. DOI: 10.1007/s10529-006-9116-5.
- [173] Kołodziejska, Renata; Studzińska, Renata (2016): Reverse Stereoselectivity in the Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Diacetylated Pyrimidine Acyclonucleosides. In: *ChemCatChem* 8 (23), S. 3644–3649. DOI: 10.1002/cctc.201600931.
- [174] van Wouwe, Pieter; Dusselier, Michiel; Basiç, Aurelie; Sels, Bert F. (2013): Bridging racemic lactate esters with stereoselective polylactic acid using commercial lipase catalysis. In: *Green Chemistry* 15 (10), S. 2817. DOI: 10.1039/c3gc41457d.
- [175] Kundys, Anna; Białecka-Florjańczyk, Ewa; Fabiszewska, Agata; Małajowicz, Jolanta (2018): *Candida antarctica* Lipase B as Catalyst for Cyclic Esters Synthesis, Their Polymerization and Degradation of Aliphatic Polyesters. In: *Journal of Polymers and the Environment* 26 (1), S. 396–407. DOI: 10.1007/s10924-017-0945-1.

- [176] Remonato, Daniela; Oliveira, J. Vladimir de; Manuel Guisan, J.; Oliveira, Débora de; Ninow, Jorge; Fernandez-Lorente, Gloria (2018): Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 185 (3), S. 705–716. DOI: 10.1007/s12010-017-2683-1.
- [177] Martinez, Carlos A.; Hu, Shanghui; Dumond, Yves; Tao, Junhua; Kelleher, Patrick; Tully, Liam (2008): Development of a Chemoenzymatic Manufacturing Process for Pregabalin. In: *Organic Process Research & Development* 12 (3), S. 392–398. DOI: 10.1021/op7002248.
- [178] Zhang, X. M.; Ai, Nasi S.; Wang, J.; Tong, Lingjun J.; Zheng, Fuping P.; Sun, B. G. (2016): Lipase-catalyzed modification of the flavor profiles in recombined skim milk products by enriching the volatile components. In: *Journal of dairy science* 99 (11), S. 8665–8679. DOI: 10.3168/jds.2015-10773.
- [179] Ross Holland, Vaughan Leslie Crow, Shao Quan Liu, Transesterification reaction for production of dairy flavour enhancing esters, EP 1482806A1, 2002.
- [180] Jones, Peter; Dunford, H. Brian (2005): The mechanism of Compound I formation revisited. In: *Journal of inorganic biochemistry* 99 (12), S. 2292–2298. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2005.08.009.
- [181] Vlasits, Jutta; Jakopitsch, Christa; Schwanninger, Manfred; Holubar, Peter; Obinger, Christian (2007): Hydrogen peroxide oxidation by catalase-peroxidase follows a non-scrambling mechanism. In: *Federation of European Biochemical Societies letters* 581 (2), S. 320–324. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.12.037.
- [182] Fita, Ignacio; Rossmann, Michael G. (1985): The active center of catalase. In: *Journal of Molecular Biology* 185 (1), S. 21–37. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90180-9.
- [183] Foerster, E. C.; Fahrenkemper, T.; Rabe, U.; Graf, P.; Sies, H. (1981): Peroxisomal fatty acid oxidation as detected by H₂O₂ production in intact perfused rat liver. In: *The Biochemical journal* 196 (3), S. 705–712. DOI: 10.1042/bj1960705.
- [184] Glorieux, Christophe; Calderon, Pedro Buc (2017): Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. In: *Biological chemistry* 398 (10), S. 1095–1108. DOI: 10.1515/hsz-2017-0131.
- [185] Goyal, Madhur M.; Basak, Anjan (2010): Human catalase: looking for complete identity. In: *Protein & cell* 1 (10), S. 888–897. DOI: 10.1007/s13238-010-0113-z.
- [186] Montibus, Mathilde; Pinson-Gadais, Laëtitia; Richard-Forget, Florence; Barreau, Christian; Ponts, Nadia (2015): Coupling of transcriptional response to oxidative stress and

secondary metabolism regulation in filamentous fungi. In: *Critical reviews in microbiology* 41 (3), S. 295–308. DOI: 10.3109/1040841X.2013.829416.

[187] Johnson, Lisa A.; Hug, Laura A. (2019): Distribution of reactive oxygen species defense mechanisms across domain bacteria. In: *Free radical biology & medicine* 140, S. 93–102. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.032.

[188] Mulvey, M. R.; Switala, J.; Borys, A.; Loewen, P. C. (1990): Regulation of transcription of katE and katF in *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 172 (12), S. 6713–6720. DOI: 10.1128/jb.172.12.6713-6720.1990.

[189] Engelmann, Susanne; Hecker, Michael (1996): Impaired oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis* sigB mutants and the role of katA and katE. In: *Federation of European Microbiological Societies letters* 145 (1), S. 63–69. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08557.x.

[190] Cho, You-Hee; Lee, Eun-Jin; Roe, Jung-Hye (2000): A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*. In: *Molecular microbiology* 35 (1), S. 150–160. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01685.x.

[191] Klotz, M. G.; Klassen, G. R.; Loewen, Peter C. (1997): Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. In: *Molecular biology and evolution* 14 (9), S. 951–958. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025838.

[192] Chelikani, Prashen; Fita, Ignacio; Loewen, Peter C. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. In: *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 61 (2), S. 192–208. DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5.

[193] Zamocky, Marcel; Furtmüller, Paul G.; Obinger, Christian (2008): Evolution of catalases from bacteria to humans. In: *Antioxidants & redox signaling* 10 (9), S. 1527–1548. DOI: 10.1089/ars.2008.2046.

[194] Switala, Jacek; Loewen, Peter C. (2002): Diversity of properties among catalases. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 401 (2), S. 145–154. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00049-8.

[195] Switala, Jacek; O'Neil, Joe O.; Loewen, Peter C. (1999): Catalase HPII from *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to denaturation. In: *Biochemistry* 38 (13), S. 3895–3901. DOI: 10.1021/bi982863z.

[196] Miłek, Justyna; Wójcik, Marek; Verschelde, W. (2014): Thermal stability for the effective use of commercial catalase. In: *Polish Journal of Chemical Technology* 16 (4), S. 75–79. DOI: 10.2478/pjct-2014-0073.

[197] Amorim, Alexandra M.; Gasques, Marcelo D. G.; Andreaus, Jürgen; Scharf, Mauro (2002): The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after

bleaching of cotton fabrics. In: *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 74 (3), S. 433–436. DOI: 10.1590/S0001-37652002000300006.

[198] Kaushal, Jyoti; Mehandia, Seema; Singh, Gursharan; Raina, Arun; Arya, Shailendra Kumar (2018): Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. In: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16, S. 192–199. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.07.035.

[199] Sangar, Shefali; Pal, Mohan; Moon, Lomary S.; Jolly, Ravinder S. (2012): A catalase-peroxidase for oxidation of β -lactams to their (*R*)-sulfoxides. In: *Bioresource technology* 115, S. 102–110. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.09.045.

[200] Magner, Edmond; Klibanov, Alexander M. (1995): The oxidation of chiral alcohols catalyzed by catalase in organic solvents. In: *Biotechnology and bioengineering* 46 (2), S. 175–179. DOI: 10.1002/bit.260460211.

[201] Meghwanshi, Gautam Kumar; Kaur, Navpreet; Verma, Swati; Dabi, Narendra Kumar; Vashishtha, Abhishek; Charan, P. D. et al. (2020): Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. In: *Biotechnology and applied biochemistry* 67 (4), S. 586–601. DOI: 10.1002/bab.1919.

[202] Putnam, Christopher D.; Arvai, Andrew S.; Bourne, Yves; Tainer, John A. (2000): Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. In: *Journal of molecular biology* 296 (1), S. 295–309. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3458.

[203] Babenko, L. M.; Shcherbatiuk, Mykola M.; Skaterna, Tania D.; Kosakivska, I. V. (2017): Lipoxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance. In: *Ukrainian biochemical journal* 89 (1), S. 5–21. DOI: 10.15407/ubj89.01.005.

[204] Pokotylo, Igor V.; Kolesnikov, Y. S.; Derevyanchuk, M. V.; Kharitonenko, A. I.; Kravets, V. S. (2015): Lipoxygenases and plant cell metabolism regulation. In: *Ukrainian biochemical journal* 87 (2), S. 41–55. DOI: 10.15407/ubj87.02.041.

[205] Blée, Elizabeth (1998): Phytooxylipins and plant defense reactions. In: *Progress in Lipid Research* 37 (1), S. 33–72. DOI: 10.1016/s0163-7827(98)00004-6.

[206] Feussner, Ivo; Wasternack, Claus (1998): Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. In: *Fett/Lipid* 100 (4-5), S. 146–152. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4133(19985)100:4/5<146::AID-LIP1146>3.0.CO;2-D

[207] Blée, Elizabeth (1998): Biosynthesis of phytooxylipins: the Peroxygenase pathway. In: *Fett/Lipid* 100 (4-5), S. 121–127. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4133(19985)100:4/5<121::AID-LIP1121>3.0.CO;2-4

- [208] Hamberg, Mats (1995): Hydroperoxide isomerases. In: *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* 12 (2-3), S. 283–292. DOI: 10.1016/0929-7855(95)00034-n.
- [209] Hamberg, Mats (1988): Biosynthesis of 12-oxo-10,15(Z)-phytodienoic acid: Identification of an allene oxide cyclase. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 156 (1), S. 543–550. DOI: 10.1016/s0006-291x(88)80876-3.
- [210] Ziegler, Jörg; Stenzel, Irene; Hause, Bettina; Maucher, Helmut; Hamberg, Mats; Grimm, Rudi et al. (2000): Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (25), S. 19132–19138. DOI: 10.1074/jbc.M002133200.
- [211] Noordermeer, Minke A.; Veldink, Gerrit A.; Vliegthart, Johannes F. G. (2001): Fatty Acid Hydroperoxide Lyase: A Plant Cytochrome P450 Enzyme Involved in Wound Healing and Pest Resistance. In: *ChemBioChem* 2 (7-8), S. 494–504. DOI: 10.1002/1439-7633(20010803)2:7/8<494::AID-CBIC494>3.0.CO;2-1.
- [212] Matsui K. (1998): Properties and structures of fatty acid hydroperoxide lyase. In: *Belgian Journal of Botany* 131(1), S. 50-62. DOI: 10.2307/20794431
- [213] Kühn, H.; Wiesner, R.; Rathmann, J.; Schewe, T. (1991): Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. In: *Eicosanoids* 4 (1), S. 9–14. PMID: 1905562
- [214] Hamberg, Mats (1999): An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. In: *Lipids* 34 (11), S. 1131–1142. DOI: 10.1007/s11745-999-0464-7.
- [215] Göbel, Cornelia; Feussner, Ivo; Schmidt, Axel; Scheel, Dierk; Sanchez-Serrano, Josse; Hamberg, Mats; Rosahl, Sabine (2001): Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (9), S. 6267–6273. DOI: 10.1074/jbc.M008606200.
- [216] Singh, Priyanka; Arif, Yamshi; Miszczuk, Edyta; Bajguz, Andrzej; Hayat, Shamsul (2022): Specific Roles of Lipoxygenases in Development and Responses to Stress in Plants. In: *Plants (Basel, Switzerland)* 11 (7). DOI: 10.3390/plants11070979.
- [217] Kolupaev, Yuriy E.; Yastreb, Tetiana O.; Lugova, G. A. (2016): Role of jasmonates in plant adaptation to abiotic stressors. In: *Plant physiology and genetics*. 48 (2), S. 95–111. DOI: 10.15407/frg2016.02.095.
- [218] Cohen, Yigal (1993): Local and Systemic Protection Against *Phytophthora infestans* Induced in Potato and Tomato Plants by Jasmonic Acid and Jasmonic Methyl Ester. In: *Phytopathology* 83 (10), S. 1054. DOI: 10.1094/Phyto-83-1054.

- [219] Villaverde, Juan José; Santos, Sónia A.O.; Simões, Mário M.Q.; Neto, Carlos Pascoal; Domingues, M. Rosário M.; Silvestre, Armando J.D. (2011): Analysis of linoleic acid hydroperoxides generated by biomimetic and enzymatic systems through an integrated methodology. In: *Industrial Crops and Products* 34 (3), S. 1474–1481. DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.05.001.
- [220] Gardner, Harold W. (1989): Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. In: *Free Radical Biology and Medicine* 7 (1), S. 65–86. DOI: 10.1016/0891-5849(89)90102-0.
- [221] Lazzari, Massimo; Chiantore, Oscar (1999): Drying and oxidative degradation of linseed oil. In: *Polymer Degradation and Stability* 65 (2), S. 303–313. DOI: 10.1016/S0141-3910(99)00020-8
- [222] Mehta, B. (2015), *Lipid Oxidation* (2005), 2nd edn, edited by E.N. Frankel, Woodhead Publishing Ltd., Sawston, Cambridge, UK. ISBN-13: 978-0-9531949-8-8. Price £150.00. *Int J Dairy Technol*, 68: 148-149. DOI: 10.1111/1471-0307.12128
- [223] Hamberg, Mats; Gotthammar, Birgitta (1973): A new reaction of unsaturated fatty acid hydroperoxides: Formation of 11-hydroxy-12,13-epoxy-9-octadecenoic acid from 13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid. In: *Lipids* 8 (12), S. 737–744. DOI: 10.1007/BF02531842.
- [224] Nanda, S.; Yadav, J. S. (2003): Lipoxygenase biocatalysis: a survey of asymmetric oxygenation. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 26 (1-2), S. 3–28. DOI: 10.1016/S1381-1177(03)00146-2.
- [225] Heshof, Ruud; Graaff, Leo H. de; Villaverde, Juan J.; Silvestre, Armando J. D.; Haarmann, Thomas; Dalsgaard, Trine K.; Buchert, Johanna (2016): Industrial potential of lipoxygenases. In: *Critical reviews in biotechnology* 36 (4), S. 665–674. DOI: 10.3109/07388551.2015.1004520.
- [226] Hayward, Stefan; Cilliers, Tertius; Swart, Pieter (2017): Lipoxygenases: From Isolation to Application. In: *Comprehensive reviews in food science and food safety* 16 (1), S. 199–211. DOI: 10.1111/1541-4337.12239.
- [227] Gigot, Cédric; Ongena, Marc; Fauconnier, Marie-Laure; Wathelet, Jean-Paul; du Jardin, Patrick; Thonart, Philippe (2010): The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 2010, (3), 14, S. 451-460, URL: <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=5669>

- [228] Gardner, Harold W.; Plattner, R. D. (1984): Linoleate hydroperoxides are cleaved heterolytically into aldehydes by a Lewis acid in aprotic solvent. In: *Lipids* 19 (4), S. 294–299. DOI: 10.1007/BF02534458.
- [229] Kerler, Josef; Kohlen, Eric; Fitz, Wolfgang; van der Vliet, Armin; Winkel, Chris; Method for the Enzymatic Preparation of Aldehydes Rich Aromas c6-c10. US 6864072B2, 2005.
- [230] Otte, Konrad B.; Kirtz, Marko; Nestl, Bettina M.; Hauer, Bernhard (2013): Synthesis of 9-oxononanoic acid, a precursor for biopolymers. In: *ChemSusChem* 6 (11), S. 2149–2156. DOI: 10.1002/cssc.201300183.
- [231] Löwe, Jana; Dietz, Karl-Josef; Gröger, Harald (2020): From a Biosynthetic Pathway toward a Biocatalytic Process and Chemocatalytic Modifications: Three-Step Enzymatic Cascade to the Plant Metabolite *cis*-(+)-12-OPDA and Metathesis-Derived Products. In: *Advanced science (Weinheim, Baden-Württemberg, Germany)* 7 (13), S. 1902973. DOI: 10.1002/advs.201902973.
- [232] Baysal, Taner; Demirdöven, Aslihan (2007): Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. In: *Enzyme and Microbial Technology* 40 (4), S. 491–496. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.11.025.
- [233] Drouet, Philippe; Thomas, Daniel; Legoy, Marie Dominique (1994): Production of 13(S)-hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadecadienoic acid using soybean lipoxygenase 1 in a biphasic octane-water system. In: *Tetrahedron Letters* 35 (23), S. 3923–3926. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)76703-7.
- [234] Márczy, Judit Sz.; Németh, Ágnes Sz.; Samu, Zsuzsanna; Háger-Veress, Ádám; Szajáni, Béla (2002): Production of hexanal from hydrolyzed sunflower oil by lipoxygenase and hydroperoxide lyase enzymes. In: *Biotechnology Letters* 24 (20), S. 1673–1675. DOI: 10.1023/A:1020657618363.
- [235] Fauconnier, Marie-Laure.; Marlier, M. (1996): An efficient procedure for the production of fatty acid hydroperoxides from hydrolyzed flax seed oil and soybean lipoxygenase. In: *Biotechnol Tech* 10 (11), S. 839–844. DOI: 10.1007/BF00154668.
- [236] Németh, Ágnes Sz; Márczy, Judit Sz; Samu, Zsuzsa; Háger-Veress, Ádám; Szajáni, Béla (2004): Biocatalytic production of 2(E)-hexenal from hydrolysed linseed oil. In: *Enzyme and Microbial Technology* 34 (7), S. 667–672. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.03.003.
- [237] Piazza, George J. (1992): Lipoxygenase catalyzed hydroperoxide formation in microemulsions containing nonionic surfactant. In: *Biotechnology Letters* 14 (12), S. 1153–1158. DOI: 10.1007/BF01027020.

- [238] Rodakiewicz-Nowak, Janina; Maślakiewicz, Paweł; Haber, Jerzy (1996): The effect of linoleic acid on pH inside sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate reverse micelles in isooctane and on the enzymic activity of soybean lipoxygenase. In: *European journal of biochemistry* 238 (2), S. 549–553. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0549z.x.
- [239] Kermasha, Selim; Dioum, Ndeye; Bisakowski, Barbara (2001): Biocatalysis of lipoxygenase in selected organic solvent media. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11 (4-6), S. 909–919. DOI: 10.1016/S1381-1177(00)00143-0.
- [240] Gargouri, Mohamed; Legoy, Marie Dominique (1997): Bienzymatic reaction for hydroperoxide production in a multiphasic system. In: *Enzyme and Microbial Technology* 21 (2), S. 79–84. DOI: 10.1016/S0141-0229(96)00229-3.
- [241] Gargouri, Mohamed; Dominique Legoy, Marie (2002): A two-enzyme system for the transformation of unsaturated oils to 9(S)-hydroperoxy fatty acids. In: *Biotechnology Letters* 24 (11), S. 915–918. DOI: 10.1023/A:1015588008300.
- [242] Wang, Jianhua; Li, Kai; He, Yaojia; Liu, Xiaoxiao; Wang, Pengbo; Xu, Li et al. (2021): Bi-enzyme directed self-assembled system toward biomimetic synthesis of fatty acid hydroperoxides like soybean. In: *Composites Part B: Engineering* 222, S. 109091. DOI: 10.1016/j.compositesb.2021.109091.
- [243] Few, A. V.; Fraser, M. J.; Gilby, A. R. (1957): The intracellular catalase of *Micrococcus lysodeikticus*. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 24, S. 306–314. DOI: 10.1016/0006-3002(57)90199-3.
- [244] Basso, Alessandra; Froment, Luc; Hesseler, Martin; Serban, Simona (2013): New highly robust divinyl benzene/acrylate polymer for immobilization of lipase CALB. In: *European Journal of Lipid Science & Technology* 115 (4), S. 468–472. DOI: 10.1002/ejlt.201200419.
- [245] Elshof, M.B.W.; Janssen, M.; Veldink, Gerrit A.; Vliegthart, Johannes F.G. (1996): Biocatalytic large-scale production of 13(S)-hydroperoxy-9(Z), 11(E)-octadecadienoic acid from hydrolysed safflower oil by a crude soybean-flour extract as lipoxygenase source. In: *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 115 (11-12), S. 499–504. DOI: 10.1002/recl.19961151109.
- [246] Berry, Hugues; Debat, Hélène; Larreta-Garde, Véronique (1997): Excess substrate inhibition of soybean lipoxygenase-1 is mainly oxygen-dependent. In: *Federation of European Biochemical Societies Letters* 408 (3), S. 324–326. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)00453-5.
- [247] Kim, Kyoung-Rok; An, Jung-Ung; Lee, Seon-Hwa; Oh, Deok-Kun (2015): Selective Production of 9R-Hydroxy-10E,12Z,15Z-Octadecatrienoic Acid from α -Linolenic Acid in Perilla

Seed Oil Hydrolyzate by a Lipoxygenase from *Nostoc Sp.* SAG 25.82. In: *Public Library of Science one* 10 (9), e0137785. DOI: 10.1371/journal.pone.0137785.

[248] Rejeb, Ines Ben; Hamida, Jeannette Ben; Gargouri, Mohamed (2004): Coupled-enzyme system for the determination of lipase activity. In: *Biotechnology Letters* 26 (16), S. 1273–1276. DOI: 10.1023/B:BILE.0000044917.68640.c4.

[249] Wang, Zhi Xin; Killilea, S. Derek; Srivastava, D. K. (1993): Kinetic evaluation of substrate-dependent origin of the lag phase in soybean lipoxygenase-1 catalyzed reactions. In: *Biochemistry* 32 (6), S. 1500–1509. DOI: 10.1021/bi00057a014.

[250] Gargouri, Mohamed; Legoy, Marie Dominique (1997): Chemoenzymatic production of (+)-coriolic acid from trilinolein: Coupled synthesis and extraction. In: *Journal of the American Oil Chemists Society* 74 (6), S. 641–645. DOI: 10.1007/s11746-997-0196-8.

[251] Chapman, Michael R.; Cosgrove, Sebastian C.; Turner, Nicholas J.; Kapur, Nikil; Blacker, A. John (2018): Highly Productive Oxidative Biocatalysis in Continuous Flow by Enhancing the Aqueous Equilibrium Solubility of Oxygen. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 57 (33), S. 10535–10539. DOI: 10.1002/anie.201803675.

[252] Beverungen, Carsten; Buyukuslu, Nihal; Candar, Volkan; Eryasa, Yonca; Schörken, Ulrich; Weiss, Albrecht; Wunderlich, M. Process for recovering hydroperoxides, EP 1336659A2, 2003.

[253] Coenen, Anna; Gala Marti, Valentin; Müller, Kira; Sheremetiev, Maria; Finamore, Lorenzo; Schörken, Ulrich (2022): Synthesis of Polymer Precursor 12-Oxododecenoic Acid Utilizing Recombinant Papaya Hydroperoxide Lyase in an Enzyme Cascade. In: *Applied biochemistry and biotechnology*. DOI: 10.1007/s12010-022-04095-0.

[254] Ortiz, Claudia; Ferreira, María Luján; Barbosa, Oveimar; dos Santos, José C. S.; Rodrigues, Rafael C.; Berenguer-Murcia, Ángel et al. (2019): Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? In: *Catalysis Science & Technology* 9 (10), S. 2380–2420. DOI: 10.1039/c9cy00415g.

[255] Simone, Angela de; Naldi, Marina; Bartolini, Manuela; Davani, Lara; Andrisano, Vincenza (2019): Immobilized Enzyme Reactors: An Overview of Applications in Drug Discovery from 2008 to 2018. In: *Chromatographia* 82 (1), S. 425–441. DOI: 10.1007/s10337-018-3663-5.

[256] Thompson, Matthew P.; Peñafiel, Itziar; Cosgrove, Sebastian C.; Turner, Nicholas J. (2019): Biocatalysis Using Immobilized Enzymes in Continuous Flow for the Synthesis of Fine Chemicals. In: *Organic Process Research & Development* 23 (1), S. 9–18. DOI: 10.1021/acs.oprd.8b00305.

- [257] Hsu, An-Fei; Wu, Emily; Foglia, Thomas A; Piazza, George J. (2000): Kinetic behavior of soybean lipoxygenase: a comparative study of the free enzyme and the enzyme immobilized in an alginate silica sol-gel matrix. *Journal Food Biochemistry*, 24, 21–31. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2000.tb00040.x
- [258] Karadag, H., Bilgin, R., Tukel, S., Immobilization of Soybean Lipoxygenase onto Polyacrylamide Gel. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2006, 20, 95-100. DOI: 10.1080/13102818.2006.10817348
- [259] Ngin, Putheary; Cho, Kyoungwon; Han, Oksoo (2021): Immobilization of Soybean Lipoxygenase on Nanoporous Rice Husk Silica by Adsorption: Retention of Enzyme Function and Catalytic Potential. *Molecules*, 26, 291. DOI: 10.3390/molecules26020291
- [260] Battu, Serge; Cook-Moreau, Jeanne; Beneytout, Jean L. (1994): Stabilization of potato tuber lipoxygenase on talc. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1211 (3), S. 270–276. DOI: 10.1016/0005-2760(94)90150-3.
- [261] Petrus Cuperus F.; Kramer, Gerard.F.H.; Derksen, Johannes T.P.; Bouwer, Sietze Th. (1995): Activity of immobilized lipoxygenase used for the formation of perhydroxyacids. *Catalysis* 25, 441–445. DOI: 10.1016/0920-5861(95)00075-Q
- [262] Dennisse Parra-Diaz, Dorothy P. Brower, George J. Piazza (1993): A Method for the Immobilization of Soybean Lipoxygenase. In: *Biotechnology and applied biochemistry*, (18), S. 359–367.
- [263] Hsu, An-Fei; Wu, Emiliy; Shen, Siyuan; Foglia, Thomas A.; Jones Kerby (1999): Immobilized lipoxygenase in a packed-bed column bioreactor: continuous oxygenation of linoleic acid. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 30, 245-50. DOI: 10.1111/j.1470-8744.1999.tb00777.x
- [264] Rodrigues, Rafael C.; Virgen-Ortíz, Jose J.; Dos Santos, José C. S.; Berenguer-Murcia, Ángel; Alcantara, Andres R.; Barbosa, Oveimar et al. (2019): Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. In: *Biotechnology advances* 37 (5), S. 746–770. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.04.003.
- [265] Manoel, Evelin A.; Dos Santos, José C. S.; Freire, Denise M. G.; Rueda, Nazzoly; Fernandez-Lafuente, Roberto (2015): Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. In: *Enzyme and Microbial Technology* 71, S. 53–57. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.02.001.
- [266] Baron, Alessandra Machado; Barouh, Nathalie; Barea, Bruno; Villeneuve, Pierre; Mitchell, David Alexander; Krieger, Nadia (2014): Transesterification of castor oil in a solvent-

free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. In: *Fuel* 117, S. 458–462. DOI: 10.1016/j.fuel.2013.09.065.

[267] Du, Chuang; Zhao, Bo; Li, Chunyuan; Wang, Ping; Wang, Zhi; Tang, Jun; Wang, Lei (2009): Improvement of the enantioselectivity and activity of lipase from *Pseudomonas sp.* via adsorption on a hydrophobic support: kinetic resolution of 2-octanol. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 27 (5-6), S. 340–347. DOI: 10.3109/10242420903225230.

[268] Boncel, Sławomir; Zniszczoł, Aurelia; Szymańska, Katarzyna; Mrowiec-Białoń, Julita; Jarzębski, Andrzej; Walczak, Krzysztof Z. (2013): Alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* non-covalently immobilised on pristine versus oxidised multi-wall carbon nanotubes as efficient and recyclable catalytic systems in the synthesis of Solketal esters. In: *Enzyme and Microbial Technology* 53 (4), S. 263–270. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2013.05.003.

[269] Buchhaupt, Markus; Guder, Jan Christopher; Etschmann, Maria Magdalena Walburga; Schrader, Jens (2012): Synthesis of green note aroma compounds by biotransformation of fatty acids using yeast cells coexpressing lipoxygenase and hydroperoxide lyase. In: *Applied microbiology and biotechnology* 93 (1), S. 159–168. DOI: 10.1007/s00253-011-3482-1.

[270] Rabetafika, Holy N.; Gigot, Cédric; Fauconnier, Marie-Laure; Ongena, Marc; Destain, Jacqueline; Du Jardin, Patrick et al. (2008): Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes. In: *Biotechnology letters* 30 (6), S. 1115–1119. DOI: 10.1007/s10529-008-9652-2.

[271] Fukushige, Hirotada; Hildebrand, David F. (2005): A simple and efficient system for green note compound biogenesis by use of certain lipoxygenase and hydroperoxide lyase sources. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 53 (17), S. 6877–6882. DOI: 10.1021/jf047954j.

[272] Austin, Richard G.; Pretzer, Wayne R.; Kobylinski, Thaddeus P., Decomposition of cumene hydroperoxide using a Lewis acid catalyst, US 4267380A, 1981.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: LOX-katalysierte Reaktion von Linolsäure ((Z,Z)-Octadeca-9,12-diensäure) zu den korrespondierenden Hydroperoxiden (S)-13-HPODE und (S)-9-HPODE.....	6
Abbildung 2: Darstellung der zwei Modelle zur Erklärung der Regiospezifität bei der LOX-katalysierten Hydroperoxidierung.	7
Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen	9
Abbildung 4: Dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums der Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen.....	10
Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der LOX-katalysierten Oxidation von Linolsäure zu (S)-13-HPODE	11
Abbildung 6: Katalytischer Mechanismus von Lipasen.	13
Abbildung 7: (A) Offene (PDB: 4TGL) und geschlossene Konformation (PDB: 3TGL) der Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i>	14
Abbildung 8: Struktur der humanen Erythrocyten-Katalase.....	16
Abbildung 9: Übersicht des Oxylipin-Stoffwechsels ausgehend von Linolsäure oder Linolensäure.....	18
Abbildung 10: Vergleichende GC-Analyse von LOX Substraten	48
Abbildung 11: Aktivität (A) und Regioselektivität (B) von LOX-1 von Sigma Aldrich und einer Suspension aus Aceton-extrahiertem Mehl	50
Abbildung 12: Effekte der Linolsäurekonzentration bei einer Sauerstoffflussrate von 0 - 100 ml/min auf die Produktbildung (A) und Regioisomerenverhältnis von 13-HPODE (B)	51
Abbildung 13: A) Einfluss von Ultraturrax (●), Ultraschall (■) und Rühren (▲) auf die HPODE-Ausbeute	52
Abbildung 14: Einfluss von Lösungsmittel auf die HPODE-Ausbeute (A), LOX-1 Aktivität (B) und Regioselektivität (C).	53
Abbildung 15: Gemittelte relative Ausbeute von Hydroperoxiden bei Zugabe von Detergenzien unterschiedlicher HLB-Werte.....	54
Abbildung 16: HPODE Ausbeute als Funktion der Linolsäurekonzentration und des Enzym-Substrat-Verhältnisses mit 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110	56
Abbildung 17: A) Ausbeute von Hydroperoxiden bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten nach 2 Stunden B) Ausbeute HPODE nach 2 Stunden bei verschiedenen Reaktionstemperaturen.	57
Abbildung 18: Ausbeute (A) und Anteil von 13-HPODE (B) im Produktgemisch nach der Extraktion	58
Abbildung 19: A) Aktivität der getesteten Katalase aus <i>M. lysodeikticus</i> in einem pH-Bereich von 6,5 bis 10. B) Evaluierung der Mindestmenge an Katalase aus <i>M. lysodeikticus</i> nötig zur	

kontinuierlichen Umsetzung von H ₂ O ₂ C) Ausbeute an HPODE bei Variation der H ₂ O ₂ -Zuflussrate nach 3 Stunden bei pH 8.....	60
Abbildung 20: Ausbeute an freien Fettsäuren bei der Hydrolyse von Distelöl mit Lipasen bei pH 9 (A) und pH 8 (B).....	62
Abbildung 21: Zeitverlauf der Hydrolyse von Distelöl mit Lipasen bei pH 8 (A) und Ausbeute an freien Fettsäuren bei der Hydrolyse von Distelöl mit Lipase aus <i>P. fluorescens</i> bei pH 8 (B).	63
Abbildung 22: (A) Hydroperoxidierung von Distelöl ausgehend mit <i>P. fluorescens</i> Lipase und LOX (B) Säurezahl nach 3 Stunden Reaktion.....	64
Abbildung 23: Vergleichende Hochtemperatur-GC-Analyse der Hydroperoxidationsprodukte nach Hydrierung und Silylierung ausgehend von Distelöl und Linolsäure	65
Abbildung 24: A) Vergleich der HPODE-Ausbeuten bei Verwendung von Linolsäure (●) und Linolsäuremonoglycerid (■) bei pH 8. B) Vergleich der Umsetzung von Linolsäure ohne Glycerol (●) und in der Präsenz von 30 (■) und 100 mM Glycerol (▲).....	66
Abbildung 25: A) Analyse der HPODE-Ausbeute bei verschiedenen LOX-Dosierungen ausgehend von Distelöl mit Lipase aus <i>P. fluorescens</i> . B) Analyse der HPODE-Ausbeuten basierend auf dem Gehalt an Linolsäure mit Sojamehl Suspension und LOX-1 ausgehend von Distelöl mit Lipase aus <i>P. fluorescens</i>	67
Abbildung 26: Vergleich der Schaumentwicklung während der Enzymkaskade mit in situ Sauerstoffzeugung (A) und 50 ml/min Sauerstoff-Flussrate (B).....	69
Abbildung 27: A) HPODE-Ausbeuten bei Einsatz der Kaskade mit LOX-1, Lipase und Katalase in Tris-HCl Puffer pH 8 B) Analyse der Regioisomeren-Verteilung (13:9) der Reaktionsprodukte aus A)	70
Abbildung 28: Oxidierte Kohlenstoffnanoröhren nach Behandlung mit Nitriersäure	72
Abbildung 29: Optimierung der Immobilisierung von LOX auf Immobead 150 P.	72
Abbildung 30: A) Verlauf der spezifischen Enzymaktivität im Überstand während der Immobilisierung von LOX-1 auf Immobead 150 P bei verschiedenen Enzymbeladungen B) Relative spezifische Aktivität bei verschiedenen pH-Werten von 6 bis 10.....	73
Abbildung 31: Zeit-Umsatz Kurven der Hydroperoxidierung von Linolsäure bei 1 mM Substratkonzentration bei Verwendung LOX immobilisiert auf Immobead 150 P (○) und eingeschlossen in Alginatperlen (□).....	76
Abbildung 32: Ausbeute an HPODE während des Recyclings von LOX auf Immobead 150 P (A) und Alginatperlen mit 2,5 mg/ml TMMS (B). C) Aktivität von LOX auf Immobead 150 P während des Recyclings. D) Aktivität von LOX in Alginatperlen während des Recyclings	77
Abbildung 33: A) Verwendeter 3D-gedruckter Reaktor mit Anschlüssen an beiden Seiten. B) Verlauf der Aktivität von auf Immobead 150 P immobilisierter LOX-1 in einem Zeitraum von 16	

Stunden bei kontinuierlichem Durchfluss von 30 mM Linolsäurelösung pH 8 mit einer Flussrate von 0,5 ml/min.....	78
Abbildung 34: Untersuchung der HPODE-Ausbeute bei Umsetzung von Linolsäure mit immobilisierter LOX unter kontinuierlichen Bedingungen.....	79
Abbildung 35: Verlauf der Aktivität und Konzentration im Überstand während der Immobilisierung von Katalase aus <i>M. lysodeikticus</i> auf Immobead 150 P.....	80
Abbildung 36: Untersuchung von LOX und Katalase, die gemeinsam auf Immobead 150 P bei 1 mM und 30 mM Linolsäure-Konzentration bei pH 9 mit 3 % ((v/v) Substrat) Triton CG-110 immobilisiert wurden.....	82
Abbildung 37: Übersicht der Immobilisierung von Amano Lipase aus <i>P. fluorescens</i> auf Immobead 150 P.....	84
Abbildung 38: A) Vergleich von LOX + Lipase, die gemeinsam auf Immobead 150 P über 4 Stunden immobilisiert wurden. B) Ausbeute an freien Fettsäuren nach 4 Stunden bei Verwendung verschiedener Lipase-Immobilisate bei pH 8 mit Distelöl äquivalent zu 30 mM Linolsäure.....	87
Abbildung 39: Beispielchromatogramm einer Spaltung von 13-HPODE mit AlCl_3 in MTBE.....	90
Abbildung 40: Kombiniertes Batch-Verfahren mit getrennten Immobilisaten	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für Anwendungsgebiete der in dieser Arbeit untersuchten Lipasen.	15
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle.	21
Tabelle 3: Verwendete Referenzsubstanzen.	23
Tabelle 4: Verwendete Tenside.	24
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen.	24
Tabelle 6: Verwendete Enzyme und Enzympräparationen.	25
Tabelle 7: Verwendete Trägermaterialien mit Bezugsquelle.	26
Tabelle 8: Verwendete Laborgeräte mit Angabe des Herstellers.	26
Tabelle 9: Übersicht der Optimierungsparameter und die getesteten Bedingungen.	34
Tabelle 10: Zusammensetzung der Puffer Stocklösung zur Bestimmung der Enzymaktivität von Lipase während der Immobilisierung.	41
Tabelle 11: Schema der finalen Verdünnung in der Küvette für die Bestimmung der Hydroperoxidreaktion während einer biokatalytischen Umsetzung von Linolsäure mit LOX-1.	42
Tabelle 12: Übersicht über die GC-Methode zur Untersuchung der Distelölbestandteile über eine ErAcc-WAX-MS-Säule.	43
Tabelle 13: Übersicht über die GC-Methode zur Untersuchung der Hydroperoxyfettsäuren über eine MTX-Biodiesel TG Säule.	44
Tabelle 14: Schema der HPLC-Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Linolsäurehydroperoxiden.	45
Tabelle 15: Pipettierschema zur Bestimmung der Mizellgröße von Linolsäure bei verschiedenen Konzentrationen nach Homogenisierung.	46
Tabelle 16: Fettsäureprofil von Distelöl und gereinigter Linolsäure nach Harnstoff Fraktionierung.	47
Tabelle 17: Verwendete Puffer für die Messung der LOX-1 Aktivität aus verschiedenen Quellen bei unterschiedlichen pH-Werten.	49
Tabelle 18: Liste der Tenside nach HLB-Werten geordnet.	55
Tabelle 19: Analyse der HPODE-Bildung und Hydrolysegrad der Experimente aus Abbildung 22.	65
Tabelle 20: Optimierte Parameter für die Enzymkaskade mit Lipase und LOX.	68
Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Trägermaterialien.	71
Tabelle 22: Ergebnisse der Immobilisierung von LOX aus Sojabohnen auf Immobead 150 P.	74
Tabelle 23: Einfluss der verschiedenen Co-Polymer-Agenzien auf die Aktivität der eingeschlossenen Lipoxygenase in Alginatperlen.	74

Tabelle 24: Biokatalysatorbeladung, Bindungskapazität und spezifische Aktivität der getesteten Trägermaterialien nach Immobilisierung von LOX-1 aus Sojabohnen	75
Tabelle 25: Einfluss der verschiedenen Co-Polymer Agenzien auf die Aktivität der eingeschlossenen Katalase in Alginatperlen.....	80
Tabelle 26: Immobilisierung von Katalase aus <i>M. lysodeikticus</i> auf Immobead 150 P.	81
Tabelle 27: Ergebnisse der Immobilisierung von Amano Lipase aus <i>P. fluorescens</i> auf Immobead 150 P.	83
Tabelle 28: Ergebnisse der Immobilisierung von Lipasen aus <i>P. fluorescens</i> (<i>P. flu</i>) und <i>C. rugosa</i> (CCL, VII) auf Lewatit VP OC 1600 und Accurel MP 1000 nach 24 Stunden.	85
Tabelle 29: Bindungskapazitäten (%) und maximale Aktivitäten (U/g Immobilisat) der Lipasen aus <i>P. fluorescens</i> und <i>C. rugosa</i> (CCL, VII) bei einer Enzymbeladung von 20 mg/g nach 24 Stunden inkubation.....	85
Tabelle 30: Untersuchung der Hexanalsynthese nach Spaltung von 13-HPODE mit $AlCl_3$ in verschiedenen Lösungsmitteln.	89
Tabelle 31: Untersuchung der Hexanalsynthese nach Spaltung von 13-HPODE mit $ZrCl_4$ in MTBE und THF.	91
Tabelle 32: Vergleich der LOX-Reaktionsbedingungen zu Beginn und am Ende der Optimierung.....	93
Tabelle 33: Vergleich der Immobilisierung von LOX auf unterschiedlichen Trägern.....	99

Danksagung

Ein Experte ist ein Mensch, der auf einem eng begrenzten Feld alle nur denkbaren Fehler gemacht hat.

(Niels Bohr)

Wie durch Kooperation zwischen Menschen schon Zivilisationen geschaffen worden sind und technische, soziale wie auch kulturelle Wunder vollbracht wurden, so ist auch diese Dissertation nicht durch die Forschung eines einzelnen Doktorandes im stillen Kämmerlein entstanden, sondern unter Einbezug von vielen.

Zunächst einmal möchte ich mich herzlich bei den Projektpartnern der Partnerunternehmen Enzymicals und Evonik, Dr. Henrike Brundiek und Dr. Oliver Thum, für ihren Input und fruchtbaren Ideen bedanken.

Darüber hinaus gebührt mein Dank Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger, der sich bereit erklärt hat, als Doktorvater für diese Dissertation zu fungieren und mir mit Hilfestellung unterstützend zur Seite stand. Ein großer Dank gebührt auch Berivan Gones, Katja Nowak, Evangelios Kaliakoudas, Christoph Müller, Eugen Banmann, Simone Carola Bandte und Vitaliy Spector, deren Abschlussarbeiten ich betreuen und von denen ich viel für mein Leben lernen durfte.

Ein besonderer Dank gebührt auch meiner Projektkollegin Anna Coenen für unsere offenen und hilfreichen Diskussionen und Gespräche im Verlauf der Laborarbeit, die mehr als einmal zu entscheidenden Schlussfolgerungen geführt haben und, wenn nicht, dann zumindest unterhaltsam waren.

Ein herzlicher Dank gebührt meinem Mentor Prof. Dr. Ulrich Schörken, ohne den diese ganze Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Von der Leitung des Projekts bis zum Austausch von Ideen und den zwischenzeitlichen Plausch über Allerweltsthemen kann sein Einfluss für den Erfolg dieser Arbeit kaum überschätzt werden.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meinem Vater, die immer zur rechten Zeit das sagten, was ich nicht hören wollte. Und als allerletztes kann ich mich nur bei meiner Ehefrau Stefanie bedanken, ohne deren Unterstützung ich schon mehr als einmal abgebrochen hätte. Für die vielen Gespräche und Aufmunterungen, für die Konflikte und die Ideen, an denen ich bis zu diesem Moment wachsen konnte, möchte ich mich herzlich bei allen bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Valentin Gala Marti
Geboren: 30.11.1991
Geburtsort: Mönchengladbach
Familienstand: Verheiratet
Nationalität: Deutsch, Spanisch

Hochschulausbildung

2019 – 2022 Promotion
Institut für Angewandte Naturwissenschaft – Arbeitsgruppe Green Chemistry and Biotechnology TH Köln bei Prof. Dr. Ulrich Schörken
Thema: „Entwicklung einer enzymatischen Reaktionskaskade zur Darstellung von Fettsäure-Hydroperoxiden aus Distelöl“

2016 – 2018 M. Sc. Chemie
Master Thesis Institut für Biochemie I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Thema: „Klonierung, Expression und Charakterisierung von Peroxidasen und Peroxygenasen aus Lignin-abbauenden Pilzen“ unter der Anleitung von Prof. Dr. Vlada B. Urlacher

2012 – 2016 B. Sc. Chemie
Bachelor Thesis Institut für Biochemie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Thema: „Aufreinigung und Charakterisierung von Vif-Varianten“ unter der Anleitung von Prof. Dr. Lutz Schmitt

Schulbildung

2002 – 2011 Stiftisches Humanistisches Gymnasium (Allgemeine Hochschulreife)
1998 – 2002 Katholische Grundschule Zeppelinstraße

Publikationsliste

Gala Marti, Valentin; Coenen, Anna; Schörken, Ulrich (2021): Synthesis of Linoleic Acid 13-Hydroperoxides from Safflower Oil Utilizing Lipoxygenase in a Coupled Enzyme System with In-Situ Oxygen Generation. In: *Catalysts* 11 (9), S. 1119. DOI: 10.3390/catal11091119.

Anteil an dieser Arbeit: Versuchsplanung und Durchführung, Etablierung von Methoden und Visualisierung von Daten, Schreiben und Überarbeitung des Manuskripts

Coenen, Anna; Gala Marti, Valentin; Müller, Kira; Sheremetiev, Maria; Finamore, Lorenzo; Schörken, Ulrich (2022): Synthesis of Polymer Precursor 12-Oxododecenoic Acid Utilizing Recombinant Papaya Hydroperoxide Lyase in an Enzyme Cascade. In: *Applied biochemistry and biotechnology*. DOI: 10.1007/s12010-022-04095-0.

Anteil an dieser Arbeit: Versuchsplanung und Durchführung, Etablierung von Methoden, Schreiben und Überarbeitung des Manuskripts

Gala Marti, Valentin; Müller, Christoph; Spector, Vitaliy; Schörken, Ulrich (2022): Immobilization of lipoxygenase, catalase and lipase for a reactor design targeting linoleic acid hydroperoxidation. In: *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2022, 2200140, DOI: 10.1002/ejlt.202200140.

Anteil an dieser Arbeit: Versuchsplanung und Durchführung, Etablierung von Methoden und Visualisierung von Daten, Schreiben und Überarbeitung des Manuskripts

Präsentationen bei internationalen Konferenzen

Gala Marti, V., Coenen, A., Schörken, U. (2020); Regioselective synthesis of linoleic acid based hydroperoxides with *in situ* oxygen generation; European Biotechnology Congress, Prag, Tschechien.

Gala Marti, V., Coenen, A., Schörken, U. (2021); Development of an enzymatic cascade for regioselective hydroperoxide synthesis with *in situ* oxygen generation; Multistep Enzyme Catalyzed Processes Congress, Aachen, Deutschland

Gala Marti, V., Coenen, A., Schörken, U. (2021); Synthesis of hydroperoxides from safflower oil utilizing a coupled enzyme system with *in situ* oxygen generation; 18th Euro Fed Lipid Congress and Expo, Frankfurt, Deutschland

Coenen, A., Gala Marti, V., Schörken, U. (2021); Cloning, expression and characterization of hydroperoxide lyases for synthesis of 12-oxododecenoic acid, Biotrans, Graz, Österreich

Gala Marti, V., Schörken, U. (2022); Immobilization of LOX for the synthesis of linoleic acid hydroperoxides in a flow bed reactor; 11th International CeBiTec Research Conference, Bielefeld, Deutschland

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Herr Valentin Gala Marti, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ort, Datum

(Valentin Gala Marti)

Erklärung Nutzungsrechte

Ich, Herr Valentin Gala Marti, versichere, dass ich die Nutzungsrechte an allen Abbildungen, Tabellen, Daten und sonstigem Material zur Erstellung dieser Arbeit inne habe.

Ort, Datum

(Valentin Gala Marti)