

# **Charakterisierung und rationale Immobilisierung von Lipasen in biphasischen Reaktionssystemen**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der  
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des  
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom Biologe

Andreas Buthe

aus Steinfurt

Berichter: Universitätsprofessor Dr.-Ing. Winfried Hartmeier  
Universitätsprofessor Dr.-Ing. Jochen Büchs

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2006

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.



Berichte aus der Biotechnologie

**Andreas Buthe**

**Charakterisierung und rationale Immobilisierung  
von Lipasen in biphasischen Reaktionssystemen**

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Shaker Verlag  
Aachen 2006

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2006

Copyright Shaker Verlag 2006

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN-10: 3-8322-5516-8

ISBN-13: 978-3-8322-5516-9

ISSN 1434-4556

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • E-Mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

## ***Vorwort***

*Diese Arbeit entstand im Rahmen meiner Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Biotechnologie der RWTH Aachen.*

*Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Winfried Hartmeier und Frau Dr. Marion Ansorge-Schumacher für die Überlassung des interessanten Themas und die exzellente Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Für die Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Prof. Jochen Büchs, der in fruchtbaren Diskussionen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Ebenso ist der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung dieser Arbeit innerhalb des SFB 540 "Modellgestützte experimentelle Analyse kinetischer Phänomene in mehrphasigen fluiden Reaktionssystemen" zu danken.*

*Des Weiteren möchte ich mich bei Tobias Recker, Lars Wiemann, Anne van den Wittenboer, Marco Schlepütz, Mathias Klein, Susanne Dreyer, Meike Beer, Thomas Somrak und Alice Kapitain herzlich bedanken, die im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Bachelorarbeiten meine Ideen mit unermüdlichem Einsatz und großer Begeisterung umsetzten. Darüber hinaus danke ich dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die im Rahmen des VIGONI-Projektes und der „Acciones Integrada“ ermöglichten Auslandsaufenthalte sowie in diesem Zusammenhang Dr. Paolo Braiuca, Prof. Andrés Alcantara und Prof. Francesco Molinari. Für die zahlreichen fachlichen Anregungen und kritischen Diskussionen in inspirierender Atmosphäre, die mir die italienische und spanische Lebensart näher brachte, gilt mein besonderer Dank Fabrizio Sibilla und Dr. Pablo Domínguez de María. Natürlich profitierte diese Arbeit auch von der herzlichen Arbeitsatmosphäre am Lehrstuhl für Biotechnologie, wofür allen Mitarbeitern herzlich gedankt sei.*

*Ganz besonders möchte ich meine Dankbarkeit gegenüber meinen Eltern betonen, die in unvergesslicher Art und Weise die Voraussetzungen für ein erfolgreiches Studium geschaffen haben!*



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Enzyme – wertvolle Werkzeuge in der Biotechnologie .....	1
1.2 Lipasen .....	3
1.3 Technische Nutzung von Lipasen .....	7
1.3.1 Einsatzspektrum .....	7
1.3.2 Reaktionssysteme für nicht-konventionelle Medien .....	9
1.4 Rationaler Einsatz von Biokatalysatoren – Immobilisierung .....	12
1.4.1 Immobilisierungsverfahren.....	12
1.4.2 Immobilisierung von Lipasen.....	15
1.4.3 Probleme beim technischen Einsatz von Lipase-Immobilisaten .....	17
1.5 Aufgabenstellung.....	20
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Chemikalien/Enzyme .....	22
2.2 Geräte .....	23
2.3 Gaschromatographische Analyse .....	23
2.4 Proteinmengenbestimmung nach BRADFORD [1976].....	24
2.5 Massentransfer im nicht-gelstabilisierten Zweiphasensystem .....	25
2.6 pH-Optimum der lipasenkatalysierten Veresterung .....	26
2.6.1 Titration der Enzymlösungen .....	26
2.6.2 Nicht-gelstabilisiertes biphasisches Reaktionssystem.....	26
2.6.3 Reihenuntersuchung weiterer Lipasen.....	27
2.7 Einfluss der Grenzfläche auf die lipasenkatalysierte Reaktion .....	27
2.7.1 Alginatekugeln verschiedener Größe.....	27
2.7.2 Nicht-gelstabilisiertes biphasisches Reaktionssystem.....	29
2.7.3 Gelstabilisiertes biphasisches Reaktionssystem .....	31
2.8 „Molecular modelling“ der Enzymoberfläche.....	31
2.9 Immobilisierung in Siliconsphären als Statische Emulsion .....	32
2.10 Immobilisierung nach der Sol-Gel-Technik .....	33
2.11 Bestimmung des Durchmessers der Immobilisate .....	34
2.12 Charakterisierung der Statischen Emulsion.....	36
2.12.1 Quellungsverhalten.....	36
2.12.2 Abrieb und Elastizität .....	37

2.12.3	Untersuchungen zum Massentransfer .....	38
2.12.4	Evaporation der emulgierten wässrigen Phase.....	39
2.12.5	Ausbluten .....	39
2.13	Lipaskatalysierte Synthese von Octyloctanoat.....	39
2.14	Lipaskatalysierte Synthese von Fettsäureethylhexylestern.....	40
2.15	Lipaskatalysierte Synthese von Propyllaurat .....	42
2.16	Lipaskatalysierte Racematspaltung von Benzoin.....	42

**3. Ergebnisse und Diskussion..... 45**

3.1	pH-Optimum der lipaskatalysierten Estersynthese .....	45
3.1.1	Wahl und Charakterisierung eines geeigneten Untersuchungssystems .....	46
3.1.2	pH-Optima .....	49
3.1.3	Einfluss der Propionsäurekonzentration auf das pH-Aktivitätsprofil.....	51
3.1.3.1	<i>pH-Aktivitätsprofil bei drei verschiedenen Gesamtsäurekonzentrationen ..</i>	51
3.1.3.2	<i>Substratkinetik der protonierten Säure am pH-Optimum .....</i>	53
3.1.4	Extrapolation der pH-Optima.....	55
3.1.5	Mechanistische Erklärung für das pH-Optimum der Veresterung.....	58
3.1.6	Praktische Relevanz .....	61
3.2	Bedeutung der Grenzfläche für die lipaskatalysierte Reaktion.....	64
3.2.1	Katalytische Aktivität und die spezifische Grenzfläche .....	66
3.2.1.1	<i>Enzym-Alginatkugeln – Variation der spezifischen Grenzfläche.....</i>	66
3.2.1.2	<i>Variable spezifische Grenzfläche .....</i>	68
3.2.1.3	<i>Konstante spezifische Grenzfläche.....</i>	72
3.2.1.4	<i>Variable spezifische Grenzfläche im gelstabilisierten Zweiphasensystem ..</i>	75
3.2.1.5	<i>Einfluss der Wasseraktivität bei variabler spezifischer Grenzfläche .....</i>	77
3.2.1.6	<i>Hydrolyse von Butylpropionat bei variabler spezifischer Grenzfläche .....</i>	79
3.2.2	„Molecular Modelling“ der Enzymoberfläche.....	81
3.2.3	Thermodynamik der Esterbildung im fluiden Zweiphasensystem .....	85
3.2.4	Hypothese über die Vorgänge an der Grenzfläche .....	88
3.2.5	Praktische Relevanz .....	90
3.3	Entwicklung einer Immobilisierungstechnik .....	92
3.3.1	Einfluss von Wasser auf die Produktivität biphasischer Reaktionssysteme ....	93
3.3.2	Erzeugung einer Statischen Emulsion in Silicon .....	96
3.3.3	Aktivität von in Statischer Emulsion immobilisierten Lipasen .....	99

---

3.3.3.1	<i>Aktivität der Statischen Emulsion</i> .....	100
3.3.3.2	<i>Vergleich mit Sol-Gel-Immobilisaten</i> .....	102
3.4	Charakterisierung der Statischen Emulsion.....	105
3.4.1	Katalytische Stabilität.....	105
3.4.1.1	<i>Wiederverwendbarkeit</i> .....	105
3.4.1.2	<i>Ausbluten</i> .....	106
3.4.1.3	<i>Lagerung</i> .....	107
3.4.2	Abriebstabilität und Elastizität .....	108
3.4.3	Quellung in Hexan.....	110
3.4.4	Massentransfer und Verteilung.....	111
3.5	Anwendung der Statischen Emulsion für die Synthese von Fein- und Bulkchemikalien .....	117
3.5.1	Lipase von <i>Thermomyces lanuginosa</i> für die Synthese von Esterölen .....	117
3.5.1.1	<i>Sol-Gel</i> .....	119
3.5.1.2	<i>Statische Emulsion</i> .....	120
3.5.1.3	<i>Veresterung von Fettsäuren aus Nebenproduktfraktionen der Biodieselproduktion</i> .....	121
3.5.2	Lipase B von <i>Candida antarctica</i> für die Synthese von Propyllaurat.....	123
3.5.3	Lipase von <i>Pseudomonas stutzeri</i> für die Synthese von <i>S</i> -Benzoinbutyrat....	127
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>134</b>
<b>5.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>136</b>