

Organolösliche Polymer-Enzym Konjugate auf Basis von Poly-2-Alkyloxazolinen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Dr. rer. nat.
von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
der Technischen Universität Dortmund
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Ing. Stefan Konieczny
aus
Moers

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg C. Tiller
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Schmid

Dortmund 2014

Für meine Mutter

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2009 bis Januar 2014 am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Danksagung

Prof. Dr. Jörg C. Tiller möchte ich ganz herzlich danken für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas, die hervorragende Betreuung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen. Weiterhin danke ich meinem Doktorvater für die vielen fachlich anregenden wissenschaftlichen Diskussionen, seinen unerschöpflichen Ideenreichtum und sein großes Interesse an der vorliegenden Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Allen voran möchte ich meinen Arbeitskollegen des Lehrstuhl BMP für die freundschaftliche angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre und die sonstige Unterstützung danken. Besonders danke ich in diesem Zusammenhang meinen Labor- und Bürokollegen Frau Ina Schönfeld und Herrn Dr. Christian Krumm, sowie meinem Laborkollegen Herrn Dr. Christoph Fik für die gute Zusammenarbeit, die vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen sowie auch für die weniger fachlichen Gespräche, die lustigen Momente und ihre Freundschaft. Danken möchte ich außerdem meinen Kollegen bzw. ehemaligen Kollegen Herrn Peter von Czarnecki, Herrn Dr. Matthias Thiel, Frau Melanie Leurs, Frau Ramona Tillmann, Herrn Arne Straßburg, Herrn Felix Siedenbiedel, Herrn Dr. Stephan Dech, Frau Dr. Anna Pipetz und Herrn Marco Müller für die vielen fachlichen und weniger fachlichen Diskussionen und Anregungen.

Herrn Dr. Frank Katzenberg danke ich für die immer kompetente fachliche Unterstützung sowie auch für die vielen weniger fachbezogenen Diskussionen. Herrn Thorsten Moll danke ich für die GPC-Messungen sowie seine Unterstützung bei technischen und weniger technischen Belangen. Danken möchte ich auch Frau Monika Meuris vom Zentrum für Elektronenmikroskopie für die exzellenten TEM-Aufnahmen wie auch für die vielen freundschaftlichen Gespräche. Ich danke außerdem unserer Sekretärin Frau Kristine Katzmarczyk und unserer ehemaligen Sekretärin Frau Elisa Ferrao-Prates für ihre Unterstützung bei der Bewältigung vieler bürokratischen Hindernisse.

Ein besonderer Dank geht an meine talentierten und äußerst motivierten Diplomanden Frau Ina Schönfeld, Frau Melanie Leurs und Herrn Dominik Doert sowie an meine nicht weniger motivierten und talentierten Mitarbeiterpraktikanten Frau Julia Brück-

ner, Herrn Martin Körner und Herrn Lukas Witt. Eure Betreuung hat mir viel Spaß gemacht.

Bei Herrn Jörg Fischer vom Lehrstuhl Technische Biochemie bedanke ich mich für das zur Verfügung stellen von diversen Chemikalien und Geräten die bei uns nicht vorhanden waren, sowie bei Herrn Dr. Felix Stehle für die HPLC-MS Messungen.

Bei meinen beiden studentischen Hilfskräften Herrn Thorsten Greinert und Herrn Christian Eickmeier möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der enzymatischen Aktivitätsassays, der Silberfärbung, sowie bei der Bearbeitung der GC-Chromatogramme bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Wolf Hiller und beim gesamten Team der NMR-Abteilung der Fakultät Chemie für die Messung der vielen NMR-Spektren, sowie bei Frau Rita Fobbe vom ISAS-Dortmund für die Messung der Polymer ESI-MS-Spektren.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenclusters bedanke ich mich beim Cluster Industrielle Biotechnologie (CLIB2021).

Meiner Mutter Gisela Konieczny danke ich ganz besonders für ihre ständige Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums.

**„The most elementary and valuable statement in science,
the beginning of wisdom, is 'I do not know'“**

Data, USS Enterprise
Star Trek - The Next Generation [S02E02]

Veröffentlichungen

Konieczny, S., Leurs, M.; Tiller, J.C., „Polymer enzyme conjugates as chiral ligands for Sharpless dihydroxylation of alkenes in organic solvents“, *ChemBioChem*, **2015**, 16, 83-90.

Fik, C.P.; **Konieczny, S.**, Pashley, D.H.; Waschinski, C.J.; Ladisch, R.S.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J.C., „Telechelic Poly(2-oxazoline)s with a Biocidal and a Polymerizable Terminal as Collagenase Inhibiting Additive for Long-term Active Antimicrobial Dental Materials“, *Macromolecular Bioscience*, **2014**, 14, 1569-1579.

Konieczny, S.; Krumm, C.; Doert, D; Neufeld, K.; Tiller, J.C., „Investigations on the activity of poly(2-oxazoline) enzyme conjugates dissolved in organic solvents“, *Journal of Biotechnology*, **2014**, 181, 55-63.

Krumm, C.; **Konieczny, S.**, Dropalla, G.J.; Milbradt, M.; Tiller, J.C., „Amphiphilic Polymer Conetworks Based on End Group Cross-Linked Poly(2-oxazoline) Homo- and Triblock Copolymers“, *Macromolecules*, **2013**, 46, 3234-3245.

Krumm, C.; **Konieczny, S.**, Dropalla, G.J.; Milbradt, M.; Tiller, J.C., „Poly(2-oxazolin) based amphiphilic polymer conetworks“, *Scientific Highlights*, **2012**.

Konieczny, S.; Fik, C.P.; Aversch, N.J.H.; Tiller, J.C., „Organosoluble Enzyme Conjugates with Poly(oxazoline)s via Pyromellitic Acid Dianhydride“, *Journal of Biotechnology*, **2012**, 159, 195-203.

Konieczny, S.; Tiller, J.C., „Organosoluble Polymer Enzyme Conjugates with Poly(oxazoline)s“, *Polymer Preprints*, **2012**, 53 , 356.

Konieczny, S.; Tiller, J.C., „Polymer Enzyme conjugates with Poly(oxazoline)s“, *Scientific Highlights*, **2011**.

Fik, C.P.; **Konieczny, S.**; Krumm, C.; Schönfeld, I.; Tiller, J.C., „Telechelic Poly(oxazoline)s for Bioactive Conjugates“, *Macromolecular Rapid Communications*, **2011**, 32 , F73-F74.

Vorträge

Konieczny, S., Tiller, J.C., „Organosoluble Polymer Enzyme Conjugates“ *17th International Pushchino School Conference of Young Scientists*, Pushchino, 2013.

Konieczny, S., Tiller, J.C., „Organosoluble Polymer Enzyme Conjugates with Poly(oxazoline)s“, *ACS Meeting*, San Diego, 2012.

Konieczny, S., Tiller, J.C., „Tandem catalysis with enzymes“, *CLIB-GC retreat*, Bonn, 2011.

Poster

Konieczny, S.; Tiller, J.C., „Bioactive polymer enzyme conjugates for tandem catalysis“, *CLIB-GC retreat, Bergisch Gladbach*, **2012**.

Fik, C.P.; **Konieczny, S.**; Krumm, C.; I. Schönfeld, Tiller, J.C., „Telechelic Poly(oxazoline)s for Bioactive Conjugates“, *Makromolekulares Kolloquium Freiburg*, **2011**.

Konieczny, S.; Tiller, J.C., „Bioactive polymer enzyme conjugates for tandem catalysis“, *CLIB-GC retreat, Bonn*, **2011**.

Konieczny, S.; Schönfeld, I.; Tiller, J.C., „Polymer Protein conjugates for tandem catalysis“, *CLIB-GC retreat, Wuppertal*, **2010**.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Symbolverzeichnis	XIX
1 Einleitung	1
1.1 Biokatalyse	1
1.1.1 Enzyme	1
1.1.2 Coenzyme	4
1.2 Biokatalyse in unkonventionellen Medien	6
1.2.1 Biokatalyse in organischen Lösungsmitteln	6
1.2.2 Einsatzmöglichkeiten in organischen Lösungsmitteln	9
1.2.2.1 Einsatz freier Enzyme	9
1.2.2.2 Einsatz immobilisierter Enzyme	11
1.2.3 Polymer-Enzymkonjugate	13
1.2.3.1 Polyethylenglykol-Enzymkonjugate	13
1.2.3.2 Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugate	15
1.2.4 Polymer-Coenzymkonjugate	17
1.3 Enzyme in der asymmetrischen Katalyse	17
1.3.1 Künstliche Metalloenzyme	18
1.3.1.1 Bindungsstrategie	19
1.3.2 Anwendungen von künstlichen Metalloenzymen	20
1.3.3 Tandemkatalyse	20
2 Aufgabenstellung	23
3 Materialien und Methoden	25
3.1 Chemikalien und Geräte	25
3.1.1 Chemikalien	25
3.1.2 Enzyme	30
3.1.3 Proteinmarker	31

3.1.4	Geräte	31
3.1.4.1	Gelpermeationschromatografie (GPC)	31
3.1.4.2	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	32
3.1.4.3	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	32
3.1.4.4	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	33
3.1.4.5	Mikrowellensynthesen	33
3.1.4.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	33
3.1.4.7	HPLC-ESI-MS	34
3.1.4.8	Gaschromatographie (GC)	35
3.1.4.8.1	Bestimmung der Kalibrierfaktoren	35
3.1.4.8.1.1	Synthese von Laurinsäureoktylester	35
3.1.5	Gase und Flüssiggase	38
3.2	Polymersynthese	38
3.2.1	Darstellung von Benzyltosylat	38
3.2.2	Monomersynthese	39
3.2.2.1	Darstellung von 2-Butyl-2-Oxazolin	39
3.2.2.2	Darstellung von 2-Heptyl-2-Oxazolin	39
3.2.2.3	Destillation der 2-R-2-Oxazolinmonomere	40
3.2.3	Trocknung von Chloroform	41
3.2.4	Polymerisation einseitig gestarteter Poly(2-Oxazoline)	41
3.2.4.1	Polymerisation einseitig gestarteter Poly(2-R-Oxazolin) Homopolymere	41
3.2.4.2	Polymerisation einseitig gestarteter Poly(2-R-Oxazolin) Diblockcopolymere	44
3.2.4.3	Polymerisationskinetiken von 2-Butyl-2- und 2-Heptyl- 2-Oxazolin mit Benzyltosylat als Initiator	46
3.2.5	Terminierung der Poly(2-Oxazoline)	46
3.2.5.1	Ethylendiamin	46
3.2.5.2	Methanolische Kaliumhydroxidlösung	46
3.2.6	Aufreinigung der Poly(2-R-Oxazoline)	47
3.2.6.1	Fällung	47
3.2.6.2	Dialyse	47
3.3	Synthese von Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugaten	48
3.3.1	Direkte Terminierung	48
3.3.2	Hexamethylendiisocyanat als Linker	49
3.3.2.1	Synthese des aminoreaktiven POX-Derivates	49
3.3.2.2	Synthese von Polymer-Enzymkonjugaten	49

3.3.3	<i>N,N'</i> -Disuccinimidylcarbonat als Linker	50
3.3.3.1	Trocknung von Aceton	50
3.3.3.2	Synthese des aminoreaktiven POX-Derivates	50
3.3.3.3	Umsetzung mit Octylamin	50
3.3.3.4	Synthese von Polymer-Enzymkonjugaten	50
3.3.4	Bernsteinsäuredichlorid als Linker	51
3.3.5	Pyromellitsäuredianhydrid als Linker	51
3.3.5.1	Trocknung von <i>N,N</i> -Dimethylformamid	51
3.3.5.2	Dimerisierungsuntersuchungen	52
3.3.5.3	Synthese von Polymer-Enzymkonjugaten in reinem DMF	52
3.3.5.4	Synthese von Polymer-Enzymkonjugaten in DMF-Puffer- Mischung	52
3.3.5.5	Bestimmung der Transparenz	53
3.4	Synthese von Poly(2-Oxazolin)-Coenzymkonjugaten	53
3.4.1	Direkte Terminierung	53
3.4.2	Bernsteinsäureanhydrid als Linker	54
3.5	Aufreinigung der Enzym- und Coenzymkonjugate	54
3.5.1	Dialyse	54
3.5.2	Ultrafiltration	55
3.5.3	Lyophilisation	55
3.6	Synthese von amphiphilen Polymernetzwerken	56
3.7	Enzymatische Aktivitätsbestimmung im Wässrigen	57
3.7.1	Peptidase	57
3.7.1.1	Azocasein-Assay	57
3.7.1.2	<i>N</i> -Succinyl-L-Phenylalanin- <i>p</i> -Nitroanilid-Assay	58
3.7.2	Lysozym	59
3.7.3	Laccase	60
3.7.3.1	2,6-Dimethoxyphenol-Assay	60
3.7.3.1.1	Inhibierungsuntersuchungen	60
3.7.3.2	ABTS-Assay	61
3.7.4	Peroxidase	62
3.7.5	Alkoholdehydrogenase	63
3.7.6	Lipase	64
3.8	Enzymatische Aktivitätsbestimmung in organischen Lösungsmitteln	65
3.8.1	Peptidase	66
3.8.2	Lipase	66
3.8.3	Laccase	67

3.8.4	Peroxidase	68
3.8.5	Alkoholdehydrogenase	69
3.9	Elektrophorese	70
3.9.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	70
3.9.2	Isoelektrische Fokussierung	72
3.9.3	Coomassie-Färbung	73
3.9.4	Silberfärbung	73
3.10	Proteinbestimmung	74
3.10.1	BRADFORD-Assay	74
3.10.2	POPOV-Assay	75
3.11	Bestimmung der Anzahl freier Aminogruppen	76
3.11.1	TNBS-Assay	76
3.12	SHARPLESS-Dihydroxylierung von Alkenen	76
3.12.1	Verwendung von Pyridin als Ligand	76
3.12.2	Verwendung von POX-Enzymkonjugaten als Liganden	78
3.12.3	Tandemkatalyse mit PMeOx-Lipasekonjugaten	81
3.12.3.1	Enzymatische Veresterung von 1-Phenylethan-1,2-diol mit Laurinsäure	81
3.12.3.2	Veresterung von 1-Phenylethan-1,2-diol mit Laurinsäure	81
3.12.3.3	Tandemreaktion	82
4	Ergebnisse und Diskussion	83
4.1	Poly(2-Oxazolin)synthese	83
4.1.1	Kinetik der lebenden kationischen Polymerisation	83
4.1.2	Mechanismus der lebenden kationischen Ringöffnungspolymeri- sation	85
4.1.3	Initiatorsynthese	86
4.1.4	Monomersynthese	88
4.1.4.1	Synthese von 2-Heptyl-2-Oxazolin	88
4.1.5	Ermittlung der Propagationsgeschwindigkeitskonstanten	90
4.1.6	Polymercharakterisierung	96
4.1.6.1	Aminterminierte Poly(2-R-Oxazoline)	96
4.1.6.1.1	Homopolymere	96
4.1.6.1.2	Diblockcopolymere	99
4.1.6.1.3	ESI-MS Messungen	100
4.1.6.1.3.1	Übertragungsreaktion	101
4.1.6.2	Hydroxylterminierte Polyoxazoline	102

4.2	Organolösliche Polymer-Enzymkonjugate	104
4.2.1	Direkte Terminierung	106
4.2.2	Succinimidylcarbonat als Linker	111
4.2.3	Hexamethylendiisocyanat als Linker	115
4.2.4	Pyromellitsäuredianhydrid als Linker	117
4.2.4.1	Enzymmodifikation in reinem Dimethylformamid . . .	119
4.2.4.2	Enzymmodifikation in DMF-Puffer-Mischung	129
4.2.5	Bernsteinsäuredichlorid als Linker	142
4.2.6	Enzymatische Aktivität der Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugate	143
4.2.6.1	Hydrolasen	144
4.2.6.1.1	Glykosidasen	145
4.2.6.1.2	Peptidasen	146
4.2.6.1.3	Lipasen	149
4.2.6.2	Oxidoreduktasen	154
4.2.6.2.1	Laccase	154
4.2.6.2.2	Peroxidase	156
4.2.6.2.3	Alkoholdehydrogenase	158
4.2.7	Zusammenfassung	160
4.3	Organolösliche Polymer-Coenzymkonjugate	162
4.3.1	Direkte Terminierung	162
4.3.1.1	Aktivität der Polymer-Coenzymkonjugate	169
4.3.2	Bernsteinsäureanhydrid als Linker	173
4.3.2.1	Aktivität der Polymer-Coenzymkonjugate	177
4.3.3	Zusammenfassung	177
4.4	Polymer-Enzymkonjugate für die asymmetrische Katalyse	178
4.4.1	SHARPLESS-Dihydroxylierung von Alkenen	178
4.4.2	SHARPLESS-Dihydroxylierung von Alkenen mittels Pyridinligand	180
4.4.3	SHARPLESS-Dihydroxylierung von Alkenen mittels Poly(2-R-Oxa- zolin)-Enzymkonjugaten als Liganden	183
4.4.3.1	Etablierung geeigneter Reaktionsbedingungen	184
4.4.3.2	Eignung unterschiedlicher POX-Enzymkonjugate als Li- ganden	188
4.4.3.3	Laccase- sowie Collagenase-POX-Enzymkonjugate als Liganden	191
4.4.3.3.1	Untersuchungen zum Metallaustausch bei Ein- satz der POX-Laccasekonjugate als Liganden	194
4.4.3.3.2	Erweiterung des Eduktspektrums	197

4.4.3.4	Tandemkatalyse	199
4.4.4	Zusammenfassung	203
5	Zusammenfassung	205
5.1	Organolösliche Polymer-Enzymkonjugate	205
5.2	Organolösliche Polymer-Coenzymkonjugate	210
5.3	Polymer-Enzymkonjugate für die asymmetrische Katalyse	212
	Literaturverzeichnis	217
	Abstract	240
	Kurzzusammenfassung	242
	Kurzlebenslauf	244

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Å	Ångström
A	Ampere
Abb.	Abbildung
abdest.	abdestilliert
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AOT	Aerosol OT, Natriumdioctylsulfosuccinat
APCN	amphiphile Polymernetzwerke, engl. <i>amphiphilic polymer Conetworks</i>
APEE	<i>N</i> -Acetyl-L-Phenylalaninethylester
APPE	<i>N</i> -Acetyl-L-Phenylalaninpropylester
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATR-FTIR	FOURIER-Transformations-Infrarot-Spektroskopie unter abgeschwächter Totalreflexion
BeOTs	Benzyltosylat, Benzyl- <i>p</i> -Toluolsulfonsäure
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderalbumin, engl. <i>Bovines serum albumin</i>
BSDC	Bernsteinsäuredichlorid
Bsp.	Beispiel
BSSA	Bernsteinsäureanhydrid
BuOx	2-Butyl-2-Oxazolin
ca.	circa
CaLB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CLEA	quervernetzte Enzymaggregate, engl. <i>cross linked enzyme aggregate</i>
CrL	<i>Candida rugosa</i> Lipase
CROP	kationische Ringöffnungspolymerisation, engl. <i>cationic ring opening polymerization</i>
d	Dublett
d	Tage
Da	DALTON
DAD	Dioden-Array-Detektor

DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP _{GPC}	Polymerisationsgrad bestimmt mittels GPC, engl. <i>degree of polymerisation</i>
DP _{NMR}	Polymerisationsgrad bestimmt mittels ¹ H-NMR Spektroskopie, engl. <i>degree of polymerisation</i>
DP _{Set}	angesetzter Polymerisationsgrad, engl. <i>degree of polymerisation</i>
DPD	<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -Phenylendiamin
DSC	<i>N,N'</i> -Disuccinimidylcarbonat
DTT	Dithiothreitol
EDA	Ethylendiamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Ethylacetat
ESI	Elektrosprayionisation
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
EtOx	2-Ethyl-2-Oxazolin
Fa.	Firma
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
ges.	gesättigt
Gl.	Gleichung
GPC	Gelpermeationschromatografie
h	Stunden
HeptOx	2-Heptyl-2-Oxazolin
HMDI	Hexamethylendiisocyanat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
I	Initiator
I ⁻	Gegenion
IEF	Isoelektrische Fokussierung
J	Joule
Kap.	Kapitel

L	Liter
Lsg.	Lösung
Lsgm.	Lösungsmittel
M	Molarität
M	Monomer
m	Multipllett
max.	maximal
MeOH	Methanol
MeOTs	Methyltosylat, Methyl- <i>p</i> -Toluolsulfonsäure
MeOx	2-Methyl-2-Oxazolin
min	Minuten
mol-%	Molprozent
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Ausschlussgrenze, eng. <i>molecular weight cut-off</i>
n.b.	nicht bestimmt
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid; NAD ⁺ bzw. NADH
NAD ⁺	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat; NADP ⁺ bzw. NADPH
NADP ⁺	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphats
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie engl. <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
org.	organisch
p.a.	zur Analyse, lat. <i>pro analysi</i>
PADA	Pyromellitsäuredianhydrid
PBuOx	Poly(2-Butyloxazolin)
PEG	Polyethylenglykol
PEK	Polymer-Enzymkonjugat
PEtOx	Poly(2-Ethyloxazolin)
PheOx	2-Phenyl-2-Oxazolin
PHeptOx	Poly(2-Heptyloxazolin)
pI	isoelektrischer Punkt
PMeOx	Poly(2-Methyloxazolin)
pNpp	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat
Pos.	Position

POX	Poly(2-Oxazolin)
PP	Polypropylen
PPheOx	Poly(2-Phenyloxazolin)
ppm	Anteil, engl. <i>parts per million</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
q	Quartett
rac.	racemisch
RI	Brechungsindex, engl. <i>refractive index</i>
RmL	<i>Rhizomucor miehei</i> Lipase
RotV	Rotationsverdampfer
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	am Polymer verbleibender Rest des Initiators
s	Singulett
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	Größenausschlußchromatographie, engl. <i>size exclusion chromatography</i>
SPNA	<i>N</i> -Succinyl- <i>L</i> -Phenylalanin- <i>p</i> -Nitroanilid
stab.	stabilisiert
T	Terminierungsmittel
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TOF	Flugzeit, engl. <i>Time-of-flight</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen, engl. <i>volume to volume</i>
VE	voll entsalzt
versch.	verschiedenen
vgl.	vergleiche
Vol-%	Volumenprozent

W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen, engl. <i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel
äq.	äquivalent

Präfixe von Maßeinheiten

k	Kilo
M	Mega
μ	Mikro
m	Milli
n	Nano
p	Piko

Symbolverzeichnis

δ	chemische Verschiebung [ppm]
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
$\hat{U}_{\text{Laccase, 25 }^\circ\text{C}}$	arbitrary units, $\Delta E = \frac{0,001}{\text{min}}$ bei 25 °C
$\hat{U}_{\text{Laccase, 37 }^\circ\text{C}}$	arbitrary units, $\Delta E = \frac{0,001}{\text{min}}$ bei 37 °C
\hat{U}_{Lysozym}	arbitrary units, $\Delta E = \frac{0,001}{\text{min}}$
$\hat{U}_{\text{Peroxidase}}$	arbitrary units, $\Delta E = \frac{0,001}{\text{min}}$
$\hat{U}_{\text{Protease}}$	arbitrary units, $\Delta E = \frac{0,01}{\text{h}}$
ϑ	Temperatur [°C]
a_w	Wasseraktivität, engl. <i>activity of water</i>
c_{Enzym}	Enzymkonzentration der Probe [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$]
$d_{\text{Küvette}}$	Schichtdicke Küvette [cm]
E	Extinktion
ee	Enantiomerenüberschuss, engl. <i>enantiomeric excess</i>
f_T	Terminierungsfunktionalisierung
g	Erdbeschleunigung, $9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}$
J	Kopplungskonstante [Hz]
k_i	Initierungsgeschwindigkeitskonstante
k_p	Propagationsgeschwindigkeitskonstante
k_t	Terminierungsgeschwindigkeitskonstante
m	Masse
$M_{\text{Benzylrest}}$	Molmasse Benzylrest, $91,06 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$
$M_{\text{EDA-Rest}}$	Molmasse EDA-Rest, $59,06 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$
M_{Enzym}	Molekulargewicht des Enzyms [$\frac{\text{mg}}{\text{mmol}}$]
m_{Enzym}	Masse Enzym [mg]
$M_{\text{ESI, theor.}}$	theoretische Molmasse des Polymers [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]
m_{Gerade}	Steigung Ausgleichsgerade
$m_{\text{Initiator}}$	Masse Initiator [g]
M_{MeOx}	Molmasse MeOx-Rest, $85,05 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$
M_{Monomer}	Molmasse Monomer [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]
m_{Monomer}	Masse Monomer [g]
M_{P}	angestrebtes Molekulargewicht
M_i	Molare Masse der Polymere in Fraktion i

m_i	Gesamtmasse der Fraktion i
M_n	zahlenmittleres Molekulargewicht
M_w	gewichtsmittleres Molekulargewicht
n_{Enzym}	Stoffmenge Enzym [μmol]
$n_{\text{Initiator}}$	Stoffmenge Initiator [mol]
n_{Ketten}	Stoffmenge Polymerketten [mol]
n_{Os}	Stoffmenge $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ [μmol]
n_{Produkt}	Stoffmenge Produkt [μmol]
N_i	Anzahl der Makromoleküle in Fraktion i
PDI	Polydispersitätsindex
R^2	Bestimmtheitsmaß
t	Zeit
TON	katalytische Produktivität, engl. <i>turnover number</i>
U	Unit [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$]
V	Volumen
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v_i	Initiierungsgeschwindigkeit
v_p	Propagationsgeschwindigkeit
v_t	Terminierungsgeschwindigkeit
z	Ladung
$[I]$	Initiatorkonzentration
$[M]$	Monomerkonzentration
$[M^+]$	Konzentration der lebenden Kettenenden
$[M_0]$	Startmonomerkonzentration
$[M_t]$	Restmonomerkonzentration zum Zeitpunkt t

1 Einleitung

1.1 Biokatalyse

Der größte Teil der weltweit hergestellten chemischen Produkte wird unter Einsatz von Katalysatoren hergestellt. Aus diesem Grund haben sie auch eine enorme wirtschaftliche Bedeutung. Katalysatoren werden hierbei in den unterschiedlichsten Bereichen der Industrie eingesetzt.¹ Auf Grund ihrer Vorteile und dem verstärkten Interesse an umweltfreundlichen Produktionsprozessen hat der Anteil an biokatalysierten Verfahren in der Produktion von Feinchemikalien für beispielsweise die pharmazeutische Industrie in den letzten Jahren immer weiter zugenommen¹⁻³. Biokatalyse ist die Anwendung von Mikroorganismen und Enzymen in der synthetischen Chemie³. Zu den Biokatalysatoren gehören die erst seit den 1980er Jahren bekannten Ribozyme⁴ sowie die Enzyme. In der Biokatalyse können sowohl ganze Zellen, Zellorganellen sowie auch isolierte Enzyme eingesetzt werden¹.

Auf Grund der Vorteile (s. Kap. 1.1.1) von enzymatisch katalysierten Reaktionen, den Fortschritten in der effizienten Produktion von Enzymen^{1,5}, der Entdeckung neuer Enzyme sowie der Möglichkeit der Enzymverbesserung durch gerichtete Evolution oder rationales Proteindesign sowie durch die Zuwendung zu nachhaltigen Prozessen hat der Anteil an enzymatisch katalysierten Reaktionen in der Industrie in den letzten Jahrzehnten zugenommen^{2,3}. Während früher eine Anpassung des Prozesses an den verwendeten Biokatalysator notwendig war, ermöglicht die künstliche Evolution heute die Anpassung des Biokatalysators an den Prozess³. Diese sogenannte „weiße Biotechnologie“, d.h. der industrielle Einsatz biotechnologischer Verfahren, wird daher vorraussichtlich auch in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen⁵. Schon jetzt werden eine Reihe von Prozessen auch im industriellen Maßstab bereits enzymkatalysiert durchgeführt.^{1-3,6} Im Jahr 2010 betrug der globale Markt für industrielle Enzyme 3,3 Mrd. US-\$ und es wird eine Steigerung auf 4,4 Mrd. US-\$ im Jahr 2015 erwartet⁷. Daher besteht ein starkes Forschungsinteresse an neuen enzymkatalysierten Verfahren.

1.1.1 Enzyme

Enzyme (griechisch: *en-* - in; *Zymoma* - Hefe)⁸ sind katalytisch aktive Proteine, welche in der Lage sind die Einstellung des chemischen Gleichgewichts zu beschleunigen ohne

dieses jedoch zu verändern.¹ Die Beschleunigung beruht nur auf der Herabsetzung der Aktivierungsenergie, welche z.B. durch die Stabilisierung des Übergangszustandes hervorgerufen wird (Abb. 1.1)⁹. Dadurch sind enzymatisch katalysierte Reaktionen um den Faktor $10^8 - 10^{10}$, in einigen Fällen sogar bis zu 10^{17} -fach schneller als die entsprechenden unkatalysierten Reaktionen und damit auch deutlich schneller als chemische Katalysatoren¹. Ohne Enzyme würde deshalb nahezu jede Reaktion in biologischen

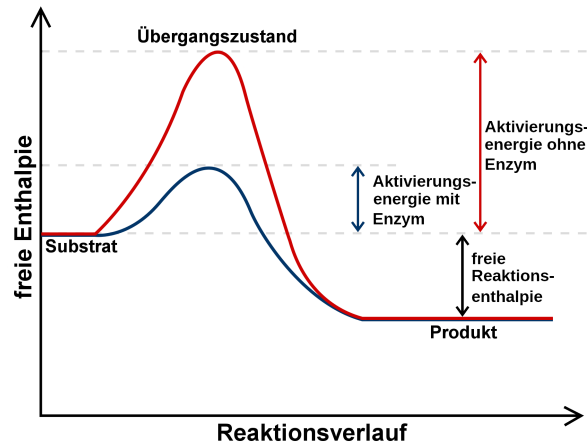


Abbildung 1.1: Auftragung der freien Enthalpie gegen den Reaktionsfortschritt einer Reaktion mit und ohne Enzym, nach Berg *et al.*¹⁰.

Systemen nur mit vernachlässigbarer Geschwindigkeit ablaufen. Darüber hinaus sind Enzyme in der Lage, zwei Reaktionen über ein Intermediat so zu koppeln, dass eine thermodynamisch begünstigte Reaktion eine thermodynamisch benachteiligte Reaktion ablaufen lassen kann¹¹. Ein Beispiel hierfür ist die enzymatische Hydrolyse von ATP, die hierbei freiwerdende Energie wird häufig verwendet um endergonische Reaktionen ablaufen zu lassen¹². Enzyme katalysieren sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion gleichermaßen, daher ist es möglich, sofern das Gleichgewicht nicht zu stark auf einer Seite liegt, die Reaktion umzukehren¹.

Enzyme können aus 62^{13} bis zu über 2500^{14} Aminosäuren bestehen, welche zu linearen Ketten verknüpft sind. Diese lineare Kette ordnet sich entsprechend der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) zu einer spezifischen dreidimensionalen Struktur (Sekundärstruktur, Tertiärstruktur) an, welche die Aktivität eines Enzyms bestimmt, obwohl nur wenige Aminosäuren¹⁵ (2 - 4) direkt an der Katalyse beteiligt sind. Bei Enzymen, die aus mehreren Ketten bestehen, ist zudem die richtige Anordnung der Untereinheiten zueinander (Quartärstruktur) wichtig für die katalytische Aktivität.¹⁰ Die Region des Enzyms, die die katalytisch aktiven Aminosäurereste enthält, und in der die Bindung und Umsetzung des Substrates durchgeführt wird, wird aktives Zentrum

genannt. Neben dem aktiven Zentrum besitzen einige Enzyme weitere Bindungsstellen für Cofaktoren (s. Kap. 1.1.2) oder für kleinere Moleküle, welche beispielsweise der Regulation dienen¹². Die hohe Spezifität der Enzyme wird durch die dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums hervorgerufen, welche dafür sorgt, dass nur ein strukturell komplementäres Substrat gebunden werden kann und somit die hohe Substratspezifität bedingt. Dieses wird bis heute mit dem von FISCHER eingeführten Begriff des Schlüssel-Schloss-Prinzips beschrieben. Eine Weiterentwicklung dieses Modells ist das *Induced fit model*. In diesem Modell wird berücksichtigt, dass Enzyme flexible Strukturen sind, in denen sich das aktive Zentrum bei der Interaktion des Substrates mit dem Enzym umformt.¹⁶

Es sind zum jetzigen Zeitpunkt über 5400 Enzyme bei der *Enzyme Nomenclature Database* bekannt¹⁷ und es existieren nach Schätzungen in der Natur etwa 25000¹⁸. Enzyme katalysieren verschiedene Arten von Reaktionen und werden nach Art der Reaktion in sechs Hauptklassen sowie weitere Unterklassen eingeteilt (Tab. 1.1). In diesem System wird jedes Enzym durch eine vierstellige Nummer, die sogenannte EC-Nummer (*Enzyme commission*), in der Form EC A.B.C.D charakterisiert. Die Klassifizierung wird von links nach rechts immer spezifischer wobei A für die Hauptklasse steht.¹⁶

Tabelle 1.1: Enzymklassifizierung¹⁶.

Hauptklasse	Bezeichnung	Reaktionstyp
1	Oxidoreduktasen	Redox-Reaktionen
2	Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen wie z.B. Alkohol-, Alkyl-, oder Nitrogruppen
3	Hydrolasen	Hydrolyse von z.B. Estern, Ethern, Peptiden, Glycosiden, Säureanhydriden
4	Lyasen	nicht hydrolytische Spaltung
5	Isomerasen	intramolekulare Umwandlung z.B. Isomerisierung
6	Ligasen	kovalente Verknüpfung mittels energiereicher Cofaktoren

Enzyme als Biokatalysatoren besitzen einige Vorteile gegenüber klassischen Katalysatoren. Diese machen sie zu einer interessanten Alternative in vielen Bereichen der Industrie, wie der chemischen oder der Pharmaindustrie. Enzyme besitzen eine hohe Chemo-, Regio- und Enantioselektivität⁹. Durch die Chemo-selektivität entstehen kaum Nebenprodukte, was die Aufreinigung vereinfacht und damit die Kosten senkt, sowie die Umweltfreundlichkeit erhöht¹⁹, während die Enantioselektivität die Synthese von

enantiomerenreinen Produkten ermöglicht. Dies ist besonders für die pharmazeutische Industrie und die Agrochemie von Interesse, da zwei Enantiomere zwar dieselben physikalischen und chemischen Eigenschaften besitzen, was auch die Trennung von Enantiomergemischen aufwendig macht, aber ihre Auswirkungen in biologischen Systemen stark unterschiedlich sein können¹. Beispielsweise kann im Falle eines Pharmazeutikums ein Enantiomer des Wirkstoffs die gewünschte Wirkung besitzen, während das andere sogar schädlich sein kann²⁰. Deshalb werden seit 1996 von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde (*Food and Drug Administration*) nur noch enantiomerenreine Wirkstoffe zugelassen²¹. Der Anteil enantiomerenreiner Wirkstoffe lag 2006 schon bei 80 %⁵. Enzyme arbeiten unter milden Reaktionsbedingungen bezogen auf Druck, Temperatur und den pH-Wert, was den Energieaufwand bei der Synthese reduziert. Der Einsatz von Biokatalysatoren ist eine umweltfreundliche Alternative zu herkömmlichen Katalysatoren, da sie biologisch leicht und vollständig abbaubar sind. Darüber hinaus können sie, auf Grund der meist hohen spezifischen Aktivität im Vergleich zu chemischen Katalysatoren, auch in geringeren Mengen eingesetzt werden. So werden von einem konventionellen Katalysator meist ca. 0,1 - 1 mol-% benötigt, bei einer enzymatisch katalysierten Reaktion hingegen nur ca. 0,0001 - 0,001 mol-%. Der Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren hat allerdings auch Nachteile. Einige Enzyme benötigen natürliche Cofaktoren (s. Kap 1.1.2), was die Kosten erhöht bzw. eine mehr oder weniger aufwendige Cofaktorregenerierung erfordert. Außerdem lässt sich die Stereoselektivität nicht einfach umkehren, wie dies bei chemischen Katalysatoren möglich ist. Zudem arbeiten Enzyme nur in einem engen Reaktionsparameterbereich optimal und ihre Stabilität unter Prozess- bzw. Lagerbedingungen ist limitiert. Die Enzymaktivität ist in wässrigen Systemen am höchsten, allerdings ist Wasser obwohl es ein umweltfreundliches Medium ist, auf Grund des hohen Siedepunktes und der hohen Verdampfungsenthalpie sowie weiterer Nachteile, wie etwa der niedrigen Löslichkeit vieler Edukte und Produkte, für die meisten organischen Synthesen kein geeignetes Lösungsmittel.¹ Daher werden verstärkt Anstrengungen unternommen, um Enzyme auch in organischen Medien einsetzen zu können und auch hier hohe Aktivitäten zu erzielen (Kap. 1.2.1).

1.1.2 Coenzyme

Coenzyme, auch Cosubstrate genannt, sind eine Untergruppe der Cofaktoren¹². Es handelt sich um kleine (typischerweise $< 1000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$)²², nicht aus Aminosäuren bestehende, org. Moleküle, die während einer enzymatisch katalysierten Reaktion Protonen, Elektronen, funktionelle Gruppen oder auch Energie aufnehmen oder abgeben können,

wobei sie direkt an der Reaktion teilnehmen und verändert aus dieser hervorgehen¹⁶. Bei einigen Coenzymen handelt es sich um Derivate von Vitaminen^{23,24}. Sie können mehr oder weniger stark an das Enzym gebunden sein, wobei es sich nicht um eine kovalente Bindung handelt^{16,25}. Bei stark gebundenen Coenzymen erfolgt die Regeneration in der Regel im selben Reaktionsschritt, während diese bei weniger stark gebundenen Coenzymen im allgemeinen in einer nachfolgenden Reaktion erfolgt, welche auch von einem anderen Enzym durchgeführt werden kann²². Der aktive Komplex aus Enzym und Cofaktor wird Holoenzym genannt, während das Enzym ohne Cofaktor als Apoenzym bezeichnet wird¹². Es gibt eine Reihe von Coenzymen^{23,24}, wichtige sind das Nicotinamidadenin dinucleotid (NAD) bzw. Nicotinamidadenin dinucleotidphosphat (NADP) welche als Redoxäquivalente dienen und hierbei formal ein Hydridion (zwei Elektronen sowie ein Proton)²⁶ übertragen (Abb. 1.2). Die Abkürzung NAD bzw. NADP steht in dieser Arbeit allgemein sowohl für die oxidierte wie auch die reduzierte Form des jeweiligen Coenzym.

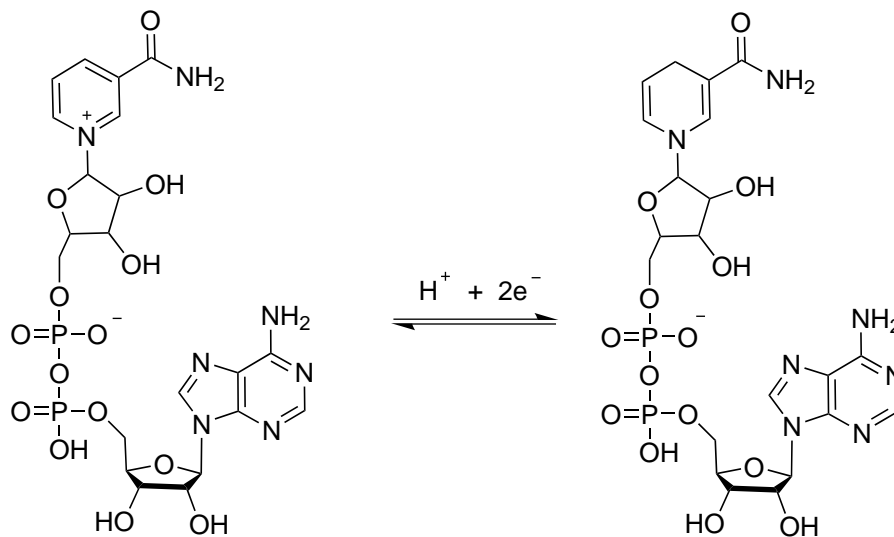


Abbildung 1.2: Reaktionsgleichung der Redoxreaktion von NAD.

NAD bzw. NADP wird von der Enzymklasse der Oxidoreduktasen verwendet, also von Enzymen, die Redoxreaktionen katalysieren. Solche Enzyme haben eine große Bedeutung für die Anwendung als Biokatalysator, z.B. die Monooxygenasen und Dehydrogenasen¹⁶. Mittels Dehydrogenasen lassen sich z.B. asymmetrische Alkohole aus prochiralen Ketonen^{1,27} oder, mittels Baeyer-Villiger Monooxygenasen enantioselektiv chirale Lactone synthetisieren²⁸. Hierbei müssen die Coenzyme entweder stoichiometrisch eingesetzt werden, was allerdings teuer ist oder sie müssen regeneriert werden. Eine solche Coenzymregeneration, welche auf verschieden Weise durchgeführt werden kann, ist mit zusätzlichem Aufwand verbunden.²⁷ Beim Einsatz solcher Enzyme in rein

org. Medien erfolgt die Coenzymregenerierung mit Hilfe eines zweiten Substrates²⁷, da NAD bzw. NADP in org. Medien unlöslich sind. Organolösliche NAD bzw. NADP Derivate (s. Kap. 1.2.4) würden hier die Möglichkeit eines breiteren Spektrums an Regenerierungsmöglichkeiten eröffnen, vor allem im Hinblick auf die Kopplung von zwei oder mehr enzymatischen Reaktionen, sogenannten Tandemreaktionen (s. Kap. 1.3.3).

1.2 Biokatalyse in unkonventionellen Medien

Aus historischen Gründen wird Wasser als konventionelles Reaktionsmedium bezeichnet, während alle davon abweichenden Medien als unkonventionelle Medien gelten. Ein stark reduzierter Wasseranteil ist die Gemeinsamkeit all dieser Medien²⁹. Unkonventionelle Medien lassen sich in vier Gruppen einteilen^{1,18}:

- organische Lösungsmittel (s. Kap. 1.2.1)
- überkritische Flüssigkeiten (z.B. Hammond *et al.*³⁰)
- ionische Flüssigkeiten (z.B. Magnuson *et al.*³¹)
- Gasphase (z.B. Maugard *et al.*³²)

Lange Zeit war die Ansicht vorherrschend, dass Enzyme nur in wässrigen Puffersystemen bzw. Wasser als ihrem natürlichen Medium aktiv sind¹⁸, obwohl bekannt ist, dass die natürliche Umgebung von Enzymen weniger wässrig ist, sondern vielmehr aus einer viskosen und komplexen Mischung von Proteinen, Zuckern, DNA, RNA, und vielen weiteren Komponenten besteht³³. Wässrige Medien sind daher möglicherweise für die Biokatalyse mittels isolierter Enzyme nicht immer das Optimum. Entgegen der damaligen Erwartungen zeigten Enzyme katalytische Aktivität auch in nicht wässrigen Umgebungen. In den letzten Jahrzehnten wurde die Aktivität von Enzymen in diesen verschiedenen Medien untersucht, wobei in der Literatur hauptsächlich Systeme mit organischen Lösungsmitteln beschrieben werden³⁴, welche auch bereits einige Anwendungen in der Industrie gefunden haben². Im Folgenden liegt der Fokus auf organischen Lösungsmitteln bezüglich ihrer Eigenschaften selbst bzw. Wechselwirkungen mit Enzymen. Für weitere Informationen bezüglich der übrigen unkonventionellen Medien sei auf die angegebene Literatur verwiesen.

1.2.1 Biokatalyse in organischen Lösungsmitteln

Dass organische Lösungsmittel als Medium für enzymatische Reaktionen geeignet sind, wurde bereits in den 1930er Jahren gezeigt³⁵, aber erst in den 1980er Jahren wieder-

entdeckt³⁶⁻³⁹. Es gibt viele Enzyme, die in reinen organischen Lösungsmitteln bzw. org. Lösungsmitteln mit minimalem Wasseranteil nicht nur aktiv sind, sondern auch weitere bzw. andere Aktivitäten zeigen. Die Verwendung von Enzymen als Biokatalysatoren in org. Medien hat einige Vorteile wie etwa die leichtere Rückführbarkeit des Katalysators sowie die Verhinderung von mikrobiellen Kontaminationen³⁴. Ein anderer wichtiger Aspekt ist die sehr gute Löslichkeit von hydrophoben org. Verbindungen in organischen Medien, was die Anzahl der möglichen einsetzbaren Substrate stark erhöht³⁴. Viele enzymkatalysierte Reaktionen können auf Grund der schlechten Löslichkeit der Substrate oder Produkte in wässrigen Lösungen gar nicht durchgeführt werden^{34,40}. Des Weiteren ist Wasser für die Darstellung vieler Produkte ein ungünstiges Reaktionsmedium, da unerwünschte Nebenreaktionen, vor allem beim Einsatz von Hydrolasen, unterdrückt oder sogar ganz verhindert werden³⁴. Außerdem können Substrat- und Produktracemisierungen oder andere Produktinstabilitäten auftreten⁴¹. Es ist Enzymen zudem möglich, in org. Lösungsmitteln Reaktionen zu katalysieren, die in wässrigen Medien unmöglich sind³⁴. Ein Beispiel ist die Umkehr der Esterhydrolyse bei Lipasen oder die Beschleunigung von Umesterungen³⁸. In einigen Fällen konnte auch eine Veränderung bzw. Beeinflussung der Regio-, Enantio-, und auch der Substratselektivität beobachtet werden, die auf die Wechselwirkungen des Enzyms mit dem sie umgebenden Medium zurückgeführt werden können^{34,42,43}. Mit Hilfe des sogenannten *medium engineering* lässt sich der Einfluss des Mediums auf z.B. die Selektivität eines Enzyms gezielt ausnutzen, was die Möglichkeit von neuen Syntheseprozessen eröffnet. Das *medium engineering*⁴⁴ ist somit eine Alternative zum *protein engineering*³⁴. Vor allem Lipasen sind besonders gut für den Einsatz in org. Medien geeignet, da sie auch natürlicherweise an einer Grenzfläche (Lipid-Wasser) arbeiten und hydrophobe Umgebungen bevorzugen^{45,46}. Deshalb wurden vor allem Lipasen im Hinblick auf den Einfluss von organischen Lösungsmitteln untersucht. Hierbei konnte in einigen Beispielen ein Einfluss auf die Stereoselektivität beobachtet werden⁴⁷.

Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von Enzymen in org. Lösungsmitteln ist, dass sie häufig in wasserfreien Lösungsmitteln eine deutlich erhöhte Stabilität, auch gegenüber thermischer Belastung, aufweisen. Beispielsweise ist in der Literatur beschrieben, dass die Thermostabilität von Enzymen wie Lysozym, Ribonuclease oder auch α -Chymotrypsin im wasserfreien Medium erheblich ansteigt. Dies liegt darin begründet, dass in wasserfreien Lösungsmitteln das Enzym in seiner strukturellen Beweglichkeit stark eingeschränkt ist und außerdem keine Reaktionen stattfinden, die für die irreversible Denaturierung in wässrigen Lösungen verantwortlich sind.^{34,37,42,47} Ein bedeutender Nachteil der Anwendung von Enzymen in org. Lösungsmitteln ist die niedrige Aktivität^{42,48}. Diese ergibt sich ebenfalls wie die erhöhte Stabilität aus der geringen

strukturellen Beweglichkeit der Enzyme. Für die katalytische Aktivität ist eine gewisse strukturelle Beweglichkeit der Enzyme notwendig, da bei der Ausbildung des Enzym-Substrat Komplexes geringe Konformationsänderungen nötig sind. Liegt der Biokatalysator in zu starrer Konformation vor, wie dies durch die Abwesenheit von Wasser auftreten kann, ist die katalytische Aktivität stark herabgesetzt.⁴² Der Wassergehalt kann auch einen Einfluss auf die Regioselektivität von Enzymen haben⁴⁹. Entscheidend ist der Anteil an frei verfügbarem (ungebundenem und locker gebundenem) Wasser und nicht der Gesamtwassergehalt. Die Menge an frei verfügbarem Wasser wird über die Wasseraktivität (a_w , *activity of water*) beschrieben³⁴, welcher als Quotient des Wasserdampfdrucks über dem Medium und dem Wasserdampfdruck über reinem Wasser bei einer bestimmten Temperatur definiert ist⁵⁰. Wichtig sind die an das Enzym gebundenen Wassermoleküle. Für die optimale enzymatische Aktivität und Stabilität muss die Wasseraktivität für jedes Lösungsmittel und Enzym deshalb eingestellt werden³⁴. Hierbei kann die notwendige Menge Wasser für die optimale Hydratisierung je nach Enzym stark schwanken. Beispielsweise benötigt α -Chymotrypsin zum Erhalt der katalytischen Aktivität pro Enzymmolekül nur etwa 50 Wassermoleküle⁵¹, während eine Polyphenoloxidase hingegen ungefähr 1000 Wassermoleküle pro Enzymmolekül benötigt⁵².

Auf Grund der Verteilung zwischen dem Wasser auf der Enzymoberfläche und dem Wasser im Rest des organischen Lösungsmittels, haben sich hydrophobe, nicht wassermischbare Lösungsmittel wie Toluol oder Oktan als die besseren Reaktionsmedien erwiesen als hydrophile, wassermischbare Lösungsmittel wie z.B. Aceton oder Tetrahydrofuran³⁹. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass solche hydrophilen, wassermischbaren Lösungsmittel unbegrenzt Wasser aufnehmen können und deshalb eine größere Tendenz haben, das Wasser von der Oberfläche der Enzyme zu entfernen⁵¹.

Es kann in vielen Fällen allerdings auch zur Denaturierung der Enzyme in organischen Medien kommen. Dies liegt darin begründet, dass die katalytisch aktive, dreidimensionale Struktur sich energetisch nur gering von der ungefalteten bzw. nicht mehr aktiven Struktur unterscheidet. Da die Standard-Gibbs-Entfaltungsenthalpie bei $20 - 60 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ ⁵³ liegt, kann eine Denaturierung leicht auftreten was zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führt. In einer Arbeit von LI *et al.* wurde die Konformationsänderung am Beispiel der Lipase B aus *Candida antarctica* untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass unpolare Lösungsmittel weitaus geringere Änderungen der Konformation verursachen als polare Lösungsmittel⁵⁴. In wässrig-organischen Lösungsmittelsystemen können, je nach Art und Menge des verwendeten wassermischbaren organischen Lösungsmittels, gravierende Veränderungen in der Enzymstruktur auftreten und so zu einer Denaturierung führen⁵⁵. In solchen Systemen besitzen Enzyme sowohl das Bestreben zur Konfor-

mationsänderung ebenso wie eine genügende strukturelle Beweglichkeit. Je höher der Anteil des organischen Lösungsmittels in einem solchen System ist, desto größer wird die Tendenz zur Denaturierung. Andererseits verringert sich mit steigendem Anteil des organischen Lösungsmittels die Konformationsflexibilität.⁵⁶

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Aktivität von Enzymen ist der pH-Wert bei dem sie eingesetzt werden. In wässrigen Medien lässt sich der pH-Wert des Reaktionsmediums mittels eines Puffersystems einfach auf den für das Enzym optimalen pH-Wert einstellen, was in organischen Lösungsmitteln natürlich so nicht möglich ist. Es lässt sich jedoch der Effekt ausnutzen, dass der pH-Wert des umgebenden Mediums den Protonierungszustand des Enzyms beeinflusst, um dieses auch in organischen Medien bei seinem optimalen pH-Wert einsetzen zu können und so eine möglichst hohe Aktivität zu erzielen. Dazu wird das Enzym in einem wässrigen Puffer mit optimalem pH-Wert gelöst und anschließend z.B. mittels Gefriertrocknung (Lyophilisation) isoliert. Hierbei bleibt der Protonierungszustand des Enzyms erhalten und ändert sich auch beim Einsatz im organischen Medium nicht, sofern dort keine sauren oder basischen Konditionen vorhanden sind. Dieser Effekt wird als „pH-memory“ Effekt bezeichnet.⁴⁸

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Einsatz von Enzymen in org. Medien trotz einiger Herausforderungen bezüglich der Handhabung viele Vorteile bietet, welche die Einsatzmöglichkeiten von Enzymen stark erweitern.

1.2.2 Einsatzmöglichkeiten in organischen Lösungsmitteln

Der Einsatz von Enzymen in org. Medien kann auf vielfältige Weise erfolgen. Hierdurch können einige der zuvor bereits diskutierten Schwierigkeiten, die sich beim Einsatz von Enzymen in solchen Lösungsmitteln ergeben können, teilweise ausgeglichen werden. Zunächst wird der Einsatz freier, d.h. nicht immobilisierter Enzyme beschrieben.

1.2.2.1 Einsatz freier Enzyme

Enzyme können in einphasigen org. Lösungsmitteln eingesetzt werden. Da sie in nahezu allen org. Lösungsmitteln unlöslich sind, werden sie in Pulverform eingesetzt. Diese Enzympulver werden gewöhnlich durch Lyophilisation hergestellt. Allgemein ist die Lyophilisation ein schonendes Trocknungsverfahren. Hierbei wird die enzymhaltige Lösung eingefroren und das Eis im Vakuum sublimiert. Nur die nicht flüchtigen Komponenten bleiben, gewöhnlich unverändert, zurück.⁴² Allerdings kann durch die Dehydrierung eine Veränderung in der Sekundärstruktur der Proteine auftreten. Daher ist in vielen Fällen nicht das organische Medium selbst für die Konformationsveränderungen verantwortlich, sondern der vorgelagerte Trocknungsprozess. Der Anteil an ungeordneten

Bereichen im Protein wird geringer, während die Proteinstruktur immer geordneter wird. Die strukturellen Veränderungen sind durch eine Rehydrierung reversibel.⁵⁷ Dieser nachteilige Effekt kann durch den Zusatz von sog. *Lyoprotectants*, wie beispielsweise Polyethylenglykol, Zuckern oder durch bestimmte anorganische Salze minimiert werden⁴². Ein weiterer Nachteil beim Einsatz von lyophilisierten, dispergierten Enzymen sind Stofftransportlimitierungen, die auch durch starkes Rühren oder Schütteln nicht verhindert werden können. Es können außerdem sterische Hinderungen des aktiven Zentrums durch die benachbarten Enzyme auftreten.⁴⁸

Alternativ lassen sich freie Enzyme auch in einem Zweiphasensystem einsetzen, bei dem ein kaum oder nur gering wassermischbares, organisches Lösungsmittel eingesetzt wird^{28,58,59}. In derartigen Systemen werden die Enzyme und die eventuell notwendigen hydrophilen Cofaktoren in der wässrigen Phase gelöst, während sich das hydrophobe Substrat bzw. Produkt hauptsächlich in der hydrophoben Phase befindet. Je nach Verteilungskoeffizient diffundiert ein Teil des Substrates in die wässrige Phase bzw. ein Teil des Produktes aus der wässrigen Phase in die organische Phase. Dadurch, dass das Substrat kontinuierlich umgesetzt wird, diffundiert es konstant in die wässrige Phase nach, die organische Phase dient als Reservoir. Limitierend für den Stoffaustausch ist die Phasengrenzfläche. Um diese zu vergrößern, ist kontinuierliches Rühren erforderlich so dass sich eine Emulsion ausbildet.²⁹ Vor allem Lipasen sind wegen ihrer Aktivierung durch die Phasengrenzfläche^{45,46} für solche Systeme besonders geeignet, darüber hinaus benötigen sie keine Cofaktoren. Biokatalysatoren, die im Wässrigen aktiv sind, besitzen generell auch Aktivität in Zweiphasensystemen⁵⁹. Ein Vorteil der Reaktionsführung im Zweiphasensystem ist es, hohe Substratkonzentrationen einsetzen zu können, sowie falls notwendig die Substrat- oder Produktkonzentration in der wässrigen Phase gering zu halten, falls der Biokatalysator darauf empfindlich reagiert. Des Weiteren können hydrophile Cofaktoren eingesetzt werden, während sich auch die Cofaktorregeneration parallel durchführen lässt. Außerdem lässt sich das Produkt oft leicht aus der organischen Phase gewinnen, während das Enzym im wässrigen Medium verbleibt.⁵⁸ Ein gravierender Nachteil solcher Zweiphasensysteme ist ein in den meisten Fällen auftretender negativer Effekt auf die Stabilität der Enzyme, welcher je nach Enzym und verwendetem org. Lösungsmittel unterschiedlich ausgeprägt ist. Der negative Einfluss wird hauptsächlich auf Interaktionen mit der hydrophoben Grenzfläche zwischen den beiden Phasen zurückgeführt⁶⁰. Von BALDASCINI und JANSSEN beispielsweise ist eine Hypothese zur Grenzflächeninaktivierung beschrieben worden⁶¹.

Eine Weiterentwicklung ist die Verwendung sogenannter Mini- oder Mikroemulsionen. Dabei wird ein Tensid eingesetzt um eine, aus makroskopischer Sicht, homogene Mischung der wässrigen und der organischen Phase zu erreichen. Die organische Phase

ist hierbei in Form sehr kleiner Tröpfchen (50 - 500 nm) dispergiert und bildet eine stabile Emulsion. Der Einsatz solcher Miniemulsionen führt zu höheren Reaktionsraten im Vergleich zu den zuvor beschriebenen klassischen Emulsionen.⁶² Da in solchen Systemen keine Phasentrennung erfolgen kann, ist die Produktabtrennung sowie die Enzymrückgewinnung schwierig. Zudem kann das eingesetzte Tensid einen negativen Einfluss auf die verwendeten Enzyme ausüben⁶³.

Enzyme können auch in Mischungen aus Wasser und wassermischbaren, org. Lösungsmitteln eingesetzt werden. Hierbei können erhöhte Substrat- oder Produktlöslichkeiten erreicht werden und es wurden sogar positive Einflüsse auf die Stabilität und Aktivität sowie die Selektivität von Enzymen beobachtet. Es kommt zu einer Reduzierung der Wasseraktivität, was zuerst positive, aber bei höheren Anteilen des org. Mediums, negative Auswirkungen auf die Aktivität hat.⁶⁴ Auch treten bei höheren Konzentrationen Denaturierungseffekte auf, welche je nach Enzym und Lösungsmittel stark variieren.⁵⁵ Weitere Nachteile sind, dass sich hydrophobe Substrate nur begrenzt verwenden lassen sowie die teilweise aufwendige Produktaufarbeitung⁶⁵.

Eine weitere Möglichkeit freie Enzyme in org. Medien einzusetzen ist, sie mit Hilfe des Tensids Aerosol OT zu lösen. Hierbei wird das Enzym aus einer wässrigen in die org. Phase, welche das Tensid enthält, extrahiert. Es bildet sich ein Enzym-Tensid Komplex, bei dem das Enzym seine native Struktur behält. Mit Hilfe dieser Strategie kann α -Chymotrypsin in trockenen (ca. 300 ppm), hydrophilen (Tetrahydrofuran), wie auch hydrophoben Lösungsmitteln (Toluol, Isooktan) gelöst werden. In Isooktan beträgt die Löslichkeit $1,12 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, in THF sogar bis zu $10 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$. Das gelöste α -Chymotrypsin zeigt eine mindestens um drei Größenordnungen erhöhte Aktivität im Vergleich zum dispergierten Enzympulver. Die stark erhöhte Aktivität lässt sich neben der stark verringerten Diffusionslimitierung gegenüber dem dispergierten Enzympulver wahrscheinlich auch auf einen stabilisierenden Effekt des Tensids zurückführen.⁶⁶

1.2.2.2 Einsatz immobilisierter Enzyme

Häufig werden Enzyme in org. Medien in immobilisierter Form eingesetzt, wobei es mehrere Vorgehensweisen gibt⁶⁷. Unterscheiden lassen sich die chemische Immobilisierung (Aufbringung auf Träger, Quervernetzung) und die physikalische Immobilisierung (Adsorption, Einschluss in Membranen, Netzwerken und Partikeln). Ein Vorteil der Immobilisierung ist die leichte Abtrennbarkeit des Biokatalysators, was die Wiederverwendung erleichtert und die Aufarbeitung vereinfacht.^{67,68}

Enzyme können auf anorganische Materialien (Glas, Keramik), Polysacchariden (Agarose, Cellulose) sowie auf Kunststoffen aufgebracht werden, wobei hier Geometrien mit

großer Oberfläche (wie z.B. Kugeln) verwendet werden⁹. Oft werden poröse Trägermaterialien verwendet⁶⁷. Eine Adsorption auf der Oberfläche des Trägers ist bereits ausreichend. Da Enzyme in org. Medien unlöslich sind können sie dort nicht wieder desorbieren¹⁶, allerdings ist in Systemen, die gerührt werden ein Abreiben möglich. Außerdem gibt es interne Diffusionslimitierungen und das aktive Zentrum kann je nach Lage auf der Oberfläche blockiert sein²³. Eine andere Möglichkeit ist das kovalente Anbinden von Enzymen auf Trägermaterialien. Hierbei wird die Stabilität zwar erhöht, allerdings kann es auch hier dazu kommen, dass das aktive Zentrum durch die Lage des Enzyms auf der Oberfläche sterisch blockiert wird. Durch die kovalente Immobilisierung selbst kann es zu Störungen der nativen Struktur und damit zu Aktivitätsverlust kommen.¹

Eine weitere Möglichkeit ist die Quervernetzung von Enzymaggregaten zu sogenannten CLEAs (*Cross linked enzyme aggregates*) mittels versch. vor allem bifunktionaler Reagenzien. Hierbei entstehen robuste Enzymaggregate⁶⁷, die Stabilität der Enzyme wird erhöht allerdings kann es mit steigender Größe der Aggregate zu einer Diffusionslimitierung kommen⁶⁹. Die Herstellung ist einfach aber die Kontrolle über die Größe der entstehenden Aggregate ist schwierig.⁶⁸

Enzyme können auch durch Einschluss in verschiedene Materialien (Polyurethan, Silicat) oder Polymernetzwerke immobilisiert werden^{68,70,71}. Hierbei können verschiedene Geometrien hergestellt werden (Membranen, Kügelchen, Partikel). Für die Immobilisierung besonders geeignet sind die sogenannten amphiphilen Polymerconetzwerke (APCN)⁷²⁻⁷⁸. Diese bestehen aus einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase welche kovalent miteinander verknüpft sind und nanophasensepariert vorliegen. Daher können APCNs sowohl in Wasser wie auch in org. Medien quellen. Die Enzyme können hierbei entweder vor oder nach der Polymerisation in das Netzwerk eingebracht werden. Wird das Conetzwerk nachträglich mit Enzym beladen, so ist dies nur mit relativ kleinen Enzymen möglich und die Beladung ist limitiert⁷². Trotzdem konnten mit Hilfe solcher Netzwerke bereits sehr hohe Aktivierungen von versch. Enzymen in unterschiedlichen nicht wässrigen Medien erreicht werden⁷²⁻⁷⁸. Ein generelles Problem beim Einschluss von Enzymen ist die je nach verwendetem Material und Größe des resultierenden Immobilisats mehr oder weniger stark eingeschränkte Diffusion des Substrates bzw. Produktes⁷¹. Solche Diffusionslimitierungen können durch Verkleinerung des Immobilisats verringert, aber nicht vollständig überwunden werden⁷⁴.

1.2.3 Polymer-Enzymkonjugate

Eine Alternative zu den oben vorgestellten Einsatzmöglichkeiten von Enzymen in organischen Medien stellt die chemische Enzymmodifizierung mit Polymeren dar (Abb. 1.3).

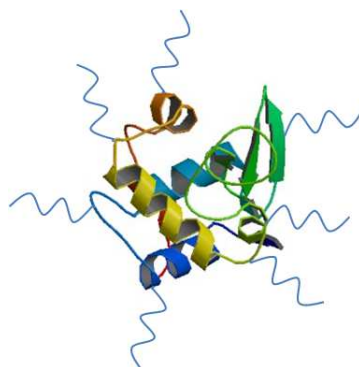


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines Polymer-Enzymkonjugates mit Lysozym als Beispiel (Lysozymstruktur von SUKUMAR *et al.*⁷⁹).

Der große Vorteil hierbei ist, dass die Enzyme durch eine solche Modifikation im organischen Lösungsmittel löslich werden und im Idealfall molekular dispers verteilt vorliegen. Dies führt zu höheren Aktivitäten im Vergleich zum Einsatz von lyophilisiertem Enzympulver, da es keine Diffusionslimitierungen für das Substrat gibt. Des Weiteren kommt es nicht zu sterischen Hinderungen des aktiven Zentrums durch benachbarte Enzymmoleküle⁴⁸. Darüber hinaus werden die Enzyme durch die Modifizierung auch vor dem organischen Lösungsmittel geschützt und das Entfernen des essentiellen Wassers auf der Oberfläche der Enzyme wird gehemmt⁸⁰. Die resultierenden Polymer-Proteinkonjugate sind ebenfalls stabiler gegen Denaturierung durch z.B. hohe Temperaturen⁸¹. Als Bindungsstellen im Enzym kommen verschiedene Aminosäurereste wie etwa Lysin, Cystein, Histidin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin, Serin, Threonin und Tyrosin in Frage, genauso wie der N- und C-Terminus⁸².

Das Hauptanwendungsgebiet von Polymer-Enzym-Konjugaten (PEK) bzw. vor allem Polymer-Proteinkonjugaten ist allerdings nicht ihre Anwendung in der Biokatalyse, sondern der Einsatz als therapeutisch wirksame Proteine in der Medizin^{83,84}.

1.2.3.1 Polyethylenglykol-Enzymkonjugate

Das erste Polymer, das im großen Stil für die Enzym- und Proteinmodifikation in verschiedenen Anwendungsgebieten verwendet wurde und auch heute noch eingesetzt wird, ist Polyethylenglykol (PEG)^{82,85-87}. PEG ist ein hygroskopisches, je nach Kettenlänge flüssiges oder festes, synthetisches Polymer (Abb. 1.4). Es ist sowohl sehr gut in Wasser als auch in einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln⁸⁸ wie etwa

Methanol oder auch Benzol löslich. Es wird üblicherweise durch Polymerisation von Ethylenoxid hergestellt⁸² und ist kommerziell über einen weiten Molekulargewichtsbe-
reich erhältlich⁸³. Außerdem ist PEG mit höherem Molekulargewicht nicht toxisch⁸⁹.

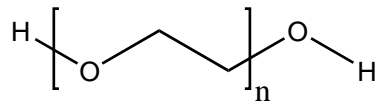


Abbildung 1.4: Strukturformel von PEG.

Die kovalente Bindung von PEG an ein anderes Molekül wird PEGylierung genannt⁸⁹. Seit der Entwicklung der Methode in den 1970er Jahren wurde eine Vielzahl von Molekülen auf verschiedene Weise PEGyliert⁸³. Hierbei stand vor allem die Synthese therapeutisch wirksamer PEG-Proteinkonjugate im Vordergrund⁸⁴, welche seit Anfang der 1990er Jahre auch kommerziell in mehreren Arzneimitteln Anwendung gefunden hat^{90,91}. Die ersten PEG-Proteinkonjugate (Albumin, Katalase) wurden 1977 von ABUCHOWSKI *et al.* synthetisiert^{92,93}. Die PEGylierung erfüllt hierbei mehrere Aufgaben. Die konjugierten Proteine besitzen z.B. eine längere Verweilzeit im Körper durch verzögerte Ausscheidung, sie sind zudem stabiler gegen den Abbau durch Proteasen, da PEG proteinabweisende Eigenschaften besitzt. Sie weisen auf Grund der Maskierung durch das PEG eine geringere immunogene Aktivität und Antigenität (*Stealth*-Effekt) auf.⁹⁰

Neben der medizinischen Anwendung werden PEG-Proteinkonjugate auch für die Biokatalyse verwendet. Bei den hierbei verwendeten PEG-Enzymkonjugaten kann die Polymermodifikation zu einer Löslichkeit der Enzyme im org. Medium führen. Darüber hinaus führt die Konjugation auch zu einer erhöhten Stabilität der Enzyme beispielsweise gegen Denaturierung durch z.B. hohe Temperaturen⁸¹. In der Literatur finden sich einige Beispiele, in denen unterschiedliche Enzyme mit PEG konjugiert wurden⁹⁴⁻⁹⁹, und in verschiedenen Fällen konnte dadurch eine Organolöslichkeit erreicht werden⁹⁵⁻⁹⁹. Die Konjugation fand hierbei häufig über die ϵ -Aminogruppe des Lysins statt^{88,95,98}. Verwendet wurden beispielsweise versch. Lipasen^{95,96}, Katalase⁹⁵, Peroxidase^{95,98} und versch. Proteasen wie Papain¹⁰⁰ oder α -Chymotrypsin⁹⁵. Die so mit PEG konjugierten Enzyme sind in verschiedenen org. Lösungsmitteln löslich. Im folgenden sind einige Beispiele für solche Konjugate aufgeführt. Das PEG- α -Chymotrypsinkonjugat ist löslich in z.B. Benzol⁹⁵, Dimethylformamid⁹⁷, Toluol sowie versch. chlorierten Lösungsmitteln⁹⁵, das PEG-Katalasekonjugat beispielsweise in Benzol, Toluol, Chloroform und weiteren chlorierten Lösungsmitteln mit bis zu $2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ ⁹⁵ und das PEG-Lipasekonjugat (aus *Candida rugosa*) löst sich z.B. in Benzol, Toluol, Chloroform sowie Trichlorethan, wobei die Löslichkeit der im Wässrigen entspricht⁹⁶. Hierbei zeigte sich,

dass die Löslichkeit sowohl vom Molekulargewicht des verwendeten PEG abhängt, als auch von der Anzahl der angehängten Polymerketten^{95,96}.

Im wässrigen Medium sinkt die Aktivität der resultierenden Konjugate im Vergleich mit den nativen Enzymen durch die Modifizierung mit PEG in der Regel ab^{97,98}. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Abhängigkeit zwischen der Aktivität und der Anzahl bzw. dem Molekulargewicht des verwendeten PEG besteht. Je mehr Polymerketten an das Enzym gebunden werden desto geringer wird die Aktivität. In organischen Medien allerdings sind die Aktivitäten der Konjugate höher als die der nativen Enzyme.⁹⁷ Beispielsweise steigt die Aktivität einer mit PEG (5000 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$) modifizierten Lipase aus *Candida rugosa* in Trichlorethan um den Faktor 4,5⁹⁶. In einigen anderen Untersuchungen wurde zwar die Aktivität von weiteren PEG-Enzymkonjugaten in versch. org. Lösungsmitteln bestimmt, allerdings sind hier keine Aktivitäten der nativen Enzyme in den jeweiligen Lösungsmitteln angegeben, daher ist keine Einschätzung der durch die Modifikation erzielten Aktivierung möglich^{80,99,100}.

Auch wenn die PEG-Enzymkonjugate in einigen org. Medien gute Löslichkeiten aufweisen, sind die in der Literatur angegebenen Aktivierungen doch eher gering. Der Einsatz von PEG hat jedoch noch einige weitere Nachteile. Beispielsweise ist PEG mit niedrigem Molekulargewicht toxisch⁸⁹. Zudem ist PEG nur schwierig zu modifizieren und die Struktur von PEG lässt sich nicht einfach verändern, um die Eigenschaften des resultierenden Konjugates einzustellen bzw. anzupassen. Des Weiteren wurden in aktuellen Untersuchungen von Menschen die mit PEG-Proteinkonjugaten behandelt wurden spezifische Antikörper gegen PEG gefunden^{101,102}.

1.2.3.2 Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugate

Eine Alternative zu PEG kann die Polymerklasse der Poly(2-Oxazoline) (POX) bieten. Poly(2-R-Oxazoline) werden mittels lebender kationischer Ringöffnungspolymerisation von 2-R-2-Oxazolinen, fünfgliedrigen, heterocyclischen Iminoethern, hergestellt¹⁰³ (Abb. 1.5). Auf die Synthese der POX wird in Kapitel 4.1 genauer eingegangen.

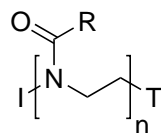


Abbildung 1.5: Strukturformel eines Poly(2-R-Oxazolins); I = Initiator, T = Terminierungsmittel.

Durch den lebenden Charakter lassen sich definierte Polymere mit enger Molmassenverteilung synthetisieren. Auf Grund des lebenden Charakters und der Variabilität der

Seitenkette, lassen sich durch die große Anzahl möglicher verschiedener Substituenten unterschiedlichste Polymerarchitekturen, wie beispielsweise amphiphile Blockcopolymere, aufbauen.¹⁰⁴ Durch die Verwendung der mikrowellengestützten Synthese lassen sich in kurzer Zeit Polymere verschiedener Molmasse synthetisieren^{105,106}. Die Hydrophobizität der Polymere lässt sich über die Art der verwendeten Monomere einstellen¹⁰⁴. Sie sind, in Abhängigkeit von den eingesetzten Monomeren, sowohl in Wasser als auch in versch. org. Lösungsmitteln löslich und zudem nicht toxisch¹⁰⁷. Mittels des Initiierungs- oder des Terminierungsschrittes lassen sich die Polymere darüber hinaus mit versch. funktionellen Gruppen ausstatten^{104,108–111}. Poly(2-Methyloxazolin) sowie Poly(2-Ethyloxazolin) zeigen ähnliche Eigenschaften wie PEG, was die proteinabweisenden Eigenschaften, den *Stealth*-Effekt, sowie die Biokompatibilität betrifft¹⁰⁴.

Von MIYAMOTO *et al.* wurde 1990 der erste Bericht über ein POX-Proteinkonjugat publiziert, hierbei wurde eine Katalase mit Poly(2-Methyloxazolin) und Poly(2-Ethyloxazolin) modifiziert⁸⁷. Seitdem wurden einige Artikel über die Modifikation von unterschiedlichen Enzymen bzw. Proteinen mit versch. POX veröffentlicht^{87,107,112–119}, wobei in den neuesten Publikationen die Konjugate vor allem für die Anwendung als Therapeutikum untersucht wurden^{112–115}. Für die Anwendung als Biokatalysator in org. Medien wurden bisher neben einer Katalase, eine Lipase (aus *Candida rugosa*) mit versch. POX konjugiert und beispielsweise der Effekt des verwendeten Polymers auf die Aktivität untersucht^{87,116–119}. Außerdem wurde eine Meerrettichperoxidase und eine Lipase in Aggregate aus amphiphilen POX Blockcopolymeren eingeschlossen, wobei die Polymere nicht kovalent an die Enzyme gebunden wurden^{120,121}. Allerdings wurde nur an einer Stelle die Löslichkeit der resultierenden Konjugate in organischen Lösungsmitteln wie Benzol und Chloroform explizit angegeben. Die höchste Löslichkeit des hier verwendeten Poly(2-Ethyloxazolin)-Katalasekonjugates ($M_{n, \text{PEtOx}} = 6500 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$) konnte in Chloroform mit $0,077 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ erreicht werden, bei der Konjugation mit Poly(2-Methyloxazolin) betrug die Löslichkeit in Chloroform nur noch $0,0079 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$. Trotz der sehr geringen Löslichkeit waren die Konjugate in Benzol (max. Löslichkeit $0,023 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) maximal etwa 20 mal aktiver als die zum Vergleich hergestellten PEG-Katalasekonjugate.⁸⁷ Im Falle der Lipase aus *Candida rugosa* konnte durch die Modifikation mit Poly(2-Isopropyloxazolin) in Toluol sogar eine Aktivierung von maximal ca. 160 erreicht werden, obwohl das Konjugat hier nur fein dispergiert, aber nicht gelöst war¹¹⁸.

Dies verdeutlicht das große Potential solcher POX-Enzymkonjugate für den Einsatz in der Biokatalyse, welche in dieser Arbeit intensiver untersucht werden sollen.

1.2.4 Polymer-Coenzymkonjugate

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, kann bei der Anwendung in rein org. Medien ein organolösliches Coenzymderivat das Anwendungsspektrum von Enzymen, die solche Coenzyme benötigen, stark vergrößern. Ein organolösliches Coenzymderivat lässt sich möglicherweise durch Modifikation mit Polymeren erreichen. Für die in diesem Zusammenhang vor allem interessanten Redoxäquivalente NAD, NADP bzw. FAD sind in der Literatur bereits Modifikationen mit verschiedenen Polymeren bekannt. Es wurden beispielsweise Dextran¹²², Polyethylenimin^{123,124}, Casein¹²⁵, Polylysin¹²⁴ sowie PEG mit verschiedenen Molekulargewichten (3000 - 20000 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$)^{122,126} verwendet. Für die Kopplung wurden hierbei verschiedene Synthesewege verwendet, wobei das Polymer in nahezu allen Fällen an der primären Aminogruppe des Adenins gebunden wird, da dieser Teil des Coenzym, wie aus röntgenkristallographischen Untersuchungen bekannt ist, fast immer nach außen zeigt. Diese Modifikationen hatten allerdings nicht das Ziel die Coenzyme organolöslich zu machen, sondern nur das Molekulargewicht zu erhöhen um die Coenzyme mittels Ultrafiltration in einem Reaktor zurückhalten zu können. Es wurden je nach verwendetem Enzym und verwendetem Polymer sehr unterschiedliche Enzymaktivitäten erhalten, wobei die PEG-Coenzymkonjugate die besten Ergebnisse zeigten. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) variierte je nach verwendetem Enzym und Polymer. Im Vergleich mit unmodifiziertem Coenzym lag sie zwischen 3 und 95 %, in einem Fall konnte allerdings eine deutliche Steigerung beobachtet werden. In der Regel führte die Modifikation aber zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit.¹²⁷

Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine Modifikation mittels POX gleich derer der Enzyme auch hier zu einer Organolöslichkeit führt, ohne das die Coenzyme ihre Aktivität vollständig verlieren.

1.3 Enzyme in der asymmetrischen Katalyse

Für die Produktion von pharmazeutischen Wirkstoffen, Aroma- und Duftstoffen sowie anderen Produkten ist die Synthese von enantiomerenreinen Stoffen von entscheidender Bedeutung und daher Gegenstand aktueller Forschung¹²⁸. Enantiomerenreine Chemikalien lassen sich dabei auf verschiedene Weise darstellen, wie etwa durch Enantiomerentrennung, Synthese aus chiralen Vorstufen oder durch enantioselektive Reaktionen¹²⁹. Unter Betrachtung der Atomökonomie, ist allerdings die Verwendung von enantioselektiven Katalysatoren der effizienteste Weg im Vergleich zu enantioselektiven stöchiometrischen Reaktionen, da sich so aus einer kleinen Menge asymmetrischer

Information große Mengen chiraler Produkte synthetisieren lassen¹³⁰.

Enzymatische Systeme, wie auch heterogene oder homogene Metallkatalysatoren lassen sich für die Synthese von chiralen Wirkstoffen einsetzen¹²⁹. Homogene, metallkatalysierte, enantioselektive Reaktionen spielen eine wichtige Rolle in der modernen Chemie¹²⁹ und werden in der Regel mit einem Übergangsmetallkatalysator basierend auf z.B. Palladium, Ruthenium oder Osmium durchgeführt, die an einen oder mehrere chirale Liganden gebunden werden^{131,132}. Solche Übergangsmetallkomplexe katalysieren eine Reihe von anspruchsvollen chemischen Reaktionen wie etwa Kreuzkupplung¹³³, Metathese¹³³, Epoxidierung¹³⁴, oder auch Dihydroxylierung¹³⁵ und besitzen ein großes Eduktspektrum, wobei die umgesetzten Edukte meist unpolar sind¹²⁹. Durch eine geeignete Wahl der Liganden lässt sich die Selektivität des Metallzentrums steuern um idealerweise nur ein Enantiomer zu erhalten¹³⁵.

1.3.1 Künstliche Metalloenzyme

Wie bereits in Kap. 1.1 dargestellt, besitzt der Einsatz von Enzymen viele Vorteile, es gibt aber auch Einschränkungen. So besitzen sie in der Regel ein eingeschränktes Substratspektrum, katalysieren nur eine begrenzte Anzahl von Reaktionen und die umgesetzten Substrate sind meist polar¹²⁹.

Aus der Vereinigung von enzymatischer und Metallkatalyse resultieren die sogenannten künstlichen Metalloenzyme (*artificial metalloenzymes*). Dabei handelt es sich um Hybridkatalysatoren, die aus einem Metallkomplex und einem Protein oder Enzym bestehen, in den dieser Metallkomplex eingelagert ist¹²⁹. Hierbei katalysiert der Metallkomplex die gewünschte Reaktion, während die Proteinumgebung für die Selektivität verantwortlich ist. Enzyme besitzen, zusätzlich zu ihrer katalytischen Aktivität, eine definierte chirale Umgebung, welche die Selektivität für die metallkatalysierte Reaktion induziert. Auf diese Weise können künstliche Metalloenzyme stereoselektive Reaktionen unabhängig von ihrer ursprünglichen enzymatischen Aktivität katalysieren^{129,136}. Eine Art solcher künstlicher Metalloenzyme ist von natürlichen Metalloenzymen abgeleitet, wobei das im aktiven Zentrum gebundene Metallion durch ein nicht natürliches ersetzt wird. Eine solche Modifikation führt zu neuen, nicht natürlichen, katalytischen Eigenschaften.^{137,138} Die zweite Variante von künstlichen Metalloenzymen werden aus Proteinen oder Enzymen generiert, die natürlicherweise kein Metallion besitzen. Diese werden synthetisiert indem ein unselektiver, aber katalytisch aktiver Metallkomplex in ein Protein oder Enzym eingelagert wird. Hierbei können verschiedene Strategien genutzt werden um das Metallion im Protein zu verankern (Kap. 1.3.1.1). Künstliche

Metalloenzyme unterscheiden sich in drei wichtigen Punkten voneinander: dem verwendeten Metallkomplex, der Bindungsstrategie sowie dem verwendeten Protein¹³⁶.

1.3.1.1 Bindungsstrategie

Es gibt drei unterschiedliche Strategien, einen Metallkomplex in ein Biomolekül fest einzubinden. Man unterscheidet die koordinative (*dative anchoring*), die supramolekulare (*supramolecular anchoring*) und die kovalente Verankerungsstrategie (*covalent anchoring*)^{129,136}.

Die supramolekulare Verankerungsstrategie basiert auf der hohen Affinität unterschiedlicher Moleküle zu versch. Proteinen. Der Vorteil hierbei ist, dass kein chemischer Kopplungsschritt zwischen dem Metallkomplex und dem Protein notwendig ist. Eine interessante Möglichkeit um ein nativ passendes Protein für den Metallkatalysator zu erzeugen ist es, Antikörper gegen den Katalysator herzustellen^{129,136}. Einige Proteine, wie etwa Serumalbumine, vor allem aus dem Rind, besitzen die bemerkenswerte Eigenschaft hydrophobe Moleküle, wie etwa Fettsäuren oder Porphyrine, stark zu binden. Dieser Ansatz für die Einlagerung von Metallkomplexen wurde bereits für einige enantioselektive Reaktionen eingesetzt. Eine weitere oft verwendete Methode ist der Einsatz der Biotin-(Strept-)Avidin Technologie. Hierbei wird die hohe Affinität zwischen Biotin und (Strept-)Avidin (z.B. Biotin-Avidin $K_a = 10^{15} \frac{1}{M}$) ausgenutzt. Der Metallkatalysator wird hierbei über einen Spacer an das Biotin gebunden (Abb. 1.6).¹³⁶

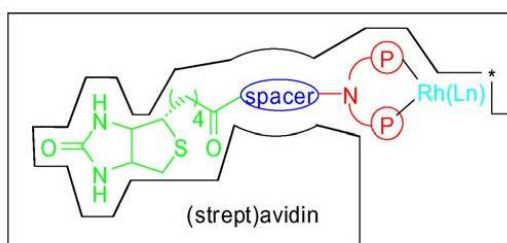


Abbildung 1.6: Biotin-(Strept-)Avidin Technologie: künstliches Metalloenzym für die enantioselektive Katalyse basierend auf der Verankerung des Metallkatalysators in einem Wirtspoltein über einen Liganden, einen Spacer sowie das Biotin¹³⁶.

Die koordinative Verankerungsstrategie beruht auf Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren der Proteine und dem Metallion bzw. dem Metall-Ligand Komplex. YAMAMURA und KAISER waren die ersten, die das aktive Zentrum eines Enzyms mittels der koordinativen Verankerungsstrategie modifizierten um ein künstliches Metalloenzym mit neuen katalytischen Eigenschaften herzustellen. Hierbei wurde das Zinkion

in der Carboxypeptidase A gegen ein Kupferion ausgetauscht¹³⁷. Inzwischen wurden verschiedene künstliche Metalloenzyme durch den Einsatz dieser Ankerstrategie synthetisiert¹³⁶.

Bei der kovalenten Verankerungsstrategie werden Aminosäuren des Proteins gezielt modifiziert, um neue katalytische Eigenschaften zu generieren. Beispielsweise konnten LEVINE *et al.* eine Protease durch kovalente Modifikation eines Cysteinrestes mit einem modifizierten Coenzymalogon in eine sehr effektive Oxidoreduktase überführen¹³⁹. Auch diese Ankerstrategie wird vielfach für versch. Proteine eingesetzt¹³⁶.

1.3.2 Anwendungen von künstlichen Metalloenzymen

Bereits literaturbekannt ist der Einsatz von künstlichen Metalloenzymen für diverse Arten von Reaktionen, wie z.B. für Sulfoxidierungen¹⁴⁰, Peroxidierungen¹³⁶, Epoxidierungen¹⁴¹, Hydrierungen¹²⁹, Dihydroxylierungen¹⁴², Alkoholoxidationen¹³⁶, sowie Hydroformylierungen¹³⁶. Hierbei konnten, je nach verwendeter Reaktion, Metallkomplex und Protein unterschiedliche Ausbeuten und Selektivitäten erzielt werden, wobei sowohl für die Selektivität als auch für die Ausbeute Werte von über 99 % erreicht werden konnten¹³⁶. Fast alle diese Reaktionen wurden in wässrigen Systemen durchgeführt¹²⁹, nur in einigen wenigen Fällen wurden zweiphasige Reaktionsmedien verwendet^{143–145}. Dies schränkt die Bandbreite verwendbarer Substrate ein. Um die Vorteile von reinen organischen Lösungsmittelsystemen ausnutzen zu können ist es wünschenswert, solche künstlichen Metalloenzyme auch dort einsetzen zu können. Daher befasst sich ein Teil dieser Arbeit mit der Synthese künstlicher Metalloenzyme, welche sich in organischen Medien einsetzen lassen.

1.3.3 Tandemkatalyse

Nach FOGG und DOS SANTOS ist Tandemkatalyse definiert als eine gekoppelte Katalyse mit einer aufeinanderfolgenden Umwandlung des Substrates über zwei (oder mehr) mechanistisch verschiedene Prozesse, bei der alle katalytisch aktiven Spezies von Anfang an, entweder maskiert oder sichtbar, im Reaktionsansatz vorhanden sind. Es lassen sich drei verschiedene Arten unterscheiden, die orthogonale Tandemkatalyse (*orthogonal tandem catalysis*), die Auto-Tandemkatalyse (*auto-tandem catalysis*) sowie die unterstützte Tandemkatalyse (*assisted tandem catalysis*) (Abb. 1.7). Bei der unterstützten Tandemkatalyse führt eine Änderung der Reaktionsbedingungen zu einer Umschaltung von einem Katalysatormechanismus zu einem anderen, wobei die Umwandlung nicht simultan verläuft (Abb. 1.7 b). Bei der Auto-Tandemkatalyse hingegen

laufen zwei oder mehr mechanistisch voneinander unabhängige Reaktionen an einem Katalysator ab. Beide katalytische Zyklen laufen spontan ab, ohne dass eine Veränderung der Reaktionsbedingungen als Trigger erforderlich ist (Abb. 1.7 c). Im Falle der orthogonalen Tandemkatalyse arbeiten zwei oder mehr sich im Prinzip gegenseitig nicht störende, funktionell unabhängige Katalysatoren. Häufig arbeiten die Katalysatoren gleichzeitig, obwohl die Eduktumwandlung sequenziell erfolgt (Abb. 1.7 a).¹⁴⁶

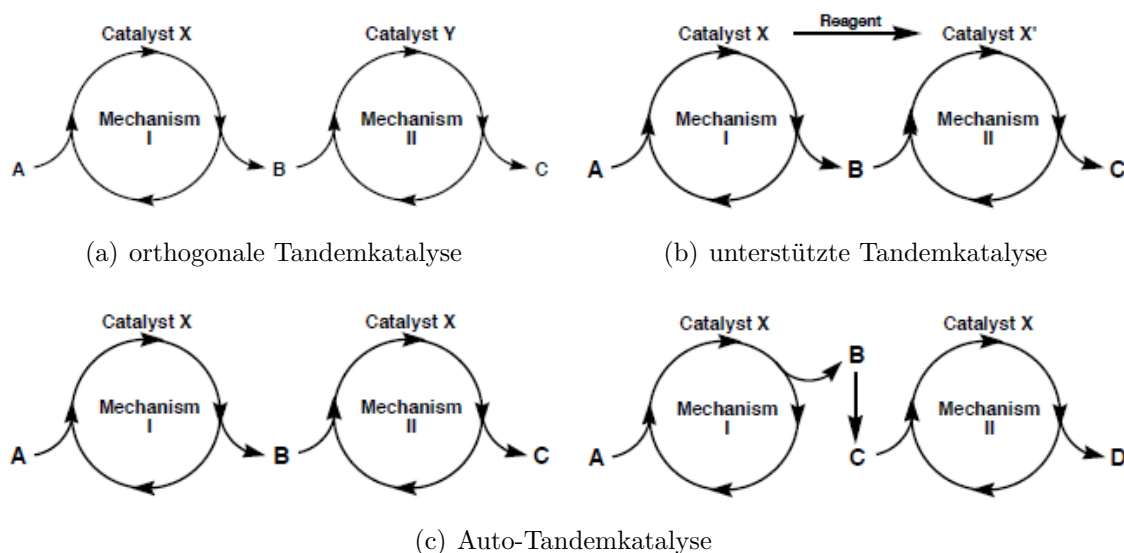


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Arten der Tandemkatalyse¹⁴⁶.

Tandemreaktionen haben allgemein den Vorteil, dass die Aufarbeitung von Zwischenprodukten entfällt, was die Synthese vereinfacht, und damit zu einer Zeit- bzw. Kostenersparnis führen kann. Falls Zwischenprodukte nur schwierig zu isolieren oder aufzuarbeiten sind, erhöht sich auch die Ausbeute des Prozesses. Im Falle der Auto- bzw. unterstützten Tandemkatalyse ergibt sich auch eine höhere Katalysatoreffizienz bzw. bei der orthogonalen und Auto-Tandemkatalyse eine höhere Prozesseffizienz. Nachteile können die schwierige Katalysatorrückgewinnung sein, sowie die Schwierigkeit Reaktionsbedingungen zu finden, die für beide Katalysatoren geeignet sind. Bei der orthogonalen Tandemkatalyse besteht außerdem eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass der eine Katalysator einen nachteiligen Effekt auf den anderen Katalysator hat bzw. unerwünschte Nebenprodukte entstehen.¹⁴⁶

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von organolöslichen Polymer-Enzym- und Polymer-Coenzymkonjugaten unter Erhaltung der biologischen Aktivität. Die Konjugate sollen durch Modifikation verschiedener Enzyme mit Poly(2-R-Oxazolin), welche über die freien Aminogruppen mit dem Enzym verknüpft sind, gebildet werden. Durch die Modifikation der Enzyme bzw. Coenzyme mittels einseitig gestarteter Poly(2-R-Oxazolin) Homo- und Diblockcopolymere variabler Kettenlänge und Seitengruppe R soll die Organolöslichkeit erreicht werden. Als Seitengruppe R sollen sowohl die hydrophile Methyl- und Ethylgruppe wie auch die hydrophobe Butyl-, Heptyl- sowie Phenylgruppe eingesetzt werden. Die Poly(2-R-Oxazolin) sollen mittels mikrowellengestützter lebender kationischer Ringöffnungspolymerisation hergestellt werden. Entweder mittels Terminierung oder mittels Terminierung und anschließender polymeranaloger Umsetzung sollen die resultierenden Poly(2-R-Oxazolin) im Anschluss mit den Enzymen bzw. Coenzymen kovalent verknüpft werden.

Die Charakterisierung der Polymere soll über $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie, GPC/SEC, DLS und ESI-MS erfolgen, für die Konjugate soll zusätzlich die SDS-PAGE, IEF sowie die UV/Vis Spektroskopie eingesetzt werden. Nach der Etablierung eines geeigneten Modifizierungsystems soll im Anschluss der Einfluss der Modifikation auf die enzymatische Aktivität der resultierenden Konjugate untersucht werden. Hierzu soll die enzymatische Aktivität der verschiedenen synthetisierten Poly(2-R-Oxazolin)-Enzym- sowie Coenzymkonjugate sowohl im Wässrigen wie auch in diversen organischen Medien quantifiziert und mit denen der reinen Enzyme verglichen werden.

Außerdem soll in der vorliegenden Arbeit das Potential der Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugate als chirale Liganden für asymmetrische metallkatalysierte Synthesen in organischen Medien evaluiert werden. Nach der Etablierung eines geeigneten Reaktionssystems soll hier vor allem der Einfluss der verschiedenen Enzyme auf die Enantioselektivität der Reaktion untersucht werden. Insbesondere sollen auch die Reaktionsbedingungen im Hinblick auf eine hohe Enantioselektivität der Reaktion gewählt und optimiert werden.

Des Weiteren soll sich die vorliegende Arbeit der Tandemkatalyse widmen. Hierbei sollen die Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugate sowohl als Ligand bei einer metallkatalysierten Synthese verwendet werden als auch gleichzeitig ihre enzymatische Aktivität genutzt werden, um eine Tandemreaktion zu ermöglichen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3.1: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nummer	Bezugsquelle
α, α' -Dibromo- <i>p</i> -Xylol	98 %	623-24-5	Sigma-Aldrich
α -Methylstyrol	99 % stab.	98-83-9	Alfa Aesar
β -Mercaptoethanol	> 99 %	60-24-2	AppliChem
<i>p</i> -Methylstyrol	98 %	622-97-9	Alfa Aesar
(\pm)-1-Phenylethan-1,2-diol	\geq 95 %	93-56-1	Merck
(<i>S</i>)-(+)-1-Phenylethan-1,2-diol	97 %	25779-13-9	ABCR
1 <i>H</i> -Inden	> 90% stab.	95-13-6	Alfa Aesar
1,2-Dihydronaphthalin	98 %	447-53-0	Alfa Aesar
2,6-Dimethoxyphenol	99 %	91-10-1	Fisher Scientific
2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure	5 % (w/v) in H ₂ O	2508-19-2	Sigma-Aldrich
1-Propanol	\geq 99,5 %	71-23-8	Merck
2-Hydroxyethylacrylat	97 %	818-61-1	Sigma-Aldrich
2-Propanol	\geq 99,8 %	67-63-0	Sigma-Aldrich
1-Oktanol	zur Synthese	111-87-5	Merck
(\pm)-2-Oktanol	> 96 %	123-96-6	Fluka
2-Ethyl-2-Oxazolin	99 %	10431-98-8	Merck
2-Methyl-2-Oxazolin	99 %	1120-64-5	Alfa Aesar
2-Phenyl-2-Oxazolin	99 %	7127-19-7	Sigma-Aldrich
2-Oktanon	99 %	111-13-7	Sigma-Aldrich
2-Propanol	HPLC	67-63-0	Sigma-Aldrich
4-(Dimethylamino)-Pyridin	99 %	1122-58-3	Sigma-Aldrich
ABTS	\geq 98	30931-67-0	Sigma-Aldrich

Tabelle 3.1: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nummer	Bezugsquelle
Aceton	technisch	67-64-1	Merck
Acetonitril	<i>p.a.</i>	75-05-8	VWR
Aerosol OT	98 %	577-11-7	Sigma-Aldrich
AgNO ₃	99,9 %	7761-88-8	Roth
Albumin bovine Fraction V	≥ 98 % protease-frei	90604-29-8	Roth
Aluminiumoxid 90 aktiv basisch 0,063 - 0,200 mm	-	1344-28-1	Merck
Amidoschwarz 10B	<i>p.a.</i>	1064-48-8	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	≥ 98 % <i>p.a.</i>	7727-54-0	Roth
APEE	98 %	2361-96-8	Sigma-Aldrich
Azocasein	-	102110-74-7	Sigma-Aldrich
Benzylalkohol	99 %	100-51-6	Acros
Bernsteinsäureanhydrid	≥ 99,5 %	108-30-5	Sigma-Aldrich
Bernsteinsäuredichlorid	96 %	543-20-4	Alfa Aesar
Butylecyanid	99 %	110-59-8	Acros
Butylhydroxytoluol	> 99 %	128-37-	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	<i>p.a.</i>	34725-61-6	Serva
CaCl ₂	97 %	10043-52-4	Alfa Aesar
CaH ₂	zur Synthese	7789-78-8	Merck
CaSO ₄	wasserfrei	7778-18-9	Merck
CDCl ₃	99,8 atom %D, 0,03 v/v % TMS, stab. mit Silber	865-49-6	Armar Chemicals
CDCl ₃	99,8 atom %D, stab. mit Silber	865-49-6	Armar Chemicals
CHCl ₃	RECTAPUR®	865-49-6	VWR
CombiCoulomat fritless	-	-	Merck
KARL-FISCHER Reagenz			
Coomassie Brilliant Blau R 250	rein	6104-59-2	Roth
CuSO ₄	<i>p.a.</i>	7758-98-7	Fluka
Cyclohexan	technisch	110-82-7	Applichem
D ₂ O	99.8 atom %D	7789-20-0	Armar Chemicals

Tabelle 3.1: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nummer	Bezugsquelle
Diethylether	RECTAPUR®	60-29-7	VWR
Dimethylsulfoxid	reinst	67-68-5	AppliChem
Dimethylsulfoxid-d ₆	99,8 atom %D	2206-27-1	Armar Chemicals
Dithiothreitol	≥ 99,5 %	3483-12-3	AppliChem
DPD	97 %	99-98-9	Sigma-Aldrich
Essigsäure	100 %	64-19-7	Merck
Ethanol, vergällt	96 %	64-17-5	VWR
Ethanolamin	>99 %	141-43-5	Sigma-Aldrich
Ethylacetat	technisch	64-17-5	VWR
Ethylendiamin	zur Synthese	107-15-3	ABCR
Ethylendiamintetraessigsäure	≥ 99 %	60-00-4	Roth
EDTA-Na ₂ · 2 H ₂ O	≥ 99 %	6381-92-6	Roth
Formaldehydls.	37 %	50-00-0	Merck
Glycerin	99 %	56-81-5	Sigma-Aldrich
Glycin	reinst Ph. Eur.	56-40-6	AppliChem
Gummi-Arabicum	> 99 %	9000-01-5	Sigma-Aldrich
H ₂ O ₂	30 %	7722-84-1	Merck
H ₃ PO ₄	85 %	7664-38-2	Merck
HCl	37 %	7647-01-0	Merck
Heptylcyanid	97 %	124-12-9	Alfa Aesar
Hexamethylendiisocyanat	zur Synthese	822-06-0	Sigma-Aldrich
Irgacure 651	-	24650-42-8	Ciba
K ₂ CO ₃	reinst	584-08-7	VWR
K ₃ Fe(CN) ₆	>98%	13746-66-2	Alfa Aesar
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	zur Analyse	16788-57-1	Merck
KH ₂ PO ₄	zur Analyse	7778-77-0	Merck
KOH	zur Analyse	1310-58-3	VWR
K ₂ OsO ₄ · 2 H ₂ O	-	10022-66-9	Fisher Scientific
Laurinsäure	≥ 98 %	143-07-7	Sigma-Aldrich
Laurinsäurechlorid	98 %	112-16-3	Sigma-Aldrich
LiBr	99 %	7550-35-8	Sigma-Aldrich
Methanol	98 %	67-56-1	AppliChem
Methanol-d ₄	99,8 atom %D	811-98-3	Armar Chemicals

Tabelle 3.1: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nummer	Bezugsquelle
Methyl- <i>p</i> -Toluolsulfonsäure	98 %	80-48-8	Sigma-Aldrich
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	lyophilisierte Zellen	-	Sigma-Aldrich
Molsieb 3 Å	-	-	Merck
Molsieb 4 Å	-	-	Merck
<i>N</i> -(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamid	99 %	5205-93-6	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -Acetyl-L-Phenylalaninethylester	95 %	2361-96-8	ABCR
<i>n</i> -Heptan	99 %	142-82-5	VWR
<i>n</i> -Tetradecan	zur Synthese	629-59-4	Merck
<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid	97 %	7529-22-8	Sigma-Aldrich
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	≥ 99 %	538-75-0	Sigma-Aldrich
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	RECTAPUR [®]	68-12-2	VWR
<i>N,N'</i> -Disuccinimidylcarbonat	≥ 95 %	74124-79-1	Sigma-Aldrich
Natriumacetat · 3 H ₂ O	≥ 99,5 %	6131-90-4	Roth
Natriumdesoxycholat	≥ 98 %	83-44-3	Sigma-Aldrich
NaCO ₃	p.a.	497-19-8	Merck
NAD ⁺	≥ 98%	53-84-9	Roth
NADH–Na ₂	≥ 98%	606-68-8	Roth
NADP ⁺ –Na ₂	98 %	24292-60-2	Roth
NaHCO ₃	zur Analyse	144-55-8	Merck
Na ₂ HPO ₄	reinst	7558-79-4	AppliChem
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	p.a.	13472-35-0	Merck
NaN ₃	reinst	26628-22-8	Merck
NaOH	99%	1310-73-2	Roth
Natriumpyrophosphat	98 %	7722-88-5	Alfa Aesar
Natriumtartrat · 2 H ₂ O	p.a.	6106-24-7	AppliChem
Natriumthiosulfat	wasserfrei	7772-98-7	Merck
Octylamin	zur Synthese	111-86-4	Merck

Tabelle 3.1: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nummer	Bezugsquelle
P ₄ O ₁₀	99 %	1314-56-3	Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat	≥ 98 %	1492-30-4	Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid	> 97 %	98-59-9	Fluka
Phenol	zur Synthese	108-95-2	Merck
Pyridin	99,8 %	110-86-1	Sigma-Aldrich
Pyromellitsäuredianhydrid	97 %	89-32-7	Sigma-Aldrich
Prot. Test Mixture for pI Det. pH 3-10	-	-	Serva
Roti [®] -Mark 10-150	-	-	Roth
Roti [®] Nanoquant	-	-	Roth
Rotiphorese [®] Gel 40 (37,5:1)	-	-	Roth
SDS	99,5 %.	151-21-3	Roth
SPNA	≥ 98 %	2440-62-2	Sigma-Aldrich
Styrol	≥ 99%	100-42-5	Sigma-Aldrich
Toluol	≥ 99,5 %	108-88-3	VWR
TEMED	99 %	110-18-9	Merck
<i>tert</i> -Butanol	zur Synthese	75-65-0	Merck
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	Lsg. 6 M in Decan	75-91-2	Sigma-Aldrich
Tetrahydrofuran	zur Analyse	109-99-9	VWR
Trichloressigsäure	20 %	76-03-9	AppliChem
Triethylamin	≥ 99%	121-44-8	Sigma-Aldrich
TRIS-Base	> 99,9 %	77-86-1	Roth
TRIS-HCl	> 99 %	1185-53-1	Roth
Triton-X 100	reinst	9002-93-1	Roth
Wasserstoffperoxid	30 %	7722-84-1	Merck
Zinkacetat · 2 H ₂ O	≥ 98 %	5970-45-6	Sigma-Aldrich

3.1.2 Enzyme

Tabelle 3.2: Enzyme

Enzym	Enzyme	Herkunft	Aktivität	Hersteller
Proteinase K		<i>Tritirachium album</i>	3 - 15 $\frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 37 °C, pH 7,5; Hämoglobin	Sigma-Aldrich
Papain		<i>Carica papaya</i>	$\geq 3 \frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 25 °C, pH 6,2; <i>N</i> -Benzoyl-L-Argininmethylester	Sigma Aldrich
α -Chymotrypsin		Rinderpankreas	90 $\frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 28 °C, pH 7,8; <i>N</i> -Succinyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Prolyl-L-Phenylalanin 4-Nitroanilid	Fluka
Trypsin		Schweinepankreas	1000 - 2000 $\frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 25 °C, pH 7,6; <i>N</i> _{α} -Benzoyl-L-Arginin-ethylester	Sigma-Aldrich
Collagenase Typ I		<i>Clostridium histolyticum</i>	0,25 - 1,0; 25 °C; <i>N</i> -[3-(2-Furyl)Acryl]-L-Leucyl-Glycyl-L-Prolyl-L-Alanin	Sigma-Aldrich
Lysozym		Hühnereiweiß	$\geq 20000 \frac{\dot{U}}{\text{mg}}$	Applichem
Lipase		<i>Candida rugosa</i> Typ VII	$\geq 700 \frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 37°C, pH 7,2; Triglycerid	Sigma-Aldrich
Lipase		<i>Rhizomucor miehei</i>	20000 $\frac{\dot{U}}{\text{g}}$; pH 6,2	Novozyme
Lipase		<i>Candida antarctica</i>	$\approx 9 \frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 40 °C, pH 8; Tributyrin	Sigma-Aldrich
Monoxygenase		<i>Bacillus megaterium</i>	-	-
Glukoseoxidase		<i>Aspergillus niger</i>	$\approx 200 \frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 25 °C, pH 7,0; Glukose	Sigma-Aldrich
Alkoholdehydrogenase		Pferdeleber	$\geq 0,5 \frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 30 °C, pH 7,0; Benzaldehyd	Sigma-Aldrich
Alkoholdehydrogenase		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\geq 10 \frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 25 °C, pH 8,8; Ethanol	Sigma-Aldrich
Laccase		<i>Trametes versicolor</i>	$\geq 10 \frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 25 °C, pH 4,5; Brenzcatechin	Sigma-Aldrich
Peroxidase		Meerrettich	20000 $\frac{\dot{U}}{\text{Voll}}$	Merck
RNase A		Rinderpankreas	80 $\frac{\dot{U}}{\text{mg}}$; 25 °C, pH 5,0; Hefe-RNA	Applichem

3.1.3 Proteinmarker

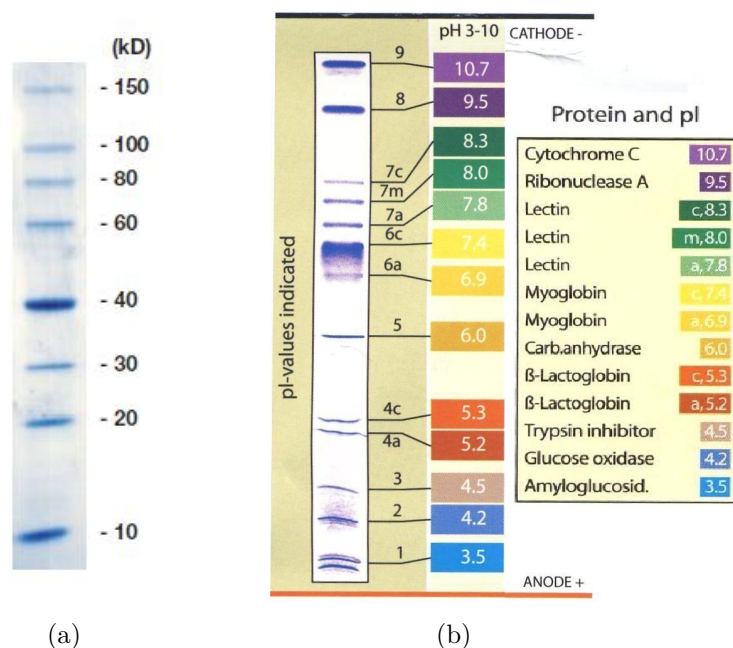


Abbildung 3.1: (a) Proteinmarker SDS-PAGE, Roti[®]-Mark 10-150 (Roth)
 (b) Proteinmarker IEF, Protein Test Mixture for pI Determination pH 3-10 (Serva)

3.1.4 Geräte

3.1.4.1 Gelpermeationschromatografie (GPC)

Die Gelpermeationselugramme wurden mittels eines GPCMax System (Tab. 3.5), ausgestattet mit einem Brechungsindexdetektor (RI), temperiert auf 55 °C, gemessen. Eingesetzt wurden zwei TSKgel[®] GMHHR-M 7,8 x 300 mm (5 μ m Porengröße) Säulen der Fa. Tosoh sowie eine TSKgel[®] Vorsäule. Die Säulenofentemperatur betrug 60 °C. Als Laufmittel wurde *N,N*-Dimethylformamid (DMF), versetzt mit 20 $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ LiBr und einer Flussrate von 0,7 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ verwendet. Die Kalibrierung wurde durchgeführt mittels Polystyrolstandards ($1050 < M < 3800000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$) der Fa. Viscotek; die Probenkonzentrationen betragen 2,0 - 4,0 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ bei einem Injektionsvolumen von 100 μ L. Die Proben wurden im Lsgm. gelöst, zur Äquilibration über Nacht stehengelassen und anschließend durch einen 0,2 μ m PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels der Software OmniSEC (Viscotek) Version 4.6.0.346.

Das resultierende Elugramm zeigt die Molmassenverteilung, aus der sich das zahlenmittlere (M_n) sowie das gewichtsmittlere Molekulargewicht (M_w) des Polymers bestim-

men lassen. Gl. 3.1 und 3.2 stellen die mathematische Definition dieser Kenngrößen dar.

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n N_i \cdot M_i}{\sum_{i=1}^n N_i} \quad (3.1)$$

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^n m_i \cdot M_i}{\sum_{i=1}^n m_i} \quad (3.2)$$

Das Verhältnis von M_w zu M_n wird als Polydispersitätsindex (*PDI*) bezeichnet, dieser ist ein Maß für die Breite einer Molmassenverteilung des Polymers (Gl. 3.3).

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} \quad (3.3)$$

3.1.4.2 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die ^1H -NMR Spektren wurden in deuterierten Lösungsmitteln an FT-Geräten der Fa. Bruker, DPX-200 (200 MHz), DPX-300 (300 MHz), DRX-400 (400 MHz) und DRX-500 (500 MHz), ausgestattet mit 5 mm Probenkopf, bei RT, in DMSO- d_6 , CDCl_3 , D_2O , oder CD_3OD aufgenommen (Tab. 3.5). Hierbei dienten die Restprotonen, der nicht vollständig deuterierten Lösungsmittel als Referenz (DMSO- d_6 : $\delta = 2, 50$, CDCl_3 : $\delta = 7, 27$, D_2O : $\delta = 4, 75$, CD_3OD : $\delta = 3, 31$). Die Probenkonzentration lag bei 10 - 100 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$. Die aufgeführten chemischen Verschiebungen beziehen sich auf die δ -Skala und sind in ppm angegeben. Bei den ^1H -NMR Spektren wurden für die Spin-Spin-Kopplungen folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multiplet). Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Software NMR Processor Academic Edition (ACD Labs) Version 12.0.

3.1.4.3 Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die ESI-MS Messungen wurden mittels eines LTQ-FT-ICR-Ultra (Lineares Ionenfallen-Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer, Tab. 3.5) gekoppelt an ein Advion TriversaNanomate (Nanoelektrosprayionisationsroboter) durchgeführt. Die Polymerproben wurden in bidest. Wasser gelöst und mit einer Mischung aus 70 % bidest. Wasser, 30 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure verdünnt. Die Probenkonzentration nach der Verdünnung lag bei 1 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ($\approx 0,3 \frac{\text{pmol}}{\mu\text{L}}$). Für die direkte Injektion wurden 3 μl Probe unter Verwendung eines Chip-A-384 Emitters (5 μm In-

nendurchmesser) injiziert, was zu einer Flußrate von $\approx 200 \frac{\text{nL}}{\text{min}}$ führte. Der nominelle Stickstoff Gegendruck sowie die Ionisationsspannung wurden der Probe angepasst und lagen zwischen 28 - 63 mbar bzw. 1,4 - 2,0 kV. Die Massenspektren wurden im positiven Modus in einem Massenbereich von 225 - 2000 mit einer Auflösung von 100000 aufgenommen. Die erhaltenen Massenspektren enthielten Ladungen bis zu 20 und wurden dekonvolutiert mittels XtractRAW. Die Polymerverteilung wurde auf Basis der monoisotopischen Peaks bestimmt.

3.1.4.4 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die DLS-Messungen wurden mittels eines Zetasizer nano S (Tab. 3.5), temperiert auf 25 °C, durchgeführt. Die Äquilibrationszeit betrug 3 min. Die Proben wurden in reinem DMF vermessen und vorher durch einen PTFE-Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm filtriert.

3.1.4.5 Mikrowellensynthesen

Sämtliche Polymer- sowie die Monomersynthesen wurden in Discover Synthesemikrowellenreaktoren mit einer maximalen Leistung von 300 W durchgeführt (Tab. 3.5). Hierbei wurden für die Polymersynthesen Glasgeräte mit einem Gesamtvolumen von 10 mL (Glasviolen mit Septum) bis 50 mL (SCHOTT-Flasche) verwendet. Für die Monomersynthesen wurde eine modifizierte 250 mL SCHOTT-Flasche mit Normschliff (29/32) und Rückflusskühler eingesetzt (s. Kap. 3.2.2.1, 3.2.2.2). Die Geräte verfügten über eine Druckluftkühlung, ein Magnetührwerk, sowie einen vertikal fokussierten Infrarotsensor zur kontinuierlichen Temperaturüberwachung und -regelung. Die gesamte Reaktionsführung erfolgte rechnergesteuert mittels der Software Synergy (CEM Corporation) in der Version 1.36.

3.1.4.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Größenausschlußchromatographie (SEC) der Enzyme und der Enzymkonjugate wurde mittels eines LaChrom Elite HPLC Systems (Tab. 3.5), ausgestattet mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD), durchgeführt. Verwendet wurde eine Biobasic SEC-300 7,8 x 300 mm Säule mit 300 Å Porengröße mit entsprechender Vorsäule (30 x 7,8 mm, 300 Å Porengröße) der Fa. Thermo Scientific, die Säulentemperatur betrug 30 °C. Als Eluent wurde 0,1 M KH_2PO_4 -Puffer mit einem pH-Wert von 7 eingesetzt, bei einer Flussrate von 1,0 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$. Die Injektion der Proben erfolgte mit reinem Wasser und die Proben wurden durch einen 0,2 μm PP-Spritzenvorsatzfilter filtriert. Die Detektion der Enzyme und Konjugate erfolgte bei 280 nm.

Für die Analyse chiraler Substanzen wurde eine CHIRALPAK[®]-IC 4,6 x 250 mm Säule (Silica-Gel mit 5 μm Partikelgröße, Cellulose 3,5-Dichlorophenylcarbamate) der Fa. Daicel Chemical Industries Ltd. eingesetzt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus *n*-Heptan und 2-Propanol im Verhältnis 9:1 (für 2-Phenylpropan-1,2-diol 9,8:0,2) bei einer Flussrate von 0,5 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ verwendet, die Injektion der Proben erfolgte mit reinem 2-Propanol. Die Säulentemperatur lag bei 25 °C. Die Detektion wurde mit dem DAD bei 210 nm bzw. 216 nm für 1-(*p*-tolyl)Ethan-1,2-diol und 1-Phenylethan-1,2-diol vorgenommen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels der Software EZ-Chrom Elite (Agilent) Version 3.3.2 (Build 3.3.2.954).

Tabelle 3.3: Retentionszeiten der synthetisierten Diole.

Produkt	Retentionszeit t [min]
1-Phenylethan-1,2-diol <i>S</i>	23,5
1-Phenylethan-1,2-diol <i>R</i>	25,3
2-Phenylpropan-1,2-diol	68,2
2-Phenylpropan-1,2-diol	69,9
1-(<i>p</i> -tolyl)Ethan-1,2-diol	20,7
2,3-dihydro-1 <i>H</i> -Inden-1,2-diol 1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	19,7
2,3-dihydro-1 <i>H</i> -Inden-1,2-diol 1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	26,8
1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin-1,2-diol 1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	12,5
1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin-1,2-diol 1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	16,6

3.1.4.7 HPLC-ESI-MS

Die HPLC-ESI-MS Messung der Produkte der Tandemkatalyse wurden mit einem 1260 Infinity HPLC System (Tab. 3.5) gekoppelt mit einem Compact Q-TOF Massenspektrometer durchgeführt. Verwendet wurde eine Purospher RP-18 Säule (LiChroCART 4,6 x 125 mm, 5 μm Porengröße) der Fa. Merck, die Säulentemperatur betrug 30 °C. Als Laufmittel wurde Acetonitril mit einer Flussrate von 0,5 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ verwendet, die Injektion der Proben erfolgte mit reinem Acetonitril. Es wurden folgende MS Einstellungen verwendet: Kapillarspannung 3800 V; Verneblerdruck 0,6 bar; Trockengasstrom (N_2) 5 $\frac{\text{L}}{\text{min}}$; Trockungstemperatur 220 °C. Die Massenspektren wurden im positiven Modus in einem Massenbereich von 90 - 700 aufgenommen.

3.1.4.8 Gaschromatographie (GC)

Die GC Messungen wurden mit einem Clarus GC 500 (Tab. 3.5) und einer CP-SIL 8 CB-Säule von Varian (Außendurchmesser 0,32 mm, Innendurchmesser 0,1 μm , Länge 30 m) mit Stickstoff als Trägergas (1 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$) durchgeführt. Die Injektionstemperatur betrug 230 °C bei einem Split-Verhältnis von 5:1 und die FID-Detektor-Temperatur wurde auf 280 °C eingestellt. Die Injektionsmenge lag bei 0,5 μl . Die Temperaturprogramme für die jeweiligen Analyten, sowie die verwendeten Kalibrierfaktoren, sind in Tab. 3.4 aufgeführt. Als interner Standard wurde immer *n*-Tetradecan verwendet, dessen Menge der Beschreibung des jeweiligen Assays zu entnehmen ist. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels der Software TotalChrom (PerkinElmer) Version 6.3.1.0504.

3.1.4.8.1 Bestimmung der Kalibrierfaktoren

Die Kalibrierfaktoren für 1-Phenylethan-1,2-diol, 2-Oktanol, 2-Oktanon sowie *N*-Acetyl-L-Phenylalanin Ethylester wurden bestimmt, indem Verdünnungsreihen der jeweiligen Stoffe angesetzt wurden, denen die selbe Menge interner Standard (*n*-Tetradecan) zugesetzt wurde wie sie auch bei den Messproben verwendet wurde. Aus der Auftragung der Quotienten der Integrale des jeweiligen Stoffes und der Integrale des internen Standards wurden die Kalibrierfaktoren berechnet.

3.1.4.8.1.1 Synthese von Laurinsäureoktylester

Für die Synthese des Laurinsäureoktylesters wurden unter Argonatmosphäre 4 mL (3,32 g, 0,0255 mol) trockenes 1-Oktanol (getrocknet über 4 Å Molsieb) sowie 3,21 mL (1,1 äq., 2,35 g, 0,0232 mol) trockenes Triethylamin (getrocknet über 4 Å Molsieb) in 10 mL trockenes THF (getrocknet durch Destillation über NaK) gegeben. Danach wurde unter Rühren inert über einen Zeitraum von ca. 10 min 5,36 mL (1,1 äq., 5,07 g, 0,0232 mol) Laurinsäurechlorid zugegeben. Anschließend wurde der entstandene Feststoff abfiltriert und verworfen. Das THF des Filtrats wurde mittels RotV entfernt, das Produkt am Feinvakuum getrocknet, bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie charakterisiert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,09 - 4,02$ (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, $\text{C}_7\text{H}_{15}-\text{CH}_2-\text{O}-$); 2,33 - 2,25 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}-\text{CH}_2-\text{C}-$); 1,69 - 1,53 (m, 4H, $\text{C}_6\text{H}_{13}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $\text{C}_9\text{H}_{19}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-$); 1,42 - 1,18 (m, 24H, $\text{CH}_3-\text{C}_4\text{H}_8-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $\text{CH}_3-\text{C}_8\text{H}_{16}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-$), 0,92 - 0,85 (t, 6H, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_3$).

Tabelle 3.4: GC-Temperaturprogramme, Retentionszeiten und Kalibrierfaktoren.

Analyt	Temperaturprogramm	Retentionszeit t [min]	Kalibrierfaktor $\left[\frac{\text{mL}}{\mu\text{mol}}\right]$
Laurinsäure		6,20	-
1-Oktanol		3,40	-
Laurinsäureoktylester	100 °C 1 min; 20 $\frac{^\circ\text{C}}{\text{min}}$ bis 250 °C; 250 °C 2 min	9,22	0,92285
1-Phenylethan-1,2-diol		4,78	0,7257 ^a -0,5113 ^b
<i>n</i> -Tetradecan		5,22	-
2-Oktanol		8,38	0,2975
2-Oktanon	50 °C 1 min; 2,5 $\frac{^\circ\text{C}}{\text{min}}$ bis 65 °C; 30 $\frac{^\circ\text{C}}{\text{min}}$ bis 250 °C; 250 °C 1 min	8,19	0,3155
<i>n</i> -Tetradecan		11,73	-
<i>N</i> -Acetyl-L-Phenylalanin ester		11,92	0,5236
<i>N</i> -Acetyl-L-Phenylalanin Propylester	50 °C 2 min; 20 $\frac{^\circ\text{C}}{\text{min}}$ bis 150 °C; 10 $\frac{^\circ\text{C}}{\text{min}}$ bis 200 °C; 20 $\frac{^\circ\text{C}}{\text{min}}$ bis 280 °C	12,65	0,5236
<i>n</i> -Tetradecan		8,84	-
2-Hydroxy-1-Phenylethyl- Laurinsäureester		10,77	-
2-Hydroxy-2-Phenylethyl- Laurinsäureester	100 °C 1 min; 20 $\frac{^\circ\text{C}}{\text{min}}$ bis 250 °C; 250 °C 10 min	10,5	-

^a Steigung der Kalibriergeraden^b y -Achsenabschnitt der Kalibriergeraden

Tabelle 3.5: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Pipetten	Research, Reference	Eppendorf
Heizrührer	RCT classic	Ika
Gefriertrocknung	Alpha 1-2 LD plus	Christ
Hochvakuumpumpe	RZ6	Vacuubrand
Trockenschrank	T 6030	Heraeus Instruments
Rotationsverdampfer	Laborota 4001 efficient	Heidolph Instruments
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments
Feinwaage	XS105	Mettler-Toledo
Karl-Fischer Titrator	TitroLine KF	Schott
NMR Spektrometer	DPX-500	Bruker
NMR Spektrometer	DRX-400	Bruker
NMR Spektrometer	DPX-300	Bruker
NMR Spektrometer	DPX-200	Bruker
IEF-Gelelektrophoresekammer	Multiphor II	GE Healthcare
Synthesemikrowelle	Discover	CEM
pH-Meter	GMH 3530	Greisinger electronic GmbH
Photometer	Specord 210	Analytik Jena
SDS-Gelelektrophoresekammer	MiniTwin	Analytik Jena
Spannungsquelle-SDS	EV231	Consort
Spannungsquelle-IEF	EPS 3501 XL	GE-Healthcare
Lichtstreuung	Zetasizer nano S	Malvern
Thermoshaker	Thermomixer comfort	Eppendorf
GPC	GPCMax	Viscotek
Zentrifuge	Z300	Hermle
Gaschromatograph	Clarus GC 500	Perkin Elmer
HPLC	LaChrom Elite	Hitachi
ESI-MS	LTQ-FT-ICR-Ultra	Thermo Scientific
Refraktometer	2WAJ	Abbe
Kryostat (Photometer)	RM6	Lauda
Kryostat (Refraktometer)	C6	Lauda
Kryostat	Eco RE 1050	Lauda
Ultraschallbad	RK 100H	Bandelin

Tabelle 3.5: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Vortex	Genius 3	IKA
ATR-FTIR	Alpha	Bruker
ESI-TOF-MS (HPLC)	Compact Q-TOF	Bruker
HPLC (ESI-MS)	1260 Infinity	Agilent
Autoklav	LTA 3x4x4	Zirbus
Lichtpolymerisationsgerät	Heraflash	Heraeus Kulzer

3.1.5 Gase und Flüssiggase

Tabelle 3.6: Gase und Flüssiggase

Gas	Reinheit	Hersteller	Verwendungszweck
Argon, Ar	5.0, $\geq 99,999$ %	Messer	Schutzgas zur Inertisierung
Stickstoff, N ₂	$\geq 99,8$ %	Messer	Schutzgas zur Inertisierung
Stickstoff, N ₂	5.0, $\geq 99,999$ %	Messer	Trägergas GC
Wasserstoff, H ₂	5.0, $\geq 99,999$ %	Messer	Brenngas FID-Detektor
Sauerstoff, O ₂	99,5 %	Messer	Laccaseassay
Synthetische Luft (N ₂ : O ₂ ; 79,5 : 20,5)	5.0, $\geq 99,999$ %	Messer	Brenngas FID-Detektor
fl. Stickstoff, N ₂	2.8, $\geq 99,8$ %	Linde	zur Kühlung

3.2 Polymersynthese

3.2.1 Darstellung von Benzyltosylat

Die Synthese des Initiators Benzyl-*p*-Toluolsulfonsäure (Benzyltosylat, BeOTs) wurde als Feststoffsynthese nach KAZEMI *et al.* durchgeführt.¹⁴⁷ Hierfür wurden 5 g (36 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat mit 2,85 g (15 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in einem Mörser vermischt. Anschließend wurden 1,04 mL Benzylalkohol (1,081 g, 10 mmol) zugegeben und 5 min mit Hilfe des Mörsers kräftig vermahlen. Hiernach wurde 2,806 g (50 mmol) Kaliumhydroxid zugegeben und das Gemisch für weitere 2 min kräftig verrieben. Im Anschluss wurden 50 mL Diethylether (Et₂O) hinzugegeben und

der Feststoff mittels eines Faltenfilters abfiltriert. Der Feststoff wurde verworfen, die Etherphase am Rotationsverdampfer (RotV) eingengt und das Produkt 2-mal aus *n*-Heptan bei -30 °C umkristallisiert. Nach dem Umkristallisieren wurde das Produkt unter Eiskühlung am Feinvakuum getrocknet und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Erhalten wurde der Initiator als weißer, kristalliner, watteartiger Feststoff mit einer Ausbeute von ca. 75 %, welcher mittels ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert wurde.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,76 - 7,4$ (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, $-S-o-C_6H_4-CH_3$); 7,21 - 7,19 (m, 7H, $-S-m-C_6H_4-CH_3$, $-CH_2-C_6H_5$); 5,03 - 5,07 (s, 2H, $-CH_2-C_6H_5$); 2,41 - 2,48 (s, 3H, $-C_6H_4-CH_3$).

3.2.2 Monomersynthese

3.2.2.1 Darstellung von 2-Butyl-2-Oxazolin

Die Synthese von 2-Butyl-2-Oxazolin wurde nach einer modifizierten Methode von WITTE und SEELIGER durchgeführt^{108,148}. Hierzu wurden 85 mL (67,58 g, 0,81 mol) Butylcyanid vorgelegt und 58,87 mL (1,2 äq., 3,61 g, 0,97 mol) Ethanolamin sowie 3,57 g (0,02 äq., 0,0162 mol) Zinkacetat Dihydrat als Katalysator hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h unter Rückfluss bei 140 °C in der Synthesemikrowelle erhitzt (vgl. Kap. 3.1.4.5). Nach Abkühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch in 100 mL abdest. Cyclohexan gelöst und 3-5 mal mit ca. 250 mL VE-Wasser extrahiert bis die Lösung nur noch leicht gelb war. Hiernach wurde die org. Phase mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lsgm. am RotV komplett entfernt. Im Anschluss wurde das Rohprodukt zweifach destilliert (vgl. Tab. 3.7).

3.2.2.2 Darstellung von 2-Heptyl-2-Oxazolin

Hierzu wurden 70 mL Heptylcyanid (56,98 g, 0,46 mol), 32,94 mL Ethanolamin (1,2 äq., 33,34 g, 0,55 mol) sowie 2,02 g Zinkacetat Dihydrat (0,02 äq., 0,0092 mol) unter Rückfluss bei 130 °C in der Synthesemikrowelle erhitzt. Zur Beobachtung des Reaktionsfortschritts wurden zu bestimmten Zeiten (1, 2, 4, 6, 23, 24, 25 h) Proben des Reaktionsgemisches mittels ATR-FTIR untersucht. Das Reaktionsgemisch wurde in 200 mL abdest. Cyclohexan gelöst und für die Extraktion wurden ca. 400 mL VE-Wasser verwendet. Die weitere Aufarbeitung des 2-Heptyl-2-Oxazolins wurde analog zur 2-Butyl-2-Oxazolinsynthese durchgeführt (s. Kap. 3.2.2.1).

3.2.2.3 Destillation der 2-R-2-Oxazolinmonomere

Die Destillation der Monomere erfolgte für alle Monomere mittels einer Vigreuxdestille mit Ausnahme des 2-Butyl-2-Oxazolins, hier wurde eine Mikrodestille verwendet. Die Destillationsapparatur wurde über Nacht im Trockenschrank bei 130 °C ausgeheizt. Vor der Destillation wurde die gesamte Apparatur nochmals unter Vakuum ausgeheizt und dazwischen mit Argon gespült. Das 2-R-2-Oxazolin wurde zunächst über Calciumhydrid als Trocknungsmittel unter leichtem Unterdruck 30 min gerührt und anschließend mit 10 Vol-% Vorlauf abdestilliert (Tab. 3.7). Anschließend wurde das Destillat ein zweites mal, jedoch ohne CaH₂, destilliert. Erhalten wurden klare Flüssigkeiten, die unter Argonatmosphäre bei -30 °C im Tiefkühlschrank gelagert wurden.

Tabelle 3.7: Destillationsparameter der versch. 2-R-2-Oxazolinmonomere.

Monomer	Ölbadtemperatur ϑ [°C]	Druck [mbar]
2-Methyl-2-Oxazolin (MeOx)	40	40
2-Ethyl-2-Oxazolin (EtOx)	65	50
2-Butyl-2-Oxazolin (BuOx)	126	85
2-Heptyl-2-Oxazolin (HeptOx)	130	0,4
2-Phenyl-2-Oxazolin (PheOx)	105	0,3

MeOx:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 4,17 - 4,13$ (t, $J = 9,4$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$); $3,77 - 3,70$ (t, $J = 9,4$ Hz, 2H, $-\text{N}-\text{CH}_2-$); $1,89$ (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

EtOx:

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 4,22 - 4,15$ (t, $J = 9,4$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$); $3,82 - 3,74$ (t, $J = 9,5$ Hz, 2H, $-\text{N}-\text{CH}_2-$); $2,29 - 2,21$ (q, $J = 7,5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); $1,19 - 1,11$ (t, $J = 7,7$ Hz, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$).

BuOx:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 4,09 - 4,00$ (t, $J = 9,4$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$); $3,69 - 3,60$ (t, $J = 9,5$ Hz, 2H, $-\text{N}-\text{CH}_2-$); $2,14 - 2,07$ (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3$); $1,50 - 1,40$ (m, 2H $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); $1,27 - 1,15$ (m, 2H $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); $0,79 - 0,72$ (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, $-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$).

HeptOx:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,09 - 4,00$ (t, $J = 9,5$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$); $3,70 - 3,60$ (t, $J = 9,5$ Hz 2H, $-\text{N}-\text{CH}_2-$); $2,14 - 2,05$ (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$); $1,52 - 1,42$ (quint, $J = 7,4$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$); $1,22 - 1,05$ (m, 8H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$); $0,78 - 0,66$ (t, $J = 6,8$ Hz, 3H, $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$).

PheOx:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,93 - 7,88$ (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, $-o-\text{C}_6\text{H}_5$); $7,41 - 7,29$ (m, 3H, $-m-,p-\text{C}_6\text{H}_5$); $4,33 - 4,26$ (t, $J = 9,5$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$); $3,99 - 3,91$ (t, $J = 9,6$ Hz, 2H, $-\text{N}-\text{CH}_2-$).

3.2.3 Trocknung von Chloroform

Der RotV wurde durch Destillation von ca. 50 mL Toluol und im Anschluss Essigsäureethylester unter verminderter Kühlung und Argonatmosphäre getrocknet. Das CHCl_3 wurde am RotV bei 300 mbar und 40°C mit ca. 10 Vol-% Vorlauf abdestilliert. Die anschließende Trocknung erfolgte ebenfalls am RotV unter Argonatmosphäre. Das abdestillierte CHCl_3 wurde am RotV 30 min bei leichtem Unterdruck (ca. 500 mbar) über ca. $500 \frac{\text{g}}{\text{L}}$ aktiviertem basischem Aluminiumoxid als Trockenmittel gerührt und hiernach erneut mit einem Vorlauf von 10 Vol-% abdestilliert. Nach dem Überführen mittels einer ausgeheizten Transferkanüle in einen ebenfalls ausgeheizten und mit aktiviertem (ausgeheizt bei 350°C) 4 \AA Molsieb zu einem Drittel gefüllten und mit einem Septum verschlossenen Schlenkkolben wurde das getrocknete CHCl_3 nach Versiegeln des Septums mit Parafilm bei 4°C im Kühlschrank gelagert (Wassergehalt $< 0,1$ ppm, gemessen per KARL-FISCHER-Titration).

Deutertes Chloroform (ohne Tetramethylsilan) wurde in einen ausgeheizten und mit aktiviertem (ausgeheizt bei 350°C) 4 \AA Molsieb zur Hälfte gefüllten und mit einem Septum verschlossenen Schlenkkolben überführt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert (Wassergehalt 1 ppm, gemessen per KARL-FISCHER-Titration).

3.2.4 Polymerisation einseitig gestarteter Poly(2-Oxazoline)

3.2.4.1 Polymerisation einseitig gestarteter Poly(2-R-Oxazolin) Homopolymere

Im Folgenden wird die generelle Synthese der Poly(2-R-2-Oxazolin) Homopolymere (MeOx, EtOx, BuOx, HeptOx) beschrieben. Für die Polymerisation von 1 g POX wurde eine Borglasviole verwendet, für die 3 g und 5 g POX Ansätze wurde eine 50 mL

SCHOTT-Flasche (mit Ethylen-Tetrafluorethylen Deckel, Ausgießring sowie PTFE beschichteter Silikondichtung) verwendet. Diese wurden (incl. Rührfisch) über Nacht im Trockenschrank bei 130 °C ausgeheizt. Nach Abkühlen auf RT unter Argonatmosphäre wurde das getrocknete CHCl_3 (4 mL CHCl_3 pro g Monomer) inert vorgelegt und die entsprechende Menge des Monomers zugegeben. Anschließend wurde der Initiator (MeOTs oder BeOTs) in flüssiger bzw. fester Form hinzugegeben. Die Menge des benötigten Initiators wurde mit Hilfe folgender Gleichungen berechnet:

$$n_{\text{Ketten}} = \frac{m_{\text{Monomer}}}{\text{DP}_{\text{Set}} \cdot M_{\text{Monomer}}} = n_{\text{Initiator}} \quad (3.4)$$

$$m_{\text{Initiator}} = M_{\text{Initiator}} \cdot n_{\text{Initiator}} \quad (3.5)$$

mit:

DP_{Set} = angesetzter Polymerisationsgrad

m_{Monomer} = Masse Monomer in g

M_{Monomer} = Molmasse Monomer in $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$

$n_{\text{Initiator}}$ = Stoffmenge Initiator in mol

$m_{\text{Initiator}}$ = Masse Initiator in g

Die benötigten physikalischen Daten der Monomere sind in Tab. 3.8 aufgelistet.

Tabelle 3.8: Physikalische Daten der verwendeten 2-R-2-Oxazolinmonomere.

Oxazolinmonomer	Molmasse [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]	Dichte [$\frac{\text{g}}{\text{mL}}$]
MeOx	85,11	1,01
EtOx	99,13	0,98
BuOx	127,18	0,94
HeptOx	169,15	0,87
PheOx	147,18	1,12

Die Reaktionsmischung wurde bei der jeweiligen Polymerisationstemperatur in der Synthesemikrowelle (Maximalleistung 300 W, Stirring: Medium, Power Max: Off) polymerisiert. Die Polymerisationszeit wurde entsprechend dem angesetzten Polymerisationsgrad gewählt (Tab. 3.9). Hierbei wurde falls notwendig automatisch mit Druckluft gekühlt. Nach Ablauf der Polymerisationszeit wurde der Reaktionsansatz wie in Kap. 3.2.5.1 bzw. Kap. 3.2.5.2 beschrieben terminiert. Alle Polymere wurden nach

der Terminierung und anschließender Aufreinigung mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie (s. Kap 3.1.4.2) sowie GPC (s. Kap. 3.1.4.1) charakterisiert.

Für die direkte Terminierung der Enzyme und Coenzyme mit POX wurde das lebende Polymer inert zu den jeweiligen gelösten bzw. festen Enzymen (s. Kap. 3.3.1) bzw. Coenzymen gegeben (s. Kap. 3.4.1). Hierbei wurde ein Präkursor entnommen, der ohne weitere Terminierung durch Umfällen (s. Kap. 3.2.6.1) aufgearbeitet wurde.

Tabelle 3.9: Übersicht über die Polymerisationszeiten und -temperaturen der synthetisierten POX Homopolymere.

Polymer	DP_{Set}	Polymerisationstemperatur ϑ [°C]	Polymerisationszeit t [h]
PMeOx ₃₆	30	100	4
PMeOx ₆₈	60	100	8
PEtOx ₃₅	30	120	4
PEtOx ₈₇	50	120	6,6
PEtOx ₁₂₀	120	105	48
PBuOx ₄₀	30	110	7
PHeptOx ₃₀	30	130	4

Im Folgenden sind exemplarisch die $^1\text{H-NMR}$ Daten der mit MeOTs bzw. BeOTs gestarteten versch. synthetisierten Poly(2-R-Oxazolin) Homopolymere aufgelistet, wovon einige mittels Ethylendiamin gezielt aminterminiert wurden:

PMeOx:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): $\delta = 7,40 - 7,20$ (b, 5H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); $4,60 - 4,50$ (b, 2H, $\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); $3,65 - 3,10$ (b, $n \cdot 4\text{H}$, $-\text{N}(\text{CH}_2)_2-$); $2,70 - 2,55$ (b, 6H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$); $2,10 - 1,85$ (b, $n \cdot 3\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_3$).

PEtOx:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): $\delta = 3,75 - 3,10$ (b, $n \cdot 4\text{H}$, $-\text{N}(\text{CH}_2)_2-$); $2,75 - 2,55$ (b, 6H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$); $2,45 - 2,05$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2\text{CH}_3$); $1,10 - 0,75$ (b, $n \cdot 3\text{H}$, $-\text{NCOCH}_2-\text{CH}_3$).

PBuOx:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7,40 - 7,20$ (b, 5H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); $4,70 - 4,60$ (b, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); $3,75 - 3,4$ (b, $n \cdot 4\text{H}$, $-\text{N}(\text{CH}_2)_2-$); $2,85 - 2,70$ (b, 6H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$); $2,54 - 2,25$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3$); $1,7 - 1,48$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); $1,47 - 1,28$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); $1,05 - 0,85$ (b, $n \cdot 3\text{H}$, $-\text{NCO}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$).

PHeptOx:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7,40 - 7,20$ (b, 5H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); $4,70 - 4,60$ (b, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); $3,75 - 3,35$ (b, $n \cdot 4\text{H}$, $-\text{N}(\text{CH}_2)_2-$); $2,85 - 2,70$ (b, 6H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$); $2,50 - 2,25$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$); $1,70 - 1,50$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$); $1,42 - 1,25$ (b, $n \cdot 8\text{H}$, $-\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$); $0,96 - 0,85$ (b, $n \cdot 3\text{H}$, $-\text{NCO}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$).

3.2.4.2 Polymerisation einseitig gestarteter Poly(2-R-Oxazolin) Diblockcopolymeren

Die Polymerisation des ersten Blocks der Diblockcopolymeren wurde analog zu der oben beschriebenen Synthese der Homopolymere durchgeführt. Die jeweiligen Polymerisationszeiten und Temperaturen sind in Tab. 3.10 aufgelistet. Nach Ablauf der Polymerisationszeit für den ersten Block wurde der Reaktionsansatz mittels Druckluft auf $50\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und unter Argonatmosphäre das zweite Monomer zugegeben. Anschließend wurde der zweite Block bei der in Tab. 3.10 angegebenen Temperatur sowie der angegebenen Zeit polymerisiert. Nach Ablauf der Polymerisationszeit wurde der Reaktionsansatz wie in Kap. 3.2.5.1 bzw. Kap. 3.2.5.2 beschrieben terminiert. Alle Polymere wurden nach der Terminierung und anschließender Aufreinigung mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie (s. Kap. 3.1.4.2) sowie GPC (s. Kap. 3.1.4.1) charakterisiert. Für die direkte Terminierung der Enzyme (s. Kap. 3.3.1) und Coenzyme mit POX wurde das lebende Polymer unter Argonatmosphäre zu den jeweiligen gelösten bzw. festen Enzymen bzw. Coenzymen gegeben. Hierbei wurde ein Präkursor entnommen, welcher ohne weitere Terminierung durch Umfällen (s. Kap. 3.2.6.1) weiter aufgearbeitet wurde.

Tabelle 3.10: Übersicht über die Polymerisationszeiten und -temperaturen der synthetisierten POX Diblockcopolymeren.

Polymer	DP _{Set}	Polymerisations- temperatur ϑ [°C]	Polymerisationszeit t [h]
PBuOx ₅₀ - <i>b</i> -PMeOx ₁₂	40/10	110/100	7/1,3
PPheOx ₆₂ - <i>b</i> -PEtOx ₅	40/10	160/80	25/6
PPheOx ₅₃ - <i>b</i> -PMeOx ₁₂	40/10	160/100	25/2,6
PPheOx ₁₀₈ - <i>b</i> -PMeOx ₁₁	80/20	160/100	50/2,6
PHeptOx ₅₀ - <i>b</i> -PMeOx ₅	30/5	160/100	4,/0,6
PHeptOx ₅₀ - <i>b</i> -PMeOx ₁₀	30/10	160/100	4/1,3

Im Folgenden sind exemplarisch die ¹H-NMR Daten der mit MeOTs bzw. BeOTs gestarteten versch. synthetisierten Poly(2-R-Oxazolin) Diblockcopolymeren aufgelistet, wovon einige mittels Ethylendiamin gezielt aminterminiert wurden:

PBuOx-*b*-PMOx:

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 7,40 - 7,20$ (b, 5H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); $4,70 - 4,60$ (b, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); $3,75 - 3,4$ (b, $n \cdot 4\text{H}$, $-\text{N}-(\text{CH}_2)_2-$); $2,85 - 2,7$ (b, 6H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$); $2,54 - 2,25$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3$); $2,18 - 2,05$ (b, $n \cdot 3\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_3$); $1,7 - 1,48$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); $1,47 - 1,28$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); $1,05 - 0,85$ (b, $n \cdot 3\text{H}$, $-\text{NCO}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$).

PPheOx-*b*-PEtOx:

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,48 - 6,87$ (b, $n \cdot 5\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{C}_6\text{H}_5$); $4,00 - 2,45$ (b, $n \cdot 4\text{H}$, $-\text{N}-(\text{CH}_2)_2-$); $2,45 - 2,14$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); $1,04 - 0,86$ (b, $n \cdot 3\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$).

PHeptOx-*b*-PMOx:

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 7,43 - 7,18$ (b, 5H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); $4,70 - 4,61$ (b, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$); $3,82 - 3,33$ (b, $n \cdot 4\text{H}$, $-\text{N}-(\text{CH}_2)_2-$); $2,85 - 2,71$ (b, 6H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$); $2,54 - 2,23$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$); $2,20 - 2,05$ (b, $n \cdot 3\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_3$); $1,68 - 1,50$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$); $1,43 - 1,24$ (b, $n \cdot 2\text{H}$, $-\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$); $1,00 - 0,85$ (b, $n \cdot 3\text{H}$, $-\text{NCO}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$).

3.2.4.3 Polymerisationskinetiken von 2-Butyl-2- und 2-Heptyl-2-Oxazolin mit Benzyltosylat als Initiator

Für die Polymerisationskinetik von 2-Heptyl-2-Oxazolin wurde unter Argonatmosphäre 4 mL trockenes CDCl_3 in eine ausgeheizte (über Nacht bei 130 °C im Trockenschrank) und auf RT abgekühlte, mit einem Rührfisch versehene, Borglasviole gegeben. Der Ansatz wurde für ein Polymer mit einer angestrebten Länge von 30 Wiederholungseinheiten berechnet. Anschließend wurden inert 1 g des Monomers (1,15 mL, 5,91 mmol) und danach 51,76 mg (0,197 mmol) des Initiators BeOTs zugegeben. Nach Verschließen der Borglasviole mit einem Septum wurde der Reaktionsansatz bei 110 °C in der Synthesemikrowelle (Maximalleistung 300 W, Stirring: Medium, Power Max: Off) polymerisiert. Nach 10, 20 und 30 min wurde die Reaktionsmischung mittels Druckluft auf 50 °C heruntergekühlt und eine Probe von $\approx 650 \mu\text{L}$ aus dem Ansatz entnommen, welche unter Argonatmosphäre in ein ausgeheiztes und mit Argon gespültes NMR Röhrchen transferiert wurde. Das NMR Röhrchen wurde mit Parafilm versiegelt und die entnommene Probe wurde unmittelbar mittels ^1H -NMR Spektroskopie (s. Kap 3.1.4.2) analysiert. Nach Entnahme der Probe wurde die Polymerisation bei 110 °C fortgesetzt.

Der Bestimmung der Kinetik für 2-Butyl-2-Oxazolin ($\text{DP}_{\text{Set}} = 30$) erfolgte analog, hierbei wurden 69,33 mg (0,26 mmol) BeOTs sowie 1 g 2-Butyl-2-Oxazolin (1,06 mL, 0,262 mmol) verwendet. Die Polymerisation wurden bei 110 °C durchgeführt und es wurden nach 10, 20, 30, und 40 min Proben entnommen.

3.2.5 Terminierung der Poly(2-Oxazoline)

3.2.5.1 Ethylendiamin

Zur Einführung einer terminalen Aminogruppe wurde nach Ende der Polymerisation und Abkühlen des Reaktionsansatzes das lebende Polymer unter Argonatmosphäre mit 5 mL (4,5 g, 0,075 mol) Ethylendiamin (EDA) terminiert. Die Terminierung wurde bei 45 °C für 48 h durchgeführt. Anschließend wurde das Polymer mittels Umfällen (s. Kap. 3.2.6.1) und Dialyse aufgereinigt (s. Kap. 3.2.6.2).

3.2.5.2 Methanolische Kaliumhydroxidlösung

Zur Einführung einer terminalen Hydroxylgruppe wurde nach Ende der Polymerisation und Abkühlen des Reaktionsansatzes das lebende Polymer unter Argonatmosphäre mit einem leichten Überschuss (1,1 äq.) einer 0,2 M methanolischen KOH Lösung für 24 h terminiert¹⁴⁹. Anschließend wurde das Polymer mittels Umfällen (s. Kap. 3.2.6.1) aufgereinigt.

3.2.6 Aufreinigung der Poly(2-R-Oxazoline)

3.2.6.1 Fällung

Nach Abschluss der Terminierungsreaktion wurde das Polymer drei mal in Diethylether/Chloroform umgefällt. Hierzu wurde das in Chloroform gelöste Polymer tropfenweise unter starkem Rühren in Et₂O gegeben (Verhältnis Chloroform: Et₂O 1:10 v/v). Nach 10 minütigem Rühren wurde das Polymer durch Sedimentation bzw. Zentrifugation (5 min 3864 · g) und anschließendes Abdekantieren vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde entfernt und im Fall der EDA-terminierten Polymere und auf Grund der Aminkontamination verworfen und nicht wieder aufgearbeitet. Anschließend wurde das gefällte Polymer wieder in möglichst wenig Chloroform gelöst. Im Fall der EDA- und OH-terminierten Polymere blieben nach dem Lösen des Polymers noch unlösliche Rückstände (KOH bzw. protoniertes EDA) zurück, welche vor dem nächsten Umfällschritt mittels eines Spritzenvorsatzfilters (0,2 µm) entfernt wurden. Nach Abschluss wurde das Lösungsmittel am RotV entfernt und die EDA-terminierten Polymere zur vollständigen Entfernung des überschüssigen EDAs dialysiert (s. Kap. 3.2.6.2). Die übrigen Polymere wurden im Feinvakuum getrocknet.

3.2.6.2 Dialyse

Es wurden benzoylierte Cellulosemembranen (ZelluTrans Roth V) der Firma Roth verwendet. Für die Dialysen der versch. POX wurden Dialysemembranen mit einer Ausschlussgrenze (MWCO) von 1000 bzw. 2000 Da eingesetzt. Diese wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung durch die kontinuierliche Zugabe (zutropfen über 4 h) von Methanol (MeOH) auf dieses Dialysemittel konditioniert. Die am RotV getrockneten Polymere wurden in MeOH gelöst und für 2 - 4 d gegen MeOH dialysiert. Anschließend wurde das MeOH am RotV entfernt und die Polymere im Feinvakuum getrocknet. Die reinen Poly(2-Oxazoline) wurden nach der Dialyse als weiße Feststoffe in Ausbeuten zwischen 50 und 90 % erhalten.

Das mittels *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat synthetisierte aminoreaktive POX-Derivat wurde in einer Mischung aus trockenem CHCl₃ und trockenem Aceton (1:9 v/v) für 24 h dialysiert. Der Dialyseschlauch wurde hierzu, wie oben für die Dialyse in Methanol beschrieben, auf die CHCl₃-Aceton-Mischung konditioniert. Die Dialyse nach der Umsetzung mit Octylamin wurde für 48 h gegen Acetonitril durchgeführt, hierzu wurde der Dialyseschlauch ebenfalls wie beschrieben konditioniert.

3.3 Synthese von Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugaten

Die für die Konjugation relevanten Daten der verwendeten Enzyme sind in Tab. 3.11 dargestellt.

Tabelle 3.11: Daten der zur Konjugation verwendeten Enzyme.

Enzym	Herkunft	Molekulargewicht kDa	Anzahl der NH ₂ -Gruppen
Lipase	<i>Candida rugosa</i>	57,6 ¹⁵⁰	20+1 ¹⁵⁰
Lipase	<i>Candida antartica</i>	33,2 ¹⁵¹	9+1 ¹⁵¹
Lipase	<i>Rhizomucor miehei</i>	29 ¹⁵²	7+1 ¹⁵³
Lysozym	Hühnereiweiß	14,3 ¹⁵⁴	6+1 ¹⁵⁵
RNase A	Rinderpankreas	13,7 ¹⁵⁶	10+1 ¹⁵⁷
Alkoholdehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	141 ¹⁵⁸	24+1 ¹⁵⁹
Alkoholdehydrogenase	Pferdeleber	80 ¹⁶⁰	31+1 ¹⁶¹
Glucoseoxidase	<i>Aspergillus niger</i>	150 ¹⁶²	15+1 ¹⁶²
Laccase	<i>Trametes versicolor</i>	53,7 ¹⁶³	5+1 ¹⁶⁴
Monooxygenase	<i>Bacillus megaterium</i>	117,6 ¹⁶⁵	70+1 ¹⁶⁵
Peroxidase	Meerrettich	44 ¹⁶⁶	6+1 ¹⁶⁶
Proteinase K	<i>Tritirachium album</i>	28,9 ¹⁶⁷	8+1 ¹⁶⁷
Collagenase	<i>Clostridium histolyticum</i>	114 ¹⁶⁸	110+1 ¹⁶⁸
Papain	<i>Carica papaya</i>	23,4 ¹⁶⁹	10+1 ¹⁶⁹
Trypsin	Schweinepankreas	24,9 ¹⁷⁰	12+1 ¹⁷¹
α -Chymotrypsin	Rinderpankreas	25,2 ¹⁷²	14+1 ¹⁷³

3.3.1 Direkte Terminierung

Für die direkte Terminierung in reinem CHCl₃ wurden ca. 7 mg des Enzyms in 1 mL eines 0,5 mM Carbonatpuffer pH 9,65 gelöst und danach lyophilisiert (s. Kap. 3.5.3). Nach vollständiger Sublimation wurden die Enzyme bei -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Für die Terminierungsreaktion wurden 20 äq. des lebenden POX, bezogen auf die Aminogruppen des Enzyms, inert zugegeben und der Ansatz für 2 d bei RT gerührt. Anschließend wurde das CHCl₃ am RotV entfernt und die Probe in Wasser gelöst. Mittels Ultrafiltration wurde ein Teil des überschüssigen Polymers entfernt und

die Probe mittels TNBS-Assay (s. Kap. 3.11.1) bzw. SDS-PAGE (s. Kap. 3.9.1) analysiert.

Bei der direkten Terminierung in einer Emulsion aus Carbonatpuffer und CHCl_3 wurden ca. 7 mg Enzym in 1 mL eines 0,5 mM Carbonatpuffers mit einem pH 9,65 gelöst. Anschließend wurden 20 äq. der lebenden POX, bezogen auf die Aminogruppen des Enzyms, inert zugegeben und der Ansatz für 2 d bei RT gerührt. Die Aufarbeitung und Analytik erfolgte analog der direkten Terminierung in reinem CHCl_3 .

3.3.2 Hexamethylendiisocyanat als Linker

3.3.2.1 Synthese des aminoreaktiven POX-Derivates

266,98 μL (1,67 mmol, 280,3 mg) Hexamethylendiisocyanat (HMDI) wurden in 6 mL trockenem CHCl_3 vorgelegt und mittels Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 1 g eines aminterminierten PMeOx (0,33 mmol) in 10 mL trockenem CHCl_3 gelöst und unter Rühren über einen Zeitraum von 45 min zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung weitere 15 min bei RT gerührt. Das Polymer wurde anschließend einmal umgefällt (s. Kap. 3.2.6.1) und unter Argonatmosphäre bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.3.2.2 Synthese von Polymer-Enzymkonjugaten

Für die Synthese der Polymer-Enzymkonjugate in reinem CHCl_3 wurden zu 7 mg Lysozym (lyophilisiert aus 0,5 mM Carbonatpuffer, pH 9,65) 20 äq. des aminoreaktiven PMeOx-Derivates (bezogen auf die primären Aminogruppen des Lysozyms) gelöst in 3 mL trockenem CHCl_3 gegeben.

Für den Ansatz in einer Puffer- CHCl_3 -Emulsion wurden 5 mg Lysozym in 100 μL des Carbonatpuffers gelöst. 20 äq. des aminoreaktiven PMeOx-Derivates (bezogen auf die primären Aminogruppen des Lysozyms) wurden in 3 mL CHCl_3 gelöst und zu dem gelösten Lysozym gegeben.

Für den Ansatz in reinem Puffer wurde ebenfalls 5 mg Lysozym verwendet. 20 äq. des aminoreaktiven PMeOx-Derivates, bezogen auf die Aminogruppen des Lysozyms, wurden in 3 mL des Carbonatpuffers gelöst und zum Lysozym gegeben.

Alle drei Ansätze wurden für 1 d bei RT gerührt. Danach wurden die Lösungsmittel am RotV vollständig entfernt und die Proben am Feinvakuum getrocknet. Die Proben wurden anschließend in bidest. Wasser gelöst und mittels SDS-PAGE analysiert (s. Kap 3.9.1).

3.3.3 *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat als Linker

3.3.3.1 Trocknung von Aceton

Die Herstellung von trockenem Aceton wurde unter Argonatmosphäre am RotV durchgeführt. Der RotV wurde durch Destillation von ca. 50 mL Toluol und im Anschluss Essigsäureethylester unter verminderter Kühlung und Argonatmosphäre getrocknet. Das Aceton wurde ca. 20 min am RotV bei leichtem Unterdruck (ca. 800 mbar) über ca. 300 $\frac{g}{L}$ wasserfreiem $CaSO_4$ gerührt. Anschließend wurde das Aceton bei 465 mbar und 40 °C mit ca. 10 Vol-% Vorlauf abdestilliert. Im Anschluss wurde das Aceton ein weiteres mal über $CaSO_4$ getrocknet und abdestilliert. Das Aceton wurde mittels einer ausgeheizten Transferkanüle in einen ausgeheizten und zu einem Drittel mit aktiviertem (ausgeheizt bei 350 °C) 3 Å Molsieb gefüllten und mit einem Septum verschlossenen Schlenkkolben überführt und das Septum mit Parafilm versiegelt.

3.3.3.2 Synthese des aminoreaktiven POX-Derivates

300 mg (0,069 mmol) des OH-terminierten PMeOx (OH-Terminierung s. Kap. 3.2.5.2) wurden in 20 mL trockenem $CHCl_3$ gelöst. 177,01 mg (10 äq., 0,691 mmol) *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat (DSC) wurden in 15 mL trockenem Aceton gelöst und zu dem in $CHCl_3$ gelösten Polymer gegeben. Danach wurden 84,4 mg 4-(Dimethylamino)-Pyridin (0,691 mmol) zugegeben und die Mischung bei 35 °C für 24 h gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Produkt mittels Umfällen (s. Kap. 3.2.6.1) und Dialyse (s. Kap. 3.2.6.2) aufgereinigt und unter Argonatmosphäre bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.3.3.3 Umsetzung mit Octylamin

100 mg (0,03 mmol) des aminoreaktiven POX-Derivates wurden in 4 mL trockenem $CHCl_3$ gelöst, danach wurden 10 äq. Octylamin (55,23 μL , 0,3 mmol) zugegeben. Der Ansatz wurde für 48 h bei RT gerührt, mittels Dialyse (s. Kap. 3.5.1) aufgearbeitet und anschließend durch 1H -NMR Spektroskopie (s. Kap. 3.1.4.2) charakterisiert.

3.3.3.4 Synthese von Polymer-Enzymkonjugaten

Für die Synthese der Polymer-Enzymkonjugate in reinem $CHCl_3$ wurden zu 2 mg lyophilisiertem Lysozym (Phosphatpuffer, 50 mM pH 7) 10 äq. des aminoreaktiven PMeOx-Derivates (bezogen auf die primären Aminogruppen des Lysozyms), gelöst in 1,5 mL trockenem $CHCl_3$, gegeben.

Für den Ansatz in einer Puffer- $CHCl_3$ -Emulsion wurden 2 mg Lysozym in 100 μL des

Phosphatpuffers gelöst. 10 äq. des aminoreaktiven PMeOx-Derivates (bezogen auf die primären Aminogruppen des Lysozyms) wurden in 1,5 mL CHCl_3 gelöst und zu dem gelösten Lysozym gegeben.

Für den Ansatz in reinem Puffer wurde ebenfalls 2 mg Lysozym verwendet. 10 äq. des aminoreaktiven PMeOx Derivates, bezogen auf die Aminogruppen des Lysozyms, wurden in 1,5 mL des Phosphatpuffers gelöst und zum Lysozym gegeben.

Alle drei Ansätze wurden für 4 h bei RT und im Anschluss für 48 h bei 4 °C gerührt. Danach wurden die Lösungsmittel am RotV vollständig entfernt und die Proben am Feinvakuum getrocknet. Die Proben wurden anschließend in bidest. Wasser gelöst und mittels SDS-PAGE analysiert (s. Kap 3.9.1).

3.3.4 Bernsteinsäuredichlorid als Linker

10 äq. an PMeOx, bezogen auf die primären Aminogruppen des Lysozyms (7 mg), wurden in 5 mL trockenem DMF bzw. Acetonitril gelöst. Es wurde ein molares Polymer zu Bernsteinsäuredichlorid (BSDC) Verhältnis von 1:0,8 verwendet. Das BSDC wurde zum gelösten Polymer gegeben und für 12 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 7 mg Lysozym in 1 mL eines 0,5 mM Carbonatpuffers pH 9,65 gelöst und zu der Polymerlösung gegeben. Einmal wurde das Lysozym nicht in Puffer gelöst sondern in 2 mL DMF dispergiert und zu der in DMF gelösten Polymer-BSDC-Lösung gegeben. In allen Fällen wurde die Reaktionsmischung nach der Zugabe des Enzyms für 24 h bei RT gerührt. Danach wurden die Proben gegen bidest. Wasser dialysiert (s. Kap.3.5.1) und lyophilisiert (s. Kap. 3.5.3) und mittels SDS-PAGE (s. Kap. 3.9.1) analysiert.

3.3.5 Pyromellitsäuredianhydrid als Linker

3.3.5.1 Trocknung von *N,N*-Dimethylformamid

Die Herstellung von trockenem und aminfreien *N,N*-Dimethylformamid (DMF) wurde am RotV unter Argonatmosphäre durchgeführt. Der RotV wurde durch Destillation von ca. 50 mL Toluol und im Anschluss Essigsäureethylester unter verminderter Kühlung und Argonatmosphäre getrocknet. Das DMF wurde ca. 25 min am RotV bei leichtem Unterdruck (ca. 500 mbar) über ca. 25 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Phosphorpentoxid als Trockenmittel bei RT gerührt und danach bei 17 mbar und 53 °C mit ca. 10 Vol-% Vorlauf abdestilliert. Anschließend wurden ca. 2 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ wasserfreies K_2CO_3 zugegeben und das DMF erneut bei 17 mbar und 53 °C mit ca. 10 Vol-% Vorlauf abdestilliert. Nach dem Überführen in eine ausgeheizte und mit aktiviertem (ausgeheizt bei 350 °C) 3 Å Molsieb zur Hälfte

gefüllte SCHOTT-Flasche wurde das getrocknete DMF dunkel bei 4 °C im Kühlschrank gelagert (Wassergehalt 4 - 50 ppm, gemessen per KARL-FISCHER-Titration).

3.3.5.2 Dimerisierungsuntersuchungen

Ein aminterminiertes PMeOx wurde in 2,5 mL trockenem und aminfreiem DMF gelöst. Anschließend wurde das Pyromellitsäuredianhydrid (PADA) in versch. molaren Verhältnissen (PMeOx:PADA = 1:0,3; 1:0,4; 1:0,5; 1:0,6; 1:0,8) zum gelösten Polymer gegeben und die Ansätze für 4 d bei 45 °C gerührt. Danach wurden die Proben mittels GPC analysiert.

3.3.5.3 Synthese von Polymer-Enzymkonjugaten in reinem DMF

Für die Synthese der Polymer-Enzymkonjugate (PEK) in reinem DMF wurden die entsprechende Menge PADA in 3 mL trockenem und aminfreiem DMF gelöst. Es wurden Polymer zu PADA Verhältnisse (molar) von 1:0,8; 1:0,5; und 1:0,076 verwendet. Die Polymermenge, welche im Anschluss zugegeben wurde, wurde mit einem 9-fachen molaren Überschuss (10 äq.) bezogen auf die primären Aminogruppen des Enzyms (7 mg) berechnet. Die Reaktionsmischung wurde für 12 h bei RT gerührt. Das Enzym, welches in 1 mL 0,5 mM Carbonatpuffer pH 9,65 gelöst und dann lyophilisiert (s. Kap. 3.5.3) wurde, wurde in 2 mL DMF dispergiert und tropfenweise über einen Zeitraum von 15 min zu der POX-PADA-Mischung gegeben. Die Proben wurden mittels DLS (s. Kap. 3.1.4.4) analysiert, im Anschluss gegen bidest. Wasser dialysiert (s. Kap. 3.5.1) gegebenenfalls aufkonzentriert (s. Kap. 3.5.2) und mittels SDS-PAGE (s. Kap. 3.9.1), IEF (s. Kap. 3.9.2) sowie SEC (s. Kap. 3.1.4.6) untersucht.

3.3.5.4 Synthese von Polymer-Enzymkonjugaten in DMF-Puffer-Mischung

Generell wurde für die Synthese der PEK in der DMF-Puffer-Mischung die entsprechende Menge PADA in 5 mL trockenem und aminfreiem DMF gelöst. Es wurde ein Polymer zu PADA Verhältnis von 1:0,8 verwendet. Die Polymermenge, welche im Anschluss zugegeben wurde, wurde mit einem 9-fachen molaren Überschuss (10 äq.) bezogen auf die primären Aminogruppen des Enzyms (7 mg) berechnet. Die Reaktionsmischung wurde für 12 h bei RT gerührt. Das Enzym, wurde danach in 1 mL 0,5 mM Carbonatpuffer pH 9,65 gelöst die Polymer-PADA Mischung zugegeben und der Ansatz für 24 h bei RT gerührt. Danach wurden die Proben dialysiert, (s. Kap. 3.5.1) gegebenenfalls aufkonzentriert (s. Kap. 3.5.2) und entweder direkt mittels SDS-PAGE (s. Kap. 3.9.1), IEF (s. Kap. 3.9.2) sowie SEC (s. Kap. 3.1.4.6) untersucht oder zuerst lyophilisiert (s. Kap. 3.5.3) und dann mit den zuvor genannten Methoden analysiert.

Für die nicht wasserlöslichen hydrophoben POX (PBuOx, PBuOx-*b*-PMeOx, PHeptOx, PHeptOx-*b*-PMeOx) wurde der Polymer-PADA-Lösung vor der Zugabe des gelösten Enzyms ein Lösungsvermittler zugegeben. Als Lösungsvermittler wurden für die PBuOx-Derivate 3 mL MeOH bzw. EtOH, 1 mL THF oder 80 mg Aerosol OT (AOT) und für die PHeptOx-Derivate 1 mL THF bzw. CHCl₃ oder 80 mg AOT eingesetzt.

3.3.5.5 Bestimmung der Transparenz

Die Lichtdurchlässigkeit der PEK-Lösungen ($1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) wurde photometrisch bei 760 nm und 25 °C in einem temperierten Photometer gegen das reine Lösungsmittel als Referenz in 0,2 cm Küvetten vermessen.

3.4 Synthese von Poly(2-Oxazolin)-Coenzymkonjugaten

3.4.1 Direkte Terminierung

Für den Vorversuch der direkten Terminierung von NADP⁺ in reinem CHCl₃ wurden zu 10 mg (0,0134 mmol) NADP⁺ (NADP Na₂) 5 äq. (0,067 mmol) eines lebenden PMeOx gegeben und für 2 d bei RT gerührt. Anschließend wurde das CHCl₃ am RotV entfernt, die Probe in Wasser gelöst, dialysiert (s. Kap. 3.2.6.2, 2 kDa MWCO) und abschließend lyophilisiert (s. Kap. 3.5.3). Für den Vorversuch der direkten Terminierung in einer Emulsion aus Puffer und CHCl₃ wurden 10 mg NADP⁺ (0,0134 mmol) in 200 µL Carbonatpuffer (0,5 mM, pH 9,65) gelöst 5 äq. (0,067 mmol) eines lebenden PMeOx zugegeben und für 2 d bei RT gerührt. Anschließend wurde das CHCl₃ am RotV entfernt, die Probe in Wasser gelöst und dialysiert (s. Kap. 3.2.6.2, 2 kDa MWCO). Von dem eingesetzten PMeOx wurde ein Präkursor von ca. 200 mg entnommen, welcher umgefällt (s. Kap. 3.2.6.1) und, ebenso wie die beiden Proben, mittels ¹H-NMR Spektroskopie (s. Kap. 3.1.4.2) charakterisiert wurde.

NAD steht hier für NAD⁺ oder NADH, da keine genauere Unterscheidung notwendig ist. Für die Synthese der POX-NAD-Konjugate wurde das Coenzym in Carbonatpuffer (0,5 mM, pH 9,65) gelöst (1,25 mL Puffer pro 200 mg NAD) und die lebenden POX in versch. molaren Verhältnissen zugegeben (POX:NAD Verhältnisse von 1:1, 1,5:1, 2,5:1, 5:1, 7,5:1, 10:1). Von den eingesetzten POX wurde jeweils ein Präkursor von ca. 200 mg entnommen, welcher umgefällt (s. Kap. 3.2.6.1) und mittels ¹H-NMR Spektroskopie (s. Kap. 3.1.4.2) charakterisiert wurde. Die resultierende Emulsion wurde 2 d bei RT gerührt, danach wurden die Lösungsmittel am RotV entfernt. Die Konjugate der wasserlöslichen POX (PMeOx, PEtOx) wurden dialysiert (s. Kap. 3.2.6.2, 1 kDa MWCO)

und abschließend lyophilisiert (s. Kap. 3.5.3). Die resultierenden Produkte wurde anschließend mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie (s. Kap 3.1.4.2) und in einigen Fällen auch mittels GPC (s. Kap. 3.1.4.1) charakterisiert. Die Konjugate der wasserunlöslichen POX (PHeptOx, PHeptOx-*b*-PMeOx) wurden nicht dialysiert, die Produkte wurden nach der Entfernung der Lösungsmittel im Feinvakuum getrocknet.

3.4.2 Bernsteinsäureanhydrid als Linker

Die Synthese von PMeOx-NAD⁺-Konjugaten wurde nach einer modifizierten Variante von WYKES *et al.* durchgeführt¹²³. Hierzu wurden 500 mg NAD⁺ (0,75 mmol) sowie 20 g (0,2 mol) Bernsteinsäureanhydrid (BSSA) in 50 mL trockenes DMSO gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 4 d bei RT gerührt. Um das überschüssige BSSA zu entfernen, wurde der Ansatz in 250 mL Aceton gefällt. Nach 10 minütigem Rühren wurde das Bernsteinsäure-NAD⁺-Derivat durch Zentrifugation (10 min 3864 · *g*) und anschließendes Abdekantieren vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde verworfen und der resultierende Feststoff dreimal unter Rühren mit Aceton gewaschen und wiederum durch Zentrifugation vom Überstand getrennt.

50 mg des Bernsteinsäure-NAD⁺-Derivates wurden in 0,25 mL bidest. Wasser gelöst und 0,25 mL Pyridin (0,245 mg, 3,1 μmol) hinzugegeben. Danach wurden 12,5 mg (0,061 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid gelöst in 50 μL Pyridin hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 12 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurden 200 mg (0,049 mmol) eines aminterminierten PMeOx, gelöst in 0,8 mL bidest. Wasser, zugegeben und die Reaktionsmischung für 4 h bei RT gerührt. Hiernach wurden 2 mL Wasser hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 5 min bei 3864 · *g* zentrifugiert. Der abzentrifugierte Feststoff wurde verworfen und der Überstand gegen bidest. Wasser für 3 d dialysiert (1000 Da MWCO) und abschließend lyophilisiert (s. Kap.3.5.3). Das Produkt wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie (s. Kap 3.1.4.2) charakterisiert.

3.5 Aufreinigung der Enzym- und Coenzymkonjugate

3.5.1 Dialyse

Es wurden benzoilyerte Cellulosemembranen (ZelluTrans Roth V) der Firma Roth verwendet. Für die Dialyse der wasserlöslichen Lysozym PEKs wurden die Dialysemembranen mit einem MWCO von 5 kDa eingesetzt, für alle anderen wasserlöslichen PEKs wurde ein MWCO von 10 kDa eingesetzt. In den Dialyseschlauch wurde etwas bidest. Wasser gegeben und die in DMF bzw. DMF-Puffer-Mischung gelösten Konjuga-

te im Anschluss zugegeben. Die Dialyse erfolgte für 2 - 4 d gegen bidest. Wasser. Eines der in reinem DMF synthetisierten PMeOx-Lysozymkonjugate wurde gegen CHCl_3 dialysiert. Hierbei wurde der Dialyseschlauch nicht konditioniert (5 kDa MWCO). Im Fall einiger, in der DMF-Puffer-Mischung synthetisierten Laccasekonjugate, welche für SHARPLESS-Dihydroxylierung verwendet wurden, wurde zuerst 1 d gegen bidest. Wasser dialysiert dann für 1 d gegen eine 10 mM EDTA Lösung und zum Abschluss nochmals 2 d gegen bidest. Wasser (10 kDa MWCO). Das für die Aktivitätsmessungen verwendete PMeOx-Laccasekonjugat wurde gegen einen Acetatpuffer (1 mM, pH 4,5) mit 0,8 mM CuSO_4 dialysiert.

Falls notwendig, wurden die dialysierten Proben mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Hierzu gehörten alle Proben für die isoelektrische Fokussierung (s. Kap. 3.9.2). Im Anschluss wurden die Konjugate mittels Lyophilisation (s. Kap 3.5.3) getrocknet.

Für die Dialyse der in der DMF-Puffer-Mischung synthetisierten PBuOx-, PBuOx-*b*-PMeOx- bzw. PHeptOx-, PHeptOx-*b*-PMeOx-Konjugate gegen THF, MeOH oder EtOH (2 d) wurden ebenfalls Dialysemembranen mit 10 kDa MWCO verwendet. Hierbei wurde direkt gegen THF, MeOH oder EtOH dialysiert ohne vorherige Konditionierung der Membran. Die Dialyse der PBuOx-Derivat- bzw. PHeptOx-Derivat-Konjugate gegen Toluol erfolgte zuerst gegen THF wie bereits beschrieben. Im Anschluss wurde dann langsam der Toluolgehalt des Dialysemediums erhöht. Hierbei wurden ebenfalls Membranen mit 10 kDa MWCO eingesetzt.

Für die Dialyse der Coenzymkonjugate wurde eine Dialysemembran mit 1 kDa bzw. 2 kDa verwendet und es wurde 2 d gegen bidest. Wasser dialysiert.

3.5.2 Ultrafiltration

Für die Konzentrierung und Entsalzung der Proben wurden je nach Volumen die Amicon[®] Ultra-15 Zentrifugationsfiltereinheiten (Millipore) oder die Microcon[®] Zentrifugationsfiltereinheiten (Millipore) verwendet. Alle Ultrafiltrationseinheiten hatten einen MWCO von 10 kDa. Vor der ersten Verwendung wurden sie mit bidest. Wasser gespült. Die Amicon[®] Ultra-15 Ultrafiltrationseinheiten wurden bei $3600 \cdot g$, die Microcon[®] Ultrafiltrationseinheiten bei $13000 \cdot g$ zentrifugiert.

3.5.3 Lyophilisation

Die Enzym- und Coenzymkonjugate wurden nach Abbruch der Dialyse in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Das Wasser wurde mittels einer

Alpha 1-4 LD plus Gefriertrocknungsanlage (s. Tab. 3.5) bei 0,001 mbar und $-56\text{ }^{\circ}\text{C}$ Kondensatortemperatur vollständig sublimiert. Des Weiteren wurden reine Enzyme nach dem Lösen in Puffer auf die gleiche Weise gefriergetrocknet.

3.6 Synthese von amphiphilen Polymerconetzwerken

Die verwendeten amphiphilen Polymerconetzwerke wurden dankenswerterweise von Frau Dipl.-Ing. Ina Schönfeld hergestellt. Die Synthese ist hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Für die Polymerisation des verwendeten PEO wurden unter Argon in 12 mL trockenem CHCl_3 0,16 g (0,606 mmol) des Initiators *p*-Dibromxylool (2-mal umkristallisiert aus CHCl_3) gelöst und im Anschluss 3 mL des Monomers zugegeben. Die Polymerisation erfolgte für 4 h bei $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Synthesemikrowelle. Nach der Polymerisation wurden zwei Spatelspitzen Butylhydroxytoluol, sowie zur Terminierung 5,5 mL *N*-(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamid (5,17 g, 0,03 mol) zugegeben und unter Lichtausschluss bei $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 d terminiert. Nach der Terminierung wurde das Polymer durch Umfällen aufgereinigt, wie in Kap. 3.2.6.1 beschrieben. Das für die Netzwerksynthese benötigte 2-Hydroxyethylacrylat wurde unter Argon bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ölbadtemperatur) und 0,6 mbar destilliert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Tiefkühlschrank gelagert. 4 mg der ADH (aus *S. cerevisiae*) sowie 0,1 mg (0,15 μmol) NAD^+ bzw. eine äquivalente Menge des Coenzymkonjugates wurden in 30 μL eines 10 mM KH_2PO_4 Puffers (pH 7,8) gelöst. Zu der Lösung wurden 71,14 mg PEO ($M_n = 5000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$) gegeben und gründlich gemischt. Danach wurden 0,8 mg des Initiators Irgacure 651 sowie 30,13 mg (0,258 mmol) 2-Hydroxyethylacrylat zugeben und wiederum gemischt. Die Reaktionsmischung wurde auf einen mit Tesafilm beklebten Objektträger aufgegeben und mit einem weiteren ebenfalls mit Tesafilm beklebten Objektträger abgedeckt. Als Abstandhalter zwischen den Objektträger dienten drei übereinandergeklebte Tesafilmstreifen (Gesamtdicke $\approx 170\text{ }\mu\text{m}$). Die Polymerisation erfolgte für dreimal 180 s in einer UV-Polymerisationskammer, wobei ein Seitenwechsel erfolgte. Nach Ablösen des Polymernetzwerkes vom Objektträger wurde dieser bis zu seiner Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Tiefkühlschrank gelagert.

3.7 Enzymatische Aktivitätsbestimmung im Wässrigen

In allen Assays wurde bei der Aktivitätsbestimmung der Polymer-Enzymkonjugate für die Berechnung der Enzymkonzentration (c_{Enzym}) bzw. für die Enzymmasse (m_{Enzym}) der berechnete Enzymgehalt des entsprechenden Konjugates verwendet und **nicht** die Einwaage des Konjugates. Das heißt, die spezifische enzymatische Aktivität ($\frac{U}{\text{mg}}$ bzw. $\frac{\hat{U}}{\text{mg}}$) der Polymer-Enzymkonjugate bezieht sich auf das reine Enzym im Konjugat. Der Enzymgehalt der Konjugate wurde aus der Masse des eingesetzten Enzyms vor der Modifikation sowie der Masse des resultierenden Konjugates nach der Aufarbeitung, unter der Annahme, dass bei der Modifikation kein Enzymverlust auftritt, berechnet.

3.7.1 Peptidase

3.7.1.1 Azocasein-Assay

Für die Messung der Peptidaseaktivität der Polymer-Enzymkonjugate sowie der reinen Enzyme mittels eines hochmolekularen Substrates ($\approx 23,6$ kDa Sigma-Aldrich Produktdatenblatt¹⁷⁴) wurde eine modifizierte Variante des Azocasein-Assays eingesetzt^{175,176}. Dieser Assay beruht auf der Abspaltung farbstoffgekoppelter Peptide von dem Substrat Azocasein. Die freigesetzten farbigen Peptide sind, im Gegensatz zum Azocasein selbst, in einer Trichloressigsäurelösung löslich. Das nicht hydrolysierte Azocasein wird ausgefällt, abzentrifugiert und der Überstand anschließend photometrisch vermessen.

Benötigte Lösungen:

- 0,1 M TRIS-HCl-Puffer pH 6: 15,7 g TRIS-HCl in ca. 80 mL bidest. Wasser lösen, anschließend auf pH 6 einstellen und auf 100 mL auffüllen, Lagerung bei 4 °C
- 0,5 %ige Azocaseinlösung: Lagerung max. eine Woche bei 4 °C
- 3 %ige Trichloressigsäure-Lsg.: Lagerung bei 4 °C

Für den Blindwert wurden ca. 140 μL der Probe für 15 min in kochendem Wasser erhitzt. Es wurden für den Blindwert sowie für den Testansatz jeder Probe 300 μL des 0,1 M TRIS-HCl-Puffers sowie 100 μL der Azocaseinlösung in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß gemischt und fünf min bei 40 °C vorgewärmt. Danach wurden 100 μL der Probe bzw. für den Blindwert der inaktivierten Probe zugesetzt. Dieser Ansatz wurde für 15 min bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurden 750 μL der 3 %igen TCA-Lsg.

hinzugefügt, die Gefäße für zehn min auf Eis gestellt und die ausgefällten Proteine bei $18000 \cdot g$ abzentrifugiert. Die Messung der klaren Überstände erfolgte mit Halbmikroküvetten bei 366 nm und 25 °C in einem temperierten Photometer gegen Wasser als Referenz.

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\hat{U}_{\text{Protease}}}{\text{mg}} = \frac{\Delta E_{366 \text{ nm}} \cdot 60 \text{ min}}{V_{\text{Probe}} \cdot 15 \text{ min} \cdot 0,01 \cdot c_{\text{Enzym}}} \quad (3.6)$$

mit:

c_{Enzym} = Enzymkonzentration der Probe in $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\Delta E_{366 \text{ nm}}$ = Extinktion der Probe - Extinktion des Blindwertes

$V_{\text{Probe}} = 0,1 \text{ mL}$

Hierbei ist eine $\hat{U}_{\text{Protease}}$ definiert als die Enzymmenge, die in einer Stunde eine Extinktionsdifferenz von 0,01 hervorruft (arbitrary units).

3.7.1.2 *N*-Succinyl-L-Phenylalanin-*p*-Nitroanilid-Assay

Die Proteaseaktivität der Polymer-Enzymkonjugate sowie der reinen Enzyme bezüglich eines niedermolekularen Substrates wurde photometrisch mittels *N*-Succinyl-L-Phenylalanin-*p*-Nitroanilid (SPNA) gemessen¹⁷⁷. Der Assay beruht auf der Freisetzung des farbigen *p*-Nitroanilin durch enzymatische Aktivität.

Benötigte Lösungen:

- 0,5 mM SPNA-Lösung: 19,3 mg SPNA in 1 mL Methanol lösen, frisch ansetzen
- 0,05 M TRIS-HCl Puffer pH 7,6 mit 0,02 M CaCl_2 : 1,97 g TRIS-HCl sowie 0,74 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in ca. 200 mL bidest. Wasser lösen auf pH 7,6 einstellen und anschließend auf 250 mL auffüllen
- 30 %ige Essigsäure-Lsg.

Es wurden 1225 μL des TRIS-HCl-Puffers sowie 25 μL der SPNA-Lsg. mit 250 μL der Probenlösung bzw. bidest. Wasser für den Blindwert in einem 2 mL Eppendorfgefäß gemischt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 250 μL der 30 %igen Essigsäure-Lsg. zugegeben. Die Messung erfolgte in Halbmikroküvetten bei 25°C und 410 nm gegen Wasser als Referenz.

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\Delta E_{410 \text{ nm}} \cdot 1,75 \text{ mL}}{V_{\text{Probe}} \cdot 15 \text{ min} \cdot \epsilon_{410 \text{ nm}} \cdot d_{\text{Küvette}} \cdot c_{\text{Enzym}}} \quad (3.7)$$

mit:

c_{Enzym} = Enzymkonzentration der Probe in $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\Delta E_{410 \text{ nm}}$ = Extinktion der Probe - Extinktion des Blindwertes

$V_{\text{Probe}} = 0,25 \text{ mL}$

$\epsilon_{410 \text{ nm}} = 8,8 \frac{\text{mL}}{\mu\text{mol}\cdot\text{cm}}$, molarer Extinktionkoeffizient von *p*-Nitroanilin¹⁷⁷

$d_{\text{Küvette}} = 1 \text{ cm}$

3.7.2 Lysozym

Die Aktivität der Lysozym PEKs sowie des reinen Enzyms wurde photometrisch nach einer modifizierten Variante von SHUGAR gemessen¹⁷⁸. Es wurden hierzu lyophilisierte *Micrococcus lysodeikticus* Zellen (0,015 % w/v) in 66 mM Phosphatpuffer pH 6 suspendiert. 2,5 mL der Zellsuspension wurden mittels eines temperierbaren Photometers auf 25 °C vorgewärmt und die Extinktion bei 450 nm gemessen bis diese konstant war. Anschließend wurden 100 μL Probe hinzugegeben und unter Rühren die Abnahme der Extinktion über ca. 5 min verfolgt. Für den Blindwert wurden 100 μL Puffer statt Probe verwendet. Die Messung erfolgte mit Vollküvetten bei 450 nm und 25 °C in einem temperierten Photometer gegen Wasser als Referenz.

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\hat{U}_{\text{Lysozym}}}{\text{mg}} = \frac{\frac{\Delta E_{450 \text{ nm,Probe}}}{\text{min}} - \frac{\Delta E_{450 \text{ nm,Blind}}}{\text{min}}}{V_{\text{Probe}} \cdot 0,001 \cdot c_{\text{Enzym}}} \quad (3.8)$$

mit:

c_{Enzym} = Enzymkonzentration der Probe in $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\frac{\Delta E_{450 \text{ nm}}}{\text{min}}$ = Abnahme der Extinktion pro min

$V_{\text{Probe}} = 0,1 \text{ mL}$

Hierbei ist eine \hat{U}_{Lysozym} definiert als die Enzymmenge, die in einer Minute eine Extinktionsdifferenz von 0,001 hervorruft (arbitrary units).

3.7.3 Laccase

3.7.3.1 2,6-Dimethoxyphenol-Assay

Die Aktivität der Laccase PEKs sowie des reinen Enzyms wurde photometrisch durch die Oxidation von 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) zu einem farbigen Produkt nach einer modifizierten Variante von WAN *et al.* bestimmt¹⁷⁹.

Benötigte Lösungen:

- 0,1 M Acetatpuffer pH 4,5: 0,6 g Essigsäure in 80 mL bidest. Wasser lösen, auf pH 4,5 einstellen und anschließend auf 100 mL auffüllen
- 28,8 mM DMP-Lösung: 44,5 mg DMP in 10 mL 0,1 M Acetatpuffer pH 4,5 unter leichtem Erwärmen lösen, frisch ansetzen

Es wurden 900 μL der DMP-Lsg. mittels eines temperierbaren Photometers auf 25 °C vorgewärmt. Anschließend wurden 100 μL der Probe zugegeben und die Zunahme der Extinktion über ca. 5 min verfolgt. Zur Bestimmung des Blindwertes wurden 100 μL bidest. Wasser statt Probe verwendet. Die Messung erfolgte in Halbmikroküvetten bei 468 nm und 25 °C gegen Wasser als Referenz.

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\hat{U}_{Laccase, 25\text{ }^\circ\text{C}}}{\text{mg}} = \frac{\frac{\Delta E_{468\text{ nm, Probe}}}{\text{min}} - \frac{\Delta E_{468\text{ nm, Blind}}}{\text{min}}}{V_{\text{Probe}} \cdot 0,001 \cdot c_{\text{Enzym}}} \quad (3.9)$$

mit:

c_{Enzym} = Enzymkonzentration der Probe in $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\frac{\Delta E_{468\text{ nm}}}{\text{min}}$ = Zunahme der Extinktion pro min

$V_{\text{Probe}} = 0,1\text{ mL}$

Hierbei ist eine $\hat{U}_{Laccase, 25\text{ }^\circ\text{C}}$ definiert als die Enzymmenge, die unter den gegebenen Bedingungen bei 25 °C in einer Minute eine Extinktionsdifferenz von 0,001 hervorruft (arbitrary units).

3.7.3.1.1 Inhibierungsuntersuchungen

Die Laccasestammlösung ($0,63\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) wurde im Verhältnis 1:50 mit einer 1 und 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Lsg. (in 0,1 M Acetatpuffer pH 4,5) sowie reinem Acetatpuffer verdünnt und für 12 h bei 8 °C inkubiert.

Für die Inhibierungsuntersuchungen wurde eine 13 mM DMP-Lsg. (20,04 mg DMP in 10 mL 0,1 M Acetatpuffer pH 4,5) verwendet. 980 μL der DMP-Lsg. wurden mittels eines temperierbaren Photometers auf 37 °C vorgewärmt. Anschließend wurden 20 μL der inkubierten Probe zugegeben und die Zunahme der Extinktion bei 37 °C und 468 nm über 60 min verfolgt. Zur Bestimmung des Blindwertes wurden 20 μL bidest. Wasser statt Probe verwendet. Die Messung erfolgte in Halbmikroküvetten gegen Wasser als Referenz. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte analog zu Gl. 3.9. Hierbei ist ein $\hat{U}_{\text{Laccase}, 37\text{ °C}}$ definiert als die Enzymmenge, die unter den gegebenen Bedingungen bei 37 °C in einer Minute eine Extinktionsdifferenz von 0,001 hervorruft (arbitrary units).

3.7.3.2 ABTS-Assay

Die Bestimmung der Aktivität der Laccase PEKs sowie des reinen Enzyms wurde photometrisch mit 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) als Substrat durchgeführt. Das ABTS wird hierbei durch die enzymatische Aktivität oxidiert, wobei ein stabiles Radikalkation ($\text{ABTS}^{+\bullet}$) gebildet wird, welches eine grünblaue Färbung hervorruft und bei 420 nm photometrisch detektiert werden kann. Der Assay wurde nach einer modifizierten Variante von MAJCHERCZYK *et al.* durchgeführt¹⁸⁰.

Benötigte Lösungen:

- 100 mM Natriumtartratpuffer: 2,3 g Natriumtartrat \cdot 2 H₂O in ca. 80 mL bidest. Wasser lösen auf pH 4,5 einstellen und anschließend auf 100 mL auffüllen
- 5 mM ABTS-Lösung: 13,7 mg ABTS in 5 mL bidest. Wasser lösen, frisch ansetzen

800 μL des Natriumtartratpuffers sowie 100 μL der ABTS-Lösung wurden gemischt und mittels eines temperierbaren Photometers auf 25 °C vorgewärmt. Anschließend wurde 100 μL der in Wasser gelösten Probe zugegeben und der Anstieg der Extinktion bei 420 nm über ca. 5 min verfolgt. Zur Bestimmung des Blindwertes wurden 100 μL bidest. Wasser statt Probe verwendet. Die Messung erfolgte in Halbmikroküvetten bei 25 °C gegen Wasser als Referenz.

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\frac{\Delta E_{420\text{ nm, Probe}}}{\text{min}} - \frac{\Delta E_{420\text{ nm, Blind}}}{\text{min}} \cdot 1\text{ mL}}{V_{\text{Probe}} \cdot \epsilon_{420\text{ nm}} \cdot d_{\text{Küvette}} \cdot c_{\text{Enzym}}} \quad (3.10)$$

mit:

c_{Enzym} = Enzymkonzentration der Probe in $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\frac{\Delta E_{420 \text{ nm}}}{\text{min}}$ = Zunahme der Extinktion pro min

$V_{\text{Probe}} = 0,1 \text{ mL}$

$\epsilon_{405 \text{ nm}} = 36 \frac{\text{mL}}{\mu\text{mol}\cdot\text{cm}}$, molarer Extinktionskoeffizient des oxidierten ABTS¹⁸⁰

$d_{\text{Küvette}} = 1 \text{ cm}$

3.7.4 Peroxidase

Die Bestimmung der Aktivität der Peroxidase PEKs sowie des reinen Enzyms erfolgte photometrisch. Hierbei wurde ebenfalls ABTS als Substrat verwendet. Der Assay wurde nach einer modifizierten Variante von PÜTTER und BECKER durchgeführt¹⁸¹.

Benötigte Lösungen:

- 100 mM Kaliumphosphatpuffer: 1,36 g KH_2PO_4 in ca. 80 mL bidest. Wasser lösen auf pH 5 einstellen und anschließend auf 100 mL auffüllen
- 9,1 mM ABTS-Lösung: 149,8 mg ABTS in 30 mL des 100 mM Kaliumphosphatpuffers lösen, frisch ansetzen und kühl halten
- 0,3 %ige Wasserstoffperoxidlösung: frisch ansetzen
- 40 mM Kaliumphosphatpuffer mit 0,25 % w/v BSA und 0,5 % v/v Triton X-100: 544,36 mg KH_2PO_4 in ca. 80 mL bidest. Wasser lösen 250 mg BSA und 500 μL Triton X-100 zugeben, auf pH 6,8 einstellen und anschließend auf 100 mL auffüllen, Lagerung max. eine Woche bei 4 °C

Die Proben wurden in dem 40 mM Kaliumphosphatpuffer mit BSA und Triton X-100 gelöst. Anschließend wurden 1,45 mL der ABTS-Lösung mit 25 μL der Probenlösung gemischt, mittels eines temperierbaren Photometers auf 25 °C vorgewärmt und die Extinktion bei 405 nm gemessen bis diese konstant war. Für den Blindwert wurden 25 μL des 40 mM Kaliumphosphatpuffers (mit BSA und Triton X-100) statt Probe verwendet. Anschließend wurden 50 μL der Wasserstoffperoxidlösung zugegeben und der Anstieg der Extinktion bei 405 nm über 5 min verfolgt. Die Messung erfolgte mit Vollküvetten bei 25 °C gegen Wasser als Referenz.

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\frac{\Delta E_{405 \text{ nm, Probe}}}{\text{min}} - \frac{\Delta E_{405 \text{ nm, Blind}}}{\text{min}} \cdot 1,525 \text{ mL}}{V_{\text{Probe}} \cdot \epsilon_{405 \text{ nm}} \cdot d_{\text{Küvette}} \cdot c_{\text{Enzym}}} \quad (3.11)$$

mit:

c_{Enzym} = Enzymkonzentration der Probe in $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\frac{\Delta E_{405 \text{ nm}}}{\text{min}}$ = Zunahme der Extinktion pro min

$V_{\text{Probe}} = 0,025 \text{ mL}$

$\epsilon_{405 \text{ nm}} = 36,8 \frac{\text{mL}}{\mu\text{mol}\cdot\text{cm}}$, molarer Extinktionskoeffizient des oxidierten ABTS¹⁸²

$d_{\text{Küvette}} = 1 \text{ cm}$

3.7.5 Alkoholdehydrogenase

Die Alkoholdehydrogenaseaktivität der ADH PEKs sowie des reinen Enzyms wurde photometrisch bestimmt¹⁸³. Zusätzlich wurde mit Hilfe dieses Assays die Aktivität des mit PMeOx bzw. PEtOx modifizierten, oxidierten Nicotinamidadenindinukleotids (NAD⁺) gemessen. Hierbei wird Ethanol zu Acetaldehyd oxidiert, wobei das Cosubstrat NAD⁺ im gleichen Schritt zu NADH reduziert wird, welches bei 340 nm detektiert werden kann.

Benötigte Lösungen:

- 50 mM Pyrophosphatpuffer pH 8,8: 664 mg Natriumpyrophosphat in 40 mL bidest. Wasser lösen mit Phosphorsäure auf pH 8,8 einstellen und anschließend auf 50 mL auffüllen
- 10 mM Natriumphosphatlösung: 156 mg NaH₂PO₄ · 2 H₂O in 100 mL bidest. Wasser lösen
- 10 mM Phosphatpuffer pH 7,5: 142 mg Na₂HPO₄ in 90 mL bidest. Wasser lösen und mit der 10 mM Natriumphosphatlösung auf pH 7,5 einstellen und anschließend auf 100 mL auffüllen
- 10 mM Phosphatpuffer pH 7,5 mit 0,1 % (w/v) BSA: 142 mg Na₂HPO₄ in 90 mL bidest. Wasser lösen 100 mg BSA zugeben und mit 1 M HCl auf pH 7,5 einstellen und anschließend auf 100 mL auffüllen
- 15 mM NAD⁺-Lösung: 49,75 mg NAD⁺ in 5 mL bidest. Wasser lösen, frisch ansetzen, kühl halten

- 95 %ige (v/v) Ethanollsg.: 9,5 mL absolut Ethanol mit bidest. Wasser auf 10 mL auffüllen
- ADH-Stammlsg.: 1 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ ADH in kaltem 10 mM Phosphatpuffer pH 7,5 lösen, frisch ansetzen, kühl halten
- ADH-Arbeitslösung: 10 μL ADH-Stammlsg. mit 4990 μL kaltem 10 mM Phosphatpuffer **mit** BSA verdünnen, direkt vor der Messung frisch herstellen, kühl halten

Für die Bestimmung der ADH-Aktivität wurden 1,3 mL des 50 mM Pyrophosphatpuffers mit 1,1 mL EtOH-Lsg. und 1,5 mL der NAD^+ -Lsg. gemischt, mittels eines temperierbaren Photometers auf 25 °C vorgewärmt und die Extinktion bei 340 nm gemessen, bis diese konstant war. Anschließend wurden 100 μL Probe hinzugegeben und die Zunahme der Extinktion bei 340 nm und 25 °C über ca. 7 min gegen Wasser als Referenz gemessen. Für die Bestimmung des Blindwertes wurden 100 μL der 10 mM Phosphatpuffer pH 7,5 mit BSA verwendet.

Für die Messungen mit modifiziertem NAD^+ wurden Verdünnungsreihen sowohl des modifizierten als auch des reinen NAD^+ vermessen, welche statt der oben angegebenen NAD^+ -Lsg. eingesetzt wurden. Hierbei wurde ADH aus *S. cerevisiae* eingesetzt.

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\left(\frac{\Delta E_{340 \text{ nm, Probe}}}{\text{min}} - \frac{\Delta E_{340 \text{ nm, Blind}}}{\text{min}} \right) \cdot V_{\text{gesamt}}}{V_{\text{Probe}} \cdot \epsilon_{340 \text{ nm}} \cdot c_{\text{Enzym}} \cdot d_{\text{Küvette}}} \quad (3.12)$$

mit:

c_{Enzym} = Enzymkonzentration der Probe in $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\frac{\Delta E_{340 \text{ nm}}}{\text{min}}$ = Zunahme der Extinktion pro min

$V_{\text{Probe}} = 0,1 \text{ mL}$

$V_{\text{gesamt}} = 4 \text{ mL}$

$\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,22 \frac{\text{mL}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}$, molarer Extinktionskoeffizient des NADH^{184}

$d_{\text{Küvette}} = 1 \text{ cm}$

3.7.6 Lipase

Die Aktivität der Lipase PEKs sowie der reinen Enzyme wurde photometrisch mit *p*-Nitrophenylpalmitat (pNpp) als Substrat nach einem modifizierten Protokoll von WINKLER und STUCKMANN ermittelt¹⁸⁵.

Benötigte Lösungen:

- 7,95 mM pNpp-Lsg.: 12 mg pNpp in 4 mL 2-Propanol lösen, frisch ansetzen
- 50 mM Sörensen-Phosphatpuffer pH 8: 17:1 Mischung aus $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lsg. ($8,9 \frac{\text{g}}{\text{L}}$ in bidest. Wasser) und KH_2PO_4 -Lsg. ($6,8 \frac{\text{g}}{\text{L}}$ in bidest. Wasser)
- Gummi-Arabicum-Lsg.: 40 mg Gummi-Arabicum und 82,8 mg Natriumdesoxycholat ($0,2 \text{ mmol}$) in 36 mL des 50 mM Sörensenpuffers lösen

Die Substratlösung wurde aus 4 mL der pNpp-Lsg., welche unter starkem Rühren zu 36 mL der Gummi-Arabicum-Lsg. gegeben wurde, hergestellt. Für die Messung wurden $960 \mu\text{L}$ der Substratlösung 5 min im Thermomixer auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmt und anschließend $40 \mu\text{L}$ der Probe zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 650 rpm bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 410 nm gemessen. Für den Blindwert wurden $40 \mu\text{L}$ bidest. Wasser statt Probe verwendet. Die Messung erfolgte mit Halbmikroküvetten gegen Wasser als Referenz.

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\Delta E_{410 \text{ nm}} \cdot 1 \text{ mL}}{V_{\text{Probe}} \cdot 15 \text{ min} \cdot \epsilon_{410 \text{ nm}} \cdot c_{\text{Enzym}}} \quad (3.13)$$

mit:

c_{Enzym} = Enzymkonzentration der Probe in $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\Delta E_{410 \text{ nm}}$ = Extinktion der Probe - Extinktion des Blindwertes

$V_{\text{Probe}} = 0,1 \text{ mL}$

$\epsilon_{410 \text{ nm}} = 18,45 \frac{\text{mL}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}$ molarer Extinktionskoeffizient des *p*-Nitrophenol

Der molare Extinktionskoeffizient wurde über eine Verdünnungsreihe von *p*-Nitrophenol, gelöst in der Gummi-Arabicum Lsg., ermittelt.

3.8 Enzymatische Aktivitätsbestimmung in organischen Lösungsmitteln

In allen Assays wurde bei der Aktivitätsbestimmung der Polymer-Enzymkonjugate für die Berechnung der Enzymkonzentration (c_{Enzym}) bzw. für die Enzymmasse (m_{Enzym}) der berechnete Enzymgehalt des entsprechenden Konjugates verwendet und **nicht** die Einwaage des Konjugates. Das heißt, die spezifische enzymatische Aktivität ($\frac{U}{\text{mg}}$ bzw.

$\frac{\hat{v}}{\text{mg}}$) der Polymer-Enzymkonjugate bezieht sich auf das reine Enzym im Konjugat. Der Enzymgehalt der Konjugate wurde aus der Masse des eingesetzten Enzyms vor der Modifikation sowie der Masse des resultierenden Konjugates nach der Aufarbeitung, unter der Annahme, dass bei der Modifikation kein Enzymverlust auftritt, berechnet.

3.8.1 Peptidase

Die Aktivität der versch. Polymer-Peptidasekonjugate sowie des reinen Enzyms wurde durch eine Umesterung von *N*-Acetyl-L-phenylalaninethylester (APEE) mittels 1-Propanol zu *N*-Acetyl-L-phenylalaninpropylester (APPE) in versch. org. Lösungsmitteln mit versch. Wassergehalten gemessen⁷⁸. Die Wassergehalte wurden bestimmt mittels KARL-FISCHER Titration. Als Lösungsmittel wurden CHCl_3 (1 ppm), sowie THF (22000 ppm, 500 ppm) verwendet. Die Bildung des Produktes APPE wurde per GC quantitativ verfolgt (s. 3.1.4.8).

Benötigte Lösung für die Experimente in CHCl_3 :

- 60 mM APEE-Lsg. mit 2 M 1-Propanol und 0,002 mM *n*-Tetradecan: 144 mg APEE in 8,5 mL des Lösungsmittels lösen, 1,5 mL 1-Propanol und 5,2 μL *n*-Tetradecan zugeben

Bei den Messungen in CHCl_3 wurden die Konjugate in 1 mL des Lösungsmittels gelöst. Anschließend wurde 1 mL der Substratlösung (APEE, 1-Propanol, *n*-Tetradecan) zugegeben.

Bei den Messungen in THF befand sich das Konjugat nach der Dialyse bereits in Lösung, daher wurden hier 0,06 mmol (14,4 mg) APEE, 2 mmol (149,6 μL) 1-Propanol sowie 0,002 μmol (0,52 μL *n*-Tetradecan) zu 2 mL der konjugathaltigen THF-Lösung gegeben.

Anschließend wurden die Proben unter Rühren bei 37 °C inkubiert. Für die Bestimmung des Blindwertes wurde reines Lsgm. verwendet. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden ca. 45 μL Probe genommen und per GC (s. Kap. 3.1.4.8) analysiert.

3.8.2 Lipase

Die Aktivität der versch. Lipase Polymer-Enzymkonjugate, der reinen sowie immobilisierten Enzyme wurde mittels einer Veresterung von 1-Oktanol mit Laurinsäure in versch. org. Lösungsmitteln und mit versch. Wassergehalten sowie unterschiedlichen Temperaturen (0, 10, 18, 28, 37 °C) bestimmt⁷⁷. Es wurden folgende Lsgm. verwendet: CHCl_3 (0 ppm, 300 ppm, 700 ppm, wassergesättigt), Toluol sowie THF

(22000 ppm, 500 ppm). Die Wassergehalte wurden mittels KARL-FISCHER Titration bestimmt. Die Bildung des Produktes Laurinsäureoktylester wurde per GC quantitativ verfolgt (s. 3.1.4.8).

Benötigte Lösungen:

- 200 mM Laurinsäurelösung: 400 mg Laurinsäure in 10 mL des Lsgm. lösen
- 400 mM 1-Oktanollösung mit 0,004 mM *n*-Tetradecan: 656,5 μL 1-Oktanol sowie 10,4 μL *n*-Tetradecan zu 10 mL des Lsgm. geben
- 0,002 mM methanolische *n*-Tetradecan Lsg.: 5,2 μL *n*-Tetradecan zu 10 mL MeOH geben

Das Polymer-Lipasekonjugat wurde in das Lösungsmittel gegeben und 2 h bei 37 °C unter Rühren gelöst bzw. beim reinen Enzym dispergiert. Die immobilisierte Lipase wurde direkt in das Lösungsmittel gegeben. Bei den Messungen in Toluol befand sich das Konjugat nach der Dialyse bereits in Lösung, daher wurde hier 1 mL dieser Lösung verwendet.

Zu 1 mL der Probelösung wurden 500 μL der Laurinsäurelösung sowie 500 μL der tetradecanhaltigen 1-Oktanollösung gegeben. Anschließend wurden die Proben unter Rühren bei der gewählten Temperatur inkubiert. Für die Bestimmung des Blindwertes wurde reines Lsgm. verwendet. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden jeweils ca. 45 μL Probe genommen und mit 1,5 μL β -Mercaptoethanol versetzt und per GC (s. Kap. 3.1.4.8) analysiert. Im Falle der Messungen in Toluol wurden 40 μL Probe genommen, welche mit 3 μL β -Mercaptoethanol sowie zusätzlich 40 μL der methanolischen *n*-Tetradecanlösung versetzt wurde.

3.8.3 Laccase

Die Aktivität der Polymer-Laccasekonjugate sowie des reinen Enzyms wurde in CHCl_3 , wie im Wässrigen, photometrisch durch die Oxidation von 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) zu einem farbigen Produkt nach einer modifizierten Variante von WAN *et al.* bestimmt (vgl. 3.7.3.1)¹⁷⁹.

Die Laccaseaktivität wurde sowohl in trockenem (0 ppm, s. Kap. 3.2.3), wie auch in wassergesättigtem CHCl_3 (bestimmt mittels KARL-FISCHER Titration) gemessen. Hierzu wurde eine 26 mM DMP-Lsg. (40,08 mg in 10 mL trockenem bzw. wassergesättigtem CHCl_3) verwendet.

Das Polymer-Enzymkonjugat wurde in 1 mL CHCl_3 (1 ppm bzw. wassergesättigt)

gelöst bzw. im Fall des reinen Enzyms dispergiert. Anschließend wurde 1 mL der DMP-Lsg. hinzugegeben und unter Rühren die Zunahme der Extinktion bei 468 nm und 37 °C über einen Zeitraum von ca. 5 min für das Konjugat bzw. 60 min für das reine Enzym verfolgt. Bei der Messung der Konjugate wurde die Reaktionsmischung außerdem in einigen Versuchen vor der Messung bzw. erneuten Messung mittels einer Kanüle mit reinem Sauerstoff begast.

Zur Bestimmung des Blindwertes wurde 1 mL reines CHCl_3 an Stelle der Probe verwendet. Die Messung erfolgte in Quarzglasvollküvetten bei 468 nm und 37 °C gegen reines CHCl_3 als Referenz.

Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\hat{U}_{Laccase,org.}}{\text{mg}} = \frac{\frac{\Delta E_{468 \text{ nm,Probe}}}{\text{min}} - \frac{\Delta E_{468 \text{ nm,Blind}}}{\text{min}}}{0,001 \cdot m_{\text{Enzym}}} \quad (3.14)$$

mit:

m_{Enzym} = Enzymmasse in mg

$\frac{\Delta E_{468 \text{ nm}}}{\text{min}}$ = Zunahme der Extinktion pro min

$V_{\text{Probe}} = 0,1 \text{ mL}$

Hierbei ist ein $\hat{U}_{Laccase,org.}$ definiert als die Enzymmenge, die unter den gegebenen Bedingungen bei 37 °C in einer Minute eine Extinktionsdifferenz von 0,001 hervorruft (arbitrary units).

3.8.4 Peroxidase

Die Aktivität der Polymer-Peroxidasekonjugate sowie des reinen Enzyms wurde in CHCl_3 photometrisch durch die oxidative Kupplung von *N,N*-Dimethyl-*p*-Phenylen-diamin (DPD) und Phenol mit *tert*-Butylhydroperoxid nach einer modifizierten Methode von BRUNS und TILLER bestimmt⁷⁵.

Benötigte Lösungen:

- 20 mM DPD-Lsg.: 5,4 mg DPD in 2 mL CHCl_3 lösen, frisch ansetzen
- 20 mM Phenollösung: 3,8 mg Phenol in 2 mL CHCl_3 lösen
- 10 mM *tert*-Butylhydroperoxid-Lsg.: 1,82 μL 6 molare *tert*-Butylhydroperoxid-Lsg. (in Decan) in 2 mL CHCl_3 lösen

Das Polymer-Enzymkonjugat wurde in 900 μL CHCl_3 gelöst bzw. im Fall des reinen Enzyms dispergiert. Im Anschluss wurden 100 μL der DPD-Lsg., 100 μL der Phenollösung sowie 100 μL der *tert*-Butylhydroperoxid-Lsg. hinzugefügt und gemischt. Die Zunahme der Extinktion wurde unter konstantem Rühren über ca. 60 min bei 546 nm und 25 °C beobachtet. Zur Bestimmung des Blindwertes wurden 900 μL reines CHCl_3 ohne Enzym bzw. Konjugat verwendet. Die Messung erfolgte in Quarzglasküvetten gegen reines CHCl_3 als Referenz.

$$\frac{\hat{U}_{\text{Peroxidase}}}{\text{mg}} = \frac{\frac{\Delta E_{546 \text{ nm, Probe}}}{\text{min}} - \frac{\Delta E_{546 \text{ nm, Blind}}}{\text{min}}}{0,001 \cdot m_{\text{Enzym}}} \quad (3.15)$$

mit:

m_{Enzym} = Enzymmasse in mg

$\frac{\Delta E_{546 \text{ nm}}}{\text{min}}$ = Zunahme der Extinktion pro min

Für ein Reaktionsvolumen von 1,2 mL

Hierbei ist ein $\hat{U}_{\text{Peroxidase}}$ definiert als die Enzymmenge, die unter den gegebenen Bedingungen bei 25 °C in einer Minute eine Extinktionsdifferenz von 0,001 hervorruft (arbitrary units).

3.8.5 Alkoholdehydrogenase

Die Aktivität der ADH PEKs, des reinen Enzyms sowie der Einfluss der Konjugation der Coenzyme auf die Aktivität der ADH wurden im organischen Medium durch die Oxidation von 2-Oktanol bzw. die Reduktion von 2-Oktanon untersucht. Der Assay wurde auf Grundlage der Arbeit von YANG und RUSSELL¹⁸⁶ entwickelt.

Für die Bestimmung der ADH-Aktivität des reinen Enzyms in *n*-Heptan bzw. CHCl_3 wurden 2,5 mg ADH (aus *S. cerevisiae*) in 0,5 mL eines 10 mM KH_2PO_4 -Puffer (pH 7,8) gelöst. Hierzu wurde 1 mL einer NAD^+ bzw. NADH-Lösung (0,1 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) gegeben und der Ansatz anschließend lyophilisiert (s. Kap. 3.5.3). Zu der gefriergetrockneten ADH/ NAD^+ bzw. ADH/NADH-Mischung wurde 1 mL *n*-Heptan bzw. CHCl_3 mit 0,26 $\frac{\mu\text{L}}{\text{mL}}$ (1 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$) *n*-Tetradecan sowie 2,5 μL (0,25 %) bidest. Wasser gegeben. Danach wurden der ADH/ NAD^+ -Reaktionsmischung 3,98 μL 2-Oktanol (3,26 mg, 0,025 mmol) sowie 1,98 μL Aceton (1,56 mg, 0,027 mmol) zugegeben. Zu der ADH/NADH-Reaktionsmischung wurden 3,91 μL 2-Oktanon (3,21 mg, 0,025 mmol) sowie 2,1 μL 2-Propanol (1,62 mg, 0,027 mmol) zugegeben. Die Proben wurden anschließend bei 28 °C unter Rühren inkubiert. Für die Bestimmung des Blindwertes wurde reines Lsgm. ohne

Enzym und Coenzym verwendet. Über mehrere Tage wurden jeweils ca. 45 μL Probe genommen und per GC (s. Kap. 3.1.4.8) analysiert.

Beim Einsatz der amphiphilen Polymernetzwerke (s. Kap. 3.6) wurde das Netzwerk in 1 mL CHCl_3 gegeben. Danach wurden 3,98 μL 2-Oktanol (3,26 mg, 0,025 mmol) sowie 1,98 μL Aceton (1,56 mg, 0,027 mmol) zugegeben und die Probe bei 28 °C unter Rühren inkubiert. Für die Bestimmung des Blindwertes wurde reines Lsgm. ohne Enzym und Coenzym verwendet. Über mehrere Tage wurden jeweils ca. 45 μL Probe genommen und per GC (s. Kap. 3.1.4.8) analysiert.

3.9 Elektrophorese

3.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde das Verfahren nach LAEMMLI verwendet¹⁸⁷. Es wurde das MiniTwin-System der Firma Analytik Jena eingesetzt. Die Gelstärke lag bei 1 mm.

Folgende Lösungen wurden für die SDS-PAGE verwendet:

Laufpuffer, 10x:

TRIS-Base	30,2 g
Glycin	144,2 g
SDS	10,0 g
bidest. Wasser	ad 1,0 L

Der Laufpuffer wurde vor dem Gebrauch 1:10 mit bidest. Wasser verdünnt.

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Lower Tris, 4x:

TRIS-Base	181,7 g
SDS	4,0 g
bidest. Wasser	ad 1,0 L

Der pH-Wert der Lösung wurde mittels HCl auf 8,8 eingestellt.

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Upper Tris, 4x:

TRIS-Base	60,55 g
SDS	4,0 g
bidest. Wasser	ad 1,0 L

Der pH-Wert der Lösung wurde mittels HCl auf 6,8 eingestellt.

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Probenauftragspuffer

1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 mL
20 %ige SDS-Lösung	2,0 mL
Bromphenolblau	20,0 mg
87 %ige Glycerinlösung	2,3 mL
bidest. Wasser	ad 8,0 mL

Der Probenauftragspuffer wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Ammoniumpersulfat-Lösung (APS):

APS	4,0 g
bidest. Wasser	ad 10,0 mL

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Die Zusammensetzung der versch. Trenngele sowie des Sammelgels ist Tab. 3.12 zu entnehmen.

Das Trenngel wurde bis 1 cm unterhalb des Probenkammendes gegossen. Anschließend wurde mit 2-Propanol überschichtet, um eine stabile Trennlinie zu erhalten. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 45 min wurde das 2-Propanol entfernt und mit bidest. Wasser gespült. In den getrockneten Plattenzwischenraum wurde anschließend das Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

Die Proben wurden jeweils mit dem gleichen Volumen Probenauftragspuffer versetzt und per Vortex gemischt. Die so vorbereiteten Proben wurden für 10 Minuten im Thermomixer auf 96 °C erhitzt, anschließend auf Eis gestellt, mit 2 μ L 1 M DTT-Lösung je 10 μ L Probe versetzt und anschließend in die Geltaschen gegeben. Als Proteinmarker wurden 6,5 μ L des Roti[®]-Mark 10-150 verwendet.

Für den Lauf im Sammelgel wurde eine konstante Spannung von 60 V gewählt, für den

Tabelle 3.12: Zusammensetzung von versch. Trenngelen sowie dem Sammelgel (Angaben für 2 Gele).

	Trenngel				Sammelgel
	8 %	10 %	12 %	14 %	4 %
Lower Tris, 4x		3,0 mL			-
Upper Tris, 4x	-	-	-	-	0,75 mL
bidest. Wasser	6,6 mL	6,0 mL	5,4 mL	4,8 mL	1,8 mL
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %	2,4 mL	3,0 mL	3,6 mL	4,2 mL	0,45 mL
APS		30 μ L			15 μ L
TEMED		15 μ L			6 μ L

Lauf im Trenngel wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Wenn die Bromphenolblau-bande aus dem Gel ausgetreten war, wurde die PAGE beendet und das Gel mittels Coomassie (vgl. Kap. 3.9.3) oder per Silberfärbung (vgl. Kap. 3.9.4) gefärbt.

3.9.2 Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden Gele mit einem immobilisierten pH-Gradienten von pH 3 - 10 verwendet (ServalytTM PrecotesTM), die Dicke lag bei 300 μ m (Serva). Die Vorbereitung des IEF-Gels wurde gemäß der beiliegenden Anleitung durchgeführt. Abhängig vom Proteingehalt der Proben wurden mittels zweier oder dreier nebeneinanderliegender Applikatorstreifen bis zu 36 μ L (2 - 3 x 12 μ L) aufgetragen. Es wurden 24 μ L (2 x 12 μ L) Marker (Protein Test Mixture for pI Determination pH 3-10, Serva) verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftrag mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und entsalzt (vgl. 3.5.2). Während der IEF wurde das Gel auf 4 °C gekühlt.

Elektrophoreseprogramm:

Stufe 1:	500 V	3 mA	6W	150 Vh
Stufe 2:	2000 V	3 mA	6W	3500 Vh

Nach beendeter IEF wurde das Gel mittels Coomassie (vgl. 3.9.3) gefärbt.

3.9.3 Coomassie-Färbung

Die zu färbenden Gele wurden über Nacht in einer Lösung aus 40 % Ethanol, 10 % konz. Essigsäure und $290 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ Coomassie Brilliant Blau R 250 fixiert und gefärbt. Der Hintergrund wurde bis zum gewünschten Grad mit einer Lösung aus 25 % Ethanol und 8 % konz. Essigsäure entfärbt.¹⁸⁸

3.9.4 Silberfärbung

Als Silberfärbung wurde eine modifizierte Variante der Silberfärbung nach HEUKESHOVEN und DERNICK eingesetzt¹⁸⁹.

Benötigte Lösungen:

Lösung A:

Ethanol	50 mL
Essigsäure 100 %	10 mL
bidest. Wasser	ad 100 mL

Lösung B:

Ethanol	30 mL
Natriumacetat · 3 H ₂ O	6,8 g
Natriumthiosulfat	0,127 g
bidest. Wasser	ad 100 mL

Lösung C:

Silbernitrat	0,2 g
Formaldehydsg. 37 %	28,8 μL
bidest. Wasser	ad 100 mL

Lösung D:

Natriumcarbonat	2,5 g
bidest. Wasser	ad 100 mL

Lösung E:

Natriumcarbonat	2,5 g
Formaldehydlsg. 37 %	28,8 μ L
bidest. Wasser	ad 100 mL

Lösung F:

EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,85 g
bidest. Wasser	ad 100 mL

Ablauf:

1. Fixierung: Lösung A, 30 min bei RT, max. 24 h
2. Inkubation: Lösung B, 20 min bei RT
3. Waschen: 2 x 20 min mit Reinstwasser bei RT
4. Färbung: Lösung C, 30 min bei RT
5. In Reinstwasser schwenken und direkt wieder entfernen
6. Spülen: Lösung D, 1 min inklusive entfernen der Lösung
7. Entwickeln: Lösung E, nach Bedarf max. 15 min. bei RT
8. Stoppen: Lösung F, mind. 20 min bei RT
9. Wässern bei RT

Inkubationslösung, Silbernitratlösung und Entwickler wurden erst kurz vor Gebrauch angesetzt.

3.10 Proteinbestimmung

3.10.1 BRADFORD-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die kommerziell erhältliche Lösung Roti[®] Nanoquant verwendet, die auf der Modifikation der Proteinbestimmung nach BRADFORD beruht¹⁹⁰. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde das Roti[®] Nanoquant 5x-Konzentrat 1:5 mit bidest. Wasser verdünnt. 200 μ L der Probe wurden mit 800 μ L der Arbeitslösung versetzt und durch mehrmaliges Invertieren vermischt. Anschließend wurde die Extinktion bei 590 nm sowie 450 nm gegen Wasser als Referenz bestimmt. Die Kalibriergerade wurde durch Auftragung des Quotienten der Extinktion

von 590 nm und 450 nm gegen den Proteingehalt von Standardlösungen ($5-100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ für BSA, $10-100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ für Lysozym; in bidest. Wasser) durch lineare Regression erhalten.

3.10.2 POPOV-Assay

Beim POPOV-Assay bilden die basischen Aminosäuren der Proteine Komplexe mit dem sauren Farbstoff Amidoschwarz 10 B und werden so ausgefällt. Nach mehreren Waschschritten, bei denen ungebundener Farbstoff entfernt wird, wird der Komplex in 0,1 M NaOH gelöst und photometrisch bei 620 nm gegen 0,1 M NaOH vermessen. Die Vorteile des POPOV-Assays bestehen in der Unempfindlichkeit gegenüber Störsubstanzen und in der Kalibrierfunktion, die im oberen Konzentrationsbereich über einen unbegrenzten Bereich linear ist, da vor der photometrischen Messung die Proben beliebig mit 0,1 M NaOH verdünnt werden können¹⁹¹.

Benötigte Lösungen:

POPOV I-Lösung: 9 Teile Methanol (100 %) und 1 Teil Essigsäure (100 %)

POPOV II-Lösung: 325 mg Amidoschwarz 10 B unter mindestens einstündigem Rühren in 20 mL POPOV I-Lösung lösen und anschließend den ungelösten Farbstoff abfiltrieren.

POPOV III-Lösung: 1 Teil POPOV II-Lösung mit 9 Teilen Popov I-Lösung verdünnen

Durchführung:

200 μL der Analysenlösung wurden in einem 1,5 mL Eppendorfgeläß mit 750 mL POPOV III-Lösung versetzt, kurz geschüttelt und der Protein-Farbstoffkomplex bei 16000 $\cdot g$ für 5 min pelletiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde mit 1 mL POPOV I-Lösung versetzt und 5 min bei 16000 $\cdot g$ zentrifugiert. Im Folgenden wurde der Überstand sehr vorsichtig entfernt. Dieser Vorgang wurde zweifach wiederholt. Das Pellet wurde dann in 0,1 M NaOH-Lösung gelöst und bei 620 nm gegen 0,1 M Natronlauge photometrisch vermessen. Die Proteinkonzentrationen wurden durch lineare Regression der Extinktionswerte von mitgeführten BSA-Standardlösungen berechnet. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Auf Grund der unbegrenzten Linearität der Kalibrierfunktion¹⁹¹ können Proben vor der photometrischen Messung mit 0,1 M NaOH verdünnt werden.

3.11 Bestimmung der Anzahl freier Aminogruppen

3.11.1 TNBS-Assay

Die Anzahl der freien Aminogruppen wurde photometrisch nach einer modifizierten Variante von TILLER *et al.* bestimmt¹⁹². 1 mL der Probe mit einer Proteinkonzentration zwischen 0,5 und 0,9 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ wurde mit 1 mL einer 4 %igen NaHCO_3 -Lösung versetzt. Im Anschluss wurden 100 μL einer 5 %igen TNBS-Lösung zugegeben und 4 h bei 40 °C und 650 rpm im Thermomixer inkubiert. Danach wurde eine saure Hydrolyse der Proben durchgeführt, hierzu wurden 3 mL einer 6 M HCl-Lösung zugegeben und eine Stunde bei 135 °C autoklaviert. Hierbei reagiert gleichzeitig das noch vorhandene überschüssige TNBS ab. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit bidest. Wasser auf ca. 10 mL aufgefüllt und im Anschluss dreimal mit jeweils 20 mL Et_2O extrahiert. Der nach dem Extrahieren verbliebene Rest Et_2O wurde mittels Wasserbad (60 °C, 20 min) entfernt und die Proben wurden danach mit bidest. Wasser auf 20 mL aufgefüllt. Die photometrische Messung erfolgte bei 346 nm gegen eine identisch behandelte Blindprobe, welche 1 mL bidest. Wasser anstelle der Probe enthielt. Die Auswertung erfolgte über das LAMBERT-BEERSCHE Gesetz (Gl. 3.16).

$$\text{Anzahl NH}_2\text{-Gruppen} = \frac{E_{346 \text{ nm}} \cdot V_{\text{Probe}} \cdot M_{\text{Enzym}}}{\epsilon_{346 \text{ nm}} \cdot d_{\text{Küvette}} \cdot m_{\text{Enzym}}} \quad (3.16)$$

mit:

$\epsilon_{346 \text{ nm}} = 14600 \frac{\text{mL}}{\text{mmol} \cdot \text{cm}}$, molarer Extinktionskoeffizient des 2,4,6-Trinitrobenzol- ϵ -aminolysins

$E_{346 \text{ nm}}$ = Extinktion der Probe

$V_{\text{Probe}} = 20 \text{ mL}$

M_{Enzym} = Molekulargewicht des Enzyms

$d_{\text{Küvette}} = 1 \text{ cm}$

m_{Enzym} = Masse Enzym

3.12 SHARPLESS-Dihydroxylierung von Alkenen

3.12.1 Verwendung von Pyridin als Ligand

Die Dihydroxylierung der Alkene wurde unter modifizierten SHARPLESS-Bedingungen durchgeführt¹³⁵. Hierzu wurden 410 mg (3 mmol) K_2CO_3 , 980 mg (3 mmol) gemörsertes $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,82 μL (0,01 mmol) des nicht chiralen Liganden Pyridin sowie 0,74 mg

(0,002 mmol) des Katalysators $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ in 10 mL des jeweiligen Lösungsmittelsystems gegeben, wobei das Pyridin nach Zugabe des Lösungsmittels hinzugefügt wurde. Als Lösungsmittelsystem verwendet wurden eine Mischung aus *tert*-Butanol-Wasser (1:1) und CHCl_3 -Wasser (1:1) sowie wassergesättigtes Chloroform (Wassergehalt ca. 1200 ppm, bestimmt per KARL-FISCHER-Titration). Zum Schluss wurde 1 mmol des Alkens (Tab. 3.13) zugegeben und die Reaktionsmischung für einen Tag bei RT stark gerührt. In einigen zusätzlichen Versuchen wurde das $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ durch 309 μL (3 mmol) *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) ersetzt. Hierbei wurde Styrol als Edukt in wassergesättigtem CHCl_3 sowie der CHCl_3 /Wasser Mischung (1:1) eingesetzt.

Tabelle 3.13: Übersicht über die physikalischen Daten der für die Dihydroxylierung verwendeten Alkene sowie die eingesetzten Alkenvolumina für die Dihydroxylierung mit dem Liganden Pyridin.

Alken	Molmasse [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]	Dichte [$\frac{\text{g}}{\text{mL}}$]	eingesetztes Volumen [μL]
Styrol	104,15	0,906	115
α -Methylstyrol	118,18	0,909	129,8
<i>p</i> -Methylstyrol	118,18	0,897	131,3
1 <i>H</i> -Inden	116,16	0,996	117,3
1,2-Dihydronaphthalin	130,19	0,997	130,58

Im Anschluss wurden bei den aus zwei flüssigen Phasen bestehenden Lösungsmittelsystemen (*tert*-Butanol/Wasser, CHCl_3 /Wasser) die Phasen getrennt und das Lösungsmittel der org. Phase entfernt. Die wässrige Phase wurde vier mal mit 25 mL abdestilliertem Ethylacetat (EE) extrahiert. Im Fall des wassergesättigten CHCl_3 wurde das Lsgm. vollständig entfernt, der Rückstand in 25 mL bidest. Wasser aufgenommen und wie beschrieben mit EE extrahiert. Nach Entfernen des EE wurden die Rückstände aus beiden Phasen im Vakuum vollständig getrocknet und per ^1H -NMR Spektroskopie (s. Kap. 3.1.4.2), HPLC (s. Kap. 3.1.4.6) sowie GC (s. Kap. 3.1.4.8) charakterisiert.

Im Folgenden sind die ^1H -NMR Daten der Dihydroxylierungsprodukte aufgeführt:

1-Phenylethan-1,2-diol:

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 7,41 - 7,17$ (m, 5H, $-C_6H_5$); 5,18 - 5,17 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H, $-CHOH$); 4,68 - 4,66 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, $-CH_2OH$); 4,55 - 4,52 (q, $J = 4,2$ Hz, 1H, $-CHOH$); 3,44 - 3,42 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H, $-CH_2OH$).

2-Phenylpropan-1,2-diol:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 7,52 - 7,44$ (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, $-o-C_6H_5$); 7,34 - 7,25 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, $m-C_6H_5$); 7,24 - 7,16 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, $-p-C_6H_5$); 4,93 - 4,88 (s, 1H, $-OH$); 4,76 - 4,68 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H, $-CH_2-OH$); 3,50 - 3,42 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, $-CH_2-OH$); 1,47 - 1,39 (s, 1H, $-CH_3$).

1-(*p*-tolyl)Ethan-1,2-diol:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 7,23 - 7,17$ (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, $-CH_3-m-C_6H_4$); 7,13 - 7,07 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, $-CH_3-o-C_6H_4$); 5,19 - 5,16 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H, $-OH$); 4,76 - 4,71 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, $-CH-OH$); 4,52 - 4,44 (dd, $J = 10,3, 5,8$ Hz, 2H, $-CH_2-OH$); 3,41 - 3,35 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, $-C_6H_4-CH_3$).

2,3-Dihydro-1*H*-Inden-1,2-diol:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 7,34 - 7,14$ (m, 4H, $-C_6H_4$); 5,03 - 4,96 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, $C_6H_4-CHOH-$); 4,81 - 4,74 (td, $J = 6,0; 0,9$ Hz, 1H, $C_6H_4-CHOH-CHOH$); 4,61 - 4,55 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H, $C_6H_4-CHOH-$); 4,29 - 4,22 (dt, $J = 9,0; 4,9$ Hz, 1H, $C_6H_4-CH-CHOH$); 2,96 - 2,72 (m, 2H, $C_6H_4-CH_2-$).

1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin-1,2-diol:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 7,37 - 7,01$ (m, 4H, $-C_6H_4$); 4,93 - 4,88 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, $C_6H_4-CH-OH$); 4,60 - 4,56 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H, $C_6H_4-CH-OH$); 4,48 - 4,42 (td, $J = 3,4; 2,7$ Hz, 1H, $C_6H_4-CH-OH$); 3,85 - 3,76 (td, $J = 8,0; 3,5$ Hz, 1H, $C_6H_4-CH-CHOH-$); 2,91 - 2,58 (m, 2H, $C_6H_4-CHOH-CHOH-CH_2-$); 1,99 - 1,66 (m, 2H, $C_6H_4-CH_2-$).

3.12.2 Verwendung von POX-Enzymkonjugaten als Liganden

Typischerweise wurden die nach der Aufreinigung erhaltenen PMeOx-Enzymkonjugate (vgl. Kap. 3.3.5.4) in verschiedenen Konzentrationen unter Rühren in 10 mL wasser-gesättigtem CHCl_3 gelöst. Im Fall des PBUOx-*b*-PMeOx- α -Chymotrypsinkonjugates wurden 10 mL THF mit 72 μL Wasser verwendet. Zu den gelösten Konjugaten wurde 410 mg (3 mmol) K_2CO_3 , 980 mg (3 mmol) gemörsertes $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, sowie 0,74 mg (0,002 mmol) des Katalysators $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ gegeben. Zuletzt wurde 1 mmol des Alkens (Tab. 3.13) zugegeben und die Reaktionsmischung bei unterschiedlichen Temperaturen für einen Tag bis drei Wochen stark gerührt. In einem zusätzlichen Versuch wurde das $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ durch 309 μL (3 mmol) *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO)

ersetzt. Hierbei wurde Styrol als Edukt in wassergesättigtem CHCl_3 verwendet. Die verwendeten Polymer-Enzymkonjugate sowie die zugehörigen Reaktionsbedingungen, Lösungsmittel und Abweichungen vom Standardprotokoll sind in Tab. 3.14 zusammengefasst.

Tabelle 3.14: Übersicht über die verwendeten Polymer-Enzym Konjugate sowie die verwendeten Lösungsmittel, Alkene und Reaktionsbedingungen.

Enzym	Polymer	c_{Enzym}^a [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$]	ϑ [$^{\circ}\text{C}$]	t [d]	Alken
ADH	PMeOx	0,018	0	7	Styrol
BSA	PMeOx	0,011	0	7	Styrol
CaLB	PMeOx	0,021	0	8	Styrol
α -Chymotrypsin	PMeOx	0,027	RT	1	Styrol
α -Chymotrypsin ^b	PMeOx	0,027	RT	1	Styrol
α -Chymotrypsin	PMeOx	0,027	9	7	Styrol
α -Chymotrypsin	PMeOx	0,027	5	4	Styrol
α -Chymotrypsin	PMeOx	0,027	0	7	Styrol
α -Chymotrypsin ^c	PMeOx	0,027	0	7	Styrol
α -Chymotrypsin	PMeOx	0,111	0	7	Styrol
α -Chymotrypsin ^d	PBuOx- <i>b</i> -PMeOx	0,027	0	7	Styrol
α -Chymotrypsin	PEtOx	0,027	0	7	Styrol
Collagenase	PMeOx	0,012	0	7	Styrol
Collagenase	PMeOx	0,024	0	7	Styrol
CrL	PMeOx	0,012	0	7	Styrol
Laccase	PMeOx	0,026	0	7	Styrol
Laccase ^e	PMeOx	0,026	0	7	Styrol
Laccase	PMeOx	0,039	0	7	Styrol
Laccase ^f	PMeOx	0,039	0	7	Styrol
Laccase	PMeOx	0,053	0	3	Styrol
Laccase	PMeOx	0,053	0	7	Styrol
Laccase	PMeOx	0,053	0	10	Styrol
Laccase	PMeOx	0,053	0	14	Styrol
Laccase	PMeOx	0,105	0	7	Styrol
Laccase	PMeOx	0,053	-15	21	Styrol
Laccase	PMeOx	0,053	0	7	α -Methylstyrol
Laccase	PMeOx	0,053	0	7	<i>p</i> -Methylstyrol
Laccase	PMeOx	0,053	0	7	1 <i>H</i> -Inden

Tabelle 3.14: Übersicht über die verwendeten Polymer-Enzym Konjugate sowie die verwendeten Lösungsmittel, Alkene und Reaktionsbedingungen.

Enzym	Polymer	c_{Enzym}^a [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$]	ϑ [°C]	t [d]	Alken
Laccase ^g	PMeOx	0,026	0	7	1,2-Dihydro-naphthalin
Lysozym	PMeOx	0,048	0	7	Styrol
Monooxygenase	PMeOx	0,006	4	3	Styrol
Peroxidase	PMeOx	0,016	0	7	Styrol
Proteinase K	PMeOx	0,024	0	6	Styrol
RmL	PMeOx	0,018	0	8	Styrol
Trypsin	PMeOx	0,12	0	6	Styrol

^a Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit POX.

^b Verwendung von NMO als Oxidationsmittel statt $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

^c Zusatz von 40 μL H_2O zum Reaktionsansatz.

^d Verwendung von THF als Lösungsmittel; Zusatz von 72 μL H_2O zum THF.

^e Verwendung von H_2O als Lösungsmittel.

^f Enzymkonjugat wurde 24 h gegen 10 mM EDTA-Lösung dialysiert, gefolgt von einer 48 stündigen Dialyse gegen bidest. Wasser.

^g Das Konjugat wurde für 48 h gegen 10 mM EDTA dialysiert, gefolgt von einer 48 stündigen Dialyse gegen bidest. Wasser.

Außerdem wurde in weiteren Referenzversuchen das Polymer-Enzymkonjugat durch reines Enzympulver sowie reines aminterminiertes PMeOx ersetzt. Als Lösungsmittel wurde bidest. Wasser sowie wassergesättigtes CHCl_3 verwendet (Tab. 3.15).

Tabelle 3.15: Verwendete Liganden und Reaktionsbedingungen der Referenzansätze.

Ligand	c_{Ligand} [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$]	Lsgm.
α -Chymotrypsin	0,055	CHCl_3
Laccase	0,026	CHCl_3
PMeOx (aminterminiert)	2,29	CHCl_3
PMeOx (aminterminiert) + Laccase	0,026	CHCl_3
Laccase	0,026	H_2O
PMeOx (aminterminiert)	2,29	H_2O

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Ansätze durch Zugabe von 700 mg (5,5 mmol) Natriumsulfit unter einstündigem langsamen Erwärmen auf RT gequenched. Danach wurde das Lsgm. entfernt und der Rückstand in 25 mL bidest. Wasser gelöst und vier mal mit 25 mL abdestilliertem EE extrahiert. Die wässrige Phase wurde verworfen und der nach Entfernen des EE und Trocknen im Vakuum erhaltene Feststoff wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie, HPLC sowie GC charakterisiert. Der Ansatz mit dem PBuOx-*b*-PMeOx- α -Chymotrypsinkonjugat als Ligand wurde aufgearbeitet, indem das Konjugat mit Hilfe von Wasser ausgefällt und per Zentrifugation abgetrennt wurde. Danach wurde das Lsgm. entfernt und wie die übrigen Ansätze weiter aufgearbeitet.

3.12.3 Tandemkatalyse mit PMeOx-Lipasekonjugaten

3.12.3.1 Enzymatische Veresterung von 1-Phenylethan-1,2-diol mit Laurinsäure

In 1 mL CHCl_3 wurden 3 mg 1-Phenylethan-1,2-diol gelöst und 3 mg CaLB hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 37 °C für 5 Tage stark gerührt. Die jeden Tag entnommenen Proben wurden mittels GC (s. Kap. 3.1.4.8) analysiert.

3.12.3.2 Veresterung von 1-Phenylethan-1,2-diol mit Laurinsäure

2 g 1-Phenylethan-1,2-diol (0,0145 mol) wurden unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem THF (getrocknet durch Destillation über NaK) gelöst und 1,4 mL (0,7 äq., 1,03 g, 0,01 mol) Triethylamin (getrocknet über 4 Å Molsieb) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mittels Eis auf 0 °C gekühlt und unter Rühren wurden 2,68 mL (0,8 äq., 2,53 g, 0,0116 mol) Laurinsäurechlorid, gelöst in 20 mL trockenem THF, in-ert über einen Zeitraum von 30 min zugetropft. Danach wurde der Ansatz auf Eis noch für 1 h gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und verworfen. Das THF des Filtrats wurde mittels RotV entfernt. Das resultierende Produkt wurde in 25 mL EE gelöst und kurz zwei mal mit 25 mL KOH-Lösung (0,1 M) ausgeschüttelt und die wässrige Phase verworfen. Der nach Entfernen des EE am RotV und Trocknen im Feinvakuum erhaltene Feststoff wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie (s. Kap. 3.1.4.2), HPLC (s. Kap. 3.1.4.6) sowie GC (s. Kap. 3.1.4.8) charakterisiert.

3.12.3.3 Tandemreaktion

Für die Tandemkatalyse wurden ein PMeOx-CaLB-Konjugat verwendet, welches in 10 mL wassergesättigtem CHCl_3 ($0,021 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$ bezogen auf die reine Enzymmenge vor der Funktionalisierung) gelöst wurde. Nach dem Lösen wurden 410 mg (3 mmol) K_2CO_3 , 980 mg (3 mmol) gemörsertes $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, sowie 0,74 mg (0,002 mmol) des Katalysators $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ zugegeben und die Reaktionsmischung für sieben Tage bei 37 °C stark gerührt. Anschließend wurde der dispergierte Feststoff durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Zu der klaren Lösung wurden 100,16 mg (0,5 mmol) Laurinsäure gegeben und für weitere sieben Tage bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 700 mg (5,5 mmol) Natriumsulfit gequenched und dann sieben mal mit 25 mL abdestilliertem EE extrahiert. Die EE-Phase wurde im Anschluss kurz zwei mal mit 25 mL KOH-Lösung (0,1 M) ausgeschüttelt und die wässrige Phase verworfen. Der nach Entfernen des EE am RotV und Trocknen im Feinvakuum erhaltene Feststoff wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie (s. Kap. 3.1.4.2), HPLC (s. Kap. 3.1.4.6) sowie GC (s. Kap. 3.1.4.8) charakterisiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

Wie in Kap. 1.2.3.2 dargestellt, gibt es bereits Beispiele für die erfolgreiche Biokatalyse in org. Lösungsmitteln mittels POX-Enzymkonjugaten mit wenigen Enzymen. Jedoch waren die hierbei erzielten Löslichkeiten ($0,0079 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, $0,077 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) sowie Aktivierungen (20 - 160) eher gering^{87,118}. Durch Anwendung einer anderen Modifikationsstrategie sowie die geeignete Wahl der verwendeten POX soll sowohl die Löslichkeit wie auch die Aktivität der Konjugate verbessert werden.

Die hergestellten Konjugate sollen ebenfalls für die asymmetrische Katalyse in org. Medien eingesetzt werden.

Es soll untersucht werden, ob eine Konjugation von Coenzymen mit POX zu einer Organolöslichkeit führt und wie sich die Modifikation auf die Aktivität auswirkt.

4.1 Poly(2-Oxazolin)synthese

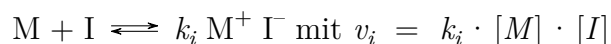
Die Zielstellung in diesem Kapitel ist es, definierte Polymerstrukturen (Homo- und Copolymere) aus unterschiedlichen 2-R-2-Oxazolinen für die Enzym- und Coenzymmodifikation zu synthetisieren, welche je nach Verwendungszweck durch die Terminierung gezielt endgruppenfunktionalisiert wurden.

Wie in Kap. 1.2.3.2 bereits erwähnt, werden POX durch lebende kationische ringöffnende Polymerisation (engl. *cationic ring-opening polymerization*, CROP) hergestellt. Es handelt sich bei der kationischen Polymerisation um eine Kettenwachstumsreaktion, welche zu den ionischen Polymerisationsverfahren zählt, und daher die Bildung einer aktiven, kationisch geladenen Spezies bei der Initiierung voraussetzt¹⁹³.

4.1.1 Kinetik der lebenden kationischen Polymerisation

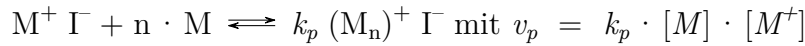
Eine lebende CROP besteht aus drei Stufen, der Start- (Initiierung), Wachstums- (Propagation), sowie Abbruchsreaktion (Terminierung).¹⁹³

Bei der Initiierung reagieren das Monomer M und der Initiator I mit der Initiationsgeschwindigkeit v_i zum Ionenpaar M^+ und I^- .

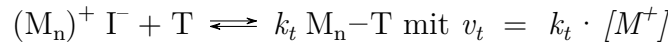


$[M]$, $[I]$ sind die molaren Konzentrationen der jeweiligen Komponenten im Reaktionsgemisch

Beim folgenden Kettenwachstum werden weitere Monomere M n -mal mit der Propagationsgeschwindigkeit v_p an das lebende Kettenende M^+ gebunden, wobei hierbei gilt $v_p \ll v_i$.



Der Kettenabbruch (Terminierung) erfolgt durch die Zugabe des Terminierungsmittels T mit der Terminierungsgeschwindigkeit v_t , wobei das Terminierungsmittel in der Regel mit einem deutlichen molaren Überschuss bezogen auf die lebenden Kettenenden ($(M_n)^+$) eingesetzt wird, hierbei gilt $v_t < v_p \ll v_i$. Auf Grund dieses Überschusses kann eine Reaktionskinetik 1. Ordnung angenommen werden. M_n-T bezeichnet hierbei das terminierte Polymer der Länge n .



Das angestrebte Molekulargewicht M_P lässt sich über das Verhältnis der Stoffmenge des Monomers (n_{Monomer}) zur Stoffmenge des Initiators ($n_{\text{Initiator}}$) berechnen.

$$M_P = \frac{n_{\text{Monomer}}}{n_{\text{Initiator}}}$$

Eine ideale lebende kationische Polymerisation muss folgende Kriterien erfüllen

- die Initiierung verläuft sehr viel schneller als die Propagation $v_i \gg v_p$
- sofortige vollständige Reaktion aller Initiatormoleküle zu Beginn der Polymerisation zum Zeitpunkt $t = 0$, d.h. die Konzentration der aktiven Ketten ist zu jeder Zeit gleich der Initiatorkonzentration $(M_n)^+ = I$
- keine Übertragungs-, Abbruch-, oder Nebenreaktionen, d.h. die Konzentration der aktiven Ketten $(M_n)^+$ ist über den gesamten Reaktionsverlauf stationär
- die Reaktivität ist unabhängig vom Molekulargewicht

4.1.2 Mechanismus der lebenden kationischen Ringöffnungspolymerisation

Die Propagationsgeschwindigkeit v_p hängt vom Verhältnis zwischen kationischer und kovalenter Propagationsspezies ab. Da die Reaktionsgeschwindigkeit der kationischen Propagationsspezies im Vergleich zur kovalenten viel größer ist, findet die Propagation vorzugsweise über die kationische Spezies statt. Beeinflusst wird dieses Verhältnis durch die Art des Gegenions (Anion) des Initiators, die Art des Monomers, sowie durch das verwendete Lösungsmittel, die Monomerkonzentration und die Temperatur¹⁰³. Das Lösungsmittel solvatisiert das Gegenion und beeinflusst über die Distanz des resultierenden Ionenpaares das Verhältnis zwischen kationischer und kovalenter Spezies. Die Wahl des Lösungsmittels wird also vom verwendeten Initiator beeinflusst sowie vom gewählten Terminierungsreagenz. Häufig verwendet werden polare Lösungsmittel wie Acetonitril oder Chloroform.¹⁹³

Als Initiatoren für die lebende CROP eignen sich beispielsweise Alkyl-, Benzyl- und Allylhalogenide, Sulfonsäureester, Protonensäuren wie Schwefelsäure oder auch LEWIS-säuren^{103,194}. Die verwendeten Initiatoren sollten nach der erfolgten Initiierung ein möglichst wenig nukleophiles, unreaktives und stabiles Gegenion bilden. Je nach verwendetem Initiator überwiegt entweder der ionische oder der kovalente Charakter, wobei es auch Mischformen gibt. Die kationische Spezies überwiegt beispielsweise bei sehr guten Abgangsgruppen wie der Gruppe der Sulfonsäureester (Mesylate, Tosylate, und Triflate). Bei anderen Initiatoren wie *n*-Alkylbromiden überwiegt die kovalente Spezies und beide Bindungsanteile finden sich z.B. bei Alkyljodiden.¹⁹³

Die lebende CROP folgt dem Mechanismus einer bimolekularen nukleophilen Substitution (S_N2 -Mechanismus), welcher in Abb. 4.1 beispielhaft mit dem Initiator Methyltosylat und einer Terminierung mittels eines beliebigen primärenamins dargestellt ist. Bei der Initiierung greift das Valenzelektronenpaar des Stickstoffs des ersten Oxazolinmonomers nukleophil an das elektrophile Kohlenstoffatom des Initiators an, hierdurch bildet sich eine kovalente Bindung. Der Rest des Initiators (OTs^-) verlässt als Abgangsgruppe das Molekül und bildet das Gegenion des entstandenen Oxazoliniumkations. Im nächsten Schritt greift ein weiteres Monomer am elektrophilsten Kohlenstoffatom, dem in der Nachbarschaft zum Sauerstoff, an. Unter Ringöffnung bildet sich im Folgenden die typische Seitengruppe aus. Die Propagation, wird so lange fortgesetzt bis entweder alle Monomere verbraucht sind oder eine gezielte oder ungezielte (z.B. durch H_2O -Spuren) Terminierung durch ein Nukleophil, wie beispielsweise durch ein primäres Amin, erfolgt.

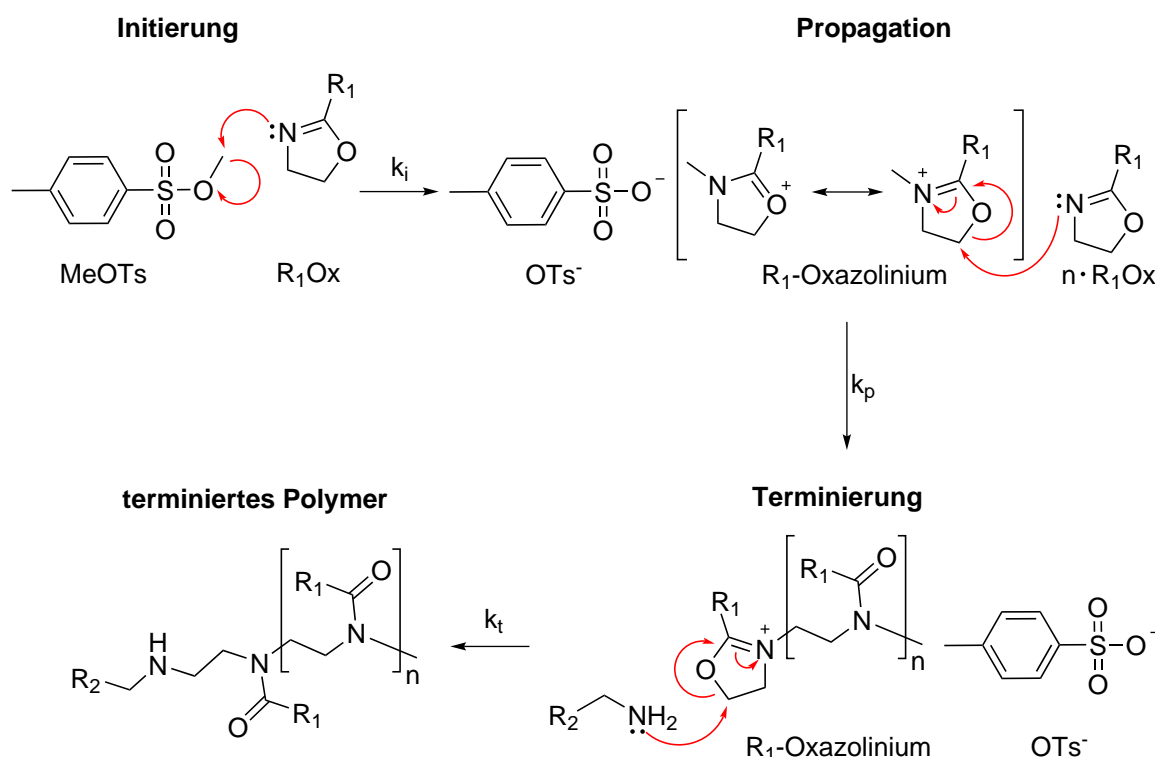


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation eines 2-R-Oxazolins (R_1Ox) mit dem Initiator Methyltosylat ($MeOTs$) als Beispiel. Die Terminierung erfolgt beispielhaft mit einem beliebigen primären Amin ($R_2-CH_2-NH_2$).

4.1.3 Initiatorsynthese

Da die Gruppe der Sulfonsäureester als Initiator für die Polymerisation von 2-R-2-Oxazolin gut geeignet ist^{103,194} (vgl. Kap. 4.1.2), wurden für die Polymerisation, der in dieser Arbeit verwendeten Polymere als Initiatoren das kommerziell erhältliche Methyltosylat ($MeOTs$), sowie das synthetisierte Benzyltosylat ($BeOTs$) verwendet. $BeOTs$ hat durch die am Polymer verbleibende Benzylgruppe den Vorteil, dass im 1H -NMR Spektrum zwei gut sichtbare Signale definierter Größe vorhanden sind, welche nicht durch andere Signale überlagert werden und sich somit als Referenzsignal nutzen lassen. Dies ist vor allem von Bedeutung zur Bestimmung des Terminierungs- bzw. Funktionalisierungsgrades der Polymere bzw. Coenzym-Konjugate, sowie auch zur Ermittlung der Kettenlänge der Polymere. Des Weiteren wird die Hydrophobizität des Polymers durch die endständige Benzylgruppe erhöht. Eine solche hydrophobe Komponente am Polymerende kann zu einer erhöhten Aktivität der Enzymkonjugate führen, dies wurde bereits in der Literatur für ein POX-Lipasekonjugat beschrieben¹¹⁶.

Der mittels Feststoffsynthese (s. Kap. 3.2.1) synthetisierte Initiator BeOTs wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie sowie Elementaranalyse charakterisiert. Abb. 4.2 zeigt beispielhaft ein $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des nach der Aufreinigung erhaltenen kristallinen Initiators. Es wurden alle im Spektrum auftretenden Signale eindeutig dem BeOTs zugeordnet und es sind keine protonenhaltigen Verunreinigungen vorhanden.

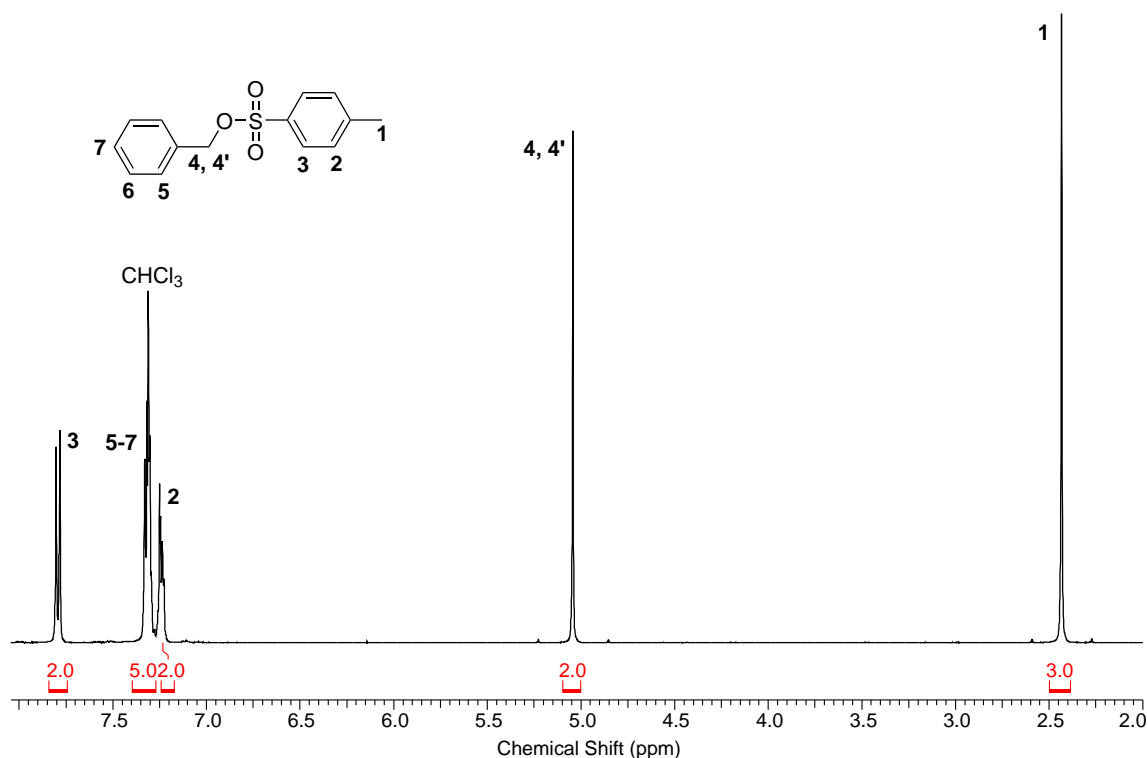


Abbildung 4.2: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Initiators BeOTs nach der Aufreinigung durch Umkristallisieren, aufgenommen in CDCl_3 bei 400 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Das am weitesten tieffeldverschobene Signal bei 7,74 - 7,76 ppm wird den beiden Aromatenprotonen (Pos. 3, 2H) in *ortho*-Stellung zur Sulfonsäuregruppe zugeordnet. Das Multiplett bei 7,17 - 7,32 ppm (Pos. 5 - 7, 5H) beschreibt die Protonen des Phenylrings des Benzylrestes. Die Protonen in *meta*-Position zum Sulfonsäureester-Rest sind bei 7,17 - 7,22 ppm (Pos. 2, 2H) zu sehen. Das Singulett bei 4,98 - 5,03 ppm (Pos. 4, 4' 2H) wird den Protonen der Methylengruppe des Benzylrestes zugeordnet. Ein weiteres Singulett tritt bei 2,36 - 2,43 ppm auf. Dieses wird den Methylprotonen (Pos. 1, 3H) zugeordnet, welche durch die Nähe zum aromatischen Ring entschirmt werden und deshalb einen Tieffeldshift erfahren. Die Reinheit des Initiators lag bei 99,4 %. Die weitere Untersuchung mittels Elementaranalyse ergab einen Kohlenstoffanteil von 63,9 % und einen Wasserstoffanteil von 5,6 %. Diese Ergebnisse weisen eine geringe

Abweichung zu den theoretischen Werten von 64,1 % für Kohlenstoff bzw. 5,4 % für Wasserstoff auf und bestätigen die Reinheit des synthetisierten BeOTs.

4.1.4 Monomersynthese

Da nur 2-Methyl-, 2-Ethyl- und 2-Phenyl-2-oxazolin kommerziell erhältlich sind, wurden 2-Butyl-2- und 2-Heptyl-2-Oxazolin synthetisiert. 2-R-2-Oxazoline lassen sich beispielsweise durch die Kondensationsreaktion von Aminoalkoholen mit dem entsprechenden Nitril unter Verwendung eines LEWIS-Säure Katalysators (z.B. Cadmiumacetat, Zinkacetat) herstellen (Abb. 4.3)^{148,195}. Auf Grund der einfachen Reaktionsführung und der großen Anzahl kommerziell erhältlicher Nitrile, lassen sich auf diese Weise eine große Anzahl von Oxazolinmonomeren synthetisieren¹⁹⁵.

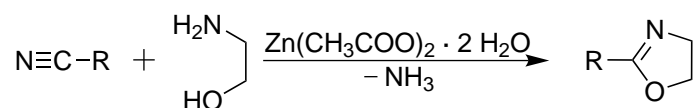


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der generellen Syntheseroute von 2-R-2-Oxazolinen mittels Nitrilen.

Das 2-Butyl-2-Oxazolin (BuOx) wurde entsprechend den am Lehrstuhl bekannten Parametern ohne den Einsatz von Lösungsmittel synthetisiert (s. Kap. 3.2.2.1) und aufgearbeitet und nach der Destillation mit einer Ausbeute von 55 % und einer Reinheit von 99,9 % erhalten.

4.1.4.1 Synthese von 2-Heptyl-2-Oxazolin

Die Synthese von 2-Heptyl-2-oxazolin wurde am Lehrstuhl erstmals im Rahmen einer Diplomarbeit von Dominik Doert durchgeführt.¹⁹⁶ In der Literatur ist die Synthese von 2-Heptyl-2-Oxazolin (HeptOx) im Rahmen eines Screenings bisher nur unter Einsatz von Lösungsmitteln und in sehr kleinem Maßstab durchgeführt worden¹⁹⁵. Um festzustellen, ob sich die Synthese auch in größerem Maßstab unter Einsatz der Synthesemikrowelle durchführen lässt, und um die notwendige Synthesezeit für die Reaktion ohne Lösungsmittel zu ermitteln, wurden aus dem Reaktionsgemisch zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und mittels FOURIER-Transformations-Infrarot-Spektroskopie unter abgeschwächter Totalreflexion (ATR-FTIR) untersucht. Die Analyse mittels ATR-FTIR erlaubt es qualitativ die Produktbildung zu verfolgen. Abb. 4.4 zeigt die ATR-FTIR-Spektren von Proben aus dem Reaktionsgemisch zu Beginn der Reaktion sowie nach 2, 6 und 25 h Reaktionszeit.

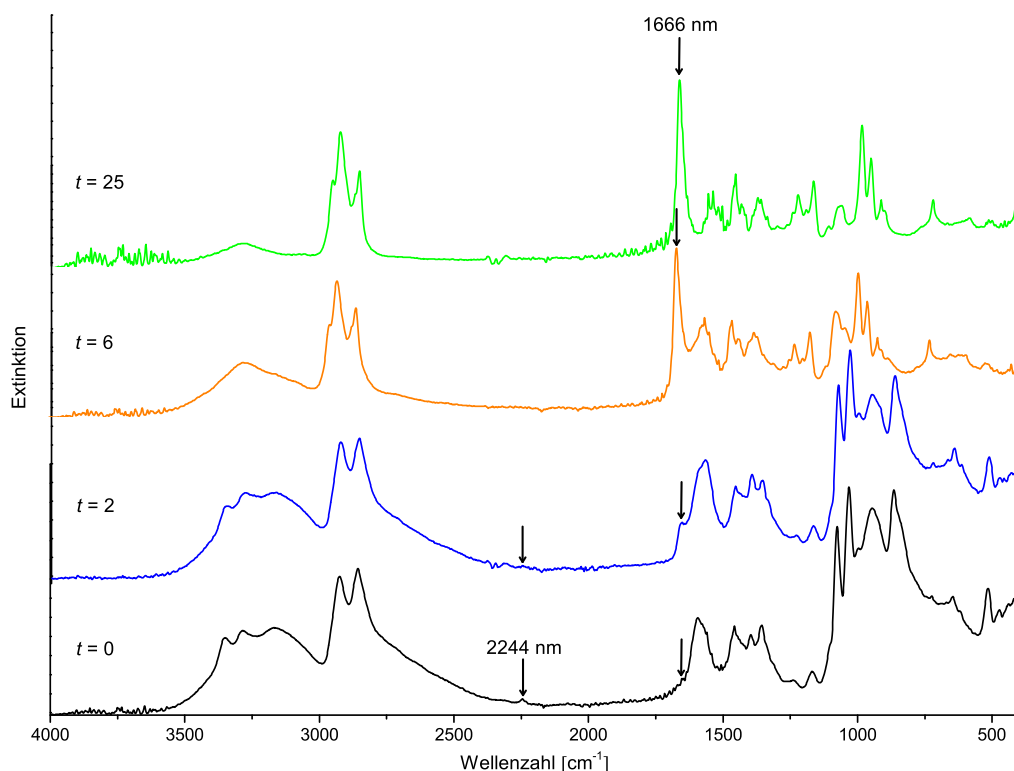


Abbildung 4.4: ATR-FTIR-Spektren von Proben der 2-Heptyl-2-Oxazolinsynthese nach versch. Reaktionszeiten; schwarz $t = 0$ h, blau $t = 2$ h, orange $t = 6$ h, grün $t = 25$ h.

Charakteristisch für das Edukt Heptylcyanid ist die Valenzschwingung der Nitrilgruppe bei einer Wellenzahl von ca. $2244 \frac{1}{\text{cm}}$. Diese ist bereits bei der Probe zum Zeitpunkt $t = 0$ nur schwach zu erkennen und nach zwei Stunden Reaktionszeit nahezu vollständig verschwunden und daher ungeeignet um den Reaktionsverlauf zu verfolgen. Besser eignet sich die Deformationsschwingung der Imingruppe, welche laut Literatur in einem Bereich zwischen $1650 - 1700 \frac{1}{\text{cm}}$ zu erwarten ist¹⁹⁷ und auch nicht von Banden der Edukte überlagert wird. Für das HeptOx ergibt die Schwingung der Imingruppe eine Bande bei einer Wellenzahl von $1666 \frac{1}{\text{cm}}$, welche mit fortschreitender Reaktionsdauer immer weiter zunimmt. Nach 25 h wurde keine weitere Zunahme des Signals mehr beobachtet. Daher wurde die Reaktion nach dieser Zeit beendet.

Nach der Aufarbeitung wurde das erhaltene Monomer mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie charakterisiert. In Abb. 4.5 dargestellt ist ein $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des nach der Aufreinigung erhaltenen HeptOx. Alle in dem Spektrum auftretenden Signale sind hierbei eindeutig dem HeptOx zuzuordnen.

Die beiden Triplets bei 4,05 - 4,15 ppm (Pos. 1, 2H) und 3,65 - 3,75 ppm (Pos. 2, 2H) werden den Protonen des Oxazolinrings zugeordnet. Auf Grund der Nähe zu den

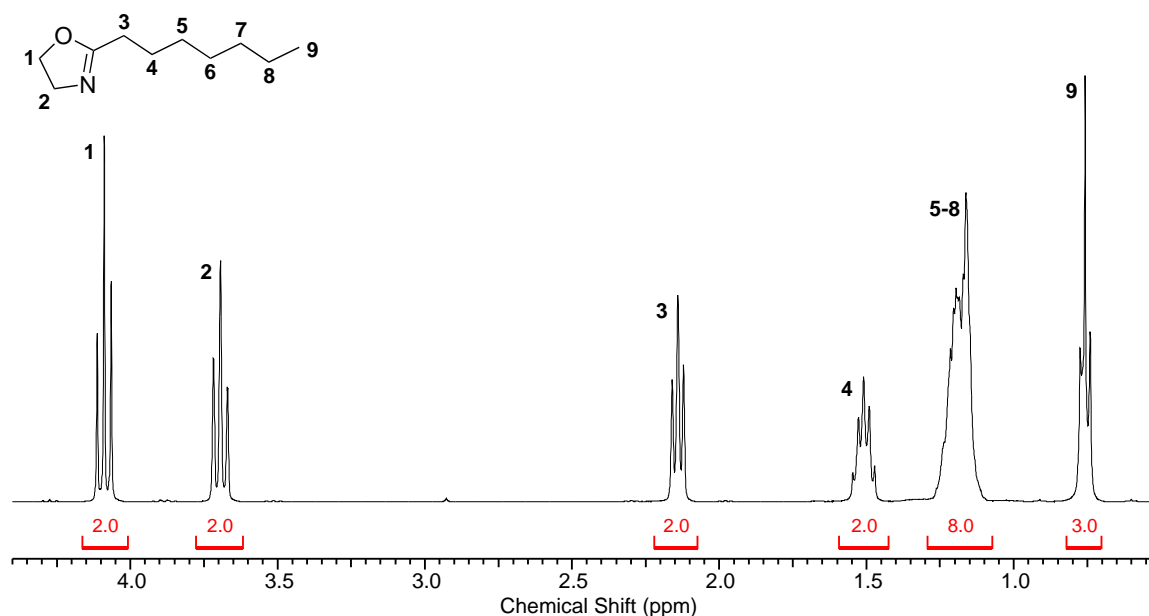


Abbildung 4.5: ¹H-NMR Spektrum des HeptOx nach der Aufreinigung, aufgenommen in CDCl₃ bei 400 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Heteroatomen erscheinen diese im tieferen Feld, wobei die beiden Wasserstoffatome an Pos. 1 durch die größere Elektronegativität des Sauerstoffs stärker entschirmt und damit tieffeldverschoben sind. Das Triplet bei 2,1 - 2,2 ppm (Pos. 3, 2H) wird durch die Protonen der erste Methylengruppe der Seitenkette hervorgerufen, die Protonen der zweite Methylengruppe (Pos. 4, 2H) erzeugen ein Multiplett bei 1,43 - 1,6 ppm. Die restlichen Methylengruppenprotonen (Pos. 5 - 8, 8H) werden dem breiten Signal bei 1,07 - 1,3 ppm zugeordnet. Die Methylgruppenprotonen der Seitenkette (Pos. 9, 3H) erzeugen das Triplet bei 0,69 - 0,84 ppm. Das HeptOx wurde mit einer Reinheit von 99,4 % und einem Wassergehalt von 0,35 ppm (bestimmt mittels KARL-FISCHER Titration) bei einer Ausbeute von ca. 70 % erhalten.

4.1.5 Ermittlung der Propagationsgeschwindigkeitskonstanten

Um die für einen vollständigen Monomerumsatz notwendige Polymerisationszeit zu ermitteln wurden die Propagationsgeschwindigkeitskonstanten k_p (s. Kap. 4.1.1) für Poly(2-Butyl-) (PBUx) sowie Poly(2-Heptyloxazolin) (PHeptOx) bestimmt. Hierzu wurden 1 g des jeweiligen Monomers in 4 mL trockenem deuteriertem Chloroform mit Benzyltosylat als Initiator in der Synthesemikrowelle polymerisiert und zu verschiedenen Zeiten ($t = 10, 20, 30, 40, 50$ min) Proben entnommen, welche mittels ¹H-NMR Spektroskopie analysiert wurden (s. Kap. 3.2.4.3). Die Ansätze wurden auf einen Polymeri-

sationsgrad (DP, engl. *degree of polymerisation*) von 30 Monomereinheiten angesetzt. Referenziert wird auf die am weitesten tieffeldverschobenen Protonen in *ortho*-Stellung zur Sulfonsäuregruppe bei 7,55 - 7,61 ppm (Pos. 12, 2H Abb. 4.7) am Gegenion des Initiators, da diese durch keine anderen Signale überlagert werden. Es ist möglich das Gegenion als Referenz zu nutzen, da keine weitere Aufarbeitung stattfindet und deshalb auch kein Austausch des Gegenions erfolgen kann. Über die Einwaage des Initiators kann dessen Stoffmenge und somit auch die Restmonomerkonzentration $[M_t]$ berechnet werden.

Abb. 4.7 zeigt exemplarisch für die Kinetik der Polymerisation von Poly-2-Heptyloxazolin drei ausgewählte $^1\text{H-NMR}$ Spektren, aufgenommen nach $t = 10, 20$ und 40 min Reaktionszeit sowie zum Vergleich ein Spektrum des Monomers 2-Heptyl-2-Oxazolin. Mit einem blauen Pfeil markiert ist das Signal des Monomer, welches für die Auswertung der Kinetik verwendet wurde. Dieses Triplet ist den Protonen des Monomers an Pos. a (4,06 - 4,14 ppm) zuzuordnen. Diese sind durch ihre Nähe zum Sauerstoff stark entschirmt und deshalb ins Tieffeld verschoben. Das Triplet des Monomers an Pos. b (3,67 - 3,75 ppm) wird durch die Protonen am Oxazolinring in der Nähe des Stickstoffes hervorgerufen. Dieses Triplet kann jedoch auf Grund des Tailings des Polymerrückgratsignals nicht zur Auswertung der Kinetik verwendet werden. Es zeigt sich, dass mit Fortschreiten der Reaktion die Signale des Monomers (Pos. a, b) immer weiter abnehmen, bis sie nach 40 min fast vollständig verschwunden sind. Die Signale des Polymers (Pos. 1 - 9) weisen darauf hin, dass die Polymerisation bereits nach 10 min zu einem großen Teil abgeschlossen ist, da im Anschluss die Signale kaum noch zunehmen bzw. nach 20 min sogar im Rahmen der Genauigkeit der Mess- bzw. Auswertemethode konstant bleiben. Alle weiteren auftretenden Signale gehören eindeutig zum Polymer bzw. dem Gegenion. Diese sind für die Auswertung hier nicht relevant und wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in der Abbildung nicht zugeordnet. Die genaue Zuordnung sämtlicher Signale wird in Kap. 4.1.6 diskutiert. Die Auswertung der Kinetik der Poly(2-Butyloxazolin)polymerisation erfolgte analog.

Neben der Bestimmung von k_p lässt sich aus den $^1\text{H-NMR}$ Spektren noch ein weiteres wichtiges Detail ablesen. Die Spektren geben Auskunft über das Verhältnis zwischen kovalenter und ionischer Propagationsspezies (Abb. 4.6).

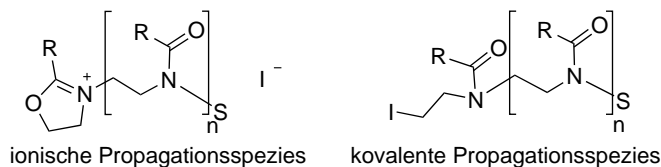


Abbildung 4.6: Darstellung der ionischen und kovalenten Propagationsspezies eines Poly(2-R-Oxazolins); S = Initiatorrest, I⁻ = Gegenion.

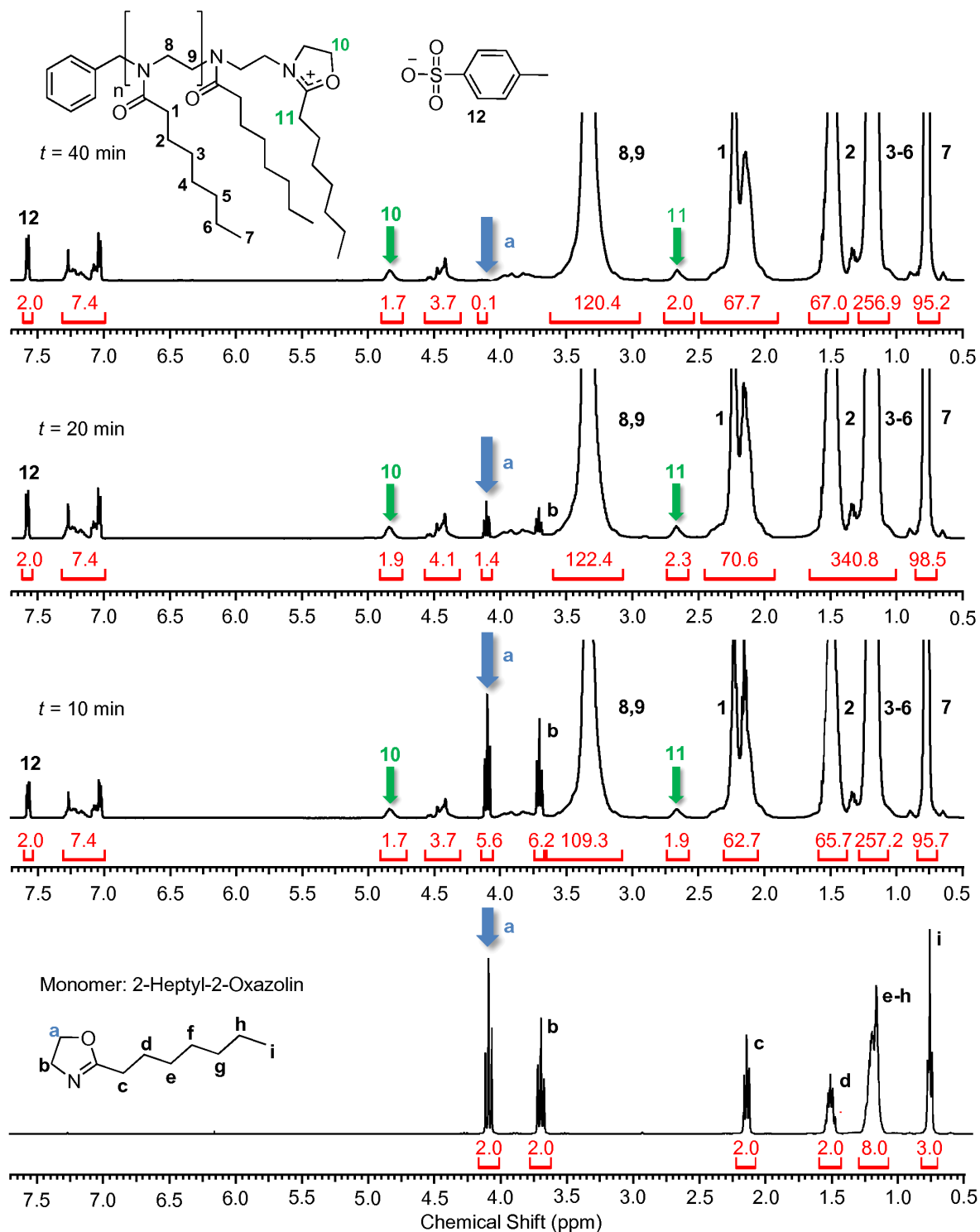


Abbildung 4.7: $^1\text{H-NMR}$ Spektren der Kinetik der HeptOx Polymerisation, durchgeführt bei $110\text{ }^\circ\text{C}$ in CDCl_3 ; aufgenommen bei RT nach $t = 10, 20$ und 40 min, bei 500 MHz; sowie zum Vergleich ein $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Monomers (unten); zugeordnet sind nur die für die aktuelle Auswertung relevanten Signale; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Die grünen Pfeile markieren zwei Signale, die durch die kationische Propagationsspezies hervorgerufen werden. Das Signal bei 4,72 - 4,92 ppm (Pos. 10, 2H) wird hierbei den Protonen des Oxazoliniumkations, welche durch die größere Elektronegativität des benachbarten Sauerstoffs am meisten entschirmt und damit tieffeldverschoben sind, zugeordnet. Das Signal bei 2,55 - 2,76 ppm (Pos. 11, 2H) wird auf die Protonen der ersten Methylengruppe der Seitenkette des lebenden Oxazoliniumkations zurückgeführt. Die übrigen Signale des lebenden Kettenendes werden von anderen Signalen überlagert und sind daher nicht zu sehen. Anhand der Signale des lebenden Oxazoliniumkations lässt sich ablesen, dass auch in Chloroform mit dem Initiator BeOTs, genau wie in der Literatur für Acetonitril beschrieben¹⁰³, das Verhältnis zwischen kovalenter und kationischer Propagationsspezies komplett auf der Seite der kationischen Propagationsspezies liegt, da die Integrale dieser Signale, im Rahmen der möglichen Genauigkeit, dem Wert von zwei entsprechen.

In Tab. 4.1 dargestellt sind die Ergebnisse der Kinetikmessungen mit den zu den jeweiligen Probenzeiten gehörenden Umsätzen. Wie bereits bei der Diskussion der ¹H-NMR Spektren des PHeptOx weiter oben angedeutet, scheint die Polymerisation bereits nach kurzer Zeit (10 min) sehr weit fortgeschritten zu sein. Dies bestätigen die Umsätze sowohl für die Polymerisation von BuOx wie auf für HeptOx. In beiden Fällen liegt der Umsatz nach 10 min bereits bei über 90 %.

Tabelle 4.1: Polymerisationszeiten und Umsätze der Poly(2-Oxazolin)kinetikmessungen von BuOx und HeptOx in CDCl₃ bei 110 °C; bestimmt über ¹H-NMR Spektroskopie.

Monomer	Zeit t [min] ^a	Umsatz an Monomer [%]
2-Butyl-2-Oxazolin	10	92,94
	20	99,24
	30	99,83
	40	99,96
2-Heptyl-2-Oxazolin	10	90,59
	20	97,71
	30	99,40

^a Angegeben sind die Zeiten, bei denen die Abkühlung der Reaktionsmischung mittels Druckluft gestartet wurde.

Die lebende CROP von 2-R-2-Oxazolinen folgt einer Kinetik 2. Ordnung. Damit ergibt sich für die Konzentrationsabnahme des Monomers über die Zeit:

$$\frac{dc_{Monomer}}{dt} = -k_p \cdot [M] \cdot [M^+] \quad (4.1)$$

Unter den Annahmen, die bereits in Kap. 4.1.1 beschrieben wurden, und unter Berücksichtigung, dass ein monofunktioneller Initiator verwendet wurde, ist die Konzentration der lebenden Kettenenden $[M^+]$ konstant und gleich der Initiatorkonzentration $[I]$. Damit ergibt sich eine Kinetik pseudoerster Ordnung:

$$\frac{d[M]}{dt} = -k_p \cdot [M] \cdot [I] \quad (4.2)$$

Wird Gl. 4.2 nun vom Zeitpunkt 0 bis t bzw. von der bekannten Startmonomerkonzentration $[M_0]$ bis zur Restmonomerkonzentration $[M_t]$ integriert, ergibt sich:

$$\int_{[M_0]}^{[M_t]} \frac{[dM]}{[M]} = -k_p \cdot \int_0^t dt \Leftrightarrow \ln \frac{[M_0]}{[M_t]} = k_p \cdot [I] \cdot t \quad (4.3)$$

Durch Auftragung von $\ln \frac{[M_t]}{[M_0]}$ gegen die Reaktionszeit t lässt sich aus der Steigung der Ausgleichsgeraden m die Propagationsgeschwindigkeitskonstante k_p berechnen:

$$k_p = \frac{m_{Gerade}}{[I]} \quad (4.4)$$

Die Polymerisationskinetiken von Poly(2-Heptyloxazolin) und Poly(2-Butyloxazolin) wurden bei 110 °C durchgeführt. In Abb. 4.8 sind die Ergebnisse der Auswertung der Kinetik für die beiden untersuchten Monomere dargestellt. Die erhaltenen Ausgleichsgeraden schneiden extrapoliert nicht im Nullpunkt die y-Achse sondern weiter oben. Dies bedeutet, dass zum Zeitpunkt $t = 0$ bereits ein signifikanter Umsatz vorhanden gewesen wäre, was auszuschließen ist. Das die extrapolierten Geraden nicht im Nullpunkt die y-Achse schneiden lässt sich damit erklären, dass nach Ablauf der jeweiligen Reaktionszeit noch ein gewisser Zeitraum verging bis die Proben vermessen wurden. Es ist wahrscheinlich, dass die Reaktion während dieser Zeit weiterging, vor allem da die Reaktionsmischung von der Synthesemikrowelle auch nur auf 50 °C abgekühlt wurde und bereits dieser Abkühlungsschritt ca. 1 min dauerte. Da für die Auswertung nur die Steigung der Ausgleichsgeraden von Belang ist, hat dies keine Auswirkungen auf die Berechnung der Propagationsgeschwindigkeitskonstanten.

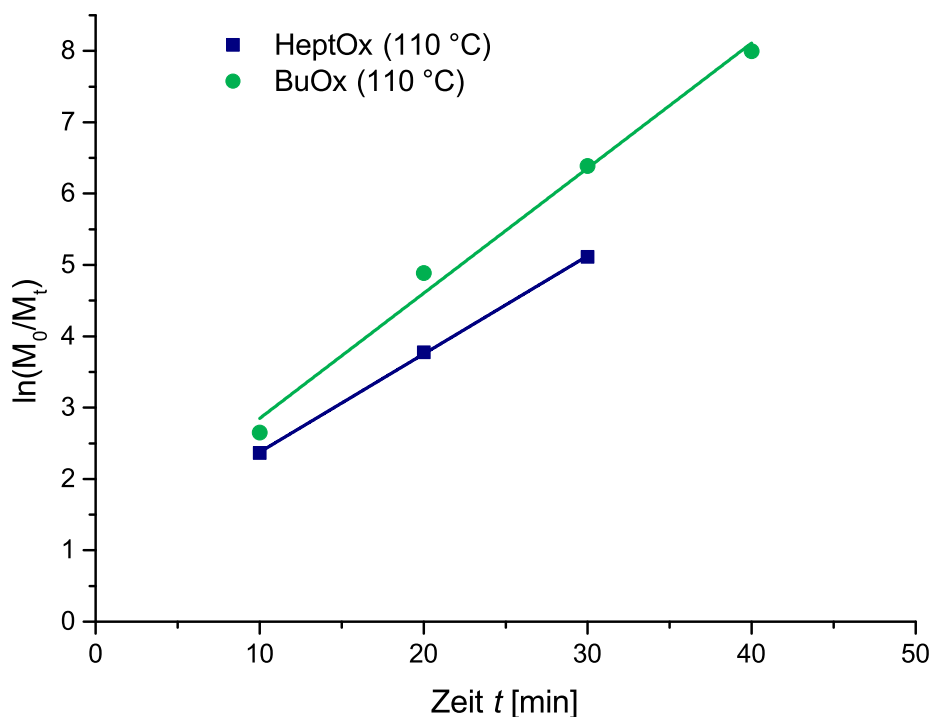


Abbildung 4.8: Auftragung des Verhältnisses der Anfangsmonomerkonzentration zur Restmonomerkonzentration $\ln \frac{[M_0]}{[M_t]}$ als Funktion der Reaktionszeit t für die Polymerisation von BuOx und HeptOx in überhitztem CHCl_3 bei 110 °C mit BeOTs als Initiator. Die Geraden stellen lineare Regressionen der jeweiligen experimentell ermittelten Datenpunkte dar (PBuOx: $R^2 = 0,9955$; PHeptOx: $R^2 = 0,9999$).

In Tab. 4.2 sind die Propagationsgeschwindigkeitskonstanten k_p für die beiden untersuchten Monomere dargestellt. Mit Hilfe der bestimmten k_p -Werte ist eine genaue Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Polymerisation bei der gegebenen Initiator- ($[I]$) und Monomerkonzentration ($[M_0]$) möglich.

Tabelle 4.2: Aus der Kinetik ermittelte Propagationsgeschwindigkeitskonstanten.

Monomer	k_p [$\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{s}}$]	Standardfehler
2-Butyl-2-oxazolin	0,17545	$\pm 0,0115$
2-Heptyl-2-oxazolin	0,13758	$\pm 0,00227$

Wie auf Grund der unterschiedlichen Reaktivitäten zu erwarten war¹⁰⁵, liegt der k_p -Wert für das BuOx höher als für das HeptOx.

4.1.6 Polymercharakterisierung

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit für die Enzym- und Coenzymmodifikation verwendeten Poly(2-R-Oxazoline) genauer charakterisiert. Verwendet wurden sowohl Homopolymere als auch Diblockcopolymere aus 2-Methyl-2-, 2-Ethyl-2-, 2-Butyl-2-, 2-Heptyl-2- und 2-Phenyl-2-Oxazolin unterschiedlicher Länge. Die Diblockcopolymere wurden mittels sogenannter *One-pot two-stage* Polymerisation synthetisiert. Bei dieser Art der Reaktionsführung wird der lebende Charakter der Oxazolinpolymerisation ausgenutzt. Im ersten Schritt wird der erste Block bis zum vollständigen Umsatz polymerisiert, im Anschluss wird das zweite Monomer zugegeben, welches dann an die lebenden Kettenenden des ersten Blocks polymerisiert wird und so den zweiten Block ergibt. Im Anschluss kann das resultierende Copolymer wie das Homopolymer durch die Terminierungsreaktion funktionalisiert werden. Alle Polymere wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie und GPC charakterisiert.

4.1.6.1 Aminterminierte Poly(2-R-Oxazoline)

Für die Synthese der Polymer-Enzym- und Coenzymkonjugate wurden die mittels MeOTs bzw. BeOTs gestarteten POX mittels Ethylendiamin (EDA) terminiert und dadurch mit einer endständigen primären Aminogruppe versehen. Um eine vollständige Terminierung zu gewährleisten und sicherzustellen, dass ein EDA-Molekül mit nur einer Polymerkette reagiert, wurde das EDA in großem molaren Überschuss eingesetzt. Zur vollständigen Entfernung des EDA-Überschusses wurden die POX mittels Umfällen und anschließender Dialyse in Methanol aufgereinigt.

4.1.6.1.1 Homopolymere

In Abb. 4.9 ist beispielhaft der relevante Bereich des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums eines BeOTs gestarteten und mit EDA-terminierten Poly(2-Methyloxazolins) (PMeOx), angesetzt auf einen DP von 30 (DP_{set}), dargestellt. Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 7,42 - 7,16 ppm (Pos. 1 - 3, 5H) wird von den aromatischen Protonen des am Polymer verbleibenden Benzylrestes des Initiators verursacht. Dieses Signal wird als Referenz zur Bestimmung der Flächenintegrale der anderen Signale genutzt und daher auf den theoretischen Wert von fünf Protonen gesetzt. Das Signal bei 4,61 - 4,49 ppm (Pos. 4, 2H) ist den Protonen der α -Methylengruppe des Benzylrestes zuzuordnen. Das stark verbreiterte Signal bei 3,54 - 3,17 ppm wird von den Protonen des Polymerrückgrats hervorgerufen (Pos. 6, 7, 8 $n \cdot 4\text{H}$). Die EDA-Terminierung erzeugt ein Signal bei 2,71 - 2,53 ppm, welches sowohl auf die Protonen der beiden Methylengruppen (Pos. 10,

11, 4H) des EDA, sowie auch auf die Protonen der letzten Methylengruppe (Pos. 9, 2H) des PMeOx-Rückgrat zurückgeführt wird. Eine vollständige EDA-Terminierung entspricht somit einer Fläche von sechs Protonen. Das ebenfalls stark verbreiterte Signal bei 2,11 - 1,85 ppm (Pos. 5, $n \cdot 3H$) wird von den Protonen der Methylseitengruppe des PMeOx hervorgerufen.

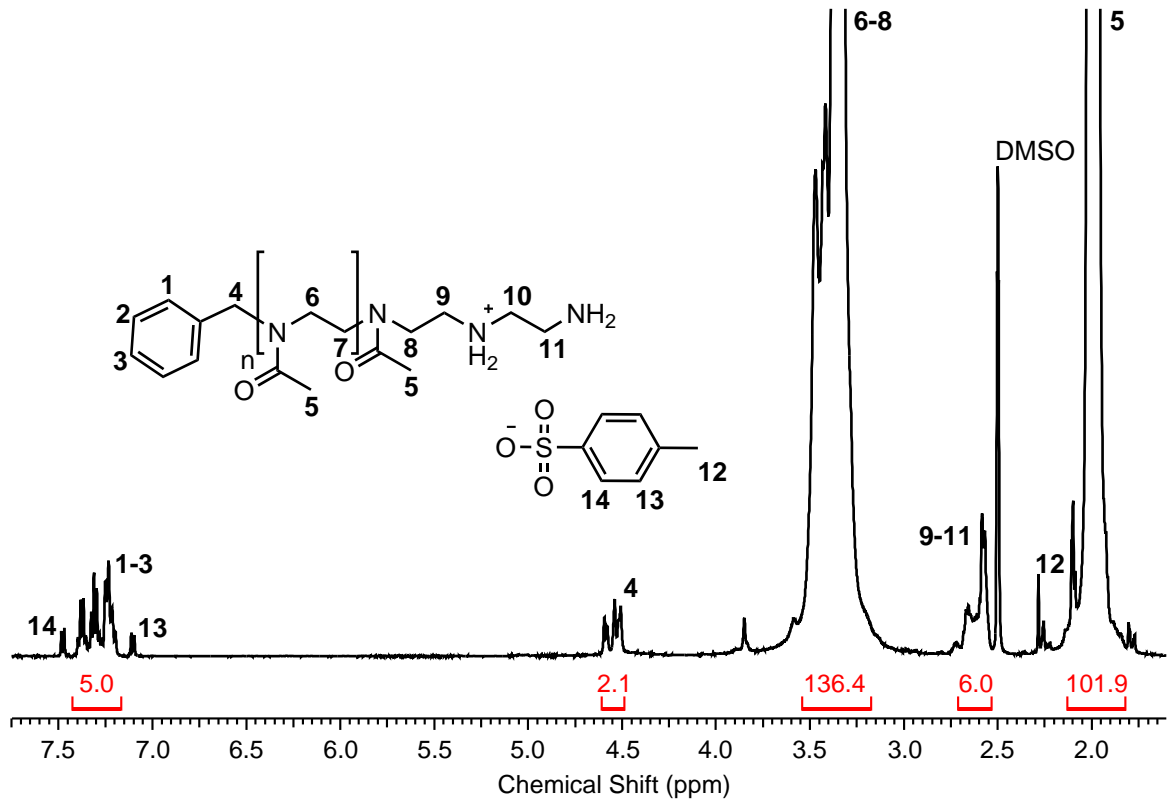


Abbildung 4.9: ^1H -NMR Spektrum eines EDA-terminierten PMeOx, aufgenommen in DMSO-d_6 bei 500 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Durch die Referenzsignale des Initiators lässt sich aus dem Flächenintegral des Polymerückgratsignals sowie des Polymerseitenkettensignals der DP für PMeOx mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{DP}_{\text{NMR}} = \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\sum \text{Rückgratprotonen}}{4} + \frac{\sum \text{Seitenkettenprotonen}}{3} \right) \quad (4.5)$$

Bei dem hier dargestellten ^1H -NMR Spektrum ergibt sich somit ein DP_{NMR} von 34. Der Terminierungsgrad (f_T) lässt sich aus dem Quotienten des theoretischen Werts des Integrals des Terminierungssignals (Pos. 9 - 11, 6H) und dem aus dem ^1H -NMR Spektrum ermittelten Wert dieses Integrals berechnen. Aus Abb. 4.9 lässt sich ein Wert von 6,0 Protonen entnehmen, damit ergibt sich ein Terminierungsgrad von 100 %.

Die GPC-Messung ergaben ein zahlenmittleres Molekulargewicht (M_n) von $2960 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, ein gewichtsmittleres Molekulargewicht (M_w) von $3500 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$. Der Polydispersitätsindex (PDI) liegt damit bei 1,19. Damit ergibt sich unter Berücksichtigung der molaren Massen von Initiator- und Terminierungsfunktion ein DP_{GPC} von 33.

Bei den POX mit anderen Seitenketten ist die Zuordnung der Initiator-, Polymerrückgrat- und Terminierungssignale analog. Durch die unterschiedlichen Seitenketten werden vom PMeOx (Abb. 4.9) abweichende Signale hervorgerufen. Abb. 4.10 zeigt beispielhaft das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum eines PHeptOx, initiiert mit BeOT und terminiert mit EDA ($DP_{\text{Set}} = 30$). Auf Grund der Abschirmung durch die Carbonylgruppe sind die Protonen der ersten benachbarten Methylengruppe am weitesten tieffeldverschoben und erscheinen bei 2,53 - 2,23 ppm (Pos. 5, $n \cdot 2\text{H}$). Die benachbarte Methylengruppen-

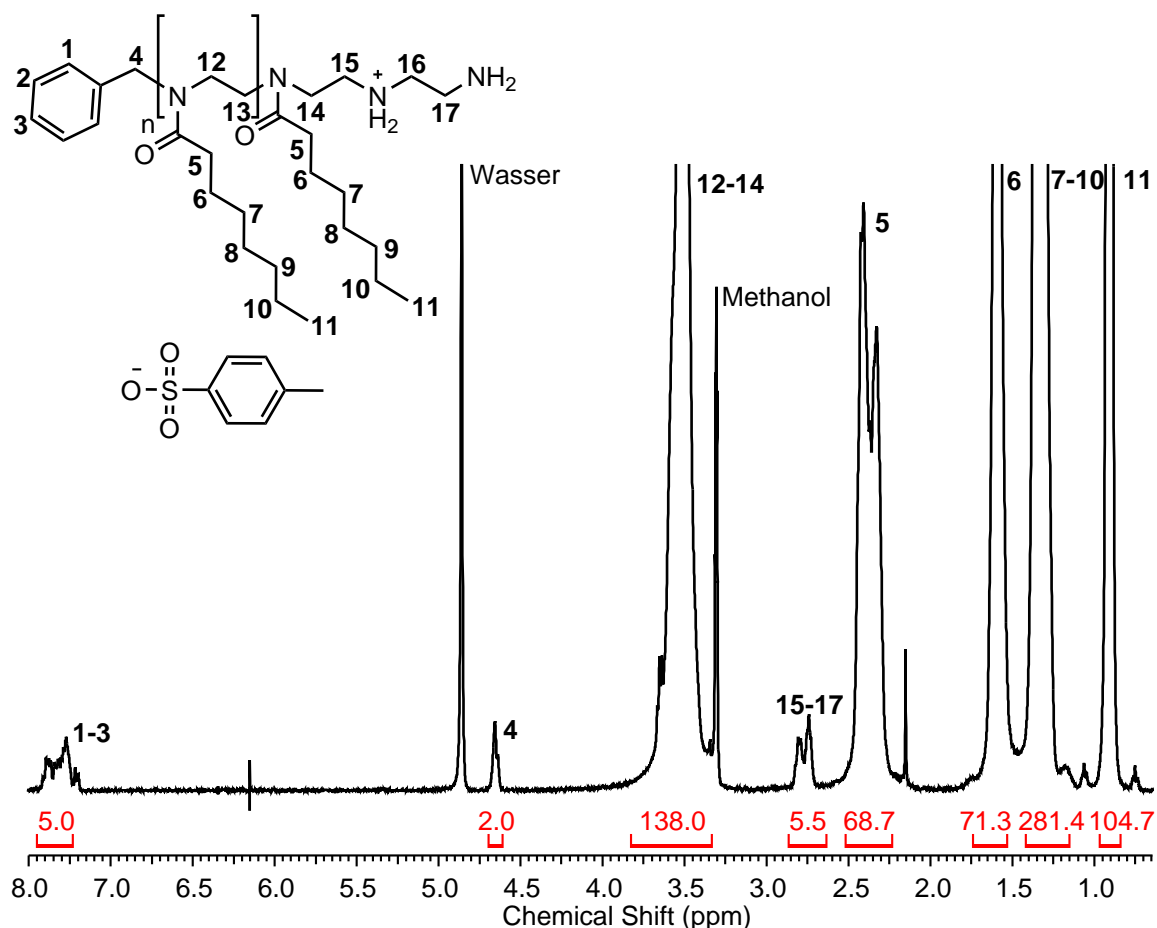


Abbildung 4.10: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum eines EDA-terminierten PHeptOx, aufgenommen in Methanol- d_4 bei 400 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

protonen verursachen das Signal bei 1,69 - 1,48 ppm (Pos. 6, $n \cdot 2H$). Das Signal bei 1,47 - 1,20 ppm ist den Protonen der übrigen Methylengruppen (Pos. 7 - 10, $n \cdot 8H$) zuzuordnen, während die Protonen der Methylgruppe das Signal im Hochfeld bei 0,97 - 0,84 ppm (Pos. 11, $n \cdot 3H$) hervorrufen. Die 1H -NMR Spektren der anderen synthetisierten POX-Homopolymere wurden analog ausgewertet. Die GPC-Messung ergaben ein $M_n = 5140 \frac{g}{mol}$, $M_w = 5690 \frac{g}{mol}$ und einen PDI von 1,11. Unter Berücksichtigung der molaren Massen von Initiator- und Terminierungsfunktion ergibt sich ein DP_{GPC} von 30.

4.1.6.1.2 Diblockcopolymerere

Die Auswertung der 1H -NMR Spektren der Diblockcopolymerere erfolgte analog derer der Homopolymere. Wie in Abb. 4.11 am Bsp. eines S-PBuOx-*b*-PMeOx (DP_{set} 50:10) zu erkennen ist, werden die versch. Signale der beiden Blöcke nicht voneinander überlagert, so dass eine Bestimmung der Blocklängen und Blockverhältnisse möglich ist.

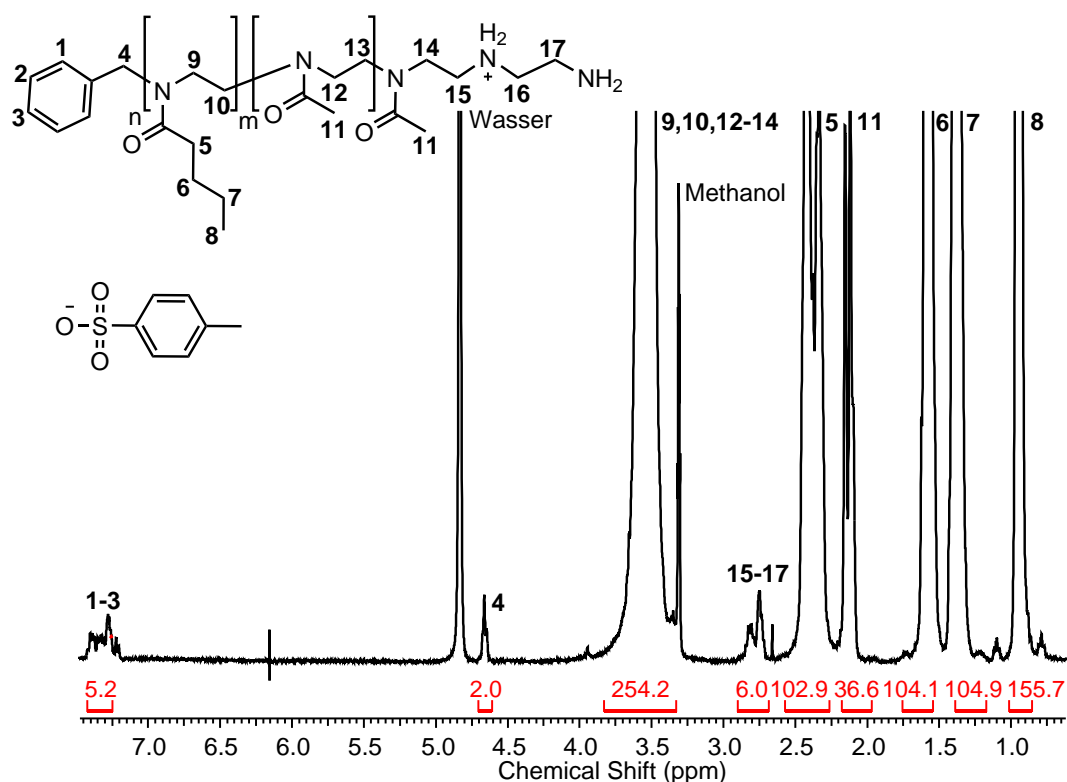


Abbildung 4.11: 1H -NMR Spektrum eines EDA-terminierten Diblockcopolymerere S-PBuOx-*b*-PMeOx (50:10), gemessen in Methanol- d_4 bei 400 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Mit S bezeichnet ist bei den verwendeten Diblockcopolymeren die Seite des Polymers von der die Polymerisation gestartet wurde. Für das dargestellte Diblockcopolymer ergibt sich für den MeOx-Block eine Länge von 12 Monomereinheiten und für den BuOx-Block eine Länge von 52 Wiederholungseinheiten. Daraus folgt ein Blockverhältnis von 1:4,3. Die mittels GPC bestimmten Werte für M_n und M_w liegen bei 8480 bzw. $9400 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ womit sich ein PDI von 1,11 ergibt.

4.1.6.1.3 ESI-MS Messungen

Um den Terminierungsgrad der durch Terminierung mit EDA aminfunktionalisierten POX zusätzlich zu der bereits durchgeführten $^1\text{H-NMR}$ Analytik (s. Kap. 4.1.6.1) zu bestätigen, wurden Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) Untersuchungen vorgenommen. Diese Messungen wurden am Leibniz-Institut für analytische Wissenschaften Dortmund durchgeführt. Außerdem sollte auf diese Weise zusätzlich zur GPC-Analytik überprüft werden, ob, wie durch den großen EDA-Überschuss beabsichtigt, ein EDA-Molekül mit nur einer Polymerkette reagiert hat. Stellvertretend für die in dieser Arbeit synthetisierten aminterminierten POX wurde ein PMeOx gestartet mit BeOTs und einem DP_{Set} von 30 untersucht (Abb. 4.12).

Wie in Abb. 4.12 zu sehen ist, liegt zwischen den einzelnen Signalen jeweils die molare Masse eines MeOx Monomers ($85,05 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$). Durch Variation der Anzahl der Monomereinheiten sind alle Signale dieser Hauptfraktion eindeutig dem Polymer zuzuordnen. Die Hauptfraktion repräsentiert das Zielpolymer, das eine Benzyl- und eine EDA-Endgruppe trägt. Beispielhaft ist die Berechnung der Masse eines so funktionalisierten Polymers mit 30 Wiederholungseinheiten in Gl. 4.6 dargestellt.

$$\begin{aligned}
 M_{ESI,theor.} &= M_{Benzylrest} + 30 \cdot M_{MeOx} + 2 \cdot M_{H^+} + M_{EDA-Rest} \\
 &= (91,06 + 30 \cdot 85,05 + 2 \cdot 1,01 + 59,06) \frac{\text{g}}{\text{mol}} \\
 &= 2703,64 \frac{\text{g}}{\text{mol}}
 \end{aligned} \tag{4.6}$$

Beim Vergleich der theoretischen Masse ($M_{ESI,theor.}$) mit der gemessenen ergibt sich nur eine geringe Abweichung von $0,05 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$. Bei der zweiten viel kleineren Polymergeneration handelt es sich um ein Kettenübertragungsprodukt, welches eine Proton- und eine EDA-Endgruppe trägt. Die Berechnung wurde analog zu Gl. 4.6 durchgeführt. Die Kettenübertragung wird in Kap. 4.1.6.1.3.1 ausführlich diskutiert. Es wurden keine Signale für Polymere gefunden, bei denen zwei oder mehr PMeOx-Ketten mit einem EDA Molekül reagiert haben. Daraus lässt sich schließen, dass alle Polymere eine EDA-

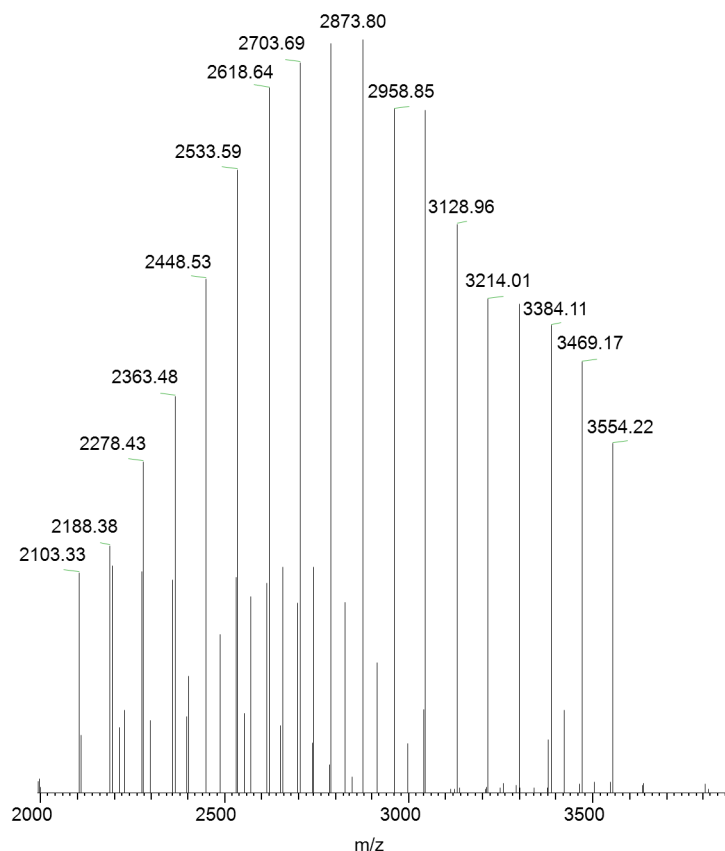


Abbildung 4.12: ESI-MS Spektrum eines BeOTs gestarteten und EDA-terminierten PMeOx, $DP_{\text{set}} = 30$; die dargestellten Signale zeigen das Molekulargewicht auf Grundlage der Isotope mit der niedrigsten Masse; aufgenommen in 70 % bidest. Wasser, 30 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure.

Endgruppe tragen, was ein Nachweis für eine vollständige Terminierung ist. Das über ESI-MS berechnete M_n des Polymers liegt bei $2560 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, das M_w bei $2690 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$. Damit ergibt sich ein PDI von 1,05. Unter Berücksichtigung der Massen von Initiator- und Terminierungsfunktion ergibt sich DP von 28, welcher gut zu dem angesetzten Wert von 30 Wiederholungseinheiten passt.

4.1.6.1.3.1 Übertragungsreaktion

Vor allem bei hohen Temperaturen (130 - 160 °C) und hohen Monomerkonzentrationen wird in der Literatur eine bei der Polymerisation von POX auftretende Nebenreaktion beschrieben. Bei dieser in Abb. 4.13 dargestellten Reaktion treten β -H-Eliminierungen auf, welche am Polymerkettenende zu ungeladenen Enamin-Terminalen führen, welche sich nicht weiter mittels Terminierung funktionalisieren lassen (Abb. 4.13).

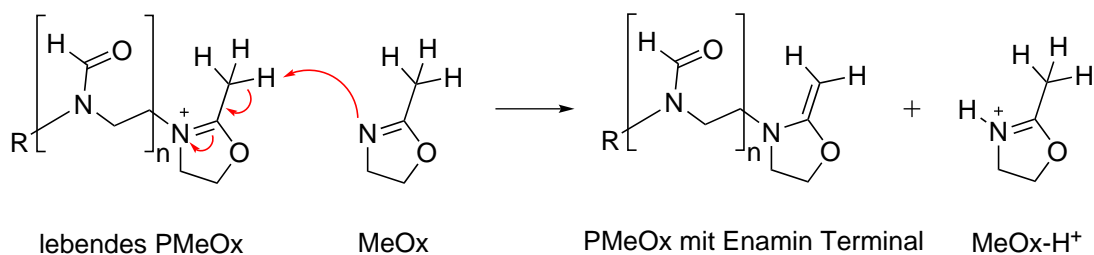


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Kettenübertragung als mögliche Nebenreaktion bei der Polymerisation am Beispiel von MeOx^{198,199}.

Das hierbei entstehende Proton kann auf ein Monomer übertragen werden. Dieses so entstandene Oxazoliniumkation kann nun als Initiator fungieren und eine neue, nicht mit dem gewünschten Initiator funktionalisierte Kette starten. Diese Übertragungsreaktion führt zu einer verbreiterten Molekulargewichtsverteilung, sowie zu einer unvollständigen Funktionalisierung der entstehenden Polymere.^{198,199}

4.1.6.2 Hydroxylterminierte Polyoxazoline

Für die Synthese von Polymer-Enzymkonjugaten wurde auch ein OH-terminiertes PMeOx verwendet. In Abb. 4.14 ist beispielhaft der relevante Bereich des ¹H-NMR Spektrums eines MeOTs gestarteten und OH-terminierten PMeOx dargestellt. Die grundlegende Zuordnung der Polymerpeaks ist bei den OH-terminierten POX die sel-

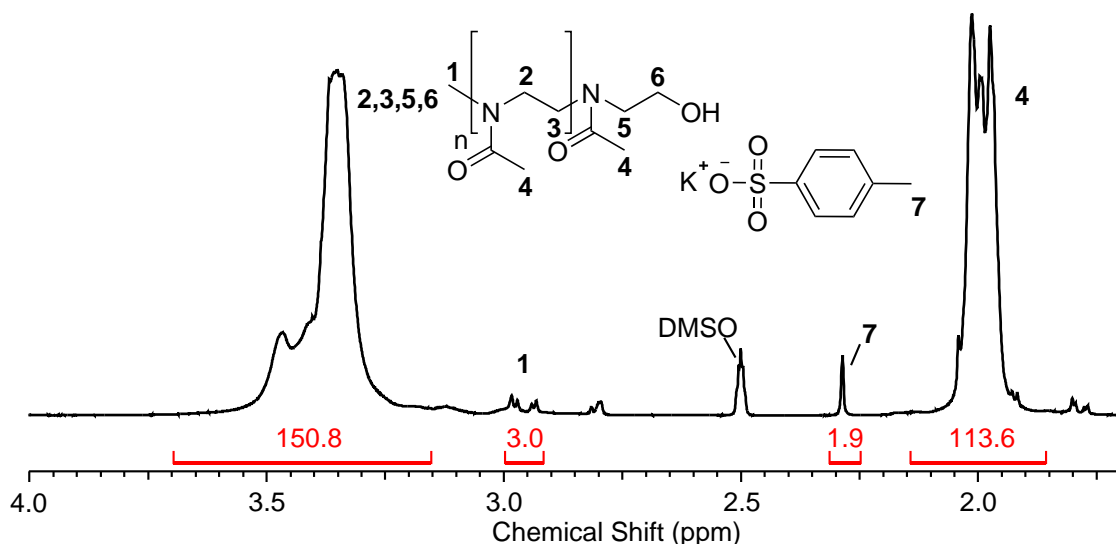


Abbildung 4.14: ¹H-NMR Spektrum eines OH-terminierten PMeOx, gemessen in DMSO-d₆ bei 400 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

be wie bei den EDA-terminierten POX. Die Protonen der letzten Methylengruppe des PMeOx vor der Hydroxygruppe werden zwar durch die Elektronegativität des Sauerstoffs tieffeldverschoben, allerdings nicht so weit, als dass das Signal (Pos. 6) nicht mehr vom verbreiterten Signal des Polymerrückgrates bei 3,69 - 3,15 ppm (Pos. 2, 3, 5; 4H) überlagert wird.

4.2 Organolösliche Polymer-Enzymkonjugate

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die kovalente Enzymmodifikation mittels unterschiedlicher Kopplungsstrategien durchgeführt. Wie bereits in Kap. 1.2.3 dargestellt, eignen sich hierfür die funktionellen Gruppen verschiedener Aminosäuren. In dieser Arbeit wurde die ϵ -Aminogruppe des Lysins zur Anbindung der Polymere gewählt, da sie häufig in Proteinen vorhanden ist, sich mit versch. Reagenzien modifizieren lässt und häufig auf der Außenseite der Proteine zu finden ist²⁰⁰. Es wurden zwei unterschiedliche Synthesestrategien zur Herstellung der Polymer-Enzymkonjugate (PEK) verwendet. Zum einen die direkte Terminierung (s. Kap 4.2.1), bei der das unterminierte POX direkt mit den ϵ -Aminogruppen des Lysins reagiert (Abb. 4.15).

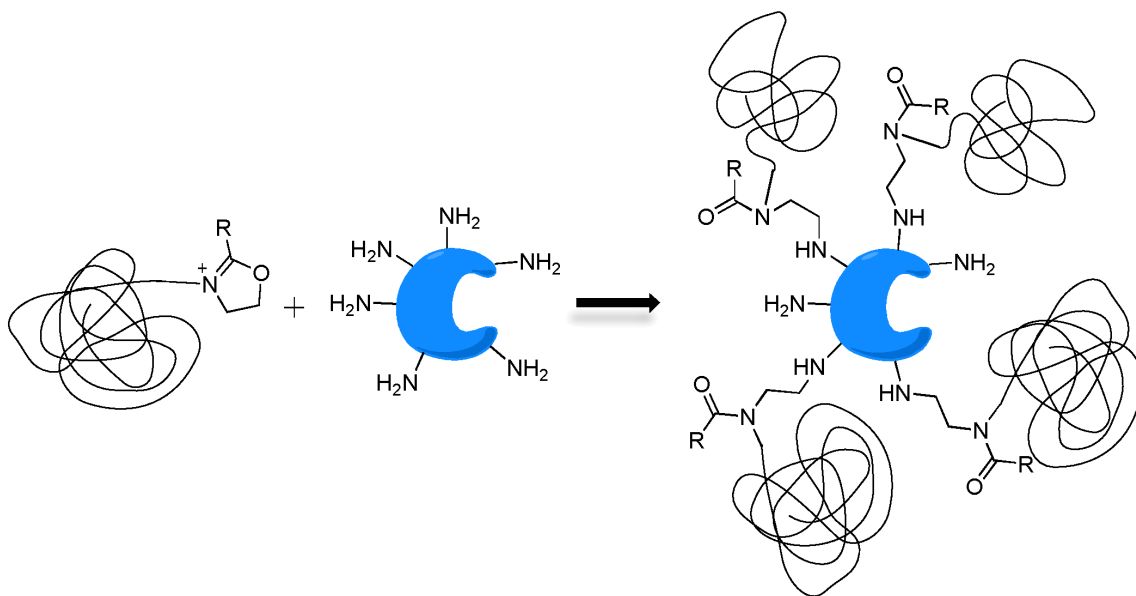


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung der Enzymmodifikation mittels direkter Terminierung von POX mittels Enzymen unter Verwendung eines Poly(2-R-Oxazolins).

Zum anderen werden versch. bifunktionelle Linker (s. Kap. 4.2.2 - 4.2.5) genutzt, um die Enzyme mit POX zu modifizieren. Hier wurde das Polymer zuerst mit dem jeweiligen bifunktionellen Linker umgesetzt. Im Anschluss erfolgte die Reaktion des aminoreaktiven Polymers mit dem Enzym (Abb. 4.17). In Abb. 4.16 ist die generelle Synthese der drei, ausgehend von EDA-terminierten Poly(2-R-Oxazolinen), hergestellten aminoreaktiven POX-Derivate dargestellt.

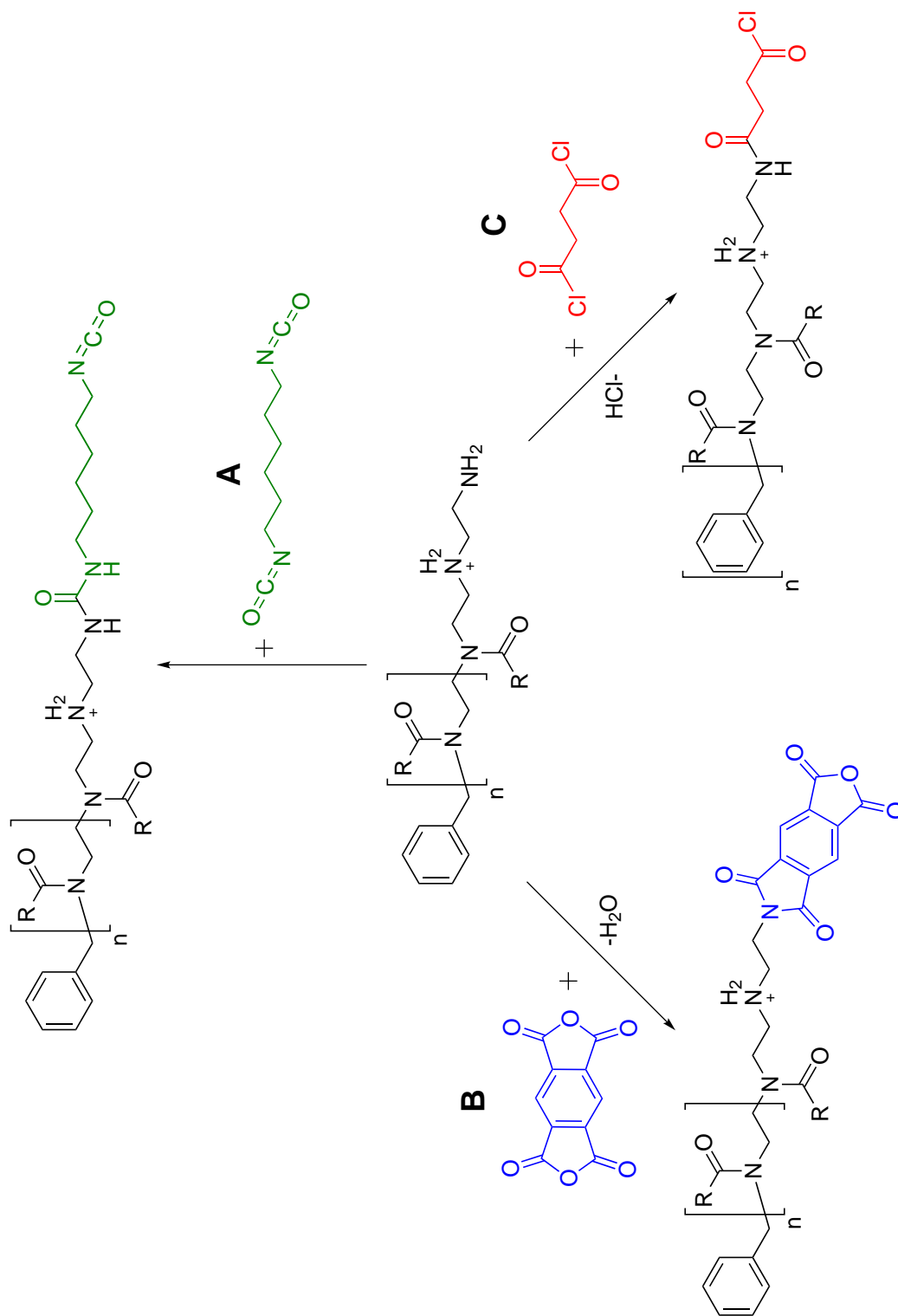


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung der Synthese von drei aminoreaktiven Benzyltolylat gestarteten Poly(2-R-Oxazolinen) über: A Hexamethylen-diisocyanat, B Pyromellit-säuredianhydrid und C Bernsteinsäuredichlorid.

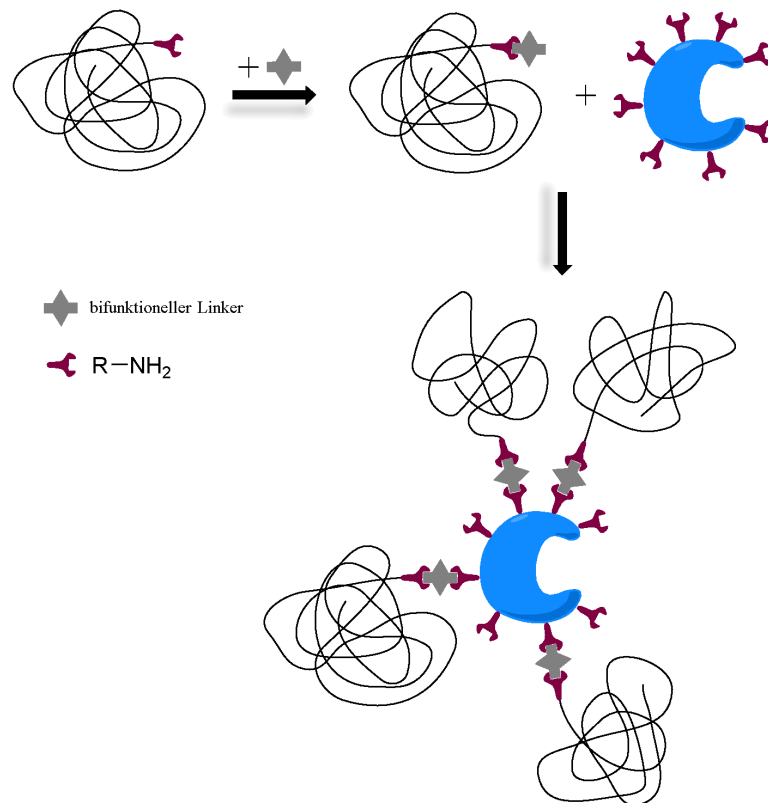


Abbildung 4.17: Schematische Darstellung der Enzymmodifikation mittels eines bifunktionellen Linkers unter Verwendung eines beliebigen Poly(2-R-Oxazolins).

4.2.1 Direkte Terminierung

Teile der Ergebnisse dieses Abschnittes wurden in Zusammenarbeit mit Ina Schönfeld im Rahmen ihrer Studienarbeit erarbeitet.²⁰¹ Die direkte Terminierung ist der einfachste denkbare Ansatz zur Synthese von POX-Enzymkonjugaten, da für die Konjugation nur ein Reaktionsschritt erforderlich ist (Abb. 4.15). Hierbei wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass die lebenden POX-Enden mit Nukleophilen terminiert werden können (s. Kap. 4.1.2). Die Aminogruppen der Enzyme fungieren hierbei als Nukleophil. Der Vorteil bei einer solchen Vorgehensweise ist, neben der einfachen Durchführung, dass eine Modifikation direkt im org. Medium möglich ist.

Die Modifikation wurde sowohl in reinem CHCl₃, in dem das lyophilisierte Enzym suspendiert wird, als auch in einer Emulsion, bestehend aus CHCl₃ und im Puffer gelöstem Enzym, mit den Modellenzymen Lysozym und α -Chymotrypsin mit versch.

POX durchgeführt (Tab. 4.3). Lysozym ist ein kleines Enzym mit einem Molekulargewicht von 14,3 kDa, α -Chymotrypsin hat etwa die doppelte Masse (25,4 kDa) (vgl. Tab. 3.11).

Tabelle 4.3: Analytische Daten der für die Enzymmodifikation eingesetzten POX.

Polymer	$M_{n,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	$M_{w,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	DP _{GPC}	DP _{NMR}	PDI
PEtOx ₃₅	3500	3800	35	32	1,09
I-PPheOx ₆₂ - <i>b</i> -PEtOx ₅	9700	1200	62/5 ^a	- ^b	1,19
I-PPheOx ₅₃ - <i>b</i> -PMeOx ₁₂	9000	11000	53/12 ^a	- ^b	1,21
I-PPheOx ₁₀₈ - <i>b</i> -PMeOx ₁₁	17000	23000	108/11 ^a	- ^b	1,38

^a Berechnet aus dem Molekulargewicht M_n (GPC) unter der Annahme der aus dem ¹H-NMR Spektrum bestimmten Blockverhältnisse.

^b Eine Berechnung ist auf Grund des breiten Polymerrückradsignals nicht möglich, da diese die Initiatorsignale überlagern.

Die POX wurden direkt nach der Polymerisation in einem Verhältnis von 20 zu 1, bezogen auf die Aminogruppen des Enzyms, zu dem gelösten bzw. lyophilisierten Enzym gegeben. Das Enzym wurde in einem basischen Puffer (Carbonatpuffer 0,5 mM, pH 9,65) gelöst bzw. aus diesem basischen Puffer lyophilisiert. Um den Erfolg der Modifikation zu überprüfen, wurde die Anzahl der freien Aminogruppen vor und nach der Modifikation bestimmt. Für die Bestimmung der freien Aminogruppen wurde die Reaktion der primären ϵ -Aminogruppe des Lysins mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) zu einem farbigen Trinitrophenyl-Aminosäurederivat ausgenutzt, welcher photometrisch (346 nm) detektiert wird (Abb. 4.18).

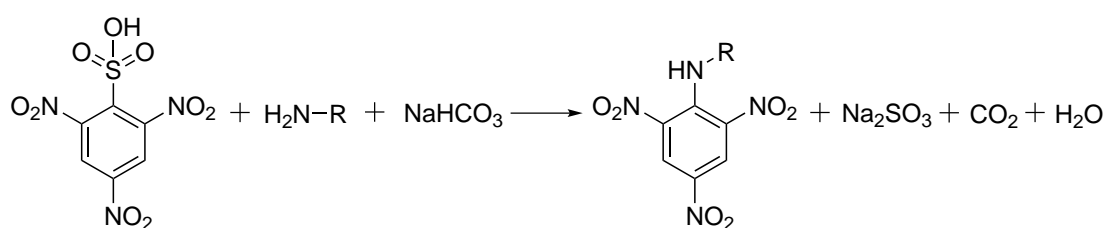


Abbildung 4.18: Reaktionsgleichung eines primären Amins mit TNBS.

Der TNBS-Assay zeigt für das mit PEtOx₃₅ modifizierte und während der Konjugation suspendierte Lysozym keine Veränderung der Anzahl der $-\text{NH}_2$ (Tab. 4.4). Wird die Modifikation in einer Emulsion aus CHCl_3 und in Puffer gelösten Enzym (α -Chymotrypsin) durchgeführt, so wird im Rahmen des Fehlers eine Verringerung der Anzahl der freien Aminogruppen im Vergleich zum nativen Enzym beobachtet.

Tabelle 4.4: Ergebnisse des TNBS-Assays für die reinen Enzyme sowie die Konjugate.

Enzym	Polymer	$\frac{\text{NH}_2\text{-Gruppen}}{\text{Enzym}}$	TNBS-Assay	$\frac{\text{NH}_2\text{-Gruppen}}{\text{Enzym}}$
Lysozym (Hühnereiweiß)	-	$5,4 \pm 0,8$		$6 + 1^{155}$
Lysozym (Hühnereiweiß) ^a	PEtOx ₃₅	$4,9 \pm 0,67$		$6 + 1^{155}$
α -Chymotrypsin (Schweinepankreas)	-	$11,2 \pm 0,06$		$14 + 1^{173}$
α -Chymotrypsin (Schweinepankreas) ^b	PEtOx ₃₅	$7,3 \pm 0,01$		$14 + 1^{173}$

^a Modifizierung in in reinem CHCl₃.

^b Modifizierung in einer Emulsion aus Puffer und CHCl₃.

Die Konjugate wurden zusätzlich mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert.

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Das anionische Tensid SDS überdeckt hierbei die Eigenladung der Proteine. Die Proteine weisen somit eine konstante negative Ladung mit einem konstanten Verhältnis von Masse zu Ladung ($\approx 1,4$ g SDS pro g Protein) auf. Der negativ geladene Protein-SDS Komplex wandert im elektrischen Feld zur Anode. Das SDS führt zusammen mit der Denaturierung durch Erhitzen auf 96 °C und der optionalen Reduktion der Disulfidbrücken z.B. mittels DTT oder β -Mercaptoethanol zu einer Zerstörung der Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur und zu einer Linearisierung der Proteine. Die Trennung erfolgt daher nach der Kettenlänge, welche dem Molekulargewicht proportional ist. Das verwendete Polyacrylamidgel wirkt hierbei als Sieb, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit nur von der Größe des Proteins abhängt. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden zwei verschiedene Gele verwendet, das Sammel- und das Trenngel. Am häufigsten wird das TRIS/Glycin Puffersystem verwendet, welches bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE aus drei versch. Puffern besteht (Sammel-, Trenngel- und Elektrodenpuffer). Hierbei durchlaufen die Proben zuerst ein weitporiges Sammelgel mit neutralem pH-Wert. Durch den hier vorhandenen Feldstärkegradienten ordnen sich die Proteine nach ihrer Mobilität (Stapeleffekt) und der Proteinstapel wandert mit konstanter Geschwindigkeit bis zum Trenngel. Durch den höheren pH-Wert von 8,8 ergibt sich eine höhere Nettoladung im engmaschigen Trenngel, indem die Proteine nach ihrer Größe getrennt werden. Wird die SDS-PAGE zur Bestimmung des Molekulargewichts eingesetzt, wird zusätzlich zu den Proben ein Marker mit Proteinen bekannten Molekulargewichts auf-

getragen. Hierüber werden dann, anhand einer Kalibrierkurve, die Molekulargewichte der gesuchten Banden berechnet. Nach der Elektrophorese werden die Proteine im Gel fixiert und anschließend gefärbt. Dies geschieht häufig mit Coomassie-Brillant-Blau, einem Triphenylmethanfarbstoff, oder mittels Silberfärbung.

Bei der Modifikation in reinem CHCl_3 mit PEtOx_{35} werden, wie Abb. 4.19 a zeigt, im Vergleich mit dem nativen Lysozym keine zusätzlichen, neuen Banden erhalten, d.h. die Modifikation war nicht erfolgreich. Wird die Modifikation hingegen in einem Zweiphasensystem aus CHCl_3 und in Puffer gelösten Enzym (α -Chymotrypsin) durchgeführt (Abb. 4.19 b), so zeigen sich neue Banden bei ca. 37 und 47 kDa.

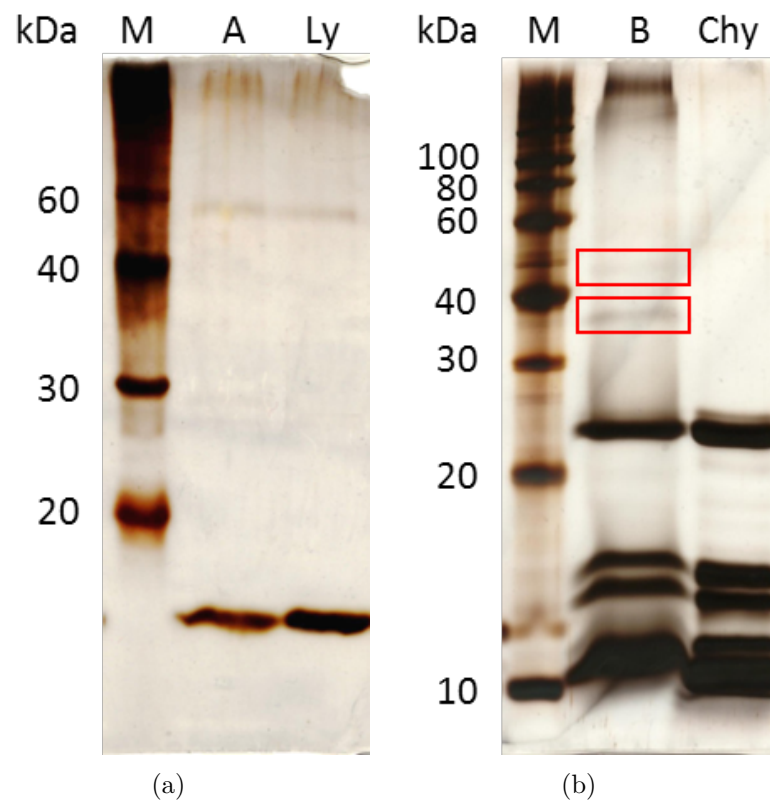


Abbildung 4.19: SDS-PAGE von Lysozym und α -Chymotrypsin, sowie der jeweiligen POX-Konjugate nach Silberfärbung: (a) Ly, Lysozym; A, PEtOx_{35} terminiert mit Lysozym in reinem CHCl_3 , Enzym wurde vorher lyophilisiert in 0,5 mM Carbonatpuffer pH 9,65; (b) Chy, α -Chymotrypsin; B, PEtOx_{35} terminiert mit α -Chymotrypsin in einem Zweiphasensystem aus CHCl_3 und 0,5 mM Carbonatpuffer pH 9,65; 14 %ige Gele.²⁰¹

Die deutlich sichtbare Bande von unmodifiziertem α -Chymotrypsin zeigt die geringe Effizienz dieser Methode. Die SDS-PAGE bestätigt somit die Ergebnisse des TNBS-

Assays. Das erhaltene Produkt war unlöslich in CHCl_3 .

Da die Modifikation im Zweiphasensystem mit α -Chymotrypsin zumindest teilweise erfolgreich war (TNBS-Assay Reduzierung der Aminogruppen um 34 %), wurde, um eine Organolöslichkeit zu erreichen, die Modifikation von Lysozym und α -Chymotrypsin mit hydrophoben POX Diblockcopolymeren aus Poly(2-Phenylloxazolin) (PPheOx) und PEtOx bzw. PMeOx durchgeführt. Eine Analyse mittels TNBS-Assay bzw. SDS-PAGE war auf Grund der Wasserunlöslichkeit der verwendeten Polymere nicht möglich, daher wurde nur die Löslichkeit in CHCl_3 untersucht. Bei der Verwendung des Diblockcopolymeres S-PPheOx₆₀-*b*-PEtOx₅ war keine Verbesserung der Löslichkeit der Enzyme zu erkennen (Abb. 4.20 a). Wurde jedoch S-PPheOx₅₃-*b*-PMeOx₁₂ eingesetzt, verbesserte sich die Löslichkeit von α -Chymotrypsin (Abb. 4.20 b).

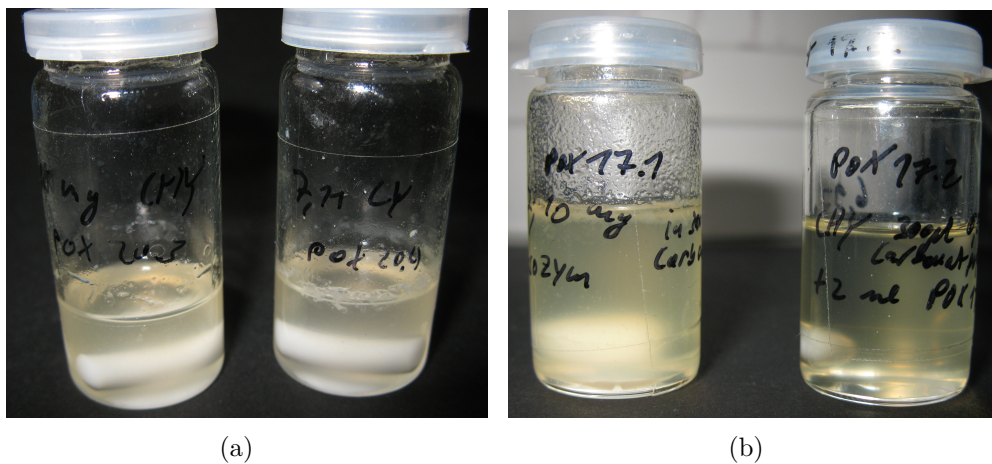


Abbildung 4.20: Bilder des (a) S-PPheOx₆₀-*b*-PEtOx₅-Lysozymkonjugates (links) sowie des S-PPheOx₆₀-*b*-PEtOx₅- α -Chymotrypsinkonjugates (rechts); (b) S-PPheOx₅₃-*b*-PMeOx₁₂-Lysozymkonjugates (links) sowie des S-PPheOx₅₃-*b*-PMeOx₁₂- α -Chymotrypsinkonjugates (rechts); in CHCl_3 , je ≈ 7 mg Enzym in 3 mL bzw. 5,8 mL.

Eine weitere Vergrößerung des hydrophoben Blocks (S-PPheOx₁₀₈-*b*-PMeOx₁₁) erhöhte die Löslichkeit vor allem des α -Chymotrypsinkonjugates, ohne das eine vollständig klare Lösung erreicht wurde (Abb. 4.21).

Auf Grund dessen, dass mit dieser Methode keine vollständig Chloroform-löslichen Enzyme erhalten wurden und der unpraktikabel langen Polymerisationszeiten des PPheOx-Blockes, wurde diese Variante der Konjugatsynthese nicht weiter verfolgt.

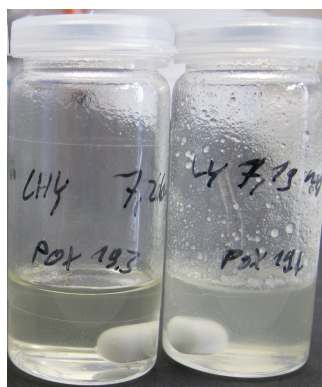


Abbildung 4.21: Bilder des S-PPheOx₁₀₈-*b*-PMeOx₁₁- α -Chymotrypsinkonjugates (links) sowie des S-PPheOx₁₀₈-*b*-PMeOx₁₁-Lysozymkonjugates (rechts); in CHCl₃, je \approx 7 mg Enzym in 3 mL CHCl₃.

4.2.2 Succinimidylcarbonat als Linker

Eine bereits für PEG bekannte Methode zur Einführung einer aminoreaktiven Endgruppe ist die Verwendung des bifunktionellen Linkers *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat (DSC)²⁰². Eine Übertragung dieser Methode auf POX sollte zu der Darstellung aminoreaktiver POX-Derivate führen. In Abb. 4.22 ist die Reaktionsgleichung der Synthese des aminoreaktiven POX-Derivates, sowie dessen Reaktion mit einem Enzym, ausgehend von einem OH-terminierten PMeOx dargestellt.

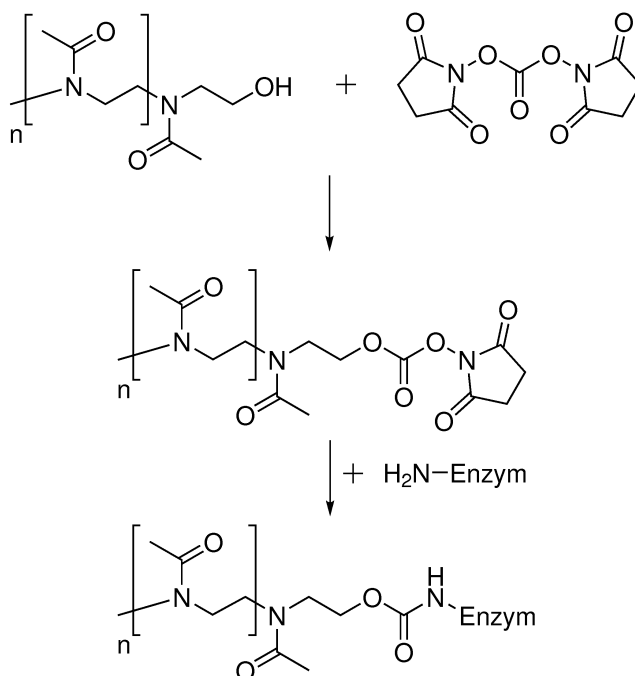


Abbildung 4.22: Schematische Darstellung der Enzymmodifikation mittels des bifunktionellen Linkers DSC unter Verwendung von PMeOx.

Die terminale Hydroxygruppe wurde durch eine literaturbekannte Terminierung mittels methanolischer KOH-Lösung¹⁴⁹ in das mit Methyltosylat gestartete PMeOx eingeführt (vgl. Kap. 4.1.6.2). Tab. 4.5 zeigt die analytischen Daten des erhaltenen Polymers nach der Aufarbeitung durch Umfällen.

Tabelle 4.5: Analytische Daten des für die Synthese des aminoreaktiven PMeOx-Derivates verwendeten OH-terminierten Polymers.

$M_{n,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	$M_{w,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	DP_{GPC}	DP_{NMR}	PDI
3870	4730	45	38	1,22

Das für die Synthese des aminoreaktiven PEG in der Literatur²⁰² verwendete Lösungsmittelsystem aus Dioxan/Aceton ist auf Grund der Unlöslichkeit von PMeOx in Dioxan und Aceton nicht geeignet, daher wurde eine Mischung aus trockenem Chloroform und trockenem Aceton bei der Umsetzung mit DSC eingesetzt. Die Verwendung von trockenen Lösungsmitteln während der gesamten Synthese ist notwendig, um ein vorzeitiges Abreagieren mit Wasser zu verhindern. Nach der Reaktion des OH-terminierten PMeOx mit dem DSC wurde das Polymer durch Umfällen und Dialyse aufgereinigt und durch ¹H-NMR Spektroskopie charakterisiert (Abb. 4.23).

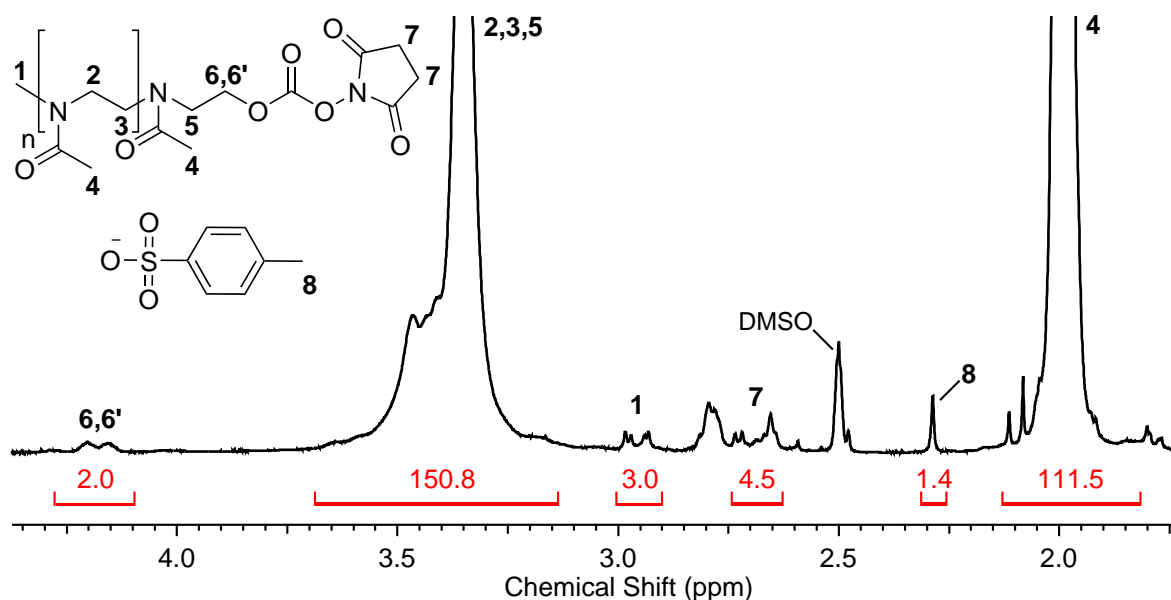


Abbildung 4.23: ¹H-NMR Spektrum des mit DSC umgesetzten PMeOx nach der Dialyse, gemessen in DMSO-d₆ bei 400 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Neben den bereits in Kap. 4.1.6 diskutierten Polymersignalen, zeigt das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zwei neue Signale, welche durch das eingeführte Succinimidylcarbonat hervorgerufen werden. Hierbei ist das Signal bei 4,11 - 4,32 ppm (Pos. 6, 6', 2H) den Protonen der letzten Methylengruppe des Polymers vor der Endgruppe zuzuordnen. Das Signal bei 2,75 - 2,63 ppm (Pos. 7, 4H) entspricht den vier Methylengruppenprotonen des Succinimidylcarbonats. Referenziert wurde auf die Protonen der endständigen Methylgruppe bei 3,02 - 2,88 ppm (Pos. 1, 3H), welche durch den Initiator in das Polymer eingebracht wurde. Die Integralverhältnisse zeigen, dass die polymeranalogue Umsetzung vollständig erfolgt ist.

Um zu überprüfen wie aminoreaktiv das mit Succinimidylcarbonat funktionalisierte PMeOx ist, wurde es mit Octylamin als Modellamin (10 äq. bezogen auf das Polymer) in trockenem Chloroform umgesetzt. Während der Reaktion wurde der Ausfall eines Feststoffes beobachtet. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um *N*-Hydroxysuccinimid handelt, welches in Chloroform unlöslich ist. Um das überschüssige Octylamin zu entfernen, wurde das resultierende Polymer nach der Reaktion gegen eine Mischung aus Chloroform und Aceton dialysiert und mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie charakterisiert (Abb. 4.24).

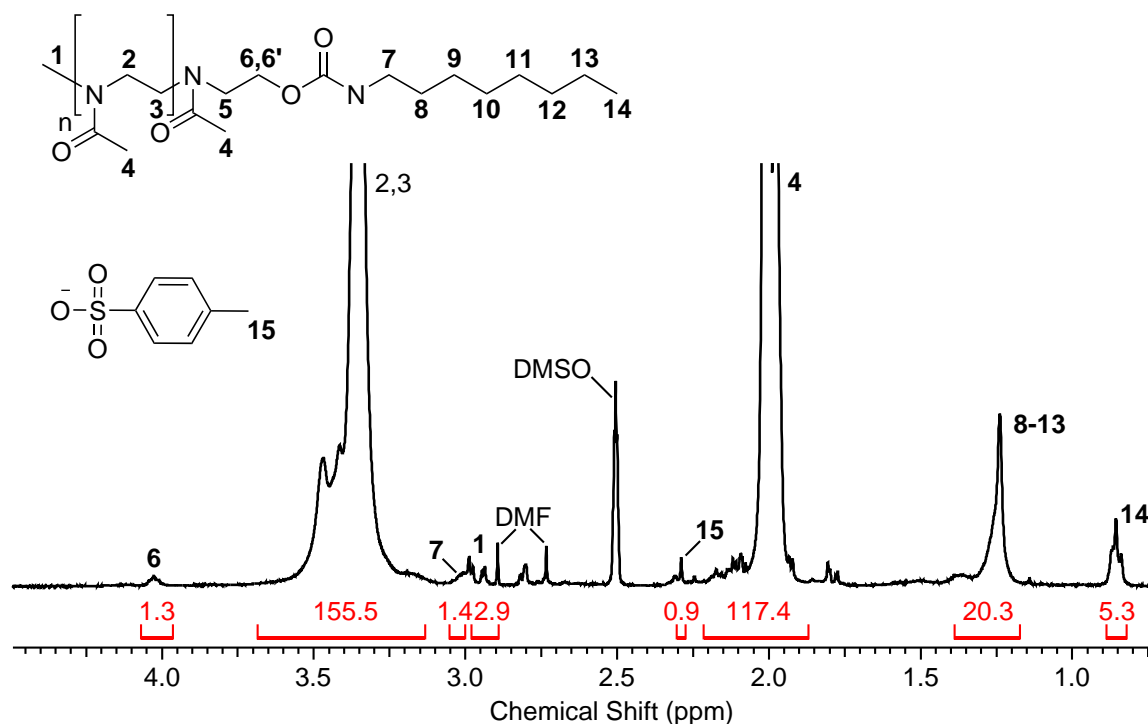


Abbildung 4.24: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des mit Octylamin umgesetzten PMeOx-Succinimidylcarbonats nach Dialyse, aufgenommen in DMSO-d_6 bei 400 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigt, dass die beiden Signale, welche den Protonen der Succinimidylcarbonatendgruppe zugeordnet wurden nicht mehr vorhanden sind. Es treten neue Signale bei 1,39 - 1,17 ppm und 0,9 - 0,81 ppm auf, die durch das Octylamin verursacht werden (Pos. 8 - 13, 12H; Pos. 14, 3H). Zwei weitere charakteristische Signale bei 4,06 - 3,98 ppm und 3,06 - 2,99 ppm werden durch das an das Polymer gebundene Octylamin hervorgerufen (Pos. 6, 6', 2H; Pos. 7, 2H). Aus der Integration der Signale an Pos. 6, 6' und 7 ergibt sich ein Funktionalisierungsgrad von 68 %. Demnach gelang es ein aminoreaktives PMeOx zu synthetisieren und dies mit Octylamin als Modellamin umzusetzen.

Im Folgenden wurde das funktionalisierte PMeOx mit Lysozym als Modellenzym umgesetzt. Die Enzymmodifikation wurde in reinem Phosphatpuffer (50 mM pH 7), in reinem Chloroform, sowie in einer Emulsion aus Phosphatpuffer und Chloroform mit Puffer als disperse Phase durchgeführt. Hierfür wurden 10 äq. Polymer, bezogen auf die Aminogruppen des Lysozyms, eingesetzt. Die Proben wurden nach der Modifikation mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 4.25).

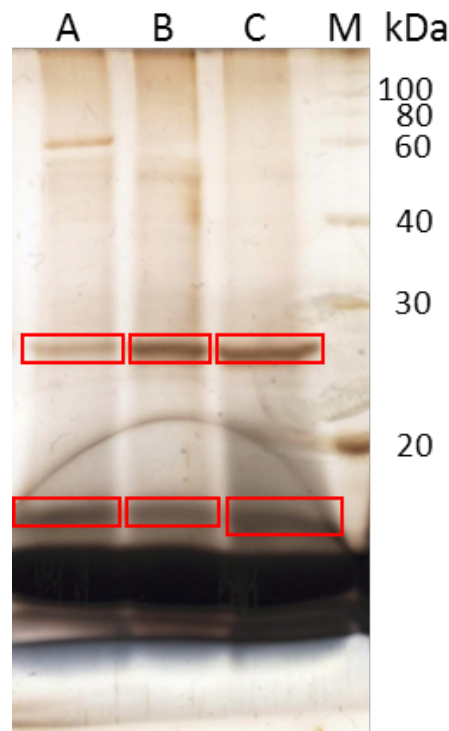


Abbildung 4.25: SDS-PAGE der Lysozym PEKs modifiziert mit PMeOx-DSC nach der Silberfärbung, M, Marker; A, modifiziert in Phosphatpuffer (50 mM pH 7); B, modifiziert in Chloroform; C, modifiziert in einer Emulsion aus Phosphatpuffer (50 mM pH 7) und Chloroform, 14 %iges Gel.

Hierbei zeigte sich, dass in allen drei Fällen ein sehr großer Anteil an nicht modifiziertem Lysozym vorhanden ist. Außerdem zeigen sich zwei weitere Banden, welche nicht zum nativen Lysozym gehören, eine bei ca. 18,2 kDa, sowie eine bei ca. 29,5 kDa. Über das Molekulargewicht der Banden lässt sich die Anzahl der gebundenen Polymerketten abschätzen. Die Bande bei 18,2 kDa entspricht Lysozym, welches mit einer Polymerkette modifiziert wurde, die Bande bei 29,5 kDa entspricht Lysozym modifiziert mit vier Polymerketten. Es konnte zwar eine Konjugatbildung nachgewiesen werden, dennoch ist diese Variante der Konjugatsynthese auf Grund der niedrigen Konjugationseffizienz nicht weiter verfolgt worden. Die Löslichkeit in organischen Medien wurde daher nicht untersucht.

4.2.3 Hexamethylen-diisocyanat als Linker

Eine Möglichkeit zur Einführung einer aminoreaktiven Gruppe in POX ist der Einsatz des bifunktionellen Linkers Hexamethylen-diisocyanat (HMDI), ausgehend von einem mit EDA terminierten PMeOx (vgl. Abb. 4.16). Tab. 4.6 zeigt die analytischen Daten des verwendeten amineterminierten Polymers nach der Aufarbeitung durch Umfällen ohne Dialyse gegen MeOH.

Tabelle 4.6: Analytische Daten des für die Synthese des aminoreaktiven PMeOx-Derivates verwendeten amineterminierten Polymers.

$M_{n,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	$M_{w,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	DP_{GPC}	DP_{NMR}	PDI
3280	4030	37	54	1,23

Um eine Dimerbildung bei der Reaktion zu unterdrücken wurde das HMDI in molarem Überschuss bei 0 °C vorgelegt und das amineterminierte Polymer, gelöst in trockenem Chloroform, langsam zugetropft. Nach der Reaktion wurde das resultierende Polymer durch Umfällen in Diethylether aufgereinigt. Eine GPC-Messung dieses Polymers zeigte eine bimodale Verteilung (Abb. 4.26). Der erste Peak hat ein M_w von etwa $3980 \frac{g}{mol}$ und entspricht dem Ursprungspolymer, der zweite Peak, der einen Anteil von 43 % am Gesamtpolymer hat besitzt ein M_w von etwa $9350 \frac{g}{mol}$. Dies deutet, im Rahmen der Genauigkeit der GPC, auf die Bildung eines Dimers hin.

Dieses Polymergemisch wurde mit Lysozym als Modellenzym umgesetzt, da 56 % der Polymerendgruppen für die Aminogruppen des Enzyms zugänglich waren. Die Enzymmodifikation wurde sowohl in reinem Carbonatpuffer (0,5 mM pH 9,65), als auch in reinem Chloroform und in einer Emulsion aus Carbonatpuffer (0,5 mM pH 9,65) und Chloroform mit Puffer als disperse Phase durchgeführt. Hierfür wurden 10 äq. des Po-

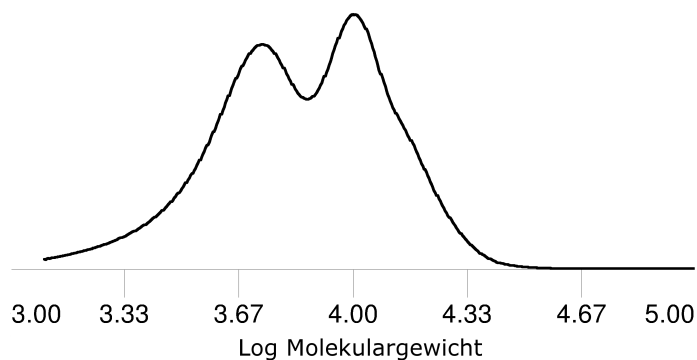


Abbildung 4.26: Molekulargewichtsverteilung des aminterminierten PMeOx nach der Reaktion mit HMDI; Messung mittels GPC, 60 °C in DMF mit 20 mM LiBr.

lymers, bezogen auf die Aminogruppen des Lysozyms, eingesetzt. Die Proben wurden nach der Modifikation mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 4.27).

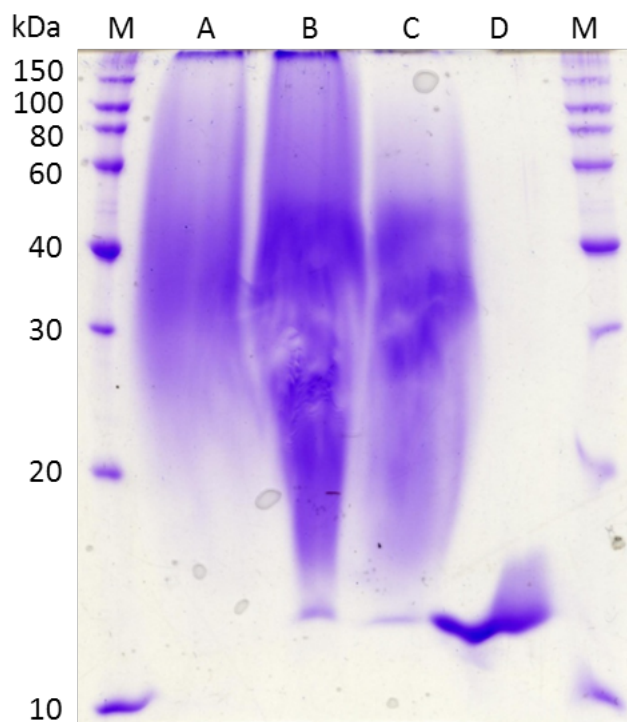


Abbildung 4.27: SDS-PAGE der Lysozym PEKs modifiziert mit PMeOx-HMDI nach der Coomassiefärbung, M, Marker; A, modifiziert in Chloroform; B, modifiziert in einer Emulsion aus Carbonatpuffer (0,5 mM pH 9,65) und Chloroform; C, modifiziert in Carbonatpuffer (0,5 mM pH 9,65); D, Lysozym nativ; 14 %iges Gel.

Die Verzerrungen bei der SDS-PAGE werden durch den hohen POX Gehalt hervorgerufen. Das SDS-Gel zeigt im Vergleich zum nativen Lysozym (Laufbahn D) bei allen drei Modifikationsvarianten sehr breite Banden über einen großen Molmassenbereich mit einem Maximum zwischen 30 und 40 kDa. Bei der Modifikation in reinem Chloroform (Laufbahn A) ist kein unmodifiziertes Lysozym mehr zu erkennen, während in den beiden anderen Fällen noch eine schwache Bande des unmodifizierten Lysozyms vorhanden ist. Die Bande beginnt hier erst bei etwa 20 kDa, was bedeutet, dass das Lysozym hier mindestens zweifach modifiziert vorliegt. Das theoretisch maximal mögliche Molekulargewicht eines mit diesem Polymer vollständig modifizierten Lysozyms liegt bei ca. 34 kDa und wird in allen drei Fällen deutlich überschritten. Die Bande reicht bei der Modifikation in Chloroform, sowie in der Emulsion bis ca. 100 bzw. 150 kDa. Dies weist auf eine Aggregatbildung oder eine Quervernetzung der Konjugate oder der Enzyme durch nicht vollständig entferntes freies HMDI hin. Nur bei der Modifikation in reinem Puffer endet die Bande bei etwa 50 kDa, d.h. die Aggregatbildung bzw. Quervernetzung ist hier geringer. Auch wenn hier im Gegensatz zum Einsatz von DSC als bifunktionellem Linker die Konjugationseffizienz deutlich größer war, wurde diese Variante der PEK Synthese auf Grund der Dimerbildung von 43 % bei Funktionalisierung mit HMDI, sowie der Aggregatbildung oder möglichen Quervernetzung der Konjugate nicht weiter verfolgt. Aus diesem Grund wurde die Löslichkeit im organischen Medium nicht untersucht.

4.2.4 Pyromellitsäuredianhydrid als Linker

Ein alternativer bifunktionaler Linker zur Einführung einer aminoreaktiven Gruppe in Poly(2-R-Oxazoline) ist die Verwendung von Pyromellitsäuredianhydrid (PADA), wiederum ausgehend von EDA-terminierten POX (vgl. Abb. 4.16). Bisher wurde PADA nur dazu eingesetzt, um die Hydrophilie von Enzymen zu erhöhen²⁰³. Auf Grund der Löslichkeit des PADA ist die Funktionalisierung der Poly(2-R-Oxazoline) nur in *N,N*-Dimethylformamid (DMF), *N*-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP) und Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel möglich. Auf Grund dessen, dass DMF einfacher zu Trocknen, sowie zu Entfernen ist, wurde es als Lösungsmittel ausgewählt. Es wurde hierbei untersucht, ob sich das PADA auf Grund seiner hohen Reaktivität im Unterschuss einsetzen lässt ohne dass es zu einer Dimerbildung kommt und eine weitere Aufarbeitung des aminoreaktiven POX damit überflüssig wäre. Es wurde aminoterminiertes PMeOx mit PADA in versch. molaren Verhältnissen zwischen 0,3 und 0,8 umgesetzt. Die Reaktion wurde für 4 d bei 45 °C durchgeführt. Tritt unter diesen Reaktionsbedingungen keine Dimerbildung auf, wird davon ausgegangen, dass eine Dimerbildung auch bei

einer Reaktionszeit von nur 12 h bei RT nicht eintritt. Nach Reaktionsende wurden die Proben mittels GPC untersucht (Tab. 4.7).

Tabelle 4.7: GPC Ergebnisse der Umsetzung von aminterminiertem PMeOx mit PADA in versch. molaren Verhältnissen, nach 4 d Reaktionszeit bei 45 °C in trockenem DMF.

Verhältnis POX:PADA	$M_{n,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	$M_{w,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	PDI
1:0	2940	3370	1,15
1:0,3	3260	4120	1,26
1:0,4	3520	4550	1,29
1:0,5	3060	3810	1,25
1:0,6	3560	4500	1,27
1:0,8	3830	4830	1,26

Wie die Ergebnisse der GPC Untersuchungen zeigen, sind die Molekulargewichte der mit PADA umgesetzten PMeOx größer als die des unfunktionalisierten aminterminierten Ausgangspolymers. Die Verschiebung zu höheren Molekulargewichten lässt sich möglicherweise auf Wechselwirkungen des PADA-funktionalisierten PMeOx mit dem Säulenmaterial zurückführen, auch die höheren PDI weisen hierauf hin. In den GPC-Eluogrammen wurde in keinem Fall ein zweiter Peak oder eine Schulter (vgl. Abb. 4.26) beobachtet. In Abb. 4.28 ist die Molekulargewichtsverteilung des Ausgangspolymers (Abb. 4.28 a), sowie die Molekulargewichtsverteilung des mit PADA funktionalisierten PMeOx bei einem POX zu PADA Verhältnis von 1:0,7 (Abb. 4.28 b) dargestellt.

Die Molekulargewichtsverteilungen weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. Der einzige Unterschied ist die Breite der Verteilung hin zu höheren Molekulargewichten bei dem mit PADA funktionalisierten PMeOx. Die GPC Ergebnisse zeigen, dass unter den gewählten Bedingungen keine nachweisbare Dimerbildung stattfindet. Daher wurde das PADA im folgenden in molarem Unterschuss zum aminterminierten POX eingesetzt und das resultierende aminoreaktive POX-Derivat direkt ohne weitere Aufarbeitung zur Enzymmodifikation verwendet. Der Grund, für die fehlende Dimerbildung, ist die hohe Reaktivität des PADA. Im ersten Schritt reagiert das PADA einseitig mit der primären terminalen Aminogruppe des POX. Durch die Bindung des PADA an das POX vergrößert sich der Diffusionskoeffizient gegenüber dem des reinen PADA. Durch diese Diffusionslimitierung ist das mit PADA funktionalisierte POX-Derivat weniger reaktiv, deshalb ist die einseitige Reaktion gegenüber der Dimerbildung bevorzugt.

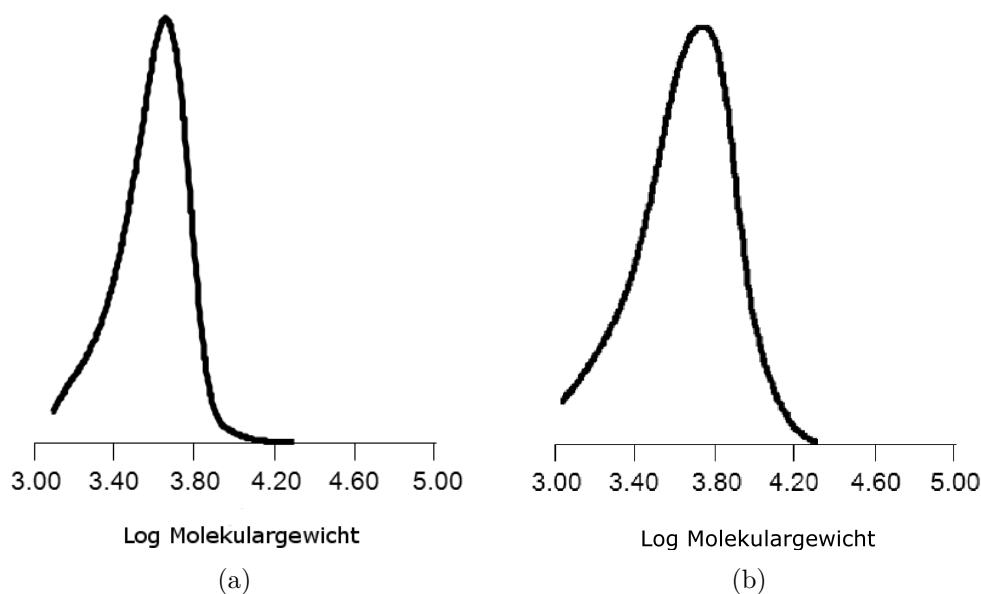


Abbildung 4.28: Vergleich der Molekulargewichtsverteilungen von: (a) aminterminiertem PMeOx und (b) desselben mit PADA funktionalisierten PMeOx, Verhältnis POX zu PADA 1:0,7; Messung mittels GPC, 60 °C in DMF mit 20 mM LiBr.

4.2.4.1 Enzymmodifikation in reinem Dimethylformamid

Als Modellenzyme wurden Lysozym aus Hühnereiweiß, sowie α -Chymotrypsin und RNase A aus Rinderpankreas verwendet. RNase A ist wie Lysozym ein kleines Enzym mit einem Molekulargewicht von 13,7 kDa, α -Chymotrypsin hat etwa die doppelte Masse (25,4 kDa) (vgl. Tab. 3.11).

Für die Modifikation von RNase A und α -Chymotrypsin wurde PMeOx₃₄ und PMeOx₆₈, für Lysozym PMeOx₆₈ sowie PEtOx₈₇ verwendet. Die analytischen Daten der verwendeten POX sind in Tab. 4.8 aufgelistet.

Tabelle 4.8: Analytische Daten der für die Enzymmodifikation in reinem DMF verwendeten POX.

Polymer	$M_{n,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	$M_{w,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	DP_{GPC}	DP_{NMR}^a	PDI
PMeOx ₃₄	2900	3400	34	37	1,15
PMeOx ₆₈	5900	7100	68	76	1,2
PEtOx ₈₇	8700	9700	87	73	1,11

^a Berechnet aus dem Integral des charakteristischen EDA-Endgruppensignals, sowie aus dem Mittelwert der POX Rückgrat bzw. Seitengruppensignale bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie unter der Annahme einer 100 %igen Terminierung.

Es wurden 10 äq. des mit PADA funktionalisierten POX, bezogen auf die Aminogruppen des Enzyms, eingesetzt. Die Enzyme wurden vor der Modifikation in Carbonatpuffer mit einem pH-Wert von 9,65 gelöst und lyophilisiert. Die Modifikation von Lysozym resultierte sowohl unter Verwendung von PMeOx_{34} , als auch PEtOx_{87} in vollständig DMF-löslichen Lysozym PEKs. Das native Lysozym ist, ebenso wie das nur mit der selben Menge an aminterminierten PMeOx_{34} Ausgangspolymer bzw. PADA versetzte Lysozym unlöslich in DMF (Abb. 4.29).

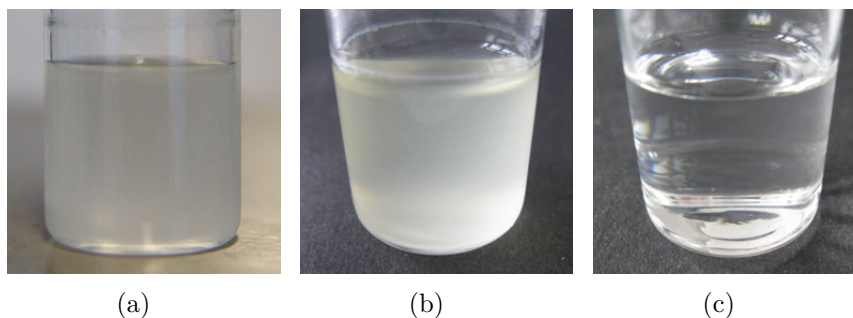


Abbildung 4.29: Bilder von ≈ 7 mg Lysozym in 5 mL DMF: (a) nativ, (b) nur mit PADA (5 mg) modifiziert (Lysozym vorher in DMF dispergiert) und (c) mit PMeOx_{34} (81,3 mg) und PADA (5 mg) modifiziert.

Die Löslichkeit beträgt $\geq 1,4 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, dies ist eine mehr als 25 mal größere Löslichkeit in org. Lsgm. als in bisher quantifizierten literaturbekannten Systemen, wie z.B. einer PEtOx modifizierten Katalase⁸⁷ (vgl. Kap. 1.2.3.2). Für den Ansatz, bei dem das Lysozym nur mit reinem PADA funktionalisiert wurde, wurde das Enzym vor der Zugabe in DMF dispergiert. Das Lysozym löst sich nur unter Verwendung von PADA funktionalisiertem POX in DMF, dies zeigt, dass die POXYlierung scheinbar erfolgreich war und für die Löslichkeit verantwortlich ist.

Die DMF löslichen PMeOx_{34} -Lysozymkonjugate wurden gegen Chloroform dialysiert (MWCO 5000 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$) und waren auch nach dem Lösungsmittelwechsel weiterhin löslich (Abb. 4.30). Das PEK war außerdem löslich in NMP und DMSO.

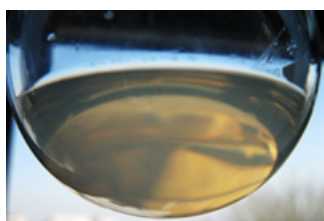


Abbildung 4.30: PMeOx_{34} -Lysozymkonjugat nach der Dialyse gegen Chloroform.

Nach Entfernen des Chloroforms und Lösen des Rückstandes in Wasser wurde mittels Messung der Extinktion der PEKs, sowie des reinen Lysozyms und EDA-terminiertem PMeOx_{34} qualitativ nachgewiesen, dass sich im Chloroform auch nach der Dialyse Protein befand (Abb. 4.31). Wie in Abb. 4.31 zu erkennen ist, besitzt das aminter-

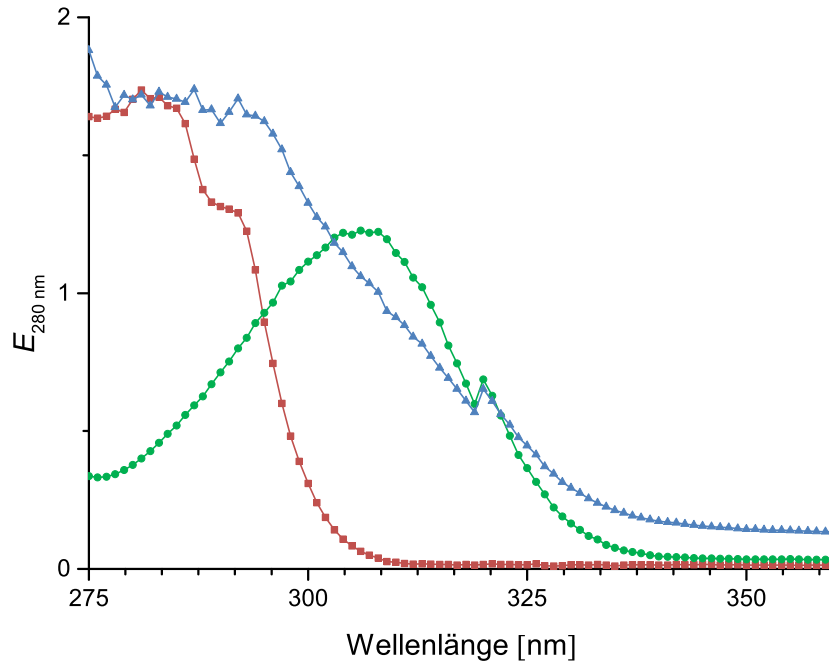


Abbildung 4.31: Auftragung der Extinktion gegen die Wellenlänge von rot ($-\blacksquare-$) nativem Lysozym, grün ($-\bullet-$) EDA-terminiertem PMeOx_{34} , sowie blau ($-\blacktriangle-$) PMeOx_{34} -Lysozymkonjugat, gemessen in CHCl_3 .

minierte PMeOx_{34} (grün) ein Absorptionsmaximum bei ca. 305 nm, während das native Lysozym (rot) ein Maximum bei 280 nm besitzt. Dieses Maximum wird durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren hervorgerufen. Der Verlauf der Kurve des Konjugates (blau) besitzt kein ausgeprägtes Maximum. Es ist deutlich eine hohe Extinktion bei 280 nm zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass Protein in der Probe vorhanden ist. Die Kurve entspricht der Summe der Kurven beider Reinstoffe.

Um den Modifizierungsgrad zu variieren wurde das PADA in unterschiedlichen Verhältnissen (POX zu PADA 1:0,8 - 1:0,076) eingesetzt und im Anschluss das Enzym zugegeben. Um die Konjugate mittels SDS-PAGE und isoelektrischer Fokussierung (IEF) zu charakterisieren, wurde durch Dialyse (MWCO 1000 Da) das Lösungsmittel aller DMF-löslicher Konjugate gegen Wasser ausgetauscht. Die Konjugatbildung wurde per SDS-PAGE nachgewiesen. Im Gegensatz zum unmodifizierten Lysozym (Laufbahn Ly, Abb. 4.32 a), welches eine definierte Bande bei 14,4 kDa hervorruft, führt die Modifi-

kation mit PMeOx_{34} (PMeOx_{34} zu PADA Verhältnis 1:0,5, Laufbahn A, Abb. 4.32 a) zu einer breiten Bande von etwa 17 kDa bis 100 kDa mit einem Maximum bei ca. 40 kDa. Die Bande des unmodifizierten Lysozyms ist nur noch sehr schwach zu erken-

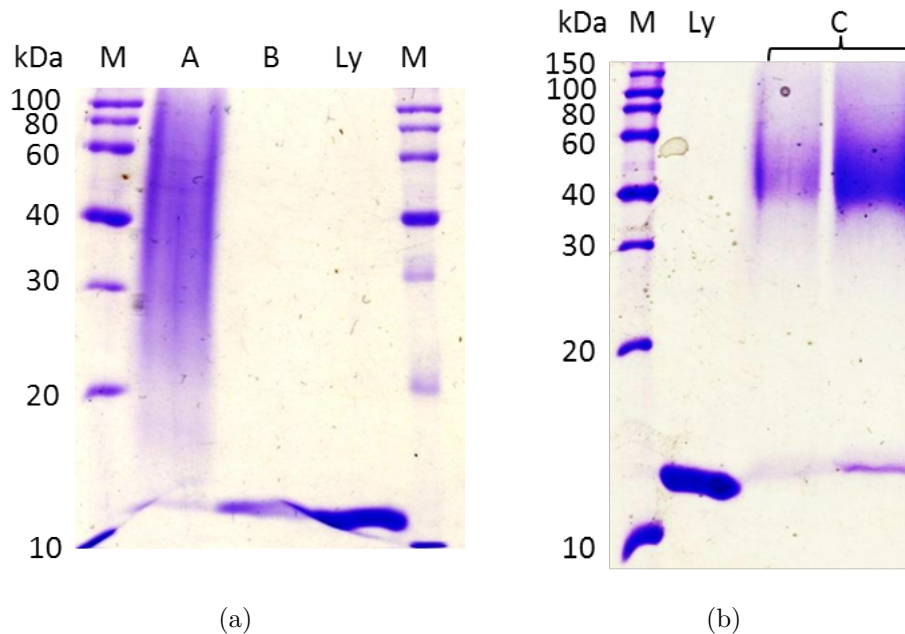


Abbildung 4.32: SDS-PAGE von Lysozym sowie der jeweiligen POX-Konjugate nach der Coomassiefärbung: (a) Ly, Lysozym; A, PMeOx_{34} -Lysozymkonjugat (PMeOx_{34} zu PADA 1:0,5); B, PMeOx_{34} -Lysozymkonjugat (PMeOx_{34} zu PADA 1:0,076); (b) C, PEtOx_{87} -Lysozymkonjugat; 14 %ige Gele.

nen. Wenn das PMeOx_{34} zu PADA-Verhältnis auf 1:0,076 verringert wird, sind auf dem Gel keine Konjugate sichtbar (Laufbahn B, Abb. 4.32 a). Wird PEtOx_{87} (Laufbahn C, Abb. 4.32 b) für die Konjugation eingesetzt, werden schmalere und schärfere Banden erhalten. Es ist zu vermuten, dass dies auf das größere PEtOx_{87} zurückzuführen ist, welches entweder weniger Aminogruppen modifiziert oder die Konjugate besser separiert. Lysozym hat sechs Aminogruppen plus den N-Terminus, welche modifiziert werden können (vgl. Tab. 3.11), wobei alle Aminogruppen für eine chemische Modifikation zugänglich sind²⁰⁴. Das maximal mögliche Molekulargewicht für Lysozym, modifiziert mit PMeOx_{34} , liegt bei etwa 40 kDa beim Einsatz von PEtOx_{87} bei etwa 83 kDa. Im Falle des PMeOx_{34} -Lysozymkonjugates ist das erhaltene Molekulargewicht viel größer als erwartet, was auf eine Aggregatbildung der teilweise modifizierten Enzyme hindeutet, während beim PEtOx_{87} -Lysozymkonjugat das theoretische Limit nur geringfügig überschritten wird, was auf eine geringere Aggregatbildung hindeutet. Aggregate sind in der SDS-PAGE nicht immer sichtbar, da sie durch die notwendige

Probenvorbereitung zerstört werden können. Daher wurden Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) mit den PMeOx_{34} -Lysozymkonjugaten durchgeführt. Bei der Lichtstreuung wird die Probe mit Laserlicht bestrahlt. Trifft das Licht auf Partikel wird es in alle Richtungen gestreut. Das Streulicht der versch. Streuzentren interferiert miteinander und durch die sich ständig ändernden Abstände der Streuzentren auf Grund der BROWNSchen Molekularbewegung kommt es zu einer zeitlichen Fluktuation in der Streuintensität. Über die zeitliche Änderung der Streuintensität lässt sich der Diffusionskoeffizient ermitteln, aus dem sich über die STOKES-EINSTEIN-Beziehung der hydrodynamische Radius berechnen lässt.

Die DLS-Messung eines PMeOx_{34} -Lysozymkonjugates (PMeOx_{34} zu PADA 1:0,5) zeigte Partikel mit einem Durchmesser von etwa 47 nm (Abb. 4.33). Das native Enzym in Puffer besitzt einen Durchmesser von 4 nm²⁰⁵, PMeOx_{34} mit einem DP von 45 ist ca. 3,5 nm im Durchmesser¹⁰⁹. Der Durchmesser eines einzelnen Konjugates sollte daher ca. 11 nm betragen. Der gemessene Wert ist etwa 4-mal größer als der theoretische Durchmesser eines einzelnen Lysozymkonjugates, was auf die Bildung großer Aggregate während der Modifikation hindeutet. Wird das POX zu PADA Verhältnis

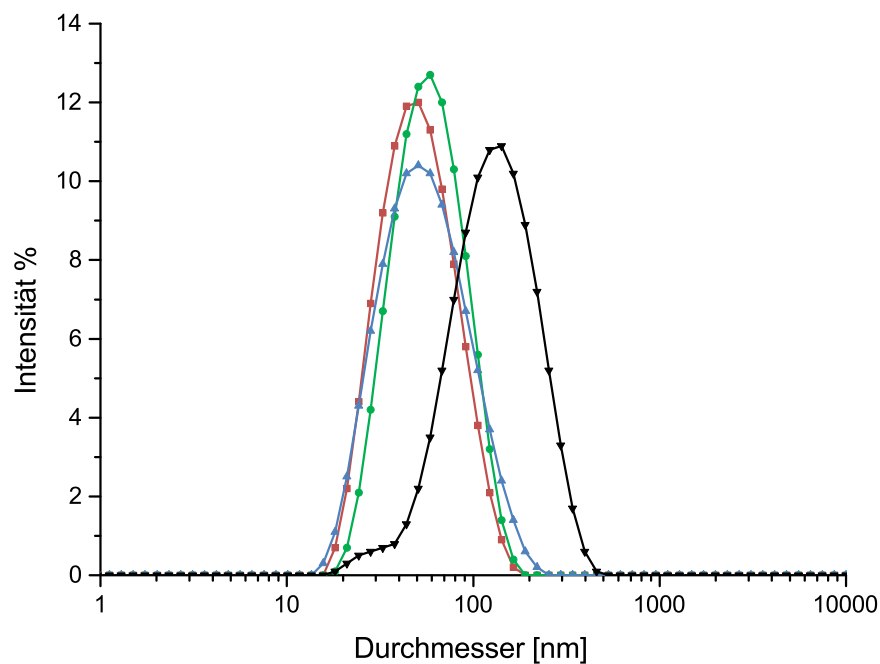


Abbildung 4.33: DLS-Messungen des PMeOx_{34} -Lysozymkonjugates: rot (—■—) POX zu PADA 1:0,5, Peakdurchmesser 47 nm; grün (—●—) POX zu PADA 1:0,2, Peakdurchmesser 54 nm; blau (—▲—) POX zu PADA 1:0,2 nach Ultraschallbehandlung, Peakdurchmesser 54 nm; schwarz (—▼—) POX zu PADA 1:0,076 Peakdurchmesser 142 nm.

verringert (1:0,2), hat dies nur einen kleinen Einfluss auf den Aggregatdurchmesser. Wird diese Probe mit Ultraschall, behandelt verändert sich der Aggregatdurchmesser nicht. Bei einer starken Verringerung auf 1:0,076 (POX:PADA) war das P_{MeOx}₃₄-Lysozym schlecht filtrierbar (0,2 μm), was auf große Aggregate hinweist. Offenbar war der Modifizierungsgrad gerade ausreichend für die DMF-Löslichkeit. Die DLS-Messung bestätigt den großen Aggregatdurchmesser und deutet auf einen niedrigen Modifizierungsgrad der Probe hin. Auf dem SDS-Gel sind ebenfalls keine Konjugate sichtbar (Laufbahn B, Abb. 4.32 a).

Die Ergebnisse der Experimente mit versch. POX zu PADA Verhältnissen bestätigen, dass das PADA nur einseitig mit dem P_{MeOx}₃₄-EDA reagiert, auch wenn letzteres im großen Überschuss vorhanden ist. Der Aggregatdurchmesser verändert sich nicht, wenn das POX zu PADA Verhältnis verringert wird, bis ein unterstöchiometrisches Verhältnis zwischen dem PADA funktionalisierten POX und den Aminogruppen des Enzyms erreicht ist.

Weitere Untersuchungen der Konjugate wurden mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt (Abb. 4.34). Dies ist der pH-Wert, an dem die Nettoladung des

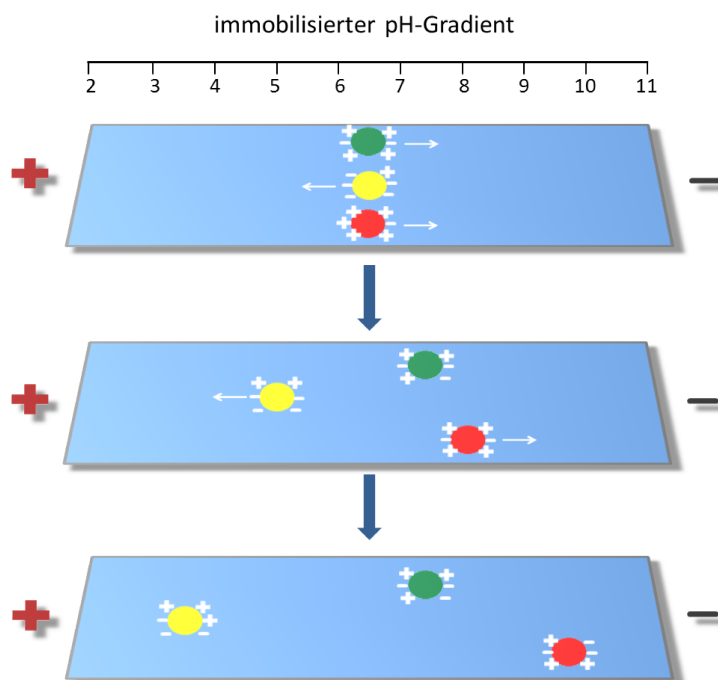


Abbildung 4.34: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der IEF.

Proteins null beträgt. Die Aminosäurereste der Proteine besitzen je nach pH-Wert des sie umgebenden Mediums unterschiedliche Ladungen, es sind Ampholyte. Wird ein Protein nun auf großporige Polyacrylamidgele (diese verhindern einen Siebeffekt auf

Grund der unterschiedlichen Größe der Proteine) mit immobilisiertem pH-Gradienten aufgebracht, und von außen ein elektrisches Feld angelegt, wandert beispielsweise ein Protein, welches sich in einer pH-Region unterhalb seines pI befindet, durch seine positive Nettoladung Richtung Kathode. Während der Wanderung verringert sich die Nettoladung durch den steigenden pH-Gradienten, bis das Protein die pH-Region erreicht die seinem pI entspricht. Hier ist die Nettoladung und damit die elektrophoretische Mobilität null und es findet keine weitere Wanderung statt.

Durch die Modifikation der ϵ -Aminogruppen der Lysinreste im Enzym, verändert sich der pI der modifizierten Enzyme gegenüber dem nativen Enzym. Daher kann mittels IEF zwischen modifiziertem und unmodifiziertem Enzym unterschieden werden. Für jede modifizierte Aminogruppe ergibt sich eine Veränderung des pI. Je mehr POX-Moleküle an das Enzym gebunden werden, desto mehr sinkt der pI. In Abb. 4.35 dargestellt ist ein IEF-Gel mit einer mittels Ultrafiltration (MWCO 10 kDa) aufkonzentrierten Probe eines PMeOx_{34} -Lysozymkonjugates (PMeOx_{34} zu PADA 1:0,5, Laufbahn A) und zum Vergleich natives Lysozym (Laufbahn Ly).

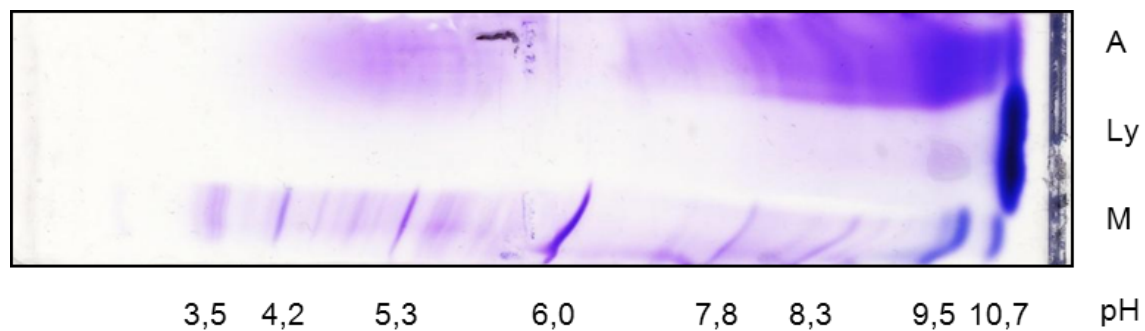


Abbildung 4.35: IEF von Lysozym und dem zugehörigen PEK nach Coomassiefärbung: A, PMeOx_{34} -Lysozymkonjugat (POX zu PADA 1:0,5); Ly, Lysozym; M, Marker.

Es sind zahlreiche neue Banden zu sehen und nur eine kleine Menge unmodifizierten Lysozyms ist noch sichtbar. Der pI verringert sich von $11,35^{206}$, dem pI des nativen Lysozyms, bis auf minimal 4,2. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass nahezu alle Lysozymmoleküle modifiziert wurden, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß.

Die Modifikation von RNase A wurde mit PMeOx_{34} mit einem POX zu PADA Verhältnis von 1:0,5 durchgeführt. Auch hier wurde ein vollständig DMF-lösliches PEK erhalten ($\geq 1,4 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$). Native RNase A ist unlöslich in DMF, genauso wie das nur mit derselben Menge an PADA funktionalisierte Enzym (Abb. 4.36).

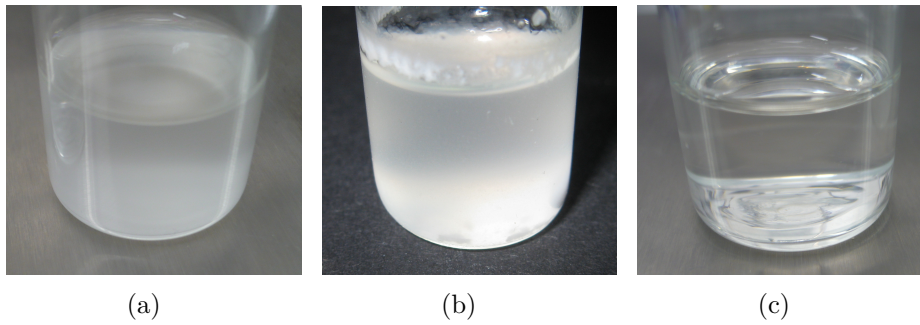


Abbildung 4.36: Bilder von ≈ 7 mg RNase A in 5 mL DMF: (a) nativ, (b) nur mit PADA (6,9 mg) modifiziert (RNase A vorher in DMF dispergiert) und (c) mit P MeOx_{34} (188,1 mg) und PADA (6,9 mg) modifiziert.

Die SDS-PAGE der RNase A-Konjugate zeigt im Vergleich mit den Lysozymkonjugaten ähnliche Ergebnisse (Abb. 4.37). Das Molekulargewicht der modifizierten RNase A

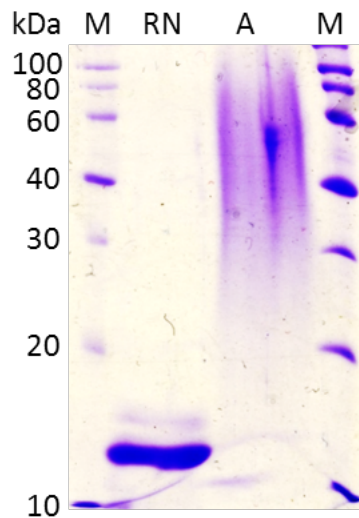


Abbildung 4.37: SDS-PAGE von RNase A sowie des POX-Konjugates nach Coomassiefärbung: RN, RNase A; A, P MeOx_{34} -RNase A-Konjugat (P MeOx_{34} zu PADA 1:0,5); 14 %iges Gel.

vergrößert sich von 13,7 kDa (Molmasse des unmodifizierten Enzyms, s. Tab. 3.11) auf 27 - 100 kDa (Abb. 4.37). RNase A besitzt 10 Lysinreste plus den N-Terminus, welche für die Modifikation verwendet werden können (s. Tab. 3.11), daher liegt das maximal mögliche theoretische Molekulargewicht des Konjugates beim Einsatz des oben beschriebenen P MeOx_{34} bei etwa 51 kDa. Dies passt zu der Hauptbande auf der SDS-PAGE (Laufbahn A, Abb. 4.37). Zusätzlich sind aber auch Konjugate mit einem höheren Molekulargewicht sichtbar, was auf eine Aggregatbildung hindeutet.

Größenausschlußchromatographie-Untersuchungen (SEC, engl. *size exclusion chromatography*) bestätigen die Ergebnisse der SDS-PAGE und zeigen ebenfalls einen nahezu vollständigen Umsatz, d.h. es ist kein unmodifiziertes Enzym mehr vorhanden (Abb. 4.38). Das SEC-Chromatogramm zeigt außerdem eine breite und bimodale Verteilung der Konjugate. Der erste Peak wird wahrscheinlich von Aggregaten hervorgerufen, der zweite Peak zeigt die erwartete breite Verteilung der PEKs.

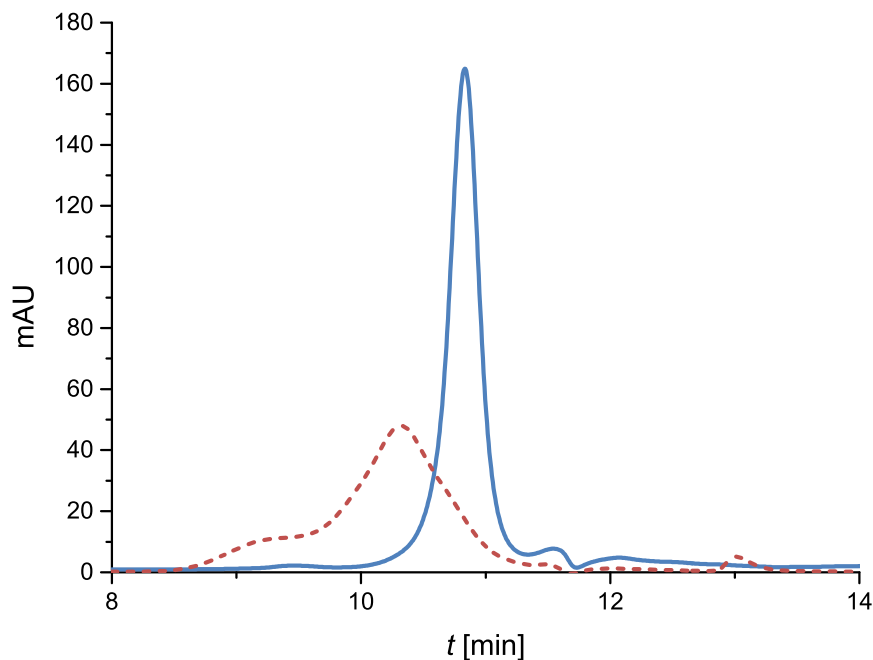


Abbildung 4.38: SEC-Chromatogramme von RNase A sowie des PMeOx_{34} -RNase A-Konjugates (PMeOx_{34} zu PADA 1:0,5): blau (—) RNase A, rot (---) PMeOx_{34} -RNase A-Konjugat; Absorption wurde bei 280 nm gemessen.

In Puffer gelöste RNase A besitzt einen Durchmesser von 4,2 nm²⁰⁷. Wie bereits erwähnt, besitzt ein PMeOx mit einem DP von 45 einen Durchmesser von etwa 3,5 nm. Die DLS-Messung der modifizierten RNase A in DMF zeigt eine bimodale Verteilung (Abb. 4.39). Der erste Peak repräsentiert Konjugate mit einem Durchmesser von ca. 7,2 nm, dies ist eine mögliche Größe für ein nicht aggregiertes Konjugat. Der zweite Peak hingegen zeigt einen Durchmesser von etwa 41 nm und kann somit nur von Aggregaten stammen.

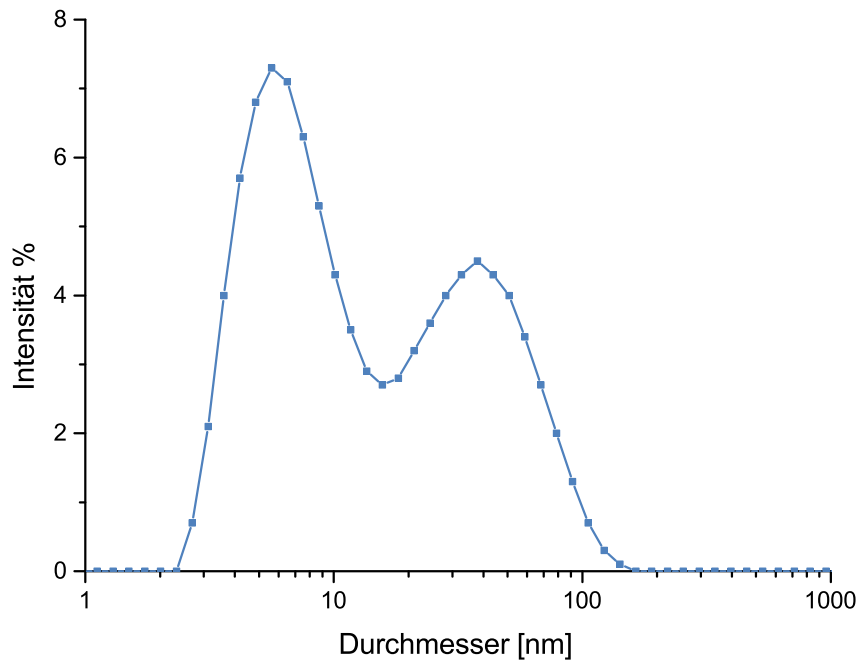


Abbildung 4.39: DLS-Messung des PMeOx₃₄-RNase A-Konjugates, PMeOx₃₄ zu PADA 1:0,5; Peakdurchmesser 7,2 und 47 nm.

Bei der Modifikation von α -Chymotrypsin mit PMeOx₃₄, sowie PMeOx₆₈ wurden keine DMF-löslichen Konjugate erhalten. Um zu überprüfen, ob die Konjugation dennoch erfolgreich war, wurde das Lösungsmittel durch Dialyse gegen Wasser gewechselt und eine SDS-PAGE der Konjugate durchgeführt (Abb. 4.40 b). Hierbei wurden im Vergleich zu nativem α -Chymotrypsin (Abb. 4.40 a) keine Banden auf dem Trenngel erhalten. Es scheint als wäre ein großer Anteil an Aggregaten gebildet worden, die zu groß sind um die Grenze zwischen dem Trenn- und Sammelgel zu passieren.

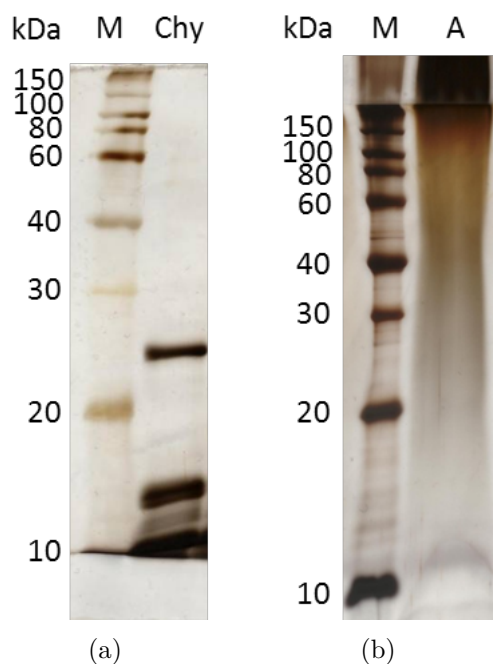


Abbildung 4.40: SDS-PAGE von α -Chymotrypsin sowie des POX-Konjugates nach Silberfärbung: M, Marker; (a) Chy, α -Chymotrypsin; (b) A, P_{MeOx}₆₈- α -Chymotrypsinkonjugat; 14 %iges Gel.

4.2.4.2 Enzymmodifikation in DMF-Puffer-Mischung

Zur Reduzierung der Aggregatbildung wurde die Modifikation der Enzyme in einer Mischung aus 5 mL DMF und 1 mL eines Carbonatpuffers mit einem pH-Wert von 9,65 durchgeführt (POX zu PADA 1:0,8). Das Enzym wurde hierzu im Puffer gelöst und das aminoreaktive mit PADA-funktionalisierte POX wurde im Anschluss zugegeben. Danach wurde zur Entfernung des DMFs, sowie zur Entfernung bzw. Reduzierung des überschüssigen Polymers gegen bidest. Wasser dialysiert (5 kDa MWCO für die Lysozym-, 10 kDa MWCO für alle anderen Konjugate). Die Modifikation in diesem System wurde mit Lysozym sowie α -Chymotrypsin mit unterschiedlichen POX genauer untersucht und im Anschluss auf weitere Enzyme übertragen. Die analytischen Daten sämtlicher für die Modifikation in der DMF-Puffer-Mischung verwendeten POX sind in Tab. 4.9 aufgelistet. Bei der Modifikation von Lysozym mit P_{MeOx}₃₆, sowie einem P_{MeOx} mit einem höheren Molekulargewicht (P_{MeOx}₆₈), wurde auch mit diesem Verfahren ein organolösliches Konjugat erhalten. Eine Untersuchung der Konjugate mittels SDS-PAGE (Abb. 4.41) zeigt für das Konjugat mit P_{MeOx}₃₆ eine breite Bande zwischen 24 kDa und 48 kDa mit einem Maximum bei etwa 30 kDa. Offenbar ist die Aggregatbildung gegenüber der Modifikation in reinem DMF reduziert (vgl. Abb. 4.32), sehr

Tabelle 4.9: Analytische Daten aller für die Enzymmodifikation in der DMF-Puffer-Mischung verwendeten POX.

Polymer	$M_{n,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	$M_{w,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	DP_{GPC}	DP_{NMR}	PDI	f_T [%] ^a
PMeOx ₃₆	3270	3720	34	37 ^c	1,14	100
PMeOx ₆₈	5900	7100	68	76 ^c	1,20	97
PEtOx ₄₀	3880	4300	44	40 ^c	1,11	91
PEtOx ₈₇	8700	9700	87	73 ^d	1,11	-
PEtOx ₁₂₀	20130	23100	202	117 ^d	1,15	-
PBuOx ₄₀	5900	6400	45	53 ^c	1,07	97
S-PBuOx ₅₀ - <i>b</i> - PMeOx ₁₂	8500	9400	70 ^b	50/12 ^c	1,11	96
PHeptOx ₃₀	4850	5510	28	40 ^c	1,13	98
S-PHeptOx ₅₀ - <i>b</i> - PMeOx ₁₀	9900	11000	65 ^b	55/15 ^c	1,11	91
S-PHeptOx ₅₀ - <i>b</i> - PMeOx ₅	8400	9600	55 ^b	57/8 ^c	1,15	93

^a Terminierungsfunktionalisierung (f_T), bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie aus dem Integralverhältnis der charakteristischen Initiator- und Terminierungssignale.

^b Berechnet aus dem Molekulargewicht M_n (GPC) unter Annahme der aus dem ¹H-NMR Spektrum bestimmten Blockverhältnisse.

^c Berechnet aus dem Integralverhältnis der charakteristischen Initiatorsignale, sowie aus dem Mittelwert der POX Rückgrat bzw. Seitengruppensignale, bestimmt über ¹H-NMR Spektroskopie.

^d Berechnet aus dem Integral des charakteristischen EDA-Endgruppensignals sowie aus dem Mittelwert der POX Rückgrat bzw. Seitengruppensignale bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie unter der Annahme einer 100 %igen Terminierung.

wahrscheinlich durch einen höheren Modifizierungsgrad in der DMF-Puffer-Mischung (Abb. 4.41 a). Das maximal mögliche Molekulargewicht von 40 kDa wird im Vergleich zu der Modifikation in reinem DMF deutlich weniger überschritten. Beim Einsatz von PMeOx₆₈ werden auf dem Gel diskrete Banden erhalten, welche unterschiedliche Modifizierungsgrade des Lysozyms repräsentieren (Abb. 4.41 b). Es wurden Konjugate mit bis zu 6 PMeOx Ketten erhalten, was der vollständigen Modifizierung aller Lysinreste entspricht, wobei einfach modifiziertes Lysozym den größten Anteil ausmacht. Es sind keine Aggregate sichtbar, allerdings ist noch ein deutlicher Anteil unmodifiziertes Lysozyms sichtbar. Daraus lässt sich schließen, dass mit steigender Länge des verwendeten Polymers die Modifizierungseffizienz abnimmt. Eine Modifikation von Lysozym ist ebenfalls mit PEtOx (PEtOx₈₇, PEtOx₁₂₀) möglich.

Abb. 4.42 zeigt beispielhaft ein SDS-Gel von Lysozym, modifiziert mit PEtOx₁₂₀.

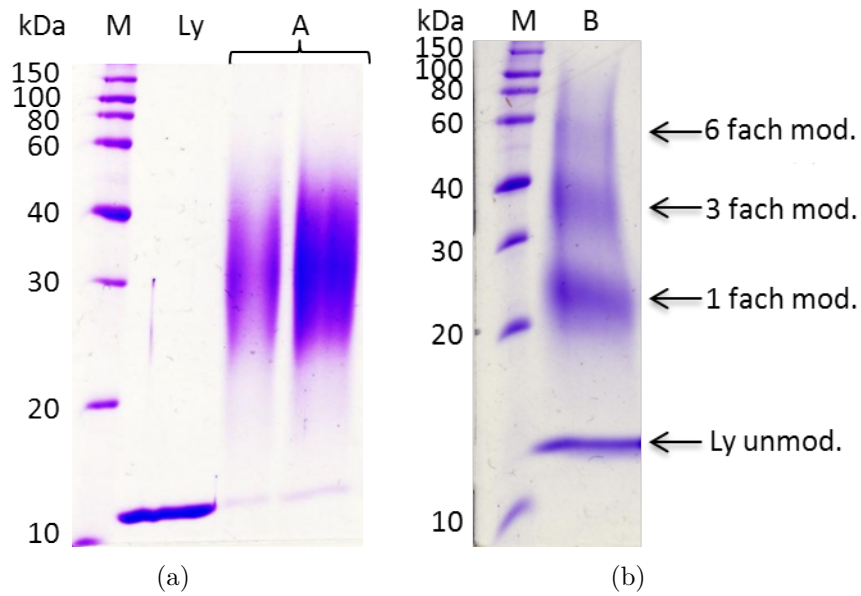


Abbildung 4.41: SDS-PAGE von Lysozym sowie der POX-Konjugate (modifiziert in DMF-Puffer-Mischung) nach Coomassiefärbung: (a) M, Marker; Ly, Lysozym; A, PMeOx₃₆-Lysozymkonjugat, (b) M, Marker; B, PMeOx₆₈-Lysozymkonjugat; 14 %iges Gel.

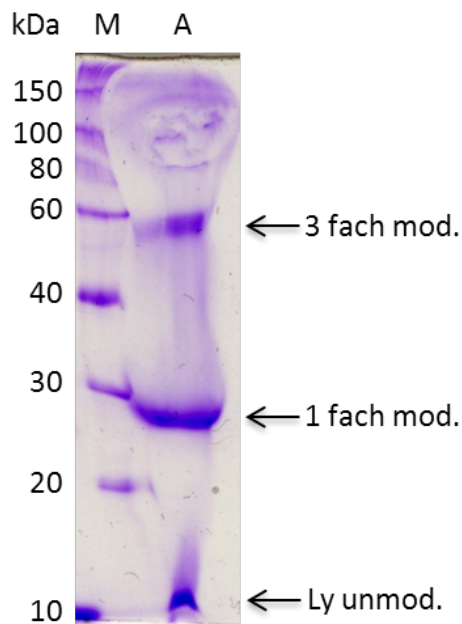


Abbildung 4.42: SDS-PAGE des POX-Konjugates (modifiziert in DMF-Puffer-Mischung) nach Coomassiefärbung: M, Marker; A, PEtOx₁₂₀-Lysozymkonjugat; 14 %iges Gel.

Hier sind drei deutliche Banden zu erkennen, die unterste wird vom unmodifizierten Lysozym hervorgerufen, die Bande bei etwa 28 kDa stammt von Lysozym mit einer

gebundenen Polymerkette und die Bande bei ca. 57 kDa gehört zu Lysozym mit drei kovalent gebundenen PEtOx₁₂₀-Ketten. Hier ist ähnlich, wie bei der Modifikation mit PMeOx₆₈ ein deutlicher Anteil an unmodifiziertem Lysozym zu sehen. Die Verzerrung der Laufbahnen, vor allem im oberen Bereich des Gels, ist auf den hohen Anteil an Polymer zurückzuführen, da das Polymer sich auf Grund des hohen Molekulargewichtes nicht mehr durch die Dialyse abtrennen lässt. Die Verzerrung ist bei höheren Polymeranteilen noch stärker ausgeprägt und führt zu einer völligen Unauswertbarkeit. Durchgeführte SEC-Messungen bestätigen ebenfalls die Bildung von Konjugaten mit den versch. POX (Abb. 4.43). Bei den POX mit höherem Molekulargewicht zeigen sich die unterschiedlichen Modifizierungsgrade in den versch. Maxima der Chromatogramme.

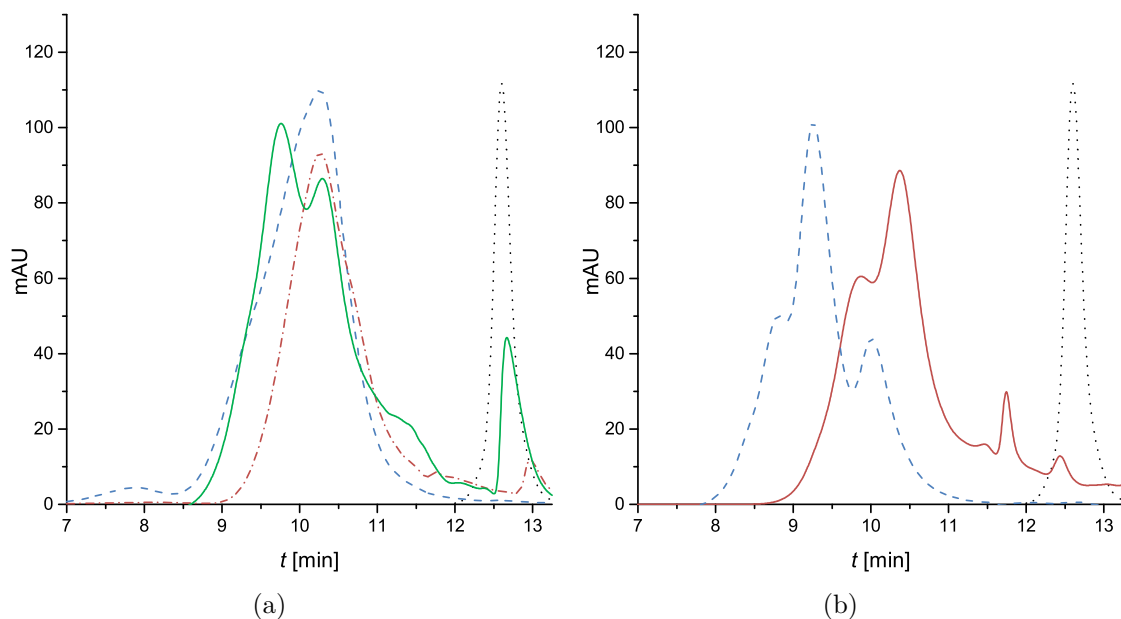


Abbildung 4.43: Normalisierte SEC-Chromatogramme von nativem Lysozym sowie der versch. Konjugate:

(a) schwarz (· · ·) Lysozym nativ; blau (– –) PMeOx₃₄-Lysozymkonjugat modifiziert in reinem DMF; rot (– · –) PMeOx₃₆-Konjugat; grün (—) PMeOx₆₈-Konjugat

(b) schwarz (· · ·) Lysozym nativ; rot (—) PEtOx₈₇-Konjugat; blau (– –) PEtOx₁₂₀-Konjugat; soweit nicht anders angegeben erfolgte die Modifikation in DMF-Puffer-Mischung; Absorption wurde bei 280 nm gemessen.

Bei der Modifikation von α -Chymotrypsin in der DMF-Puffer-Mischung wurde, im Gegensatz zu der Modifikation in reinem DMF, beim Einsatz von PMeOx₃₆ ein DMF- und CHCl₃-lösliches Konjugat erhalten. Wird PMeOx₆₈ oder PEtOx₈₇ für die Modifikation

verwendet, wurde kein vollständig DMF-lösliches Konjugat erhalten, obwohl man annehmen sollte, dass eine Modifikation mit einem POX mit höherem Molekulargewicht einer mit einem POX mit niedrigem Molekulargewicht überlegen ist. Die SDS-PAGE des P_{MeOx}₃₆-Konjugates zeigt im Vergleich mit dem unmodifizierten α -Chymotrypsin (Laufbahn Chy, Abb. 4.44 a) eine neue diskrete Bande bei etwa 30 kDa, welche dem Enzym mit zwei gebundenen P_{MeOx}₃₆-Ketten zuzuordnen ist. Eine weitere schwache Bande ist bei ungefähr 34 kDa sichtbar, welche einem α -Chymotrypsin mit drei gebundenen Polymerketten entspricht (Laufbande A, Abb. 4.44 a). Wenn P_{MeOx}₆₈ für die Konjugation verwendet wurde, erscheint eine diskrete Bande bei etwa 35 kDa, die von einem Konjugat mit zwei P_{MeOx}₆₈-Ketten hervorgerufen wird. Das höhere Molekulargewicht des Konjugates lässt sich auf die höhere Molmasse des verwendeten Polymers zurückführen (Laufbahn B, Abb. 4.44 b). Eine zweite Bande ist bei ca. 41 kDa schwach sichtbar, die wahrscheinlich von einem dreifach POXylierten α -Chymotrypsin verursacht wird. Auch wenn eine Silberfärbung keine quantitativen Rückschlüsse auf die Proteinmenge der jeweiligen Banden zulässt, lässt sich trotzdem feststellen, dass noch unmodifiziertes α -Chymotrypsin vorhanden ist.

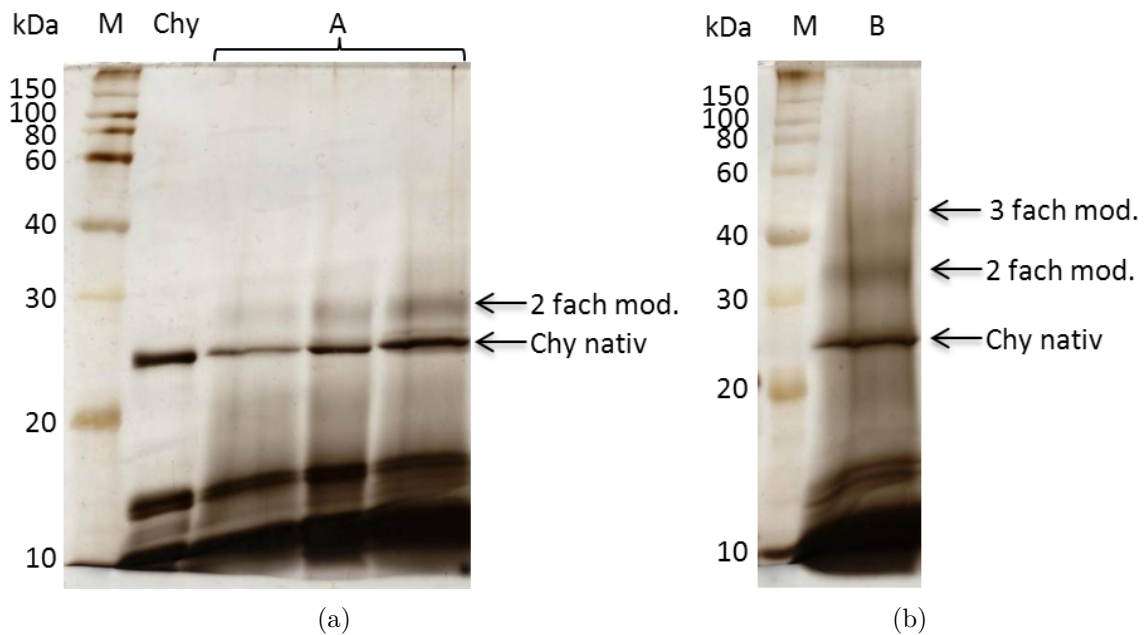


Abbildung 4.44: SDS-PAGE von α -Chymotrypsin sowie der POX-Konjugate (modifiziert in DMF-Puffer-Mischung) nach Silberfärbung: (a) M, Marker; Chy, α -Chymotrypsin; A, P_{MeOx}₃₆- α -Chymotrypsinkonjugat, (b) M, Marker; B, P_{MeOx}₆₈- α -Chymotrypsinkonjugat; 14 %ige Gele.

SEC-Messungen bestätigen das Resultat der SDS-PAGE, dass bei der Modifikation mit PMeOx_{36} (blau) noch ein Teil unmodifiziertes α -Chymotrypsin vorhanden ist (Abb. 4.45). Das in grün dargestellte Chromatogramm in Abb. 4.45 zeigt, dass auch eine Modifikation mit PEtOx_{120} erfolgreich war.

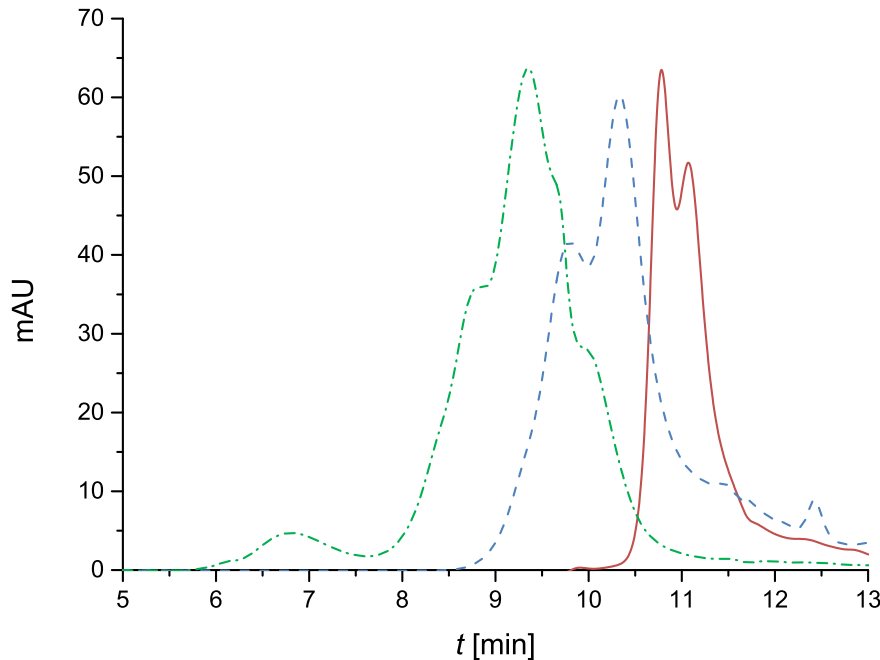


Abbildung 4.45: Normalisierte SEC-Chromatogramme von nativem α -Chymotrypsin sowie zwei versch. Konjugaten modifiziert in DMF-Puffer-Mischung: rot (—) α -Chymotrypsin nativ; blau (— —) PMeOx_{36} -Konjugat; grün (- · -) PEtOx_{120} -Konjugat; Absorption wurde bei 280 nm gemessen.

Es wurden zahlreiche weitere Enzyme mit den hydrophilen PMeOx_{36} , PMeOx_{60} und PEtOx_{40} im DMF-Puffer-System modifiziert. Wie die Abb. 4.46 mit weiteren ausgewählten SDS-Gelen der nativen sowie modifizierten Enzyme zeigt, wurden in allen Fällen PEKs erhalten. Der Modifizierungsgrad variiert ebenso wie der Anteil des restlichen unmodifizierten Enzyms zwischen den versch. untersuchten Proteinen. In einigen Proben liegt das Molekulargewicht der Konjugate über dem theoretischen möglichen Maximalwert, was auf eine Aggregatbildung der Konjugate hinweist.

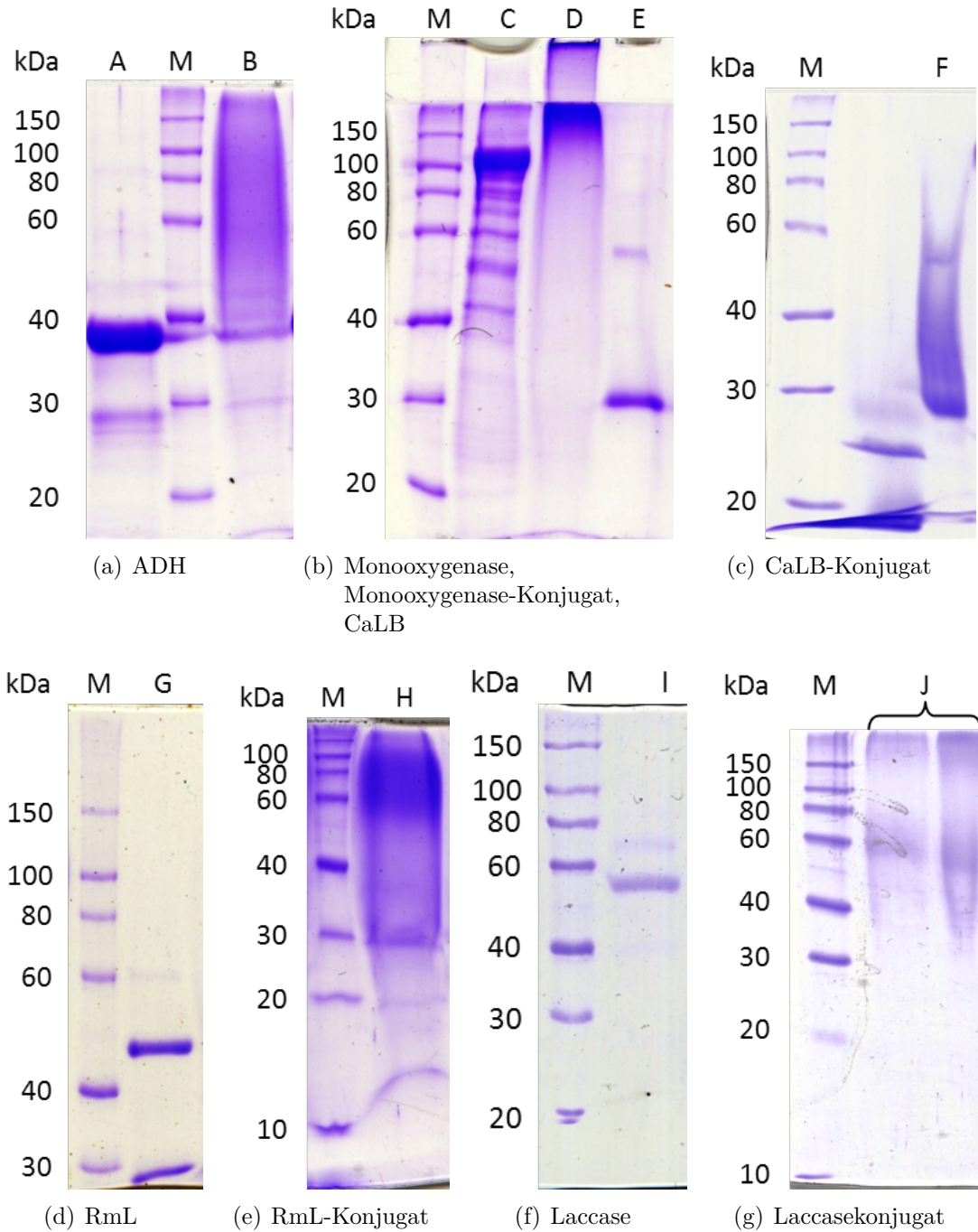


Abbildung 4.46: SDS-PAGE versch. Enzyme und der zugehörigen PMeOx Konjugate (modifiziert in DMF-Puffer-Mischung) nach Coomassiefärbung, M, Marker: (a) A, ADH (*S. cerevisiae*), B, PMeOx₃₆-ADH-Konjugat; 12 %iges Gel, (b) C, Monooxygenase, D, PMeOx₃₆-Monooxygenasekonjugat, E, CaLB; 8 %iges Gel,²⁰⁸ (c) F, PMeOx₃₆-CaLB-Konjugat; 12 %iges Gel, (d) G, RmL; 8 %iges Gel, (e) H, PMeOx₃₆-RmL- Konjugat, (f) I, Laccase; 12 %iges Gel, (g) J, PMeOx₃₆-Laccasekonjugat; 12 %iges Gel.

Die Löslichkeit der versch. synthetisierten PMeOx- und PEtOx-Konjugate wurde im Folgenden untersucht (Tab. 4.10). Generell führt die Modifikation mit PMeOx₃₆ zu einer Löslichkeit der Konjugate in DMF und CHCl₃.

Tabelle 4.10: Auflistung der organolöslichen Konjugate bestehend aus den hydrophilen POX-Derivaten. Löslichkeit ist in diesem Kontext definiert als Transmission einer PEK-Dispersion von über 90 %, wenn nicht anders gekennzeichnet, wobei 1 mL Lösungsmittel 1 mg Enzym enthält (berechnet über die ursprüngliche Enzymeinwaage).

Enzym	Polymer	Lösungsmittel
Lysozym (Hühnereiweiß)	PMeOx ₃₆	DMF, CHCl ₃
	PMeOx ₆₀	DMF, CHCl ₃
	PEtOx ₄₀	DMF, CHCl ₃
Alkoholdehydrogenase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (ADH)	PMeOx ₃₆	CHCl ₃
Alkoholdehydrogenase (Pferdeleber)	PMeOx ₃₆	CHCl ₃
Laccase (<i>Trametes versicolor</i>)	PMeOx ₃₆	CHCl ₃
Monooxygenase (<i>Bacillus megaterium</i>)	PMeOx ₃₆	CHCl ₃
Peroxidase (Meerrettich)	PMeOx ₃₆	CHCl ₃
Proteinase K (<i>Tritirachium album</i>)	PMeOx ₃₆	DMF, CHCl ₃
Papain (<i>Carica papaya</i>)	PMeOx ₃₆	DMF, CHCl ₃
Kollagenase (<i>Clostridium histolyticum</i>)	PMeOx ₃₆	CHCl ₃
Trypsin (Schweinepankreas)	PMeOx ₃₆	CHCl ₃
α-Chymotrypsin (Rinderpankreas)	PMeOx ₃₆	DMF, CHCl ₃
	PEtOx ₄₀	DMF, CHCl ₃
Lipase (<i>Candida antartica</i>) (CaLB) ^a	PMeOx ₃₆	DMF, CHCl ₃
	PMeOx ₆₀	DMF, CHCl ₃
Lipase (<i>Rhizomucor miehei</i>) (RmL)	PMeOx ₃₆	CHCl ₃
Lipase (<i>Candida rugosa</i>) (CrL)	PMeOx ₃₆	DMF, CHCl ₃

^a Transmission über 70 %.

Eine Ausnahme bildet die untersuchte Glukoseoxidase (aus *A. niger*). Die Konjugate sind nicht nur unlöslich in org. Lsgm., sondern fallen auch in Wasser aus, obwohl die erfolgreiche Modifikation durch die SDS-PAGE bestätigt wurde (Abb. 4.47).

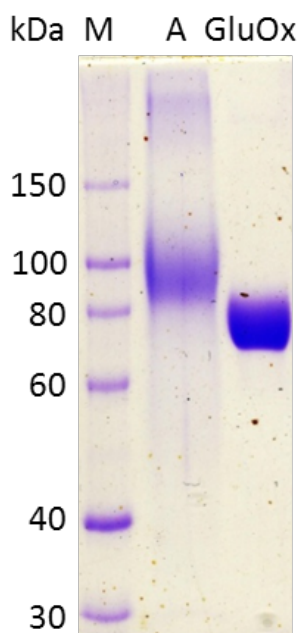


Abbildung 4.47: SDS-PAGE von Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger* sowie des PMeOx-Konjugates (modifiziert in DMF-Puffer-Mischung) nach Coomassiefärbung: M, Marker; GluOx, Glukoseoxidase; A, PMeOx₃₆-GluOx-Konjugat; 8 %iges Gel.

Die Präzipitatbildung in Wasser wird vermutlich durch die Zerstörung der Homodimerstruktur²⁰⁹ des Enzyms und weitere Denaturierung durch die POXYlierung, oder die Konjugationsprozedur selbst hervorgerufen. Die CaLB-Konjugate waren nicht in allen Fällen vollständig CHCl₃-löslich (Transmission über 70 %). Alle untersuchten Enzyme wurden, bis auf die RmL, die in Lösung geliefert wurde, ohne weitere Aufreinigung so eingesetzt wie sie vom Hersteller bereitgestellt wurden. Die geringere Transmission, die bei den CaLB-Konjugaten beobachtet wurde, lässt sich daher wahrscheinlich auf Verunreinigungen zurückführen, welche in der kommerziell erhältlichen CaLB vorhanden sind. Der Hersteller (Sigma-Aldrich) gibt keine Reinheit an, allerdings wird dem Enzym Gummi-Arabicum in von Charge zu Charge unterschiedlichen Mengen zugesetzt. Eine Proteinbestimmung nach BRADFORD ergab bei einer Kalibrierung mittels Lysozym einen über mehrere Chargen bestimmten mittleren Proteingehalt von 14,7 %, bei einer Kalibrierung mit dem verbreitet für diesen Zweck eingesetzten *Bovinen serum albumin* (BSA) betrug der mittlere Proteingehalt sogar nur 8,1 %.

Auf Grund der begrenzten Anzahl von Lösungsmitteln, in denen sich PMeOx bzw. PEtOx lösen, ist auch die Löslichkeit der resultierenden Konjugate auf diese Lösungsmittel begrenzt. Um eine Löslichkeit der Konjugate in anderen u.a. auch unpolaren

und für Enzyme geeigneteren Lsgm. zu erreichen, wurden für die Modifikation ebenfalls hydrophobere POX (PBuOx, S-PBuOx₅₀-*b*-PMeOx₁₂, PHeptOx, S-PHeptOx-*b*-PMeOx) verwendet.

Eine Modifikation im DMF-Puffer-System ist mit dem oben beschriebenen Verfahren so nicht möglich, da die hydrophoben PBuOx-Derivate ausfallen, sobald das in Puffer gelöste Enzym zugegeben wird. Um das Ausfallen zu verhindern, wurde der Polymerlösung vor der Zugabe des enzymhaltigen Puffers ein Lösungsvermittler zugesetzt. Als Lösungsvermittler wurden Methanol (MeOH) und Ethanol (EtOH) sowie das Tensid Aeerosol OT (AOT) getestet. Die mittels der Lösungsvermittler MeOH und EtOH erhaltenen PBuOx₄₀-Lysozym-, PBuOx₄₀-Trypsin- und PBuOx₄₀- α -Chymotrypsinkonjugate waren vollständig löslich in CHCl₃, MeOH und EtOH (Abb. 4.48) allerdings nicht in den gewünschten Lösungsmitteln THF oder Toluol. Die anderen hier untersuchten Enzyme (CaLB, RmL, Papain, Proteinase K) waren nach der Modifikation mit PBuOx₄₀ weder EtOH noch MeOH löslich.



Abbildung 4.48: ≈ 7 mg α -Chymotrypsin nach der Modifikation mit PBuOx₄₀ in 5 mL CHCl₃.

Die DLS-Messung des PADA-funktionalisierten PBuOx₄₀ in CHCl₃ zeigt zwei Peaks, einen bei 6,6 nm, was ein realistischer Wert für den Durchmesser des reinen Polymers ist (Abb. 4.49). Der zweite Peak bei etwa 160 nm lässt sich auf Polymeraggregate zurückführen. Die DLS-Messung des löslichen PBuOx₄₀- α -Chymotrypsinkonjugates zeigt ebenfalls zwei Peaks, einen bei 6,2 nm, welcher das PBuOx repräsentiert. Der zweite Peak bei ca. 70 nm kann auf Grund seiner Größe nicht zu den Aggregaten des PBuOx gehören und muss daher von den Konjugaten stammen. Da der Durchmesser allerdings zu groß für ein einzelnes Konjugat ist, muss es sich um Aggregate handeln. Wie Aktivitätsmessungen der α -Chymotrypsinkonjugate, sowie Referenzversuche mit nicht modifiziertem, aber auf die gleiche Weise behandeltem Enzym in CHCl₃ gezeigt haben, führt der Einsatz von MeOH oder EtOH als Lösungsvermittler zum vollständigen Aktivitätsverlust. Um die enzymatische Aktivität zu erhalten, wurden als alternative Lösungsvermittler AOT und THF untersucht. Auch hierbei wurden mit PBuOx₄₀ keine THF löslichen α -Chymotrypsin- oder Lysozymkonjugate erhalten.

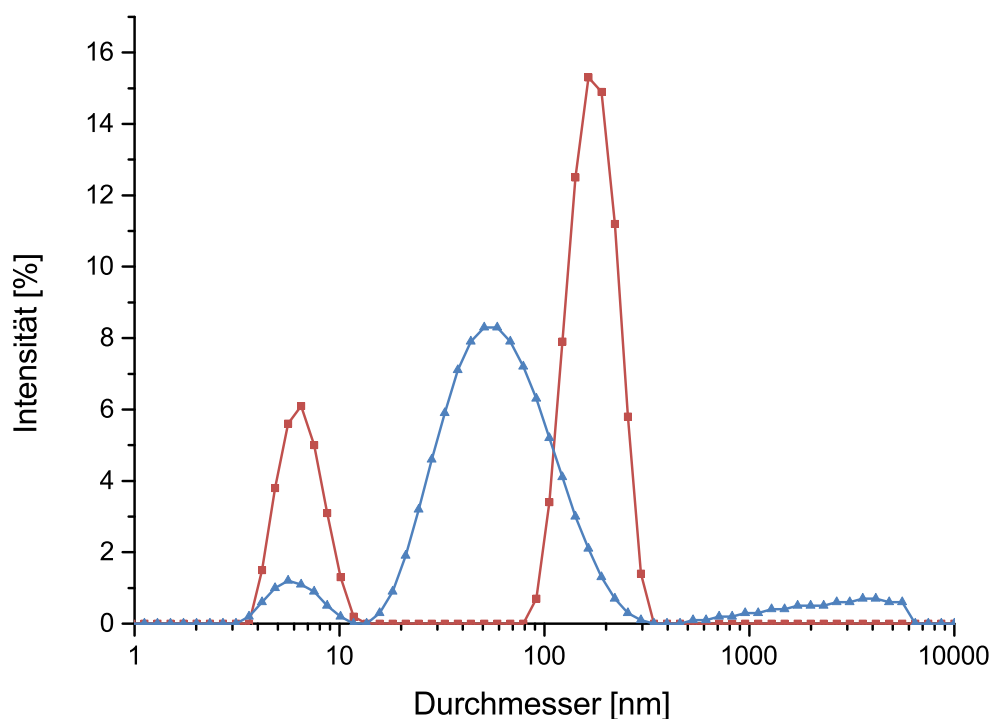


Abbildung 4.49: DLS-Messungen in CHCl_3 des PADA funktionalisierten PBuOx_{40} rot ($-\blacksquare-$), Peakdurchmesser 6,6 nm, 157,9 nm und des PBuOx_{40} - α -Chymotrypsinkonjugates blau ($-\blacktriangle-$), Peakdurchmesser 6,2 nm, 69,5 nm.

Bei der Verwendung des S-PBuOx_{50} - b - PMeOx_{12} hingegen wurde ein THF lösliches α -Chymotrypsinkonjugat erhalten (Abb. 4.50 b).

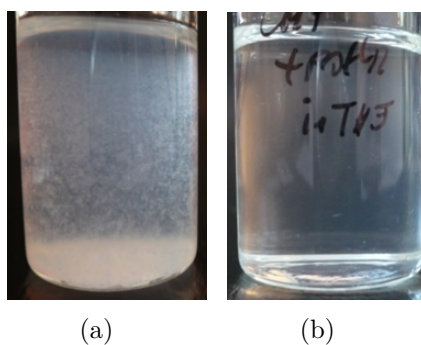


Abbildung 4.50: Bilder von ≈ 7 mg α -Chymotrypsin in 7 mL THF: (a) nur mit AOT ohne POX (b) modifiziert mit dem S-PBuOx_{50} - b - PMeOx_{12} Diblockcopolymer und AOT als Lösungsvermittler.

Um sicherzustellen, dass die Löslichkeit der Konjugate im Falle der Verwendung von AOT nicht alleine durch das Tensid verursacht wird, wurde ein Kontrollexperiment ohne den Zusatz von S-PBuOx_{50} - b - PMeOx_{12} durchgeführt. Hierbei wurde kein THF lösli-

ches Enzym erhalten, was darauf hindeutet, dass die Modifikation für die Löslichkeit verantwortlich ist (Abb. 4.50 a). Dies steht im Gegensatz zu den vorherigen Arbeiten von PARADKAR und DORDICK, die α -Chymotrypsin mittels einer anderen Methode in THF gelöst haben. Hierbei wird das Enzym aus einer wässrigen Lösung in die AOT-haltige organische Phase extrahiert.⁶⁶

Es wurden zusätzlich zu α -Chymotrypsin weitere Enzyme mit S-PBuOx₅₀-*b*-PMeOx₁₂ modifiziert und die Löslichkeit der resultierenden Konjugate untersucht (Tab. 4.11). Hierbei wurden vier THF-lösliche Konjugate erhalten, zwei dieser Konjugate waren auch in Toluol löslich. Die anderen untersuchten Enzyme waren nicht THF-löslich.

Tabelle 4.11: Übersicht über die Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchungen der versch. S-PBuOx₅₀-*b*-PMeOx₁₂-Enzymkonjugate. Löslichkeit ist in diesem Kontext definiert als Transmission einer PEK-Dispersion von über 90 %, wenn nicht anders gekennzeichnet, wobei 1 mL Lösungsmittel 1 mg Enzym enthält (berechnet über die ursprüngliche Enzymeinwaage).

Enzym	Lösungsmittel	Löslichkeit
Lysozym (Hühnereiweiß)	THF, MeOH, EtOH, CHCl ₃	X
Trypsin (Schweinepankreas)	THF	X
α -Chymotrypsin (Rinderpankreas)	THF, CHCl ₃ , Toluol	X
Papain (<i>Carica papaya</i>)	THF	-
Proteinase K (<i>Tritirachium album</i>)	THF	-
Lipase (<i>Candida antarctica</i>) ^a	THF, Toluol	X
Lipase (<i>Rhizomucor miehei</i>)	THF	-
Laccase (<i>Trametes versicolor</i>)	THF	-

^a Transmission über 70 %.

Um die Löslichkeit der Konjugate weiter zu verbessern, wurden die Enzyme mit den noch hydrophoberen PHeptOx-Derivaten modifiziert. Ebenso wie bei den PBuOx-Derivaten ist für die Modifikation in der DMF-Puffer-Mischung ein Lösungsvermittler notwendig, um ein Ausfallen des Polymers zu verhindern. Als Lösungsvermittler wurden hier AOT, THF, CHCl₃ sowie Toluol in unterschiedlichen Mengen untersucht, wobei die Modifikation bei RT und 40 °C durchgeführt wurde. Außerdem wurde das Verhältnis zwischen Enzymlösung (0,2 - 1 mL) und DMF (5 mL) variiert. Im Gegensatz zu den PBuOx-Derivaten eignet sich AOT nicht als Lösungsvermittler für die PHeptOx-Derivate. Für die Optimierung der Modifizierungsbedingungen wurde

Lysozym als Modellprotein verwendet. Hierbei zeigte sich, dass 1 mL des Lösungsvermittlers und 0,25 mL Enzymlösung für die Modifikation am besten geeignet sind, bei den anderen untersuchten Varianten bildete sich ein Niederschlag. Außerdem war eine Erhöhung der Modifikationstemperatur auf 40 °C notwendig, um organolösliche Konjugate zu erhalten (Tab. 4.12). Als Lösungsvermittler eignen sich sowohl CHCl₃ als auch

Tabelle 4.12: Übersicht über die Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchungen der versch. PHeptOx₃₀-Enzymkonjugate. Löslichkeit ist in diesem Kontext definiert als Transmission einer PEK-Dispersion von über 90 %, wenn nicht anders gekennzeichnet, wobei 1 mL Lösungsmittel 1 mg Enzym enthält (berechnet über die ursprüngliche Enzymeinwaage); wenn nicht anders gekennzeichnet wurde THF als Lösungsvermittler verwendet.

Enzym	ϑ^a	Lösungsmittel	Löslichkeit
Lysozym (Hühnereiweiß)	RT	Toluol	-
	40 °C	Toluol	X
	RT	CHCl ₃ ^b	-
	40 °C	CHCl ₃ ^b	X
	RT	THF	-
	40 °C	THF	X
Laccase (<i>Trametes versicolor</i>)	40 °C	THF	-
α -Chymotrypsin (Rinderpankreas)	40 °C	Toluol	X
	40 °C	CHCl ₃ ^b	X
Papain (<i>Carica papaya</i>)	40 °C	Toluol	-
	40 °C	THF	-
Lipase (<i>Candida antartica</i>) ^c	40 °C	THF	-
	40 °C	Toluol	X
Lipase (<i>Rhizomucor miehei</i>)	40 °C	Toluol	X

^a Modifikationstemperatur.

^b CHCl₃ als Lösungsvermittler.

^c Transmission über 70 %.

THF. Beim Einsatz des PHeptOx₃₀ Homopolymers wurde ein vollständig THF-lösliches Lysozymkonjugat erhalten. Bei Verwendung der Diblockcopolymeren, bestehend aus PHeptOx und PMeOx (S-PHeptOx₅₀-*b*-PMeOx₁₀, S-PHeptOx₅₀-*b*-PMeOx₅), wur-

den keine vollständig THF-löslichen Lysozymkonjugate erhalten. Daher wurde für die Modifikation weiterer Enzyme nur noch das PHeptOx Homopolymer (PHeptOx₃₀) eingesetzt. Von den untersuchten Enzymen waren durch die Modifikation mit PHeptOx Lysozym, α -Chymotrypsin, sowie zwei Lipasen (aus *Candida antartica* sowie *Rhizomucor miehei*) in Toluol löslich (Tab. 4.12). Bei Papain und Laccase führt die Modifikation nicht zu organolöslichen Konjugaten.

4.2.5 Bernsteinsäuredichlorid als Linker

Mittels PADA als bifunktionellem Linker wurden gute Modifizierungsergebnisse für zahlreiche Enzyme erzielt, allerdings wird DMF hierbei als Lösungsmittel benötigt, was zu einer Denaturierung der Enzyme führen kann. Als weitere Alternative wurde daher das bifunktionelle Reagenz Bernsteinsäuredichlorid (BSDC) untersucht, um eine aminoreaktive Gruppe am Ende des POX einzubringen. Hierbei wurde als Modellenzym Lysozym verwendet. Die Modifikation wurde, um eine Vergleichbarkeit mit dem Linker PADA zu ermöglichen, in reinem DMF, in einer Mischung aus DMF und Puffer (Carbonatpuffer 0,5 mM, pH 9,65), sowie in einer Mischung aus Acetonitril und Puffer (Carbonatpuffer 0,5 mM, pH 9,65) mit PMeOx₃₆ durchgeführt. In allen Fällen wurden CHCl₃-lösliche Konjugate erhalten (Abb. 4.51).

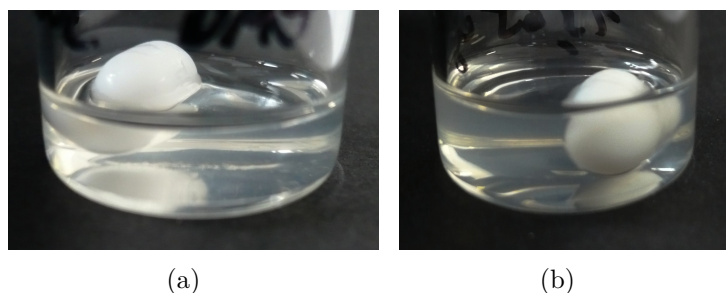


Abbildung 4.51: Bilder der mittels BSDC als Linker hergestellten Lysozym PEKs in 1 mL CHCl₃: hergestellt in (a) reinem DMF (12,46 mg Konjugat) (b) Acetonitril-Puffer-Mischung (13,65 mg Konjugat).

Die SDS-PAGE zeigt, dass in allen Fällen Konjugate entstanden sind, allerdings wurden im Gegensatz zur Modifikation mittels PADA schmale scharfe Banden erhalten was darauf hindeutet, dass größtenteils nur ein Modifizierungsgrad erhalten wurde (Abb. 4.52).

Ein Nachteil an der Modifikation mittels BSDC ist der niedrige Modifizierungsgrad im Vergleich zu PADA als Linker. Das maximale Molekulargewicht, welches, bei der Modifikation in reinem DMF erreicht wurde lag bei etwa 27 kDa, d.h. im besten Fall

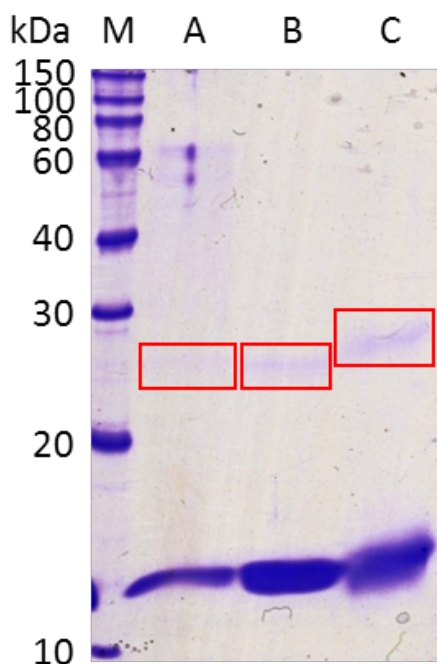


Abbildung 4.52: SDS-PAGE der PMeOx-Lysozymkonjugate mit BSDC als Linker nach Coomassiefärbung: M Marker, A Modifikation in DMF-Puffer, B Modifikation in Acetonitril-Puffer, C Modifikation in reinem DMF; 14 %iges Gel.

sind 3 - 4 Polymerketten an das Enzym gebunden. Im Gegensatz hierzu führt der Einsatz von PADA als Linker zu Konjugaten mit bis zu 6 gebundenen Polymerketten. Ein zweiter Nachteil von BSDC als Linker ist die niedrige Modifizierungseffizienz, d.h. ein signifikanter Anteil von unmodifiziertem Lysozym ist noch vorhanden. Ein hoher Modifizierungsgrad, sowie eine hohe Modifizierungseffizienz sind allerdings erforderlich, um auch große Enzyme organolöslich zu machen, daher ist BSDC als bifunktionaler Linker keine geeignete Alternative zu PADA.

4.2.6 Enzymatische Aktivität der Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugate

Im Folgenden wurde die enzymatische Aktivität der mittels PADA hergestellten PEKs sowohl im wässrigen als auch im org. Medium bestimmt und mit denen der nativen Enzyme verglichen. In allen Assays wurde bei der Aktivitätsbestimmung der PEKs für die Berechnung der eingesetzten Enzymmenge der berechnete Enzymgehalt des entsprechenden Konjugates verwendet und nicht die Einwaage des Konjugates. Das heißt, die spezifische enzymatische Aktivität ($\frac{U}{mg}$ bzw. $\frac{\dot{U}}{mg}$) der PEKs bezieht sich auf das reine Enzym im Konjugat. Der Enzymgehalt der Konjugate wurde aus der Masse des eingesetzten Enzyms vor der Modifikation, sowie der Masse des resultierenden

Konjugates nach der Aufarbeitung, unter der Annahme, dass bei der Modifikation und der anschließenden Aufarbeitung kein Enzymverlust auftritt, berechnet. Ein Enzymverlust kann nicht ausgeschlossen werden, allerdings ist von einem gleichbleibenden Fehler auszugehen, der außerdem die berechneten Aktivitäten nur verschlechtern würde. Auf eine quantitative Bestimmung des Proteingehaltes mittels BRADFORD-, LOWRY-, oder POPOV-Assay wurde verzichtet, da diese Assays für die Enzymkonjugate keine verlässlichen Messwerte ergaben.²⁰¹ Der Farbstoff des BRADFORD-Assays (Coomassie-Brilliant-Blau G-250) beispielsweise reagiert auch mit reinem PMeOx ohne die Anwesenheit eines Proteins (Abb. 4.53).

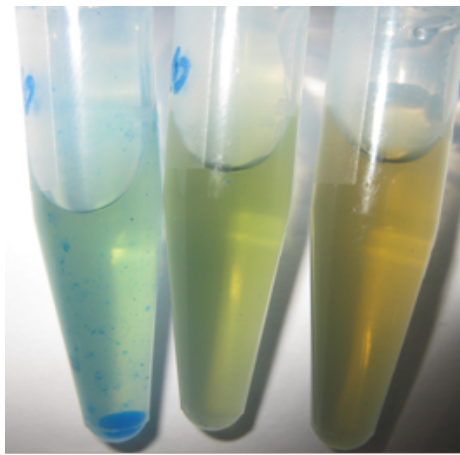


Abbildung 4.53: Bilder des Bradford-Assays mit PMeOx (links), PEtOx (mitte) sowie zum Vergleich mit bidest. Wasser (rechts).²⁰¹

Der POPOV-Assay ergab ebenfalls keine zuverlässigen Messwerte für die Konjugate. Die Abweichungen beim POPOV-Assay lassen sich damit erklären, dass dieser auf der Reaktion der basischen Aminosäuren mit dem sauren Farbstoff Amidoschwarz 10B beruht¹⁹¹ und die Modifikation über die basische Aminosäure Lysin verläuft.

4.2.6.1 Hydrolasen

Hydrolasen bilden die dritte Gruppe innerhalb der EC-Klassifikation (vgl. Tab. 1.1, Kap. 1.1.1) (EC 3.-.-.-). Sie katalysieren im wässrigen Medium die reversible, hydrolytische Spaltung chemischer Bindungen, wie etwa der Ester- oder Peptidbindung. Je nach Art der jeweils gespaltenen Bindung, werden sie weiter unterteilt. Es wird geschätzt das etwa 80 % der industriell eingesetzten Enzyme Hydrolasen sind¹⁸.

4.2.6.1.1 Glykosidasen

Aus der Gruppe der Glykosidasen wurde Lysozym aus Hühnereiweiß eingesetzt. Bei Lysozym (EC 3.2.1.17), auch Muramidase genannt, handelt es sich um eine Endoglykosidase, welche die β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäure, den Bestandteilen des Peptidoglykans, spaltet. Das Makromolekül Peptidoglycan (Murein) ist ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand (Abb. 4.54). Auf Grund der von Lysozym katalysierten Reaktion ist eine Aktivitätsmessung nur in wässrigen Medien möglich.

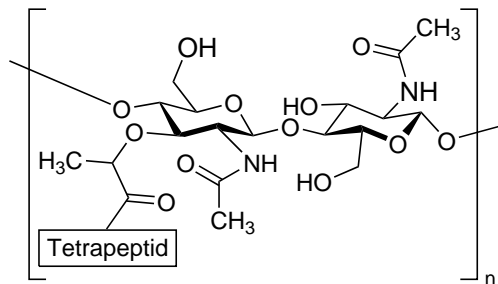


Abbildung 4.54: Strukturformel von Peptidoglycan, bestehend aus β -(1,4)-glykosidisch verknüpfter *N*-Acetylmuraminsäure (links) und *N*-Acetylglucosamin (rechts), quervernetzt durch Tetrapeptide nach ROYET und DZIARSKI²¹⁰.

Eine häufig und im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methode zur Bestimmung der Lysozymaktivität ist die Trübungsmessung¹⁷⁸. Hierbei werden getrocknete *Micrococcus lysodeikticus* Zellen bzw. Zellbruchstücke in Puffer suspendiert und die Lyse der Zellen und die damit verbundene Abnahme der optischen Dichte photometrisch verfolgt.

Die Aktivität von unmodifiziertem Lysozym beträgt $32500 \frac{\hat{U}_{\text{Lysozym}}}{\text{mg}}$ (*arbitrary units*). Die Aktivität des PMeOx₃₄-Lysozymkonjugates, modifiziert in reinem DMF, liegt bei $153 \frac{\hat{U}_{\text{Lysozym}}}{\text{mg}}$. Im Falle des PMeOx₃₆-Lysozymkonjugates, welches durch Modifikation in der DMF-Puffer-Mischung synthetisiert wurde, liegt die Aktivität bei $175 \frac{\hat{U}_{\text{Lysozym}}}{\text{mg}}$. Dies entspricht einer Restaktivität von 0,47 % bzw. 0,54 %. Der Aktivitätsverlust der Lysozymkonjugate lässt sich möglicherweise auf die Aggregation und Denaturierung der Enzyme durch das DMF zurückführen. Eine wahrscheinlichere Erklärung für die geringe Aktivität ist der hohe Modifizierungsgrad. Es wurde gezeigt, dass mit PEG modifiziertes Lysozym durch die Konjugation sämtliche Aktivität gegenüber *M. lysodeikticus* Zellen verliert, und sich durch die Abspaltung der PEG-Ketten beinahe die Originalaktivität wiederherstellen lässt²¹¹. Es ist literaturbekannt, dass Enzyme welche, mit Polymeren modifiziert wurden, ihre Aktivität gegenüber niedermolekularen Substraten behalten aber gegenüber Substraten mit hohem Molekulargewicht

verlieren²¹². Die verwendeten *M. lysodeikticus* Zellen sind ein Substrat mit sehr hohem Molekulargewicht.

4.2.6.1.2 Peptidasen

Peptidasen (EC 3.4.-.-), auch Proteasen oder Proteinasen genannt, sind Enzyme, welche die Hydrolyse der Peptidbindung katalysieren. Dies kann bis zum vollständigen Abbau des Proteins zu Aminosäuren führen. Sie kommen ubiquitär, d.h. in allen Zellen aller Organismen vor. Es lassen sich beispielsweise Exo- und Endopeptidasen unterscheiden, wobei die Endopeptidasen im Gegensatz zu Exopeptidasen auch Peptidbindungen weit innerhalb ihres Substratmoleküls spalten²¹³. Nach den an der Katalyse beteiligten Aminosäuren werden die Peptidasen in sechs Gruppen eingeteilt, die Serin-, Threonin-, Cystein-, Glutamin-, Asparaginsäure sowie Metallopeptidasen²¹⁴. Serinproteasen besitzen eine katalytische Triade aus Asparaginsäure, Histidin und Serin¹⁰.

In dieser Arbeit wurden die Peptidase α -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) aus Rinderpankreas, sowie deren Konjugate hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Serinendopeptidase, welche die Peptidbindung bevorzugt am C-Terminus von aromatischen Aminosäureresten, wie z.B. Tyrosin oder Tryptophan, spaltet²¹³.

Im Wässrigen wurde die Peptidaseaktivität mittels zweier versch. Methoden bestimmt, wobei ein hoch- und ein niedermolekulares Substrat verwendet wurde. Als hochmolekulares Substrat wurde Azocasein eingesetzt ($\approx 23,6$ kDa nach dem Sigma-Aldrich Produktdatenblatt¹⁷⁴). Es handelt es sich dabei um Casein, an welches ein Azofarbstoff gekoppelt wurde. Durch enzymatische Hydrolyse werden farbstoffgekoppelte Peptide freigesetzt, welche nach Abtrennen des überschüssigen Azocaseins photometrisch (bei 366 nm) detektiert werden^{175,176}. Als niedermolekulares Substrat wurde *N*-Succinyl-L-Phenylalanin-*p*-Nitroanilid (SPNA) zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt¹⁷⁷. Hierbei wird durch die Peptidase das farbige *p*-Nitroanilin freigesetzt, das ebenfalls photometrisch (bei 410 nm) detektiert wird (Abb. 4.55). Durch Korrelation mit der Reaktionszeit und der eingesetzten Enzym- bzw. Konjugatmenge und dem molaren Extinktionskoeffizienten von *p*-Nitroanilin wurde die Aktivität berechnet.

Die Aktivität von unmodifiziertem α -Chymotrypsin, bestimmt mittels Azocasein-Assay, liegt bei $12290 \frac{\hat{U}_{\text{Protease}}}{\text{mg}}$ (*arbitrary units*). Die Modifikation in DMF-Puffer-Mischung mit PMeOx₃₆ führt zu einer Abnahme der Aktivität auf $8500 \frac{\hat{U}_{\text{Protease}}}{\text{mg}}$, dies sind 69 % der Originalaktivität. Wird PMeOx₆₈ für die Modifikation eingesetzt, welches etwa die doppelte Masse des PMeOx₃₆ besitzt, verringert sich die Aktivität auf $1050 \frac{\hat{U}_{\text{Protease}}}{\text{mg}}$, was 8,5 % der Originalaktivität entspricht. Wie bereits in Kap. 4.2.6.1.1 dargestellt,

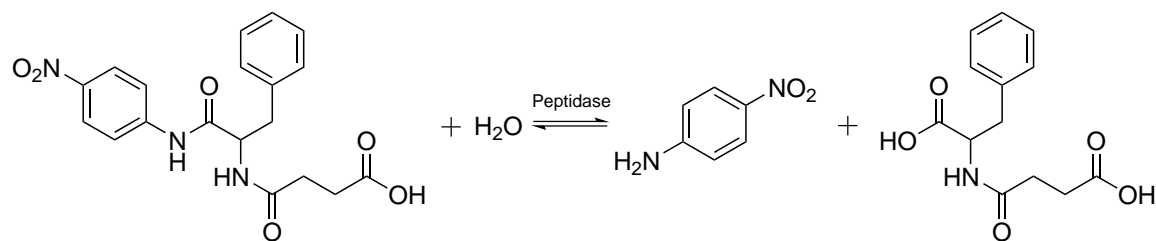


Abbildung 4.55: Reaktionsgleichung der enzymatischen Hydrolyse von *N*-Succinyl-L-Phenylalanin-*p*-Nitroanilid zur Bestimmung der Peptidaseaktivität im wässrigen Medium.

verlieren Enzyme, die mit Polymeren modifiziert wurden, ihre Aktivität gegenüber Substraten mit hohem Molekulargewicht, behalten sie aber gegenüber niedermolekularen Substraten²¹¹. Es wird vermutet, dass kovalent an Enzyme gebundene Polymere den Zugang von hochmolekularen Substraten zum aktiven Zentrum des Enzyms einschränken bzw. verhindern²¹⁵. Ein Polymer mit höherem Molekulargewicht führt daher vermutlich zu einer größeren sterischen Hinderung. Dies ist eine mögliche Erklärung für die hohe Aktivitätsdifferenz zwischen den beiden Proben. Um dies genauer zu untersuchen, wurde die Peptidaseaktivität der Proben ebenfalls unter Verwendung des niedermolekularen Substrates SPNA bestimmt. Die Aktivität des unmodifizierten α -Chymotrypsins wurde bestimmt zu $0,051 \frac{U}{mg}$. Nach der Modifikation mit $PMeOx_{36}$ fällt die Aktivität auf $0,017 \frac{U}{mg}$, was ca. 33 % der ursprünglichen Aktivität entspricht. Das $PMeOx_{68}$ - α -Chymotrypsinkonjugat zeigt eine Aktivität von $0,007 \frac{U}{mg}$, dies entspricht etwa 13 % der Originalaktivität. Ein Vergleich der Aktivitätsunterschiede zwischen dem $PMeOx_{68}$ - und $PMeOx_{36}$ -Konjugat in den beiden Assays zeigt, dass der Einfluss des Molekulargewichtes im Azocasein-Assay deutlich ausgeprägter ist als im SPNA-Assay. Der Aktivitätsunterschied zwischen den beiden Proben beträgt im Azocasein-Assay etwa Faktor 8, im SPNA-Assay nur ca. Faktor 2,5; d.h. bei einem niedermolekularen Substrat ist der Einfluss der Molmasse des zur Modifikation eingesetzten POX geringer als bei einem hochmolekularen Substrat. Dies zeigt, dass es eine größere sterische Hinderung durch das höhere Molekulargewicht des $PMeOx_{68}$ gegenüber dem $PMeOx_{36}$ gibt.

In organischen Medien katalysieren Peptidasen Umesterungen²¹⁶, dies wird auch hier für die Bestimmung der Aktivität ausgenutzt. Hierbei wird *N*-Acetyl-L-Phenylalaninethylester (APEE) mit 1-Propanol zu *N*-Acetyl-L-Phenylalaninpropylester (APPE) umgeestert⁷⁸ (Abb. 4.56). Mittels Gaschromatographie (GC) wird die Zunahme des APPE über die Zeit verfolgt. Über die Korrelation mit der Zeit, der Enzym- bzw.

Konjugatmenge und dem Kalibrierfaktor für APPE wurde die Peptidaseaktivität berechnet.

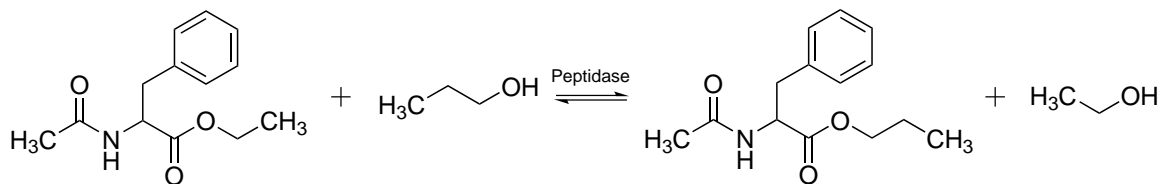


Abbildung 4.56: Reaktionsgleichung der enzymatischen Umesterung von *N*-Acetyl-L-Phenylalaninethylester mit 1-Propanol zu *N*-Acetyl-L-Phenylalaninpropylester und Ethanol zur Bestimmung der Peptidaseaktivität in organischen Medien.

Die Aktivität des kommerziell erhältlichen nativen α -Chymotrypsins suspendiert in THF, wurde mit der Aktivität des gelösten S-PBuOx₅₀-*b*-PMeOx₁₂-Konjugates, hergestellt mit AOT als Lösungsvermittler, verglichen. Wie bereits in Kap. 1.2.1 dargestellt, ist literaturbekannt, dass der Wassergehalt vor allem bei wassermischbaren Lösungsmitteln einen großen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat. Dieser Effekt wurde auch hier beobachtet, bei THF mit einem Wassergehalt von ca. 22000 ppm (bestimmt mittels KARL-FISCHER Titration, der Wassergehalt wurde vor der Zugabe der Edukte gemessen) beträgt die Aktivität des nativen α -Chymotrypsins 0,025 $\frac{\text{U}}{\text{g}}$. Wird der Wassergehalt auf 500 ppm verringert, sinkt die Aktivität drastisch um 97,6 % auf 0,0007 $\frac{\text{U}}{\text{g}}$. Im Gegensatz hierzu zeigt das S-PBuOx₅₀-*b*-PMeOx₁₂- α -Chymotrypsinkonjugat das entgegengesetzte Verhalten. Die Aktivität des Konjugates liegt in THF mit einem Wassergehalt von ca. 22000 ppm bei 0,0029 $\frac{\text{U}}{\text{g}}$ und damit etwa um den Faktor neun unterhalb der Aktivität des nativen Enzyms. Liegt der Wassergehalt bei nur 500 ppm, zeigt das S-PBuOx₅₀-*b*-PMeOx₂₀- α -Chymotrypsinkonjugat eine Aktivität von 0,21 $\frac{\text{U}}{\text{g}}$, was einer 72-fachen Steigerung, verglichen mit der Aktivität in THF mit einem höheren Wassergehalt, entspricht. Dies legt die Vermutung nahe, dass das PMeOx, da es ein hydrophiles und sehr hydroskopisches Polymer ist²¹⁷, lokal die Wasserkonzentration an der Oberfläche des modifizierten Enzyms erhöht. Absolut gesehen liegt die Aktivität des POXylierten α -Chymotrypsins etwa 8,4 mal höher als die des nativen Enzyms. Obwohl die Aktivität des Konjugates höher ist als die des nativen Enzyms, ist sie immer noch gering verglichen mit α -Chymotrypsin, das mittels der AOT Extraktionsmethode in THF gelöst wurde⁶⁶. Wird an Stelle von AOT als Lösungsvermittler THF mit einem Wassergehalt von 500 ppm verwendet, ergibt sich eine Aktivität von 0,034 $\frac{\text{U}}{\text{g}}$. Diese Aktivität ist um den Faktor 6,2 niedriger als die Aktivität mit AOT als Lösungsvermittler was zeigt, dass AOT sich besser als Lösungsvermittler eignet.

Mittels derselben Methode wurde die Aktivität von nativem α -Chymotrypsin, sowie des P_{MeOx₃₆}-Konjugates in CHCl₃ mit einem Wassergehalt von < 1 ppm untersucht. Das native Enzym besitzt eine Aktivität von 0,00048 $\frac{U}{g}$. Im Gegensatz hierzu liegt die Aktivität des mit P_{MeOx₃₆} modifizierten Enzyms bei 0,55 $\frac{U}{g}$, was einer 1146-fachen Steigerung im Vergleich zum nativen Enzym entspricht.

4.2.6.1.3 Lipasen

Lipasen (EC 3.1.1.-) katalysieren die Hydrolyse von Lipiden und sind eine Unterklasse der Esterasen. Sie kommen in fast allen Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen vor. Neben ihrer Bedeutung in biologischen Systemen spielen hauptsächlich die aus Bakterien und Pilzen gewonnenen Lipasen eine bedeutende Rolle in der Biotechnologie. Sie besitzen industriell ein breites Anwendungsspektrum, sie werden z.B. in der Papier-, Wasch- und Lebensmittelindustrie, aber auch in der org. Synthese eingesetzt, da sie eine hohe Regio- und Stereoselektivität und ein breites Substratspektrum aufweisen.^{16,46} In der org. Synthese werden sie großindustriell z.B. in der Produktion chiraler (Zwischen-)Produkte, wie enantiomerenreiner Alkohole oder Amine verwendet^{46,218}. Sie sind außerdem beständig gegen org. Lösungsmittel. Die meisten Lipasen weisen eine Grenzflächenaktivierung auf, d.h. die enzymatische Aktivität ist größer, wenn sie an eine hydrophobe Grenzfläche, wie etwa zwischen Fetttropfen und Wasser, adsorbieren^{45,46}. Lipasen besitzen im aktiven Zentrum eine katalytische Triade aus Histidin, Serin und Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure⁴⁶.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität von drei versch. Lipasen und deren Konjugaten untersucht. Die Lipase B aus *Candida antartica* (CaLB) wird auf Grund ihrer breiten Substratspezifität²¹⁹, Thermostabilität²²⁰ und Enantioselektivität²¹⁹ bereits häufig in der org. Synthese eingesetzt^{219,220}. Sie ist sowohl als Pulver, als auch in geträgerter Form, adsorbiert auf einer Acrylharzmatrix (Novozym 435), kommerziell erhältlich.

Die zweite untersuchte Lipase stammt aus *Rhizomucor miehei* (RmL) und wurde ursprünglich für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie hergestellt. Mittlerweile wird sie aber auch in der Biodieselproduktion, sowie in der org. Synthese eingesetzt, da das Enzym eine gute Veresterungsaktivität und Stabilität in wasserfreien Medien aufweist. Außerdem besitzt auch diese Lipase eine breite Substratspezifität und zudem eine hohe Regio- und Enantioselektivität.²²¹

Die dritte untersuchte Lipase stammt aus *Candida rugosa* (CrL) und wird ebenfalls in der Biotechnologie eingesetzt²²².

Im Wässrigen wurde die Aktivität der untersuchten Lipasen durch Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat (pNpp) ermittelt¹⁸⁵. Hierbei wird 4-Nitrophenol freigesetzt, das photometrisch (410 nm) detektiert wird. Durch eine Korrelation der Reaktionszeit, der Enzym- bzw. Konjugatmenge und dem molaren Extinktionskoeffizienten von 4-Nitrophenol wurde die Lipaseaktivität berechnet.

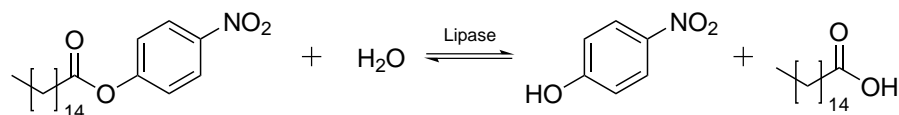


Abbildung 4.57: Reaktionsgleichung der enzymatischen Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat zu 4-Nitrophenol und Palmitinsäure zur Bestimmung der Lipaseaktivität im wässrigen Medium.

Die Aktivität der nativen CrL liegt bei $1,48 \pm 0,22 \frac{U}{mg}$. Die Restaktivität des PMeOx₃₆-CrL-Konjugates liegt bei $0,0014 \pm 0,00042 \frac{U}{mg}$, dies entspricht einer Restaktivität von nur 0,095 %, d.h. die Modifikation hat einen drastischen Aktivitätsverlust zur Folge.

Die Aktivität der nativen CaLB liegt bei $0,4 \pm 0,023 \frac{U}{mg}$. Die Aktivität des PMeOx₃₆-CaLB-Konjugates beträgt $0,0398 \pm 0,0065 \frac{U}{mg}$, dies entspricht einer Restaktivität von etwa $9,84 \pm 1,62$ %, wobei die Aktivität zwischen den versch. Chargen schwankte. Wird PMeOx₆₈ mit einem fast doppelt so hohen Molekulargewicht verwendet, so sinkt die Aktivität auf $0,0082 \frac{U}{mg}$, dies entspricht einer Restaktivität von nur noch 2,03 %. Damit ist die Aktivität dieser Konjugate im Vergleich zu den PMeOx₃₆ Konjugaten um etwa den Faktor 4,8 niedriger. Dieser negative Effekt des PMeOx mit höherem Molekulargewicht auf die Aktivität wurde bereits bei den α -Chymotrypsinkonjugaten beobachtet und diskutiert (vgl. Kap. 4.2.6.1.2).

Die native RmL zeigt im Wässrigen eine Aktivität von $28,9 \pm 6,41 \frac{U}{mg}$. Die Aktivität des PMeOx₃₆-RmL-Konjugates liegt bei $0,96 \pm 0,066 \frac{U}{mg}$, dies entspricht einer Restaktivität von $3,3 \pm 0,23$ %. Damit ist die Restaktivität bei dieser Lipase gegenüber der modifizierten CaLB um den Faktor drei geringer. Die Modifikation hat also bei der RmL einen deutlich höheren Aktivitätsverlust zur Folge.

Im Gegensatz zur Esterhydrolyse in wässrigen Medien, katalysieren Lipasen in org. Medien u.a. Veresterungen^{1,46}. Die katalytische Aktivität der Lipasen in org. Medien wurde daher mittels einer Veresterung von Laurinsäure und 1-Oktanol untersucht⁷⁷. Die Zunahme des entstehenden Laurinsäureoktylestere wurde mittels GC über die Zeit

verfolgt. Durch Korrelation der Reaktionszeit, der Enzym- bzw. Konjugatmenge und dem Kalibrierfaktor für Laurinsäureoktylester wurde die Lipaseaktivität berechnet.

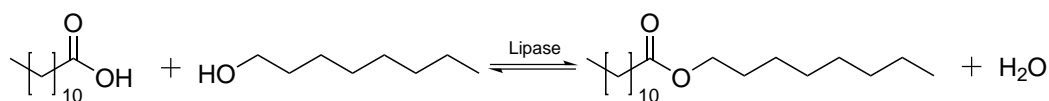


Abbildung 4.58: Reaktionsgleichung der enzymatischen Veresterung von Laurinsäure mit 1-Oktanol zur Bestimmung der Lipaseaktivität in organischen Medien.

Die native CrL zeigt in CHCl_3 (bei 37°C) suspendiert eine Aktivität von $0,041 \frac{\text{U}}{\text{g}}$, das gelöste PMeOx_{36} -CrL-Konjugat hingegen eine Aktivität von $0,58 \frac{\text{U}}{\text{g}}$. Die Modifikation führt zu einer etwa 14,1-fachen Aktivierung. Unter Berücksichtigung der Restaktivität beträgt die Aktivierung sogar das 14900-fache.

Die native RmL besitzt in trockenem CHCl_3 (bei 37°C) eine Aktivität von $3,6 \frac{\text{U}}{\text{g}}$, die Aktivität des Konjugates liegt mit $1,5 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ um den Faktor 2,4 darunter. Wird die Aktivität des Konjugates nur auf den im Wässrigen noch aktiven Anteil bezogen, so ergibt sich eine Aktivität von $45,5 \frac{\text{U}}{\text{g}}$. Dies zeigt, dass eine Aktivierung der noch aktiven Enzymmoleküle durch die Modifikation und die damit einhergehende Löslichkeit im org. Medium vorhanden ist, allerdings überwiegt der negative Effekt. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei den in Toluol gelösten PHeptOx_{30} -RmL-Konjugaten. Das in Toluol dispergierte native Enzym hat eine Aktivität von $126,6 \frac{\text{U}}{\text{g}}$, während die Aktivität des Konjugates bei nur $0,178 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ liegt. Selbst unter Berücksichtigung der geringen Restaktivität im Wässrigen ist die Aktivität des Konjugates in Toluol noch ca. 23,5-fach geringer als die des nativen Enzyms. Die Modifikation führt also nicht zu einer Aktivierung der Lipase in Toluol.

Für die CaLB wurde die Aktivität sowohl des nativen in CHCl_3 dispergierten Enzyms, als auch der Konjugate in Abhängigkeit des Wassergehaltes bestimmt. Der Wassergehalt wurde immer vor der Zugabe des Konjugates, sowie der Edukte gemessen bzw. auf den jeweiligen Wert eingestellt. Wie Tab. 4.13 zeigt, steigt die Aktivität der nativen CaLB mit zunehmendem Wassergehalt an. Dieses Verhalten wurde bereits bei versch. Enzymen in unterschiedlichen org. Lsgm. beobachtet^{52,223}. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität der beiden untersuchten PMeOx -Konjugate in beiden Fällen bei 300 ppm am höchsten und fällt mit steigendem Wassergehalt.

Dies ist vermutlich, wie bereits weiter oben erwähnt, auf die lokal erhöhte Wasserkonzentration an der Oberfläche des modifizierten Enzyms zurückzuführen. Die Akti-

Tabelle 4.13: Aktivität von nativer CaLB, sowie der CaLB PEKs mit unterschiedlichen POX in CHCl_3 als Funktion des Wassergehaltes; gemessen bei $28\text{ }^\circ\text{C}$, angegeben in $\frac{\text{U}}{\text{g}} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{g}} \right)$.

ppm	CaLB nativ	PMeOx ₃₆ -CaLB	PMeOx ₆₈ -CaLB	PEtOx ₄₀ -CaLB
1	0,58	17,18	3,04	0,37
300	1,44	17,59	5,73	0,77
700	2,55	11,51	n.b.	0,92
gesättigt	n.b.	8,06	2,97	1,21

vität des PMeOx₆₈-CaLB-Konjugates ist um etwa den Faktor 3,1 niedriger als die des PMeOx₃₆-Konjugates. Eine mögliche Erklärung wurde bereits bei den Enzymen Lysozym und α -Chymotrypsin diskutiert (vgl. Kap. 4.2.6.1.1, 4.2.6.1.2). Das PEtOx₄₀-CaLB-Konjugat wiederum zeigt ein ähnliches Verhalten wie das native Enzym. Die Aktivität nimmt mit steigendem Wassergehalt zu. Außerdem ist zu erkennen, dass die höchste Aktivität des PEtOx₄₀-CaLB-Konjugates um den Faktor 14,5 niedriger ist als die höchste Aktivität des PMeOx₃₆-Konjugates. Die höchste Aktivität des Konjugates (bei 300 ppm) ist 6,9 mal größer als die höchste Aktivität des nativen Enzyms (bei 700 ppm).

Es wurde im Folgenden die Aktivität der PMeOx-CaLB-Konjugate in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt und mit denen der nativen CaLB, sowie des kommerziell erhältlichen immobilisierten Enzyms, in Form von Novozyme 435, verglichen. Wie bereits in Kap. 4.2.4.1 dargestellt, liegt der mittlere Proteingehalt der kommerziell erhältlichen CaLB bei 14,7 % bzw. 8,1 %. Die Enzymladung des kommerziell erhältlichen Novozyme 435 liegt bei $200 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}^{224}$. Um die Aktivitäten vergleichen zu können, wurde die Aktivität der immobilisierten CaLB auf den Enzymgehalt des Immobilisats bezogen (spezifische Aktivität) und die Aktivität des nativen Enzyms sowie des Konjugates (vor der Modifikation) auf einen Proteingehalt von 8,1 %. Es zeigte sich, dass die Aktivität der nativen CaLB mit steigender Temperatur zunimmt. Sie liegt jedoch über den gesamten Temperaturbereich deutlich unter der des Konjugates bzw. des Novozyme 435 (Abb. 4.59). Auch die Aktivität des Novozyme 435 steigt mit zunehmender Temperatur. Das Konjugat hingegen zeigt ein Aktivitätsmaximum bei $28\text{ }^\circ\text{C}$ mit $1405 \frac{\text{U}}{\text{g}}$, dies entspricht einer etwa 54-fachen Aktivierung gegenüber dem nativen Enzym. Die Aktivität des Konjugates ist bis $28\text{ }^\circ\text{C}$ höher als die des Novozyme 435, bei $28\text{ }^\circ\text{C}$ ist das Konjugat sogar 4,3-mal aktiver als das immobilisierte Enzym. Wird die im Wässrigen gemessene Restaktivität des Konjugates mit einbezogen, ergibt sich sogar eine Akti-

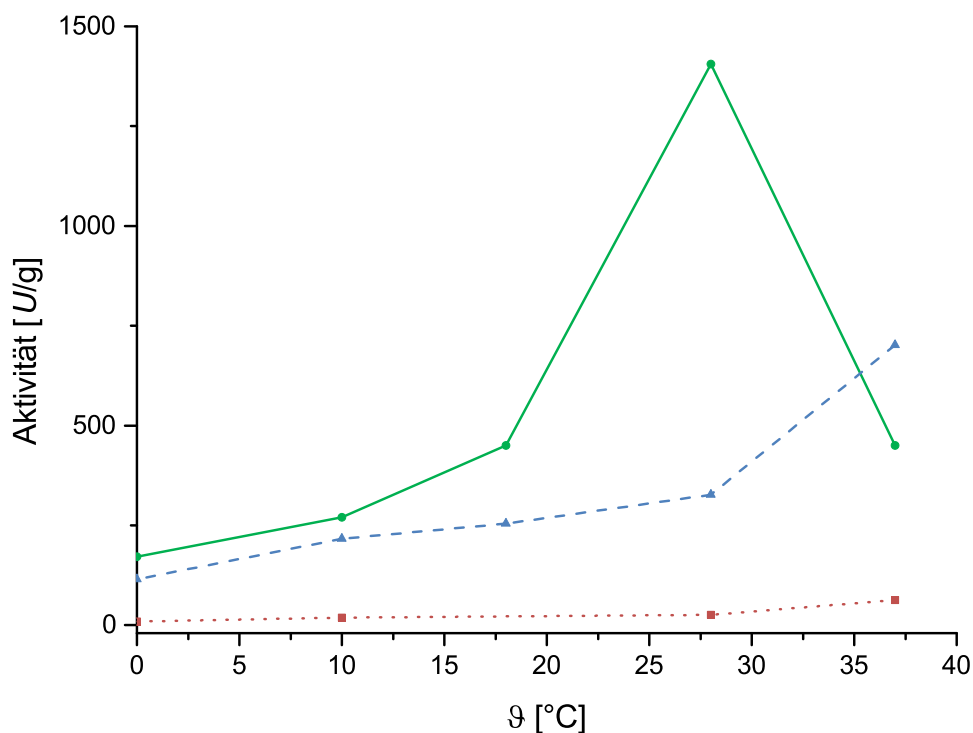


Abbildung 4.59: Auftragung der Aktivität gegen die Temperatur von: rot (· ·) nativer CaLB, grün (—) PMeOx₃₆-CaLB-Konjugat, blau (- -) Novozyme 435.

vierung von 549 gegenüber dem nativen Enzym und 44 gegenüber dem Novozyme 435. Die unterschiedlich großen Aktivierungen zwischen dem Konjugat und dem nativen Enzym bei der Untersuchung zur Abhängigkeit der Aktivität vom Wassergehalt und der Temperaturabhängigkeit lassen sich auf die unterschiedlichen verwendeten Chargen der verwendeten CaLB, sowie des verwendeten Konjugates zurückführen.

Die Aktivität der CaLB-Konjugate wurde zusätzlich in THF und Toluol untersucht. In THF mit einem Wassergehalt von ca. 22000 ppm (bestimmt mittels KARL-FISCHER Titration) wurde eine Aktivität der nativen Lipase von $1,8 \frac{U}{g}$ ermittelt, in THF (500 ppm) betrug die Aktivität $0,3 \frac{U}{g}$. Das S-PBuOx₅₀-*b*-PMeOx₁₂-CaLB-Konjugat zeigte in beiden Fällen keine messbare Aktivität.

Das PHeptOx₃₀-CaLB-Konjugat zeigt in Toluol bei 37 °C eine Aktivität von $10,9 \frac{U}{g}$. Allerdings besitzt das native Enzym unter diesen Bedingungen eine 4,6-fach höhere Aktivität ($50,4 \frac{U}{g}$). Das S-PBuOx₅₀-*b*-PMeOx₁₂-Konjugat zeigt sogar eine um den Faktor 19,5 ($0,56 \frac{U}{g}$) geringere Aktivität als das native Enzym. Die Modifikation führt in beiden Fällen genauso, wie bei der RmL, nicht zu einer Aktivierung der Lipase in Toluol.

4.2.6.2 Oxidoreduktasen

Oxidoreduktasen bilden die erste Gruppe innerhalb der EC-Klassifikation (EC 1.-.-.-). Sie katalysieren versch. Arten von Redoxreaktionen und werden weiterhin nach dem Elektronendonator unterteilt.

4.2.6.2.1 Laccase

Laccasen (EC 1.10.3.2) zählen zu den multinuklearen kupferhaltigen Oxidasen. Sie katalysieren die Ein-Elektron-Oxidation von vier Substratmolekülen zu den jeweiligen reaktiven Radikalen unter Reduktion von einem Molekül Sauerstoff zu Wasser.²²⁵ Die Rolle der Kupferatome wird in Kap. 4.4.3.3.1 genauer vorgestellt. Sie sind vor allem in Pflanzen und Pilzen²²⁶ zu finden, treten aber auch in Insekten²²⁷ und Bakterien²²⁸ auf. Industriell werden Laccasen für die Entfärbung von Textilien und für die Vermeidung des Korktons bei Wein eingesetzt, wobei noch einige weitere mögliche industrielle Anwendungsmöglichkeiten bekannt sind²²⁹. Die meisten der bisher charakterisierten Laccasen stammen aus Pilzen, vor allem aus den Weißfäulepilzen²³⁰.

Die in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Aktivität charakterisierte Laccase, sowie deren Konjugate stammt aus dem Weißfäulepilz *Trametes versicolor*.

Im Wässrigen wurde die Aktivität der Laccase mittels zweier unterschiedlicher Assays bestimmt und mit den Aktivitäten des P_{MeOx}₃₆-Konjugates verglichen. Hierzu wurde 2,6-Dimethoxyphenol¹⁷⁹ (DMP) und 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) als Substrat eingesetzt. ABTS wird durch die Laccase mittels molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel oxidiert und bildet ein stabiles, grünblau gefärbtes Radikalkation, das photometrisch (405 nm) detektiert wurde (Abb. 4.60).¹⁸⁰

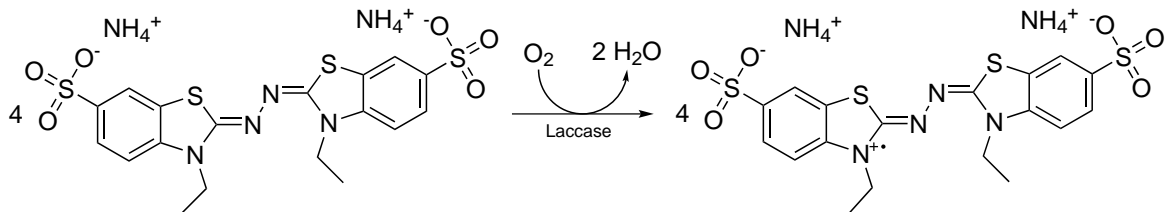


Abbildung 4.60: Reaktionsgleichung des Assays zur Bestimmung der Laccaseaktivität im wässrigen Medium mittels ABTS als Substrat.

Wird DMP als Substrat verwendet, entstehen durch oxidative Kopplung versch. dimere Produkte²³¹. In Abb. 4.61 ist der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus für die Reaktion zum Hauptprodukt 3,3',5,5'-Tetramethoxy-1,1'-Biphenyl-4,4'-diol dargestellt^{179,232}. Die Aktivität der nativen Laccase im wässrigen Medium unter Verwendung von DMP als Substrat liegt bei etwa $14800 \frac{\hat{U}_{\text{Laccase}, 25 \text{ } ^\circ\text{C}}}{\text{mg}}$ (*arbitrary units*). Wird das P_{MeOx}₃₆-

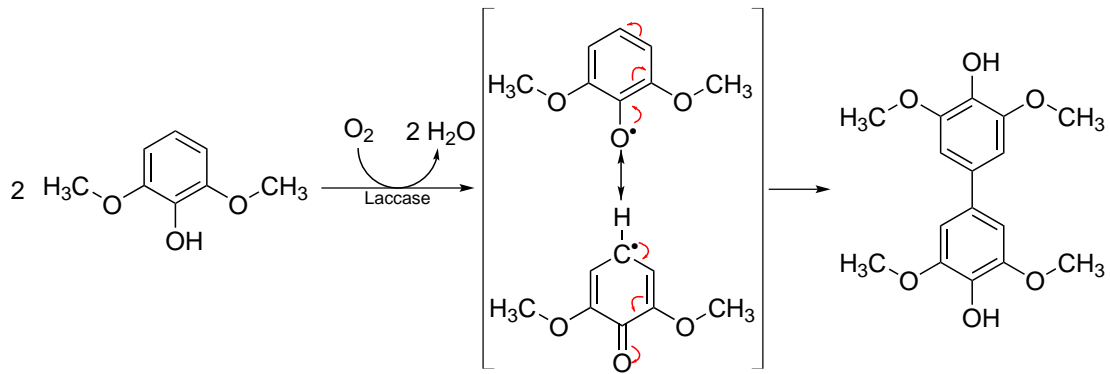


Abbildung 4.61: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der enzymatisch katalysierten oxidativen Kupplung von DMP zu 3,3',5,5'-Tetramethoxy-1,1'-Biphenyl-4,4'-diol^{179,232}.

Laccasekonjugat gegen Wasser dialysiert, ist keine Aktivität feststellbar. Dies wird in Kap. 4.4.3.3.1 noch genauer diskutiert. Um die enzymatische Aktivität zu erhalten, wurden die Konjugate daher im Folgenden gegen eine CuSO₄-Lösung geringer Konzentration (0,8 mM) dialysiert. Die Aktivität des PMeOx₃₆-Laccasekonjugates beträgt $474 \frac{\hat{U}_{\text{Laccase}, 25^\circ\text{C}}}{\text{mg}}$. Dies entspricht einer Restaktivität von ca. 3,2 %. Wird hingegen ABTS als Substrat verwendet, liegt die Aktivität des nativen Enzyms bei $10100 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ und die des Konjugates bei $0,66 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$, was einer Restaktivität von nur noch 0,0066 % entspricht. ABTS ist, bezogen auf die molare Masse ein, 3,6-fach größeres Substrat als DMP. Der etwa 480-fache Unterschied in den Restaktivitäten zwischen den beiden Assays ist daher wahrscheinlich auf sterische Hinderungen durch die kovalent gebundenen PMeOx-Ketten zurückzuführen, wie sie auch bei den PMeOx- α -Chymotrypsin-konjugaten beobachtet wurde (s. Kap. 4.2.6.1.2).

In CHCl₃ wurde die Laccaseaktivität mit dem gleichen Assay wie im Wässrigen, mittels DMP als Substrat, bestimmt. Suspendiert in trockenem CHCl₃ war keine Aktivität des kommerziell erhältlichen Laccasepulvers zu beobachten ($< 0,01 \frac{\hat{U}_{\text{Laccase}, 25^\circ\text{C}}}{\text{mg}}$). In wassergesättigtem CHCl₃ beträgt die Aktivität $0,017 \frac{\hat{U}_{\text{Laccase}, 25^\circ\text{C}}}{\text{mg}}$. Im Gegensatz hierzu zeigt das PMeOx₃₆-Laccasekonjugat, gelöst in wassergesättigtem CHCl₃ (1200 ppm), eine Anfangsaktivität von $83 \frac{\hat{U}_{\text{Laccase}, 25^\circ\text{C}}}{\text{mg}}$, dies entspricht einer etwa 5000 fachen Steigerung im Vergleich zum nativen Enzym. Das Konjugat ist ebenfalls aktiv in trockenem CHCl₃ mit einer Anfangsaktivität von ca. $75 \frac{\hat{U}_{\text{Laccase}, 25^\circ\text{C}}}{\text{mg}}$. Wird die Aktivität nur auf die nach der Konjugation im Wässrigen noch aktiven Enzymmoleküle (mittels DMP als Substrat) bezogen, so ergibt sich eine 153000-fache Aktivierung gegenüber dem nativen Enzym.

Es wurde nur die Anfangsaktivität betrachtet, da wie Abb. 4.62 zeigt die Extinktion nach etwa 2,5 min deutlich langsamer ansteigt. Durch Begasen derselben Probe mit reinem Sauerstoff war es möglich, den dargestellten Extinktionsverlauf zu reproduzieren. Da die Laccase für die Reaktion molekularen Sauerstoff benötigt, deutet dies darauf hin, dass die Reaktion nach kurzer Zeit durch den Mangel an Sauerstoff limitiert wird und die Diffusion des O₂ in die Lösung nicht ausreicht, um die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit aufrechtzuerhalten. Durch das Begasen der Lösung wurde das Chloroform wieder mit O₂ gesättigt, sodass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wieder erreicht wurde. Im Fall des suspendierten, nativen Enzyms ist die Aktivität so gering, dass dieser Effekt nicht sichtbar ist.

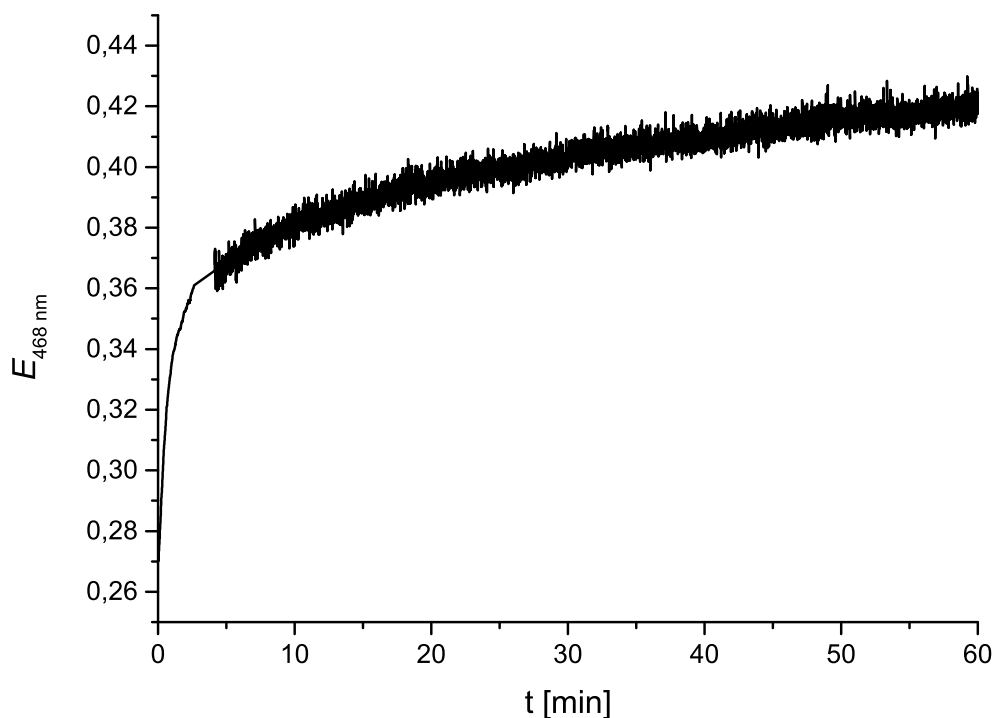


Abbildung 4.62: Auftragung der Extinktion (468 nm) gegen die Zeit bei der oxidativen Kupplung von DMP mittels eines PMeOx₃₆-Laccase-konjugates in CHCl₃.

4.2.6.2.2 Peroxidase

Bei Peroxidasen (EC 1.11.1.-) handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Redoxenzymen, welche ubiquitär in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vorkommen. Trotz ihrer versch. biologischen Funktionen haben sie die Gemeinsamkeit, dass sie H₂O₂ oder organische Peroxide als Oxidationsmittel verwenden, natürlicherweise katalysieren sie am häufigsten die Reduktion von zelltoxischem H₂O₂. Sie werden häufig

nach ihrem Substrat (z.B. Ligninperoxidase) oder ihrer Herkunft (z.B. Meerrettichperoxidase) benannt. Da Peroxidasen im Vergleich zu Monooxygenasen keine Coenzyme benötigen und in der Lage sind, synthetisch nützliche Reaktionen wie beispielsweise oxidative Halogenierungen oder Dehydrierungen zu katalysieren, sind sie interessant für präparative Biotransformationen.¹

In dieser Arbeit wurde die Aktivität der Meerrettichperoxidase (HRP) sowie deren Konjugate untersucht.

Die Aktivität der Peroxidase wurde im Wässrigen, ähnlich wie bei der Bestimmung der Laccaseaktivität mit ABTS als Substrat bestimmt. Als Oxidationsmittel diente hier allerdings H₂O₂. Das sich bildende Oxidationsprodukt, das stabile grünblau gefärbte Radikalkation, wurde wiederum photometrisch (405 nm) detektiert (vgl. Abb. 4.60). Die Aktivität der nativen Meerrettichperoxidase wurde mit der des Konjugates verglichen. Die Aktivität der nativen Peroxidase beträgt $161,7 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$. Das PMeOx₃₆-Peroxidasekonjugat besitzt eine Restaktivität von $1,2 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$, dies entspricht 0,74 %. Dies deutet darauf hin, dass ein Großteil des Enzyms durch die Modifikation deaktiviert wurde.

Die Peroxidaseaktivität wurde in CHCl₃ durch die oxidative Kupplung von *N,N*-Dimethyl-*p*-Phenylendiamin mit Phenol ermittelt⁷⁵ (Abb. 4.63). Diese Reaktion verläuft in zwei Schritten, wobei ein organisches Hydroperoxid als Oxidationsmittel dient. Hierbei entsteht ein blau-violett gefärbter Indophenol-Farbstoff, welcher photometrisch (546 nm) detektiert wurde.

Die native Peroxidase zeigt in CHCl₃ eine Aktivität von $0,52 \pm 0,11 \frac{\hat{U}_{\text{Peroxidase}}}{\text{mg}}$ (*arbitrary units*). Dieser Wert ist vergleichbar mit einem literaturbekannten Wert⁷⁵, welcher in *n*-Heptan ermittelt wurde. Im Gegensatz dazu zeigt das in CHCl₃ gelöste Konjugat mit $0,98 \pm 0,05 \frac{\hat{U}_{\text{Peroxidase}}}{\text{mg}}$ beinahe die doppelte Aktivität. Die erzielte höhere Aktivität ist vor allem bemerkenswert, unter Berücksichtigung der geringen Restaktivität des Konjugates (0,74 %) im Wässrigen. Wird die in CHCl₃ gemessene Aktivität nur auf die im Wässrigen noch aktiven Enzymmoleküle bezogen, ergibt sich eine 255-fache Aktivierung.

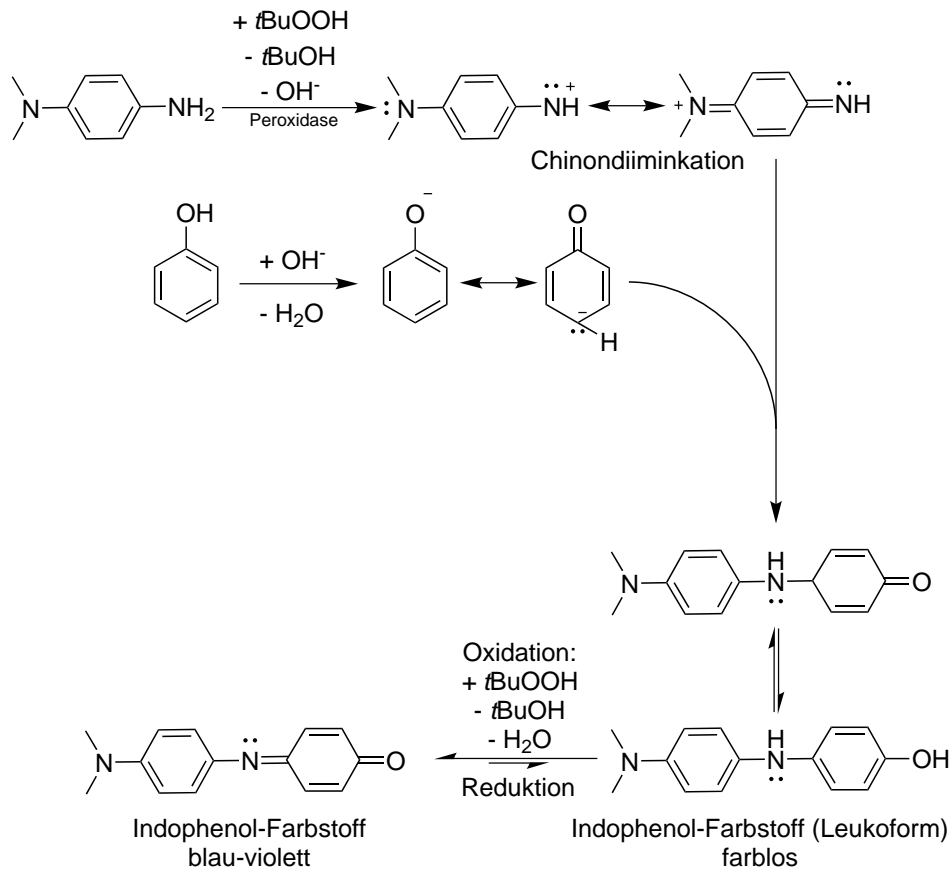


Abbildung 4.63: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der oxidativen Kuppelung von *N,N*-Dimethyl-*p*-phenyldiamin und Phenol zu einem blau-violett gefärbten Indophenolfarbstoff im organischen Medium nach BRUNS⁶⁷.

4.2.6.2.3 Alkoholdehydrogenase

Alkoholdehydrogenasen (EC 1.1.1.1) sind Enzyme, welche sowohl die Oxidation von Alkoholen zu den korrespondierenden Aldehyden bzw. Ketonen, sowie auch die Rückreaktion katalysieren. Bei jedem Reaktionsschritt wird hierbei ein Coenzymmolekül, wie beispielsweise $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$, reduziert bzw. oxidiert. Sie kommen ubiquitär in vielen Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren vor²³³. Alkoholdehydrogenasen lassen sich für die Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen einsetzen^{234,235}. Nachteilig ist die Notwendigkeit von Coenzymen, die mit Hilfe weiterer Reaktionen wieder regeneriert werden müssen. Des Weiteren ist ihr praktischer Einsatz durch enge Substratspezifität und Instabilität vieler Alkoholdehydrogenasen limitiert²³⁵.

Die Aktivität der untersuchten Alkoholdehydrogenase (ADH) (aus *S. cerevisiae*) wurde im Wässrigen durch die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd ermittelt (Abb. 4.64).

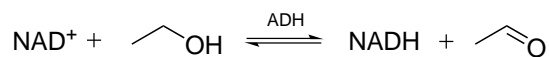


Abbildung 4.64: Reaktionsgleichung des Assays zur Bestimmung der Alkoholdehydrogenaseaktivität im wässrigen Medium mittels Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd bzw. Reduktion von NAD^+ zu NADH.

Hierbei wird das Coenzym NAD^+ zu NADH reduziert. Durch die Reduktion am Nicotinamidring (Abb. 4.65, sowie Kap. 1.1.2, Abb. 1.2) entsteht ein Dihydropyridin-ähnliches System dessen Bildung bei 340 nm photometrisch detektiert wurde¹⁸³.

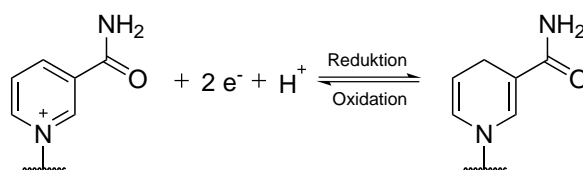


Abbildung 4.65: Reaktionsgleichung der Redoxreaktion von NAD, dargestellt ist nur der für die Redoxreaktion relevante Teil des Coenzym.

Für die native ADH wurde eine Aktivität von $90,6 \pm 2,68 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ ermittelt. Für das mit PMeOx_{36} modifizierte Enzym ist die Aktivität mit $0,00097 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ kaum noch nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für die niedrige Aktivität ist die Entfernung der für die katalytische Aktivität wie auch für die Konformationsstabilität wichtigen Zinkatome (2 pro Untereinheit) durch die Dialyse der Konjugate, sowie dies auch im Fall der Laccase zu beobachten war (vgl. Kap. 4.2.6.2.1, 4.4.3.3.1). Der nachteilige Effekt der Modifikation lässt sich wahrscheinlich auch auf die Struktur der ADH zurückführen. Die ADH aus *S. cerevisiae* ist ein Tetramer aus vier identischen oder unterschiedlichen Untereinheiten (Homo- bzw. Heterotetramer)¹⁵⁹. Die Modifikation selbst bzw. die Konjugationsprozedur zerstört möglicherweise die Tetramerstruktur und die Untereinheiten selbst sind nicht mehr katalytisch aktiv.

Obwohl im wässrigen Medium nur eine Restaktivität von 0,0011 % gemessen wurde, wurde eine Messung der Aktivität der in CHCl_3 gelösten Konjugate durchgeführt. Hierbei wird 2-Oktanol zu 2-Oktanon oxidiert, das Coenzym NAD^+ wird mittels Aceton wieder regeneriert (Abb. 4.66). Es wurde die Oxidation von 2-Oktanol zu 2-Oktanon gewählt, da bei der Reduktion von 2-Oktanon in CHCl_3 keine enzymatische Aktivität der ADH nachweisbar war (vgl. Kap. 4.3.1.1). Die Zunahme des entstehenden Produktes wurde mittels GC über die Zeit verfolgt. Durch Korrelation der Reaktionszeit, der Enzym- bzw. Konjugatmenge und dem Kalibrierfaktor wurde die Alkoholdehydrogenaseaktivität berechnet.

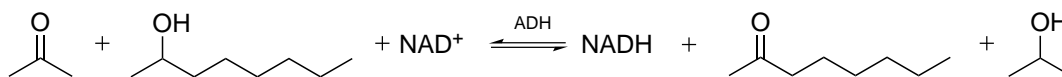


Abbildung 4.66: Reaktionsgleichung des Assays zur Bestimmung der Alkoholdehydrogenaseaktivität im organischen Medium mittels Oxidation von 2-Oktanol zu 2-Oktanon bzw. der Reduktion von NAD^+ zu NADH.

Im Gegensatz zu *n*-Heptan ist CHCl_3 kein geeignetes Lösungsmittel für die ADH (vgl. Kap. 4.3.1.1). Für das native Enzym wurde nur eine Aktivität von $0,015 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ gemessen. Für das PMeOx_{36} -ADH-Konjugat war auch nach einer Reaktionszeit von einer Woche keine Produktbildung nachweisbar.

4.2.7 Zusammenfassung

Die Konjugation von Enzymen mit POX stellt eine vielseitige Methode dar, um Enzyme in org. Lsgm. zu lösen. Es wurden hierbei versch. Strategien zur Synthese von POX-Enzymkonjugaten untersucht, wobei vor allem bifunktionelle Linker zur Konjugatsynthese eingesetzt wurden. Sowohl mittels direkter Terminierung als auch mit Succinimidylcarbonat, Hexamethylendiisocyanat, Bernsteinsäuredichlorid und Pyromellitsäuredianhydrid als Linker ist es gelungen, POX-Enzymkonjugate herzustellen. PADA zeigte sich hierbei als besonders gut für die Konjugatsynthese geeignet. Daher wurde diese Kopplungsstrategie optimiert und die synthetisierten POX-Enzymkonjugate mit SDS-PAGE, IEF, SEC sowie DLS weiter charakterisiert. Sowohl bei der Modifizierung in reinem DMF, als auch in der DMF-Puffer-Mischung wurden, je nach verwendetem Enzym, unterschiedliche Modifizierungsgrade bis hin zu einer vollständigen Modifizierung aller Aminogruppen der Enzyme erhalten. Mit PMeOx und PEtOx wurden DMF- und CHCl_3 -lösliche Konjugate unterschiedlicher Enzyme erhalten. Nach dem Anpassen der Parameter für wasserunlösliche POX ($\text{PBUOx-}b\text{-PMeOx}$, PHeptOx), wurden auch THF und sogar Toluol lösliche Konjugate erhalten.

Die Aktivitätsmessungen im Wässrigen zeigen, dass bei allen Enzymen ein Teil durch den Modifikationsprozess deaktiviert wird. Trotz dieser Deaktivierung sind die Aktivitäten des α -Chymotrypsins, der CaLB, der CrL, der Laccase sowie der Peroxidase höher als die, der in dem jeweiligen org. Lsgm. dispergierten Enzyme. Vor allem unter Berücksichtigung der im Wässrigen bestimmten Restaktivitäten wurden enorme Aktivierungen erreicht. Die größten Aktivierungen wurden in CHCl_3 für das PMeOx_{36} -Laccasekonjugat mit ca. 153000, das PMeOx_{36} -CrL-Konjugat mit etwa 14900, das PMeOx_{36} - α -Chymotrypsinkonjugat mit ca. 1146, das PMeOx_{36} -HRP-Konjugat mit

etwa 255 sowie das P_{MeOx}₃₆-CaLB-Konjugat mit ca. 549 erzielt. Bei dem P_{MeOx}₃₆-CaLB Konjugat liegt die Aktivität unter Berücksichtigung des Proteingehaltes des kommerziell erhältlichen Enzyms bis 28 °C sogar über denen der geträgerten CaLB, in Form des kommerziell erhältlichen Novozyme 435. Bei 28 °C wurde unter Berücksichtigung der im Wässrigen ermittelten Restaktivität sogar eine 44-fache Aktivierung gegenüber Novozyme 435 erreicht. Interessanterweise sind die P_{MeOx}₃₆-CaLB-Konjugate in CHCl₃, sowie die S-PBuOx₅₀-*b*-P_{MeOx}₁₂- α -Chymotrypsinkonjugate in THF in trockenem Lsgm. aktiver als in Lsgm. mit höherer Wasseraktivität. Dies steht im Gegensatz zu den Aktivitäten der nativen Enzyme im jeweiligen Lösungsmittel, was nahe legt, dass die Konjugation mit P_{MeOx} zu einer lokal erhöhten Wasserkonzentration an der Oberfläche des modifizierten Enzyms führt.

4.3 Organolösliche Polymer-Coenzymkonjugate

Wie bereits in Kap. 1.2.4 dargestellt, würde ein organolösliches Redoxäquivalent (NAD bzw. NADP) die Anwendungsmöglichkeiten für den Einsatz von Oxidoreduktasen in org. Medien erweitern. Ziel dieses Kapitels war deshalb die Synthese und Charakterisierung von organolöslichem NAD bzw. NADP. NAD bzw. NADP steht hier allgemein sowohl für die oxidierte wie auch die reduzierte Form des Coenzym. Die Organolöslichkeit dieser Coenzyme sollte wie bereits für die Enzymkonjugate (Kap. 4.2) beschrieben, durch Modifikation mit POX erreicht werden. Für die Synthese von Polymer-Coenzymkonjugaten wurden zwei unterschiedliche Synthesestrategien gewählt, wobei in beiden Fällen die Verknüpfung über die primäre Aminogruppe des Adeninrestes erfolgte. Bei der ersten Synthesestrategie wurde das POX analog zur Enzymmodifikation mit dem Coenzym terminiert (Kap. 4.3.1). Die zweite Variante war eine zweistufige Synthese mittels Bernsteinsäureanhydrid (BSSA) als Kupplungsreagenz (Kap. 4.3.2).

4.3.1 Direkte Terminierung

Teile der Ergebnisse dieses Abschnittes wurden in Zusammenarbeit mit Dominik Doert im Rahmen seiner Studienarbeit erarbeitet.²⁰⁸

Die Syntheseroute für die Konjugation von NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H mit POX mittels direkter Terminierung ist in Abb. 4.67 dargestellt.

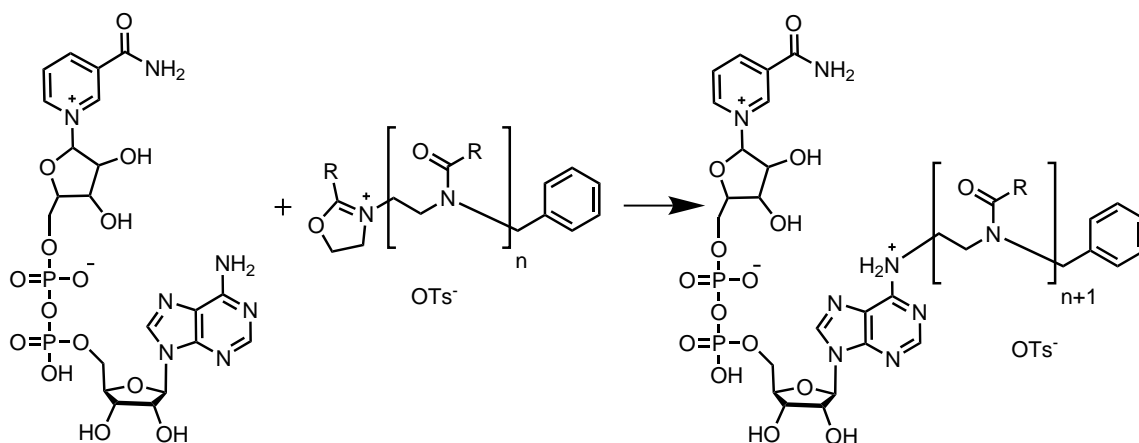


Abbildung 4.67: Darstellung der Synthese von POX-Coenzymkonjugaten mittels direkter Terminierung am Beispiel von NAD⁺ und einem Poly(2-R-Oxazolin).

Das lebende POX wurde hierbei direkt nach der Polymerisation in molarem Überschuss zum Coenzym gegeben. Zur Entfernung des nicht polymergebundenen Coenzym wurden die Proben im Anschluss gegen bidest. Wasser dialysiert, überschüssiges Polymer

wurde so allerdings nicht abgetrennt. Eine weitere Aufarbeitung fand nicht statt, so dass immer überschüssiges POX im Produkt vorhanden war. Der Coenzymgehalt der Konjugate wurde über die Masse des resultierenden Produktes nach der Lyophilisation, sowie über das Molverhältnis zwischen POX und Coenzym, welches mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie bestimmt wurde berechnet.

In einem Vorversuch wurde die Konjugation in reinem CHCl_3 , sowie auch in einer Emulsion, bestehend aus CHCl_3 und in Carbonatpuffer (0,5 mM pH-Wert 9,65) gelöstem Coenzym untersucht. Bei der Verwendung von PMeOx (PMeOx Precursor $\text{DP}_{\text{NMR}} = 29$, 10 äq. bezogen auf das Coenzym) und des Coenzym NADP $^+$ zeigte sich bei der Analyse mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie nach der Dialyse (2 kDa MWCO), dass in der Probe, die in reinem CHCl_3 mit suspendierten NADP $^+$ hergestellt wurde, kaum noch Signale des Coenzym zu erkennen sind. In der Probe, die mittels in Puffer gelöstem NADP $^+$ hergestellt wurde, ist der NADP $^+$ Anteil um etwa den Faktor 4,2 größer. Das resultierende Produkt ist, wie Abb. 4.68 b zeigt, vollständig in CHCl_3 löslich im Gegensatz zu reinem NADP $^+$ (Abb. 4.68 a). Daher wurden alle folgenden Modifikationen mit in Puffer gelöstem Coenzym in der Emulsion durchgeführt.

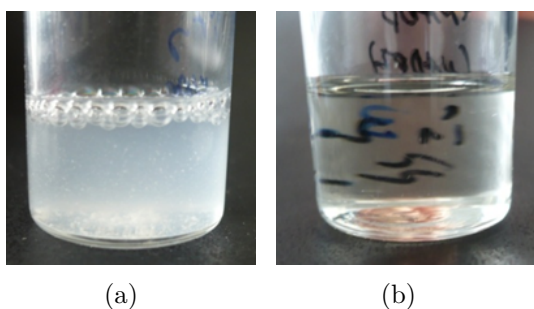


Abbildung 4.68: Bilder von ≈ 3 mg NADP $^+$ in 2 mL CHCl_3 : (a) nativ, (b) modifiziert mit PMeOx (die 3 mg beziehen sich auf den Anteil des reinen NADP $^+$ in der Probe).

Im Folgenden wurde auf Grund des höheren Anteils NAD-abhängiger Enzyme¹ sowie des gestiegenen industriellen Interesses an solchen Enzymen das Coenzym NAD $^+$ bzw. NADH untersucht²³⁶. Hierzu wurden versch. POX synthetisiert (Tab. 4.14), welche dann mittels in Carbonatpuffer gelöstem NAD $^+$ /NADH in der Emulsion terminiert und zur Entfernung von nicht gebundenem Coenzym im Falle der wasserlöslichen POX (PMeOx, PEtOx) im Anschluss gegen bidest. Wasser (MWCO 1 kDa) dialysiert wurden. Im Fall der nicht wasserlöslichen POX (PHeptOx, S-PHeptOx-PMeOx Diblockcopolymer) wurden die Proben im Vakuum getrocknet.

Wie beim NADP $^+$ resultiert die Terminierung von NAD $^+$ mit 10 äq. PMeOx₃₈ (bezogen auf das Coenzym) in einem CHCl_3 -löslichen Produkt, ebenso wie das auf die gleiche

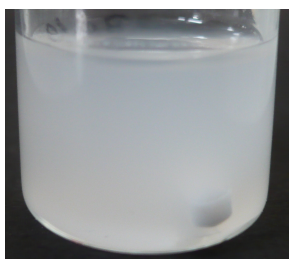
Tabelle 4.14: Analytische Daten der Präkursoren der für die Modifikation von NAD⁺ bzw. NADH verwendeten POX.

Polymer	$M_{n,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	$M_{w,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	DP _{GPC}	DP _{NMR} ^a	PDI
PMeOx ₃₈	3370	3530	38	36	1,19
PEtOx ₃₅	3490	3820	34	37	1,19
PHeptOx ₃₀	5050	5550	30	33	1,10
S-PHeptOx ₃₇ - <i>b</i> -PMeOx ₃	5130	5710	29/2 ^b	37/3	1,11
S-PHeptOx ₃₈ - <i>b</i> -PMeOx ₁₂	5490	6450	25/16 ^b	38/12	1,18

^a Berechnet aus dem Integralverhältnis der charakteristischen Initiatorsignale sowie aus dem Mittelwert der POX Rückgrat bzw. Seitengruppensignale, bestimmt über ¹H-NMR Spektroskopie.

^b Berechnet aus dem Molekulargewicht M_n (GPC) unter Annahme der aus dem ¹H-NMR Spektrum bestimmten Blockverhältnisse.

Weise hergestellte PMeOx₃₈-NADH-Konjugat, wohingegen NAD⁺ bzw. NADH nicht CHCl₃-löslich sind. Die PMeOx₃₈-NAD⁺ und die NADH-Konjugate sind außerdem löslich in DMF, Acetonitril sowie Dichlormethan. Einen Hinweis auf eine kovalente Bindung zwischen dem Coenzym und dem POX ergab ein Kontrollexperiment, bei dem NAD⁺ mit einem OH-terminierten PMeOx (analytische Daten s. Kap. 4.2.2, Tab. 4.5) gemischt, in Wasser gelöst und nach der Trocknung in CHCl₃ gegeben wurde. Diese Mischung ist nicht löslich in CHCl₃ (Abb. 4.69).

**Abbildung 4.69:** Mischung von NAD⁺ und einem OH-terminierten PMeOx in 4 mL CHCl₃, ≈ 5 mg NAD + 25 mg PMeOx.

Im Folgenden wurde der molare PMeOx-Überschuss bei der Reaktion schrittweise verringert, von dem oben verwendeten zehn Äquivalenten (bezogen auf das Coenzym) bis hin zu einem äquimolaren Verhältnis zwischen Coenzym und Polymer. Wie Abb. 4.70 anhand von vier Beispielen zeigt, sind alle erhaltenen Produkte CHCl₃-löslich.

Wie zu erwarten war, verringerte sich die Ausbeute des NAD⁺-Konjugates (Tab. 4.15, bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie) mit abnehmendem Polymerverhältnis. Dies ist darauf zurückzuführen, dass mit abnehmendem Polymerverhältnis auch das Verhält-

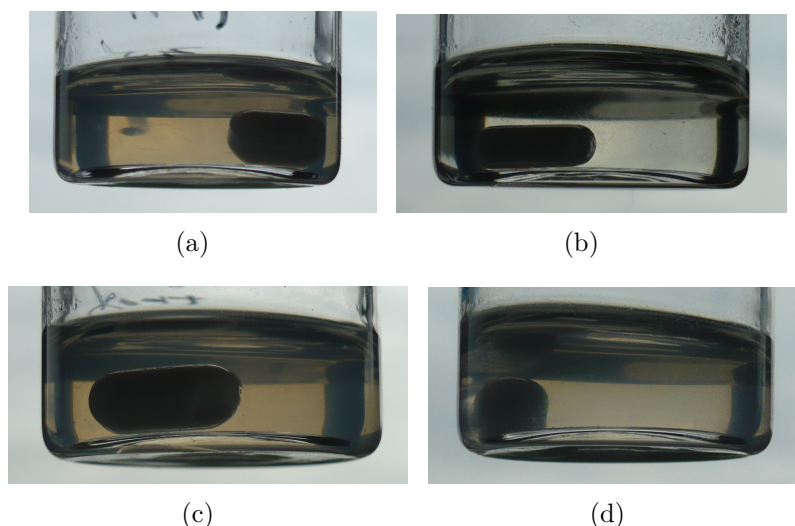


Abbildung 4.70: Bilder von $\text{PMeOx}_{38}\text{-NAD}^+$ -Konjugaten in CHCl_3 ; hergestellt mit versch. $\text{PMeOx}_{38}\text{:NAD}^+$ Verhältnissen: (a) 1:1, (b) 1,5:1, (c) 2,5:1, (d) 5:1.

nis zwischen CHCl_3 und dem verwendeten Puffer abnimmt. Dadurch wird ein immer größerer Anteil des PMeOx durch das Wasser des Puffers terminiert und steht somit nicht für die NAD^+ Modifikation zur Verfügung. Das nicht polymergebundene NAD^+ wurde im Anschluss durch die Dialyse entfernt.

Tabelle 4.15: Ausbeuten an NAD^+ -Konjugat bezogen auf die eingesetzte NAD^+ Menge in Abhängigkeit der eingesetzten PMeOx Äquivalente nach Dialyse und Lyophilisation im Konjugat, bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie.

Verhältnis PMeOx:NAD^+	Ausbeute [%]	Lösungsmittelverhältnis $\text{CHCl}_3\text{:Puffer}$
1:1	7,96	3,1:1
1,5:1	21,30	4,6:1
2,5:1	32,36	7,7:1
5:1	57,70	15,3:1

Neben PMeOx_{38} wurde zur Modifikation des NAD^+ auch PEtOx_{35} sowie hydrophobe PHeptOx Homo-, sowie zwei Diblockcopolymere, bestehend aus PHeptOx und PMeOx ($\text{PHeptOx}_{37}\text{-}b\text{-PMeOx}_3$, $\text{S-PHeptOx}_{38}\text{-}b\text{-PMeOx}_{12}$) eingesetzt. Das $\text{PEtOx}_{35}\text{-NAD}^+$ -Konjugat ist vollständig CHCl_3 löslich. Wie die Abb. 4.71 zeigt, wird im Fall des reinen PHeptOx_{30} -Konjugates keine vollständig klare Lösung erhalten, was vermutlich auf eine niedrigere Modifizierungsrate zurückzuführen ist, da das nicht modifizierte NAD^+

bei den nicht wasserlöslichen POX nicht mittels Dialyse abgetrennt werden konnte. Das S-PHeptOx₃₈-*b*-PMeOx₁₂-NAD⁺-Konjugat ist unlöslich, nur das S-PHeptOx₃₇-*b*-PMeOx₃-NAD⁺-Konjugat ist löslich.

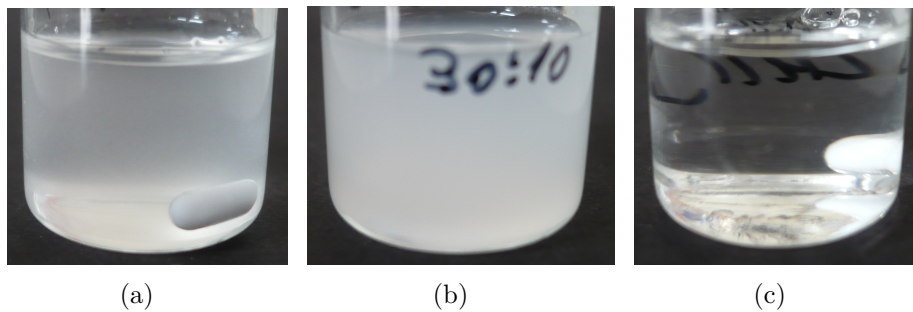


Abbildung 4.71: Bilder von versch. POX-NAD⁺-Konjugaten in CHCl₃: (a) PHeptOx₃₀-NAD⁺-Konjugat, (b) S-PHeptOx₃₈-*b*-PMeOx₁₂-NAD⁺-Konjugat, (c) S-PHeptOx₃₇-*b*-PMeOx₃-NAD⁺-Konjugat.

Die erhaltenen Produkte wurden mittels ¹H-NMR Spektroskopie charakterisiert und mit dem Spektrum des reinen NAD⁺, verglichen (Abb. 4.72).

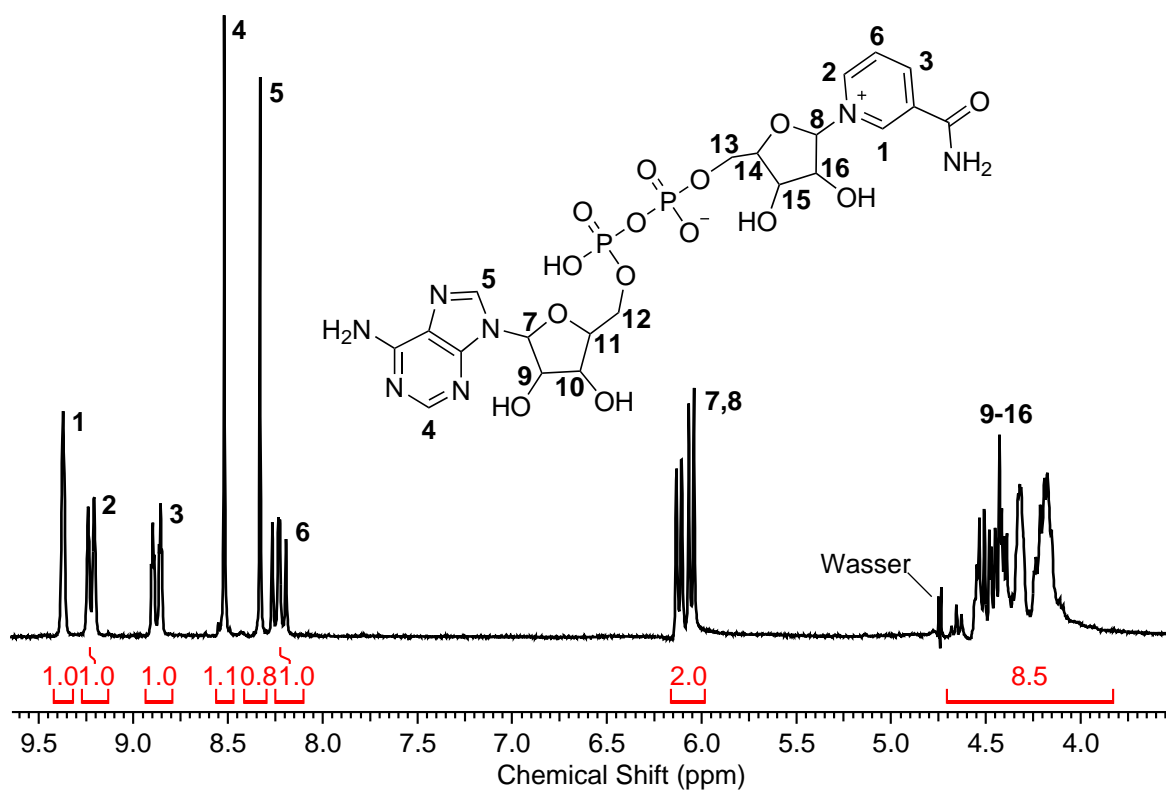


Abbildung 4.72: ¹H-NMR Spektrum von NAD⁺, gemessen in D₂O bei 200 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Im Spektrum des NAD^+ sind die Aromatensignale (Pos. 1 - 6) sowie die Signale an Pos. 7 und 8 eindeutig zuzuordnen und die erhaltenen Integrale der Signale entsprechen im Rahmen der Messgenauigkeit den erwarteten Werten. Die übrigen Signale sind auf Grund der Überlagerung der Signale nicht zugeordnet (Pos. 9 - 16). Das in Abb. 4.73 beispielhaft dargestellte $^1\text{H-NMR}$ Spektrum eines $\text{PMeOx}_{38}\text{-NAD}^+$ -Konjugates, hergestellt mittels eines $\text{POX}:\text{Coenzymverhältnisses}$ von 5:1, zeigt neben den beiden charakteristischen PMeOx Signalen (Pos. 17 - 21) und den Initiatorsignalen (Pos. 20 - 23), auch NAD^+ Signale (Pos. 1 - 16, 9 - 16).

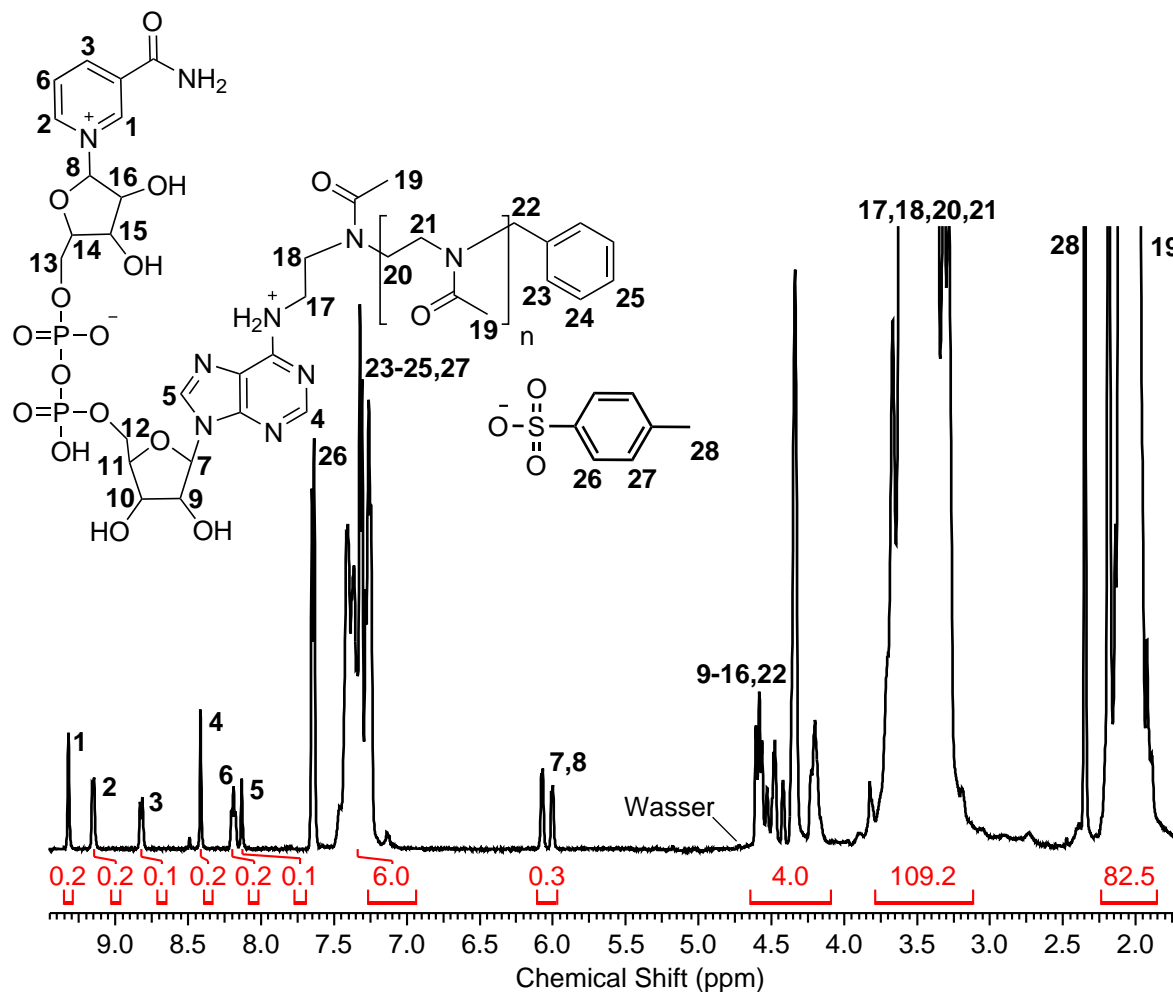


Abbildung 4.73: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum eines $\text{PMeOx}_{38}\text{-NAD}^+$ -Konjugates, hergestellt mit einem Polymer zu NAD^+ Verhältnis von 5:1, nach Dialyse, aufgenommen in D_2O bei 500 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Referenziert wurde auf das Aromatensignal des Initiators bei 7,50 - 7,15 ppm (Pos. 23 - 25, 5H), da das Signal der Methylengruppe des Initiators (Pos. 22, 2H) von den NAD^+

Signalen überlagert wird. Unter dem Aromatensignal des Benzylrestes liegt bei Messungen in D_2O allerdings auch ein Aromatensignal des Initiatorgegenions (Pos. 27), wodurch dieses nicht auf fünf gesetzt werden kann. Durch die Dialyse wird das Gegenion teilweise ausgetauscht, so dass das Integral kleiner ist als die zu erwartenden zwei Protonen, daher kann auch nicht von einer Fläche von sieben ausgegangen werden. Die Gesamtfläche der Signale (Pos. 23 - 25 + 27) wurde deshalb durch einen Vergleich mit dem Integral des zweiten Aromatensignals des Gegenions bei 7,70 - 7,60 ppm (Pos. 26) errechnet. In diesem Spektrum ergab sich so für die Signale Pos. 23 - 25 und 27 eine Fläche von sechs Protonen und für das Signal an Pos. 26 eine Fläche von einem Proton. Die Signale des Pyridinrestes des NAD^+ (Pos. 1 - 3, 6) und auch die beiden Signale an Pos. 7 und 8 weisen im Rahmen der Mess- und Auswertungsgenauigkeit keine Veränderung der chemischen Verschiebung im Vergleich mit dem reinen NAD^+ auf. Eine Veränderung tritt bei den beiden Signalen der Protonen des Adeninrestes (Pos. 4, 5) auf. Die beiden Singulets der Protonen an Pos. 4 und 5 des Adeninrestes sind im Spektrum des mit P $MeOx$ umgesetzten NAD^+ nicht mehr vorhanden, dafür ist bei 8,49 - 8,43 ppm sowie bei 8,20 - 8,14 ppm ein neues Signal zu erkennen. Da es sich bei diesen Signalen ebenfalls um Singulets handelt, liegt die Vermutung nahe, dass die Signale an Pos. 4 und 5 durch die Bindung zwischen NAD^+ und P $MeOx$ ins Hochfeld verschoben werden. Dies ist ein Hinweis auf eine kovalente Bindung zwischen NAD^+ und P $MeOx$. Die Integrale dieser Signale stimmen außerdem im Rahmen der Messgenauigkeit mit den übrigen NAD^+ Signalen überein. Allerdings ist es möglich, dass die Signale z.B. durch Wechselwirkungen zwischen Polymer und NAD^+ und nicht durch eine kovalente Bindung verschoben werden. Die 1H -NMR Analytik gibt daher nur einen Hinweis auf eine kovalente Bindung zwischen NAD^+ und P $MeOx$. Das molare Verhältnis zwischen P $MeOx$ und NAD^+ liegt in diesem Beispiel bei etwa 5:1.

Die P $MeOx_{38}$ - sowie die P $EtOx_{35}$ - NAD^+ -Konjugate wurden des Weiteren mittels GPC untersucht. Die GPC Elugramme des in DMF gelösten Produktes zeigen nach der Dialyse gegen Wasser sowohl beim Einsatz von P $MeOx_{38}$, als auch bei Einsatz von P $EtOx_{35}$ im Vergleich zu dem Präkursorpolymer einen weiteren Peak im Fall des P $MeOx_{38}$ (Abb. 4.74 b) bzw. eine Schulter beim P $EtOx_{35}$ (Abb. 4.74 d). Dies deutet ebenfalls auf eine erfolgreiche Modifikation des NAD^+ mit dem jeweiligen POX hin.

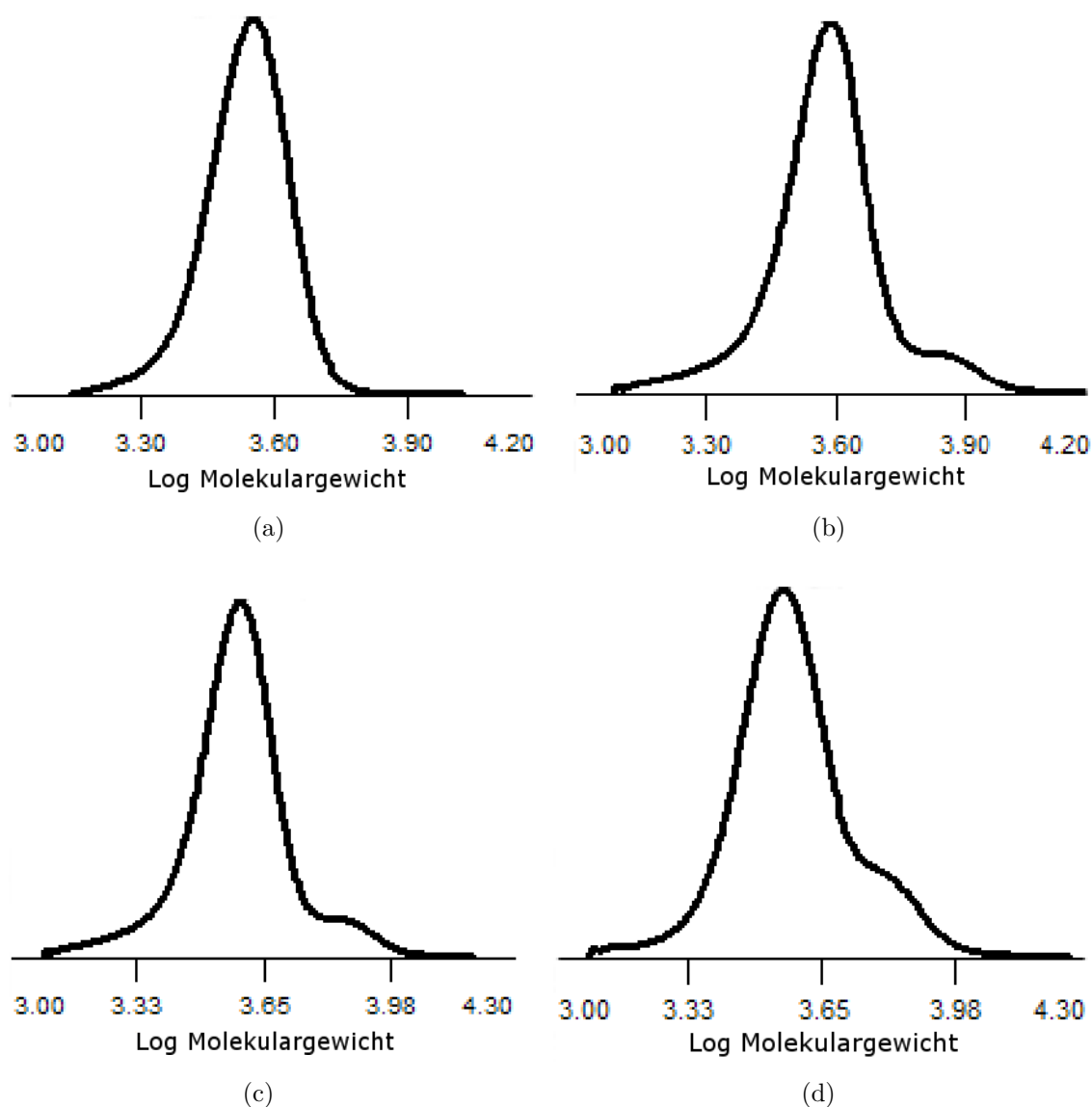


Abbildung 4.74: Vergleich der Molekulargewichtsverteilungen von: (a) P_{MeOx}₃₈ Präkursor, (b) dialysiertes P_{MeOx}₃₈-NAD⁺-Konjugat, (c) P_{EtOx}₃₅ Präkursor, (d) dialysiertes P_{EtOx}₃₅-NAD⁺-Konjugat, jeweils hergestellt mit einem POX:NAD⁺ Verhältnis von 7,5:1; Messung mittels GPC, 60 °C in DMF mit 20 mM LiBr; nach DOERT²⁰⁸.

4.3.1.1 Aktivität der Polymer-Coenzymkonjugate

Die Aktivität des reinen NAD⁺ bzw. die biologische Restaktivität der wasserlöslichen POX-NAD⁺-Konjugate im wässrigen Medium wurde photometrisch mittels ADH aus *S. cerevisiae* ermittelt (vgl. Kap. 4.2.6.2.3). Da das molare Verhältnis zwischen NAD⁺ und Polymer im Konjugat nur mittels ¹H-NMR Spektroskopie bestimmt werden kann-

te, und daher eine gewisse Unsicherheit hinsichtlich des genauen Coenzymanteils vorlag, wurde zuerst die Abhängigkeit der ADH-Aktivität von der Coenzymkonzentration untersucht, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Hierzu wurde für das reine NAD^+ bei konstanter ADH-Konzentration die Coenzymkonzentration variiert. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivität der ADH mit zunehmender Coenzymkonzentration steigt, ein Maximum bei ca. $0,013 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}$ durchläuft und mit weiter steigender Konzentration wieder abfällt (Abb. 4.75). Es ist bekannt dass hohe Coenzymkonzentrationen zu einer Enzyminhibierung führen können²³⁷, dies ist auch für die ADH aus *S. cerevisiae* bereits beschrieben worden²³⁸.

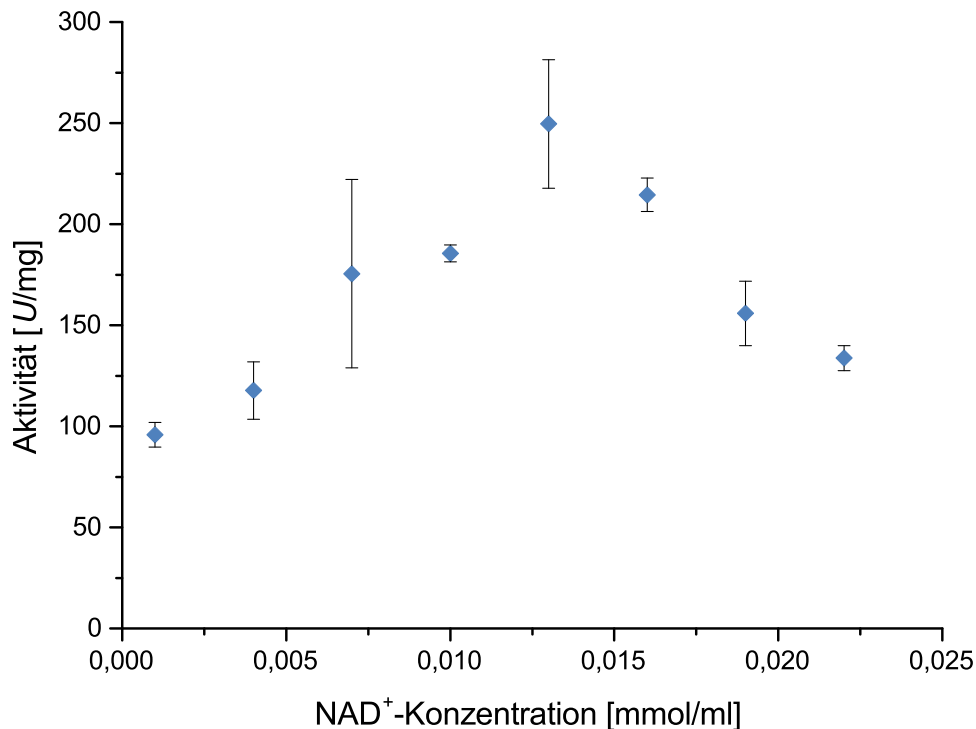


Abbildung 4.75: Abhängigkeit der Alkoholdehydrogenaseaktivität von der NAD^+ -Konzentration.

Bei den PMeOx- bzw. PEtOx- NAD^+ -Konjugaten wurden ähnliche Aktivitätsverläufe wie für das reine NAD^+ beobachtet. Auch hier wird mit steigender Konzentration ein Maximum durchlaufen, allerdings werden die Maxima erst bei höheren Coenzymkonzentrationen erreicht (Abb. 4.76). Dies deutet darauf hin, dass der NAD^+ Gehalt der Konjugate geringer ist, als der über die molaren Verhältnisse zwischen Polymer und Coenzym berechnete.

Werden die gemessenen maximalen Enzymaktivitäten, welche mit den Coenzymkonjugaten gemessen wurden, mit denen des reinen NAD^+ verglichen, so zeigt sich, dass bei dem mit einem POX zu Coenzymverhältnis von 5:1 hergestellten PMeOx₃₈- NAD^+ -

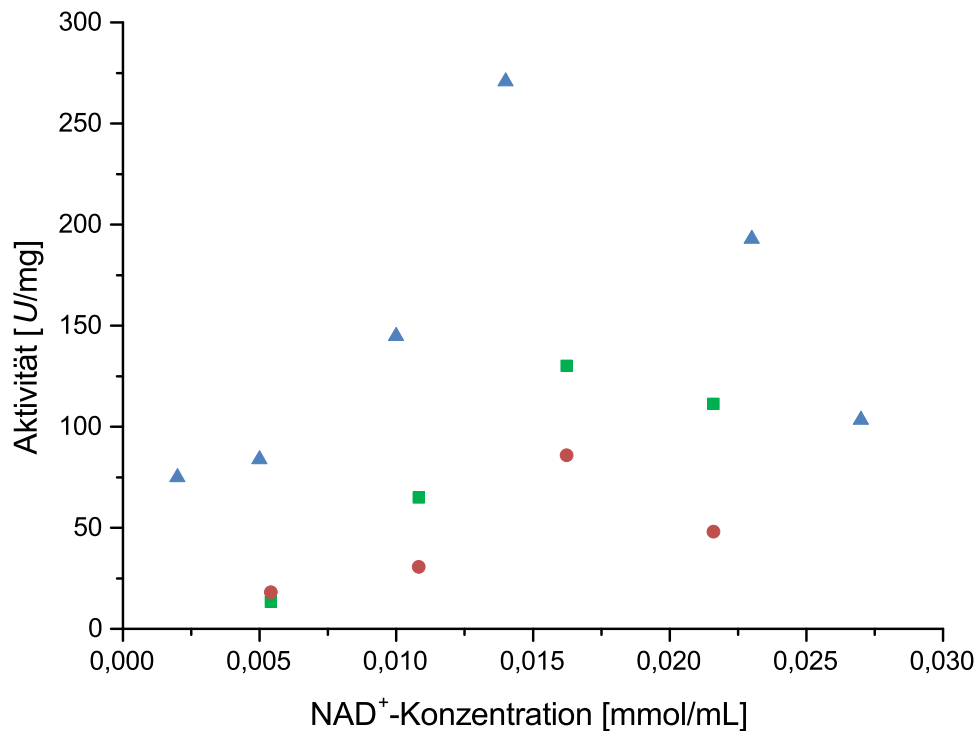


Abbildung 4.76: Abhängigkeit der Alkoholdehydrogenaseaktivität von der NAD⁺-Konjugatkonzentration: blau (▲) PMeOx₃₈-NAD⁺-Konjugat, POX zu Coenzymverhältnis von 5:1; rot (●) PMeOx₃₈-NAD⁺-Konjugat, POX zu Coenzymverhältnis von 10:1; grün (■) PEtOx₃₅-NAD⁺-Konjugat, POX zu Coenzymverhältnis von 5:1.

Konjugat innerhalb des Messfehlers eine ähnliche Aktivität wie beim reinen NAD⁺ vorliegt. Beim Einsatz des PMeOx₃₈-NAD⁺-Konjugates, das mit einem POX zu Coenzymverhältnis von 10:1 hergestellt wurde, liegt die enzymatische Aktivität der ADH bei nur noch 34 % des Ursprungswertes, beim Einsatz des PEtOx₃₅-NAD⁺-Konjugates, welches mit einem POX zu Coenzymverhältnis von 5:1 hergestellt wurde, liegt die Aktivität der ADH bei etwa 52 % der ursprünglichen Aktivität. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich PMeOx besser für die Konjugation eignet als PEtOx und dass ein großes POX zu Coenzymverhältnis die Aktivität verringert. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass das nicht abreagierte Polymer nicht abgetrennt werden konnte und auf Grund der hohen Konzentration die enzymatische Reaktion behindert. Um dies zu untersuchen, wurden zu einer Reaktionslösung mit nativen NAD⁺ 100 mg eines OH-terminiertes PMeOx gegeben, was die Aktivität der ADH um 85 % verringerte. Auf Grund der Ergebnisse im Wässrigen wurde die Aktivität der Coenzymkonjugate auch im org. Medium untersucht. Hierzu wurden Vorversuche mit reinem NAD⁺ durchgeführt. Als Reaktion wurde die Oxidation von 2-Oktanol bzw. Reduktion von

2-Oktanon in *n*-Heptan sowie CHCl_3 durch eine ADH aus *S. cerevisiae* untersucht (vgl. Kap. 4.2.6.2.3, Abb. 4.66). Hierbei wurde Aceton bzw. 2-Propanol zur Regeneration des Coenzym eingesetzt (Tab. 4.16).

Tabelle 4.16: ADH-Aktivität für die Oxidation von 2-Oktanol bzw. die Reduktion von 2-Oktanon in *n*-Heptan sowie CHCl_3 .

Edukt	Lösungsmittel	Aktivität $\frac{\text{U}}{\text{g}}$
2-Oktanol	<i>n</i> -Heptan	0,21
2-Oktanon	<i>n</i> -Heptan	0,48
2-Oktanol	CHCl_3	0,015
2-Oktanon	CHCl_3	-

Wie die Messergebnisse zeigen, ist das System prinzipiell geeignet, da in *n*-Heptan sowohl bei der Oxidation von 2-Oktanol, als auch bei der Reduktion von 2-Oktanon enzymatische Aktivität nachweisbar ist, wobei diese bei der Reduktion um etwa den Faktor 2,3 höher ist. Da die Coenzymkonjugate unlöslich in *n*-Heptan sind, wurde ebenfalls die Aktivität in CHCl_3 untersucht. Hierbei ist bei der Reduktion von 2-Oktanon in CHCl_3 keine Aktivität nachweisbar. Bei der Oxidation von 2-Oktanol ist die Aktivität um den Faktor 14 geringer als in *n*-Heptan. Trotzdem wurde die Aktivität der POX- NAD^+ -Konjugate mittels der Oxidation von 2-Oktanol in CHCl_3 untersucht. Bei Einsatz des PMeOx_{38} - NAD^+ -Konjugates ist allerdings keine Aktivität messbar. Da die Aktivität in CHCl_3 , verglichen mit der in *n*-Heptan, bereits mit reinem NAD^+ niedrig ist, wurde die ADH in ein amphiphiles Polymerconetzwerk (APCN) einpolymerisiert, um so die Aktivität zu steigern und so auch eine Messung der ADH-Aktivität beim Einsatz des NAD^+ -Konjugates zu ermöglichen. Diese Netzwerke bestanden aus PEtOx ($M_n = 5000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, terminiert mit *N*-(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamid) und 2-Hydroxyethylacrylat (HEA) im Verhältnis 70:30 und wurden freundlicherweise von Frau Dipl.-Ing. Ina Schönfeld hergestellt. Hierbei wurde die ADH sowie das reine NAD^+ bzw. das PMeOx_{38} - NAD^+ -Konjugat in einem Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,8) gelöst, mit den übrigen Netzwerkbestandteilen gemischt, und mittels Photopolymerisation polymerisiert. Die Aktivität der ADH mit reinem NAD^+ liegt in CHCl_3 mit $0,0030 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ allerdings um den Faktor 5 niedriger als bei den vorherigen Messungen. Trotzdem zeigt die ADH beim Einsatz des PMeOx_{38} - NAD^+ -Konjugates eine Aktivität von $0,0016 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ was ca. 53 % der Aktivität des Enzyms mit reinem NAD^+ entspricht. Durch die Konjugation des Coenzym wurde also keine verbesserte Aktivität der ADH in CHCl_3 erreicht.

4.3.2 Bernsteinsäureanhydrid als Linker

Obwohl mittels direkter Terminierung organolösliche POX-Coenzymkonjugate erhalten wurden, wurde eine zweite zweistufige und damit aufwändigere Synthesestrategie mittels BSSA als Linker untersucht, welche bereits für Polyethylenimin literaturbekannt ist¹²³ (Abb. 4.77).

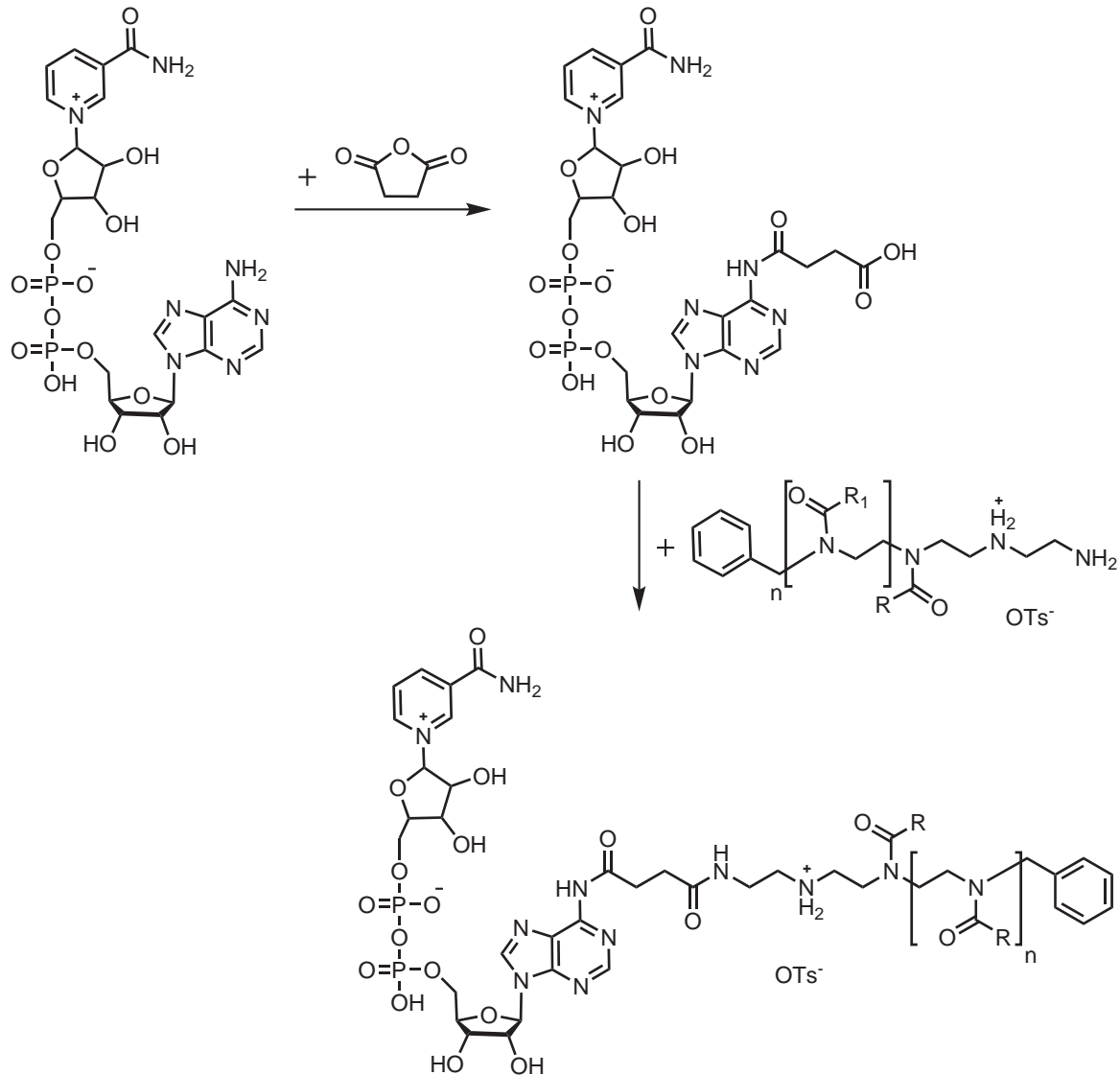


Abbildung 4.77: Darstellung der Synthese von POX-Coenzymkonjugaten mittels des Linkers BSSA am Beispiel von NAD⁺ und einem Poly(2-R-Oxazolin).

Diese Synthesestrategie bietet den Vorteil, dass das POX-Coenzymkonjugat sich besser mittels ¹H-NMR Spektroskopie charakterisieren lässt. Im ersten Schritt wurde das NAD⁺ mit einem großen molaren Überschuss BSSA umgesetzt. Nach der Abtrennung des BSSA Überschusses durch mehrmaliges Umfällen und anschließendes Tro-

cken wurde das erhaltene Produkt mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie charakterisiert (Abb. 4.78). Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigt neben den unveränderten NAD^+ Signalen (Pos. 1 - 3, 6, 8 und 9 - 16) neue Signale, welche dem Bernsteinsäure- NAD^+ -Derivat zuzuordnen sind. Durch die entstandene Amidbindung zwischen der Bernsteinsäure und dem NAD^+ verschieben sich drei Signale von Protonen des Adenosinsrestes (Pos. 4', 5', 7') weiter ins Tieffeld. Des Weiteren sind zwei neue Triplets bei 3,01 - 2,89 ppm (Pos. 17, 2H) und 2,83 - 2,69 ppm (Pos. 18, 2H) sichtbar, welche durch die Protonen der beiden Methylengruppen der gebundenen Bernsteinsäure hervorgerufen werden. Die Integralverhältnisse zeigen, dass das Produktgemisch zu etwa 50 % aus dem gewünschten Bernsteinsäure- NAD^+ -Derivat besteht, die andere Hälfte ist unfunktionaliertes NAD^+ . Damit liegt der Funktionalisierungsgrad 10 % über dem Literaturwert

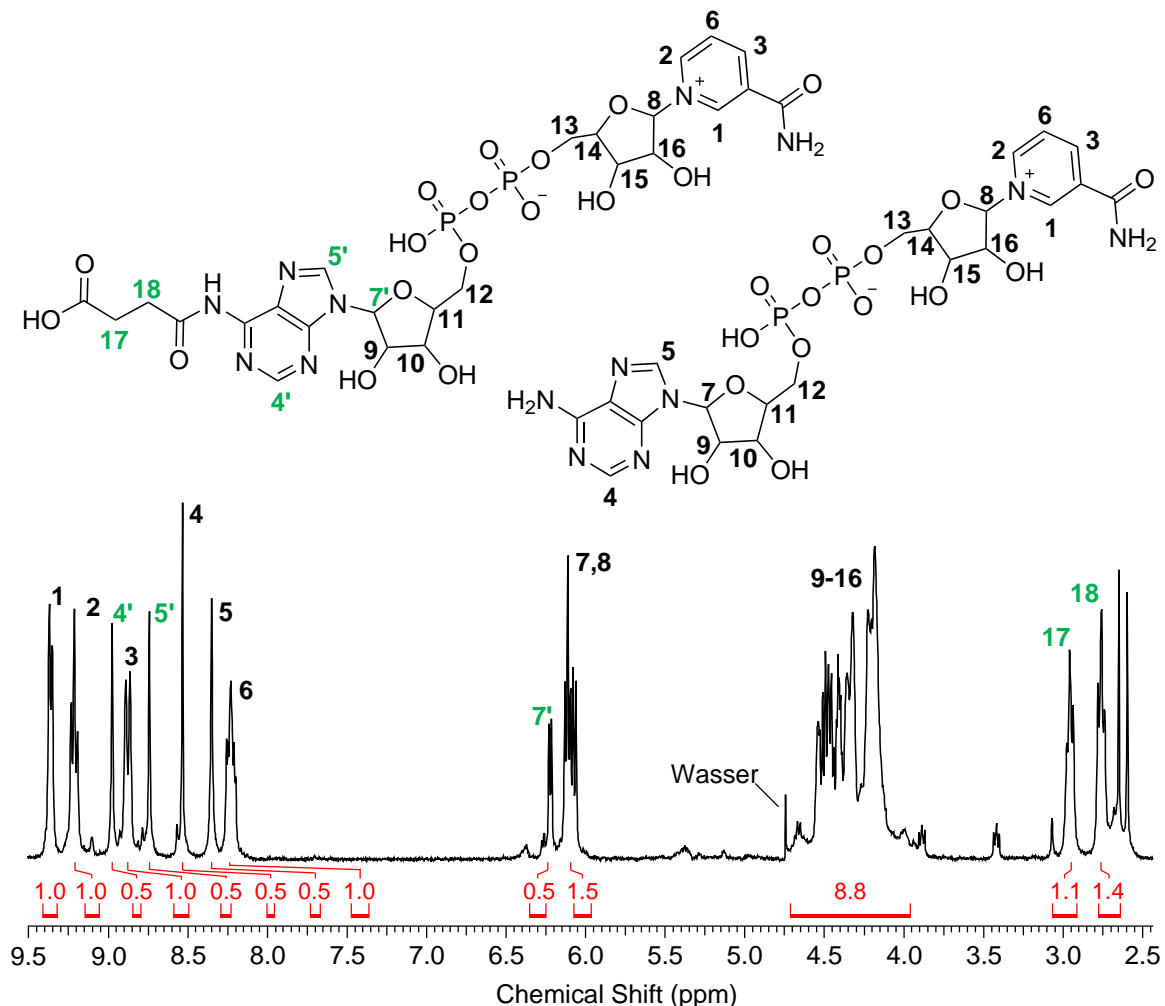


Abbildung 4.78: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von NAD^+ nach der Umsetzung mit BSSA, gemessen in D_2O ; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

von 40 %¹²³. Das unfunktionalierte NAD⁺ wurde aus dem Produktgemisch nicht abgetrennt, da es die nachfolgende Reaktion mit dem POX nicht beeinträchtigt. Es wurde ein PMeOx (PMeOx₄₅, analytische Daten s. Tab. 4.17) bestehend aus 45 Monomereinheiten für die Reaktion verwendet.

Tabelle 4.17: Analytische Daten des für die Modifikation von NAD⁺ mittels BSSA als Linker verwendeten POX.

Polymer	$M_{n,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	$M_{w,GPC}$ [$\frac{g}{mol}$]	DP _{GPC}	DP _{NMR} ^a	PDI	f_T [%] ^b
PMeOx ₄₅	4120	4910	47	45	1,19	100

^a Berechnet aus dem Integralverhältnis der charakteristischen Initiatorsignale sowie aus dem Mittelwert der POX Rückgrat bzw. Seitengruppensignale, bestimmt über ¹H-NMR Spektroskopie.

^b Terminierungsfunktionalisierung (f_T), bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie aus dem Integralverhältnis der charakteristischen Initiator- und Terminierungssignale.

Um nicht polymergebundenes Bernsteinsäure-NAD⁺-Derivat sowie das unfunktionalierte NAD⁺ abzutrennen, wurde die Probe nach der Reaktion mittels Dialyse (1 kDa MWCO) aufgereinigt. Das erhaltene Produkt wurde nach der Lyophilisation mittels ¹H-NMR Spektroskopie charakterisiert (Abb. 4.79).

Das ¹H-NMR Spektrum des Produktes zeigt neben den Polymersignalen bei 3,99 - 3,15 ppm (Pos. 6 - 8, 11) und 2,30 - 1,80 ppm (Pos. 5), sowie dem Initiatorsignal bei 7,45 - 7,17 ppm (Pos. 1 - 3, 5H) auch NAD⁺ Signale (Pos. 16 - 27, 29). Referenziert wurde hierbei auf die Aromatenprotonen der Benzylgruppe des Initiators. Das Signal der Protonen der Methylengruppe (Pos. 4, 2H) wird von NAD⁺ Signalen (Pos. 17 - 24) überlagert. Die Triplets der beiden Methylengruppenprotonen des Bernsteinsäurerests bei 2,91 - 2,81 bzw. 2,66 - 2,59 ppm (Pos. 12, 13) sind im Vergleich zum reinen Bernsteinsäure-NAD⁺-Derivat leicht verschoben, was auf eine Bindung zwischen dem Derivat und dem Polymer hindeutet. Des Weiteren zeigt sich ein neues Signal bei 3,13 - 3,03 ppm, welches den Protonen der beiden Methylengruppen an Pos. 9 und 10 zuzuordnen ist, und damit ebenfalls auf eine Polymerbindung hinweist. Werden die Integrale der Signale an Pos. 9, 10 und 11 zugrunde gelegt, so ergibt sich eine Funktionalisierung des PMeOx₄₅ mit dem Bernsteinsäure NAD⁺-Derivat von ca. 53 %. Allerdings konnten nicht alle im Tieffeld des Spektrums auftretenden Signale den Edukten bzw. dem gewünschten Produkt eindeutig zugeordnet werden. Dies lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass eventuell vorhandene π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Systemen im NAD⁺-Rest durch die Bindung an das Polymer verändert werden und daher eine Verschiebung der aromatischen Signale auftritt. Eine Bindung des Bernsteinsäure-NAD⁺-Derivates an das Polymer konnte deshalb nicht eindeutig nachgewiesen werden.

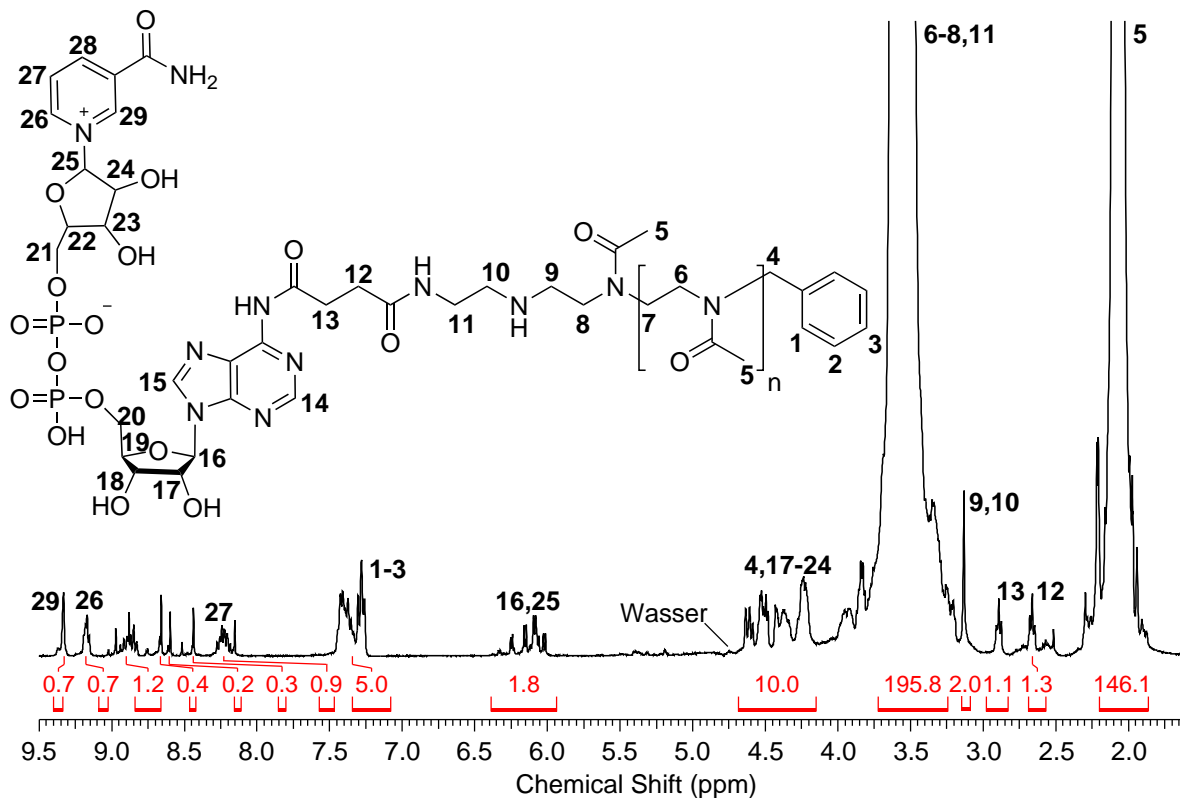


Abbildung 4.79: ^1H -NMR Spektrum von BSSA-NAD $^+$ nach der Umsetzung mit PMeOx $_{45}$, aufgenommen in D $_2$ O bei 400 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Ein Löslichkeitstest in CHCl $_3$ zeigte, dass das Produkt löslich ist (Abb. 4.80). Dies deutet ebenfalls auf eine Bindung zwischen dem Bernsteinsäure-NAD $^+$ -Derivat und dem Polymer hin, da eine Mischung aus OH-terminiertem PMeOx und reinem NAD $^+$ nicht zu einer Löslichkeit in CHCl $_3$ führt (vgl. Abb. 4.69).



Abbildung 4.80: 10,5 mg des mit PMeOx $_{45}$ umgesetzten Bernsteinsäure-NAD $^+$ -Derivates in 1 mL CHCl $_3$.

4.3.2.1 Aktivität der Polymer-Coenzymkonjugate

Die biologische Restaktivität des PMeOx_{45} -BSSA- NAD^+ -Derivates wurde im Wässrigen, wie bereits in Kap. 4.2.6.2.3 beschrieben, photometrisch vermessen und mit der des reinen NAD^+ verglichen. Wegen der geringen synthetisierten Menge wurde im Assay eine Konzentration von $0,00053 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}$ des PMeOx_{45} -BSSA NAD^+ -Derivates bzw. des reinen NAD^+ verwendet. Die Aktivität der ADH liegt unter Verwendung von reinem NAD^+ bei $15,96 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$, wird das PMeOx_{45} -BSSA NAD^+ -Derivat eingesetzt beträgt die Aktivität $13,55 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$, dies entspricht einer Restaktivität von 84,9 %.

4.3.3 Zusammenfassung

Durch direkte Terminierung in einer Emulsion aus CHCl_3 und Puffer ist es mittels versch. POX gelungen organolösliche Coenzymkonjugate zu synthetisieren. Diese Konjugate sind löslich in DMF, CHCl_3 , Dichlormethan und Acetonitril. Indiziennachweise sprechen für eine kovalente Bindung zwischen POX und Coenzym. Aktivitätsmessungen der Konjugate mittels ADH im Wässrigen zeigen, dass bei dem Coenzymkonjugat, welches mit einem PMeOx zu Coenzymverhältnis von 5:1 hergestellt wurde, eine Aktivität ähnlich der des reinen NAD^+ erhalten wurde. Der Einsatz eines höheren PMeOx zu Coenzymverhältnisses bei der Konjugation verringert, genauso wie die Verwendung von PEtOx_{35} , die enzymatische Aktivität. In CHCl_3 ist bei der Oxidation von 2-Oktanol im Gegensatz zum reinen NAD^+ keine Aktivität der ADH unter Einsatz des PMeOx_{38} -Coenzymkonjugates (PMeOx zu Coenzymverhältnis 5:1) nachweisbar. Einpolymerisiert in ein APCN, ist eine Aktivität von 53 % verglichen mit reinem NAD^+ nachweisbar. Die angestrebte Verbesserung der ADH Aktivität im Organischen wurde nicht erreicht.

Bei der zweistufigen Synthese mittels Bernsteinsäureanhydrid als Linker wurde beim ersten Syntheseschritt ein höherer Funktionalisierungsgrad als der in der Literatur angegebene erzielt. Die Bindung des BSSA- NAD^+ -Derivates an das PMeOx_{45} konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Das resultierende Produkt ist vollständig löslich in CHCl_3 , was auf eine Bindung zwischen POX und NAD^+ hinweist. Unter Einsatz des PMeOx_{45} -BSSA- NAD^+ -Derivates wurde im Wässrigen eine ADH Aktivität gemessen, die 84,9 % der Aktivität entspricht, welche mit reinem NAD^+ gemessen wurde.

4.4 Polymer-Enzymkonjugate für die asymmetrische Katalyse

Große Teile der Ergebnisse dieses Abschnittes wurden in Zusammenarbeit mit Melanie Leurs im Rahmen ihres Forschungspraktikums²³⁹, sowie ihrer Diplomarbeit²⁴⁰, sowie mit Martin Körner²⁴¹ im Rahmen seines Wahlpflichtpraktikums erarbeitet.

Wie bereits in Kap. 1.3.1 erläutert, wäre es von Vorteil wenn sich künstliche Metalloenzyme auch in organischen Medien einsetzen ließen. Daher war das Ziel dieses Kapitels die organolöslichen PEKs, deren Synthese in Kap. 4.2 beschrieben wurde, für eine asymmetrische Katalyse einzusetzen. Hierzu wurden die PEKs eingesetzt, welche mittels PADA als bifunktionellem Linker (Kap. 4.2.4) synthetisiert wurden. Ein chiraler Metallkomplex wird erzeugt, indem in die PEKs eine katalytisch aktive Metallverbindung eingelagert wird.

Als Reaktion wurde die asymmetrische Dihydroxylierung nach SHARPLESS gewählt, da röntgenkristallographische Untersuchungen gezeigt haben, dass der Ligand eine enzymähnliche Bindungstasche ausbildet, wodurch die stereochemische Information übertragen wird (Abb. 4.81)²⁴².

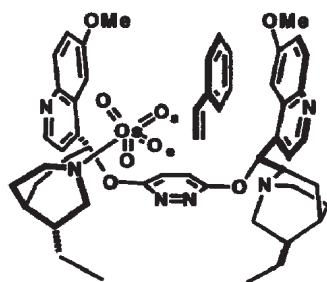


Abbildung 4.81: Schematische Darstellung der Bindung des OsO₄ Katalysators sowie eines Eduktes (Styrol) an einen chiralen Liganden²⁴².

Daher liegt es nahe, Enzyme oder in diesem Fall organolösliche PEKs für die asymmetrische Dihydroxylierung einzusetzen. Zudem toleriert die Reaktion nicht nur Wasser, sondern dieses ist auch für die Reaktion notwendig^{135,243} (vgl. Abb. 4.84). Die Wassertoleranz ist notwendig, da die Konjugate auch nach der Lyophilisierung nicht vollständig wasserfrei sind. Mit Hilfe der SHARPLESS-Dihydroxylierung wurden außerdem im Wässrigen mit BSA und Steptavidin als Ligand bereits erfolgreich enantioselektive Dihydroxylierungen durchgeführt^{142,244}.

4.4.1 SHARPLESS-Dihydroxylierung von Alkenen

Die Dihydroxylierung nach SHARPLESS (Abb. 4.82) ist eine sehr effiziente katalytische Methode zur Synthese von vicinalen *cis*-Diolen durch Oxidation von Olefinen.

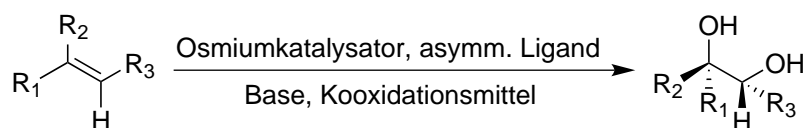


Abbildung 4.82: Allgemeine Reaktionsgleichung der SHARPLESS-Dihydroxylierung.

Als Katalysator wird OsO_4 in einem prozentualen Anteil von 0,2 mol-%¹³⁵ verwendet, als Kooxidationsmittel, welches zur Regeneration des Katalysators eingesetzt wird, eignen sich z.B. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ²⁴⁵ oder *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid²⁴⁶ (NMO). Zusätzlich wird eine Base benötigt, meist wird hierzu K_2CO_3 eingesetzt. Durch den Einsatz eines chiralen Liganden (ca. 1 mol-%²⁴⁵) wird die Enantioselektivität der Reaktion gesteuert, außerdem wird zusätzlich eine Ligandenbeschleunigung²⁴³ erreicht. Als Lösungsmittelsystem wird eine Mischung aus *tert*-Butanol und Wasser (1:1) verwendet¹³⁵. Durch die Synthese versch. Liganden, welche fast ausschließlich auf Chinidin oder Chinin basieren²⁴⁴, ist es möglich verschiedene Olefine in die jeweiligen Dialkohole mit hoher Enantioselektivität zu überführen^{245,247}. Häufig verwendete Liganden sind $(\text{DHQD})_2\text{PHAL}$ und $(\text{DHQ})_2\text{PHAL}$ (Abb. 4.83). Diese sind Bestandteile der kommerziell erhältlichen Reaktionsmischungen (AD-Mix), in der sämtliche benötigten Chemikalien enthalten sind.¹³⁵

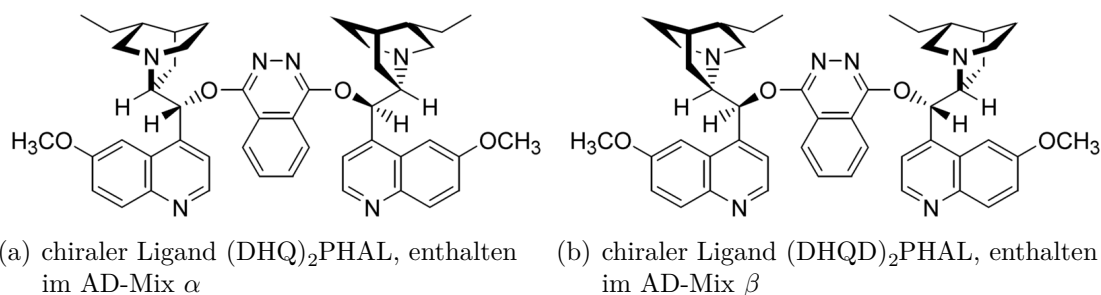


Abbildung 4.83: Schematische Darstellung der Liganden im AD-Mix α und AD-Mix β nach SHARPLESS *et al.*²⁴⁵.

Der Reaktionsmechanismus verläuft nach der Anlagerung des Alkens an den Osmium-(VIII)-oxid Ligandkomplex über eine Cycloaddition. Hierbei entsteht ein fünfgliedriges Intermediat, welches im Anschluss hydrolysiert wird, und so das entsprechende Diol freisetzt. Das Osmiumtetroxid wird während der Reaktion über ein freies Elektronenpaar im sp^3 -Orbital des Stickstoffs des Liganden gebunden. Das ebenfalls entstehende reduzierte Osmat wird durch das überstöchiometrisch zugesetzte Kooxidationsmittel wieder reoxidiert. In dem in der Regel eingesetzten Zweiphasensystem findet die Bil-

dung des cyclischen Intermediats in der organischen Phase statt, die Reoxidation des Osmats dagegen in der wässrigen Phase (Abb. 4.84).¹³⁵

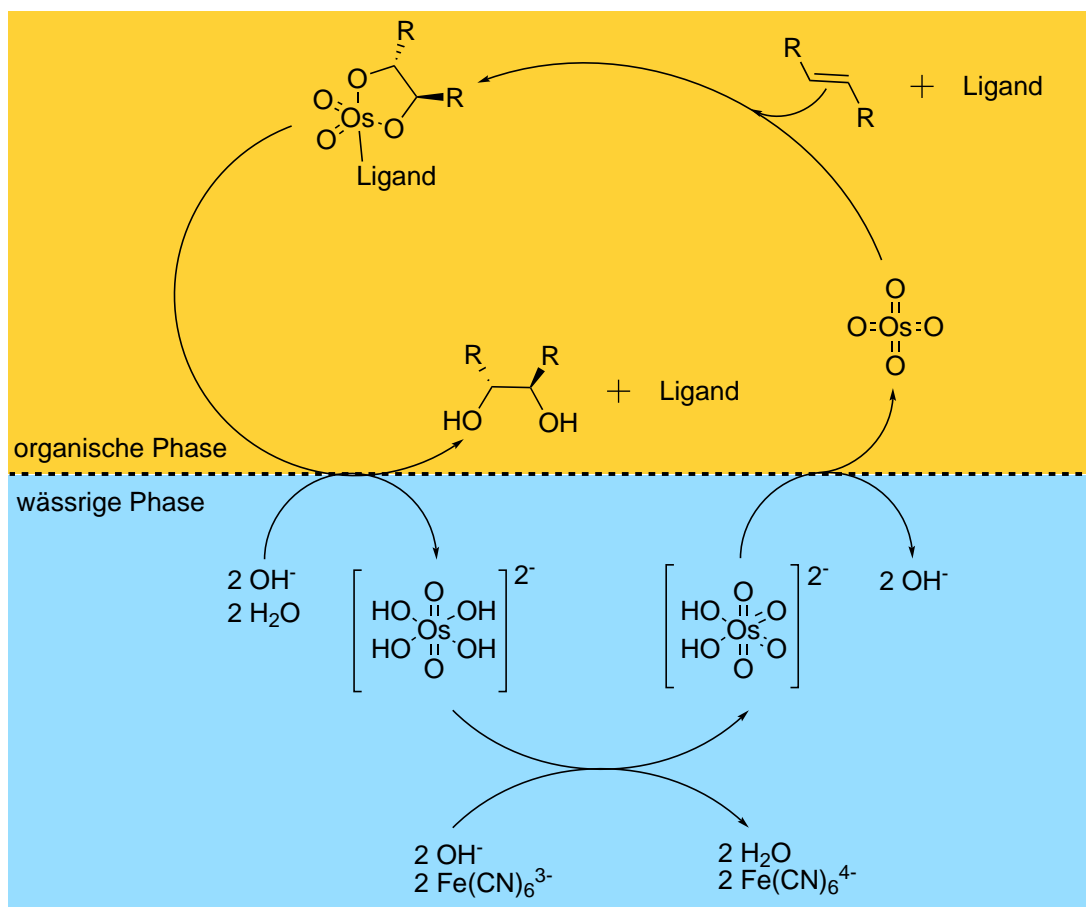


Abbildung 4.84: Mechanismus der asymmetrischen SHARPLESS-Dihydroxylierung in einem Zweiphasensystem mit K₃Fe(CN)₆ als Kooxidationsmittel nach KOLB *et al.*¹³⁵.

Die Dihydroxylierung mit POX-Enzymkonjugaten als Liganden im Standard Lösungsmittelsystem *tert*-Butanol-Wasser durchzuführen, war nicht möglich, da die synthetisierten PEKs zwar in versch. org. Medien löslich waren, allerdings nicht in *tert*-Butanol. Da nahezu alle synthetisierten PEKs chloroformlöslich sind (vgl. Tab. 4.10, Kap. 4.2.4.2) bot es sich an, dieses als Lösungsmittel zu verwenden.

4.4.2 SHARPLESS-Dihydroxylierung von Alkenen mittels Pyridinligand

Um zu überprüfen, ob Chloroform-basierte Lösungsmittelsysteme generell für die Dihydroxylierung nach SHARPLESS geeignet sind, wurde Pyridin als nicht chiraler Ligand verwendet²⁴³. Als Alken wurde Styrol eingesetzt, welches bereits erfolgreich in vorherigen Arbeiten angewendet wurde^{135,245}. Hierbei entstehen zwei Enantiomere des

entsprechenden Dialkohols (Abb. 4.85). Als Kooxidationsmittel wurde $K_3Fe(CN)_6$ verwendet.

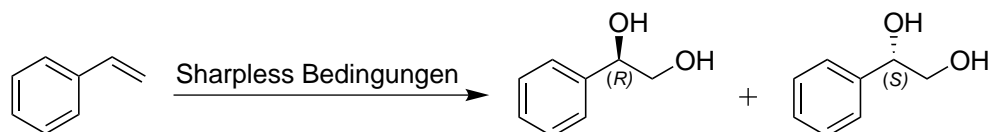


Abbildung 4.85: Reaktionsgleichung der SHARPLESS-Dihydroxylierung von Styrol zu *R*- und *S*-1-Phenylethan-1,2-diol.

Zuerst wurde ein Zweiphasensystem aus Chloroform und Wasser im Verhältnis 1:1 verwendet, als Kontrollsystem diente das Standardlösungsmittelsystem aus *tert*-Butanol-Wasser (1:1). Nach der Reaktion, welche 24 h bei RT durchgeführt wurde, konnte in beiden Fällen mittels 1H -NMR-Spektroskopie das Produkt 1-Phenylethan-1,2-diol nachgewiesen werden. Abb. 4.86 zeigt exemplarisch das 1H -NMR Spektrum der Reaktion in *tert*-Butanol-Wasser, es sind alle auftretenden Signale eindeutig zuzuordnen.

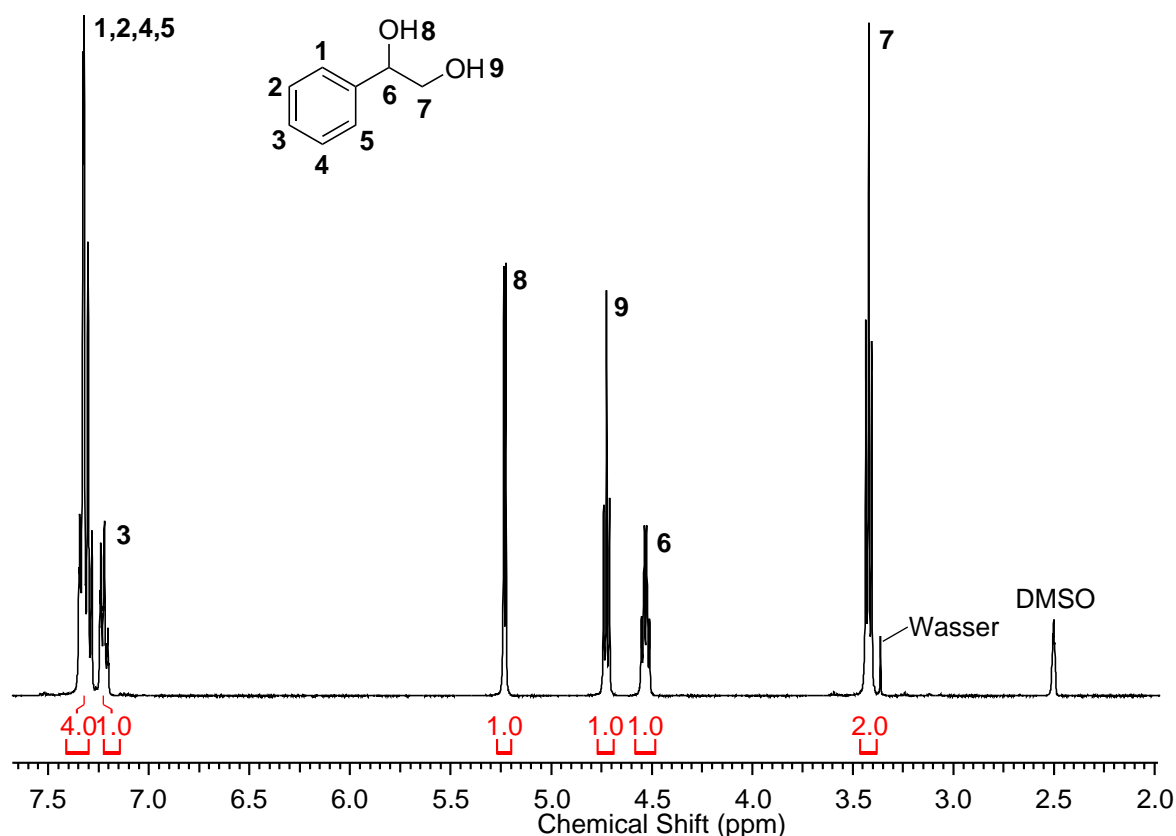


Abbildung 4.86: 1H -NMR Spektrum von 1-Phenylethan-1,2-diol, synthetisiert in *tert*-Butanol-Wasser (1:1) für 24 h bei RT, gemessen in $DMSO-d_6$ bei 400 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

Da durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie der Anteil der jeweiligen Enantiomere nicht bestimmt werden kann, wurden HPLC-Messungen unter Verwendung einer chiralen Säule durchgeführt. Diese HPLC-Messungen zeigen in beiden Fällen, wie beim Einsatz eines achiralen Liganden erwartet, ein racemisches Produktgemisch. Daraus lässt sich schließen, dass Chloroform-basierte Lösungsmittelsysteme für die SHARPLESS-Dihydroxylierung geeignet sind.

Ein Zweiphasensystem aus Chloroform und Wasser ist jedoch ungeeignet beim Einsatz von PEKs als Liganden, da die PEKs trotz der Modifikation immer noch wasserlöslich sind und sie sich daher hauptsächlich in der Wasserphase und nicht in der Chloroformphase befinden. Im Gegensatz dazu befindet sich das Styrol auf Grund der Unlöslichkeit in Wasser in der org. Phase. Eine solche Verteilung könnte zu einem Verlust einer eventuellen Enantioselektivität führen, da auch das freie Osmium(VIII)-oxid ohne Ligand katalytisch aktiv ist, wenn auch sehr viel langsamer auf Grund der fehlenden Ligandenbeschleunigung. Daher wurden auch Versuche in einer einphasigen Lösung (einphasig bezogen auf das Lösungsmittel) aus wassergesättigtem Chloroform anstelle einer zweiphasigen Mischung durchgeführt. Hierbei konnte jedoch, weder mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, noch mit der empfindlicheren HPLC eine Produktbildung nachgewiesen werden. Ein Grund dafür, dass in reinem Chloroform keine Produktbildung beobachtet werden konnte, ist wahrscheinlich die geringe Löslichkeit von Wasser in Chloroform (ca. 1500 ppm, bestimmt per KARL-FISCHER Titration), da für die Bildung des Diols pro Äquivalent Alken zwei Äquivalente H_2O benötigt werden. Des Weiteren liegt das als Kooxidans eingesetzte $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und das als Base verwendete K_2CO_3 in wassergesättigtem Chloroform zu einem sehr großen Anteil nicht gelöst, sondern als kristalliner Feststoff vor, was die Reoxidation des Osmiumkatalysators behindert (Abb. 4.87).

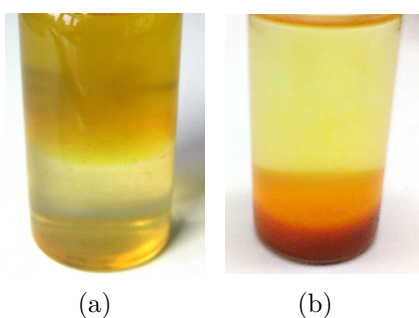


Abbildung 4.87: Vergleich der Reaktionsansätze der SHARPLESS-Dihydroxylierung von Styrol mit Pyridin als achiralem Liganden in den beiden verwendeten Chloroform-basierten Lösungsmittelsystemen: (a) Chloroform/Wasser (1:1), (b) Chloroform wassergesättigt²⁴⁰.

4.4.3 SHARPLESS-Dihydroxylierung von Alkenen mittels Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugaten als Liganden

Obwohl die SHARPLESS-Dihydroxylierung in wassergesättigtem CHCl_3 zunächst nicht erfolgreich war, wurde im Folgenden die Eignung von PEKs als Liganden für die Dihydroxylierung untersucht, und deren Einfluss auf die Enantioselektivität der Reaktion. Der prozentuale Enantiomerenüberschuss (*ee*, engl. *enantiomeric excess*) wurde, ausgehend von den mittels HPLC gemessenen prozentualen Anteilen der Enantiomere, mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$ee[\%] = |\text{Anteil Enantiomer 1} [\%] - \text{Anteil Enantiomer 2} [\%]| \quad (4.7)$$

Die katalytische Produktivität (*TON*, engl. *turnover number*) wurde mittels Gaschromatographie über eine Kalibrierung mit 1-Phenylethan-1,2-diol-Lösungen bekannter Konzentration bestimmt. Hierbei sind zwei versch. *TON* zu unterscheiden, welche wie folgt definiert sind:

$$TON_{\text{OS}} = \frac{n_{\text{Produkt}}}{n_{\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4}} \quad (4.8)$$

$$TON_{\text{Enzym}} = \frac{n_{\text{Produkt}}}{n_{\text{Enzym}}} \quad (4.9)$$

Hierbei bezieht sich n_{Enzym} auf die Enzymstoffmenge vor der Funktionalisierung.

In Tab. 4.18 aufgeführt sind die analytischen Daten der für die Konjugation der zur SHARPLESS-Dihydroxylierung eingesetzten Konjugate verwendeten POX.

Tabelle 4.18: Analytische Daten der aminterminierten für die Enzymmodifikation verwendeten POX.

Polymer	$M_{n,GPC}$ [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]	$M_{w,GPC}$ [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]	DP_{GPC}	DP_{NMR}^a	PDI	f_T [%] ^b
PMeOx ₃₈	4260	4950	38	48	1,16	95
S-PBuOx- <i>b</i> -PMeOx	8500	9400	70 ^c	50/12	1,11	96
PEtOx ₄₀	3380	4300	44	40	1,11	91

^a Berechnet aus dem Integralverhältnis der charakteristischen Initiatorsignale sowie aus dem Mittelwert der POX Rückgrat bzw. Seitengruppensignale, bestimmt über ¹H-NMR Spektroskopie.

^b Terminierungsfunktionalisierung (f_T), bestimmt mittels ¹H-NMR Spektroskopie aus dem Integralverhältnis der charakteristischen Initiator- und Terminierungssignale.

^c Berechnet aus dem Molekulargewicht M_n (GPC) unter Annahme der aus dem ¹H-NMR Spektrum bestimmten Blockverhältnisse.

4.4.3.1 Etablierung geeigneter Reaktionsbedingungen

Neben den Versuchen mit Pyridin als Ligand, wurden die Versuche zur SHARPLESS-Dihydroxylierung mit PEKs als Ligand, auf Grund der weiter oben bereits diskutierten Gründe in wassergesättigtem Chloroform durchgeführt. Die ersten Experimente wurden mit PMeOx_{38} - α -Chymotrypsinkonjugaten mit einer Konzentration von $0,027 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$ (entspricht 0,135 äq. PEK bezogen auf den Katalysator) bei RT durchgeführt. Im Gegensatz zur Reaktion mit Pyridin als Ligand konnte hier das gewünschte Produkt 1-Phenylethan-1,2-diol mittels HPLC-Untersuchungen nachgewiesen werden. Dass mittels PEK als Ligand eine Produktbildung erfolgte, kann auf die hydrophilen und hygroskopischen Eigenschaften²¹⁷ (vgl. Kap. 4.2.6) des verwendeten PMeOx und des Enzyms selbst zurückgeführt werden. Durch diese Eigenschaften wird vermutlich das im Chloroform enthaltene Wasser, und damit auch die darin gelösten Salze, um die Enzyme herum konzentriert, und stehen damit am Ort der Dihydroxylierungsreaktion zur Verfügung. Zudem enthalten die Konjugate auch nach der Lyophilisierung noch einen gewissen Anteil an Wasser, was den Wassergehalt des Reaktionsmediums weiter erhöht, ohne dass es jedoch zur Ausbildung einer zweiten Phase kommt (Abb. 4.88). Dies konnte exemplarisch anhand eines PMeOx -Collagenasekonjugates nachgewiesen werden. Bei der Zugabe von 12,41 mg des Konjugates zu 1 mL CHCl_3 steigt der Wassergehalt von 31 ppm auf 409 ppm (bestimmt mittels KARL-FISCHER Titration).

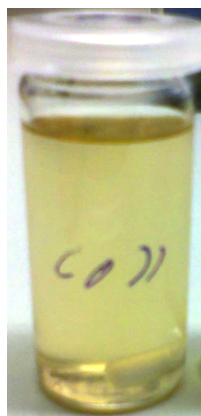


Abbildung 4.88: 14 mg PMeOx_{38} -Collagenasekonjugat in 10 mL CHCl_3 ; Einwaage bezogen auf das Enzym vor der Modifikation; Collagenase aus *Clostridium histolyticum*.²⁴⁰

Es zeigte sich außerdem ein sichtbarer Unterschied zwischen den Reaktionsmischungen mit Pyridin und denen mit PEKs als Liganden. Beim Einsatz der PEKs als Ligand bilden sich feine Dispersionen von $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und K_2CO_3 , welche sich, im Gegensatz zu den Reaktionsmischungen mit Pyridin, auch nach Beenden des Rührens nicht sofort

wieder entmischten (Abb. 4.89). Dadurch erhöht sich bei den Reaktionsmischungen mit den PEK Liganden die Zugänglichkeit des Kooxidationsmittels für den Katalysator.

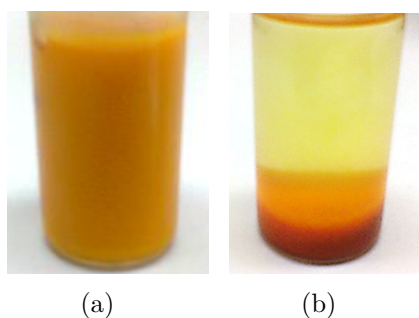


Abbildung 4.89: Vergleich der Reaktionsansätze der SHARPLESS-Dihydroxylierung von Styrol mit unterschiedlichen Liganden; (a) 7 mg P_{MeOx}₃₈- α -Chymotrypsinkonjugat, (b) Pyridin; Einwaage bezogen auf das Enzym vor der Modifikation.²⁴⁰

Es wurde zusätzlich untersucht, ob ein organolösliches Kooxidationsmittel wie *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) an Stelle des K₃Fe(CN)₆ die Reoxidation des Katalysators verbessert. NMO wurde bereits erfolgreich für die SHARPLESS-Dihydroxylierung eingesetzt²⁴⁶. Jedoch wurde beim Einsatz von NMO mit den P_{MeOx}₃₈- α -Chymotrypsinkonjugaten (0,027 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$, 0,135 äq. PEK bezogen auf den Katalysator) bei RT keine Produktbildung beobachtet.

Die HPLC Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem Produkt, welches bei der Reaktion mit den P_{MeOx}₃₈- α -Chymotrypsinkonjugat (0,027 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$, 0,135 äq. PEK bezogen auf den Katalysator, 1 d, RT) als Ligand und K₃Fe(CN)₆ als Kooxidationsmittel gebildet wurde, um ein racemisches (rac.) Produkt handelt. Die selektive Umsetzung am Osmium-Enzymkomplex würde auf Grund der Ligandenbeschleunigung viel schneller ablaufen, als die unspezifische Reaktion über das freie Osmium(VIII)-oxid. Da die ligandenbeschleunigte Reaktion eine niedrigere Aktivierungsenergie gegenüber der Reaktion über das freie Osmium(VIII)-oxid besitzt, würde dies dazu führen, dass letztere durch eine Absenkung der Reaktionstemperatur stärker verlangsamt wird. Daher wäre zu erwarten, dass die Enantioselektivität der Reaktion eine Temperaturabhängigkeit aufweist. Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu reduzieren und damit auch den selektiven Reaktionsmechanismus zu begünstigen, wurde die Reaktionstemperatur schrittweise bis auf 0 °C gesenkt. Gleichzeitig wurde die Reaktionszeit erhöht, um eine ausreichende Menge an Produkt zu erhalten. In Abb. 4.90 ist die Auftragung des *ee* gegen die Reaktionstemperatur dargestellt. Wie erwartet zeigt sich eine Temperaturabhängigkeit der Enantioselektivität der Reaktion, der *ee* steigt signifikant mit abnehmender Reaktionstemperatur bis zu einem Maximum von 19,4 % (*S*-Konfiguration) bei 0 °C.

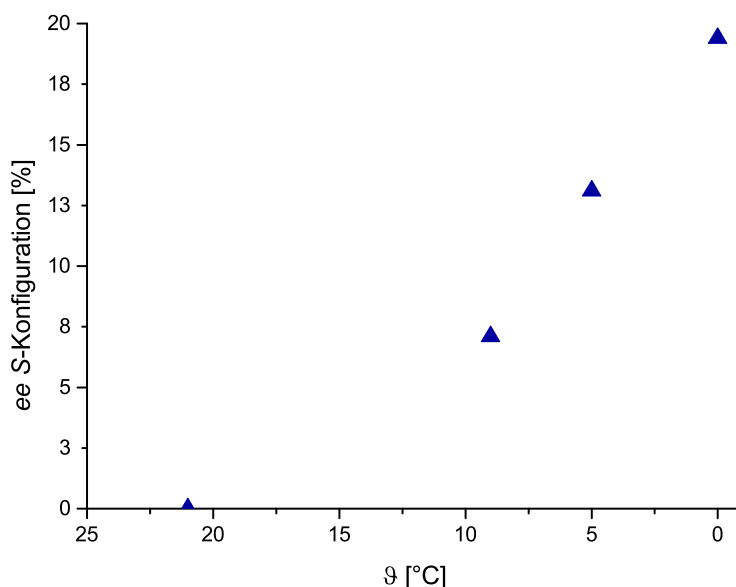


Abbildung 4.90: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses von der Reaktionstemperatur bei der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem CHCl_3 mittels PMeOx_{38} - α -Chymotrypsinkonjugat ($0,027 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$, 0,135 äq. PEK bezogen auf den Katalysator) als Ligand; Enzymkonzentration bezogen auf die Enzymeinwaage vor der Modifikation; nach LEURS²⁴⁰.

Ein Nachteil bei der Verringerung der Reaktionstemperatur ist die, auf Grund der niedrigeren Reaktionsgeschwindigkeit, starke Abnahme der *TON* (Tab. 4.19).

Tabelle 4.19: Temperaturabhängigkeit des *ee* und der *TON* der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem CHCl_3 mittels PMeOx_{38} - α -Chymotrypsinkonjugaten als Ligand, $c_{\text{Os}} = 0,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$.

$c_{\text{Enzym}} [\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}]^a$	ϑ [°C]	t [d]	TON_{Os}^b	TON_{Enzym}^c	<i>ee</i> [%]
0,027	RT	1	6,2	45,93	rac.
0,027	9	7	0,1	0,74	7,2 <i>S</i>
0,027	5	4	0,07	0,52	13,1 <i>S</i>
0,027	0	7	0,07	0,52	19,4 <i>S</i>
0,027 ^d	0	7	0,16	1,19	6,6 <i>S</i>

^a Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx_{38} , entspricht 0,135 äq. PEK bezogen auf den Katalysator.

^b Eine TON_{Os} von 1 entspricht einem Umsatz von 0,2 % ($2 \mu\text{mol}$) Styrol.

^c Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx_{38} , 1 TON_{Enzym} entspricht $0,27 \mu\text{mol}$.

^d Zusatz von $40 \mu\text{L}$ Wasser zum 10 mL Reaktionsansatz.

Die insgesamt niedrigen TON_{Os} lassen vermuten, dass nur ein kleiner Teil des Osmium-(VIII)-oxids katalytisch aktiv ist. Daher wurden einer Reaktionsmischung (10 mL) gezielt 40 μL Wasser zugesetzt, um durch Erhöhung des Wassergehalts die Dihydroxylierung selbst sowie die Reoxidation des Katalysators zu verbessern und so die TON zu steigern. Es konnte ein etwa zweifacher Anstieg der TON beobachtet werden, allerdings zu Lasten des ee , welcher etwa um den Faktor drei abfiel. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Untersuchungen in wassergesättigtem CHCl_3 mit PMeOx-Konjugaten ohne weiteren Wasserzusatz durchgeführt.

Die TON_{Enzym} wurde auf Grundlage der Enzymmasse vor der Modifikation mit PMeOx berechnet. Da Enzymverluste bei der Synthese der Konjugate, z.B. durch die Dialyse nicht auszuschließen sind, können die Werte durchaus über den hier berechneten liegen.

Zusätzlich wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen PEtOx₄₀, sowie ein Diblockcopolymer aus S-PBuOx-*b*-PMeOx zur α -Chymotrypsinmodifikation eingesetzt wurden. Da die S-PBuOx-*b*-PMeOx- α -Chymotrypsinkonjugate THF-löslich sind, wurde die asymmetrische Dihydroxylierung in THF untersucht. THF besitzt den Vorteil der Wassermischbarkeit. Durch Erhöhung des Wassergehalts der Reaktionsmischung bestand die Möglichkeit, die Dihydroxylierung, sowie die Reoxidation des Katalysators zu verbessern. Um einen möglichst hohen ee zu erzielen, wurden die Versuche bei 0 °C durchgeführt. Wie in Tab. 4.20 dargestellt, wurde in beiden Fällen das Produkt 1-Phenylethan-1,2-diol gebildet.

Tabelle 4.20: TON und ee der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol mittels eines S-PBuOx-*b*-PMeOx- α -Chymotrypsin- in THF sowie eines PEtOx₄₀- α -Chymotrypsinkonjugates in wassergesättigtem CHCl_3 als Ligand, $c_{Os} = 0,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$.

$c_{\text{Enzym}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right]^a$	ϑ [°C]	t [d]	TON_{Os}^b	TON_{Enzym}^c	ee [%]
0,027 ^d	0	7	0,37	2,72	6,8 <i>R</i>
0,027 ^e	0	7	0,21	1,52	8,9 <i>S</i>

^a Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit POX, entspricht 0,135 äq. PEK bezogen auf den Katalysator.

^b Eine TON_{Os} von 1 entspricht einem Umsatz von 0,2 % (2 μmol) Styrol.

^c Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit POX, 1 TON_{Enzym} entspricht 0,27 μmol .

^d Konjugat mit Diblockcopolymer S-PBuOx-*b*-PMeOx; Zusatz von 72 μL Wasser zum THF des Reaktionsansatzes (10 mL).

^e Konjugat mit PEtOx₄₀.

Die TON liegen mit einem Faktor von etwa 5,3 für das Diblockcopolymerkonjugat sowie mit einem Faktor von drei für das PEtOx₄₀-Konjugat über denen, welche mit den PMeOx₃₈-Konjugaten als Liganden bei 0 °C erzielt wurden. Allerdings sind die Enantiomerenüberschüsse geringer. Auffällig ist hierbei, dass beim Einsatz des Diblockcopolymerkonjugates in THF das *R*-Enantiomer erhalten wurde, während bei der Verwendung der PMeOx₃₈- und PEtOx₄₀-Konjugate in CHCl₃ das *S*-Enantiomer gebildet wurde. Wegen der im Vergleich zu den PMeOx-Konjugaten niedrigeren Enantiomerenüberschüssen wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen nur noch PMeOx₃₈-Enzymkonjugate als Liganden eingesetzt.

4.4.3.2 Eignung unterschiedlicher POX-Enzymkonjugate als Liganden

Im Folgenden wurden versch. PEKs auf ihre Eignung als Liganden für die SHARPLESS-Dihydroxylierung untersucht. Ausgehend von den vorherigen Ergebnissen zur Optimierung der Reaktionsbedingungen, wurden ausschließlich PMeOx-Enzymkonjugate verwendet. Um eine möglichst enantioselektive Reaktion zu erreichen, wurde eine Reaktionstemperatur von 0 °C bzw. 5 °C gewählt. Wie die Ergebnisse in Tab. 4.21 zeigen, war die Dihydroxylierung in allen Fällen erfolgreich und das Produkt 1-Phenylethan-1,2-diol konnte mittels HPLC in allen Experimenten nachgewiesen werden, jedoch unterscheiden sich die erhaltenen Selektivitäten deutlich. Einige PEKs zeigen nur eine geringe Selektivität und in drei Fällen, wie z.B. beim Lysozym, wurde ein racemisches Produktgemisch erhalten. In den meisten Fällen wurde das *S*-Enantiomer erhalten. Nur mittels der Collagenase- und Laccasekonjugate wurde die *R*-Konfiguration erhalten. Interessanterweise zeigen die PMeOx₃₈-BSA-Konjugate unter den gegebenen Bedingungen keine Selektivität im Gegensatz zu einem literaturbekannten System, bei dem reines BSA in einem Puffersystem verwendet wurde. Hier ist unter Verwendung von Styrol ein *ee* von 6 % erreicht worden¹⁴². Dies legt die Vermutung nahe, dass die Selektivität entweder durch das Lösungsmittel oder durch die Modifikation beeinflusst wird. KOKUBO *et al.* postulierten, dass der Osmiumkatalysator über die primären Aminogruppen des BSA koordiniert wird. Diese werden jedoch für die Modifikation mit PMeOx verwendet und sind daher mehr oder weniger blockiert. Dies ist eine mögliche Erklärung für den Mangel an Selektivität. Auffällig ist zudem, dass alle verwendeten Metalloenzyme eine Enantioselektivität der Reaktion hervorrufen. Hier besteht potentiell die Möglichkeit eines gezielten Metallaustausches mit dem eingesetzten Osmium(VIII)-oxid und dadurch dessen Einlagerung in eine definierte chirale Umgebung. Dies wird in Kap. 4.4.3.3.1 genauer diskutiert.

Tabelle 4.21: TON und ee der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem CHCl_3 mittels unterschiedlicher PMeOx_{38} -Enzymkonjugate als Ligand, $c_{\text{Os}} = 0,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$; rot hervorgehoben sind Metalloenzyme.

Ligand	$c_{\text{Enzym}} [\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}]^a$	$\vartheta [^\circ\text{C}]$	$t [\text{d}]$	TON_{Os}^b	TON_{Enzym}^c	$ee [\%]$
ADH	0,018 (0,09 äq.)	0	7	0,17	1,89	12,1 <i>S</i>
BSA	0,011 (0,055 äq.)	0	7	0,08	1,45	rac.
CaLB	0,021 (0,105 äq.)	0	8	0,19	1,81	rac.
α -Chymotrypsin	0,027 (0,135 äq.)	0	7	0,07	0,52	19,4 <i>S</i>
Collagenase	0,012 (0,06 äq.)	0	7	24,7	410,8	25,2 <i>R</i>
CrL	0,012 (0,06 äq.)	0	7	0,07	1,17	11,6 <i>S</i>
Laccase	0,026 (0,13 äq.)	0	7	0,11	0,85	15,2 <i>R</i>
Lysozym	0,048 (0,24 äq.)	0	7	0,29	1,21	rac.
Monooxygenase	0,006 (0,03 äq.)	5	4	0,08	2,67	8,2 <i>S</i>
Peroxidase	0,016 (0,08 äq.)	0	7	0,09	1,13	11,8 <i>S</i>
Proteinase K	0,024 (0,12 äq.)	0	6	0,08	0,67	6,2 <i>S</i>
RmL	0,018 (0,09 äq.)	0	8	0,37	4,11	9,9 <i>S</i>
Trypsin	0,12 (0,6 äq.)	0	6	0,07	0,12	28,8 <i>S</i>

^a Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx_{38} ; die in Klammern angegebenen PEK äq. sind bezogen auf den Katalysator.

^b Eine TON_{Os} von 1 entspricht einem Umsatz von 0,2 % (2 μmol) Styrol.

^c Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx_{38} , 1 TON_{Enzym} entspricht 0,27 μmol .

Es wurden außerdem Kontrollexperimente durchgeführt. Es wurde reines Enzympulver (α -Chymotrypsin sowie Laccase) gelöst in Wasser und suspendiert in Chloroform, reines PMeOx_{38} (aminterminiert) gelöst in Wasser und Chloroform sowie eine Mischung aus PMeOx_{38} (aminterminiert) und Laccase in CHCl_3 eingesetzt, wobei das PMeOx_{38} hier nicht an die Laccase gebunden war. Wie die Ergebnisse in Tab. 4.22 zeigen, konnte das Produkt 1-Phenylethan-1,2-diol in allen Fällen, mit Ausnahme des Ansatzes bei dem das PMeOx_{38} -Laccase-Gemisch verwendet wurde, mittels HPLC nachgewiesen werden. Allerdings wurde in sämtlichen Experimenten nur ein racemisches Produktgemisch erhalten, was zeigt, dass zwar eine Produktbildung auch ohne PEKs stattfindet, aber für die chirale Steuerung der Reaktion die PEKs notwendig sind. Da die reinen Enzyme in CHCl_3 unlöslich sind und daher größere Aggregate bilden, ist wahr-

scheinlich die Zugänglichkeit der chiralen Bereiche für den Osmiumkatalysator oder das Styrol stark eingeschränkt, was zur Bildung eines Racemates führt.

Tabelle 4.22: *TON* und *ee* der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol für die Kontrollexperimente; Reaktionszeit 7 d bei 0 °C, $c_{\text{Os}} = 0,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$.

Ligand	$c_{\text{Ligand}} [\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}]^a$	Lösungsmittel	TON_{Os}^b	TON_{Enzym}^c	<i>ee</i> [%]
α -Chymotrypsin	0,055 (0,28 äq.)	CHCl ₃ ges.	0,08	0,29	rac.
Laccase	0,026 (0,13 äq.)	CHCl ₃ ges.	0,07	0,54	rac.
PMeOx	2,29 (11,45 äq.)	CHCl ₃ ges.	0,09	-	rac.
PMOx + Laccase	0,026 (0,13 äq.)	CHCl ₃ ges.	-	-	-
Laccase	0,026 (0,13 äq.)	H ₂ O	43,33	333,31	rac.
PMeOx	2,29 (11,45 äq.)	H ₂ O	0,45	-	rac.

^a Die in Klammern angegebenen PEK äq. sind bezogen auf den Katalysator.

^b Eine TON_{Os} von 1 entspricht einem Umsatz von 0,2 % (2 μmol) Styrol.

^c Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge, 1 TON_{Enzym} entspricht 0,27 μmol .

Bei den vorherigen Untersuchungen wurde davon ausgegangen das potentiell mehr als ein Katalysatormolekül in jedes Konjugatmolekül eingelagert wird. Würde jedoch pro Konjugatmolekül nur ein Katalysatormolekül eingelagert werden, würde dies bedeuten, dass ein Teil des Osmiumkatalysators in seiner freien Form, ohne Ligand, vorliegt. Im Vergleich hierzu werden beim Standard SHARPLESS-System fünf Äquivalente Ligand pro Äquivalent Katalysator eingesetzt. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass eine Erhöhung der PEK-Konzentration, was bei konstanthalten aller anderen Parameter einer Erhöhung des Verhältnisses zwischen PEK und dem Osmiumkatalysator entspricht, zu einer Erhöhung der Enantioselektivität führt. Diese Annahme wurde mittels der PMeOx₃₈- α -Chymotrypsinkonjugate überprüft. Wird die Konjugatkonzentration um das vierfache auf $0,111 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$ (entspricht 0,555 äq. PEK bezogen auf den Katalysator) erhöht, steigt die Enantioselektivität ca. um den Faktor zwei, auf 36 % *ee* (*S*) (vgl. Tab. 4.19). Dies zeigt, dass die Enantioselektivität neben der Temperatur auch signifikant von der eingesetzten Konjugatmenge abhängt. Neben dem *ee* steigt auch die *TON* ($TON_{\text{Os}} = 0,49$, $TON_{\text{Enzym}} = 0,88$) signifikant an, was sich wahrscheinlich darauf zurückführen lässt, dass mehr Koordinationsstellen für den Osmiumkatalysator zur Verfügung stehen, und daher ein größerer Teil der Reaktion über den selektiven, ligandenbeschleunigten Mechanismus verläuft. Zudem wird durch die größere Konjugatmenge auch der Wassergehalt des Reaktionsmediums weiter erhöht.

4.4.3.3 Laccase- sowie Collagenase-POX-Enzymkonjugate als Liganden

Es werden nun die PEKs genauer untersucht, die bereits hohe Enantioselektivitäten auch bei niedrigen PEK zu Osmiumkatalysator Verhältnissen gezeigt haben. Dies sind vor allem die PEKs die aus den Metalloenzymen Collagenase und Laccase hergestellt wurden. Wie in Tab. 4.23 dargestellt, wurde für die Collagenase durch Verdopplung der PEK Äquivalente bezogen auf den Osmiumkatalysator ein deutlicher Anstieg des *ee* von 25,2 % auf 72,4 % (*R*) erreicht.

Tabelle 4.23: *TON* und *ee* der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem CHCl_3 mittels PMeOx_{38} -Collagenasekonjugaten als Ligand; Reaktionszeit 7 d bei 0 °C, $c_{\text{Os}} = 0,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$.

$c_{\text{Enzym}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right]^a$	TON_{Os}^b	TON_{Enzym}^c	<i>ee</i> [%]
0,012 (0,06 äq.)	24,65	410,83	25,2 <i>R</i>
0,024 (0,12 äq.)	1,57	13,08	72,4 <i>R</i>

^a Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx_{38} , die in Klammern angegebenen PEK äq. sind bezogen auf den Katalysator.

^b Eine TON_{Os} von 1 entspricht einem Umsatz von 0,2 % (2 μmol) Styrol.

^c Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx_{38} , 1 TON_{Enzym} entspricht 0,27 μmol .

Im Fall der Laccase PEKs wurde das PEK zu Katalysatorverhältnis schrittweise erhöht, hierbei steigt auch der *ee* rasch an. Bei einer Erhöhung des Verhältnisses um den Faktor vier auf 0,53 äq. ($0,105 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$) ist ein *ee* von 92,6 % (*R*) erreicht worden, obwohl auch hier die PEKs immer noch im Unterschuss zum Katalysator eingesetzt wurden (Abb. 4.91, Tab. 4.91). Wird die Reaktionstemperatur bei konstantem PEK zu Katalysatorverhältnis (0,53 äq., $0,053 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$) weiter auf -15 °C abgesenkt, so steigt der *ee* von 84,6 auf 94,2 % (*R*). Dies verdeutlicht nochmals den Einfluss der Temperatur auf die Enantioselektivität, welcher schon bei den α -Chymotrypsin PEKs beobachtet wurde (vgl. Abb. 4.90).

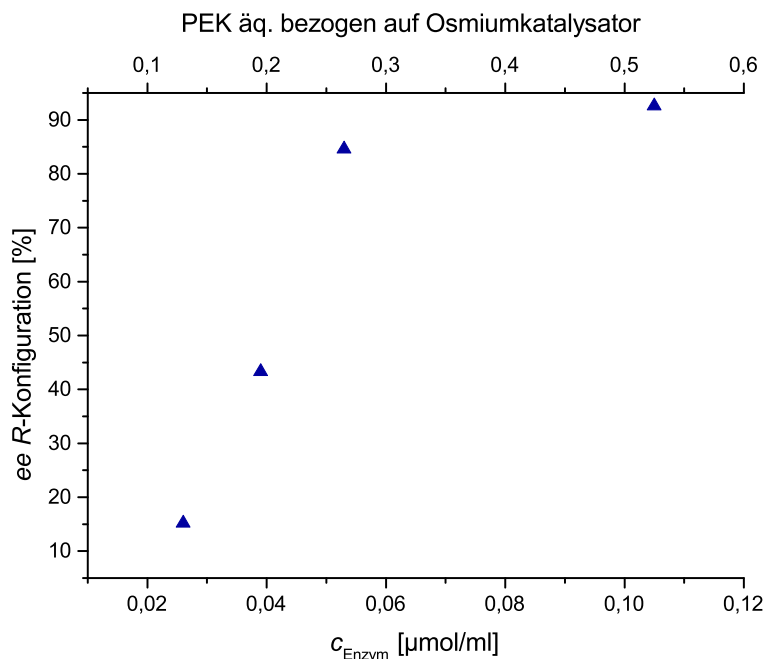


Abbildung 4.91: Abhängigkeit des *ee* vom PEK zu Osmiumkatalysatorverhältnis bzw. der PEK-Konzentration bei der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem CHCl_3 mittels PMeOx_{38} -Laccasekonjugat als Ligand; Enzymkonzentration bezogen auf die Enzymeinwaage vor der Modifikation; nach LEURS²⁴⁰.

Trotz schwankender Werte, zeigt Tab. 4.24 dennoch die Tendenz, dass mit steigendem PEK zu Katalysatorverhältnis (entspricht einer steigender PEK Konzentration, da alle anderen Parameter konstant sind) auch die *TON* ansteigt. Die auftretenden Schwankungen sind vermutlich auf die unterschiedliche „Qualität“ der PEKs zurückzuführen. Es wurde außerdem der Einfluss der Reaktionszeit auf die *TON*, sowie die Enantioselektivität der Reaktion untersucht. Hierzu wurde die Reaktionszeit bei 0 °C und 0,27 äq. PEK bezogen auf den Osmiumkatalysator ($0,053 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$) auf drei Tage verkürzt. Hierbei konnte ein *ee* von 99,4 % (*R*) erhalten werden. Abb. 4.92 b zeigt das zugehörige HPLC-Chromatogramm sowie zum Vergleich ein Chromatogramm (Abb. 4.92 a) eines racemisches Produktgemisches. Unter Verwendung der Laccase PEKs wurden somit in Chloroform höhere Enantioselektivitäten erreicht als bei einer vergleichbaren asymmetrischen Dihydroxylierung von α -Methylstyrol mittels versch. Streptavidin-Mutanten als Liganden im wässrigen Medium²⁴⁴. KÖHLER *et al.* erzielten hierbei Werte von maximal 97 % *ee*. Es zeigte sich, dass der erhaltene Enantiomerenüberschuss von 99,4 % größer ist als der, der mittels kommerziell erhältlicher SHARPLESS-Katalysator-Ligandensysteme unter Standardbedingungen für die Umsetzung von Sty-

Tabelle 4.24: *TON* und *ee* der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem CHCl_3 mittels PMeOx_{38} -Laccasekonjugaten als Ligand; Reaktionszeit, 7 d sofern nicht anders angegeben $c_{\text{Os}} = 0,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$.

$c_{\text{Enzym}} [\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}]^a$	$\vartheta [^\circ\text{C}]$	TON_{Os}^b	TON_{Enzym}^c	<i>ee</i> [%]
0,026 (0,13 äq.)	0	0,11	0,85	15,2 <i>R</i>
0,039 (0,20 äq)	0	0,12	0,62	43,3 <i>R</i>
0,053 (0,27 äq)	0	16,02	60,45	84,6 <i>R</i>
0,105 (0,53 äq)	0	7,07	13,47	92,6 <i>R</i>
0,053 (0,27 äq) ^d	0	0,62	2,34	99,4 <i>R</i>
0,053 (0,27 äq) ^e	-15	1,78	6,72	94,2 <i>R</i>

^a Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx_{38} , die in Klammern angegebenen PEK äq. sind bezogen auf den Katalysator.

^b Eine TON_{Os} von 1 entspricht einem Umsatz von 0,2 % (2 μmol) Styrol.

^c Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx_{38} , 1 TON_{Enzym} entspricht 0,27 μmol .

^d Reaktionszeit 3 d.

^e Reaktionszeit 21 d.

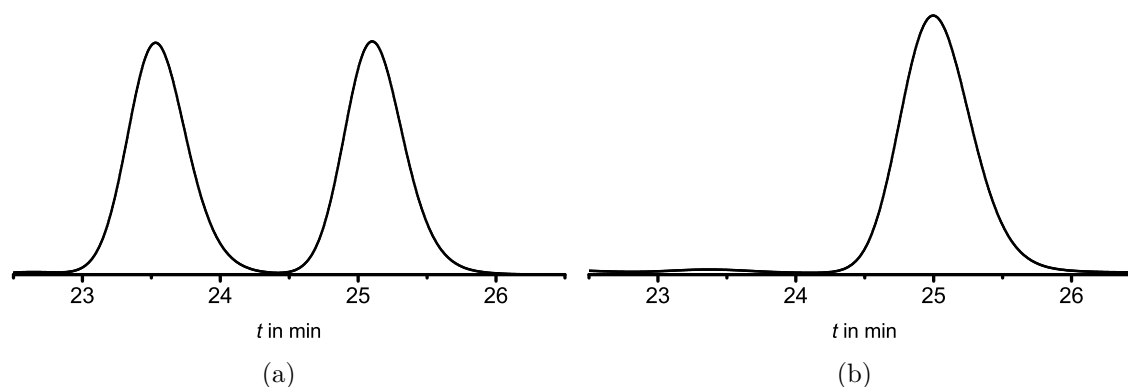


Abbildung 4.92: HPLC-Chromatogramme von: (a) Racemat von 1-Phenylethan-1,2-diol, (b) Reaktionsansatz mit 0,27 äq. PEK bezogen auf den Osmiumkatalysator (0,053 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$) PMeOx_{38} -Laccasekonjugat als Ligand, 0 $^\circ\text{C}$, 3 d, *ee*: 99,4 % (*R*), Enzymkonzentration bezogen auf die Enzymeinwaage vor der Modifikation; gemessen bei 216 nm.

rol zu 1-Phenyl-1,2-ethanediol erhalten werden kann. Dabei wurden maximal 97 % *ee* erzielt²⁴⁵. Die Tatsache, dass der *ee* mit steigender Reaktionszeit abnimmt, deutet darauf hin, dass die Reaktion zunehmend in einer nicht chiralen Umgebung abläuft oder der Katalysator nicht mehr am Liganden gebunden ist. Dies lässt sich z.B. durch die zunehmende Denaturierung der Enzyme, beispielsweise durch das verwendete Oxidationsmittel erklären, was zu einem Verlust von Koordinationsstellen in chiraler Umgebung führt.

4.4.3.3.1 Untersuchungen zum Metallaustausch bei Einsatz der POX-Laccasekonjugate als Liganden

Wie bereits in Kap. 4.4.3.2 erwähnt, besteht bei Metalloenzymen potentiell die Möglichkeit, das jeweilige Metallatom im aktiven Zentrum gegen den verwendeten Osmiumkatalysator auszutauschen. Es wird vermutet, dass aus diesem Grund mittels der hier näher untersuchten Metalloenzym PEKs (Collagenase, Laccase) als Liganden solche hohen Enantiomerenüberschüsse erreicht wurden. Ein solcher Metallaustausch führt dazu, dass der Osmiumkatalysator selektiv in eine chirale Umgebung eingelagert wird. Am Beispiel der Laccase soll dies näher erläutert und untersucht werden.

Die Reaktionen, die von Laccasen katalysiert werden, verlaufen über die Ein-Elektron-Oxidation von vier Substratmolekülen zu den jeweiligen reaktiven Radikalen unter Reduktion von einem Molekül Sauerstoff zu Wasser. Der Redoxprozess findet mit Hilfe von vier Kupferionen statt, welche den Kern des aktiven Zentrums bilden. In Abb. 4.93 dargestellt ist die dreidimensionale Struktur der Laccase aus *Trametes versicolor*, inklusive der Lage der Kupferatome, sowie schematisch die versch. Kupferzentren.^{225,248} Diese vier Kupferzentren lassen sich nach ihren spektroskopischen Eigenschaften unterscheiden und werden in Typ 1, Typ 2 und Typ 3 Kupfer eingeteilt. Typ 2 und Typ 3 Kupfer bilden einen sogenannten trinuklearen Cluster, welcher für die Bindung und Reduktion des Sauerstoffs verantwortlich ist. Die Substratoxidation hingegen wird durch das Typ 1 Kupfer katalysiert, welches im Anschluss die Elektronen an den trinuklearen Cluster transferiert. Das Typ 1 Kupfer ist zugänglich für die Interaktion mit dem umgebenden Lösungsmittel und auch für die charakteristische Färbung der Laccase verantwortlich und wird deshalb auch als „blaues“ Kupfer bezeichnet.^{225,248} Es ist bereits literaturbekannt, dass das Typ 1 Kupfer durch Metalle wie Quecksilber oder Cobalt ersetzt werden kann, und es sich auch durch kupferkomplexierende Reagenzien entfernen lässt. Das Entfernen bzw. der Austausch des Typ 1 Kupferzentrums führt zu einer Verringerung der Laccaseaktivität.²⁵⁰ Es liegt daher die Vermutung nahe, dass ein Austausch des Typ 1 Kupfers gegen den Osmiumkatalysator möglich ist.

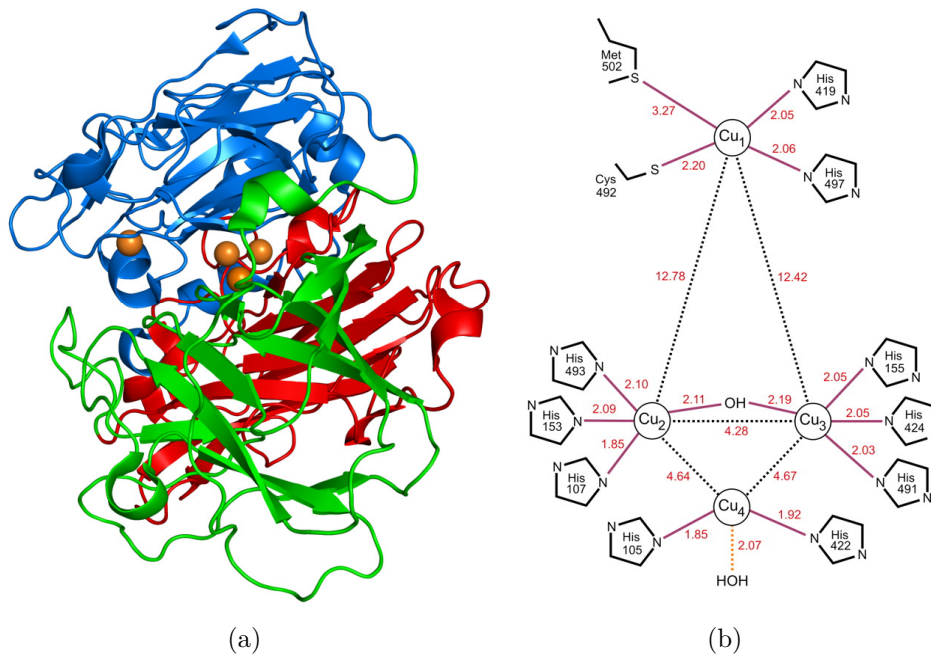


Abbildung 4.93: (a) Dreidimensionale Struktur der Laccase aus *Trametes versicolor* (PDB-Nummer 1GYC), die vier Kupferatome sind orange gekennzeichnet.²²⁹
 (b) Schematische Darstellung der versch. Kupferzentren T1 (Cu₁) sowie T2/T3 (Cu₂-Cu₄) einer Laccase aus *Bacillus subtilis* mit Angabe der interatomaren Abstände für alle relevanten Atome, nach ENGUITA *et al.*²⁴⁹

Wahrscheinlich findet eine partielle Entfernung des Typ 1 Kupfers bereits während der Dialyse der Konjugate statt, da eine zunehmende Entfärbung der konjugathaltigen Lösung beobachtet wurde. Ein weiteres Indiz hierfür ist die Tatsache, dass gegen eine CuSO₄-Lösung geringer Konzentration (0,8 mM) dialysiert werden musste, um die enzymatische Aktivität der PEKs zu erhalten. Bei einer Dialyse gegen bidest. Wasser wurde keine Aktivität beobachtet (vgl. Kap. 4.2.6.2.1). Aus diesem Grund lag es nahe, eine gezielte Entfernung des Kupferions mittels eines Chelatbildners, wie beispielsweise Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), durchzuführen. Ein Entfernen des Typ 1 Kupfers verringert die enzymatische Aktivität, daher ist die Restaktivität nach der Inkubation mit dem Chelatbildner ein Maß für den Anteil an entfernten Kupferionen. Um zu überprüfen, ob sich EDTA hier als Chelatbildner eignet, sowie um die notwendige EDTA-Konzentration zu bestimmen, wurde native Laccase mit versch. EDTA-Konzentrationen inkubiert. Die Laccaseaktivität wurde anschließend im Wässrigen mittels DMP als Substrat (vgl. Kap. 4.2.6.2.1) gemessen und mit der Aktivität einer unter gleichen Bedingungen inkubierten Laccase ohne EDTA-Zusatz verglichen.

Wie Abb. 4.94 zeigt, nimmt die Restaktivität mit steigender EDTA-Konzentration ab. Mittels linearer Regressionen wurde aus den Daten die Aktivität der Laccase berechnet.

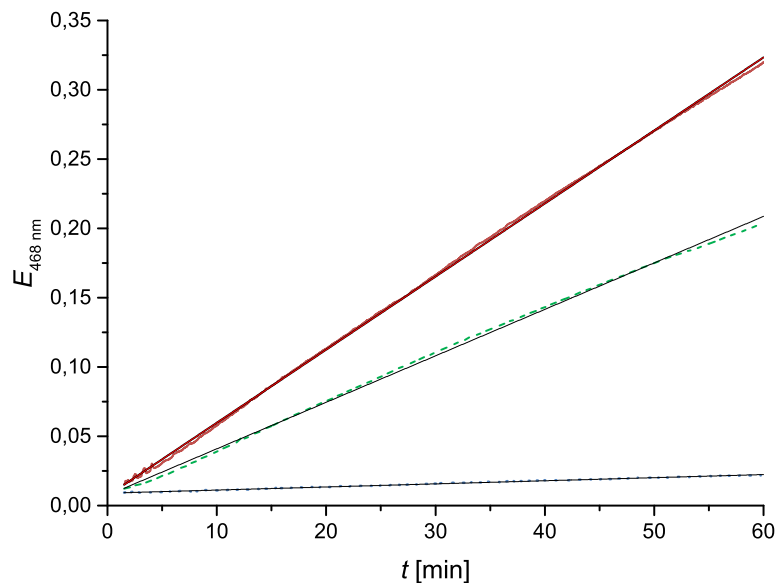


Abbildung 4.94: Auftragung der Extinktion bei 468 nm gegen die Zeit; dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen; Laccasekonzentration $0,013 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$: rot (—) ohne EDTA $R^2 = 0,9996$, grün (- -) 1 mM EDTA $R^2 = 0,9993$, blau (· ·) 10 mM EDTA $R^2 = 0,9988$; nach LEURS²⁴⁰.

Es wurde beim Einsatz einer 10 mM EDTA-Lösung eine Inhibierung von ca. 94 % erreicht (Tab. 4.25). Dieses Ergebnis zeigt, dass sich EDTA hier als Chelatbildner eignet und eine 94 %ige Entfernung des Kupferions aus der Laccase möglich ist.

Tabelle 4.25: Vergleich der Laccaseaktivitäten mit und ohne 12 stündige Inkubation mit EDTA, bestimmt mittels DMP als Substrat.

EDTA-Konzentration [mM]	Steigung $\cdot 10^{-3}$	$\dot{U}_{\text{Laccase, } 37^\circ\text{C}}$ mg	Inhibierung [%]
0	$5,30 \pm 0,30$	$405,4 \pm 23$	-
1	$3,40 \pm 0,30$	$257,7 \pm 23$	$35,8 \pm 2,1$
10	$0,21 \pm 0,015$	$17,2 \pm 1,1$	$93,8 \pm 2,7$

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob sich das Entfernen des Kupferions in den Laccase PEKs auf den *ee* bzw. die *TON* bei der asymmetrische Dihydroxylierung auswirkt. Auf Grundlage der Resultate der Inhibierungsversuche wurde eine EDTA-Konzentration von 10 mM eingesetzt. Die Laccase PEKs wurden 24 h gegen

die EDTA-Lösung dialysiert und im Anschluss für 48 h gegen bidest. Wasser, um sicherzustellen, dass das EDTA wieder vollständig entfernt wurde. Im Vergleich mit den Laccase PEKs, die nicht mit EDTA behandelt wurden, konnte bei gleichem PEK zu Osmiumkatalysatorverhältnis (0,20 äq., 0,039 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$) eine signifikante Steigerung des *ee* von 43,3 auf 59,8 % (*R*) beobachtet werden (Tab. 4.26).

Tabelle 4.26: Vergleich von *TON* und *ee* der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem CHCl_3 mittels PMeOx_{38} -Laccasekonjugaten als Ligand mit und ohne Einsatz von EDTA; Reaktionszeit 7 d, $c_{\text{Os}} = 0,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$.

$c_{\text{Enzym}} [\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}]^a$	$\vartheta [^\circ\text{C}]$	TON_{Os}^b	TON_{Enzym}^c	<i>ee</i> [%]
0,039 (0,20 äq.)	0 °C	0,120	0,620	43,3 <i>R</i>
0,039 (0,20 äq.) ^d	0 °C	7,72	39,59	59,8 <i>R</i>

^a Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx , die in Klammern angegebenen PEK äq. sind bezogen auf den Katalysator.

^b Eine TON_{Os} von 1 entspricht einem Umsatz von 0,2 % (2 μmol) Styrol.

^c Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx , 1 TON_{Enzym} entspricht 0,27 μmol .

^d Das Konjugat wurde für 24 h gegen 10 mM EDTA dialysiert, gefolgt von einer 48 stündigen Dialyse gegen bidest. Wasser.

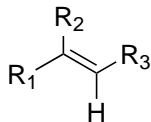

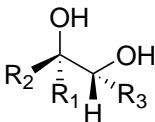
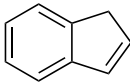
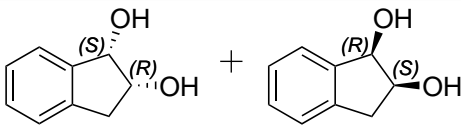
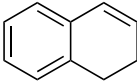
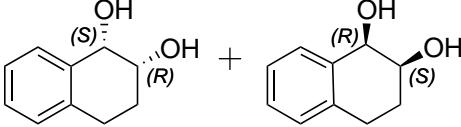
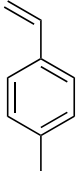
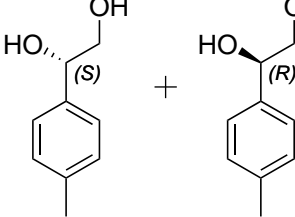
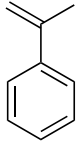
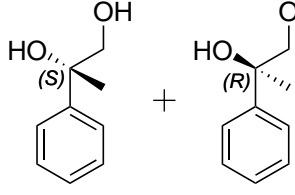
Vor allem die *TON* steigt deutlich, um etwa den Faktor 64 an. Dieses Resultat unterstützt die Annahme, dass das Kupferion gegen den Osmiumkatalysator ausgetauscht wird, und dass sich wahrscheinlich die zum Teil niedrigen *TON*s, welche in den vorherigen Experimenten (vgl. Kap. 4.4.3.3) erhalten wurden, durch den Einsatz von EDTA noch weiter erhöhen lassen.

4.4.3.3.2 Erweiterung des Eduktspektrums

Zusätzlich zu Styrol wurden Untersuchungen mit PEKs als chirale Liganden mit vier weiteren Alkenen durchgeführt. Hierzu wurden α -Methylstyrol, 4-Methylstyrol, 1*H*-Inden sowie 1,2-Dihydronaphthalin verwendet. In Tab. 4.27 dargestellt sind die Strukturformeln der Edukte und sowie der erwarteten Produkte. Im Zweiphasensystem *tert*-Butanol-Wasser wurden unter Verwendung des achiralen Liganden Pyridin die Produkte mittels ^1H -NMR Spektroskopie nachgewiesen. Alle hierbei auftretenden Signale waren den jeweiligen Produkten zuzuordnen. Mittels HPLC-Messungen ist eine Enantiomertrennung der Produkte nur für die Edukte 1,2-Dihydronaphthalin, α -Methylstyrol

sowie 1*H*-Inden möglich. Hierbei wurde, wie bei der Verwendung eines achiralen Liganden zu erwarten war, ein racemisches Produktgemisch erhalten. Wie bei der Verwendung des Eduktes Styrol wurde in wassergesättigtem Chloroform mit Pyridin als Ligand keine Produktbildung beobachtet.

Tabelle 4.27: Übersicht über die zusätzlich zu Styrol verwendeten Edukte sowie die Produkte, welche bei der asymmetrischen Dihydroxylierung hieraus entstehen können.

Edukt	Produkte
	 
 1 <i>H</i> -Inden	 2,3-Dihydro-1 <i>H</i> -Inden-1,2-diol
 1,2-Dihydronaphthalin	 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin-1,2-diol
 4-Methylstyrol	 1-(<i>p</i> -tolyl)Ethan-1,2-diol
 α -Methylstyrol	 2-Phenylpropan-1,2-diol

Auf Grund der guten Ergebnisse, die unter Verwendung der Laccase PEKs bei der Dihydroxylierung von Styrol erhalten wurden, wurden diese analog zu den vorher durchgeführten Untersuchungen eingesetzt. Bei der Verwendung von α -Methylstyrol und 4-Methylstyrol als Edukt war mittels HPLC keine Produktbildung nachweisbar. Beim

Einsatz der Edukte 1*H*-Inden und 1,2-Dihydronaphthalin hingegen wurden die jeweiligen Dihydroxylierungsprodukte erhalten. Es wurde hierbei ein *ee* von 28,2 % für das Produkt 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin-1,2-diol (0,13 äq., 0,026 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$) und ein *ee* von 34,6 % für 2,3-Dihydro-1*H*-Inden-1,2-diol (0,27 äq., 0,053 $\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$) erreicht (Tab. 4.28).

Tabelle 4.28: Enantiomerenüberschüsse der asymmetrischen Dihydroxylierung von Alkenen in wassergesättigtem CHCl_3 mittels PMeOx_{38} -Laccase-konjugaten als Ligand; Reaktionszeit 7 d bei 0 °C, $c_{\text{Os}} = 0,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$.

Alken	$c_{\text{Enzym}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right]^a$	<i>ee</i> [%]
<i>H</i> -Inden	0,053 (0,27 äq.)	34,6 1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>
1,2-Dihydronaphthalin ^b	0,026 (0,13 äq.)	28,2 1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>
4-Methylstyrol	0,053 (0,27 äq.)	-
α -Methylstyrol	0,053 (0,27 äq.)	-

^a Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx , die in Klammern angegebenen PEK äq. sind bezogen auf den Katalysator.

^b Das Konjugat wurde für 48 h gegen 10 mM EDTA dialysiert, gefolgt von einer 48 stündigen Dialyse gegen bidest. Wasser.

Die erhaltenen Enantiomerenüberschüsse sind vergleichbar mit Literaturwerten bei denen die Dihydroxylierung mittels versch. Streptavidin-Mutanten im Wässrigen durchgeführt wurde. Hier wurde für das 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin-1,2-diol ein *ee* von max. 41 % (1*R*, 2*S*) und für das 2,3-Dihydro-1*H*-Inden-1,2-diol ein max. *ee* von 45 % (1*R*, 2*S*) erhalten²⁴⁴. Unter Verwendung des Standard AD-Mixes ergaben sich Werte von von 56 bzw. 53 % *ee*²⁵¹. Wie sich beim Einsatz von Styrol gezeigt hat, führt eine Erhöhung des PEK zu Osmiumkatalysatorverhältnisses zu höheren Enantiomerenüberschüssen, daher ist es möglich, dass sich auch für 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin-1,2-diol und 2,3-Dihydro-1*H*-Inden-1,2-diol höhere Enantiomerenüberschüsse erzielen lassen.

4.4.3.4 Tandemkatalyse

Wie bereits in Kap. 1.3.3 dargestellt, haben Tandemreaktionen einige Vorteile. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit erste Versuche zur Etablierung einer tandemkatalysierten Reaktion im organischen Medium durch Kombination der enzymatischen Aktivität der PEKs (s. Kap. 4.2) mit ihrer Funktion als Liganden bei der asymmetrischen Dihydroxylierung (s. Kap. 4.4.3) durchzuführen.

Der erste katalytische Schritt war die asymmetrische Dihydroxylierung, von Styrol in

CHCl_3 mit CaLB PEKs als Liganden, während das entstandene 1-Phenylethan-1,2-diol im zweiten Reaktionsschritt mittels der eigentlichen katalytischen Aktivität der Lipase mit Laurinsäure verestert werden sollte (Abb. 4.95).

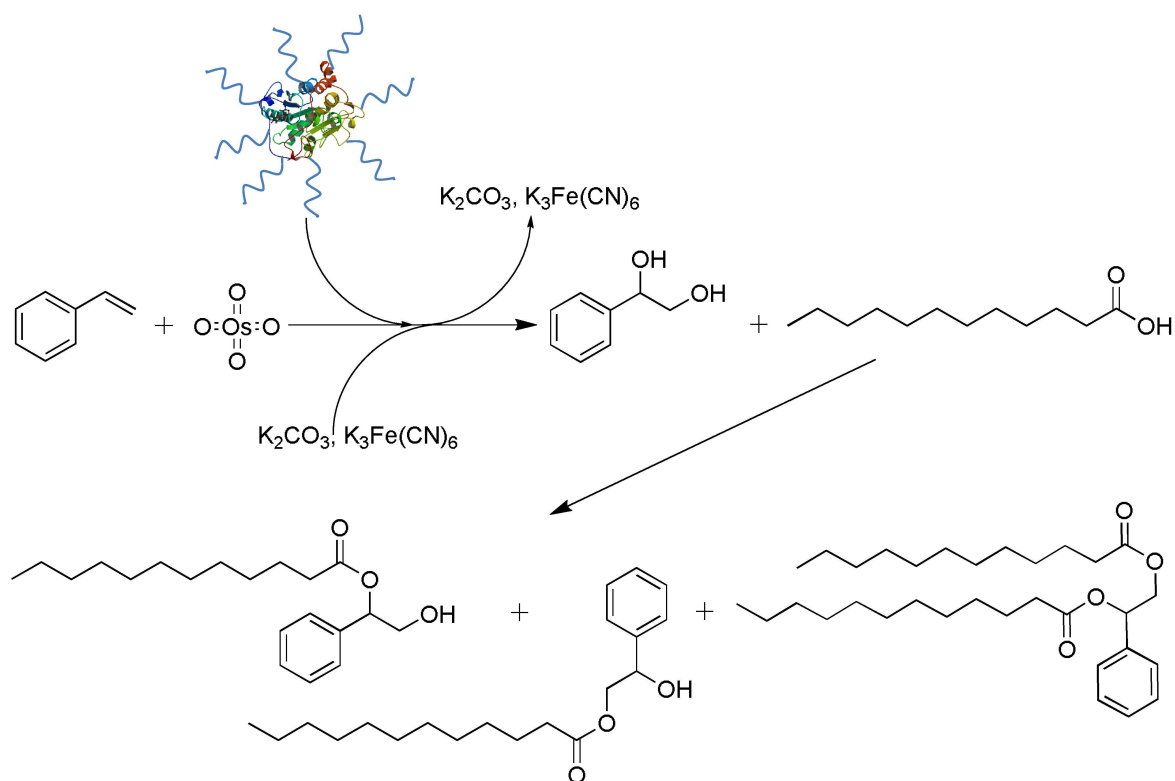


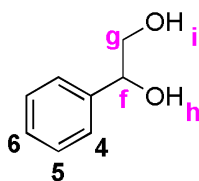
Abbildung 4.95: Schematische Darstellung der Tandemkatalyse mit CaLB PEKs (CaLB-3D-Struktur nach Uppenberg *et al.*¹⁵¹).

Es ist hierbei möglich, dass nur eine der beiden Hydroxylgruppen verestert wird, aber auch eine Veresterung beider Hydroxylgruppen ist denkbar. Es wurden die PMeOx_{38} -CaLB-Konjugate verwendet, da sich in einem Vorversuch mittels GC nachweisen lies, dass mittels des unmodifizierten Enzyms eine Veresterung von 1-Phenylethan-1,2-diol mit Laurinsäure erfolgreich möglich ist. Es zeigte sich in diesem Experiment außerdem, dass das Enzym sowohl die Veresterung von einer, als auch von beiden Hydroxylgruppen katalysiert. Des Weiteren zeigen die CaLB PEKs wie in Kap. 4.2.6.1.3 dargestellt, die höchste enzymatische Aktivität der hier untersuchten Lipasekonjugate.

Da beim Einsatz der PMeOx_{38} -CaLB-Konjugate als Liganden in der asymmetrischen Dihydroxylierung auch bei einer Reaktionstemperatur von 0 °C nur ein Racemat erhalten wurde, wurde zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit die Reaktionstemperatur auf 37 °C erhöht, die Reaktionsdauer aber bei sieben Tagen belassen mit dem Ziel einen höheren Umsatz zu erreichen. Um eine Reaktion zwischen der Laurinsäure und

dem Kaliumcarbonat zu verhindern, wurde die Laurinsäure nicht von Anfang an zum Reaktionsansatz gegeben, sondern erst nach dem ersten Reaktionsschritt, der asymmetrischen Dihydroxylierung, nachdem zuvor alle ungelösten Salze durch Zentrifugation entfernt wurden. Damit entspricht die durchgeführte Tandemreaktion der in Kap. 1.3.3 vorgestellten unterstützten Tandemkatalyse, da eine Veränderung der Reaktionsbedingungen für den zweiten Katalyseschritt notwendig ist. Um einen direkten Vergleich bei der anschließenden Analytik zu ermöglichen, wurde die Estersynthese chemisch durchgeführt, hierbei entstanden alle drei möglichen Ester. Die chemisch hergestellte Estermischung, wie auch der aufgearbeitete Ansatz der Tandemkatalyse wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie, HPLC und GC untersucht. In Abb. 4.96 A dargestellt ist das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der chemischen Estersynthese. Die Signale sind den drei möglichen Estern, sowie einem der Edukte 1-Phenylethan-1,2-diol zuzuordnen. Es ist zu erkennen, dass als Hauptprodukt 2-Hydroxy-2-Phenylethyl-Laurinsäureester entsteht und der bisubstituierte Ester nur zu einem geringen Anteil vorhanden ist. Wird dieses $^1\text{H-NMR}$ Spektrum mit demjenigen der aufgearbeiteten Reaktionsmischung der Tandemkatalyse (Abb. 4.96 B) verglichen, so zeigt sich, dass die Tandemkatalyse erfolgreich war, denn es sind sämtliche Signale des 2-Hydroxy-2-Phenylethyl-Laurinsäureesters, sowie des 2-Hydroxy-1-Phenylethyl-Laurinsäureesters vorhanden und lassen sich eindeutig diesen Produkten zuordnen. Auch hier war, wie bei der chemischen Estersynthese das Hauptprodukt der 2-Hydroxy-2-Phenylethyl-Laurinsäureester. Mittels HPLC, HPLC-MS und GC-Messungen wurden die Ergebnisse der $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie bestätigt.

Edukt



1-Phenylethan-1,2-diol

Produkte

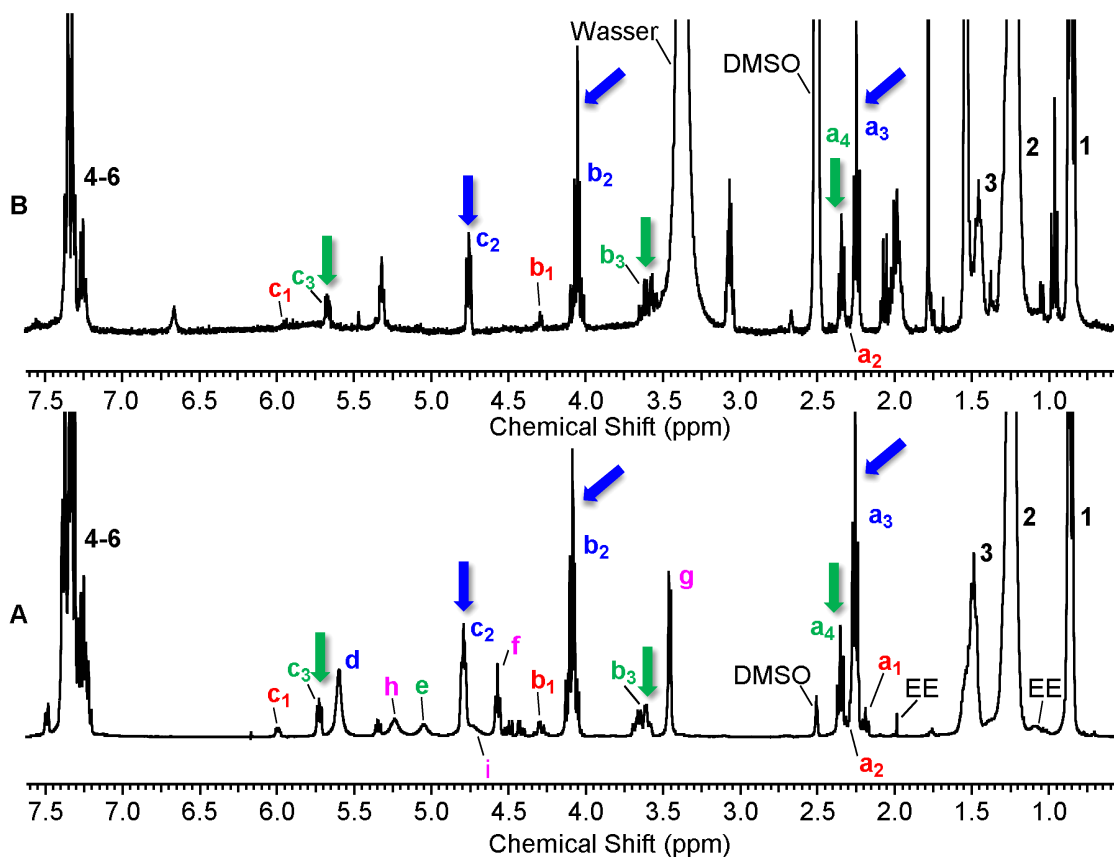
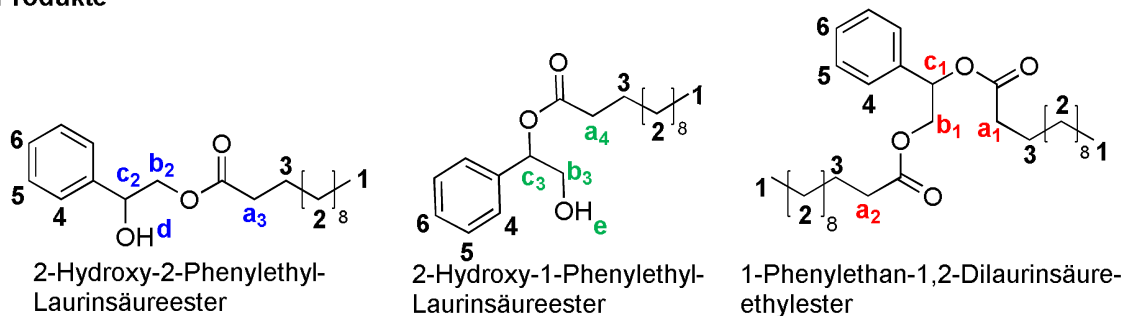


Abbildung 4.96: ¹H-NMR Spektren von A: Chemisch synthetisierte Ester, B: Reaktionsmischung der Tandemkatalyse nach der Aufarbeitung, mit Pfeilen markiert sind die Signale welche deutlich in beiden Spektren vertreten sind, aufgenommen in DMSO-d₆ bei 400 MHz; die Nummerierung bezieht sich auf die Protonen; äquivalente Protonen sind gleich bezeichnet.

In Abb. 4.97 dargestellt ist das für die Masse von 307,22 extrahierte HPLC-MS Spektrum der Reaktionsmischung. Dies ist die Masse des ionisierten Hauptproduktes 2-Hydroxy-2-Phenylethyl-Laurinsäureester. Bei 3 min ist in dem Chromatogramm ein deutliches Signal zu erkennen, dies ist ein weiterer Hinweis auf den Erfolg der Tandemreaktion.

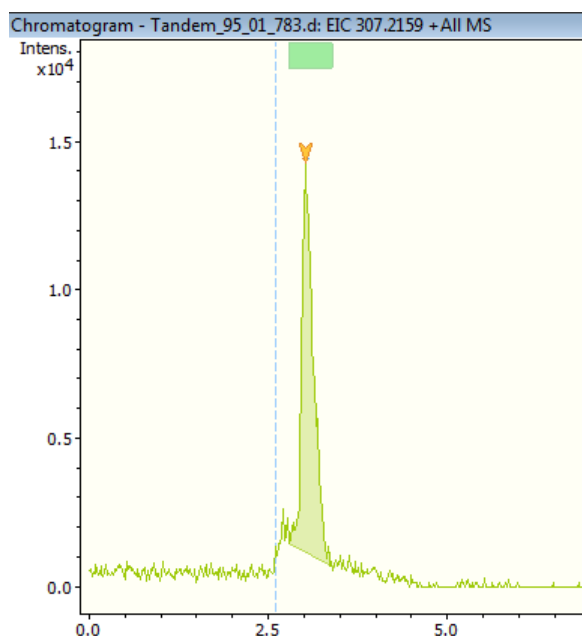


Abbildung 4.97: Für die Masse von 2-Hydroxy-2-Phenylethyl-Laurinsäureester ($\frac{m}{z} = 307, 22$) extrahiertes HPLC-ESI-MS Spektrum der Reaktionsmischung der Tandemkatalyse nach der Aufarbeitung; Acetonitril als Laufmittel.

4.4.4 Zusammenfassung

Es ist gelungen, PEKs als Liganden für die asymmetrische Dihydroxylierung nach SHARPLESS einzusetzen, als Alken wurde Styrol verwendet. Hierbei zeigte sich, dass von den untersuchten Konjugaten die PMeOx PEKs am besten geeignet sind. Die besten Resultate wurden mit wassergesättigtem Chloroform als Lösungsmittel erzielt.

Es wurde bei den PMeOx- α -Chymotrypsinkonjugaten eine Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses sowie der *TON* von der Reaktionstemperatur nachgewiesen, je niedriger die Temperatur, desto höher ist der erzielte *ee*. Der maximal erzielte *ee* liegt bei diesen Konjugaten bei 19,4 % (*S*).

Je nachdem welches PMeOx-Enzymkonjugat verwendet wurde, wurde das *R*- oder auch das *S*-Enantiomer erhalten. So lässt sich über die Wahl des Enzyms steuern, welches Enantiomer bevorzugt gebildet wird. Es zeigte sich, dass vor allem Metalloenzym

PEKs für die Dihydroxylierung besonders geeignet sind, was auf einen Austausch des Metallions gegen den verwendeten Osmiumkatalysator hinweist. Dies wurde mittels der Laccase PEKs genauer untersucht. Durch die gezielte Entfernung des Kupferions ist es möglich, den *ee* um das ca. 1,4-fache und die *TON* sogar um den Faktor 64 zu erhöhen. Außerdem wurde anhand der Laccase PEKs der Einfluss des PEK zu Katalysatorverhältnisses auf den *ee* und die *TON* nachgewiesen, je höher das Verhältnis, desto höher sind die erzielten Werte. Es wurde so ein maximaler *ee* von 99,4 % (*R*) erreicht. Dieser Wert ist sogar höher als der, welcher mittels kommerziell erhältlicher SHARPLESS-Katalysator-Ligandensysteme unter Standardbedingungen (97 %) erzielt wurde. Es wurde außerdem gezeigt, dass neben Styrol auch weitere Alkene als Edukte verwendet werden können.

Durch Kombination der enzymatischen Aktivität und ihrer Wirkung als Ligand in der asymmetrischen Dihydroxylierung wurde mittels der CaLB PEKs außerdem ein erster Versuch zur Tandemkatalyse erfolgreich durchgeführt.

5 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Synthese von organolöslichen Polymer-Enzym- und Coenzymkonjugaten unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität. Zur Modifikation der versch. Enzyme bzw. Coenzyme wurden einseitig gestartete Poly(2-R-Oxazolin) (POX) Homo- und Diblockcopolymere variabler Kettenlänge und Seitengruppe eingesetzt. Als Seitengruppen wurden sowohl die hydrophile Methyl- und Ethylgruppe sowie die hydrophobe Butyl-, Heptyl- und Phenylgruppe verwendet. Die Synthese der verwendeten Poly(2-R-Oxazoline) erfolgte mittels mikrowellengestützter kationisch lebender, ringöffnender Polymerisation. Die Polymere wurden über $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie, GPC, und ESI-MS Untersuchungen charakterisiert. Es wurden Polymere mit enger Molekulargewichtsverteilung erhalten.

5.1 Organolösliche Polymer-Enzymkonjugate

Es ist gelungen, organolösliche Polymer-Enzymkonjugate zu synthetisieren. Die kovalente Bindung zwischen den Enzymen und den Poly(2-R-Oxazolin) erfolgte über die ϵ -Aminogruppe des Lysins sowie den N-Terminus. Hierzu wurden die POX mit Ethylendiamin funktionalisiert und danach mittels des bifunktionellen Linkers Pyromellitsäuredianhydrid an das Enzym gebunden (Abb. 5.1).

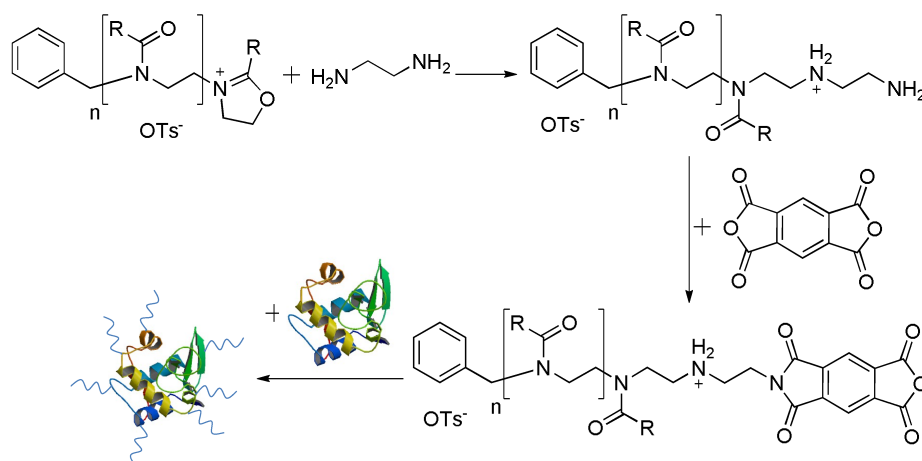


Abbildung 5.1: Darstellung der Enzymmodifikation mittels des bifunktionellen Linkers PADA unter Verwendung eines Poly(2-R-Oxazolins) mit Lysozym als Beispiel (Lysozymstruktur von SUKUMAR *et al.*⁷⁹).

Es wurden auch mittels direkter Terminierung von POX mit α -Chymotrypsin sowie unter Verwendung von Succinimidylcarbonat, Hexamethylendiisocyanat und Bernsteinsäuredichlorid als bifunktionellem Linker Enzymkonjugate erhalten, allerdings zeigte sich, dass Pyromellitsäuredianhydrid (PADA) als Linker auf Grund seiner hohen Reaktivität am besten geeignet ist. Wegen der Löslichkeitseigenschaften des PADA wurde die Modifikation in reinem DMF sowie in einer Mischung aus DMF und einem Carbonatpuffer (0,5 mM, pH 9,65) durchgeführt, hierzu wurden die Modellenzyme RNase A, α -Chymotrypsin (beide aus Rinderpankreas) sowie Lysozym (aus Hühner-eiweiß) verwendet. Es zeigte sich, dass die Modifikation in einer Mischung aus DMF und dem Carbonatpuffer (0,5 mM, pH 9,65) derjenigen in reinem DMF auf Grund der niedrigeren Aggregatbildung überlegen ist, auch wenn bei der Modifikation in reinem DMF bereits DMF-lösliche RNase A- und Lysozymkonjugate erhalten wurden. Natives Lysozym sowie Lysozym, welches nur mit PADA modifiziert wurde, ist dagegen unlöslich in DMF (Abb. 5.2).

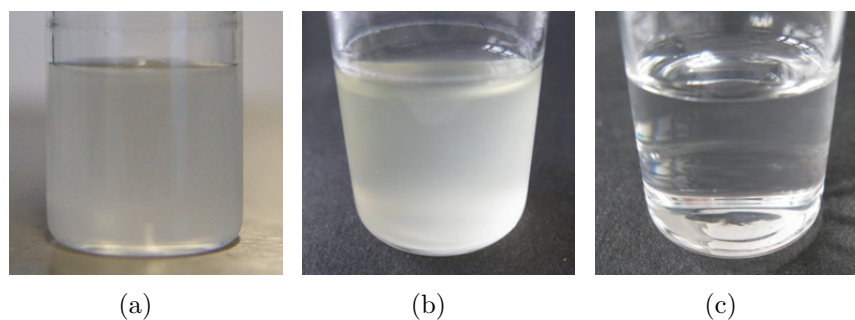


Abbildung 5.2: Bilder von ≈ 7 mg Lysozym in 5 mL DMF: (a) nativ, (b) nur mit PADA (5 mg) modifiziert (Lysozym vorher in DMF dispergiert) und (c) mit PMeOx₃₄ (81,3 mg) und PADA (5 mg) modifiziert.

Die Analyse der PMeOx₃₆-Lysozymkonjugate mittels SDS-PAGE zeigt, dass bei der Modifikation in der DMF-Puffer-Mischung die Bande des nativen Lysozym beinahe vollständig verschwunden ist, wobei unterschiedliche Modifizierungsgrade (3 - 7-fach) erhalten wurden (Abb. 5.3 a). Bei Verwendung von PMeOx₆₈, welches etwa das doppelte Molekulargewicht von PMeOx₃₆ besitzt, wurden diskrete Banden erhalten, welche die unterschiedlichen Modifizierungsgrade des Lysozyms repräsentieren (1 - 6 fach), allerdings ist die Bande des nativen Lysozyms noch deutlich sichtbar, d.h. die Modifizierungseffizienz ist bei einem längeren Polymer deutlich geringer (Abb. 5.3 b). Die Ergebnisse der SDS-PAGE wurden mittels SEC Untersuchungen bestätigt.

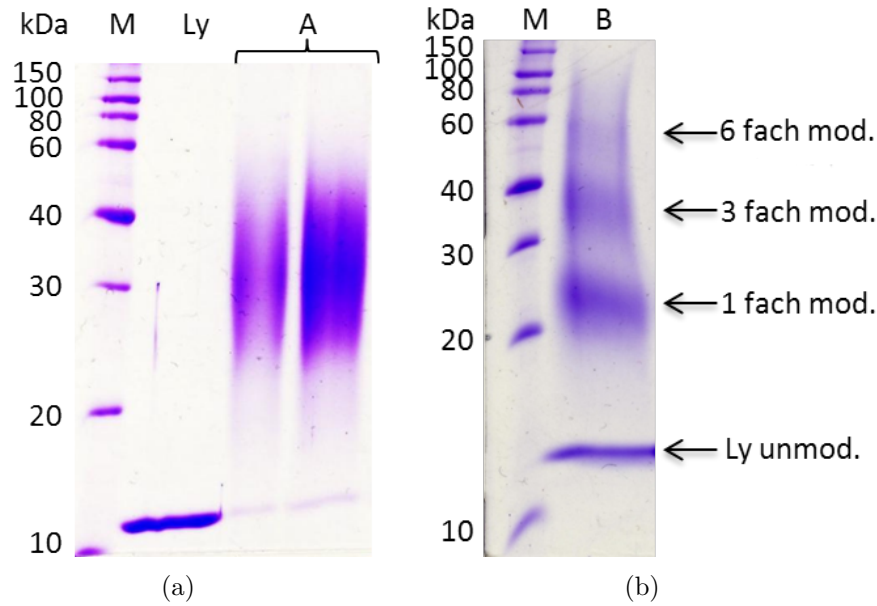


Abbildung 5.3: SDS-PAGE von Lysozym sowie der POX-Konjugate (modifiziert in DMF-Puffer-Mischung) nach Coomassiefärbung: (a) M, Marker; Ly, Lysozym; A, PMeOx₃₆-Lysozymkonjugat, (b) M, Marker; B, PMeOx₆₈-Lysozymkonjugat; 14 %iges Gel.

Es wurden aus den Enzymklassen der Hydrolasen und Oxidoreduktasen weitere 13 Enzyme mit den hydrophilen POX (PMeOx₃₆, PEtOx₄₀) modifiziert und mittels SDS-PAGE charakterisiert. Alle Enzyme wurden durch die Modifikation löslich in CHCl₃ und, sofern untersucht, auch in DMF (Tab. 5.1). Die Löslichkeit beträgt $\geq 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ (berechnet über die ursprüngliche Enzymeinwaage).

Tabelle 5.1: Auflistung der organolöslichen Konjugate bestehend aus den hydrophilen POX-Derivaten. Löslichkeit ist in diesem Kontext definiert als Transmission einer PEK-Dispersion von über 90 %, wenn nicht anders gekennzeichnet.

Enzym	Polymer	Lösungsmittel
Lysozym (Hühnereiweiß)	PMeOx ₃₆	DMF, CHCl ₃
	PMeOx ₆₀	DMF, CHCl ₃
	PEtOx ₄₀	DMF, CHCl ₃
Alkoholdehydrogenase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (ADH)	PMeOx ₃₆	CHCl ₃

Tabelle 5.1: Auflistung der organolöslichen Konjugate bestehend aus den hydrophilen POX-Derivaten. Löslichkeit ist in diesem Kontext definiert als Transmission einer PEK-Dispersion von über 90 %, wenn nicht anders gekennzeichnet.

Enzym	Polymer	Lösungsmittel
Alkoholdehydrogenase (Pferdeleber)	PMeO _{x36}	CHCl ₃
Laccase (<i>Trametes versicolor</i>)	PMeO _{x36}	CHCl ₃
Monoxygenase (<i>Bacillus megaterium</i>)	PMeO _{x36}	CHCl ₃
Peroxidase (Meerrettich)	PMeO _{x36}	CHCl ₃
Proteinase K (<i>Tritirachium album</i>)	PMeO _{x36}	DMF, CHCl ₃
Papain (<i>Carica papaya</i>)	PMeO _{x36}	DMF, CHCl ₃
Kollagenase (<i>Clostridium histolyticum</i>)	PMeO _{x36}	CHCl ₃
Trypsin (Schweinepankreas)	PMeO _{x36}	CHCl ₃
α -Chymotrypsin (Rinderpankreas)	PMeO _{x36}	DMF, CHCl ₃
	PEtO _{x40}	DMF, CHCl ₃
Lipase (<i>Candida antarctica</i>) (CaLB) ^a	PMeO _{x36}	DMF, CHCl ₃
	PMeO _{x60}	DMF, CHCl ₃
Lipase (<i>Rhizomucor miehei</i>) (RmL)	PMeO _{x36}	CHCl ₃
Lipase (<i>Candida rugosa</i>) (CrL)	PMeO _{x36}	DMF, CHCl ₃

^a Transmission über 70 %.

Durch eine Anpassung des Modifizierungsverfahrens ist es möglich, auch hydrophobere POX (PBuOx und PHeptOx Homo- und Diblockcopolymeren) für die Modifikation einzusetzen. Durch Einsatz eines S-PBuOx₅₀-*b*-PMeOx₁₂ Diblockcopolymeren wurden vier der untersuchten acht Enzyme THF-löslich, zwei sind zudem löslich in Toluol (Tab. 5.2). Die Löslichkeit beträgt $\geq 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ (berechnet über die ursprüngliche Enzymeinwaage).

Tabelle 5.2: Übersicht über die Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchungen der versch. S-PBuOx₅₀-*b*-PMeOx₁₂-Enzymkonjugate. Löslichkeit ist in diesem Kontext definiert als Transmission einer PEK-Dispersion von über 90 %, wenn nicht anders gekennzeichnet.

Enzym	Lösungsmittel	Löslichkeit
Lysozym (Hühnereiweiß)	THF, MeOH, EtOH, CHCl ₃	X
Trypsin (Schweinepankreas)	THF	X
α -Chymotrypsin (Rinderpankreas)	THF, CHCl ₃ , Toluol	X
Papain (<i>Carica papaya</i>)	THF	-
Proteinase K (<i>Tritirachium album</i>)	THF	-
Lipase (<i>Candida antartica</i>) ^a	THF, Toluol	X
Lipase (<i>Rhizomucor miehei</i>)	THF	-
Laccase (<i>Trametes versicolor</i>)	THF	-

^a Transmission über 70 %.

Durch die Verwendung eines PHeptOx₃₀ Homopolymers wurden von den untersuchten sechs Enzymen vier löslich in Toluol bzw. THF (Tab. 5.3). Die Löslichkeit beträgt $\geq 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ (berechnet über die ursprüngliche Enzymeinwaage).

Tabelle 5.3: Übersicht über die Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchungen der versch. PHeptOx₃₀-Enzymkonjugate. Löslichkeit ist in diesem Kontext definiert als Transmission einer PEK-Dispersion von über 90 %.

Enzym	Lösungsmittel	Löslichkeit
Lysozym (Hühnereiweiß)	Toluol	X
	THF	X
Laccase (<i>Trametes versicolor</i>)	THF	-
α -Chymotrypsin (Rinderpankreas)	Toluol	X
Papain (<i>Carica papaya</i>)	Toluol	-
	THF	-
Lipase (<i>Candida antartica</i>) ^a	THF	-
	Toluol	X
Lipase (<i>Rhizomucor miehei</i>)	Toluol	X

^a Transmission über 70 %.

Bei der Untersuchung der Aktivität der hergestellten Konjugate im wässrigen Medium zeigte sich, dass bei allen Enzymen ein Teil (max. Restaktivität 69 %) durch den Modifikationsprozess deaktiviert wird. Trotzdem sind die Konjugate von α -Chymotrypsin, einer Laccase, einer Peroxidase, sowie zweier Lipasen im organischen Medium aktiver als die in dem jeweiligen org. Lsgm. dispergierten nativen Enzyme. Vor allem unter Berücksichtigung der im Wässrigen bestimmten Restaktivitäten wurden enorme Aktivierungen erreicht. Die höchsten Aktivierungen wurden für die P_{MeOx}₃₆-Konjugate der Laccase (ca. 153000-fach), CrL (14900-fach) α -Chymotrypsin (ca. 1146-fach), der Peroxidase (ca. 255-fach) und der CaLB (ca. 549) in CHCl₃ erzielt. Unter Berücksichtigung des niedrigen Proteingehaltes von 14,7 bzw. 8,1 % der kommerziell erhältlichen CaLB liegt die Aktivität des Konjugates sogar über derjenigen der kommerziell erhältlichen geträgerten Form der CaLB (Novozyme 435). Bei 28 °C wurde, unter Berücksichtigung der im wässrigen Medium ermittelten Restaktivität, sogar eine 44-fache Aktivierung gegenüber Novozyme 435 erreicht. Im Gegensatz zu den nativen Enzymen zeigen die P_{MeOx}₃₆-CaLB-Konjugate in CHCl₃, genauso wie die S-P_{BuOx}₅₀-b-P_{MeOx}₁₂-Konjugate in THF, eine höhere Aktivität in trockenem Lösungsmittel als in Lösungsmitteln mit einer höheren Wasseraktivität. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Konjugation mit P_{MeOx} zu einer lokal erhöhten Wasserkonzentration an der Oberfläche der modifizierten Enzyme führt. Durch einen Vergleich der Aktivitäten von α -Chymotrypsinkonjugaten, hergestellt mit POX mit unterschiedlichem Molekulargewicht, gegenüber Substraten mit unterschiedlicher Molmasse, konnte außerdem gezeigt werden, dass Polymere mit einem höheren Molekulargewicht zu einer größeren sterischen Hinderung führen, was sich besonders bei hochmolekularen Substraten auswirkt.

5.2 Organolösliche Polymer-Coenzymkonjugate

Es wurden organolösliche Polymer-Coenzymkonjugate von NAD (NAD⁺ bzw. NADH) und NADP⁺ unter Verwendung von P_{MeOx}, P_{EtOx} und P_{HeptOx} synthetisiert. Das POX wurde hierbei direkt mit den Coenzymen terminiert (Abb. 5.4).

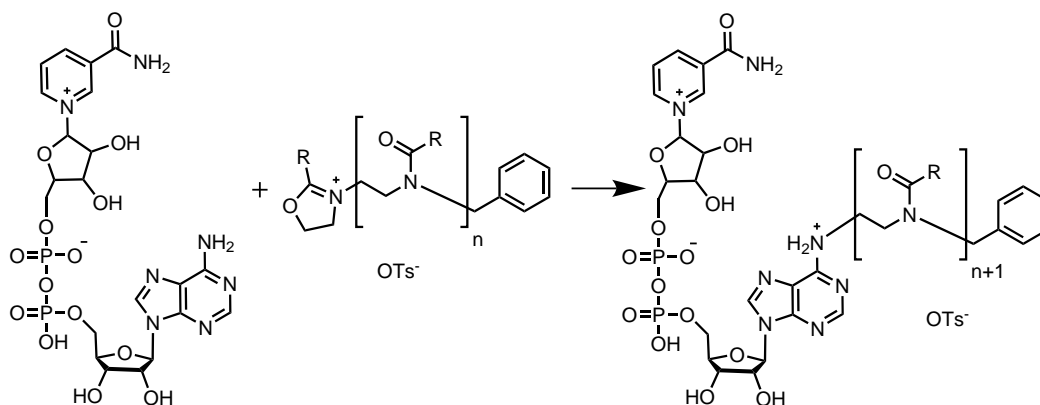


Abbildung 5.4: Darstellung der Synthese von POX-Coenzymkonjugaten mittels direkter Terminierung am Beispiel von NAD^+ und eines Poly(2-R-Oxazolins).

Mittels dieser direkten Terminierung in einer Emulsion aus Chloroform und Carbonatpuffer (0,5 mM, pH 9,65) wurden die Coenzyme NADP^+ , NADH und NAD^+ bei der Verwendung von PMeOx_{38} , PEtOx_{35} und S-PHeptOx_{37} - b - PMeOx_3 organolöslich (Abb. 5.5).

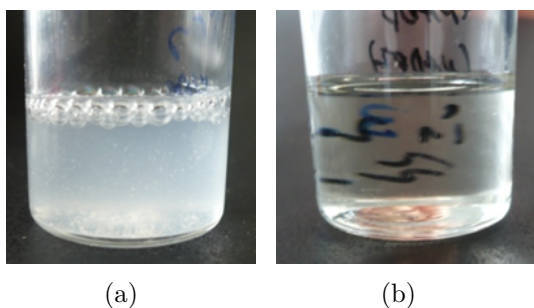


Abbildung 5.5: Bilder von ≈ 3 mg NADP^+ in 2 mL CHCl_3 : (a) nativ, (b) modifiziert mit PMeOx_{38} (die 3 mg beziehen sich auf den Anteil des reinen NADP^+ in der Probe).

Die PMeOx_{38} - NADH - und NAD^+ -Konjugate sind löslich in DMF, Acetonitril, Dichlormethan und CHCl_3 . Das PHeptOx_{37} - b - PMeOx_3 - NAD^+ -Konjugat ist ebenfalls CHCl_3 -löslich. Untersuchungen mittels GPC sowie $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie gaben Indizien nachweise für eine kovalente Bindung zwischen den Coenzymen und dem Polymer. Aktivitätsmessungen der PMeOx_{38} - NAD^+ -Konjugate im wässrigen Medium zeigen, dass die maximale Enzymaktivität bei der Verwendung eines Polymer zu Coenzymverhältnisses von 10:1 verglichen mit reinem NAD^+ zu einer 34 % geringeren Aktivität führt. Die Verwendung von PEtOx_{35} führt zu einer Aktivitätsabnahme von 48 % verglichen mit der maximalen Enzymaktivität unter Einsatz des nativen Coenzym.

Das $\text{PMeOx}_{38}\text{-NAD}^+$ -Konjugat, welches mit einem Polymer zu Coenzymverhältnis von 5:1 hergestellt wurde, weist allerdings eine maximale Aktivität ähnlich der des reinen NAD^+ auf.

5.3 Polymer-Enzymkonjugate für die asymmetrische Katalyse

Es ist gelungen, Polymer-Enzymkonjugate im organischen Medium als Liganden für die asymmetrische Dihydroxylierung nach SHARPLESS einzusetzen, hierbei wurde Styrol als Alken verwendet. Die besten Resultate wurden mit wassergesättigtem CHCl_3 als Lösungsmittel, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ als Kooxidationsmittel und PMeOx als Polymer erreicht. Unter Verwendung von $\text{PMeOx-}\alpha$ -Chymotrypsinkonjugaten wurde bei RT in wassergesättigtem Chloroform, im Gegensatz zum achiralen Liganden Pyridin, eine Bildung von 1-Phenylethan-1,2-diol, dem Dihydroxylierungsprodukt des Styrols, mittels HPLC nachgewiesen. Unter diesen Bedingungen wurde ein racemisches Produktgemisch erhalten. Eine Verringerung der Reaktionstemperatur bis auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ bei gleichzeitiger Erhöhung der Reaktionszeit führt zu einem signifikanten Anstieg des Enantiomerenüberschusses (ee) auf bis zu 19,4 % (S -Konfiguration) (Abb. 5.6), aber auch zu einer Verringerung der katalytischen Produktivität (TON , engl. *turnover number*).

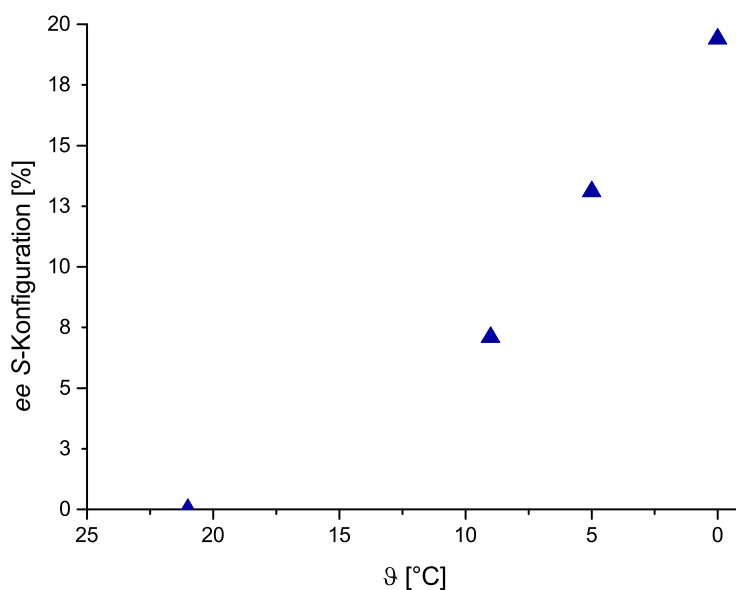


Abbildung 5.6: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses von der Reaktionstemperatur bei der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem CHCl_3 mittels $\text{PMeOx}_{38}\text{-}\alpha$ -Chymotrypsinkonjugat ($0,027 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$, $0,135$ äq. PEK bezogen auf den Katalysator) als Ligand; Enzymkonzentration bezogen auf die Enzymeinwaage vor der Modifikation; nach LEURS²⁴⁰.

Es wurden zwölf weitere Enzymkonjugate bei 0 °C Reaktionstemperatur als Liganden für die asymmetrische Dihydroxylierung untersucht und in allen Fällen konnte das Produkt 1-Phenylethan-1,2-diol nachgewiesen werden (Tab. 5.4).

Tabelle 5.4: TON und ee der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem CHCl_3 mittels unterschiedlicher PMeOx -Enzymkonjugate als Ligand, $c_{\text{Os}} = 0,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$; rot hervorgehoben sind Metalloenzyme.

Ligand	$c_{\text{Enzym}} [\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}]^a$	ϑ [°C]	t [d]	TON_{Os}^b	TON_{Enzym}^c	ee [%]
ADH	0,018 (0,09 äq.)	0	7	0,17	1,89	12,1 <i>S</i>
BSA	0,011 (0,055 äq.)	0	7	0,08	1,45	rac.
CaLB	0,021 (0,105 äq.)	0	8	0,19	1,81	rac.
α -Chymotrypsin	0,027 (0,135 äq.)	0	7	0,07	0,52	19,4 <i>S</i>
Collagenase	0,012 (0,06 äq.)	0	7	24,7	410,8	25,2 <i>R</i>
CrL	0,012 (0,06 äq.)	0	7	0,07	1,17	11,6 <i>S</i>
Laccase	0,026 (0,13 äq.)	0	7	0,11	0,85	15,2 <i>R</i>
Lysozym	0,048 (0,24 äq.)	0	7	0,29	1,21	rac.
Monooxygenase	0,006 (0,03 äq.)	5	4	0,08	2,67	8,2 <i>S</i>
Peroxidase	0,016 (0,08 äq.)	0	7	0,09	1,13	11,8 <i>S</i>
Proteinase K	0,024 (0,12 äq.)	0	6	0,08	0,67	6,2 <i>S</i>
RmL	0,018 (0,09 äq.)	0	8	0,37	4,11	9,9 <i>S</i>
Trypsin	0,12 (0,6 äq.)	0	6	0,07	0,12	28,8 <i>S</i>

^a Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx_{38} ; die in Klammern angegebenen PEK äq. sind bezogen auf den Katalysator.

^b Eine TON_{Os} von 1 entspricht einem Umsatz von 0,2 % (2 μmol) Styrol.

^c Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmenge vor der Funktionalisierung mit PMeOx_{38} , 1 TON_{Enzym} entspricht 0,27 μmol .

In drei Fällen wurden racemische Produktgemische erhalten, in sieben Fällen das *S*-Enantiomer und nur in zwei Fällen das *R*-Enantiomer. Es lässt sich also über die Wahl des Enzyms steuern, welches Enantiomer bevorzugt gebildet wird. Mit Hilfe von versch. Kontrollexperimenten, bei denen nur racemische Produktgemische erhalten wurden, wurde nachgewiesen, dass für die Enantioselektivität der Reaktion das Vorhandensein von Polymer-Enzymkonjugaten erforderlich ist. Es zeigte sich, dass die Polymer-Metalloenzymkonjugate besonders geeignete Liganden darstellen. Die Metalloenzymkonjugate einer Laccase (aus *Trametes versicolor*) und Collagenase (aus *Clostridium*

histolyticum) wurden daher genauer untersucht. Eine Erhöhung des Konjugat zu Katalysatorverhältnisses um den Faktor zwei bzw. vier führt bei beiden Konjugaten zu einer deutlichen Erhöhung des *ee* bis auf 92,6 % (*R*) bei den Laccasekonjugaten (Abb. 5.7), auch wenn die Konjugate weiterhin in molarem Unterschuss im Verhältnis zum Osmiumkatalysator eingesetzt wurden.

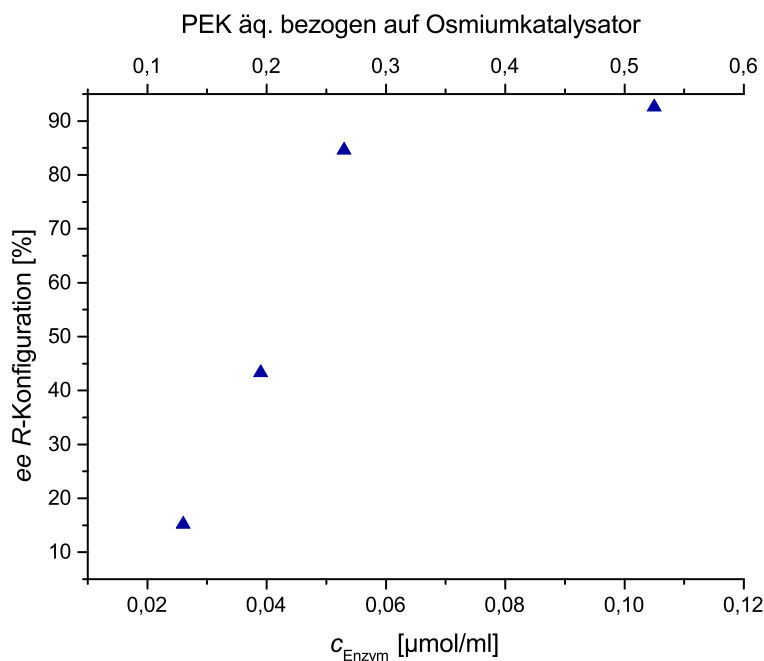


Abbildung 5.7: Abhängigkeit des *ee* vom PEK zu Osmiumkatalysatorverhältnis bzw. der PEK-Konzentration bei der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem CHCl_3 mittels PMeOx_{38} -Laccasekonjugat als Ligand; Enzymkonzentration bezogen auf die Enzymeinwaage vor der Modifikation; nach LEURS²⁴⁰.

Durch eine Verkürzung der Reaktionszeit von sieben auf drei Tage wurde sogar ein *ee* von 99,4 % (*R*) erreicht. Dieser Wert ist zudem größer als der, welcher mittels kommerziell erhältlicher SHARPLESS-Katalysator-Ligandensysteme unter Standardbedingungen für die Umsetzung von Styrol zu 1-Phenylethan-1,2-diol erzielt wurde, hier lag der *ee* bei 97 %.

Um die Möglichkeit eines gezielten Metallaustausches zwischen dem Metalloenzym und dem verwendeten Osmiumkatalysator zu untersuchen, wurde aus den Laccasekonjugaten mittels EDTA gezielt das Typ 1 Kupfer entfernt. Die Entfernung wurde durch eine Aktivitätsmessung bestätigt. Durch die Entfernung des Typ 1 Kupfers wurde, bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen eine signifikante Steigerung des *ee* um das ca. 1,4-fache sowie der *TON* um das 64-fache beobachtet. Dieses Resultat unterstützt die Annahme, dass das Kupferion gegen den Osmiumkatalysator ausge-

tauscht wird. Neben Styrol wurden noch die Alkene 1*H*-Inden, 1,2-Dihydronaphthalin, 4-Methylstyrol und α -Methylstyrol als Edukte für die asymmetrische Dihydroxylierung mit Laccasekonjugaten verwendet. Die beiden Alkene 1*H*-Inden und 1,2-Dihydronaphthalin wurden erfolgreich zu den jeweiligen Dihydroxylierungsprodukten umgesetzt, wobei die erhaltenen Enantiomerenüberschüsse mit Literaturwerten vergleichbar sind, welche bei der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels versch. Streptavidin-Mutanten im Wässrigen erzielt wurden.

Ein Versuch zur Tandemkatalyse wurde erfolgreich durchgeführt, hierbei wurde durch Kombination der eigentlichen enzymatischen Aktivität eines PMeOx-CaLB-Konjugates sowie dessen Funktion als Ligand in der asymmetrischen Dihydroxylierung Styrol zu 1-Phenylethan-1,2-diol umgesetzt und anschließend enzymatisch mit Laurinsäure verestert.

Literaturverzeichnis

1. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6th ed., Springer-Verlag, Heidelberg, Dordrecht, London, New York, **2011**.
 2. Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C., *Industrial biotransformations*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
 3. Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K., Engineering the thirdwave of biocatalysis. *Nature* **2012**, 485, 185–194.
 4. Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E.; Cech, T. R., Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **1982**, 31, 147–157.
 5. Breuer, M.; Stürmer, R., Chemie und Biologie Hand in Hand. Enzyme als Katalysatoren. *Chemie in unserer Zeit* **2006**, 40, 104–111.
 6. Schmid, S.; Hollmann, F.; Park, J. B.; Bühler, B., The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13, 359–366.
 7. Erickson, B.; Nelson, J. E.; Winters, P., Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnology Journal* **2012**, 7, 176–185.
 8. Kühne, W., Ueber das Verhalten verschiedener organisirter und sog. ungeformter Fermente. *FEBS Letters* **1976**, 62, E4–E7.
 9. Bommarius, A. S.; Riebel-Bommarius, B. R., *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
 10. Berg, N. J.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemie*, 5th ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2003**.
 11. Nicholls, D.; Ferguson, S., *Bioenergetics 3*, Academic Press, Massachusetts, **2002**.
 12. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman und Company, New York, **2005**.
-

13. Chen, L. H.; Kenyon, G. L.; Curtin, F.; Harayama, S.; Bembenek, M. E.; Hajipour, G.; Whitman, C. P., 4-Oxalocrotonate tautomerase, an enzyme composed of 62 amino acid residues per monomer. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 17716–17721.
 14. Smith, S., The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB Journal* **1994**, 8, 1248–1259.
 15. Furnham, N.; Holliday, G. L.; de Beer, T. A.; Jacobsen, J. O.; Pearson, W. R.; Thornton, J. M., The Catalytic Site Atlas 2.0: cataloging catalytic sites and residues identified in enzymes. *Nucleic Acids Research* **2014**, 42, D485–D489.
 16. Álvaro, G.; Illanes, A., *Enzyme Biocatalysis - Principles and Applications*; Illanes, A., Ed., Springer-Verlag, Heidelberg, Dordrecht, London, New York, **2008**.
 17. Enzyme nomenclature database., <http://enzyme.expasy.org/>.
 18. Krishna, S. H., Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advances* **2002**, 20, 239–267.
 19. Veit, T., Biocatalysis for the production of cosmetic ingredients. *Engineering in Life Sciences* **2004**, 4, 508–511.
 20. Rouhi, A. M., Chirality at work. *Chemical & Engineering News* **2003**, 81, 56–61.
 21. Stinson, S. C., Counting on chiral drugs. *Chemical & Engineering News* **1998**, 76, 83–104.
 22. Facci, P., *Biomolecular Electronics: Bioelectronics and the Electrical Control of Biological Systems and Reactions*; Micro and Nano Technologies, Elsevier, Amsterdam, **2014**.
 23. Drauz, K., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, 2nd ed.; Drauz, K., Waldmann, H., Eds., Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
 24. Metzler, D. E., *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*, 2nd ed., Academic Press, Massachusetts, **2001**.
 25. Walsh, C., Flavin Coenzymes: At the Crossroads of Biological Redox Chemistry. *Accounts of Chemical Research* **1980**, 13, 148–155.
 26. Zhu, X.; Liu, Y.; Cheng, J., Which Hydrogen Atom Is First Transferred in the NAD(P)H Model Hantzsch Ester Mediated Reactions via One-Step and Multistep Hydride Transfer? *Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, 8980–8981.
-

27. Weckbecker, A.; Gröger, H.; Hummel, W., Regeneration of Nicotinamide Co-enzymes: Principles and Applications for the Synthesis of Chiral Compounds. *Biosystems Engineering I* **2010**, 195–242.
 28. Schulz, F.; Leca, F.; Hollmann, F.; Reetz, M. T., Towards practical biocatalytic Baeyer-Villiger reactions: applying a thermostable enzyme in the gram-scale synthesis of optically-active lactones in a two-liquid-phase system. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2005**, 1.
 29. Gerhards, T., Einfluss unkonventioneller Medien auf die Selektivität ThDP-abhängiger Enzyme., Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, **2012**.
 30. Hammond, D. A.; Karel, M.; Klibanov, A. M.; Krukonis, V. J., Enzymatic reactions in supercritical gases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1985**, 11, 393–400.
 31. Magnuson, D. K.; Bodley, J. W.; Evans, D. F., The Activity and Stability of Alkaline-Phosphatase in Solutions of Water and the Fused Salt Ethylammonium Nitrate. *Journal of Solution Chemistry* **1984**, 13, 583–587.
 32. Maugard, T.; Lamare, S.; Legoy, M. D., Gas phase biotransformation reaction catalyzed by baker's yeast. *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, 73, 164–168.
 33. McGuffee, S. R.; Elcock, A. H., Diffusion, crowding & protein stability in a dynamic molecular model of the bacterial cytoplasm. *PLoS Computational Biology* **2010**, 6, 398–403.
 34. Carrea, G.; Riva, S., Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angewandte Chemie, International Edition* **2000**, 39, 2226–2254.
 35. Sym, E. A., Über die Esterasewirkung III. *Biochemische Zeitschrift* **1933**, 258, 304–324.
 36. Klibanov, A. M.; Samokhin, G. P.; Martinek, K.; Berezin, I. V., A New Approach to Preparative Enzymatic Synthesis. *Biotechnology and Bioengineering* **1977**, 19, 1351–1361.
 37. Zaks, A.; Klibanov, A. M., Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100°C. *Science* **1984**, 15, 1249–1251.
 38. Zaks, A.; Klibanov, A. M., Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, 82, 3192–3196.
-

39. Zaks, A.; Klivanov, A. M., Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263, 3194–3201.
 40. Khmelnitsky, Y. L.; Rich, O. J., Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, 3, 47–53.
 41. Dech, S., Entwicklung von amphiphilen Poly(2-oxazolin)-basierten Polymerco-netzwerken zur Trägerung von Biokatalysatoren., Dissertation, TU-Dortmund, Dortmund, **2013**.
 42. Klivanov, A. M., Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **2001**, 409, 241–246.
 43. Kim, M. J.; Choi, M. Y.; Lee, J. K.; Ahn, Y., Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: Significantly enhanced reactivity and regioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, 26, 115–118.
 44. Wescott, C. R.; Klivanov, A. M., The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology* **1994**, 1206, 1–9.
 45. Verger, R., 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* **1997**, 15, 32–38.
 46. Reetz, M. T., Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, 6, 145–150.
 47. Gupta, M. N., Enzyme function in organic solvents. *European Journal of Biochemistry* **1992**, 203, 25–32.
 48. Klivanov, A. M., Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology* **1997**, 15, 97–101.
 49. Carrea, G.; Ottolina, G.; Riva, S., Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends in Biotechnology* **1995**, 13, 63–70.
 50. Hou, C. T., *Handbook of Industrial Biocatalysis*, CRC Press, Boca Raton, **2005**.
 51. Klivanov, A. M., Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends in Biochemical Sciences* **1989**, 14, 141–144.
 52. Zaks, A.; Klivanov, A. M., The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263, 8017–8021.
 53. Allen, G., *Protein*, Elsevier, Amsterdam, **1999**.
-

-
54. Li, C.; Tan, T.; Zhang, H.; Feng, W., Analysis of the Conformational Stability and Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Solvents: Insight from Molecular Dynamics and Quantum Mechanics/Simulations. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 28434–28441.
 55. Khmelnitsky, Y. L.; Mozhaev, V. V.; Belova, A. B.; Sergeeva, M. V.; Martinek, K., Denaturation capacity - A new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. *European Journal of Biochemistry* **1991**, 198, 31–41.
 56. Griebenow, K.; Klibanov, A. M., On Protein Denaturation in Aqueous-Organic Mixtures but Not in Pure Organic Solvents. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 11695–11700.
 57. Griebenow, K.; Klibanov, A. M., Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, 92, 10969–10976.
 58. Carrea, G., Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems. *Trends in Biotechnology* **1984**, 2, 102–106.
 59. Straathof, A. J. J., Enzymatic catalysis via liquid-liquid interfaces. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, 83, 371–375.
 60. Blanco, R. M.; Halling, P. J.; Bastida, A.; Cuesta, C.; Guisáun, J. M., Effect of immiscible organic solvents on activity/stability of native chymotrypsin and immobilized-stabilized derivatives. *Biotechnology and Bioengineering* **1992**, 39, 75–84.
 61. Baldascini, H.; Janssen, D. B., Interfacial inactivation of epoxide hydrolase in a two-liquid-phase system. *Enzyme and Microbial Technology* **2005**, 36, 285–293.
 62. Gröger, H.; May, O.; Hüsken, H.; Georgeon, S.; Drauz, K.; Landfester, K., Enantioselective Enzymatic Reactions in Miniemulsions as Efficient Nanoreactors. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 1645–1648.
 63. Carvalho, C. M. L.; Cabral, J. M. S., Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* **2000**, 82, 1063–1085.
 64. Castro, G.; Knubovets, T., Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. *Critical Reviews in Biotechnology* **2003**, 23, 195–231.
 65. Eggers, D. K.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M., Extractive catalysis-Solvent effects on equilibria of enzymatic-reactions in 2-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology* **1989**, 11, 84–89.
-

66. Paradkar, V. M.; Dordick, J. S., Aqueous-Like Activity of α -Chymotrypsin Dissolved in Nearly Anhydrous Organic Solvents. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, 5009–5010.
 67. Bruns, N., Design von amphiphilen Conetzwerken zur Generierung von nanoskaligen Reaktionsräumen für Biotransformationen in nichtwässrigen Medien., Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br., **2006**.
 68. Romaškevič, T.; Budrienė, S.; Pielichowski, K.; Pielichowski, J., Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. *Chemija* **2006**, 17, 74–98.
 69. Sheldon, R. A., Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology* **2011**, 92, 467–477.
 70. May, S. W., New applications for biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, 8, 181–186.
 71. Cao, L., *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
 72. Dech, S.; Cramer, T.; Ladisch, R.; Bruns, N.; Tiller, J. C., Solid-solid interface adsorption of proteins and enzymes in nanophase-separated amphiphilic conetworks. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 1594–1601.
 73. Dech, S.; Wruk, V.; Fik, C. P.; Tiller, J. C., Amphiphilic polymer conetworks derived from aqueous solutions for biocatalysis in organic solvents. *Polymer* **2012**, 53, 701–707.
 74. Schönfeld, I.; Dech, S.; Ryabenky, B.; Daniel, B.; Glowacki, B.; Ladisch, R.; Tiller, J. C., Investigations on Diffusion Limitations of Biocatalyzed Reactions in Amphiphilic Polymer Conetworks in Organic Solvents. *Biotechnology and Bioengineering* **2013**, 110, 2333–2342.
 75. Bruns, N.; Tiller, J. C., Amphiphilic Network as Nanoreactor for Enzymes in Organic Solvents. *Nano Letters* **2005**, 5, 45–48.
 76. Bruns, N.; Tiller, J. C., Nanophasic amphiphilic conetworks with a fluorophilic phase. *Macromolecules* **2006**, 39, 4386–4394.
 77. Bruns, N.; Bannwarth, W.; Tiller, J. C., Amphiphilic conetworks as activating carriers for the enhancement of enzymatic activity in supercritical CO₂. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, 101, 19–26.
 78. Savin, G.; Bruns, N.; Thomann, Y.; Tiller, J., Nanophase separated amphiphilic microbeads. *Macromolecules* **2005**, 38, 7536–7539.
-

79. Sukumar, N.; Biswal, B. K.; Vijayan, M., Structures of orthorhombic lysozyme grown at basic pH and its low-humidity variant. *Acta Crystallographica* **1999**, 55, 934–937.
 80. Takahashi, K.; Nishimura, H.; Yoshimoto, T.; Okada, M.; Ajima, A.; Matsushima, A.; Tamaura, Y.; Saito, Y.; Inada, Y., Polyethylene glycol-modified enzymes trap water on their surface and exert enzymatic activity in organic solvents. *Biotechnology Letters* **1984**, 6, 765–770.
 81. DeSantis, G.; Jones, J. B., Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Current Opinion in Biotechnology* **1999**, 10, 324–330.
 82. Herman, S.; Hooftman, G.; Schacht, E., Poly(Ethylene Glycol) with Reactive Endgroups: I. Modification of Proteins. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **1995**, 10, 145–187.
 83. Zalipsky, S., Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, 16, 157–182.
 84. Matsushima, A.; Kodera, Y.; Hiroto M. Nishimura, H.; Inada, Y., Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1996**, 2, 1–17.
 85. Hooftman, G.; Herman, S.; Schacht, E., Review: Poly(Ethylene Glycol)s with Reactive Endgroups. II. Practical Consideration for the Preparation of Protein-PEG Conjugates. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **1996**, 11, 135–159.
 86. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 459–476.
 87. Miyamoto, M.; Naka, K.; Shiozaki, M.; Chujo, Y.; Saegusa, T., Preparation and enzymic activity of poly[(N-acylimino)ethylene]-modified catalase. *Macromolecules* **1990**, 23, 3201–3205.
 88. Veronese, F. M.; Pasut, G., PEGylation of Proteins as Tailored Chemistry for Optimized Bioconjugates. *Advances in Polymer Science* **2006**, 192, 95–134.
 89. Davis, F. F., The origin of peganology. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 457–458.
 90. Harris, J. M.; Martin, N. E; Modi, M., Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics* **2001**, 40, 539–551.
 91. Fee, C. J.; Van Alstine, J. M., PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chemical Engineering Science* **2006**, 61, 924–939.
-

-
92. Abuchowski, A.; McCoy, J. R.; Palczuk, N. C.; van Es, T.; Davis, F. F., Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry* **1977**, 252, 3582–3586.
 93. Abuchowski, A.; van Es, T.; Palczuk, N. C.; Davis, F. F., Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene Glycol. *Journal of Biological Chemistry* **1977**, 252, 3578–3581.
 94. Inada, Y.; Furukawa, M.; Sasaki, H.; Kodera, Y.; Hiroto, M.; Nishimura, H.; Matsushima, A., Biomedical and biotechnological applications of PEG- and PM-modified proteins. *Trends in Biotechnology* **1995**, 13, 86–91.
 95. Inada, Y.; Takahashi, K.; Yoshimoto, T.; Ajima, A.; Matsushima, A.; Saito, Y., Application of polyethylene glycol-modified enzymes in biotechnological processes: organic solvent-soluble enzymes. *Trends in Biotechnology* **1986**, 4, 190–194.
 96. Baillargeon, M. W.; Sonnet, P. E., Polyethylene Glycol Modification of *Candida rugosa* Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1988**, 65, 1812–1815.
 97. Pina, C.; Clark, D.; Blanch, H., The activity of PEG-modified chymotrypsin in aqueous and organic media. *Biotechnology Techniques* **1989**, 3, 333–338.
 98. Takahashi, K.; Nishimura, H.; Yoshimoto, T.; Saito, Y.; Inada, Y., A chemical modification to make horseradish peroxidase soluble and active in benzene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1984**, 121, 261–265.
 99. Takahashi, K.; Ajima, A.; Yoshimoto, T.; Inada, Y., Polyethylene glycol-modified catalase exhibits unexpectedly high activity in benzene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1984**, 125, 761–766.
 100. Lee, H.; Takahashi, K.; Kodera, Y.; Ohwada, K.; Tsuzuki, T.; Matsushima, A.; Inada, Y., Polyethylene glycol-modified papain catalyzes peptide bond formation in benzene. *Biotechnology Letters* **1988**, 10, 403–407.
 101. Sherman, M. R.; Saifer, M. G. P.; Perez-Ruiz, F., PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, 60, 59–68.
 102. Armstrong, J. K.; Hempel, G.; Koling, S.; Chan, L. S.; Fisher, T.; Meiselman, H. J.; Garratty, G., Antibody against poly-(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* **2007**, 110, 103–111.
-

103. Fijten, M. W. M.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S., Initiator Effect on the Cationic Ring-Opening Copolymerization of 2-Ethyl-2-Oxazoline and 2-Phenyl-2-Oxazoline. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, *12*, 4804–4816.
 104. Hoogenboom, R., Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 7978–7994.
 105. Wiesbrock, F.; Hoogenboom, R.; Leenen, M. A. M.; Meier, M. A. R.; Schubert, U. S., Investigation of the Living Cationic Ring-Opening Polymerization of 2-Methyl-, 2-Ethyl-, 2-Nonyl-, and 2-Phenyl-2-oxazoline in a Single-Mode Microwave Reactor. *Macromolecules* **2005**, *38*, 5025–5034.
 106. Wiesbrock, F.; Hoogenboom, R.; Abeln, C. H.; Schubert, U. S., Single-Mode Microwave Ovens as New Reaction Devices: Accelerating the Living Polymerization of 2-Ethyl-2-Oxazoline. *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, *25*, 1895–1899.
 107. Mero, A.; Pasut, G.; Via, L. D.; Fijten, M. W. M.; Schubert, U. S.; Hoogenboom, R.; Veronese, F. M., Synthesis and characterization of poly(2-ethyl 2-oxazoline)-conjugates with proteins and drugs: Suitable alternatives to PEG-conjugates? *Journal of Controlled Release* **2008**, *125*, 87–95.
 108. Krumm, C.; Fik, C. P.; Meuris, M.; Dropalla, G. J.; Geltenpoth, H.; Sickmann, A.; Tiller, J. C., Well-defined amphiphilic poly(2-oxazoline) ABA triblock copolymers and their aggregation behavior in aqueous solution. *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33*, 1677–1682.
 109. Waschinski, C. J.; Barnert, S.; Theobald, A.; Schubert, R.; Kleinschmidt, F.; Hoffmann, A.; Saalwächter K. and Tiller, J. C., Insights in the antibacterial action of poly(methyloxazoline)s with a biocidal end group and varying satellite groups. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1764–1771.
 110. Waschinski, C. J.; Herdes, V.; Schueler, F.; Tiller, J. C., Influence of satellite groupson telechelic antimicrobial functions of polyoxazolines. *Macromolecular Bioscience* **2005**, *5*, 149–156.
 111. Krumm, C.; Harmuth, S.; Hijazi, M.; Neugebauer, B.; Kampmann, A. L.; Geltenpoth, H.; Sickmann, A.; Tiller, J. C., Antimicrobial Poly(2-methyloxazoline)s with Bioswitchable Activity through Satellite Group Modification. *Macromolecular Rapid Communications* **2014**, *53*, 3830–3834.
-

-
112. Tong, J.; Luxenhofer, R.; Yi, X.; Jordan, R.; Kabanov, A. V., Protein Modification with Amphiphilic Block Copoly(2-oxazoline)s as a New Platform for Enhanced Cellular Delivery. *Molecular Pharmaceutics* **2010**, 7, 984–992.
113. Tong, J.; Yi, X.; Luxenhofer, R.; Banks, W. A.; Jordan, R.; Zimmerman, M. C.; Kabanov, A. V., Conjugates of Superoxide Dismutase 1 with Amphiphilic Poly(2-oxazoline) Block Copolymers for Enhanced Brain Delivery: Synthesis, Characterization and Evaluation in Vitro and in Vivo. *Molecular Pharmaceutics* **2013**, 10, 360–377.
114. Viegas, T. C.; Bentley, M. D.; Harris, J. M.; Fang, Z.; Yoon, K.; Dizman, B.; Weimer, R.; Mero, A.; Pasut, G.; Veronese, F. M., Polyoxazoline: Chemistry, Properties, and Applications in Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, 22, 976–986.
115. Luxenhofer, R.; Han, Y.; Schulz, A.; Tong, J.; He, Z.; Kabanov, A. V.; Jordan, R., Poly(2-oxazoline)s as polymer therapeutics. *Bioconjugate Chemistry* **2012**, 33, 1613–1631.
116. Naka, K.; Chujo, Y.; Miyamoto, M.; Saegusa, T., Chemical Modification of Lipase with Poly[(N-Acylimino)ethylene]s Having a Hydrophobic Component at the Polymer End. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* **1997**, 34, 123–132.
117. Naka, K.; Miyamoto, M.; Chujo, Y.; Saegusa, T., Preparation and Esterification Activity of Poly[(N-Propionyl)-Iminoethylene] Modified Lipase from *Candida Cylindracea*. *Biocatalysis and Biotransformation* **1997**, 15, 91–100.
118. Naka, K.; Chujo, Y.; Miyamoto, M.; Saegusa, T., Effect of Modifier on Enzymatic Function of Poly[(N-Acylimino)ethylene]-Modified Lipases in Organic Solvents. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **1997**, 34, 35–48.
119. Naka, K.; Miyamoto, M.; Chujo, Y.; Saegusa, T., Effect of solvent polarity on enzymatic function of poly [(N-acylimino)ethylene] modified lipase. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* **1999**, 75, 49–53.
120. Naka, K.; Ohki, A.; Maeda, S., Amphiphilic block copolymer-horseradish peroxidase aggregate as a new polymer-enzyme hybrid in organic solvents. *Chemistry Letters* **1991**, 20, 1303–1306.
121. Naka, K.; Nakamura, T.; Ohkia, A.; Maeda, S., Amphiphilic Block Copolymer-Lipase Aggregate in Aqueous-Organic Media. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* **1997**, 34, 587–595.
-

-
122. Bückmann, A. F., A new synthesis of coenzymically active water-soluble macromolecular NAD and NADP derivatives. *Biocatalysis* **1987**, 1, 173–186.
 123. Wykes, J. R.; Dunnill, P.; Lilly, M. D., The preparation of soluble high molecular weight NAD derivative active as a cofactor. *Biochimica et Biophysica Acta* **1972**, 286, 260–268.
 124. Zappelli, P.; Rossodivita, A.; Re, L., Synthesis of Coenzymically Active Soluble and Insoluble Macromolecularized NAD⁺ Derivatives. *European Journal of Biochemistry* **1975**, 54, 475–482.
 125. Yoshikawa, M.; Goto, M.; Ikura, K.; Sasaki, R.; Chiba, H., Transglutaminase-catalysed Formation of Coenzymatically Active NAD⁺ Analog Casein Conjugates. *Agricultural and Biological Chemistry* **1982**, 46, 207–213.
 126. Okuda, K.; Urabe, I.; Okuda, H., Synthesis of poly(ethylene glycol)-bound NADP by selective modification at the 6-amino group of NADP. *European Journal of Biochemistry* **1985**, 151, 33–38.
 127. Bückmann, A. F.; Carrea, G., Synthesis and Application of Water-Soluble Macromolecular Derivatives of the Redox Coenzymes NAD(H), NADP(H) and FAD. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **1989**, 39, 97–152.
 128. Stinson, S. C., CHIRAL TRIUMPHS. *Chemical & Engineering News* **1999**, 77, 57–65.
 129. Thomas, C. M.; Ward, T. R., Artificial metalloenzymes: proteins as hosts for enantioselective catalysis. *Chemical Society Reviews* **2005**, 34, 337–346.
 130. Weitkamp, J.; Gläser, R., *Chemische Technik: Prozesse und Produkte*, 5th ed.; Dittmeyer, R., Keim W. Kreysa, G., Oberholz, A., Eds., Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
 131. Pordea, A.; Ward, T. R., Artificial Metalloenzymes: Combining the Best Features of Homogeneous and Enzymatic Catalysis. *Synlett* **2009**, 20, 3225–3236.
 132. Gillespie, J. A.; Dodds, D. L.; Kamer, C. J., Rational design of diphosphorus ligands - a route to superior catalysts. *Dalton Transactions* **2010**, 39, 2751–2764.
 133. Lewis, J. C., Artificial Metalloenzymes and Metallopeptide Catalysts for Organic Synthesis. *ACS Catalysis* **2013**, 3, 2954–2975.
 134. Katsuki, T.; Sharpless, K. B., The first practical method for asymmetric epoxidation. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, 102, 5974–5976.
 135. Kolb, H. C.; Van Nieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B., Catalytic Asymmetric Dihydroxylation. *Chemical Reviews* **1994**, 94, 2483–2547.
-

-
136. Steinreiber, J.; Ward, T. R., Artificial metalloenzymes as selective catalysts in aqueous media. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, 252, 751–766.
 137. Yamamura, K.; Kaiser, E. T., Studies on the oxidase activity of copper(II) carboxypeptidase A. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1976**, 20, 830–831.
 138. Fernández-Gacio, A.; Codina, A.; Fastrez, J.; Riant, O.; Soumillion, P., Transforming Carbonic Anhydrase into Epoxide Synthase by Metal Exchange. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **2006**, 7, 1013–1016.
 139. Levine, H. L.; Nakagawa, Y.; Kaiser, E. T., Flavopapain: Synthesis and properties of semi-synthetic enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1977**, 76, 67–70.
 140. Colonna, S.; Gaggero, N.; Leone, M., Enantioselective oxidation of sulphides to sulphoxides in the presence of bovine serum albumin. *Tetrahedron* **1991**, 47, 8385–8398.
 141. Colonna, S.; Manfredi, A., Catalytic asymmetric weitz-scheffer reaction in the presence of bovine serum albumin. *Tetrahedron Letters* **1986**, 27, 387–390.
 142. Kokubo, T.; Sugimoto, T.; Uchida, T.; Tanimoto, S.; Okano, M., The Bovine Serum Albumin-2-Phenylpropane-1,2-diolatodioxo-osmium(VI) Complex as an Enantioselective Catalyst for *cis*-Hydroxylation of Alkenes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1983**, 14, 769–770.
 143. Allard, M.; Dupont, C.; Muñoz Robles, V.; Doucet, N.; Lledós, A.; Maréchal, J. D.; Urvoas, A.; Mahy, J. P.; Ricoux, R., Incorporation of Manganese Complexes into Xylanase: New Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Epoxidation. *ChemBioChem* **2011**, 13, 240–251.
 144. Colonna, S.; Manfredi, A.; Spadoni, M., The effect of organic cosolvents on the enantioselectivity in the bovine serum albumin catalyzed Weitz-Scheffer condensation. *Tetrahedron Letters* **1987**, 28, 1577–1580.
 145. Laan, W.; Muñoz, B. K.; den Heeten, R.; Kamer, P. C. J., Artificial Metalloenzymes through Cysteine-Selective Conjugation of Phosphines to Photoactive Yellow Protein. *ChemBioChem* **2010**, 11, 1236–1239.
 146. Fogg, D. E.; dos Santos, E. N., Tandem catalysis: a taxonomy and illustrative review. *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, 248, 2365–2379.
-

-
147. Kazemi, F.; Massah, A. R.; Javaherian, M., Chemoselective and scalable preparation of alkyl tosylates under solvent-free conditions. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5083–5087.
148. Witte, H.; Seeliger, W., Cyclische Imidsäureester aus Nitrilen und Aminoalkoholen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1974**, *6*, 996–1009.
149. Lee, S. C.; Kang, S. W.; Kim, C.; Kwon, I. C.; Jeong, S. Y., Synthesis and characterization of amphiphilic poly(2-ethyl-2-oxazoline)/poly(ϵ -caprolactone) alternating multiblock copolymers. *Polymer* **2000**, *41*, 7091–7097.
150. Mancheño, J. M.; Pernas, M. A.; Martínez, M. J.; Ochoa, B.; Rúa, M. L.; Hermoso, J. A., Structural insights into the lipase/esterase behavior in the *Candida rugosa* lipases family: crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *332*, 1059–1069.
151. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A., The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **1994**, *2*, 293–308.
152. Macario, A.; Moliner, M.; Corma, A.; Giordano, G., Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. *Microporous and Mesoporous Materials* **2009**, *118*, 334–340.
153. Derewendat, Z. S.; Derewenda, U., The Crystal and Molecular Structure of the *Rhizomucor miehei* Triacylglyceride Lipase at 1.9 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **1992**, *227*, 818–839.
154. Van den Berg, B.; Chung, E. W.; Robinson, C. V.; Dobson, C., Characterisation of the dominant oxidative folding intermediate of hen lysozyme. *Journal of Molecular Biology* **1999**, *290*, 781–796.
155. Canfield, R., The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry* **1963**, *238*, 2698–2707.
156. Chatani, E.; Hayashi, R., Functional and structural roles of constituent amino acid residues of bovine pancreatic. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2001**, *92*, 98–107.
157. Smyth, D. G.; Stein, W. H.; Moore, S., The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations. *The Journal of Biological Chemistry* **1963**, *238*, 227–234.
158. Jörnvall, H., The Primary Structure of Yeast Alcohol Dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* **1977**, *72*, 425–442.
-

-
159. Bennetzen, J. L.; Hall, B. D., *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* **1982**, 257, 3018–3025.
160. Ramaswamy, S.; Eklund, H.; Plapp, B. V., Structures of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase Complexed with NAD⁺ and Substituted Benzyl Alcohols. *Biochemistry* **1994**, 33, 5230–5237.
161. Jörnvall, H., Horse liver alcohol dehydrogenase, On the primary structures of the isoenzymes. *European Journal of Biochemistry* **1970**, 16, 25–40.
162. Frederick, K. R.; Tung, J.; Emerick, R. S.; Masiarz, F. R.; Chamberlain, S. H.; Vasavada, A.; Rosenberg, S.; Chakraborty, S.; Schopfer, L. M.; Massey, V., Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **1990**, 265, 3793–3802.
163. Cassland, P.; Jönsson, L. J., Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, 52, 393–400.
164. Joensson, L. J.; Sjoestroem, K.; Haeggstroem, I.; Nyman, P., Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1995**, 1251, 210–215.
165. Ruettinger, R. T.; Wen, L. P.; Fulco, A. J., Coding Nucleotide, 5' Regulatory, and Deduced Amino Acid Sequences of P-450BM-3a, Single Peptide Cytochrome P-450:NADPH-P-450 Reductase from *Bacillus megaterium*. *The Journal of Biological Chemistry* **1989**, 264, 10987–10995.
166. Welinder, K. G., Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase Amino and Carboxyl Termini, Cyanogen Bromide and Tryptic Fragments, the Complete Sequence, and Some Structural Characteristics of Horseradish Peroxidase C. *European Journal of Biochemistry* **1979**, 96, 483–502.
167. Jany, K. D.; Lederer, G.; Mayer, B., Amino acid sequence of proteinase K from the mold *Tritirachium album* Limber Proteinase K - a subtilisin-related enzyme with disulfide bonds. *FEBS Letters* **1986**, 199, 139–144.
168. Matsushita, O.; Jung, C. M.; Katayama, S.; Minami, J.; Y., T.; Okabe, A., Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. *Journal of Bacteriology* **1999**, 181, 923–933.
-

-
169. Mitchel, R. E. J.; Chaiken, I. M.; Smith, E. L., The complete amino acid sequence of papain. Additions and corrections. *The Journal of Biological Chemistry* **1970**, 245, 3485–3492.
170. Charles, M.; Rovey, A.; Desnuelle, G. P., Sur le trypsinogine et la trypsine de porc. *Biochimica et Biophysica Acta* **1963**, 69, 115–129.
171. Hermodson, M. A.; Ericsson, L. H.; Neurath, H.; Walsh, K. A., Determination of the Amino Acid Sequence of Porcine Trypsin by Sequenator Analysis. *Biochemistry* **1973**, 12, 3146–3153.
172. Singh, N.; Jabeen, T.; Sharma, S.; Roy, I.; Gupta, M. N.; Bilgrami, S.; Somvanshi, R. K.; Dey, S.; Perbandt, M.; Betzel, C.; Srinivasan, A.; Singh, T. P., Detection of native peptides as potent inhibitors of enzymes. Crystal structure of the complex formed between treated bovine alpha-chymotrypsin and an autocatalytically produced fragment, Ile-Val-Asn-Gly-Glu-Glu-Ala-Val-Pro-Gly-Ser-Trp-Pro-Trp, at 2.2 angstroms resolution. *FEBS Journal* **2005**, 272, 562–572.
173. Shotton, D. M.; Hartley, B. S., Amino-acid sequence of porcine pancreatic elastase and its homologies with other serine proteinases. *Nature* **1970**, 225, 802–806.
174. Sigma-Aldrich, Product Information Azocasein A 2756., www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a2765pis.pdf.
175. Park, S. Y.; Gibbs, B. F.; Lee, H. B., Effects of crude enzyme of *Lactobacillus casei* LLG on water-soluble peptides of enzymemodified cheese. *Food Research International* **1995**, 28, 43–49.
176. Kilcawley, K. N.; Wilkinson, M.; Fox, P. F., Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme and Microbial Technology* **2002**, 31, 310–320.
177. Erlanger, B. F.; Edel, F.; Cooper, A. G., The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1966**, 115, 206–220.
178. Shugar, D., The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta* **1952**, 8, 302–309.
-

-
179. Wan, Y.; Lu, R.; Xiao, L.; Du, Y.; Miyakoshi, T.; Chen, C.; Knill, C. J.; Kennedy, J. F., Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *International Journal of Biological Macromolecules* **2010**, 47, 488–495.
180. Majcherczyk, A.; Johannes, C.; Hüttermann, A., Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Applied microbiology and biotechnology* **1999**, 51, 267–276.
181. Pütter, J.; Becker, R., *Methods of Enzymatic Analysis*, dritte Auflage; Bergmeyer, H. U., Ed., Verlag Chemie, Deerfield Beach, **1983**, Band III, 286–293.
182. Keesey, J., *Biochemica Information*, erste Auflage, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, **1987**, p 58.
183. Kägi, J. H. R.; Vallee, B. L., The role of zinc in alcohol dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* **1960**, 235, 3188–3192.
184. Sadasivam, S.; Manickam, A., *Biochemical Methods*, New Age International, Neu-Delhi, **1996**.
185. Winkler, U. K.; Stuckmann, M., Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* **1979**, 138, 663–670.
186. Yang, F.; Russell, A. J., Optimization of Baker's Yeast Alcohol Dehydrogenase Activity in an Organic Solvent. *Biotechnology Progress* **1993**, 9, 234–241.
187. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680–685.
188. Fazekas De St. Groth, S.; Webster, R. G.; Datyner, A., Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et Biophysica Acta* **1963**, 71, 377–391.
189. Heukeshoven, J.; Dernick, R., Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **1985**, 6, 103–112.
190. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, 72, 248–254.
-

-
191. Popov, N.; Schmitt, S.; Matthies, H., Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteinsgehaltes in Gewebehomogenaten. *Acta Biologica Germanica* **1975**, 34, 1441–1446.
 192. Tiller, J. C.; Banner, G.; Pan, L. C.; Klibanov, A. M., Improving biomaterial properties of collagen films by chemical modification. *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, 73, 246–252.
 193. Fik, C. P., Bioaktive, telechele Polyoxazoline mit funktionellen Satellitengruppen für neuartige antimikrobielle und Kollagenase-hemmende Materialien., Dissertation, TU-Dortmund, Dortmund, **2013**.
 194. Waschinski, C. J., Synthese, Charakterisierung und Untersuchung der Wirksamkeitsparameter bakterizider Poly(oxazoline) und damit modifizierter Polymernetzwerke., Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br., **2007**.
 195. Kempe, K.; Lobert, M.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S., Screening the Synthesis of 2-Substituted-2-oxazolines. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2009**, 11, 274–280.
 196. Doert, D., Proteinmodifizierung mit Poly-2-Heptyloxazolin basierenden Polymeren., Diplomarbeit, TU-Dortmund, **2013**.
 197. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7th ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
 198. Litt, M.; Levy, A.; Herz, J., Polymerization of Cyclic Imino Ethers. X. Kinetics, Chain Transfer, and Repolymerization. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* **1975**, 9, 703–727.
 199. Litt, M.; Levy, A., Polymerization of Cyclic Iminoethers. V. 1,3-Oxazolines with Hydroxy-, Acetoxy-, and Carboxymethyl-Alkyl Groups in the 2 Position and Their Polymers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1968**, 6, 1883–1894.
 200. Jung, B.; Theato, P., Chemical Strategies for the Synthesis of Protein-Polymer Conjugates. *Advances in Polymer Science* **2013**, 253, 37–70.
 201. Schönfeld, I., Polymer Protein Konjugate mit Polyoxazolinen., Studienarbeit, TU-Dortmund, **2010**.
 202. Miron, T.; Wilchek, M., A simplified Method for the Preparation of Succinimidyl Carbonate Polyethylene Glycol for Coupling to Proteins. *Bioconjugate Chemistry* **1993**, 4, 568–569.
-

-
203. Mozhaev, V. V.; Šikšnis, V.; Melik-Nubarov, N. S.; Galkantaite, N. Z.; Denis, G. J.; Butkus, E. P.; Zaslavsky, B. Y.; Mestechkina, N. M.; Martinek, K., Protein stabilization via hydrophilization. Covalent modification of trypsin and α -Chymotrypsin. *European Journal of Biochemistry* **1988**, 173, 147–154.
204. Habeeb, A. F. S. A.; Atassi, M. Z., Enzymatic and immunochemical properties of lysozyme. Evaluation of several amino group reversible blocking reagents. *Biochemistry* **1970**, 9, 4939–4944.
205. Georgalis, Y.; Umbach, P.; Raptis, J.; Saenger, W., Lysozyme aggregation studied by light scattering. II. Variations of protein concentration. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **1997**, 53, 703–712.
206. Wetter, L. R.; Deutsch, H. F., Immunological studies on egg white proteins. IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry* **1951**, 192, 237–242.
207. Boyer, M.; Roy, M. O.; Jullien, M., Dynamic light scattering study of precrystallizing ribonuclease solutions. *Journal of Crystal Growth* **1996**, 167, 212–220.
208. Doert, D., Aktivitätsbestimmung von Polymer-Enzym- und -Coenzym-Konjugaten., Studienarbeit, TU-Dortmund, **2012**.
209. Hecht, H. J.; Kalisz, H. M.; Hendle, J.; Schmid, R. D.; Schomburg, D., Crystal Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **1993**, 229, 153–172.
210. Royet, J.; Dziarski, R., Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nature Reviews Microbiology* **2007**, 5, 264–277.
211. Zalipsky, S.; Mullah, N.; Engbers, C.; Hutchins, M. U.; Kiwan, R., Thiolytically cleavable dithiobenzyl urethane-linked polymer-protein conjugates as macromolecular prodrugs: reversible PEGylation of proteins. *Bioconjugate Chemistry* **2007**, 18, 1869–1878.
212. Veronese, F. M.; Largajolli, R.; Boccù, E.; Benassi, C. A.; Schiavon, O., Surface modification of proteins. Activation of monomethoxy-polyethylene glycols by phenylchloroformates and modification of ribonuclease and superoxide dismutase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1985**, 11, 141–152.
213. Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6th ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2008**.
-

-
214. Oda, K., New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *The Journal of Biochemistry* **2012**, 151, 13–25.
215. Caliceti, P.; Schiavon, O.; Sartore, L.; Monfardini, C.; Veronese, F. M., Active site protection of proteolytic enzymes by poly(ethylene glycol) surface modification. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **1993**, 8, 41–50.
216. Zaks, A.; Klivanov, A. M., Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents. *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263, 3198–3201.
217. Kranenburg, J. M.; Tweedie, C. A.; Hoogenboom, R.; Wiesbrock, F.; Thijs, H. M. L.; Hendriks, C. E.; Van Vliet, K. J.; Schubert, U. S., Elastic moduli for a diblock copoly(2-oxazoline) library obtained by high-throughput screening. *Journal of Materials Chemistry* **2007**, 17, (26), 2713–2721.
218. Schmid, R.; Verger, R., Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie, International Edition* **1998**, 37, 1609–1633.
219. Kirk, O.; Christensen, M. W., Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Organic Process Research & Development* **2002**, 6, 446–451.
220. Anderson, E. M.; Larsson, K. M.; Kirk, O., One biocatalyst-many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* **1998**, 16, 181–204.
221. Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R., Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, 64, 1–22.
222. Benjamin, S.; Pandey, A., *Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology. *Yeast* **1998**, 14, 1069–1087.
223. Herbst, D.; Peper, S.; Niemeyer, B., Enzyme catalysis in organic solvents: influence of water content, solvent composition and temperature on *Candida rugosa* lipase catalyzed transesterification. *Journal of Biotechnology* **2012**, 162, 398–403.
224. Miletić, N.; Vuković, Z.; Nastasović, A.; Loos, K., Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate)resins-Versatile immobilization supports for biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, 56, 196–201.
225. Riva, S., Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* **2006**, 24, 219–226.
-

-
226. Reinhammar, B.; Malstrom, B. G., *Blue copper-containing oxidases*; Lontie, R., Ed., CRC Press, Boca Raton, **1981**, 1–35.
227. Dittmer, N. T.; Suderman, R. J.; Jiang, H.; Zhu, Y. C.; Gorman, M. J.; Kramer, K. J.; Kanost, M. R., Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **2004**, 34, 29–41.
228. Claus, H., Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* **2003**, 179, 145–150.
229. Koschorreck, K., Expression, Charakterisierung und Optimierung mikrobieller Laccasen für die Biokatalyse., Dissertation, Universität Stuttgart, Stuttgart, **2008**.
230. Bourbonnais, R.; Paice, M. G., Oxidation of nonphenolic substrates - an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* **1990**, 267, 99–102.
231. Wan, Y.; Du, Y.; Miyakoshi, T., Enzymatic catalysis of 2,6-dimethoxyphenol by laccases and products characterization in organic solutions. *Science in China Series B: Chemistry* **2008**, 51, 669–676.
232. Betts, W. B.; King, J. E., Oxidative coupling of 2,6-dimethoxyphenol by fungi and bacteria. *Mycological Research* **1991**, 95, 526–530.
233. Sund, H.; Theorell, H., *The Enzymes*, 2nd ed.; Boyer, P. D., Lardy, H., Myrback, K., Eds., Academic Press, Massachusetts, **1963**, 7, 25–83.
234. Hummel, W., Enzyme-catalyzed synthesis of optically pure R(+)-phenylethanol. *Biotechnology Letters* **1990**, 12, 403–408.
235. Hummel, W., New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **1997**, 58, 145–184.
236. Elleuche, S.; Fodor, K.; Klippel, B.; von der Heyde, A.; Wilmanns, M.; Antranikian, G., Structural and biochemical characterisation of a NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase from *Oenococcus oeni* as a new model molecule for industrial biotechnology applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, 97, 8963–8975.
237. Hollmann, F.; Witholt, B.; Schmid, A., [Cp*Rh(bpy)(H₂O)]₂⁺: a versatile tool for efficient and non-enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin coenzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, 19–20, 167–176.
-

-
238. Utecht, R. E., A Kinetic Study of Yeast Alcohol Dehydrogenase. *Journal of Chemical Education* **1994**, 71, 436.
239. Leurs, M., Anwendung von Enzym-Polyoxazolin-Konjugaten als Liganden bei der Sharpless-Dihydroxylierung., Forschungspraktikum, TU-Dortmund, **2013**.
240. Leurs, M., Protein-vermittelte metallkatalysierte Umsetzungen., Diplomarbeit, TU-Dortmund, **2013**.
241. Körner, M., Sharpless-Dihydroxylierung von Alkenen mithilfe von Enzym-Polyoxazolin-Konjugaten als Liganden., Wahlpflichtpraktikum, TU-Dortmund, **2014**.
242. Corey, E. J.; Noe, M. C.; Sarshar, S., X-ray crystallographic studies provide additional evidence that an enzyme-like binding pocket is crucial to the enantioselective dihydroxylation of olefins by OsO₄-bis-cinchona alkaloid complexes. *Tetrahedron Letters* **1994**, 35, 2861–2864.
243. Brückner, R., *Reaktionsmechanismen*, 2nd ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2003**.
244. Köhler, V.; Mao, J.; Heinisch, T.; Pordea, A.; Sardo, A.; Wilson, Y. M.; Knörr, L.; Creus, M.; Prost, J. C.; Schirmer, T.; Ward, T. R., OsO₄-Streptavidin: A Tunable Hybrid Catalyst for the Enantioselective *cis*-Dihydroxylation of Olefins. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50, 10863–10866.
245. Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K.; Kwong, H.; Morikawa, K.; Wang, Z.; Xu, D.; Zhang, X., The Osmium-Catalyzed Asymmetric Dihydroxylation: A New Ligand Class and a Process Improvement. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, 57, 2768–2271.
246. Van Rheenen, V.; Kelly, R. C.; Cha, D. Y., An improved catalytic OsO₄ oxidation of olefins to *cis* 1,2-glycols using tertiary amine oxides as the oxidant. *Tetrahedron Letters* **1976**, 17, 1973–1976.
247. Xu, D.; Crispino, G. A.; Sharpless, K. B., Selective Asymmetric Dihydroxylation of Dienes. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, 7570–7571.
248. Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E., Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews* **1996**, 96, 2563–2605.
249. Enguita, F. J.; Martins, L. O.; Henriques, A. O.; Carrondo, M. A., Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, 279, 19416–19425.
-

250. Yaropolov, A. I.; Skorobogat'ko, O. V.; Vartanov, S. S.; Varfolomeyev, S. D., Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied biochemistry and biotechnology* **1994**, 49, 257–280.
251. Becker, H.; King, S. B.; Taniguchi, M.; Vanhessche, K. P. M.; Sharpless, K. B., New Ligands and Improved Enantioselectivities for the Asymmetric Dihydroxylation of Olefins. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60, 3940–3941.
-

Abstract

The objective of this work was the synthesis of organosoluble polymer-enzyme and coenzyme-conjugates while preserving their biological activity.

The conjugates were synthesised by modification of the free amino groups of enzymes with poly(2-methyl-, 2-ethyl- and 2-heptyloxazoline) as well as with a poly(2-butyl-oxazoline)-*b*-poly(2-methyloxazoline) diblock-copolymer. The synthesis of 14 organosoluble conjugates was performed via amin-terminated poly(2-R-oxazolines) and pyromellitic acid dianhydride. The conjugates are depending on the used enzyme and poly(2-R-oxazoline) soluble in DMF, THF, chloroform and toluene with solubilities of $\geq 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, which is approximately 20-times higher than literature known values for poly(2-R-oxazoline)-enzyme-conjugates. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focussing and size exclusion chromatography show the high degree of modification of the conjugates. Their activities were determined in aqueous und organic media. In organic solvents, activations of up to 153000 were achieved by use of poly(2-methyloxazoline) compared to the native dispersed enzyme. The activity of a poly(2-methyloxazoline)-lipase-conjugate in chloroform is up to 44-times higher than the activity of the commercially available immobilized enzyme.

The solubility of NAD (NAD⁺, NADH) and NADP⁺ in organic solvents was achieved for the first time via termination of poly(2-methyl- and 2-ethyloxazoline) as well as a poly(2-heptyloxazoline)-*b*-poly(2-methyloxazoline) diblock-copolymer. The poly(2-methyloxazoline)-NAD-conjugates were soluble in dimethylformamide, acetonitrile, dichloromethane and chloroform. Their biological activity was quantified in buffer and chloroform.

The poly(2-R-oxazoline)-enzyme-conjugates were furthermore used as chiral ligands for asymmetric metal-catalysed syntheses in chloroform. Poly(2-methyloxazoline)-conjugates are best suited for the investigated SHARPLESS-dihydroxylation of styrene. Depending on the enzyme-conjugate, the *R*- or *S*-enantiomer with varying enantiomeric excess was obtained. From the (2-methyloxazoline)-conjugates, the metalloenzyme-conjugates are especially suitable. By the use of poly(2-methyloxazoline)-laccase-conjugates a higher enantiomeric excess was achieved compared to the commercially available SHARPLESS-catalyst-ligand-systems. The educt range was extended to other alkenes. The potential of this system was successfully proven by combination of the SHARPLESS-dihydroxylation with poly(2-methyloxazoline)-lipase-conjugates and the real enzymatic activity in a tandem catalysis.

Kurzzusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Synthese organolöslicher Polymer-Enzym- und Coenzymkonjugate unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität.

Die Konjugate wurden durch Modifikation der Enzyme mit Poly(2-Methyl-, 2-Ethyl- und 2-Heptyloxazolin), sowie ein Poly(2-Butyloxazolin)-*b*-Poly(2-Methyloxazolin) Diblockcopolymer, welche über die freien Aminogruppen der Enzyme gebunden wurden, synthetisiert. Mittels der amineterminierten Poly(2-R-Oxazoline) und des bifunktionellen, aminoreaktiven Linkers Pyromellitsäuredianhydrid wurden 14 organolösliche Konjugate synthetisiert. Die Konjugate sind, abhängig vom verwendeten Enzym und Poly(2-R-Oxazolin), löslich in DMF, THF, Chloroform und Toluol mit Löslichkeiten $\geq 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$. Dies ist eine etwa 20-mal höhere Löslichkeit als die höchste literaturbekannte für Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugate. Eine Analyse mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, isoelektrischer Fokussierung und Größenausschlusschromatographie zeigte einen hohen Modifizierungsgrad der resultierenden Konjugate. Die Aktivitäten der Konjugate wurden in wässrigen und organischen Medien quantifiziert. Es wurden unter Einsatz von Poly(2-Methyloxazolin) im organischen Medium im Vergleich mit den nativen dispergierten Enzymen Aktivierungen bis zu ca. 153000 erreicht. Die Aktivität eines Poly(2-Methyloxazolin)-Lipasekonjugates ist in Chloroform sogar bis zu 44-mal höher als die des kommerziell erhältlichen immobilisierten Enzyms.

Mittels Terminierung von Poly(2-Methyl- und 2-Ethyloxazolin) sowie eines Poly(2-Heptyloxazolin)-*b*-Poly(2-Methyloxazolin) Diblockcopolymers mit NAD (NAD⁺, NADH) und NADP⁺ wurde erstmals eine Löslichkeit dieser Coenzyme in organischen Lösungsmitteln erreicht. Die Poly(2-Methyloxazolin)-NAD-Konjugate sind löslich in DMF, Acetonitril, Dichlormethan sowie Chloroform. Der Einfluss der Konjugation auf die biologische Aktivität der Coenzyme wurde in Puffer und Chloroform quantifiziert.

Die Poly(2-R-Oxazolin)-Enzymkonjugate wurden zudem als chirale Liganden für asymmetrische metallkatalysierte Synthesen in Chloroform eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass die Poly(2-Methyloxazolin)-Konjugate für die untersuchte SHARPLESS-Dihydroxylierung mit Styrol am besten geeignet sind. Je nach Enzymkonjugat wurde das *R*- oder *S*-Enantiomer mit unterschiedlichen Enantiomerenüberschüssen erhalten. Von den Poly(2-Methyloxazolin)-Konjugaten sind besonders die Metalloenzymkonjugate geeignet. Mittels der Poly(2-Methyloxazolin)-Laccasekonjugate wurde ein größerer Enantiomerenüberschuss erzielt als mittels kommerziell erhältlichen SHARPLESS-Katalysator-Ligandensystemen unter Standardbedingungen. Zudem wurde das Eduktspektrum erfolgreich auf andere Alkene erweitert. Das Potential dieses Systems wurde unter Kombination der SHARPLESS-Dihydroxylierung mittels Poly(2-Methyloxazolin)-Lipasekonjugaten und der eigentlichen enzymatischen Aktivität bei einer Tandemkatalyse bewiesen.

Kurzlebenslauf

Daten zur Person:

Name: Stefan Konieczny
Geburtsdatum-/Ort: 25.01.1982 in Moers
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1988 - 1992 Bodelschwingh Grundschule, Hamm
1992 - 2001 Beisenkamp-Gymnasium, Hamm
11.06.2001 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

Sept. 2001 - Mai 2002 Altenheim St. Josef, Hamm

Studium

Okt. 2002 - Okt. 2008 Studium des Bioingenieurwesen an der TU-Dortmund
24. Okt. 2008 Abschluss: Dipl.-Ing., Schwerpunkt: Verfahrenstechnik
Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Zorn
Titel: „Neuartige Peptidasen aus Basidiomyceten“

Promotion:

Mai 2009 - Mai 2014 Bei Prof. Dr. J. C. Tiller am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften an der Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen der TU-Dortmund
Titel: „Organolösliche Polymer-Enzym Konjugate auf Basis von Poly-2-Alkyloxazolin“
Mai 2009 - Mai 2012 Promotionsstipendium Cluster industrielle Biotechnologie (CLIB2021), gefördert vom Land NRW

Erklärung zur Reproduktion vorab veröffentlichter Inhalte

Teile dieser Arbeit sind bereits vom Autor veröffentlicht und präsentiert worden oder basieren auf Messdaten, die im Rahmen betreuter studentischer Arbeiten am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften (Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) entstanden sind. Insbesondere die Datenerfassung sind Reproduktion oder beruhen auf den explizit genannten Beiträgen anderer Autoren:

Kapitel 4	4.1.4.1	Datenerhebung in Teilen aus	[a]
	4.2.1	Datenerhebung in Teilen aus	[b]
	4.2.4	in Teilen modifiziert aus	[A, B, C]
	4.2.5	in Teilen modifiziert aus	[C]
	4.2.6	in Teilen modifiziert aus	[A, B, C]
	4.3.1	Datenerhebung in Teilen aus	[c]
	4.4	in Teilen modifiziert aus	[D]
		Datenerhebung in Teilen aus	[d, e]
	4.4.3.3.2	Datenerhebung in Teilen aus	[f]

Publikationen

[A] Konieczny, S.; Fik, C.P.; Aversch, N.J.H.; Tiller, J.C., Organosoluble Enzyme Conjugates with Poly(oxazoline)s via Pyromellitic Acid Dianhydride, *Journal of Biotechnology*, **2012**, 159, 195-203.

B Konieczny, S.; Tiller, J.C., Organosoluble Polymer Enzyme Conjugates with Poly(oxazoline)s, *Polymer Preprints*, **2012**, 53, 356.

[C] Konieczny, S.; Krumm, C.; Doert, D.; Neufeld, K.; Tiller, J.C., Investigations on the activity of poly(2-oxazoline) enzyme conjugates dissolved in organic solvents, *Journal of Biotechnology*, **2014**, 181, 55-63.

[D] Konieczny, S., Leurs, M.; Tiller, J.C., Polymer enzyme conjugates as chiral ligands for Sharpless dihydroxylation of alkenes in organic solvents, *ChemBioChem*, **2015**, 16, 83-90.

Datenerhebung im Rahmen studentischer Arbeiten

[a] Doert, D., Proteinmodifizierung mit Poly-2-Heptyloxazolin basierenden Polymeren., Diplomarbeit, TU-Dortmund, **2013**.

[b] Schönfeld, I., Polymer Protein Konjugate mit Polyoxazolinen., Studienarbeit, TU-Dortmund, **2010**.

[c] Doert, D., Aktivitätsbestimmung von Polymer-Enzym- und -Coenzym-Konjugaten., Studienarbeit, TU-Dortmund, **2012**.

[d] Leurs, M., Anwendung von Enzym-Polyoxazolin-Konjugaten als Liganden bei der SHARPLESS-Dihydroxylierung., Forschungspraktikum, TU-Dortmund, **2013**.

[e] Leurs, M., Protein-vermittelte metallkatalysierte Umsetzungen., Diplomarbeit, TU-Dortmund, **2013**.

[f] Körner, M., Sharpless-Dihydroxylierung von Alkenen mithilfe von Enzym-Polyoxazolin-Konjugaten als Liganden., Wahlpflichtpraktikum, TU-Dortmund, **2014**.
