

Enzymtechnologie

Eutektische Lösungsmittel in der Biokatalyse

MAGDALENA PÄTZOLD, DIRK HOLTSMANN
 DECHEMA-FORSCHUNGSINSTITUT, INDUSTRIELLE BIOTECHNOLOGIE, FRANKFURT A. M.

Perfect solvents in biocatalysis have to fulfill a large number of requirements, such as high enzyme activity and stability, and high substrate solubility. Deep eutectic solvents (DES) have recently been evaluated as new solvents in different biocatalytic reactions. They can provide improvements in substrate supply, conversion and stability. The best results were obtained when the DES is formed by the substrates of an enzymatic reaction.

DOI: 10.1007/s12268-019-1074-2
 © Springer-Verlag 2019

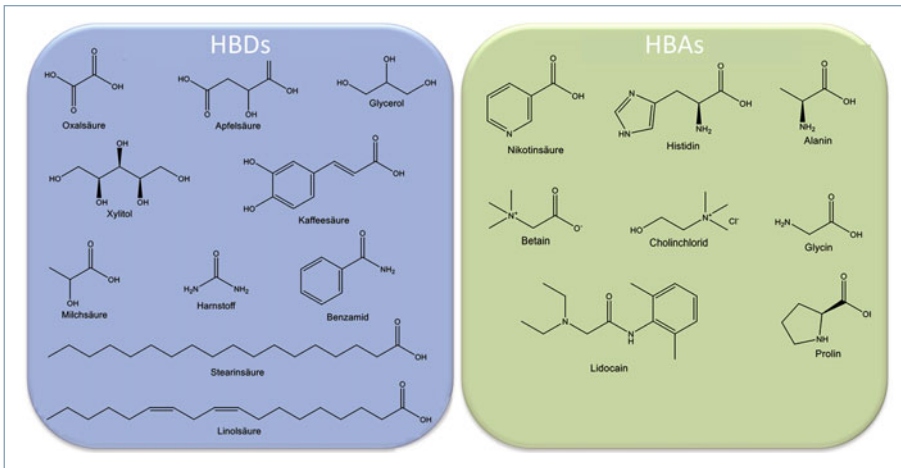
■ Wässrige Systeme sind die am häufigsten verwendeten Lösungsmittel in der Biokatalyse. Allerdings hat Wasser eine hohe Polarität, während viele relevante Substrate hydrophobe Eigenschaften aufweisen. Dies führt zu einer geringen Löslichkeit der Substrate im Reaktionsmedium und damit – selbst bei hundertprozentigem Umsatz – zu niedrigen Produktkonzentrationen. Die Umwandlung schwer wasserlöslicher Substrate erfordert daher ein Reaktionsmedium, das sowohl eine akzeptable Lösungskapazität für die Substrate aufweist, aber auch enzymverträglich ist und damit hohe Wechselzahlen (*ttn*, *total turnover numbers*) der Enzyme ermöglicht. Eine Biokatalyse in nicht-wässrigen Medien kann dazu führen, dass bedeutend höhere Substrat- und damit auch Produktkonzentrationen erreicht werden. Weiterhin können durch die Vermeidung wasserabhängiger Nebenreaktionen positive Einflüsse auf das Reaktionsgleichgewicht auftreten [1]. Daher wurden unkonventionelle Medien, wie organische Lösungsmittel, ionische und überkritische Flüssigkeiten, als Reaktionsmedien für Biotransformationen untersucht. In den letzten zwei Jahrzehnten haben insbesondere ionische Flüssigkeiten (ILs) als Reaktionsmedien enorm an Bedeutung gewonnen. Ihre technische Anwendbarkeit und Umweltfreundlichkeit sind jedoch oft begrenzt, was vor allem auf hohe Kosten, schlechte biologische Abbaubarkeit, schlechte Biokompatibilität und geringe Nachhaltigkeit zurückzuführen ist. Eutek-

tische Lösungsmittel, oft auch als tief eutektische Lösungsmittel (*deep eutectic solvents*, DES) bezeichnet, sind eine attraktive Alternative zu den ILs. DES wurden im Jahr 2003 erstmalig beschrieben und von R. J. Kazlauskas und Mitarbeitern 2008 in enzymatischen Reaktionen eingesetzt [2, 3]. DES sind Eutektika, die in der Regel durch Mischen eines Wasserstoffbindungsakzeptors (HBA) mit einem Wasserstoffbindungsdonor (HBD) unter gleichzeitigem Erwärmen und Rühren gebildet werden, bis eine Flüssigkeit entsteht [4]. Aufgrund der Bildung von intermolekularen Wasserstoffbrücken bleiben die gebildeten DES bei Umgebungstemperatur flüssig [5]. Der eutektische Punkt einer Mischung beschreibt die molare Zusammensetzung zwischen HBA und HBD, bei der die stärkste Gefrierpunktniedrigung auftritt. DES spielen wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle in der Natur; die Bildung von DES in Zellen könnte beispielsweise die hohen Konzentrationen von schlecht wasserlöslichen Flavonoiden und Anthocyanen in den Zellen erklären [6]. Im Bereich der Biotechnologie können die DES sowohl in der Reaktionstechnik wie auch zur Extraktion von Wertstoffen eingesetzt werden. DES werden auch in weiteren Anwendungsfeldern (z. B. Batterie- und Brennstoffzellentechnik, Elektrochemie und Korrosion) erfolgreich eingesetzt. Einer der Gründe für diesen vielfältigen Einsatz ist, dass die DES als ungiftige, nicht-flüchtige, nicht-brennbare und häufig als biologisch abbaubare Flüssigkeiten

bezeichnet werden können. Daher werden DES häufig als „grüne“ Lösungsmittelklasse angesehen [7]. Ein weiterer Grund für das vermehrte Interesse ist die große Anzahl möglicher Ausgangsstoffe, aus denen ein geeignetes DES für eine bestimmte Anwendung entwickelt werden kann. Für technische Anwendungen können DES, z. B. unter Verwendung kostengünstiger HBA wie Cholinchlorid (ChCl) [8] und HBDs, aus nachwachsenden Rohstoffen wie Zucker, organischen Säuren und Aminosäuren, Alkoholen oder Prozessabfällen wie Glycerin hergestellt werden. **Abbildung 1** zeigt beispielhaft chemische Strukturen entsprechender Ausgangsstoffe für DES. Für die Herstellung von DES sind in der Literatur im Wesentlichen zwei Methoden beschrieben. Zum einen besteht die Möglichkeit, DES durch Rühren der Ausgangsstoffe bei erhöhten Temperaturen herzustellen. Zum anderen lassen sich DES auch durch Gefriertrocknung von wässrigen Lösungen der Ausgangssubstanzen produzieren. Die Reinheit der synthetisierten DES hängt direkt von der Reinheit der Ausgangsstoffe ab. Im Gegensatz zur Synthese ionischer Flüssigkeiten erfolgt keine weitere Aufreinigung nach der Synthese, wodurch die Herstellung von DES im Gegensatz zur Synthese von ILs einen E-Faktor ($\text{kg}_{\text{Abfall}}/\text{kg}_{\text{Produkt}}$) von 0 aufweist. Verschiedene Enzyme und Mikroorganismen wurden bisher erfolgreich für Biotransformationen in DES eingesetzt [1]. Der Schwerpunkt lag dabei auf lipasekatalysierten Reaktionen mit freien und immobilisierten Enzymen, insbesondere Synthesen von Esterverbindungen und Umesterungsreaktionen. Weiterhin wurden auch Dehalogenierungen, die Hydrolyse von Epoxidbindungen, Peptidsynthesen, Oxidationen und die Knüpfung von C-C-Bindungen in DES durchgeführt.

Zwei-in-eins-Konzept – DES als Lösungsmittel und Substratpool

In den ersten Untersuchungen diente das DES als Lösungsmittel für die Substrate, oft auch nur als Ko-Solvens in anderen Lösungsmitteln. Motiviert von der Prämisse „das beste Lösungsmittel ist kein Lösungsmittel“ [9]

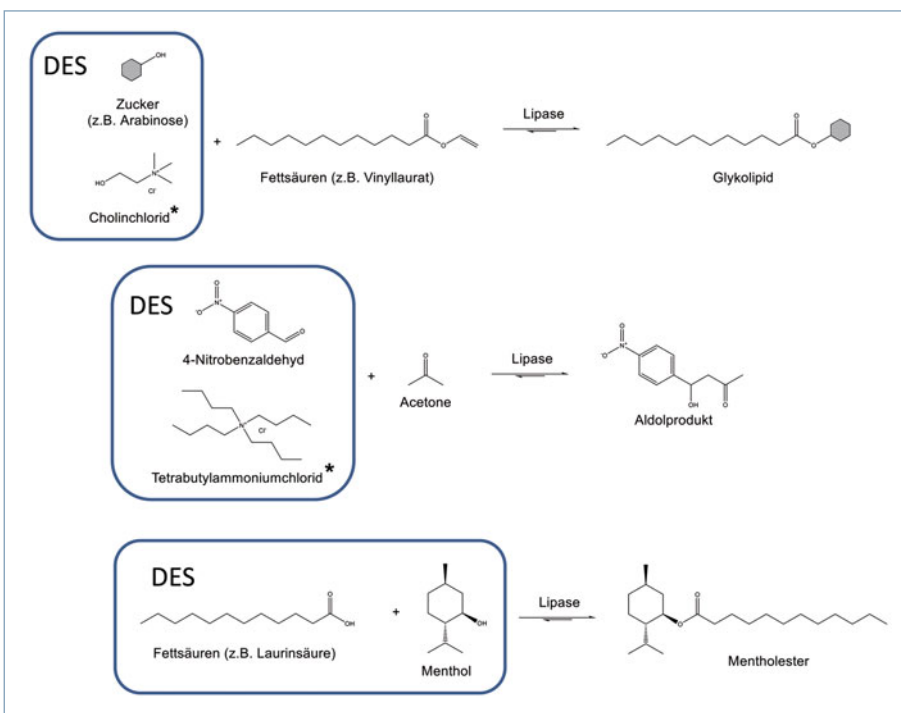


▲ **Abb. 1:** Ausgewählte Komponenten für die Herstellung von eutektischen Lösungsmitteln (adaptiert aus [15]). HBAs: Wasserstoffbindungsakzeptoren; HBDs: Wasserstoffbindungsdonoren.

haben kürzlich einige Forschungsgruppen Reaktionen untersucht, in denen das Substrat ein Teil des DES ist. In diesem sogenannten Zwei-in-eins-Konzept hat das DES zwei Aufgaben – es fungiert gleichzeitig als Reaktionsmedium und Substratpool (**Abb. 2**).

Auf konventionelle Lösungsmittel kann bei diesem Ansatz weitestgehend verzichtet werden. Ein vielversprechendes Beispiel für das Zwei-in-eins-Konzept ist die Lipase-katalysierte Synthese von Glykolipiden, die in Waschmitteln als Biotenside eingesetzt wer-

den können. Hier wurden DES aus Cholinchlorid und verschiedenen Zuckern verwendet [10]. In dieser Reaktion dienten die Zucker gleichzeitig als DES-Komponente und Substrat. Der Vorteil der Verwendung der DES besteht darin, dass der Einsatz eines organischen Lösungsmittels vermieden und Löslichkeitsprobleme des Zuckers in nicht-wässrigen Lösungsmitteln ausgeschlossen werden konnten. Eine Vielzahl von Kombinationen aus Zuckern und Fettsäuren wurden als potenzielle Substrate für die enzymatische



▲ **Abb. 2:** Beispiele für Umsetzungen, in denen das DES (*deep eutectic solvent*) sowohl als Substratpool wie auch als Lösungsmittel dient (* = nicht umgesetzte Komponente des DES) [10–13].

Synthese von maßgeschneiderten Glykolipiden untersucht. Für eine lipasekatalysierte C-C-Knüpfung zwischen 4-Nitrobenzaldehyd (4-NBA) und Aceton wurde ein DES aus 4-NBA und einer quartären Ammoniumverbindung eingesetzt [11]. In einem dritten Beispiel wurde aus beiden Substraten ein DES gebildet, ohne dass ein zusätzliches Lösungsmittel oder eine zusätzliche DES-Komponente eingesetzt werden musste [12, 13]. Das Terpen (-)-Menthol und verschiedene Fettsäuren wurden als Reaktionsmedium für die Lipasekatalysierte Veresterung der DES-Komponenten zur Synthese von (-)-Mentholfettsäureestern eingesetzt. (-)-Menthol besitzt aufgrund seines charakteristischen Geschmacks nach Minze und seiner erfrischenden Kühlwirkung ein breites Anwendungsspektrum in den Bereichen Aromen, Kosmetik, Pharmazie sowie in der Tabakindustrie. Für einige Anwendungen kann es sinnvoll sein, das starke Aroma von (-)-Menthol durch Veresterung mit Fettsäuren abzumildern. Durch den Einsatz des DES konnten Produktivitäten von über 200 Gramm pro Liter und Stunde und finale Produktkonzentrationen von bis zu 460 Gramm pro Liter erreicht werden. Es wurde weiterhin gezeigt, dass der Zusatz von Wasser die Reaktionen beschleunigen kann, was vermutlich durch eine Erhöhung der Enzymaktivität im DES bedingt ist. In diesem Beispiel wurden auch die E-Faktoren als grober Parameter für die Abschätzung der Umweltbelastung bestimmt [14]. Hier wurden sehr geringe Werte von bis zu $1,7 \text{ kg}_{\text{Abfall}}/\text{kg}_{\text{Produkt}}$ ermittelt. Das unterstreicht die Vorteile der DES im Allgemeinen und im Besonderen die des Zwei-in-eins-Konzeptes für ressourceneffiziente Biotransformationen.

Zusammenfassung und Ausblick

Der Einsatz von DES-basierten Prozessen bietet die Möglichkeit, Bioprozesse mit extrem

hohen Substratkonzentrationen zu entwickeln, welche zu hohen Produktkonzentrationen führen können. Insbesondere das Zwei-in-eins-Konzept kann dazu genutzt werden, neue ökonomische und ökologische Synthesekonzepte zu entwickeln. Aufgrund der Vielfalt der Ausgangsstoffe kann erwartet werden, dass sich für vielfältige Biotransformationen geeignete DES identifizieren lassen. Weiterhin erlauben die DES auch komplett neue Reaktionswege, welche in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln nicht möglich sind. Bisher wurden meist Lipasen in DES eingesetzt, im Fokus der aktuellen Untersuchungen stehen nun vermehrt weitere Enzyme und auch Ganzzell-Biokatalysatoren. Auch die Rückgewinnung der nicht umgesetzten Komponenten des DES und eine Produktabtrennung rücken vermehrt in den Mittelpunkt. Zusammenfassend erweitern die DES das biokatalytische Synthesepotenzial um ein „grünes“ und „einfaches“ Lösungsmittel.

Danksagung

Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die freundliche Unterstützung der Forschungsarbeiten im Rahmen des Projektes „NIESEL – Niedrigschmelzende eutektische Solventien als Lösungsmittel für die Biokatalyse“ (Förderkennzeichen 031B0014C).

Literatur

- [1] Pätzold M, Siebenhaller S, Kara S et al. (2019) Deep eutectic solvents as efficient solvents in biocatalysis. *Trends Biotechnol*, doi: 10.1016/j.tibtech.2019.03.007
- [2] Abbott AP, Capper G, Davies DL et al. (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem Commun (Camb)* 1:70–71
- [3] Gorke JT, Srien F, Kazlauskas RJ (2008) Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem Commun (Camb)* 10:1235–1237
- [4] Liu P, Hao J-W, Mo L-P et al. (2015) Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions. *RSC Adv* 5:48675–48704

- [5] Pena-Pereira F, Namiesnik J (2014) Ionic liquids and deep eutectic mixtures: sustainable solvents for extraction processes. *ChemSusChem* 7:1784–1800
- [6] Choi YH, van Spronsen J, Dai Y et al. (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol* 156:1701–1705
- [7] Paiva A, Craveiro R, Aroso I et al. (2014) Natural deep eutectic solvents – solvents for the 21st century. *ACS Sustain Chem Eng* 2:1063–1071
- [8] Zhao H, Zhang C, Crittle TD (2013) Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J Mol Catal B Enzym* 85–86:243–247
- [9] Sheldon RA (2005) Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chem* 7:267–278
- [10] Siebenhaller S, Muhle-Goll C, Luy B et al. (2016) Sustainable enzymatic synthesis of glycolipids in a deep eutectic solvent system. *J Mol Catal B: Enzym* 133:S281–S287
- [11] Milker S, Pätzold M, Bloh JZ et al. (2019) Comparison of deep eutectic solvents and solvent-free reaction conditions for aldol production. *Mol Catal* 466:70–74
- [12] Hümmer M, Kara S, Liese A et al. (2018) Synthesis of (-)-menthol fatty acid esters in and from (-)-menthol and fatty acids – novel concept for lipase catalyzed esterification based on eutectic solvents. *Mol Catal* 458:67–72
- [13] Pätzold M, Weimer A, Liese A et al. (2019) Optimization of solvent-free enzymatic esterification in eutectic substrate reaction mixture. *Biotechnol Rep* 22:e00333
- [14] Ni Y, Holtmann D, Hollmann F et al. (2014) How green is biocatalysis? To calculate is to know. *ChemCatChem* 6:930–943
- [15] Francisco M, van den Bruinhorst A, Kroon MC (2013) Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents. *Angew Chem Int Ed Engl* 52:3074–3085



Magdalena Pätzold und Dirk Holtmann

Korrespondenzadresse:

Dr.-Ing. Dirk Holtmann
 DECHEMA-Forschungsinstitut
 Industrielle Biotechnologie
 Theodor-Heuss-Allee 25
 D-60486 Frankfurt a. M.
 Tel.: 069-7564-610
 holtmann@dechema.de