

# **Artifizielle Metalloenzyme in organischen Medien**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Dr. rer. nat.**

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen  
der Technischen Universität Dortmund  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Melanie Leurs**

aus

Geldern

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2019

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg C. Tiller

2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Vogt

**Dortmund 2019**



**Für meine Oma und Erhan**

---



Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2014 bis Dezember 2017 am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften der Fakultät Bio-und Chemieingenieurwesen der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

---



---

## Danksagung

Bei Prof. Dr. Jörg C. Tiller möchte ich mich herzlich bedanken für die Bereitstellung des äußerst interessanten und herausfordernden Themas, seine ständige hervorragende Betreuung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Lehrstuhl BMP. Des Weiteren danke ich ihm für die zahlreichen motivierenden wissenschaftlichen Diskussionen, seine Hilfsbereitschaft und den Ideenreichtum sowie sein andauerndes Interesse an dieser Arbeit.

Ich danke allen Kollegen, ehemaligen Kollegen und Mitarbeitern am Lehrstuhl BMP für das hervorragende Arbeitsklima sowie die stetige sowohl fachliche als auch menschliche Unterstützung. Das sind Herr Dr. habil. Frank Katzenberg, Herr Montasser Hijazi, Frau Lena Benski, Herr Dominik Segiet, Herr Sascha Wilhelm, Herr, Marko Milovanovic, Herr Dr. Martin Schmidt, Herr Dr. Nicolas Rauner, Herr Dr. Arne Straßburg, Herr Dr. Thomas Raidt, Frau Ramona Plothe, Herr Dr. Christian Krumm, Herr Dr. Stefan Konieczny, Frau Dr. Ina Sittko, Herr Dr. Dominik Quitmann, Herr Dr. Robin Höher, Herr Dr. Matthias Thiel, Herr Peter von Czarnecki, Frau Monika Meuris, Herr Thorsten Moll, Herr Volker Brandt, Frau Alexandra Riedel und Frau Kristine Katzmarczyk .

Herrn Thorsten Moll danke ich zudem für die Durchführung der GPC-Messungen sowie seine stete Hilfsbereitschaft bei technischen und weniger technischen Fragestellungen. Weiterhin danke ich unserer Sekretärin Frau Alexandra Riedel sowie unserer ehemaligen Sekretärin Frau Kristine Katzmarczyk für ihre Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung vieler kleinerer und größerer bürokratischer Hürden.

Der NMR-Abteilung der Fakultät Chemie und chemische Biologie unter der Leitung von Herrn Dr. Wolf Hiller gilt mein herzlicher Dank für die durchgeführten NMR-spektroskopischen Messungen.

Mein besonderer Dank gilt zudem „meinen“ Studenten Frau Pia Spiekermann, Herr Philipp Baumann, Herr Jens Wilken, Herr Marvin Kloß, Frau Eleonora Buchholz, Frau Andrea Machalica, Herr Tobias Heitkemper, Frau Lydia Mihailowitch, Herr Björn Dorn, Frau Magiliny Manisegaran, und Herr Philipp Rausch, die ich während meiner Zeit am Lehrstuhl BMP betreut habe.

Außerdem danke ich von Herzen meiner Familie sowie meinen Freunden für ihre andauernde Unterstützung, ihre Zeit und dafür, dass sie nie aufgehört haben an mich und meine Ziele zu glauben und mir zu jeder Zeit Kraft und Mut gaben.

---





**„You know, almost everyone has a moment in their lives when they  
exceed their own limits...achieve what seems to be impossible...“**

*Troi to Barclay*

*Star Trek - The Next Generation / “The Nth Degree”*

---



---

## 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 Biomaterialien und Polymerwissenschaften (Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund) entstanden sind. Insbesondere die Datenerfassungen sind Reproduktionen oder beruhen auf den explizit genannten Beiträgen anderer Autoren:

- 4.1.2 in Teilen modifiziert aus [B]
  - 4.1.3.1 in Teilen modifiziert aus [C]
    - Datenerhebung in Teilen aus [b]
  - 4.1.3.2 In Teilen modifiziert aus [C]
    - Datenerhebung in Teilen aus [a]
  - 4.1.3.3 Datenerhebung in Teilen aus [c, g]
  - 4.2.1.1 Datenerhebung in Teilen aus [i]
  - 4.2.1.3 Datenerhebung in Teilen aus [d, e, f]
  - 4.2.1.2 Datenerhebung in Teilen aus [h, i, j]
  - 4.3.1 In Teilen modifiziert aus [E]
    - Datenerhebung in Teilen aus [k]
  - 4.3.2 In Teilen modifiziert aus [E]
    - Datenerhebung in Teilen aus [k, l]
  - 4.3.3 In Teilen modifiziert aus [E]
    - Datenerhebung in Teilen aus [l]
-

## Publikationen

[A] Leurs, M., Konieczny, S., Tiller, J. C., Polymer Enzyme Conjugates as Chiral Ligands for Sharpless Dihydroxylation of Alkenes in Organic Solvents, *Scientific Highlights* **2014**, 16.

[B] Konieczny, S., Leurs, M., Tiller, J. C., Polymer Enzyme Conjugates as Chiral Ligands for Sharpless Dihydroxylation of Alkenes in Organic Solvents, *ChemBioChem* **2015**, 16, 1, 83-90.

[C] Leurs, M., Spiekermann, P. S., Tiller, J. C., Optimization of and Mechanistic Considerations for the Enantioselective Dihydroxylation of Styrene Catalyzed by Osmate-Laccase-Poly(2-Methyloxazoline) in Organic Solvents, *ChemCatChem* **2016**, 8, 3, 593-599.

[D] Leurs, M., Tiller, J. C., Chapter 17 - Nanoarmored Enzymes for Organic Enzymology: Synthesis and Characterization of Poly(2-Alkyloxazoline)-Enzyme Conjugates, *Methods in Enzymology* **2017**, 590, 413-444.

[E] Leurs, M., Dorn, B., Wilhelm, S., Manisegaran, M., Tiller, J.C., „Multicore Artificial Metalloenzymes derived from acylated proteins as catalysts for the enantioselective dihydroxylation and epoxidation of styrene derivatives”, *Chemistry - A European Journal* **2018**, 24, 42, 10859-10867.

---

---

## Studentische Arbeiten

[a] Spiekermann, P. S., Poly(2-R-oxazolin)-Enzym Konjugate als chirale Liganden für metallkatalysierte Reaktionen in organischen Medien, Bachelorarbeit 2014, TU Dortmund, Dortmund.

[b] Baumann, P., Vertiefungspraktikum 2015, TU Dortmund, Dortmund.

[c] Wilken, J., Untersuchung verschiedener Polymer-Enzym-Konjugate als Ligand bei der Sharpless-Dihydroxilierung, Vertiefungspraktikum 2015, TU-Dortmund, Dortmund.

[d] Kloß, M., Tandemreaktion von Styrol unter Biokatalyse, Wahlpflichtpraktikum Wahlpflichtpraktikum 2015, TU Dortmund, Dortmund.

[e] Buchholz, E., Optimierung der Tandemkatalyse von Styrol mit unterschiedlichen Enzymkonjugaten, Wahlpflichtpraktikum 2016, TU Dortmund, Dortmund.

[f] Machalica, A., Tandemkatalyse mittels Poly(2-Methyloxazolin)-Lipase-Konjugaten, Vertiefungspraktikum 2016, TU Dortmund, Dortmund.

[g] Wilken, J., Poly(2-R-oxazolin)-Enzym-Konjugate als Liganden für die Dihydroxilierung von Alkenen, Bachelorarbeit 2016, TU-Dortmund, Dortmund.

[h] Kloß, M., Tandemreaktion von Styrol unter Verwendung von Novozym 435, Wahlpflichtpraktikum 2017, TU Dortmund, Dortmund.

[i] Heitkemper, T., Untersuchungen zur tandemkatalytischen Veresterung von Styrol mittels artifizieller CaLB, Wahlpflichtpraktikum 2017, TU Dortmund, Dortmund.

[j] Mihailowitch, L., Untersuchung von Reaktionsverläufen und Stereoselektivitäten unter Enzymzugabe, Vertiefungspraktikum 2017, TU Dortmund, Dortmund.

[k] Dorn, B., Synthese und Charakterisierung funktionalisierter Enzyme für die Katalyse in organischen Medien, Masterarbeit 2018, TU Dortmund, Dortmund.

[l] Manisegaran, M., Asymmetrische Epoxidierung mit Hilfe artifizieller Metalloenzyme in organischen Medien, Wahlpflichtpraktikum 2018, TU Dortmund, Dortmund.

---

## Vorträge\*

1. M. Leurs, S. Konieczny, J. C. Tiller, „Polymer Enzyme Conjugates as Chiral Ligands for Sharpless Dihydroxylation of Alkenes in Organic Solvents“, EPF 2015, 26.06.15, Dresden.

## Poster\*

1. M. Leurs, S. Konieczny, J. C. Tiller, „Polymer Enzyme Conjugates as Chiral Ligands for Sharpless Dihydroxylation of Alkenes in Organic Solvents“, 8. Tag der Chemie, 13. Februar 2015, Dortmund.
2. M. Leurs, S. Konieczny, J. C. Tiller, “Enzyme-poly(2-oxazoline) Conjugates as Highly Selective Artificial Metallo-enzymes“, ACS' 252nd National Meeting “Chemistry of the People, by the People, for the People”, 21. – 25.08.2016, Philadelphia.

\* Vortragender unterstrichen

---

## Inhalt

1	Motivation .....	1
2	Einleitung .....	3
2.1	Katalyse .....	3
2.2	Biokatalyse .....	7
2.2.1	Enzyme in wässrigen Reaktionsmedien .....	9
2.2.2	Enzyme in unkonventionellen Medien .....	10
2.2.3	Artifizielle Metalloenzyme .....	15
2.3	Tandemkatalyse .....	21
2.3.1	Begriffsdefinitionen .....	21
2.3.2	Enzymatische Systeme für die Tandemkatalyse .....	23
3	Zielsetzung .....	27
4	Ergebnisse und Diskussion .....	29
4.1	Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-PMOx-Konjugaten .....	29
4.1.1	Poly(2-methyloxazolin)-Enzym-Konjugate .....	29
4.1.2	Dihydroxylierung mittels $K_2OsO_2(OH)_4$ und $K_3[Fe(CN)_6]$ als Kooxidations-mittel.....	35
4.1.3	Dihydroxylierung mittels Metall-Enzym-PMOx als Katalysator und <i>tert</i> -Butylhydroperoxid als Kooxidationsmittel .....	37
4.1.4	Kapitelzusammenfassung .....	54
4.2	Tandemkatalyse .....	57
4.2.1	Tandemkatalytische Veresterungen ausgehend von Alkenen.....	58
4.2.2	Kapitelzusammenfassung .....	74
4.3	Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten .....	77
4.3.1	Funktionalisierung von Proteinen mittels Anhydriden.....	78
4.3.2	Asymmetrische Dihydroxylierung mittels Metall-Protein-Acyl- Konjugaten .....	85
4.3.3	Asymmetrische Epoxidierung mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten	96
4.3.4	Kapitelzusammenfassung .....	112
5	Zusammenfassung .....	115
5.1	Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-PMOx-Konjugaten .....	115
5.2	Tandemkatalyse .....	118
5.3	Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten .....	120
6	Experimenteller Teil.....	125
6.1	Chemikalien und Geräte.....	125
6.1.1	Verwendete Geräte.....	125
6.1.2	Verwendete Chemikalien.....	126

---

6.1.3	Verwendete Proteine .....	128
6.1.4	Gase und Flüssiggase.....	128
6.2	Synthese von Poly-2-alkyloxazolin.....	129
6.2.1	Darstellung des Initiators Benzyltosylat.....	129
6.2.2	Trocknung von Chloroform .....	129
6.2.3	Destillation von 2-Methyl-2-oxazolin .....	130
6.2.4	Polymerisation von 2-Methyl-2-oxazolin .....	130
6.3	Funktionalisierung verschiedener Enzyme mit Poly-2-Methyloxazolin .....	132
6.3.1	Trocknung von Dimethylformamid .....	132
6.3.2	Enzymfunktionalisierung mit Poly-2-Methyloxazolin .....	133
6.4	Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-POx-Konjugaten.....	135
6.4.1	Dihydroxylierung von Alkenen mit Pyridin als Ligand und $K_3[FeCN]_6$ als Kooxidationsmittel .....	135
6.4.2	Dihydroxylierung von Alkenen mittels PMeOx-Enzym-Konjugaten.....	137
6.5	Tandemkatalyse.....	141
6.5.1	STEGLICH-Veresterung.....	141
6.5.2	Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol.....	144
6.5.3	Tandemreaktionen ausgehend von Styrol mit Os- Lipase-PMOx - generelle Prozedur .....	146
6.5.4	Tandemreaktionen ausgehend von Styrol mit immobilisierter Lipase - generelle Prozedur .....	146
6.6	Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten.....	147
6.6.1	Funktionalisierung von Proteinen mittels verschiedener Anhydride.....	147
6.6.2	Dihydroxylierung mittels Os-Protein-Acyl-Konjugaten .....	148
6.6.3	Epoxidierung mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten .....	149
6.7	Analytik und Geräteparameter.....	150
6.7.1	Dynamische Lichtstreuung .....	150
6.7.2	Kernspinresonanzspektroskopie .....	150
6.7.3	Gefriertrocknung.....	150
6.7.4	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	150
6.7.5	Bestimmung der Anzahl freier primärer Aminogruppen .....	151
6.7.6	Bestimmung des Proteingehaltes .....	152
6.7.7	Aufreinigung von Proteinen .....	152
6.7.8	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	153
7	Abstract.....	155
8	Kurzzusammenfassung.....	157
9	Literatur.....	159
10	Tabellenverzeichnis.....	173
11	Abbildungsverzeichnis.....	179

---



---

## Abkürzungsverzeichnis

[K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Kaliumhexacyanoferrat
°C	Grad Celsius
Å	Angström
Abb.	Abbildung
acyl.	acyliert
allg.	allgemein
AME	Artifizielles Metalloenzym
ATRP	<i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>
BES	<i>N,N</i> -Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
Br	Bromid
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
ca.	circa
CaH <sub>2</sub>	Calciumhydrid
CaLB	Lipase aus <i>Candida antarctica</i>
CDCl <sub>3</sub>	deutertes Chloroform
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
Cl	Chlorid
CRL	Lipase aus <i>Candida rugosa</i>
d	Tage
d	Dublett
d	Durchmesser
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DERA	Desoxiribose-Phosphat Aldolase aus <i>Escherichia coli</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	<i>Degree of polymerization</i> , Polymerisationsgrad
E	Extinktion
E <sub>a</sub>	Aktivierungsenergie
EA	Essigsäureanhydrid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuss
eq.	Äquivalente
EtOH	Ethanol
F	Fluorid

---

---

ges.	gesättigt
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HA	Hexansäureanhydrid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
I	Initiator
J	Kopplungskonstante
k	Reaktionsgeschwindigkeit
K	Kelvin
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kaliumcarbonat
K <sub>2</sub> OsO <sub>4</sub>	Kaliumosmat
Kap.	Kapitel
K <sub>m</sub>	MICHAELIS-MENTEN-Konstante
KMnO <sub>4</sub>	Kaliumpermanganat
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
Lacc	Laccase aus <i>trametes versicolor</i>
LYS	Lysozym
M	molare Masse
m	Masse
MeOH	Methanol
Min	Minute
MO	Monooxygenase aus <i>Bacillus megatrium</i>
MPV	Metall-zu-Protein-Verhältnis
n	Stoffmenge
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
Os	Osmat
PA	Propansäureanhydrid
PADA	Pyromellitsäuredianhydrid
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Poly(ethylenglycol)
PEK	Polymer-Enzym-Konjugat
PMOx	Poly(2-Methyloxazolin)
PNiPAM	Poly( <i>N</i> -isopropylacrylamid)
POx	Poly(oxazolin)
ppm	<i>Parts per million</i>
prim.	primär
R	allgemeine Gaskonstante
Rac.	racemisch
RML	Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i>
RT	Raumtemperatur

---

---

Ru	Ruthenium-
RuCl <sub>3</sub>	Rutheniumchlorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	sekundär
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
<sup>t</sup> BuOOH	<i>tert</i> -Buthylhydroperoxid
Ti	Titan
Ti(OMe <sub>4</sub> )	Titanmethoxid
TMS	Trimethylsilan
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TOF	<i>Turnover frequency</i> , Umsatzfrequenz
TON	<i>Turnover number</i> , Umsatzzahl
V	Volumen
Yqjm	Flavin Oxidoreduktase aus <i>Bacillus subtilis</i>
z.B.	zum Beispiel
Δ	chemische Verschiebung
E	molarer Extinktionskoeffizient
ρ	Dichte

## Präfixe

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

---



## 1 Motivation

Die Bedeutung von Katalysatoren in der chemischen Industrie nimmt stetig zu. Schon seit mehr als 100 Jahren werden in großtechnischen Prozessen diverse Katalysatoren eingesetzt, z.B. bei der Synthese von Salpetersäure aus Ammoniak oder auch katalytischen Hydrierungen<sup>1</sup>. Bis zum Jahre 2008 durchliefen schon ca. 75 % der hergestellten Produkte mindestens einen katalytischen Syntheseschritt<sup>1</sup>. Sowohl bei der Herstellung von Basis- als auch Feinchemikalien haben sich homogen sowie heterogen katalysierte Verfahren industriell etabliert. Ihre häufig hohen Selektivitäten bewirken einen geringen Anfall an Nebenprodukten, was neben einem wirtschaftlichen Vorteil auch umweltschonendere Verfahren ermöglicht.<sup>2</sup> Zudem ist die Gewinnung enantiomerenreiner Substanzen von zunehmender Wichtigkeit, insbesondere bei der Synthese komplexer Pharmazeutika. So zeigt bei Arzneistoffen oftmals nur ein Enantiomer die gewünschte Wirkung und häufig weist das andere Enantiomer sogar unerwünschte oder gar toxische Wirkungen auf<sup>3</sup>. Vielfach ist die Nutzung enantioselektiver Katalysatorsysteme der ökonomischste und ökologischste Weg solche Produkte zugänglich zu machen. Ein wichtiger Vorteil dieser Prozesse besteht darin, dass sich mit Hilfe asymmetrischer Katalysatoren chirale Informationen auf große Substratmengen übertragen lassen. In der modernen Chemie und Industrie gewinnt zudem die Umweltfreundlichkeit und Nachhaltigkeit chemischer Prozesse eine immer größere Bedeutung („grüne Chemie“, „weiße Biotechnologie“)<sup>4-7</sup>. Im Zuge dessen besteht in den letzten Jahren verstärkt ein Interesse an der Nutzung von Enzymen für solche katalytischen Umsetzungen. Einen wichtigen Grundstein für die Konkurrenzfähigkeit enzymatischer Systeme gegenüber der klassischen Metallkatalyse leistete die Möglichkeit der großtechnischen Produktion von Enzymen mittels moderner Biotechnologie<sup>4</sup>. Aus diesem Grund stellt die Entwicklung und Erforschung neuer enzymbasierender Katalysatorsysteme ein großes und bedeutendes Forschungsgebiet dar. Eine besondere Herausforderung ist hierbei unter anderem der Einsatz von Enzymen in organischen Medien unter Erhalt der enzymatischen Aktivität<sup>8-18</sup> sowie die Verknüpfung der Biokatalyse mit der klassischen (Übergangs-)Metallkatalyse<sup>19-26</sup>, z.B. durch die Verbindung von Enzymen mit klassischen Metallkatalysatoren. Diese Modifikationen bieten die Möglichkeit, das Spektrum möglicher enzymkatalysierter Reaktionen gravierend zu erweitern, sowie die Aussicht die Chemo-, Regio- sowie Stereoselektivitäten der gewünschten Reaktionen aktiv steuern zu können. Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit mit der Generierung und Optimierung artifizieller Metalloenzyme für den Einsatz in rein organischen Lösungsmittelsystemen.

---



## 2 Einleitung

### 2.1 Katalyse

Katalytische Reaktionen wurden schon genutzt, bevor das Prinzip der Katalyse überhaupt bekannt wurde, so z.B. bei der enzymatischen Vergärung von Zucker zu Ethanol. Bereits 1836 wurde der Begriff „Katalyse“ durch BERZELIUS eingeführt, welcher annahm, dass bestimmte Stoffe („Katalysatoren“) besondere Kräfte besitzen, die die elektrochemische Affinität anderer Substanzen zueinander beeinflussen können<sup>27</sup>.

Eine spätere, auch heute noch häufig verwendete, Definition lieferte OSTWALD im Jahre 1895. Er definierte einen Katalysator als einen Stoff, welcher die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion erhöht ohne dabei die Lage des Gleichgewichts zu beeinflussen.<sup>28</sup>

Während man zu dieser Zeit noch annahm, dass sich Katalysatoren während der gesamten Reaktion nicht verändern, ist es heute allgemein bekannt, dass sie im Laufe der Reaktion sehr wohl Bindungen mit Reaktanden oder Coreagenzien eingehen. Daher kann der Katalysevorgang im Allgemeinen als Zyklus dargestellt werden (Abb. 2.1).<sup>1</sup>

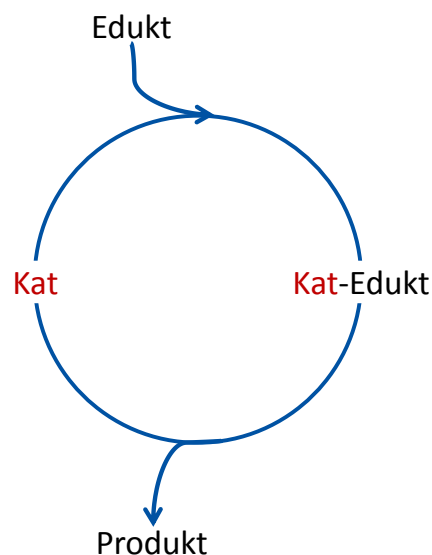


Abb. 2.1: Stark vereinfachte Darstellung eines Katalysezyklus.

Ein idealer Katalysator könnte theoretisch unendlich viele solcher Zyklen durchlaufen, allerdings kommt es in realen Systemen immer zu einer Deaktivierung von Katalysatormolekülen, beispielsweise durch Konkurrenzreaktionen oder den Zerfall des Katalysators. Die katalytische Wirkung beruht auf der Absenkung der Aktivierungsenergie, welche zunächst überwunden werden muss um eine chemische Reaktion in Gang zu setzen (Abb. 2.2).

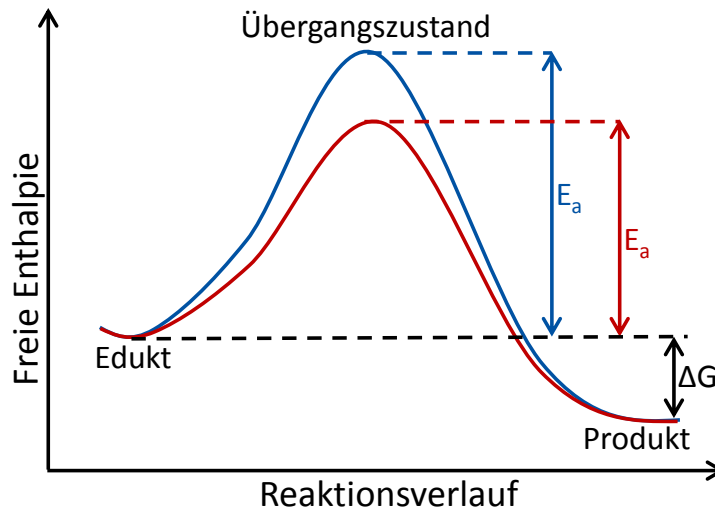


Abb. 2.2: Auftragung der freien Enthalpie gegen den Reaktionsfortschritt einer Reaktion mit und ohne Katalysator nach SAUERMOST und FREUDIG.<sup>29</sup>

Aufgrund des exponentiellen Zusammenhangs zwischen der Aktivierungsenergie ( $E_a$ ) und der Reaktionsgeschwindigkeit ( $k$ ) (Gleichung 1) resultiert selbst eine geringe Absenkung ersterer in einer großen Geschwindigkeitsänderung. Das Verhältnis zwischen den Geschwindigkeiten von unkatalysierter und katalysierter Reaktion liegt hierbei häufig zwischen  $10^6$  und  $10^{14}$ .<sup>30</sup>

$$\frac{k_{kat}}{k_{unkat}} = e^{\frac{E_{a,unkat} - E_{a,kat}}{RT}} \quad (1)$$

Mit:  $k$  = Reaktionsgeschwindigkeit;  $E_a$  = Aktivierungsenergie;  $R$  = allg. Gaskonstante;  $T$  = Temperatur

Einen weiteren wichtigen Vorteil katalysierter Reaktionen bietet die Möglichkeit, durch geeignete Wahl des Katalysatorsystems die Chemo-, Regio- und Enantioselektivität einer Reaktion zu beeinflussen. Unter anderem ist die Gewinnung enantiomerenreiner Substanzen von zunehmender Wichtigkeit bei der Synthese von Feinchemikalien, insbesondere bei der Herstellung komplexer Pharmazeutika, Herbizide und anderer Wirkstoffe.<sup>3</sup> Ein großer Vorteil der Nut-



zung eines asymmetrischen Katalysators besteht hierbei darin, dass sich aus der geringen Menge an asymmetrischer Information große Mengen chiraler Produktmoleküle synthetisieren lassen.

Aus allen diesen Gründen nimmt die Bedeutung von Katalysatoren in der chemischen Industrie stetig zu. Schon seit über 100 Jahren werden in großtechnischen Prozessen diverse Katalysatoren eingesetzt, z.B. bei der Synthese von Ammoniak mit dem bekannten Haber-Bosch-Verfahren<sup>31</sup> oder auch katalytischen Hydrierungen<sup>32</sup>.<sup>1</sup> Bis zum Jahre 2008 durchliefen schon ca. 75 % der hergestellten Produkte mindestens einen katalytischen Syntheseschritt, bei neu hinzukommenden Prozessen wird die Zahl bereits auf über 90 % geschätzt.<sup>1</sup>

Traditionelle Katalysatoren, welche auf vielfältige Weise in der modernen chemischen Industrie Anwendung finden, basieren häufig auf Metallen, insbesondere Edelmetallen (z. B. Platin, Palladium, Rhodium) und metallorganischen Verbindungen. Ein gravierender Nachteil bei der Verwendung von Edelmetallen als Katalysator ist ihr hoher Preis. Zudem sind ihre Ressourcen stark begrenzt. Die Anwendung von metallorganischen Verbindungen als katalytisch aktive Spezies ist bedingt durch den häufig aufwendigen, individuellen Syntheseprozess in vielen Fällen ebenfalls mit hohen Kosten verbunden. Darüber hinaus sind die verwendeten Verbindungen oftmals toxisch, empfindlich gegenüber bestimmten Bedingungen, wie beispielsweise Luft oder Wasser, und es werden zum Teil aufwendige und ressourcenintensive Aufreinigungs- und Recyclingverfahren benötigt.<sup>33-34</sup>

Ein Katalysator wird generell durch dessen Aktivität, Selektivität sowie seine Lebensdauer gekennzeichnet. Hierbei wird zur Charakterisierung häufig die TON (*turnover number*, Umsatzzahl, Gleichung (2)) herangezogen, die der Stoffmenge ( $n$ ) an gebildetem Produkt bezogen auf die Stoffmenge verwendeten Katalysators entspricht.<sup>2</sup>

$$TON = \frac{n_{\text{Produkt}}}{n_{\text{Katalysator}}} \quad (2)$$

Mit: TON = Umsatzzahl (*turnover number*),  $n$  = Stoffmenge

Bezieht man diese Größe zusätzlich auf die Zeit ( $t$ ), so wird die TOF (*turnover frequency*, [mol·mol<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>], Gleichung (3)) erhalten, welche ein Maß für die Katalysatoraktivität darstellt. Hierbei wird, insbesondere bei industriellen Prozessen, eine hohe Umsatzzahl bei gleichzeitig hoher Aktivität angestrebt um das Reaktorvolumen und sowohl Katalysatorkonzentration als auch -verbrauch möglichst gering halten zu können.<sup>2</sup>

---

$$TOF = \frac{n_{\text{Produkt}}}{n_{\text{Katalysator}}} \cdot 1/t \quad (3)$$

Mit: TOF = *turnover frequency*,  $n$  = Stoffmenge,  $t$  = Zeit

Eine wichtige Kenngröße für die Enantioselektivität einer Reaktion ist der Enantiomerenüberschuss ( $ee$ , [%]) des gebildeten Produkts, welcher über die Masse ( $m$ ) nach Gleichung (4) ermittelt werden kann.

$$ee (\%) = \frac{|m_1 - m_2|}{m_1 + m_2} \cdot 100 \quad (4)$$

Mit:  $ee$  = Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*),  $m$  = Masse

Grundsätzlich können Katalysatoren hinsichtlich ihres Aggregatzustandes im Vergleich zum Reaktionsgemisch in zwei Klassen unterteilt werden. Liegt der Katalysator in einer unterschiedlichen Phase vor, wird von heterogenen Katalysatoren gesprochen. Liegt er dagegen in der gleichen Phase vor, wird er als homogener Katalysator bezeichnet. Beide dieser Systeme haben charakteristische Vor- und Nachteile. Wichtige Vorzüge der heterogenen Katalyse sind u.a die häufig leichtere Abtrennbarkeit und eine effizientere Rückgewinnung des Katalysators. Zudem befinden sich durch die unterschiedlichen Phasen häufig geringere Mengen an Katalysatorverunreinigungen im Produkt. Dies führt zu einer vereinfachten Handhabbarkeit, Prozessführung und Aufreinigung, woraus häufig geringeren Kosten resultieren.<sup>35</sup> Homogene Katalysatoren besitzen dagegen oftmals eine höhere Selektivität und Aktivität, da unter anderem im Gegensatz zu heterogenen Katalysatoren keine größeren Diffusionslimitierungen auftreten, jedoch ist dies in den meisten Fällen mit aufwändiger Separation und eingeschränkter Rezyklierbarkeit verbunden<sup>34</sup>.

Eine große Herausforderung bei der Generierung neuer katalytischer Systeme ist es daher eine Balance zwischen guter Handhabbarkeit und hoher Katalysatoreffizienz zu erreichen. In der modernen Chemie und Industrie spielt zudem, wie bereits eingangs erwähnt, die Steigerung der Nachhaltigkeit, Umweltfreundlichkeit und Ressourcenschonung bei chemischen Prozessen eine immer größere Rolle. Grüne Chemie, auch nachhaltige Chemie genannt, bezeichnet hierbei eine Vorgehensweise, die darauf ausgelegt ist, Produkte möglichst umweltverträglich und energieschonend zu produzieren. Einen wichtigen Beitrag dazu kann die weiße Biotechnologie liefern. Unter dieser, welche auch oftmals industrielle Biotechnologie genannt wird, wird die Verwendung von lebenden Organismen, aus ihnen gewonnener Teile sowie deren Produkte in industriellen Prozessen verstanden.<sup>4-7</sup>

Unter anderem aus diesen Gründen, sowie weiterer spezifischer Vorteile dieser Katalysator-Klasse, besteht in den letzten Jahren verstärkt ein Interesse an der Nutzbarmachung von Biomolekülen für katalytische Umsetzungen.

## 2.2 Biokatalyse

Allgemein bezeichnet Biokatalyse die Anwendung von Biomolekülen und Mikroorganismen in der synthetischen Chemie<sup>36</sup>. Im Rahmen der Biokatalyse können sowohl ganze Zellen, Zellbestandteile wie z.B. Zellorganellen sowie auch isolierte Biomoleküle eingesetzt werden<sup>4</sup>.

Die Verwendung biokatalysierter Prozesse reicht bis weit in die Antike zurück. Dort wurden bereits diverse Fermentationsprozesse unter anderem zur Herstellung von Bier, Wein und Käse genutzt<sup>37</sup>. Chemische und industrielle Bedeutung gewann die Biokatalyse allerdings erst in der Mitte des 19. Jahrhunderts. Eine bedeutende Entdeckung machte Pasteur, indem er Weinsäure mithilfe von *Penicillium glaucum* enantiomerenrein herstellte<sup>38</sup>. Bis heute haben bereits zahlreiche biokatalytische Prozesse den Weg in die Industrie genommen<sup>39-44</sup>.

Durch die Möglichkeit der großtechnischen Produktion von Enzymen mittels moderner Biotechnologie<sup>4</sup>, der Entdeckung neuer Enzyme sowie der Möglichkeit der Enzymmutation und Anpassung an den jeweiligen Prozess durch gerichtete Evolution oder rationales Proteindesign<sup>45-48</sup>, rückten diese Biokatalysatoren wieder verstärkt in den Fokus der Forschung.

Enzyme sind generell als leistungsstarke Biokatalysatoren zu betrachten, ohne die nahezu jede Reaktion in biologischen Systemen nur mit vernachlässigbarer Geschwindigkeit ablaufen und somit Leben unmöglich sein würde. Sie katalysieren unterschiedliche Reaktionstypen und werden nach Art der Reaktion in sechs Hauptklassen (Tab. 2.1) sowie, davon ausgehend, in weitere Unterklassen eingeteilt. In diesem Nomenklatursystem wird jedes Enzym durch eine vierstellige Nummer in der Form EC A.B.C.D charakterisiert. Diese Klassifizierung mittels der sogenannten EC-Nummer (*Enzyme Commission*) wird dabei von links nach rechts immer spezifischer.<sup>49</sup>

Tab. 2.1: Enzymklassifizierung<sup>49</sup>.

Hauptklasse	Bezeichnung	Reaktion
1	Oxidoreduktase	Redox-Reaktionen
2	Transferase	Übertragung funktioneller Gruppen
3	Hydrolase	Hydrolysereaktionen
4	Lyase	Nicht hydrolytische Spaltungen
5	Isomerase	Intramolekulare Umwandlungen
6	Ligase	Kovalente Verknüpfungen mittels Cofaktoren

Die katalytische Wirkung von Enzymen beruht, wie die eines jeden Katalysators, auf der Absenkung der Aktivierungsenergie, welche zunächst überwunden werden muss um eine chemische Reaktion in Gang zu setzen (vgl. auch Kap. 2.1). Die Substrate, also Reaktanden, werden im sogenannten aktiven Zentrum des Enzyms unter Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes gebunden. An diesem Ort findet die Reaktion statt und nach erfolgter Umwandlung der Substrate in die Reaktionsprodukte zerfällt dieser Komplex und die Produkte werden freigesetzt.

Wichtig für die enzymatische Aktivität ist hierbei neben der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) vor allem die korrekte Faltung der Aminosäureketten (Sekundärstruktur, Tertiärstruktur). Bei Enzymen die sich aus mehreren Einzelketten zusammensetzen, ist ebenfalls die korrekte Faltung der Untereinheiten zueinander (Quartärstruktur) von Bedeutung.

Enzyme besitzen im Allgemeinen eine hohe Substratspezifität, welche durch das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ bzw. das erweiterte Modell des „induced fit“ erklärt werden kann (Abb. 2.3).

Das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“, welches erstmals von EMIL FISCHER im Jahre 1894 postuliert wurde besagt, dass die Geometrien des Substrats und des aktiven Zentrum des Enzyms wie Schlüssel und Schloss zueinander passen müssen um eine chemische Wirkung aufeinander ausüben zu können<sup>50</sup>. Das Modell des „*induced fit*“ von KOSHLAND stellt ein erweitertes Modell des „Schlüssel-Schloss-Prinzips“ dar. Bei diesem wird davon ausgegangen, dass die Geometrien von aktivem Zentrum und Substrat nicht vollkommen starr sind sondern eine gewisse Konformationsflexibilität besitzen. Sie können sich daher in einem gewissen Rahmen durch Konformationsänderungen aneinander anpassen<sup>51</sup>.

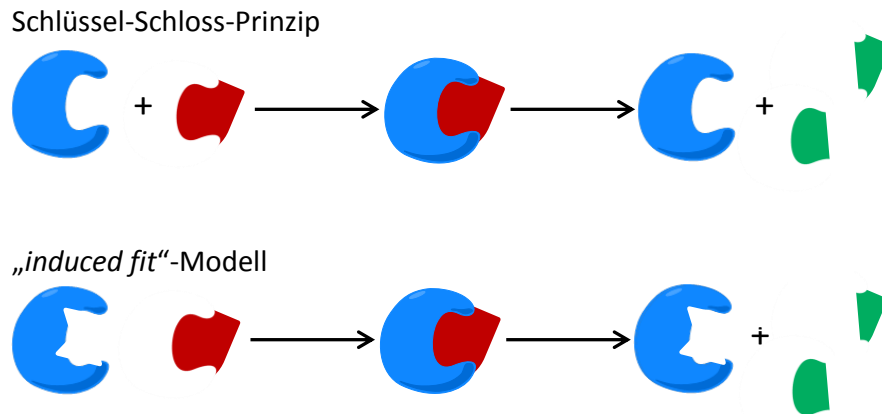


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Schlüssel-Schloss-Prinzips sowie des „Induced fit“-Modells. Enzym: blau; Substrat: rot; Produkte: grün.

Die sich daraus ergebende häufig sehr hohe Regio-, Chemo- und Enantioselektivität enzymatisch katalysierter Reaktionen sowie die oftmals geringe Toxizität dieser Biokatalysatoren machen sie unter anderem so interessant für einen industriellen Einsatz, z.B. in der Pharmazie und der Lebensmittelindustrie.<sup>13</sup>

Eine Vielzahl von Enzymen ist unter sehr milden Reaktionsbedingungen aktiv. Die bevorzugten pH-Werte liegen im Allgemeinen zwischen 5 und 8 bei Temperaturen zwischen 20 und 40 °C. Des Weiteren besitzen sie in vielen Fällen eine geringere Toxizität als gängige chemisch synthetisierte Katalysatoren und können meist in sehr viel geringeren Mengen eingesetzt werden. Dies resultiert in einem verminderten Energie- und Ressourcenverbrauch im Prozess und der damit einhergehenden Reduktion von Abfallstoffen. Oftmals kann durch den Einsatz selektiver Biokatalysatoren auch die Bildung toxischer oder gefährlicher Nebenprodukte in der Produktion vermieden werden. Dies führt unter anderem zu einer Verringerung der Komplexität für den Downstream eines Produktes.<sup>13, 52</sup>

### 2.2.1 Enzyme in wässrigen Reaktionsmedien

Bereits heute haben Enzyme ein breites Anwendungsspektrum bei diversen Prozessen in vielen Bereichen der Industrie gefunden<sup>53-59</sup>. Dies umfasst unter anderem die Synthese von Traubenzucker ausgehend von Mais- oder Kartoffelstärke mittels Amylasen, die Verwendung von Pektinasen bei der Gewinnung von Saft aus Früchten bis hin zur Ledergerbung unter Zuhilfenahme von Proteasen<sup>6</sup>. Des Weiteren löste z.B. die Synthese von Acrylamid mittels Nitrilhydratase die klassische chemische Produktion teilweise ab. Während bei der klassisch verwendeten

Kupferkatalysierten Synthese nur Teilumsätze erreicht werden können und eine aufwendige Aufreinigung (u.a. Abtrennung von Edukrückständen mittels Ionenaustauschern) nötig ist, liefert die enzymkatalysierte Route hohe Umsätze von 99,97 % mit einer hervorragenden Selektivität von 99,98 %<sup>5</sup>. Zudem macht beispielsweise der Chemiekonzern BASF chirale, enantiomerenreine Amine über eine Lipase-katalysierte Acylierung mit 2-Methoxyessigsäureethylester zugänglich<sup>37, 60</sup>.

Trotz der vielen Vorteile ergeben sich hier durch den Einsatz von Enzymen auch einige Einschränkungen. So ist beispielsweise ihre Stabilität unter Reaktions- und Lagerungsbedingungen deutlich begrenzt und sie arbeiten nur in einem engen Prozessparameterbereich mit hoher Effizienz. Zudem sind viele denkbare Edukte nicht oder nur schlecht wasserlöslich, was deren Umsatz erschwert und somit das Substratspektrum stark einschränkt. Die Verwendung zweiphasiger Systeme aus einem wässrigen und einem organischen Medium dagegen führt zu Stofftransportlimitierungen und beeinträchtigt häufig die Enzymstabilität.<sup>13</sup> Außerdem lässt sich die Stereoselektivität hier, im Gegensatz zu vielen chemisch synthetisierten Katalysatoren, nicht direkt umkehren. Für viele industrielle Prozesse ist Wasser kein geeignetes Reaktionsmedium, z.B. aufgrund der erhöhten Gefahr der mikrobiellen Kontamination oder auch des hohen Siedepunktes sowie der hohen Verdampfungsenthalpie. Aus diesen Gründen werden in den letzten Jahren verstärkt Anstrengungen unternommen diese Biokatalysatoren auch in unkonventionellen, insbesondere organischen, Medien unter Erhalt ihrer Aktivität nutzbar zu machen.

### 2.2.2 Enzyme in unkonventionellen Medien

Als unkonventionelle Medien werden alle Reaktionsmedien für Enzyme bezeichnet, die von Wasser abweichen. Entgegen der früher vorherrschenden Meinung zeigen Enzyme auch in nicht-wässrigen Reaktionsmedien katalytische Aktivität. In den letzten Jahrzehnten wurde die Anwendung von Enzymen in solchen Systemen verstärkt erforscht. Diese sind z.B. ionische<sup>61-63</sup> oder überkritische<sup>64-67</sup> Flüssigkeiten, Gasphasenreaktionen<sup>68-69</sup> und auch organische Lösungsmittel. Im Folgenden liegt der Fokus auf der Verwendung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln. Für weitere Informationen bezüglich anderer unkonventionellen Medien sei auf die einschlägige obenstehende Literatur verwiesen.

Die Nutzung dieser Biokatalysatoren in organischen Lösungsmitteln führt zu einer starken Erweiterung des Reaktionsspektrums. Zum einen steigt hier die Anzahl umsetzbarer Substrate, da auch solche verwendet werden können, die in wässrigem Medium nicht oder sehr schlecht

---

löslich sind. Zum anderen kann die Wahl des Reaktionsmediums durchaus einen bedeutenden Einfluss auf die Substratspezifität sowie die Regio-, Chemo- und Enantioselektivität der katalysierten Reaktionen haben<sup>9, 14, 70-73</sup>. Mittels dieses sogenannten *medium-engineering*<sup>73</sup> kann der Einfluss des Reaktionsmediums auf das Enzym gezielt ausgenutzt werden, was die Möglichkeit der Entwicklung neuer Synthesestrategien eröffnet. So wird beispielsweise als Hauptprodukt der durch Chymotrypsin katalysierten Acetylierung von 2-(3,5-Dimethoxybenzyl)-1,3-propandiol in Diisopropylether oder Cyclohexan als Lösungsmittel der *S*-Monoester gebildet. Dagegen ist in Acetonitril oder Essigsäuremethylester das *R*-Enantiomer das bevorzugte Produkt<sup>74</sup>.

Die Verwendung organischer Lösungsmittel ermöglicht ebenfalls die Durchführung von Reaktionen, welche in wasserhaltigen Systemen nicht durchführbar sind. So verschiebt sich beispielsweise das Reaktionsgleichgewicht von der Seite der Esterhydrolyse hin zur Synthese von Estern aus Carbonsäuren. Zudem können so im wässrigen Medium häufig vorkommende Nebenreaktionen, wie z.B. die Hydrolyse von Carbonsäureestern sowie -anhydriden, unterdrückt werden.<sup>13</sup>

Des Weiteren wird häufig eine Erhöhung der thermischen Stabilität von Enzymen in organischen Solventien beobachtet. So werden z.B. für  $\alpha$ -Chymotrypsin<sup>11</sup>, Schweinepankreas-Lipase<sup>12</sup> und Ribonuclease<sup>75</sup> Halbwertszeiten von mehreren Stunden bei 100 °C erreicht, während in Wasser innerhalb weniger Sekunden eine Deaktivierung stattfindet. Diese tritt vor allem in hydrophoben Lösungsmitteln bei geringen Wassergehalten auf. Während Enzyme im Wässrigen sowie auch wässrig-organischen Lösungsmittelgemischen denaturieren und somit eine Strukturänderung erfahren können, fehlt in rein organischen Medien die nötige Konformationsflexibilität, da es hier nicht möglich ist Wasserstoffbrücken zu den umgebenden Solvensmolekülen auszubilden.<sup>10, 71</sup> Ein gewisser Wasseranteil muss allerdings am Enzym verbleiben, damit dessen Aktivität erhalten bleibt. ZAKS und KLIBANOV zeigten, dass die enzymatische Aktivität in unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln annähernd konstant war solange die Menge des an die Biokatalysatoren gebundenen Wassers gleich war<sup>76</sup>. Es wurde die maximale Aktivität bei einer Wassermenge gefunden, welche in etwa einer Monoschicht um das Enzym herum entspricht. In hydrophilen Solventien (z.B. Aceton, THF) ist daher ein erheblich höherer Wassergehalt nötig als in hydrophoben Lösungsmitteln (z.B. Toluol, Heptan), da erstere eher dazu neigen dem Enzym seine Hydrathülle zu entziehen. Für eine optimale enzymatische Aktivität und Enzymstabilität muss der Wassergehalt für jedes Lösungsmittel und Enzym deshalb eingestellt werden.<sup>9-11</sup>

Ein weiterer Parameter, welcher die Enzymaktivität entscheidend beeinflusst, ist der Protonierungsgrad verschiedener funktioneller Gruppen innerhalb des Enzyms, insbesondere derjenigen im aktiven Zentrum. Dieser kann im wässrigen Medium relativ simpel über den pH-Wert einer Pufferlösung eingestellt werden, in organischen Lösungsmitteln hingegen entfällt diese Möglichkeit. Es wurde allerdings beobachtet, dass die Aktivität der Biokatalysatoren in organischen Lösungsmittelsystemen deutlich vom pH-Wert der Lösung abhängt, aus der die Enzyme zuvor isoliert wurden. Dieser Effekt wird „*pH-Memory*“ genannt.<sup>9</sup> Ein häufig eingesetztes und enzymeschonendes Verfahren zur Isolierung aus wässrigen Lösungen stellt hierbei die Lyophilisierung (Gefriertrocknung) dar. Dabei wird die Lösung, welche das Enzym enthält, unter Einsatz von flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Wasser anschließend im Hochvakuum vollständig sublimiert.

Aufgrund der bereits dargestellten Vorteile wurden in den letzten Jahren verstärkt Anstrengungen unternommen, die in aller Regel in organischen Systemen unlöslichen Enzyme für eine Nutzung in organischen Lösungsmitteln unter Erhalt ihrer Aktivität zugänglich zu machen. Dies umfasst unter anderem die direkte Suspendierung von festem Enzympulver in organischen Medien<sup>11</sup>, die Anwendung dieser Biokatalysatoren in zweiphasigen Solvenssystemen aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel<sup>77-79</sup> sowie in Mischungen aus Wasser und wasser-mischbaren organischen Solventien<sup>80-81</sup>. Zudem können Enzyme auch an festen Trägermaterialien immobilisiert werden oder in amphiphile Polymer-Netzwerke oder elektrogenesponnene Nanofasern eingelagert werden, was die typischen Vor- und Nachteile heterogener Katalysatorsysteme mit sich führt (vgl. auch Kapitel 2.1)<sup>8, 82-91</sup>.

Eine weitere Möglichkeit ist das Erzielen einer Löslichkeit von Enzymen im organischen Reaktionsmedium beispielsweise durch die Bildung von Konjugaten mit verschiedenen Polymeren. Solche Polymer-Konjugate sind bekannt dafür Enzyme vor der Zersetzung durch Proteasen und Denaturierung zu schützen<sup>92-93</sup>. Das am meisten erforschte Polymer für Protein- und Enzymmodifizierungen ist Poly(ethylenglycol) (PEG). Diese Vorgehensweise wird auch PEGylierung genannt. Die erste PEGylierung wurde bereits 1977 von ABUCHOWSKI *et al.* durchgeführt<sup>94</sup>. Seitdem wurden praktisch alle funktionellen Gruppen eines Enzyms bereits über verschiedenste Kupplungsmethoden PEGyliert<sup>95-98</sup>. Der Fokus neuerer Kupplungsstrategien liegt auf der Funktionalisierung über Thiolgruppen<sup>99-101</sup>. Häufig liegt besonderes Augenmerk bei PEGylierungen auf der Synthese therapeutisch aktiver Konjugate<sup>102</sup> mit höheren Verweilzeiten im Körper und höherer Stabilität gegen Proteasen<sup>92</sup>. Diese Forschung hat bereits zu zugelassenen Medikamenten geführt<sup>92, 103</sup>. Neben der medizinischen Anwendung werden PEG-Proteinkonjugate auch für die Biokatalyse verwendet. Es ist literaturbekannt, dass verschiedene mit PEG modifi-



zierte Enzyme und Proteine in organischen Lösungsmitteln löslich sind<sup>104-105</sup> und auch in einigen Fällen eine katalytische Aktivität im organischen Reaktionsmedium aufweisen<sup>106</sup>.

Zudem wurden verschiedene weitere Polymere zur Protein- und Enzymmodifikation verwendet. So wurden z.B. Polystyrol-Reste an Enzyme gebunden. Dies führt zur Bildung von größeren amphiphilen Strukturen, den sogenannten „Riesenamphiphilen“ (*giant amphiphiles*).<sup>107-108</sup> Außerdem wurden intelligente und schaltbare Polymer-Enzym-Konjugate hergestellt und untersucht<sup>109</sup>. Temperatursensitive und -steuerbare Konjugate können beispielsweise durch die Konjugation mit Poly(N-isopropylacrylamid) (PNiPAM) oder Poly[(oligoethylenglycol)methylethermethacrylat] erhalten werden<sup>87, 110-113</sup>.

Neben der direkten Anbindung von Polymeren an Proteine (*graftin to*) wurden auch unterschiedliche Möglichkeiten erforscht Polymere von der Enzymoberfläche aus wachsen zu lassen (*grafting from*). Beispielsweise die zahlreichen an der Oberfläche zugänglichen Lysinreste, die in Proteinen vorhanden sind, ermöglichen so die Synthese extrem dichter Polymermäntel. Viele der bisher verwendeten Initiatoren besitzen hierbei eine geringe Löslichkeit in wässriger Lösung. Schwer wasserlösliche Initiatoren erfordern die Durchführung von Immobilisierungsreaktionen in Gemischen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln, die zur Inaktivierung und/oder Denaturierung von Enzymen führen können<sup>114-117</sup>. Diese Initiatoren erlauben auch keine Kontrolle über das Ausmaß der Modifikation<sup>114</sup>. Um die Initiator-Protein-Reaktion zu verbessern, sind wasserlösliche ATRP-Initiatoren beschrieben worden<sup>118-119</sup>. Typischerweise enthalten Initiatoren eine proteinreaktive Einheit, wie einen N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) und ein Transfermittel (typischerweise ein Halogen, wie Br, Cl oder F), das die kontrollierte Polymerisationsreaktion initiiert. Es wurde gezeigt, dass Immobilisierungsreaktionen mit wasserlöslichem ATRP-Initiator hocheffizient sind und zur Herstellung von Protein-Polymer-Konjugaten hoher Dichte führen<sup>118, 120-122</sup>.

Eine Alternative, insbesondere zu PEG, ist die Polymerklasse der Poly(2-oxazolin)e (POx), welche durch lebende, kationische Ringöffnungspolymerisation von 2-Alkyl-2-oxazolinen zugänglich sind. (vgl. auch Kap. 4.1.1) Die POx können durch den Einsatz verschiedener Initiatoren und Terminierungsmittel einfach mit diversen Endgruppen ausgestattet werden. Der lebende Charakter der Polymerisation erlaubt die Synthese definierter Polymere mit geringem Polydispersitätsindex (PDI) und der Polymerisationsgrad (*degree of polymerization*, DP) kann durch das Initiator-zu-Monomer-Verhältnis eingestellt werden. Die Verwendung eines Mikrowellenreaktors erlaubt die Synthese verschiedenster POx innerhalb kurzer Zeitspannen.<sup>123-124</sup>

---

Aufgrund des lebenden Charakters und der Variabilität der Seitenkette können davon ausgehend verschiedene Polymerarchitekturen generiert werden. Dazu gehören amphiphile Copolymere<sup>125-126</sup>, amphiphile Polymernetzwerke<sup>82, 84</sup> und elektrogesponnene Nanofasern<sup>83</sup> als Träger für Enzyme, bei denen sich die Hydrophobizität über die Wahl des Monomers einstellen lässt<sup>127</sup>.

MIYAMOTO *et al.* waren im Jahre 1990 die ersten, die ein POx-Enzym-Konjugat durch die Modifikation einer Katalase mit Poly(2-ethyloxazolin) (PEtOx) generierten<sup>128</sup>. Die höchste Organolöslichkeit eines solchen Konjugates wurde mit 0.077 mg/mL in Benzol angegeben. Trotz der geringen Löslichkeit waren diese Konjugate bis zu 20-mal aktiver in diesem Lösungsmittel als das korrespondierende freie Enzym. Seitdem haben diverse Forschungen in diesem Bereich sowohl für therapeutische Zwecke<sup>129-131</sup> als auch mit dem Ziel, Enzyme und Proteine organolöslich zu machen,<sup>132-134</sup> stattgefunden. Für eine mit Poly(2-isopropylloxazolin) modifizierte Lipase aus *Candida rugosa* konnten Aktivierungen von annähernd 160 erreicht werden, auch wenn das Konjugat nur feindispers in Toluol vorlag<sup>133</sup>. KONIECZNY *et al.* generierten POx-Enzym-Konjugate (Abb. 2.4) mit diversen Enzymen, welche sowohl eine Aktivität im wässrigen als auch im organischen Medium zeigen<sup>16, 18</sup>.

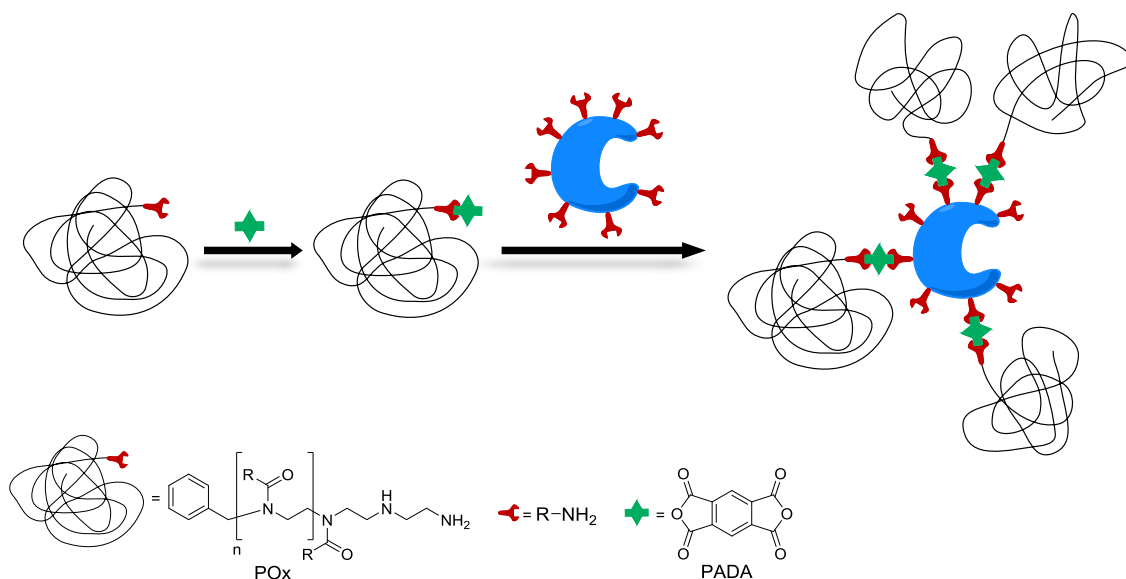


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Funktionalisierung von Enzymen mit Poly(2-oxazolin)en mit Pyromellitsäuredianhydrid (PADA) als Linker nach KONIECZNY *et al.*<sup>16-18</sup>.

Dabei wurde ermittelt, dass obwohl die Aktivität im Wässrigen im Vergleich zum nativen Enzym sinkt die Konjugation in organischen Solventien aktivierend wirkt. Die höchsten Aktivie-

rungen wurden hierbei für ein PMOx-Laccase-Konjugat mit 153000 und ein entsprechendes  $\alpha$ -Chymotrypsin-Konjugat mit 1146 gefunden.<sup>17</sup>

Trotz der vielen Vorteile, die eine Nutzung von Enzymen im organischen Medium bietet, lassen sich hierdurch nicht alle Einschränkungen dieser Biokatalysatoren umgehen. Eine große Herausforderung stellt nach wie vor die Erweiterung des Reaktionsspektrums dar, da nicht für jede mögliche Reaktion ein natürliches Enzym vorliegt. Ein vielversprechender Ansatz zur Lösung dieses Problems ist die Generierung von künstlichen Metalloenzymen, welche im Folgenden näher betrachtet wird.

### 2.2.3 Artificielle Metalloenzyme

Zusätzlich zu ihrer eigentlichen katalytischen Aktivität besitzen Enzyme eine definierte chirale Matrix. Dies eröffnet die Möglichkeit, sie als chirale Liganden für katalytisch aktive (Übergang)metalle und deren Komplexe zu nutzen. Bereits im Jahre 1978 führten WILSON und WHITESIDES einen Diphosphinrhodium-Komplex in unterschiedliche Proteine ein und generierten so homogene asymmetrische Hydrierungskatalysatoren<sup>135</sup>. Diese Kombination aus Proteinen und Metallen resultiert in sogenannten „artifiziellen Metalloenzymen“ (AME, künstliche Metalloenzyme, *artificial metalloenzymes*) (Abb. 2.5), welche die Molekülerkennungsfähigkeit des Enzyms und das breite Reaktionsspektrum der Metallspezies besitzen<sup>23, 136</sup>. Durch diese Modifikation lässt sich das Spektrum möglicher Reaktionen also gravierend erweitern. Zudem bietet die gerichtete Evolution die Möglichkeit den Enzymliganden an das gewünschte System anzupassen. Artificielle Metalloenzyme, welche über verschiedene Bildungsstrategien erhalten wurden, wurden bereits für eine Vielzahl verschiedener metallkatalysierter Reaktionen verwendet. Dazu gehören unter anderem Sulfoxidierungen<sup>137</sup>, Hydrierungen<sup>135, 138-139</sup>, Diels-Alder-Reaktionen<sup>140-141</sup>, Epoxidierungen<sup>142-143</sup> und Dihydroxylierungen<sup>144</sup>.

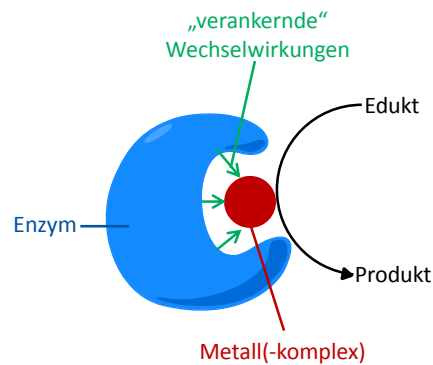


Abb. 2.5: Schematische Darstellung eines künstlichen Metalloenzym.

Künstliche Metalloenzyme werden im Allgemeinen nach der Art des biomolekularen Wirtes, der verwendeten katalytisch aktiven Metallspezies und der Bindungsstrategie klassifiziert<sup>145</sup>.

Im Allgemeinen werden drei Strategien zur Einbettung der katalytisch aktiven Metallspezies in eine Proteinmatrix unterschieden, die koordinative (*dativ anchoring*) die supramolekulare (*supramolecular anchoring*) sowie die kovalente (*covalent anchoring*) Verankerungsstrategie<sup>145-146</sup>, wobei sich die beiden erstgenannten durchaus in einigen wichtigen Punkten überschneiden und oftmals nicht klar voneinander abgegrenzt werden können.

Die koordinative Verankerungsstrategie basiert generell auf der direkten Interaktion zwischen den Aminosäuren des Proteins mit dem Metallion oder -komplex. Häufig wird hierbei ein bereits im nativen Enzym vorkommendes Metallion gegen ein anderes ausgetauscht (Abb. 2.6).<sup>142, 147</sup>



Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Generierung künstlicher Metalloenzyme mittels Metallaustausch; M = Metall(komplex).

YAMAMURA und KAISER waren die ersten, die einen solchen Hybridkatalysator herstellten, indem sie das natürlich vorkommende Zinkion in Carboxypeptidase A durch Kupferionen austauschten<sup>147</sup>. Zwei weitere Berichte beschreiben die Epoxidierung verschiedener Styrolerivate

mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Oxidationsmittel, katalysiert durch Rinder- und menschliche Carbonanhydrasen, wobei das ursprüngliche katalytische  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion durch eine Manganspezies ersetzt wurde. Die von OKRASA und KAZLAUSKAS veröffentlichte Studie berichtet von Umwandlungen zwischen 1 % (TON = 2,2 nach 2 h) und 12 % (TON = 21 nach 16 h) und Enantiomerenüberschüssen zwischen 50 % *ee* und 66 % *ee* bei 30 °C mit BES-Puffer (0,1 M, pH 7,2) als Reaktionsmedium<sup>148</sup>. SOUMILLION *et al.* verwendeten ein wässriges Phosphatpuffer (50 mM, pH 7)/DMF-Gemisch und berichteten von Ausbeuten zwischen 9 % und 57 % mit 18 bis 52 % *ee* über Nacht bei 4 °C<sup>149</sup>. Die Epoxidierung von Styrol mit einer künstlichen Manganchloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* in BES-Puffer (0,1 M, pH 7,2) ergibt 40 % Umsatz nach 5 h (TON = 1500) mit einem Enantiomerenüberschuss von 49 % *ee* (*R*).<sup>148</sup> KÖHLER *et al.* bildeten dagegen erfolgreich artifizielle Metalloenzyme aus Proteinen ohne eigenes Metallzentrum, wie Streptavidin und Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA), für die *cis*-Dihydroxylierung mit Osmiumtetroxid im wässrigen Reaktionsmedium und erreichten dabei Enantioselektivitäten bei der Umsetzung von  $\alpha$ -Methylstyrol bis hin zu 97 % *ee* bei moderaten TONs von bis zu 27<sup>144</sup>.

Die supramolekulare Verankerungsstrategie basiert auf der hohen Affinität diverser Moleküle zum Protein-Wirtsmolekül<sup>150</sup>. Hierbei wird ausgenutzt, dass manche Enzyme und Proteine eine beachtlich starke Wechselwirkung zu hydrophoben Molekülen, wie z.B. Fettsäuren oder Porphyrinen, ausbilden. Eine in diesem Zusammenhang häufige Methode ist die Verwendung der Biotin-(Strept-)Avidin-Technologie. Bei dieser Strategie wird die hohe Affinität von (Strept-)Avidin zu Biotin (Biotin-Avidin  $K_a = 10^{15}$  1/M) ausgenutzt, wobei der Metallkatalysator über ein Linkermolekül kovalent an das Biotin gebunden wird. Inspiriert durch die Pionierarbeit von WILSON und WHITESIDES<sup>135</sup> hat z.B. die Arbeitsgruppe um WARD eine Bibliothek von künstlichen Metalloenzymen mit biotinylierten Cofaktoren aufgebaut. Diese Metalloenzyme katalysieren verschiedene Reaktionen regio-, diastereo- und enantioselektiv, darunter Suzuki-Kreuzkupplungen<sup>151-152</sup>, allylische Alkylierungen<sup>153</sup>, Sulfoxidationen<sup>154-155</sup>, oder die Hydrierung von Olefinen<sup>156-161</sup>, Ketonen<sup>162-164</sup>, Enonen und Iminen<sup>165-169</sup>.

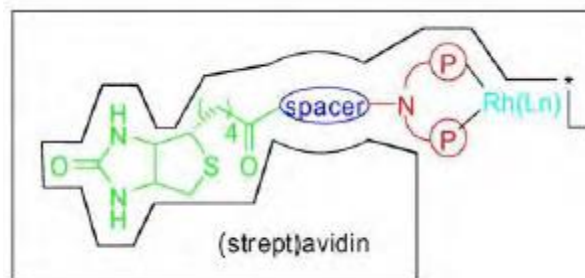


Abb. 2.7: Biotin-(Strept-)Avidin Technologie zur Generierung künstlicher Metalloenzyme durch die Verankerung der katalytisch aktiven Metallspezies an das Wirtspolypeptid über einen Liganden, welcher über einen Spacer mit Biotin verknüpft ist. Abb. aus STEINREIBER und WARD<sup>145</sup>.

Ein weiteres Beispiel für Proteine mit hoher Wirtsspezifität sind Serum-Albumine, die häufigsten Serumproteine in Säugetieren. Sie sind gut löslich in Wasser ( $>585 \text{ mg/mL}$  für BSA)<sup>170</sup> und binden bekanntlich eine Vielzahl von hydrophoben Metaboliten, Medikamenten und kleinen Molekülen. So transportiert Serum-Albumin beispielsweise Fettsäuren<sup>171</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass Komplexe, die potentiell in der Lage sind aktive Katalysatoren in der stereoselektiven Katalyse zu sein, wie z.B. Metall-Salen-Komplexe<sup>172-173</sup>, Phthalocyanine<sup>141</sup> oder Corrole<sup>174-176</sup> ebenfalls an Albumine binden. Ungeachtet der hohen Affinität von Albuminen gegenüber einer Vielzahl großer organischer Moleküle sind die ersten Albumin-Metallohybride durch kovalente Verankerung eines kleinen anorganischen Komplexes generiert worden. Die so dargestellten BSA-Osmatester katalysieren die stereoselektive Dihydroxylierung von Olefinen bis zu einem *ee* von 68 %<sup>177</sup>. Hierbei wurde vermutet, dass das Osmat über primäre Aminogruppen des Lysins an das Protein bindet.

Das Ziel der kovalenten Verankerungsstrategie ist die selektive Modifikation bestimmter Aminosäuren des Proteinwirts mit Molekülen, welche als gute Liganden für die gewünschte katalytisch aktive Metallspezies fungieren. So generierten beispielsweise KAISER und LAWRENCE eine potente Oxidoreduktase aus Papain durch die kovalente Modifikation der Thiolgruppe des Cysteins mit Flavinen<sup>178</sup>. DAVIES und DISTEFANO publizierten 1997 die kovalente Bindung von 1,10-Phenanthrolin an fettsäurebindende Proteine und die anschließende Einlagerung von Kupfer<sup>179</sup>.

Die meisten Reaktionen mit künstlichen Metalloenzymen wurden in wässrigen Lösungen, dem natürlichen Milieu der Enzyme, oder wässrig-organischen Mischsystemen durchgeführt. Es gibt nur verhältnismäßig wenige Berichte, in denen hierbei ein hoher Anteil organischer Lösungsmittel erfolgreich eingesetzt wurde.<sup>19-20, 150, 180-183</sup> FUJIEDA *et al.* generierten in 2017 beispiels-

weise eine hyperstabile, artifizielle Osmium-Peroxygenase, welche die Dihydroxylierung von 2-Methoxy-6-vinylnaphtalen in *tert*-BuOH/HEPES-Puffer (50:50 v/v) mit einer Ausbeute von bis zu 92 % katalysiert<sup>183</sup>.

Diese Lösungsmittellimitierung schränkt die Bandbreite möglicher Reaktionen und Substrate stark ein. Um auch hier alle Vorteile, die die Anwendung von Enzymen im organischen Lösungsmittel mitbringt (vgl. Kapitel 2.2.2), nutzen zu können, ist es wünschenswert künstliche Metalloenzyme auch in rein organischen Lösungsmitteln anwenden zu können.

KONIECZNY und LEURS entwickelten ein Konzept, das die Verwendung von AMEs in solchen Lösungsmittelsystemen erlaubt<sup>17, 184-185</sup> (Abb. 2.8).

Die Basis dieses Konzepts bildet die etablierte Synthese organolöslicher Poly(2-oxazolin)-Enzym-Konjugate von KONIECZNY, welche –insoweit sie für diese Arbeit von Bedeutung ist– in Kapitel 4.1.1 näher erläutert wird. Für weiterführende synthetische und analytische Details sowie tiefergehende Informationen über die Anwendungsmöglichkeiten und Limitierungen dieser Polymer-Enzym-Konjugate (PEKs) sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen<sup>16-18, 184</sup>.

Zusätzlich zur eigenen enzymatischen Aktivität der PEK wurde vermutet, dass diese im organischen Lösungsmittel als *Core-Shell*-Nanopartikel fungieren können, welche in der Lage sind, anorganische Metallsalze im hydrophilen Proteinkern zu binden. Daher wurden am Beispiel der SHARPLESS-Dihydroxylierung zunächst im Rahmen von Promotionsstudien von KONIECZNY<sup>17</sup> und Forschungen im Rahmen der Diplomarbeit von LEURS<sup>185</sup> erste Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt.

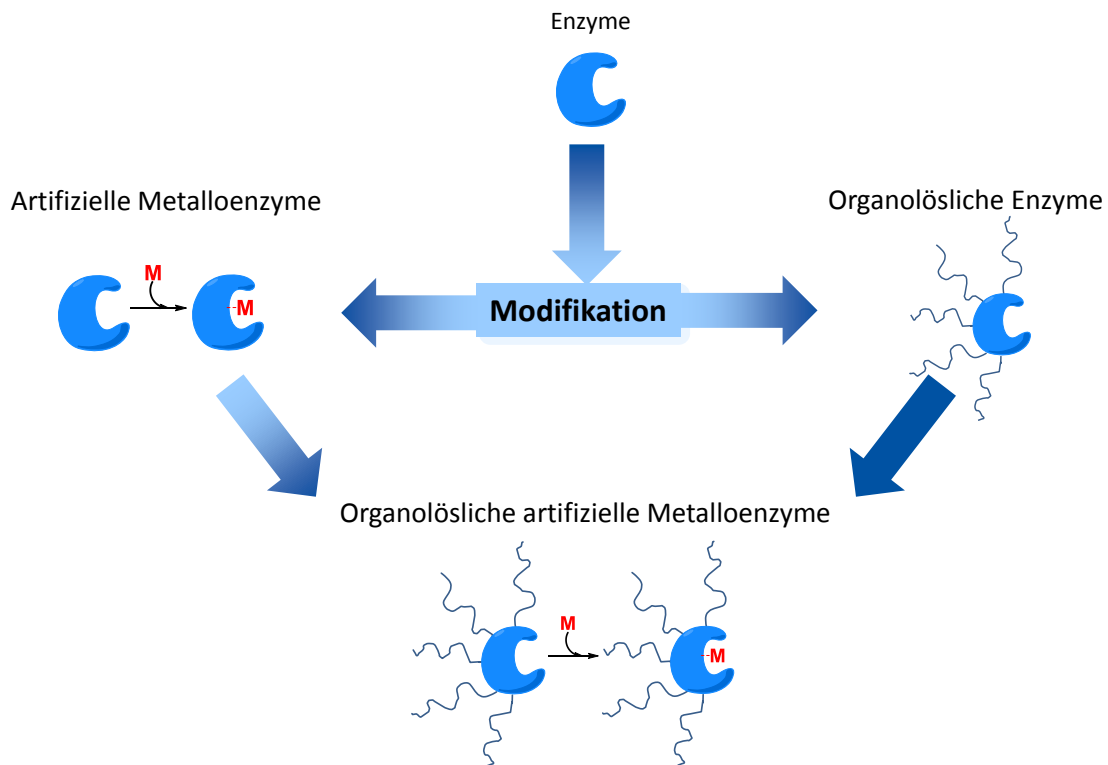


Abb. 2.8: Schematische Darstellung des Konzepts zur Generierung organolöslicher AMEs durch Verknüpfung der Strategien zur Bildung von künstlichen Metalloenzymen mit der Funktionalisierung von Proteinen mittels Poly(2-alkyloxazolin)en.

Im Rahmen dessen synthetisierten KONIECZNY und LEURS die ersten organolöslichen artifiziellen Metalloenzyme durch kovalente Modifikation verschiedener Enzyme mit POx und anschließende Insertion von Osmat (Abb. 2.9)<sup>184</sup>.

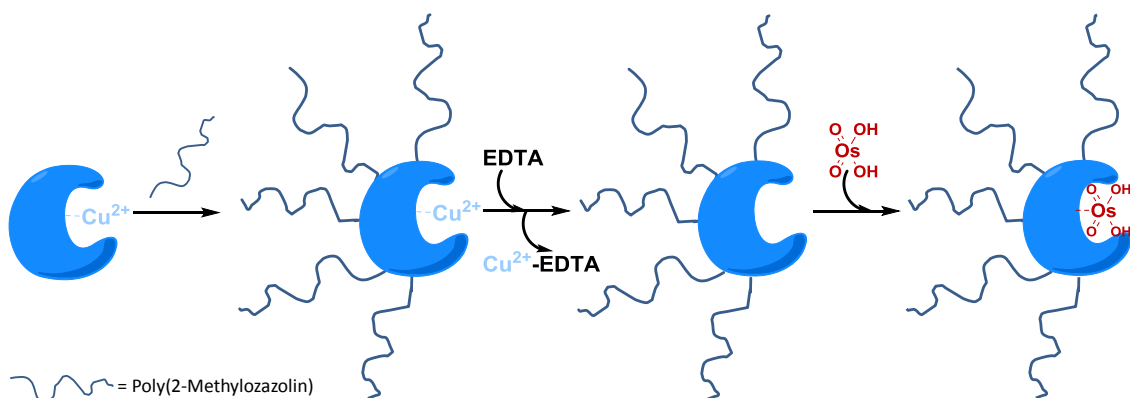


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der Generierung organolöslicher artifizieller Metalloenzyme am Beispiel von Osmat-Laccase-PMOx.



Die so generierte artifizielle Osmat-Laccase-PMOx liefert in der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol in wassergesättigtem Chloroform Enantiomerenüberschüsse von 99,4 %, welche sogar höher sind als die gängiger Sharpless-Katalysatoren (97 % *ee*)<sup>186</sup>. Die Umsatzzahlen (*turnover number*, TON) bezogen auf das eingesetzte Osmat sind allerdings mit maximal 42 nur gering. Nichtsdestotrotz verdeutlicht dies das große Potential der Anwendung künstlicher Metalloenzyme in organischen Medien.

## 2.3 Tandemkatalyse

Prinzipiell ermöglicht die bereits vorgestellte Nutzung von Enzymen als AMEs in Kombination mit der katalytischen Aktivität des nativen Enzyms die Generierung spezifischer Tandemkatalysatoren. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, eine tandemkatalysierte Reaktion im organischen Medium durch Kombination der natürlichen enzymatischen Aktivität mit ihrer Funktion als AMEs bei der asymmetrischen Dihydroxylierung (Kap. 4.1.3) zu etablieren. Die erhaltenen Ergebnisse dieser Forschungen werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

### 2.3.1 Begriffsdefinitionen

Tandemreaktionen besitzen im Allgemeinen einige Vorteile und stehen somit verstärkt im Interesse aktueller Forschungen<sup>187-191</sup>. Hierbei kommen häufig Metall-basierte Katalysatoren zum Einsatz.

Eine Tandemkatalyse ist nach FOGG und DOS SANTOS<sup>191</sup> eine gekoppelte Katalyse über zwei oder mehr mechanistisch unterschiedliche Reaktionen, bei der alle katalytisch aktiven Spezies, entweder maskiert oder in ihrer aktiven Form, bereits von Anfang an im Reaktionsgemisch vorliegen. Hierbei kann zwischen orthogonaler, Auto- und assistierter Auto-Tandemkatalyse unterschieden werden, wobei diese klar von Eintopf- („*one-pot*“) und Kaskadenreaktionen abgegrenzt werden.

Bei der orthogonalen Tandemkatalyse finden mindestens zwei unterschiedliche, sich gegenseitig nicht inhibierende Katalysatoren Anwendung. Wie Abb. 2.10 zeigt führt die Katalysereaktion des Katalysators A vom Edukt A zum Zwischenprodukt B, welches in einer Folgereaktion vom Katalysator B zum Produkt B umgesetzt wird. Wichtig ist hierbei, dass die verwendeten Katalysatoren verschiedene Substrate über unterschiedliche mechanistische Wege umsetzen, so dass gewährleistet ist, dass beispielsweise das Substrat A nicht durch den Katalysator B –

und umgekehrt- umgesetzt werden kann. Zudem sollten die vorhandenen Edukte, Zwischenprodukte und Produkte sich nicht inhibierend auf einen Reaktionsschritt auswirken.<sup>191</sup>

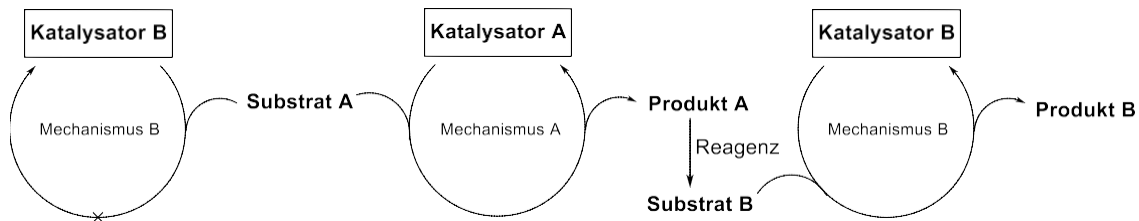


Abb. 2.10: Schematische Darstellung einer orthogonalen Tandemkatalyse aus FOGG und DOS SANTOS<sup>191</sup>.

Bei der Auto-Tandemkatalyse wird dagegen nur eine katalytisch aktive Spezies A verwendet um das Substrat A unter Ausbildung eines Zwischenproduktes A in das gewünschte Produkt B zu überführen. Der verwendete Katalysator A weist hierbei zwei unterschiedliche Reaktivitäten auf, wobei beide vom Katalysator katalysierten Reaktionen über unterschiedliche Mechanismen ablaufen (Abb. 2.11).<sup>191</sup>

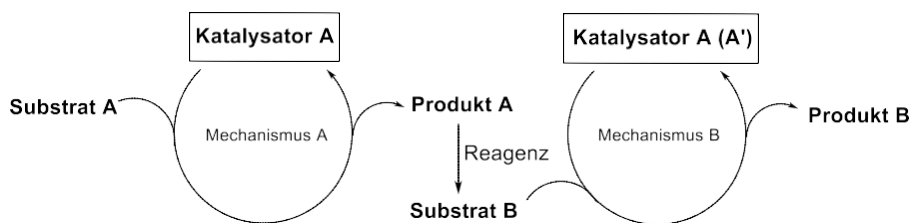


Abb. 2.11: Schematische Darstellung einer Auto-Tandemkatalyse aus FOGG und DOS SANTOS<sup>191</sup>.

Der erste Reaktionsschritt der assistierten Auto-Tandemkatalyse ist die Umsetzung des Substrats A zum Zwischenprodukt A durch einen Katalysator A. Durch Zugabe eines externen Stimulus (des sogenannten Triggers), z.B. in Form eines Reagenzes, wird der Katalysator A in situ in eine neue katalytisch aktive Spezies B umgewandelt und es kommt in Folge dessen zur Reaktion des Zwischenprodukts A zum gewünschten Endprodukt B (Abb. 2.12).<sup>191</sup>

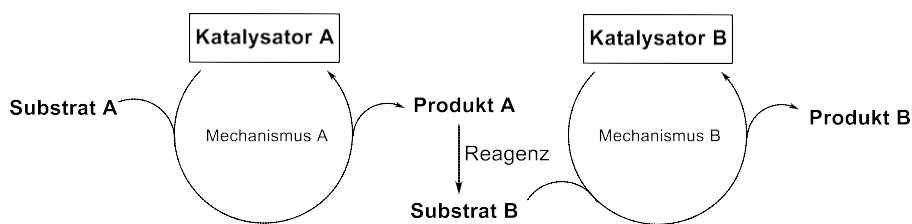


Abb. 2.12: Schematische Darstellung einer assistierten Auto-Tandemkatalyse aus FOGG und dos SANTOS<sup>191</sup>.

Aus den dargestellten Vorgehensweisen ergeben sich einige spezifische Vorteile, aber auch Herausforderungen. So entfällt bei tandemkatalysierten Reaktionen beispielsweise die häufig zeit- und kostenintensive Aufreinigung von Zwischenprodukten. Zudem kann gegebenenfalls die Ausbeute des Prozesses erhöht werden, da es keine Masseverluste durch Aufarbeitungsprozesse gibt. Im Falle der Auto- bzw. unterstützten Tandemkatalyse ergibt sich zudem eine höhere Katalysatoreffizienz bzw. bei der orthogonalen und Auto-Tandemkatalyse eine größere Prozesseffizienz. Ein wichtiger Nachteil kann, wie bei allen katalytischen Prozessen, eine schwierige Katalysatorrückgewinnung sein. Zudem ergibt sich hier generell die Herausforderung, effiziente Reaktionsbedingungen zu finden, die für beide Katalysatoren geeignet sind. Speziell bei der orthogonalen Tandemkatalyse besteht außerdem eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass einer der Katalysatoren einen nachteiligen Effekt auf den zweiten Katalysator ausübt bzw. bei den Umsetzungen zudem unerwünschte Nebenprodukte entstehen.<sup>191</sup>

### 2.3.2 Enzymatische Systeme für die Tandemkatalyse

Unter anderem bieten enzymatische Systeme vielversprechende Werkzeuge zur Generierung aktiver und selektiver tandemkatalytischer Synthesen. So wurden beispielsweise bereits *in vitro* Multi-Enzym-Reaktionen zur Synthese verschiedener Substanzen erfolgreich eingesetzt<sup>192-194</sup>. Dies umfasst u.a. die (enantioselektive) Bildung von Alkoholen<sup>195-197</sup>, die Synthese von Aminosäuren und Aminen<sup>198-200</sup>, sowie C-C-Bindungsknüpfungen<sup>201</sup>.

Eine Möglichkeit Enzyme unter Kopplung ihrer natürlichen enzymatischen Aktivität und eines eingeführten artifiziellen katalytisch aktiven Zentrums zur Dihydroxylierung bietet die Klasse der Lipasen, welche zur Enzymklasse der Hydrolasen gehören. Sie kommen in beinahe jedem Organismus vor und katalysieren dort die hydrolytische Spaltung von häufig wasserunlöslichen Fetten in Glycerin und Fettsäuren.<sup>202</sup> Hierbei zeigen eine Vielzahl von Lipasen ihre optimale katalytische Aktivität nicht in rein wässrigen Medien, sondern an der Grenzfläche zwischen

wässriger Phase und hydrophobem Substrat<sup>203-204</sup>. Dieses Phänomen wird häufig als „Grenzflächenaktivierung“ bezeichnet und konnte u.a. durch Röntgenstrukturanalyse zweier verschiedener Lipasen aufgeklärt werden, wobei gezeigt wurde, dass diese Lipasen eine bestimmte amphiphile Peptideinheit besitzen, welche als bewegliches Strukturelement wie eine Art Deckel den Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms verschließt<sup>205</sup>. Dieses wird als sogenanntes „Lid“ bezeichnet. Bei Kontakt des Biokatalysators mit einer hydrophoben Grenzfläche kommt es schließlich, entsprechend des *Induced-Fit*-Modells, zu einer Konformationsänderung in diesem Bereich, wodurch das Lid geöffnet wird und das Substrat Zugang zum aktiven Zentrum erhält.

Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich besonders Lipasen auch für eine Anwendung in rein organischen Lösungsmitteln und stellen dort potente Katalysatoren für Ver- sowie Umes-terungen dar. Zudem wird Lipasen aus Bakterien und Pilzen wegen ihrer hohen strukturellen Stabilität, der relativ einfachen Produktion durch Fermentation und der leichten Isolierbarkeit aus dem Kulturüberstand ein großes Potential als industrielle Biokatalysatoren beigemessen. In der Industrie kommen heute bereits verschiedene Lipasen, häufig in geträgerter Form, sowohl in wässrigen als auch organischen Medien zum Einsatz.<sup>206-207</sup> Sie werden z.B. in der Waschmittel-, Papier- sowie Lebensmittelindustrie, aber auch in verschiedenen Bereichen der organischen Synthese eingesetzt, da sie eine hohe Regio- und Stereoselektivität in Kombination mit einem breiten Substratspektrum aufweisen<sup>49, 204</sup>. So werden Lipasen großindustriell beispielsweise zur Produktion chiraler (Zwischen-)Produkte wie enantiomerenreiner Alkohole oder Amine verwendet<sup>204, 208</sup>.

KONIECZNY führte im Rahmen seiner Promotion bereits erste Untersuchungen zur Verwendung von CaLB-PEKs als Tandemkatalysatoren durch<sup>17</sup>. Der erste katalytische Schritt war dabei die asymmetrische Dihydroxylierung von Styrol in  $\text{CHCl}_3$  mit CaLB-PEKs als Liganden für Osmat, während das entstandene 1-Phenylethan-1,2-diol im zweiten Reaktionsschritt mittels der eigentlichen katalytischen Aktivität der Lipase mit Laurinsäure verestert werden sollte. Eine große Schwierigkeit stellten hierbei die verwendeten Reaktionsbedingungen der Dihydroxylierung dar, da das verwendete Kaliumcarbonat und  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  dazu führte, dass die Laurinsäure als Kaliumsalz aus dem Reaktionsgemisch ausgefällt wurde. Daher mussten alle verwendeten Salze im Anschluss an die Dihydroxylierung aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden bevor nachfolgend die Laurinsäure zugegeben wurde. Auch wenn abschließend ein Produktgemisch aus den resultierenden Estern nachgewiesen werden konnte, so stellt die Notwendigkeit eines zwischengeschalteten partiellen Aufreinigungsschrittes doch einen bedeutenden Nachteil dieser Synthesestrategie dar. Allerdings unterstreichen die erhaltenen Ergebnisse die prinzipielle

Möglichkeit der Nutzung dieser enzymbasierten Systeme als potente Tandemkatalysatoren im organischen Medium.

Daher befasst sich diese Arbeit mit der Generierung und Optimierung artifizieller Metalloenzyme für den Einsatz in rein organischen Lösungsmittelsystemen.

---



### 3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Generierung von artifiziellen Metalloenzymen zur Anwendung in rein organischen Lösungsmittelsystemen sowie die Optimierung ihrer Leistung in verschiedenen ausgewählten Reaktionen.

Aufbauend auf die vorangegangenen Arbeiten von KONIECZNY<sup>17,184</sup> und LEURS<sup>184-185</sup> soll zunächst das Eduktspektrum der asymmetrischen Dihydroxylierung, katalysiert durch artifizielle POx-Enzym-Konjugate, erweitert und die Enantioselektivitäten und Umsatzzahlen der Katalysatoren sowie die Gesamtausbeute des Produktes durch Anpassung der Reaktionsparameter optimiert werden.

Des Weiteren sollen weitere Enzymmodifikationen gefunden und generiert werden, welche eine Anwendung von künstlichen Metalloenzymen in organischen Solventien mit hoher Selektivität und Aktivität erlauben. Im Fokus steht hierbei die Vereinfachung der zeitaufwendigen Polymermodifizierung sowie die Verbesserung des Modifizierungsgrades der freien primären Aminogruppen des Enzyms, um diese als potentielle Metallbindungsstellen effektiv ausschalten zu können.

Außerdem sollen weitere asymmetrische Reaktionssysteme, welche durch künstliche Metalloenzyme in organischen Medien katalysiert werden können, gefunden und optimiert werden. Auch hierbei wird ein besonderes Augenmerk auf die Selektivität, insbesondere Regio- und Enantioselektivität, sowie die Aktivität des artifiziellen Metalloenzym gelegt.

Zusätzlich soll sich die vorliegende Arbeit der enzymbasierten Tandemkatalyse in organischen Lösungsmitteln widmen. Hierbei sollen Enzyme sowohl als artifizielles Metalloenzym in einer asymmetrischen, metallkatalysierten Reaktion verwendet werden als auch gleichzeitig die ursprüngliche enzymatische Aktivität genutzt werden, um eine Tandemreaktion durchführen zu können.

Die Etablierung geeigneter analytische Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung der entstandenen Reaktionsprodukte war ebenfalls Gegenstand der Forschungen.

---





## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-PMOx-Konjugaten

Wie bereits eingangs erläutert wurde (vgl. Kapitel 2.2), bringt die Anwendung von Proteinen und Enzymen neben vielen Vorteilen auch einige Einschränkungen mit sich. Ein wichtiger Faktor ist hierbei die Limitierung hinsichtlich des Reaktionsspektrums, da nicht für jede mögliche Reaktion ein natürliches Enzym vorliegt, was durch die Bildung von artifiziellen Metalloenzymen (AMEs) deutlich erweitert werden kann. Jedoch schränkt die Lösungsmittelimitierung auf überwiegend wässrige und wasserhaltige Systeme die Bandbreite möglicher Reaktionen und Substrate, z.B. aufgrund deren Löslichkeitsverhalten oder in wässrigen Medien auftretenden Nebenreaktionen, stark ein. Unter anderem aus diesen Gründen ist es wünschenswert künstliche Metalloenzyme auch in rein organischen Lösungsmitteln unter Erhalt einer guten Reaktivität und Selektivität anwenden zu können. Ausgehend von dem Konzept von KONIECZNY und LEURS<sup>17, 184-185</sup> (siehe Kapitel 2.2.3) wurde daher im Rahmen dieser Arbeit zunächst die asymmetrische Dihydroxylierung mittels auf Laccase-PEKs basierender AMEs in solchen Lösungsmittelsystemen optimiert sowie die Eignung weiterer künstlicher Metalloenzyme für ein solches Reaktionssystem näher untersucht.

#### 4.1.1 Poly(2-methyloxazolin)-Enzym-Konjugate

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PEKs wurden nach einer Methode von KONIECZNY *et al.* synthetisiert<sup>16-18</sup>.

KONIECZNY fand heraus, dass der praktikabelste Weg Proteine mit Poly(2-Alkyloxazolin)en zu verknüpfen in der Kopplung freier primärer Aminogruppen des Proteins mit POx, welche eine prim. Aminogruppe als Endgruppe tragen (Abb. 4.1) ist<sup>16-17, 209</sup>.

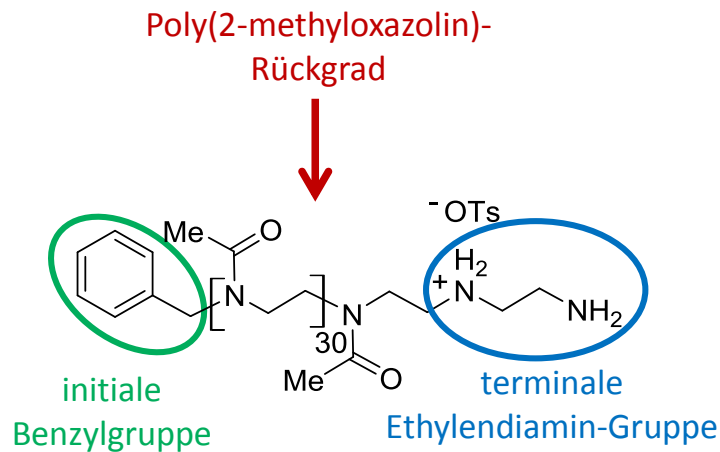


Abb. 4.1: Aufbau der Poly(2-alkyloxazolin)e für die Funktionalisierung von Proteinen am Beispiel von Poly(2-methyloxazolin) mit einem Polymerisationsgrad von 30.

Letzteres ist einfach durch lebende kationische ringöffnende Polymerisation (engl. *cationic ring-opening polymerization*, CROP) zugänglich (Abb. 4.2, siehe auch Kapitel 2.2.2).

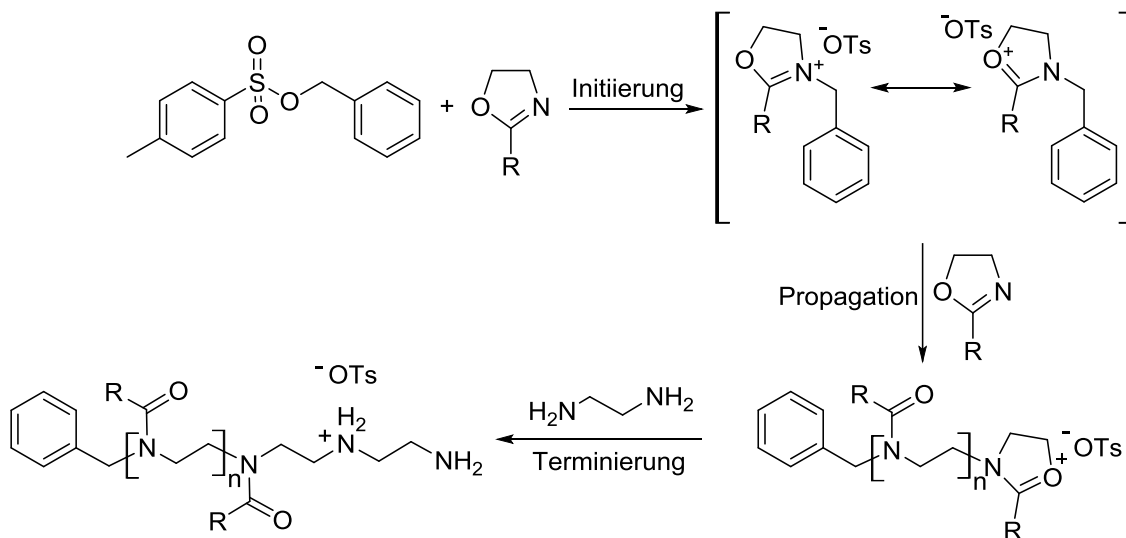


Abb. 4.2: Reaktionsschema einer lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation von 2-Methyl-2-oxazolin mit dem Initiator Benzyltosylat als Beispiel. Die Terminierung erfolgt hier mit Ethylendiamin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Enzymmodifikation Poly(2-methyloxazolin) mit einer eingestellten Kettenlänge von 30 Wiederholungseinheiten und einer Ethylendiamin-Endgruppe nach einer literaturbekannten Prozedur<sup>123-124</sup> synthetisiert und verwendet, da sich dieses in

vorangegangenen Arbeiten als am besten geeignet für die asymmetrische Dihydroxylierungsreaktion erwiesen hat.<sup>17</sup> Als Initiator kam Benzyltosylat zum Einsatz. Die aufgereinigten Polymere wiesen Kettenlängen zwischen 30 und 35 Wiederholungseinheiten auf mit einem Polydispersitätsindex (PDI) zwischen 1,1 und 1,3 (bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie sowie Gelpermeationschromatographie (GPC), siehe Kapitel 6.7.4).

Die Verknüpfung des PMOx mit dem Protein erfolgt nach der Methode von KONIECZNY<sup>17</sup> über das hochreaktive Pyromellitsäuredianhydrid als Linker in einem DMF/Wasser-Gemisch (Abb. 4.3). Abweichend von dem Originalprotokoll, in welchem beide Verknüpfungsschritte bei RT durchgeführt wurden, wurde hier der zweite Reaktionsschritt –die Enzymverknüpfung– bei 4 °C durchgeführt um das Verfahren enzymeschonender zu gestalten.

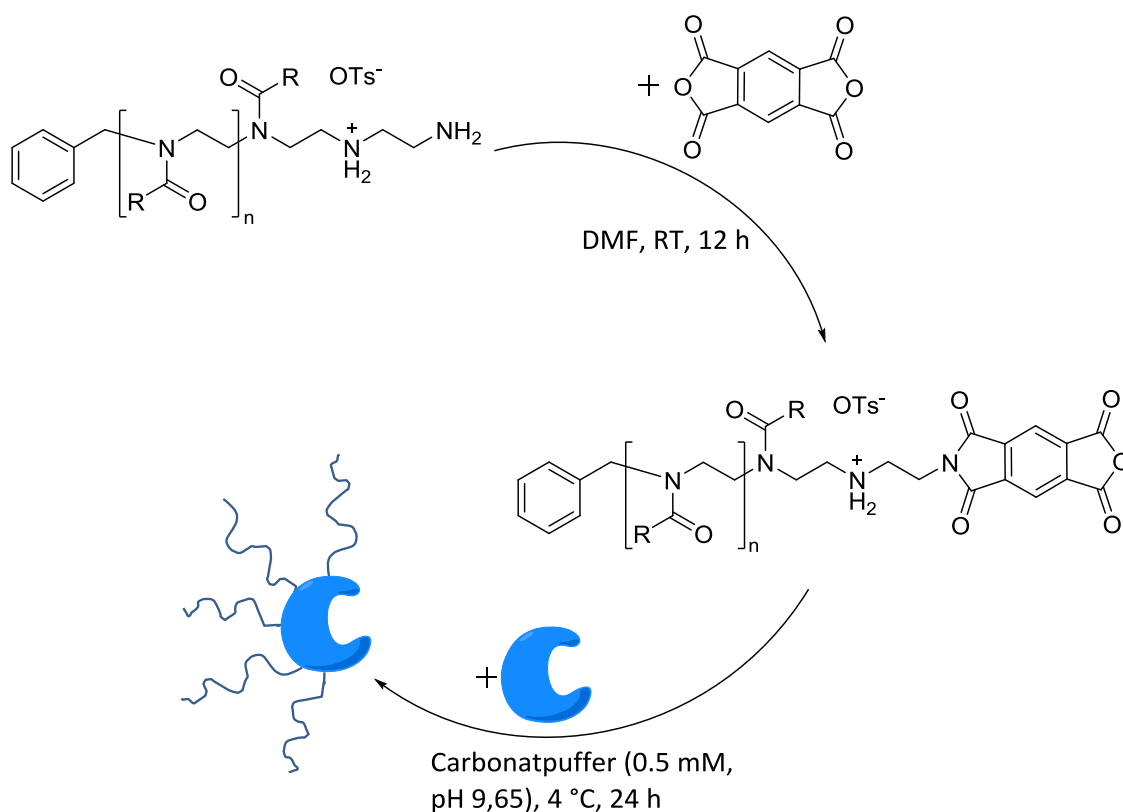


Abb. 4.3: Reaktionsschema der Proteinmodifizierung mit PMOx unter Verwendung des Linkers Pyromellitsäuredianhydrid.

Die erhaltenen PEKs wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) analysiert um den Erfolg der Konjugatbildung nochmals weiterführend nachzuweisen sowie eine mögliche Aggregatbildung in Chloroform zu untersuchen. Diese Methode

ermöglicht die Bestimmung des Durchmessers von Partikeln in Solventien. Wie die Messungen zeigen, vergrößern sich die Durchmesser der funktionalisierten Enzyme im Vergleich zu den korrespondierenden nativen Formen (Abb. 4.5). Der Durchmesser der verwendeten Lysozym-PMOx-Konjugate in Chloroform beträgt 7,8 nm. Dies entspricht der Summe aus den gemessenen Durchmessern des nativen Enzyms (3,6 nm) und angelagertem freiem PMeOx (2 nm). So scheinen die Konjugate in Chloroform als einzelne Moleküle vorzuliegen und nicht zu einem größeren Anteil Aggregate auszubilden. Im Gegensatz dazu besitzen die HRP- und Chymotrypsin-Konjugate mit PMOx größere Durchmesser als die Summe aus Polymerhülle und nativem Enzym erlauben würde. Daher scheinen diese Enzymkonjugate Aggregate in Chloroform zu bilden. Die erhaltenen Ergebnisse stützen vorhergehende Untersuchungen von KONIECZNY, welche klar gezeigt haben, dass sich nach der Funktionalisierungsprozedur letztgenannter Enzymkonjugate noch ein Anteil unfunktionalisiertes Enzym neben dem polymerkonjugierten vorliegt, wogegen die Lysozym-PMOx-Konjugate nahezu vollständig funktionalisiert sind, wenn auch mit unterschiedlichen Modifikationsgraden<sup>16-18, 210</sup>

---

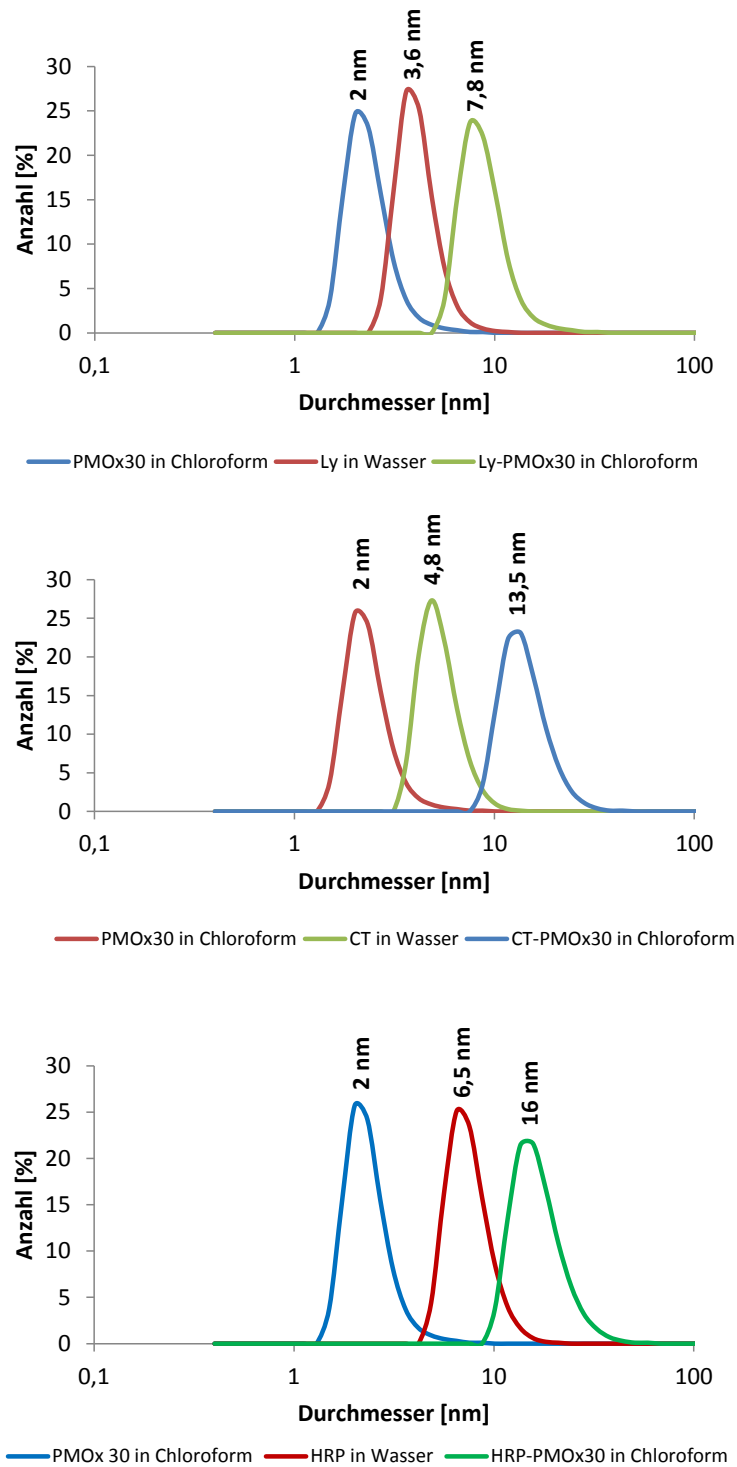


Abb. 4.4: DLS-Messungen von PMOx-Enzym-Konjugaten und freiem PMOx in Chloroform sowie nativem Enzym in Wasser.

Trotzdem ist auch die Mischung aus funktionalisiertem und unfunktionalisiertem Protein löslich in Chloroform. Die DLS-Messungen legen nahe, dass die funktionalisierten Enzyme Cluster,

bilden in denen native Enzyme eingelagert werden, was heißt, dass erstere sich wie eine Art Tensid für letztere verhalten (Abb. 4.5).

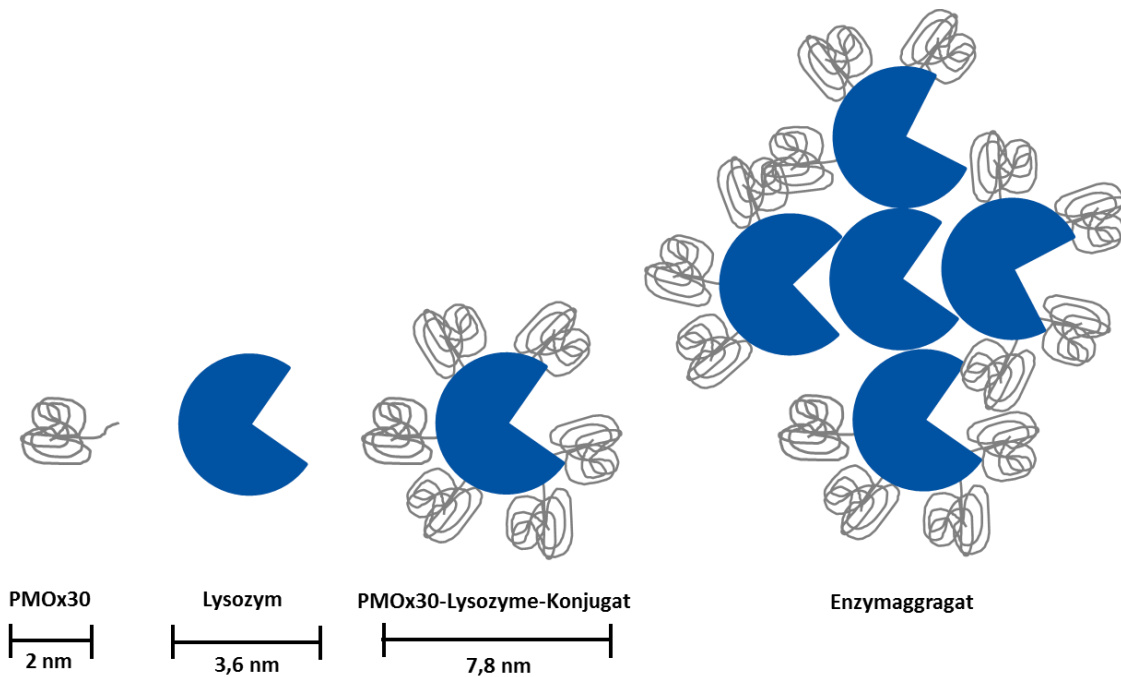


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Durchmesser der in Chloroform gebildeten Partikel verschiedener Enzym-PMOx30-Konjugate.

Die erhaltenen Enzym-PMOx-Konjugate werden im Folgenden für die Generierung von organolöslichen künstlichen Metalloenzymen für den Einsatz in organischen Lösungsmittelsystemen verwendet.

#### 4.1.2 Dihydroxylierung mittels $K_2OsO_2(OH)_4$ und $K_3[Fe(CN)_6]$ als Kooxidationsmittel

Gemäß Kapitel 4.1.1 hergestellte PMOx-Laccase-Konjugate wurden für Dihydroxylierungen nach SHARPLESS von verschiedenen Styrolderivaten verwendet, da diese in vorangegangenen Arbeiten zum höchsten Enantiomerenüberschuss von bis zu 99.4 % *ee* für 1-Phenyl-1,2-Ethandiol (*R*) führten<sup>17, 184-185</sup>. Die dort erreichten Enantiomerenüberschüsse bei einem Metall-zu-Protein-Verhältnis (MPV) von im Minimum 3,8 für andere Styrolderivate sind allerdings nur als gering zu betrachten<sup>17</sup>, so dass hier eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen sinnvoll erscheint.

Zunächst wurde vermutet, dass ein Absenken des MPV zu höheren Enantiomerenüberschüssen des entstehenden Diols führen könnte, da dieses die Wahrscheinlichkeit einer selektiven Einlagerung des Salzes in das Enzym begünstigen dürfte. Die Dihydroxylierungen wurden hier deswegen zunächst in Gegenwart von Os-Laccase-PMOx mit einem MPV von 1,9 durchgeführt, wobei das Laccase-PEK in wassergesättigtem Chloroform vorgelegt, das Osmat sowie die Salze zugeführt und die Reaktionsmischung über 10 min auf 0 °C abgekühlt wurde. Anschließend wurde das Alken hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 7 d bei 0 °C gerührt (Abb. 4.6).

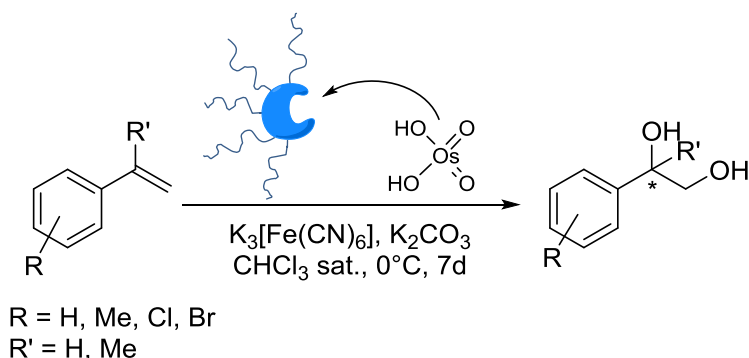


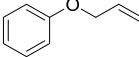

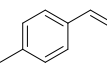
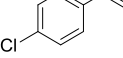
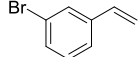


Abb. 4.6: Allgemeines Reaktionsschema der SHARPLESS-Dihydroxylierung mit Os-Laccase-PMOx.

1H-Inden (71 % *ee*), 1,2-Dihydronaphtalen (75 % *ee*) und Allylphenylether (87 % *ee*) wurden hierbei im Rahmen dieser Arbeit mit höheren Enantiomerenüberschüssen umgesetzt als zuvor berichtet wurde. KÖHLER *et al.* erzielten 45, 41, und 82 % *ee* unter Einsatz von Streptavidin-Mutanten in wässrigem Medium<sup>144</sup>. Unter Einsatz des Standard-SHARPLESS-Systems wurden Enantiomerenüberschüsse von 53 % für 2,3-Dihydro-1H-Inden-1,2-diol (*1R*, *2S*) und 56 % für

1,2,3,4-Tetrahydronaphtalen-1,2-diol (1*R*, 2*S*) erreicht<sup>211</sup>. Die Umsetzung von Inden und 1,2-Dihydronaphtalen mittels Os-Laccase-PMOx in Chloroform durch KONIECZNY lieferte 34,6 5 % *ee* bzw. 28,2 % *ee* (1*R*, 2*S*)<sup>17</sup>.

Tab. 4.1: TON und *ee* der asymmetrischen Dihydroxylierung von Alkenen mit Laccase-PEK-AMEs (MPV = 1,9) bei 0 °C. Die Reaktion wurde mit 0,105 μmol/mL Laccase-Konjugat, 0,2 μmol/mL K<sub>2</sub>OsO<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub>, 300 μmol/mL K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 300 μmol/mL K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 100 μmol/mL Alken in Chloroform durchgeführt. Die TON<sub>Enz</sub> ist definiert als μmol Produkt pro μmol Protein. Die TON<sub>Os</sub> ist definiert als μmol Produkt pro μmol Osmat.

Alken	TON <sub>Os</sub>	TON <sub>Enz</sub>	<i>ee</i> [%]	
	3	5	71 <sup>[e]</sup>	1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>
	11	20	75 <sup>[e]</sup>	1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>
	0,6	1	87	<i>R</i>
	-	-	-	
	-	-	-	
	4	8	rac.	
	1	2	rac.	

Zwei der hier untersuchten Alkene, α-Methylstyrol und 4-Methylstyrol, werden unter den verwendeten Reaktionsbedingungen nicht von Os-Laccase-PMOx umgesetzt. Dies steht im Gegensatz zu der Arbeit von KÖHLER et al., wo keine Produktselektivität der AMEs gegenüber diesen Substraten festgestellt wurde<sup>144</sup>. Das indiziert, dass das Osmat in den Laccase-PEKs spezifischer gebunden wird und unterstreicht somit die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich des Metallaustausches<sup>18</sup>.

Jedoch sind die hier erreichten TON als sehr gering zu betrachten. Ein Problem der Verwendung von K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] als Kooxidationsmittel ist dessen Unlöslichkeit in vielen organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Chloroform. Dies schränkt die Zugänglichkeit für den Katalysator stark ein und kann somit zu den geringen Umsätzen beitragen. Ein anderer limitierender Faktor ist die geringe Löslichkeit der OH<sup>-</sup>-Quelle Wasser in diesem Solvens. Daher bietet die Wahl eines



anderen Kooxidationsmittelsystems ein großes Potential zur weiteren Optimierung der Reaktionsbedingungen der AME-katalysierten asymmetrischen Dihydroxylierung.

#### 4.1.3 Dihydroxylierung mittels Metall-Enzym-PMOx als Katalysator und *tert*-Butylhydroperoxid als Kooxidationsmittel

##### 4.1.3.1 Optimierung der Reaktionsparameter mit Osmat-Laccase-PMOx

Teilbereiche der Messdaten dieses Abschnittes wurden zusammen mit Phillip Baumann im Rahmen seines Forschungspraktikums erarbeitet<sup>[b]</sup>.

Aus den bereits in Kapitel 4.1.2 dargestellten Gründen wurde für die weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen der asymmetrischen Dihydroxylierung von Alkenen mittels Os-Laccase-PMOx ein Wechsel des Kooxidationsmittelsystems als vielversprechend angesehen. Als mögliches Reoxidationsmittel für den Katalysator wurde *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) in Erwägung gezogen und auf seine Eignung für diese Reaktion untersucht (Abb. 4.7). Hierbei wurde zunächst Styrol als Alken verwendet.

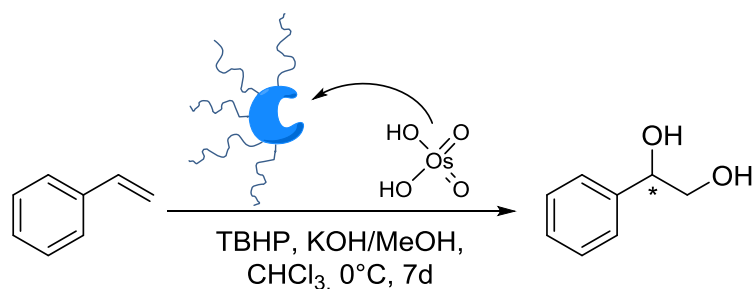


Abb. 4.7: Reaktionsschema der SHARPLESS-Dihydroxylierung mit Os-Laccase-PMOx und TBHP-basiertem Kooxidationsmittelsystem.

Wie Abb. 4.8 zeigt resultiert daraus, im Gegensatz zum K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]-basierten Reaktionssystem, ein homogenes Reaktionsgemisch, was die Zugänglichkeit des Kooxidationsmittels für den Katalysator stark erhöhen sollte.



Abb. 4.8: Fotos der Dihydroxylierung von Styrol mit  $K_3[Fe(CN)_6]$  (links) sowie TBHP (rechts) als Kooxidationsmittel.

Tatsächlich steigt die  $TON_{Os}$  bei einem Metall-zu-Protein-Verhältnis (MPV) von 2 hierbei etwa 6-fach an, ohne eine signifikante Änderung des  $ee$  (Tab. 4.2). Um die *turnover number* weiter zu steigern wurde methanolische KOH als zusätzliche  $OH^-$ -Quelle hinzugefügt. Dies führte zu einem Anstieg der  $TON_{Os}$  von 258 auf 328. Ein weiteres Herabsetzen des MPV von 2 auf 1 resultiert in einer  $TON_{Os}$  von 501 mit einer Erhöhung des  $ee$  auf 99,4 %, was dem Detektionslimit der verwendeten HPLC-Analytik entspricht. Alles in Allem konnte durch den Wechsel des Kooxidationsmittels und Zugabe einer weiteren  $OH^-$ -Quelle eine Steigerung der *turnover number* bezogen auf das Osmat um das 12-fache beobachtet werden.

Tab. 4.2: Enantioselektivität ( $R$ ) und Umsatz der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx in Chloroform in Abhängigkeit vom verwendeten Kooxidationsmittel. Die Reaktionen wurden, falls nicht anders gekennzeichnet, mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,026  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2OsO_2(OH)_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die  $TON_{Os}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat pro h.

MPV	Kooxidationsmittel	Base	$TON_{Os}$	TOF [ $h^{-1}$ ]	Ausbeute [%]	$ee$ [%]
2	$K_3[Fe(CN)_6]^a$	$K_2CO_3$	42	0,25	1,0	98,4
2	TBHP	-	258	1,54	6,5	97,2
2	TBHP <sup>b</sup>	$K_2CO_3$	232	1,38	6,0	97,8
2	TBHP <sup>c</sup>	KOH/MeOH	328	1,95	8,5	98,6
1	TBHP <sup>d</sup>	KOH/MeOH	501	2,98	6,6	99,4

a: 300  $\mu\text{mol/mL}$   $K_3[Fe(CN)_6]$  statt TBHP, zusätzlich 300  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2CO_3$ .

b: zusätzlich 300  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2CO_3$ , c: zusätzlich 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigte methanolische KOH.

d: 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  statt 0,026  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2OsO_2(OH)_4$ , zusätzlich 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigte methanolische KOH.

Es ist literaturbekannt, dass die Aktivität eines Enzyms durch das Reaktionsmedium stark beeinflusst wird. Dieser Effekt bietet die Möglichkeit des sogenannten *medium engineering*<sup>13</sup>. Diesem Ansatz folgend wurde eine Auswahl von sechs Lösungsmitteln, in denen sich das Polymer-Laccase-Konjugat löst, unter ansonsten identischen Bedingungen in der Dihydroxylierungsreaktion verwendet. Die Ergebnisse zeigen eine klare Abhängigkeit sowohl der TON als auch der Enantioselektivität vom verwendeten Lösungsmittel (Tab. 4.3, Abb. 4.9).

Tab. 4.3: Abhängigkeit der Enantioselektivität (*R*) und des Umsatzes der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx von verschiedenen Lösungsmitteln. Die Reaktionen wurden mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die  $\text{TON}_{\text{Os}}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat pro h.

Lösungsmittel	TON	TOF [ $\text{h}^{-1}$ ]	Ausbeute [%]	ee [%]
$\text{CHCl}_3$	501	2,98	6,6	99,4
DCM	600	3,57	7,8	94,1
MeOH	315	1,87	4,1	0,0
EtOH	266	1,58	3,5	0,0
DMF	38	0,23	0,5	0,0
DMSO	10	0,06	0,1	75,7
MeCN	49	0,29	0,6	0,0

Die höchste Aktivität des Katalysators wurde in Dichlormethan (DCM) erreicht. Diese ist um etwa 20 % höher als jene in Chloroform, was einer Ausbeute von ca. 8 % entspricht. Jedoch ist der ee mit 94,1 % geringer als in  $\text{CHCl}_3$  (99,4 %).

Die polaren, protischen Lösungsmittel Methanol und Ethanol setzen Styrol ebenfalls mit einer guten TON bis hin zu 315 um. Dies geht allerdings mit einem kompletten Verlust der Enantioselektivität einher.

In Dimethylformamid (DMF) und Acetonitril (MeCN) dagegen zeigt sich weder eine hohe Aktivität noch eine enantioselektive Steuerung der Reaktion. Die geringste Aktivität des artifiziell-

len Metalloenzym wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gefunden, mit einer moderaten Enantioselektivität (75 % *ee*).

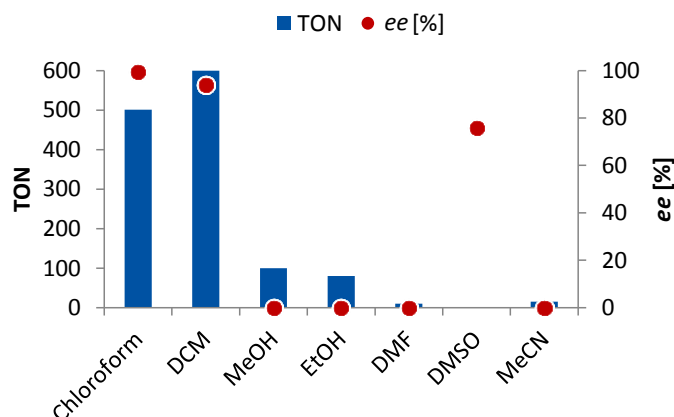


Abb. 4.9: TON und *ee* (*R*) der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx (MPV = 1) in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Reaktion wurde mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die  $\text{TON}_{\text{Os}}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat.

Der Grund für den Verlust der enantioselektiven Steuerung in MeOH und EtOH liegt wahrscheinlich in der Tatsache begründet, dass das verwendete Osmat in diesen Lösungsmitteln löslich ist (Abb. 4.10). Daher vermindert sich die Triebkraft des Salzes im Inneren des Laccase-Konjugates, welches nach vorherigen Untersuchungen zu urteilen als amphiphiler Polymernanocontainer wirkt<sup>184</sup>, zu binden. Aus diesem Grunde wird die Bindungsstelle im aktiven Zentrum der Laccase nicht mehr favorisiert sein, was zu einer unselektiven Produktbildung führt.

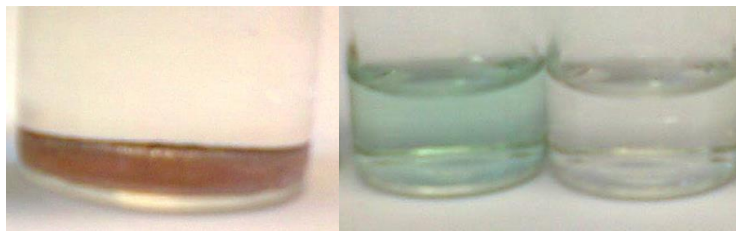


Abb. 4.10: Fotos von 1 mg/mL Kaliumosmat in Chloroform (links) und Methanol (Mitte) sowie reines Methanol zum Vergleich (rechts).

Kontrollexperimente unter denselben Reaktionsbedingungen, allerdings ohne die Zugabe des PEKs, zeigen, dass Styrol in Methanol und Ethanol, im Gegensatz zu Chloroform und Dichlormethan, in signifikanten Mengen (TON bis zu 250) unter Bildung eines Racemates umgesetzt wird. Dies zeigt, dass der Osmat-(Lösungsmittel)-Komplex in ersteren bereits eine katalytische Aktivität zeigt. In anderen Lösungsmitteln ist die Komplexbildung mit dem Enzymkonjugat dagegen nötig. Es konnte also gezeigt werden, dass die Wahl des Lösungsmittels einen entscheidenden Einfluss sowohl auf den Umsatz als auch die Selektivität der Reaktion hat. Betrachtet man beides, TON und *ee*, so ist Chloroform das Lösungsmittel der Wahl für weitere Untersuchungen zur osmatkatalysierten Dihydroxylierung mittels Laccase-PMOx-Konjugaten als chiraler Ligand.

Bis hierhin wurden alle Reaktionen bei 0 °C durchgeführt, weil in vorhergehenden Untersuchungen<sup>17, 184-185</sup> herausgefunden wurde, dass es eine dramatische Temperaturabhängigkeit des *ee* (sowie der TON<sub>Os</sub>) gibt. Um zu untersuchen ob es bei diesem System möglich ist, durch eine Temperaturerhöhung einen größeren Umsatz ohne Verlust der Enantioselektivität zu erhalten, wurde die Synthese ebenfalls bei 4 °C sowie 22 °C mit verschiedenen MPVs durchgeführt. Hierbei wurde vermutet, dass das Osmat bei einem bestimmten Verhältnis nur noch an die aktive Tasche bindet, welche den früheren Experimenten nach zu urteilen die größte Komplexbildungskonstante haben sollte.

Zudem wurde angenommen, dass der selektive Umsatz des Substrates am Osmat-Enzym-Komplex aufgrund einer Ligandenbeschleunigung schneller abläuft als die unselektive Umsetzung an freiem oder nicht spezifisch gebundenem Osmat. Aus diesen Gründen wurde erwartet, dass die Unterdrückung einer nicht spezifischen Bindung größere Enantiomerenüberschüsse auch bei höheren Temperaturen möglich macht und sich somit die Effizienz des Katalysators erhöhen lässt. Die Ergebnisse, welche in Tab. 4.4 dargestellt sind, bestätigen diese Erwartungen klar.

Tab. 4.4: Abhängigkeit des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx von der Reaktionstemperatur und dem MPV. Die Reaktionen wurden mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,007-0,026  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in  $\text{CHCl}_3$  für 7 d durchgeführt. Die  $\text{TON}_{\text{Os}}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat. Die  $\text{TON}_{\text{Enz}}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Enzym.

MPV	$\text{TON}_{\text{Os}}$	$\text{TON}_{\text{Enz}}$	Ausbeute [%]	<i>ee</i> ( <i>R</i> ) [%]
<b>T = 22 °C</b>				
2	724	1448	19,0	11,3
1	842	842	11,1	67,8
0,5	597	299	3,8	73,6
<b>T = 4 °C</b>				
2	690	1380	17,9	48,8
1	636	636	8,4	85,8
0,5	515	258	2,7	84,4
<b>T = 0 °C</b>				
2	328	656	8,5	98,6
1	501	501	6,6	99,4
0,5	-	-	-	-

Es zeigt sich, dass die Enantiomerenüberschüsse (*R*) stark ansteigen, wenn das MPV von zwei auf eins reduziert wird. Zum Beispiel steigt der *ee* von 11,3 auf 67,8 % bei 22 °C (Abb. 4.11). Eine weitere Erniedrigung des Osmat-zu-Enzym-Verhältnisses auf 0,5 führt zwar zu einer geringen Steigerung des *ee* auf 73,6 % bei 22 °C jedoch ebenso zu einer Verringerung der  $\text{TON}_{\text{Os}}$  und einer Gesamtausbeute die unterhalb derer bei 0°C liegt. Bei 4 °C kommt bei es einem MPV von 0,5 zu keiner weiteren Veränderung des *ee* bei gleichzeitiger Verringerung der TON von 636 auf 415. Dies deutet darauf hin, dass genau ein Osmat an das aktive Zentrum der Laccase bindet, da ein MPV von 2 zu einem Verlust der Enantioselektivität und eines von 0,5 zu keiner signifikanten Änderung des Enantiomerenüberschusses führt (Abb. 4.11). Legt man den Fokus

auf eine stark enantioselektive Produktbildung ist daher ein MPV von 1 bei niedrigen Reaktionstemperaturen optimal.

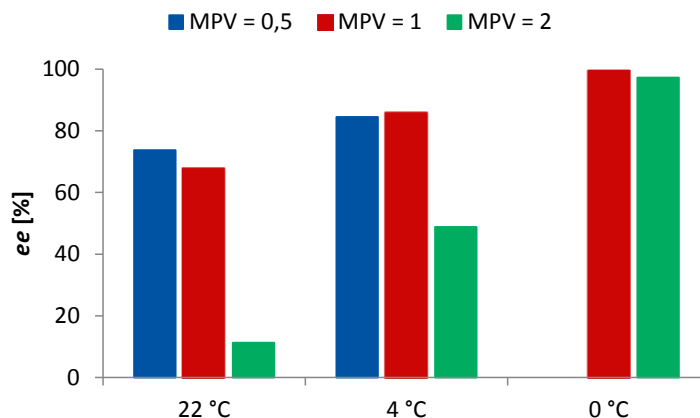


Abb. 4.11: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses [%] (*R*) der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx von der Reaktionstemperatur. Die Reaktionen wurden mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in  $\text{CHCl}_3$  für 7 d durchgeführt.

Die  $\text{TON}_{\text{Os}}$  sind nicht streng abhängig vom MPV, was die Vermutung nahe legt, dass ebenso nicht spezifisch gebundenes Osmat eine gewisse, geringere katalytische Aktivität zeigt, jedoch mit einer nicht selektiven Produktbildung. Die Umsatzzahlen bezogen auf das Osmat steigen mit höherer Reaktionstemperatur wie erwartet an (Abb. 4.12). Jedoch ist der Anstieg (ca. 1,7-fach) bei einer Erhöhung um 22 K nicht so stark wie es nach dem  $Q_{10}$ -Temperaturkoeffizienten zu erwarten wäre (4-bis 9-fach). Dies ist typischerweise ein Indiz dafür, dass eine Reaktion innerhalb ihres Verlaufes durch weitere Faktoren beeinflusst wird.

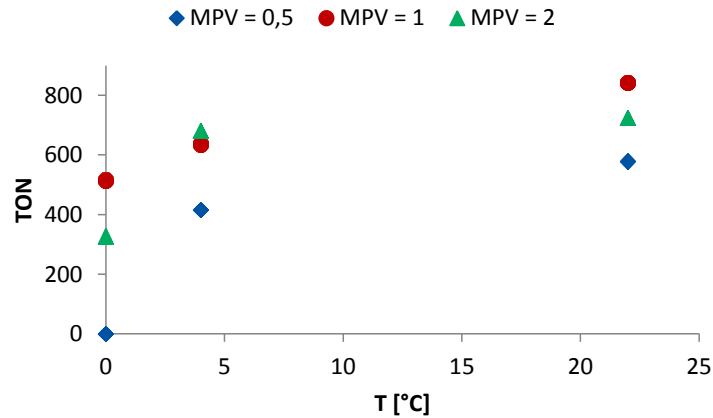


Abb. 4.12: Abhängigkeit der  $\text{TON}_{\text{Os}}$  der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx von der Reaktionstemperatur. Die Reaktionen wurden mit  $0,013 \mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx,  $0,013 \mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ ,  $110 \mu\text{mol/mL}$  TBHP,  $10 \mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und  $100 \mu\text{mol/mL}$  Styrol in  $\text{CHCl}_3$  für 7 d durchgeführt. Die  $\text{TON}_{\text{Os}}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat.

Um dies näher zu betrachten, wurde das Reaktionsprofil bei einem MPV von eins für sieben Tage beobachtet, wobei alle 24 h eine Probe genommen wurde. Abb. 4.13 zeigt die erhaltenen Daten in normalisierter Form.

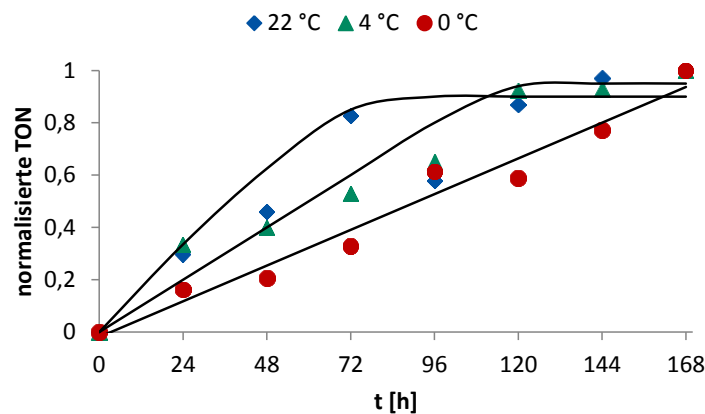


Abb. 4.13: Auftragung der normalisierten TON ( $\text{TON}/\text{TON}_{168\text{h}}$ ) gegen die Zeit der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels Laccase-PMOx als Ligand. Die Reaktionen wurden bei verschiedenen Temperaturen mit  $0,013 \mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx,  $0,013 \mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ ,  $110 \mu\text{mol/mL}$  TBHP,  $10 \mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und  $100 \mu\text{mol/mL}$  Styrol in  $\text{CHCl}_3$  für 7 d durchgeführt. Die schwarzen Linien zeigen den Trend der Datenpunkte und sind keine berechneten Regressionskurven. Die  $\text{TON}_{\text{Os}}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat.



Es ist deutlich zu sehen, dass die TON bei einer Temperatur von 0 °C über die gesamte Zeit linear ansteigt. Bei einer Reaktionstemperatur von 4 °C ist der Verlauf der Kurve steiler und nach 5 Tagen wird kein Produkt mehr gebildet. Die Umsatzzahl steigt bei 22 °C erneut an, jedoch stoppt hier die Produktbildung bereits nach drei Tagen.

Ein Vergleich der Umsätze in der linearen Region zeigt, dass die TOF sich von 2,98 h<sup>-1</sup> bei 0 °C über 3,74 h<sup>-1</sup> bei 4 °C auf 8,60 h<sup>-1</sup> bei 22 °C erhöht. Dies bedeutet, dass die TOF, welche hier proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit ist, sich insgesamt 3-fach vergrößert. Dies ist deutlich näher an einer typischen Temperatur/Reaktionsgeschwindigkeits-Beziehung. Vermutlich kommt es zu einem temperaturabhängigen Reaktivitätsverlust des Osmat-Laccase-Komplexes. Möglicherweise verändert sich das aktive Zentrum des Enzyms im Laufe der Reaktionszeit, wahrscheinlich durch das Kooxidationsmittel oder das Kaliumosmat selbst.

Ein weiterer typischer Aspekt enzymatischer Reaktionen ist die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration gemäß der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik<sup>212</sup>. Daher ist die Substrataffinität zum aktiven Zentrum der kontrollierende Parameter, zum Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. Um dies näher zu untersuchen, wurde die Dihydroxylierung mit verschiedenen Styrolkonzentrationen zwischen 12,5 und 300 µmol/mL durchgeführt (Tab. 4.5). Um zu gewährleisten, dass das Enzym während der Reaktionszeit nicht denaturiert, wurde diese auf 24 h festgesetzt.

---

Tab. 4.5: Abhängigkeit des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses (*R*) der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx von der Reaktionstemperatur. Die Reaktionen wurden mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 12,5–300  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in  $\text{CHCl}_3$  für 24 h durchgeführt. Die  $\text{TON}_{\text{Os}}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat pro h.

$C_{\text{Styrol}} [\mu\text{mol/mL}]$	22 °C			0 °C		
	$\text{TON}_{\text{Os}}$	TOF [1/h]	<i>ee</i> [%]	$\text{TON}_{\text{Os}}$	TOF [1/h]	<i>ee</i> [%]
0	0	0	-	0	0	-
12,5	10	0,71	62,0	9	0,4	99,4
25	67	4,79	60,4	12	0,5	99,4
50	81	5,8	67,8	22	0,91	99,4
100	130	9,29	63,6	87	3,64	99,4
150	155	11,09	64,3	86	3,59	99,4
200	138	9,86	63,0	123	5,11	99,4
250	168	12,02	62,5	138	5,76	97,5
300	151	10,8	62,3	142	5,9	97,0

Abb. 4.14 zeigt, dass sich die TOF bei 22 °C von 0,72 auf 11  $\text{h}^{-1}$  erhöht, wenn man die Styrolkonzentration von 12,5 auf 150  $\text{mmol/mL}$  erhöht.

Wendet man eine MICHAELIS-MENTEN-Kinetik auf die Daten an, so ermittelt sich eine MICHAELIS-Konstante ( $K_m$ ) von 35  $\mu\text{mol/mL}$ . Bei 0 °C dagegen berechnet sich  $K_m$  zu 115  $\mu\text{mol/mL}$ , was darauf schließen lässt, dass das Substrat eine geringere Affinität zum Enzym hat als bei 22 °C. Es könnte sein, dass sich die Faltung des aktiven Zentrums temperaturabhängig ändert. Eine Neufaltung des Enzyms kann auch einen Teil zu den hohen Selektivitäten bei niedrigen Temperaturen beitragen. Die Konsequenz daraus ist, dass sich die TOF durch Variation der Styrolkonzentration um bis 30 % steigern lässt, was eine weitere 1,4-fache Steigerung der Umsatzrate bedeutet.

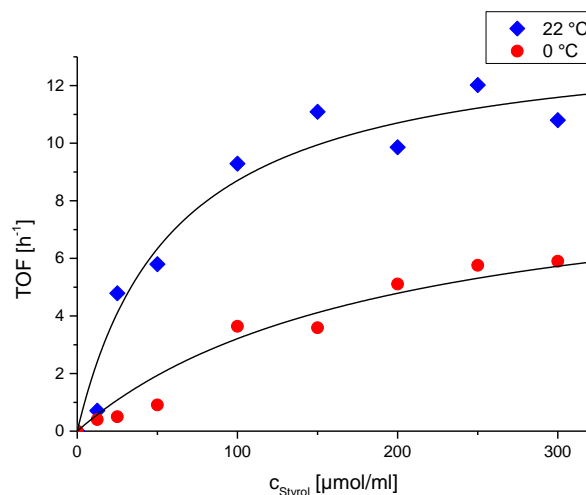


Abb. 4.14: Auftragung der TOF gegen die Styrolkonzentration der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels Os-Laccase-PMOx. Die Reaktionen wurden bei verschiedenen Temperaturen mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und verschiedenen Styrolkonzentrationen in  $\text{CHCl}_3$  für 24 h durchgeführt. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat pro h.

Alles in allem konnte also durch Optimierung der Reaktionsparameter eine bis zu 48-fache Steigerung der *turnover frequency* der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol mit Os-Laccase-PMOx im Vergleich zum  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -basierten Kooxidationsmittelsystem<sup>184</sup> erreicht werden. Die erreichten Produktausbeuten von bis zu 20 % bieten allerdings durchaus noch Potential zur Optimierung. Eine Möglichkeit bietet hierbei beispielsweise die Verwendung verschiedener Proteine sowie weiterer Metallspezies, die eine Dihydroxylierung von Alkenen ermöglichen, zur Generierung von AMEs einzusetzen.

#### 4.1.3.2 Variation der katalytisch aktiven Metallspezies

Teile der Ergebnisse dieses Abschnittes wurden in Zusammenarbeit mit Pia Spiekermann im Rahmen ihrer Bachelorarbeit ermittelt<sup>[a]</sup>.

Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen mit Os-Laccase-PMOx wurden weitere Metallspezies zur Generierung artifizierender Metalloenzyme zur asymmetrischen Dihydroxylierung in Erwägung gezogen und hinsichtlich ihrer Effizienz untersucht. Hierzu wurden zunächst Kaliumpermanganat mit einem MPV von 1 zu Laccase-PMOx-Konjugaten hinzugegeben (Tab. 4.6). Im Vergleich zu Os-Laccase-PMOx führt die Verwendung von Kaliumpermanganat zu einem drastischen Absinken des *ee* (*R*-Enantiomer) von 99,4 % *ee* auf 25,6 % *ee* und ebenso einer 10-

fach kleineren TON (501 zu 51) nach 7 Tagen. Dieser Umstand kann darin begründet liegen, dass  $\text{KMnO}_4$  ein stärkeres Oxidationsmittel darstellt als  $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , was in einer schnelleren Proteindenaturierung resultieren kann. Eine weitere Klasse literaturbekannter Reagenzien für die Dihydroxylierung von Alkenen sind verschiedene Eisen-Komplexe<sup>213-215</sup>. Das Fe(II)-Laccase-PMOx-Konjugat in Chloroform führt zu einem *ee* von nur 11 % und einer TON von 20 nach 7 d bei 0 °C. Dies ist zwar im Vergleich zu dem Osmat-Komplex ein sehr geringer Wert für die TON, jedoch ist diese immer noch mehr als doppelt so hoch als diejenige eines literaturbekannten Fe-basierten Systems (TON 9,4 für  $[\text{Fe}(\text{II})(4\text{-MeO-C}_6\text{H}_4\text{-DPAH})_2](\text{OTf})_2$ , keine Untersuchungen zum Enantiomerenüberschuss<sup>213</sup>). Wird die Reaktion dagegen in DCM als Lösungsmittel durchgeführt, kann keinerlei Umsatz detektiert werden.

Tab. 4.6: Vergleich des *ee*, der TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels Metall-Laccase-PMOx mit einem MPV von 1 mit verschiedenen Metallspezies bei 0 °C für 7 d. Die Reaktion wurde mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-Konjugat, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Metallspezies, 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  ges. methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

Metallspezies	TON	TOF [ $\text{h}^{-1}$ ]	Ausbeute [%]	<i>ee</i> [%]
$\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$	501	2,98	6,6	99,4 ( <i>R</i> )
$\text{KMnO}_4$	51	0,30	0,6	25,6 ( <i>R</i> )
$\text{FeCl}_2$	20	0,07	0,2	11,0 ( <i>R</i> )

Zudem wurden weitere Fe-Protein-PMOx-Konjugate auf ihre Eignung als artifizielle Metalloenzyme für die Katalyse der asymmetrischen Styrol-Dihydroxylierung untersucht. Hierbei führt die Verwendung von BSA-, Lysozym (LYS)- sowie CaLB-PMOx-Konjugaten als chirale Liganden für den Eisenchlorid-Katalysator zu keinerlei Umsatz von Styrol zum korrespondierenden Diol innerhalb der Nachweisgrenze der HPLC-Analytik. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen unter Verwendung von Osmat, wo unter Einsatz dieser Proteine die racemische Bildung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol beobachtet werden konnte.<sup>17, 184-185</sup>

Als weitere mögliche Katalysatoren wurden Enzyme herangezogen, welche natürlicherweise bereits einen Eisenkomplex in Form einer Häm-Gruppe tragen. Hierzu wurden Meerrettichperoxidase (HRP) und Catalase aus Rinderleber als mögliche Kandidaten identifiziert und mit

PMOx funktionalisiert. HRP-PMOx katalysiert die Dihydroxylierung von Styrol in Chloroform mit einer TON von 5 und einem Enantiomerenüberschuss von 34 % (*R*) (siehe Tab. 4.7). Mit DCM als Lösungsmittel wird ein drastischer Anstieg der Enantioselektivität auf 90 % *ee* beobachtet, allerdings sinkt die TON um mehr als das fünffache auf nur 0,6 innerhalb von 7 d. Dagegen kann mit Catalase-PMOx als Katalysator die gegenteilige Beobachtung gemacht werden. In DCM wird ein hoher *ee* von 95 % bei einer sehr geringen TON von 0,3 erhalten, während in Chloroform der Enantiomerenüberschuss lediglich 21 % beträgt und der Umsatz allerdings auf eine TON von 28 steigt. Im Gegensatz zu dem Laccase-basierten System führt hier zudem der Zusatz von methanolischer KOH als weitere OH-Quelle zu einem nahezu vollständigen Verlust der Enantioselektivität.

Tab. 4.7: Vergleich des *ee* (*R*), der TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels Häm-Enzym-PMOx bei 0 °C für 7 d. Die Reaktion wurde mit 110 μmol/mL TBHP und 100 μmol/mL Styrol durchgeführt. Die TON ist definiert als μmol Produkt pro μmol Protein. Daten aus SPIEKERMANN<sup>[a]</sup>.

PMOx-Konjugat	Solvens	TON	<i>ee</i> [%]
HRP	CHCl <sub>3</sub>	5	34
HRP	DCM	0,6	90
Catalase	CHCl <sub>3</sub>	28	21
Catalase	DCM	0,3	95

Generell scheint ein Anstieg der Enantioselektivität häufig mit einer Verringerung der Aktivität zu korrelieren. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl Umsatz als auch Selektivität der Reaktion nicht nur stark vom gewählten Lösungsmittel, sondern auch von der Art des gewählten Enzyms in diesem Lösungsmittel sowie der verwendeten Metallspezies für das jeweilige Enzym abhängt. Somit lassen sich die Reaktionsbedingungen nicht einfach auf unterschiedliche AME-Systeme übertragen, so dass eine Optimierung des Reaktionssystems im Hinblick auf den gewünschten Parameter (hier TON und/oder *ee*) für jedes dieser Systeme nötig ist.

Alles in allem lässt sich sagen, dass trotz der hier erhaltenen hohen Enantiomerenüberschüsse von bis zu 95 %, die hier erhaltenen TON nur gering sind, so dass die Osmat-Laccase-basierenden Systeme in Hinblick auf beide Parameter, die Selektivität und die Aktivität, geeig-

netere Katalysatoren für die asymmetrische Dihydroxylierung von Styrol darstellen. Allerdings ist die mittels Fe-Laccase-PMOx erreichte TON mehr als doppelt so hoch als diejenige eines literaturbekannten Fe-basierten Katalysatorsystems, wo eine TON von 9,4 unter Verwendung von  $[\text{Fe(II)}(4\text{-MeO-C}_6\text{H}_4\text{-DPAH)}_2](\text{OTf})_2$ , als Katalysator erreicht wurde (keine Untersuchungen zum Enantiomerenüberschuss)<sup>213</sup>.

#### 4.1.3.3 Dihydroxylierung von Styrolderivaten mittels verschiedener Os-AMEs

Große Teile der Ergebnisse dieses Abschnittes wurden in Zusammenarbeit mit Jens Wilken im Rahmen seines Wahlpflichtpraktikums sowie seiner Bachelorarbeit gewonnen<sup>[c, g]</sup>.

Wie die in Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.1.3.1 beschriebenen Ergebnisse zeigen, stellte sich Osmat-Laccase-PMOx als äußerst aktives und selektives AME für die asymmetrische Dihydroxylierung von Styrol heraus. Jedoch tritt eine Limitierung umsetzbarer Alkene durch die Substratselektivität dieses AMEs auf. Für 4-Methylstyrol sowie  $\alpha$ -Methylstyrol konnten beispielsweise mittels Os-Laccase-PMOx keinerlei Umsätze erzielt werden. Zudem sind die Umsatzzahlen der Osmat-katalysierten Dihydroxylierungen mit  $\text{K}_3[\text{FeCN}_6]$  als Kooxidationsmittel, Os-Laccase-PMOx und Allylphenylether und 1*H*-Inden als Substrat wesentlich geringer (TON: 1 bzw. 5 bezogen auf das Enzym; *ee*: 87 % (*R*) bzw. 71 % (*1R*, *2S*)) als diejenigen von Styrol (TON = 13, *ee* = 93 % (*R*)) (siehe Kapitel 4.1.2). Da bereits gezeigt wurde, dass sowohl Umsatz als auch Selektivität der Reaktion stark vom verwendeten AME abhängt (vgl. Kapitel 4.1.3.2 sowie<sup>184</sup>), wurden im Folgenden weitere Osmat-Enzym-PMOx-Konjugate auf ihre Eignung für die asymmetrische, osmatkatalysierte Dihydroxylierung verschiedener Alkene mit dem in Kapitel 4.1.3.1 beschriebenen TBHP-basierten Reaktionssystem untersucht. Hierbei wurden die Enzyme Monooxygenase (*Bacillus megatrium*) (MO), YQJM (*Bacillus subtilis*), DERA (*Escherichia coli*), sowie die günstig in reiner Form erhältlichen Proteine Lysozym aus Hühnereiweiß sowie BSA (Rinderserum) als mögliche Substanzen zur Generierung von Os-AMEs in Betracht gezogen. Tab. 4.8 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Tab. 4.8: TON und *ee* [%] ((1*S*,2*R*) für 1H-Inden, (*S*) für 4-Methylstyrol und  $\alpha$ -Methylstyrol) der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Protein-PMOx (MPV = 1) in Chloroform. Die Reaktion wurde mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Alken bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Daten zu großen Teilen aus WILKEN<sup>[6]</sup>.

Konjugat	1H-Inden		4-Chlorstyrol		4-Methylstyrol		$\alpha$ -Methylstyrol	
	<i>ee</i> [%]	TON	<i>ee</i> [%]	TON	<i>ee</i> [%]	TON	<i>ee</i> [%]	TON
BSA	9	467	11 ( <i>R</i> )	68	30	252	6	145
LYS	8	294	rac	14	11	153	rac	67
Monooxygenase	35	77	6	363	6	370	7	115
DERA	20	80	17 ( <i>S</i> )	17	rac	70	rac	91
YQJM	34	92	22 ( <i>S</i> )	22	rac	573	rac	141

Im Gegensatz zur Dihydroxylierung unter Verwendung von Os-Laccase-PMOx kann mit allen hier verwendeten AMEs ein Umsatz aller vier Substrate, inklusive 4-Methylstyrol (TON zwischen 70 und 573) sowie  $\alpha$ -Methylstyrol (TON zwischen 67 und 145) beobachtet werden. Dabei hängt die Umsatzzahl stark vom verwendeten Enzym ab. Die höchste für 4-Methylstyrol erreichte TON liegt mit 573 im Bereich der mit Os-Lacc-PMOx erreichten Werte für die Umsetzung von Styrol, allerdings erfolgt die Produktbildung racemisch (Abb. 4.16, unten links). Die Verwendung von Os-BSA-PMOx führt dagegen zu einem rund 50 % geringeren Substratumsatz allerdings mit einem *ee* von 30 %, was dem maximal hier erzielten Enantiomerenüberschuss entspricht. Die Umsatzzahl von  $\alpha$ -Methylstyrol liegt für alle Enzyme, mit Ausnahme von DERA, unterhalb derer für das para-substituierte Styrolerivat (Abb. 4.16). Zudem konnten hier keine signifikanten Enantiomerenüberschüsse erreicht werden. Dies zeigt, dass die Position des Methylsubstituenten einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität und Selektivität der AMEs besitzt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die  $\alpha$ -Methyl-Gruppe die gerichtete Einlagerung in ein chirales Zentrum sterisch behindert, was zu einem sinkenden Umsatz sowie zum vollständigen Verlust der Enantioselektivität der Reaktion führt.

Zudem spielen vermutlich enzyspezifische elektronische Effekte eine größere Rolle. Tauscht man den elektronenschiebenden (+I) 4-Methylsubstituenten gegen einen elektronenziehenden (-I) Chlor-Substituenten aus, so zeigt sich, dass beispielsweise die TON des Os-Monooxygenase-

PMOx-AMEs um etwa das dreifache ansteigt, während selbige der anderen verwendeten AMEs sinkt (Abb. 4.16).

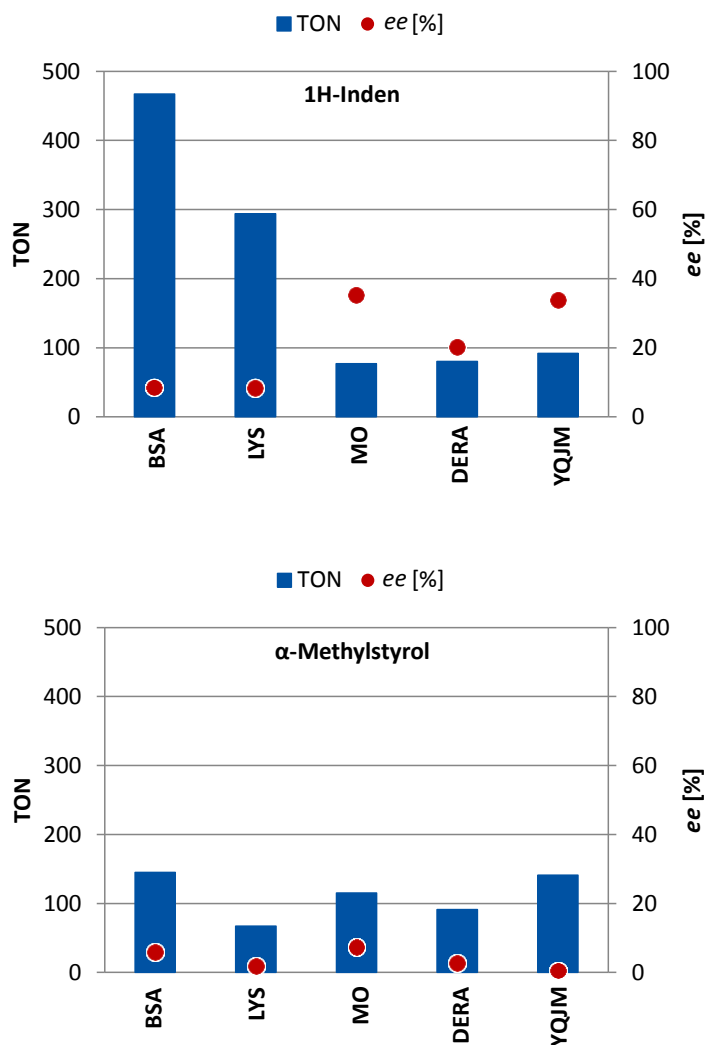


Abb. 4.15: TON und ee [%] ((1*S*,2*R*) für 1*H*-Inden, (*S*) und  $\alpha$ -Methylstyrol) der Dihydroxylierung mit Osmat-Protein-PMOx (MPV = 1) in Chloroform. Die Reaktion wurde mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Alken bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Daten zu großen Teilen aus WILKEN<sup>[g]</sup>.



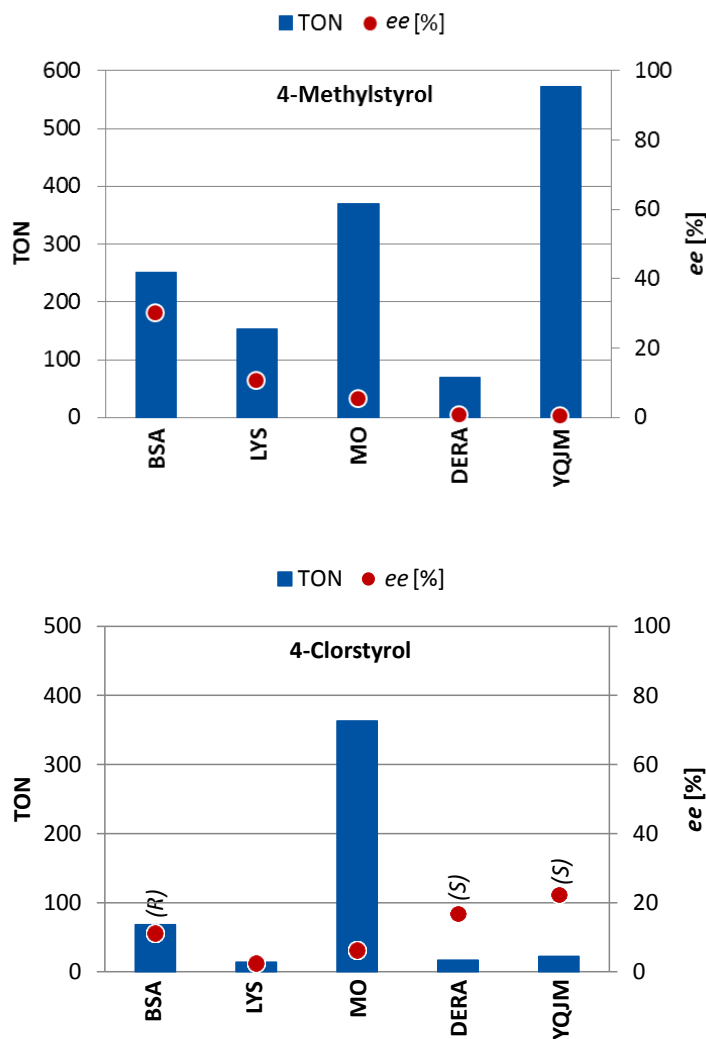


Abb. 4.16: TON und *ee* [%] für 4-Methylstyrol (*S*) und 4-Chlorstyrol der Dihydroxylierung mit Osmat-Protein-PMOx (MPV = 1) in Chloroform. Die Reaktion wurde mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Alken bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Daten zu großen Teilen aus WILKEN<sup>[6]</sup>.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der hier verwendeten Proteine auch Substrate umgesetzt werden, welche durch Osmat-Laccase-PMOx nicht in das korrespondierende Diol überführt werden konnten. Jedoch sind die Enantiomerenüberschüsse mit maximal 35 % *ee* nur als gering zu betrachten. Die erhaltenen TON können mit bis zu 470 jedoch in einigen Fällen durchaus mit denen der auf Osmat-Laccase-basierenden Systeme (TON = 501 für Styrol) konkurrieren.

#### 4.1.4 Kapitelzusammenfassung

Die Dihydroxylierung von Styrol unter Verwendung von Os-Laccase-PMOx als AME wurde im Detail untersucht, um optimale Reaktionsbedingungen für diese Umsetzung zu finden. Der Wechsel des Kooxidationsmittels von  $K_3[Fe(CN)_6]$  zu TBHP führte hierbei zu einem homogenen Reaktionssystem und daraus resultierend zu einem 12-fachen Anstieg der Reaktionsrate (von  $TON_{Os} = 42$  auf 501). Zudem konnten sehr hohe Enantiomerenüberschüsse von bis zu 99,4 % *ee* (*R*) erhalten werden, welche die klassischer Katalysatorsysteme nach SHARPLESS übersteigen (97 % *ee*)<sup>211, 216</sup> und vergleichbar mit denen vorangegangener Studien unter Verwendung von Os-Laccase-PMOx als AME sind<sup>17, 184-185</sup>. Untersuchungen hinsichtlich verschiedener Lösungsmittel als Reaktionsmedium zeigen, dass, betrachtet man TON, TOF sowie *ee* gleichermaßen, Chloroform am besten für Reaktion mit diesem AME geeignet ist.

Die Auswirkungen der Verwendung verschiedener MPV zwischen 0,5 und 2 auf die asymmetrische Dihydroxylierung wurden im Detail untersucht. Hierbei wurde vermutet, dass das Osmat bei einem bestimmten MPV nur noch an die aktive Tasche des Enzyms via Metallaustausch bindet, welche nach früheren Experimenten zu urteilen die größte Komplexbildungskonstante haben sollte. Tatsächlich konnte ermittelt werden, dass der stöchiometrisch gegenüber dem Enzym eingesetzte Metallkomplex die besten Ergebnisse hinsichtlich TON und *ee* liefert. Ein MPR von 2 dagegen führt zwar zu einer Erhöhung der TON, jedoch einhergehend mit einem starken Verlust der Enantioselektivität der Reaktion. Somit erhärten die erhaltenen Ergebnisse diese Erwartungen klar.

Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 0 °C auf 4 bzw. 22 °C führt zu einem Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit, jedoch auch zu einem drastischen Verlust der enantioselektiven Steuerung. Die Enantioselektivität der Reaktion ist somit stark temperaturabhängig. Anscheinend kommt es zudem zu einem temperaturabhängigen Reaktivitätsverlust des Osmat-Laccase-Komplexes. Wird die Kinetik der Reaktion näher betrachtet, so ist klar zu erkennen, dass die katalytisch aktive Spezies mit steigender Temperatur deutlich schneller einer Deaktivierung unterliegt. So ist bei 22 °C bereits nach 3 d keine Produktbildung mehr zu beobachten wobei bei 0 °C das Produkt selbst nach 7 d noch linear zunimmt. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich das artifizielle aktive Zentrum des Enzyms im Laufe der Reaktionszeit verändert, wahrscheinlich durch das Kooxidationsmittel oder das Kaliumosmat selbst.

Zudem zeigt sich, dass auch die Affinität des Substrates Styrol zum aktiven Zentrum einer Temperaturabhängigkeit unterliegt. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass sich die Faltung des

aktiven Zentrums temperaturabhängig ändert. Dies kann auch einen Teil zu den hohen Selektivitäten bei niedrigen Temperaturen beitragen.

Die Dihydroxylierung von Styrol lässt sich neben Osmat ebenfalls mit Hilfe eingelagerter anderer Metallspezies, insbesondere Kaliumpermanganat und Eisenchlorid, katalysieren. Die so generierten AMEs sind jedoch sowohl im Hinblick auf die Aktivität als auch Enantioselektivität der Reaktion dem Osmat-basierten System klar unterlegen. Allerdings ist die mittels Fe-Laccase-PMOx erreichte TON mehr als doppelt so hoch wie diejenige eines literaturbekannten Fe-basierten Katalysatorsystems (TON 9,4 für  $[\text{FeII}(4\text{-MeO-C}_6\text{H}_4\text{-DPAH)}_2](\text{OTf})_2$  als Katalysator, keine Untersuchungen zum Enantiomerenüberschuss<sup>213</sup>).

Zudem konnten einige weitere Styrolerivate unter Verwendung von unterschiedlichen AMEs erfolgreich umgesetzt werden. Dabei hängen sowohl Umsatz als auch Selektivität der Reaktion stark vom verwendeten AME ab.

Alles in allem konnte durch Optimierung der Reaktionsparameter eine bis zu 48-fache Steigerung der *turnover frequency* der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol mit Os-Laccase-PMOx im Vergleich zum  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -basierten Kooxidationsmittelsystem<sup>184</sup> erreicht werden. Zudem liefert das AME sehr hohe Enantioselektivitäten bis zu 99,4 % *ee*, was dem Detektionsmaximum der verwendeten HPLC-Analytik entspricht.

Somit ist es gelungen, aktive und hochselektive AMEs für die asymmetrische Dihydroxylierung in organischen Lösungsmittelsystemen zu generieren.

---



## 4.2 Tandemkatalyse

Prinzipiell ermöglicht die bereits vorgestellte Nutzung von Enzymen als AMEs in Kombination mit der katalytischen Aktivität des nativen Enzyms die Generierung spezifischer Tandemkatalysatoren. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, eine tandemkatalysierte Reaktion im organischen Medium durch Kombination der natürlichen enzymatischen Aktivität mit ihrer Funktion als AMEs bei der asymmetrischen Dihydroxylierung (Kap. 4.1.3) zu etablieren. Die erhaltenen Ergebnisse dieser Forschungen werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

Aufbauend auf die Arbeit von KONIECZNY<sup>17</sup> (vgl. Kapitel 2.3.2) wurden funktionalisierte Lipasen für weitere Untersuchungen hinsichtlich geeigneter enzymbasierter Systeme zur Generierung potenter Tandemkatalysatoren in Erwägung gezogen. Eine Möglichkeit stellt hierbei die Verwendung von Lipase-PEKs<sup>17</sup>, und somit die Generierung organolöslicher enzymbasierter Tandemkatalysatoren, dar. Zudem bieten sich auch immobilisierte Lipasen, wie die bekannte auf einem Acrylharz immobilisierte CaLB (ehemals Novozym 435), zu diesem Zwecke an.

Wie bereits beschrieben eignen sich immobilisierte Lipasen sowie Lipase-PMOx-Konjugate als mögliche Katalysatoren für die Tandemkatalyse (siehe Kap. 2.3.2). Als Zielreaktion wurde eine tandemkatalytische Dihydroxylierung/Veresterung mit Hilfe dieser Enzyme gewählt. Für diese Reaktion sollten die Lipasen zunächst mit Osmat konjugiert werden. Ziel bei dieser Vorgehensweise ist es, dass zunächst mittels der artifiziellen Aktivität von Os-Lipase durch die asymmetrische Dihydroxylierung ausgehend von Styrol *in situ* 1-Phenyl-1,2-ethandiol generiert wird, welches im zweiten, nachfolgenden Reaktionsschritt mittels der nativen katalytischen Aktivität der Lipase direkt mit einer Carbonsäure verestert werden soll (Abb. 4.17).

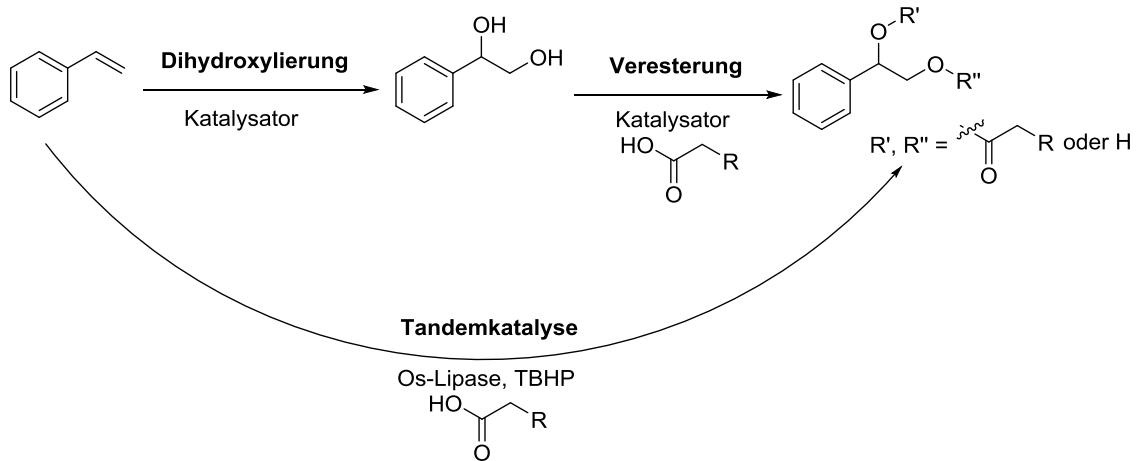


Abb. 4.17: Reaktionsschema der tandemkatalytischen Dihydroxylierung/Veresterung mit Os-Lipase ausgehend von Styrol.

Hierzu war es zunächst nötig zu überprüfen, ob und inwieweit die jeweiligen Lipasen 1-Phenyl-1,2-ethandiol unter den gewählten Reaktionsbedingungen als Substrat akzeptieren sowie die Reaktionsparameter für eine möglichst effiziente Katalyse anzupassen. Zudem galt es eine geeignete Analytik für die sechs möglichen Produktisomere (3 Regioisomere und jeweils 2 Enantiomere) der Veresterungsreaktion zu etablieren. Die erhaltenen Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

## 4.2.1 Tandemkatalytische Veresterungen ausgehend von Alkenen

### 4.2.1.1 Etablierung geeigneter Analytik

Die Ergebnisse dieses Abschnittes wurden in Zusammenarbeit mit Tobias Heitkemper im Rahmen seines Vertiefungspraktikums erarbeitet<sup>[i]</sup>.

Um geeignete Analytikmethoden für die möglichen Veresterungsprodukte der Test- und Tandemreaktionen zu etablieren und einen Vergleich zur klassischen Synthese zu ermöglichen, wurden mögliche Ester zuerst chemisch mittels einer Veresterung nach STEGLICH synthetisiert<sup>217-218</sup>. Ausgehend vom racemischen 1-Phenyl-1,2-ethandiol sind, wie bereits erwähnt, generell sechs unterschiedliche isomere Produkte zu erwarten (Abb. 4.18).

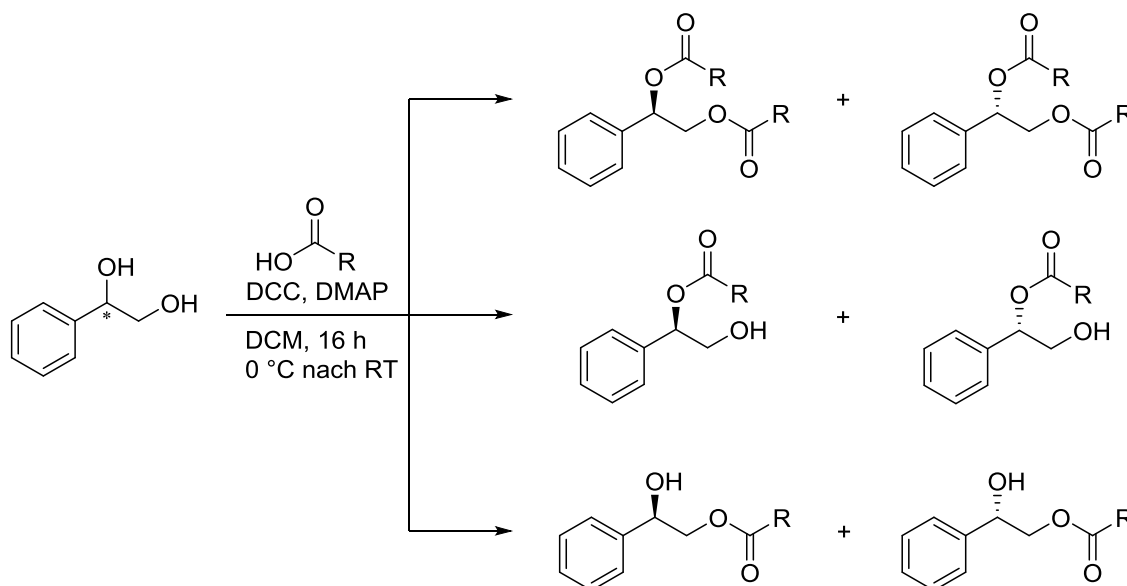


Abb. 4.18: Allgemeines Reaktionsschema der STEGLICH-Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit verschiedenen Carbonsäuren<sup>217-218</sup>.

Allgemein konnten die Diester mit dieser Methode einfach in großem Überschuss durch die Verwendung von bereits 2 eq. der Carbonsäure dargestellt werden.

Wird dagegen ein eq. Carbonsäure bei der STEGLICH-Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol zugegeben, entsteht ein Produktgemisch aus allen sechs möglichen Estern mit einer bevorzugten Bildung des primären (prim.) Esters gefolgt von dem Monoester bei dem die sekundäre Alkoholfunktion verestert wurde (sec. Ester). Aus den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren lassen sich die jeweiligen Produktverhältnisse bestimmen. Die Zuordnung und chemischen Verschiebungen sind in Kapitel 6.5.1 zu finden.

Die synthetisierten Ester wurden zudem mittels HPLC mit einer chiralen Säule untersucht, um geeignete Parameter für diese Analytik zu etablieren und die Retentionszeiten der unterschiedlichen Isomere zu erhalten. Da ein racemisches Gemisch des 1-Phenyl-1,2-ethandiols bei der Veresterung eingesetzt wurde und das Reaktionsgemisch keine enantioselektiv dirigierenden Komponenten enthält, muss es sich folglich bei den Produkten ebenfalls um Racemate handeln. Deswegen wird erwartet, dass die Integrale, welche den Enantiomeren derselben Verbindungen zugeordnet wurden, im HPLC-Chromatogramm (Abb. 4.19) den gleichen prozentualen Flächeninhalt aufweisen.

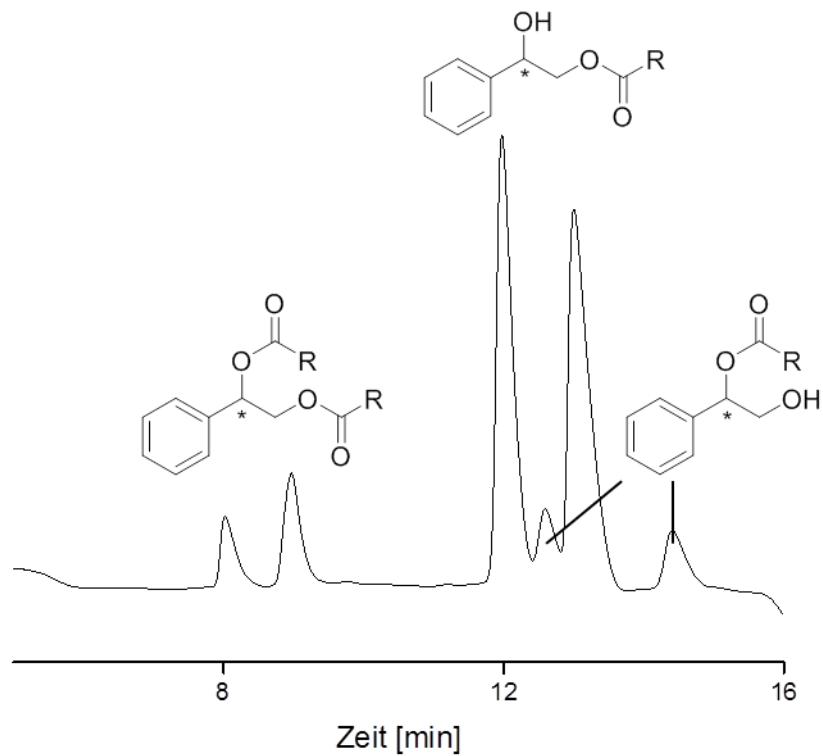


Abb. 4.19: HPLC-Chromatogramm der Steglich-Veresterung am Beispiel von Laurinsäure. Für die verwendeten Messbedingungen siehe Kapitel 6.7.8.2.

Davon ausgehend sowie auf Grundlage der mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermittelten Produktverhältnisse konnten die Peaks aus den HPLC-Chromatogrammen den entsprechenden primären und sekundären Estern sowie dem Diester zugeordnet werden.

Die ermittelten Retentionszeiten sind in Tab. 4.9 dargestellt.



Tab. 4.9: Auflistung der Retentionszeiten für die unterschiedlichen Produktester. Die absolute Konfiguration der einzelnen Enantiomere wurde nicht aufgeklärt (1 = Enantiomer mit der geringeren Retentionszeit, 2 = Enantiomer mit der höheren Retentionszeit). Die verwendeten Messbedingungen sind unter Kapitel 6.7.8.2 näher erläutert.

Carbonsäure	Retentionszeiten [min]					
	prim. Ester 1	prim. Ester 2	sec. Ester 1	sec. Ester 2	Diester 1	Diester 2
Hexansäure	16,41	18,76	18,11	22,84	10,31	10,63
Octansäure	23,82	25,50	24,79	27,26	17,28	17,58
Laurinsäure	12,04	13,55	12,62	15,79	8,30	8,52
Stearinsäure	10,57	11,69	10,95	12,96		7,74

Somit konnten die Enantiomere unter Verwendung einer chiralen HPLC-Säule erfolgreich getrennt werden, was eine Analytik der Produkte der Tandemreaktion hinsichtlich Regio- und Enantioselektivität ermöglicht.

#### 4.2.1.2 Tandemkatalyse im organischen Medium mittels immobilisierter Lipase

Teile der Daten dieses Abschnittes wurden zusammen mit Tobias Heitkemper, Marvin Kloß sowie Lydia Mihailowitch im Rahmen ihrer Vertiefungspraktika ermittelt<sup>[h, i, j]</sup>.

Als mögliche Quelle für enzymbasierte Tandemkatalysen bieten sich, wie bereits erwähnt, immobilisierte Lipasen, wie beispielsweise die auf einem Acrylharz immobilisierte CalB (ehemals Novozym 435) an. Diese Systeme sind literaturbekannt als potente Veresterungskatalysatoren in organischen Medien (siehe auch Kap. 2.3.2).

Zunächst wurde die Veresterungsreaktion von rac 1-Phenyl-1,2-ethandiol mittels immobilisierter CalB näher betrachtet. Hierbei wurde der Einfluss des Lösungsmittels näher untersucht, da hier im Gegensatz zur Verwendung von Enzym-PMOX-Konjugaten keine Limitierung hinsichtlich Lösungsmitteln besteht, in denen das Konjugat löslich ist. Zusätzlich zu Chloroform wurden als weitere mögliche Lösungsmittel Toluol sowie *n*-Heptan in Erwägung gezogen, da bei vorherigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass immobilisierte Lipasen in diesen unpolaren org. Lösungsmitteln eine besonders hohe Aktivität zeigen<sup>82-83</sup>. Da das verwendete Diol 1-Phenyl-1,2-ethandiol in *n*-Heptan nicht löslich ist und somit keine Produktbildung beobachtet

werden konnte, wurde für die weiteren Untersuchungen Toluol sowie ein Gemisch aus Toluol und Chloroform (50:50 v:v) als Lösungsmittel verwendet. Die Ergebnisse in Tab. 4.10 nach 3 d Reaktionszeit bei RT zeigen klar, dass im Hinblick auf die Regioselektivität und Gesamterausbeute (60 %) Toluol als Lösungsmittel für die Veresterung zu bevorzugen ist. So wird hier zu 80 % der primäre Ester mit einem moderaten *ee* von 43 % gebildet.

Tab. 4.10: Regio- und Enantioselektivität der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Laurinsäure mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL immobilisierter CaLB, 100  $\mu\text{mol/mL}$  1-Phenyl-1,2-ethandiol und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Laurinsäure in Toluol bei RT für 3 d durchgeführt.

Lösungsmittel	Regioselektivität	<i>ee</i> [%]			Ausbeute [%]
		Diester:prim.:sec	Diester	Prim. Sec.	
Chloroform	12:69:19	12	20	77	45
Chloroform/Toluol	15:66:19	>99	15	34	52
Toluol	12:80:8	>99	43	10	60

Daher wird für die nachfolgenden Untersuchungen zunächst Toluol als Lösungsmittel gewählt. Neben dem Lösungsmittel ist es auch denkbar, dass die Kettenlänge der verwendeten Carbonsäure einen großen Einfluss auf die Selektivität der Reaktion sowie auf die Aktivität des Katalysators haben könnte. Es wurde vermutet, dass mit steigender Kettenlänge die Zugänglichkeit des Substrates zum aktiven Zentrum des Enzyms eingeschränkt wird, insbesondere im Hinblick auf die Bildung des Diesters. Um zu ermitteln, welche Carbonsäuren als Substrat für die Tandemkatalyse mittels immobilisierter CaLB besonders geeignet sind und die Regioselektivitäten der Veresterungsreaktion zu untersuchen, wurde die Reaktion mit verschiedenen Kettenlängen Zwischen C-6 und C-12 durchgeführt. Als zweites Substrat kam auch hier 1-Phenyl-1,2-ethandiol zum Einsatz. Zeitgleich wurde der Reaktionsverlauf näher betrachtet. Zunächst wurde eine Veresterung mit 2 eq. Hexansäure für 24 h durchgeführt, wobei dem Reaktionsgemisch zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen wurden (Tab. 4.11).

Tab. 4.11: Reaktionsverlauf der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Hexansäure mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100  $\mu\text{mol/mL}$  1-Phenyl-1,2-ethandiol und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Hexansäure in Toluol bei RT für insgesamt 24 h durchgeführt.

Zeit [min]	Diester [%]	Sec. Ester [%]	Prim. Ester [%]	Diol-Anteil [%]
10	0,3	3	11	85
20	0,3	5	18	77
30	0,3	2	25	73
40	0,3	5	30	65
50	0,4	5	35	60
60	0,3	2	39	59
70	0,5	5	42	53
120	0,3	2	51	46
180	0,3	1	58	41
240	0,3	1	60	38
300	0,3	1	64	34
360	0,4	1	67	32
1440	0,3	3	66	31

Wie in Abb. 4.20 zu erkennen ist, wird fast ausschließlich der primäre Ester bei der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol gebildet. Bei Verwendung von Hexansäure sind es nach 24 Stunden etwa 66 % des primären Esters bei 69 % Umsatz des Diols. Der Anteil des sekundären Esters sowie des Diesters liegt hier bei maximal bei 5 % bzw. 0,3 %. Somit kann gesagt werden, dass die immobilisierte CaLB eine sehr hohe Regioselektivität hin zum primären Ester besitzt. Zudem zeigt sich, dass der Reaktionsverlauf nur innerhalb der ersten 70 Minuten bei einem Diolumsatz von ca. 55 % annähernd lineares Verhalten zeigt. Allgemein entspricht die gemessene Kurve dem typischen Verlauf einer Reaktion 2. Ordnung. Es konnte ein maximaler Umsatz von 1-Phenyl-1,2-ethandiol von ca. 69 % erreicht werden. Eine mögliche Ursache für den nicht vollständigen Umsatz könnte die abnehmende Substratkonzentration während der Reaktion

und eine damit einhergehende Verlangsamung der enzymatischen Katalyse sein. Zudem wurde das bei der Veresterung entstehende Wasser während der Reaktion nicht abgetrennt, so dass sich mit steigendem Wassergehalt ein chemisches Gleichgewicht zwischen der Veresterungs- und Hydrolysereaktion einstellt.

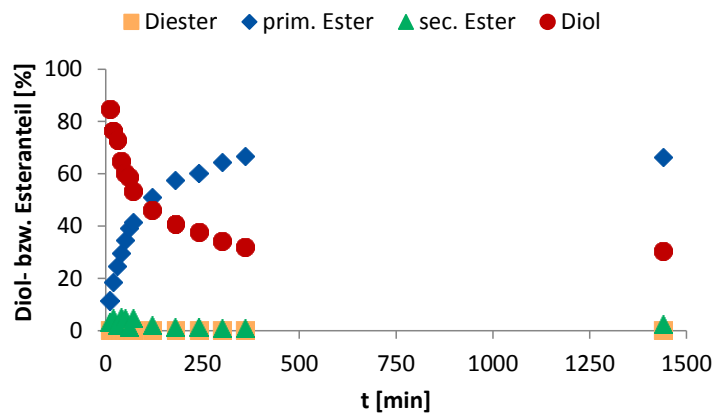


Abb. 4.20: Reaktionsverlauf der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Hexansäure mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100  $\mu\text{mol/mL}$  1-Phenyl-1,2-ethandiol und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Hexansäure in Toluol bei RT für insgesamt 24 h durchgeführt.

Weitere Untersuchungen wurden mit jeweils 2 eq. Oktansäure sowie Laurinsäure durchgeführt (Tab. 4.12). Betrachtet wurden hier jeweils nur die ersten 70 min. der Veresterungsreaktion, wobei eine Probenentnahme alle 10 Minuten erfolgte.

Tab. 4.12: Reaktionsverlauf der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Oktan- sowie Laurinsäure mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100  $\mu\text{mol/mL}$  1-Phenyl-1,2-ethandiol und 200  $\mu\text{mol/mL}$  der Carbonsäure in Toluol bei RT für insgesamt 70 min durchgeführt.

	Zeit [min]	Diester [%]	Sec. Ester [%]	Prim. Ester [%]	Diol-Anteil [%]
Oktansäure	10	2	2	7	88
	20	2	2	13	82
	30	2	3	18	78
	40	2	3	22	73
	50	2	3	26	69
	60	2	3	30	65
	70	2	3	35	61
Laurinsäure	10	1	2	11	86
	20	1	2	18	79
	30	2	3	23	72
	40	3	3	28	65
	50	4	4	34	59
	60	5	4	39	52
	70	5	6	45	44

Hierbei zeigt die Veresterung mit Oktansäure (Abb. 4.21, oben) einen sehr ähnlichen Verlauf zu der Reaktion mit Hexansäure (Abb. 4.20). Allerdings ist der Umsatz des Diols mit 39 % hier um etwa 10 % geringer als der unter Einsatz von Hexansäure nach der gleichen Reaktionszeit (47 %). Wird Laurinsäure als Substrat verwendet, so wird nach 70 min ein Diol-Umsatz von 66 % erreicht, welcher höher ist als der der anderen verwendeten Carbonsäuren. Die regioselektive Steuerung befindet sich allerdings in allen Fällen im selben Größenordnungsbereich, so dass gesagt werden kann, dass die Länge der verwendeten Carbonsäurekette zwischen C-6 und C-12 keinen bedeutenden Einfluss hierauf hat.

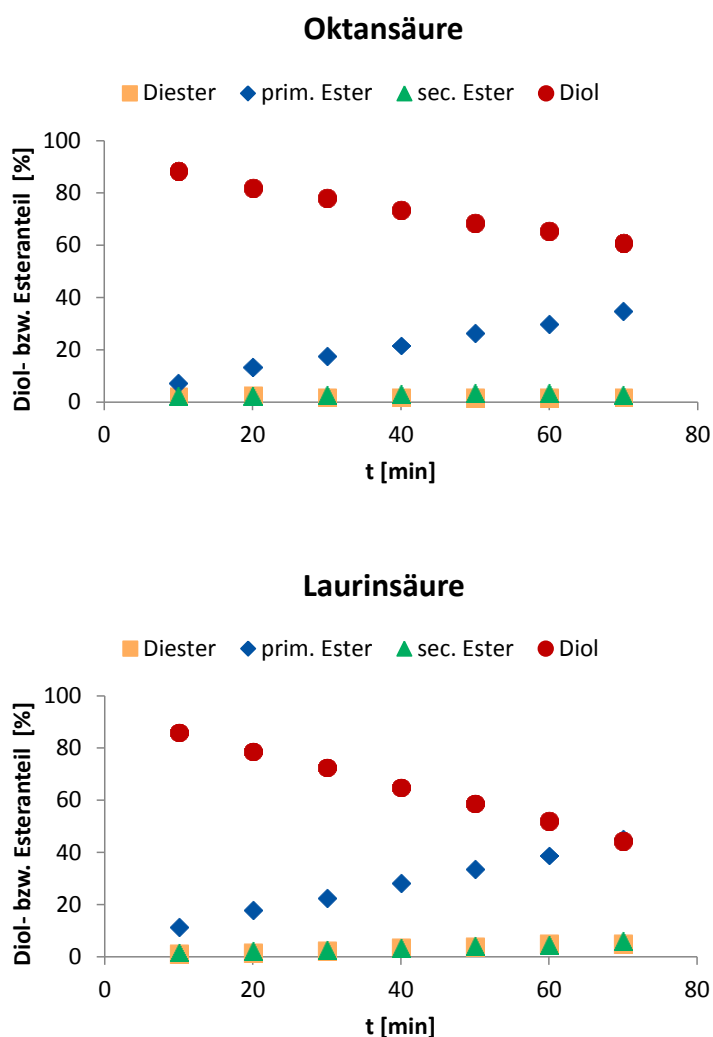


Abb. 4.21: Reaktionsverlauf der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Oktan- sowie Laurinsäure mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100  $\mu\text{mol/mL}$  1-Phenyl-1,2-ethandiol und 200  $\mu\text{mol/mL}$  der Carbonsäure in Toluol bei RT für insgesamt 70 min durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle drei verwendeten Carbonsäuren in der Veresterungsreaktion zu einer hohen bis sehr hohen Regioselektivität der Reaktion hin zu dem prim. Ester führen. Daher erscheinen sie zunächst geeignet für weitere Untersuchungen zur Tandemkatalyse im organischen Medium.

Wird lediglich die Dihydroxylierungsreaktion mit der immobilisierten Lipase mit einem MPV von 1 bei RT für 3 d durchgeführt so zeigt sich, dass unter Verwendung von Chloroform als Lösungsmittel eine Produktausbeute von 10 % erreicht werden kann. Die immobilisierte CaLB katalysiert die Reaktion in Toluol dagegen mit einer Ausbeute von rund 14 %, was einer Steigerung um ca. 40 % im Vergleich zu Chloroform entspricht. Wie erwartet wird 1-Phenyl-1,2-

ethandiol in beiden Fällen racemisch gebildet. Dies zeigt, dass Toluol im Hinblick auf die Aktivität des AMEs auch hier als Lösungsmittel überlegen ist.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die tandemkatalytische Dihydroxylierung/Veresterung mittels immobilisierter Os-CaLB mit einem MPV von 1 bei RT in Toluol durchgeführt (Tab. 4.13). Hierbei zeigen sich deutliche Unterschiede von sowohl Regio- als auch Enantioselektivität im Vergleich zu den Einzelreaktionen.

Tab. 4.13: Regio- und Enantioselektivität der tandemkatalytischen Dihydroxylierung/Veresterung von Styrol mit verschiedenen Carbonsäuren mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol, 0,02  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Carbonsäure in Toluol oder Chloroform bei RT für 3 d durchgeführt.

Carbonsäure	Lösungsmittel	Regioselektivität			ee [%]		Umsatz Diol [%]
		Diester:Prim.:Sec.	Diester	Prim.	Sec.		
Hexansäure	Toluol	32:59:9	87	2	34	99	
	Chloroform	25:70:5	41	5	45	99	
Oktansäure	Toluol	45:50:40	85	6	26	99	
	Chloroform	25:72:6	64	28	26	99	
Laurinsäure	Toluol	4:89:7	89	36	40	97	
	Chloroform	1:72:26	63	71	88	95	

So wird beispielsweise unter Verwendung von Laurinsäure in Toluol der primäre Ester zu rund 90 % gebildet (Abb. 4.22). Im Gegensatz dazu entsteht dieser bei der einzeln betrachteten Veresterungsreaktion nur zu 80 %. Der Enantiomerenüberschuss der Tandemkatalyse liegt mit ca. 36 % in der gleichen Größenordnung wie derjenige der Veresterung. Dies zeigt, dass sich die Ergebnisse aus der Betrachtung der Einzelreaktionen nicht einfach auf die Tandemkatalyse übertragen lassen. Möglicherweise kommt es durch die Insertion des Osmats zu Veränderungen im aktiven Zentrum des Enzyms und/oder einer Veränderung der Affinität der Substrate zum Enzym. Davon ausgehend wurde die identische Tandemkatalyse gleichfalls in Chloroform durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse stützen diese These. So liegt die prozentuale Bildung

des primären Produktesters hier zwar mit 72 % in der gleichen Größenordnung der Veresterung, jedoch verschiebt sich die Regioselektivität der verbleibenden Ester hin zum sekundären Ester, wobei der Diester mit nur 1 % einen sehr geringen Anteil des Produktgemisches ausmacht. Außerdem sind die Enantioselektivitäten der Tandemreaktion mit zwischen 63 und 68 % *ee* deutlich höher als diejenigen der reinen Veresterung mit Laurinsäure.

Der Vergleich der Tandemkatalysen mit verschiedenen Kettenlängen der Carbonsäure zwischen C-6 und C-12 zeigt, dass der Anteil an Diester im Produktgemisch tendenziell mit steigender Kettenlänge sinkt. So liegt dieser bei Laurinsäure nur bei 4 (Toluol) bzw. 1 % (Chloroform), während dieser bei Hexan- bzw. Oktansäure im zweistelligen Prozentbereich liegt. Dies stützt die Vermutung, dass mit steigender Kettenlänge die Zugänglichkeit des Substrates zum aktiven Zentrum des Enzyms insbesondere im Hinblick auf die Bildung des Diesters erschwert wird. Im besten Falle wird der prim. Ester hier in Toluol zu ca. 90 % gebildet, jedoch ist die Enantioselektivität mit ca. 40 % als recht gering zu betrachten. In Chloroform dagegen beträgt die Enantioselektivität 71 % *ee*, jedoch liegt der Anteil hier bei lediglich ca. 70 %.

Wird die Enantioselektivität der tandemkatalytischen Reaktion betrachtet, so zeigt sich, dass generell die höchsten Enantioselektivitäten beim Diester mit bis zu 89 % *ee* erreicht werden. Dieser stellt jedoch in allen Fällen nicht den größten Teil des Produktestergemisches dar.

---



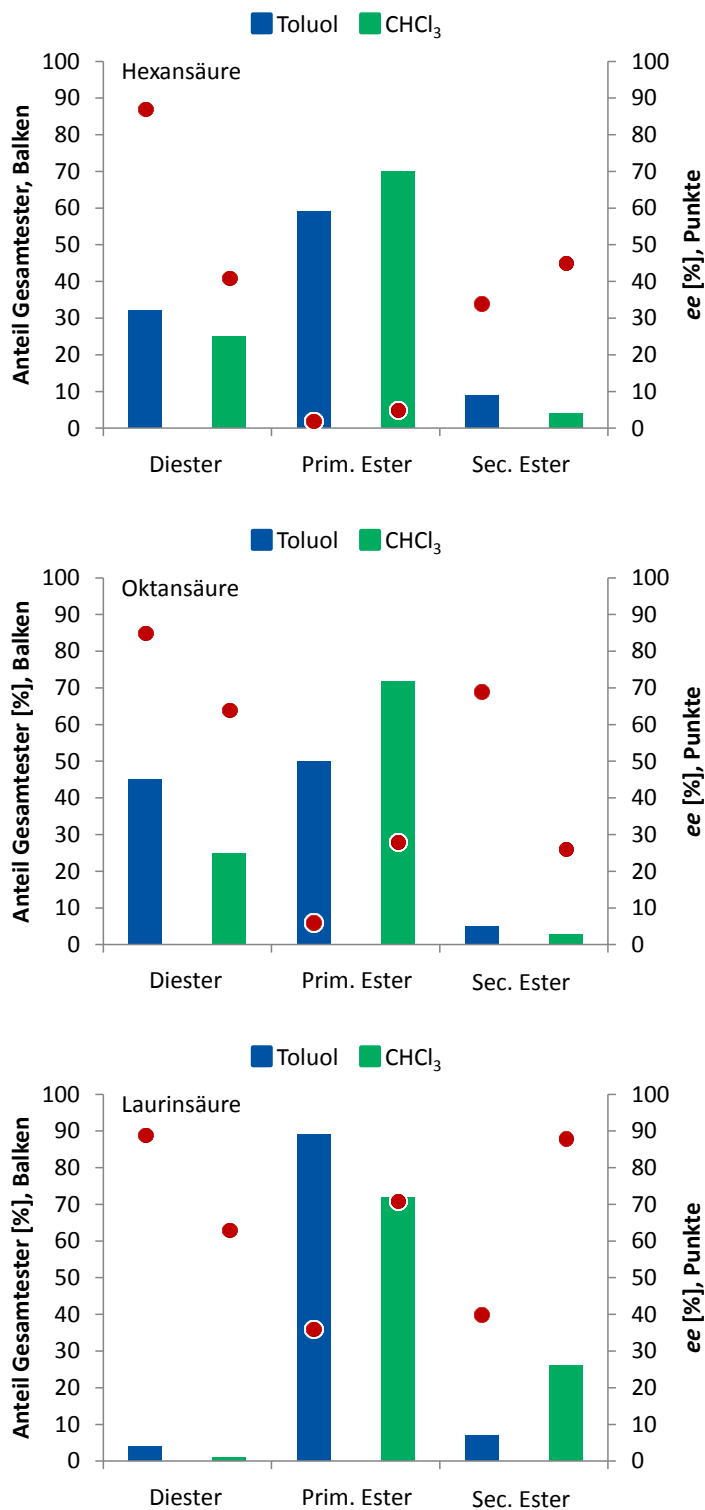


Abb. 4.22: Regio- und Enantioselektivität der tandemkatalytischen Dihydroxylierung/Veresterung von Styrol mit verschiedenen Carbonsäuren mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol, 0,02  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Carbonsäure in Toluol oder Chloroform bei RT für 3 d durchgeführt.

Somit ist es erfolgreich gelungen, die Dihydroxylierung/Veresterung mit immobilisierter Os-CaLB erfolgreich tandemkatalytisch durchzuführen. Hierbei konnte eine hohe regioselektive Steuerung von bis zu 90 % zugunsten des primären Esters erreicht werden. Dies unterstreicht das große Potential solcher enzymbasierter tandemkatalytischer Reaktionen. Jedoch ist es nicht gelungen die selektive Bildung nur eines der möglichen Produktisomere zu erreichen unter Erhalt einer guten Regio- und Enantioselektivität. Liegt der Fokus auf beiden dieser Punkte, so ist eine aufwendige Enantiomeren- und Racemattrennung hier dennoch unumgänglich.

#### 4.2.1.3 Tandemkatalyse im organischen Medium mittels Os-Lipase-PMOx

Große Teile der Ergebnisse dieses Abschnittes wurden gemeinsam mit Eleonora Buchholz, Andrea Machalica und Marvin Kloß im Rahmen Ihrer Vertiefungspraktika gewonnen<sup>[d, e, f]</sup>.

Wie bereits beschrieben eignen sich ebenfalls organolösliche PEKs als mögliche Katalysatoren für die Tandemkatalyse (siehe Kap. 2.3.2). Da vermutet wurde, dass die Polymerkonjugation möglicherweise einen Einfluss auf sowohl die Selektivität als auch Aktivität bei der tandemkatalytischen Umsetzung hat wurden auch diese auf ihre Eignung bei der Tandemkatalyse ausgehend von Styrol im TBHP-basierten System näher untersucht.

Im Folgenden wurden verschiedene Lipase-PMOx-Konjugate hinsichtlich ihrer Eignung für die Tandemkatalyse untersucht. Hierzu wurden Lipase B aus *Candida antarctica* (CaLB), Lipase aus *Candida rugosa* (CRL) sowie Lipase aus *Rhizomucor miehei* (RML) verwendet. Dabei wurden auch hier zunächst die beiden gewünschten Reaktionsschritte, die Dihydroxylierung sowie Veresterung, separat betrachtet.

Führt man die Dihydroxylierung von Styrol, in Anlehnung an die vorherigen Untersuchungen (siehe Kap. 4.1.3), mit Os-Lipase-PMOx mit einem MPV von 1 bei 0 °C für 7 d, durch so zeigt sich, dass die verwendeten Lipasen diese Reaktion mit nur sehr geringer Enantioselektivität katalysieren. Im besten Fall wurde, unter Verwendung von Os-CaLB-PMOx ein *ee* von 20 % (*S*) erhalten bei einer TON von nur 85 (Ausbeute 1,1 %). Daher wurden davon ausgehend im Folgenden die Reaktionstemperatur auf RT (3 d, gemäß 4.1.3.1) angehoben, was zwar zu einem vollständigen Verlust der Enantioselektivität bei allen Systemen, jedoch zu einer bis zu 5-fachen Erhöhung der *turnover number* führte.

---

Bei der Veresterung von rac. 1-Phenyl-1,2-ethandiol unter identischen Bedingungen mit Laurinsäure mittels Osmat-freier CaLB-PEKs kann ein 40 %-iger Eduktumsatz erzielt werden, was bedeutet, dass das Diol in diesem Fall als Substrat akzeptiert wird.

Daher wurden diese Systeme weiterhin im Hinblick auf ihre Eignung als Tandemkatalysatoren näher untersucht. Hierzu wurden die AMEs durch Zugabe von Osmat mit verschiedenen MPV und anschließendem Rühren für 30 Minuten generiert und anschließend erfolgte die Zugabe aller weiteren Reaktionskomponenten. Als Alken wurde Styrol verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 4.14 zu finden. Es zeigt sich, dass bei allen verwendeten Systemen ein Umsatz von Styrol zu den korrespondierenden Estern erfolgt. Der Anteil des *in situ* gebildeten Zwischenproduktes 1-Phenyl-1,2-ethandiol im Produktgemisch beträgt dabei in allen Fällen weniger als 5 %.

Tab. 4.14: Regioselektivität, Enantioselektivität und Produkt-zu-Zwischenprodukt-Verhältnis der asymmetrischen Dihydroxylierung/Veresterung von Styrol mit Os-Lipase-PMOx in Chloroform bei verschiedenen MPV. Die Reaktionen wurden mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Lipase-PMOx, 0,007 - 0,026  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol bei 20 °C für 3 d durchgeführt.

Lipase	MPV	Regioselektivität		ee [%]		Gesamtester-Diol-Verhältnis
		Diester:Prim.:Sec.	Diester	Prim.	Sec.	
Os-CaLB-PMOx	0,5	4:76:20	84	62	64	95:5
	1	18:58:24	62	74	88	99:1
	2	13:58:29	64	72	94	96:4
Os-CRL-PMOx	0,5	34:46:20	54	79	54	97:3
	1	7:62:31	72	40	88	98:2
	2	7:61:32	46	58	82	98:2
Os-RML-PMOx	0,5	4:59:38	77	87	97	99:1
	1	6:54:40	70	78	52	98:2
	2	4:58:37	62	56	18	99:1
CaLB-PMOx	0	16:50:34	96	72	58	40:60

Es ist zudem klar zu erkennen, dass die Reaktion von Styrol zu den jeweiligen Estern mittels aller Os-Lipase-PEKs katalysiert werden kann. Hierbei erfolgt die Umsetzung sowohl bei unterstöchiometrisch (MPV = 0,5) sowie überstöchiometrisch (MPV = 2) eingesetztem Osmat. Dies legt die Vermutung nahe, dass der ans Enzym gebundene Metallkomplex das aktive Zentrum nicht behindert, und somit beide Reaktionen an einem katalytisch aktiven AME ablaufen können, was der Definition einer Auto-Tandemkatalyse entspricht.

Generell zeigt sich, dass der primäre Ester mit 86 – 40 % in allen Fällen den größten Anteil am Produktester-Gemisch stellt, mit Enantioselektivitäten zwischen 40 und 87 % *ee*. Der sekundäre Ester wird, mit Ausnahme der Verwendung von Os-CRL-PMOx (MPV = 0,5) am zweithäufigsten gebildet (20 – 38 %, mit 52 – 97 % *ee*), während der Diester den kleinsten Anteil von 4 – 18 % (54 – 84 % *ee*) am Produktgemisch stellt. Jedoch wird in keinem Fall die regioselektive Bildung nur eines Esters erreicht. Betrachtet man die Regioselektivität in Abhängigkeit vom MPV für die einzelnen Lipase-Konjugate, so werden deutliche Unterschiede für die verschiedenen Lipasen festgestellt (siehe Abb. 4.23). So sinkt unter Verwendung von Os-CaLB-PEKs bei einer Erhöhung des MPV von 0,5 auf 1 der Anteil des primären Esters unter gleichzeitig erhöhter Bildung des Diesters (sowie des sekundären Esters), was die Vermutung nahe legt, dass in diesem Fall der Diester überwiegend ausgehend vom prim. Ester gebildet wird und zudem die Weiterreaktion des Monoesters zum Diester durch, z.B. die Anlagerung des Osmats in räumlicher Nähe zum Reaktionsort, erleichtert wird. Wird dagegen Os-CRL-PMOx als Katalysator eingesetzt, so kommt es zu einem Anstieg der Bildung des primären sowie sekundären Esters zu annähernd gleichen Teilen unter einer Verringerung des Umsatzes zum Diester. Dies deutet darauf hin, dass die Bildung des Diesters hier nicht aus einem der Regioisomere bevorzugt erfolgt und zudem die Reaktion zum Diester durch die höhere Osmatmenge unterdrückt wird. Bei Os-RML-PEKs kann kein Einfluss des MPV auf diese Aspekte der Produktbildung beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung des MPV von 1 auf 2 zeigt bei allen verwendeten Lipasen keinen weiteren Effekt auf die Regioselektivität.

---

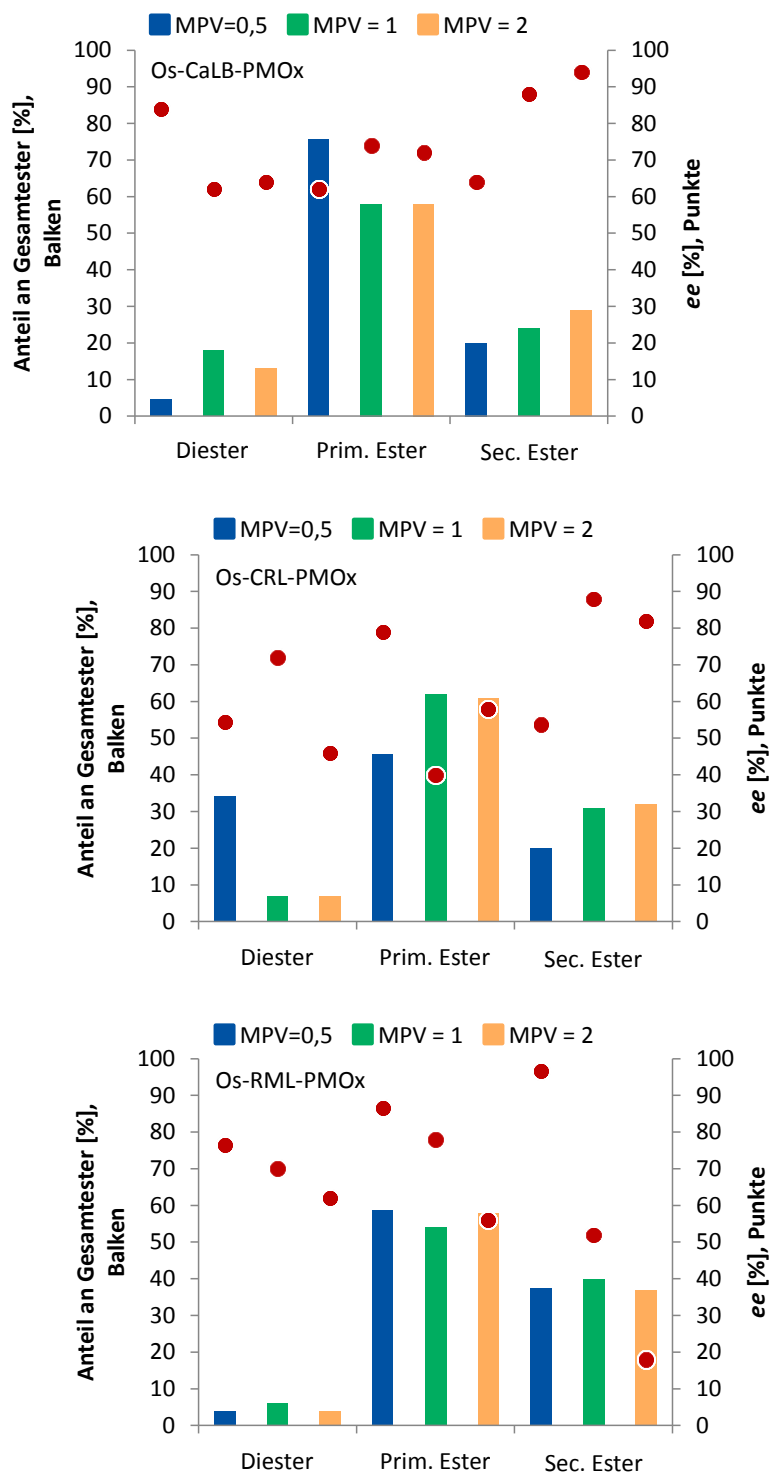


Abb. 4.23: Regioselektivität und Enantioselektivität der asymmetrischen Dihydroxylierung/Veresterung von Styrol mit Laurinsäure mittels Os-Lipase-PMOx in Chloroform bei verschiedenen MPV. Die Reaktionen wurden mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Lipase-PMOx, 0,007 - 0,026  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol bei 20 °C für 3 d durchgeführt.

Somit zeigt sich, dass eine Tandemreaktion mittels Os-Lipase-PMOx erfolgreich durchgeführt werden kann. Hierbei wurde im besten Fall eine Regioselektivität von 4:76:20 (Di:Prim:Sec) erreicht. Die maximal ermittelte Enantioselektivität beträgt sehr gute 97 % *ee* (Os-RML-PMOx, MPV = 0,5, sekundärer Ester). Jedoch ist es nicht gelungen die selektive Bildung nur eines der möglichen Produktisomere zu erreichen unter Betrachtung einer guten Regio- und Enantioselektivität. Zudem führt die vorgeschaltete Dihydroxylierungsreaktion nur zu relativ geringen Umsätzen von maximal ca. 5 % (TON = 410) von Styrol zu 1-Phenyl-1,2-Ethandiol, was den Gesamtumsatz der Tandemkatalyse stark limitiert.

#### 4.2.2 Kapitelzusammenfassung

Eine tandemkatalytische Dihydroxylierung/Veresterung konnte sowohl mittels immobilisierter Os-CaLB als auch Os-Lipase-PMOx erfolgreich durchgeführt werden.

Mittels immobilisierter Os-CaLB konnte eine hohe enantioselektive Steuerung von bis zu 90 % zugunsten des primären Laurinsäureesters, jedoch mit einem *ee* von nur 36 %, erreicht werden. Wird die Enantioselektivität der Reaktion betrachtet, so zeigt sich, dass generell die höchsten Enantioselektivitäten beim Diester mit bis zu 89 % *ee* erreicht werden. Dieser stellt jedoch in allen Fällen nicht den größten Teil des Produktestergemisches dar.

Im Vergleich der beiden Einzelreaktionen, insbesondere der Veresterung, mit der Tandemkatalyse zeigen sich deutliche Unterschiede von sowohl Regio- als auch Enantioselektivität. Somit können die Ergebnisse der Einzelreaktionen nicht einfach auf die Tandemkatalyse übertragen werden, was die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen erschwert.

Für Os-CaLB-PMOx wurde ausgehend von Styrol im besten Fall eine Regioselektivität von 4:76:20 (Di:Prim:Sec) erreicht. Die maximal ermittelte Enantioselektivität beträgt sehr gute 97 % *ee* für den Diester, welcher jedoch mit 4 % bei weitem nicht den höchsten Anteil am Produktestergemisch darstellt.

Die erhaltenen Ergebnisse untermauern insgesamt das große Potential solcher enzymbasierter tandemkatalytischer Systeme im Bereich der Katalyse. Allerdings ist es im Rahmen dieser Studien nicht gelungen die selektive Bildung nur eines der möglichen Produktisomere zu erzielen, unter Betrachtung einer guten Regio- und Enantioselektivität gleichermaßen.

---

Wird der Fokus auf beide diese Parameter gelegt, so ist eine aufwendige Enantiomeren- und Racemattrennung unumgänglich.

Zudem führt der erste Reaktionsschritt, die Dihydroxylierungsreaktion, nur zu relativ geringen Umsätzen von maximal ca. 14 % von Styrol zu 1-Phenyl-1,2-Ethandiol, was den Gesamtumsatz der Tandemkatalyse stark limitiert.

---





### 4.3 Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten

In den vorherigen Kapiteln wurde die Verwendung von Metall-Protein-PMOx-Konjugaten als organolösliche artifizielle Metalloenzyme beschrieben. Hierbei wurden bemerkenswerte Enantioselektivitäten bis zu mehr als 99 % *ee* für die Dihydroxylierung von Styrol in Chloroform erreicht. Jedoch ist die Funktionalisierung der Proteine mit Poly(2-alkyloxazolin) sehr zeitaufwändig (von der Polymerisation bis zum einsatzfähigen Konjugat bis zu ca. 2 Wochen). Zudem ist die Aufreinigung der erhaltenen Protein-POx-Konjugate schwierig und es befindet sich häufig noch ein größerer Anteil ungebundenes Polymer im Reaktionsgemisch. Aus diesen Gründen ist es wünschenswert, eine unkompliziertere und schonendere Methode der Enzymfunktionalisierung zu finden. Zudem sind die Enzyme, die bisher zu einer hochselektiven Produktbildung und hoher Katalysatoreffizienz führten, teuer und häufig nicht in reiner Form erhältlich. Neben dem Erreichen einer Organolöslichkeit scheint die Blockierung der einfach zugänglichen primären Aminogruppen an der Oberfläche des Proteins eine entscheidende Rolle für die Enantioselektivität der nachfolgenden Katalyse zu spielen. Auf diese Weise befinden sich die übrigen potentiellen Bindungsstellen für das Metall eher im Inneren des Enzyms und somit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sie sich in einer chiralen Umgebung befinden (Abb. 4.24). Aus diesen Gründen wurde in Erwägung gezogen ob auch eine Modifizierung der Proteine mit niedermolekularen Verbindungen zur Generierung hochselektiver und aktiver artifizieller Metalloenzyme ausreichend sein kann. Eine denkbare Möglichkeit hierzu ist die Funktionalisierung der Biokatalysatoren mit Hilfe von verschiedenen Carbonsäureanhydriden<sup>219</sup>.

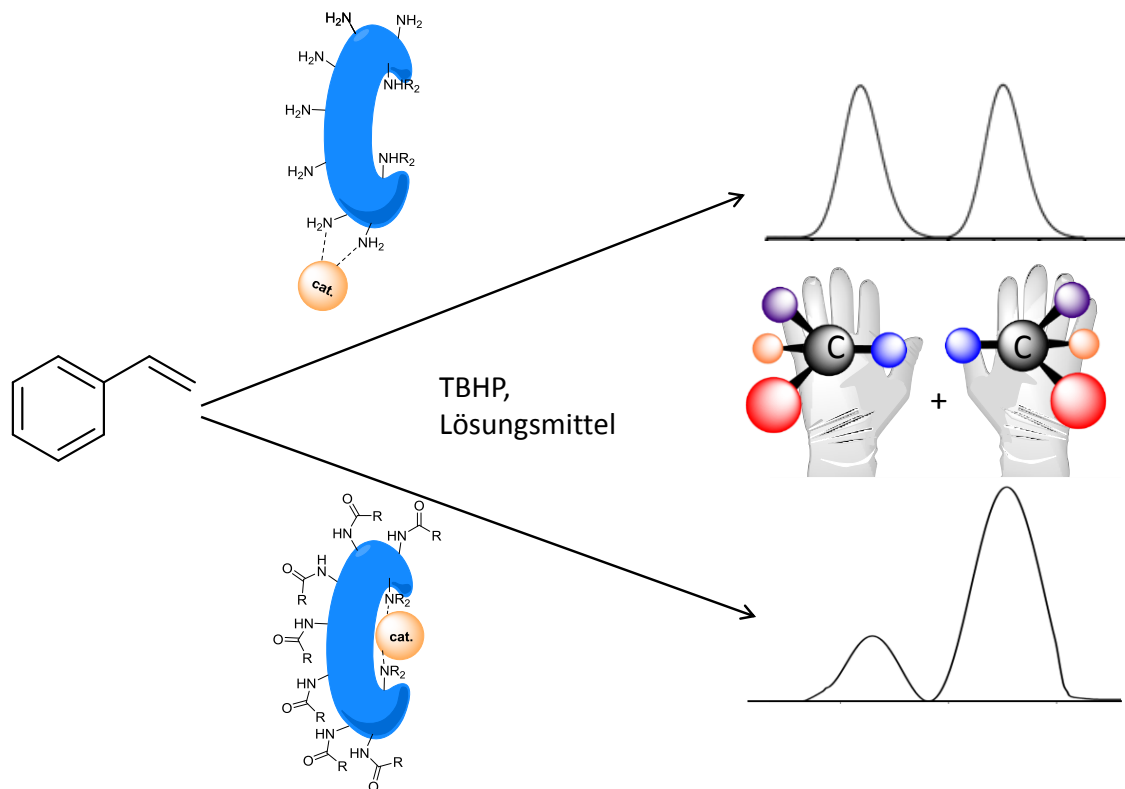


Abb. 4.24: Schematische Darstellung der Strategie zur Generierung selektiver artifizierender Metalloenzyme durch die Blockierung der primären Aminogruppen des Proteins.

In den folgenden Kapiteln wird die Generierung solcher artifizierender Metalloenzyme und deren Anwendung in verschiedenen asymmetrischen, metallkatalysierten Reaktionen näher betrachtet.

#### 4.3.1 Funktionalisierung von Proteinen mittels Anhydriden

Große Teile der Daten dieses Abschnittes wurden in Zusammenarbeit mit Björn Dorn im Rahmen seiner Masterarbeit erhalten<sup>[k]</sup>.

Unterschiedliche Proteine wurden mittels verschiedener Carbonsäureanhydride, in Anlehnung an bekannte Literaturprotokolle zur *N*-Acylierung, im wässrigen Reaktionsmedium funktionalisiert (Abb. 4.25)<sup>219-221</sup>. Ziel war es hier vor allem die leicht zugänglichen primären Aminogruppen an der Oberfläche des Proteins als mögliche Metallbindungsstellen zu blockieren um die Wahrscheinlichkeit einer Einlagerung in weiter innen liegende Bereiche des Biokatalysators zu erhöhen, welche vermutlich eine bessere enantioselektive Steuerung der Katalyse bedingen.

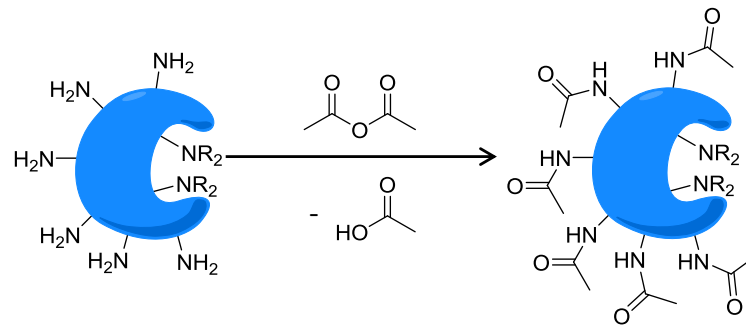


Abb. 4.25: Schematische Darstellung der Funktionalisierung der primären Aminogruppen von Proteinen mittels Anhydriden am Beispiel von Essigsäureanhydrid.

Um den Grad der Funktionalisierung zu bestimmen, wurde ein modifizierter TNBS-Assay nach HABEED durchgeführt<sup>222</sup>. Bei diesem reagiert 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) mit den primären Aminen eines Moleküls zu einem orangenen Produkt, welches photometrisch in einem Wellenlängenbereich von 335 - 345nm detektiert werden kann. Für das native Lysozym ließ sich eine Anzahl freier primärer Aminogruppen von  $4,7 \pm 0,1$  ermitteln. Dieser Wert zeigt gute Übereinstimmung mit der Arbeit von KONIECZNY, welcher einen Wert von  $5,4 \pm 0,8$  ermittelte<sup>17</sup>. Ein Literaturvergleich zeigt, dass Lysozym 6 Lysingruppen plus den N-Terminus besitzt<sup>223</sup>. Im Vergleich zur Literatur weist der Assay eine gewisse Abweichung auf. Zudem wurden Kontrollmessungen mit der Reaktionslösung ohne Vorhandensein des Enzyms durchgeführt um sicherzustellen, dass der Assay nicht durch die Komponenten gestört wird. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die verwendete Methode zur Bestimmung des Funktionalisierungsgrades geeignet ist.

Für die Funktionalisierung wurden wässrige Lösungen von Lysozym mit einer Konzentration von  $c = 1,43 \text{ mg/mL}$  hergestellt. Mit 5 eq. Essigsäureanhydrid (EA) bezogen auf die freien primären Aminogruppen des Lysozyms wurde nach 20 Minuten bei 20 °C ein Funktionalisierungsgrad von 33 % erhalten. Durch eine Verlängerung der Reaktionszeit konnte keine Steigerung des Wertes erreicht werden. Ein Herabsenken der Reaktionstemperatur auf 4 °C resultierte in einer Erhöhung des Funktionalisierungsgrades auf 67 %. Ein wahrscheinlicher Grund hierfür ist, dass die niedrigere Temperatur die Hydrolyse des EA in wässriger Lösung verlangsamt und dieses so länger für eine Reaktion mit dem Enzym zur Verfügung steht. Im Folgenden wurde die Reaktion mit verschiedenen molaren eq. Essigsäureanhydrid durchgeführt. Zum einen reichte die verwendete Stoffmenge von 5 eq. bezogen auf die freien Aminogruppen nicht für eine vollständige Funktionalisierung aus, zum anderen sollte durch die Variation überprüft werden, ob der Funktionalisierungsgrad beliebig eingestellt werden kann. Daher wurde die

Reaktion mit Stoffmengen zwischen 1 und 100 eq. des Anhydrids durchgeführt (Abb. 4.26, Tab. 4.15). Zudem wurden Propan- und Hexansäureanhydrid als zwei weitere Carbonsäureanhydride zur Funktionalisierung eingesetzt.

Tab. 4.15: Funktionalisierungsgrad von Lysozym in Abhängigkeit der verwendeten molaren Äquivalente des Carbonsäureanhydrids pro freier primärer Aminogruppe des Enzyms. EA: Essigsäureanhydrid, PA: Propansäureanhydrid, HA: Hexansäureanhydrid. Daten zu großen Teilen aus DORN<sup>[k]</sup>.

eq. Anhydrid <sup>a</sup>	F <sub>EA</sub> [%]	F <sub>EA</sub> [Aminogruppe] <sup>a</sup>	F <sub>PA</sub> [%]	F <sub>PA</sub> [Aminogruppe] <sup>a</sup>	F <sub>HA</sub> [%]	F <sub>HA</sub> [Aminogruppe] <sup>a</sup>
0	0	0	0	0	0	0
1	27±13	1,9±0,9	31±9	2,2±0,6	42±4	2,9±0,3
2	51±8	3,6±0,5	53±13	3,7±0,9	47±10	3,3±0,7
5	59±12	4,1±0,9	80±4	5,6±0,3	61±25	4,3±1,8
7	64±10	4,4±0,7	84±1	5,9±0,1	82±20	5,7±1,4
10	75±7	5,2±0,5	93±5	6,5±0,4	95±2	6,7±0,1
25	83±10	5,8±1,0	97±10	6,8±0,7	97±8	6,8±0,6
50	95±5	6,7±0,4	99±1	6,9±0,1	98±2	6,9±0,3
100	99±1	6,9±0,1	99±1	6,9±0,1	99±1	6,9±0,1

a: Unter der Annahme, dass Lysozym 7 freie primäre Aminogruppen (6 Lysin + N-Terminus) besitzt<sup>224</sup>.

Eine Verlängerung der Kohlenstoffkette der Anhydride wurde deswegen in Betracht gezogen, da diese einen möglichen Einfluss auf die Löslichkeit bzw. Dispergierbarkeit des Enzyms in organischen Medien haben können und auch auf den Einsatz als artifizielle Metalloenzyme in diesen Medien. Die Durchführung war im Wesentlichen analog zu der mit Essigsäureanhydrid. Lediglich die Reaktion mit Hexansäureanhydrid wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, da sich durch ein Absenken der Temperatur keine höheren Funktionalisierungsgrade erreichen ließen sowie sich zudem das Anhydrid nur schlecht in Wasser suspendieren ließ und somit durch Vortexen des Reaktionsgemisches eine gute Durchmischung sichergestellt wurde. Abb. 4.26 zeigt die Ergebnisse des TNBS-Assays für die verschiedenen Anhydride.

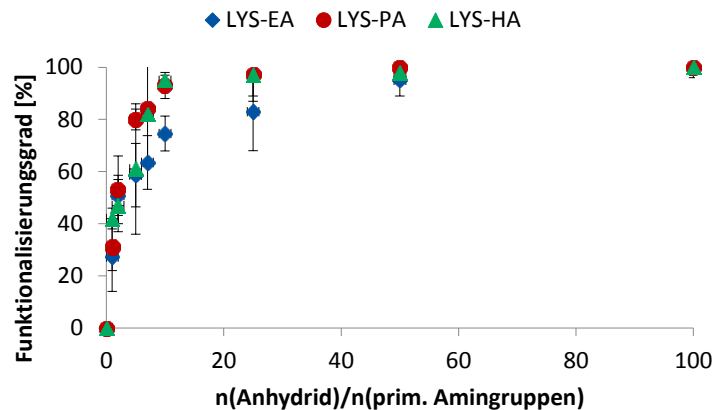


Abb. 4.26: Auftragung des Funktionalisierungsgrades von Lysozym gegen die verwendeten molaren Überschüsse des Anhydrids pro freier primärer Aminogruppe des Enzyms. EA: Essigsäureanhydrid, PA: Propionsäureanhydrid, HA: Hexansäureanhydrid. Daten zu großen Teilen aus Dorn<sup>[k]</sup>.

Es ist zu erkennen, dass ein geringerer Überschuss Propionsäure- und Hexansäureanhydrid eingesetzt werden muss als es bei Essigsäureanhydrid der Fall ist, um ähnliche Funktionalisierungsgrade zu erhalten. So führt beispielsweise die Verwendung von 25 eq. EA zu Funktionalisierungsgraden von  $83 \pm 10\%$ , wohingegen beim Einsatz von PA bzw. HA bereits eine Funktionalisierung von  $97 \pm 10\%$  bzw.  $97 \pm 8\%$  erfolgt. Dies unterstreicht die Vermutung, dass die konkurrierende Hydrolysereaktion bei Essigsäureanhydrid eine wesentlich größere Rolle spielt. Bei der Modifizierung von Lysozym mit Essigsäureanhydrid beträgt die größte Abweichung des Funktionalisierungsgrades bei gegebenen eq. EA ca. 13%. Geht man davon aus, dass Lysozym 7 freie prim. Aminogruppen besitzt, die funktionalisiert werden können, so beträgt die Abweichung lediglich ca.  $\pm 1$  Aminogruppe. Lediglich bei Hexansäureanhydrid beträgt die maximal ermittelte Abweichung ca.  $\pm 2$  Gruppen.

Die erhaltenen Konjugate sind, im Gegensatz zu den Enzym-PMOx-Konjugaten, nicht löslich in organischen Medien, bilden jedoch stabile Suspensionen in verschiedenen Lösungsmitteln, wie z.B. Chloroform oder Toluol. Hierbei ist optisch zu erkennen, dass mit sinkender Polarität des Lösungsmittels die Trübung des Gemisches tendenziell abnimmt. Dies führt zu der Vermutung, dass die Partikelgröße sinkt. Um dies näher zu betrachten, wurde die Größe der Teilchen mittels DLS-Messungen bestimmt.

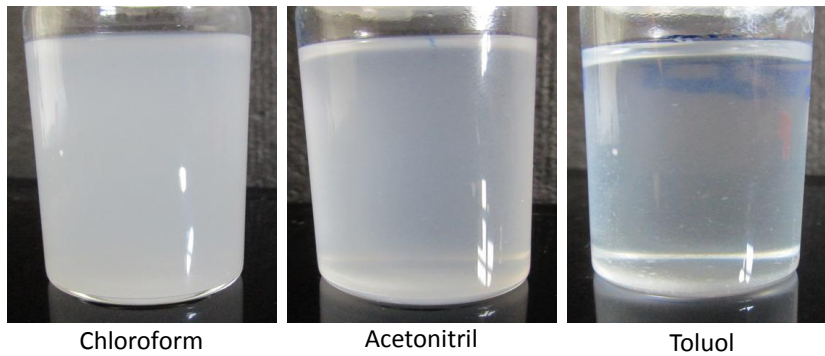


Abb. 4.27: Fotos von 1,43 mg Lysozym-EA in 5 mL verschiedener Lösungsmittel; links: Chloroform, mitte: Acetonitril, rechts: Toluol.

Die DLS-Messungen mit acyliertem Lysozym in Toluol zeigen, dass die Größe der sich in diesem Lösungsmittel bildenden Aggregate in der Reihenfolge LYS-EA (4-6  $\mu\text{m}$ )>LYS-PA (1-2  $\mu\text{m}$ )>LYS-HA (0,5 – 0,8  $\mu\text{m}$ ) abnimmt (Abb. 4.28). In Chloroform konnten dagegen keine Partikel mittels DLS detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass sich Aggregate bilden, welche größer als 10  $\mu\text{m}$  sind, was dem Detektionsmaximum entspricht.

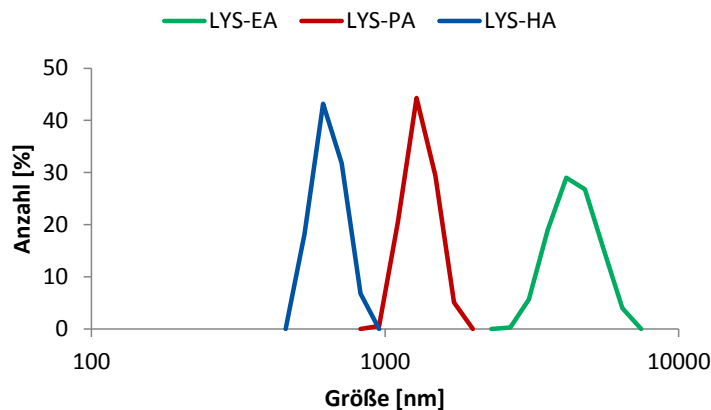


Abb. 4.28: DLS-Messungen von 4,2 mg acyliertem Lysozym in Toluol. EA: Essigsäureanhydrid, PA: Propansäureanhydrid, HA: Hexansäureanhydrid.

Dies stimmt mit der Erwartung überein, dass sich in unpolaren Lösungsmitteln wie Toluol feinere Dispersionen der Konjugate bilden sollten, da durch die Modifikationen eine unpolare Kohlenstoffkette ins Enzym eingeführt wird. Ebenso sinkt die Größe der Partikel erwartungsgemäß hin zu einer längeren unpolaren Gruppe.

Neben Lysozym konnte auch BSA erfolgreich unter Einsatz von Carbonsäureanhydriden funktionalisiert werden. Im Vergleich zum Lysozym (14,3 kDa<sup>224</sup>) ist BSA (66,4 kDa<sup>225</sup>) ein deutlich größeres Protein und besitzt 61 Aminogruppen die prinzipiell funktionalisiert werden können. In Tab. 4.16 ist beispielhaft für BSA-EA der Funktionalisierungsgrad bzw. die Anzahl funktionalisierter prim. Aminogruppen in Abhängigkeit des molaren Überschusses EA bezogen auf die freien prim. Aminogruppen des Proteins dargestellt.

Tab. 4.16: Funktionalisierungsgrad von BSA in Abhängigkeit der verwendeten molaren Äquivalente Essigsäureanhydrid (EA) pro freier primärer Aminogruppe des Enzyms. Daten zu großen Teilen aus Dorn<sup>[k]</sup>.

eq. Anhydrid <sup>a</sup>	F <sub>EA</sub> [%]	F <sub>EA</sub> [Aminogruppe] <sup>a</sup>
0	0	0
1	20±11	12±7
2	27±11	16±7
5	42±15	26±9
7	51±14	31±9
10	64±22	39±13
15	73±13	45±8
20	80±6	49±4
50	93±6	57±4
100	100	61

a: Unter der Annahme, dass BSA 61 freie primäre Aminogruppen (60 Lysin + N-Terminus) besitzt<sup>225</sup>.

Die Abweichung bezogen auf die Aminogruppen ist bei BSA deutlich größer als bei Lysozym, was zum Teil durch die deutlich höhere Anzahl dieser Gruppen und eine vermutlich teilweise schlechtere Zugänglichkeit dieser aufgrund der Molekülgröße und Struktur begründet sein kann. So entspricht die Abweichung, bezogen auf die Aminogruppen, bei einer Abweichung von beispielsweise 22 % hier etwa 13 Gruppen. Gezielt eine bestimmte Anzahl an Gruppen zu blockieren stellt sich daher als schwieriger dar bei größeren Proteinen.

In Abb. 4.29 ist die Funktionalisierungskurve von BSA mit EA dargestellt. Die Steigung der Kurve hin zu höheren prozentualen Funktionalisierungsgraden ist deutlich flacher, als diejenige von Lysozym (Abb. 4.26). Generell musste bei BSA, insbesondere bei geringen Funktionalisierungsgraden, ein höherer Überschuss im Vergleich zum Lysozym zugeführt werden, um eine ähnlich hohe prozentuale Funktionalisierung zu erreichen. Es wird vermutet, dass die Zugänglichkeit einiger Gruppen aufgrund der räumlichen Struktur von BSA geringer ist und somit die parallel ablaufende Hydrolyse des Anhydrids insgesamt einen größeren Einfluss hat.

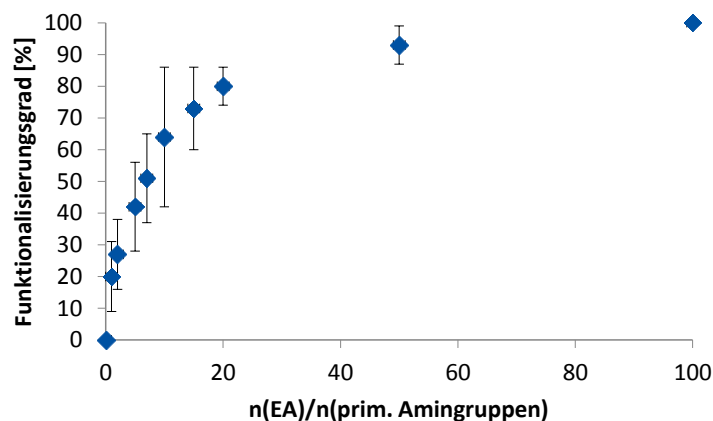


Abb. 4.29: Auftragung des Funktionalisierungsgrades von BSA gegen die verwendeten molaren Überschüsse von Essigsäureanhydrid (EA) pro freier primärer Aminogruppe des Enzyms. Daten zu großen Teilen aus Dorn<sup>[k]</sup>.

Zusätzlich zu den bereits dargestellten Proteinen konnten mit dieser Methode auch einige weitere Enzyme erfolgreich und reproduzierbar vollständig modifiziert werden. Dazu gehören verschiedene Lipasen (CaLB, RML, CRL) sowie Laccase aus *trametes vesicolor*.

Somit ist es gelungen, eine Modifizierungsstrategie für die freien prim. Aminogruppen von diversen Proteinen für den Einsatz als artifizielle Metalloenzyme in organischen Lösungsmitteln zu finden, welche deutlich weniger zeitaufwendig ist als die zuvor durchgeführte Modifikation mit POx. So konnte die Dauer von der Polymersynthese bis zum fertigen Konjugat von bis zu ca. 2 Wochen auf 2 Tage reduziert werden, was einer Zeitersparnis von etwa 85 % entspricht. Zudem kann die Modifizierung der Proteine vollständig im wässrigen Medium erfolgen und es werden keine organischen Kosolventien benötigt. Ein weiterer wichtiger Vorteil dieser Methode ist es, dass der Funktionalisierungsgrad über einen weiten Bereich selektiv eingestellt wer-



den kann und gezielt und reproduzierbar ein Funktionalisierungsgrad von 100 % erreicht werden kann.

#### 4.3.2 Asymmetrische Dihydroxylierung mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten

Teile der Ergebnisse dieses Abschnittes wurden in Zusammenarbeit mit Björn Dorn im Rahmen seiner Masterarbeit gewonnen<sup>[k]</sup>.

Die gemäß Kapitel 4.3.1 synthetisierten funktionalisierten LYS wurden zunächst in der etablierten asymmetrischen Dihydroxylierung mit Osmat mit einem MPV von eins eingesetzt. Es ist literaturbekannt, dass die Aktivität von Enzymen im organischen Medium stark vom Protonierungsgrad des Proteins abhängt<sup>9</sup>. Dieser kann in wässriger Umgebung eingestellt werden und bleibt, nach Trocknung des Enzyms, auch im organischen Medium erhalten (*pH-Memory*). Daher wurden die mit verschiedenen Modifikationsgraden acylierten LYS auf unterschiedliche pH-Werte (pH 6,3; 7,0; und 8,4) eingestellt und lyophilisiert. Anschließend wurden die Konjugate in Chloroform suspendiert, Osmat wurde hinzugefügt und nach 30 min, wurden das Edukt Styrol sowie TBHP zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 7 d bei 0 °C wurde das erhaltene Produkt mittels HPLC hinsichtlich Ausbeute und Enantiomerenüberschuss untersucht. Für das unmodifizierte LYS konnte kein Produktumsatz detektiert werden (Tab. 4.17).

Tab. 4.17: *ee* (*S*-Enantiomer) TON und TOF der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-LYS-EA mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden und einem MPV von 1 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol für 7 d bei 0 °C in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h. Daten zu großen Teilen Reproduktionen aus Dorn<sup>[k]</sup>.

F [%]	pH	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [ $\text{h}^{-1}$ ]
99	6,7	28	43	0,3
99	7,1	47	63	0,4
99	8,5	33	60	0,4
57	6,3	40	38	0,2
57	7,0	47	60	0,4
57	8,4	0	3	0,0
23	6,2	14	70	0,4
23	7,1	40	30	0,2
23	8,4	20	23	0,1
0	7,0	-	0	0

Im Gegensatz dazu führt die Verwendung der modifizierten Lysozyme zu signifikanten Umsätzen (Abb. 4.30). Bei allen Derivaten wird hierbei das (*S*)-Enantiomer von 1,2-Phenylethandiol bevorzugt gebildet.

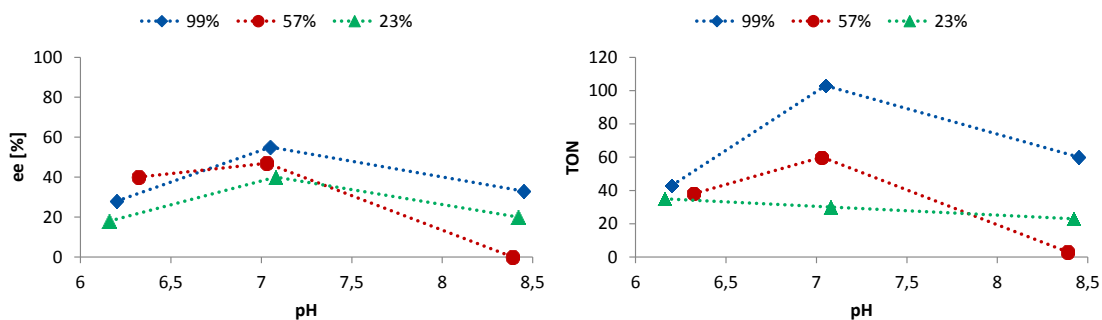


Abb. 4.30: Auftragung des *ee* (*S*-Enantiomer) bzw. der TON gegen den vor der Gefriertrocknung eingestellten pH-Wert der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-LYS-AA mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden und einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol für 7 d bei 0°C in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Funktionalisierungsgrade des Proteins: blau 99 %, rot 57 %, grün 23 %. Daten zu großen Teilen Reproduktionen aus Dorn<sup>[k]</sup>.

Wie in Abb. 4.30 zu erkennen ist wird die höchste Aktivität bzw. Selektivität bei pH 7 erreicht. Zudem steigen beide Größen ebenfalls mit steigendem Funktionalisierungsgrad des LYS an. Diese Beobachtung stimmt mit der Erwartung überein, dass die Blockierung der primären Aminogruppen dazu führt, dass sich das Metall in einer chiralen Region des Proteins anlagert und dies somit zu einer selektiveren Produktbildung führt.

Auch unter Verwendung von LYS-PA und LYS-HA zeigt sich, dass die vollständige Modifizierung und ein pH-Wert von 7 zu den höchsten Enantiomerenüberschüssen führen (Tab. 4.18).

Tab. 4.18: *ee* (*(S)*-Enantiomer), TON und TOF der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-LYS-PA und Osmat-LYS-HA mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden und einem MPV von 1 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol für 7 d bei 0 °C in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

	F [%]	pH	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [ $\text{h}^{-1}$ ]
LYS-PA	99	6,2	84	46	0,3
	99	7,1	94	85	0,5
	99	8,3	90	66	0,4
	55	6,2	83	137	0,8
	55	7,0	72	262	1,6
	55	8,4	76	174	1,0
LYS-HA	99	6,2	80	228	1,4
	99	7,0	98	289	1,7
	99	8,5	80	148	0,9
	49	6,2	78	278	1,7
	49	7,0	80	336	2,0
	49	8,3	48	351	2,1

Aus den zuvor dargelegten Gründen wurden alle weiteren Untersuchungen mit vollständig modifiziertem Protein, welches auf pH 7 eingestellt wurde, durchgeführt. Zunächst wurde das mit EA, PA sowie HA funktionalisierte Lysozym mit Osmat komplexiert und auf die Eignung als artifizielles Metalloenzym für die Dihydroxylierung von Styrol untersucht (Tab. 4.19).

Tab. 4.19: *ee* (*S*-Enantiomer), TON, TOF und Ausbeute bei der Dihydroxylierung von Styrol bei verschiedenen Temperaturen mit vollständig acylierten Osmat-LYS-Komplexen (pH 7) mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in Chloroform durchgeführt. Die Reaktionszeiten wurden gemäß vorheriger Untersuchungen mit Osmat-Laccase-PMOx gewählt und betragen bei 0 °C 7 d, bei 20 °C 3 d und bei 40 °C 1 d. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

AME	T [°C]	t [h]	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [ $\text{h}^{-1}$ ]	Ausbeute [%]
LYS	0 °C	168	-	0	0	0
LYS-EA	0 °C	168	57 $\pm$ 2	103 $\pm$ 10	0,6 $\pm$ 0,06	3 $\pm$ 0,3
LYS-PA	0 °C	168	94 $\pm$ 3	85 $\pm$ 9	0,5 $\pm$ 0,05	2 $\pm$ 0,2
LYS-HA	0 °C	168	98 $\pm$ 3	289 $\pm$ 29	2 $\pm$ 0,2	9 $\pm$ 0,9
LYS-EA	20	72	38 $\pm$ 1	166 $\pm$ 17	3 $\pm$ 0,3	5 $\pm$ 0,5
LYS-PA	20	72	85 $\pm$ 3	104 $\pm$ 10	1 $\pm$ 0,1	3 $\pm$ 0,3
LYS-HA	20	72	88 $\pm$ 3	264 $\pm$ 26	4 $\pm$ 0,4	8 $\pm$ 0,8
LYS-PA	40	24	40 $\pm$ 1	122 $\pm$ 12	5 $\pm$ 0,5	4 $\pm$ 0,4
LYS-HA	40	24	32 $\pm$ 1	390 $\pm$ 39	16 $\pm$ 1,6	11 $\pm$ 1

Ein Blick auf Abb. 4.31 zeigt, dass die höchste Enantioselektivität mit etwa 98 % *ee* mit vollständig Hexansäure-funktionalisiertem Lysozym bei einer Reaktionstemperatur von 0 °C erhalten wird.

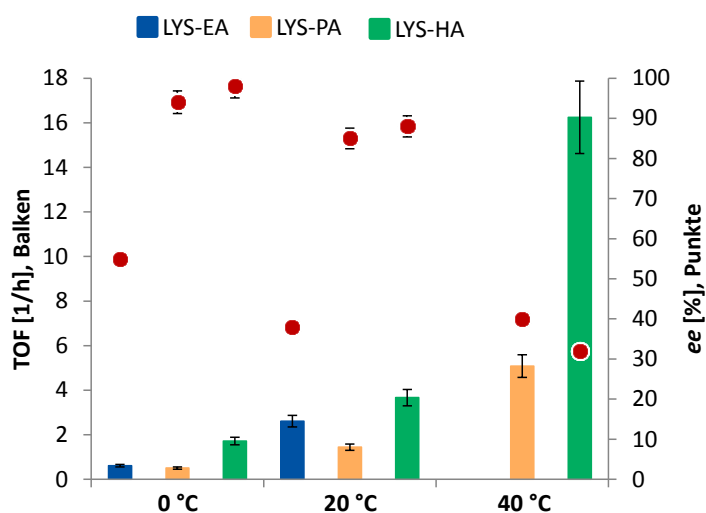


Abb. 4.31: Auftragung des *ee* (*S*-Enantiomer) bzw. der TOF bei der Dihydroxylierung von Styrol bei verschiedenen Temperaturen mit vollständig acylierten Osmat-LYS-Komplexen (pH 7) mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in Chloroform durchgeführt. Die Reaktionszeiten wurden gemäß vorheriger Untersuchungen mit Osmat-Laccase-PMOx gewählt und betragen bei 0 °C 7 d, bei 20 °C 3 d und bei 40 °C 1 d. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

Das propionylierte LYS zeigt ebenfalls mit 95 % *ee* eine hoch enantioselektive Reaktion, jedoch mit 4-fach geringerer Aktivität. Im Vergleich zu den zuvor genannten Komplexen zeigt der Osmat-LYS-EA Komplex mit einer TOF von  $0,6 \text{ h}^{-1}$  und einem *ee* von 57 % insgesamt die schlechteste Leistung als asymmetrischer Katalysator für die Dihydroxylierung von Styrol.

Wird die Reaktionstemperatur auf 20 °C erhöht, steigt erwartungsgemäß die Aktivität um einen Faktor 2-5 an. Hierbei zeigen Osmat-LYS-PA und Osmat-LYS-HA noch gute Enantioselektivitäten von 88 bzw. 85 % *ee*. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 40 °C führt wiederum zu einer starken Erhöhung der TOF, jedoch sinkt der Enantiomerenüberschuss in allen Fällen unter 40 %. Somit sind in diesem Fall Temperaturen bis maximal 20 °C für eine selektive Produktbildung möglich.

Die gleichen Experimente wurden mit vollständig acyliertem BSA durchgeführt (Abb. 4.32, Tab. 4.20). Der ermittelte optimale pH-Wert vor der Lyophilisierung aus wässriger Lösung beträgt hierbei ebenfalls 7,0.

Tab. 4.20: *ee* (*S*-Enantiomer), TON, TOF und Ausbeute bei der Dihydroxylierung von Styrol bei verschiedenen Temperaturen mit vollständig acylierten Osmat-BSA-Komplexen (pH 7) mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in Chloroform durchgeführt. Die Reaktionszeiten wurden gemäß vorheriger Untersuchungen mit Osmat-Laccase-PMOx gewählt und betragen bei 0 °C 7 d, bei 20 °C 3 d und bei 40 °C 1 d. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

AME	T [°C]	t [h]	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [ $\text{h}^{-1}$ ]	Ausbeute [%]
BSA	0 °C	168	-	0	0 $\pm$	0
BSA-AA	0 °C	168	73 $\pm$ 2	146 $\pm$ 15	0,9 $\pm$ 0,09	4 $\pm$ 0,4
BSA-PA	0 °C	168	94 $\pm$ 3	136 $\pm$ 14	0,8 $\pm$ 0,08	4 $\pm$ 0,4
BSA-HA	0 °C	168	25 $\pm$ 1	20 $\pm$ 2	0,1 $\pm$ 0,01	1 $\pm$ 0,1
BSA-AA	RT	72	80 $\pm$ 2	275 $\pm$ 28	4 $\pm$ 0,4	8 $\pm$ 0,8
BSA-PA	RT	72	76 $\pm$ 2	143 $\pm$ 14	2 $\pm$ 0,2	4 $\pm$ 0,4
BSA-HA	RT	72	0	54 $\pm$ 5	0,7 $\pm$ 0,07	2 $\pm$ 0,2
BSA-AA	40	24	62 $\pm$ 2	297 $\pm$ 30	12 $\pm$ 1,2	9 $\pm$ 0,9
BSA-PA	40	24	39 $\pm$ 1	250 $\pm$ 25	10 $\pm$ 1,0	8 $\pm$ 0,8
BSA-AA	50	24	30 $\pm$ 1	390 $\pm$ 39	16 $\pm$ 1,6	12 $\pm$ 1,2

Die Verwendung des Osmat-BSA-Komplexes mit unmodifiziertem BSA führt nicht zu einer Produktbildung innerhalb der Nachweisgrenze der HPLC-Analytik. Im Gegensatz zu Lysozym zeigt das acetylierte Osmat-BSA die höchste Aktivität (TOF 0,9  $\text{h}^{-1}$ , TON von 275 nach 7 d bei 0°C) mit 73 % *ee* für das (*S*)-Enantiomer. Im Fall des Osmat-BSA-HA ist die Produktbildung kaum selektiv (25 % *ee* bei 0 °C), während die Verwendung von Osmat-BSA-PA zu einem Enantiomerenüberschuss von 94 % führt. Eine Temperaturerhöhung auf 20 °C führt, wie bereits bei den Osmat-LYS-Komplexen, zu erhöhten TOF und im Fall von BSA-PA und BSA-EA ist die Selektivität mit einem Bereich zwischen 76 und 80 % *ee* immer noch hoch. Bemerkenswerterweise zeigt Osmat-BSA-AA auch noch Enantiomerenüberschüsse von über 60 % bei 40 °C.

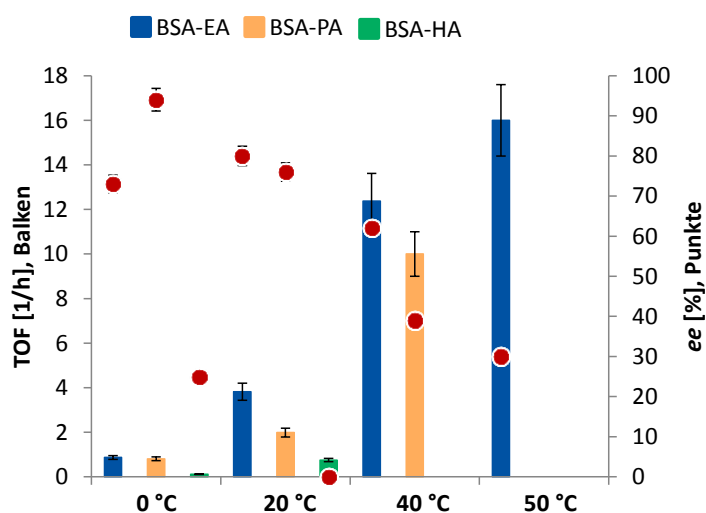


Abb. 4.32: Auftragung des *ee* (*S*-Enantiomer) bzw. der TOF bei der Dihydroxylierung von Styrol bei verschiedenen Temperaturen mit vollständig acylierten Osmat-BSA-Komplexen (pH 7) mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in Chloroform durchgeführt. Die Reaktionszeiten wurden gemäß vorheriger Untersuchungen mit Osmat-Laccase-PMOx gewählt und betragen bei 0 °C 7 d, bei 20 °C 3 d und bei 40 °C 1 d. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier erreichten Enantioselektivitäten von bis zu 98 % *ee* mit anderen artifiziellen Metalloenzymen für die asymmetrische Dihydroxylierung vergleichbar sind. Dies zeigt, dass sich durch die simple Acylierung von günstigen, kommerziell erhältlichen Proteinen und deren anschließende Komplexierung mit Osmat artifizielle Metalloenzyme für die Dihydroxylierung von Styrol im organischen Medium herstellen lassen. Die Aktivität und Enantioselektivität hängt hierbei sowohl vom verwendeten Protein als auch von dem zur Funktionalisierung herangezogenen Carbonsäureanhydrid ab. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist zudem bei höheren Temperaturen im Hinblick auf die Enantioselektivität der Reaktion funktionalisiertes Osmat-BSA stabiler als Osmat-LYS.

Wie zuvor bereits bei den mit PMOx funktionalisierten artifiziellen Metalloenzymen gezeigt wurde, spielt das Lösungsmittel eine große Rolle für die Enzymselektivität und -aktivität. Daher wurden mit acyliertem Osmat-LYS ebenfalls Experimente in Toluol durchgeführt (Tab. 4.21).



Tab. 4.21: Erhaltene *ee* (*S*-Enantiomer), TON, TOF und Ausbeute bei der Dihydroxylierung von Styrol 0 °C mit vollständig acylierten Osmat-LYS-Komplexen (pH 7) mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  für 7 d Styrol in Toluol durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

AME	Lösungsmittel	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [ $\text{h}^{-1}$ ]	Ausbeute [%]
LYS-AA	Toluol	30 $\pm$ 1	219 $\pm$ 22	1,5 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,7
LYS-PA	Toluol	18 $\pm$ 1	292 $\pm$ 30	1,8 $\pm$ 0,2	8 $\pm$ 0,8
LYS-HA	Toluol	23 $\pm$ 1	220 $\pm$ 22	2,3 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,7

Es zeigt sich, dass die Aktivität aller drei Enzym-Komplexe im Bereich von Osmat-LYS-AA in Chloroform liegen, welches dort die höchste Aktivität zeigt. Allerdings sinkt die Enantioselektivität in allen Fällen unter 30 % *ee* (*S*-Enantiomer, Abb. 4.33). Dies unterstreicht noch einmal die große Bedeutung der Wahl eines geeigneten Lösungsmittels für die Verwendung von künstlichen Metalloenzymen im organischen Medium.

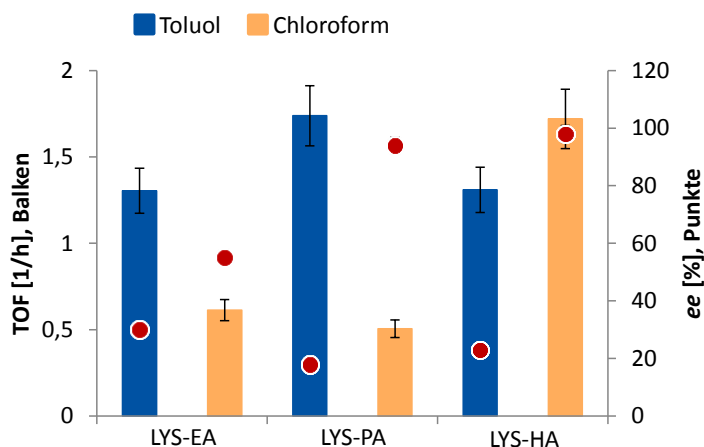


Abb. 4.33: Auftragung des *ee* (*S*-Enantiomer) bzw. der TOF bei der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-LYS-Komplexen mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol für 7 d bei 0 °C in Chloroform oder Toluol durchgeführt. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

Zusätzlich wurden verschiedene Osmat-Lipase-EA-Konjugate als AMEs in der asymmetrischen Dihydroxylierung eingesetzt (Tab. 4.22). Hierbei wurde, mit Ausnahme von Os-RML-EA, im Gegensatz zu LYS- und BSA-Komplexen das (*R*)-Enantiomer erhalten. Dies zeigt, dass sich das bevorzugt gebildete Enantiomer prinzipiell durch die Wahl des AMEs steuern lässt. Unter Verwendung von Os-CaLB-EA wird beispielsweise ein *ee* von 43 % (*R*) mit einer TON von 32 erhalten. Zusätzlich wurde auch die geträgerte CalB (ehemals Novozym 435) in ihrer funktionalisierten Form eingesetzt, ohne jedoch den genauen Funktionalisierungsgrad zu kennen. Dieser konnte mit dem verwendeten Assay nicht bestimmt werden. Die Ergebnisse zeigen ein nahezu identisches Bild und sowohl der *ee* als auch die Umsatzzahlen sind fast identisch. Vergleicht man dagegen Os-RML-EA (Proteingehalt 3% ± 0, 1%) mit ihrer geträgerten Form, so kann eine Steigerung der Aktivität und Selektivität des Katalysatorsystems beobachtet werden (Tab. 4.22). Im Allgemeinen kann jedoch festgestellt werden, dass die Lipasen im Vergleich zu LYS- und BSA-Komplexen nur mäßige *ee* und TON aufweisen, jedoch die Möglichkeit bieten, auch das (*R*)-Enantiomer bevorzugt herstellen zu können.

Tab. 4.22: Vergleich des *ee*, der TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol mittels vollständig acylierter Osmat-Lipase-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei 0 °C für 7 d. Die Reaktion wurde mit 0,03 µmol/mL Protein-Konjugat, 0,03 µmol/mL K<sub>2</sub>OsO<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub>, 110 µmol/mL TBHP und 100 µmol/mL Styrol in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein pro h. Daten in Teilen Reproduktionen aus Dorn<sup>[k]</sup>.

Konjugat	Modifizierte Gruppen	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [h <sup>-1</sup> ]
CaLB-EA	10 (>99 %)	43 ( <i>R</i> )	32	0,2
Novozym 435-EA	nb	44 ( <i>R</i> )	34	0,2
CRL-EA	20 (95 %)	32 ( <i>R</i> )	35	0,2
RML-EA	5 (60%)	45 ( <i>S</i> )	9	0,1
RML(on immovead)-EA	nb	57 ( <i>S</i> )	40	0,2

Zur Erweiterung des Eduktspektrums wurden schließlich eine Reihe weiterer Substrate eingesetzt. Hierzu wurde zunächst der Osmat-LYS-HA-Komplex, welcher die höchste Aktivität und

Selektivität bei der Dihydroxylierung von Styrol zeigt, verwendet (Tab. 4.23). Als Reaktionstemperatur wurde 20 °C gewählt.

Tab. 4.23: Vergleich des des *ee*, der TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels vollständig acylierter Osmat-Protein-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 mit verschiedenen Alkenen bei 20 °C für 3 d. Die Reaktion wurde mit 0,03 µmol/mL Lysozym-Konjugat, 0,03 µmol/mL  $K_2OsO_2(OH)_4$ , 110 µmol/mL TBHP und 100 µmol/mL Alken in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein pro h. 1H-Inden und Allylphenylether werden von beiden artifiziellen Enzymen nicht umgesetzt.

Konjugat	Alken	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [h <sup>-1</sup> ]	Ausbeute [%]
LYS-HA	4-Chlorstyrol	50	112	1,5	3,4
LYS-HA	4-Methylstyrol	43	20	0,3	0,6
LYS-HA	α-Methylstyrol	31	3	0,04	0,09
BSA-EA	4-Chlorostyrol	51	55	0,8	1,7
BSA-EA	4-Methylstyrol	90	108	1,5	3,3
BSA-EA	α-Methylstyrol	26	5	0,06	0,1

Wie Tab. 4.23 zeigt, katalysiert dieses künstliche Metalloenzym die Dihydroxylierung von 4-Chlorostyrol, 4-Methylstyrol und α-Methylstyrol. 1H-Inden und Allylphenylether werden dagegen nicht umgesetzt.

Die Enantioselektivität der Umsetzung von 4-Chlorostyrol ist mit 50 % *ee* signifikant niedriger als die von Styrol (85 % *ee*). 4-Methylstyrol und α-Methylstyrol werden mit geringeren Umsätzen gebildet und es kann kaum eine enantioselektive Steuerung beobachtet werden.

Bei der Durchführung der Reaktionen mit Osmat-BSA-AA wird ein ähnliches Bild erhalten. Lediglich die Dihydroxylierung von 4-Methylstyrol verläuft mit einer 5-fach höheren TON und 90 % *ee*. Diese Ergebnisse sowie die Tatsache, dass Osmat-Laccase-PMOx eine unterschiedliche Substratselektivität (vgl. Kapitel 4.1.2) zeigt, unterstreichen die starke Rolle, die die Art des Proteins für den katalytischen Prozess zu spielen scheint. Letztere katalysiert beispielsweise die Dihydroxylierung von 1H-Inden (TON = 5,2 nach 7 d bei 0 °C, 71 % *ee* (1*R*, 2*S*)) und Al-

lylphenylether (TON = 1,2 nach 7 d bei 0 °C, 87 % *ee* (*R*)), jedoch wurde kein Umsatz für 4-Methylstyrol sowie  $\alpha$ -Methylstyrol gefunden. Diese hohe Substratselektivität der AMEs könnte z.B. nützlich sein für die Trennung von Produktgemischen verschiedener Styrolerivate.

Alles in allem konnte gezeigt werden, dass das zuvor erläuterte Konzept der Generierung selektiver AMEs durch die Blockierung der freien primären Aminogruppen des Proteins sich in diesem Fall bestätigt. Dies eröffnet ein großes Potential auf einfache Weise hochaktive und -selektive AMEs als Katalysatoren aus natürlichen Quellen für unterschiedliche Reaktionen zu erhalten.

### 4.3.3 Asymmetrische Epoxidierung mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten

Teilbereiche der Ergebnisse dieses Abschnittes wurden in gemeinsam mit Magiliny Manisegaran im Rahmen ihres Vertiefungspraktikums erarbeitet<sup>[1]</sup>.

Um das Konzept der Verwendung von acylierten Enzymen als artifizielle Metalloenzyme auf andere asymmetrische Reaktionen zu erweitern, wurden die Proteine mit katalytisch aktiven Metallkomplexen, welche sich zur Epoxidierung von Alkenen eignen, konjugiert. Die erhaltenen Epoxide bieten ferner die Möglichkeit, sie zu Alkoholen, Diolen, Ethern und weiteren Verbindungen umzusetzen, weshalb die asymmetrische Epoxidierung in der organischen Chemie, insbesondere auch der Naturstoffsynthese, eine unverzichtbare Basisreaktion darstellt. Zur Konjugation mit den acylierten Proteinen wurden Ti-, Mn- sowie Ru-basierte Metallspezies als mögliche geeignete Katalysatorsysteme durch Literaturrecherche identifiziert<sup>226-232</sup>. Die Verwendung von Ti-Spezies ist vor allem aus der asymmetrischen Epoxidierung nach SHARPLESS<sup>233</sup> bekannt, während die JACOBSEN-KATUSKI-Epoxidierung auf Mn-Salen-Komplexen beruht<sup>234</sup>. Auch die Anwendung von Ru-Komplexen als metallbasierte Katalysatorsysteme ist literaturbekannt<sup>235</sup>. Allen Methoden gemein ist die Notwendigkeit eines Oxidationsmittels, wie beispielsweise TBHP oder NOCl, in mindestens stöchiometrischer Menge bezogen auf das Alken. Häufig werden die Reaktionen in Dichlormethan durchgeführt. Abb. 4.34 zeigt das allgemeine Reaktionsschema der metallkatalysierten Epoxidierung mit TBHP als Oxidationsmittel am Beispiel von Styrol.

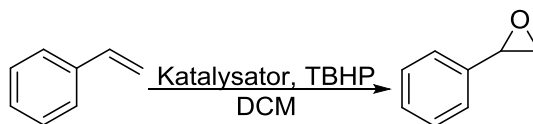


Abb. 4.34: Reaktionsschema der asymmetrischen metallkatalysierten Epoxidierung am Beispiel von Styrol.

Um diese Reaktion mit AMEs durchzuführen, wurden zunächst vollständig acyliertes LYS und BSA mit einem MPV von 1 verwendet. Diese wurden analog zur Dihydroxylierung zuvor auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Die Reaktion wurde in Dichlormethan durchgeführt. Voruntersuchungen zeigten, dass die höchste Aktivität der artifiziiellen Metalloenzyme unter Verwendung von  $\text{RuCl}_3$  als Katalysator erreicht wird. Daher werden diese Ergebnisse an dieser Stelle zuerst diskutiert.

Um eine Aussage über die benötigte Reaktionszeit treffen zu können, wurde die Kinetik der Epoxidierung von Styrol mit Ru-LYS-EA bei 0 °C, 20 °C und 40 °C gemessen. Wie in Abb. 4.35 zu sehen ist, steigt die TON bei 0 °C linear über die gesamte Reaktionszeit von 7 d an. Es resultiert eine TON von 500, was einem Umsatz von 16 % des Styrols zum Epoxid entspricht. Die Enantioselektivität ist hierbei mit 95 % *ee* für das (*R*)-Enantiomer (vgl. Abb. 4.36) sehr hoch. Eine Erhöhung der Temperatur auf 20 °C führt zu einem steileren Anstieg der Kurve, jedoch ist die Produktbildung nach 3 d beendet. Die erreichte TON ist mit 749 (22 % Ausbeute) erwartungsgemäß höher, jedoch sinkt die Enantioselektivität auf 63 % *ee*.

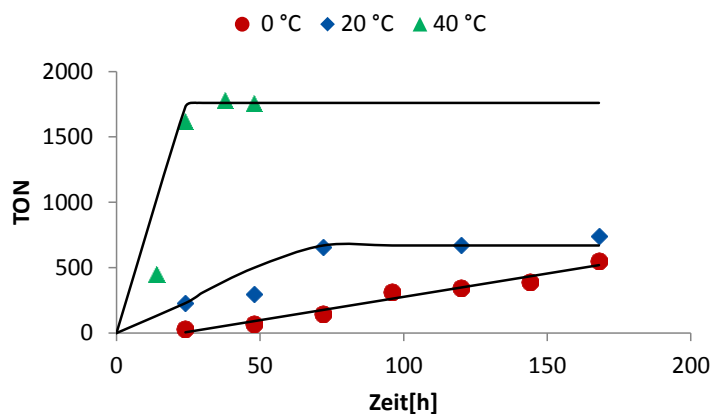


Abb. 4.35: Auftragung der TON gegen die Zeit der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-LYS-EA-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeföhrt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein.

Bei 40 °C verdoppelt sich die erreichte Produktausbeute annähernd bei einer erneuten Verringerung der Reaktionszeit (47 % innerhalb eines Tages) einhergehend mit einem Verlust des *ee* auf 50 %. Dies deutet darauf hin, dass das generierte aktive Zentrum des künstlichen Metalloenzymes im Verlauf der Reaktion verändert wird. Diese Beobachtung wurde auch bereits bei der Dihydroxylierung von Styrol mittels Osmat-Laccase-PMOx gemacht. Bemerkenswert ist zudem, dass sich die gemessenen Enantiomerenüberschüsse über die gesamte Reaktionszeit nicht signifikant verändern (Tab. 4.24).

Tab. 4.24: Vergleich der TON sowie *ee* (*R*-Enantiomer) der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-LYS-EA-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Die maximal ermittelte Standardabweichung des *ee* beträgt 4,4 %.

	Zeit	14 h	24 h	38 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
<b><u>T = 40 °C</u></b>	<b>TON</b>	447	1624	1785	1762					
	<b><i>ee</i> [%]</b>	47	50	49	47					
<b><u>T = 20 °C</u></b>	<b>TON</b>		229		300	658		670		742
	<b><i>ee</i> [%]</b>		60		68	63		65		67
<b><u>T = 0 °C</u></b>	<b>TON</b>		28		70	148	313	342	392	549
	<b><i>ee</i> [%]</b>		99		95	97	97	99	95	95

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden die Reaktionszeiten für alle folgenden Untersuchungen wie folgt festgelegt: 7 d bei 0 °C, 3 d bei 20 °C und 1 d bei 40 °C.

Wird die Epoxidierung von Styrol mittels funktionalisierter Ru-LYS betrachtet, so zeigt sich, dass die Aktivität des artifiziellen Enzyms in der Reihenfolge LYS, LYS-HA, LYS-PA, LYS-AA steigt (Tab. 4.25, Abb. 4.36, links).

Tab. 4.25: *ee* (*(R)*-Enantiomer), TON, TOF und Ausbeuten der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-LYS-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen 7 d bei 0 °C, 3 d bei 20 °C und 1 d bei 40 °C und 50 °C. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

AME	T [°C]	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [ $\text{h}^{-1}$ ]	Ausbeute [%]
LYS-AA	0	95±4	520±52	3±0,3	16±2
LYS	20	10±1	361±36	5±0,5	11±1
LYS-AA	20	63±3	749±75	10±1	22±2
LYS-PA	20	74±3	561±56	8±0,8	17±2
LYS-HA	20	56±2	449±45	6±0,6	13±1
LYS-AA	40	50±2	1545±155	64±6	46±5
LYS-PA	40	41±2	41±4	1±0,1	2±0,2
LYS-EA	50	30±1	1535±154	64±6	46±5

In allen Fällen wird zudem die (*R*)-Konformation des erhaltenen Epoxids bevorzugt gebildet. Das unmodifizierte Ru-LYS zeigt hierbei mit einer TOF von 5 (TON = 361) eine verhältnismäßig hohe Aktivität, jedoch verläuft die Produktbildung kaum enantioselektiv (10 % *ee*). Die Verwendung von Ru-LYS-HA als Katalysator führt zu einem *ee* von 56 % bei geringfügig höherer Produktivität (TOF = 6  $\text{h}^{-1}$ ). Ru-LYS-PA (74 % *ee*) und Ru-LYS-EA (63 % *ee*) zeigen höhere Enantiomerenüberschüsse und eine ebenfalls erhöhte Aktivität des künstlichen Metalloenzym im Vergleich zu den zuvor genannten. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 40 °C führt im Falle des Ru-LYS-EA zu einem etwa 6-fachen Anstieg der TOF, was einer Epoxid-Ausbeute von 46 % (mit 50 % *ee*) nach einem Tag entspricht. Bei einer Temperatur von 50 °C wird keine Erhöhung der Ausbeute mehr beobachtet, jedoch fällt der *ee* auf 30 %.



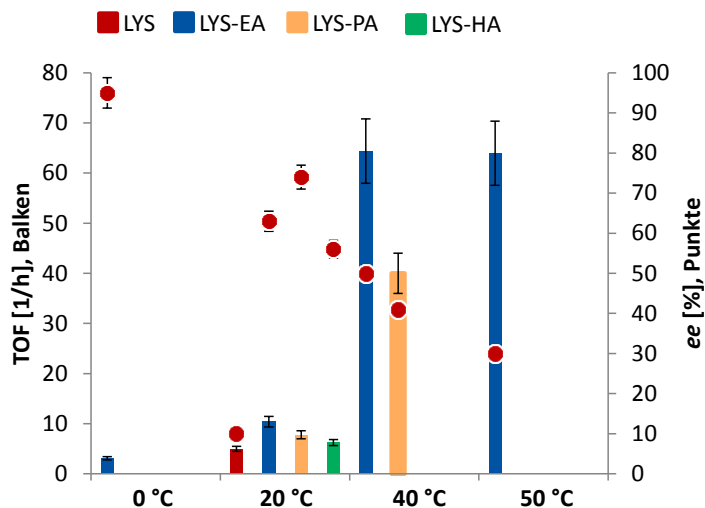


Abb. 4.36: Auftragung der TOF und des *ee* (*R*-Enantiomer) gegen die Temperatur der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-LYS-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen 7 d bei 0 °C, 3 d bei 20 °C und 1 d bei 40 °C und 50 °C. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

Werden die Experimente mit Ru-BSA bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt, so stellt sich heraus, dass hier das hexanylierte Protein am besten für die Epoxidierung von Styrol geeignet ist ( $ee = 88\%$ ,  $\text{TOF} = 6 \text{ h}^{-1}$ ,  $\text{TON} = 452$  nach 3 d) (Tab. 4.26). Zwar führt die Verwendung von Ru-BSA-PA zu einer ähnlich hohen Enantioselektivität der Reaktion (72 % *ee*), jedoch beträgt die Aktivität nur etwa die Hälfte der zuvor genannten. Mit LYS-BSA-EA dagegen werden sowohl geringe Enantiomerenüberschüsse als auch Umsätze erhalten. Lediglich das unmodifizierte Ru-BSA weist mit nur 20 % *ee* noch geringere Werte auf.

Tab. 4.26: *ee* (*(R)*-Enantiomer), TON, TOF und Ausbeuten der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-BSA-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen 7 d bei 0 °C, 3 d bei 20 °C und 1 d bei 40 °C und 50 °C. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

AME	T [ °C]	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [ $\text{h}^{-1}$ ]	Ausbeute [%]
BSA-HA	0	90 $\pm$ 4	334 $\pm$ 33	2 $\pm$ 0,2	10 $\pm$ 1
BSA	20	20 $\pm$ 1	302 $\pm$ 30	4 $\pm$ 0,4	9 $\pm$ 0,9
BSA-EA	20	30 $\pm$ 1	261 $\pm$ 26	4 $\pm$ 0,4	8 $\pm$ 0,8
BSA-PA	20	72 $\pm$ 3	212 $\pm$ 21	3 $\pm$ 0,3	6 $\pm$ 0,6
BSA-HA	20	88 $\pm$ 4	452 $\pm$ 45	6 $\pm$ 0,6	14 $\pm$ 1
BSA-PA	40	50 $\pm$ 2	724 $\pm$ 72	30 $\pm$ 3	22 $\pm$ 2
BSA-HA	40	80 $\pm$ 3	835 $\pm$ 84	35 $\pm$ 4	25 $\pm$ 3
BSA-HA	50	56 $\pm$ 2	1567 $\pm$ 157	65 $\pm$ 7	47 $\pm$ 5

Wie bereits bei den LYS-Komplexen beobachtet wurde, führt auch bei den BSA-Konjugaten eine Temperaturerhöhung von 20 °C auf 40 °C zu einem Anstieg der TOF um etwa das 6-fache. Bemerkenswerterweise ist die Enantioselektivität mit 80 % *ee* für das Ru-BSA-HA immer noch in einem sehr guten Bereich. Bei 50 °C wird innerhalb von 24 h 47 % Des Styrols zum Epoxid umgesetzt, jedoch sinkt der Enantiomerenüberschuss hier auf 56 %.

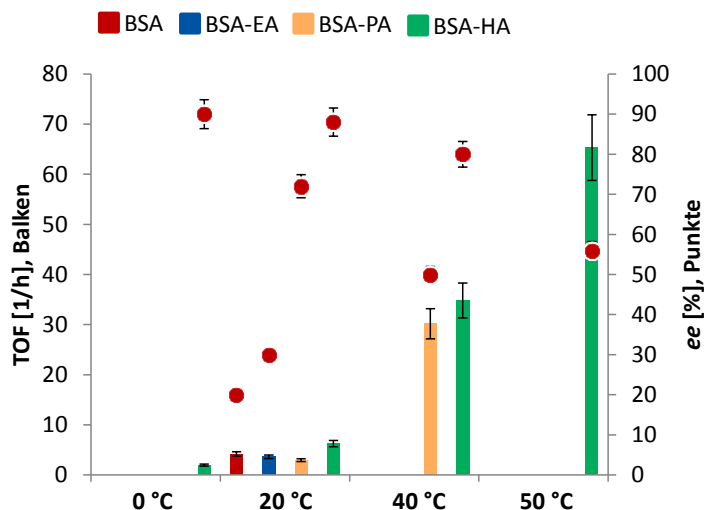


Abb. 4.37: Auftragung der TOF und des *ee* (*(R)*-Enantiomer) gegen die Temperatur der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-BSA-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen 7 d bei 0 °C, 3 d bei 20 °C und 1 d bei 40 °C und 50 °C. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

Wird Verlust der Selektivität der Reaktion über die Temperatur verglichen, so kann gesagt werden, dass Ru-BSA-HA stabiler gegen höhere Reaktionstemperaturen ist als das Ru-LYS-EA-Konjugat.

Acyliertes LYS wurde ebenso mit  $\text{Mn}(\text{Ac})_2$  komplexiert (Abb. 4.38). Hierbei wurden bei 20 °C geringe TOF zwischen 0,1 und 0,3  $\text{h}^{-1}$  (TON = 8-24 nach 3 d) erhalten. Die ermittelten Enantiomerenüberschüsse liegen dabei in einem ähnlichen Bereich wie die der Ru-LYS-Komplexe. Dies liegt im Bereich einer literaturbekannten Carboanhydrase<sup>149</sup>.

Zudem wurden acylierte  $\text{Ti}(\text{OMe})_4$ -LYS als Katalysatoren für die asymmetrische Epoxidierung von Styrol bei 20 °C für 3 d untersucht (Abb. 4.38, Tab. 4.27).

Die ermittelten TOF liegen bei 0,2 bis 0,3  $\text{h}^{-1}$  (TON = 14-22 nach 3 d) für Ti-LYS-PA und Ti-LYS-EA. Für Ti-LYS-HA konnte dagegen keinerlei Umsatz des Styrols zum Epoxid detektiert werden. Besonders interessant ist hier, dass das artifizielle Metalloenzym, im Gegensatz zu den Ru- und Mn-Komplexen, zur bevorzugten Bildung des (*S*)-Enantiomers des resultierenden Epoxids führt. Dabei werden hohe Enantiomerenüberschüsse von 86 bzw. 90 % erreicht. Auch der Ti-BSA-HA-Komplex katalysiert die Epoxidierung, mit ähnlich geringen Umsätzen und moderaten

75 % *ee* (vgl. auch Tab. 4.27, Abb. 4.39). Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Selektivitäten bei Verwendung verschiedener Metallspezies liegt in den unterschiedlichen Mechanismen der Epoxidbildung. So ist literaturbekannt, dass Titanate häufig Metallacyclo-Intermediate bilden während die Epoxidbildung bei Ru-basierten Katalysatoren eher über eine elektrophile Oxidation erfolgt<sup>236-237</sup>.

Ebenso kann das verwendete TBHP eine Rolle dabei spielen, da der sich intermediär bildende Ti-Komplex so einen zusätzlichen *tert*-Butyl-Liganden trägt, welcher durch seinen sterischen Einfluss sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit senken als auch die Enantioselectivität der Umsetzung beeinflussen kann.

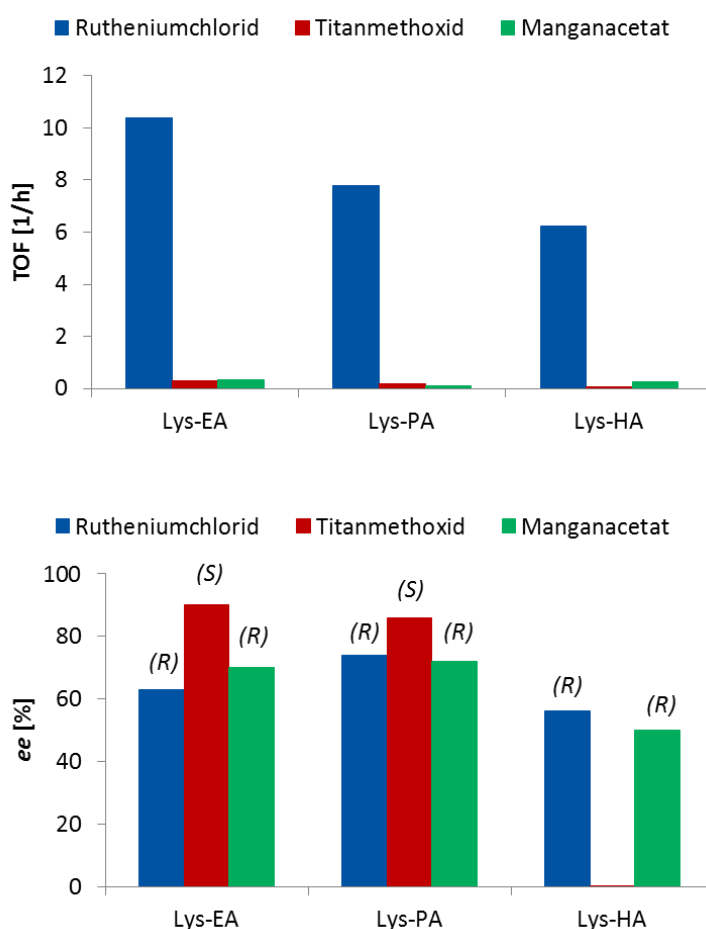


Abb. 4.38: Auftragung der TOF (oben) sowie des *ee* (unten) der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Metall-LYS-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei 20 °C. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol für 3 d in DCM durchgeführt. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h.

Aufgrund der Ergebnisse der vorherigen Untersuchungen mit Osmat-Laccase-PMOx (Kapitel 4.1.3), wo die besten Enantioselektivitäten bei einem MPV von 1 erzielt wurden, wurden zunächst auch hier das Protein und die Metallspezies in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Um zu ermitteln ob die mittels Acylierung und anschließender Metallkomplexierung generierten artifiziellen Metall-LYS und Metall-BSA mehr als eine selektive Metallbindungsstelle besitzen, wurden Reaktionen mit unterschiedlichen MPV durchgeführt (Tab. 4.27).

Tab. 4.27: *ee* (*R*) unter Verwendung von RuCl<sub>3</sub>, (*S*) bei Ti(OMe)<sub>4</sub>, TON, TOF und Ausbeuten der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Metall-Protein-Komplexe (pH 7) bei RT °C für 3 d für Metall-LYS-EA und bei 40 °C für 1 d für Metall-BSA-HA. Die Reaktion wurde mit 0,06 µmol/mL Protein-Konjugat, 0,06-0,24 µmol/mL Metallspezies, 220 µmol/mL TBHP und 200 µmol/mL Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein pro h.

AME	Metallspezies	MPV	T [°C]	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [h <sup>-1</sup> ]	Ausbeute [%]
LYS-EA	RuCl <sub>3</sub>	1	RT	63	749	10	22
LYS-EA	RuCl <sub>3</sub>	2	RT	55	1121	16	34
LYS-EA	RuCl <sub>3</sub>	3	RT	35	2174	30	65
LYS-EA	Ti(OMe) <sub>4</sub>	1	RT	90	22	0.3	1
LYS-EA	Ti(OMe) <sub>4</sub>	2	RT	80	70	1	2
LYS-EA	Ti(OMe) <sub>4</sub>	3	RT	6	173	2	5
BSA-HA	RuCl <sub>3</sub>	1	40	80	835	34	25
BSA-HA	RuCl <sub>3</sub>	2	40	90	1812	75	54
BSA-HA	RuCl <sub>3</sub>	3	40	82	2613	109	78
BSA-HA	RuCl <sub>3</sub>	4	40	44	2936	122	88
BSA-HA	Ti(OMe) <sub>4</sub>	1	40	66	22	1	1
BSA-HA	Ti(OMe) <sub>4</sub>	2	40	74	49	2	2
BSA-HA	Ti(OMe) <sub>4</sub>	3	40	64	82	3	3
BSA-HA	Ti(OMe) <sub>4</sub>	4	40	40	111	5	4

Zunächst wurde hierzu  $\text{RuCl}_3$  in verschiedenen molaren Verhältnissen zu LYS-AA-Konjugaten gegeben und die Epoxidierung von Styrol bei 20 °C für 3 d durchgeführt (Abb. 4.39, oben). Es zeigt sich, dass ein MPV von 2 die Aktivität des künstlichen Metalloenzymes annähernd verdoppelt (von  $\text{TOF} = 10 \text{ h}^{-1}$  zu  $\text{TOF} = 16 \text{ h}^{-1}$ ) bei nur geringfügigem Verlust der Enantioselektivität von 65 % *ee* zu 56 % *ee*. Wird das MPV auf 3 erhöht, steigt der Styrolumsatz erneut an, jedoch werden nur noch 35 % *ee* erhalten. Daraus lässt sich schließen, dass das LYS-AA zwei Bindungsstellen für das Ru besitzt, welche beide zu einer enantioselektiven Epoxidbildung mit Favorisierung des (*R*)-Enantiomers führen. Ebenso gibt es eine dritte Metallbindungsstelle, welche jedoch nicht dirigierend im Hinblick auf die Enantioselektivität der Reaktion wirkt.

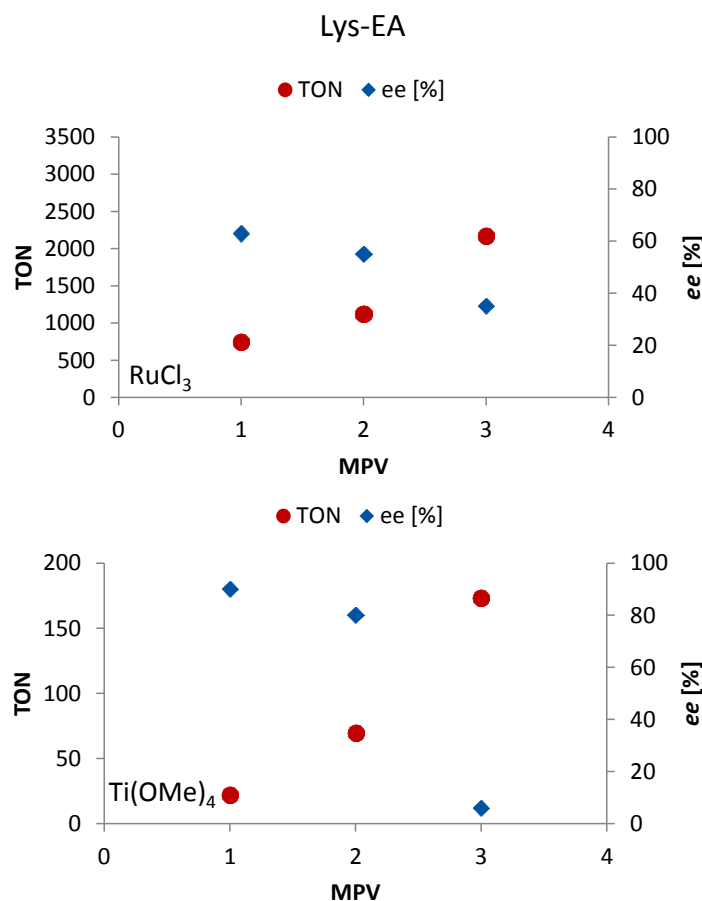


Abb. 4.39: Auftragung der TON bzw. des *ee* (*R*) unter Verwendung von  $\text{RuCl}_3$ , (*S*) bei  $\text{Ti}(\text{OMe})_4$  gegen das MPV der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru- sowie Ti-LYS-Komplexe (pH 7) mit verschiedenen MPV bei 20 °C für 3 d. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,06-0,18  $\mu\text{mol/mL}$  Metallspezies, 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein.

Dieselbe Untersuchung wurde ebenfalls mit BSA-HA bei 40 °C für 24 h durchgeführt (Abb. 4.40, oben). Wie zu sehen ist, scheint das BSA-HA sogar drei selektive Bindungsstellen für Ru zu besitzen. Dieser Ru<sub>3</sub>-BSA-HA-Komplex ist der aktivste und immer noch hoch enantioselektiv dirigierende Katalysator zur Epoxidierung von Styrol, welcher im Zuge dieser Untersuchungen generiert werden konnte.

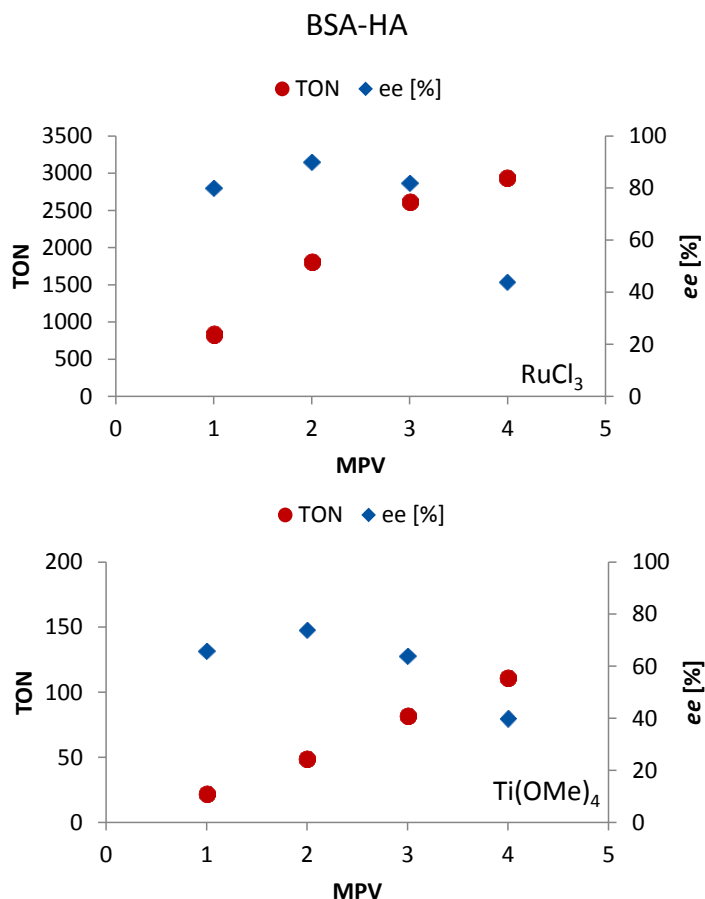


Abb. 4.40: Auftragung der TON bzw. des ee (*R*) unter Verwendung von RuCl<sub>3</sub>, (*S*) bei Ti(OMe)<sub>4</sub> gegen das MPV der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru- sowie Ti-BSA-Komplexe (pH 7) mit verschiedenen MPV bei 40 °C für 1 d. Die Reaktion wurde mit 0,06 μmol/mL BSA-Konjugat, 0,06-0,24 μmol/mL Metallspezies, 220 μmol/mL TBHP und 200 μmol/mL Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als μmol Produkt pro μmol Protein.

Mit nur 0,18 μmol/mL Ruthenium(III)-chlorid und 0,06 μmol/mL BSA-Konjugat konnten Styroloxid-Ausbeuten von 78 % (TON = 2613, TOF = 109 h<sup>-1</sup>) nach 24 h Reaktionszeit erreicht werden. Zudem ist der Enantiomerenüberschuss mit 82 % ee für das (*R*)-Enantiomer hier immer noch bemerkenswert hoch. Außerdem zeigen <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchungen (vgl.

Abb. 4.41), dass der Anteil an gebildetem Aldehyd, bei dem es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Benzaldehyd handelt, als Nebenprodukt bei dieser Reaktion bei lediglich etwa 1 % liegt und der generelle mögliche Anteil an Nebenprodukten (z.B. durch Öffnung des Epoxids entstehender Benzylalkohol) bei maximal ca. 10 %.

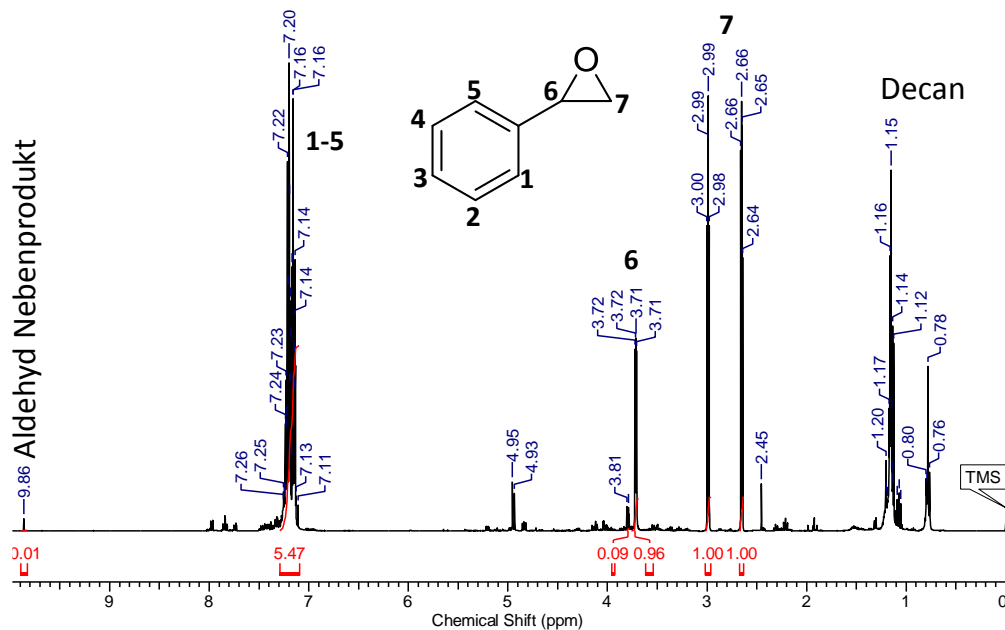


Abb. 4.41:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-BSA-HA (pH 7) mit einem MPV von 3 bei 40 °C für 1 d. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  BSA-Konjugat, 0,18  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Das Spektrum wurde bei 400 MHz in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommen und die chemische Verschiebung auf das TMS-Signal referenziert.

Dieses System kann durchaus mit einem kürzlich berichteten Ru-Aqua-Komplex, welcher auf Silica-Partikeln immobilisiert wurde, konkurrieren. Unter Verwendung von diesem wurde eine Styrooxid-Ausbeute von 92 % und ein ee von 79 % nach 6 h bei 25 °C und einer Katalysatormenge von 1 mol% Ruthenium gefunden.<sup>228</sup> Eine Erhöhung des MPV (Ru zu BSA-HA) auf 4 führt sogar zu einer Ausbeute von 88 % jedoch beträgt der Enantiomerenüberschuss hier nur noch 44 %.

Ein ähnliches Bild wurde für den Ti-LYS-EA-Komplex gefunden (Abb. 4.39, unten). Dies legt die Vermutung nahe, dass das Titanat an denselben Stellen im Enzym bindet wie die Ruthenium-



verbindung. Der einzige Unterschied liegt darin, dass die dritte Bindungsstelle in diesem Fall einen größeren Verlust der Enantioselektivität verursacht als zuvor bei Ru<sub>3</sub>-LYS-EA beobachtet wurde. Alles in allem sind die Ti-basierten artifiziellen Metalloenzyme selektiver, jedoch bei weitem weniger aktiv als die Ru-basierten Systeme. Trotz dieses Unterschiedes scheinen sich die Bindungsstellen in beiden acylierten Proteinen (LYS und BSA) zu gleichen (vgl. Abb. 4.39, Abb. 4.40).

Um mögliche Bindungsstellen für Metalle innerhalb der Proteine zu identifizieren, wurde die Proteinstruktur näher betrachtet. Wie bereits erwähnt führte die Epoxidierung mit unmodifiziertem Ru-Protein zu niedrigen Enantiomerenüberschüssen. Eine Blockierung dieser Gruppen führt erwartungsgemäß zu einer Steigerung der Enantioselektivität der Reaktion. Dies legt nahe, dass –wie bereits vermutet– die leicht zugänglichen primären Aminogruppen (Lysin) auf der Oberseite des Makromoleküls tatsächlich mögliche Metallbindungsstellen darstellen. Als weitere mögliche Koordinationsstellen werden die sekundären Aminoseitengruppen von Tryptophan (Trp) und Histidin (His) sowie die Tyrosin-Reste in Betracht gezogen. Zudem wird angenommen, dass mögliche chirale Bereiche innerhalb des Proteins besonders innerhalb geordneter Bereiche der Proteinfaltung, wie z.B. Helices, auftreten. Lysozym besitzt insgesamt 3 Tyrosine, 6 Tryptophane und ein einziges Histidin<sup>238</sup>. Aufgrund der hohen erreichten *ee*-Werte und der daraus resultierenden Notwendigkeit einer stabilen Metallbindung in einer chiralen Umgebung ist es eine naheliegende Vermutung, dass der gebildete Metall-Protein-Komplex, welcher zu einer selektiven Produktbildung führt, mindestens zweizählig sein wird. Für ein solches Bindungsszenario können in Lysozym drei Bindungsstellen identifiziert werden (Abb. 4.42). Zwei davon (via Trp28, Tyr23 und Trp 108, Trp 111) sind nahe bzw. in einer helicalen Struktur des Enzyms lokalisiert. Die dritte dagegen (Trp 62, Trp 63) liegt innerhalb eines *Random-Coils*.

BSA dagegen besitzt eine viel umfangreichere Struktur, welche 20 Tyrosine, 2 Tryptophane und 17 Histidine und somit viel mehr mögliche Koordinationsstellen für Metallspezies bietet.<sup>239</sup> Unter der Annahme, dass zwei- oder mehrzählige Komplexe gebildet werden, bieten sich hier ebenfalls mehrere Möglichkeiten, wie es exemplarisch in Abb. 4.43 dargestellt ist.

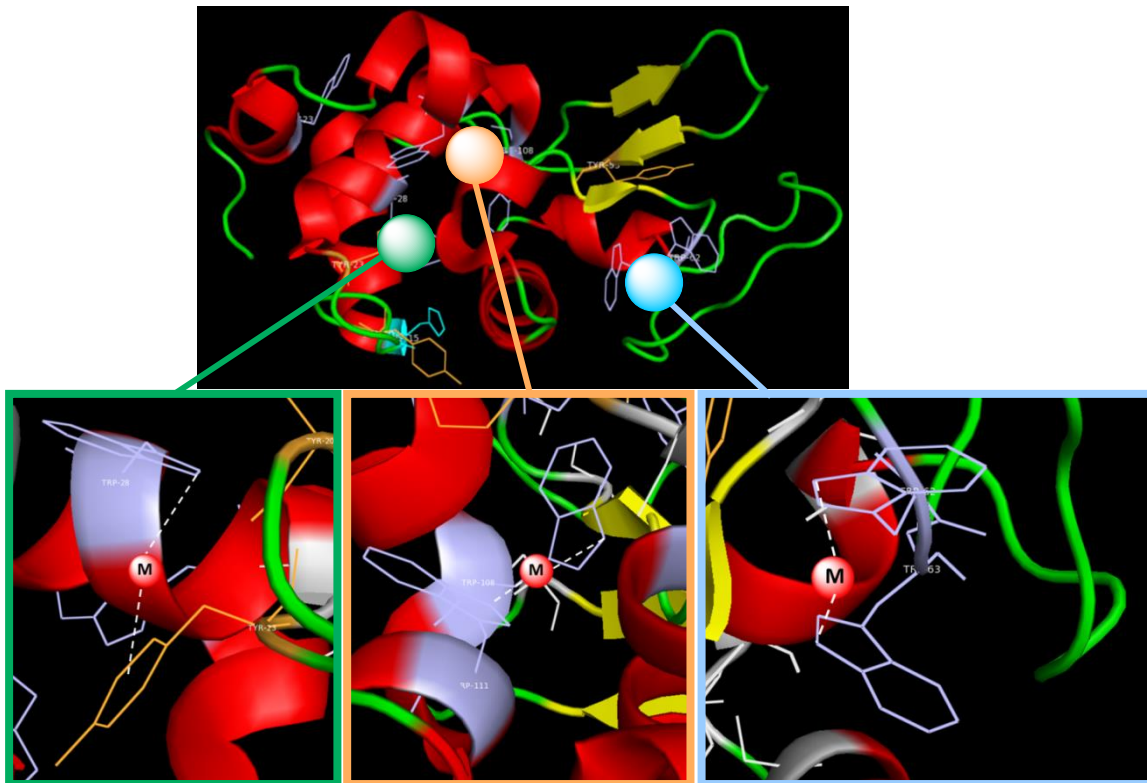


Abb. 4.42: Illustration möglicher Metallbindungsstellen in Lysozym. Die Kugeln zeigen die vermuteten Bindungsstellen. Tyr: Lila, Trp: Orange, His: Türkis.

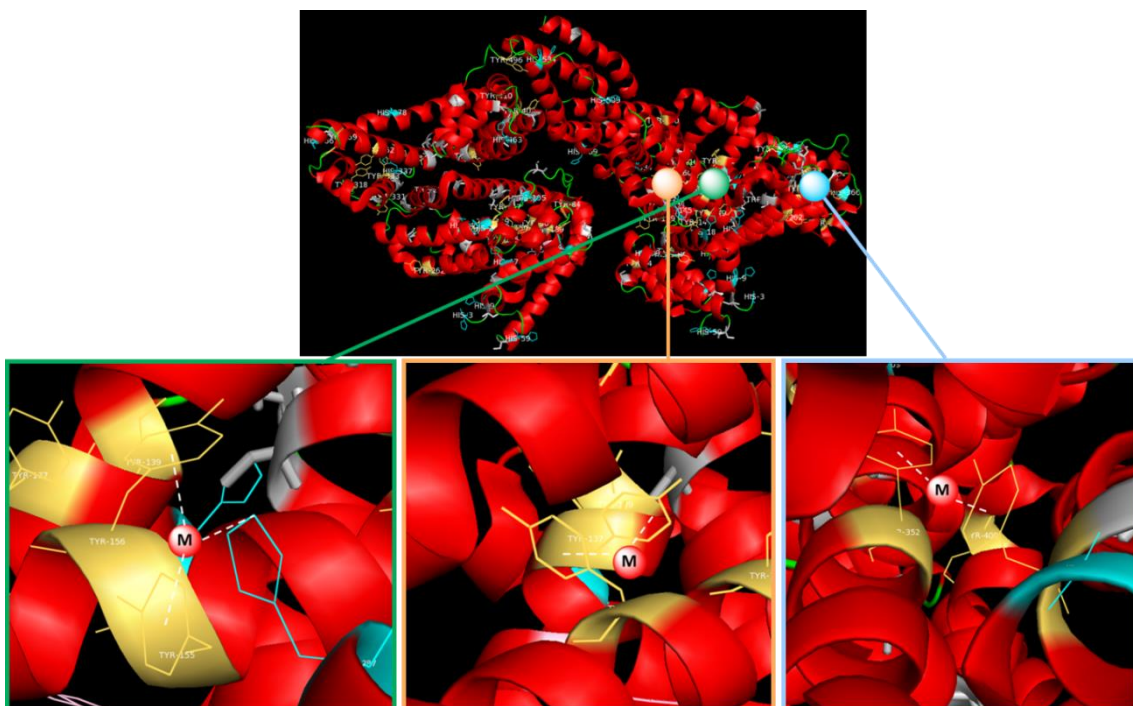


Abb. 4.43: Illustration möglicher Metallbindungsstellen in BSA. Die Kugeln zeigen die vermuteten Bindungsstellen. Trp: Gelb, His: Türkis.

Um das Reaktionsspektrum zu erweitern, wurden verschiedene Styrolerivate als Edukte für die Epoxidierung mittels Ru<sub>3</sub>-BSA-HA und Ru<sub>2</sub>-LYS-AA bei 40 °C bzw. 20 °C verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.28 dargestellt. Die Reaktion kann mit 4-Chlorstyrol, 4-Methylstyrol und  $\alpha$ -Methylstyrol mit signifikantem Umsatz durchgeführt werden. Inden und Allylphenylether werden, wie bereits bei der asymmetrischen Dihydroxylierung mit LYS- bzw. BSA-Komplexen beobachtet wurde, nicht umgesetzt. Hierbei wird 4-Chlorstyrol mit Ru<sub>3</sub>-BSA-HA in 42 %igem Umsatz und 78 % *ee* umgesetzt. Die Epoxidierung mit Ru<sub>2</sub>-LYS-EA als Katalysator führt zu einem sehr guten Enantiomerenüberschuss von 97 %, jedoch einer Produktausbeute von nur 10 %. 4-Methylstyrol wird mit Ru<sub>3</sub>-BSA-HA zu 21 % umgesetzt, mit einem geringen *ee* von 32 %. Im Gegensatz dazu führt die Verwendung von Ru<sub>2</sub>-LYS-EA zu einem dramatischen Anstieg der Enantioselektivität auf 80 % *ee*, aber es wird nur ca. die Hälfte des Umsatzes erzielt. Wird  $\alpha$ -Methylstyrol als Edukt verwendet, so werden 24 % des korrespondierenden Epoxids (91 % *ee*) mit Ru<sub>3</sub>-BSA-HA erhalten, wohingegen die Verwendung von Ru<sub>2</sub>-LYS-EA als Katalysator zu einer drastischen Abnahme beider Werte führt. Es kann gesagt werden, dass die Effektivität des Katalysators stark von der Art des verwendeten artifiziellen Enzyms abhängt und ebenso von der Art des verwendeten Substrates. Auch wenn das Spektrum hier breiter ist als bei der asymmetrischen Dihydroxylierung mit Osmat-Protein-Komplexen, so bleibt doch eine Limitierung auf Strukturen, welche sehr ähnlich zu Styrol sind.

Tab. 4.28: Vergleich von *ee*, TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Epoxidierung mittels vollständig acylierter Ru-Protein-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 2 bei 20 °C für 3 d für Ru<sub>2</sub>-LYS-EA und einem MPV von 3 bei 40 °C für 1 d für Ru<sub>3</sub>-BSA-HA mit verschiedenen Alkenen. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,12 bzw. 0,18  $\mu\text{mol/mL}$  RuCl<sub>3</sub>, 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h. 1H-Inden und Allylphenylether werden von beiden artifiziellen Enzymen nicht umgesetzt.

Konjugat	Alken	<i>ee</i> [%]	TON	TOF [h <sup>-1</sup> ]	Ausbeute [%]
BSA-HA	4-Chlorostyrol	79	1381	58	42
BSA-HA	4-Methylstyrol	36	703	29	21
BSA-HA	$\alpha$ -Methylstyrol	91	789	33	24
LYS-EA	4-Chlorostyrol	97	341	4,7	10
LYS-EA	4-Methylstyrol	80	318	4,4	9
LYS-EA	$\alpha$ -Methylstyrol	67	28	0,4	0,8

Die im Rahmen dieser Studie synthetisierten artifiziellen Metalloenzyme sind hoch selektive und –aktive Epoxidierungskatalysatoren und übertreffen im Hinblick auf die Aktivität und Enantioselektivität partiell sogar literaturbekannte artifizielle Metalloenzyme für die Epoxidierung. So führt z.B. die Verwendung einer Xylanase, welche mit einem Manganporphyrin-Komplex ausgestattet wurde, als Katalysator zu einer Styroloxid-Ausbeute von 17 % mit einem Enantiomerenüberschuss von 8,5 % ((*S*)-Enantiomer) nach einer Stunde Reaktionszeit bei Raumtemperatur in einem Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) <sup>180</sup>. Zwei weitere Veröffentlichungen beschreiben die Epoxidierung verschiedener Styrolderivate mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Oxidationsmittel. Als artifizielle Metalloenzyme werden dabei Carboanhydrasen (Rind und Mensch) verwendet, bei denen das natürliche Zn<sup>2+</sup>-Ion durch eine Mangan-Spezies substituiert wurde. Dasjenige, welches von OKRASA und KAZLAUSKAS publiziert wurde, berichtet Umsätze zwischen 1 % (TON = 2.2 nach 2 h) und 12 % (TON = 21 nach 16 h) sowie Enantiomerenüberschüsse zwischen 50 und 66 %. Als Reaktionsmedium wurde BES-Puffer (0,1 M, pH 7,2) verwendet. <sup>148</sup> SOUMILLION *et al.* dagegen benutzten ein Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7)/DMF-Gemisch und erreichten Ausbeuten zwischen 9 und 57 % mit 18-52 % *ee* über Nacht bei 4 °C. <sup>149</sup> Die Epoxidierung von Styrol mittels einer artifiziellen Mn-Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago* in BES Puffer (0,1 M, pH 7,2) liefert 49 % *ee* für das (*R*)-Enantiomer von Styroloxid und eine Ausbeute von 40 % (TON 1500) nach 5 Stunden Reaktionszeit. <sup>148</sup>

Im Vergleich mit nativen Enzymen, welche Epoxidierungsreaktionen katalysieren, zeigt sich, dass diese zwar häufig initial viel aktiver, aber dafür wesentlich weniger stabil sind als die hier generierten AMEs. So führt z.B. die Verwendung eines kombinierten StyA/StyB Systems aus *Pseudomonas sp.* zu sehr hohen spezifischen Aktivitäten für die Dihydroxylierung von Styrol von 95 min<sup>-1</sup> (99 % *ee* (*S*) innerhalb der ersten 5 min (TON = 475)). HOLLMANN *et al.* erreichten eine Produktivität von maximal 6,4 mM/h mit 6,5 μM StyA nach 15 min, was einer TOF von ca. 66 min<sup>-1</sup> und einer TON von 663 nach 2 h entspricht mit mehr als 98 % *ee* (*S*) für Styroloxid.

#### 4.3.4 Kapitelzusammenfassung

Die Konzeptidee der vorliegenden Studie in diesem Kapitel war es, Proteine durch Blockierung der primären Aminogruppen der Biomoleküle durch Acylierung, in hochselektive und –aktive AMEs zu konvertieren. Die zunächst ausgewählten, kommerziell günstig und in reiner Form erhältlichen Proteine Lysozym und Rinderserumalbumin wurden daher mit verschiedenen Carbonsäureanhydriden acyliert. Hierbei gelang es sowohl den Grad der Acylierung über einen weiten Bereich einstellen zu können als auch reproduzierbar vollständig acylierte Proteine zu

erhalten. Zudem konnten auch weitere Proteine, wie verschiedene Lipasen, erfolgreich modifiziert werden, so dass gezeigt werden konnte, dass das Konzept auch auf weitere Enzyme übertragbar ist.

Die so generierten modifizierten Proteine wurden mit verschiedenen katalytisch aktiven Metallkomplexen inkubiert, um AMEs zu erhalten. Hierzu wurden der Dihydroxylierungskatalysator  $K_2O_2(OH)_4$  sowie drei Katalysatoren, welche sich zur Epoxidierung von Alkenen eignen ( $Ti(OMe)_4$ ,  $Mn(Ac)_2$  und  $RuCl_3$ ) verwendet. Die AMEs wurden anschließend zur asymmetrischen Dihydroxylierung bzw. Epoxidierung von, zunächst, Styrol in organischen Lösungsmitteln eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass obwohl in nahezu allen Fällen ein Umsatz zum gewünschten Produkt erzielt werden konnte, die möglichst vollständige Blockierung der primären Aminogruppen für eine hochselektive Produktbildung von großer Bedeutung ist. Diese Beobachtung stimmt mit der Erwartung überein, dass die Blockierung der primären Aminogruppen dazu führt, dass sich das Metall in einer chiralen Region des Proteins anlagert und dies somit zu einer selektiveren Produktbildung führt. Das zeigt, dass das zuvor erläuterte Konzept gültig ist und eröffnet eine große Chance, auf einfache Weise hochaktive und -selektive AME als Katalysatoren aus natürlichen Quellen für unterschiedliche Reaktionen zu erhalten.

Zudem hängen sowohl Aktivität als auch Selektivität stark von dem zur Proteinmodifikation gewählten Anhydrid für das jeweilige Protein ab.

Des Weiteren sind die hier generierten AMEs durchaus konkurrenzfähig zu literaturbekannten katalytischen Systemen zur asymmetrischen Epoxidierung. So übertreffen die im Rahmen dieser Studie synthetisierten artifiziellen Metalloenzyme im Hinblick auf sowohl Aktivität und Enantioselektivität literaturbekannte artifizielle Metalloenzyme für die Epoxidierung. Weiterhin kann dieses System durchaus mit einem kürzlich publizierten Ru-Aqua-Komplex, welcher auf Silica-Partikeln immobilisiert wurde, konkurrieren. Im Vergleich mit nativen Enzymen, welche Epoxidierungsreaktionen katalysieren, zeigt sich, dass diese zwar häufig initial viel aktiver, aber dafür wesentlich weniger stabil sind als die hier generierten AMEs (für einen detaillierten Literaturvergleich siehe Kapitel 4.3.3).

Es ist außerdem besonders bemerkenswert, dass die verwendeten acylierten Proteine BSA und LYS wahrscheinlich mehr als eine Bindungsstelle besitzen. So scheint BSA drei selektive Bindungsstellen für die Metallspezies zu besitzen und mindestens eine weitere, die anscheinend das andere Enantiomer begünstigt. LYS dagegen könnte zwei solcher selektiv dirigierender Metallbindungszentren besitzen sowie mindestens ein drittes nicht-selektives. Dies zeigt, dass

Proteine sehr reich an verschiedenen chiralen Bindungszentren sind und unterstreicht das große Potential solcher Systeme bei der Entwicklung neuer asymmetrischer Katalysatoren.

---

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-PMOx-Konjugaten

Es wurde die Dihydroxylierung von Styrol unter Verwendung von Os-Laccase-PMOx als AME im Detail untersucht, um günstige Reaktionsbedingungen für diese Umsetzung zu ermitteln. Hierbei konnte ein homogenes Reaktionsgemisch durch den Wechsel des Kooxidationsmittels  $K_3[Fe(CN)_6]$  zu TBHP erreicht werden. Dies führte zu einem 12-fachen Anstieg der Reaktionsrate (von  $TON_{Os} = 42$  auf 501). Zudem konnten bei der Umsetzung von Styrol zu 1-Phenyl-1,2-ethandiol sehr hohe Enantiomerenüberschüsse von bis zu 99,4 % *ee* (*R*) des Reaktionsproduktes erhalten werden. Diese übersteigen diejenigen der klassischer Katalysatorsysteme nach SHARPLESS (97 % *ee*)<sup>186, 216</sup> und sind zudem vergleichbar mit den in vorhergehenden Untersuchungen unter Verwendung von Os-Laccase-PMOx als AME erreichten Enantioselektivitäten<sup>17, 184-185</sup>. Untersuchungen hinsichtlich der Eignung verschiedener Lösungsmittel als Reaktionsmedium für diese asymmetrische Dihydroxylierung von Styrol zeigen, dass, betrachtet man die Parameter TON, TOF sowie *ee* gleichermaßen, Chloroform am besten für Reaktion mit diesem AME geeignet ist (Abb. 5.1).

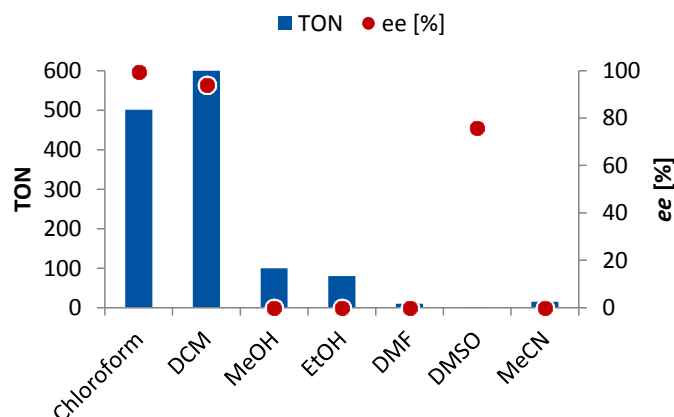


Abb. 5.1: TON und *ee* der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx (MPV = 1) in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Reaktion wurde mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2OsO_2(OH)_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die  $TON_{Os}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat.

Da zudem vermutet wurde, dass das Osmat bei einem bestimmten MPV nur noch an die aktive Tasche des Enzyms via Metallaustausch bindet, da diese früheren Experimenten zu urteilen die größte Komplexbildungskonstante haben sollte, wurde die Auswirkungen der Verwendung verschiedener MPV zwischen 0,5 und 2 auf die asymmetrische Dihydroxylierung mit Os-Laccase-PMOx näher betrachtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der stöchiometrisch gegenüber dem Enzym eingesetzte Metallkomplex tatsächlich die besten Ergebnisse unter Betrachtung der Parameter TON und *ee* liefert. Ein höheres MPV von 2 dagegen führt zwar zu einer weiteren Steigerung der TON, jedoch einhergehend mit einem drastischen Verlust der enantioselektiven Steuerung. Somit stützen die erhaltenen Ergebnisse das Konzept eines Metall-Metall-Austausches klar.

Eine Erhöhung Reaktionstemperatur von 0 °C über 4 °C auf 22 °C führt zu einem Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit, jedoch auch zu einem starken Verlust der Enantioselektivität der Umsetzung. Die enantioselektive Steuerung der Reaktion ist daher stark temperaturabhängig.

Wird die Kinetik der Reaktion näher betrachtet, so zeigt sich, dass bei 22 °C bereits nach 3 d keine Produktbildung mehr zu beobachten ist, wobei bei 0 °C der Reaktionsverlauf selbst nach 7 d noch linear ist. Anscheinend kommt es hierbei zu einem temperaturabhängigen Reaktivitätsverlust des Osmat-Laccase-Komplexes. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich das artifizielle aktive Zentrum des Enzyms im Laufe der Reaktionszeit verändert, wahrscheinlich durch das Kooxidationsmittel oder das Kaliumosmat selbst.

Zudem zeigen weitere Untersuchungen, dass auch die Affinität des Substrates Styrol zum aktiven Zentrum temperaturabhängig ist, wobei die Faltung des aktiven Zentrums eine mögliche Ursache für diese Beobachtung darstellt. Dies kann auch einen Teil zu den erzielten hohen Selektivitäten bei niedrigen Temperaturen beitragen.

Die Dihydroxylierung von Styrol lässt sich außerdem auch mit weiteren Metallspezies, insbesondere Kaliumpermanganat und Eisenchlorid, erfolgreich katalysieren (Tab. 5.1). Diese artifiziellen Metalloenzyme sind jedoch sowohl im Hinblick auf die Aktivität als auch die enantioselektive Steuerung dem Osmat-basierten System eindeutig unterlegen. Trotzdem ist die hier mit Hilfe von Fe-Laccase-PMOx als Katalysator erzielte *turnover number* mehr als doppelt so hoch als die mittels eines literaturbekannten Fe-basierten Katalysatorsystems (TON 9,4 für [Fe(II)(4-MeO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-DPAH)<sub>2</sub>](OTf)<sub>2</sub> als Katalysator, keine Untersuchungen zum Enantiomerenüberschuss<sup>213</sup>) erreichte.



Tab. 5.1: Vergleich des *ee*, der TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels Metall-Laccase-PMOx mit einem MPV von 1 mit verschiedenen Metallspezies bei 0 °C für 7 d. Die Reaktion wurde mit 0,013 µmol/mL Laccase-Konjugat, 0,013 µmol/mL Metallspezies, 110 µmol/mL TBHP, 10 µL/mL ges. methanolischer KOH und 100 µmol/mL Styrol in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein pro h.

Metallspezies	TON	TOF [h <sup>-1</sup> ]	Ausbeute [%]	<i>ee</i> [%]
K <sub>2</sub> OsO <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub>	501	2,98	6,6	99,4 <i>R</i>
KMnO <sub>4</sub>	51	0,30	0,6	25,6 <i>R</i>
FeCl <sub>2</sub>	20	0,07	0,2	11,0 <i>R</i>

Zudem konnten auch einige weitere Styrolerivate inklusive derer welche durch Osmat-Laccase-PMOx nicht in das korrespondierende Diol überführt werden konnten, unter Verwendung von unterschiedlichen AMEs mit TBHP als Kooxidationsmittel erfolgreich umgesetzt werden. Dabei hängen Umsatz sowie Selektivität der Reaktion stark sowohl vom verwendeten AME als auch Lösungsmittelsystem ab. Allerdings sind die erhaltenen Enantiomerenüberschüsse mit maximal 35 % *ee* als durchaus gering zu betrachten. Die erzielten *turnover numbers* können mit maximal 470 jedoch in einigen Fällen mit denen der auf Osmat-Laccase-PMOx aufbauenden Systeme (TON = 501 für Styrol, MPV = 1) konkurrieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Optimierung der Reaktionsparameter ein bis zu 48-facher Anstieg der *turnover frequency* der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol zu 1-Phenyl-1,2-Ethandiol mittels Os-Laccase-PMOx als Katalysator im Vergleich zum K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]-basierten Kooxidationsmittelsystem<sup>184</sup> erzielt werden konnte. Des Weiteren liefert dieses AME sehr hohe Enantioselektivitäten mit mehr als 99,4 % *ee* (*R*), was dem Detektionsmaximum der verwendeten HPLC-Analytik entspricht.

Somit ist es erfolgreich gelungen hochselektive und -aktive AMEs für die asymmetrische Dihydroxylierung in organischen Lösungsmitteln zu generieren.

## 5.2 Tandemkatalyse

Organolösliche PEKs eignen sich prinzipiell als Katalysatoren für Tandemkatalysen (siehe Kap. 2.3.2). Als Zielreaktion wurde in dieser Arbeit eine tandemkatalytische Dihydroxylierung/Veresterung mittels Lipasen gewählt. Für die Tandemkatalyse wurden zunächst immobilisierte CaLB verwendet, welche anschließend wie in Kapitel 4.1.1 dargestellt mit Osmat beladen wurde. Das Ziel bei dieser Vorgehensweise ist es, dass zunächst mittels der artifiziellen Aktivität von Os-Lipase-PMOx durch die asymmetrische Dihydroxylierung von Styrol *in situ* 1-Phenyl-1,2-ethandiol generiert wird, welches im zweiten, nachgelagerten Reaktionsschritt mittels der nativen katalytischen Aktivität der Lipase direkt mit einer Carbonsäure verestert wird (Abb. 5.2).

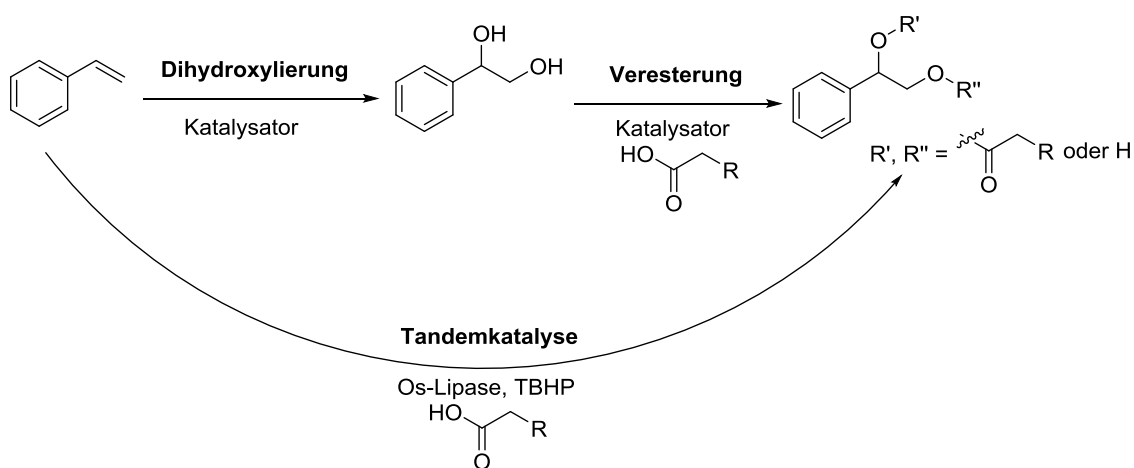


Abb. 5.2: Reaktionsschema der tandemkatalytischen Dihydroxylierung/Veresterung mit Os-Lipase-PMOx ausgehend von Styrol.

Hierbei konnte eine tandemkatalytische Dihydroxylierung/Veresterung sowohl mittels immobilisierter Os-CaLB als auch mit Hilfe von Os-Lipase-PMOx-Konjugaten erfolgreich durchgeführt werden.

Untersuchungen mit immobilisierter Os-CaLB als Katalysator kommen zu dem Schluss, dass eine hohe regioselektive Steuerung von bis zu 90 % für den prim. Laurinsäurester, jedoch mit einem *ee* von nur 36 %, erreicht werden kann. Zudem konnte die Tandemkatalyse auch mit Hexan- bzw. Oktansäure als Substrat erfolgreich durchgeführt werden. Wird die Enantioselektivität der Reaktion betrachtet, so zeigt sich, dass generell die höchsten Enantioselektivitäten

bei der Bildung des Diesters mit bis zu 89 % *ee* erreicht werden. Dieser stellt jedoch in allen Fällen nicht den größten Teil des Produktestergemisches.

Wird die Veresterungsreaktion mit der Tandemkatalyse verglichen, so zeigen sich deutliche Unterschiede von sowohl Regio- als auch Enantioselektivität. Daher können die Ergebnisse der Einzelreaktionen nicht direkt auf die tandemkatalytische Umsetzung übertragen werden, was die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen stark erschwert.

Zudem führt der erste Reaktionsschritt, die Dihydroxylierungsreaktion, generell nur zu relativ geringen Umsätzen von maximal ca. 14 % von Styrol zu 1-Phenyl-1,2-Ethandiol, was den Gesamtumsatz der Tandemkatalyse stark limitiert.

Wird lediglich die Dihydroxylierung von Styrol mit Os-CaLB-PMOx mit einem MPV von 1 bei 0 °C für 7 d durchgeführt so zeigt sich, dass die verwendeten Lipasen diese Reaktion mit einem geringeren *ee* von maximal 20 % (*S*) bei einer TON von nur 85 (Ausbeute 1,1 %) katalysieren. Daher wurde die Reaktionstemperatur auf RT (3 d, gemäß 4.1.3.1) angehoben, was zwar zu einem vollständigen Verlust der Enantioselektivität, jedoch zu einer bis zu 5-fachen Erhöhung der *turnover number* führte.

Bei der Veresterungsreaktion von rac. 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Laurinsäure mittels Osmatfreier CaLB-PEKs kann unter ansonsten identischen Bedingungen ein 40 %-iger Eduktumsatz erzielt werden, was bedeutet, dass sowohl das Diol als auch die Carbonsäure vom Enzym als Substrat akzeptiert wird.

Diese Untersuchungen zeigen auch, dass die Dihydroxylierungsreaktion mit hoher Wahrscheinlichkeit den limitierenden Schritt für die Ausbeute der Gesamtreaktion darstellt.

Hinsichtlich der Tandemkatalyse zeigt sich, dass bei allen verwendeten Systemen ein Umsatz von Styrol zu den korrespondierenden Estern erfolgte. Weiterführende Untersuchungen legen nahe, dass es sich dabei um eine Auto-Tandemkatalyse handelt. Der Anteil des *in situ* gebildeten Zwischenproduktes 1-Phenyl-1,2-ethandiol im Produktgemisch beträgt dabei in allen Fällen weniger als 5 %.

Es wurde für Os-CaLB-PMOx ausgehend von Styrol im besten Fall eine Regioselektivität der korrespondierenden Ester von 4:76:20 (Diester:primärer Ester:sekundärer Ester) erreicht. Die maximal ermittelte Enantioselektivität beträgt sehr gute 97 % *ee*, jedoch zugunsten des Diesters, welcher mit 4 % bei weitem nicht den höchsten Anteil am Produktestergemisch darstellt.

---

Die erhaltenen Ergebnisse unterstreichen insgesamt das große Potential enzymbasierter tandemkatalytischer Systeme im Bereich der Katalyse in organischen Medien. Jedoch ist es nicht gelungen, die selektive Bildung nur eines der möglichen Produktisomere in Verbindung mit einer guten Regio- und Enantioselektivität zu erreichen. Liegt der Fokus auf beiden dieser Punkte, so ist eine aufwendige Enantiomeren- und Racemattrennung hier dennoch nötig.

### 5.3 Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten

Das Ziel war es, Proteine und Enzyme über eine gezielte Acylierung der primären Aminogruppen dieser Biomoleküle und somit deren Blockierung als potenzielle Metallbindungsstellen, in hochselektive und -aktive AMEs zu konvertieren (Abb. 5.3).

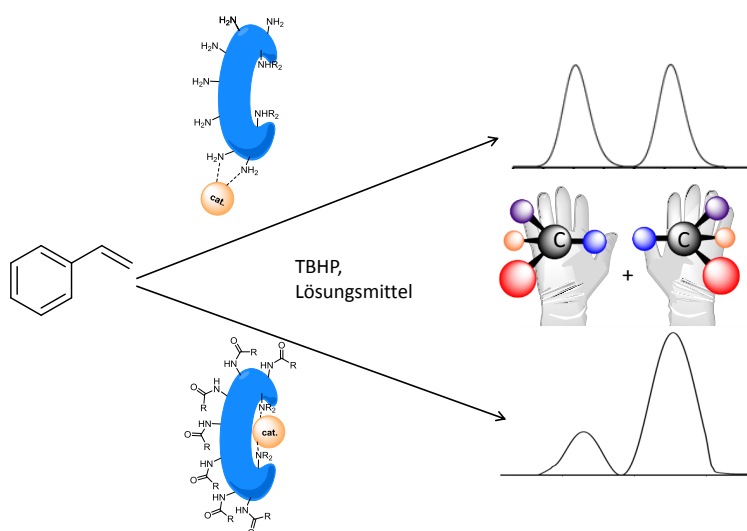


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der Strategie zur Generierung selektiver artifizierender Metalloenzyme durch die Blockierung der primären Aminogruppen des Proteins.

Hierzu wurden zunächst die kommerziell günstig und in reiner Form erhältlichen Proteine Lysozym und Rinderserumalbumin mit unterschiedlichen Carbonsäuren acyliert. Es zeigte sich, dass der Grad der Acylierung über einen weiten Bereich durch Variation des molaren Verhältnisses der Anhydride zu den Aminogruppen direkt einstellbar ist (Abb. 5.4). Zudem können reproduzierbar vollständig acylierte Proteine erhalten werden. Des Weiteren ist dieses Konzept auch auf weitere Proteine, wie z.B. verschiedene Lipasen, übertragbar.

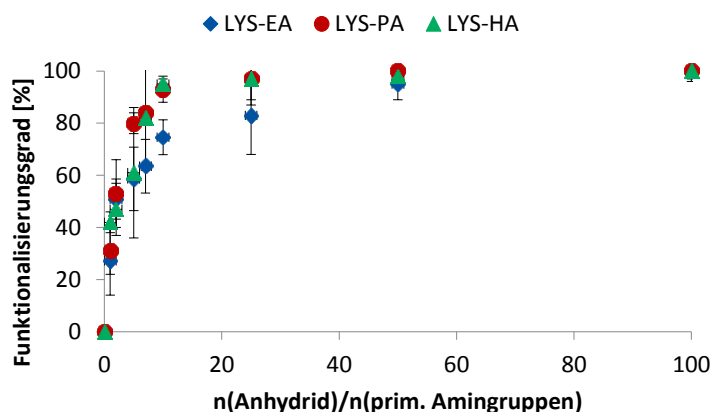


Abb. 5.4: Auftragung des Funktionalisierungsgrades von Lysozym gegen die verwendeten molaren Überschüsse des Anhydrids pro freier primärer Aminogruppe des Enzyms. EA: Essigsäureanhydrid, PA: Propansäureanhydrid, HA: Hexansäureanhydrid.

Die so erhaltenen modifizierten Proteine wurden im Folgenden mit verschiedenen katalytisch aktiven Metallkomplexen im organischen Medium inkubiert, um AMEs zu generieren. Hierzu wurden der Dihydroxylierungs-Katalysator  $K_2Os_2(OH)_4$  sowie drei Katalysatoren, welche sich zur Epoxidierung von Alkenen eignen ( $Ti(OMe)_4$ ,  $Mn(Ac)_2$  und  $RuCl_3$ ) verwendet. Die so erhaltenen AMEs wurden anschließend in verschiedenen organischen Lösungsmitteln als Katalysatoren zur asymmetrischen Dihydroxylierung bzw. Epoxidierung von Styrol eingesetzt. Hierbei stellte sich heraus, dass in nahezu allen Fällen ein Umsatz zum gewünschten Produkt erzielt werden konnte und somit mittels dieser Methode erfolgreich AMEs für den Einsatz in organischen Solventien generiert werden können. Die möglichst vollständige Blockierung der primären Aminogruppen ist für eine hochselektive Produktbildung jedoch von großer Bedeutung. Dies steht in großer Übereinstimmung mit der Erwartung, dass die Blockierung der primären Aminogruppen dazu führt, dass sich das Metall in einer chiralen Region des Proteins anlagert, was folglich zu einer selektiveren Produktbildung führt. Das zeigt, dass das eingangs erwähnte Konzept Gültigkeit besitzt und eröffnet die Möglichkeit auf einfache Weise hochaktive und -selektive AME aus natürlichen Quellen als Katalysatoren für unterschiedliche Reaktionen in rein organischen Lösungsmittelsystemen herstellen zu können.

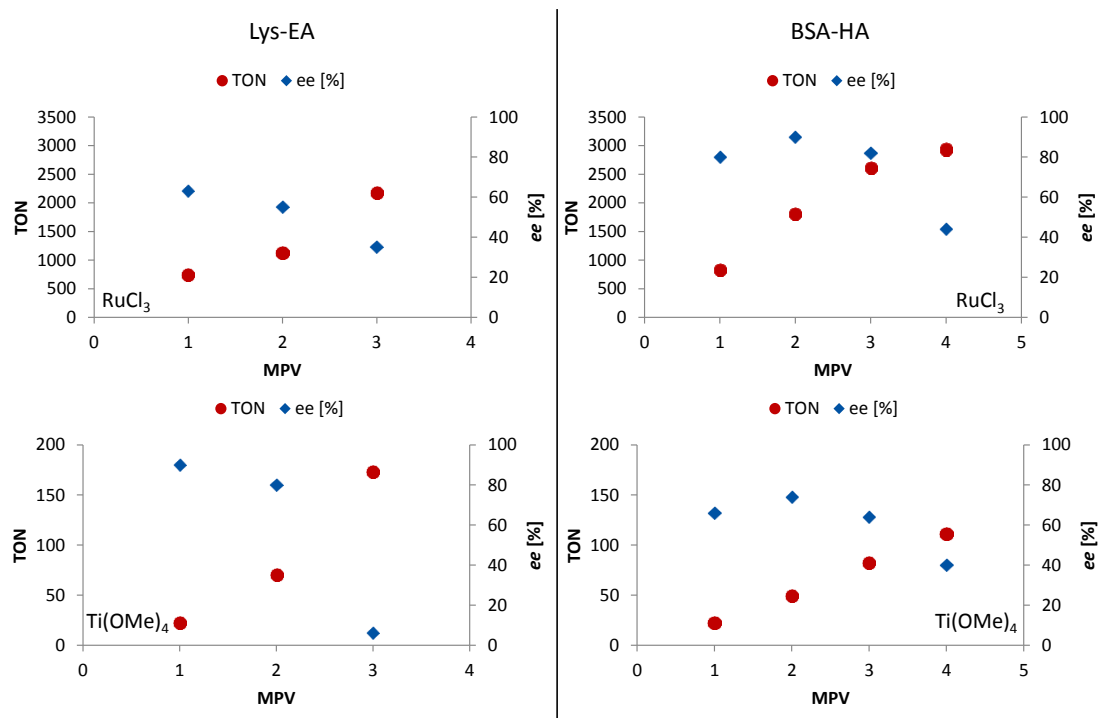
Zudem hängen sowohl Aktivität als auch Selektivität des Katalysators stark von dem zur Proteinmodifikation gewählten Anhydrid für das jeweilige Protein ab. Des Weiteren zeigten die

AMEs eine Produktselektivität hinsichtlich Katalysatoraktivität und enantioselektiver Steuerung für verschiedene Styrollderivate.

Die für die asymmetrische Epoxidierung verwendeten AMEs übertreffen im Hinblick auf sowohl Aktivität und Enantioselektivität andere artifizielle Metalloenzyme für diese Reaktion. Des Weiteren liefert dieses System Ergebnisse, welche mit einem kürzlich berichteten Ru-Aqua-Komplex, der auf Silica-Partikeln immobilisiert wurde konkurrieren können. Im Vergleich mit nativen Enzymen, welche Epoxidierungsreaktionen katalysieren, zeigt sich, dass letztere zwar häufig initial wesentlich aktiver, aber dafür deutlich weniger stabil sind als die hier generierten AMEs (für einen detaillierten Literaturvergleich siehe Kapitel 4.3.3).

Es ist zudem insbesondere bemerkenswert, dass die acylierten Proteine BSA und LYS mit hoher Wahrscheinlichkeit mehr als nur eine selektive Metallbindungsstelle besitzen (Abb. 5.5). BSA scheint somit drei selektiv dirigierende Bindungszentren für die katalytisch aktiven Metallspezies der Epoxidierungsreaktion zu besitzen und mindestens ein viertes, welches anscheinend die Bildung des anderen Enantiomers begünstigt. Dagegen besitzt LYS zwei solcher selektiver Bindungsstellen sowie mindestens eine zusätzliche, welche nicht selektiv dirigierend wirkt.

---



**Abb. 5.5:** Auftragung der TON bzw. des ee ((*R*) unter Verwendung von RuCl<sub>3</sub>, (*S*) bei Ti(OMe)<sub>4</sub>) gegen das MPV der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Metall-Protein-Komplexe (pH 7) mit verschiedenen MPV bei 20 °C für LYS-EA und bei 40 °C für 1 d für BSA-HA. Die Reaktion wurde mit 0,06 μmol/mL Protein-Konjugat, 0,06-0,24 μmol/mL Metallspezies, 220 μmol/mL TBHP und 200 μmol/mL Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als μmol Produkt pro μmol Protein.

Dies zeigt, dass Proteine sehr reich an unterschiedlichen chiralen Bereichen sind, die sich zur Komplexierung mit verschiedenen katalytisch aktiven Metallspezies eignen und unterstreicht nochmals das große Potential solcher Systeme bei der Entwicklung neuer asymmetrischer Katalysatoren.





## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Chemikalien und Geräte

#### 6.1.1 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Feinwaage	Mettler-Toledo	XS105
Gefriertrocknung	Christ	Alpha 1-2 LD plus
Gelpermeationschromatographiesystem	Viscotek	GPCMax
Hochleistungsflüssigkeitschromatographiesystem	Hitachi	LaChromElite
Hochvakuumpumpe	Vacuubrand	RZ6
Karl-Fischer-Titrator	Schott	TitroLine KF
Kryostat	Lauda	Eco RE 1050
Lichtstreuung	Malvern	Zetasizer nano S
pH-Meter	Greisinger electronic	GMH 3530
Pipetten	Eppendorf	Research, Reference
Rotationsverdampfer	Heidolph Instruments	Laborota 4001 efficient
Synthesemikrowelle	CEM	Discover
Taumelschüttler	Heidolph Instruments	Polymax 1040
Thermoschüttler	Eppendorf	Thermomixer comfort
Trockenschrank	Heraeus Instruments	T6030
Ultraschallbad	Bandelin	RK 100H
UV/vis-Photometer	Analytik Jena	Specord 210
Zentrifuge	Hermle	Z300

## 6.1.2 Verwendete Chemikalien

Tab. 6.1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	CAS-Nr.	Reinheit	Hersteller
(S)-1-Phenyl-1,2-ethandiol	25779-13-9	97 %	ABCR
(S)-Styroloxid	20780-54-5	97 %	Sigma Aldrich
1H-Inden	95-13-6	>90 % stab.	Alfa Aesar
1-Phenyl-1,2-ethandiol	93-56-1	≥95 %	Merck
2-Methyl-2-oxazolin	1120-64-5	99 %	Alfa Aesar
2-Propanol	67-63-0	≥99,8 %	Sigma-Aldrich
4-Chlorstyrol	1073-67-2	97 %	Sigma Aldrich
4-Methylstyrol	622-97-9	98 % stab.	Alfa Aesar
Aceton	67-64-1	technisch	Merck
Acetonitril	75-05-8	p.a.	VWR
Aluminiumoxid, basisch	1344-28-1		Merck
Calciumhydrid	7798-78-8	Zur Synthese	Merck
CDCl <sub>3</sub>	865-49-6	99,8 atom-% D	Armar Chemicals
CHCl <sub>3</sub>	865-49-6		VWR
Diethylether	60-29-7		VWR
Dimethylformamid	68-12-2		VWR
Dimethylsulfoxid	67-68-5	reinst	AppliChem
Dimethylsulfoxid-d <sub>6</sub>	2206-27-1	99,8 atom-% D	Armar Chemicals
Eisenchlorid-Tetrahydrat	13478-10-9		Sigma Aldrich
Essigsäure	64-19-7	100 %	Merck
Essigsäureanhydrid	108-24-7	99 %	Sigma Aldrich
Ethanol	64-17-5	96 %	VWR
Ethylacetat	64-17-5	technisch	VWR
Ethylendiamin	107-15-3	Zur Synthese	ABCR
Ethylendiamintetraessigsäure	60-00-4	≥ 99 %	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz	6381-92-6	≥ 99%	Roth
Formaldehydlösung	50-00-0	37 % wässrig	Merck
Hexansäureanhydrid	2051-49-2	97 %	Acros
K <sub>2</sub> OsO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	10022-66-9		Fisher Scientific
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	13746-66-2	>98 %	Alfa Aesar
Kaliumcarbonat	584-08-7	reinst	VWR
Kaliumhydroxid	1310-58-3	Zur Analyse	VWR

---

Kaliumpermanganat	7722-64-7	Zur Analyse	Merck
KARL-FISCHER-Reagenz CombiCoulumat fritless			Merck
Laurinsäure	143-07-7	≥98 %	Sigma-Aldrich
Manganacetat	6156-78-1		Alfa Aesar
Methanol	67-56-1	98 %	AppliChem
Molsieb 3 Å			Merck
Molsieb 4 Å			Merck
Natriumcarbonat	497-19-8	p.a.	Merck
Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	Zur Analyse	Merck
Natriumhydroxid	1310-73-2	99 %	Roth
Natriumthiosulfat	7772-98-7	wasserfrei	Merck
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	10102-17-7	p.a.	Acros
<i>n</i> -Heptan	142-82-4	99 %	VWR
Phosphorpentoxid	1314-56-3	99 %	Sigma-Aldrich
Propionsäureanhydrid	123-62-6	99 %	Acros
<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid	98-59-9	97 %	Fluka
Pyridin	110-86-1	99,8 %	Sigma-Aldrich
Pyrommelitsäuredianhydrid	89-32-7	97 %	Sigma-Aldrich
Roti-Mark 10-150			Roth
Roti-Nanoquant			Roth
Rutheniumchlorid	14898-67-0	99,9 %	ABCR
Salzsäure	7647-01-0	37 %	Merck
SDS	151-21-3	99,5 %	Roth
Styrol	100-52-5	≥ 99 % stab.	Sigma-Aldrich
Styroloxid	96-09-3		Sigma Aldrich
TEMED	110-18-9	99 %	Merck
<i>tert</i> -Butanol	75-65-0	Zur Synthese	Merck
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	75-91-2	5,5 M in Decan	Sigma-Aldrich
Ti(OMe) <sub>4</sub>	992-92-7	95 %	Alfa Aesar
TNBS	2508-19-2		Sigma-Aldrich
Toluol	108-88-3	≥99,5 %	VWR
TRIS-Base	77-86-1	>99 %	Roth
TRIS-HCl	1185-53-1	>99 %	Roth
Wasserstoffperoxid	7722-84-1	30 %	Merck
α-Methylstyrol	98-83-9	99 % stab.	Alfa Aesar

---

### 6.1.3 Verwendete Proteine

Tab. 6.2: Verwendete Proteine

Protein	Organismus	Hersteller	Aktivität gemäß Hersteller
Albumin	Rinderserum	Roth	-
Catalase	Rinderleber	Sigma-Aldrich	2000-5000 U/mg; 25 °C, pH 7; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Laccase	<i>Trametes versicolor</i>	SigmaAldrich	≥0,5 U/mg; 25 °C, pH 5; Catechol
Lipase	<i>Candida rugosa</i>	SigmaAldrich	≥700 U/mg; 37°C, pH 7,2; Triglycerid
Lipase B	<i>Candida antarctica</i>	Sigma Aldrich	Ca. 9 U/mg; 40 °C, pH 8; Tributyrin
Lipase	<i>Rhizumucor miehei</i>	BioChemica	20000 U/g; pH 6,2
Lysozym	Hühnereiweiß	Applichem	≥20000 U/mg
Monooxygenase	<i>Bacillus megaterium</i>	-	
Peroxidase	Meerrettich	Merck	20000 U/Vial
DERA	<i>Escherichia coli</i>	-	
Yqjm	<i>Bacillus subtilis</i>	-	

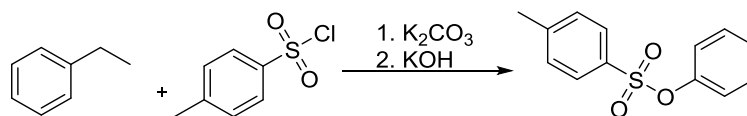
### 6.1.4 Gase und Flüssiggase

Tab. 6.3: Gase und Flüssiggase

Gas	Reinheit	Hersteller	Verwendungszweck
Argon	5.0, ≥99,999 %	Messer	Schutzgas zur Inertisierung
Stickstoff	≥99,8 %	Messer	Schutzgas zur Inertisierung
Stickstoff, flüssig	2.8, ≥99,8 %	Linde	Zur Kühlung

## 6.2 Synthese von Poly-2-alkyloxazolinen

### 6.2.1 Darstellung des Initiators Benzyltosylat



Die Synthese erfolgte nach einer Prozedur von KAZEMI *et al.*<sup>240</sup>.

Hierzu wurden 5 g (36 mmol) Kaliumcarbonat mit 1,04 mL (10 mmol) Benzylalkohol und 2,86 g (15 mmol) Tosylchlorid mit Hilfe eines Mörsers über 5 Minuten kräftig miteinander verrieben. Anschließend wurde 2,806 g (50 mmol) Kaliumhydroxid zugegeben und das Gemisch für weitere 2 Minuten gemörsert. Es wurden 50 mL Diethylether hinzugegeben und der Feststoff mittels eines Faltenfilters abfiltriert. Der feste Rückstand wurde verworfen und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Zweimaliges Umkristallisieren aus *n*-Heptan bei -32 °C liefert das Produkt als weißen kristallinen Feststoff, welcher am Feinvakuum unter Eiskühlung getrocknet wurde. Die Charakterisierung erfolgte mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie (Kapitel 6.7.2).

Ausbeute: 70-75 %

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): δ = 7,74 – 7,85 (m, 2 H, -S-C<sub>Ar</sub>-CH<sub>2,Ar</sub>-); 7,17 – 7,41 (m, 7 H, -O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5,Ar</sub>); 5,03 – 5,07 (s, 2 H, CH<sub>3</sub>-C<sub>Ar</sub>-CH<sub>2,Ar</sub>-); 2,41 – 2,48 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4,Ar</sub>-) ppm.

### 6.2.2 Trocknung von Chloroform

Zunächst wurde das Chloroform bei etwa 350 mbar und 40 °C am Rotationsverdampfer mit ca. 10 Vol % Vorlauf abdestilliert. Die Trocknung von Chloroform wurde anschließend mittels eines Rotationsverdampfers unter Argonatmosphäre durchgeführt. Hierzu wurde dieser zuerst durch das Verdampfen von Toluol und anschließend Ethylacetat von Wasserspuren befreit. Danach wurde das zuvor bereits abdestillierte CHCl<sub>3</sub> etwa 30 min bei Raumtemperatur und 500 mbar am Rotationsverdampfer über zuvor bei 300 °C ausgeheiztem Aluminiumoxid gerührt. Anschließend wurde es bei 40 °C und 350 mbar erneut abdestilliert. Der Auffangkolben wurde mit Parafilm versiegelt und das CHCl<sub>3</sub> unter Argonatmosphäre durch Anlegen eines leichten Unter-

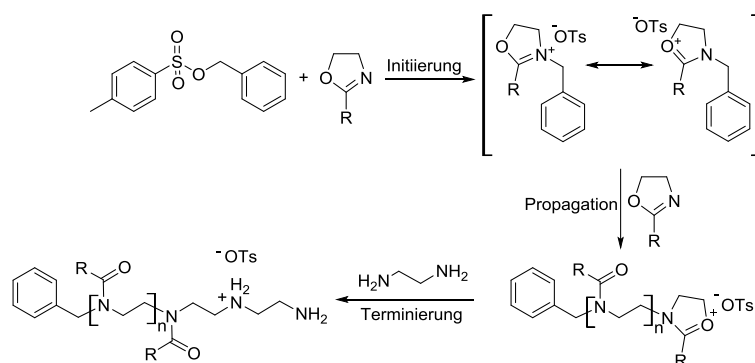
drucks mittels einer Transferkanüle in einen Schlenk Kolben transferiert, welcher zuvor mit bei 300 °C ausgeheiztem Molsieb (4 Å) befüllt wurde. Die Lagerung des getrockneten Chloroforms (< 0,1 ppm H<sub>2</sub>O, gemessen per KARL-FISCHER-Titration) erfolgte in einem abgedichteten Schlenk Kolben im Kühlschrank bei 4 °C.

### 6.2.3 Destillation von 2-Methyl-2-oxazolin

Die Destillationsapparatur wurde über Nacht in einem Trockenschrank bei 120 °C gelagert. Unmittelbar vor der Destillation wurde diese dreimalig unter Vakuum ausgeheizt und mit Argon gespült. Das 2-Methyl-2-oxazolin (MOx) wurde zunächst über CaH<sub>2</sub> bei 40 °C und einem Druck von 40 mbar destilliert. Hierbei wurden ca. 10 Vol.-% Vorlauf genommen welcher verworfen wurde. Anschließend wurde das Destillat erneut, jedoch ohne Zugabe von Calciumhydrid, destilliert. Es wurde eine transparente Flüssigkeit erhalten, welche bei -32 °C gelagert wurde.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): δ = 4,13 – 4,17 (t, J=9.4 Hz, 2 H, -O-CH<sub>2</sub>-); 3,70 – 3,77 (t, J=9.4 Hz, 2 H, -N-CH<sub>2</sub>-); 1,89 (s, 3 H, -CH<sub>3</sub>) ppm.

### 6.2.4 Polymerisation von 2-Methyl-2-oxazolin



Die kationische ringöffnende lebende Polymerisation von 2-Methyl-2-Oxazolin erfolgte in der Synthesemikrowelle nach einer literaturbekannten Prozedur<sup>123-124</sup>.

Aufgrund des lebenden Charakters der Polymerisation kann die gewünschte Kettenlänge ( $DP_{Set}$ ) der Poly-2-methyloxazoline (PMeOx) einfach über das Monomer-Initiator-Verhältnis eingestellt werden.

Hierbei gilt:

$$n_{Ketten} = n_I = \frac{m_{Monomer}}{DP_{Set} \cdot M_{Monomer}} \quad (5)$$

mit:  $n$  = Stoffmenge,  $m$  = Masse,  $M$  = molare Masse,  $DP$  = Polymerisationsgrad,  $I$  = Initiator

Die benötigte Masse ( $m$ ) des Initiators ( $I$ ), hier Benzyltosylat, kann anschließend wie folgt aus der Molmasse ( $M$ ) und der errechneten Stoffmenge ( $n$ ) ermittelt werden:

$$m_I = M_I \cdot n_I \quad (6)$$

mit:  $m$  = Masse,  $M$  = molare Masse,  $n$  = Stoffmenge

Die Molmasse des Initiators Benzyltosylat beträgt dabei 262,32 g/mol.

Für eine gewünschte Kettenlänge von 30 Monomereinheiten ( $DP_{Set} = 30$ ) wurden die in Tab. 6.4 dargestellten Mengen der Reagenzien verwendet.

Tab. 6.4: Verwendete Reagenzienmengen für die Polymerisation.

$M_{Monomer}$ [g/mol]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$V_{Monomer}$ [mL]	$m_I$ [mg]	$V_{Chloroform}$ [mL]
85,11	1	5,0	513,6	20

Unter Argonatmosphäre wurde zunächst das Monomer sowie anschließend das als Initiator verwendete Benzyltosylat bei Raumtemperatur in trockenem Chloroform (4 mL/g Monomer) gelöst. Die Polymerisation erfolgte in der Mikrowelle. Es wurden folgende Einstellungen verwendet (Tab. 6.5).

Tab. 6.5: Einstellungen der Synthesemikrowelle.

Temperatur [°C]	Ramp Time [min]	Hold [min]	Power Max	Stirring
100	3	40	off	low

Nach abgeschlossener Polymerisation wurde zur Terminierung 5 mL (42 eq. bezogen auf das Polymer) Ethylendiamin hinzugefügt und die Lösung bei 45 °C für 48 h unter Argonatmosphäre gerührt.

Anschließend wurde das so erhaltene Polymer 3 mal aus Diethylether/Chloroform (200 mL/30 mL) umgefällt. Nach jedem Umfällschritt wurde der Rückstand abzentrifugiert (5 min, 6000 rpm) und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde danach erneut in 30 mL Chloroform gelöst und das Polymer erneut durch Zugabe der Lösung zu Diethylether ausgefällt. Nach abschließender Entfernung des Lösungsmittels und Lösen des zurückbleibenden Feststoffs in Methanol wurde 48 h gegen zuvor abdestilliertes Methanol dialysiert (ZelluTrans V-Serie von Roth, Ausschlussgröße 1000 Da) um Reste nicht umgesetzten Amins zu entfernen. Hierzu wurde der Dialyseschlauch vor dem Einfüllen der Polymerlösung auf Methanol konditioniert. Dafür wurde die Membran zunächst in 50 mL Wasser vorgelegt und anschließend mit Hilfe eines Tropftrichters 50 mL Methanol unter Rühren langsam zugetropft. Dann wurde die Hälfte der so erhaltenen Lösung verworfen und erneut 50 mL Methanol zugetropft. Diese Prozedur wurde 5 mal wiederholt. Nach der Dialyse wurde das Lösungsmittel entfernt und das nach Trocknung erhaltene weiße Pulver wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie (Kapitel 6.7.2) sowie GPC (Kapitel 6.7.4) analysiert.

Ausbeute (nach Dialyse): 50-86 %

$\text{DP}_{\text{NMR}} = 30\text{-}35$ ,  $\text{DP}_{\text{GPC}} = 32\text{-}40$ ,  $\text{PDI}_{\text{GPC}} = 1,1\text{-}1,2$

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300MHz):  $\delta = 7,15 - 7,43$  (m, 5 H,  $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5, \text{Ar}$ );  $4,43 - 4,66$  (m, 2 H,  $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5, \text{Ar}$ );  $2,95 - 3,75$  (m, n·4 H,  $-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{-}$ );  $2,53 - 2,76$  (m, 6 H,  $-\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ );  $1,71 - 2,15$  (m, n·3 H,  $-\text{NCO-CH}_3$ ) ppm.

## 6.3 Funktionalisierung verschiedener Enzyme mit Poly-2-Methyloxazolin

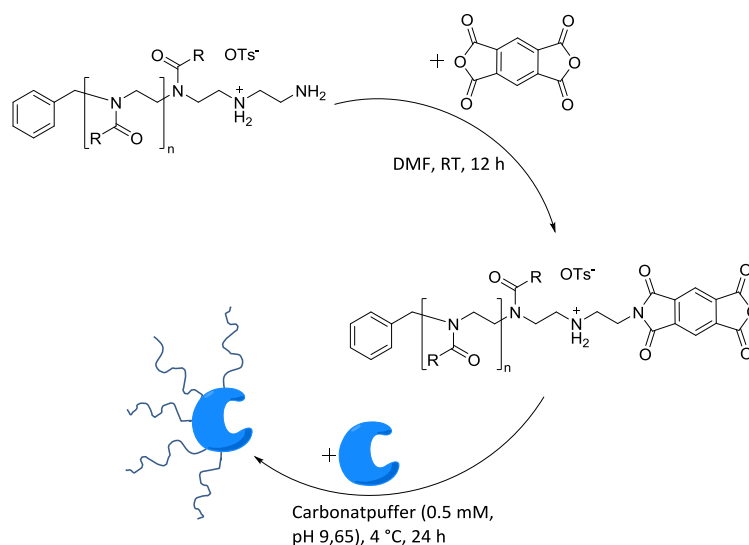
### 6.3.1 Trocknung von Dimethylformamid

Die Trocknung von Dimethylformamid (DMF) erfolgte mittels eines Rotationsverdampfers unter Argonatmosphäre. Dazu wurde dieser zunächst durch Verdampfung von Toluol und anschließend Ethylacetat von Wasserspuren befreit. Das DMF wurde zunächst für 45 min bei Raumtemperatur und 800 mbar über Phosphorpentoxid stark gerührt und anschließend unter



vermindertem Druck abdestilliert (53 °C, 15 mbar). Das erhaltene DMF wurde über  $K_2CO_3$  gegeben, welches zuvor bei 300 °C getrocknetes wurde, und anschließend erneut bei 53 °C und 15 mbar abdestilliert. Die Lagerung des getrockneten DMF erfolgte über bei 300 °C ausgeheiztem Molsieb (3 Å) in einem abgedichteten Schlenkcolben unter Argonatmosphäre bei 4 °C.

### 6.3.2 Enzymfunktionalisierung mit Poly-2-Methyloxazolin



Die Funktionalisierung von PMeOx mit verschiedenen Enzymen wurde nach einer Variante von KONIECZNY durchgeführt<sup>16-18</sup>.

Pyromellitsäuredianhydrid (PADA) (0,8 eq bezogen auf die eingesetzte Polymermenge) wurde unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem DMF gelöst. Die Lösung wurde zu der entsprechenden Menge PMeOx (10-facher Überschuss bezogen auf die primären Amin-Gruppen des Enzyms) gegeben und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Enzym in 1 mL 0,5 mM Phosphatpuffer (pH 9,7) gelöst. Die Reaktionslösung mit dem Polymer wurde hinzugegeben und für 24 h bei 4 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurde 72-96 h gegen bidestilliertes  $H_2O$  dialysiert (ZelluTrans V-Serie von Roth, Ausschlussgröße 10000 Da) um überschüssiges Polymer sowie DMF zu entfernen. Diese Laccase-Konjugate wurden vor der Verwendung bei der Dihydroxylierung zunächst 24 h gegen eine 10 mM wässrige EDTA-Lösung dialysiert und zur Entfernung des EDTA weitere 48 h gegen bidestilliertes Wasser. Der Rückstand wurde anschließend mittels Gefrierdrying getrocknet.

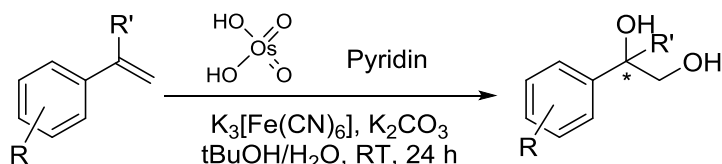
Eine Übersicht über die verwendeten Enzyme gibt Tab. 6.6.

Tab. 6.6: Verwendete Enzyme, deren molare Massen, primäre Aminogruppen.

Enzym	Organismus	Aminogruppen	$M_{\text{Enzym}}$ [kDa]
Albumin	Bovine serum	61 <sup>225</sup>	66,4 <sup>225</sup>
Catalase	Bovine liver	29 <sup>241</sup>	59,8 <sup>241</sup>
Laccase	<i>Trametes versicolor</i>	6 <sup>242</sup>	53,3 <sup>243</sup>
Lipase	<i>Candida rugosa</i>	21 <sup>244</sup>	57,1 <sup>244</sup>
Lipase B	<i>Candida antarctica</i>	10 <sup>245</sup>	33,2 <sup>245</sup>
Lipase	<i>Rhizomucor mihei</i>	8 <sup>246</sup>	39,4 <sup>247</sup>
Lysozym	Hühnereiweiß	7 <sup>223</sup>	14,3 <sup>248</sup>
Monoxygenase	<i>Bacillus megatrium</i>	71 <sup>249</sup>	117,7 <sup>249</sup>
Peroxidase	Meerrettich	7 <sup>250</sup>	44 <sup>250</sup>
Yqjm	<i>Bacillus subtilis</i>	20 <sup>251</sup>	37,6 <sup>251</sup>
DERA	<i>Escherichia coli</i>	20	27,7

## 6.4 Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-POx-Konjugaten

### 6.4.1 Dihydroxylierung von Alkenen mit Pyridin als Ligand und $K_3[Fe(CN)_6]$ als Kooxidationsmittel



Die Dihydroxylierungen von Alkenen wurden unter modifizierten Sharpless-Bedingungen<sup>186, 211, 216, 252</sup> durchgeführt.

Hierzu wurde  $K_2OsO_2(OH)_4$  (0,74 mg, 0,002 mmol) eingewogen, in Wasser (5 mL) durch starkes Rühren gelöst und mit  $K_3Fe(CN)_6$  (980 mg, 3 mmol) und  $K_2CO_3$  (410 mg, 3 mmol) versetzt. Zu der Lösung wurde *tert*-Butanol (5 mL), Pyridin (0,82  $\mu$ L, 0,01 mmol) und das entsprechende Styrolderivat (1 mmol) gegeben. Es wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Reaktionszeit wurden die Phasen getrennt und danach die wässrige Phase mit so viel gesättigter wässriger NaCl-Lösung versetzt bis sämtlicher Feststoff gelöst war. Die wässrige Phase wurde daraufhin dreimal mit 25 mL Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden mittels Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend wurde das Lösemittel mittels eines Rotationsverdampfers entfernt sowie das erhaltene Produkt am Feinvakuum getrocknet. Die Erhaltene Substanz mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (Kapitel 6.7.2) sowie HPLC (Kapitel 6.7.8) charakterisiert.

#### 1-(*p*-Toluy)ethan-1,2-diol:

Ausbeute: 77 %

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  = 7,206 – 7,227 ppm (d, 2 H,  $\text{CH}_3\text{C}_{\text{Ar}}(\text{CH}_{\text{Ar}}\text{CH}_{\text{Ar}})_2\text{C}_{\text{Ar}-}$ ); 7,103 – 7,123 ppm (d, 2 H,  $\text{CH}_3\text{C}_{\text{Ar}}(\text{CH}_{\text{Ar}}\text{CH}_{\text{Ar}})_2\text{C}_{\text{Ar}-}$ ); 5,129 ppm (m, 1 H,  $-\text{CH}(\text{OH})-$ ); 4,671 ppm (s, 1H,  $-\text{CH}_2(\text{OH})$ ); 4,481 – 4,512 ppm (t, 1H,  $-\text{CH}(\text{OH})-$ ); 3,390 – 3,406 ppm (d, 2H,  $-\text{CH}_2(\text{OH})$ ); 2,279 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}_{\text{Ar}-}$ ).

2-Phenylpropan-1,2-diol:

Ausbeute: 63 %

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta = 7,439 - 7,463$  ppm (m, 2 H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}(\text{CH}_{\text{Ar}}\text{CH}_{\text{Ar}})_2\text{C}_{\text{Ar}}^-$ );  $7,267 - 7,304$  ppm (m, 2 H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}(\text{CH}_{\text{Ar}}\text{CH}_{\text{Ar}})_2\text{C}_{\text{Ar}}^-$ );  $7,168 - 7,186$  ppm (m, 1 H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}(\text{CH}_{\text{Ar}}\text{CH}_{\text{Ar}})_2\text{C}_{\text{Ar}}^-$ );  $4,749$  ppm (bs, 2 H, OH),  $3,403$  ppm (s, 2 H,  $-\text{CH}_2^-$ ),  $1,389$  ppm (s, 3 H,  $-\text{CH}_3$ ).

1-(4-Chlorphenyl)ethan-1,2-diol:

Ausbeute: 56 %

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta = 6,513 - 6,567$  ppm (m, 4 H,  $\text{Cl-C}_{6,\text{Ar}}\text{H}_{4,\text{Ar}}^-$ );  $4,032$  ppm (s, 2 H, OH);  $3,853 - 3,877$  (t, 1 H,  $-\text{CH}(\text{OH})^-$ );  $2,761 - 2,825$  ppm (m, 2 H,  $-\text{CH}_2(\text{OH})$ ).

2,3-Dihydro-1H-inden-1,2-diol:

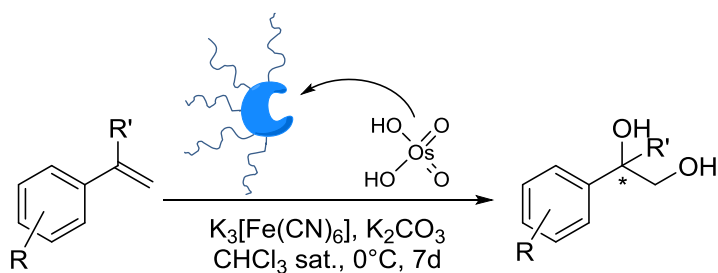
Ausbeute: 52 %

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta = 7,298 - 7,314$  ppm (m, 1 H,  $-\text{CH}_{\text{Ar}}\text{C}_{\text{Ar}}(\text{C}_{\text{Ar}})\text{CH}(\text{OH})^-$ );  $7,162 - 7,198$  ppm (m, 3 H,  $-(\text{C}_{3,\text{Ar}}\text{H}_{3,\text{Ar}})\text{CH}_{\text{Ar}}^-$ );  $4,956 - 4,970$  ppm (d, 1 H,  $-\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}(\text{OH})^-$ );  $4,765 - 4,788$  ppm (t, 1 H,  $-\text{CH}(\text{OH})^-$ );  $4,542 - 4,552$  ppm (d, 1H,  $-\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}(\text{OH})^-$ );  $4,241 - 4,278$  ppm (quin., 1 H,  $-\text{CH}(\text{OH})^-$ );  $2,900 - 2,943$  ppm (q, 1 H,  $-\text{C}_{\text{Ar}}\text{C}(\text{H})\text{H}'^-$ );  $2,748 - 2,787$  ppm (q, 1 H,  $-\text{C}_{\text{Ar}}\text{C}(\text{H})\text{H}'^-$ ).

### 6.4.2 Dihydroxylierung von Alkenen mittels PMeOx-Enzym-Konjugaten

Die Dihydroxylierungen von Alkenen mittels PMeOx-Enzym-Konjugaten wurden unter modifizierten Sharpless-Bedingungen<sup>186, 211, 216, 253</sup> durchgeführt.

#### 6.4.2.1 Dihydroxylierung mittels $K_2OsO_2(OH)_4$ und $K_3[Fe(CN)_6]$ als Kooxidationsmittel



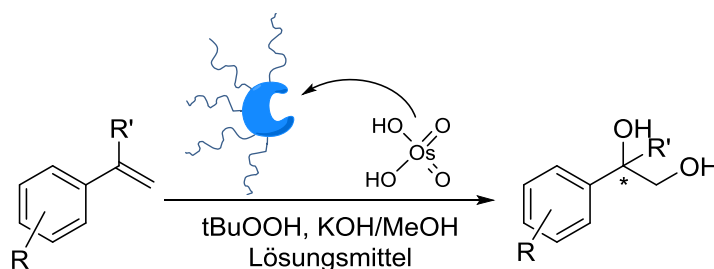
Es wurden die nach Aufarbeitung erhaltene Menge eines Enzym- PMeOx-Konjugates entsprechend 7 mg Enzym (Einwaage vor der Funktionalisierung) in 10 mL mit  $H_2O$  gesättigtem Chloroform (Wassergehalt ca. 1300 ppm, bestimmt per KARL-FISCHER-Titration) gelöst. Anschließend wurden 0,74 mg (0,002 mmol)  $K_2OsO_2(OH)_4$ , 410 mg (3 mmol)  $K_2CO_3$  und 980 mg (3 mmol)  $K_3Fe(CN)_6$  zugegeben und das Reaktionsgemisch auf  $0^\circ C$  abgekühlt. Jeweils zum Schluss erfolgte die Zugabe von 1 mmol des jeweiligen Alkens (Tab. 6.7). Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei  $0^\circ C$  für 7 Tage stark gerührt.

Nach der Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 700 mg (5,5 mmol) Natriumsulfit unter Erwärmung auf Raumtemperatur für 1 h gequenched. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der erhaltene Rückstand mit 25 mL  $H_2O$  aufgenommen und 4 mal mit 25 mL abdestilliertem Ethylacetat extrahiert. Der nach Trocknung erhaltene Feststoff wurde in Isopropanol gelöst und mittels HPLC (Kapitel 6.7.8) charakterisiert.

Tab. 6.7: Molare Masse, Dichte und verwendetes Volumen (1 mmol) verschiedener Alkene für die asymmetrische Dihydroxylierung.

Alken	Molare Masse[g/mol]	Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	Volumen [μL]
Styrol	104,14	0,91	115
α-Methylstyrol	118,18	0,91	130
4-Methylstyrol	118,18	0,90	131
4-Chlorstyrol	138,59	1,09	127
3-Bromstyrol	183,05	1,41	130
1H-Inden	116,16	0,99	117
1,2-Dihydronaphtalen	130,19	1,0	130
Allylphenylether	134,18	0,98	137

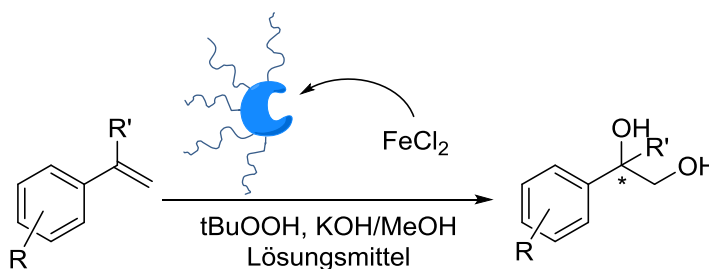
#### 6.4.2.2 Dihydroxylierung mittels $K_2OsO_2(OH)_4$ und *tert*-Butylhydroperoxid als Kooxidationsmittel – generelle Prozedur



Das jeweilige PEK (1eq.) wurde in 10 mL des jeweiligen Lösungsmittels gelöst und mit  $K_2OsO_2(OH)_4$  (1 mg/mL in MeOH) entsprechend des angestrebten Metall-zu-Protein-Verhältnisses versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 5 min auf die jeweilige Reaktionstemperatur temperiert. Danach wurden, falls nicht anders vermerkt, 1 mmol des jeweiligen Alkens (siehe Tab. 6.7) und 1,1 mmol TBHP (200 μL, einer 5,5 M Lösung in Decan) sowie, im Falle von Os-Laccase-PMOx, 200 μL einer gesättigten methanolischen KOH-Lösung hinzugegeben. Die Reaktionsdauer betrug 7 d bei 0 °C, 72 h bei 4 °C sowie 24 h bei 22 °C.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch durch einen Spritzenvorsatzfilter (PTFE, 0,2  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser) filtriert. Das Reaktionsgefäß wurde mit 5 mL des entsprechenden zur Reaktion verwendeten Lösungsmittels nochmals gespült und dieses wurde ebenfalls wie zuvor filtriert. Die organische Phase wurde im Anschluss daran dreimal mit jeweils 25 mL einer wässrigen Natriumthiosulfat-Lösung (1 M) ausgeschüttelt und im Scheidetrichter von der wässrigen Phase getrennt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurde danach noch dreimal mit 25 mL Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde nachfolgend mittels eines Rotationsverdampfers entfernt. Das resultierende Produkt wurde am Feinvakuum getrocknet und anschließend mittels HPLC (Kapitel 6.7.8) charakterisiert.

#### 6.4.2.3 Dihydroxylierung mittels PMeOx-funktionalisierter Enzyme mit Häm-Gruppe und *tert*-Butylhydroperoxid als Kooxidationsmittel

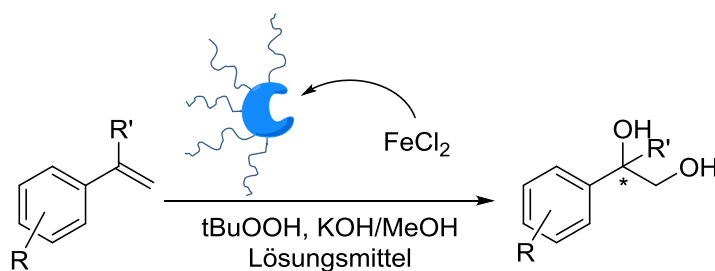


Es wurde jeweils ein Enzym-Ansatz entsprechend 7 mg Enzym (Einwaage vor der Funktionalisierung) zur Dihydroxylierung verwendet. Das Polymer-Enzym-Konjugat wurde zunächst in 10 mL des jeweiligen Lösungsmittels gelöst. Als Lösungsmittel wurden Chloroform, Dichlormethan oder bidest. Wasser verwendet. Danach wurden 115  $\mu\text{L}$  (1 mmol) Styrol oder 137,2  $\mu\text{L}$  (1 mmol) Allylphenylether hinzugefügt und anschließend 200  $\mu\text{L}$  (1,1 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid (5,5 M in Decan) langsam hinzugegropft. Die Reaktion erfolgte bei verschiedenen Temperaturen (RT, 0  $^\circ\text{C}$ ) und für verschiedene Zeiträume (2 d, 7 d). .

Zur Aufarbeitung wurden zunächst 5 mL wässrige Natriumthiosulfatlösung (1 M) zusammen mit dem Ansatz in einen 50 mL Kolben gegeben und für 5 Minuten kräftig gerührt. In einem Scheidetrichter erfolgte anschließend die Trennung der organischen von der wässrigen Phase. Die wässrige Phase wurde nachfolgend 3 mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden nachfolgend mit 20 mL bidest. Wasser gewaschen und danach wurde

das Lösungsmittel abdestilliert. Die getrocknete Probe wurde in 200  $\mu\text{L}$  Isopropanol gelöst und dann in ein Vial zur Analyse mittels HPLC (Kapitel 6.7.8) überführt.

#### 6.4.2.4 Dihydroxylierung mittels $\text{FeCl}_2$ und *tert*-Butylhydroperoxid als Kooxidationsmittel



Es wurde jeweils ein Enzym-Ansatz entsprechend 7 mg Enzym (Einwaage vor der Funktionalisierung) zur Dihydroxylierung verwendet. Das PMeOx-Enzym-Konjugat wurde in 10 mL wasser-gesättigtem Chloroform oder Dichlormethan gelöst. Anschließend wurde eine zum eingesetzten Enzym äquimolare Menge  $\text{FeCl}_2$  (1 mg/mL in MeOH) hinzugegeben. Anschließend wurden 115  $\mu\text{L}$  (1 mmol) Styrol oder 137  $\mu\text{L}$  (1 mmol) Allylphenylether dem Reaktionsansatz hinzugefügt und nachfolgend je 200  $\mu\text{L}$  (1,1 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid (5,5 M in Decan) langsam zugetropft. Die Reaktion erfolgte für 7 Tage bei 0 °C. Tab. 6.8 zeigt die verwendeten Enzymkonjugate und Reaktionsbedingungen. Die Aufarbeitung und Analytik erfolgte analog wie in Kap. 6.4.2.3 beschrieben.



Tab. 6.8: Reaktionsbedingungen für die Dihydroxylierung mittels FeCl<sub>2</sub>-Enzym-PMOx-Konjugaten.

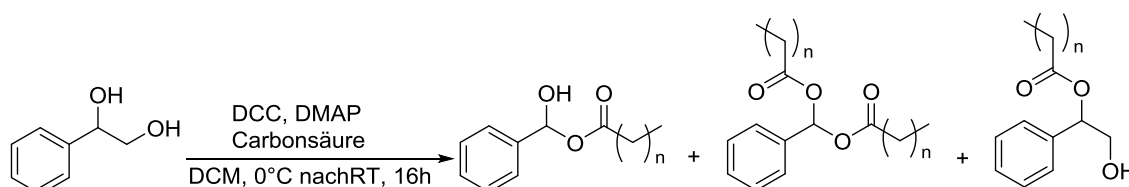
PMOx-Konjugat	n <sub>Enzym</sub> <sup>a</sup> [μmol]	Lösungsmittel	Alken
Kein Enzym	-	CHCl <sub>3</sub>	Styrol
		CHCl <sub>3</sub> <sup>b</sup>	Styrol
		CHCl <sub>3</sub>	Styrol
Laccase ( <i>Trametes versicolor</i> )	0,13	DCM <sup>b</sup>	Styrol
		DCM	Styrol
		DCM	Allylphenylether
BSA (Rinderserum)	0,11	CHCl <sub>3</sub>	Styrol
Lysozym (Hühnereiweiß)	0,49	CHCl <sub>3</sub>	Styrol
CaLB ( <i>Candida antarctica</i> )	0,12	DCM	Styrol

a: Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der eingesetzten Enzymmasse vor der Funktionalisierung

b: Reaktion ohne Zusatz von FeCl<sub>2</sub>

## 6.5 Tandemkatalyse

### 6.5.1 STEGLICH-Veresterung



Die Veresterungen wurde nach einem Protokoll nach STEGLICH durchgeführt<sup>217</sup>. Für die Veresterungen ohne Enzymbeteiligung wurde zunächst die entsprechende Fettsäure (siehe Tab. 6.9) in 10 mL trockenem Dichlormethan vorgelegt. Es wurden sowohl Reaktionen mit einem Äquivalent als auch zwei Äquivalenten der entsprechenden Fettsäure durchgeführt.

Zu dieser Lösung wurden anschließend 690 mg 1-Phenyl-1,2-ethandiol (5 mmol, 1 eq.) und 30 mg DMAP (0,25 mmol, 0,05 eq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin auf 0 °C abgekühlt. Danach wurden 2270 mg DCC (11 mmol, 2,2 eq.) zugefügt und die Reaktionslösung wurde für weitere fünf Minuten gerührt bevor das Eisbad entfernt und die Lösung über Nacht gerührt wurde. Nach der Reaktionszeit wurde der entstandene Feststoff abfiltriert und das erhaltene Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Der verbliebene Rückstand wurde

erneut in etwa 10 mL Dichlormethan aufgenommen und darauf folgend jeweils zweimal mit 0,5 M Salzsäure sowie gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfers entfernt. Die Ausbeuten der jeweiligen Reaktionen sind in Tab. 6.9 aufgelistet.

Tab. 6.9: Eingesetzte Massen bzw. Volumina der unterschiedlichen Fettsäuren sowie Gesamtausbeute der Reaktion bezogen auf alle 3 möglichen Regioisomere der gebildeten Ester.

Fettsäure	Äquivalente	Masse [g]	Stoffmenge [mmol]	Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	Volumen [μL]	Ausbeute [%]
Hexansäure	2	1,16	10	0,93	1250	30
	1	0,58	5	0,93	620	42
Octansäure	2	1,44	10	0,91	1580	55
	1	0,72	5	0,91	790	39
Laurinsäure	2	2,00	10	-	-	65
	1	1,00	5	-	-	44
Stearinsäure	2	2,84	10	-	-	61
	1	1,42	5	-	-	69

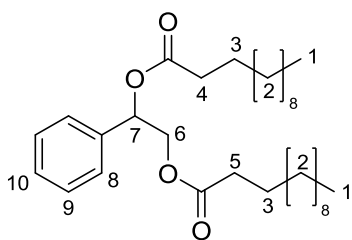
Die Erhaltenen Produkte wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie (Kapitel 6.7.2) sowie HPLC (Kapitel 6.7.8) analysiert.

Tab. 6.10: Messbedingungen der HPLC-Analytik. Zu den Messbedingungen und Retentionszeiten siehe Kapitel 6.7.8.2.

Fettsäure	Messbedingungen
Hexansäure	C
Octansäure	A
Stearinsäure	B
Laurinsäure	B

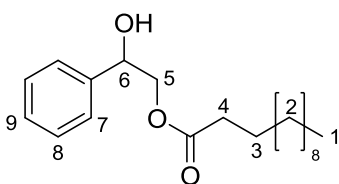
<sup>1</sup>H-NMR:

1-Phenylethan-1,2-dihexansäureethylester:



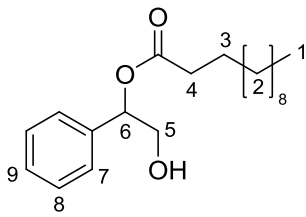
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta = 0,82 - 0,86$  (m, 6H, C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>), 1,16 – 1,31 (m, 32H, (C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)<sub>8</sub>), 1,45 – 1,57 (m, 4H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 2,26 (t, <sup>3</sup>J (H<sup>1</sup>-H) = 7,34 Hz, 2H, C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>), 2,35 (t, <sup>3</sup>J (H<sup>1</sup>-H) = 7,34 Hz, 2H, C<sup>5</sup>H<sub>2</sub>), 4,29 – 4,31 (m, 2H, C<sup>6</sup>H<sub>2</sub>), 5,96 (t, <sup>3</sup>J (H<sup>1</sup>-H) = 5,26 Hz, 2H, C<sup>7</sup>H), 7,33 – 7,39 (m, 5H, CH<sub>arom.</sub>).

2-Hydroxy-2-phenylethyllaurinsäureester:



<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta = 0,82 - 0,86$  (m, 3H, C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>), 1,16 – 1,31 (m, 16H (C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)<sub>8</sub>), 1,45 – 1,57 (m, 2H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 2,25 (t, 2 H, <sup>3</sup>J (H<sup>1</sup>-H) = 7,34 Hz, C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>), 4,02 – 4,10 (m, 2H, C<sup>5</sup>H<sub>2</sub>), 4,74 – 4,78 (m, 1H, C<sup>6</sup>H), 5,56 (d, 1H, <sup>3</sup>J (H<sup>1</sup>-H) = 4,40 Hz, OH), 7,26 – 7,38 (m, 5H, CH<sub>arom.</sub>).

## 2-Hydroxy-1-phenylethyllaurinsäureester:

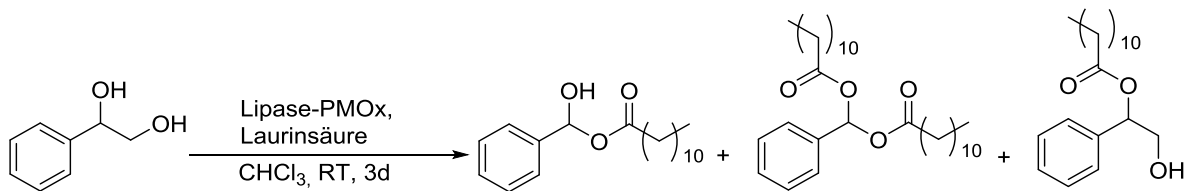


$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta = 0,82 - 0,86$  (m, 3H,  $\text{C}^1\text{H}_3$ ),  $1,16 - 1,31$  (m, 16H,  $(\text{C}^2\text{H}_2)_8$ ),  $1,45 - 1,57$  (m, 2H,  $\text{C}^3\text{H}_2$ ),  $2,35$  (t, 2H,  $^3J$  ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) =  $7,46$  Hz,  $\text{C}^4\text{H}_2$ ),  $3,54 - 3,67$  (m, 2H,  $\text{C}^5\text{H}_2$ ),  $5,02$  (t, 1H,  $^3J$  ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) =  $5,87$  Hz, OH),  $5,66 - 5,69$  (m, 1H,  $\text{C}^6\text{H}$ ),  $7,26 - 7,38$  (m, 5H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ).

Die NMR-Spektren für die Ester von Hexan-, Octan- und Stearinsäure gleichen den hier angegebenen Verbindungen in Bezug auf die chemische Verschiebung und werden deshalb nicht noch einmal separat aufgeführt. Lediglich die Integrale des zu „2“ gehörenden Signals unterscheiden sich hinsichtlich Ihrer Größe für die unterschiedlichen Fettsäuren.

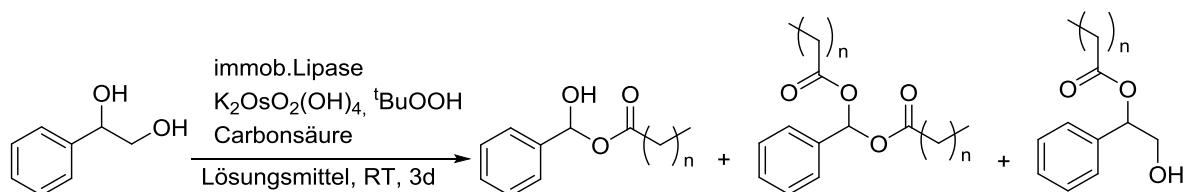
## 6.5.2 Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol

### 6.5.2.1 Testversuche zur Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit CaLB-PMOx



Es wurden  $0,13$  mmol Os-Lipase-PMOx  $10$  mL Chloroform gegeben und das Reaktionsgemisch anschließend für  $30$  min bei RT gerührt. Zum Reaktionsansatz wurden anschließend  $138$  mg 1-Phenyl-1,2-ethandiol ( $1$  mmol,  $1$  eq) und  $400$  mg Laurinsäure ( $2$  mmol,  $2$  eq) zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von  $3$  d bei RT wurde die organische Phase jeweils dreimal mit  $1$  M wässriger Natriumthiosulfat-Lösung und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen jeweils zweimal mit  $0,5$  M Salzsäure und gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen und danach mittels Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde mittels eines Rotationsverdampfers entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend in  $200$   $\mu\text{L}$  Isopropanol aufgenommen über einen Spritzenvorsatzfilter ( $0,2$   $\mu\text{m}$ , PTFE) filtriert. Das Produktgemisch wurde mittels HPLC (siehe Kapitel 6.7.8) analysiert.

## 6.5.2.2 Testversuche zur Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit immobilisierter CaLB



## 6.5.2.2.1 Variation der Fettsäuren

Für jeden der Reaktionsansätze wurden 69,1 mg 1-Phenyl-1,2-ethandiol (0,5 mmol, 1 eq.), die entsprechende Fettsäure (Tab. 6.11), 35 mg Novozyme 435 in 10 mL Chloroform in einem Schnappdeckelglas zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur gerührt und nach unterschiedlichen Zeiten wurden jeweils 1 mL der Lösung entnommen, um den Reaktionsfortschritt zu bestimmen. Die entnommenen Proben wurden durch einen Spritzenvorsatzfilter (PTFE, 0,2 µm Porengröße) filtriert und das Lösungsmittel anschließend mittels eines Rotationsverdampfers entfernt sowie der verbliebene Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Die erhaltene Substanz wurde in 0,2 mL *n*-Heptan/Isopropanol (9/1) aufgenommen, in ein Vial überführt und mittels HPLC (siehe Kap.6.7.8.2) analysiert. Für das Produkt der Reaktion mit Octansäure wurden abweichend davon 0,2 mL Isopropanol verwendet.

Tab. 6.11: Eingesetzte Massen bzw. Volumina in den unterschiedlichen Reaktionsansätzen.

Fettsäure	Eingesetzte Äquivalente	Masse [mg]	Stoffmenge [mmol]	Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	Volumen [mL]
Hexansäure	2	116,1	1	0,93	0,12
Octansäure	2	144,2	1	0,91	0,16
Laurinsäure	2	200,3	1		

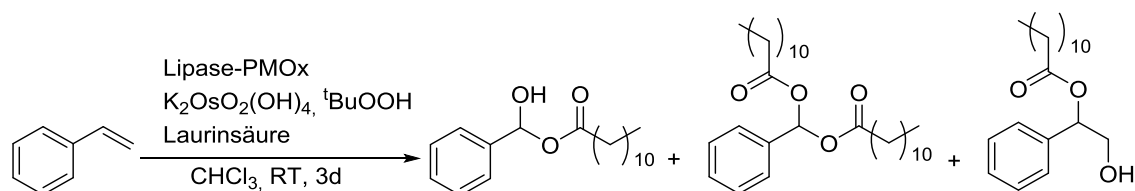
## 6.5.2.2.2 Variation des Lösungsmittels

Grundsätzlich wurde genauso verfahren wie bereits in Kapitel 6.5.2.2.1 beschrieben. Es wurden hierbei 200,3 mg Laurinsäure (1 mmol, 2 eq.) verwendet. Als Lösungsmittel wurden Chloroform, Toluol, sowie ein Gemisch dieser beiden Solventien eingesetzt.

Die Rückstände der genommenen Proben wurden in 0,2 mL Heptan/Isopropanol (9/1) aufgenommen und vor der Überführung in ein Vial durch einen Spritzenvorsatzfilter (PTFE, 0,2 µm

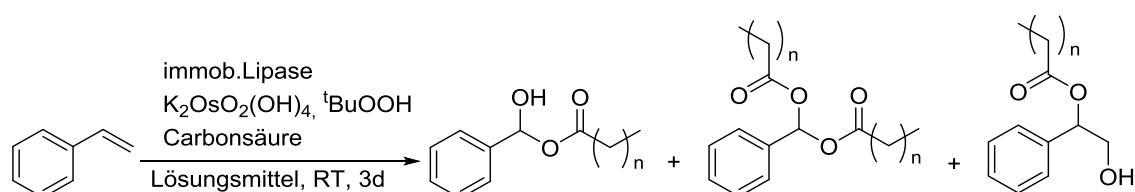
Porengröße) filtriert. Anschließend erfolgte eine Analyse mittels HPLC (siehe Kapitel 6.7.8.2, Messbedingung B).

### 6.5.3 Tandemreaktionen ausgehend von Styrol mit Os- Lipase-PMOx - generelle Prozedur



Es wurden 0,13 mmol Os-Lipase-PMOx und  $K_2OsO_2(OH)_4$  (aus einer Stammlösung: 1 mg/mL in MeOH, 0,5 – 2 eq., 0,07-0,26  $\mu$ L) in 10 mL Chloroform vermischt und das Reaktionsgemisch anschließend für 30 min bei RT gerührt. Zum Reaktionsansatz wurden anschließend 115  $\mu$ L Styrol (1 mmol, 1 eq.), 400 mg Laurinsäure (2 mmol, 2 eq.) sowie 200  $\mu$ L TBHP (5,5 M in Decan, 1,1 mmol, 1,1 eq.) zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 3 d bei RT wurde die organische Phase jeweils dreimal mit 1 M wässriger Natriumthiosulfat-Lösung und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen jeweils zweimal mit 0,5 M Salzsäure und gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen und danach mittels Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde mittels eines Rotationsverdampfers entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde anschließend in 200  $\mu$ L Isopropanol aufgenommen über einen Spritzenvorsatzfilter (0,2  $\mu$ m, PTFE) filtriert. Das Produktgemisch wurde mittels HPLC (siehe Kapitel 6.7.8.2) analysiert.

### 6.5.4 Tandemreaktionen ausgehend von Styrol mit immobilisierter Lipase - generelle Prozedur

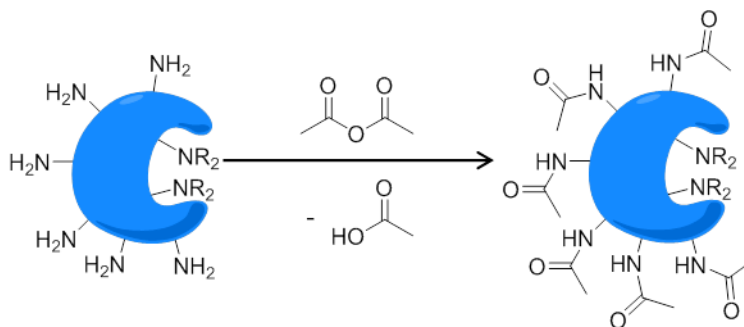


Es wurden 77,7  $\mu$ L einer Stammlösung von  $K_2[OsO_2(OH)_4]$  in Methanol (1 mg/mL, 1 eq. bezogen auf das Enzym) in ein Schnappdeckelglas gegeben und darauf folgend das Lösungsmittel in Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde entweder in 10 mL Toluol, 10 mL Chloro-

form oder 10 mL Toluol/Chloroform (Mischungsverhältnis 2 zu 1) aufgenommen und Novozym 435 (35 mg, 1 eq. bezogen auf das Osmat unter der Annahme von 20 % Enzymgehalt<sup>83</sup>) hinzugefügt. Die Lösung wurde daraufhin für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 57  $\mu$ L Styrol (0,5 mmol, 1 eq.), 200 mg Laurinsäure (1 mmol, 2 eq.) sowie 100  $\mu$ L TBHP (0,55 mmol, 1,1 eq., 5,5 M in Decan) zugegeben und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 3 d gerührt. Nach der Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch vom Feststoff befreit und danach jeweils dreimal mit Natriumthiosulfat-Lösung (1 M) und Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organische Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfers entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 200  $\mu$ L eines Lösungsmittelgemischs aus *n*-Heptan und Isopropanol (9/1) aufgenommen und mittels HPLC (siehe Kap. 6.7.8.2) charakterisiert.

## 6.6 Asymmetrische Katalyse mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten

### 6.6.1 Funktionalisierung von Proteinen mittels verschiedener Anhydride

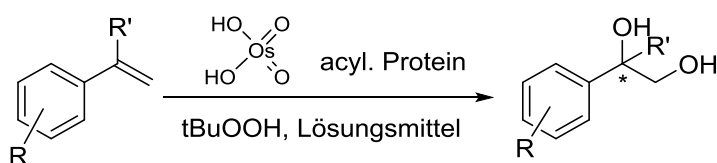


Die Modifizierung von Proteinen mit verschiedenen Carbonsäureanhydriden wurde nach einem angepassten literaturbekanntem Protokoll zur *N*-Acetylierung durchgeführt<sup>219</sup>.

Zunächst wurden hierzu 0,3  $\mu$ mol des Proteins (4,2 mg für Lysozym, 19,9 mg für BSA) in 3 mL bidest. Wasser gelöst und für die Funktionalisierung mit Essigsäure- bzw. Propionsäureanhydrid auf 4 °C abgekühlt. Die Modifikation mit Hexansäureanhydrid wurde aufgrund der besseren Suspendierbarkeit bei RT durchgeführt. Für das Erstellen der Funktionalisierungskurven von LYS und BSA wurde der 1-100-fache molare Überschuss an Carbonsäureanhydrid pro freier

Amingruppe des Proteins dem Reaktionsgemisch hinzugeben. Die Reaktion fand bei 4 °C bzw. RT unter starkem Rühren für 20 Minuten statt. Der Funktionalisierungsgrad wurde mit Hilfe des TNBS-Assays bestimmt (Kap.6.7.5). Der gewünschte Funktionalisierungsgrad der Enzymkonjugate wurde im Folgenden gemäß der erhaltenen Funktionalisierungskurve (Kap. 4.3.1) über die Zugabe der Menge an Carbonsäureanhydrid eingestellt. Nach der Reaktion wurde das Proteinkonjugat durch Lyophilisation als weißes Pulver erhalten. Danach wurde die Substanz erneut in Wasser suspendiert und mit wässrigen NaOH und HCl Lösungen (0,01 M) auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und anschließend erneut gefriergetrocknet.

### 6.6.2 Dihydroxylierung mittels Os-Protein-Acyl-Konjugaten



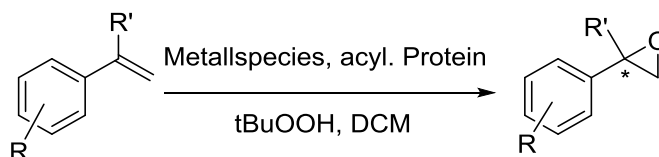
Die Dihydroxylierung wurde nach einer modifizierten Methode nach SHARPLESS durchgeführt<sup>186, 211, 216, 252</sup>. Für die Dihydroxylierung wurden 0,3 µmol des entsprechenden acylierten Proteins in 10ml des Lösungsmittels (Chloroform oder Toluol) gegeben und gerührt. Danach wurde Kaliumosmat (als Stammlösung in Methanol mit der Konzentration  $c = 1 \text{ mg/mL}$ , 11 µL für ein MPV von 1) hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 5 min auf die jeweilige Reaktionstemperatur temperiert. Danach wurden 1 mmol des jeweiligen Alkens (115 µl für Styrol, vgl. Tab. 6.7) und 1,1 mmol TBHP (200 µl, einer 5,5 M Lösung in Decan) hinzugegeben. Die Reaktionsdauer betrug 7 d bei 0 °C, 72 h bei 20 °C sowie 24 h bei 40 °C und 50 °C.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch durch eine Spritze mit einem Spritzenvorsatzfilter (PTFE, 0,2 µm Porendurchmesser) filtriert, um das ungelöste Enzym zu entfernen. Das Reaktionsgefäß wurde mit 5 mL des entsprechenden zur Reaktion verwendeten Lösungsmittels gespült und ebenfalls wie zuvor filtriert. Die organische Phase wurde im Anschluss daran zwei Mal mit jeweils 10 mL einer wässrigen Natriumthiosulfat-Lösung (1 M) ausgeschüttelt und im Scheidetrichter von der wässrigen Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde danach noch dreimal mit 10 mL des entsprechenden Lösungsmittels gewaschen. Die verei-



nigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde nachfolgend mittels eines Rotationsverdampfers entfernt. Das resultierende Produkt wurde am Feinvakuum getrocknet und anschließend mittels HPLC (Kapitel 6.7.8) charakterisiert.

### 6.6.3 Epoxidierung mittels Metall-Protein-Acyl-Konjugaten



Das acylierte Protein (0,3  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 5 mL Dichlormethan dispergiert. Anschließend wurde  $\text{RuCl}_3$ ,  $\text{Ti}(\text{OMe})_4$  oder  $\text{Mn}(\text{OAc})_2$  (1mg/mL in MeOH, 0,3  $\mu\text{mol}$  für ein MPV = 1) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 5 min auf die jeweilige Reaktionstemperatur temperiert. Nachfolgend wurden dem Reaktionsansatz 1 mmol des jeweiligen Alkens (115  $\mu\text{l}$  für Styrol, siehe Tab. 6.7) und 1,1 mmol t-Butylhydroperoxid (200  $\mu\text{l}$ , einer 5,5 M Lösung in Decan) zugefügt. Die Reaktionsdauer betrug 7 d bei 0  $^\circ\text{C}$ , 72 h bei 20  $^\circ\text{C}$  sowie 24 h bei 40  $^\circ\text{C}$  und 50  $^\circ\text{C}$ .

Nach der jeweiligen Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters (PTFE, 0,2  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser) filtriert, um das ungelöste Enzym zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde anschließend mittels eines Rotationsverdampfers vollständig entfernt. Die erhaltene Substanz wurde nachfolgend mittels HPLC (Kapitel 6.7.8) charakterisiert.

## 6.7 Analytik und Geräteparameter

### 6.7.1 Dynamische Lichtstreuung

Die DLS-Messungen wurden mittels eines Zetasizer nano S (Tab. 3.5), temperiert auf 25 °C, durchgeführt. Die Äquilibrierungszeit vor der Messung betrug 3 min. Die Proben wurden in reinem Lösungsmittel in zwei Zyklen vermessen.

### 6.7.2 Kernspinresonanzspektroskopie

Die  $^1\text{H}$ -NMR Spektren wurden in deuterierten Lösungsmitteln an FT-Geräten der Firma Bruker (DPX-200 (200 MHz), DPX-300 (300 MHz), DRX-400 (400MHz), DRX-500 (500 MHz)), ausgestattet mit einem 5 mm Probenkopf bei Raumtemperatur in deuterierten Lösungsmitteln aufgenommen. Hierbei dienten die restlichen Protonen der nicht vollständig deuterierten Lösungsmittel als Referenz. Die Probenkonzentrationen lagen in einem Bereich zwischen 10 und 100 mg/mL. Die aufgeführten chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Software NMR Processor Academic Edition (ACD Labs) in der Version 12.0.

### 6.7.3 Gefriertrocknung

Die Lyophilisierung erfolgte an einer Gefriertrocknungsanlage vom Typ Alpha 1-4 LDplus der Firma Christ. Das Wasser sublimiert hier bei einer Temperatur von  $-56\text{ °C}$  unter einem Druck von 0,05 mbar. Um das Wasser zu entfernen, wurde die Lösung in einen Rundkolben überführt, der Inhalt schnell im flüssigen Stickstoff eingefroren und an die Gefriertrocknungsanlage angeschlossen. Befand sich die Probe in einem Schnappdeckelglas mit einem maximalen Fassungsvermögen von 10 mL, wurde der Deckel perforiert und der Inhalt des Glases im flüssigen Stickstoff eingefroren. Das Glas wurde anschließend in einen Rundkolben überführt und dieser wurde an die Gefriertrocknung angeschlossen.

### 6.7.4 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die GPC-Messungen erfolgten mit einer GPCmax VE 2001 Gel-Permeations-Chromatographie-Apparatur. Es wurde ein VE 3580 28 RI DETECTOR bei einer Temperatur von 55 °C verwendet. Der Ofen hatte eine Temperatur von 60 °C. Bei den zwei eingesetzten Säulen (Tosoh

---

Bioscience) handelte es sich um Mixed-Bed-Säulen des Modells TSKgel GMHhr-M. Als Vorsäule wurde eine Column-Guard von Viscotek verwendet. Die Apparatur besitzt eine Auflösung von ca. 1500 bis vier Millionen Da. Die Messung erfolgte über den Brechungsindex mit Polystyrol als Standard. Als Probenlösungsmittel sowie mobile Phase diente DMF mit 20 mmol Lithiumbromid mit einer Flussrate von von 0,7 mL/min. Die Auflösung beträgt 1500 bis vier Millionen Da. Die Messung erfolgte über den Brechungsindex mit Polystyrol als Standard.

Einen Tag vor der Messung wurde eine Probe on 0,6 mg PMOx in 100 µL DMF gelöst. Vor der Messung wurde diese Lösung mit einem Spritzenfilter filtriert (0,2 µm, PTFE).

### 6.7.5 Bestimmung der Anzahl freier primärer Aminogruppen

Um die Anzahl an freien Aminogruppen in einem Protein zu bestimmen, wurde eine modifizierte Variante eines literaturbekannten TNBS-Assays verwendet<sup>222, 254</sup>. Hierzu wurde zunächst ein Natriumbicarbonatpuffer (0,1 M, pH 8,5) hergestellt. Eine 5 %ige (w/v) Lösung von 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) in Methanol wurde 500-fach mit dem zuvor hergestellten Puffer verdünnt. Es ergibt sich eine 0,01 %ige TNBS-Lösung. Diese Lösung muss stets frisch angesetzt werden.

Zu 100 µL der Proteinlösung (1,4 mg/mL in Wasser) wurden 400 µL Bicarbonatpuffer sowie 250 µL 0,01 % TNBS-Lösung gegeben. Dieses Gemisch wurde anschliesend im vorgewärmten Thermomixer bei 40 °C und 650 rpm für 120 min inkubiert. Danach wurden der Probe 250 µL einer 10 Gew.-%igen wässrigen SDS-Lösung sowie 125 µL einer 1M Salzsäure-Lösung hinzupipetiert und die Probe wurde zudem mehrmals invertiert.

Die Absorption der resultierenden Lösung wurde am Zweistrahlphotometer bei 346 nm und 25 °C bestimmt. Die Blindprobe enthielt 100 µL Wasser anstelle der Proteinlösung. Die Messung erfolgte gegen bidest. Wasser. Die Berechnung der Anzahl freier primärer Aminogruppen erfolgte nach dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz:

$$\text{freie NH}_2 = \frac{E_{346 \text{ nm}} \cdot V_{\text{Probe}} \cdot M_{\text{Protein}}}{\varepsilon \cdot d \cdot m_{\text{Protein}}}$$

mit:

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

$V_{\text{Probe}}$  = Volumen der Probe (1,125 mL)

$M_{\text{Protein}}$  = Molekulargewicht des Proteins

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient nach KONIECZNY (14600 mLmmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)<sup>17</sup>

$d$  = Durchmesser der Küvette (hier 1 cm)

$m_{\text{Protein}}$  = Masse des Proteins

### 6.7.6 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die kommerziell erhältliche Arbeitslösung Roti-Nanoquant von Roth verwendet. Diese beruht auf einer modifizierten Variante der Proteingehaltsbestimmung nach BRADFORD<sup>255</sup>. Zunächst wurde diese Lösung 1:5 mit bidest. Wasser verdünnt. Anschließend wurden 200 µL der Probe mit 800 µL der verdünnten Arbeitslösung versetzt und die beiden Lösungen wurden danach durch mehrmaliges Invertieren des Gefäßes vermischt. Nachfolgend wurde die Extinktion der Probe (590 nm sowie 450 nm) bei 25 °C gegen Wasser als Referenz bestimmt und der Quotient dieser beiden Werte ermittelt. Die Kalibriergerade wurde durch Auftragung des Quotienten der Extinktion bei 590 nm und 450 nm gegen den Proteingehalt von Standardlösungen (1-100 µg/mL BSA in bidest Wasser) und eines Nullwertes ohne Protein mittels linearer Regression erhalten.

### 6.7.7 Aufreinigung von Proteinen

Die Laccase aus *Trametes versicolor* (Sigma Aldrich) wurde mit einem Fast Protein Liquid Chromatographie-System (Äkta Start, GE Healthcare, das mit einer HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR Gelfiltrationssäule ausgestattet war mit Phosphatpuffer (50 mM, 150 mM NaCl, pH 7) als Elutionsmitte aufkonzentriert, gefolgt von anschließendem Entsalzen und Lyophilisieren. Die Laccaseaktivität des resultierenden Feststoffs (Proteingehalt 30 Gew.-%) wurde zu 12370 U/mg mit 2,6-Dimethoxyphenol als Substrat photometrisch gemessen (25 °C, pH 4,5, Acetatpuffer, 1 U ist definiert als Extinktionszunahme von 0,001 pro Minute). Das Substrat wurde hierzu mit der Konzentration 2 mg/mL in einem 10 mM Acetatpuffer (pH 4,5) zunächst gelöst. Anschließend wurden von der Lösung 980 µL in eine Küvette überführt und mit 20 µL der enzymhaltigen Probenlösung versetzt. Danach wurden die Extinktionen bei einer Wellen-

länge von 468 nm für 60 min an dem Zweistrahl-UV/VIS-Spektrometer Specord 210 der Firma Analytik Jena bei 25 °C vermessen.

Zur Aufkonzentrierung der CaLB aus zuckerhaltiger Lösung (Sigma) wurde Wasser als mobile Phase verwendet.

### 6.7.8 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Messungen wurden mit einem „LaChrome Elite“ System der Firma Hitachi (Tokio, Japan) durchgeführt. Dieses war ausgestattet mit einem Autosampler, einem Säulenofen, einem Diodenarraydetektor und einer Pumpe.

#### 6.7.8.1 Dihydroxylierung von Alkenen

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (*enantiomeric excess, ee*) wurde eine chirale Säule Chiralpack IC der Firma Daicel Chemical Industries Ltd. verwendet. Die Säulentemperatur betrug 8 °C. Die Injektion der Proben erfolgte mit Isopropanol und als mobile Phase wurde ein Gemisch aus 90 % *n*-Heptan und 10 % Isopropanol verwendet. Die Flussrate betrug von 0,5 mL/min für die Diolen ausgehend von Styrol, 3-Bromstyrol sowie 1H-Inden und 0,25 mL/min für 4-Chlorstyrol. Die Messung erfolgte mittels eines Diodenarraydetektors. Die Aufnahme des Chromatogramms erfolgte für 1-Phenyl-1,2-ethandiol bei 216 nm bzw. 254 nm. Für das Diol aus 4-Methylstyrol wurde ein Gemisch aus 98 % *n*-Heptan und 2 % Isopropanol bei 210 nm verwendet.

Alternativ kann die Bestimmung der Umsatzzahl (*turn-over-number, TON*) mittels einer Purospher RP-18 Säule der Firma Merck Millipore durchgeführt werden. Die Probeninjektion erfolgte mittels bidest. Wasser und als mobile Phase diente ein Gemisch aus bidest. Wasser und Acetonitril bei einem Fluss von 1 mL/min mit dem folgenden Gradienten: Initial 10 % Acetonitril (5 Minuten), danach wurde das Verhältnis über 10 Minuten auf 90 % Acetonitril erhöht und für weitere 5 Minuten gehalten. Anschließend wurde über 5 Minuten wieder auf 10 % Acetonitril verringert und erneut 5 Minuten gehalten. Die Messung erfolgte mit einem Diodenarraydetektor bei 210 nm.

#### 6.7.8.2 Tandemkatalyse

Zur Detektion der entstandenen Ester wurde ein Laufmittelegemisch aus *n*-Heptan und Isopropanol in unterschiedlichen Verhältnissen verwendet. Eine Aufstellung der verwendeten Messparameter, der Säulentemperatur sowie die Flussrate des Laufmittels ist in Tab. 6.12 dargestellt. Die Detektion der Produkte erfolgte stets bei einer Wellenlänge 254 nm.

---

Tab. 6.12: Übersicht über die verwendeten Parameter der verschiedenen Messmethoden zur Detektion der Carbonsäureester. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Methode	Verhältnis <i>n</i> -Heptan/ <i>iso</i> -Propanol	Fließgeschwindigkeit [mL/min]	Temperatur [° C]
A	9:1	0.25	20
B	9:1	0.5	8
C	93:7	0.5	8

Tab. 6.13: Auflistung der Retentionszeiten für die unterschiedlichen Produktester. Die absolute Konfiguration der einzelnen Enantiomere wurden nicht aufgeklärt (1 = Enantiomer mit der geringeren Retentionszeit, 2 = Enantiomer mit der höheren Retentionszeit). Die verwendeten Messbedingungen sind in Tab. 6.12 näher erläutert.

Carbonsäure	Retentionszeiten [min]					
	prim. Ester 1	prim. Ester 2	sec. Ester 1	sec. Ester 2	Diester 1	Diester 2
Hexansäure	16,41	18,76	18,11	22,84	10,31	10,63
Octansäure	23,82	25,50	24,79	27,26	17,28	17,58
Laurinsäure	12,04	13,55	12,62	15,79	8,30	8,52
Stearinsäure	10,57	11,69	10,95	12,96	7,74	

### 6.7.8.3 Epoxidierung von Alkenen

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde die chirale Säule Chiralpack IC der Firma Daicel Chemical Industries Ltd. verwendet. Die Säulentemperatur betrug 8 °C. Die Injektion der Proben erfolgte mit Isopropanol und als mobile Phase wurde ein Gemisch aus 90 % *n*-Heptan und 10 % Isopropanol verwendet. Die Flussrate betrug 0,5 mL/min. Die Messung erfolgte mittels eines Diodenarraydetektors. Die Aufnahme des Chromatogramms erfolgte bei 254 nm.

---

## 7 Abstract

The aim of this work was the generation of artificial metalloenzymes (AMEs) for use in organic solvent systems and the optimization of such reactions.

The asymmetric dihydroxylation of styrene with Osmate-laccase-PMOx as AME was studied in detail to find more suitable reaction conditions for this reaction. By optimizing different reaction parameters, it was possible to increase the turnover frequency up to 48-fold compared to the previously used reaction system and to achieve high enantiomeric excesses of up to 99.4% ee (R) of the reaction product. The reaction can also be catalyzed under the usage of other metal species, especially  $\text{KMnO}_4$  and iron chloride. In addition, other styrene derivatives could be converted with different AMEs. Thereby turnover and selectivity of the reaction strongly depends on both the AME and the solvent system used.

Furthermore a tandem catalytic dihydroxylation with subsequent esterification could be successfully performed by immobilized Osmat-modified lipase from *Candida antarctica* as well as by Os-lipase-PMOx. Further investigations suggest that this reaction is an auto-tandem catalysis. The proportion of in situ formed intermediate 1-phenyl-1,2-ethanediol in the product mixture is less than 5% in all cases.

In addition, proteins and enzymes have been converted into highly selective and active AMEs for asymmetric dihydroxylation and epoxidation of styrene and its derivatives by targeted acylation of the primary amino groups of these biomolecules and thus blocking of these potential metal-binding sites. Thereby it could be shown on the example of the asymmetric epoxidation that lysozyme from egg white as well as bovine serum albumin possess different enantioselective directing binding sites for catalytically active metal species. This demonstrates that proteins are very rich in different chiral domains suitable for complexation with various catalytically active metal species and underlines the great potential of such systems in the development of novel asymmetric catalysts.

---





## 8 Kurzzusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Generierung artifizierlicher Metalloenzyme für den Einsatz in rein organischen Lösungsmittelsystemen sowie die Optimierung solcher Reaktionssysteme.

Es wurde zunächst die asymmetrische Dihydroxylierung von Styrol unter Verwendung von Osmat-Laccase-PMOx als artifizielles Metalloenzym (AME) im Detail untersucht, um günstigere Reaktionsbedingungen für diese Umsetzung zu ermitteln. Durch die Optimierung verschiedener Reaktionsparameter konnte ein bis zu 48-facher Anstieg der *turnover frequency* im Vergleich zum zuvor verwendeten Reaktionssystem erreicht werden. Zudem wurden sehr hohe Enantiomerenüberschüssen von bis zu 99,4 % *ee* (R) des Reaktionsproduktes 1-Phenyl-1,2-ethandiol erhalten. Die Dihydroxylierung von Styrol lässt sich auch unter Verwendung weiterer Metallspezies, insbesondere Kaliumpermanganat und Eisenchlorid, erfolgreich katalysieren. Des Weiteren konnten auch mehrere weitere Styrolerivate unter Verwendung unterschiedlicher AMEs erfolgreich umgesetzt werden. Dabei hängen Umsatz sowie Selektivität der Reaktion stark sowohl vom verwendeten AME als auch Lösungsmittelsystem ab.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin eine tandemkatalytische Dihydroxylierung mit anschließender Veresterung sowohl mit Hilfe von immobilisierter, Osmat-modifizierter Lipase aus *Candida antarctica* (Os-CaLB) als auch mittels Os-Lipase-PMOx erfolgreich durchgeführt werden. Weiterführende Untersuchungen legen nahe, dass es sich hierbei um eine Auto-Tandemkatalyse handelt. Der Anteil des in situ gebildeten Zwischenproduktes 1-Phenyl-1,2-ethandiol im Produktgemisch beträgt dabei in allen Fällen weniger als 5 %.

Zudem wurden verschiedene Proteine und Enzyme über eine gezielte Acylierung der primären Aminogruppen dieser Biomoleküle, und somit deren Blockierung als potenziell nicht enantioselektiv dirigierende Metallbindungsstellen, in hochselektive und -aktive AMEs für die asymmetrische Dihydroxylierung sowie Epoxidierung von Styrol und seinen Derivaten konvertiert. Hierbei konnte am Beispiel der asymmetrischen Epoxidierung gezeigt werden, dass Lysozym aus Hühnereiweiß sowie Rinderserumalbumin mit hoher Wahrscheinlichkeit mehrere enantioselektiv dirigierende Bindungsstellen für katalytisch aktive Metallspezies besitzen. Dies verdeutlicht, dass Proteine sehr reich an unterschiedlichen chiralen Bereichen sind, die sich zur Komplexierung mit verschiedenen katalytisch aktiven Metallspezies eignen und unterstreicht das große Potential solcher Systeme bei der Entwicklung neuer asymmetrischer Katalysatoren.



## 9 Literatur

1. Hagen, J., Einführung. In *Technische Katalyse*, VCH Verlagsgesellschaft mbH: 2008; pp 1-15.
2. Röper, M., Homogene Katalyse in der Chemischen Industrie. Selektivität, Aktivität und Standzeit. *Chemie in unserer Zeit* **2006**, *40* (2), 126-135.
3. Ariëns, E. J., Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *European Journal of Clinical Pharmacology* **1984**, *26* (6), 663-668.
4. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2011; p 423.
5. Breuer, M.; Stürmer, R., Chemie und Biologie Hand in Hand. Enzyme als Katalysatoren. *Chemie in unserer Zeit* **2006**, *40* (2), 104-111.
6. Pilz, G., *Biotechnologie: Anwendung, Branchenentwicklung, Investitionschancen*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag: München, 2010.
7. Heiden, S. Z., H., *Weißer Biotechnologie: Industrie im Aufbruch*. BIOCUM Media GmbH: 2006.
8. Wan, Y.-Y.; Lu, R.; Xiao, L.; Du, Y.-M.; Miyakoshi, T.; Chen, C.-L.; 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* (4), 488-495.
9. Klibanov, A. M., Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **2001**, *409* (6817), 241-246.
10. Klibanov, A. M., Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in biotechnology* **1997**, *15* (3), 97-101.
11. Zaks, A.; Klibanov, A. M., Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263* (7), 3194-3201.
12. Zaks, A.; Klibanov, A. M., Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science* **1984**, *224*, 1249-1252.
13. Carrea, G.; Riva, S., Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese. *Angewandte Chemie* **2000**, *112* (13), 2312-2341.
14. Carrea, G.; Ottolina, G.; Riva, S., Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends in Biotechnology* **1995**, *13* (2), 63-70.
15. Sharma, S.; Kanwar, S. S., Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. *The Scientific World Journal* **2014**, *2014*, 15.
16. 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* (0), 55-63.
17. Konieczny, S., *Organolösliche Polymer-Enzym Konjugate auf Basis von Poly-2-Alkyloxazolinen*. Dissertation: TU Dortmund, 2014.
18. Konieczny, S.; Fik, C. P.; Aversch, N. J.; Tiller, J. C., Organosoluble Enzyme Conjugates with Poly(2-Oxazoline)S Via Pyromellitic Acid Dianhydride. *J. Biotechnol.* **2012**, *159*, 195.
19. Schwizer, F.; Okamoto, Y.; Heinisch, T.; Gu, Y.; Pellizzoni, M. M.; Lebrun, V.; Reuter, R.; Köhler, V.; Lewis, J. C.; Ward, T. R., Artificial Metalloenzymes: Reaction Scope and Optimization Strategies. *Chemical Reviews* **2017**.
20. Trindler, C.; Ward, T. R., Artificial Metalloenzymes. In *Effects of Nanoconfinement on Catalysis*, Poli, R., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 49-82.
21. Hyster, T. K.; Ward, T. R., Genetische Optimierung von Metalloenzymen: Weiterentwicklung von Enzymen für nichtnatürliche Reaktionen. *Angewandte Chemie* **2016**, *128* (26), 7468-7482.

22. Dürrenberger, M.; Ward, T. R., Recent Achievements in the Design and Engineering of Artificial Metalloenzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 99.
23. Yu, F. T.; Cangelosi, V. M.; Zastrow, M. L.; Tegoni, M.; Plegaria, J. S.; Tebo, A. G.; Mocny, C. S.; Ruckthong, L.; Qayyum, H.; Pecoraro, V. L., Protein Design: Toward Functional Metalloenzymes. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3495.
24. Constable, E. C.; Housecroft, C. E.; Creus, M.; Gademann, K.; Giese, B.; Ward, T. R.; Woggon, W. D.; Chougnat, A., Artificial Metalloenzymes: Enantioselective Catalysis and Beyond. *Chimia* **2010**, *64*, 846.
25. Thomas, C. M.; Ward, T. R., Design of Artificial Metalloenzymes. *Appl. Organomet. Chem.* **2005**, *19*, 35.
26. Diéguez, M., Bäckvall, J.-E., Pàmies, O.(eds), *Artificial Metalloenzymes and MetalloDNAzymes in Catalysis: From Design to Applications*. Wiley-VCH: Weinheim, 2018.
27. Berzelius, J. J.; Wöhler, F., *Einige Ideen über eine bei der Bildung organischer Verbindungen in der lebenden Natur wirksame aber bisher noch nicht bemerkte Kraft*. 1936.
28. Ostwald, W., Definition der Katalyse. *Zeitschrift für physikalische Chemie* **1894**, *15*, 705-706.
29. Sauermost, R.; Freudig, D., *Lexikon der Biologie: in fünfzehn Bänden*. Spektrum, Akad. Verlag: 1998.
30. Bugg, T. D., *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*. John Wiley & Sons: 2012.
31. Ertl, G., Reaktionen an Oberflächen: vom Atomaren zum Komplexen (Nobel-Vortrag). *Angewandte Chemie* **2008**, *120* (19), 3578-3590.
32. Bergius, F., Production of hydrogen from water and coal from cellulose at high temperatures and pressures. *Journal of the Society of Chemical Industry* **1913**, *32* (9), 462-467.
33. Baerns, M.; Behr, A.; Brehm, A.; Gmehling, J.; Hofmann, H.; Onken, U., *Technische chemie*. John Wiley & Sons: 2013.
34. Behr, A.; Agar, D. W.; Jörissen, J., *Einführung in die technische Chemie*. Springer: 2010.
35. Heitbaum, M.; Glorius, F.; Escher, I., Asymmetrische heterogene Katalyse. *Angewandte Chemie* **2006**, *118* (29), 4850-4881.
36. Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K., Engineering the Third Wave of Biocatalysis. *Nature* **2012**, *485*, 185.
37. Reetz, M. T., Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480.
38. Gal, J., The discovery of biological enantioselectivity: Louis Pasteur and the fermentation of tartaric acid, 1857—A review and analysis 150 yr later. *Chirality* **2008**, *20* (1), 5-19.
39. Liese, A.; Seelbach, K.; Buchholz, A.; Haberland, J., Processes: Oxireductases EC 1. In *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2006; pp 147-263.
40. Liese, A.; Seelbach, K.; Buchholz, A.; Haberland, J., Processes: Transferases EC 2. In *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2006; pp 264-272.
41. Liese, A.; Seelbach, K.; Buchholz, A.; Haberland, J., Processes: Hydrolases EC 3 - EC 3.1.1.3 to EC 3.4.17.2. In *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2006; pp 273-349.
42. Liese, A.; Seelbach, K.; Buchholz, A.; Haberland, J., Processes: Hydrolases EC 3 - EC 3.4.21.4 to EC 3.8.X.X. In *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2006; pp 350-446.
43. Liese, A.; Seelbach, K.; Buchholz, A.; Haberland, J., Processes: Lyases EC 4. In *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2006; pp 447-503.
44. Liese, A.; Seelbach, K.; Buchholz, A.; Haberland, J., Processes: Isomerases EC 5. In *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2006; pp 504-513.
45. Reetz, M. T., Gerichtete Evolution stereoselektiver Enzyme: Eine ergiebige Katalysator-Quelle für asymmetrische Reaktionen. *Angewandte Chemie* **2011**, *123* (1), 144-182.

46. Eggert, T., Optimization of Industrial Enzymes by Molecular Engineering. In *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2006; pp 93-114.
  47. Chen, K.; Arnold, F. H., Tuning the Activity of an Enzyme for Unusual Environments: Sequential Random Mutagenesis of Subtilisin E for Catalysis in Dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 5618.
  48. Kuchner, O.; Arnold, F. H., Directed Evolution of Enzyme Catalysts. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 523.
  49. Illanes, A., *Enzyme Biocatalysis: principles and Applications*. 2008; p 392.
  50. Fischer, E., Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, *27* (3), 2985-2993.
  51. Koshland, D. E., Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1958**, *44* (2), 98-104.
  52. Veit, T., Biocatalysis for the Production of Cosmetic Ingredients. *Engineering in Life Sciences* **2004**, *4* (6), 508-511.
  53. Braun, M.; Teichert, O.; Zweck, A., Biokatalyse in der industriellen Produktion.
  54. Husain, Q., Nanocarriers Immobilized Proteases and Their Industrial Applications: An Overview. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2018**, *18* (1), 486-499.
  55. Kent, J. A., *Handbook of industrial chemistry and biotechnology*. Springer Science & Business Media: 2013.
  56. Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A., Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial technology* **2006**, *39* (2), 235-251.
  57. Hoondal, G.; Tiwari, R.; Tewari, R.; Dahiya, N.; Beg, Q., Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology* **2002**, *59* (4-5), 409-418.
  58. Beg, Q.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G., Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology* **2001**, *56* (3-4), 326-338.
  59. Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J.; Serra, J. L., Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry* **1998**, *33* (1), 21-28.
  60. Balkenhohl, F.; Ditrich, K.; Hauer, B.; Ladner, W., Optisch aktive Amine durch Lipase-katalysierte Methoxyacetylierung. *Journal für Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung* **1997**, *339* (1), 381-384.
  61. Mai, N. L.; Koo, Y. M., Enzymatic Reactions in Ionic Liquids. *Emerging Areas in Bioengineering* **2018**, 35-65.
  62. Kragl, U.; Eckstein, M.; Kaftzik, N., Enzyme catalysis in ionic liquids. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, *13* (6), 565-571.
  63. Sheldon, R., Catalytic reactions in ionic liquids. *Chemical Communications* **2001**, (23), 2399-2407.
  64. Kamat, S. V.; Beckman, E. J.; Russell, A. J., Enzyme activity in supercritical fluids. *Critical reviews in biotechnology* **1995**, *15* (1), 41-71.
  65. Jessop, P. G.; Leitner, W., *Chemical synthesis using supercritical fluids*. John Wiley & Sons: 2008.
  66. Rezaei, K.; Temelli, F.; Jenab, E., Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids. *Biotechnology Advances* **2007**, *25* (3), 272-280.
  67. Erickson, J. C.; Schyns, P.; Cooney, C. L., Effect of pressure on an enzymatic reaction in a supercritical fluid. *AIChE Journal* **1990**, *36* (2), 299-301.
  68. Yang, F.; Russell, A. J., The role of hydration in enzyme activity and stability: 2. Alcohol dehydrogenase activity and stability in a continuous gas phase reactor. *Biotechnology and bioengineering* **1996**, *49* (6), 709-716.
  69. Dewar, M.; Storch, D. M., Alternative view of enzyme reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, *82* (8), 2225-2229.
-

70. Tawaki, S.; Klivanov, A. M., Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (5), 1882-1884.
71. Ueji, S.; Fujino, R.; Ōkubo, N.; Miyazawa, T.; Kurita, S.; Kitadani, M.; Muromatsu, A., Solvent-induced inversion of enantioselectivity in lipase-catalyzed esterification of 2-phenoxypropionic acids. *Biotechnology Letters* **1992**, *14* (3), 163-168.
72. Wu, S.-H.; Chu, F.-Y.; Wang, K.-T., Reversible enantioselectivity of enzymatic reactions by media. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1991**, *1* (7), 339-342.
73. Wescott, C. R.; Klivanov, A. M., The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1994**, *1206* (1), 1-9.
74. Ke, T.; Wescott, C. R.; Klivanov, A. M., Prediction of the solvent dependence of enzymatic prochiral selectivity by means of structure-based thermodynamic calculations. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (14), 3366-3374.
75. Volkin, D. B.; Staubli, A.; Langer, R.; Klivanov, A. M., Enzyme thermoinactivation in anhydrous organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering* **1991**, *37* (9), 843-853.
76. Griebenow, K.; Klivanov, A. M., On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (47), 11695-11700.
77. Straathof, A. J., Enzymatic catalysis via liquid-liquid interfaces. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, *83* (4), 371-375.
78. Carrea, G., Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems. *Trends in Biotechnology* **1984**, *2* (4), 102-106.
79. 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*, 10.
80. Castro, G. R.; Knubovets, T., Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. *Critical Reviews in Biotechnology* **2003**, *23* (3), 195-231.
81. Dordick, J. S., Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* **1989**, *11* (4), 194-211.
82. Sittko, I.; Kremser, K.; Roth, M.; Kuehne, S.; Stuhr, S.; Tiller, J. C., Amphiphilic polymer conetworks with defined nanostructure and tailored swelling behavior for exploring the activation of an entrapped lipase in organic solvents. *Polymer* **2015**, *64*, 122-129.
83. Plothe, R.; Sittko, I.; Lanfer, F.; Fortmann, M.; Roth, M.; Kolbach, V.; Tiller, J. C., Poly(2-ethylloxazoline) as matrix for highly active electrospun enzymes in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering* **2016**, n/a-n/a.
84. 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* (3), 701-707.
85. Moehlenbrock, M. J.; Minteer, S. D., Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols* **2017**, 1-7.
86. Hesticova, M.; Correro, M. R.; Lenz, M.; Corvini, P. F. X.; Shahgaldian, P.; Ward, T. R., Immobilization of an Artificial Imine Reductase within Silica Nanoparticles Improves Its Performance. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2016**, *52*, 9462.
87. Zhou, J. Q.; He, T.; Wang, J. W., The microbial transglutaminase immobilization on carboxylated poly(N-isopropylacrylamide) for thermo-responsivity. *Enzyme and Microbial Technology* **2016**, *87-88*, 44-51.
88. Kuchler, A.; Adamcik, J.; Mezzenga, R.; Schluter, A. D.; Walde, P., Enzyme immobilization on silicate glass through simple adsorption of dendronized polymer-enzyme conjugates for localized enzymatic cascade reactions. *RSC Advances* **2015**, *5* (55), 44530-44544.
89. Tielmann, P.; Kierkels, H.; Zonta, A.; Ilie, A.; Reetz, M. T., Increasing the activity and enantioselectivity of lipases by sol-gel immobilization: further advancements of practical interest. *Nanoscale* **2014**, *6* (12), 6220-6228.

90. Sheldon, R. A.; van Pelt, S., Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (15), 6223-6235.
91. Brady, D.; Jordaan, J., Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology letters* **2009**, *31* (11), 1639.
92. Harris, J. M.; Martin, N. E.; Modi, M., Pegylation. *Clinical Pharmacokinetics* **2001**, *40* (7), 539-551.
93. Moreno-Pérez, S.; Orrego, A. H.; Romero-Fernández, M.; Trobo-Maseda, L.; Martins-DeOliveira, S.; Munilla, R.; Fernández-Lorente, G.; Guisan, J. M., Chapter Three - Intense PEGylation of Enzyme Surfaces: Relevant Stabilizing Effects. In *Methods in Enzymology*, Challa Vijaya, K., Ed. Academic Press: 2016; Vol. Volume 571, pp 55-72.
94. 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* (11), 3582-6.
95. 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* (2), 135-159.
96. Herman, S.; Hooftman, G.; Schacht, E., Poly(Ethylene Glycol) with Reactive Endgroups: I. Modification of Proteins. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **1995**, *10* (2), 145-187.
97. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, Supplement, 116-127.
98. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54* (4), 459-476.
99. Katsumi, H.; Nishikawa, M.; Hirosaki, R.; Okuda, T.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M.; Sakane, T.; Yamamoto, A., Development of PEGylated Cysteine-Modified Lysine Dendrimers with Multiple Reduced Thiols To Prevent Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Molecular Pharmaceutics* **2016**.
100. Sawhney, P.; Kumar, S.; Maheshwari, N.; Guleria, S. S.; Dhar, N.; Kashyup, R.; Sahni, G., Site-Specific Thiol-mediated PEGylation of Streptokinase Leads to Improved Properties with Clinical Potential. *Curr Pharm Des* **2016**.
101. Yoon, A.; Shin, J. W.; Kim, S.; Kim, H.; Chung, J., Chicken scFvs with an Artificial Cysteine for Site-Directed Conjugation. *PLoS ONE* **2016**, *11* (1), e0146907.
102. Grigoletto, A.; Maso, K.; Mero, A.; Rosato, A.; Schiavon, O.; Pasut, G., Drug and protein delivery by polymer conjugation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2016**, *32*, Part B, 132-141.
103. Fee, C. J.; Van Alstine, J. M., PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chemical Engineering Science* **2006**, *61* (3), 924-939.
104. Gaertner, H. F.; Puigserver, A. J., Peptide synthesis catalyzed by polyethylene glycol-modified chymotrypsin in organic solvents. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **1988**, *3* (2), 130-137.
105. 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 enzymic activity in organic solvents. *Biotechnology Letters* **1984**, *6* (12), 765-770.
106. Castillo, B.; Solá, R. J.; Ferrer, A.; Barletta, G.; Griebenow, K., Effect of PEG modification on subtilisin Carlsberg activity, enantioselectivity, and structural dynamics in 1,4-dioxane. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, *99* (1), 9-17.
107. Boerakker, M. J.; Hannink, J. M.; Bomans, P. H. H.; Frederik, P. M.; Nolte, R. J. M.; Meijer, E. M.; Sommerdijk, N. A. J. M., Giant Amphiphiles by Cofactor Reconstitution. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (22), 4239-4241.
108. Velonia, K.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M., Lipase Polystyrene Giant Amphiphiles. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (16), 4224-4225.

109. Cobo, I.; Li, M.; Sumerlin, B. S.; Perrier, S., Smart hybrid materials by conjugation of responsive polymers to biomacromolecules. *Nat Mater* **2015**, *14* (2), 143-159.
110. Cao, Y.; Wang, Y., Temperature-Mediated Regulation of Enzymatic Activity. *ChemCatChem* **2016**, 2740-2747.
111. Ivanov, A. E.; Edink, E.; Kumar, A.; Galaev, I. Y.; Arendsen, A. F.; Bruggink, A.; Mattiasson, B., Conjugation of Penicillin Acylase with the Reactive Copolymer of N-Isopropylacrylamide: A Step Toward a Thermosensitive Industrial Biocatalyst. *Biotechnology Progress* **2003**, *19* (4), 1167-1175.
112. Shiroya, T.; Yasui, M.; Fujimoto, K.; Kawaguchi, H., Control of enzymatic activity using thermosensitive polymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1995**, *4* (5), 275-285.
113. Moatsou, D.; Li, J.; Ranji, A.; Pitto-Barry, A.; Ntai, I.; Jewett, M. C.; O'Reilly, R. K., Self-Assembly of Temperature-Responsive Protein-Polymer Bioconjugates. *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26* (9), 1890-1899.
114. Lele, B. S.; Murata, H.; Matyjaszewski, K.; Russell, A. J., Synthesis of uniform protein-polymer conjugates. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (6), 3380-3387.
115. Magnusson, J. P.; Bersani, S.; Salmaso, S.; Alexander, C.; Caliceti, P., In Situ Growth of Side-Chain PEG Polymers from Functionalized Human Growth Hormone • A New Technique for Preparation of Enhanced Protein-Polymer Conjugates. *Bioconjugate chemistry* **2010**, *21* (4), 671-678.
116. Nicolas, J.; San Miguel, V.; Mantovani, G.; Haddleton, D. M., Fluorescently tagged polymer bioconjugates from protein derived macroinitiators. *Chemical Communications* **2006**, (45), 4697-4699.
117. Yaşayan, G.; Saeed, A. O.; Fernández-Trillo, F.; Allen, S.; Davies, M. C.; Jangher, A.; Paul, A.; Thurecht, K. J.; King, S. M.; Schweins, R., Responsive hybrid block co-polymer conjugates of proteins-controlled architecture to modulate substrate specificity and solution behaviour. *Polymer Chemistry* **2011**, *2* (7), 1567-1578.
118. Cummings, C.; Murata, H.; Koepsel, R.; Russell, A. J., Tailoring enzyme activity and stability using polymer-based protein engineering. *Biomaterials* **2013**, *34* (30), 7437-7443.
119. Averick, S.; Simakova, A.; Park, S.; Konkolewicz, D.; Magenau, A. J.; Mehl, R. A.; Matyjaszewski, K., ATRP under biologically relevant conditions: grafting from a protein. *ACS Macro Letters* **2011**, *1* (1), 6-10.
120. Cummings, C.; Murata, H.; Koepsel, R.; Russell, A. J., Dramatically increased pH and temperature stability of chymotrypsin using dual block polymer-based protein engineering. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (3), 763-771.
121. Murata, H.; Cummings, C. S.; Koepsel, R. R.; Russell, A. J., Rational tailoring of substrate and inhibitor affinity via ATRP polymer-based protein engineering. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (7), 2817-2823.
122. Murata, H.; Cummings, C. S.; Koepsel, R. R.; Russell, A. J., Polymer-based protein engineering can rationally tune enzyme activity, pH-dependence, and stability. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (6), 1919-1926.
123. 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* (12), 5025-5034.
124. 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* (22), 1895-1899.
125. 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* (9), 3234-3245.



126. 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* (19), 1677-1682.
127. Hoogenboom, R., Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (43), 7978-7994.
128. Miyamoto, M.; Naka, K.; Shiozaki, M.; Chujo, Y.; Saegusa, T., Preparation and enzymic activity of poly[(N-acylimino)ethylene]-modified catalase. *Macromolecules* **1990**, *23* (13), 3201-3205.
129. 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* (1), 360-377.
130. Luxenhofer, R.; Han, Y.; Schulz, A.; Tong, J.; He, Z.; Kabanov, A. V.; Jordan, R., Poly(2-oxazoline)s as Polymer Therapeutics. *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33* (19), 1613-1631.
131. Viegas, T. X.; 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* (5), 976-986.
132. Naka, K.; Miyamoto, M.; Chujo, Y.; Saegusa, T., Effect of solvent polarity on enzymatic function of poly [(N-acylimino)ethylene] modified lipase. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **1999**, *75* (3), 49-53.
133. 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* (1), 35-48.
134. 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* (8), 1303-1306.
135. Wilson, M. E.; Whitesides, G. M., Conversion of a Protein to a Homogeneous Asymmetric Hydrogenation Catalyst by Site-Specific Modification with a Diphosphinerhodium(I) Moiety. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306.
136. Deuss, P. J.; den Heeten, R.; Laan, W.; Kamer, P. C. J., Bioinspired Catalyst Design and Artificial Metalloenzymes. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 4680.
137. Esmieu, C.; Cherrier, M. V.; Amara, P.; Girgenti, E.; Marchi-Delapierre, C.; Odon, F.; Iannello, M.; Jorge-Robin, A.; Cavazza, C.; Ménage, S., An Artificial Oxygenase Built from Scratch: Substrate Binding Site Identified Using a Docking Approach. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 3922.
138. Collot, J.; Gradinaru, J.; Humbert, N.; Skander, M.; Zocchi, A.; Ward, T. R., Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Catalysis Based on Biotin-Avidin. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9030.
139. Reetz, M. T.; Peyralans, J. J. P.; Maichele, A.; Fu, Y.; Maywald, M., Directed Evolution of Hybrid Enzymes: Evolving Enantioselectivity of an Achiral Rh-Complex Anchored to a Protein. *Chem. Commun.* **2006**, 4318.
140. Podtetenieff, J.; Taglieber, A.; Bill, E.; Reijerse, E. J.; Reetz, M. T., An Artificial Metalloenzyme: Creation of a Designed Copper Binding Site in a Thermostable Protein. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5151.
141. Reetz, M. T.; Jiao, N., Copper-Phthalocyanine Conjugates of Serum Albumins as Enantioselective Catalysts in Diels-Alder Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 2416.
142. Fernández-Gacio, A.; Codina, A.; Fastrez, J.; Riant, O.; Soumillon, P., Transforming Carbonic Anhydrase into Epoxide Synthase by Metal Exchange. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1013.
143. Okrasa, K.; Kazlauskas, R. J., Manganese-Substituted Carbonic Anhydrase as a New Peroxidase. *Chem. - Eur. J.* **2006**, *12*, 1587.

144. Koehler, V.; Mao, J.; Heinisch, T.; Pordea, A.; Sardo, A.; Wilson, Y. M.; Knoerr, L.; Creus, M.; Prost, J. C.; Schirmer, T., Oso4-Streptavidin: A Tunable Hybrid Catalyst for the Enantioselective Cis-Dihydroxylation of Olefins. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 10863.
145. Steinreiber, J.; Ward, T. R., Artificial Metalloenzymes as Selective Catalysts in Aqueous Media. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 751.
146. Letondor, C.; Ward, T. R., Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Catalysis: Recent Advances. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1845.
147. Yamamura, K.; Kaiser, E. T., Studies on the Oxidase Activity of Copper(II) Carboxypeptidase A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 830.
148. Okrasa, K.; Kazlauskas, R. J., Manganese-Substituted Carbonic Anhydrase as a New Peroxidase. *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12* (6), 1587-1596.
149. Fernández-Gacio, A.; Codina, A.; Fastrez, J.; Riant, O.; Soumillion, P., Transforming Carbonic Anhydrase into Epoxide Synthase by Metal Exchange. *ChemBioChem* **2006**, *7* (7), 1013-1016.
150. Thomas, C. M.; Ward, T. R., Artificial Metalloenzymes: Proteins as Hosts for Enantioselective Catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 337.
151. Chatterjee, A.; Ward, T. R., Recent Advances in the Palladium Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction in Water. *Catal. Lett.* **2016**, *146*, 820.
152. Chatterjee, A.; Mallin, H.; Klehr, J.; Vallapurackal, J.; Finke, A. D.; Vera, L.; Marsh, M.; Ward, T. R., An Enantioselective Artificial Suzukiase Based on the Biotin-Streptavidin Technology. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 673.
153. Pierron, J.; Malan, C.; Creus, M.; Gradinaru, J.; Hafner, I.; Ivanova, A.; Sardo, A.; Ward, T. R., Artificial Metalloenzymes for Asymmetric Allylic Alkylation on the Basis of the Biotin-Avidin Technology. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 701.
154. Pordea, A.; Creus, M.; Panek, J.; Duboc, C.; Mathis, D.; Novic, M.; Ward, T. R., Artificial Metalloenzyme for Enantioselective Sulfoxidation Based on Vanadyl-Loaded Streptavidin. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8085.
155. Pordea, A.; Mathis, D.; Ward, T. R., Incorporation of biotinylated manganese-salen complexes into streptavidin: New artificial metalloenzymes for enantioselective sulfoxidation. *Journal of Organometallic Chemistry* **2009**, *694* (6), 930-936.
156. Skander, M.; Malan, C.; Ivanova, A.; Ward, T. R., Chemical optimization of artificial metalloenzymes based on the biotin-avidin technology: (S)-selective and solvent-tolerant hydrogenation catalysts via the introduction of chiral amino acid spacers. *Chemical Communications* **2005**, (38), 4815-4817.
157. Rusbandi, U. E.; Lo, C.; Skander, M.; Ivanova, A.; Creus, M.; Humbert, N.; Ward, T. R., Second Generation Artificial Hydrogenases Based on the Biotin-Avidin Technology: Improving Activity, Stability and Selectivity by Introduction of Enantiopure Amino Acid Spacers. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1923.
158. Klein, G.; Humbert, N.; Gradinaru, J.; Ivanova, A.; Gilardoni, F.; Rusbandi, U. E.; Ward, T. R., Tailoring the Active Site of Chemzymes by Using a Chemogenetic-Optimization Procedure: Towards Substrate-Specific Artificial Hydrogenases Based on the Biotin-Avidin Technology. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 7764.
159. Heinisch, T.; Langowska, K.; Tanner, P.; Reymond, J. L.; Meier, W.; Palivan, C.; Ward, T. R., Fluorescence-Based Assay for the Optimization of the Activity of Artificial Transfer Hydrogenase within a Biocompatible Compartment. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 720.
160. Skander, M.; Humbert, N.; Collot, J.; Gradinaru, J.; Klein, G.; Loosli, A.; Sauser, J.; Zocchi, A.; Gilardoni, F.; Ward, T. R., Artificial Metalloenzymes: (Strept)Avidin as Host for Enantioselective Hydrogenation by Achiral Biotinylated Rhodium-Diphosphine Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411.
161. Lin, C. C.; Lin, C. W.; Chan, A. S. C., Catalytic Hydrogenation of Itaconic Acid in a Biotinylated Pyrphos-Rhodium(I) System in a Protein Cavity. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1887.

162. Pordea, A.; Creus, M.; Letondor, C.; Ivanova, A.; Ward, T. R., Improving the enantioselectivity of artificial transfer hydrogenases based on the biotin–streptavidin technology by combinations of point mutations. *Inorganica Chimica Acta* **2010**, *363* (3), 601-604.
163. Creus, M.; Pordea, A.; Rossel, T.; Sardo, A.; Letondor, C.; Ivanova, A.; LeTrong, I.; Stenkamp, R. E.; Ward, T. R., X-Ray Structure and Designed Evolution of an Artificial Transfer Hydrogenase. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1400.
164. Letondor, C.; Pordea, A.; Humbert, N.; Ivanova, A.; Mazurek, S.; Novic, M.; Ward, T. R., Artificial Transfer Hydrogenases Based on the Biotin-(Strept)Avidin Technology: Fine Tuning the Selectivity by Saturation Mutagenesis of the Host Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8320.
165. Wilson, Y. M.; Durrenberger, M.; Nogueira, E. S.; Ward, T. R., Neutralizing the Detrimental Effect of Glutathione on Precious Metal Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8928.
166. Kohler, V.; Wilson, Y. M.; Durrenberger, M.; Ghislieri, D.; Churakova, E.; Quinto, T.; Knorr, L.; Haussinger, D.; Hollmann, F.; Turner, N. J., Synthetic Cascades Are Enabled by Combining Biocatalysts with Artificial Metalloenzymes. *Nat. Chem.* **2012**, *5*, 93.
167. Durrenberger, M.; Heinisch, T.; Wilson, Y. M.; Rossel, T.; Nogueira, E.; Knorr, L.; Zimbron, M. J.; Pierron, J.; Mutschler, A.; Kersten, K., Artificial Transfer Hydrogenases for the Enantioselective Reduction of Cyclic Imines. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 3026.
168. Schwizer, F.; Kohler, V.; Durrenberger, M.; Knorr, L.; Ward, T. R., Genetic Optimization of the Catalytic Efficiency of Artificial Imine Reductases Based on Biotin-Streptavidin Technology. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1752.
169. Muñoz Robles, V.; Durrenberger, M.; Heinisch, T.; Lledos, A.; Schirmer, T.; Ward, T. R.; Maréchal, J. D., Structural, Kinetic, and Docking Studies of Artificial Imine Reductases Based on Biotin-Streptavidin Technology: An Induced Lock-and-Key Hypothesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15676.
170. Yoshikawa, H.; Hirano, A.; Arakawa, T.; Shiraki, K., Effects of alcohol on the solubility and structure of native and disulfide-modified bovine serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *50* (5), 1286-1291.
171. Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N., Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Structural Biology* **1998**, *5*, 827.
172. Rousselot-Pailley, P.; Bochot, C.; Marchi-Delapierre, C.; Jorge-Robin, A.; Martin, L.; Fontecilla-Camps, J. C.; Cavazza, C.; Ménage, S., The Protein Environment Drives Selectivity for Sulfide Oxidation by an Artificial Metalloenzyme. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 545.
173. Li, G.; Zhang, H.; Wang, R.; He, Y.; Xiong, Y., Preparation and antioxidant activity of albumin binding Salen Schiff-base metal complexes. *Chinese Science Bulletin* **2013**, *58* (24), 2956-2963.
174. Zunszain, P. A.; Ghuman, J.; Komatsu, T.; Tsuchida, E.; Curry, S., Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Structural Biology* **2003**, *3* (1), 6.
175. Mahammed, A.; Gross, Z., Albumin-Conjugated Corrole Metal Complexes: Extremely Simple yet Very Efficient Biomimetic Oxidation Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2883.
176. Mahammed, A.; Gray, H. B.; Weaver, J. J.; Sorasaene, K.; Gross, Z., Amphiphilic Corroles Bind Tightly to Human Serum Albumin. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15* (4), 738-746.
177. 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. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, *0*, 769.
178. Kaiser, E.; Lawrence, D., Chemical mutation of enzyme active sites. *Science* **1984**, *226* (4674), 505-511.

179. Davies, R. R.; Distefano, M. D., A Semisynthetic Metalloenzyme Based on a Protein Cavity That Catalyzes the Enantioselective Hydrolysis of Ester and Amide Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11643.
180. Allard, M.; Dupont, C.; Munoz Robles, V.; Doucet, N.; Lledos, A.; Marechal, J. D.; Urvoas, A.; Mahy, J. P.; Ricoux, R., Incorporation of Manganese Complexes into Xylanase: New Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Epoxidation. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 240.
181. Colonna, S.; Manfredi, A.; Spadoni, M., The Effect of Organic Cosolvents on the Enantioselectivity in the Bovine Serum Albumin Catalyzed Weitz-Scheffer Condensation. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1577.
182. Laan, W.; Munoz, B. K.; den Heeten, R.; Kamer, P. C., Artificial Metalloenzymes through Cysteine-Selective Conjugation of Phosphines to Photoactive Yellow Protein. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1236.
183. Fujieda, N.; Nakano, T.; Taniguchi, Y.; Ichihashi, H.; Sugimoto, H.; Morimoto, Y.; Nishikawa, Y.; Kurisu, G.; Itoh, S., A Well-Defined Osmium–Cupin Complex: Hyperstable Artificial Osmium Peroxygenase. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (14), 5149-5155.
184. Konieczny, S.; Leurs, M.; Tiller, J. C., Polymer Enzyme Conjugates as Chiral Ligands for Sharpless Dihydroxylation of Alkenes in Organic Solvents. *ChemBioChem* **2015**, *16* (1), 83-90.
185. Leurs, M., Protein-vermittelte metallkatalysierte Umsetzungen. Diplomarbeit: TU-Dortmund, 2013.
186. Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B., Catalytic Asymmetric Dihydroxylation. *Chemical Reviews* **1994**, *94* (8), 2483-2547.
187. Kollár, L.; Pongrácz, P., Tandem hydroformylation/aldol condensation reactions: Synthesis of unsaturated ketones from olefins. *Journal of Organometallic Chemistry* **2018**, *866*, 184-188.
188. Joan, G.; Irene, G. N.; Ignacio, F. A.; Miguel, B.; Isabel, M. M.; Feliu, M.; Sergio, C.; Yolanda, D., Enantioselective Synthesis of Aminodiols by Sequential Rhodium-Catalysed Oxyamination/Kinetic Resolution: Expanding the Substrate Scope of Amidine-Based Catalysis. *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24* (18), 4635-4642.
189. Volvoikar, P. S.; Tilve, S. G., Tandem Wittig – Reductive annulation decarboxylation approach for the synthesis of indole and 2-substituted indoles. *Tetrahedron Letters* **2018**, *59* (19), 1851-1854.
190. Stephanie, L.; Lisa-Natascha, U.; Malte, B., Tandem-Organokatalyse und -Photokatalyse: eine Anthrachinon-katalysierte sequenzielle Indol-C3-Alkylierung/Photooxidation/1,2-Umlagerung. *Angewandte Chemie* **2014**, *126* (25), 6676-6680.
191. Fogg, D. E.; dos Santos, E. N., Tandem catalysis: a taxonomy and illustrative review. *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, *248* (21), 2365-2379.
192. Oroz-Guinea, I.; García-Junceda, E., Enzyme catalysed tandem reactions. *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, *17* (2), 236-249.
193. Lopez-Gallego, F.; Schmidt-Dannert, C., Multi-enzymatic synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14* (2), 174-183.
194. Sheldon, R. A., Enzyme-Catalyzed Cascade Reactions. In *Multi-Step Enzyme Catalysis*, 2008.
195. Wada, M.; Yoshizumi, A.; Noda, Y.; Kataoka, M.; Shimizu, S.; Takagi, H.; Nakamori, S., Production of a doubly chiral compound, (4R, 6R)-4-hydroxy-2, 2, 6-trimethylcyclohexanone, by two-step enzymatic asymmetric reduction. *Applied and environmental microbiology* **2003**, *69* (2), 933-937.
196. Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Faber, K.; Knaus, T.; Macheroux, P.; Kroutil, W., Orchestration of concurrent oxidation and reduction cycles for stereoinversion and deracemisation of secondary alcohols. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (42), 13969-13972.
197. Rioz-Martínez, A.; Bisogno, F. R.; Rodríguez, C.; de Gonzalo, G.; Lavandera, I.; Pazmiño, D. E. T.; Fraaije, M. W.; Gotor, V., Biocatalysed concurrent production of enantioenriched

compounds through parallel interconnected kinetic asymmetric transformations. *Organic & biomolecular chemistry* **2010**, *8* (6), 1431-1437.

198. Resch, V.; Fabian, W. M.; Kroutil, W., Deracemisation of mandelic acid to optically pure non-natural L-phenylglycine via a redox-neutral biocatalytic cascade. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2010**, *352* (6), 993-997.

199. Findrik, Z.; Vasić-Rački, Đ., Biotransformation of D-methionine into L-methionine in the cascade of four enzymes. *Biotechnology and bioengineering* **2007**, *98* (5), 956-967.

200. Nakajima, N.; Esaki, N.; Soda, K., Enzymatic conversion of racemic methionine to the L-enantiomer. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1990**, (13), 947-948.

201. Sánchez-Moreno, I.; García-García, J. F.; Bastida, A.; García-Junceda, E., Multienzyme system for dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolase catalyzed C–C bond formation from dihydroxyacetone. *Chemical Communications* **2004**, (14), 1634-1635.

202. Bertini, I.; Luchinat, C.; Scozzafava, A., *Biochemistry*. 1982; p 45.

203. Verger, R., 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* **1997**, *15* (1), 32-38.

204. Reetz, M. T., Lipases as practical biocatalysts. *Current opinion in chemical biology* **2002**, *6* (2), 145-150.

205. Rehm, S.; Trodler, P.; Pleiss, J., Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study. *Protein Science* **2010**, *19* (11), 2122-2130.

206. Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D., Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2004**, *118* (1), 155-170.

207. Pandey, A., *Concise encyclopedia of bioresource technology*. Food Products Press New York: 2004.

208. Schmid, R. D.; Verger, R., Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37* (12), 1608-1633.

209. Konieczny, S.; Fik, C. P.; Aversch, N. J. H.; Tiller, J. C., Organosoluble enzyme conjugates with poly(2-oxazoline)s via pyromellitic acid dianhydride. *Journal of Biotechnology* **2012**, *159* (3), 195-203.

210. Leurs, M.; Tiller, J. C., Chapter Seventeen - Nanoarmored Enzymes for Organic Enzymology: Synthesis and Characterization of Poly(2-Alkyloxazoline)–Enzyme Conjugates. In *Methods in Enzymology*, Kumar, C. V., Ed. Academic Press: 2017; Vol. 590, pp 413-444.

211. 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* (13), 3940-3941.

212. Michaelis, L.; Menten, M. L., Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333-369.

213. Oldenburg, P. D.; Feng, Y.; Pryjomska-Ray, I.; Ness, D.; Que, L., Olefin Cis-Dihydroxylation with Bio-Inspired Iron Catalysts. Evidence for an FeII/FeIV Catalytic Cycle. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (50), 17713-17723.

214. Oldenburg, P. D.; Shteinman, A. A.; Que, L., Iron-Catalyzed Olefin cis-Dihydroxylation Using a Bio-Inspired N,N,O-Ligand. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (45), 15672-15673.

215. Suzuki, K.; Oldenburg, P. D.; Que, L., Iron-Catalyzed Asymmetric Olefin cis-Dihydroxylation with 97% Enantiomeric Excess. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (10), 1887-1889.

216. Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K. S.; Kwong, H. L.; Morikawa, K.; Wang, Z. M., The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57* (10), 2768-2771.

217. Neises, B.; Steglich, W., Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1978**, *17* (7), 522-524.

218. Steglich, W.; Höfle, G., 4-Dimethylamino-pyridin, ein hochwirksamer Acylierungskatalysator. *Angewandte Chemie* **1969**, *81* (23), 1001-1001.
219. Tiller, J. C.; Bonner, G.; Pan, L.-C.; Klivanov, A. M., Improving biomaterial properties of collagen films by chemical modification. *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, *73* (3), 246-252.
220. Ren, D.; Yi, H.; Wang, W.; Ma, X., The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Research* **2005**, *340* (15), 2403-2410.
221. Hirano, S.; Tsuchida, H.; Nagao, N., N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials* **1989**, *10* (8), 574-576.
222. Habeeb, A. F. S. A., Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry* **1966**, *14* (3), 328-336.
223. Canfield, R. E., The amino acid sequence of egg white lysozyme. *Journal of Biological Chemistry* **1963**, *238* (8), 2698-2707.
224. Parmar, A. S.; Muschol, M., Hydration and hydrodynamic interactions of lysozyme: effects of chaotropic versus kosmotropic ions. *Biophysical Journal* **2009**, *97* (2), 590-598.
225. Axelsson, I., Characterization of proteins and other macromolecules by agarose gel chromatography. *Journal of Chromatography A* **1978**, *152* (1), 21-32.
226. Tse, M. K.; Döbler, C.; Bhor, S.; Klawonn, M.; Mägerlein, W.; Hugl, H.; Beller, M., Development of a Ruthenium-Catalyzed Asymmetric Epoxidation Procedure with Hydrogen Peroxide as the Oxidant. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (39), 5255-5260.
227. Balavoine, G.; Eskenazi, C.; Meunier, F.; Rivière, H., The stereospecific epoxidation of olefins catalysed by ruthenium. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25* (30), 3187-3190.
228. Ferrer, Í.; Fontrodona, X.; Roig, A.; Rodríguez, M.; Romero, I., A Recoverable Ruthenium Aqua Complex Supported on Silica Particles: An Efficient Epoxidation Catalyst. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (17), 4096-4107.
229. Ujwaldev, S. M.; Sindhu, K. S.; Thankachan, A. P.; Anilkumar, G., Recent developments and perspectives in the ruthenium-catalyzed olefin epoxidation. *Tetrahedron* **2016**, *72* (41), 6175-6190.
230. McGarrigle, E. M.; Gilheany, D. G., Chromium- and Manganese-salen Promoted Epoxidation of Alkenes. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (5), 1563-1602.
231. Sirijaraensre, J.; Limtrakul, J., Theoretical investigation on reaction pathways for ethylene epoxidation on Ti-decorated graphene. *Structural Chemistry* **2018**, *29* (1), 159-170.
232. Karjalainen, J.; Hormi, O.; Sherrington, D., Efficient Polymer-Supported Sharpless Alkene Epoxidation Catalyst. *Molecules* **1998**, *3* (3), 51.
233. Katsuki, T.; Martin, V., Asymmetric epoxidation of allylic alcohols: the Katsuki-Sharpless epoxidation reaction. *Organic Reactions* **2004**, *48*, 1-299.
234. Katsuki, T., Mn-salen catalyst, competitor of enzymes, for asymmetric epoxidation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **1996**, *113* (1), 87-107.
235. Groves, J. T.; Quinn, R., Aerobic epoxidation of olefins with ruthenium porphyrin catalysts. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107* (20), 5790-5792.
236. Danov, S. M.; Kazantsev, O. A.; Esipovich, A. L.; Belousov, A. S.; Rogozhin, A. E.; Kanakov, E. A., Recent advances in the field of selective epoxidation of vegetable oils and their derivatives: a review and perspective. *Catalysis Science & Technology* **2017**, *7* (17), 3659-3675.
237. de Boer, J. W.; Browne, W. R.; Brinksma, J.; Alsters, P. L.; Hage, R.; Feringa, B. L., Mechanism of Cis-Dihydroxylation and Epoxidation of Alkenes by Highly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Efficient Dinuclear Manganese Catalysts. *Inorganic Chemistry* **2007**, *46* (16), 6353-6372.
238. Shoichet, B. K.; Baase, W. A.; Kuroki, R.; Matthews, B. W., A relationship between protein stability and protein function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92* (2), 452-456.

239. Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W., Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology* **2012**, *52* (3), 174-182.
240. Kazemi, F.; Massah, A. R.; Javaherian, M., Chemoselective and scalable preparation of alkyl tosylates under solvent-free conditions. *Tetrahedron* **2007**, *63* (23), 5083-5087.
241. Schroeder, W. A.; Shelton, J. R.; Shelton, J. B.; Robberson, B.; Apell, G.; Fang, R. S.; Bonaventura, J., The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase. *Archives of biochemistry and biophysics* **1982**, *214* (1), 397-421.
242. Jönsson, L.; Sjöström, K.; Häggström, I.; Nyman, P. O., Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1995**, *1251* (2), 210-215.
243. Cassland, P.; Jönsson, L., 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* (3), 393-400.
244. Mancheno, J. M.; Pernas, M. A.; Martinez, 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* (5), 1059-1069.
245. 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* (4), 293-308.
246. Derewenda, Z. S.; Derewenda, U.; Dodson, G. G., The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *Journal of molecular biology* **1992**, *227* (3), 818-839.
247. 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* (1-3), 334-340.
248. van den Berg, B.; Chung, E. W.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M., Characterisation of the dominant oxidative folding intermediate of hen lysozyme1. *Journal of molecular biology* **1999**, *290* (3), 781-796.
249. Ruettinger, R. T.; Wen, L.-P.; Fulco, A., Coding nucleotide, 5'regulatory, and deduced amino acid sequences of P-450BM-3, a single peptide cytochrome P-450: NADPH-P-450 reductase from *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264* (19), 10987-10995.
250. 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* (3), 483-502.
251. Blehert, D. S.; Fox, B. G.; Chambliss, G. H., Cloning and Sequence Analysis of Two *Pseudomonas* Flavoprotein Xenobiotic Reductases. *Journal of bacteriology* **1999**, *181* (20), 6254-6263.
252. Wang, L.; Sharpless, K. B., Catalytic asymmetric dihydroxylation of cis-disubstituted olefins. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (19), 7568-7570.
253. Becker, H.; Sharpless, K. B., A New Ligand Class for the Asymmetric Dihydroxylation of Olefins. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35* (4), 448-451.
254. Sashidhar, R. B.; Capoor, A. K.; Ramana, D., Quantitation of  $\epsilon$ -amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid: A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio. *Journal of Immunological Methods* **1994**, *167* (1), 121-127.
-

255. Kruger, N. J., The Bradford method for protein quantitation. In *The protein protocols handbook*, Springer: 2002; pp 15-21.

---



## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Enzymklassifizierung <sup>49</sup> .....	8
Tab. 4.1:	TON und ee der asymmetrischen Dihydroxylierung von Alkenen mit Laccase-PEK-AMEs (MPV = 1,9) bei 0 °C. Die Reaktion wurde mit 0,105 µmol/mL Laccase-Konjugat, 0,2 µmol/mL K <sub>2</sub> OsO <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub> , 300 µmol/mL K <sub>3</sub> [Fe(CN <sub>6</sub> )], 300 µmol/mL K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> und 100 µmol/mL Alken in Chloroform durchgeführt. Die TON <sub>Enz</sub> ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die TON <sub>Os</sub> ist definiert als µmol Produkt pro µmol Osmat....	36
Tab. 4.2:	Enantioselektivität ( <i>R</i> ) und Umsatz der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx in Chloroform in Abhängigkeit vom verwendeten Kooxidationsmittel. Die Reaktionen wurden, falls nicht anders gekennzeichnet, mit 0,013 µmol/mL Laccase-PMOx, 0,026 µmol/mL K <sub>2</sub> OsO <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub> , 110 µmol/mL TBHP, 10 µL/mL gesättigter methanolischer KOH und 100 µmol/mL Styrol bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die TON <sub>Os</sub> ist definiert als µmol Produkt pro µmol Osmat. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Osmat pro h. ....	38
Tab. 4.3:	Abhängigkeit der Enantioselektivität ( <i>R</i> ) und des Umsatzes der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx von verschiedenen Lösungsmitteln. Die Reaktionen wurden mit 0,013 µmol/mL Laccase-PMOx, 0,013 µmol/mL K <sub>2</sub> OsO <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub> , 110 µmol/mL TBHP, 10 µL/mL gesättigter methanolischer KOH und 100 µmol/mL Styrol bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die TON <sub>Os</sub> ist definiert als µmol Produkt pro µmol Osmat. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Osmat pro h.	39
Tab. 4.4:	Abhängigkeit des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx von der Reaktionstemperatur und dem MPV. Die Reaktionen wurden mit 0,013 µmol/mL Laccase-PMOx, 0,007-0,026 µmol/mL K <sub>2</sub> OsO <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub> , 110 µmol/mL TBHP, 10 µL/mL gesättigter methanolischer KOH und 100 µmol/mL Styrol in CHCl <sub>3</sub> für 7 d durchgeführt. Die TON <sub>Os</sub> ist definiert als µmol Produkt pro µmol Osmat. Die TON <sub>Enz</sub> ist definiert als µmol Produkt pro µmol Enzym.	42
Tab. 4.5:	Abhängigkeit des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses ( <i>R</i> ) der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx von der Reaktionstemperatur. Die Reaktionen wurden mit 0,013 µmol/mL Laccase-PMOx, 0,013 µmol/mL K <sub>2</sub> OsO <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub> , 110 µmol/mL TBHP, 10 µL/mL gesättigter methanolischer KOH und 12,5–300 µmol/mL Styrol in CHCl <sub>3</sub> für 24 h durchgeführt. Die TON <sub>Os</sub> ist definiert als µmol Produkt pro µmol Osmat. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Osmat pro h. ....	46
Tab. 4.6:	Vergleich des des ee, der TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels Metall-Laccase-PMOx mit einem MPV von 1 mit verschiedenen Metallspezies bei 0 °C für 7 d. Die Reaktion wurde mit 0,013 µmol/mL Laccase-Konjugat, 0,013 µmol/mL Metallspezies, 110 µmol/mL TBHP, 10 µL/mL ges. methanolischer KOH und 100 µmol/mL Styrol in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol	

	Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein. Die TOF ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein pro h. 48	
Tab. 4.7:	Vergleich des <i>ee</i> ( <i>R</i> ), der TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels Häm-Enzym-PMOx bei 0 °C für 7 d. Die Reaktion wurde mit 110 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP und 100 $\mu\text{mol/mL}$ Styrol durchgeführt. Die TON ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein. Daten aus SPIEKERMANN <sup>[a]</sup> . ....	49
Tab. 4.8:	TON und <i>ee</i> [%] ((1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ) für 1H-Inden, ( <i>S</i> ) für 4-Methylstyrol und $\alpha$ -Methylstyrol) der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Protein-PMOx (MPV = 1) in Chloroform. Die Reaktion wurde mit 0,013 $\mu\text{mol/mL}$ Protein-PMOx, 0,013 $\mu\text{mol/mL}$ $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP und 100 $\mu\text{mol/mL}$ Alken bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die TON ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein. Daten zu großen Teilen aus WILKEN <sup>[g]</sup> . 51	
Tab. 4.9:	Auflistung der Retentionszeiten für die unterschiedlichen Produktester. Die absolute Konfiguration der einzelnen Enantiomere wurde nicht aufgeklärt (1 = Enantiomer mit der geringeren Retentionszeit, 2 = Enantiomer mit der höheren Retentionszeit). Die verwendeten Messbedingungen sind unter Kapitel 6.7.8.2 näher erläutert. 61	
Tab. 4.10:	Regio- und Enantioselektivität der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Laurinsäure mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL immobilisierter CaLB, 100 $\mu\text{mol/mL}$ 1-Phenyl-1,2-ethandiol und 200 $\mu\text{mol/mL}$ Laurinsäure in Toluol bei RT für 3 d durchgeführt. ....	62
Tab. 4.11:	Reaktionsverlauf der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Hexansäure mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100 $\mu\text{mol/mL}$ 1-Phenyl-1,2-ethandiol und 200 $\mu\text{mol/mL}$ Hexansäure in Toluol bei RT für insgesamt 24 h durchgeführt. ....	63
Tab. 4.12:	Reaktionsverlauf der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Oktan- sowie Laurinsäure mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100 $\mu\text{mol/mL}$ 1-Phenyl-1,2-ethandiol und 200 $\mu\text{mol/mL}$ der Carbonsäure in Toluol bei RT für insgesamt 70 min durchgeführt. ....	65
Tab. 4.13:	Regio- und Enantioselektivität der tandemkatalytischen Dihydroxylierung/Veresterung von Styrol mit verschiedenen Carbonsäuren mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100 $\mu\text{mol/mL}$ Styrol, 0,02 $\mu\text{mol/mL}$ $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP und 200 $\mu\text{mol/mL}$ Carbonsäure in Toluol oder Chloroform bei RT für 3 d durchgeführt. ....	67
Tab. 4.14:	Regioselektivität, Enantioselektivität und Produkt-zu-Zwischenprodukt-Verhältnis der asymmetrischen Dihydroxylierung/Veresterung von Styrol mit Os-Lipase-PMOx in Chloroform bei verschiedenen MPV. Die Reaktionen wurden mit 0,013 $\mu\text{mol/mL}$ Lipase-PMOx, 0,007 - 0,026 $\mu\text{mol/mL}$ $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP und 100 $\mu\text{mol/mL}$ Styrol bei 20 °C für 3 d durchgeführt. ....	71
Tab. 4.15:	Funktionalisierungsgrad von Lysozym in Abhängigkeit der verwendeten molaren Äquivalente des Carbonsäureanhydrids pro freier primärer Aminogruppe des Enzyms. EA: Essigsäureanhydrid, PA: Propansäureanhydrid, HA: Hexansäureanhydrid. Daten zu großen Teilen aus DORN <sup>[k]</sup> . ....	80

- Tab. 4.16: Funktionalisierungsgrad von BSA in Abhängigkeit der verwendeten molaren Äquivalente Essigsäureanhydrid (EA) pro freier primärer Aminogruppe des Enzyms. Daten zu großen Teilen aus Dorn<sup>[k]</sup> ..... 83
- Tab. 4.17: *ee* ((*S*)-Enantiomer) TON und TOF der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-LYS-EA mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden und einem MPV von 1 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Reaktion wurde mit 0,03 µmol/mL Lysozym-Konjugat, 0,03 µmol/mL K<sub>2</sub>OsO<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub>, 110 µmol/mL TBHP und 100 µmol/mL Styrol für 7 d bei 0 °C in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein pro h. Daten zu großen Teilen Reproduktionen aus Dorn<sup>[k]</sup> ..... 86
- Tab. 4.18: *ee* ((*S*)-Enantiomer), TON und TOF der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-LYS-PA und Osmat-LYS-HA mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden und einem MPV von 1 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Reaktion wurde mit 0,03 µmol/mL Lysozym-Konjugat, 0,03 µmol/mL K<sub>2</sub>OsO<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub>, 110 µmol/mL TBHP und 100 µmol/mL Styrol für 7 d bei 0 °C in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein pro h. .... 88
- Tab. 4.19: *ee* ((*S*)-Enantiomer), TON, TOF und Ausbeute bei der Dihydroxylierung von Styrol bei verschiedenen Temperaturen mit vollständig acylierten Osmat-LYS-Komplexen (pH 7) mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03 µmol/mL Protein-Konjugat, 0,03 µmol/mL K<sub>2</sub>OsO<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub>, 110 µmol/mL TBHP und 100 µmol/mL Styrol in Chloroform durchgeführt. Die Reaktionszeiten wurden gemäß vorheriger Untersuchungen mit Osmat-Laccase-PMOx gewählt und betragen bei 0 °C 7 d, bei 20 °C 3 d und bei 40 °C 1 d. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein pro h. .... 89
- Tab. 4.20: *ee* ((*S*)-Enantiomer), TON, TOF und Ausbeute bei der Dihydroxylierung von Styrol bei verschiedenen Temperaturen mit vollständig acylierten Osmat-BSA-Komplexen (pH 7) mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03 µmol/mL Protein-Konjugat, 0,03 µmol/mL K<sub>2</sub>OsO<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub>, 110 µmol/mL TBHP und 100 µmol/mL Styrol in Chloroform durchgeführt. Die Reaktionszeiten wurden gemäß vorheriger Untersuchungen mit Osmat-Laccase-PMOx gewählt und betragen bei 0 °C 7 d, bei 20 °C 3 d und bei 40 °C 1 d. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein pro h. .... 91
- Tab. 4.21: Erhaltene *ee* ((*S*)-Enantiomer), TON, TOF und Ausbeute bei der Dihydroxylierung von Styrol 0 °C mit vollständig acylierten Osmat-LYS-Komplexen (pH 7) mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03 µmol/mL Protein-Konjugat, 0,03 µmol/mL K<sub>2</sub>OsO<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub>, 110 µmol/mL TBHP und 100 µmol/mL für 7 d Styrol in Toluol durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die TOF ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein pro h. .... 93
- Tab. 4.22: Vergleich des *ee*, der TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Dihydroxylierung von Styrol mittels vollständig acylierter Osmat-Lipase-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei 0 °C für 7 d. Die Reaktion wurde mit 0,03 µmol/mL Protein-Konjugat, 0,03 µmol/mL K<sub>2</sub>OsO<sub>2</sub>(OH)<sub>4</sub>, 110 µmol/mL TBHP und 100 µmol/mL Styrol in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Die

TOF ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein pro h. Daten in Teilen Reproduktionen aus Dorn <sup>[k]</sup> .....	94
Tab. 4.23: Vergleich des des <i>ee</i> , der TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels vollständig acylierter Osmat-Protein-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 mit verschiedenen Alkenen bei 20 °C für 3 d. Die Reaktion wurde mit 0,03 $\mu\text{mol/mL}$ Lysozym-Konjugat, 0,03 $\mu\text{mol/mL}$ $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP und 100 $\mu\text{mol/mL}$ Alken in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein. Die TOF ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein pro h. 1H- Inden und Allylphenylether werden von beiden artifiziiellen Enzymen nicht umgesetzt.	95
Tab. 4.24: Vergleich der TON sowie <i>ee</i> ( <i>R</i> -Enantiomer) der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-LYS-EA-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ Lysozym-Konjugat, 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ $\text{RuCl}_3$ , 220 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP und 200 $\mu\text{mol/mL}$ Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein. Die maximal ermittelte Standardabweichung des <i>ee</i> beträgt 4,4 %.....	99
Tab. 4.25: <i>ee</i> ( <i>R</i> -Enantiomer), TON, TOF und Ausbeuten der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-LYS-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ Protein-Konjugat, 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ $\text{RuCl}_3$ , 220 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP und 200 $\mu\text{mol/mL}$ Styrol in DCM durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen 7 d bei 0 °C, 3 d bei 20 °C und 1 d bei 40 °C und 50 °C. Die TON ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein. Die TOF ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein pro h. ....	100
Tab. 4.26: <i>ee</i> ( <i>R</i> -Enantiomer), TON, TOF und Ausbeuten der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-BSA-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ Protein-Konjugat, 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ $\text{RuCl}_3$ , 220 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP und 200 $\mu\text{mol/mL}$ Styrol in DCM durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen 7 d bei 0 °C, 3 d bei 20 °C und 1 d bei 40 °C und 50 °C. Die TON ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein. Die TOF ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein pro h. ....	102
Tab. 4.27: <i>ee</i> ( <i>R</i> ) unter Verwendung von $\text{RuCl}_3$ , ( <i>S</i> ) bei $\text{TiOMe}_4$ ), TON, TOF und Ausbeuten der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Metall- Protein-Komplexe (pH 7) bei RT °C für 3 d für Metall-LYS-EA und bei 40 °C für 1 d für Metall-BSA-HA. Die Reaktion wurde mit 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ Protein-Konjugat, 0,06-0,24 $\mu\text{mol/mL}$ Metallspezies, 220 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP und 200 $\mu\text{mol/mL}$ Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein. Die TOF ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein pro h. ....	105
Tab. 4.28: Vergleich von <i>ee</i> , TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Epoxidierung mittels vollständig acylierter Ru-Protein-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 2 bei 20 °C für 3 d für $\text{Ru}_2$ -LYS-EA und einem MPV von 3 bei 40 °C für 1 d für $\text{Ru}_3$ -BSA-HA mit verschiedenen Alkenen. Die Reaktion wurde mit 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ Lysozym-Konjugat, 0,12 bzw. 0,18 $\mu\text{mol/mL}$ $\text{RuCl}_3$ , 220 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP und 200 $\mu\text{mol/mL}$ Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein. Die TOF ist	

---

definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein pro h. 1H-Inden und Allylphenylether werden von beiden artifizierten Enzymen nicht umgesetzt.....	111
Tab. 5.1: Vergleich des <i>ee</i> , der TON, TOF und Ausbeute der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels Metall-Laccase-PMOx mit einem MPV von 1 mit verschiedenen Metallspezies bei 0 °C für 7 d. Die Reaktion wurde mit 0,013 $\mu\text{mol/mL}$ Laccase-Konjugat, 0,013 $\mu\text{mol/mL}$ Metallspezies, 110 $\mu\text{mol/mL}$ TBHP, 10 $\mu\text{L/mL}$ ges. methanolischer KOH und 100 $\mu\text{mol/mL}$ Styrol in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein. Die TOF ist definiert als $\mu\text{mol}$ Produkt pro $\mu\text{mol}$ Protein pro h.	117
Tab. 6.1: Verwendete Chemikalien.....	126
Tab. 6.2: Verwendete Proteine.....	128
Tab. 6.3: Gase und Flüssiggase.....	128
Tab. 6.4: Verwendete Reagenzienmengen für die Polymerisation.....	131
Tab. 6.5: Einstellungen der Synthesemikrowelle.....	131
Tab. 6.6: Verwendete Enzyme, deren molare Massen, primäre Aminogruppen.....	134
Tab. 6.7: Molare Masse, Dichte und verwendetes Volumen (1 mmol) verschiedener Alkene für die asymmetrische Dihydroxylierung.....	138
Tab. 6.8: Reaktionsbedingungen für die Dihydroxylierung mittels $\text{FeCl}_2$ -Enzym-PMOx-Konjugaten.....	141
Tab. 6.9: Eingesetzte Massen bzw. Volumina der unterschiedlichen Fettsäuren sowie Gesamtausbeute der Reaktion bezogen auf alle 3 möglichen Regioisomere der gebildeten Ester.....	142
Tab. 6.10: Messbedingungen der HPLC-Analytik. Zu den Messbedingungen und Retentionszeiten siehe Kapitel 6.7.8.2.....	143
Tab. 6.11: Eingesetzte Massen bzw. Volumina in den unterschiedlichen Reaktionssätzen.	145
Tab. 6.12: Übersicht über die verwendeten Parameter der verschiedenen Messmethoden zur Detektion der Carbonsäureester. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm.....	154
Tab. 6.13: Auflistung der Retentionszeiten für die unterschiedlichen Produktester. Die absolute Konfiguration der einzelnen Enantiomere wurden nicht aufgeklärt (1 = Enantiomer mit der geringeren Retentionszeit, 2 = Enantiomer mit der höheren Retentionszeit). Die verwendeten Messbedingungen sind in Tab. 6.12 näher erläutert.	154

---



## 11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Stark vereinfachte Darstellung eines Katalysezyklus. ....	3
Abb. 2.2:	Auftragung der freien Enthalpie gegen den Reaktionsfortschritt einer Reaktion mit und ohne Katalysator nach SAUERMOST und FREUDIG. <sup>29</sup> .....	4
Abb. 2.3:	Schematische Darstellung des Schlüssel-Schloss-Prinzips sowie des „Induced fit“-Modells. Enzym: blau; Substrat: rot; Produkte: grün. ....	9
Abb. 2.4:	Schematische Darstellung der Funktionalisierung von Enzymen mit Poly(2-oxazolin)en mit Pyromellitsäuredianhydrid (PADA) als Linker nach KONIECZNY <i>et al.</i> <sup>16-18</sup> . 14	
Abb. 2.5:	Schematische Darstellung eines artifiziellen Metalloenzym. ....	16
Abb. 2.6:	Schematische Darstellung der Generierung artifizieller Metalloenzyme mittels Metallaustausch; M = Metall(komplex).....	16
Abb. 2.7:	Biotin-(Strept-)Avidin Technologie zur Generierung künstlicher Metalloenzyme durch die Verankerung der katalytisch aktiven Metallspezies an das Wirtprotein über einen Liganden, welcher über einen Spacer mit Biotin verknüpft ist. Abb. aus STEINREIBER und WARD <sup>145</sup> . ....	18
Abb. 2.8:	Schematische Darstellung des Konzepts zur Generierung organolöslicher AMEs durch Verknüpfung der Strategien zur Bildung von künstlichen Metalloenzymen mit der Funktionalisierung von Proteinen mittels Poly(2-alkyloxazolin)en. ....	20
Abb. 2.9:	Schematische Darstellung der Generierung organolöslicher artifizieller Metalloenzyme am Beispiel von Osmat-Laccase-PMOx.....	20
Abb. 2.10:	Schematische Darstellung einer orthogonalen Tandemkatalyse aus FOGG und DOS SANTOS <sup>191</sup> . ....	22
Abb. 2.11:	Schematische Darstellung einer Auto-Tandemkatalyse aus FOGG und DOS SANTOS <sup>191</sup> . ....	22
Abb. 2.12:	Schematische Darstellung einer assistierten Auto-Tandemkatalyse aus FOGG und DOS SANTOS <sup>191</sup> . ....	23
Abb. 4.1:	Aufbau der Poly(2-alkyloxazolin)e für die Funktionalisierung von Proteinen am Beispiel von Poly(2-methyloxazolin) mit einem Polymerisationsgrad von 30.....	30
Abb. 4.2:	Reaktionsschema einer lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation von 2-Methyl-2-oxazolin mit dem Initiator Benzyltosylat als Beispiel. Die Terminierung erfolgt hier mit Ethylendiamin.....	30
Abb. 4.3:	Reaktionsschema der Proteinmodifizierung mit PMOx unter Verwendung des Linkers Pyromellitsäuredianhydrid. ....	31
Abb. 4.4:	DLS-Messungen von PMOx-Enzym-Konjugaten und freiem PMOx in Chloroform sowie nativem Enzym in Wasser.....	33
Abb. 4.5:	Schematische Darstellung der Durchmesser der in Chloroform gebildeten Partikel verschiedener Enzym-PMOx30-Konjugate.....	34
Abb. 4.6:	Allgemeines Reaktionsschema der SHARPLESS-Dihydroxylierung mit Os-Laccase-PMOx. ....	35

- Abb. 4.7: Reaktionsschema der SHARPLESS-Dihydroxylierung mit Os-Laccase-PMOx und TBHP-basiertem Kooxidationsmittelsystem. .... 37
- Abb. 4.8: Fotos der Dihydroxylierung von Styrol mit  $K_3[Fe(CN)_6]$  (links) sowie TBHP (rechts) als Kooxidationsmittel. .... 38
- Abb. 4.9: TON und *ee* (*R*) der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx (MPV = 1) in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Reaktion wurde mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2OsO_2(OH)_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die  $TON_{Os}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat. .... 40
- Abb. 4.10: Fotos von 1 mg/mL Kaliumosmat in Chloroform (links) und Methanol (Mitte) sowie reines Methanol zum Vergleich (rechts). .... 41
- Abb. 4.11: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses [%] (*R*) der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx von der Reaktionstemperatur. Die Reaktionen wurden mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2OsO_2(OH)_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in  $CHCl_3$  für 7 d durchgeführt. .... 43
- Abb. 4.12: Abhängigkeit der  $TON_{Os}$  der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx von der Reaktionstemperatur. Die Reaktionen wurden mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2OsO_2(OH)_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in  $CHCl_3$  für 7 d durchgeführt. Die  $TON_{Os}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat. .... 44
- Abb. 4.13: Auftragung der normalisierten TON ( $TON/TON_{168h}$ ) gegen die Zeit der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels Laccase-PMOx als Ligand. Die Reaktionen wurden bei verschiedenen Temperaturen mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2OsO_2(OH)_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in  $CHCl_3$  für 7 d durchgeführt. Die schwarzen Linien zeigen den Trend der Datenpunkte und sind keine berechneten Regressionskurven. Die  $TON_{Os}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat. .... 44
- Abb. 4.14: Auftragung der TOF gegen die Zeit der asymmetrischen Dihydroxylierung mittels Os-Laccase-PMOx. Die Reaktionen wurden bei verschiedenen Temperaturen mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2OsO_2(OH)_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und verschiedenen Styrolkonzentrationen in  $CHCl_3$  für 24 h durchgeführt. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat pro h. .... 47
- Abb. 4.15: TON und *ee* [%] ((*1S,2R*) für 1*H*-Inden, (*S*) und  $\alpha$ -Methylstyrol) der Dihydroxylierung mit Osmat-Protein-PMOx (MPV = 1) in Chloroform. Die Reaktion wurde mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2OsO_2(OH)_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Alken bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Daten zu großen Teilen aus WILKEN<sup>[6]</sup>. .... 52
- Abb. 4.16: TON und *ee* [%] für 4-Methylstyrol (*S*) und 4-Chlorstyrol der Dihydroxylierung mit Osmat-Protein-PMOx (MPV = 1) in Chloroform. Die Reaktion wurde mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $K_2OsO_2(OH)_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und



---

100 µmol/mL Alken bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein. Daten zu großen Teilen aus WILKEN <sup>[g]</sup> .....	53
Abb. 4.17: Reaktionsschema der tandemkatalytischen Dihydroxylierung/Veresterung mit Os-Lipase ausgehend von Styrol.....	58
Abb. 4.18: Allgemeines Reaktionsschema der STEGLICH-Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit verschiedenen Carbonsäuren <sup>217-218</sup> .....	59
Abb. 4.19: HPLC-Chromatogramm der Steglich-Veresterung am Beispiel von Laurinsäure. Für die verwendeten Messbedingungen siehe Kapitel 6.7.8.2.....	60
Abb. 4.20: Reaktionsverlauf der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Hexansäure mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100 µmol/mL 1-Phenyl-1,2-ethandiol und 200 µmol/mL Hexansäure in Toluol bei RT für insgesamt 24 h durchgeführt.....	64
Abb. 4.21: Reaktionsverlauf der Veresterung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit Oktan- sowie Laurinsäure mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100 µmol/mL 1-Phenyl-1,2-ethandiol und 200 µmol/mL der Carbonsäure in Toluol bei RT für insgesamt 70 min durchgeführt.....	66
Abb. 4.22: Regio- und Enantioselektivität der tandemkatalytischen Dihydroxylierung/Veresterung von Styrol mit verschiedenen Carbonsäuren mittels immobilisierter CaLB. Die Reaktion wurde mit 3,5 mg/mL CaLB, 100 µmol/mL Styrol, 0,02 µmol/mL K <sub>2</sub> OsO <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub> , 110 µmol/mL TBHP und 200 µmol/mL Carbonsäure in Toluol oder Chloroform bei RT für 3 d durchgeführt.....	69
Abb. 4.23: Regioselektivität und Enantioselektivität der asymmetrischen Dihydroxylierung/Veresterung von Styrol mit Laurinsäure mittels Os-Lipase-PMOx in Chloroform bei verschiedenen MPV. Die Reaktionen wurden mit 0,013 µmol/mL Lipase-PMOx, 0,007 - 0,026 µmol/mL K <sub>2</sub> OsO <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub> , 110 µmol/mL TBHP und 100 µmol/mL Styrol bei 20 °C für 3 d durchgeführt.....	73
Abb. 4.24: Schematische Darstellung der Strategie zur Generierung selektiver artifizierender Metalloenzyme durch die Blockierung der primären Aminogruppen des Proteins.....	78
Abb. 4.25: Schematische Darstellung der Funktionalisierung der primären Aminogruppen von Proteinen mittels Anhydriden am Beispiel von Essigsäureanhydrid.....	79
Abb. 4.26: Auftragung des Funktionalisierungsgrades von Lysozym gegen die verwendeten molaren Überschüsse des Anhydrids pro freier primärer Aminogruppe des Enzyms. EA: Essigsäureanhydrid, PA: Propansäureanhydrid, HA: Hexansäureanhydrid. Daten zu großen Teilen aus Dorn <sup>[k]</sup> .....	81
Abb. 4.27: Fotos von 1,43 mg Lysozym-EA in 5 mL verschiedener Lösungsmittel; links: Chloroform, mitte: Acetonitril, rechts: Toluol.....	82
Abb. 4.28: DLS-Messungen von 4,2 mg acyliertem Lysozym in Toluol. EA: Essigsäureanhydrid, PA: Propansäureanhydrid, HA: Hexansäureanhydrid.....	82
Abb. 4.29: Auftragung des Funktionalisierungsgrades von BSA gegen die verwendeten molaren Überschüsse von Essigsäureanhydrid (EA) pro freier primärer Aminogruppe des Enzyms. Daten zu großen Teilen aus Dorn <sup>[k]</sup> .....	84
Abb. 4.30: Auftragung des ee ((S)-Enantiomer) bzw. der TON gegen den vor der Gefriertrocknung eingestellten pH-Wert der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-LYS-	

---

- AA mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden und einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol für 7 d bei 0 °C in Chloroform durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. Funktionalisierungsgrade des Proteins: blau 99 %, rot 57 %, grün 23 %. Daten zu großen Teilen Reproduktionen aus Dorn<sup>[k]</sup> ..... 87
- Abb. 4.31: Auftragung des *ee* (*S*-Enantiomer) bzw. der TOF bei der Dihydroxylierung von Styrol bei verschiedenen Temperaturen mit vollständig acylierten Osmat-LYS-Komplexen (pH 7) mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in Chloroform durchgeführt. Die Reaktionszeiten wurden gemäß vorheriger Untersuchungen mit Osmat-Laccase-PMOx gewählt und betragen bei 0 °C 7 d, bei 20 °C 3 d und bei 40 °C 1 d. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h. .... 90
- Abb. 4.32: Auftragung des *ee* (*S*-Enantiomer) bzw. der TOF bei der Dihydroxylierung von Styrol bei verschiedenen Temperaturen mit vollständig acylierten Osmat-BSA-Komplexen (pH 7) mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in Chloroform durchgeführt. Die Reaktionszeiten wurden gemäß vorheriger Untersuchungen mit Osmat-Laccase-PMOx gewählt und betragen bei 0 °C 7 d, bei 20 °C 3 d und bei 40 °C 1 d. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h. .... 92
- Abb. 4.33: Auftragung des *ee* (*S*-Enantiomer) bzw. der TOF bei der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-LYS-Komplexen mit einem MPV von 1. Die Reaktion wurde mit 0,03  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,03  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol für 7 d bei 0 °C in Chloroform oder Toluol durchgeführt. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h. .... 93
- Abb. 4.34: Reaktionsschema der asymmetrischen metallkatalysierten Epoxidierung am Beispiel von Styrol. .... 97
- Abb. 4.35: Auftragung der TON gegen die Zeit der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-LYS-EA-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. .... 98
- Abb. 4.36: Auftragung der TOF und des *ee* (*R*-Enantiomer) gegen die Temperatur der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-LYS-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen 7 d bei 0 °C, 3 d bei 20 °C und 1 d bei 40 °C und 50 °C. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h. .... 101
- Abb. 4.37: Auftragung der TOF und des *ee* (*R*-Enantiomer) gegen die Temperatur der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-BSA-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei verschiedenen Temperaturen. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Protein-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen 7 d bei 0 °C, 3 d bei

- 20 °C und 1 d bei 40 °C und 50 °C. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h..... 103
- Abb. 4.38: Auftragung der TOF (oben) sowie des *ee* (unten) der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Metall-LYS-Komplexe (pH 7) mit einem MPV von 1 bei 20 °C. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,06  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol für 3 d in DCM durchgeführt. Die TOF ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein pro h. .... 104
- Abb. 4.39: Auftragung der TON bzw. des *ee* (*(R)* unter Verwendung von  $\text{RuCl}_3$ , (*S*) bei  $\text{TiOMe}_4$ ) gegen das MPV der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru- sowie Ti-LYS-Komplexe (pH 7) mit verschiedenen MPV bei 20 °C für 3 d. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  Lysozym-Konjugat, 0,06-0,18  $\mu\text{mol/mL}$  Metallspezies, 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein..... 106
- Abb. 4.40: Auftragung der TON bzw. des *ee* (*(R)* unter Verwendung von  $\text{RuCl}_3$ , (*S*) bei  $\text{TiOMe}_4$ ) gegen das MPV der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru- sowie Ti-BSA-Komplexe (pH 7) mit verschiedenen MPV bei 40 °C für 1 d. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  BSA-Konjugat, 0,06-0,24  $\mu\text{mol/mL}$  Metallspezies, 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Protein. .... 107
- Abb. 4.41:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Ru-BSA-HA (pH 7) mit einem MPV von 3 bei 40 °C für 1 d. Die Reaktion wurde mit 0,06  $\mu\text{mol/mL}$  BSA-Konjugat, 0,18  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{RuCl}_3$ , 220  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP und 200  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol in DCM durchgeführt. Das Spektrum wurde bei 400 MHz in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommen und die chemische Verschiebung auf das TMS-Signal referenziert. .... 108
- Abb. 4.42: Illustration möglicher Metallbindungsstellen in Lysozym. Die Kugeln zeigen die vermuteten Bindungsstellen. Tyr: Lila, Trp: Orange, His: Türkis. .... 110
- Abb. 4.43: Illustration möglicher Metallbindungsstellen in BSA. Die Kugeln zeigen die vermuteten Bindungsstellen. Trp: Gelb, His: Türkis. .... 110
- Abb. 5.1: TON und *ee* der Dihydroxylierung von Styrol mit Osmat-Laccase-PMOx (MPV = 1) in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Reaktion wurde mit 0,013  $\mu\text{mol/mL}$  Laccase-PMOx, 0,013  $\mu\text{mol/mL}$   $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ , 110  $\mu\text{mol/mL}$  TBHP, 10  $\mu\text{L/mL}$  gesättigter methanolischer KOH und 100  $\mu\text{mol/mL}$  Styrol bei 0 °C für 7 d durchgeführt. Die  $\text{TON}_{\text{Os}}$  ist definiert als  $\mu\text{mol}$  Produkt pro  $\mu\text{mol}$  Osmat..... 115
- Abb. 5.2: Reaktionsschema der tandemkatalytischen Dihydroxylierung/Veresterung mit Os-Lipase-PMOx ausgehend von Styrol. .... 118
- Abb. 5.3: Schematische Darstellung der Strategie zur Generierung selektiver artifizierender Metalloenzyme durch die Blockierung der primären Aminogruppen des Proteins..... 120
- Abb. 5.4: Auftragung des Funktionalisierungsgrades von Lysozym gegen die verwendeten molaren Überschüsse des Anhydrids pro freier primärer Aminogruppe des Enzyms. EA: Essigsäureanhydrid, PA: Propansäureanhydrid, HA: Hexansäureanhydrid.

**Abb. 5.5:** Auftragung der TON bzw. des *ee* (*R*) unter Verwendung von RuCl<sub>3</sub>, (*S*) bei TiOMe<sub>4</sub>) gegen das MPV der asymmetrischen Epoxidierung von Styrol mittels vollständig acylierter Metall-Protein-Komplexe (pH 7) mit verschiedenen MPV bei 20 °C für 3 d für LYS-EA und bei 40 °C für 1 d für BSA-HA. Die Reaktion wurde mit 0,06 µmol/mL Protein-Konjugat, 0,06-0,24 µmol/mL Metallspezies, 220 µmol/mL TBHP und 200 µmol/mL Styrol in DCM durchgeführt. Die TON ist definiert als µmol Produkt pro µmol Protein..... 123

---