

Enzymatische Transformationen von Mono- und Disacchariden in Gegenwart von Lipasen und β -Glycosidasen



Vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)
der Bergischen Universität
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Guido Machmüller
aus Gelsenkirchen

2004

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20050460

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20050460>]

Eingereicht am: 29. September 2004
Tag der mündlichen Prüfung: 05. November 2004

Referent: Prof. Dr. M. P. Schneider
Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Altenbach

Präambel

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2002 bis September 2004 im Fachbereich C – Mathematik und Naturwissenschaften – Organische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. P. Schneider für die herausfordernde Themenstellung, die Betreuung sowie für die gewährten Freiheiten bei der Durchführung dieser Arbeit. Zahlreiche Ratschläge und Gespräche waren mir eine große Hilfe.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Altenbach danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Des Weiteren möchte ich allen danken, die durch Aufnahme von Spektren und Chromatogrammen oder Durchführung von Analysen zu dieser Arbeit beigetragen haben: Frau I. Polanz, Frau A. Kessler, Herrn Dr. C. M. Weissshuhn und Herrn R. Radon.

Weiterhin möchte ich folgenden Personen besonders danken: Katja Buhr, Andreas Fischbach sowie Dr. Stefan Müller für die schnelle Korrektur der Rohfassungen.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, in der diese Arbeit entstanden ist. In diesem Zusammenhang möchte ich besonders meine Kollegen Fabio Fazio und Stefan Müller erwähnen, die durch ihre stete Bereitschaft zur mentalen Erbauung sowie durch Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Summary

Due to their overfunctionality the direct a) regioselective esterification or b) stereoselective glycosidation of native, i.e. underivatised sugars (Fig. 1.1. Enzymic derivatisations of D-glucose) poses a particularly challenging problem to synthetic organic chemists. In most cases the use of suitable protected groups and/or multistep synthetic sequences – all methods of low atom efficiency – provided in the past reasonably practical solutions.

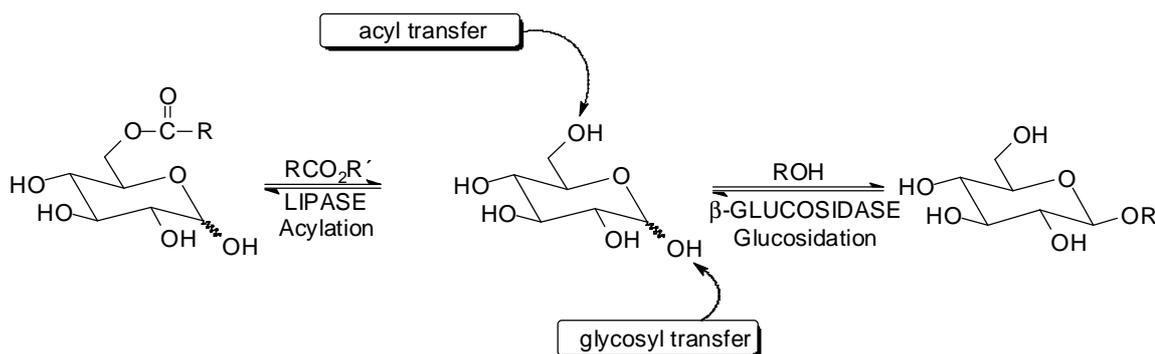


Fig. 1-1. Enzymic derivatisations of D-glucose

Hydrolytic enzymes such as esterhydrolases (lipases) or glycosidases are known for their capability of such derivatisations with high regio- and stereoselectivity, respectively. However, successful applications of these transformations were largely limited by the

- low solubility of native sugars in non-polar solvents, where lipases display their highest esterification activity
- low activity (or inactivity) of glycosidases in organic solvents.

In the past the problem was solved partially by using modified sugars like alkyl glycosides and protected sugars, solvents like DMF or pyridine or solubilising agents like phenyl boronic acid.

In this work we provide satisfactory solutions for both problems using native sugars throughout in non-toxic solvents. Inspired by the discovery of Prasad and Sørensen [1] that 2-deoxy-D-ribose and D-ribose can be acylated by Novozym SP 435™ in THF, we were able to demonstrate that also hexoses – which are practically insoluble in such organic solvents – can be esterified with high regioselectivity and excellent yields.

Similarly, **direct** glycosylations *via* **reverse hydrolysis** of native, unprotected D-glucose were achieved by compromising the low solubility of these materials in organic solvents with the need of glucosidases for a *microaqueous* environment for activity. This way we were able to produce β -glycosides in stoichiometric reactions with up to 50 % yield. Yields of this magnitude were previously only achieved with excess of one reaction partner and the use of activated glycosides.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	15
1.1	<i>Gegenstand der Arbeit</i>	15
1.2	<i>Zuckerester</i>	15
1.2.1	Einsatzmöglichkeiten	15
1.2.2	Nichtenzymatische Synthesen	16
1.3	<i>Glycoside</i>	18
1.3.1	Einsatzmöglichkeiten	18
1.3.2	Nichtenzymatische Synthesen	19
1.4	<i>Terminologie</i>	22
1.5	<i>Zielsetzung – allgemein</i>	23
1.5.1	Enzymatische regioselektive Acylierung	23
1.5.2	Enzymatische stereoselektive Glycosidierung.....	23
1.5.2.1	Glycosyltransferasekatalysierte Reaktionen	24
1.5.2.2	Glycosidasekatalysierte Reaktionen	24
1.5.2.3	Auswahl	24
1.5.3	Zielsetzung – konkret.....	25
2	Problemstellung	26
2.1	<i>Allgemeine Problemstellung – Zucker als Substrate für enzymatische Verknüpfungsreaktionen</i>	26
2.2	<i>Die spezielle Problemstellung bei der enzymatischen Acylierung</i>	28
2.2.1	Reverse Hydrolyse.....	28
2.2.2	Umesterung	29
2.2.2.1	Allgemein	29
2.2.2.2	Thermodynamische und kinetische Reaktionsführung	29
2.2.2.3	Thermodynamisch kontrollierte Umesterung: Irreversibler Acyltransfer	31
2.3	<i>Die spezielle Problemstellung bei der Glycosidsynthese</i>	33
2.3.1	Reverse Hydrolyse.....	33
2.3.2	Transglycosidierung.....	33
2.3.2.1	Thermodynamische und kinetische Reaktionsführung	34
3	Stand der Technik	37
3.1	<i>Enzymatische Acylierung von Zuckern – Stand der Technik</i>	37
3.1.1	Enzymatische Acylierung in Wasser	37

3.1.2	Enzymatische Acylierung in polaren organischen Lösungsmitteln	38
3.1.3	Enzymatische Acylierung in 2-Phasen-Systemen.....	39
3.1.4	Enzymatische Acylierung derivatisierter Zucker	39
3.1.4.1	Acylierung von Glycosiden	39
3.1.4.2	Acylierung von Zuckeracetalen	40
3.1.4.3	Acylierung von Anhydrozuckern	41
3.1.4.4	Acylierung von cyclischen Bis(phenylborsäure)estern	42
3.1.5	Enzymatische Acylierungen immobilisierter Zucker	43
3.1.6	Enzymatische Acylierungen in apolaren Lösungsmitteln	43
3.1.7	Zusammenfassung – Stand der Technik	44
3.2	<i>Enzymatische Glycosidierung von Zuckern – Stand der Technik.....</i>	<i>46</i>
3.2.1	Stand der Technik – Reverse Hydrolyse	46
3.2.1.1	Zucker als Akzeptoren – Di- und Oligosaccharide	46
3.2.1.2	Zwei-Phasen-Systeme	47
3.2.1.3	Erniedrigung der initialen Wasserkonzentration durch Cosolventien	48
3.2.2	Stand der Technik – Transglycosidierungen.....	50
3.2.3	Zusammenfassung – Stand der Technik	54
4	Durchführung	55
4.1	<i>Enzymatische Acylierung von Zuckern.....</i>	<i>55</i>
4.1.1	Zuckerester durch reverse Hydrolyse	55
4.1.1.1	Reaktionen in Wasser	55
4.1.1.2	Zuckerestersynthese im Schaumreaktor	57
4.1.2	Zuckerester durch Umesterung	58
4.1.2.1	Reaktionen in THF	58
4.1.2.2	Reaktionen in <i>N</i> -Methylpyrrolidon	90
4.1.2.3	Reaktion in Mischungen aus <i>N</i> -Methylpyrrolidon und Tetrahydrofuran	91
4.1.2.4	Übersättigte Lösungen	92
4.1.3	Diskussion der Ergebnisse	96
4.1.4	Ausblick.....	97
4.2	<i>Enzymatische Glycosidierung von Zuckern</i>	<i>99</i>
4.2.1	Entfernung des gewünschten Reaktionsproduktes aus dem Reaktionsgleichgewicht.....	99
4.2.1.1	Entfernung des gewünschten Reaktionsproduktes aus dem Reaktionsgleichgewicht durch Ausfällung	100
4.2.1.2	Entfernung des gewünschten Reaktionsproduktes aus dem Reaktionssystem	101

4.2.1.3 Entfernung des gewünschten Reaktionsproduktes aus dem Reaktionsgleichgewicht durch Komplexierung	101
4.2.2 Feststoff-zu-Feststoff-Umsetzungen	102
4.2.3 Schaumreaktoren	103
4.2.4 Enzymmodifizierungen	104
4.2.5 Kontrolle der Wasseraktivität	105
4.2.5.1 Die Thermodynamik der Kondensationsreaktionen	105
4.2.5.2 Kontrolle der Wasseraktivität I: gesättigte Salzlösungen	107
4.2.5.3 Kontrolle der Wasseraktivität II: Paare von Salzhydraten	111
4.2.5.4 Das Konzept der mikrowässrigen Umgebung	111
4.2.5.5 Immobilisierung in Gelatine und Agar-Agar	112
4.2.5.6 Immobilisierung auf Kieselgur, Bleicherde und Kieselgel	113
4.2.5.7 Immobilisierung auf EXTrelut NT™	113
4.2.6 Produktpalette	114
4.2.6.1 1-O-Allyl- β -D-glucosid (39)	115
4.2.6.2 1-O-Allyl- β -D-galactosid (40)	116
4.2.6.3 1-O-Benzyl- β -D-glucosid (41)	117
4.2.6.4 1-O-(6-Hydroxy- <i>n</i> -hexyl)- β -D-glucosid (42)	118
4.2.6.5 1-O-(6-Hydroxy- <i>n</i> -hexyl)- β -D-galactosid (43)	119
4.2.6.6 1-O-(4-Penten-1-yl)- β -D-glucosid (44)	120
4.2.6.7 1-O-(4-Penten-1-yl)- β -D-galactosid (45)	121
4.2.6.8 1-O-(Trimethylsilylethyl)- β -D-glucosid (46)	122
4.2.7 Diskussion der Ergebnisse	124
4.2.8 Ausblick	124
4.3 Zusammenfassung	125
5 Experimenteller Teil	129
5.1 Allgemeine Angaben	129
5.2 Verwendete Reagenzien, Edukte und Lösungsmittel	131
5.3 Verwendete Enzyme	131
5.3.1 Lipasen	131
5.3.2 Glycosidasen	131
5.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften	132
5.4.1 AAV 1 – Synthese von Zuckerestern in THF	132
5.4.2 AAV 2 – Synthese von Zuckerestern in übersättigten Lösungen	132
5.4.3 AAV 3 – Synthese von Fettsäurevinylestern	132

5.4.4	AAV 4 – Glycosidsynthesen unter Kontrolle der Wasseraktivität	133
5.4.5	AAV 5 – Synthese von Glycosiden auf mineralischem Trägermaterial.....	133
5.4.6	AAV 6 – Synthese von Zuckerestern im Durchflussreaktor.....	134
5.5	<i>Synthesevorschriften</i>	135
5.5.1	Spezielle Arbeitsvorschriften	135
5.5.1.1	SAV 1 – Versuch zur Synthese von Glycosiden unter Kontrolle der Wasseraktivität durch Zugabe von Salzen	135
5.5.1.2	SAV 2 – Versuch der Synthese von Glycosiden durch Schaffung einer mikrowässrigen Umgebung (Immobilisierung in Gelatine bzw. Agar-Agar)	135
5.5.1.3	SAV 3 – Herstellung und Evaluierung von Lipase-Tensid-Agglomeraten	136
5.5.1.4	SAV 4 – Feststoff-zu-Feststoff-Umsetzungen	136
5.5.1.5	SAV 5 – Versuch zur Synthese von Glycosiden im Schaumreaktor	136
5.5.2	Zuckerester und Vorläufermoleküle	137
5.5.2.1	6-O-Lauroyl-D-glucose (1)	137
5.5.2.2	6-O-Lauroyl-D-galactose (2)	139
5.5.2.3	6-O-Lauroyl-D-mannose (3)	140
5.5.2.4	5-O-Lauroyl-D-ribose (4) in Lösung	142
5.5.2.5	5-O-Lauroyl-2-desoxy-D-ribose (5) in Lösung	143
5.5.2.6	5-O-Lauroyl-D-arabinose (6) in Lösung	144
5.5.2.7	5-O-Lauroyl-L-arabinose (7)	144
5.5.2.8	5-O-Lauroyl-D-xylose (8) in Lösung	145
5.5.2.9	6-O-Lauroyl-1-[2-(hydroxymethyl)phenyl]-β-D-glucopyranosid (9)	146
5.5.2.10	6-O-Lauroyl-1-[2-(lauroylmethyl)phenyl]-β-D-glucopyranosid (10)	147
5.5.2.11	1-[2-(Lauroylmethyl)phenyl]-β-D-glucopyranosid (11)	148
5.5.2.12	6-O-Lauroyl-L-ascorbinsäure (12)	149
5.5.2.13	6'-O-Lauroylsaccharose (13)	149
5.5.2.14	6,6'-O,O'-Dilauroyl-α-D-fructofuranose-β-D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid (14)	150
5.5.2.15	6,6'-O,O'-Dicapryloyl-α-α'-trehalose (15)	151
5.5.2.16	6,6'-O,O'-Dicaprinoyl-α-α'-trehalose (16)	152
5.5.2.17	6,6'-O,O'-Dilauroyl-α-α'-trehalose (17)	153
5.5.2.18	6,6'-O,O'-Dimyristinoyl-α-α'-trehalose (18)	154
5.5.2.19	6,6'-O,O'-Dipalmitoyl-α-α'-trehalose (19)	155
5.5.2.20	6,6'-O,O'-Distearoyl-α-α'-trehalose (20)	156
5.5.2.21	6,6'-O,O'-Dioleoyl-α-α'-trehalose (21)	157
5.5.2.22	6,6'-O,O'-Dierucaoyl-α-α'-trehalose (22)	158
5.5.2.23	6,6'-O,O'-Dilinoyl-α-α'-trehalose (23)	159
5.5.2.24	6,6'-O,O'-Di(12-Hydroxystearoyl)-α-α'-trehalose (24)	160

5.5.2.25	Caprylsäurevinylester (25)	161
5.5.2.26	Caprinsäurevinylester (26)	162
5.5.2.27	Myristinsäurevinylester (27)	163
5.5.2.28	Palmitinsäurevinylester (28)	164
5.5.2.29	Stearinsäurevinylester (29)	166
5.5.2.30	12-(<i>R</i>)-Hydroxystearinsäurevinylester (30)	167
5.5.2.31	Ölsäurevinylester (31)	168
5.5.2.32	Linolsäurevinylester (32)	170
5.5.2.33	Erucasäurevinylester (33)	171
5.5.2.34	1,4-Dilauroyl-meso-erythritol (34)	172
5.5.2.35	1(4)- <i>sn</i> -Lauroyl-meso-erythritol (35)	173
5.5.2.36	2-Desoxi-2-t-butylloxycarbonylamino-D-glucose (<i>N</i> -BOC-Glucosamin) (36)	174
5.5.2.37	6- <i>O</i> -Lauroyl-2-desoxi-2-t-butyl-oxycarbonylamino-D-glucose (6- <i>O</i> -Lauroyl- <i>N</i> -BOC-glucosamin) (37)	175
5.5.2.38	<i>N</i> -Lauroyl-6-desoxi-6-amino-D-glucose (38)	176
5.5.3	β -Glycoside.....	177
5.5.3.1	1- <i>O</i> -Allyl- β -D-glucopyranosid (39)	177
5.5.3.2	1- <i>O</i> -Allyl- β -D-galactopyranosid (40)	177
5.5.3.3	1- <i>O</i> -Benzyl- β -D-glucopyranosid (41)	178
5.5.3.4	1- <i>O</i> -(6'-Hydroxyhexyl)- β -D-glucopyranosid (42)	179
5.5.3.5	1- <i>O</i> -(6'-Hydroxyhexyl)- β -D-galactopyranosid (43)	179
5.5.3.6	1- <i>O</i> -(Pent-4-enyl)- β -D-glucopyranosid (44)	180
5.5.3.7	1- <i>O</i> -(Pent-4-enyl)- β -D-galactopyranosid (45)	181
5.5.3.8	1- <i>O</i> -(2-(Trimethylsilyl)ethyl)- β -D-glucopyranosid (46)	181
6	Anhang	183
6.1	<i>Lipasen</i>	183
6.1.1	Struktur und Wirkungsmechanismus von Lipasen.....	183
6.1.2	Die Enzymkinetik beim Spezialfall der lipasekatalysierten Reaktion – Grenzflächenaktivierung	186
6.1.2.1	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i> (CaL-B)	187
6.2	<i>Glycosidasen</i>	189
6.2.1	Der Mechanismus der retentiven β -Glucosidase-katalysierten β -Glucosidspaltung	192
6.2.1.1	Die Bedeutung der Wasseraktivität	194
6.2.1.2	Gleichgewichtsumsätze für hydrolytische Reaktionen in Abhängigkeit von der Wasseraktivität a_w	197

7	Abkürzungen und Symbole	201
8	Index	203
9	Literaturverzeichnis	207

1 Einleitung

1.1 Gegenstand der Arbeit

Die regio- und stereoselektive Derivatisierung von Mono- und Disacchariden stellt aufgrund der Überfunktionalisierung solcher Moleküle eine präparative Herausforderung an den synthetisch arbeitenden Chemiker dar. Eine teilweise Lösung dieser Probleme besteht in der Nutzung von Schutzgruppen oder der Regioselektivität von Biokatalysatoren.

Gegenstand dieser Arbeit ist die biokatalytische, regio- bzw. stereoselektive Überführung von Mono- und Disacchariden in Zuckerester und Glycoside.

1.2 Zuckerester

1.2.1 Einsatzmöglichkeiten

Die Modifizierung von Zuckern, Zuckeralkoholen und deren Derivaten mit Fettsäuren ist von beträchtlichem praktischem Interesse. Eine Reihe derartiger Produkte haben a) in der Lebensmitteltechnologie (siehe Lebensmittelzusatzstoffe E 473-4, E 432-6, E 444 und E 491-5), b) als Tenside [2] und c) als pharmazeutische Wirkstoffe [3] einige Bedeutung erlangt:

- Die aus der Acylierung von Mono- und Disacchariden resultierenden, nichtionischen, oberflächenaktiven Verbindungen finden aufgrund ihrer Emulgator- [4] und Tenseideigenschaften u.a. Verwendung als Kosmetikgrundstoffe, als Lebensmittelzusatzstoffe*, als Entfettungsmittel in der Galvanik [5, 6, 7] und als Solubilisierungstenseide [8] und kristallisationsfördernde Agenzien [9] für Membranproteine in der Mikrobiologie.
- Der durch Mehrfachveresterung von Saccharose gewonnene Saccharosepolyester wird unter dem Markennamen *Olestra* als „kalorienfreies“ Diätfett vermarktet.
- Acylierte Ascorbinsäure findet Anwendung als fettlösliches Antioxidans [10].

Isomerenreine Zuckerester sind potentiell wertvolle Synthesebausteine aus dem *chiral pool* für die organische Chemie.

Derartige Produkte können aus preisgünstigen, leicht verfügbaren und natürlichen Rohstoffen (Triglyceride und Kohlenhydrate) erhalten werden. Sie sind biokompatibel und biologisch abbaubar [6]. Der amphiphile Charakter der Produkte kann durch die geeignete Wahl der Fettsäurekettenlänge und des Acylierungsgrades innerhalb weiter Grenzen variiert werden [11].

1.2.2 Nichtenzymatische Synthesen

Verfahren zur Herstellung solcher Produkte ohne den Einsatz von Enzymen sind seit fast 50 Jahren bekannt:

Wegen der mangelnden Löslichkeit von Zuckern in apolaren Lösungsmitteln benutzten Osipow *et al.* [12] bereits 1956 hochpolare, organische Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid für die Acylierung von Zuckern. Sowohl die Zucker als auch die Fettsäuremethylester sind darin löslich.

* Exemplarisch seien hier die Produkte PEG-120-Methylglucosediöleat (ANTIL[®] 120, ANTIL[®] 127), Methylglucose-sesquistearat (TEGO[®] Care PS), Sorbitanoleat (TEGO[®] SMO), Sorbitanstearat (TEGO[®] SMS), Sorbitantriöleat (TEGO[®] STO), Saccharosecocoat (TEGOSOFT[®] LSE 65 K, TEGOSOFT[®] LSE 65 K SOFT) und Saccharosestearat (TEGOSOFT[®] PSE 141G) genannt.

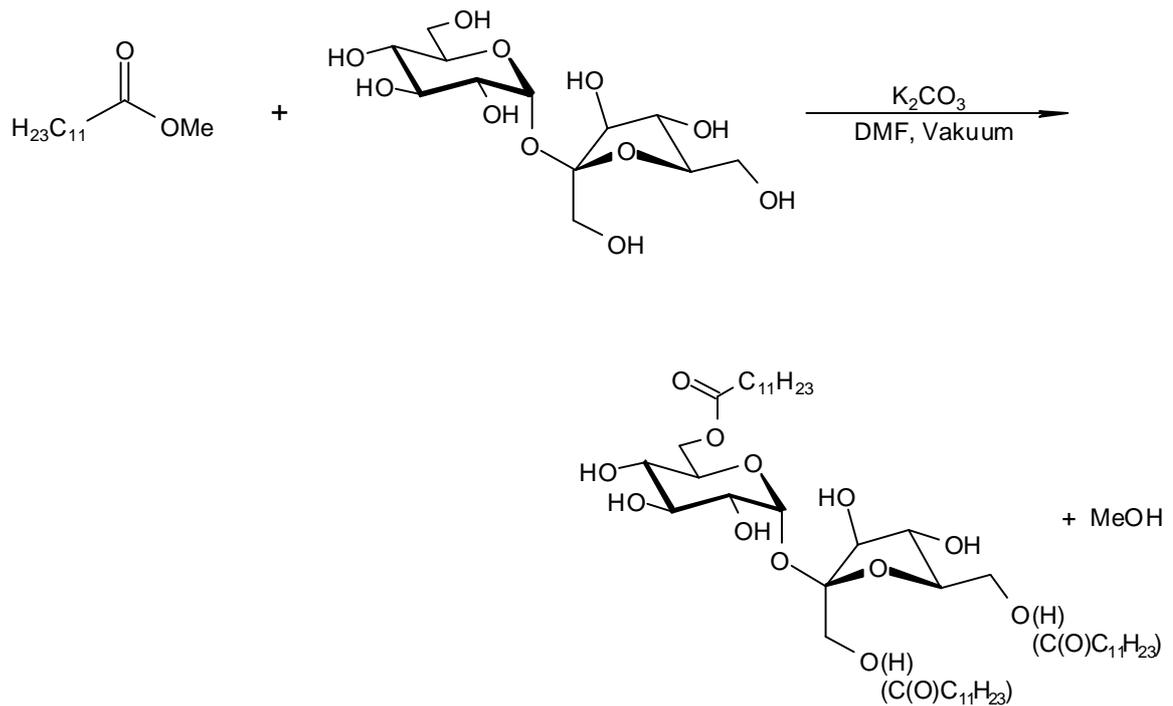


Abbildung 1-1. Acylierung von Saccharose nach Osipow [12]

Da die Entfernung letzter Spuren dieser Lösungsmittel aus den Produkten nicht gelang, konnten die so gewonnenen Emulgatoren nicht in der Lebensmittel- oder Kosmetiktechnologie eingesetzt werden. Daher wurden lösungsmittelfreie Prozesse entwickelt, von denen hier die *Mikroemulsionsmethode* [13] und die *homogene Schmelze* [14] als erfolgreichste Ansätze genannt seien.

Eine erwähnenswerte technische Variante zur Herstellung von Saccharoseestern wurde von der Coöperatie Cosun U. A. [15] entwickelt: Hier wird eine Mischung aus Saccharose, Fettsäuremethylester, Kaliumcarbonat und dem Kaliumsalz der Fettsäure unter Vakuum erwärmt (siehe Abbildung 1-2).

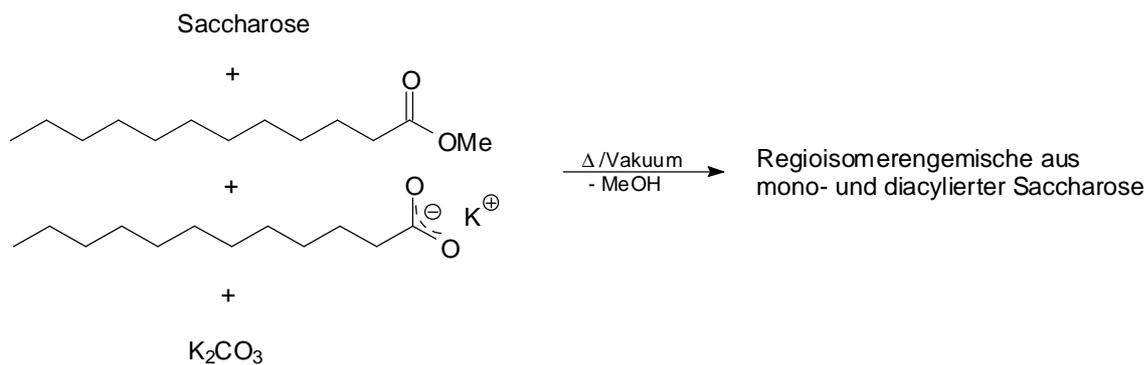


Abbildung 1-2. Lösungsmittelfreier Prozess zur technischen Herstellung von Saccharoseestern nach Nieuwenhuis und Vianen [15].

Die Produkte sind allerdings durch die erforderlichen, hohen Reaktionstemperaturen gefärbt und die oberflächenaktiven Eigenschaften der Produkte sind nach Aussage der Autoren [15] im Vergleich zu regioisomerenreiner, monoacylierter Saccharose [16] aufgrund der Anwesenheit von Regioisomeren und Diacylierungsprodukten deutlich schlechter.

Die Herstellung peracylierter Produkte ist dagegen auf klassisch-chemischem Wege vergleichsweise einfach [17]. So wird der bereits erwähnte, 6-8 Fettsäurereste tragende Saccharosepolyester (*Olestra™* (Procter & Gamble)) durch basenkatalysierte Umesterung von Fettsäuremethylestern mittels Saccharose gewonnen.

Die Herstellung regioisomerenreiner Produkte unter Anwendung milder Reaktionsbedingungen ist somit ein attraktives Ziel und macht biokatalytische Verfahren interessant. Zwar sind bereits etliche enzymatische Verfahren bekannt [18], doch wie später noch ausgeführt werden soll (siehe Abschnitt 3.1: „Enzymatische Acylierung von Zuckern – Stand der Technik“, Seite 37), sind diese noch stark verbesserungswürdig.

1.3 Glycoside

1.3.1 Einsatzmöglichkeiten

Die Bedeutung von 1-*N*- und 1-*O*-Glycosiden – als Gegenstand sowohl chemischer, biologischer als auch technologischer Studien – ist in zahlreichen Publikationen dokumentiert [19].

Einige Glycoside sind interessante, biologisch abbaubare, **nichtionische Tenside** (vgl. Alkylpolyglycoside (=APG)). Andere zeigen **antimikrobielle Eigenschaften** [20]. Derivate wie z.B. Benzyl- [21] und 2-(Trimethylsilyl)ethyl)- β -D-glucopyranosid [22] sind interessante 1-O-geschützte Ausgangsmaterialien für synthetische Anwendungen. Allyl- β -D-glucopyranosid und -galactopyranosid wurden bereits mehrfach zur Synthese von Glycopolymeren herangezogen [23].

Die Synthese solcher Verbindungen muss streng stereoselektiv erfolgen – die Bildung von Anomerengemischen vermieden werden.

1.3.2 Nichtenzymatische Synthesen

Klassisch chemische Verfahren zur Darstellung anomererenreiner Glycoside verlaufen üblicherweise über mehrere Stufen. So sind mindestens drei Reaktionsschritte notwendig, um von D-Glucose bzw. D-Galactose zum entsprechenden anomererenreinen Glycosid zu gelangen [24].

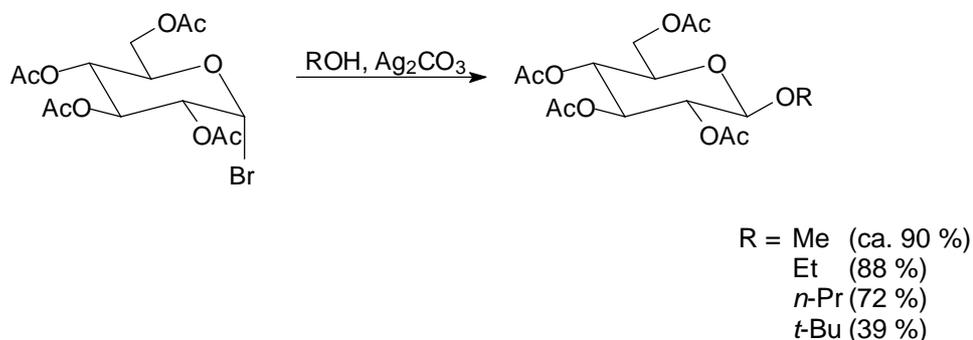
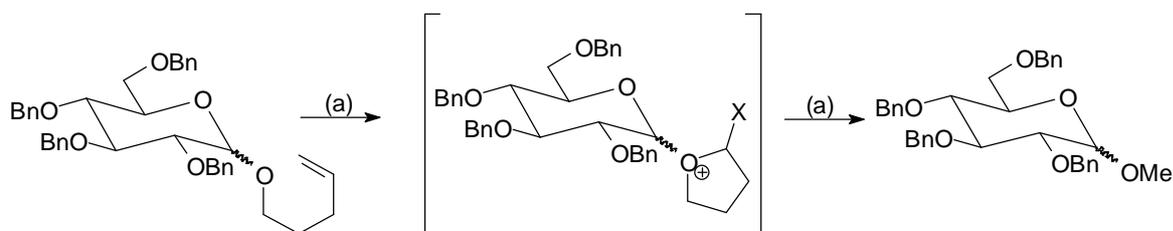


Abbildung 1-3. Klassisch-chemische Glucosylierung nach Koenigs-Knorr

Die erste universelle stereoselektive Glycosid-Synthese stammt von Koenigs und Knorr [25] aus dem Jahre 1901. Aber selbst nach hundert Jahren sind „die Bestrebungen nicht erlahmt, die *Koenigs-Knorr-Reaktion* zu optimieren oder grundsätzlich neue Wege der Glycosid-Synthese zu finden“ [26] und die Fülle der veröffentlichten „Verfahren ist gewissermaßen ein Hinweis auf einen immer noch unbefriedigenden Zustand“ [26].

Häufig zitierte Verfahren sind, neben der oben genannten, von **Glycosylhalogeniden** ausgehenden, *Koenigs-Knorr-Reaktion*, die von **Glycosylestern** ausgehende *Helferich-Methode* [27] oder die in jüngster Zeit bevorzugte sog. *Trichloracetimidatmethode* nach Schmidt [28].

Ungewöhnliche Alternativen zu diesen Varianten stellen beispielsweise die von **1-O-(4-Pentenyl)glycosiden** ausgehende Glycosidsynthese nach *Fraser-Reid* [29] (Abbildung 1-4) und die Trimethylsilyltriflat(TMSOTf)-katalysierte Transglycosidierung von **1-O-Trialkylsilylmonosacchariden** [30] dar. Einen ganz anderen Ansatz verfolgt man bei der Nutzung der – aus den entsprechenden Glycosylbromiden zugänglichen – O-acetylierten **Glykale**. Die enolische, elektronenreiche Doppelbindung eignet sich hervorragend zur elektrophilen Addition* [31] (Abbildung 1-5).



(a) = MeOH, NBS, MeCN..... 85 %, $\alpha/\beta = 1/3$
 MeOH, IDCP, CH₂Cl₂, Et₂O..... 75 %, $\alpha/\beta = 3/1$

Abbildung 1-4. Glycosidsynthese nach Fraser-Reid [29]

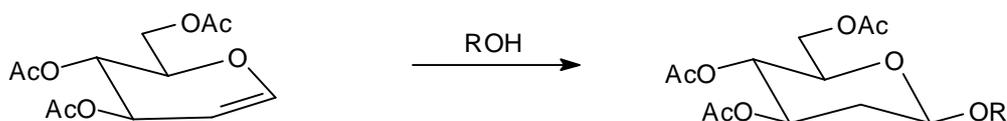


Abbildung 1-5. Glycosidsynthese ausgehend von per-O-acetylierten Glykalen [31]

* Im übrigen lassen sich Glykale auch als Glycosyldonatoren für die glycosidasekatalysierte Glycosylierung verwenden.

In diesem Zusammenhang soll auch die von **Thioglycosiden** ausgehende, auf der leichten Positivierbarkeit (z.B. mittels thiophiler Schwermetallsalze oder Oxidantien) des Schwefels beruhende Glycosylierungsprozedur Erwähnung finden [31 c], [32] (Abbildung 1-6).

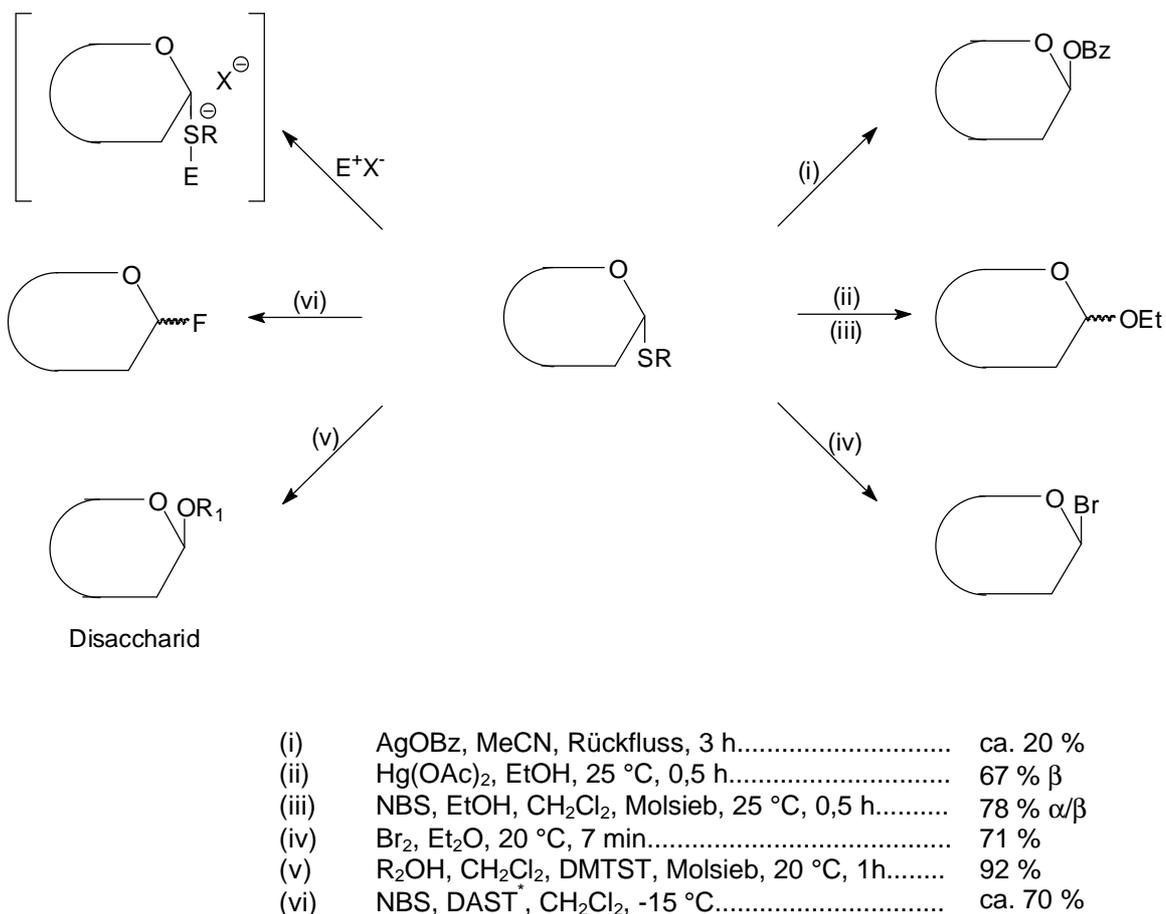


Abbildung 1-6. Glycosidsynthesen ausgehend von Thioglycosiden [31c], [32]

Alle Methoden basieren auf einer elektrophilen Aktivierung des Lactol-O-Atoms. Sie sind sehr aufwendig und weisen durch den notwendigen Einsatz von Schutzgruppen nur eine geringe Atomeffizienz auf.

Einen weiter gefassten Überblick über die nichtenzymatische, stereoselektive 1-Alkylierung von Zuckern geben verschiedene Übersichtsartikel [33].

* Diethylaminoschwefeltrifluorid

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es kaum möglich ist, allgemein gültige Rezepte zur Knüpfung glycosidischer Bindungen, z.B. zu Oligosacchariden zu geben oder Syntheseprinzipien systematisch zu ordnen. Jedes Verknüpfungsproblem aus Glykon und Aglykon hat seine spezielle Eigenart und es bleibt dem Geschick des Chemikers vorbehalten, die richtige Wahl der Schutzgruppen und Aktivierungsreagenzien zu treffen. Insbesondere, wenn es darum geht Oligosaccharide herzustellen ist eine weitsichtige Syntheseplanung erforderlich.

Die direkte, stereoselektive Glycosidierung nativer – also underivatisierter – Zucker ist hingegen bislang nahezu ausschließlich die Domäne der Biokatalyse.

Die Vorteile liegen auf der Hand: Die Reaktionen laufen unter milden Bedingungen ab, sie sind im Allgemeinen regioselektiv bzgl. des Aglykons und verlaufen fast immer stereospezifisch bzgl. des Glykons. Damit erübrigt sich auch oft der Einsatz von Schutzgruppen, der bei chemischen Glycosidierungen fast immer notwendig ist [34].

Wichtigste Methode zur Knüpfung glycosidischer Bindungen ist zwar nach wie vor die rein chemische Glycosidierung, die enzymatische Variante ist aber schon heute – insbesondere bei der Synthese von Oligosacchariden – eine wichtige Ergänzung zu den klassisch-chemischen Verfahren [35].

1.4 Terminologie

Die im Verlauf dieser Arbeit gewählte Terminologie ist in Abbildung 1-7 für Glycosylierungs- und Acylierungsreaktionen zusammengestellt.

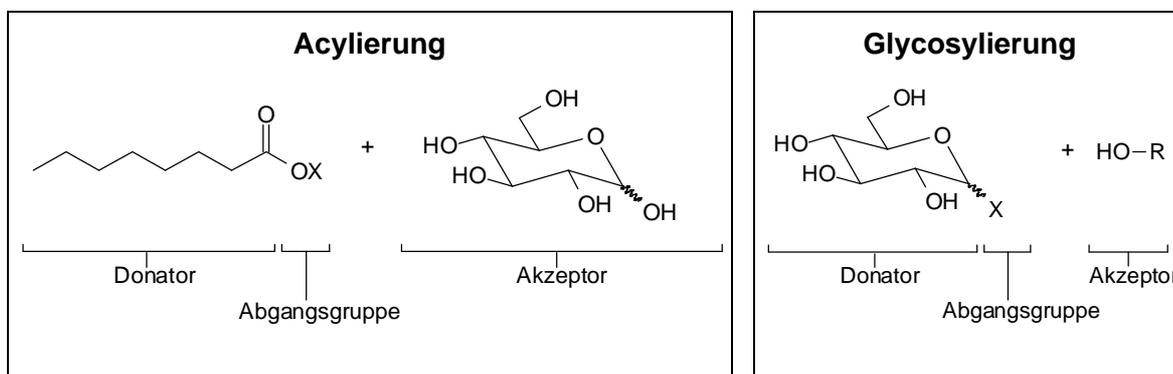


Abbildung 1-7. Rolle von Donatoren und Akzeptoren in Acylierungs- und Glycosylierungsreaktionen

Die Begriffe *Veresterung* und *Glycosidierung* werden nicht verwendet. Die Begriffe *Umesterung* und *Transglycosidierung* beschreiben Austauschreaktionen des Akzeptors und *Acytransfer* und *Transglycosylierung* den Austausch der Donatoren.

1.5 Zielsetzung – allgemein

Obige Ausführungen machen deutlich, dass bei der Synthese sowohl von Zuckerestern als auch von Glycosiden noch beträchtlicher Forschungsbedarf besteht.

In dieser Arbeit sollen – unter Berücksichtigung technologisch relevanter Gesichtspunkte wie Enzymverfügbarkeit, Kosten und Lebensmitteltauglichkeit – die Möglichkeiten zur **Lösung der Problemstellung mittels Biokatalyse** erforscht werden.

1.5.1 Enzymatische regioselektive Acylierung

Die enzymatische Acylierung von Hydroxyverbindungen – hier Zuckern – lässt sich im Prinzip mit allen Esterhydrolasen erreichen. Da die gute Eignung der Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435TM) zur Acylierung von Monosacchariden in vielfältigen Publikationen Erwähnung gefunden hat und deren Einsetzbarkeit bereits im Rahmen der Diplomarbeit gezeigt wurde, wurde auch hier dieses Enzym bevorzugt.

1.5.2 Enzymatische stereoselektive Glycosidierung

Die bekannten enzymatischen Verfahren zur 1-O-Glycosylierung können in zwei Gruppen eingeteilt werden: *glycosidasekatalysierte* und *glycosyltransferasekatalysierte* Reaktionen.

1.5.2.1 *Glycosyltransferasekatalysierte Reaktionen*

Glycosyltransferasen katalysieren *in vivo* spezifisch die Übertragung von 1-O-Glycosylresten aus Zuckernucleotiddiphosphaten (z.B. Glucosyl-1-O-Uridindiphosphat (Glc-UDP)) auf Alkohole – insbesondere andere Saccharide. Die Reaktionen verlaufen irreversibel und ohne Hydrolyse der Edukte oder Produkte. Dies liegt darin begründet, dass – erstens – die Rückreaktion, aufgrund der Alkoholyse der thermodynamisch instabilen Bindung zur Pyrophosphateinheit, ausgeschlossen ist und – zweitens – Wasser kein Substrat für Glycosyltransferasen darstellt.

1.5.2.2 *Glycosidasekatalysierte Reaktionen*

Glycosidasen katalysieren *in vivo* vergleichsweise unspezifisch (bezogen auf den Akzeptor) die Hydrolyse von 1-O-Glycosiden. Es handelt sich dabei um Gleichgewichtsreaktionen. Aufgrund des Mikroreversibilitätsprinzips lassen sich diese Katalysatoren prinzipiell auch zur Katalyse reverser Hydrolysen und darüber hinaus zur Katalyse von Transglycosidierungsreaktionen verwenden.

Der Vorteil glycosidasekatalysierter Reaktionen ist, dass Glycosidasen in relativ hoher Konzentration in vielerlei biologischem Material vorkommen und leicht zu gewinnen sind. Gleichermaßen sind die benötigten Substrate leicht herstellbar und können in hohen Konzentrationen eingesetzt werden.

1.5.2.3 *Auswahl*

Im Hinblick auf das Ziel eine – auch auf die technische Umsetzbarkeit bezogen – nützliche enzymatische Synthese von β -Glycosiden zu finden, wurden in vorliegender Arbeit ausschließlich glycosidasekatalysierten Reaktionen, insbesondere reverse Hydrolysen untersucht. Diese sind zwar aufgrund des Gleichgewichtscharakters der Reaktionen deutlich schwieriger zu kontrollieren, jedoch stehen dem Einsatz von Glycosyltransferasen deren schlechte Verfügbarkeit sowie die Erfordernis entsprechender, extrem teurer Substrate (z.B. Glc-UDP) bzw. Cofaktoren (z.B. UTP) entgegen.

1.5.3 Zielsetzung – konkret

Auf Grundlage der vorgenannten Bedingungen, lautet das Ziel der vorliegenden Arbeit daher konkret:

- a) die regioselektive Acylierung sowie
- b) die stereoselektive Glycosidierung

nativer, d.h. underivatisierter Zucker, mittels hydrolytischer Enzyme (Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435™) bzw. Glycosidasen (Abbildung 1-8)).

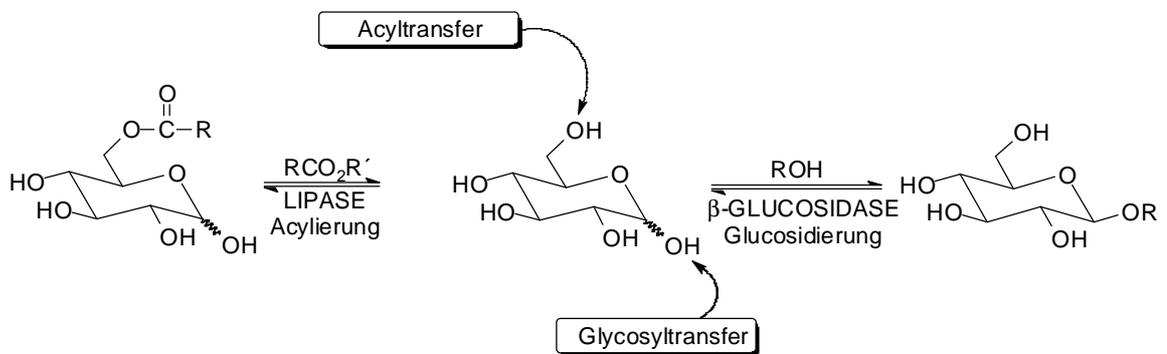


Abbildung 1-8. Enzymatische Acylierung und Glycosidierung von D-Glucose

2 Problemstellung

2.1 Allgemeine Problemstellung – Zucker als Substrate für enzymatische Verknüpfungsreaktionen

Der Einsatz von Biokatalysatoren zur Derivatisierung freier, d.h. underivatisierter Zucker ist bislang noch nicht zufriedenstellend gelöst. Verantwortlich dafür sind die sich widersprechenden Erfordernisse von Substrat und Biokatalysator bzgl. der Reaktionsbedingungen:

Das Substrat muss im verwendeten Lösungsmittel hinreichend **löslich** sein. Das setzt bei der Transformation von Zuckern den Einsatz **sehr polarer Lösungsmittel** voraus.

Das verwendete Enzym muss aber wiederum im eingesetzten Lösungsmittel gleichzeitig hinreichend **aktiv** sein. Dadurch sind bei Verwendung von Lipasen meist nur stark **hydrophobe Lösungsmittel** oder Wasser einsetzbar, während bei Glycosidasen ausschließlich Wasser oder zumindest wasserhaltige Lösungsmittel in Frage kommen [148 b, S. 48].

Damit die Syntheseverfahren auch zur Herstellung von Produkten für den Lebensmittel- oder Kosmetikbereich geeignet sind, sollte außerdem mit nichttoxischen, leichtflüchtigen Lösungsmitteln gearbeitet werden.

Bei Verwendung von Wasser in Gegenwart hydrolytischer Enzyme, ist zu beachten, dass die Hydrolyse stets eine bedeutende Konkurrenzreaktion zur Verknüpfungsbildung ist.

Dies betrifft insbesondere enzymatische Glycosidsynthesen, da für Glycosidasen eine – zumindest partiell – wässrige Umgebung obligatorisch ist. Glycosidasen zeigen selbst nach Immobilisierung [36] oder chemischer Modifizierung [37] in sehr trockenen Lösungsmitteln keine Aktivität mehr.

Die Probleme lassen sich also wie folgt zusammenfassen:

(a) Bei lipasekatalysierten Acylierungen: die **geringe Löslichkeit von Zuckern in apolaren organischen Lösungsmitteln**, in denen diese Enzyme ihre höchste Aktivität zeigen [38, 47] sowie (b) bei glycosidasekatalysierten Reaktionen: die **geringe Aktivität von Glycosidasen in organischen Lösungsmitteln** und die **ungünstige Lage des Reaktionsgleichgewichtes in wässrigen Medien**.

2.2 Die spezielle Problemstellung bei der enzymatischen Acylierung

Generell bieten sich die reverse Esterhydrolyse sowie die Umesterung als Ansätze zur Reaktionsführung an. Die folgenden beiden Kapitel befassen sich mit den Erfordernissen beider Lösungsansätze.

2.2.1 Reverse Hydrolyse

Bei enzymatischen Verknüpfungen wie der Acylierung von Zuckern im Sinne reverser Hydrolysen handelt es sich immer um Gleichgewichtsreaktionen (siehe Abbildung 2-1).

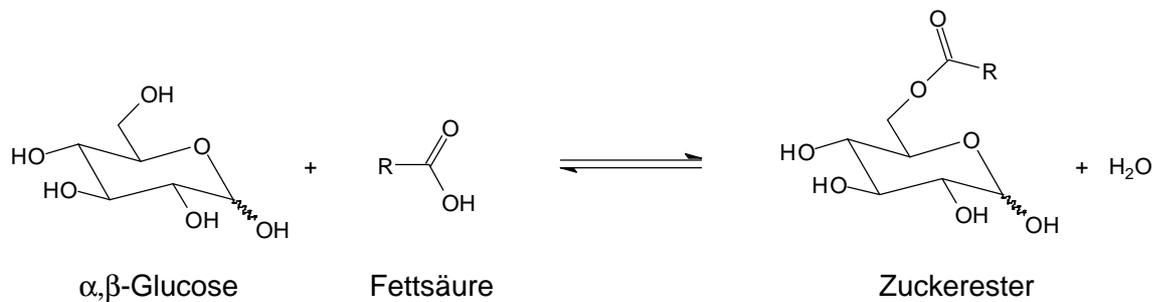


Abbildung 2-1. Synthese von Zuckerestern durch reverse Hydrolyse

Zur Erzielung hoher Ausbeuten muss demnach das Gleichgewicht in Richtung der Produkte verschoben werden.

Da dies in der Regel nur begrenzt möglich ist, gehört die reverse Hydrolyse nicht zu den bevorzugten Methoden der enzymatischen Esterbildung.

2.2.2 Umesterung

2.2.2.1 Allgemein

Bei der alternativen Reaktionsführung – der Umesterung – wird anstelle der freien Säure ein Ester als Acyldonator eingesetzt (Abbildung 2-2).

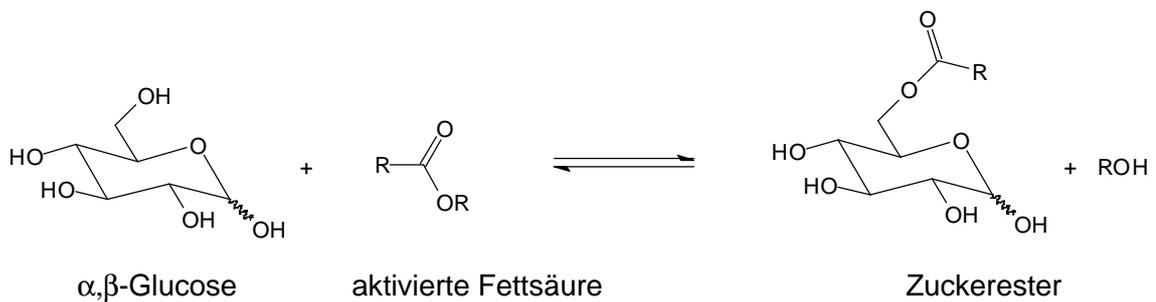


Abbildung 2-2. Umesterung

Zur Erzielung hoher Umsatzgeschwindigkeiten nutzt man Donatoren mit aktivierten Abgangsgruppen (aktivierte Ester): Die Reaktionen laufen in diesem Falle beschleunigt ab. Als nachteilig kann sich dabei die notwendige Entfernung der Abgangsgruppe aus der Produktmischung erweisen.

2.2.2.2 Thermodynamische und kinetische Reaktionsführung

Umesterungen können thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert geführt werden.

Bei **thermodynamisch kontrollierter Reaktionsführung** wird die Reaktion beendet, sobald das Reaktionsgleichgewicht erreicht ist.

Bei der **kinetisch kontrollierten Reaktionsführung** wird die Tatsache genutzt, dass Alkohole aufgrund des +I-Effekts deutlich bessere Nucleophile sind als Wasser: Der intermediär gebildete Enzym-Substrat-Komplex (Acyl-Enzym) reagiert bevorzugt (insbesondere im Hinblick auf die molaren Mengenverhältnisse Wasser/Akzeptor) mit dem Akzeptor. Die Hydrolyse des Donators, ebenso wie die des Reaktionsproduktes, ist dabei allerdings eine bedeutende Konkurrenzreaktion (siehe Abbildung 2-3), so dass nach einem Umsatz von – in der Regel – maximal 40 % (bezogen auf den Donator) die Hydrolyse überwiegt und somit die Konzentration des gewünschten Produktes wieder abnimmt. Als nachteilig erweist sich bei dieser Reaktionsführung, dass aktivierte Donatoren benötigt werden und die Umsetzung kontinuierlich verfolgt werden muss, um die Reaktion bei maximaler Produktkonzentration abubrechen. In der Regel wird zudem ein großer Überschuss an Akzeptor benötigt.

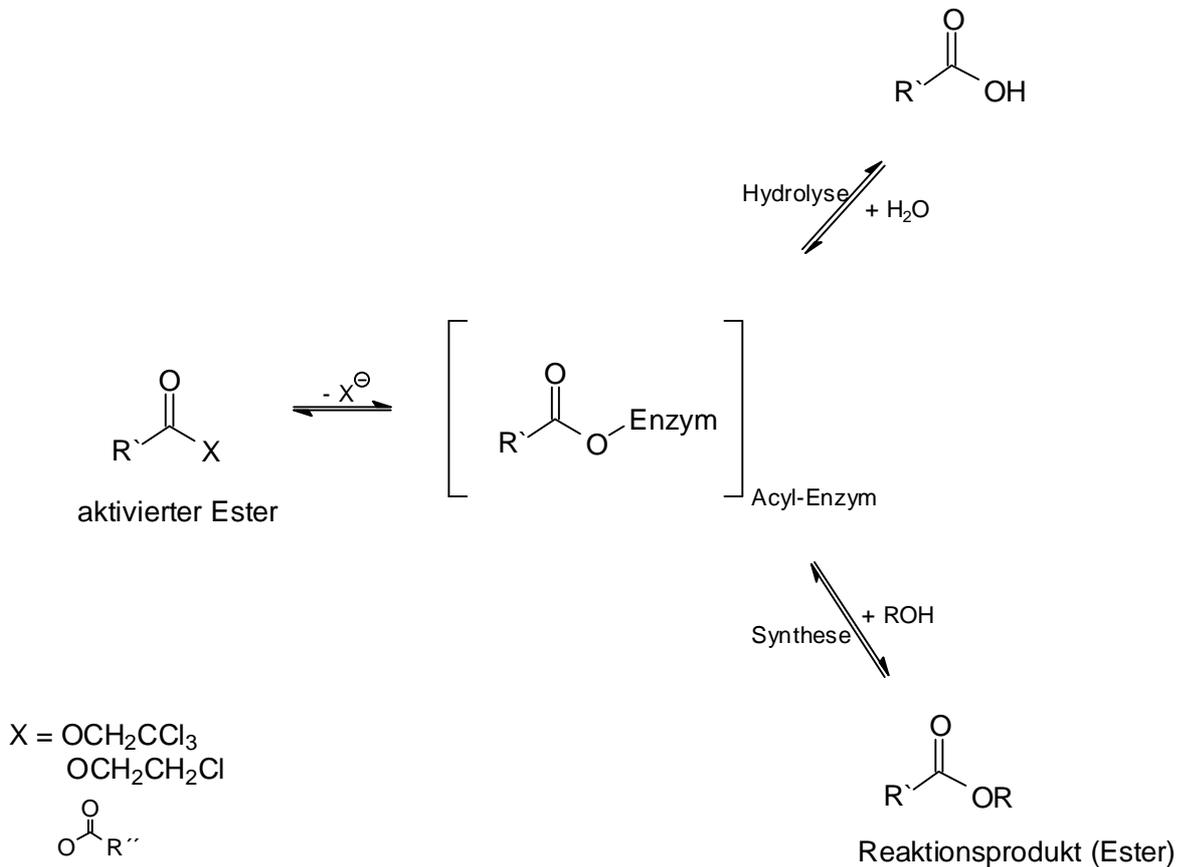


Abbildung 2-3. Estersynthese: Konkurrierende Reaktionen

2.2.2.3 *Thermodynamisch kontrollierte Umesterung: Irreversibler Acyltransfer*

Allerdings können die aktivierten Abgangsgruppen so gewählt werden, dass sie nicht mehr wirksam im Sinne des Massenwirkungsgesetzes sind. Folglich verläuft die Reaktion im Idealfall quantitativ. Man spricht daher auch von **irreversiblen Acyltransfer**. Um die Entstehung von Nebenprodukten zu vermeiden, die aus der Hydrolyse von Acyldonator oder Reaktionsprodukt resultieren, muss in **nahezu wasserfreien Reaktionsmedien** gearbeitet werden.

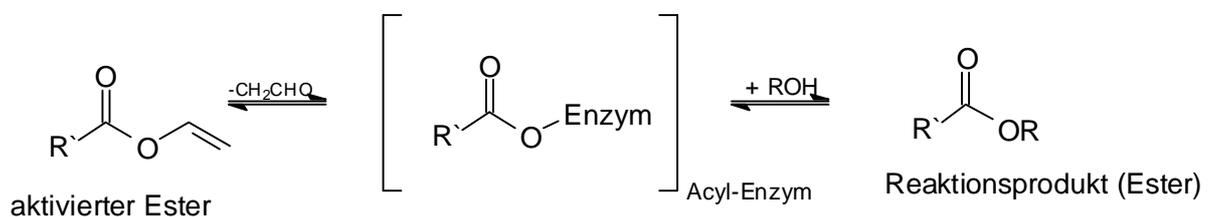


Abbildung 2-4. Irreversibler Acyltransfer

Die Palette der aktivierenden Abgangsgruppen, die einen irreversiblen Acyltransfer ermöglichen, lassen sich in zwei Kategorien einteilen:

- solche, die nach der Abspaltung tautomerisieren und somit nicht mehr als Nucleophile an der Reaktion teilhaben können (Oxyvinyl [39], Oxyisopropanyl) und
- solche, die eine sehr geringe Nucleophilie aufweisen, also Gruppen mit niedrigem HOMO ($-\text{O}-\text{N}=\text{CR}_2$ [40], Säureanhydride [41], Thioethyl ($-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_3$ [42]) oder solche die stark elektronenziehende Reste tragen (z.B. Trichlorethyl oder Trifluorethyl [43]).

Abbildung 2-5 zeigt die wichtigsten Abgangsgruppen für den irreversiblen Acyltransfer und die bei der Umesterung der aktivierten Ester entstehenden Nebenprodukte.

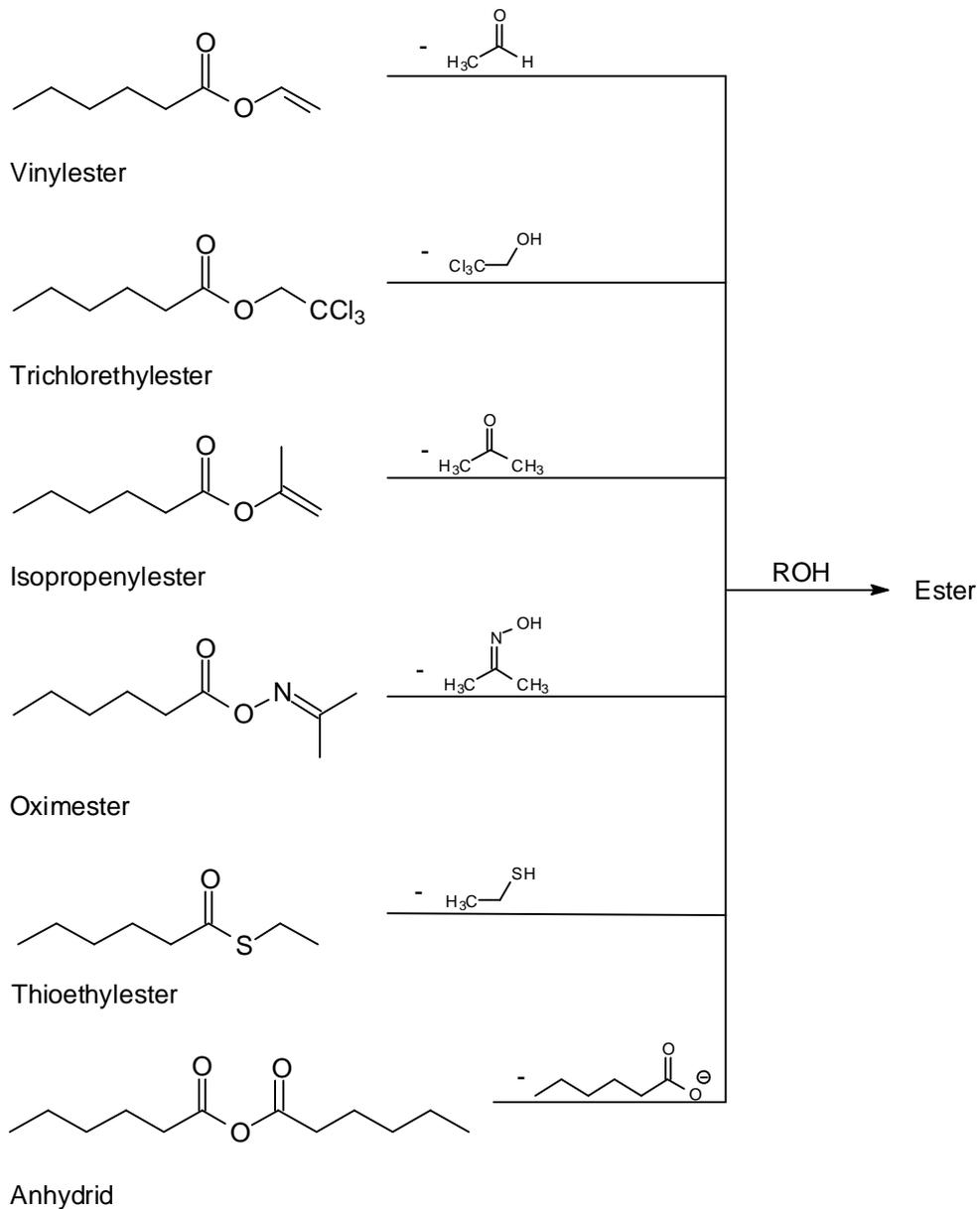


Abbildung 2-5. Acyldonatoren für irreversible Acyltransfer

Unter diesen Acyldonatoren erweisen sich die Vinylester als besonders anwendungsfreundlich: Sie sind einfach herzustellen, leicht handzuhaben und liefern aufgrund der Abspaltung von Acetaldehyd leicht zu reinigende Produktgemische.

2.3 Die spezielle Problemstellung bei der Glycosidsynthese

Analog zur enzymatischen Acylierung bieten sich die reverse Glycosidhydrolyse sowie die Transglycosidierung als Ansätze zur Reaktionsführung an. Die folgenden beiden Kapitel befassen sich mit den Erfordernissen beider Ansätze.

2.3.1 Reverse Hydrolyse

Glycosidasen katalysieren in wässrigen Systemen die anomerenselektive **Hydrolyse** von O-Glycosiden (E. Fischer 1894). Zur **Synthese** von Glycosiden muss diese Reaktion – unter Entfernung von Wasser aus dem Reaktionssystem – in umgekehrter Richtung geführt werden. Man spricht von reverser Hydrolyse (Abbildung 2-6).

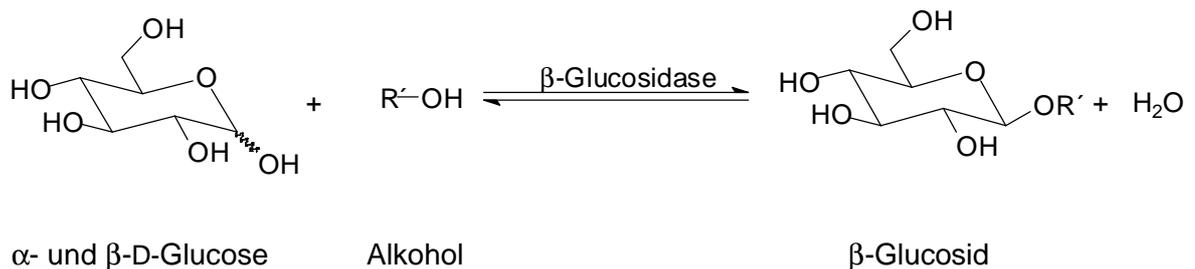


Abbildung 2-6. Enzymatische Synthese von Glycosiden durch „reverse Hydrolyse“

Wie bereits in Kapitel 1.5.2.2 "Glycosidasekatalysierte Reaktionen" erläutert, ist es zur Erreichung hoher Umsätze essentiell, das Gleichgewicht auf Richtung der Produkte zu verschieben. Bei der Anwesenheit von Wasser im Reaktionsgemisch – notwendig zur Gewährleistung einer vernünftigen Glycosidaseaktivität – ist dies besonders schwierig.

2.3.2 Transglycosidierung

Gleiches gilt für den Einsatz anderer Glycosyldonatoren als nativer Monosaccharide – also der Transglycosidierung (Abbildung 2-7).

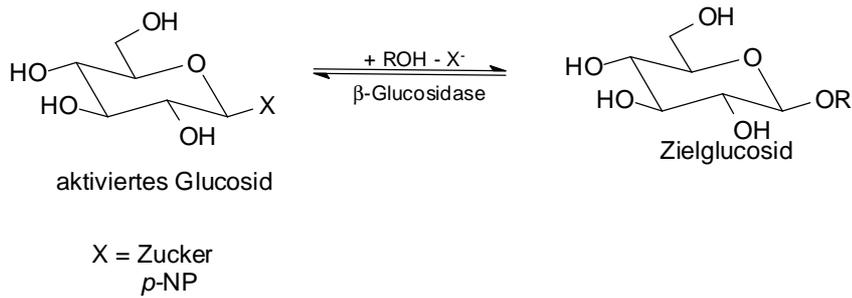


Abbildung 2-7. Enzymatische Synthese von Glycosiden durch Transglycosidierung

Üblicherweise benutzt man hier Donatoren mit aktivierten Abgangsgruppen wie z.B. *o*- und *p*-Nitrophenylderivate. Hierdurch verlaufen die Reaktionen (a) schneller und (b) irreversibel (wenngleich das auch nicht heißt, dass das Zielglycosid nicht noch mit Wasser reagieren kann.).

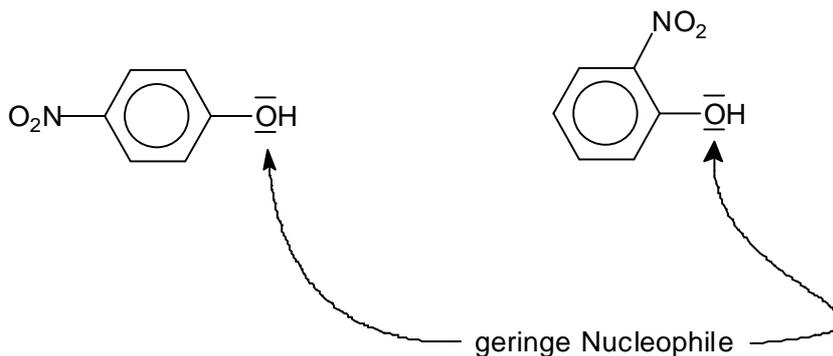


Abbildung 2-8. *p*- und *o*-Nitrophenylderivate als aktivierte Abgangsgruppen

Auch bei Transglycosidierungen unterscheidet man zwischen thermodynamisch und kinetisch kontrollierter Reaktionsführung.

2.3.2.1 *Thermodynamische und kinetische Reaktionsführung*

Bei **thermodynamisch kontrollierter Reaktionsführung** mit aktivierten Glycosiden läuft die Reaktion zwar weitgehend vollständig ab, jedoch führt die Anwesenheit von Wasser (benötigt für den Erhalt der Aktivität von Glycosidasen) stets zur Hydrolyse des Produktes. Die Reaktion kann nicht irreversibel gestaltet werden.

Bei **kinetisch kontrollierter Reaktionsführung** wird die Tatsache genutzt, dass Alkohole aufgrund des +I-Effekts deutlich bessere Nucleophile als Wasser sind: Der intermediär gebildete Enzym-Substrat-Komplex reagiert bevorzugt (insbesondere unter Betrachtung der molaren Mengenverhältnisse Wasser/Akzeptor) mit dem Akzeptor. Hydrolysen von Donator und Reaktionsprodukt sind dabei bedeutende Konkurrenzreaktionen (siehe Abbildung 2-9), so dass nach einem Umsatz von – in der Regel – maximal 40 % (bezogen auf den Donator) die Hydrolyse überwiegt und somit die Konzentration des gewünschten Produktes wieder abnimmt [77-113]. Als nachteilig bei dieser Reaktionsführung erweist sich, dass aktivierte Donatoren benötigt werden und dass die Umsetzung kontinuierlich verfolgt werden muss, um maximale Produktkonzentration zu erzielen. In der Regel wird ein großer Überschuss des Akzeptors eingesetzt.

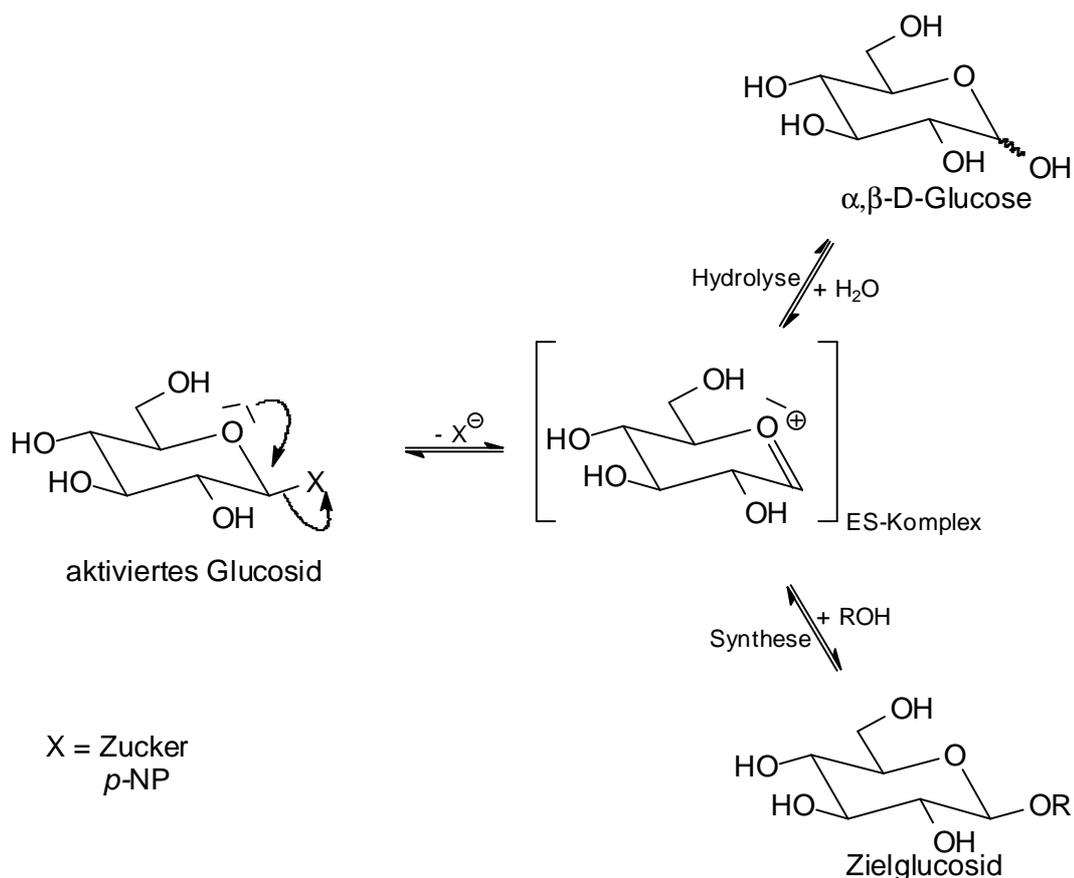


Abbildung 2-9. Glycosidsynthese: Konkurrierende Reaktionen

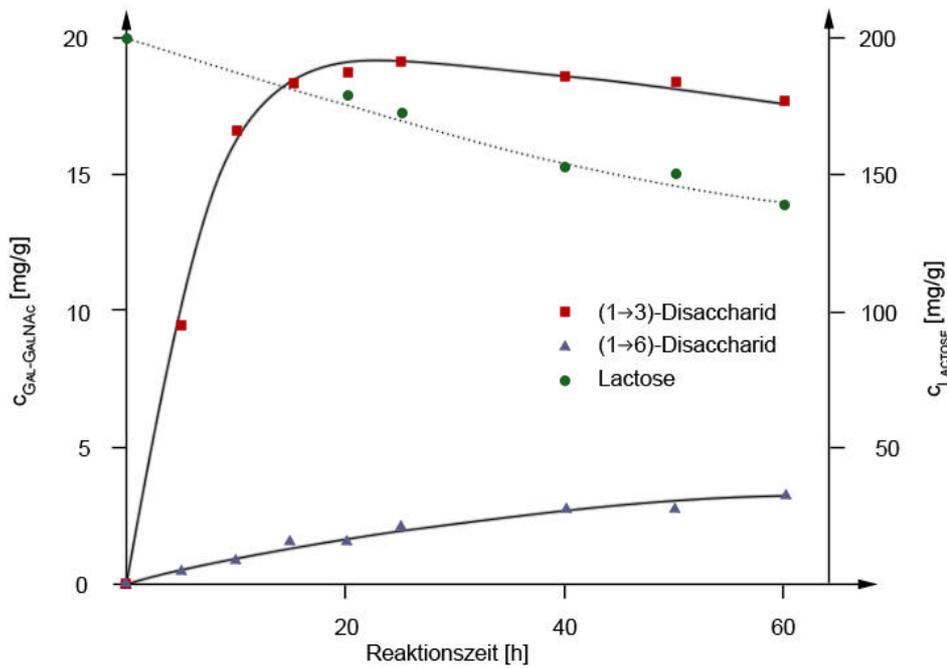
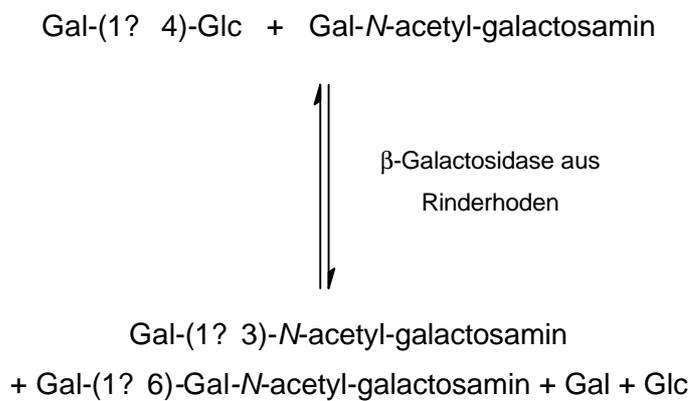


Abbildung 2-10. Produktbildung im zeitlichen Verlauf bei kinetisch kontrollierter Reaktionsführung (Donator: Lactose (Gal-Glc), Akzeptor: N-Acetyl-galactosamin (GalNAc), Reaktionsprodukt: Gal-GalNAc). Abbildung nach [26].

Abbildung 2-10 zeigt zur Verdeutlichung den Reaktionsverlauf der Umsetzung des Donators Lactose mit N-Acetyl-galactosamin in Gegenwart von β -Galactosidase aus Rinderhoden zu den beiden regioisomeren Produkten Galactosyl-(1→3)- und Galactosyl-(1→6)-N-acetyl-galactosamin:



3 *Stand der Technik*

3.1 Enzymatische Acylierung von Zuckern – Stand der Technik

Bei der enzymatischen Acylierung von Zuckern nutzt man die Regioselektivität von Enzymen – hier Lipasen – um chemisch einheitliche Produkte zu erhalten.

Hauptproblem ist dabei, wie bereits in Kapitel 2.1 "Allgemeine Problemstellung – Zucker als Substrate für enzymatische Verknüpfungsreaktionen" erläutert, die mangelnde Löslichkeit von Zuckern in organischen Lösungsmitteln, sowie die ungünstige Lage des Reaktionsgleichgewichtes.

3.1.1 Enzymatische Acylierung in Wasser

Der erste dokumentierte Versuch zur enzymatischen Acylierung von Saccharose, D-Glucose, D-Fructose und D-Sorbitol stammt von Seino und Mitarbeiter [44] aus dem Jahre 1984. Durch lipasekatalysierten Acyltransfer freier Fettsäuren in konzentrierten Saccharose-Lösungen wurde trotz der ungünstigen Lage des Reaktionsgleichgewichts über die Synthese komplexer Mischungen nicht weiter charakterisierter Mono-, Di- und Oligoacylzucker berichtet.

Über ähnliche Ergebnisse wurde bei der Umsetzung von Saccharose mit Fettsäuremethylestern in Pufferlösungen berichtet [45].

3.1.2 Enzymatische Acylierung in polaren organischen Lösungsmitteln

Klibanov und Mitarbeiter berichteten 1986 über die enzymatische Acylierung von Monosacchariden in organischen Lösungsmitteln [46]. Als Lösungsmittel wurde **Pyridin** verwendet. Es zeigte sich, dass Schweinepankreaslipase (PPL) in Pyridin ausreichend aktiv ist, um Fettsäurereste aus aktivierten Estern (hier 2,2,2-Trichlorethylester) auf **Monosaccharide** zu übertragen. Es wurde hohe Selektivität gegenüber den primären 6-Positionen beobachtet und die Methode erlaubte erstmals die enzymatische Synthese reiner Produkte im Gramm-Maßstab. Die Reaktionsgeschwindigkeiten waren jedoch vergleichsweise niedrig und Pyridin ist kein sehr anwendungsfreundliches Lösungsmittel.

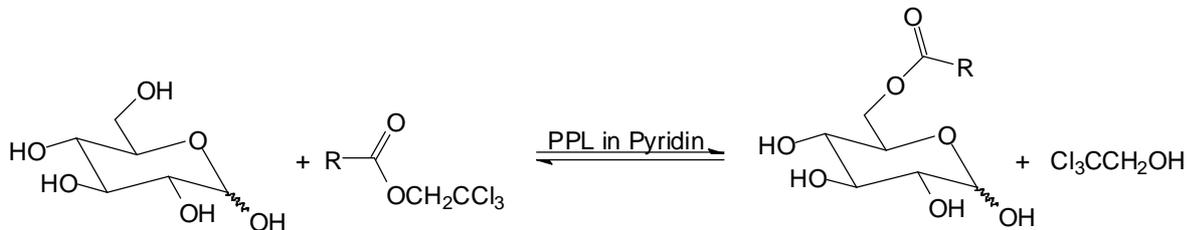


Abbildung 3-1. Enzymatische Acylierung von Monosacchariden nach Klibanov [46]

Klibanov konnte später zeigen, dass diese Umsetzungen auch in ***N,N*-Dimethylacetamid** oder ***N,N*-Dimethylformamid** gelingen [47]. Hierbei erwies sich Subtilisin (Protease aus *Bacillus subtilis* Carlsberg) als besonders geeignet. Dies gilt auch für die Acylierung von **Di- und Oligosacchariden**. Das Enzym konnte sogar zwischen den unterschiedlichen primären Positionen differenzieren. Saccharose wurde dabei vornehmlich an der 1'-Position acyliert, obwohl die 6- und 6'-Positionen chemisch reaktiver sind. Dagegen erfolgte die Acylierung von Lactose, Maltose, Cellobiose und Maltotriose stets bevorzugt an der primären Position des nicht-reduzierenden Endes. Dabei sank die Reaktionsgeschwindigkeit langsam mit zunehmender Kettenlänge der Maltose-Oligomere von Maltose (relative Geschwindigkeit = 1) bis Maltoheptaose (rel. Geschw. = 0,4). α -Cyclodextrin konnte gar nicht acyliert werden.

Einen Überblick über entsprechende Versuche in organischen Lösungsmitteln geben die Literaturstellen [48a - 48g, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57].

3.1.3 Enzymatische Acylierung in 2-Phasen-Systemen

Im Jahre 1990 gelang es Janssen *et al.* Sorbitol in einem **2-Phasen-System** bestehend aus gesättigter, wässriger Sorbitollösung und geschmolzener Fettsäure enzymatisch zu acylieren [58]. Dabei wurden keine organischen Lösungsmittel verwendet. Der Katalysator (*Candida-rugosa*-Lipase) befand sich in der wässrigen Phase. Leider war die Reaktion sehr langsam, das Reaktionsgleichgewicht wurde erst nach **300 Stunden** erreicht. Die Reaktion lieferte Mischungen aus **Mono-, Di- und Triestern** in Ausbeuten von **maximal 34 %**. Das Verfahren ließ sich nicht auf die Umsetzung von Saccharose übertragen und kann generell als wenig attraktiv bezeichnet werden.

3.1.4 Enzymatische Acylierung derivatisierter Zucker

Zur Erhöhung der Löslichkeit von Monosacchariden in apolaren organischen Lösungsmitteln wurden unterschiedlichste Derivate hergestellt und diese enzymatisch acyliert.

3.1.4.1 *Acylierung von Glycosiden*

Adelhorst *et al.* zeigten 1992, dass die Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435™) besonders gut zur Acylierung der primären Hydroxylgruppe von Ethylglucosiden geeignet ist. Dazu wurde Glucose zunächst mittels Ethanol/H⁺ in das Anomerengemisch der α -/ β -Ethylglucoside überführt und diese ohne Zugabe von Lösungsmitteln mittels Novozym SP 435™ in der Schmelze unter Einsatz freier Fettsäuren in das Anomerengemisch der 6-O-Acylglucoside überführt [59]. Die Acylierungsgeschwindigkeit war dabei stark abhängig von der Länge der Alkylkette des zur Glycosidierung verwendeten Alkohols. So wurden nach einer Reaktionszeit von bis zu 21 Tagen bei Glucose und Methylglucosid nur 20 % Ausbeute erhalten, während die Ethyl-, *n*- und Isopropyl- oder Butylglucoside innerhalb weniger Stunden vollständig umgesetzt wurden. Als Grund hierfür mag die bessere Löslichkeit/Mischbarkeit der Edukte angesehen werden. Der Prozess wurde in einer Pilotanlage auch im technischen Maßstab durchgeführt [60].

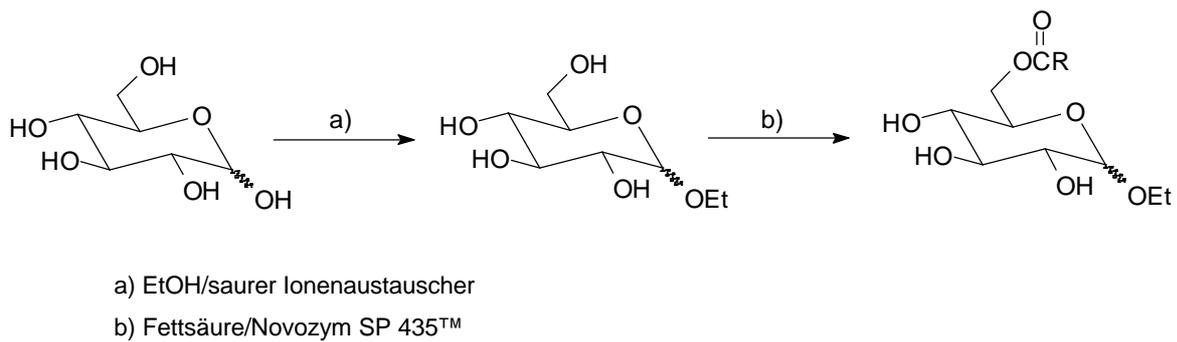


Abbildung 3-2. Lösungsmittelfreie enzymatische Acylierung von Ethylglucosiden

Als nachteilig erwies sich, dass die Reaktion nur mit den Alkylglucosiden gelingt, die in einem vorgelagerten Schritt hergestellt werden müssen.

Probleme in der Pilotanlage durch Bildung einer hochviskosen Masse wurden durch Zusatz von etwas Lösungsmittel und etwas Tensid (z.B. dem Produkt selbst) und Bildung einer Mikroemulsion gelöst [61].

3.1.4.2 *Acylierung von Zuckeracetalen*

Eine andere Methode zur apolaren Derivatisierung von Zuckern bietet deren Überführung in cyclische Acetale. So gelang z.B. im eigenen Arbeitskreis die lipasekatalysierte Acylierung von Isopropylidenglucose, -galactose, -fructose und -xylose ohne die Verwendung zusätzlicher Lösungsmittel [62a].

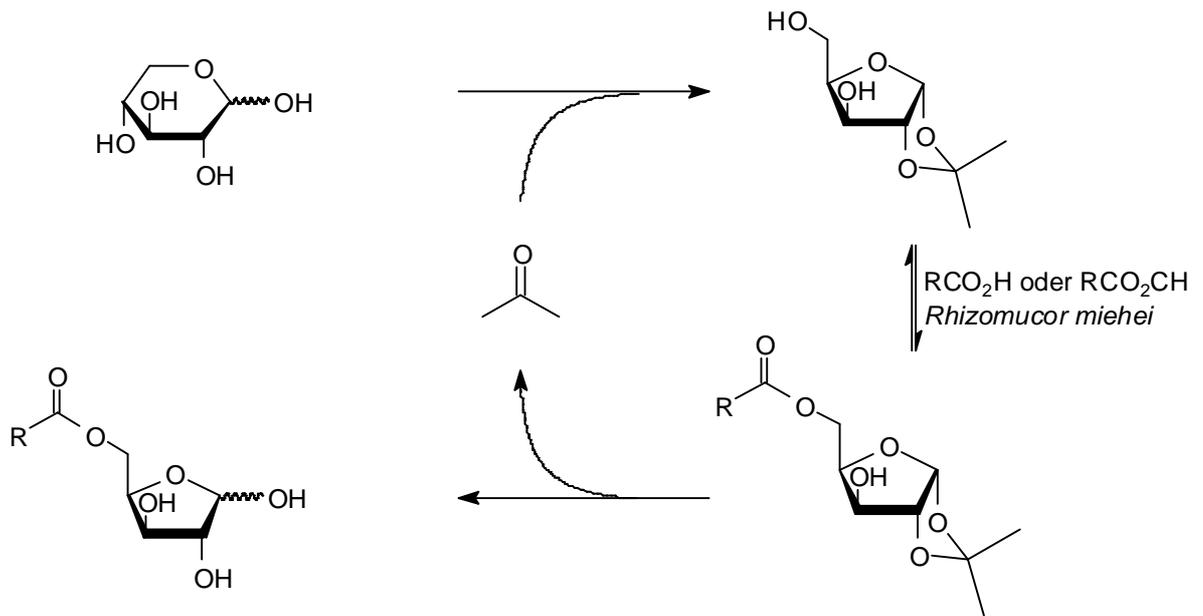


Abbildung 3-3. Selektive, lipasekatalysierte Acylierung von D-Xylose durch temporäre Isopropylidenierung [63]

Als Acyldonatoren wurden freie Fettsäuren oder deren Methylester verwendet. In wenigen Stunden konnten die entsprechenden Zuckerester in Ausbeuten von 50 - 90 % erhalten werden.

Später wurden die Reaktionen unter Verwendung von *Rhizomucor miehei* (früher *Mucor miehei*) Lipase und dem Einsatz von Vakuum so weit optimiert, dass nun freie Zuckerester in Ausbeuten von 57 - 87 % über alle Reaktionsschritte erhalten werden konnten [63] (Abbildung 3-3). Auf ähnliche Weise konnten auch Lactose- und Maltosemonoester aus den entsprechenden Zuckeracetalen und freien Fettsäuren in Gesamtausbeuten von 48 - 77 % erhalten werden [64].

Als nachteilig erweist sich natürlich wiederum bei allen Verfahren die Notwendigkeit zur Derivatisierung und nachfolgenden Abspaltung der Schutzgruppe.

3.1.4.3 Acylierung von Anhydrozuckern

Anhydrozucker sind relativ hydrophobe Zuckerderivate. Sie lassen sich daher auch in vergleichsweise apolaren Lösungsmitteln enzymatisch acylieren.

Die Acylierung in Vinylacetat (Lösungsmittel und Acetyldonator) gelang mit sechs unterschiedlichen Lipasen (darunter auch *Candida antarctica* Lipase B) und lieferte stets das Produkt einer Monoacylierung in 4-Position (Abbildung 3-4) [65].

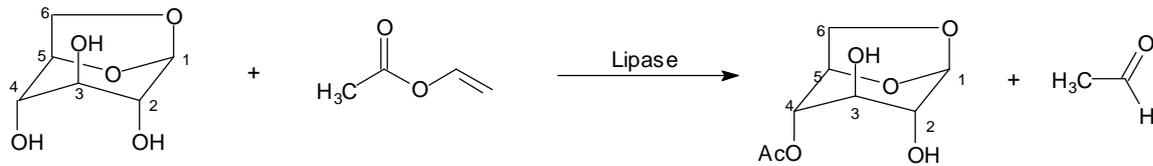


Abbildung 3-4. Enzymatische Acylierung von Anhydrozuckern

3.1.4.4 Acylierung von cyclischen Bis(phenylborsäure)estern

Lang *et al.* sowie Ikeda/Klibanov beschrieben im Jahre 1993 die Synthese von 6-O-Acylglucose bzw. -fructose über die Solubilisierung der Zucker – ausnahmslos Monosaccharide – durch Phenylborsäure [66]. Dabei entstehen cyclische Monosaccharid-bis(phenylborsäure)ester, die durch die Hydrophobizität der Phenylgruppen eine ausreichende Löslichkeit in Lösungsmitteln wie *n*-Hexan aufweisen. Nachteile der Methode sind allerdings die Kosten und die Toxizität der Phenylborsäure, der mehrstufige Reaktionsverlauf sowie die Limitierung der Methode auf Monosaccharide.

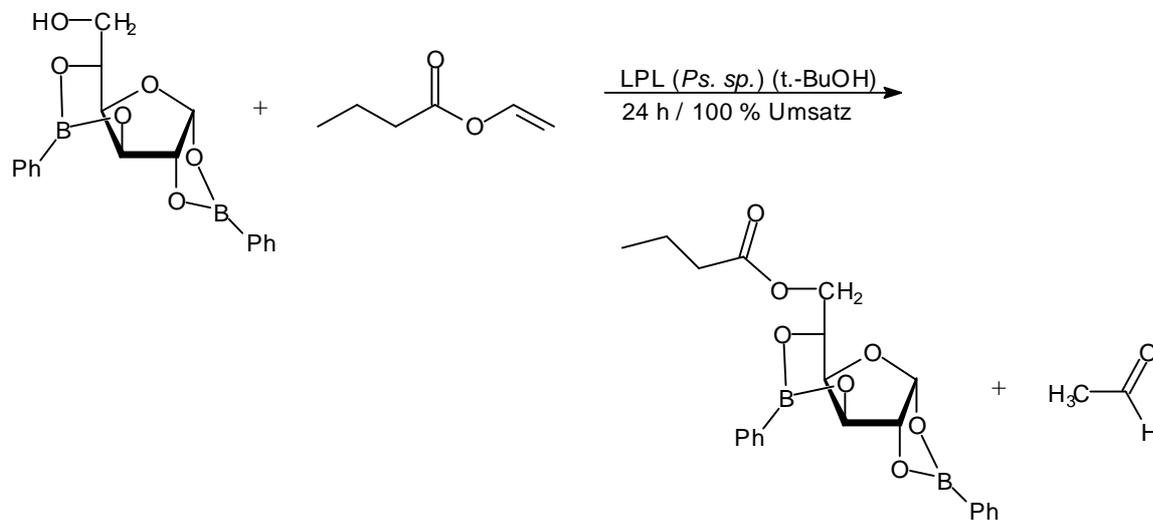


Abbildung 3-5. Acylierung des 1,2:3,5-Bis(phenylborsäure)esters von D-Glucose (furanoid Form) [66a]

3.1.5 Enzymatische Acylierungen immobilisierter Zucker

Die Umsatzgeschwindigkeit enzymatischer Acylierungen sehr hydrophiler Substrate in apolaren Lösungsmitteln steigt beträchtlich, wenn Sie auf einem Trägermaterial (engl. *support*) immobilisiert sind. Beispielsweise lassen sich vicinale Diole wie Ethylenglykol oder Glycerol überhaupt erst in MTBE oder *n*-Hexan mit Vinylestern umsetzen, wenn diese zuvor an Kieselgel oder ähnlichen Materialien adsorbiert wurden [67]. Der Zugewinn an Reaktionsgeschwindigkeit beruht wahrscheinlich auf der erheblichen Vergrößerung der Oberfläche des unlöslichen Substrates.

Auf ähnliche Weise wurde auch, mit mäßigem Erfolg, versucht, die Acylierung einiger derart adsorbierter Monosaccharide in Gegenwart von Schweinepankreaslipase (PPL) in Diisopropylether zu erreichen [68].

3.1.6 Enzymatische Acylierungen in apolaren Lösungsmitteln

Wengel und Mitarbeiter zeigten im Rahmen von Nucleosidsynthesen im Jahre 1995, dass man in Gegenwart von Novozym SP 435TM in Tetrahydrofuran (THF) unter Verwendung von Propionsäureanhydrid 2-Desoxy-D-Ribose und D-Ribose selektiv an der primären Hydroxylgruppe acylieren kann [1]. Dies zeigte eindrucksvoll, wie die Lipase aus *Candida antarctica* auch in einem relativ polaren Lösungsmittel wie THF befähigt ist, ihre Aktivität bezogen auf primäre Zucker-Hydroxylgruppen zu erhalten. Das Verfahren war allerdings auf die Synthese von Zuckern wie 2-Desoxy-D-ribose und D-Ribose beschränkt, die in THF löslich sind.

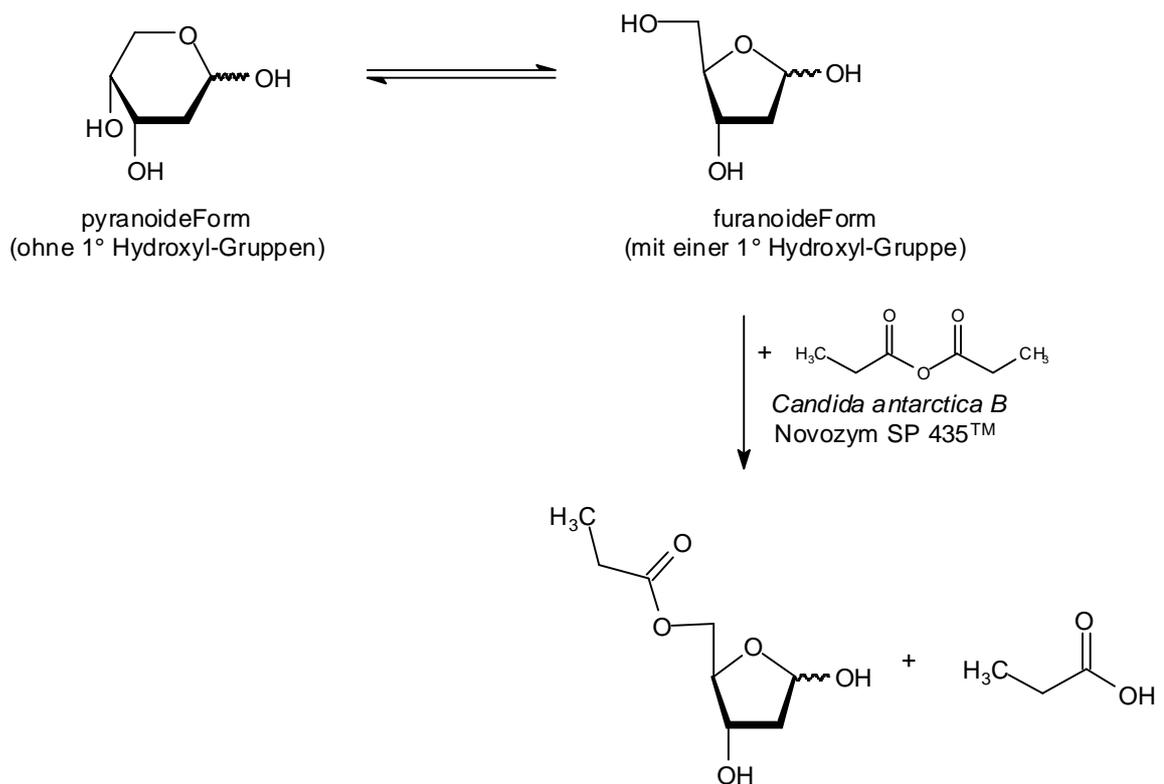


Abbildung 3-6. Regioselektive Veresterung von 2-Desoxy-D-ribose mit Propionsäureanhydrid [1]

In der jüngsten Vergangenheit wurden einige Untersuchungen zur enzymatischen Acylierung von Zuckern veröffentlicht, die sich allesamt unterschiedlicher, aber doch ähnlicher, Lösungsansätze bedienen. Diese Veröffentlichungen sind der Vollständigkeit halber im Literaturverzeichnis erwähnt [69a-l].

3.1.7 Zusammenfassung – Stand der Technik

Bei der enzymatischen Acylierung von Zuckern wurden in der Vergangenheit vor allem apolar derivatisierte Zucker in apolaren Lösungsmitteln bzw. underivatisierte Zucker in toxikologisch bedenklichen, hochpolaren Lösungsmitteln eingesetzt.

Die Umsetzungen werden in organischen Lösungsmitteln durchgeführt, die beim Einsatz zur Produktion kosmetik- und lebensmittelrelevanter Produkte problematisch sein könnten. Zudem sind die gewählten Acyldonatoren vergleichsweise teuer sowie toxikologisch nicht ganz unbedenklich.

Folglich sind alle Versuche die genannten Produkte auf biokatalytischem Wege

- schneller,
- umweltfreundlicher,
- toxikologisch einwandfrei,
- aus günstigen Acyldonatoren und
- mit besseren Ausbeuten bei quantitativem Einsatz der Edukte

herzustellen, lohnende Ziele weiterer Forschungsarbeiten.

3.2 Enzymatische Glycosidierung von Zuckern – Stand der Technik

3.2.1 Stand der Technik – Reverse Hydrolyse

3.2.1.1 *Zucker als Akzeptoren – Di- und Oligosaccharide*

Der erste Einsatz einer Glycosidase zur Synthese von Glycosiden dürfte die Gewinnung von Maltose (4-O-(α -D-Glucopyranosyl)-D-glucopyranose) aus D-Glucose mittels Maltase aus Hefe von Croft-Hill aus dem 19. Jahrhundert sein [70]. Die wenige Jahre später entdeckte Herstellung von Gentiobiose (6-O-(β -D-Glucopyranosyl)-D-glucopyranose) aus D-Glucose gelang unter Einwirkung von Mandel-Emulsin [71]. Es ist immer noch eine gute Methode zur Darstellung von Gentiobiose aus D-Glucose.

Die reverse Hydrolyse ist in dem Sonderfall, dass es sich bei Akzeptor und Donator um das gleiche Molekül handelt, eine praktikable Methode zur Synthese von Disacchariden. Da die Regioselektivität bzgl. des Akzeptors aber nur schwach ausgeprägt ist und in den meisten Fällen zur Glycosylierung primärer Hydroxylgruppen führt, ist diese Methode primär zur Synthese von – in der Natur nur selten zu findenden – 1,6-Di- bzw. Oligosacchariden einsetzbar.

Im Falle der Oligosaccharidsynthesen über reverse Hydrolyse haben sich stationäre Aktivkohle-Celite-Phasen als „Molekülfallen“ bewährt, um das Reaktionsgleichgewicht zu verschieben [72].

Sind Akzeptor und Donator identisch, so ist es auch möglich die Substratkonzentration extrem zu erhöhen, ohne einen Reaktanden im Überschuss hinzufügen zu müssen. In diesem Falle sind gute Disaccharid-Ausbeuten (30-40 %, Mischung der Regioisomere, HPLC) beobachtet worden, wenn bei erhöhter Temperatur gearbeitet wurde [73]. Die zumeist aufwendige Trennung der Regioisomere lässt die Methode allerdings wenig attraktiv erscheinen.

3.2.1.2 Zwei-Phasen-Systeme

Die Nutzung von Zwei-Phasen-Systemen zur Glycosidierung von Monosacchariden ist recht weit verbreitet [74]. Der Vorteil dieser Systeme wird darin gesehen, dass sich das Enzym und der Zucker während der Reaktion in der wässrigen Phase befinden, während das Aglykon – der Alkohol – in der organischen Phase verweilt. Das gebildete Glycosid soll ebenfalls in die organische Phase gehen und auf diese Weise aus dem Gleichgewicht entfernt werden. Allerdings muss man feststellen, dass der wasserlösliche Akzeptoralkohol im großen Überschuss eingesetzt wurde und damit die organische Phase bildete. Man kann also auch von einer Gleichgewichtsverschiebung aufgrund des molaren Überschusses ausgehen.

Zwei-Phasen-Systeme in denen die organische Phase nur ein Äquivalent Akzeptoralkohol enthält, sind schon insofern ungeeignet, weil dabei nicht nur das Reaktionsprodukt aus dem Gleichgewicht entfernt wird, sondern auch der Akzeptoralkohol. Letzterer wird sogar viel stärker aus der wässrigen Phase extrahiert als das Zielglycosid, da er in jedem Falle wesentlich lipophiler ist als das Reaktionsprodukt. Dies hat die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in die genau umgekehrte Richtung zur Folge (Abbildung 3-7).

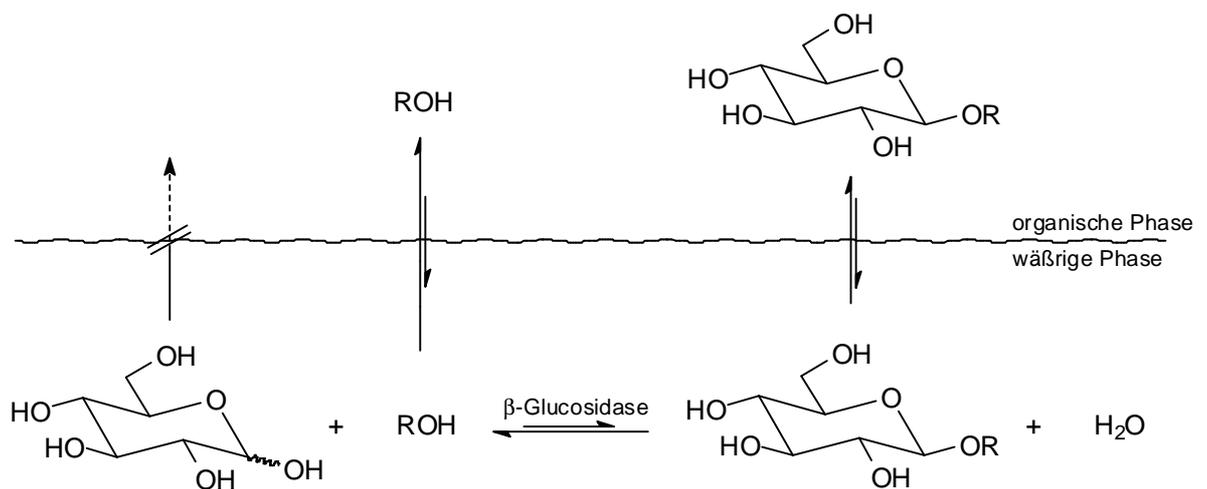


Abbildung 3-7. Reaktandenverteilung im Zwei-Phasen-System

3.2.1.3 *Erniedrigung der initialen Wasserkonzentration durch Cosolventien*

Crout und Mitarbeiter [75] versuchten durch die Zugabe von Cosolventien wie *t*-Butanol oder Acetonitril die **Konzentration des Wassers** im Reaktionssystem **durch Verdünnen** so weit **zu erniedrigen**, dass dessen Einfluss auf die Lage des Reaktionsgleichgewichtes abnimmt. Sie hofften dabei, die Enzymaktivität weitgehend zu erhalten. In der Tat wurde bei zu niedrigen Wasserkonzentrationen Inaktivierung des Enzyms beobachtet.

Bei einer Erhöhung des Wassergehaltes des Reaktionsmediums wurde eine raschere Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes sowie eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes auf die Eduktseite beobachtet.

Nicht belegt wurde allerdings ein **positiver Einfluss der Zugabe des Cosolvents auf die Lage des Reaktionsgleichgewichtes**. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich:

In einem Reaktionssystem, bestehend aus einer katalytischen Menge Mandel- β -D-glucosidase, 1 mmol Glucose, 1 mmol Akzeptoralkohol und x mmol Wasser ergibt sich folgende Situation:

Bei Zugabe einer beliebigen Menge Cosolvens sinkt die Wasserkonzentration linear mit der Menge zugegebenen Cosolvents. Allerdings sinken in gleichem Maße die Konzentrationen sämtlicher, anderer am Reaktionsgleichgewicht beteiligter Reaktionspartner, so dass von einer Verschiebung des Gleichgewichtes durch eine Herabsetzung des Wassergehaltes keine Rede sein kann*. Stattdessen sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund von Enzyminaktivierung und Substratverdünnung.

Sicher hätte man identische Gleichgewichtskonzentrationen ermittelt, hätte man einen Blindversuch mit gleicher Systemzusammensetzung ohne Zusatz von Cosolvents unternommen. Eigene Versuche bestätigten diesen Verdacht.

* Ein gewisser Einfluss durch die Zugabe des Cosolvents auf die Lage des Reaktionsgleichgewichtes ist der in Abschnitt 3.2.1.3.1 beschriebende Einfluss hydrophiler Lösungsmittel auf die Wasseraktivität (Seite 49). In gleicher Weise wie die Zugabe eines Cosolvents jedoch die Aktivität des Wassers beeinflusst, sind auch Beeinflussungen der Aktivitäten aller anderen Komponenten des Reaktionssystems zu berücksichtigen (siehe Abschnitt 3.2.1.3.1 unten), was in einem so komplexen Reaktionssystem wie dem hier beschriebenen (6 Komponenten) nicht mehr möglich ist.

3.2.1.3.1 Einfluss hydrophiler Lösungsmittel auf die Wasseraktivität

Bei gleicher Wasserkonzentration c_w ist a_w in polaren – möglicherweise mit Wasser mischbaren – Lösungsmitteln wesentlich kleiner als in apolaren Lösungsmitteln, so wie es auch aus der Definition der Wasseraktivität hervorgeht: In hydrophilen Lösungsmitteln existieren starke Wechselwirkungen zwischen dem Wasser und dem Lösungsmittel. Dies entspricht einer „Maskierung“ des Wassers. Durch Solvatisierungsprozesse ist das Wasser gebunden und steht nicht mehr vollständig für Gleichgewichtsreaktionen zur Verfügung. Exemplarisch sei hier die hohe Hygroskopie des Tetrahydrofurans genannt, die eindrucksvoll zeigt, welche hohe Affinität ein Lösungsmittel zu Wasser haben kann. Den gleichen Effekt zeigen im Übrigen auch andere hydrophile Stoffe, wie beispielsweise Zucker, im Reaktionssystem durch ihre Hygroskopie.

Der starke Einfluss des Lösungsmittels auf die Wasseraktivität ist Tabelle 3-1 zu entnehmen [76].

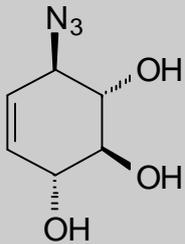
Tabelle 3-1. Aktivitätskoeffizienten (f) für Wasser in 90:10 und 80:20 (v/v) Lösungsmittel-Wasser-Mischungen bei 30 °C

Lösungsmittel-Wasser-Mischung	f ($= a_w/c(\text{H}_2\text{O})$)
90:10 (v/v)	
Aceton-H ₂ O	0,58
Acetonitril-H ₂ O	0,78
<i>t</i> -Butanol-H ₂ O	0,62
80:20 (v/v)	
Aceton-H ₂ O	0,64
Acetonitril-H ₂ O	0,81
<i>t</i> -Butanol-H ₂ O	0,72

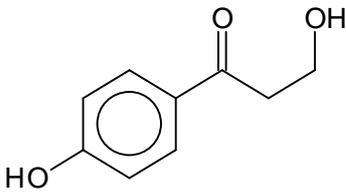
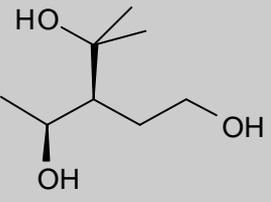
3.2.2 Stand der Technik – Transglycosidierungen

Die erste Erwähnung der enzymatischen Transglycosidierung stammt von Alessandrini *et al.* aus dem Jahre 1956. Die enzymatische Synthese von Alkylglycosiden durch Transglycosidierungsprozeduren wurde bereits intensivst erforscht. Tabelle 3-2 gibt einen Überblick über die bekannten Reaktionen die den Stand der Wissenschaft repräsentieren sollen.

Tabelle 3-2. Glycosidasekatalysierte Glycosylierungen einfacher Alkohole durch Transglycosidierung

Akzeptoren	Donator	Katalysator	Quelle
MeOH, EtOH, Glycerol, Benzylalkohol, Glycol, 1,4-Butandiol, 1,6-Hexandiol	Lactose	β -Galactosidase aus <i>K. fragilis</i> und <i>K. lactis</i>	[77]
(<i>R</i>)- und <i>rac</i> -2-Butanol, (<i>S</i>)- und <i>rac</i> -1,2-Propandiol, (<i>S</i>)- und <i>rac</i> -1,3-Butandiol, (<i>S</i>)- und <i>rac</i> -1,2-Isoproylidenglycerol	Lactose	β -Galactosidase aus <i>E. coli</i>	[78]
<i>rac</i> -1,2-Isoproylidenglycerol	Lactose	β -Galactosidase aus <i>E. coli</i>	[79]
<i>rac</i> -1,2-Isoproylidenglycerol 2,3-Epoxi-1-propanol	Lactose, <i>oNP</i> - β -Gal	β -Galactosidase aus <i>E. coli</i>	[80]
Allylalkohol Benzylalkohol 2-(Trimethylsilyl)-ethanol	Lactose, Raffinose	α -Galactosidase aus Kaffeebohnen und <i>E. coli</i> und	[81]
<i>trans</i> -2,3-Dihydroxy-1,2,2-Bicycloheptan, <i>trans</i> -2,3-Dihydroxy-1,2,2-Bicyclohept-5-en, <i>cis</i> -1,2-Cyclopentandiol, <i>cis</i> -1,2-Cyclohexandiol, <i>cis</i> -4-Cyclopenten-1,3-diol	Phenyl- β -galactosid, Lactose	β -Galactosidase aus <i>E. coli</i> und <i>A. oryzae</i>	[82]
<i>cis</i> -Cyclohex-3,5-dien-1,2-diol	Lactose	β -Galactosidase aus <i>E. coli</i>	[83]
	<i>oNP</i> - β -Gal	β -Galactosidase aus <i>E. coli</i>	[84]

Akzeptoren	Donator	Katalysator	Quelle
1-Hexanol	Methyl- β -Galactosid	PEG-modifizierte β -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i>	[85]
1-Octanol	Lactose	β -Glucosidase aus Mandeln und β -Galactosidase <i>A. oryzae</i>	[86]
Allylalkohol, 2-Methyl-allylalkohol, 3-Buten-1-ol, 4-Penten-1-ol, 1,3-Butandiol	Lactose	β -Galactosidase aus <i>E. coli</i> und <i>A. oryzae</i>	[87]
1-Octanol, 1,8-Octandiol, 1-Decanol, 1,10-Decandiol	Lactose <i>oNP</i> - β -Gal	β -Galactosidase aus <i>E. coli</i>	[88]
2-Fluor-ethanol	Lactose	<i>K. lactis</i>	[89]
Ethanol	Lactose	β -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> und <i>C. saccharolyticum</i>	[90]
Ethanol, 2-Fluor-ethanol	Lactose	β -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> und <i>Streptococcus thermophilus</i>	[91]
5-Hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyranon (Kojisäure)	Lactose	β -Galactosidase aus <i>B. circulans</i> (immobilisiert auf gesinterter, poröser, aminogruppentragender Keramik)	[92]
1,2-Propandiol, 1,2-Butandiol, 1,3-Butandiol, 1,4-Butandiol, 1,4-Pentandiol, 1,2-Hexandiol, 2-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-2,4-Pentandiol, <i>trans</i> -1,2-cyclohexandiol	Lactose, Phenyl- β -galacto- und -glucosid	β -Glycosidase aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	[93]
<i>n</i> -Alkylalkohole ($C_1 - C_8$), 2-Propanol, 2-Methyl-butanol, 2-Pentanol, 2-Hexanol, 2-Heptanol, 3-Pentanol, 3-Hexanol, 3-Heptanol, 1,2-Propandiol	Lactose, Phenyl- β -galacto- und -glucosid	β -Glycosidase aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	[94]

Akzeptoren	Donator	Katalysator	Quelle
	Phenyl- β -glucosid, Glucose	β -Glycosidase aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	[95]
	pNP- β -Gal	β -Galactosidase aus <i>K. lactis</i>	
	Glucose	β -Glucosidase aus Mandeln	
	Phenyl- β -glucosid	β -Glycosidase aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	[96]
2-, 3- und 4-Hydroxybenzylalkohol, Glycerol, 1,2-Isopropylidenglycerol	Phenyl- β -glucosid	β -Glycosidase aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	[97]
1-Hexanol	Cellobiose		
Methacrylsäure-(2-Hydroxyethyl)-ester	pNP- β -Gal	β -Glycosidase aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	[98]
Allylalkohol, Propargylalkohol	Lactose, Maltose, Cellobiose	β -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> , α -Glucosidase aus Reis, β -Glucosidase aus Mandeln	[99]
Methanol, Ethanol, n-Propanol	Cellobiose	β -Glucosidase aus <i>Fusarium oxysporum</i>	[100]
1,2-Propandiol, 3-Chlor-1,2-propandiol, 2-Phenyl-ethandiol und Phenyl-1,2-ethandiol	Phenyl- β -glucosid	β -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i>	[101]
Benzylalkohol, 2-, 3- und 4-Hydroxybenzylalkohol, 2-Phenyl-ethanol, Cyclohexanol, 1,4-Cyclohexanediol, Methanol, Ethanol, 1-Butanol, 1-Hexanol und 1-Octanol	Glucose, Cellobiose	β -Glucosidase aus Mandeln	[102]
(1R, 2R)- und (1S, 2S)-1,2-Cyclohexandiol	Maltose, Cellobiose, Salicin	Enzym-Rohfällungen aus <i>A. oryzae</i> und <i>A. niger</i> , β -Glucosidase aus Mandeln	[103]
Methanol, 1-Butanol, 2-Propanol, Cyclohexanol, 1,2-Ethandiol, 4-Methyl-1,4-Pentandiol, 4-Methyl-2,4-Pentandiol, 2-Hydroxybenzylalkohol, 2-Phenylethanol, 1-Octanol, 5-Nonanol	Phenyl- β -glucosid	β -Galactosidase aus <i>K. lactis</i>	[104]

Akzeptoren	Donator	Katalysator	Quelle
1-Dodecanol	Glucose, Cellobiose	<i>C. molischiana</i> -35M5N- β -Glucosidase	[105]
<i>n</i> -Alkylalkohole (C ₅ - C ₈)	Glucose, Cellobiose, Methyl- β -glucosid	β -Glucosidase aus Mandeln immobilisiert auf XAD-4-Harz	[106]
<i>rac</i> -3-Hydroxybuttersäureethyl-ester, 4-Hydroxybuttersäure- <i>N</i> -butylamid, 2-(Trimethylsilyl)-ethanol	Glucose, Cellobiose	β -Glucosidase aus Mandeln	[107]
Methanol, Ethanol, 2-Propanol, 1-Butanol, Ethandiol, 1,4-Butandiol, 1,3-Butandiol, 1,6-Hexandiol	<i>p</i> NP- β -Man	β -Mannosidase aus Schnecken	[108]
Methanol, Ethanol, <i>n</i> -Propanol, 2-Propanol, 1-Butanol, 2-Butanol, 1-Hexanol, Cyclohexanol, 1-Octanol	<i>p</i> NP- β -Man	β -Mannosidase aus Schnecken, β -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i>	[109]
<i>n</i> -Alkylalkohole (C ₁ - C ₅)	Mannobiose	β -Mannosidase aus <i>A. niger</i>	[110]
<i>n</i> -Alkylalkohole (C ₁ - C ₈)	Mannobiose	β -Mannosidase aus <i>A. niger</i>	[111]
Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol, 1-Butanol, 2-Methyl-1-Propanol	Xylose, Methyl- β -Xylosid	<i>Trichoderma reesei</i>	[112]
<i>n</i> -Alkylalkohole (C ₁ - C ₄), Allylalkohol	Saccharose	β -Fructofuranosidase aus <i>S. cerevisiae</i>	[113]

A. = *Aspergillus*
 B. = *Bacillus*
 C. = *Caldocellum*

E. = *Escherichia*
 K. = *Kluyveromyces*
 S. = *Saccharomyces*

In der jüngsten Vergangenheit wurden einige Untersuchungen zur enzymatischen Glycosidierung veröffentlicht, die sich allesamt unterschiedlicher, aber doch weitgehend ähnlicher Lösungsansätze bedienen. Diese Veröffentlichungen sind der Vollständigkeit halber im Literaturverzeichnis erwähnt [114a-n].

3.2.3 Zusammenfassung – Stand der Technik

Die effiziente, enzymatische Glycosidierung von Hydroxyverbindungen in Gegenwart „hydrolytischer“ Enzyme (Glycosidasen) stellt bislang ein weitgehend ungelöstes Problem dar: Glycosidasen sind nur in Gegenwart ausreichender Mengen Wassers aktiv – in wässrigen Lösungen ist aber die Hydrolyse so deutlich bevorzugt, dass die entsprechende Konkurrenzreaktion, d.h. die Synthese von Glycosiden, nur in geringem Maße stattfindet und daher meist nur schwache Umsätze erhalten werden (mesophile Glycosidasen: 10 - 15 (reverse Hydrolyse) bzw. 20 - 40 % (kinetisch kontrollierte Transglycosidierung)).

4 Durchführung

4.1 Enzymatische Acylierung von Zuckern

Wie zuvor beschrieben (Kapitel 2.2), lassen sich enzymatische Acylierungen von Zuckern generell sowohl durch reverse Hydrolyse als auch Umesterungen (Acyltransfer) realisieren. Die folgenden Kapitel 4.1.1 – „Zuckerester durch reverse Hydrolyse“ und 4.1.2 – „Zuckerester durch Umesterung“ dokumentieren die auf diesen Wegen erzielten Ergebnisse.

4.1.1 Zuckerester durch reverse Hydrolyse

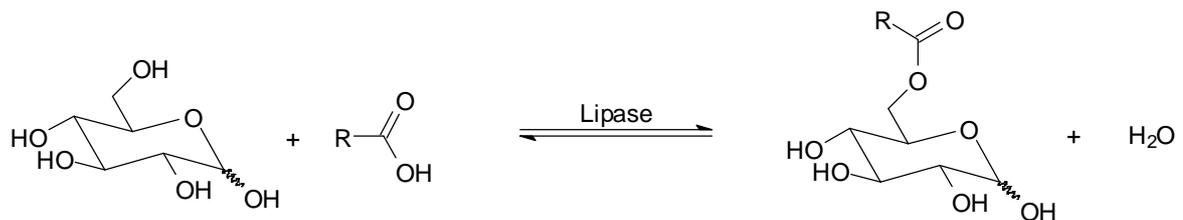


Abbildung 4-1. Zuckerester durch reverse Hydrolyse

4.1.1.1 Reaktionen in Wasser

Wasser ist ein gutes Lösungsmittel für Zucker, in welchem auch die Aktivität des Enzyms erhalten bleibt. Als nachteilig erweist sich, dass (a) hydrophobe Acyldonatoren darin unlöslich sind und dass (b) Wasser, nach dem Massenwirkungsgesetz mit dem Zucker um die Acyldonatoren konkurriert. Die Hydrolyse des Acyldonators wird damit zur Hauptreaktion, es sei denn man führt die Reaktion unter den Bedingungen der kinetisch kontrollierten enzymatischen Umesterung aus.

Aufgrund dieser Sachlage und den wenig attraktiven Ergebnissen anderer Arbeitskreise [44], [45] erscheint es auf den ersten Blick nicht sinnvoll, diese Strategie weiter zu verfolgen.

Da aber die Zuckerester langkettiger Fettsäuren (ab C₁₀) in Wasser ausgesprochen schlecht löslich sind und dadurch möglicherweise aus Wasser ausfallen, könnte die Reaktionsführung in Wasser sinnvoll sein, um das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der Produktbildung zu verschieben.

Die mangelnde Löslichkeit des Acyldonators sollte durch Verwendung der freien Fettsäuren bei gleichzeitiger

1. Zugabe von Emulgatoren zur Steigerung der Dispergierbarkeit
2. Zugabe von Natriumhydroxid um die Fettsäure partiell in das Natriumsalz zu überführen*
3. Zugabe von Cosolvenzien.

verbessert werden.

Die Synthese von 6-O-Lauroylglucose unter verschiedenen Bedingungen wurde untersucht. Dazu wurde eine Lösung von D-Glucose (10 - 200 mmol) in 100 ml Wasser hergestellt und mit 10 mmol Fettsäure und 500 mg Novoym SP 435™ versetzt.

Die folgenden Abschnitte beschreiben die damit durchgeführten Versuche.

4.1.1.1.1 Solvatisierung mittels Emulgatoren

Zugabe von Triton X-100™ oder Soja-Lecithin (5 - 30 mg) ließ – je nach Menge – eine sehr feine Emulsion im Reaktionssystem entstehen.

In keinem Falle wurde Produktbildung beobachtet.

4.1.1.1.2 Solvatisierung durch Zugabe von Base

Die zuvor getrennten Phasen von Fettsäure und Zuckerlösung lassen sich durch Zugabe von 1 - 10 ml 1-M-NaOH bzw. -KOH wie im vorigen Abschnitt in sehr feine Emulsionen überführen. In keinem Falle wurde Produktbildung beobachtet.

4.1.1.1.3 Solvatisierung unter Zugabe von Cosolvenzien

Da sich reines THF und *t*-Butanol bereits als sehr wirksame Solvenzien zur enzymatischen Umsetzung von Zuckern erwiesen haben, sollte auch der Einsatz dieser beiden Solvenzien versucht werden. In keinem Falle wurde Produktbildung beobachtet.

* Dies hat den zusätzlichen Effekt, dass die gebildeten Natriumseifen als Emulgatoren wirken.

Dazu wurden jeweils 5, 10, 15, 20, 25 bzw. 30 ml Cosolvenz zur Reaktionsmischung gegeben. In keinem Falle wurde Produktbildung beobachtet.

4.1.1.1.4 Zusammenfassung

Sämtliche Versuche zur Durchführung der Reaktion in Wasser schlugen fehl. Veränderungen des Reaktionssystems „Wasser“ durch Zugabe apolarer Cosolventien, Basen oder amphiphiler Solubilisierungsstoffe scheinen damit also sowohl die Löslichkeit des Reaktionsproduktes als auch des Acyldonators positiv zu beeinflussen. Dadurch geht der erhoffte Vorteil der Reaktionsführung, das Ausfallen des Reaktionsproduktes, verloren.

4.1.1.2 Zuckerestersynthese im Schaumreaktor

In der Literatur ist die Acylierung von Glycerol (5-facher Überschuss) in einer wässrigen Lösung (Puffer, pH 8) in Gegenwart einer flüssigen Lipase-Präparation beschrieben. Durch kontinuierliches Einleiten **trockener** Luft (P_4O_{10}), konnte quantitativer Umsatz erzielt werden [115].

Es gelingt dabei offensichtlich, durch das Durchleiten getrockneter Luft (P_4O_{10}) das Wasser quantitativ aus dem Reaktionssystem zu entfernen. Dadurch unterscheidet sich das Reaktionssystem erheblich von der in Abschnitt 4.1.1.1 beschriebenen Strategie.

In Analogie dazu, sollte versucht werden, dieses Verfahren auch auf die Synthese von Zuckerestern zu übertragen.

Dazu wurden 10 ml Wasser (VE), 0,5 mmol NaOH, 1 ml flüssige Lipasepräparation (*Candida antarctica*, Novo Nordisk A.S.), 3 mmol Glucose bzw. Saccharose und 3 (bzw. 10, 15 und 20) mmol Laurinsäure in einem 80 cm Rohr mit Fritte von unten mit einem Strom getrockneter Luft (P_4O_{10}) begast. Innerhalb von 4 Stunden war das System so weit getrocknet, dass kein Schaum mehr gebildet wurde. Der Umsatz wurde über HPLC verfolgt.

Leider konnte unter diesen Bedingungen kein messbarer Umsatz erzielt werden.

Kontrollexperimente mit Glycerol und Laurinsäure zeigten, dass dieses Verfahren zur Herstellung von Monoglyceriden problemlos reproduzierbar ist.

4.1.2 Zuckerester durch Umesterung

4.1.2.1 Reaktionen in THF

4.1.2.1.1 Acylierung von Aldohexosen

Ausgehend von der oben beschriebenen (siehe Kapitel 3.1 – „Stand der Technik“), selektiven Acylierung nativer D-Ribose und 2-Desoxy-D-ribose mittels Propionsäureanhydrid in Gegenwart der Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435™) ([1], Abbildung 4-2) sollte versucht werden, diese Reaktion auf die entsprechende Veresterung von Hexosen zu übertragen.

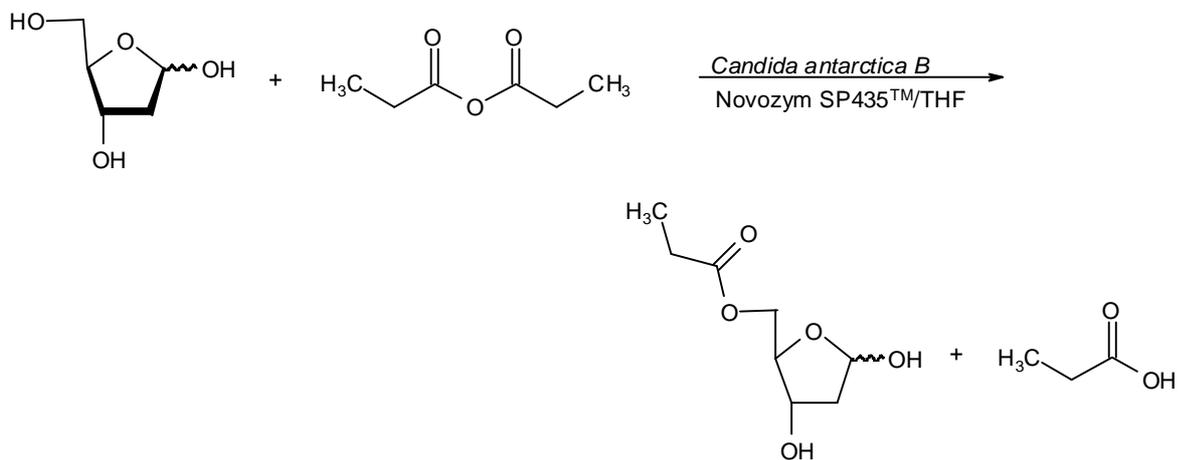


Abbildung 4-2. Regioselektive Veresterung von 2-Desoxy-D-ribose mit Propionsäureanhydrid [1]

Da die meisten Hexosen und Disaccharide in THF weitgehend unlöslich sind, war zunächst nicht damit zu rechnen, dass das Verfahren auf solche Zucker übertragbar ist. Es konnte jedoch in eigenen Arbeiten [116] gezeigt werden, dass auch diese Zucker unter den gleichen Bedingungen an der primären Hydroxylgruppe acyliert werden: Trotz der sehr geringen Löslichkeit in THF konnten D-Glucose, D-Galactose, D-Mannose unter Verwendung einer Vielzahl von Fettsäuren, Fettsäuremethyl- bzw. Fettsäurevinylestern als Acyldonatoren in Gegenwart der Lipase Novozym SP 435™ an der primären Hydroxylgruppe regioselectiv acyliert werden [116]. Innerhalb von 48 Stunden konnten 6-O-Acylaldo-D-hexosen auch im Multi-Gramm-Maßstab mit Umsätzen bis zu 97 % erhalten werden (Abbildung 4-3).

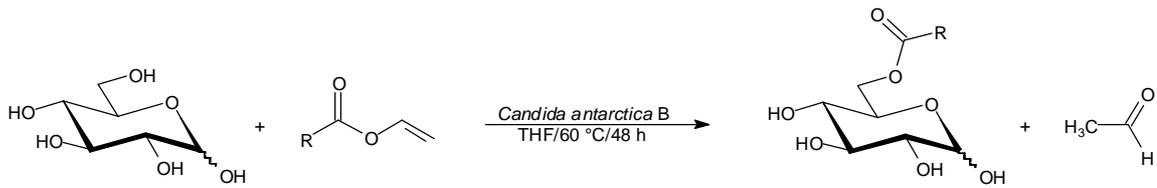


Abbildung 4-3. Enzymkatalysierte Acylierung von Hexosen mit Vinylestern am Beispiel von D-Glucose

Als Acyldonatoren wurden primär Vinylester genutzt, da deren Vertreter im Bereich höherer Kettenlängen leichter zugänglich sind, als die entsprechenden Anhydride. Zudem entsteht bei der Verwendung von Anhydriden pro Mol Produkt ein Äquivalent Fettsäure, welche die Aufreinigung der Produkte erheblich erschwert.

Die wichtigsten Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tabelle 4-1. Acylierung ausgewählter Aldo-D-hexosen (5,0 g Novozym SP 435TM, 1,5 eq. Laurinsäurevinylester, Reaktionsdauer: 48 h)

Edukt	Produkt		
	Bezeichnung	#	Umsatz* [%]
D-Glucose	6-O-Lauroyl-D-glucose	1	97
D-Mannose	6-O-Lauroyl-D-mannose	2	92
D-Galactose	6-O-Lauroyl-D-galactose	3	95

* Umsatzbestimmung durch HPLC (RP-18, basisliniengetrennte Peaks von Monosaccharid und 6-O-Acylsaccharid)

4.1.2.1.1.1 Identifizierung

Am Beispiel der 6-O-Lauroyl-D-glucose soll hier die Identifizierung mittels ^1H - und ^{13}C -NMR- und IR-Spektroskopie exemplarisch erläutert werden. Im $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Spektrum befinden sich die charakteristischen Signale dieser Verbindungsklasse im Bereich von 60 bis 180 ppm, während der Bereich von 14 bis 40 ppm die Signale der Alkylkette enthält. Diese Signale sind zum Teil nicht aufgelöst und stimmen dadurch in ihrer Anzahl nicht mit der Anzahl der Alkylkohlenstoffe überein. Da die Zuordnung der Signale des Zuckerteils durch Auswertung der Kopplungskonstanten nicht möglich ist, wurden die $(^1\text{H},^{13}\text{C})$ - und $(^1\text{H},^1\text{H})$ -korrelierten NMR-Spektren aufgenommen und ausgewertet. Die Auswertung der Signale der Alkylkette erfolgt durch Inkrementrechnung [117].

4.1.2.1.1.1.1 $(^1\text{H},^1\text{H})$ -korreliertes NMR-Spektrum ($^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY) von 6-O-Lauroyl-D-glucose (1)

Die Interpretation dieses 2D-Spektrums beginnt mit der Identifizierung der Protonen in 6-Position im $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -COSY-Spektrum (einziger Kohlenstoff im Bereich über 60 ppm mit zwei chemisch unterschiedlichen Protonen). Mit diesen Informationen kann man die Zuordnung des gesamten ABX-Systems treffen ($\delta_{\text{A}} = 3,98$ ppm, $\delta_{\text{B}} = 4,25$ ppm, $\delta_{\text{X}} = 3,75$ ppm, $|^2J_{\text{AB}}| = 1,5$ Hz, $|^3J_{\text{AX}}| = 7,5$ Hz, $|^3J_{\text{BX}}| = 6,5$ Hz). In der Folge kann, durch Verfolgung des gesamten Spinsystems, die Zuordnung sämtlicher Signale im Bereich von 3 bis 7 ppm erfolgen (siehe Tabelle 4-2).

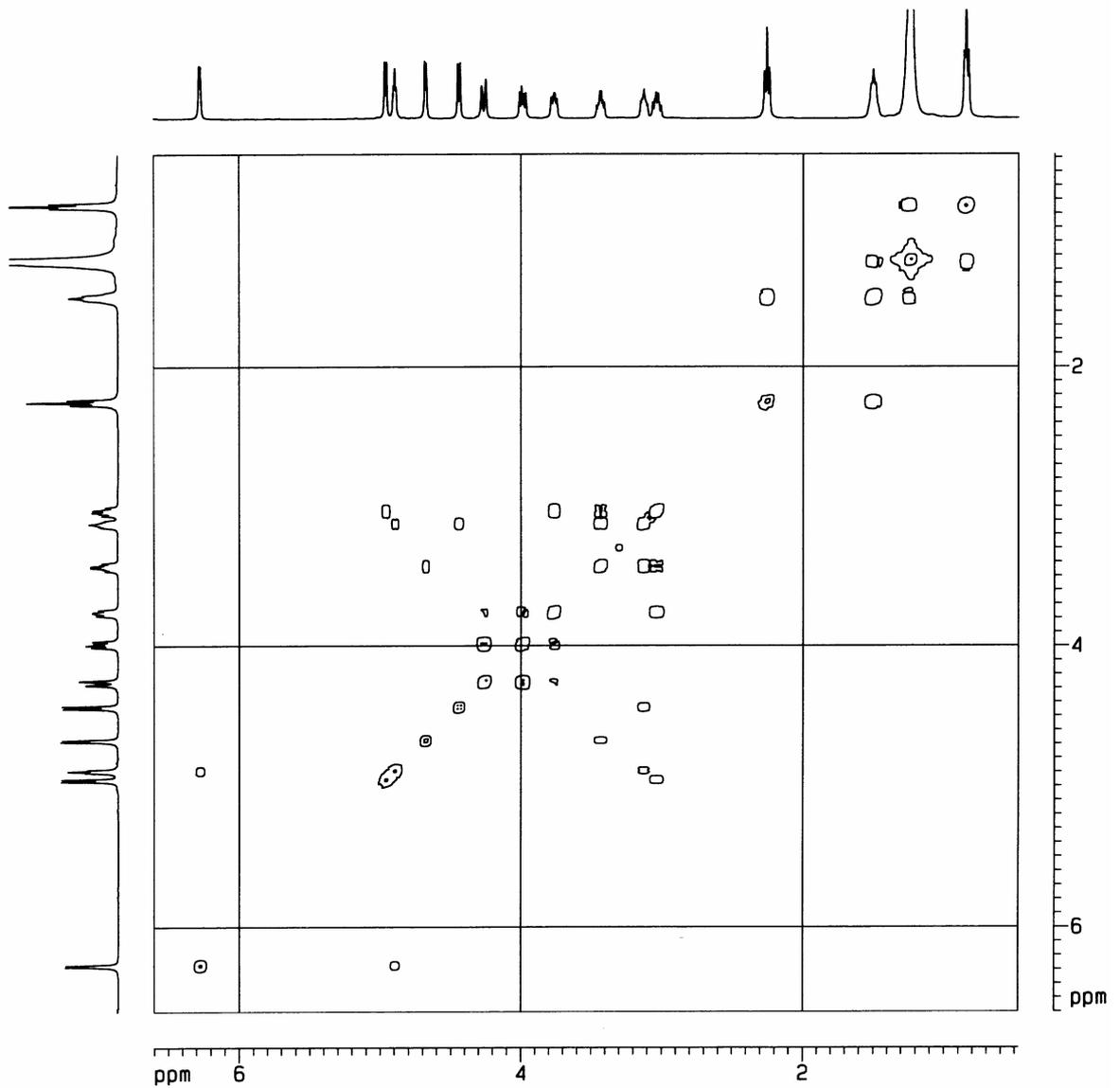


Abbildung 4-4. ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-korreliertes NMR-Spektrum ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY) von 6-O-Lauroyl-D-glucose (1)

4.1.2.1.1.2 ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$)-korreliertes NMR-Spektrum ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY) von 6-O-Lauroyl-D-glucose (1)

Die Zuordnung der ^{13}C -Signale ist nun, unter Zuhilfenahme der in Abschnitt 4.1.2.1.1.1 erhaltenen Zuordnungen der ^1H -Signale und des H,C-COSY-Spektrums, offensichtlich.

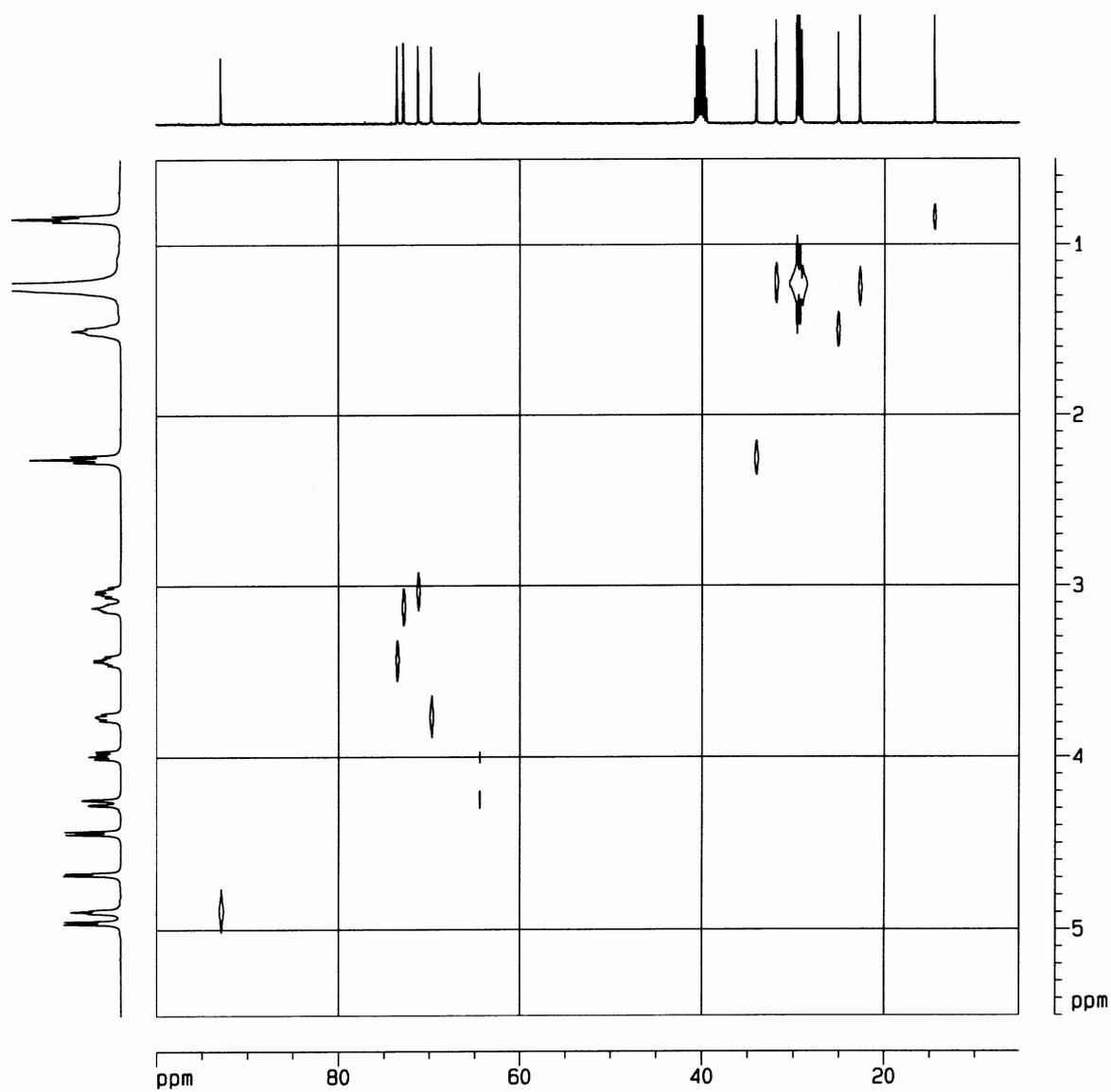
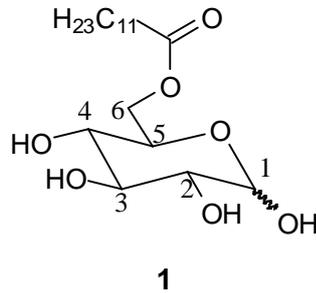


Abbildung 4-5: ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$)-korreliertes NMR-Spektrum ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY) von 6-O-Lauroyl-D-glucose (1)

Tabelle 4-2. Chemische Verschiebungen in 6-O-Lauroyl-D-glucose (1)

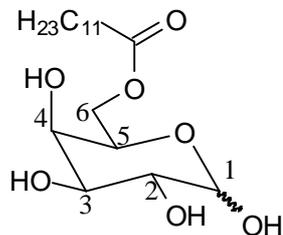


Position	chemische Verschiebung [ppm]		
	$\delta(\text{C-H})$	$\delta(\text{O-H})$	$\delta(\text{C})$
1	4,89	6,30	92,9
2	3,13	4,47	72,8
3	3,43	4,69	73,5
4	3,03	4,96	71,2
5	3,75	–	69,8
6	3,98 + 4,25 (diastereotope Protonen)	–	64,4

Die chemischen Verschiebungen sind Tabelle 4-2 zu entnehmen. Auffällig ist die typische Hochfeldverschiebung des C-6-Signals und die Tieffeldverschiebung des C-1-Signals relativ zu den restlichen Signalen des Glucoseteils.

Die Tieffeldverschiebung des ^{13}C -Signals des Kohlenstoffkerns in 6-Position (64,4 ppm) in Vergleich zur chemischen Verschiebung der gleichen Position in underivatisierter Glucose (61,8 ppm) bei gleichzeitiger Hochfeldverschiebung der benachbarten 5-Position (hier: 69,8 ppm, underivatisierte Glucose: 73 ppm) belegt die Acylierungsposition [118, 119]. Die Auswertung, speziell der 6-O-Lauroyl-D-galactose (**2**) und 6-O-Lauroyl-D-mannose (**3**), aber auch aller anderer Acylierungsprodukte, erfolgte analog.

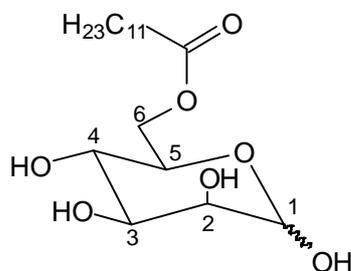
Tabelle 4-3. Chemische Verschiebungen in 6-O-Lauroyl-D-galactose (2)



2

Position	chemische Verschiebung [ppm]		
	$\delta(\text{C-H})$	$\delta(\text{O-H})$	$\delta(\text{C})$
1	4,93	6,16	93,2
2	3,51 – 3,55	4,25	69,1
3	3,66	nicht sichtbar	69,9
4	3,98	4,06 – 4,23	68,2
5	3,51 – 3,55	–	69,6
6	4,06 – 4,23	–	64,6
	(diastereotope Protonen)		

Tabelle 4-4. Chemische Verschiebungen in 6-O-Lauroyl-D-mannose (3)



3

Position	chemische Verschiebung [ppm]	
	$\delta(\text{C-H})$	$\delta(\text{C})$
1	4,81	94,5
2	3,62	71,9
3	3,64	71,1
4	3,49	67,8
5	3,80	71,1
6	4,06 + 4,33	64,8
	(diastereotope Protonen)	

4.1.2.1.2 Acylierung von Pentosen

4.1.2.1.2.1 5-O-Lauroyl-D-ribose (4)

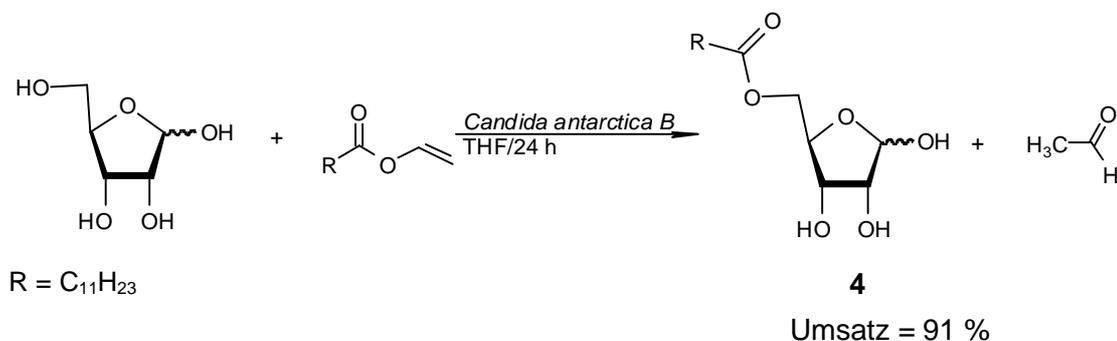


Abbildung 4-6. Enzymkatalysierte Acylierung von D-Ribose mit Laurinsäurevinylester zu 5-O-Lauroyl-D-ribose (4)

D-Ribose ist in THF löslich. 10 mmol können in 150 ml heißem THF gelöst werden. Der Zucker verbleibt beim Abkühlen in Lösung und lässt sich daher anschließend durch Zugabe von 400 mg Novozym 435TM und 1,5 eq. Laurinsäurevinylester sehr schonend und rasch bei Raumtemperatur acylieren (Abbildung 4-6).

4.1.2.1.2.2 5-O-Lauroyl-2-desoxy-D-ribose (5)

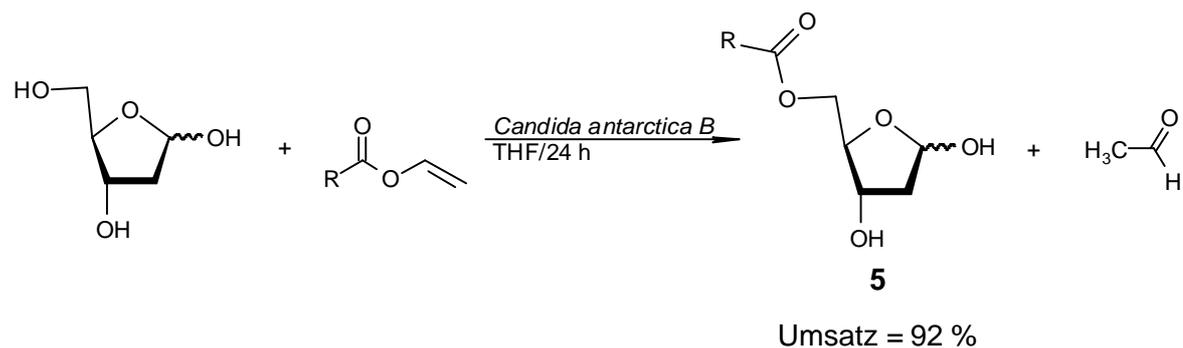


Abbildung 4-7. Enzymkatalysierte Acylierung von 2-Desoxy-D-ribose mit Laurinsäurevinylester zu 5-O-Lauroyl-2-desoxy-D-ribose (5)

2-Desoxy-D-ribose ist in THF noch besser löslich als D-Ribose. 10 mmol des Zuckers wurden in 150 ml THF gelöst und anschließend bei Raumtemperatur durch Zugabe von 400 mg Novozym 435TM und 1,5 eq. Laurinsäurevinylester sehr schonend und rasch acyliert.

4.1.2.1.2.3 5-O-Lauroyl-D-arabinose (6), 5-O-Lauroyl-L-arabinose (7) und 5-O-Lauroyl-D-xylose (8)

D-Arabinose, L-Arabinose und D-Xylose lassen sich unter Verwendung von 1,5 eq. Laurinsäurevinylester analog zur D-Ribose umsetzen (Abbildung 4-8 bis Abbildung 4-10).

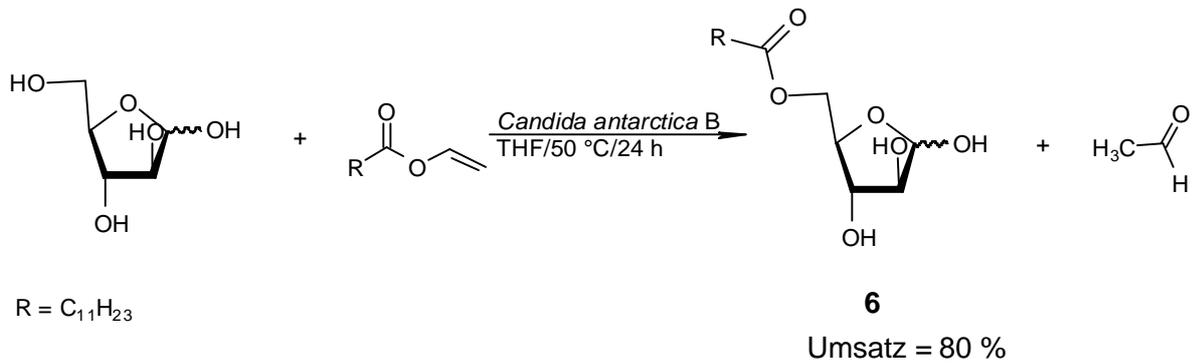


Abbildung 4-8. Enzymkatalysierte Acylierung von D-Arabinose zu 5-O-Lauroyl-D-arabinose (6)

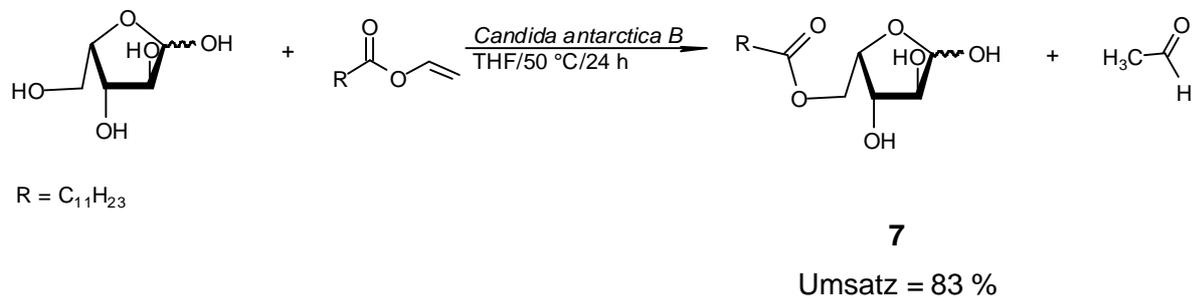


Abbildung 4-9. Enzymkatalysierte Acylierung von L-Arabinose zu 5-O-Lauroyl-L-arabinose (7)

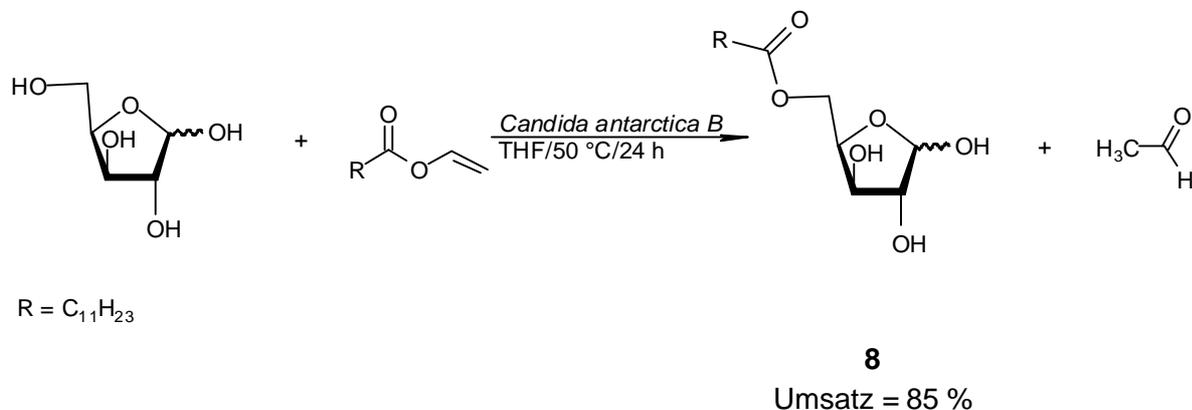
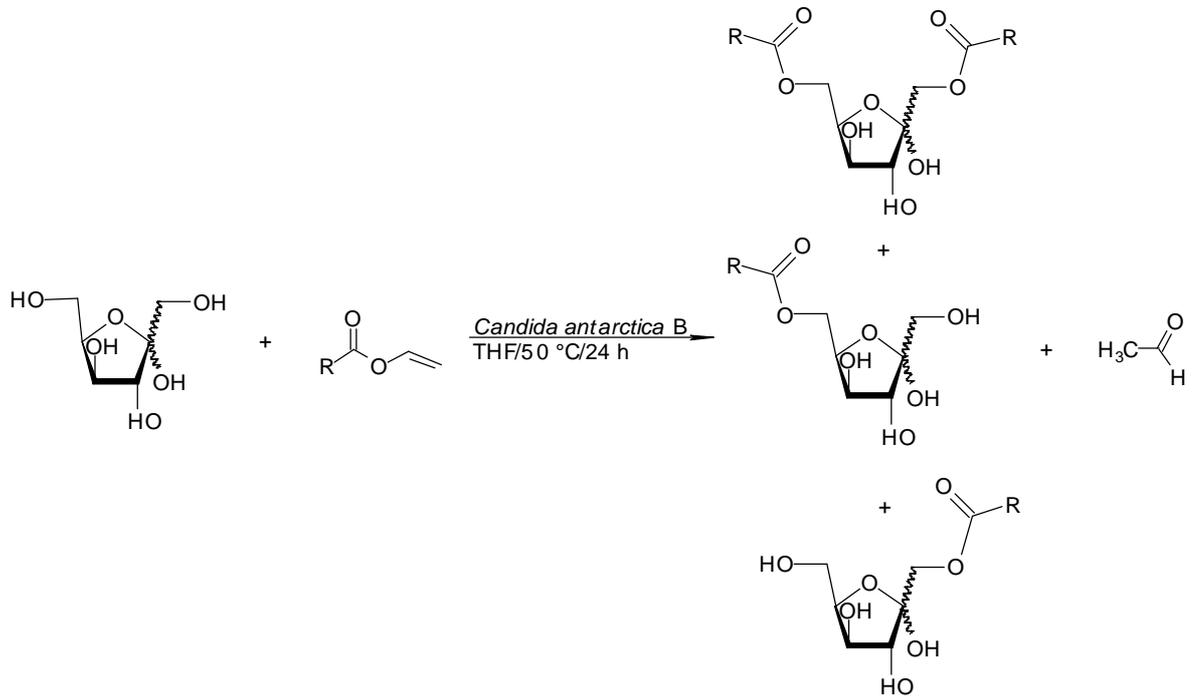


Abbildung 4-10. Enzymkatalysierte Acylierung von D-Xylose zu 5-O-Lauroyl-D-xylose (8)

4.1.2.1.3 Acylierung von Fructose



R = C₁₁H₂₃

+ pyranoide Formen

Abbildung 4-11. Enzymatische Acylierung von D-Fructose – Produktgemisch

Die Veresterung von D-Fructose unter diesen Bedingungen führt zur Bildung von Gemischen isomerer Produkte unterschiedlichen Acylierungsgrades. Diese schwer charakterisierbaren Gemische bestehen aus den

- furanoiden und pyranoiden Formen
- α - und β -Anomeren und
- Positionsisomeren und Produkte mit unterschiedliche Acylierungsgrad

Diese Gemische wurden nicht weiter charakterisiert.

4.1.2.1.4 Acylierung von Salicin

Die Umsetzung von Vinyllaurat mit Salicin nach der oben beschriebenen Methode führt zur selektiven Veresterung der Hydroxylgruppe in der 6-Position, gefolgt von der langsam verlaufenden selektiven Acylierung der benzyllischen.

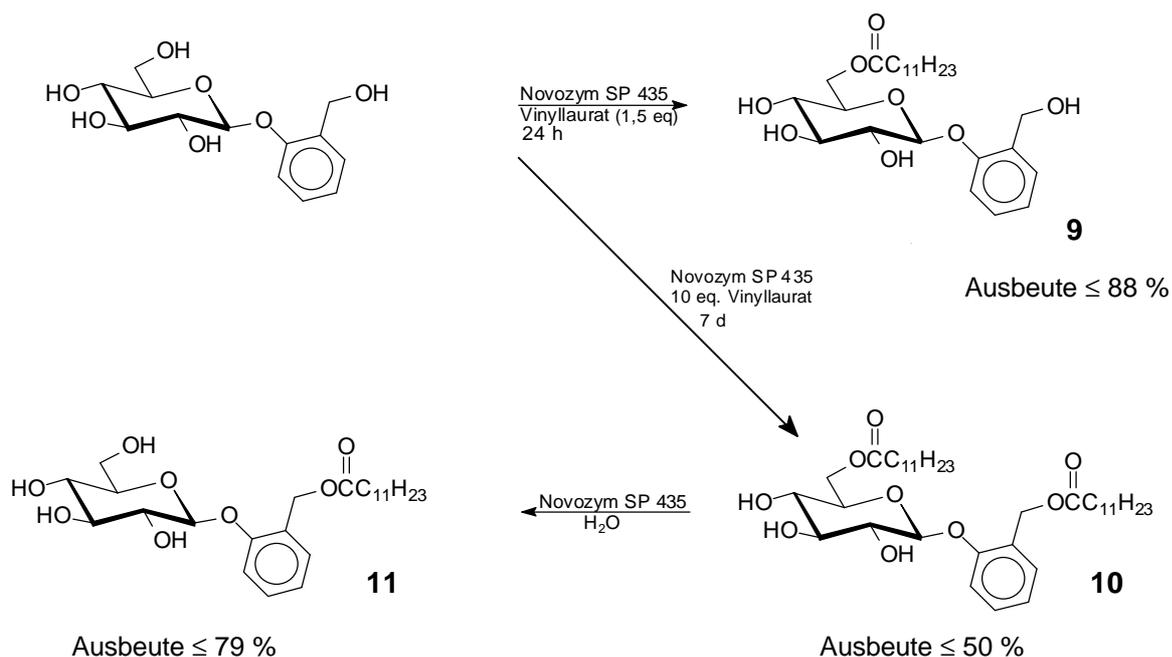


Abbildung 4-12. Enzymatische Acylierungen und Deacylierungen an Salicin

Wird das Diacylierungsprodukt anschließend mit Hilfe des gleichen Enzyms hydrolysiert, so entsteht aufgrund der Selektivität gegenüber der 6-Position der Glucoseeinheit zunächst der Ester **11**, welcher bei längerer Reaktionsdauer auch zunehmend vollständig deacyliert wird. Damit wäre ein interessantes Beispiel gezeigt, wie man mit Hilfe eines Enzyms ein Molekül an unterschiedlichen Positionen selektiv derivatisieren kann (Abbildung 4-12).

4.1.2.1.5 Acylierung von L-Ascorbinsäure

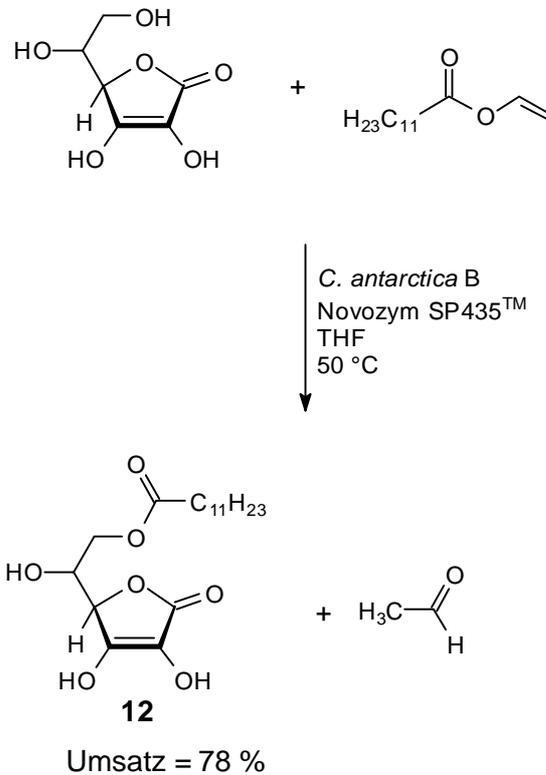


Abbildung 4-13. Enzymatische Acylierung von L-Ascorbinsäure zu 6-O-Lauroyl-L-sAscorbinsäure (12)

Die Acylierung von L-Ascorbinsäure führt ebenfalls zur selektiven Veresterung der Hydroxylgruppe in 6-Position. Aufgrund der leichten Oxidierbarkeit der Ascorbinsäure wurde bei dieser Reaktion unter Argon gearbeitet. Erhalten wurden 78 % 6-O-Lauroyl-L-ascorbinsäure (**12**). Die homologe 6-O-Palmitoyl-L-ascorbinsäure (E 304) wird in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie als Antioxidans eingesetzt [120].

4.1.2.1.6 Disaccharide

Disaccharide sind im Vergleich zu Monosacchariden wesentlich schlechter löslich in organischen Lösungsmitteln wie THF. Fast alle lassen sich daher auf die gefundene Weise durchweg weniger gut acylieren als Monosaccharide. α,α -Trehalose bildet hier allerdings überraschenderweise eine Ausnahme: Sie lässt sich in einer THF-Suspension sehr gut acylieren. Die Experimente sind im Einzelnen in der Folge beschrieben.

4.1.2.1.6.1 Maltose, Lactose

Alle Versuche Maltose oder Lactose auf die oben beschriebene Weise zu acylieren, schlugen fehl.

4.1.2.1.6.2 6'-O-Lauroyl-saccharose (13)

Es gelang auch nicht, Saccharose in einer THF-Suspension zu acylieren. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde versucht, die Saccharose durch Mahlen oder Ultraschall zu zerteilen und so besser verfügbar zu machen. Auch durch Lyophilisierung gewonnene, amorphe Saccharose oder auf Kieselgel immobilisierte Saccharose führte zu keiner Verbesserung.

Es zeigte sich jedoch, dass die Acylierungen in *N*-Methylpyrrolidon (NMP) zwar langsam, aber doch durchführbar sind [116]. So kann Saccharose bei 60 °C mit Laurinsäurevinylester nach 9 Tagen mit einem Umsatz von 51 % in 6'-O-Lauroyl-saccharose (**13**) überführt werden (Abbildung 4-14). Die Zeit-Umsatz-Kurve ist in Abbildung 4-15 gezeigt.

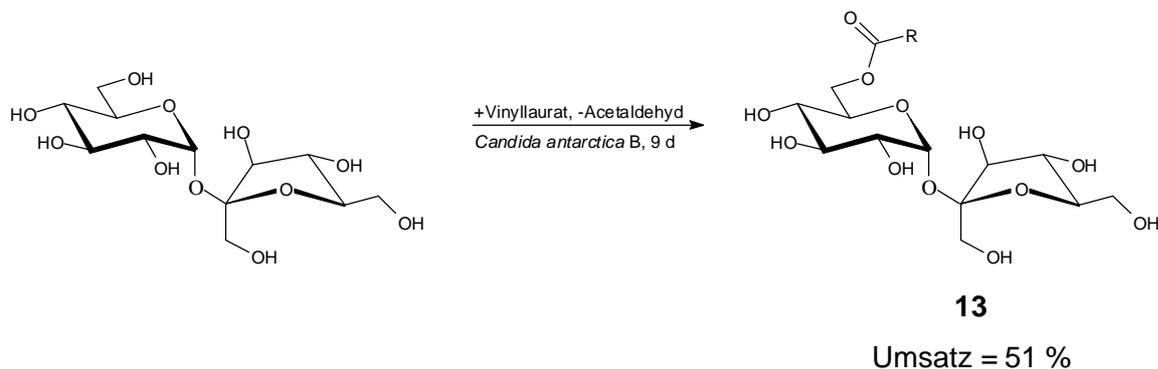


Abbildung 4-14. Enzymatische Synthese von 6'-O-Lauroylsaccharose (**13**)

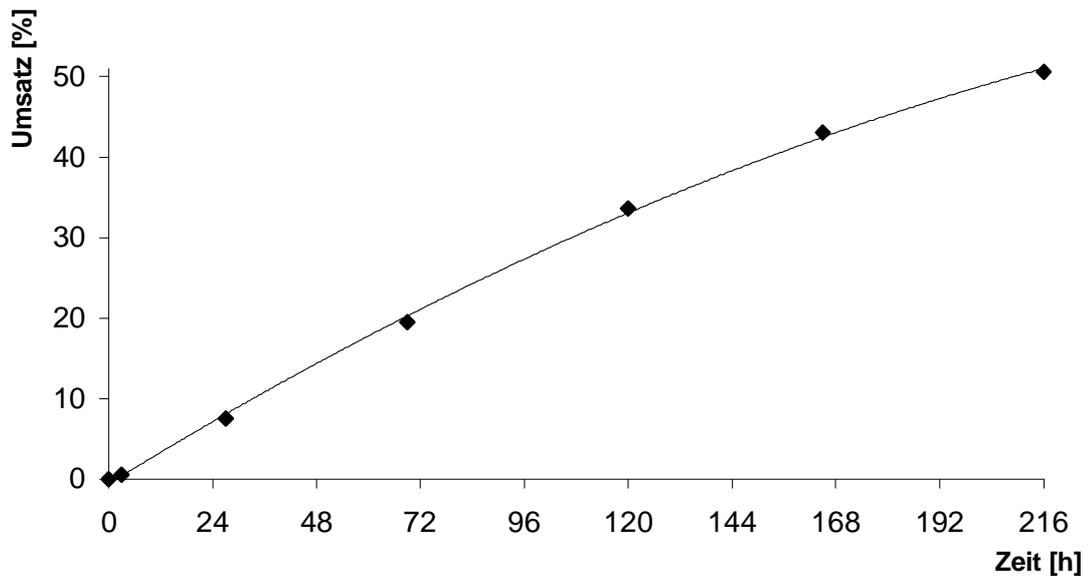


Abbildung 4-15. Zeit-Umsatzkurve der Umsetzung von Saccharose in NMP bei 60 °C. Umsatz bestimmt durch HPLC.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Herstellung einer übersättigten Lösung (siehe Kapitel 4.1.2.4) von Saccharose in geeigneten Lösungsmittelgemischen.

4.1.2.1.6.3 Acylierung von α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid

4.1.2.1.6.3.1 Reaktion

Die Umsetzung von α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid (DFA III) mit 2,2 eq. Laurinsäurevinylester unter den vorgenannten Bedingungen liefert nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden eine einheitliche Substanz.

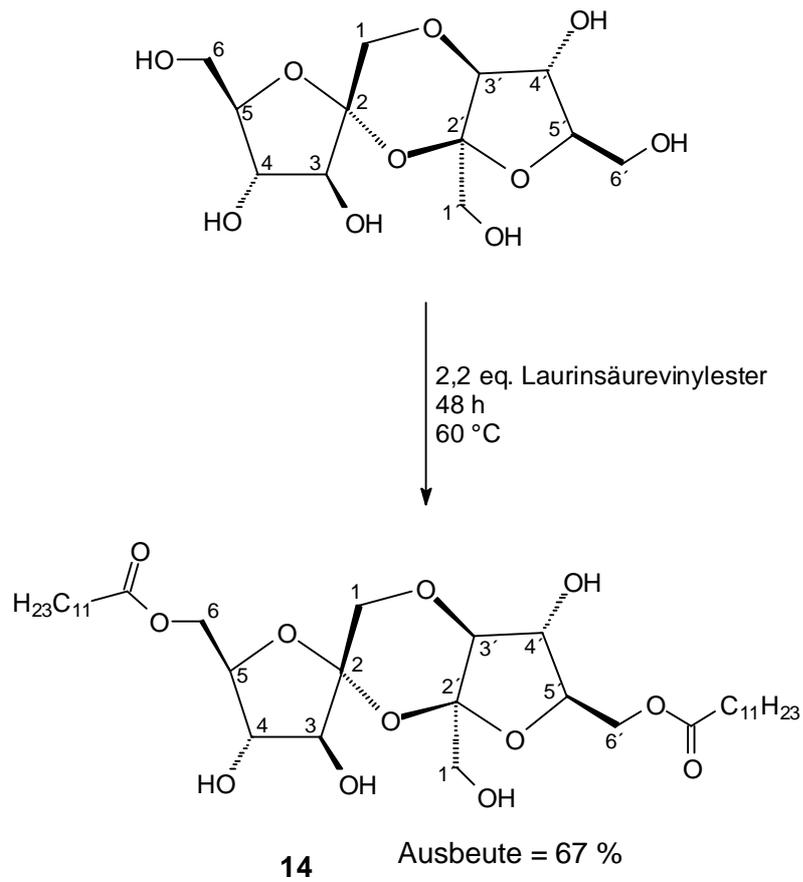


Abbildung 4-16. Enzymatische Synthese von 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α -D-fructofuranose- β -D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid (**14**)

4.1.2.1.6.3.2 Charakterisierung von 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid (**14**)

Tabelle 4-5. NMR-spektroskopische Daten von 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid (14**)**

chemische Verschiebung [ppm]			
Position	$\delta(\text{C-H})$	Position	$\delta(\text{C})$
1	3,42 + 3,80 (diastereotope Protonen)	1	59,0
1'	3,29 + 3,36 (diastereotope Protonen)	1'	64,5
3	4,22	3	79,3
3'	3,82	3'	79,3
5, 5'	3,54 - 3,63	4	73,4
4	4,39	4'	82,2
4'	3,85	5	78,9
		5'	76,6
6	4,24 + 4,07 (diastereotope Protonen)	6	63,4
6'	3,91 + 4,20 (diastereotope Protonen)	6'	63,8

Durch Integration der ^1H -Kernresonanzsignale und die Elementaranalyse wurde ein Acylierungsgrad zwischen 2 und 3 ermittelt. Da die Verbindung im HPLC einheitlich war, musste der Acylierungsgrad entweder 2 oder 3 sein. Aufgrund der Anwesenheit von drei primären Hydroxylgruppen im Edukt und der bekannten Präferenz von *Candida antarctica*-Lipase B für primäre OH-Gruppen – insbesondere bei der Acylierung von Zuckern – konnte es sich dabei also um 6,6'-, 1',6'-, 1',6-Dilauroyl- oder 1',6,6'-Tri-lauroyl- α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid **14** handeln. Zur Identifizierung des Produktes wurde nun das ^{13}C -Kernresonanzspektrum herangezogen. Dabei wurde zunächst der Acylierungsgrad bestimmt und anschließend das Acylierungsmuster ermittelt.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte eindeutig nur zwei Carbonylgruppen bei 172,93 und 172,97 ppm. Es handelt sich also um das Diacylierungsprodukt.

Aus dem ^{13}C -Signal des 2'-Kohlenstoffs kann man entnehmen, ob die 1'-Position acyliert wurde. Aus Inkrementrechnungen wird deutlich, dass die Acylierung einer primären Hydroxylgruppe zu einer Hochfeldverschiebung der β -Position um 3 ppm führt.

Da das Signal des anomeren 2'-Kohlenstoffs im Produktmolekül (101,7 ppm) mit dem des 2'-Kohlenstoffs im Edukt (101,6 ppm) ziemlich exakt übereinstimmt, ist gesichert, dass die – sterisch zudem etwas anspruchsvollere (vgl. Abbildung 4-17) – 1'-Position nicht acyliert wurde.

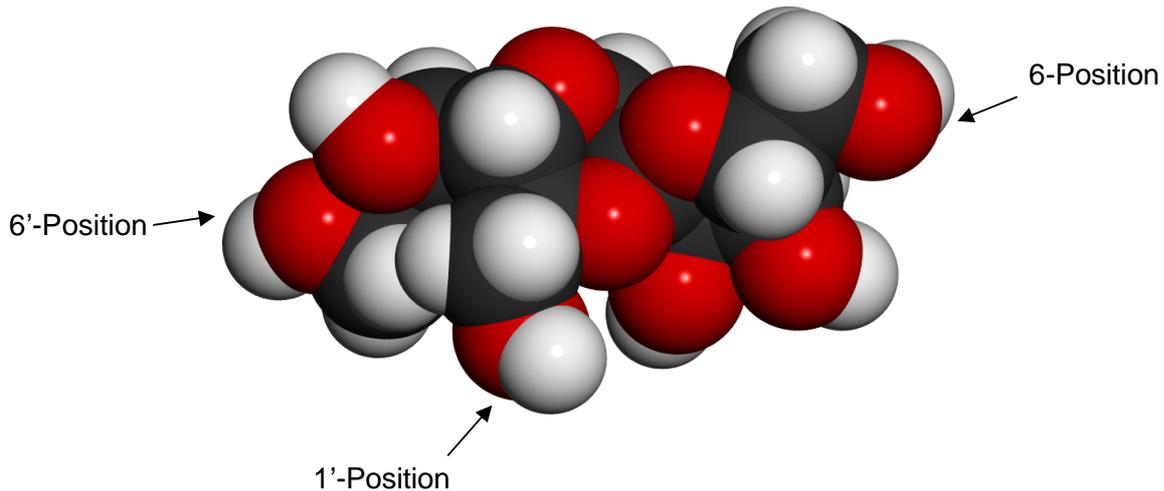


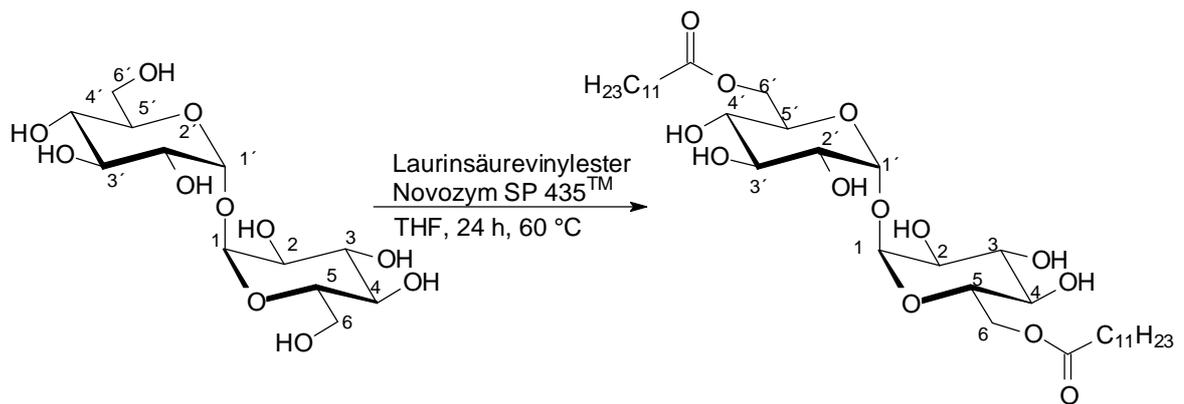
Abbildung 4-17. Kalottenmodell von α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid

Der Vergleich der Signale zwischen 70 und 90 ppm (3, 3', 4, 4', 5 und 5') zeigt, dass auch diese Positionen nicht acyliert wurden. Es handelt sich bei dem erhaltenen Produkt demnach um 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid (**14**) (Abbildung 4-16).

4.1.2.1.6.4 Acylierung von α - α' -Trehalose

4.1.2.1.6.4.1 Enzymatische Acylierung mit Laurinsäurevinylester

Die Umsetzung von α - α' -Trehalose (α -D-Glucopyranosyl- α' -D-glucopyranosid) mit 2,2 eq. Laurinsäurevinylester unter den gleichen Bedingungen liefert nach 24 Stunden Reaktionszeit ebenfalls eine einheitliche Substanz (HPLC, DC, etc.) gemäß Abbildung 4-18.



17

72 %

Abbildung 4-18. Enzymatische Synthese von 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α - α' -trehalose (17)

4.1.2.1.6.4.2 Charakterisierung von 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α - α' -trehalose (17)

Durch Integration der ^1H -NMR-Signale lässt sich bestimmen, dass das Produkt zwei Laurinsäurereste trägt. Im für Zucker relevanten Bereich des ^{13}C -NMR-Spektrums (50 - 110 ppm) findet man nur sechs Signale. Es ist also ein Molekül mit C_2 -Symmetrie* entstanden. Das bedeutet, dass man von einer Diacylierung ausgehen kann.

* Das Eduktmolekül besitzt C_2 -Geometrie. Somit sind sämtliche chemisch identischen Hydroxylgruppen homotop und das Molekül zeigt im ^{13}C -NMR-Spektrum nur sechs Signale.

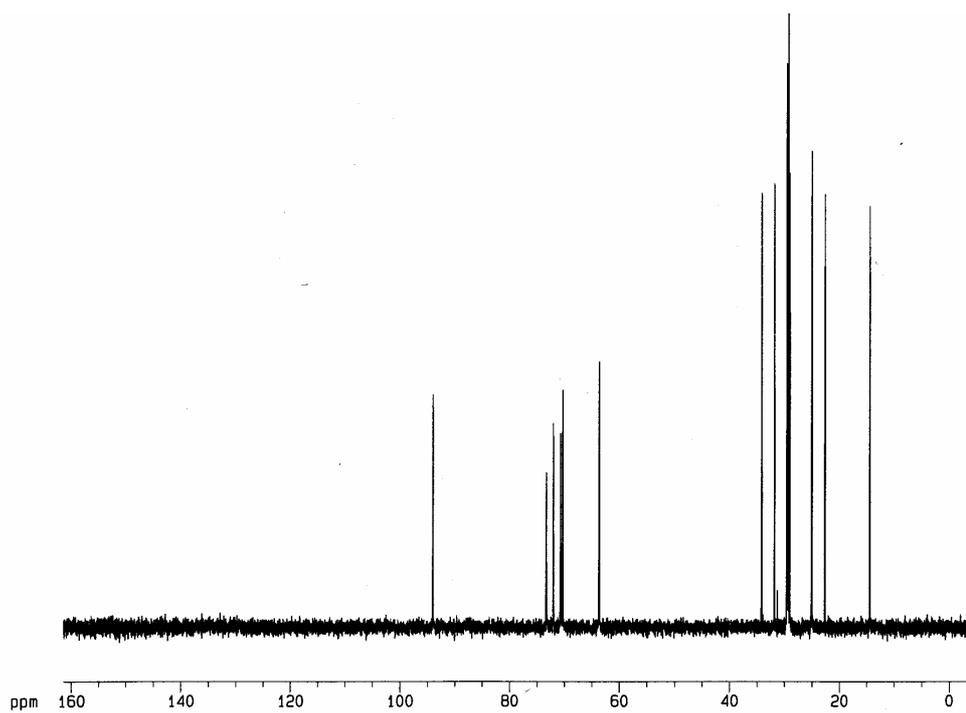


Abbildung 4-19. ^{13}C -NMR-Spektrum von 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α,α' -trehalose (17)

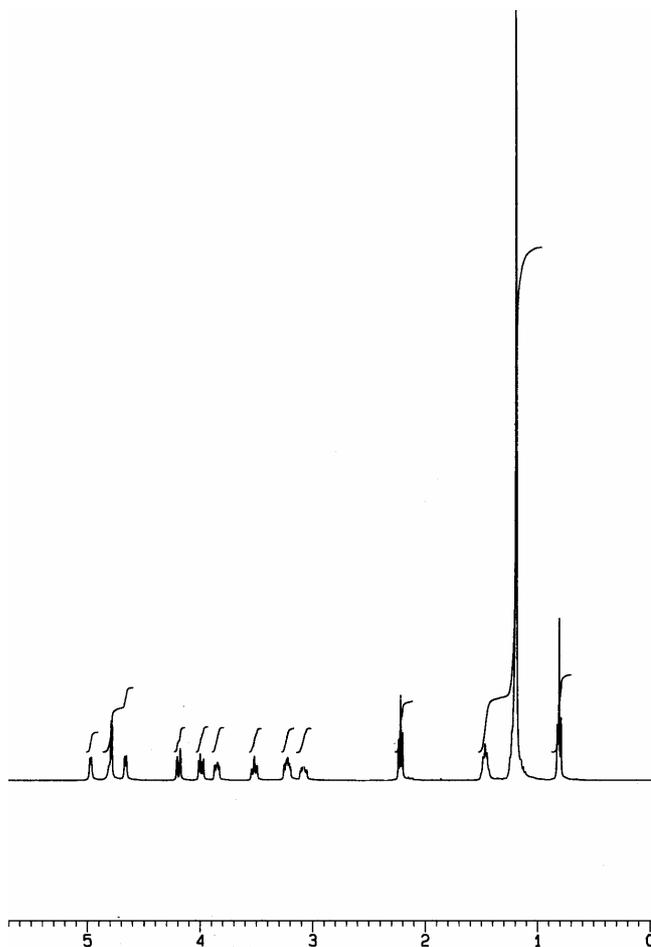


Abbildung 4-20. ^1H -NMR-Spektrum von 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α,α' -trehalose (17)

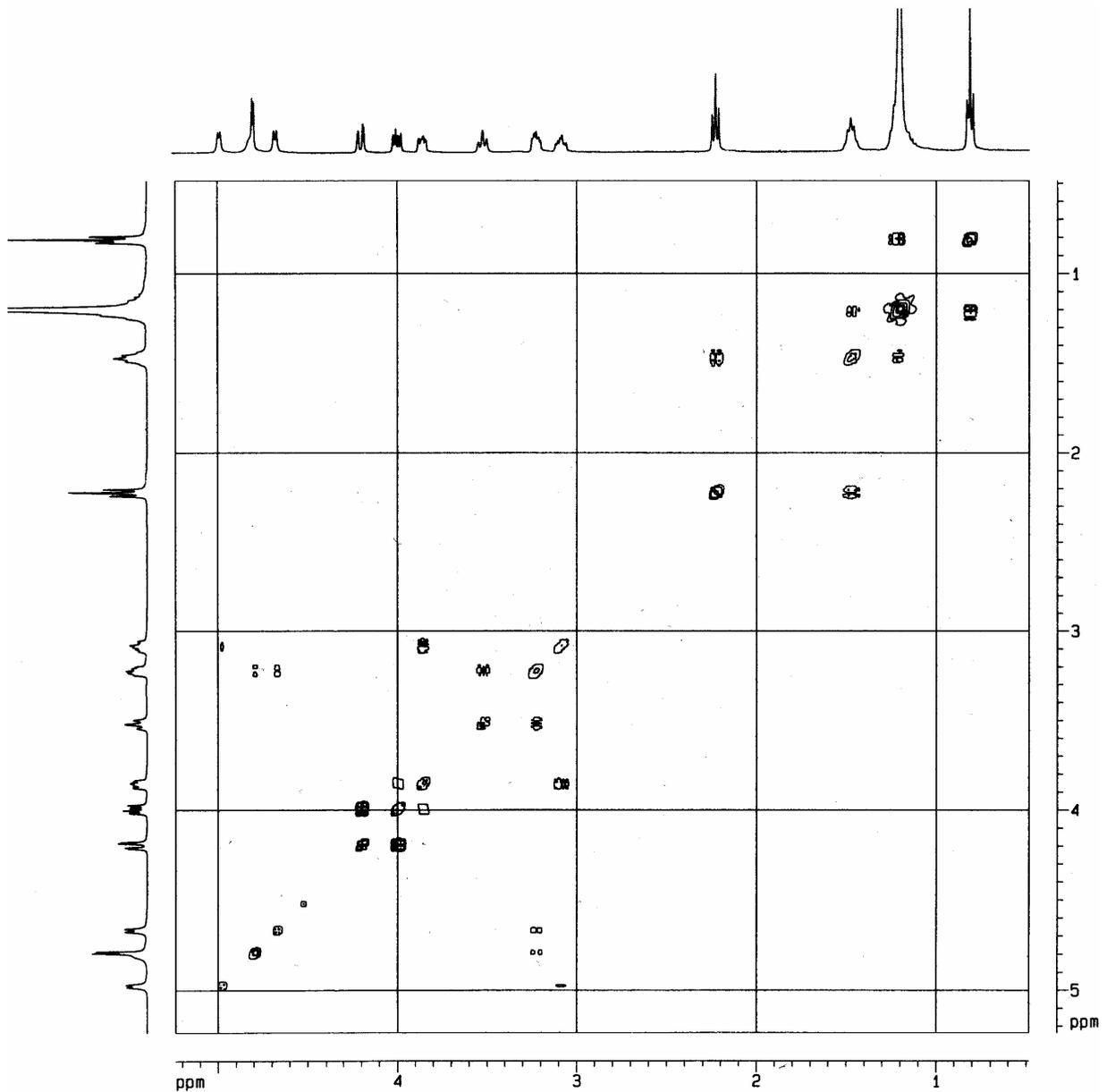


Abbildung 4-21. ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-korreliertes NMR-Spektrum ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY) von 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α,α' -trehalose (17)

Die Acylierung der 6- und 6'-Position kann über die Betrachtung der charakteristischen Verschiebung der Kohlenstoffe in 5- und 6-Position belegt werden (Tabelle 4-6).

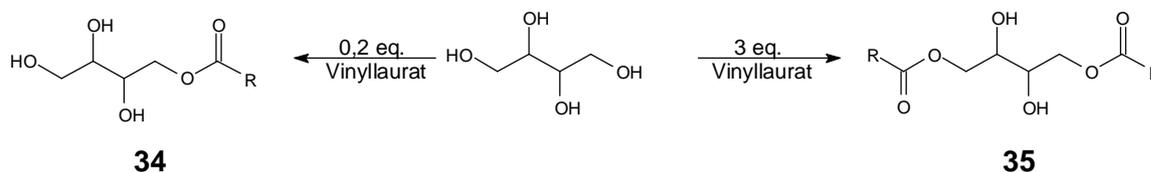
Tabelle 4-6. NMR-Daten von 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α - α' -trehalose (17)

Position	chemische Verschiebung [ppm]		
	$\delta(\text{C-H})$	$\delta(\text{O-H})$	$\delta(\text{C})$
1 + 1'	4,79	-	94,0
2 + 2'	3,22	4,67	72,1
3 + 3'	3,52	4,79	73,4
4 + 4'	3,08	4,98	70,8
5 + 5'	3,85	-	70,3
6 + 6'	3,99 + 4,20	-	63,7

Die Tieffeldverschiebung des Signals der 6- bzw. 6'-Position (63,7 ppm) des Diesters im Vergleich zur chemischen Verschiebung in underivatisierter α , α' -Trehalose (61,1 ppm) bei gleichzeitiger Hochfeldverschiebung des Signals der 5- bzw. 5'-Position belegt eindeutig die Acylierung der 6-Positionen.

4.1.2.1.7 Zuckeralkohole – Acylierung von Erythritol

Bei den zu erwartenden Zielmolekülen handelt es sich primär um 1(4)-Monolauroyl-erythritol (**35**) und 1,4-Dilauroyl-erythritol (**34**).

**Abbildung 4-22. Enzymatische Acylierung von Erythritol: Zu erwartende Zielmoleküle**

Da die ersten Versuche zur Acylierung von Erythritol unter den oben beschriebenen Bedingungen (vgl. AAV 1) nur sehr geringen Umsatz zeigten und als einziges Reaktionsprodukt 1,4-Dilauroyl-erythritol (**34**) nachgewiesen werden konnte, war es notwendig die Reaktionsparameter dahingehend zu optimieren, dass vernünftige Produktausbeuten erhalten werden.

4.1.2.1.7.1 1,4-Dilauroyl-erythritol (**34**)

Die Diacylierung von Erythritol gelang schließlich durch vorherige Immobilisation des Substrates auf Kieselgel. Dieses Verfahren ist bereits im eigenen Arbeitskreis zur enzymatischen Acylierung von Glycerol und Ethylenglykol erfolgreich erprobt worden [67]. Durch die Adsorption auf diesem Trägermaterial wird die Oberfläche des Erythritols so stark vergrößert, dass es sich suspendiert im Lösungsmittel so verhält, als wäre es in diesem homogen gelöst. Anstelle von THF wurde Dimethoxyethan verwendet.

Abbildung 4-24 und Abbildung 4-25 zeigen die Kernresonanzspektren des so erhaltenen 1,4-Dilauroylerythritols (**34**).

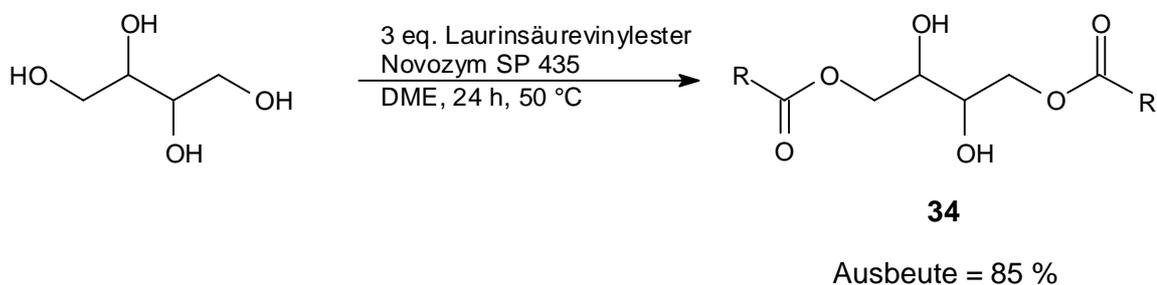


Abbildung 4-23. Enzymatische Synthese von 1,4-Dilauroylerythritol (**34**)

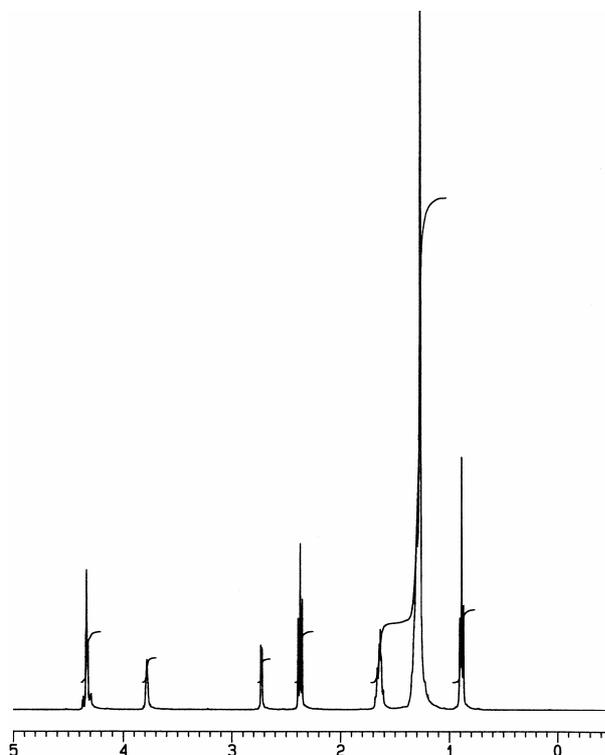
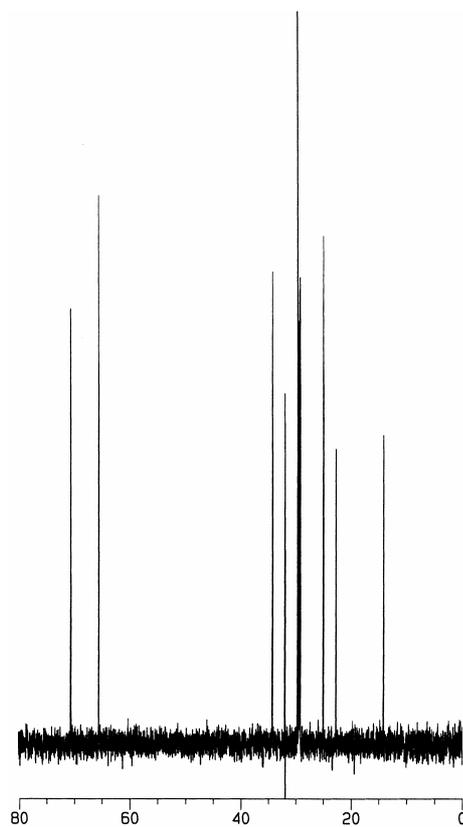


Abbildung 4-24. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 1,4-Dilauroylerythritol (**34**)

Abbildung 4-25. ^{13}C -NMR-Spektrum von 1,4-Dilauroylerythritol (34)Tabelle 4-7. NMR-Daten für 1,4-Dilauroyl-*meso*-erythritol (34)

Position	chemische Verschiebung [ppm]		
	$\delta(\text{C-H})$	$\delta(\text{O-H})$	$\delta(\text{C})$
1 + 4	4,33	-	65,5
2 + 3	3,78	2,73	70,6
Carbonyl-C	-	-	173,2
Acyl-Kette	1,27	-	65,5
β -C	1,63	-	25,1
α -C	2,37	-	34,1

4.1.2.1.7.2 1(4)-Monolauroylerythritol (35)

Die Darstellung von monoacyliertem Erythritol gestaltete sich deutlich schwieriger, da monoacyliertes Erythritol für das Enzym ein besseres Substrat darstellt als Erythritol selbst. Deshalb wird hauptsächlich 1,4-Dilauroylerythritol (**34**) gebildet. Dieses Problem wurde dadurch gelöst, dass ein fünffacher Überschuss an Erythritol eingesetzt wurde (vgl. Synthesevorschrift im exp. Teil). Dadurch wurde die Bildung von 1,4-Dilauroylerythritol (**16**) auf ca. 16 % erniedrigt.

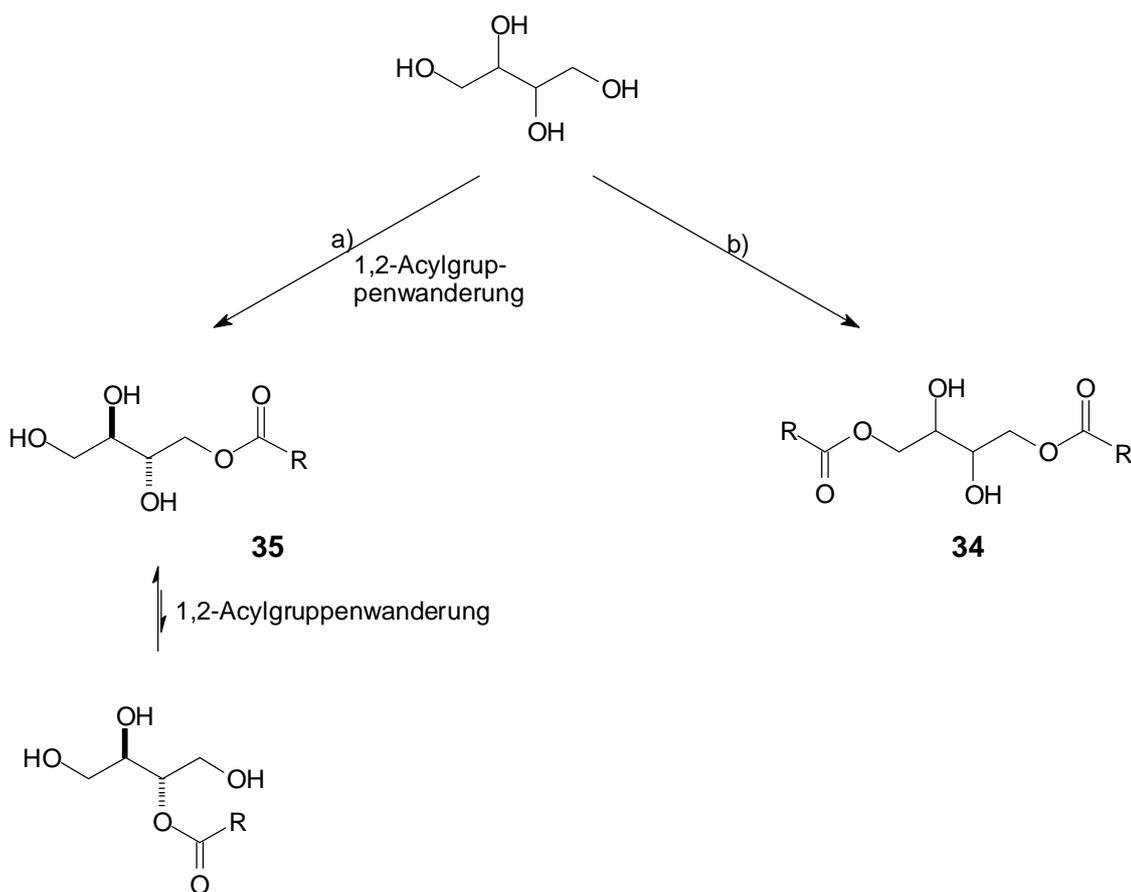


Abbildung 4-26. Umsetzungen von Erythritol a) 0,2 eq. Vinylaurat, 65 °C, DME, 24 h, Novozym SP 435TM; b) 3 eq. Vinylaurat, 65 °C, DME, 24 h, Novozym SP 435TM

Die Reinigung des 1(4)-Monolauroylerythritols (**35**) gestaltet sich schwierig: Die Trennung *via* Säulenchromatografie wird dadurch erschwert, dass außer dem Erythritol keine Komponente des Substanzgemisches bei der DC-Trennung anfärbbar/entwickelbar ist und wahrscheinlich dadurch, dass unter diesen Bedingungen stets 1,2-Acylgruppenwanderung zum 2(3)-Lauroylerythritol stattfindet. Derartige intramolekulare Acyltransfer-Reaktionen sind von den Monoglyceriden und acylierten Monosacchariden bekannt. Der Mechanismus verläuft wohl über eine begünstigte 5-gliedrige, cyclische Zwischenstufe (Abbildung 4-29). Aus diesem Grunde ist das Produkt stets mit geringen Mengen des Positionsisomers verunreinigt

Eine Lösung des Problems könnte sich dadurch ergeben, dass man geeignete Bedingungen findet, die die Kristallisation des gewünschten Monoacylderivates erzielen.

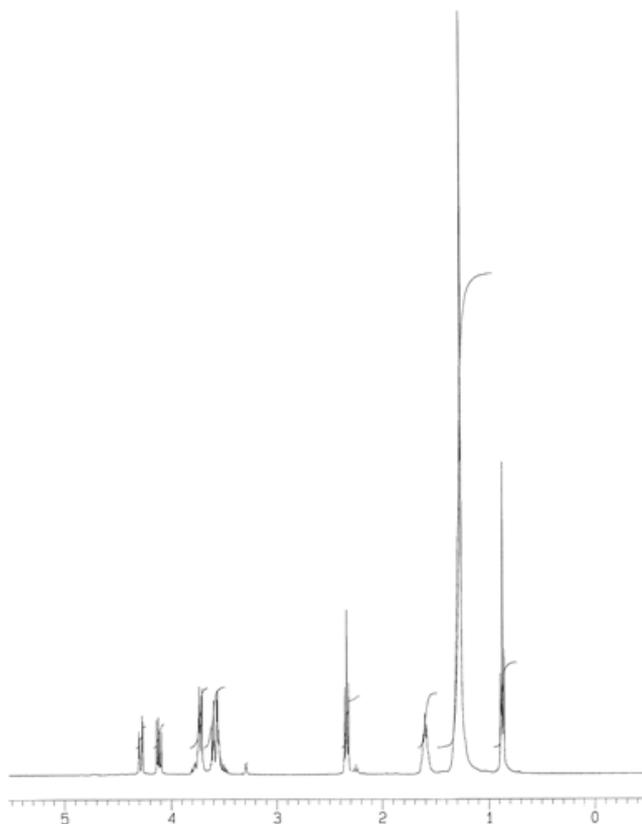


Abbildung 4-27. ^1H -NMR-Spektrum von 1(4)-Monolauroylerythritol

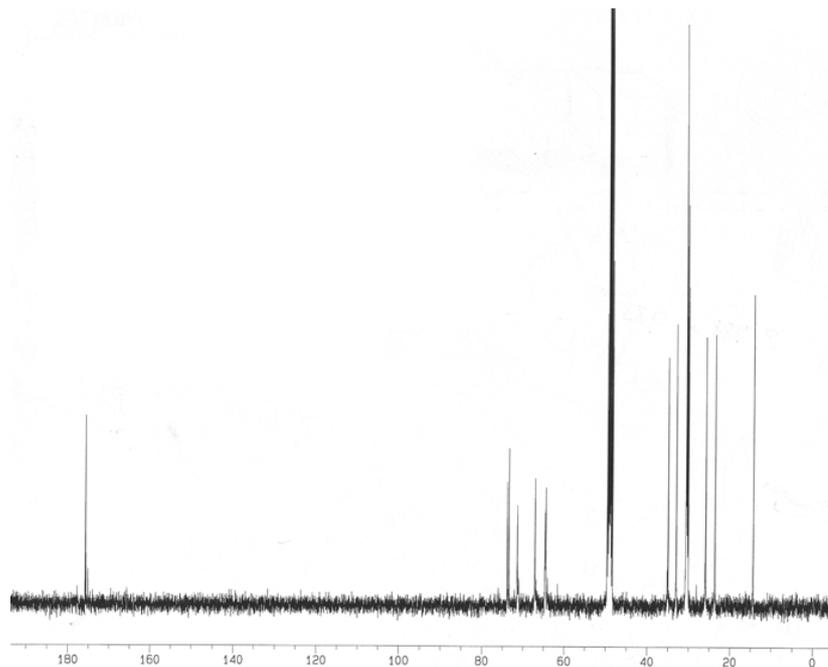


Abbildung 4-28. ^{13}C -NMR-Spektrum von 1(4)-Monolaurylethritol

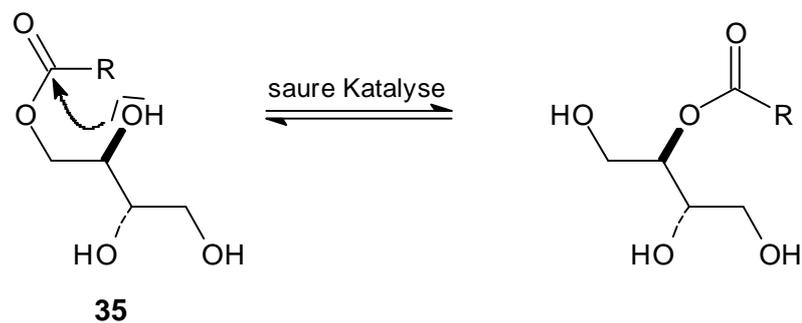


Abbildung 4-29. Spekulativer Mechanismus der Isomerisierung von 35 über eine 5-gliedrige Zwischenstufe

4.1.2.1.8 Aminosucker

4.1.2.1.8.1 Acylierung von D-Glucosaminhydrochlorid

Beim Versuch zur Acylierung von D-Glucosaminhydrochlorid (vgl. Abbildung 4-30) wurde kein Umsatz beobachtet. Grund dafür war wahrscheinlich die Salzstruktur des Eduktes und die damit verbundene geringe Löslichkeit. Aus diesem Grunde wurde das Experiment mit freiem D-Glucosamin wiederholt.

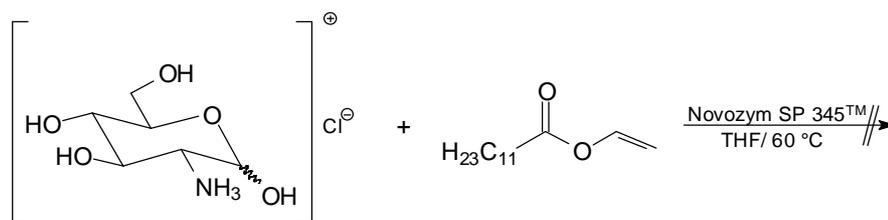


Abbildung 4-30. Versuch zur Acylierung von D-Glucosaminhydrochlorid

4.1.2.1.8.2 Acylierung von D-Glucosamin

D-Glucosamin zeigte unter diesen Bedingungen ebenfalls keinen Umsatz (Abbildung 4-31). Über eine Ursache für dieses Verhalten kann nur spekuliert werden. Zum Vergleich sollte versucht werden die Acylierung von *N*-Acetyl-D-glucosamin zu erreichen.

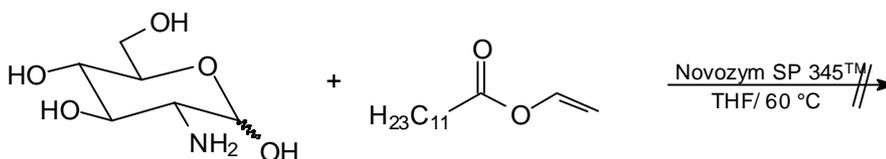


Abbildung 4-31. Versuch zur Acylierung von D-Glucosamin

4.1.2.1.8.3 Acylierung von *N*-Acetyl-D-glucosamin

Auch *N*-Acetyl-D-glucosamin ließ sich unter den genannten Bedingungen nicht umsetzen (Abbildung 4-30). *N*-Acetyl-D-glucosamin ist ebenfalls nur sehr wenig löslich in THF – vermutlich der Hauptgrund für dieses Resultat

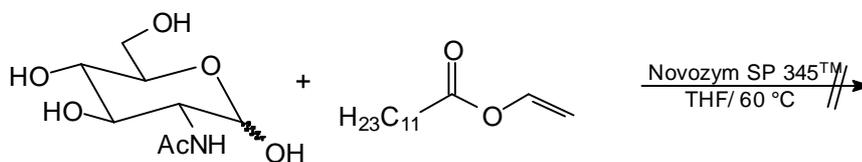


Abbildung 4-32. Versuch zur Acylierung von *N*-Acetyl-D-glucosamin

4.1.2.1.8.4 Acylierung von *N*-(*t*-Butyloxycarbonyl)-D-glucosamin (**36**)

Als Alternative wurde die Aminogruppe daher mit einer BOC-Schutzgruppe versehen. Dadurch wird auch ein lipophiler Rest eingeführt, der die Löslichkeit verbessert. In der Tat lässt sich dieses Material sehr leicht unter den üblichen Bedingungen (vgl. AAV 1) acylieren. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden wurde so 6-*O*-Lauroyl-*N*-(*t*-butyloxycarbonyl)-D-glucosamin (**37**) mit 87 %iger Ausbeute erhalten.

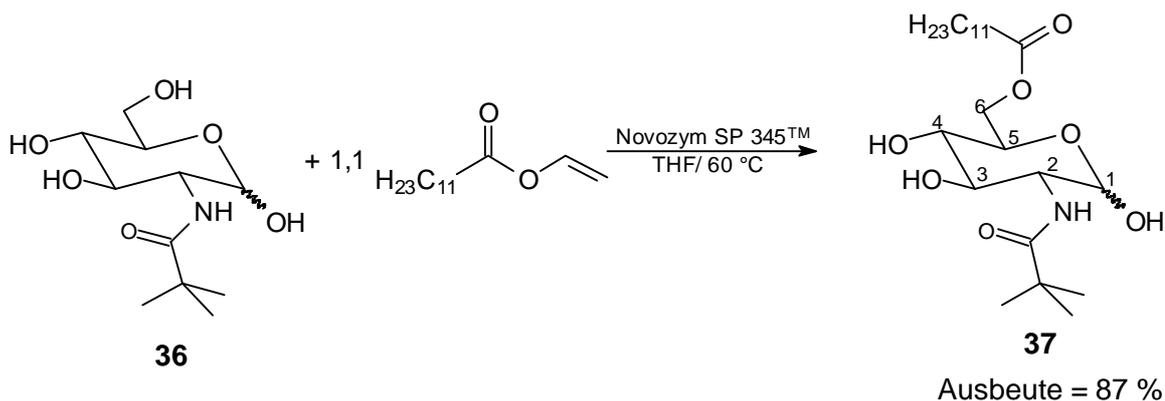


Abbildung 4-33. Enzymatische Synthese von 6-*O*-Lauroyl-*N*-(*tert.*-butyloxycarbonyl)-D-glucosamin (**37**)

Tabelle 4-8. NMR-Daten von 6-*O*-Lauroyl-*N*-(*t*-butyloxycarbonyl)-D-glucosamin (**37**)

Position	chemische Verschiebung		
	$\delta(\text{C-H})$	$\delta(\text{O-H})$ bzw. $\delta(\text{N-H})$	$\delta(\text{C})$
1	4,89	6,41	91,6
2	3,21	6,12 (Amidproton)	56,8
3	3,40	4,67	71,4
4	3,01-3,11	5,06	71,9
5	3,64	-	73,0
6	3,97 + 4,25 (diastereotope Protonen)	-	62,5

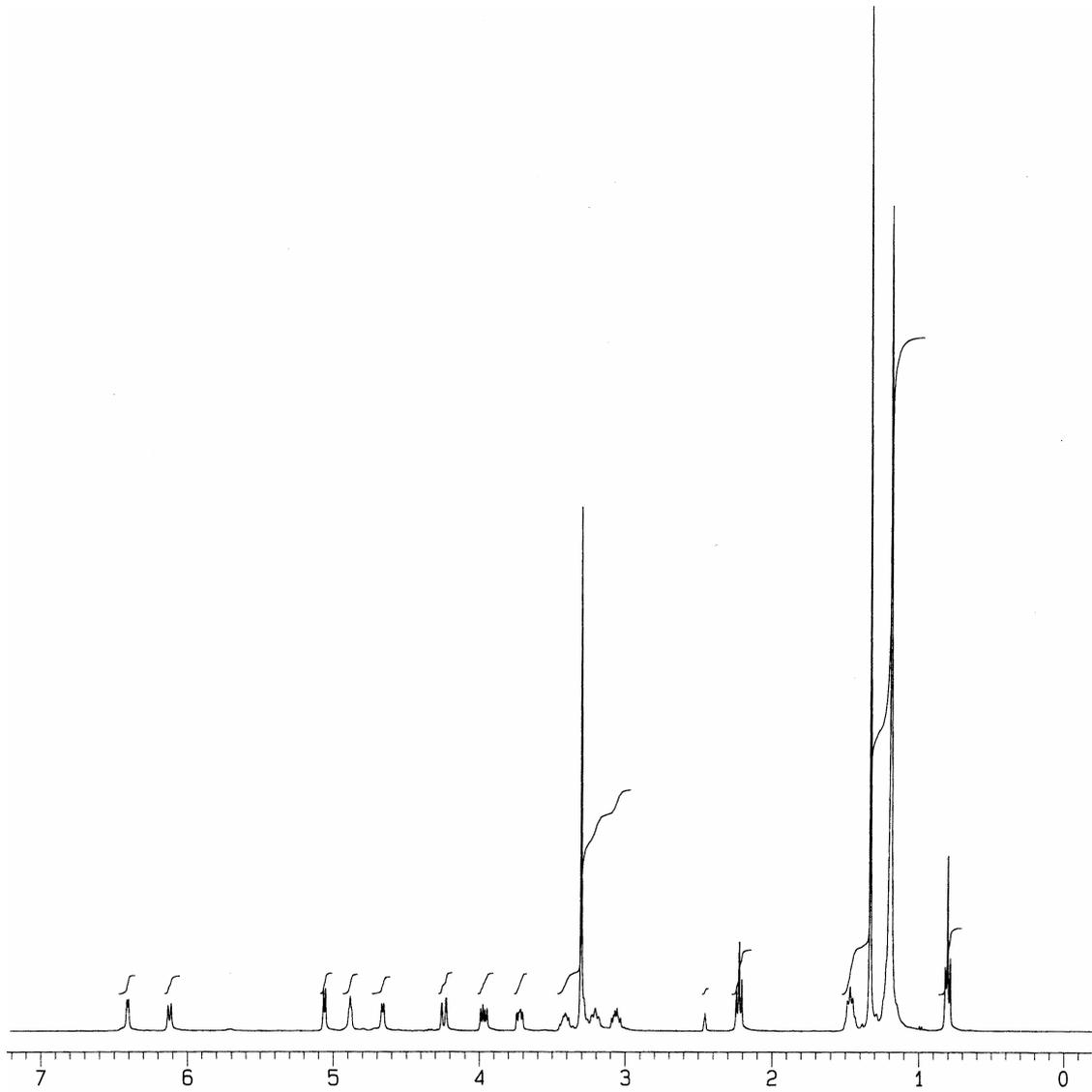


Abbildung 4-34. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 6-O-Lauroyl-N-(*t*-butyloxycarbonyl)-D-glucosamin (37)

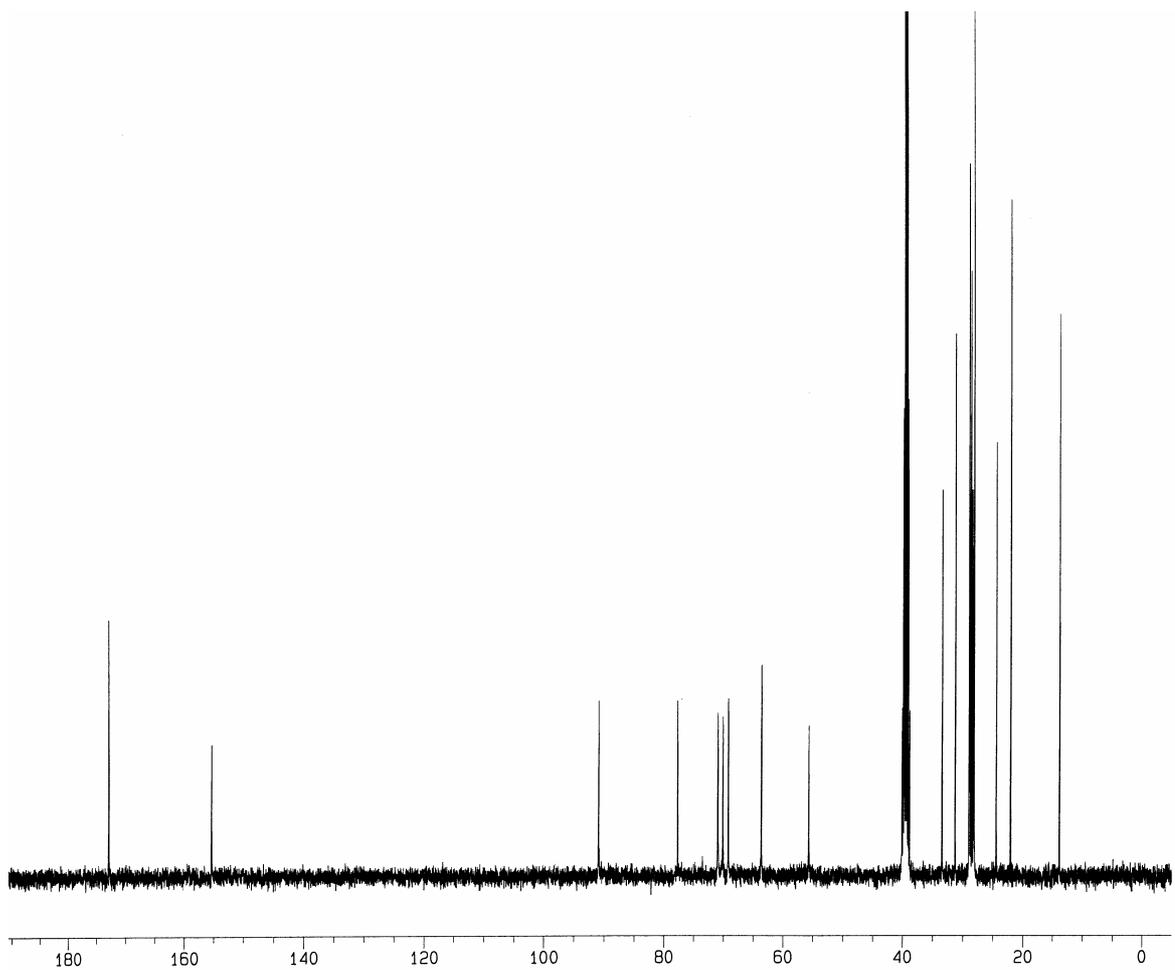


Abbildung 4-35. ^{13}C -NMR-Spektrum von 6-O-Lauroyl-*N*-(*t*-butyloxycarbonyl)-D-glucosamin (37)

4.1.2.1.8.5 Acylierung von 6-Desoxi-6-amino-D-glucose

Diese aminoanaloge Glucose lässt sich unter den oben genannten Bedingungen noch rascher umsetzen, als die D-Glucose, was sich durch die höhere Nucleophilie des Aminostickstoffs zwanglos erklären lässt. *N*-Lauroyl-1-desoxi-1-amino-D-glucose **38** wurde nach 18 h in 97 %iger Ausbeute erhalten.

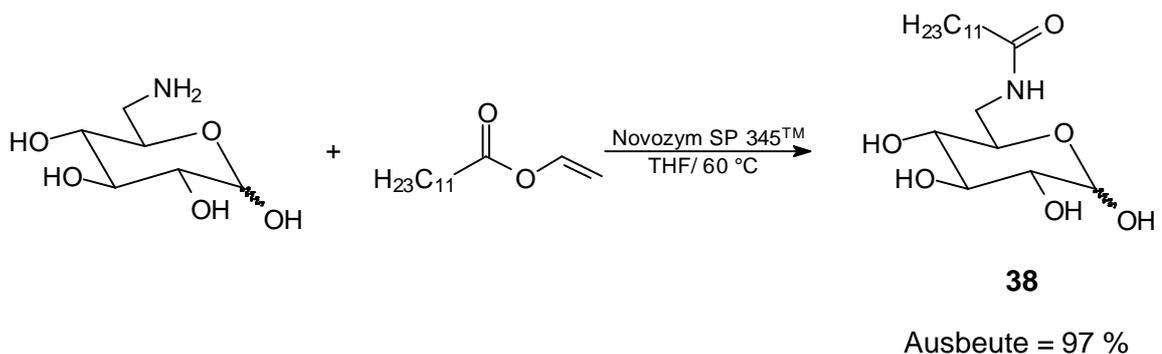


Abbildung 4-36. Enzymatische Synthese von *N*-Lauroyl-6-desoxi-6-amino-D-glucose (38)

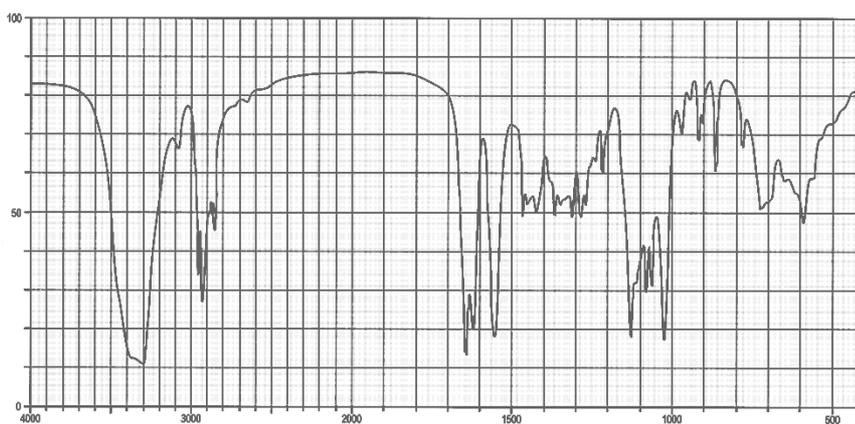


Abbildung 4-37. IR-Spektrum (KBr-Pressling) *N*-Lauroyl-6-desoxy-6-amino-D-glucose (38)

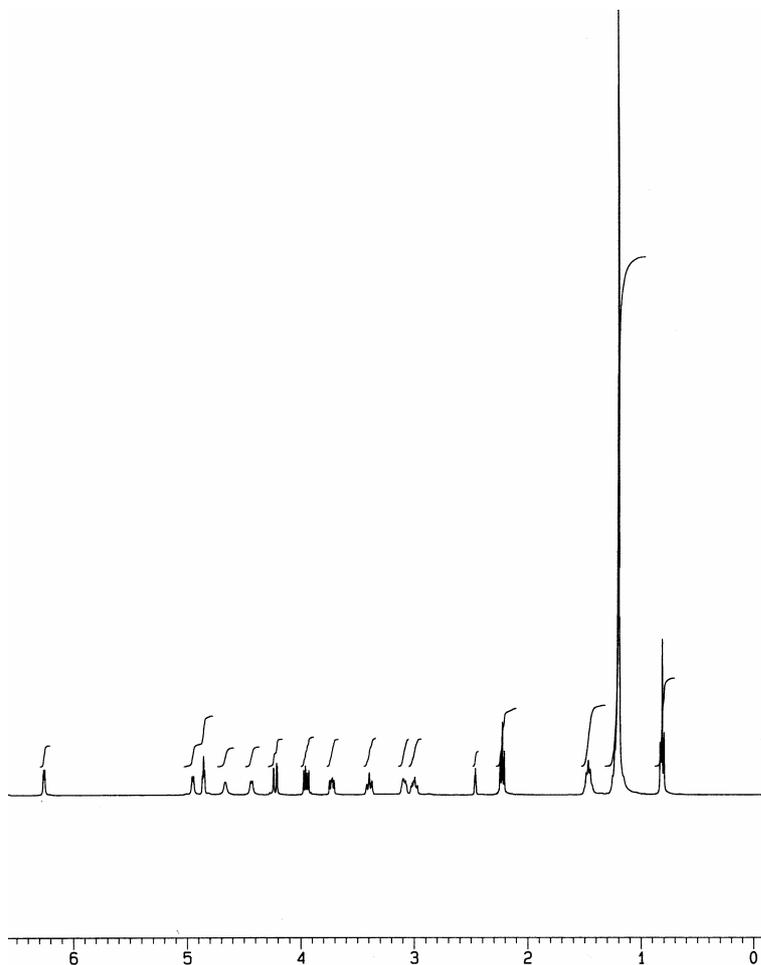


Abbildung 4-38. ¹H-NMR-Spektrum von *N*-Lauroyl-6-desoxy-6-amino-D-glucose (38)

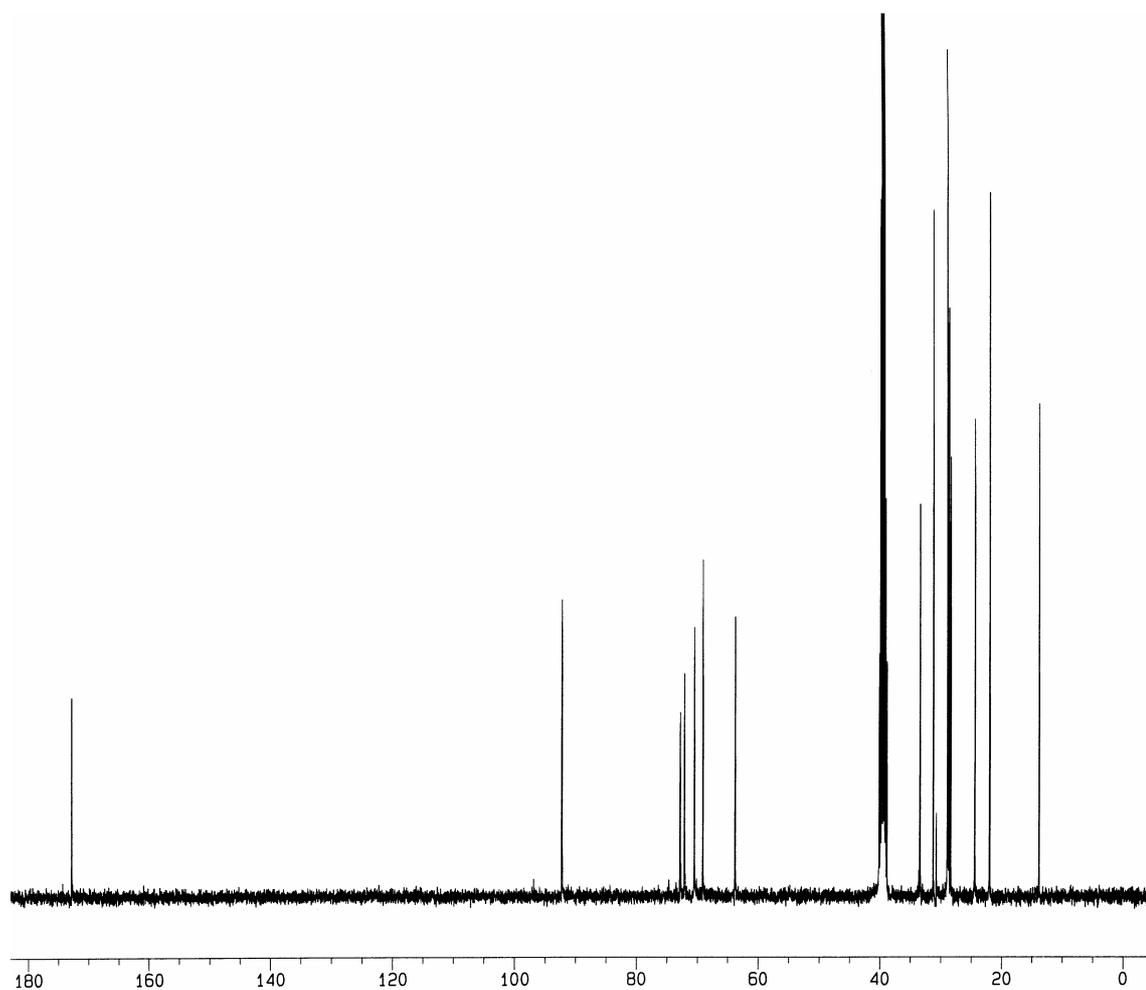


Abbildung 4-39. ^{13}C -NMR-Spektrum von *N*-Lauroyl-6-desoxy-6-amino-D-glucose (38)

Tabelle 4-9. NMR-Daten von *N*-Lauroyl-6-desoxy-6-amino-D-glucose (38)

Position	chemische Verschiebung [ppm]		
	$\delta(\text{C-H})$	$\delta(\text{O-H})$	$\delta(\text{C})$
1	4,85	6,26	92,2
2	3,10	4,45	72,2
3	3,40	4,69	72,9
4	3,00	4,96	70,5
5	3,72	-	69,1
6	3,95 + 4,22 (diastereotope Protonen)	-	63,8

4.1.2.2 Reaktionen in *N*-Methylpyrrolidon

N-Methylpyrrolidon (NMP) ist ein gutes Lösungsmittel für Zucker (Glucose: 210 g/l). Daher – und weil NMP als lebensmitteltaugliches Lösungsmittel gilt – sollte versucht werden die Umesterungen in diesem Lösungsmittel durchzuführen.

Dazu wurde eine Lösung von D-Glucose in NMP (10 % (m/v)) mit 1,1 eq. Laurinsäurevinylester in Gegenwart von Novozym SP 435TM 50 Stunden bei 50 °C gerührt. Es zeigte sich, dass die Acylierung nur sehr langsam läuft und nach 24 Stunden nur 15 % Umsatz erhalten werden (Abbildung 4-41).

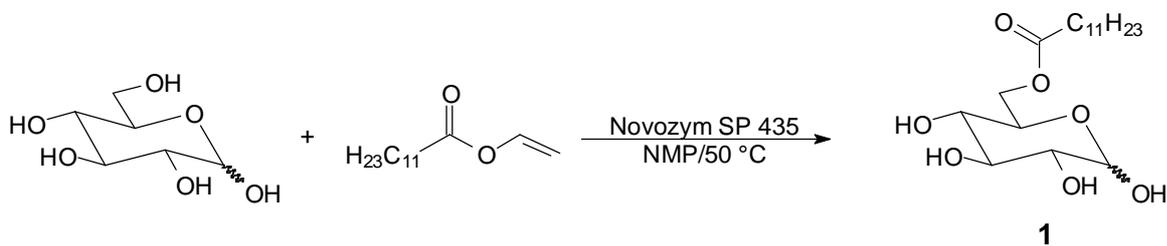


Abbildung 4-40. Acylierung von D-Glucose in NMP

Wie schon früher bestimmt [116], ist NMP als Lösungsmittel für lipasekatalysierte Reaktionen nur wenig geeignet (vgl. Abbildung 4-41). Auch alle weiteren, getesteten Lipasen zeigten in *N*-Methylpyrrolidon nur minimale Aktivität hinsichtlich der Veresterung von Zuckern.

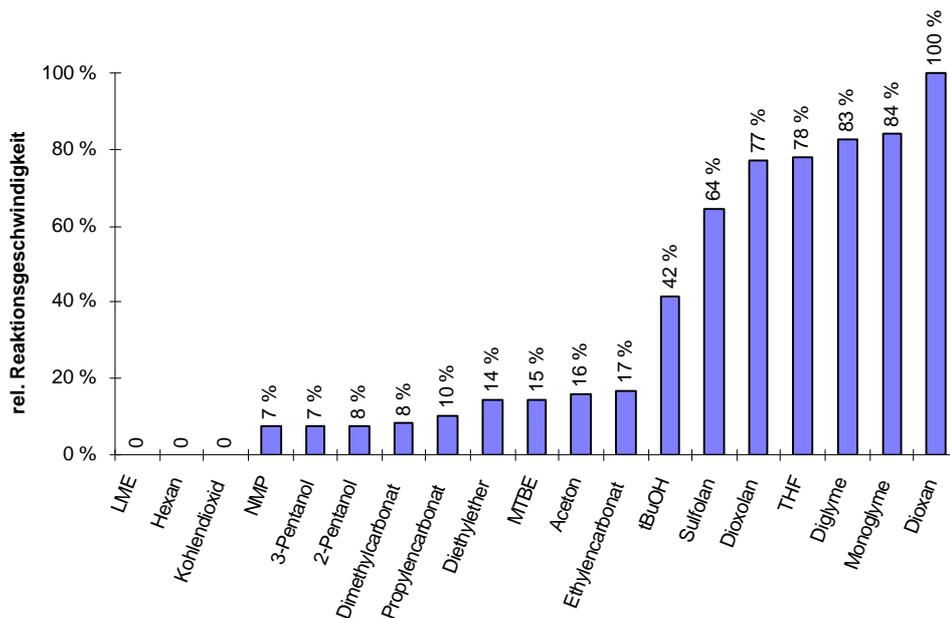


Abbildung 4-41. Lösungsmittelabhängigkeit der lipasekatalysierten Umesterung [116]

4.1.2.3 *Reaktion in Mischungen aus N-Methylpyrrolidon und Tetrahydrofuran*

Aus obigen Studien (3.1.6 oben und 4.1.2.2) kann man ableiten, dass sich Mischungen aus *N*-Methylpyrrolidon (Erhöhung der Löslichkeit) und Tetrahydrofuran (hohe Enzymaktivität) für die Veresterung von Zuckern eignen sollten. Dies ließ sich in der Tat eindeutig belegen, wobei sich ein Verhältnis von 3:2 (THF/NMP) als optimal erwies (Tabelle 4-10; Abbildung 4-42, Bestimmung durch zeitl. Verfolgung der Produktbildung via HPLC unter Zugabe von Naphtalin als internem Standard).

Tabelle 4-10. Relative Reaktionsgeschwindigkeiten in THF/NMP-Gemischen

V(THF) : V(NMP)	rel. Reaktionsgeschwindigkeit
0:5	7,0 %
1:4	35,7 %
2:3	82,8 %
3:2	100,0 %
4:1	84,4 %
5:0	68,4 %

rel. Reaktionsgeschwindigkeit

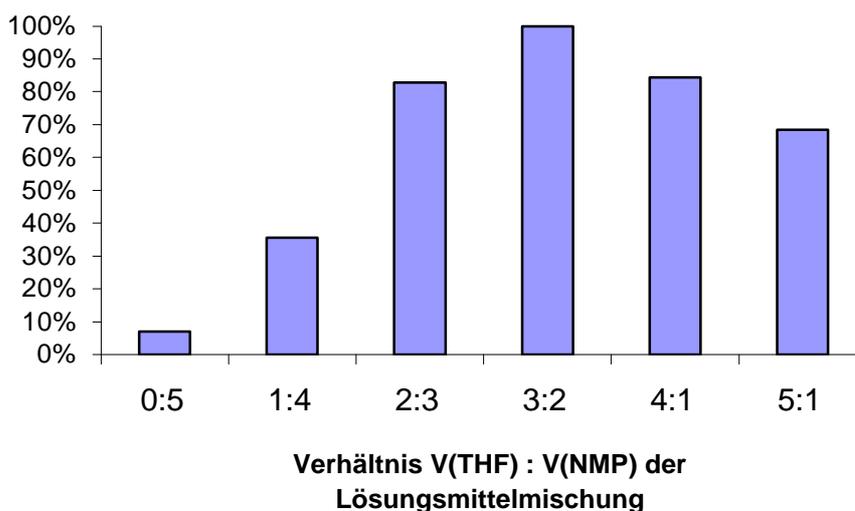


Abbildung 4-42. Mischungen aus THF und NMP

Im Hinblick auf eine technische Anwendung gilt es allerdings abzuwägen, ob der Gewinn an Reaktionsgeschwindigkeit den zusätzlichen Aufwand bei der Abtrennung des hochsiedenden NMP rechtfertigt.

Die gute Löslichkeit von Zuckern in NMP erlaubt unter Umständen auch die Herstellung übersättigter Lösungen, die für technische Anwendungen interessant sind (Kapitel 4.1.2.4).

4.1.2.4 *Übersättigte Lösungen*

Übersättigte Lösungen sind metastabil, da die Lösung mehr Solvat enthält, als dessen Löslichkeit entspricht. Die normalerweise zu erwartende Kristallisation ist kinetisch gehemmt. Die Herstellung übersättigter Lösungen ist problematisch, da in solchen Systemen der gelöste Stoff bei Erhöhung der Temperatur über einen gewissen Schwellenwert hinaus, ausfällt. Zudem muss gesichert sein, dass das zugegebene Enzym nicht die Kristallisation initiiert.

Übersättigte Lösungen werden üblicherweise durch Herstellung einer gesättigten, heißen Lösung, gefolgt von Filtration und anschließender vorsichtiger oder auch schockhafter Abkühlung, erhalten. Die Konzentration einer solchen Lösung ist also limitiert durch die Löslichkeit des gelösten Stoffes am Kochpunkt des Solvenz bzw. dem Zersetzungspunkt des Solvats. Beim Einsatz vergleichsweise apolarer Lösungsmittel ist aber selbst die Löslichkeit am Kochpunkt dermaßen gering, dass die Konzentration der übersättigten Lösung nur unbedeutend größer ist, als die der gesättigten Lösung.

Eine hier angewandte, alternative Methode besteht darin, den Zucker in einem polaren Lösungsmittel zu lösen und anschließend das apolare Lösungsmittel – gegebenenfalls unter Zuhilfenahme von Kristallisationsinhibitoren – zuzugeben. Die so hergestellte Lösung ist dann übersättigt.

4.1.2.4.1 Auswahl des polaren Lösungsmittels

Das polare Lösungsmittel sollte Zucker gut lösen, nicht nucleophil und gleichzeitig toxikologisch unbedenklich sein. Wünschenswert wäre auch ein möglichst leicht flüchtiges Lösungsmittel, so dass dessen Entfernung nach erfolgter Reaktion mit möglichst geringem Aufwand erfolgen kann.

Auf der Basis obiger Vorarbeiten fiel die Wahl auf NMP.

4.1.2.4.2 Auswahl des apolaren Lösungsmittels

Bei der Wahl des apolaren Lösungsmittels ist man weniger stark eingeschränkt: Gewünscht ist ein nicht-nucleophiles, toxikologisch unbedenkliches, leicht flüchtiges Lösungsmittel. Gleichzeitig muss das Lösungsmittel mit NMP mischbar sein. Zur Wahl standen z.B. *n*-Hexan, *t*-Butanol, MTBE, THF, 2-Methyl-2-butanol.

Dabei wären die unpolarsten Lösungsmittel wie *n*-Hexan und MTBE prinzipiell am besten geeignet, da hierbei die Zugabe möglichst geringer Mengen ausreichend ist, um die Polarität des System soweit zu senken, dass das Enzym seine volle Aktivität hat. Lösungsmittel, die selbst eine recht hohe Polarität aufweisen (wie z.B. THF), müssen demnach in viel größerer Menge dem NMP zugefügt werden, um den gleichen Effekt zu erzielen. Das hat jedoch zu Folge, dass die Substrate in der Lösung verdünnt werden, woraus ein Sinken der Katalysegeschwindigkeit resultiert. Es ist also erwünscht, das Reaktionssystem mit einem volumenmäßig so geringen Anteil Lösungsmittel wie möglich zu gestalten.

Leider zeigte sich, dass die aufgezählten unpolaren Lösungsmittel zwar mit NMP mischbar sind, aber durch die Anwesenheit des Zuckers im NMP quasi ausgesalzen werden: es kommt zur Phasentrennung. Der Versuch das unpolare Lösungsmittel durch den Acyldonator zu ersetzen hatte den gleichen Effekt zur Folge.

Es zeigte sich im Verlauf zahlreicher Experimente, dass die auf der Mischung von NMP und THF basierenden übersättigten Lösungen am stabilsten sind. Hier wurde weder durch Zugabe von Acyldonatoren noch Zugabe des Enzyms die Kristallisation des Zuckers initiiert. Daher wurde dieses System zur Grundlage aller weiteren Optimierungversuche.

4.1.2.4.3 Herstellung übersättigter Lösungen – D-Glucose

1,8 g (10 mmol) des Zuckers werden unter der Einwirkung von Ultraschall in 8,6 ml NMP gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und unter Rühren zuerst mit einem Äquivalent Acyldonator (vorzugsweise Fettsäurevinylester) und dann tropfenweise mit – über Kalium getrocknetem – THF versetzt.

Die so hergestellten Lösungen sind bei Raumtemperatur über Tage stabil.

4.1.2.4.4 Einsatz von Enzymen im ternären metastabilen System

THF/NMP/Glucose

Novozym SP 435TM erwies sich dabei als geeigneter Biokatalysator, ohne dabei die Kristallisation zu initiieren. Alle anderen getesteten – nicht an polymere Materialien gebundenen – Enzyme und an andere polymere Materialien wie DuoliteTM gebundene Enzyme initiieren hingegen die Kristallisation.

Ein typisches Reaktionssystem, bestehend aus

- 2,5 mmol (4,50 g) α -D-Glucose
- 2,5 mmol (5,65 g) Laurinsäurevinylester
- 25 g Lösungsmittel (NMP/THF = 1:5 (v/v))
- 400 mg Novozym SP 435TM (getr. über P₄O₁₀)

wird innerhalb von 2 Stunden zu 100 % umgesetzt. Der Vergleich der Zeit-Umsatz-Kurven (Abbildung 4-43, Umsatzbestimmung *via* HPLC (mit Naphtalin als internem Standard)) spricht für sich. Durch Erhöhung der zugegebenen Enzymmenge lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit weiter steigern. Der ideale Volumenanteil von THF im Reaktionsmedium ist mit ca. 5/6 deutlich höher als bei der Untersuchung der generellen Verwendbarkeit von THF/NMP-Mischungen als Reaktionsmedium ermittelt wurde (Abschnitt 4.1.2.3 – Reaktion in Mischungen aus N-Methylpyrrolidon und Tetrahydrofuran). Dies liegt daran, dass der THF-Anteil hier erhöht werden kann, ohne dass dies dazu führt, dass die Zucker ausfallen. Ein höherer THF-Anteil bewirkt aber eine höhere Enzymaktivität.

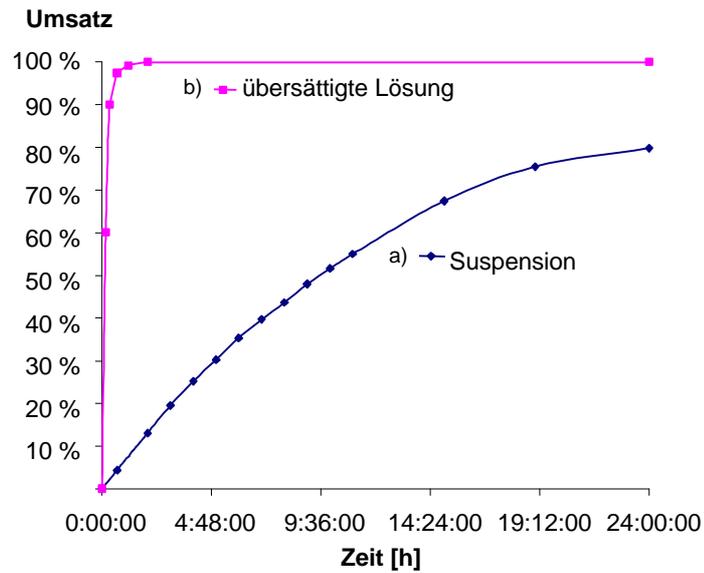


Abbildung 4-43. Irreversible enzymatische Acylierung von Glucose im Batch-Reaktor (a) Suspension (THF) und b) übersättigter Lösung ($V(\text{THF})/V(\text{NMP}) = 5:1$)

Neben dem Einsatz eines sog. *Batch*-Reaktors, bietet es sich an einen Durchflussreaktor zu verwenden. Bei Einsatz eines Durchflussreaktors ($V = 4,7 \text{ ml}$) beobachtet man bei einer Fließgeschwindigkeit von maximal $1,2 \text{ ml/min}$ quantitativen Umsatz. Zum Aufbau des Durchflussreaktors siehe Abbildung 4-44. Reaktionsdetails siehe AAV 6.

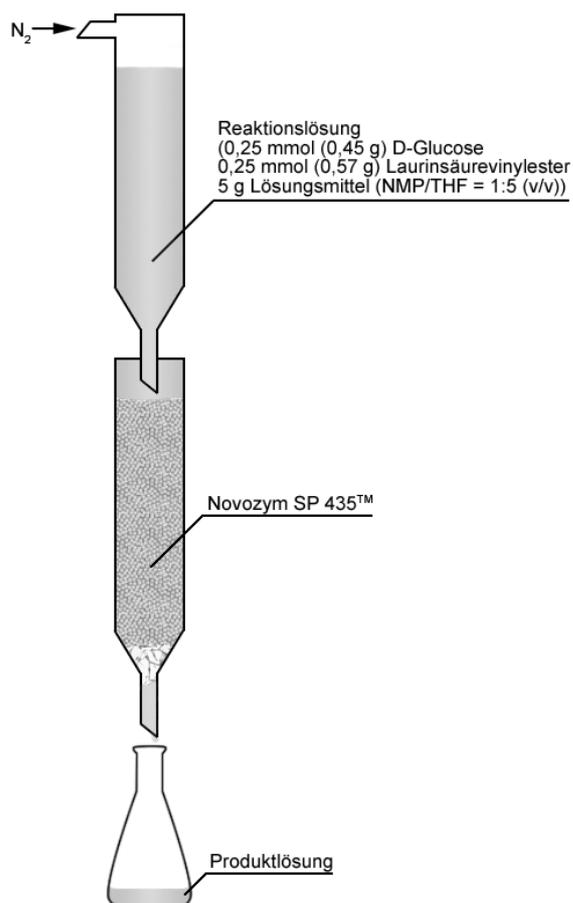


Abbildung 4-44. Schematische Darstellung der Reaktionsführung im Durchflussreaktor gemäß AAV 6

4.1.3 Diskussion der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die lipasekatalysierte Acylierung von Mono- und Disacchariden in wässrigen Medien nicht gelang.

Dagegen erwiesen sich Acyltransfer-Reaktionen in nichtwässrigen Lösungsmitteln als recht erfolgreich und lieferten die gewünschten Produkte in zum Teil guten bis sehr guten Ausbeuten.

Besonders gute Ergebnisse wurden in übersättigten Lösungen erreicht:

Das bereits zuerst in der Diplomarbeit beschriebene Verfahren zur Herstellung von Zuckerestern arbeitet mit einem **dreiphasigen** Reaktionssystem: Hier liegt sowohl der zu acylierende **Zucker** als auch das **Enzym** in **ungelöster Form** – suspendiert in einer Lösung des Acyldonators in THF – vor. Es handelt sich gewissermaßen um eine doppelt heterogene Katalyse. Trotzdem – oder gerade deshalb – beeindrucken die beobachteten Reaktionsgeschwindigkeiten.

Der Fortschritt der hier entwickelten Methode liegt darin, dass es sich im Gegensatz zum oben genannten Verfahren um ein **zweiphasiges Reaktionssystem** handelt: Hier liegt nur das Enzym in ungelöster Form vor. Der **Zucker ist** so wie der Acyldonator **Bestandteil der flüssigen Phase**.

Hierdurch wird eine beträchtliche Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Senkung des Energieeintrages erreicht. Während bei dem dreiphasigen Ansatz unter Einsatz von 1,5 Äquivalenten Acyldonator Reaktionszeiten von 24-48 Stunden bei 50-60 °C benötigt werden, lässt sich Glucose mit der hier vorgestellten Methode innerhalb von zwei Stunden bei Raumtemperatur und bei äquimolarem Einsatz der Reaktanden quantitativ umsetzen (Abbildung 4-43).

Da keine Nebenreaktionen stattfinden, muss das Produkt nur vom Lösungsmittel befreit werden und ist weitgehend frei von Verunreinigungen.

Ein weiterer Vorteil ist, dass der Prozess auch quasi-kontinuierlich betrieben werden kann, wenn man die Reaktionslösung durch einen Enzymreaktor – eine mit Enzym beschickte Glasröhre – schickt.

Dieses Verfahren birgt allerdings auch gewisse Nachteile. So ist eine weitere Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Erhöhung der Reaktionstemperatur nicht möglich. Die Erhöhung der Temperatur auch nur um wenige Grad Celsius hat die spontane Kristallisation der Zucker zur Folge. Ferner erfordert die Entfernung des *N*-Methylpyrrolidons (auch wenn das Reaktionsmedium nur zu 16-20 % (w/w) aus NMP besteht) einen höheren Aufwand als die von reinem Tetrahydrofuran. Dieser Mehraufwand sollte allerdings angesichts der deutlichen Verbesserung der Methode gerechtfertigt sein.

4.1.4 Ausblick

Es wäre durchaus denkbar ein **einphasiges Reaktionssystem** zu entwickeln, in dem auch das Enzym homogen gelöst vorliegt. Es ist allerdings bisher nicht gelungen, Lyophilisate zusammen mit dem Zucker in Lösung zu halten und somit die Katalysegeschwindigkeit weiter zu erhöhen. Die Enzyme sind bei jedem Versuch in dieser Richtung ausgeflockt und verloren ihre Aktivität. Zudem ist zu überlegen, ob ein weiterer Zeitgewinn die zusätzlichen Schwierigkeiten bei der Abtrennung des Enzyms von den Reaktionsprodukten und die wahrscheinlich nicht mögliche Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators rechtfertigt.

4.2 Enzymatische Glycosidierung von Zuckern

Wie in Kapitel 2.3 (Problemstellung) und Kapitel 3.2 (Stand der Technik) beschrieben, stellt die glycosidasekatalysierte Glycosidierung durch reverse Hydrolyse unter stöchiometrischen Bedingungen ein weitgehend ungelöstes Problem dar. Zur Erzielung möglichst hoher Ausbeuten wurden hier auf der Basis einer kritischen Bewertung früherer Arbeiten einige Strategien verfolgt, die deutliche Verbesserungen erwarten ließen:

- Entfernung des gewünschten Reaktionsproduktes aus dem Reaktionsgleichgewicht,
- Feststoff-zu-Feststoff-Umsetzungen,
- Schaumreaktoren,
- Enzymmodifizierungen,
- Kontrolle der Wasseraktivität sowie
- das Konzept der *mikrowässrigen Umgebung*

4.2.1 Entfernung des gewünschten Reaktionsproduktes aus dem Reaktionsgleichgewicht

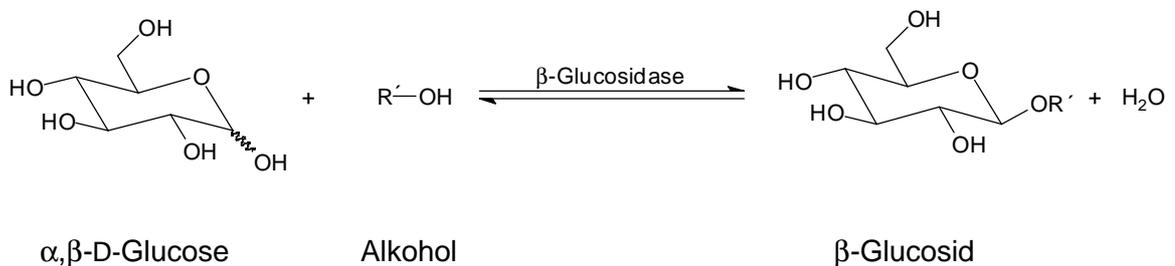


Abbildung 4-45. Enzymatische Synthese von Glycosiden durch „reverse Hydrolyse“

Durch die Entfernung des Kondensationsproduktes aus dem Reaktionsgleichgewicht (Abbildung 4-45) sollte es möglich sein, dieses weitgehend auf die Produktseite zu verschieben. Die Möglichkeiten das Reaktionsprodukt aus dem Reaktionsgleichgewicht zu entfernen lassen sich in drei Kategorien einteilen. Sie basieren auf:

- der Unlöslichkeit des Reaktionsproduktes im Reaktionssystem
- der bevorzugten Entfernung des Reaktionsproduktes aus dem Reaktionssystem
- der Komplexbildung des Reaktionsproduktes.

Diese drei Lösungsansätze werden in den folgenden drei Abschnitten behandelt.

4.2.1.1 *Entfernung des gewünschten Reaktionsproduktes aus dem Reaktionsgleichgewicht durch Ausfällung*

Durch Überführung der Zucker in Glycoside entstehen Amphiphile, deren Gesamtpolarität zwischen derjenigen der beiden Edukte Zucker und Alkohol liegt.

Weil aber beide Edukte im Reaktionssystem löslich sein sollten, ist es schwierig, Bedingungen zu finden, die das Ausfällen des Reaktionsproduktes ermöglichen.

Der einzige Ausweg wäre, dass das Produkt nicht aufgrund mangelnder Solvatationswirkung des Lösungsmittels, sondern aufgrund der eigenen starken Kristallisationsneigung (stark negative freie Kristallisationsenthalpie) ausfällt. Leider neigen jedoch die meisten Glycoside überhaupt nicht zur Kristallisation, so dass dieser Ansatz nur für die Herstellung spezieller Glycoside potentiell interessant ist.

Bei keiner der Mischungen aus Zuckern, Alkoholen und Glycosiden in diversen Lösungsmitteln wurde die Ausfällung beobachtet. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

4.2.1.2 *Entfernung des gewünschten Reaktionsproduktes aus dem Reaktionssystem*

Die Entfernung eines Glycosids aus einem Reaktionssystem gestaltet sich aus den schon in Abschnitt 4.2.1.1 genannten Gründen als sehr schwierig: Mit ihrer zwischen den beiden Edukten liegenden Polarität scheint es unmöglich die Glycoside beispielsweise durch Adsorption gezielt aus dem Reaktionssystem „herauszufiltern“. Eine Möglichkeit wäre, hochselektive Adsorptionsmaterialien einzusetzen, die selektiv Amphiphile oder mäßig polare Substanzen binden. Solche Materialien sind jedoch nicht bekannt*. Die Entfernung durch Destillation ist ebenfalls unmöglich, da sämtliche Glycoside zu hohe Siedepunkte besitzen.

Aus diesem Grunde erwies sich dieser Lösungsansatz ebenfalls als ungeeignet.

4.2.1.3 *Entfernung des gewünschten Reaktionsproduktes aus dem Reaktionsgleichgewicht durch Komplexierung*

Cyclodextrine sind Komplexierungsmoleküle für amphiphile Substanzen. Es sollte daher möglich sein, die Reaktionsprodukte der Kondensation von Zuckern mit langkettigen Alkoholen durch Komplexierung aus dem Reaktionsgleichgewicht zu entfernen. Dementsprechend würde bei hinreichender Affinität des Cyclodextrins zum Reaktionsprodukt die Reaktion deutlich in Richtung Produktbildung verschoben.

Cyclodextrine sind mit 6 (α -), 7 (β -) und 8 (γ -Cyclodextrin) Glucoseeinheiten erhältlich. Entsprechend der Größe des zu komplexierenden Moleküls wäre die Wahl des Cyclodextrins zu treffen.

* Bei der Herstellung von Disacchariden aus Monosacchariden *via* reverser Hydrolyse wurden vielfach mit Aktivkohle (als Adsorptionsmaterial) gefüllte Säulen verwendet, über die immer wieder die Reaktionslösung (die Glycosidasen waren immobilisiert und befanden sich in einer vorgeschalteten Säule) gepumpt wurde: Disaccharide besitzen im Vergleich zu Monosacchariden eine stark gesteigerte Affinität zu Aktivkohle. Dadurch wurden die Disaccharide selektiv aus dem Reaktionssystem entfernt [72]. Auf diese Weise konnten Galactosyl-Disaccharide nach 24 Stunden in Ausbeuten von deutlich über 10 % erhalten werden.

Aufgrund der starken Kristallisationsenthalpie der Cyclodextrine ist es nicht möglich konzentrierte wässrige Lösungen (oder organische Lösungen) von diesen zu gewinnen. Deshalb wurde auf das – in wässrigem und organischem Medium – wesentlich besser lösliche Dimethyl- β -Cyclodextrin zurückgegriffen. Dimethyl- β -Cyclodextrin trägt im Mittel zwei Methylgruppen pro Glucoseeinheit, wodurch dessen Neigung zur Kristallisation stark vermindert wird.

Auch wenn durch die Anwendung dieses Verfahrens zusätzliche Reinigungsprozeduren notwendig werden, sollte dieser Lösungsansatz weiter verfolgt werden.

Um die Eignung der Cyclodextrine wie auch der Reaktanden für ein solches Verfahren zu überprüfen, wurde beschlossen zunächst die Lage des Gleichgewichtes bei der glucosidasekatalysierten Hydrolyse von n -C₁₆-, n -C₁₂- und n -C₈- β -Glucosid, in Gegenwart von Cyclodextrinen zu ermitteln.

Die Bestimmung erfolgte in diversen Lösungsmittelgemischen aus Wasser und jeweils *t*-Butanol, 2-Methyl-2-butanol, THF und Aceton.

In sämtlichen Fällen waren die Glycoside durch die Cyclodextrine in keinsten Weise vor der Hydrolyse geschützt: In jedem Versuch fand quantitative Hydrolyse statt. Eine weitere Untersuchung dieser Möglichkeiten erschien daher wenig erfolgversprechend.

4.2.2 Feststoff-zu-Feststoff-Umsetzungen

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass enzymatische Reaktionen vielfach erfolgreich und in hohen Ausbeuten geführt werden können, obwohl weder die Edukte noch die Produkte gelöst vorlagen. In Suspension wurden gute Umsatzgeschwindigkeiten und sogar auch sehr gute Maximalumsätze festgestellt [121].

Derartige Reaktionen können sowohl unter Zusatz eines Lösungsmittels, in welchem die Reaktanden nur schlechte Löslichkeit zeigen [121e, f], als auch in Abwesenheit eines Lösungsmittels [121g] durchgeführt werden.

Wir werden sehen, dass in den Fällen bei denen die Kondensation bevorzugt ist, dieses Verhalten unabhängig vom eingesetzten Lösungsmittel ist. Sogar Wasser kann als Reaktionsmedium verwendet werden. Ist die Kondensation bevorzugt, so steigt der Umsatz mit abnehmender Löslichkeit der Edukte im Lösungsmittel, ganz im Gegensatz zur plausibel erscheinenden Annahme.

Es ist also möglich das Reaktionsgleichgewicht von Kondensationsreaktionen mit zwei im Medium unlöslichen Edukten unabhängig vom Wassergehalt/von der Wasseraktivität des Systems soweit auf die Produktseite zu verschieben, bis die Konzentration eines der Reaktanden soweit abgenommen hat, dass er nur noch in gelöster Form vorliegt. Aus diesem Grund scheint es durchaus lohnenswert zu sein, die enzymatische Glycosid-synthese unter den Bedingungen der Feststoff-zu-Feststoff-Umsetzung zu erforschen.

Um sowohl das Edukt (Glucose) als auch das Produkt (Glucosid) ungelöst zu halten, wurde in kleinen Mengen Wasser, aber auch in einer Vielzahl von Lösungsmitteln und in Mischungen aus Lösungsmitteln und Wasser gearbeitet. Als Akzeptoren wurde zudem eine Vielzahl von Alkoholen gewählt (1-Hexanol, 1-Dodecanol, Propanol, Benzylalkohol, Trimethylsilylethanol, 2-Hydroxybenzylalkohol und 1,6-Dihydroxyhexan).

Trotz aller experimentellen Variationen gelang es auf diese Weise nicht, Glucose in Glucoside zu überführen.

4.2.3 Schaumreaktoren

In der jüngeren Literatur wurde ein weiterer interessanter Lösungsansatz beschrieben, bei dem es gelang, Glycerol in einer wässrigen Lösung (Puffer, pH 8) in Gegenwart einer flüssigen Lipase-Präparation quantitativ (bezogen auf die Fettsäurekomponente) zu acylieren, indem das System durch Einleiten trockener Luft während der Reaktion aufgeschäumt wurde (vgl. Kapitel „4.1.1.2 Zuckerestersynthese im Schaumreaktor“, S. 57). Aufgrund der Analogie der Problematik (lipophiles Substrat Alkohol und hydrophiles Substrat Glucose) soll versucht werden, dieses Verfahren auch auf die Glycosidierungsreaktion zu übertragen. Grundsätzlich sollte aber auch die Bildung von Glycosiden auf diesem Wege möglich sein. Die verwendete Versuchsanordnung ist in SAV 5 beschrieben.

Leider wurde in keinem Fall signifikanter Umsatz festgestellt. Der in der Originalliteratur beschriebene Weg, der sich auch problemlos nacharbeiten ließ, konnte nicht auf die Umsetzung von Zuckern mit Alkoholen übertragen werden.

4.2.4 Enzymmodifizierungen

Um im Falle der Glycosidasen zu erreichen, dass die Enzyme ihre Aktivität auch unter wesentlich trockeneren Bedingungen behalten, scheinen grundlegende Veränderungen am Enzym erforderlich. Da es nicht möglich war, gezieltes *enzyme engineering* vorzunehmen (abgesehen davon, dass noch gänzlich unbekannt ist, welche strukturelle Eigenart der Glycosidasen für den hohen Wasserbedarf verantwortlich ist*), blieb nur noch die Modifizierung der Biokatalysatoren als Option. So ist vielfach bekannt, dass die Lipidmodifizierung insbesondere bei Lipasen zu enormen Aktivitätssteigerungen in apolaren organischen Lösungsmitteln führen kann [122]. Bei solchen Modifizierungen handelt es sich in der Regel um kovalente oder adsorbtive Derivatisierungen der Enzymoberfläche.

Wenn man z.B. eine ethanolische Span-60®-Lösung in die Lösung einer Lipase in TRIS-Puffer eintropft, so fällt ein Lipase-Tensid-Agglomerat aus, welches eine hohe Aktivität in organischen Lösungsmitteln aufweist [122]. Die Übertragung dieses Verfahrens auf Glucosidasen ließ Biokatalysatoren erwarten, welche ebenfalls in organischen Lösungsmitteln enzymatische Aktivität aufweisen und dadurch die enzymatische Synthese von Glycosiden ermöglichen sollten.

Derartige Glucosidase-Tensid-Agglomerate wurden nach SAV 3 hergestellt und untersucht.

Die erhaltenen Präparationen zeigten aber weder in wässrigen noch in organischen Medien hydrolytische oder synthetische Aktivität.

* Gegenstand von Spekulationen ist beispielsweise auch, dass das Enzym überhaupt nicht inaktiviert wird und die Schwierigkeit stattdessen darin liegt, den Enzym-Produkt-Komplex in Abwesenheit von Wasser zu spalten: Diese Vorstellung geht davon aus, dass die hohe Affinität der Substratbindungsstelle (polare Wechselwirkungen) zum Katalyseprodukt (oder auch -edukt) nur dadurch aufgehoben werden kann, dass ein Medium mit einer ähnlich hohen Dielektrizitätskonstante wie Wasser oder Wasser selbst in die Substratbindungsstelle eindringt und dort die elektrostatischen Kräfte aufhebt bzw. das Produktmolekül kompetitiv aus der *active site* verdrängt.

4.2.5 Kontrolle der Wasseraktivität

Eine Verschiebung der Gleichgewichte Richtung Glycoside wäre möglicherweise auch über die exakte Kontrolle der Wasseraktivität im Reaktionssystem zu erreichen. Die Einstellung der Wasseraktivität gelingt auf einfache Weise, durch Äquilibrierung mit gesättigten Salzlösungen bekannter Wasseraktivität [123]. Dies wird erreicht, indem es den beiden Gemischen (Reaktionssystem und Salzlösungen bekannter Wasseraktivität) in einem geschlossenen System (Exsikkator) ermöglicht wird, über die Gasphase Wasser auszutauschen.

Auf diese Weise können detaillierte Erkenntnisse über die Lage von Reaktionsgleichgewichten – insbesondere im Vergleich zu berechneten Werten (Thermodynamik) – erhalten werden.

4.2.5.1 *Die Thermodynamik der Kondensationsreaktionen*

Auf Basis eigener Berechnungen (siehe Anhang, Abbildung 6-8) erhält man bei Auftragung der Gleichgewichtsumsätze (revers) hydrolytischer Reaktionen gegen die Wasseraktivität die in Abbildung 4-46 dargestellten Kurvenverläufe.

Da die Gleichgewichtsausbeuten für β -Glycosidsynthesen bekannt sind ($K_{\text{rev.}} = 1,9^*$) [124], ist es möglich, den Gleichgewichtsumsatz bei bekannter Wasseraktivität im Diagramm abzulesen.

* $K_{\text{rev.}}$ beträgt für Alkyl- β -D-glycoside bei 60 °C ca. 1,9; unabhängig von der Kettenlänge des Aglykons.

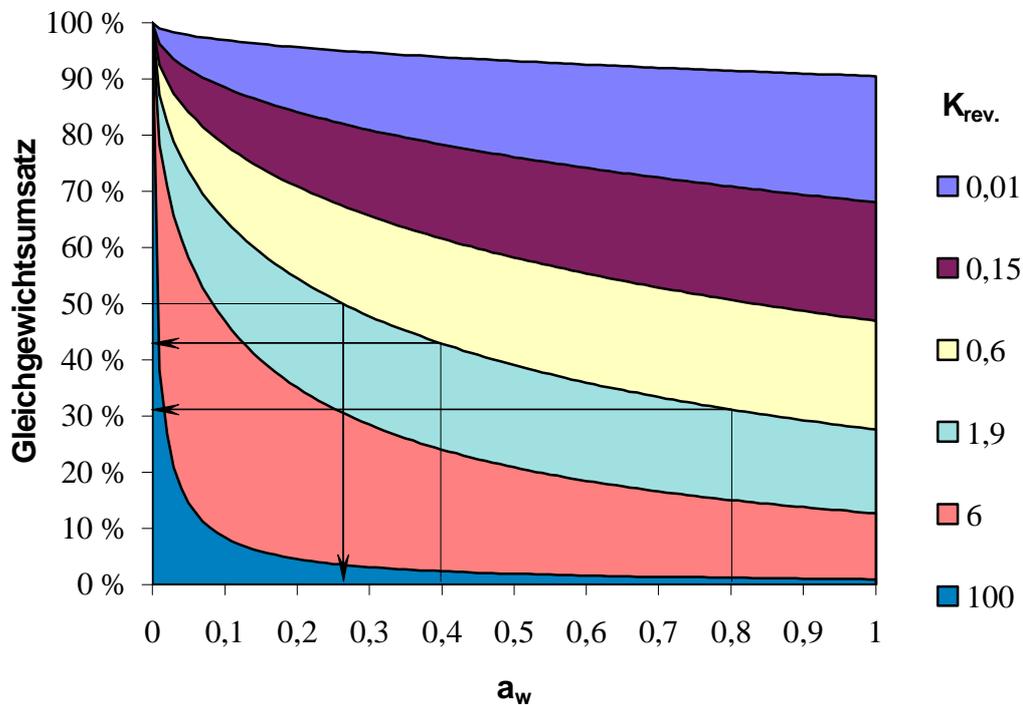


Abbildung 4-46. Lage des Reaktionsgleichgewichts bei Hydrolysereaktionen in Abhängigkeit von der Wasseraktivität a_w und der Gleichgewichtskonstante für die Produktbildung K_{rev} .

Bei idealem Reaktionsverlauf müsste die Wasseraktivität 0,26 betragen, um einen Umsatz von 50 % zu erzielen, immer vorausgesetzt, dass der Katalysator unter diesen Bedingungen noch ausreichend aktiv ist.

Glycosidasen benötigen aber zur Aufrechterhaltung ihrer enzymatischen Aktivität eine Wasseraktivität von mindestens 0,4 bis 0,8 [125]. Daraus folgt, dass – bei Gleichverteilung des Wassers im Reaktionssystem – nur Umsätze bis 31 bzw. 43 % erzielbar sind.

4.2.5.2 Kontrolle der Wasseraktivität I: gesättigte Salzlösungen

Die Wasseraktivität (a_w) einer flüssigen Phase ist im Gleichgewichtszustand immer proportional zum Partialdruck (p_w) des Wassers in der darüber befindlichen Gasphase:

$$a_w \sim p_w$$

Dieses Gleichgewicht stellt sich dadurch ein, dass immer die diesem physikalischen Gesetz entsprechende Menge Wasser aus der Gasphase in die flüssige Phase bzw. aus der flüssigen Phase in die Gasphase übergeht. Daraus folgt, dass sich die Wasseraktivität in einem System durch den Austausch mit einer **wässrigen Lösung konstanter Aktivität** über die Gasphase erreichen lässt. Solche wässrigen Lösungen konstanter Aktivität sind beispielsweise gesättigte Salzlösungen, deren Aktivitäten – in Abhängigkeit von der Wahl des Salzes – in Tabelle 4-11 aufgeführt sind. Gesättigte Salzlösungen benutzt man deshalb, weil diese selbst nach Zugabe oder Wegnahme von Wasser eine konstante Salzkonzentration – die Sättigungskonzentration – aufweisen solange noch ein Salzbodensatz besteht. „Konstante Salzkonzentration“ bedeutet allerdings auch gleichzeitig „konstante Wasserkonzentration“ und „konstante Wasseraktivität“.

Die Reaktion wurde so durchgeführt, dass die Reaktionsmischung – eine wässrige Lösung der Edukte und der Glycosidase – mit der gesättigten Salzlösung äquilibriert wurde. Die Reaktionsmischung wurde dazu in einem temperierten Exsikkator über der Salzlösung gelagert. Die entsprechende Arbeitsvorschrift ist in der AAV 4 (Experimenteller Teil) beschrieben.

Mit dieser Methode wurde zunächst versucht eine wässrige Lösung aus D-Glucose bzw. D-Galactose und 1,6-Hexandiol in Gegenwart der β -Glucosidase aus Mandeln bzw. β -Galactosidase aus *A. oryzae* im Sinne einer reversen Hydrolyse in das entsprechende β -Glycosid zu überführen. Dazu wurde eine Lösung von je 1 mmol D-Glucose bzw. D-Galactose und 1,5 mmol 1,6-Hexandiol in 1 ml Wasser 24 h über den entsprechenden gesättigten Salzlösungen gelagert (Abbildung 4-47 bzw. Abbildung 4-48).

Die Bestimmung der Umsätze erfolgte *via* HPLC (siehe „5.1 Experimenteller Teil – Allgemeine Angaben“).

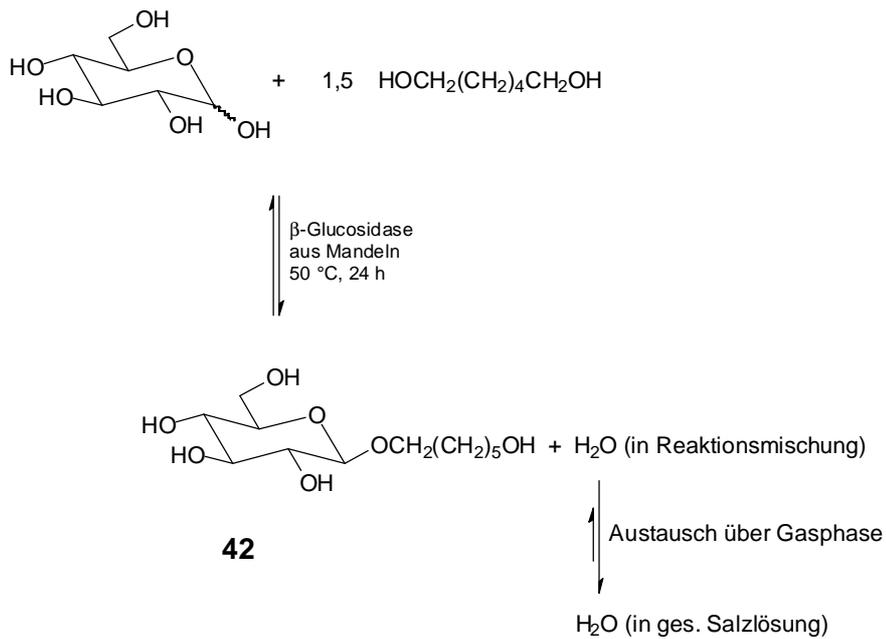


Abbildung 4-47. Reaktionssystem zur Umsetzung von D-Glucose unter Kontrolle der Wasseraktivität

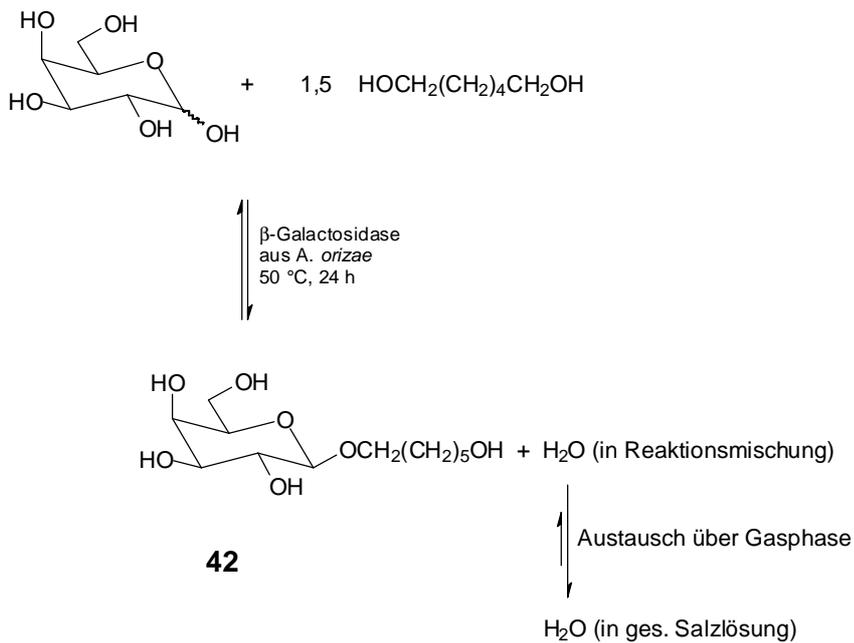


Abbildung 4-48. Reaktionssystem zur Umsetzung von D-Galactose unter Kontrolle der Wasseraktivität

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 4-11 dargestellt.

Tabelle 4-11. Umsätze der Glycosidierung von D-Glucose bzw. D-Galactose mit Hexan-1,6-diol während Äquilibrierung mit ges. Salzlösungen

über ges. Lösung von	a_w	eingesetztes Monosaccharid	
		D-Glucose	D-Galactose
Kaliumnitrat	0,94	27 %	24 %
Kaliumchlorid	0,84	29 %	26 %
Ammoniumsulfat	0,81	28 %	25 %
Ammoniumchlorid	0,79	28 %	25 %
Natriumchlorid	0,75	27 %	24 %
Natriumnitrat	0,74	26 %	23 %
Kaliumiodid	0,69	23 %	21 %
Kobaltchlorid	0,65	19 %	17 %
Magnesiumnitrat	0,53	2 %	2 %

Die grafische Darstellung der Daten ist Abbildung 4-49 zu entnehmen.

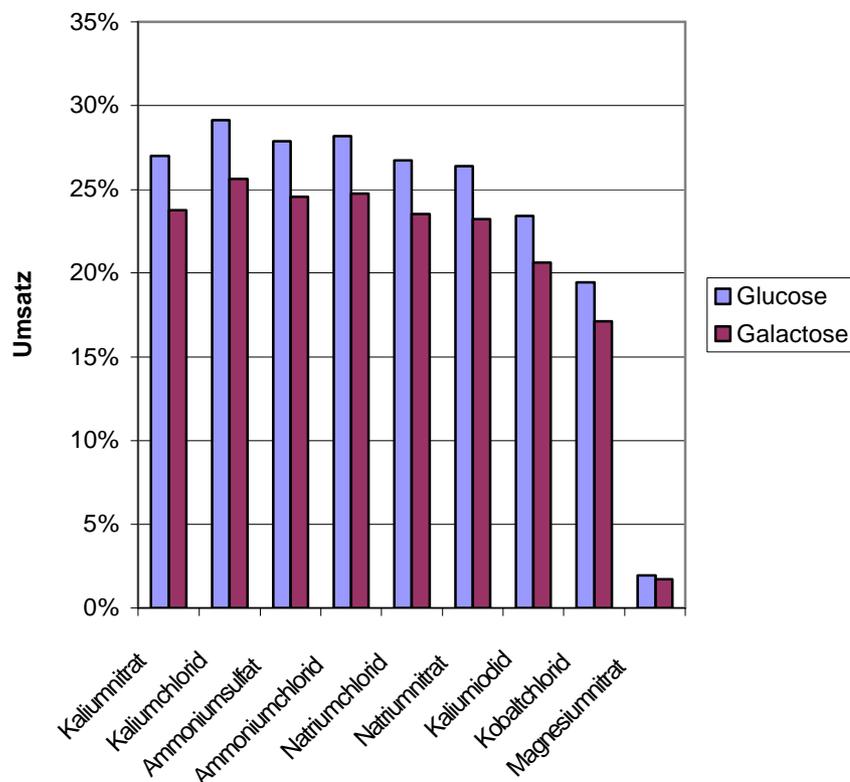


Abbildung 4-49. Umsätze der Glycosidierung von D-Glucose bzw. D-Galactose mit Hexan-1,6-diol während Äquilibrierung mit gesättigten Salzlösungen

Trägt man die erhaltenen Umsätze gegen die aus Tabelle 4-11 entnommenen Wasseraktivitäten auf so ergibt sich das folgende Bild (Abbildung 4-50).

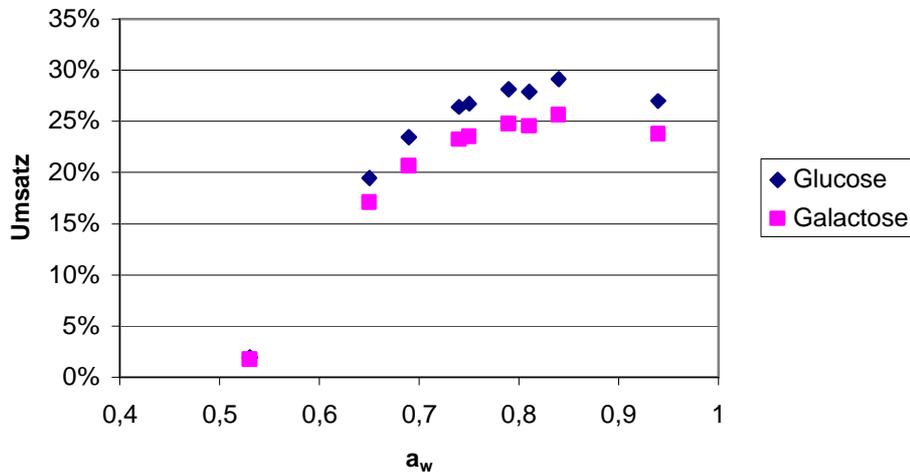


Abbildung 4-50. Umsätze der Glycosidierung von D-Glucose bzw. D-Galactose mit Hexan-1,6-diol während Äquilibration mit ges. Salzlösungen aufgetragen gegen a_w

Offensichtlich lassen sich tatsächlich die so erhaltenen Umsätze mit den Wasseraktivitäten in Zusammenhang bringen. Indem im Reaktionssystem durch den Gasphasenaustausch mit einer gesättigten KCl-Lösung eine Wasseraktivität von ca. 0,84 eingestellt wurde, konnten Umsätze bis fast 30 % erzielt werden. Die auf diese Weise erreichte Steigerung der Umsätze liegt darin begründet, dass zu Beginn der Reaktion ein Überschuss an Wasser existiert, in dem die Enzymaktivität hoch, die Gleichgewichtskonzentration des Glycosids aber niedrig ist. Mit zunehmender Entfernung des Wassers (auch des Wassers welches bei der Reaktion entsteht) wird das System jedoch so weit wie möglich auf die Produktseite verschoben. Die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt jedoch mit zunehmendem Wasserverlust.

4.2.5.3 *Kontrolle der Wasseraktivität II: Paare von Salzhydraten*

Eine weitere Möglichkeit zur Kontrolle der Wasseraktivität ist die Zugabe von Paaren von Salzhydraten [125] wie beispielsweise eine äquimolare Mischung aus $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Dieser Kombination entspricht bei 50 °C eine Wasseraktivität von 0,60. Die Salzhydratmischung wird dem Reaktionssystem einfach hinzu gegeben. Dabei ist zu beachten, dass eine Salzlast beim Überschreiten einer gewissen Grenze in einem enzymatischen Reaktionssystem zum drastischen Verlust der Enzymaktivität führen kann [126]. Die Anwesenheit zweier Salzhydrate puffert innerhalb gewisser Grenzen – der Pufferkapazität – die Wasseraktivität der Lösung durch Aufnahme von Wasser seitens des schwach hydratisierten Salzes bzw. Abgabe von Wasser seitens des stark hydratisierten Salzes analog der Funktionsweise von pH-Puffern.

Die entsprechende spezielle Arbeitsvorschrift ist SAV 1 (Experimenteller Teil) zu entnehmen.

Mit dieser Methode wurden in keinem Falle signifikante Umsätze festgestellt. Diese Ergebnisse stehen in vollen Einklang mit der Beobachtung, dass die verwendeten Glycosidasen eine geringe Toleranz gegenüber einer Salzlast im Medium zeigen.

4.2.5.4 *Das Konzept der mikrowässrigen Umgebung*

Eine weitere Strategie zur Überwindung der oben aufgezeigten Probleme bei der enzymatischen Synthese von β -Glycosiden durch reverse Hydrolyse könnte darin bestehen, das Reaktionssystem so zu konzipieren, dass es eine möglichst geringe *Gesamt-Wasseraktivität* a_w sowie eine hinreichend hohe *lokale Wasseraktivität* am Enzym aufweist.

Im Idealfall sollte die Gesamt-Wasseraktivität im System so gering sein, dass die Lage des Reaktionsgleichgewichts vollständig auf der Seite der Glycosidbildung liegt. Gleichzeitig wäre aber die lokale Wasseraktivität am Enzym so hoch, dass dieses hinreichend aktiv bleibt, um die Reaktion mit ausreichender Geschwindigkeit zu katalysieren.

* Die Wasseraktivität ist die im Massenwirkungsgesetz wirksame Wasserkonzentration. Sie ist in der Regel niedriger als die errechnete, tatsächliche Wasserkonzentration. Diese Diskrepanz resultiert aus Adsorptions-, Absorptions- und Solvatisierungsprozesse durch welche Wasser aus dem betrachteten Reaktionsgleichgewicht effektiv entfernt wird. Die Bestimmung der Wasseraktivität erfolgt durch Partialdruckmessungen ($a_w \propto p_{\text{Wasser}}$; $T = \text{konst.}$).

Es sollte daher versucht werden, das Wasser konzentriert am Ort des Enzyms zu lokalisieren/fixieren. Der Begriff der *mikrowässrigen Umgebung* (*microaqueous environment*) scheint sich dafür zu etablieren.

Zur Fixierung des Wassers im Reaktionssystem in direkter Umgebung der Enzyme könnte man die Enzyme in einem Medium „einschließen“, welches in der Lage ist, Wasser zu binden und sich dieses andererseits mit den eingeschlossenen Enzymen zur Aufrechterhaltung ihrer Aktivität zu teilen. Typische Systeme dafür sind hier z.B. reverse Micellen, durch Polymerisationseinschluss erhaltene Partikel, durch Fällungseinschluss erhaltene Partikel (Polyvinylalkohol), Kieselgur, Kieselgel, Eupergit™, EXtrelut NT™, gequollene Gelatinekörner, Agar-Agar, gequollenes XAD-4 und poröses Glas.

4.2.5.5 *Immobilisierung in Gelatine und Agar-Agar [127]*

Immobilisiert man ein Enzym in einem Material, welches unter Aufnahme von Wasser quillt, so kann man davon ausgehen, dass der so erhaltene Biokatalysator gut hydratisiert ist und somit auch dessen Aktivität erhalten bleibt. In einer ausgedehnten Versuchsreihe wurde deshalb versucht, mittels in solchen Materialien immobilisierter β -D-Glucosidase (aus Süßmandeln) bzw. β -D-Galactosidase (*A. oryzae*) in *n*-Hexan, Diethylether, Diisopropylether, MTBE, Essigester, Dichlormethan, DMSO oder DMF, 1-O-(6-Hydroxyhexyl)- β -glucosid bzw. -galactosid zu synthetisieren (siehe SAV 2). In keinem Fall wurde jedoch die Bildung des Glycosids beobachtet.

Alle Versuche, den Glycosyldonator gemeinsam mit dem Enzym zu immobilisieren und so den Stofftransport zu erleichtern schlugen fehl. Untersuchungen der dabei erhaltenen Präparationen zeigten, dass diese auch in wässriger Lösung und aufgelöst in Puffer keine Aktivität mehr zeigten: Gelatine und Agar-Agar scheinen die β -Glucosidase zu inaktivieren.

4.2.5.6 *Immobilisierung [128] auf Kieselgur, Bleicherde und Kieselgel*

Mineralische, feinkörnige Trägermaterialien wie Celite™ (Kieselgur), Bleicherde (Montmorillonit K 10™) oder Kieselgel 60 sind in der Lage Wasser an ihrer Oberfläche zu binden und dadurch Wasser in hochdispenser Form in einem Lösungsmittel oder auch an der Luft zu liefern. Vorteilhaft ist dabei, dass – ähnlich wie bei der Verwendung reverser Micellen – die Behinderung des Stoffaustauschs zwischen den Phasen durch die feine Verteilung der wässrigen Phase minimiert wird. Gleichzeitig wird die Aktivität des Wassers vergleichsweise wenig herabgesetzt, da nur die Wassermoleküle nicht zur Hydratisierung der Enzyme zur Verfügung stehen, die durch Chemisorbtion direkt an die Oberfläche des Minerals gebunden sind. Die Versuche zur Umsetzung der auf obige Trägermaterialien gezogenen Reaktionsmischungen in *stöchiometrischen* Mengen führten zu Umsätzen von bis zu 13 % (Montmorillonit K 10), 24 % (Kieselgel 60) bzw. 31 % (Kieselgur/Celite). Die Glycosidierungen erfolgten durch Reaktion mit Hexan-1,6-diol in offenen Reaktionsgefäßen, die das Entweichen des bei der Reaktion entstehenden Wassers ermöglichen. Die Beschreibung der Reaktionsführung ist in AAV 5 beschrieben.

4.2.5.7 *Immobilisierung auf EXtrelut NT™*

Die gleichen Vorteile sollte man auch bei der Verwendung von EXtrelut NT™ erwarten. EXtrelut NT™ ist wie Kieselgur ein Mineral, das aus fossilisierten Kieselalgen entstanden ist. Zudem besitzt es die filigrane Struktur des Kieselalgenskeletts, was die lokalisierte Speicherung von Wasser ermöglicht – Grundvoraussetzung für den Aktivitätserhalt der verwendeten Enzyme.

Erste Vorversuche zur Durchführung von Glycosidierungsreaktionen unter Zuhilfenahme dieses Materials lieferten sofort präparativ interessante Umsätze. Die Reaktionsbedingungen lieferten deutlich bessere Ergebnisse als alle zuvor untersuchten Verfahren.

Umsetzungen von Reaktionslösungen bestehend aus 1 mmol Monosaccharid, 1 mmol Akzeptoralkohol, 1,00 g Phosphatpuffer (pH 5), 50 mg β -D-Glucosidase (Mandeln) bzw. 73 mg β -D-Galactosidase (*A. oryzae*) auf 0,782 g EXtrelut NT führten reproduzierbar zu Umsätzen von bis zu 50 % (HPLC).

Die Immobilisierung der Reaktionslösungen erfolgte unmittelbar vor der Reaktion, indem diese gründlich mit dem Trägermaterial vermengt wurden.

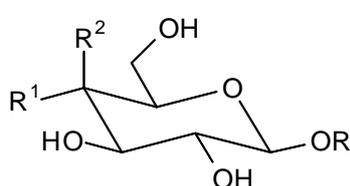
Die Reaktion erfolgte bei 50 °C über mind. 24 Stunden in offenen Reaktionsgefäßen, die das Entweichen des bei der Reaktion entstehenden Wassers ermöglichen.

Die Größe der Öffnung ist dabei von erheblicher Bedeutung für die Umsätze, da die Geschwindigkeit mit der das Wasser entweicht in der gleichen Größenordnung liegen muss, wie die Geschwindigkeit, mit der durch die reverse Hydrolyse Wasser entsteht.

Die Reinigung der Produkte erfolgte durch Säulenchromatografie, indem der gesamte Reaktionsansatz auf eine gepackte Chromatografiesäule gegeben und anschließend mit Methanol/Dichlormethan 1/5 eluiert wird.

4.2.6 Produktpalette

Die Umsetzung von D-Glucose sowie D-Galactose mit Allylalkohol, 5-Pentenol, 2-Trimethylsilylethanol, Benzylalkohol, 1,6-Dihydroxyhexan in Gegenwart von β -Glucosidase aus Süßmandeln bzw. β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* nach Co-Immobilisierung auf EXTrelut NTTM (AAV 5), führte zu der in Abbildung 4-51 aufgelisteten Produktpalette:



#	R ¹	R ²	R	Umsatz [%]
39	OH	H	Allyl	38
40	H	OH	Allyl	30
41	OH	H	Benzyl	47
42	OH	H	6'-Hydroxyhexyl	50
43	H	OH	6'-Hydroxyhexyl	44
44	OH	H	Pent-4-enyl	42
45	H	OH	Pent-4-enyl	34
46	OH	H	(2-Trimethylsilyl)ethyl	34

Abbildung 4-51. Zusammenfassung der Umsätze der β -Gluco- und -Galactosylierungsprozeduren

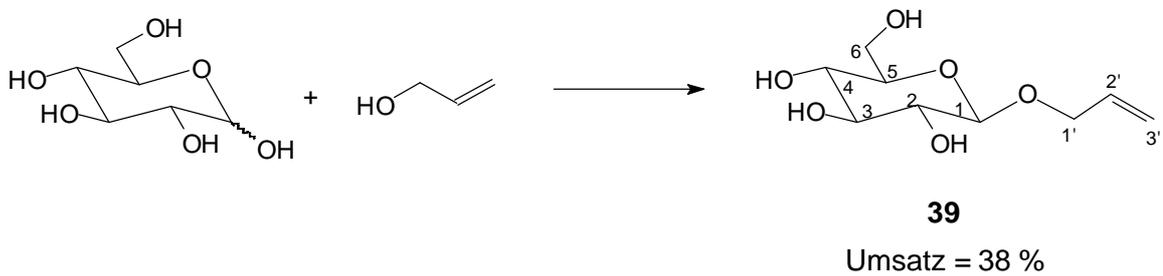
4.2.6.1 1-O-Allyl- β -D-glucosid (**39**)

Abbildung 4-52. Enzymatische Synthese von 1-O-Allyl- β -D-glucosid (**39**) aus D-Glucose und Allylalkohol

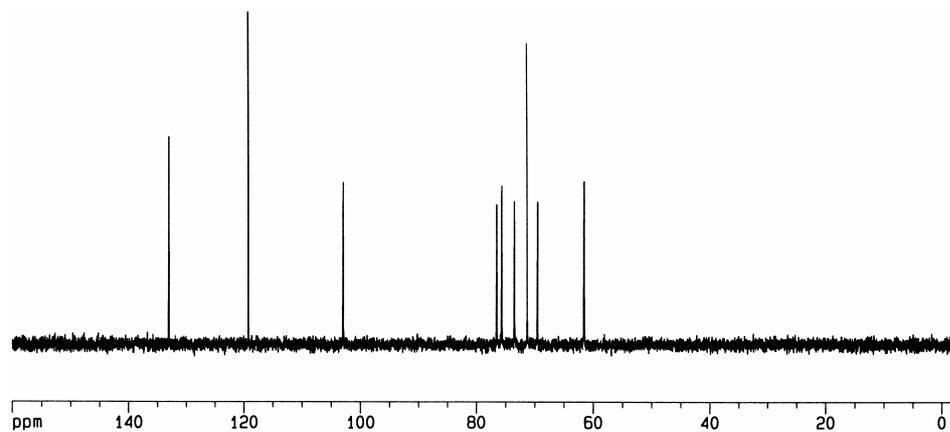
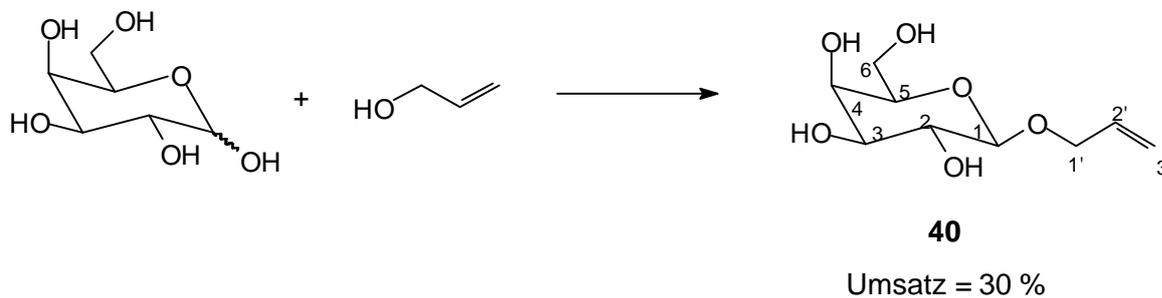
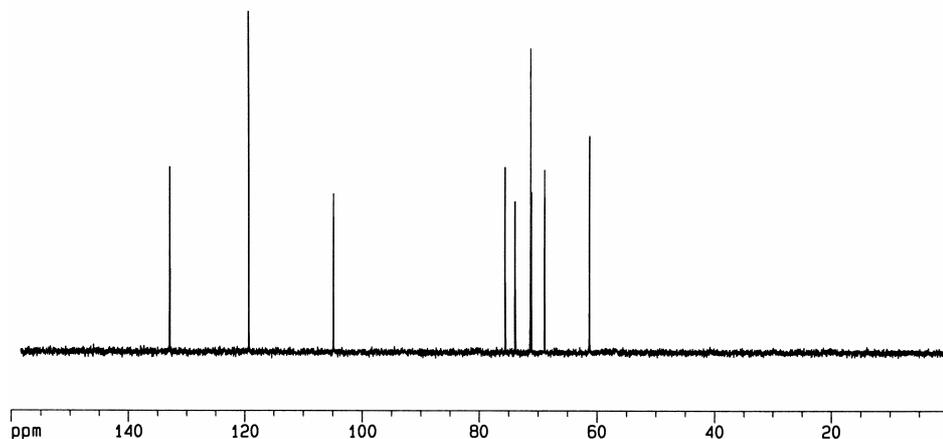


Abbildung 4-53. ^{13}C -NMR-Spektrum (DEPT 45) von 1-O-Allyl- β -D-glucosid (**39**)

Tabelle 4-12. ^{13}C -NMR-Daten von 1-O-Allyl- β -D-glucosid (**39**)

Position	chemische Verschiebung [ppm]	
	$\delta(\text{C})$	
1	102,4	
2	71,4	
3	73,4	
4	69,2	
5	75,7	
6	61,6	
1'	71,2	
2'	133,9	
3'	119,4	

4.2.6.2 1-O-Allyl-*b*-D-galactosid (40)Abbildung 4-54. Enzymatische Synthese von 1-O-Allyl-*b*-D-galactosid (40) aus D-Galactose und Allylalkohol.Abbildung 4-55. ^{13}C -NMR-Spektrum (DEPTH 135) von 1-O-Allyl-*b*-D-galactosid (40)Tabelle 4-13. ^{13}C -NMR-Daten von 1-O-Allyl-*b*-D-galactosid (40)

Position	chemische Verschiebung [ppm]	
	$\delta(\text{C})$	
1	102,4	
2	71,4	
3	73,4	
4	69,2	
5	75,7	
6	61,6	
1'	71,2	
2'	133,0	
3'	119,3	

4.2.6.3 1-O-Benzyl-b-D-glucosid (41)

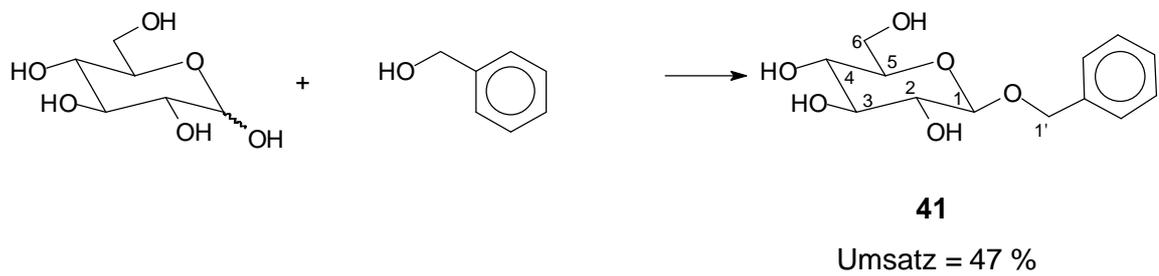


Abbildung 4-56. Enzymatische Synthese von 1-O-Benzyl-b-D-glucosid (41) aus D-Glucose und Benzylalkohol.

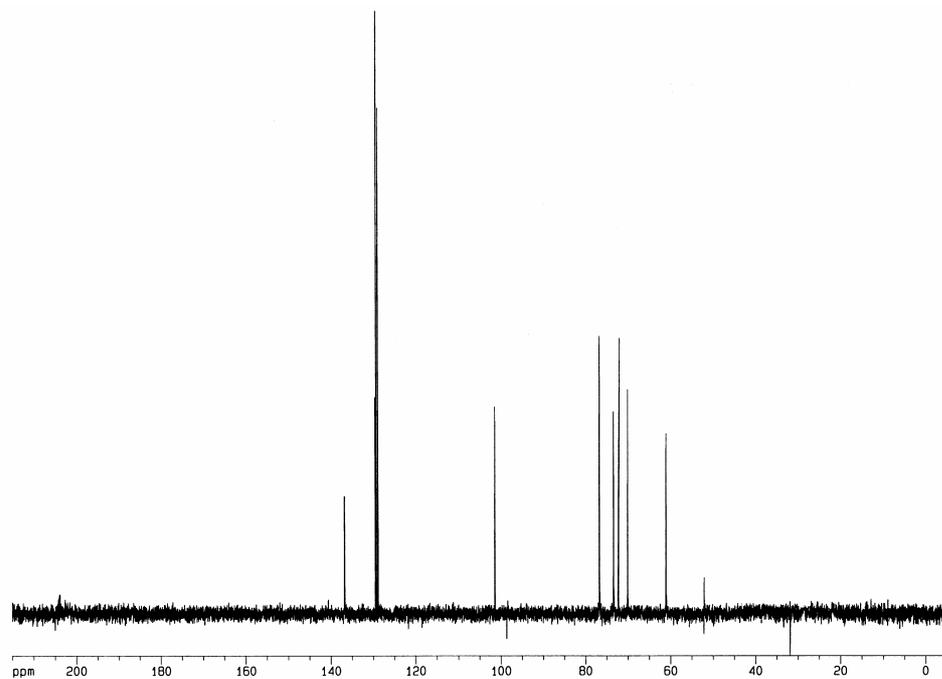


Abbildung 4-57. ^{13}C -NMR-Spektrum (DEPTH 135) von 1-O-Benzyl-b-D-glucosid (41)

Tabelle 4-14. ^{13}C -NMR-Daten von 1-O-Benzyl-b-D-glucosid (41)

Position	chemische Verschiebung [ppm]	
	$\delta(\text{C})$	
1	101,8	
2	73,7	
3 + 5	76,4 + 76,5	
4	70,3	
6	61,4	
1'	72,1	
Phenyl-C	129,1; 129,3 - 129,4	
Phenyl-C (<i>para</i>)	137,2	

4.2.6.4 1-O-(6-Hydroxy-n-hexyl)-b-D-glucosid (42)

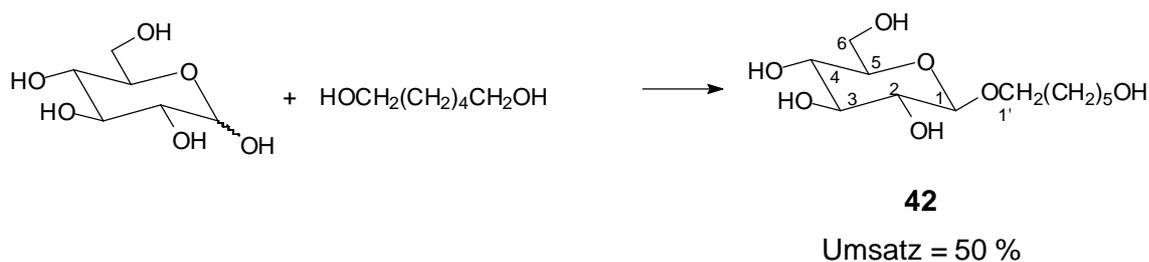


Abbildung 4-58. Enzymatische Synthese von 1-O-(6-Hydroxy-n-hexyl)-b-D-glucosid (42) aus D-Glucose und n-1,6-Hexandiol.

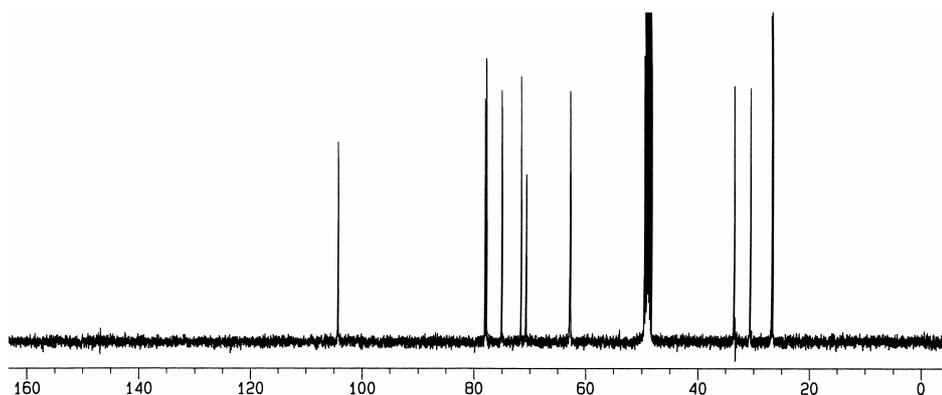
Abbildung 4-59. ^{13}C -NMR-Spektrum von 1-O-(6-Hydroxy-n-hexyl)-b-D-glucosid (42)

Tabelle 4-15. ^{13}C -NMR-Daten von 1-O-(6-Hydroxy-*n*-hexyl)- β -D-glucosid (42)

Position	chemische Verschiebung [ppm]	
	$\delta(\text{C})$	
1	102,8	
2	73,7	
3	76,4 + 76,5	
4	70,3	
6	61,4	
1'	71,1	
2'	29,3	
3' + 4'	25,4	
5'	31,8	
6'	62,5	

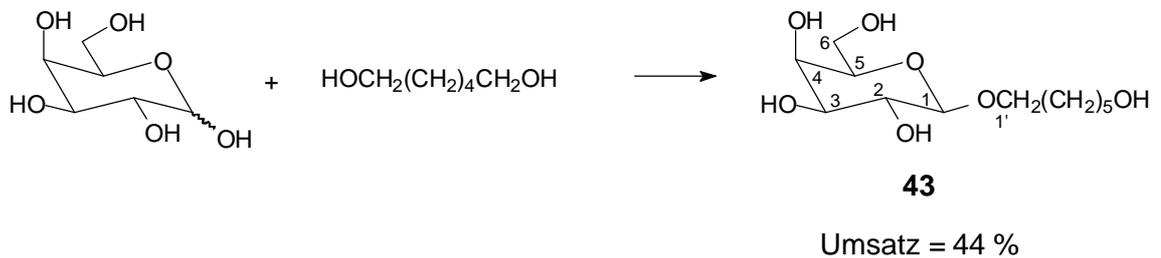
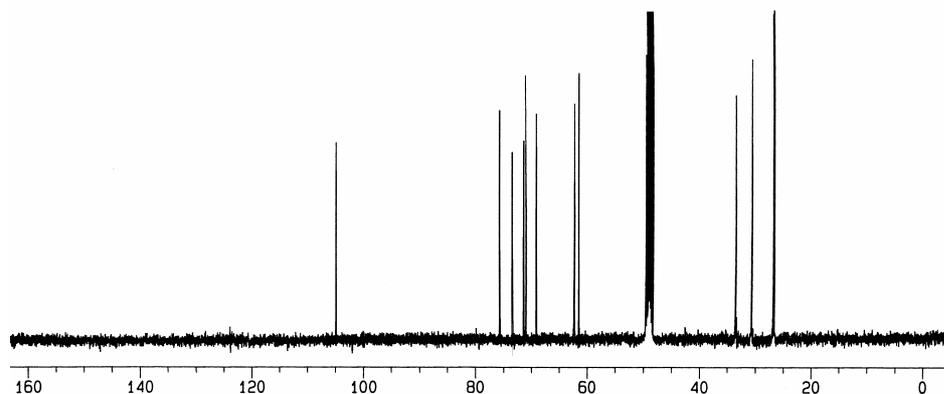
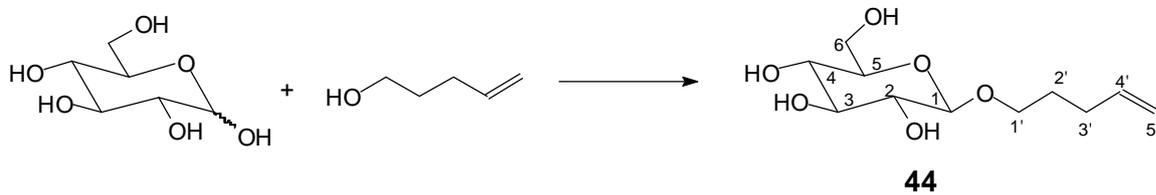
4.2.6.5 1-O-(6-Hydroxy-*n*-hexyl)- β -D-galactosid (43)Abbildung 4-60. Enzymatische Synthese von 1-O-(6-Hydroxy-*n*-hexyl)- β -D-galactosid (43) aus D-Galactose und *n*-1,6-Hexandiol.Abbildung 4-61. ^{13}C -NMR-Spektrum von 1-O-(6-Hydroxy-*n*-hexyl)- β -D-galactosid (43)

Tabelle 4-16. ^{13}C -NMR-Daten von 1-O-(6-Hydroxy-*n*-hexyl)- β -D-galactosid (43)

Position	chemische Verschiebung [ppm]	
	$\delta(\text{C})$	
1	103,5	
2	71,4	
3	73,4	
4	69,1	
5	75,7	
6	61,5	
1'	71,1	
2'	29,3	
3' + 4'	25,4	
5'	31,8	
6'	62,3	

4.2.6.6 1-O-(4-Penten-1-yl)- β -D-glucosid (44)

Umsatz = 42 %

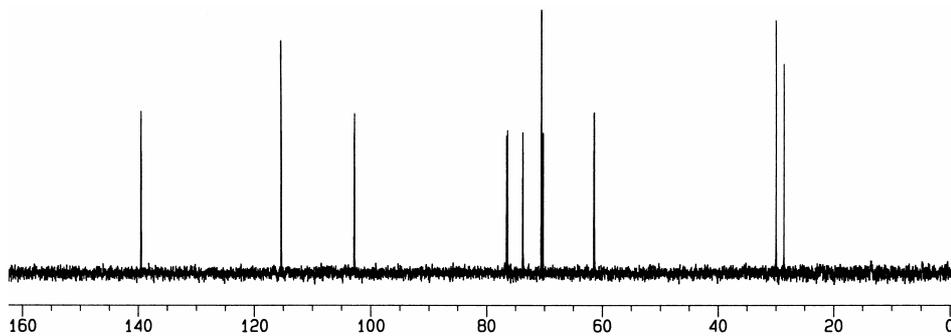
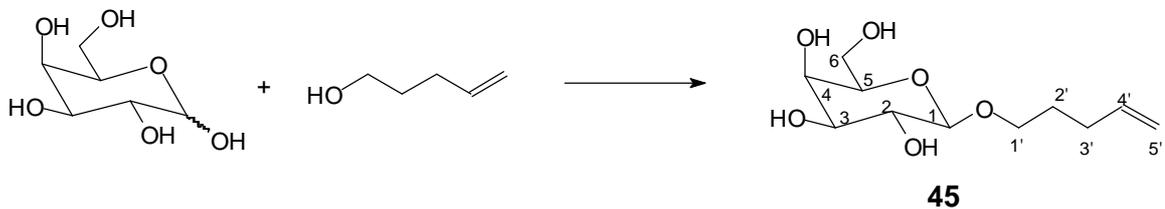
Abbildung 4-62. Enzymatische Synthese von 1-O-(4-Penten-1-yl)- β -D-glucosid (44) aus D-Glucose und 4-Penten-1-ol.Abbildung 4-63. ^{13}C -NMR-Spektrum von 1-O-(4-Penten-1-yl)- β -D-glucosid (44)

Tabelle 4-17. ^{13}C -NMR-Daten von 1-O-(4-Penten-1-yl)-b-D-glucosid (44)

Position	chemische Verschiebung [ppm]	
	$\delta(\text{C})$	
1	102,8	
2	73,7	
3 + 5	76,4 + 76,5	
4	70,3	
6	61,4	
1'	70,5	
2'	28,6	
3'	30,0	
4'	115,3	
5'	139,6	

4.2.6.7 1-O-(4-Penten-1-yl)-b-D-galactosid (45)



Umsatz = 34 %

Abbildung 4-64. Enzymatische Synthese von 1-O-(4-Penten-1-yl)-b-D-galactosid (45) aus D-Galactose und 4-Penten-1-ol.

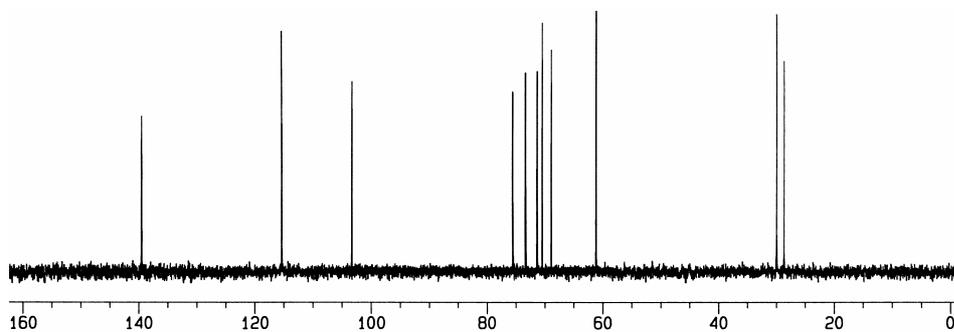
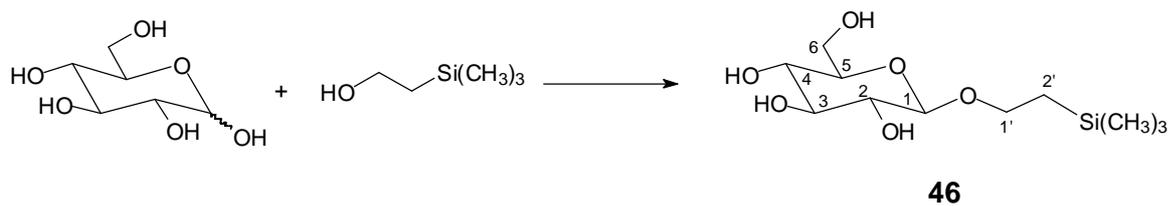
Abbildung 4-65. ^{13}C -NMR-Spektrum von 1-O-(4-Penten-1-yl)-b-D-galactosid (45)

Tabelle 4-18. ^{13}C -NMR-Daten von 1-O-(4-Penten-1-yl)- β -D-galactosid (45)

Position	chemische Verschiebung [ppm]	
	$\delta(\text{C})$	
1	103,4	
2	71,4	
3	73,4	
4	69,3	
5	75,6	
6	61,5	
1'	70,5	
2'	28,6	
3'	30,0	
4'	115,3	
5'	139,5	

4.2.6.8 1-O-(Trimethylsilylethyl)- β -D-glucosid (46)

Umsatz = 34 %

Abbildung 4-66. Enzymatische Synthese von 1-O-(Trimethylsilylethyl)- β -D-glucosid (46) aus D-Glucose und Trimethylsilylethanol

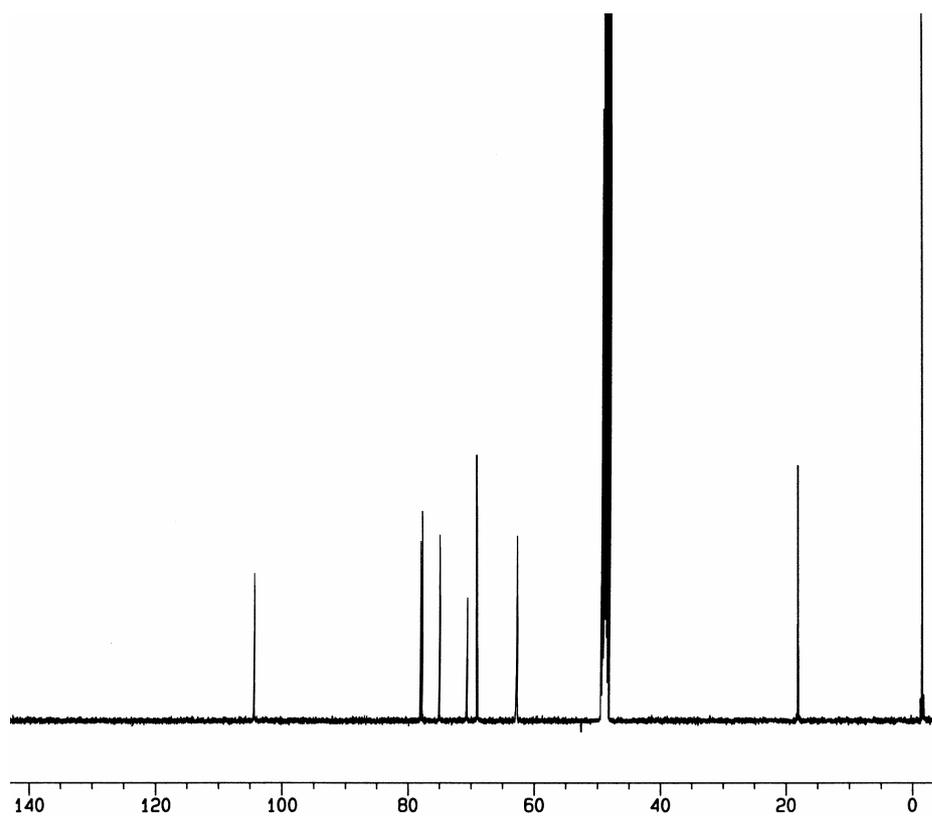


Abbildung 4-67. ^{13}C -NMR-Spektrum von 1-O-(Trimethylsilylethyl)- β -D-glucosid (46)

Tabelle 4-19. ^{13}C -NMR-Daten von 1-O-(Trimethylsilylethyl)- β -D-glucosid (46)

Position	chemische Verschiebung [ppm]	
	$\delta(\text{C})$	
1	102,0	
2	73,7	
3 + 5	2 Signale bei 76,5	
4	70,3	
6	61,3	
1'	69,0	
2'	18,2	
TMS	-1,8	

4.2.7 Diskussion der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle erfolgreichen Glycosidsynthesen dieser Arbeit auf der Kontrolle des Wassergehaltes des Reaktionssystems – insbesondere unter Betrachtung der Wasseraktivität – basierten.

Während die Reaktionsführung bei konstanter Wasseraktivität (Äquibrierung mit gesättigter Salzlösung) mit Umsätzen bis zu 29 % bereits ermutigende Ergebnisse lieferten, ließen sich durch die Verwendung mineralischer Trägermaterialien – insbesondere von EXtrelut[®] NT (Material zur Festphasenextraktionen) – die Reaktionsgeschwindigkeiten und somit – wahrscheinlich bedingt durch die (aufgrund der verkürzte Reaktionszeit) verringerten Enzymdenaturierung – auch die Reaktionsausbeuten erheblich steigern. Auf diese Art und Weise wurden bei äquimolarem Einsatz der Reaktanden Ausbeuten von bis zu 50 % erhalten.

Über derartig hohe Umsätze unter stöchiometrischem Einsatz der Edukte gibt es bislang keine Hinweise in der Literatur und das Verfahren stellt einen kleinen Quantensprung in der enzymatischen Synthese von Glycosiden dar.

Synthetisiert wurde auf diese Weise eine ganze Palette regioisomerenreiner β -Glycoside.

Nachteile dieses Verfahrens sind bislang deren Beschränkung auf wasserlösliche Akzeptoralkohole, sowie der Umstand, dass die Co-Immobilisierung auf dem mineralischen Trägermaterial erfolgt und damit einen weiteren Schritt beinhaltet.

4.2.8 Ausblick

Zwar zeigte sich, auch in eigenen Versuchen, dass Glycosidasen sehr intolerant bzgl. einer Salzlast in wässrigen Lösungen sind, dennoch könnte es lohnenswert sein, den Einsatz von Glycosidasen in ionischen Flüssigkeiten zu erforschen, denn über die Auswirkung der Salzlast in Abwesenheit von Wasser ist noch nichts bekannt. Die Chancen eines solchen Verfahrens wären indes immens, da aufgrund des praktisch nicht vorhandenen Dampfdrucks ionischer Flüssigkeiten, die Möglichkeit bestünde das Reaktionswasser während der Reaktion quantitativ abzudestillieren.

4.3 Zusammenfassung

Regioselektive Acylierungen und stereoselektive Glycosidierungen nativer, d.h. underivatisierter, Zucker stellen aufgrund deren Überfunktionalisierung eine besondere Herausforderung für die organische Synthese dar.

Erwähnenswerte Ergebnisse bei der Lösung dieser Problematik basierten in der Vergangenheit in den meisten Fällen auf dem Einsatz geeigneter Schutzgruppen und/oder mehrstufigen Synthesen – allesamt Methoden mit niedriger Atomeffizienz.

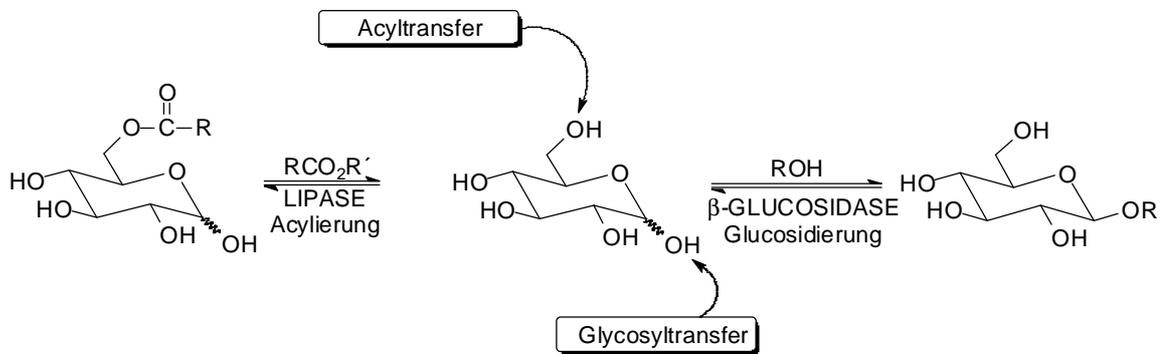


Abbildung 4-68. Enzymatische Derivatisierungen nativer D-Glucose

Bekanntlich lassen sich gewisse Hydrolasen wie Esterasen (Lipasen) und Glycosidasen verwenden, um solche Derivatisierungen mit hoher Regio- bzw. Stereoselektivität zu erzielen. Der erfolgreiche Einsatz dieser Biokatalysatoren wird allerdings durch die

- geringe Löslichkeit nativer Zucker in unpolaren Lösungsmitteln (in den Lipasen üblicherweise ihre höchste Aktivität aufweisen)
- niedrige Aktivität (oder Inaktivität) der Glycosidasen in organischen Lösungsmitteln

limitiert.

In der Vergangenheit wurde diese Problematik teilweise dadurch gelöst, dass derivatisierte Zucker wie z.B. Alkylglycoside oder mit Schutzgruppen versehene Zucker bzw. Lösungsmittel wie DMF, Pyridin oder Solubilisierungsmittel wie Phenylborsäure Verwendung fanden. In dieser Arbeit gelang es, insbesondere native Zucker in durchweg nicht-toxischen Lösungsmitteln, direkt im oben beschriebenen Sinne zu transformieren.

Die Problematik der regioselektiven, lipasekatalysierten Acylierung konnte erfolgreich gelöst werden, indem gezeigt wurde, dass selbst eine Vielzahl von in Tetrahydrofuran weitestgehend unlöslicher Zucker in diesem Medium erfolgreich von der Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435TM) in Suspension acyliert wird.

Auf diese Weise, konnte die Tabelle 4-20 dargestellte Palette regioisomerenreiner Acylierungsprodukte erhalten werden.

Um die Reaktionsgeschwindigkeiten zu erhöhen, wurde ein Verfahren zur Umsetzung in übersättigten Lösungen entwickelt.

Bei der Herstellung von Zuckerestern in Suspension erfolgt die Reaktion in einem dreiphasigen Reaktionssystem: Sowohl der zu acylierende Zucker als auch das Enzym liegen in ungelöster Form vor. Im Gegensatz zum zuvor genannten Verfahren handelt es sich bei der Umsetzung in übersättigter Lösung um ein zweiphasiges Reaktionssystem: Nur das Enzym liegt in ungelöster Form vor. Der Zucker ist wie der Acyldonator Bestandteil der flüssigen Phase (Mischung aus Tetrahydrofuran und *N*-Methylpyrrolidon. Die übersättigte Lösung ist ein Trick zur Umgehung der – thermodynamisch betrachtet – geringen Löslichkeit der gewählten Edukte: In der metastabilen Lösung besteht die Möglichkeit die Umsetzung rasch durchzuführen.

Auf diese Weise wurde es möglich, Zuckerester in einem Bruchteil der zur Umsetzung von Suspensionen benötigten Reaktionszeit (zwei Stunden) unter äquimolarem Einsatz der Reaktanden bei gleichzeitiger Senkung des Energieeintrages, quantitativ zu acylieren.

Da keine Nebenreaktionen stattfinden, muss das Produkt nur vom Lösungsmittel befreit werden und ist weitgehend frei von Verunreinigungen. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Prozess auch quasi-kontinuierlich betrieben werden kann, wenn man die Reaktionslösung durch einen Durchflussreaktor – eine mit Enzym beschickte Glasröhre – schickt.

Dieses Verfahren birgt allerdings auch gewisse Nachteile. So ist eine weitere Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Erhöhung der Reaktionstemperatur nicht möglich, denn die Erhöhung der Temperatur auch nur um wenige Grad Celsius hat die spontane Kristallisation der Zucker zur Folge. Ferner erfordert die Entfernung des *N*-Methylpyrrolidons einen höheren Aufwand als die von reinem Tetrahydrofuran. Dieser Mehraufwand sollte allerdings angesichts der deutlichen Verbesserung der Methode gerechtfertigt sein.

Tabelle 4-20. In Suspension hergestellte Acylierungsprodukte

Monosaccharide

- 6-O-Lauroyl-D-glucose **(1)**
- 6-O-Lauroyl-D-galactose **(2)**
- 6-O-Lauroyl-D-mannose **(3)**
- 5-O-Lauroyl-D-ribose **(4)**
- 5-O-Lauroyl-2-desoxy-D-ribose **(5)**
- 5-O-Lauroyl-D-arabinose **(6)**
- 5-O-Lauroyl-L-arabinose **(7)**
- 5-O-Lauroyl-D-xylose **(8)**

Disaccharide

- 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α -D-fructofuranose- β -D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid **(14)**
- 6,6'-O,O'-Acyl- α - α' -trehalosen (C₈ - C₂₂, **15-24**)

Glycoside

- 6-O-Lauroyl-1-[2-(hydroxymethyl)phenyl]- β -D-glucopyranosid **(9)**
- 6-O-Lauroyl-1-[2-(lauroylmethyl)phenyl]- β -D-glucopyranosid **(10)**

Zuckeralkohole

- 1(4)-*sn*-Lauroyl-*meso*-erythritol **(35)**
- 1,4-Dilauroyl-*meso*-erythritol **(34)**

Aminozucker/Andere

- N*-Lauroyl-6-desoxy-6-amino-D-glucose **(38)**
 - 6-O-Lauroyl-2-desoxy-2-*t*-butyl-oxycarbonylamino-D-glucose **(37)**
 - 6-O-Lauroyl-L-ascorbinsäure **(12)**
-

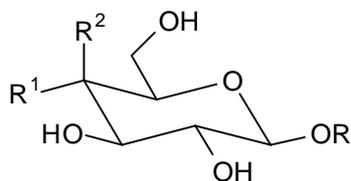
Die Problematik der glycosidasekatalysierten Glycosidbildung *via* reverser Hydrolyse konnte erfolgreich

- a) durch die Kontrolle der Wasseraktivität und
- b) durch die Entwicklung einer quasi lösungsmittelfreien Reaktion auf mineralischen Trägermaterialien

umgangen werden.

Während die Reaktionsführung unter Kontrolle der Wasseraktivität (Äquilibrierung mit gesättigter Salzlösung) mit Umsätzen bis zu 29 % bereits ermutigende Ergebnisse lieferten, ließen sich durch die Verwendung mineralischer Trägermaterialien – insbesondere EXtrelut[®] NT – die Reaktionsausbeuten erheblich steigern. Auf diese Art und Weise wurden bei äquimolarem Einsatz der Reaktanden Ausbeuten von bis zu 50 % erhalten. Über derartig hohe Umsätze unter stöchiometrischem Einsatz der Edukte gibt es bislang keine Hinweise in der Literatur. Das Verfahren stellt somit einen kleinen Quantensprung in der enzymatischen Synthese von Glycosiden dar.

Unter Verwendung von EXtrelut[®] NT als Trägermaterial wurden diverse wasserlösliche Alkohole wie Allylalkohol, 5-Pentenol, 2-Trimethylsilylethanol, Benzylalkohol und 1,6-Dihydroxyhexan in Gegenwart von β -Glucosidase aus Süßmandeln bzw. β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* gluco- bzw. galactosyliert. Auf diesem Wege wurde die in Abbildung 4-51 aufgelistete Produktpalette erhalten.



#	R ¹	R ²	R	Umsatz [%]
39	OH	H	Allyl	38
40	H	OH	Allyl	30
41	OH	H	Benzyl	47
42	OH	H	6'-Hydroxyhexyl	50
43	H	OH	6'-Hydroxyhexyl	44
44	OH	H	Pent-4-enyl	42
45	H	OH	Pent-4-enyl	34
46	OH	H	(2-Trimethylsilyl)ethyl	34

Abbildung 4-69. Zusammenfassung der Umsätze der Glycosylierungsreaktionen

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Angaben

Es wurden folgende Geräte und Materialien eingesetzt:

➤ **Schmelzpunkte:**

Die angegebenen Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren gemessen (Büchi 510) und sind nicht korrigiert.

➤ **Chromatografische Verfahren:**

a: Dünnschichtchromatografie (DC)

Für die analytische Dünnschichtchromatografie (DC) wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumfolien der Firma E. Merck, Darmstadt, benutzt. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Löschung der Fluoreszenz des Indikators im UV-Licht (254 nm), Anfärben in einer Iodkammer oder Besprühen mit einer ethanolischen Ninhydrinlösung (0,2 g in 100 ml EtOH) oder mit Vanillin-Schwefelsäure und anschließendem Erwärmen mit dem Heißluftfön.

b: Präparative Säulenchromatografie (PSC)

Zur präparativen Säulenchromatografie (PSC) wurde Kieselgel 60 (40 - 63 µm) der Firma E. Merck eingesetzt. Das Massenverhältnis von zu trennendem Substanzgemisch zu Adsorptionsmittel betrug im allgemeinen 1:100.

c: Gaschromatografie (GC)

Geräte:

- Gaschromatograph Shimadzu GC-14A
- Integrator Shimadzu Typ CR-5a
- Trennsäule Kapillarsäule SE 52 (l = 25 m)
- Detektor FID

Geräteparameter:

- Injektortemperatur 250 °C
- Detektortemperatur 250 °C
- Temperaturprogramm 100 °C- 10 °C- 300 °C
- Trägergas Wasserstoff
- Brenngas Wasserstoff/Pressluft

d: High Performance Liquid Chromatografie (HPLC)

- HPLC-System: Merck-Hitachi L 6200
- Detektoren: Merck-Hitachi UV-Detektor L 4250
Varex Streulichtdetektor
- Trennsäule LiChrospher 100 RP-18-Säule (250 x 4 mm I.D., 5 µm, endcapped, Merck-Hitachi).
- Integrator: Merck-Hitachi Integrator D 2500

Eluent, Fluss und Detektionswellenlänge sind jeweils bei den einzelnen Methoden angegeben.

Quantitative Bestimmungen erfolgten durch Integration basisliniengetrennter Peaks. Bestimmungen in Reaktionen in denen Edukte suspendiert als Feststoff vorliegen, wurden durch Zugabe von Naphtalin als internem Standard ermöglicht.

➤ IR-Spektroskopie:

Die IR-Spektren wurden mit dem Spektrometer der Firma Perkin-Elmer (Spektrometer 1420) aufgenommen.

➤ NMR-Spektroskopie:

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte mit dem Spektrometer ARX 400 der Firma Bruker. Die chemischen Verschiebungen sind in δ -Werten, bezogen auf TMS, angegeben.

➤ Massenspektroskopie:

Die Messungen erfolgten mit dem Gerät Varian MAT 311 A.

Spektren wurden durch Inkrementberechnung ausgewertet oder mit Literaturdaten verglichen. Nicht unterscheidbare Kohlenstoffe wurden als Gruppe zugeordnet. Die Nummerierung der Atome bei den Auswertungen der Spektren erfolgte nach IUPAC. Zur besseren Übersicht erhielten Glycosylreste immer einfache Ziffern, während Restgruppen durch gestrichene Ziffern gekennzeichnet wurden.

5.2 Verwendete Reagenzien, Edukte und Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel, Edukte und Reagenzien wurden nach Literaturmethoden getrocknet oder gereinigt. Nicht durch Literaturzitate gekennzeichnete Ausgangsstoffe sind kommerziell erhältlich. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungsmittel (HE, EE, CH₂Cl₂) vor Gebrauch destilliert, aber nicht getrocknet.

Lösungsmittelgemische sind in v/v, Reaktionsgemische in w/w angegeben.

5.3 Verwendete Enzyme

5.3.1 Lipasen

Als Lipase wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym SP 435™) eingesetzt. Das Enzym wurde vor dem Einsatz über P₄O₁₀ getrocknet.

5.3.2 Glycosidasen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Glycosidasen handelt es sich ausschließlich um β -Glucosidase aus Süßmandeln und β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae*.

5.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften

5.4.1 AAV 1 – Synthese von Zuckerestern in THF

10 mmol des entsprechenden Monosaccharid wurden bei 50° C in 100 ml trockenem THF mit 11 mmol Fettsäurevinylester in Gegenwart von 1,00 g Novozym SP 435™ umgesetzt. Nach vollständig abgelaufener Reaktion (HPLC-Kontrolle, DC-Kontrolle: MeOH/CH₂Cl₂ = 1/5) wurde der Ansatz filtriert und der Filterkuchen erschöpfend mit heißem THF gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum (Membranpumpe) gründlich vom THF befreit. Die Reinigung des Zuckeresters erfolgt aufgrund der grundlegend unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Produkte individuell.

Das für diese Reaktion verwendete THF hat eine Reinheit von > 99 % (Fa. Fluka/Qualität: purum).

Bedingungen zur HPLC-Reinheitskontrolle: MeOH/H₂O = 95/5, Fluss 0,5 ml/min.

5.4.2 AAV 2 – Synthese von Zuckerestern in übersättigten Lösungen

10 mmol Monosaccharid wurden (zur Beschleunigung unter Ultraschall) bei RT in 20 ml *N*-Methylpyrrolidon (NMP) gelöst. Nacheinander erfolgt die Zugabe von bis zu 100 ml über Kalium getrocknetem THF, 10 mmol Fettsäurevinylester und 400 mg Novozym SP 435™. Der Ansatz wird bei RT gerührt. Nach quantitativer Umsetzung (Kontrolle durch HPLC oder DC) wurde filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt umkristallisiert oder säulenchromatografisch gereinigt (Methanol/Dichlormethan: 1/5).

5.4.3 AAV 3 – Synthese von Fettsäurevinylestern [129]

500 mg (2,2 mmol) Palladium(II)-acetat werden in 700 ml (7,6 mol) Vinylacetat suspendiert. Anschließend werden 18 mmol freie Fettsäure zugegeben, gefolgt von der Zugabe von 90 mg (1,6 mmol) gepulvertem KOH. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur 24 - 48 h gerührt und anschließend das Vinylacetat und die entstandene Essigsäure am Rotationsverdampfer zur Hälfte abdestilliert. Nach Zugabe von 50 g Kieselgel zu dem Destillationskolben wurde weiter bis zur Trockne destilliert. Das nun so auf Kieselgel gezogene Rohprodukt wurde im Sinne einer säulenchromatografischen Trennung eluiert (Hexan/Essigester: 4/1). Die Reinheitskontrolle erfolgt durch Dünnschichtchromatografie

(Hexan/Essigester: 4/1; Detektion: ANS-Reagenz). Das optimale Mengenverhältnis der Reaktanden kann von Fall zu Fall variieren.

5.4.4 AAV 4 – Glycosidsynthesen unter Kontrolle der Wasseraktivität

1 mmol Monosaccharid (D-Glucose, D-Galactose), 1,5 mmol 1,6-Hexandiol und 50 mg β -Glycosidase (β -D-Glucosidase aus Mandeln bzw. β -D-Galactosidase aus *A. oryzae*) wurden in 1 ml Wasser gelöst und die Mischung in einem 50-ml-Becherglas in einen Exsikkator gegeben, in welchem sich die gesättigte Salzlösung als Trockenmittel befindet und der Exsikkator in einen 50 °C warmen Trockenschrank gestellt. Der Umsatz wurde nach 24 h durch HPLC geprüft, indem der getrocknete Rückstand durch Mörsern homogenisiert und anschließend eine Probe in Methanol gelöst wurde.

5.4.5 AAV 5 – Synthese von Glycosiden auf mineralischem Trägermaterial

In einem zylindrischen 20-ml-Schraubdeckelprobenfläschchen mit großer Öffnung werden unter manuellem Rühren 1,00 mmol (0,180 g) D-Glucose bzw. D-Galactose, 1,00 mmol Akzeptoralcohol und 50 mg β -D-Glucosidase (Süßmandel) oder 73 mg β -D-Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) in 1,00 g Phosphatpuffer (0,01-M, pH 5,0) gelöst. Nach vollständigem Lösen der Edukte werden 0,782 g EXTrelut NT™, Celite™, Montmorillonit bzw. Kieselgel 60 hinzu gegeben und die Mischung solange manuell gerührt, bis sich die Flüssigkeit weitgehend gleichmäßig auf dem mineralischen Material verteilt hat. Das Gefäß wird nur so weit verschlossen, dass die Evaporation des Wassers nicht zu schnell erfolgt (Öffnung ca. 1 mm²), und dann in einen, auf 50 °C aufgeheizten, Aluminiumheizblock gegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass der Heizblock das Reaktionsgefäß möglichst vollständig umschließt und dadurch die Kondensation des Wassers an der Innenwandung des Reaktionsgefäßes verhindert.

Reaktionsverfolgung erfolgte via HPLC auf der NH₂-Phase der Fa. Merck (AcCN/H₂O = 90/10).

Die Reinigung der Produkte erfolgte, indem der gesamte Reaktionsansatz auf eine gepackte Chromatografiesäule (Kieselgel 60, Merck) gegeben wird und mit dem angegebenen Lösungsmittel eluiert wird.

5.4.6 AAV 6 – Synthese von Zuckerestern im Durchflussreaktor

Die Acylierung im Durchflussreaktor erfolgt, indem die Reaktionslösung – bestehend aus 0,25 mmol (0,45 g) Glucose und 0,25 mmol (0,57 g) Laurinsäurevinylester gelöst in 5 g Reaktionsmedium (NMP/THF = 1:5) – durch eine vollständig mit Novozym SP 435TM befüllte Glasröhre (Volumen = 4,7 ml (ø 45 mm, Höhe = 11,5 mm)) geleitet wird. Die hygroskopische Reaktionslösung wird durch Begasung mit Schutzgas (N₂) vor dem Eindringen von Wasser geschützt. Zum Aufbau des Durchflussreaktors siehe Abbildung 5-1.

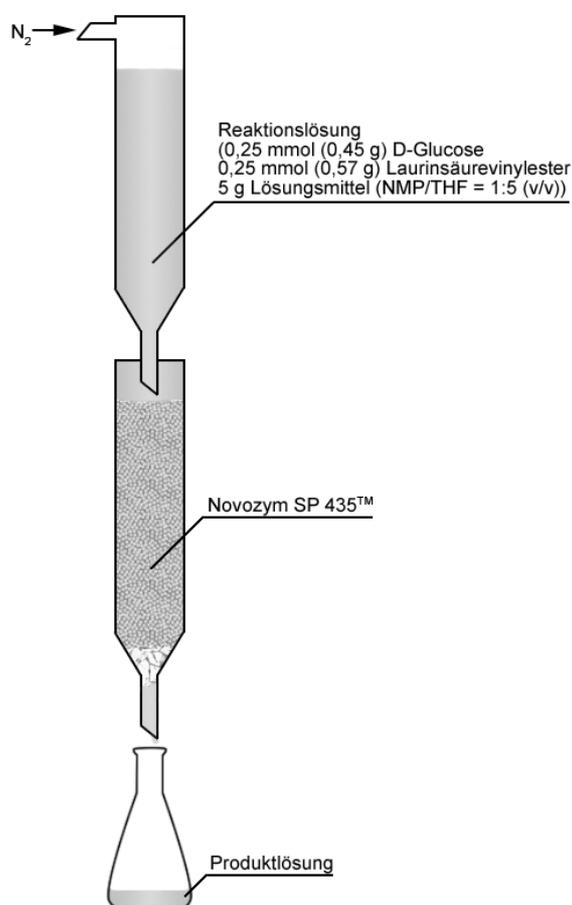


Abbildung 5-1. Aufbau des Durchflussreaktors

5.5 Synthesevorschriften

5.5.1 Spezielle Arbeitsvorschriften

5.5.1.1 *SAV 1 – Versuch zur Synthese von Glycosiden unter Kontrolle der Wasseraktivität durch Zugabe von Salzen*

1 mmol Monosaccharid (D-Glucose, D-Galactose), 1,5 mmol 1,6-Hexandiol, Glycosidase (50 mg β -D-Glucosidase aus Mandeln, bzw. 73 mg β -D-Galactosidase aus *A. oryzae*) und 200, 400 bzw. 800 mg einer äquimolaren Mischung aus $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ werden in 1 ml Lösungsmittel (*t*-Butanol, THF, 2-Methyl-2-butanol, Aceton) suspendiert und in einen 50-ml-Rundkolben gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 50 °C inkubiert. Nach 24 h erfolgt Umsatzkontrolle per HPLC.

5.5.1.2 *SAV 2 – Versuch der Synthese von Glycosiden durch Schaffung einer mikrowässrigen Umgebung (Immobilisierung in Gelatine bzw. Agar-Agar)*

Zu einer auf 50 °C abgekühlten Lösung von 100 mg Gelatine bzw. Agar-Agar in 0,3 ml Wasser wurden 50 mg β -D-Glucosidase (Süßmandel) bzw. 73 mg β -D-Galactosidase (*A. oryzae*) gegeben und im Kühlschrank erkalten gelassen. Anschließend wurde der erhaltene Gallert mechanisch in Würfel (Kantenlänge ca. 0,5 mm) zerteilt oder durch eine Spritze gedrückt, um zu einer feineren Zerteilung zu kommen. Die so erhaltene Enzympräparation wurde in organischen Lösungsmitteln wie Diisopropylether, MTBE, Essigester, Dichlormethan, DMSO oder DMF zur Transglycosidierung (mit *p*-Nitrophenylglucosid bzw. -galactosid) und zur reversen Hydrolyse eingesetzt. Nach 24 h erfolgt die Umsatzkontrolle per HPLC.

5.5.1.3 SAV 3 – Herstellung und Evaluierung von Lipase-Tensid-Agglomeraten

10 ml einer 10 %igen wässrigen Lösung von Sorbitanmonostearat (Span 60[®]) wurde im Laufe einer Stunde zu 50 ml einer Lösung von 500 mg β -D-Glucosidase (Süßmandel) bzw. 730 mg β -D-Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) in Phosphat-Puffer getropft. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und bei 20 °C an der Luft getrocknet. Die Enzymaktivität wird über die Hydrolyse von *p*-Nitrophenyl- β -glucosid bzw. -galactosid in Wasser und verschiedenen Lösungsmitteln (*n*-Hexan, tert.-Butanol, Tetrahydrofuran, Diethylether) ermittelt.

5.5.1.4 SAV 4 – Feststoff-zu-Feststoff-Umsetzungen

In 10 ml Probengläschen wurden je 1 mmol Glucose, 1 mmol Akzeptoralkohol (1-Hexanol, 1-Dodecanol, Propanol, Benzylalkohol, Trimethylsilylethanol, 2-Hydroxybenzylalkohol und 1,6-Dihydroxyhexan) und 50 mg β -D-Glucosidase (Süßmandel) gegeben. Nach Zugabe von 0,2 ml Lösungsmittel (*n*-Hexan, t-Butanol, Tetrahydrofuran, Diethylether und Mischungen (5 und 10% Wasser) von Wasser in t-Butanol und Wasser in Tetrahydrofuran) wurden die Ansätze sehr gut vermischt und bei 50 °C 24 inkubiert.

5.5.1.5 SAV 5 – Versuch zur Synthese von Glycosiden im Schaumreaktor

10 ml Wasser (VE), 200 mg β -D-Glucosidase aus Mandeln, 3 mmol Glucose und 3 (bzw. 10, 15 und 20) mmol Octanol (optional: Zugabe von 3 mg Triton-X-100 (zur Verbesserung der Schaumbildung)) wurden in einem 80 cm Rohr mit Fritte von unten einem Strom, über P₄O₁₀ getrockneter, Luft ausgesetzt. Innerhalb von 4 Stunden war das System so weit getrocknet, dass kein Schaum mehr gebildet wurde. Der Umsatz wurde über HPLC verfolgt.

5.5.2 Zuckerester und Vorläufermoleküle

5.5.2.1 6-O-Lauroyl-D-glucose (1, $M = 362,47 \text{ g/mol}$)

5.5.2.1.1 In Suspension (THF)

Gemäß AAV 1 wurden 1,80 g (10 mmol) Glucose mit 2,49 g (11 mmol) Laurinsäurevinylester in 100 ml THF bei 50 °C mit 1,00 g Novozym SP 435™ 24 h umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz heiß filtriert, der Filtrerrückstand mit 60 ml heißem THF gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum (Membranpumpe) am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Aceton umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt (2,97 g, 82 %) hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 132 °C). Indem die Reaktion in Gegenwart von 5 g Lipase bei 60 °C mit 1,5 Äquivalenten Laurinsäurevinylester über 48 Stunden geführt wurde konnten bis zu 97 % Umsatz erhalten werden.

HPLC (RP-18, AAV 1, Streulichtdetektor): $R_T = 5,4 \text{ min}$

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5/1$, Vanillin/ H_2SO_4): $R_F = 0,51$

IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3450 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 3320 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 3140 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 2930 \text{ (m, } \nu(\text{C-H})), 2900 \text{ (s, } \nu(\text{C-H})), 2880 \text{ (w, } \nu(\text{C-H})), 2850 \text{ (w, } \nu(\text{C-H})), 2830 \text{ (s, } \nu(\text{C-H})), 1720 \text{ (vs, } \nu(\text{C=O}))$.

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 0,84 \text{ (t, 3H, } \underline{\text{CH}}_3, {}^3\text{J}(\text{}^1\text{H-}^1\text{H}) = 6,8 \text{ Hz}), 1,26 \text{ (m, 16H, } \text{CH}_2\text{-Kette)}, 1,50 \text{ (m, 2H, } \underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{-COOR)}, 2,25 \text{ (t, 2H, } \text{CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}}_2\text{-COOR, } {}^3\text{J}(\text{}^1\text{H-}^1\text{H}) = 7,3 \text{ Hz)}, 3,03 \text{ (m, 1H, } \text{C(4)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 3,13 \text{ (m, 1H, } \text{C(2)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 3,43 \text{ (m, 1H, } \text{C(3)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 3,75 \text{ (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, } \text{C(5)}\underline{\text{H}}\text{CH}_2), 3,98 \text{ (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, } \underline{\text{H}}\text{C(6)H)}, 4,25 \text{ (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, } \text{HC(6)}\underline{\text{H}}), 4,47 \text{ (m, 1H, } \text{C(2)}\text{HO}\underline{\text{H}}), 4,69 \text{ (m, 1H, } \text{C(3)}\text{HO}\underline{\text{H}}), 4,89 \text{ (m, 1H, } \text{C(1)}\text{HO}\underline{\text{H}}), 4,96 \text{ (m, 1H, } \text{C(4)}\text{HO}\underline{\text{H}}), 6,30 \text{ (m, 1H, } \text{C(1)}\text{HO}\underline{\text{H}})$.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 14,5$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), $22,7$ (ω -2-C), $25,1$ (β -C), $29,0$ - $29,4$ (6 Signale, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette), $31,9$ (ω -3-C), $34,1$ (α -C), $64,4$ ($\underline{\text{C}}(6)\text{HOH}$), $69,8$ ($\underline{\text{C}}(5)\text{HOH}$), $71,2$ ($\underline{\text{C}}(4)\text{HOH}$), $72,8$ ($\underline{\text{C}}(2)\text{HOH}$), $73,5$ ($\underline{\text{C}}(3)\text{HOH}$), $92,9$ ($\text{C}(1)\text{HOH}$), $173,5$ ($\underline{\text{C}}\text{OOR}$).

MS (EI):

m/z (%) = 301 (1) [$\text{M}^+ - \text{O}-\text{C}(\text{H}_2\text{O}) - \text{CH}_3$], 273 (4) [$\text{M}^+ - \text{O}-\text{C}(\text{H}_2\text{O}) - \text{C}_3\text{H}_7$], 243 (13) [$\text{M}^+ - \text{O} - 2 \text{C}(\text{H}_2\text{O}) - \text{C}_3\text{H}_7$], 211 (3) [$\text{M}^+ - \text{O} - 4 \text{C}(\text{H}_2\text{O}) - \text{CH}_3$], 201 (23) [$\text{M}^+ - \text{O} - 2 \text{C}(\text{H}_2\text{O}) - \text{C}_6\text{H}_{13}$], 183 (83) [Acyliumion], 162 (3) [$\text{Glucose}^+ - \text{H}_2\text{O}$], 144 (6) [$\text{Glucose}^+ - 2 \text{H}_2\text{O}$], 112 (10) [$183 - \text{C}_5\text{H}_{11}$], 85 (25) [$\text{C}_6\text{H}_{13}^+$], 73 (100) [Retro-Diels-Alder: $\text{O}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}^+ - \text{H}$ und $\text{C}(\text{H}_2\text{O})_2-\text{CH}^+$], 71 (42) [$\text{C}_5\text{H}_{11}^+$], 60 (57) [Retro-Diels-Alder: $\text{C}_2(\text{H}_2\text{O})_2^+$], 57 (93) [C_4H_9^+], 43 (85) [C_3H_7^+], 41 (54) [McLafferty, Allylsplaltung].

5.5.2.1.2 In übersättigter Lösung (THF/NMP)

Gemäß AAV 2 wurden 1,80 g (10 mmol) Glucose in 20 g NMP gelöst und die Mischung mit 2,26 g (10 mmol) Laurinsäurevinylester in 100 ml THF mit 1,00 g Novozym SP 435TM bei RT 2 h umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz filtriert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Aceton umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt (2,90 g, 80 %) hatte eine Reinheit größer 98 % (Schmp.: 132 °C).

Die analytischen Daten entsprechen denjenigen aus 5.5.2.1.1 (s. oben).

5.5.2.2 6-O-Lauroyl-D-galactose (**2**, $M = 362,47 \text{ g/mol}$)

5.5.2.2.1 In Suspension (THF)

In einem 250-ml-Rundkolben wurden 1,80 g (10 mmol) Galactose mit 2,49 g (11 mmol) Laurinsäurevinylester in 100 ml THF bei 50 °C mit 1,00 g Novozym SP 435TM 24 h umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz heiß filtriert, der Filtrerrückstand mit 60 ml heißem THF gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum (Membranpumpe) am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde einmal aus Ethanol und zweimal aus Aceton umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt (1,88 g, 52 %) hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 129 °C). Bis zu 95 % Umsatz konnten erhalten werden, indem die Reaktion in Gegenwart von 5 g Lipase bei 60 °C mit 1,5 Äquivalenten Laurinsäurevinylester über 48 Stunden geführt wurde.

HPLC (RP-18, AAV 1, Streulichtdetektor): $R_T = 6,7 \text{ min}$

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5/1$, Vanillin/ H_2SO_4): $R_F = 0,39$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3450 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 3320 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 3140 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 2930 \text{ (m, } \nu(\text{C-H})), 2900 \text{ (s, } \nu(\text{C-H})), 2880 \text{ (w, } \nu(\text{C-H})), 2850 \text{ (w, } \nu(\text{C-H})), 2830 \text{ (s, } \nu(\text{C-H})), 1720 \text{ (vs, } \nu(\text{C=O}))$.

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 0,84 \text{ (t, 3H, Methylprotonen, } ^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 6,7 \text{ Hz}), 1,24 \text{ (m, 16H, CH}_2\text{-Kette)}, 1,50 \text{ (m, 2H, CH}_2\text{CH}_2\text{-COOR)}, 2,26 \text{ (t, 2H, CH}_2\text{-COOR, } ^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 7,3 \text{ Hz}), 3,51 - 3,55 \text{ (2 Signale, 2H, H-2' + H-5')}, 3,66 \text{ (m (n.a.), 1H, H-3')}, 3,98 \text{ (m, 1H, H-4')}, 4,06 - 4,23 \text{ (3 Signale, 3H, 2 H-6' + H-4')}, 4,25 \text{ (d, 1H, OH-2')}, 4,46 \text{ (d, 2H, OH-5', } ^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 3,2 \text{ Hz)}, 4,93 \text{ (m, 1H, H-1')}, 6,16 \text{ (d, 1H, OH-1', } ^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 3,7 \text{ Hz)}$.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 14,5 \text{ (C-CH}_3), 22,7 \text{ (}\omega\text{-2-C)}, 25,0 \text{ (}\beta\text{-C)}, 29,1 - 29,6 \text{ (CH}_2\text{-Kette)}, 31,9 \text{ (}\omega\text{-3-C)}, 34,0 \text{ (}\alpha\text{-C)}, 64,6 \text{ (C-6)}, 68,2 \text{ (C-4)}, 69,1 \text{ (C-2)}, 69,6 \text{ (C-5)}, 69,9 \text{ (C-3)}, 93,2 \text{ (C-1)}, 173,4 \text{ (COOR)}$.

MS (EI):

m/z (%) = 362,47 (fehlt) [M^+], 301 (0,5) [$M^+ - O - C(H_2O) - CH_3$], 273 (4) [$M^+ - O - C(H_2O) - C_3H_7$], 243 (8) [$M^+ - O - 2 C(H_2O) - C_3H_7$], 211 (3) [$M^+ - O - 4 C(H_2O) - CH_3$], 201 (16) [$M^+ - O - 2 C(H_2O) - C_6H_{13}$], 183 (39) [Acyliumion], 162 (3) [Galactose - H_2O], 144 (5) [Galactose - 2 H_2O], 140 (5) [183 - C_3H_7], 112 (4) [183 - C_5H_{11}], 85 (11) [C_6H_{13}], 73 (100) [Retro-Diels-Alder: $O=CH-CH_2-CH_2-OH - H$ und $C(H_2O)_2-CH$], 71 (18) [C_5H_{11}], 60 (40) [Retro-Diels-Alder: $C_2(H_2O)_2$], 57 (46) [C_4H_9], 43 (47) [C_3H_7].

5.5.2.2 In übersättigter Lösung (THF/NMP)

Gemäß AAV 2 wurden 1,80 g (10 mmol) Galactose gelöst in 20 ml NMP mit 2,26 g (10 mmol) Laurinsäurevinylester in 80 ml THF mit 1,00 g Novozym SP 435TM bei RT 2 h umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz filtriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde einmal aus Ethanol und zweimal aus Aceton umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt (2,79 g, 77 %) hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 129 °C).

Die analytischen Daten entsprechen denjenigen von 5.5.2.2.1 (s. oben).

5.5.2.3 6-O-Lauroyl-D-mannose (3, $M = 362,47$ g/mol)**5.5.2.3.1 In Suspension (THF)**

In einem 250-ml-Rundkolben wurden gemäß AAV 1 1,80 g (10 mmol) Mannose mit 2,49 g (11 mmol) Laurinsäurevinylester in 100 ml THF mit 1,00 g Novozym SP 435TM 24 h bei 50 °C umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend siedend heiß vom festen Rückstand abfiltriert und zweimal mit je 30 ml siedendem THF gewaschen. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer bei 60 °C entfernt. Nach Umkristallisation aus Aceton wurden 2,68 g (74 %) eines farblosen Pulvers erhalten. Das farblose, kristalline Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 116 °C). Bis zu 92 % Umsatz konnten erhalten werden, indem die Reaktion in Gegenwart von 5 g Lipase bei 60 °C über 48 Stunden mit 1,5 Äquivalenten Laurinsäurevinylester geführt wurde.

HPLC (RP-18, AAV 1, Streulichtdetektor):

$R_T = 4,9$ min

DC (CH₂Cl₂/MeOH = 5/1, Vanillin/H₂SO₄):

R_F = 0,44

¹H-NMR (400,13 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

δ = 0,89 (t, 3H, CH₃, ³J(¹H-¹H) = 6,8 Hz), 1,31 (m, 8H, CH₂-Kette), 1,62 (m, 2H, CH₂-CH₂-COOR), 2,39 (t (n.a.), 2H, CH₂-CH₂-COOR, ³J(¹H-¹H) = 7,3 Hz), 3,49 (m (n.a.), 1H, H-4'), 3,64 (m (n.a.), 1H, H-3'), 3,62 (m (n.a.), 1H, H-2'), 3,80 (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, H-5'), 4,06 (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, H-6'), 4,33 (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, H-6'), 4,81 (d (n.a.), 1H, H-2').

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

δ = 14,5 (CH₃), 22,6 (ω-2-C), 25,1 (β-C), 28,9-29,0 (γ- und δ-C), 31,7 (ω-3-C), 34,1 (α-C), 64,8 (C-6'), 67,8 (C-4'), 71,1 (2 Signale, C-3' und C-5'), 71,9 (C-2'), 94,5 (C-1'), 173,5 (COOR).

MS (EI):

m/z (%) = 306 (fehlt) [M⁺], 217 (2) [M⁺ - O-C(H₂O) - C₃H₇], 187 (11) [M⁺ - O - 2 C(H₂O) - C₃H₇], 155 (1) [M⁺ - O - 4 C(H₂O) - CH₃], 145 (25) [M⁺ - O - 2 C(H₂O) - C₆H₁₃], 144 (4,8) [Mannose⁺ - 2 H₂O], 127 (64) [Acyliumion], 85 (10) [C₆H₁₃⁺], 73 (100) [Retro-Diels-Alder: O=CH-CH₂-CH₂-OH⁺ - H und C(H₂O)₂-CH⁺], 71 (14) [C₅H₁₁⁺], 60 (58) [Retro-Diels-Alder: C₂(H₂O)₂⁺], 57 (81) [C₄H₉⁺], 43 (30) [C₃H₇⁺], 41 (27) [McLafferty, Allylsplaltung].

5.5.2.3.2 In übersättigter Lösung (THF/NMP)

Gemäß AAV 2 wurden 1,80 g (10 mmol) D-Mannose gelöst in 20 ml NMP mit 2,26 g (10 mmol) Laurinsäurevinylester in 80 ml THF mit 1,00 g Novozym SP 435TM bei RT 2 h umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz filtriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Aceton umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt (2,79 g, 77 %) hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 116 °C).

Die analytischen Daten entsprechen denjenigen von 5.5.2.3.1 (s. oben).

5.5.2.4 5-O-Lauroyl-D-ribose (**4**, $M = 332,44 \text{ g/mol}$) in Lösung

In einem 100-ml-Rundkolben werden 10,0 mmol (1,501 g) D-Ribose in 50 ml siedendem, über Kalium getrocknetem THF gelöst. Nach dem Abkühlen werden 15 mmol (3,39 g) Laurinsäurevinylester und 400 mg Novozym SP 435TM zu der übersättigten Lösung hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei Raumtemperatur magnetisch gerührt und nach quantitativem Umsatz rasch filtriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer im Membranpumpenvakuum eingeeengt und der verbleibende amorphe Rückstand zweimal aus Acetonitril umkristallisiert. Man erhält 3,02 g (91 %) eines farblosen kristallinen Feststoffs (Schmp.= 111 °C).

HPLC (RP-18, AAV 1, Streulichtdetektor): $R_T = 5,4 \text{ min}$

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5/1$, Vanillin/ H_2SO_4): $R_F = 0,50$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3450 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 3320 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 3145 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 2950 \text{ (m, } \nu(\text{C-H})), 2940 \text{ (s, } \nu(\text{C-H})), 2860 \text{ (w, } \nu(\text{C-H})), 2850 \text{ (s, } \nu(\text{C-H})), 1735 \text{ (vs, } \nu(\text{C=O}))$.

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 0,81 \text{ (t, 3H, } \underline{\text{CH}}_3, {}^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 6,7 \text{ Hz}), 1,20 \text{ (m, 16H, CH}_2\text{-Kette)}, 1,48 \text{ (m, 2H, } \underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{-COOR)}, 2,25 \text{ (t, 2H, CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}}_2\text{-COOR, } {}^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 7,4 \text{ Hz}), 3,59 \text{ (m, 1H, C(2)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 3,80 \text{ (m, 1H, C(4)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 3,90 \text{ (m, 2H, C(3)}\underline{\text{H}}\text{OH} + \text{C(5)}\underline{\text{H}}_2\text{OAc)}, 4,20 \text{ (m, 1H, C(5)}\underline{\text{H}}_2\text{OAc)}, 4,82 \text{ (d, 1H, C(3)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 4,87 \text{ (d, 1H, C(3)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 4,91 \text{ (d, 1H, C(1)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 6,23 \text{ (d, 1H, C(1)}\underline{\text{H}}\text{OH)}$.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 14,5 \text{ (}\underline{\text{C}}\text{H}_3), 22,7 \text{ (}\omega\text{-2-C)}, 24,9 \text{ (}\beta\text{-C)}, 29,1\text{-}29,6 \text{ (6 Signale, } \underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Kette)}, 31,9 \text{ (}\omega\text{-3-C)}, 34,1 \text{ (}\alpha\text{-C)}, 66,3 \text{ (}\underline{\text{C}}_{\beta}(5)\text{HOH)}, 71,7 \text{ (}\underline{\text{C}}_{\beta}(3)\text{HOH)}, 75,8 \text{ (}\underline{\text{C}}_{\beta}(2)\text{HOH)}, 79,7 \text{ (}\underline{\text{C}}_{\beta}(4)\text{HOH)}, 102,4 \text{ (}\underline{\text{C}}_{\beta}(1)\text{HOH)}, 173,5 \text{ (}\underline{\text{C}}\text{OOR)}$.

5.5.2.5 5-O-Lauroyl-2-desoxy-D-ribose (**5**, $M = 316,44$) in Lösung

In einem 100-ml-Rundkolben werden 10,0 mmol (1,341 g) 2-Desoxy-D-ribose in 50 ml siedendem, über Kalium getrocknetem THF gelöst. Nach dem Abkühlen werden 15 mmol (3,39 g) Laurinsäurevinylester und 400 mg Novozym SP 435TM zu der übersättigten Lösung hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 bei Raumtemperatur magnetisch gerührt und nach quantitativem Umsatz rasch filtriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer im Membranpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit und der verbleibende amorphe Rückstand zweimal aus Acetonitril umkristallisiert. Man erhält 2,908 g (92 %) eines farblosen kristallinen Feststoffs ($M = 316,44$ g/mol, Schmp. = 101-102 °C).

HPLC (RP-18, AAV 1, Streulichtdetektor): $R_T = 6,0$ min

DC (CH₂Cl₂/MeOH = 5/1, Vanillin/H₂SO₄): $R_F = 0,59$

IR (Film, in cm⁻¹):

$\tilde{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2960 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2930 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2880 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1720 (vs, $\nu(\text{C=O})$), weitere Banden: 1185, 1080.

¹H-NMR (400,13 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 0,84$ (t, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,27 (m, 16H, CH_2 -Kette), 1,50 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), 2,14 (m, 2H, $\text{C}(2)\underline{\text{H}}_2\text{OH}$), 2,25 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,3$ Hz), 3,50 + 3,78 (OH), 4,07 (m, 2H, $\text{C}(5)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 4,28 (m, 1H, $\text{C}(3)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 4,40 (m, 1H, $\text{C}(4)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 5,60 (m, 1H, $\text{C}(1)\underline{\text{H}}\text{OH}$).

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 14,3$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22,7 (ω -2-C), 25,0 (β -C), 29,0-29,5 (6 Signale, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette), 31,9 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 40,1 (C-2), 71,2 (C-3), 83,4 (C-4), 94,3 (C-1).

5.5.2.6 5-O-Lauroyl-D-arabinose (**6**, $M = 332,44$ g/mol) in Lösung

In einem 100-ml-Rundkolben werden 10,0 mmol (1,501 g) D-Arabinose in 50 ml siedendem, über Kalium getrocknetem THF gelöst. Nach dem Abkühlen werden 15 mmol (3,39 g) Laurinsäurevinylester und 400 mg Novozym SP 435TM zu der übersättigten Lösung hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 bei Raumtemperatur magnetisch gerührt und nach quantitativem Umsatz rasch filtriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer im Membranpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit und der verbleibende amorphe Rückstand zweimal aus Acetonitril umkristallisiert. Man erhält 2,65 g (80 %) eines farblosen, kristallinen Feststoffs ($M = 332,44$ g/mol, Schmp. = 114 °C).

HPLC (RP-18, AAV 1, Streulichtdetektor): $R_T = 5,2$ min

DC (CH₂Cl₂/MeOH = 5/1, Vanillin/H₂SO₄): $R_F = 0,50$

IR (Film, in cm⁻¹):

$\tilde{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3145 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2940 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

¹H-NMR (400,13 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 0,83$ (t, 3H, CH₃, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,0$ Hz), 1,26 (m, 16H, CH₂-Kette), 1,51 (m, 2H, CH₂-CH₂-COOR), 2,20-2,31 (m, 2H, C(2)H₂OH), 2,28 (t, 2H, CH₂-CH₂-COOR, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,3$ Hz), 3,40-3,77 (br, OH), 4,16 (m, 2H, C(5)HOH), 4,29 (m, 1H, C(4)HOH), 4,41-4,60 (m, 1H, C(3)HOH), 5,65 (m, 1H, C(1)HOH).

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 103,5$ (C_α-1), 97,4 (C_β-1), 83,6 (C_α-2), 82,0 (C_α-4), 80,8 (C_β-3), 78,5 (C_α-3), 78,3 (C_β-4), 77,0 (C_β-2), 66,7 (C_β-5), 65,2 (C_α-5).

5.5.2.7 5-O-Lauroyl-L-arabinose (**7**, $M = 332,44$ g/mol)

Darstellung und analytische Daten wie bei 5.5.2.6: „5-O-Lauroyl-D-arabinose“. Ausbeute 83 %

5.5.2.8 5-O-Lauroyl-D-xylose (**8**, $M = 332,44 \text{ g/mol}$) in Lösung

In einem 100-ml-Rundkolben werden 10,0 mmol (1,501 g) D-Xylose in 50 ml siedendem, über Kalium getrocknetem THF gelöst. Nach dem Abkühlen werden 15 mmol (3,39 g) Laurinsäurevinylester und 400 mg Novozym SP 435TM zu der übersättigten Lösung hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 bei Raumtemperatur magnetisch gerührt und nach quantitativem Umsatz rasch filtriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer im Membranpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit und der verbleibende amorphe Rückstand zweimal aus Acetonitril umkristallisiert. Man erhält 2,86 g (85 %) eines farblosen kristallinen Feststoffs ($M = 332,44 \text{ g/mol}$, Schmp. = 112-114 °C).

HPLC (RP-18, AAV 1, Streulichtdetektor): $R_T = 5,2 \text{ min}$

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5/1$, Vanillin/ H_2SO_4): $R_F = 0,48$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3450 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 3320 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 3145 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 2950 \text{ (m, } \nu(\text{C-H})), 2940 \text{ (s, } \nu(\text{C-H})), 2860 \text{ (w, } \nu(\text{C-H})), 2850 \text{ (s, } \nu(\text{C-H})), 1730 \text{ (vs, } \nu(\text{C=O}))$.

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 0,84 \text{ (t, 3H, } \underline{\text{CH}}_3, {}^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 6,9 \text{ Hz}), 1,25 \text{ (m, 16H, } \text{CH}_2\text{-Kette}), 1,51 \text{ (m, 2H, } \underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}), 2,15 \text{ (m, 2H, C(2)}\underline{\text{H}}_2\text{OH)}, 2,25 \text{ (t, 2H, } \text{CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}}_2\text{-COOR, } {}^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 7,3 \text{ Hz}), 3,50-3,80 \text{ (br, OH)}, 4,16 \text{ (m, 2H, C(5)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 4,26 \text{ (m, 1H, C(3)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 4,33 \text{ (m, 1H, C(4)}\underline{\text{H}}\text{OH)}, 5,70 \text{ (m, 1H, C(1)}\underline{\text{H}}\text{OH)}$.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 14,5 \text{ (}\underline{\text{C}}\text{H}_3), 22,7 \text{ (}\omega\text{-2-C)}, 25,1 \text{ (}\beta\text{-C)}, 29,0-29,4 \text{ (6 Signale, } \underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Kette)}, 31,9 \text{ (}\omega\text{-3-C)}, 34,1 \text{ (}\alpha\text{-C)}, 72,2 \text{ (C-3)}, 77,8 \text{ (C-2)}, 83,9 \text{ (C-4)}, 101,3 \text{ (C-1)}$.

5.5.2.9 6-O-Lauroyl-1-[2-(hydroxymethyl)phenyl]- β -D-glucopyranosid (**9**, $M = 468,59$ g/mol)

Gemäß AAV 1 wurden 2,863 g (10 mmol) 1-[2-(Hydroxymethyl)phenyl]- β -D-glucopyranosid (D(-)-Salicin) mit 3,39 g (15 mmol) Laurinsäurevinylester in 100 ml DME mit 1,50 g Novozym SP 435TM bei 50 °C 24 h umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz heiß filtriert, der Filtrerrückstand mit 60 ml heißem THF gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Isopropanol umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 127 °C). Ausbeute: 4,12 g (88 %)

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1): $R_T = 6,4$ min

DC (CH₂Cl₂/MeOH = 5/1, Vanillin/H₂SO₄): $R_F = 0,62$

IR (KBr-Pressling, in cm⁻¹):

$\tilde{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2930 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2900 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2880 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2830 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1720 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

¹H-NMR (400,13 MHz, D₂O/d₄-MeOH [ppm]):

$\delta = 0,89$ (t, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,27 (m, 16H, CH_2 -Kette), 1,59 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), 2,32 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,3$ Hz), 3,39 (dd, 1H, $\text{C}(4)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 3,47 (dd, 1H, $\text{C}(2)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 3,51 (dd, 1H, $\text{C}(3)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 3,65 (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{C}(5)\underline{\text{H}}\text{CH}_2$), 4,24 (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\underline{\text{H}}\text{C}(6)\text{H}$), 4,46 (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{HC}(6)\underline{\text{H}}$), 4,57 (d, 1H, Benzyl-H), 4,77 (d, 1H, Benzyl-H), 4,86 (d, 1H, $\text{C}(1)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 7,04 (dd, 1H, H-4*), 7,14 (d, 1H, H-3*), 7,25 (dd, 1H, H-2*), 7,35 (d, 1H, H-1*).

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, D₂O/d₄-MeOH [ppm]):

$\delta = 13,2$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22,4 (ω -2-C), 24,7 (β -C), 28,9-29,4 (6 Signale, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette), 31,8 (ω -3-C), 33,8 (α -C), 59,7 (benzyl-C), 63,4 ($\underline{\text{C}}(6)\text{HOH}$), 71,4 ($\underline{\text{C}}(4)\text{HOH}$), 73,7 ($\underline{\text{C}}(2)\text{HOH}$), 74,2 ($\underline{\text{C}}(5)\text{HOH}$), 76,6 ($\underline{\text{C}}(3)\text{HOH}$), 102,0 ($\text{C}(1)\text{HOH}$), 115,9 ($\text{C-}6^*$), 122,7 ($\text{C-}4^*$), 128,6-128,7 ($\text{C-}3^* + \text{C-}5^*$), 132,2 ($\text{C-}2^*$), 156,9 ($\text{C-}1^*$), 175,4 ($\underline{\text{C}}\text{OOR}$).

5.5.2.10 6-O-Lauroyl-1-[2-(lauroylmethyl)phenyl]- β -D-glucopyranosid (**10**, $M = 650,89 \text{ g/mol}$)

Gemäß AAV 1 wurden 2,863 g (10 mmol) 1-[2-(Hydroxymethyl)phenyl]- β -D-glucopyranosid (D-(-)-Salicin) mit 22,6 g (100 mmol) Laurinsäurevinylester in 100 ml DME bei 60 °C mit 2,00 g Novozym SP 435TM 7 d umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz heiß abfiltriert, der Filtrerrückstand mit 60 ml heißem DME gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Isopropanol umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 127 °C). Ausbeute: 3,25 g (50 %)

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1): $R_T = 6,4 \text{ min}$

DC (CH₂Cl₂/MeOH = 5/1, Vanillin/H₂SO₄): $R_F = 0,62$

IR (KBr-Pressling, in cm⁻¹):

$\tilde{\nu} = 3450 \text{ (s, v(O-H))}, 3320 \text{ (s, v(O-H))}, 3140 \text{ (s, v(O-H))}, 2930 \text{ (m, v(C-H))}, 2900 \text{ (s, v(C-H))}, 2880 \text{ (w, v(C-H))}, 2850 \text{ (w, v(C-H))}, 2830 \text{ (s, v(C-H))}, 1720 \text{ (vs, v(C=O))}.$

¹H-NMR (400,13 MHz, d₄-MeOH [ppm]):

$\delta = 0,87 \text{ (t, 6H, CH}_3\text{, } ^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 6,8 \text{ Hz}), 1,26 \text{ (m, 32H, CH}_2\text{-Ketten)}, 1,54\text{-}1,61 \text{ (m, br, 4H, CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR)}, 2,29 \text{ (t, 2H, CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR, } ^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 7,2 \text{ Hz}), 2,34 \text{ (t, 2H, CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR, } ^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 7,3 \text{ Hz}), 3,34 \text{ (dd, 1H, C(4)HOH)}, 3,46 \text{ (dd, 1H, C(2)HOH)}, 3,58 \text{ (dd, 1H, C(3)HOH)}, 3,65 \text{ (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5)HCH}_2\text{)}, 4,20 \text{ (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H)}, 4,40 \text{ (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H)}, 4,85 \text{ (d, 1H, C(1)HOH)}, 5,20 \text{ (d, 1H, Benzyl-H)}, 5,25 \text{ (d, 1H, Benzyl-H)}, 7,02 \text{ (dd, 1H, H-4*)}, 7,14 \text{ (d, 1H, H-3*)}, 7,22\text{-}7,30 \text{ (m, 2H, H-2* + H-1*)}.$

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, d₄-MeOH [ppm]):

$\delta = 14,4 \text{ (CH}_3\text{)}, 23,7 \text{ (}\omega\text{-2-C)}, 26,0 + 26,1 \text{ (2 x } \beta\text{-C)}, 30,2\text{-}30,7 \text{ (6 Signale, CH}_2\text{-Kette)}, 33,1 \text{ (}\omega\text{-3-C)}, 35,1 + 35,2 \text{ (2 x } \alpha\text{-C)}, 62,5 \text{ (Benzyl-C)}, 64,6 \text{ (C(6)HOH)}, 71,7 \text{ (C(4)HOH)}, 74,9 \text{ (C(2)HOH)}, 75,5 \text{ (C(5)HOH)}, 77,9 \text{ (C(3)HOH)}, 103,2 \text{ (C(1)HOH)}, 117,2 \text{ (C-6*)}, 123,8 \text{ (C-4*)}, 127,7 \text{ (C-2*)}, 130,3\text{+}130,4 \text{ (C-3* + C-5*)}, 156,8 \text{ (C-1*)}, 175,3 + 175,5 \text{ (2 x COOR)}.$

5.5.2.11 1-[2-(Lauroylmethyl)phenyl]- β -D-glucopyranosid (**11**, $M = 468,59 \text{ g/mol}$)

In einem 250-ml-Rundkolben wurden 1,63 g (2,50 mmol) 6-O-Lauroyl-1-[2-(lauroylmethyl)phenyl]- β -D-glucopyranosid und 0,281 g (2,60 mmol) Benzylalkohol in 50 ml THF gelöst und mit 100 mg Novozym SP 435TM versetzt. Die Reaktion wird *via* HPLC verfolgt und nach 10 h abgebrochen. Der Reaktionsansatz wird filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand aus Aceton umkristallisiert.

Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 127 °C). Ausbeute: 0,925 g (79 %)

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1): $R_T = 6,4 \text{ min}$

DC (CH₂Cl₂/MeOH = 5/1, Vanillin/H₂SO₄): $R_F = 0,62$

IR (KBr-Pressling, in cm⁻¹):

$\tilde{\nu} = 3450 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 3320 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 3140 \text{ (s, } \nu(\text{O-H})), 2930 \text{ (m, } \nu(\text{C-H})), 2900 \text{ (s, } \nu(\text{C-H})), 2880 \text{ (w, } \nu(\text{C-H})), 2850 \text{ (w, } \nu(\text{C-H})), 2830 \text{ (s, } \nu(\text{C-H})), 1720 \text{ (vs, } \nu(\text{C=O}))$.

¹H-NMR (400,13 MHz, d₄-MeOH [ppm]):

$\delta = 0,85 \text{ (t, 6H, } \underline{\text{CH}}_3, {}^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 6,8 \text{ Hz}), 1,22 \text{ (m, 32H, } \underline{\text{CH}}_2\text{-Ketten)}, 1,54\text{-}1,61 \text{ (m, 2H, } \underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{-COOR)}, 2,29 \text{ (t, 2H, } \underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{-COOR, } {}^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 7,2 \text{ Hz}), 3,34 \text{ (dd, 1H, C(4)HOH)}, 3,46 \text{ (dd, 1H, C(2)HOH)}, 3,58 \text{ (dd, 1H, C(3)HOH)}, 3,65 \text{ (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5)HCH}_2), 4,20 \text{ (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H)}, 4,40 \text{ (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H)}, 4,85 \text{ (d, 1H, C(1)HOH)}, 5,20 \text{ (d, 1H, Benzyl-H)}, 5,25 \text{ (d, 1H, Benzyl-H)}, 7,02 \text{ (dd, 1H, H-4*)}, 7,14 \text{ (d, 1H, H-3*)}, 7,22\text{-}7,30 \text{ (m, 2H, H-2* + H-1*)}$.

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, d₄-MeOH [ppm]):

$\delta = 14,1 \text{ (}\underline{\text{C}}\text{H}_3), 23,5 \text{ (}\omega\text{-2-C)}, 25,9 \text{ (}\beta\text{-C)}, 30,2\text{-}30,9 \text{ (6 Signale, } \underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Kett)}, 33,1 \text{ (}\omega\text{-3-C)}, 34,7 \text{ (}\alpha\text{-C)}, 62,5 \text{ (Benzyl-C)}, 61,8 \text{ (}\underline{\text{C}}(6)\text{HOH)}, 70,6 \text{ (}\underline{\text{C}}(4)\text{HOH)}, 74,1 \text{ (}\underline{\text{C}}(2)\text{HOH)}, 76,8 \text{ (}\underline{\text{C}}(5)\text{HOH)}, 77,2 \text{ (}\underline{\text{C}}(3)\text{HOH)}, 101,8 \text{ (C(1)HOH)}, 117,1 \text{ (C-6*)}, 123,8 \text{ (C-4*)}, 127,7 \text{ (C-2*)}, 130,3+130,4 \text{ (C-3* + C-5*)}, 156,8 \text{ (C-1*)}, 175,3 \text{ (COOR)}$.

5.5.2.12 6-O-Lauroyl-L-ascorbinsäure (**12**, $M = 346,46 \text{ g/mol}$)

10,0 mmol (1,76 g) L-Ascorbinsäure und 15,0 mmol (3,39 g) Laurinsäurevinylester wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 72 h bei 55 °C unter Ausschluss von Wasser. Nach erfolgter Umsetzung wurde die Mischung siedend heiß über eine Nutsche abgesaugt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhielt man 4,31 g eines fast farblosen, THF-löslichen Stoffes. Die Reinigung erfolgte durch Digerieren mit 20 ml Hexan/Et₂O (4/1) und anschließende Umkristallisationen aus Ethylacetat und eine weitere Umkristallisation aus Et₂O. Man erhielt 2,70 g (78 %, Reinheit > 98 %) farblose, kristalline 6-O-Lauroyl-L-Ascorbinsäure ($M = 346,46 \text{ g/mol}$, Schmp.: 132 °C).

HPLC (RP-18, AAV 1, Streulichtdetektor): $R_T = 4,4 \text{ min}$

IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):

$\bar{\nu} = 3390 \text{ (s, v(OH))}$, 2950 (m, v(C-H)) , 2917 (s, v(C-H)) , 2870 (w, v(C-H)) , 2850 (s, v(C-H)) , $1735 \text{ (s, v } \underline{\text{C=O}}$ (Fettsäure)) , $1690 \text{ (s, v } \underline{\text{C=O}}$ (Ascorbinsäure)), $1655 \text{ (s, v } \underline{\text{C=C}})$.

¹H-NMR (400,13 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 0,84 \text{ (t, 3H, } \underline{\text{CH}_3}$, $^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 6,8 \text{ Hz)}$, $1,26 \text{ (m, 16H, } \underline{\text{CH}_2}$ -Kette), $1,50 \text{ (m, 2H, } \underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$ -COOR), $2,25 \text{ (t, 2H, } \underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$ -COOR, $^3J(^1\text{H-}^1\text{H}) = 7,3 \text{ Hz)}$.

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 14,5 \text{ (} \underline{\text{CH}_3}$), $22,7 \text{ (}\omega\text{-2-C)}$, $25,1 \text{ (}\beta\text{-C)}$, $29,0\text{-}29,4 \text{ (6 Signale, } \underline{\text{CH}_2}$ -Kette), $31,9 \text{ (}\omega\text{-3-C)}$, $34,1 \text{ (}\alpha\text{-C)}$, $173,5 \text{ (} \underline{\text{COOR}})$.

5.5.2.13 6'-O-Lauroylsaccharose (**13**, $M = 512,33 \text{ g/mol}$)

10 mmol (3,42 g) Saccharose und 15 mmol Laurinsäurevinylester (3,39 g) wurden in 100 ml NMP gelöst und mit 1,0 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 500 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch RP-HPLC.

Die Identifizierung des Produktes erfolgte *via* RP-HPLC (RP-18- und NH₂-Phase) und DC mittels Vergleich mit käuflich erworbener Referenzsubstanz. Die Isolierung des Produktes war nicht möglich, da der Versuch der säulenchromatografischen Trennung in Gegenwart von NMP stets zur Zersetzung des Produktes führte.

HPLC (RP-18, AAV 1, Streulichtdetektor): $R_T = 6,3 \text{ min}$

DC (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/5, Vanillin/H₂SO₄): $R_F = 0,42$

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 14,5$ (CH₃), 22,7 (ω -2-C), 25,1 (β -C), 29,0-29,4 (6 Signale, CH₂-Kette), 31,9 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 62,1 (C-6), 62,6 (C-1), 63,6 (C-6'), 69,7 (C-4'), 70,1 (C-5'), 71,5 (C-2'), 72,6 (C-3'), 74,4 (C-4), 76,8 (C-3), 82,7 (C-5), 91,4 (C-1'), 103,8 (C-2), 173,5 (COO).

5.5.2.14 6,6'-O,O'-Dilauroyl-*a*-D-fructofuranose-*b*-D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid (**14**, $M = 688,90 \text{ g/mol}$)

Gemäß AAV 1 wurden 4,97 g (22 mmol) Laurinsäurevinylester mit 3,24 g (10 mmol) α -D-Fructofuranose- β -D-fructofuranose-2',1:2,3'-dianhydrid bei 60 °C in 100 ml THF 48 h in Gegenwart von 2,00 g Novozym SP 435TM umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz heiß abfiltriert, der Filtrerrückstand mit 60 ml heißem THF gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum (Membranpumpe) am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Diisopropylether umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 159 °C). Ausbeute 4,61 g (67 %).

HPLC (RP-18, AAV 1, Streulichtdetektor): $R_T = 6,3 \text{ min}$

DC (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/5, Vanillin/H₂SO₄): $R_F = 0,52$

¹H-NMR (400,13 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 0,84$ (t, 3H, $\underline{\text{CH}}_3$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), $1,26$ (m, 16H, CH_2 -Kette), $1,50$ (m, 2H, $\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), $2,25$ (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,3$ Hz), $3,29$ (dd, 1H, H-1'), $3,36$ (dd, 1H, H-1'), $3,42$ (d, 1H, H-1, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 12,6$ Hz), $3,54\text{-}3,63$ (m, 3H, H-5, H-5'), $3,80$ (d, 1H, H-1, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 12,6$ Hz), $3,82$ (m, 1H, H-3'), $3,85$ (m, 1H, H-4'), $3,91$ (m, 1H, H-6'), $4,07$ (dd, 1H, H-6), $4,20$ (m, 1H, H-6'), $4,22$ (m, 1H, H-3), $4,24$ (m, 1H, H-6), $4,39$ (ddd, 1H, H-4), $4,96$ (dd (Pseudotriplett), 1H, OH-1'), $5,30$ (d, 1H, OH-4', $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 5,5$ Hz), $5,44$ (d, 1H, OH-3, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 5,2$ Hz), $5,47$ (d, 1H, OH-4, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 5,2$ Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 14,5$ ($\underline{\text{CH}}_3$), $22,7$ (ω -2-C), $25,1$ (β -C), $29,0\text{-}29,4$ (6 Signale, $\underline{\text{CH}}_2$ -Kette), $31,9$ (ω -3-C), $34,1$ (α -C), $59,0$ (C-1), $63,4$ (C-6), $63,8$ (C-6'), $64,5$ (C-1'), $73,4$ (C-4), $76,6$ (C-5'), $78,9$ (C-5), $2 \times 79,3$ (C-3, C-3'), $82,2$ (C-4'), $173,5$ ($\underline{\text{COOR}}$).

5.5.2.15 6,6'-O,O'-Dicapryloyl- α - α' -trehalose (15, $M = 594,7$ g/mol)

10 mmol (3,42 g) α - α' -Trehalose und 30 mmol Caprylsäurevinylester (5,10 g) wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 24 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch RP-HPLC. Nach erfolgter Reaktion wurde der Reaktionsansatz filtriert, im Membranpumpenvakuum eingeengt und anschließend aus Isopropanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 4,16 g (70 % bezogen auf Trehalose).

Schmp. 145 °C.

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1):

$R_T = 5,4$ min

IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2920 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 0,92$ (t, 3H, Methylprotonen, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 6,7$ Hz), 1,33 (m, 8H, CH_2 -Kette), 1,50 (m, 2H, $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -COOR), 2,26 (t, 2H, CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -COOR, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,2$ Hz), 3,08 (ddd, 1H, C(4) $\underline{\text{H}}$ OH), 3,22 (m, 1H, C(2) $\underline{\text{H}}$ OH), 3,52 (ddd, 1H, C(3) $\underline{\text{H}}$ OH), 3,85 (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5) $\underline{\text{H}}$ CH₂), 3,99 (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\underline{\text{H}}$ C(6)H), 4,20 (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6) $\underline{\text{H}}$), 4,67 (d, 1H, C(2)HO $\underline{\text{H}}$), 4,79 (s, br, 1H, C(3)HO $\underline{\text{H}}$), 4,79 (d, 1H, C(1)HO $\underline{\text{H}}$), 4,98 (d, 1H, C(4)HO $\underline{\text{H}}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 14,1$ (2 x $\underline{\text{C}}$ H₃), 22,7 (2 x ω -2-C), 24,8 (2 x β -C), 29,0-29,1 (2 x γ - und 2 x δ -C), 31,8 (2 x ω -3-C), 34,1 (2 x α -C), 63,7 (2 x $\underline{\text{C}}$ (6)HOH), 70,3 (2 x $\underline{\text{C}}$ (5)HOH), 70,8 (2 x $\underline{\text{C}}$ (4)HOH), 72,1 (2 x $\underline{\text{C}}$ (2)HOH), 73,4 (2 x $\underline{\text{C}}$ (3)HOH), 94,0 (2 x C(1)HOH), 172,7 (2 x $\underline{\text{C}}$ OOH).

**5.5.2.16 6,6'-O,O'-Dicaprinoyl- α - α' -trehalose (16,
M = 650,80 g/mol)**

10 mmol (3,42 g) α - α' -Trehalose und 30 mmol Caprinsäurevinylester (5,94 g) wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 24 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch RP-HPLC. Nach erfolgter Reaktion wurde der Reaktionsansatz filtriert, im Membranpumpenvakuum eingeeengt und anschließend aus Isopropanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 4,69 g (72 % bezogen auf Trehalose). Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp. 148-9 °C).

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1):

$R_T = 6,2$ min

IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):

$\bar{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2920 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta = 0,92$ (t, 3H, Methylprotonen, $^3\text{J}(\text{H}-\text{H}) = 6,7$ Hz), $1,31$ (m, 12H, CH_2 -Kette), $1,50$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), $2,26$ (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3\text{J}(\text{H}-\text{H}) = 7,2$ Hz), $3,08$ (ddd, 1H, C(4)HOH), $3,22$ (m, 1H, C(2)HOH), $3,52$ (ddd, 1H, C(3)HOH), $3,85$ (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5)HCH₂), $3,99$ (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H), $4,20$ (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H), $4,67$ (d, 1H, C(2)HOH), $4,79$ (s, br, 1H, C(3)HOH), $4,79$ (d, 1H, C(1)HOH), $4,98$ (d, 1H, C(4)HOH).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta = 14,2$ (2 x CH₃), $22,8$ (2 x ω -2-C), $24,8$ (2 x β -C), $29,1\text{-}29,5$ (2 x 4 Signale, CH₂-Kette), $32,0$ (2 x ω -3-C), $34,1$ (2 x α -C), $63,7$ (2 x C(6)HOH), $70,3$ (2 x C(5)HOH), $70,8$ (2 x C(4)HOH), $72,1$ (2 x C(2)HOH), $73,4$ (2 x C(3)HOH), $94,0$ (2 x C(1)HOH), $172,7$ (2 x COOH).

5.5.2.17 6,6'-O,O'-Dilauroyl- α - α '-trehalose (17, $M = 706,91$ g/mol)

10 mmol (3,42 g) α - α '-Trehalose und 30 mmol Laurinsäurevinylester (6,78 g) wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 24 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch HPLC. Nach erfolgter Reaktion wurde der Reaktionsansatz filtriert, im Membranpumpenvakuum eingeeengt und anschließend aus Isopropanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 5,09 g (72 % bezogen auf Trehalose). Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp. 155 °C).

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1): $R_T = 7,2$ min**IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):**

$\tilde{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2920 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

¹H-NMR (400,13 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 0,85$ (t, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, $^3\text{J}(\text{H}-\text{H}) = 6,8$ Hz), $1,23$ (m, 8H, CH_2 -Kette), $1,50$ (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - CH_2 -COOR), $2,26$ (t, 2H, CH_2 - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -COOR, $^3\text{J}(\text{H}-\text{H}) = 7,2$ Hz), $3,08$ (ddd, 1H, $\text{C}(4)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $3,22$ (m, 1H, $\text{C}(2)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $3,52$ (ddd, 1H, $\text{C}(3)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $3,85$ (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{C}(5)\underline{\text{H}}\text{CH}_2$), $3,99$ (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\underline{\text{H}}\text{C}(6)\text{H}$), $4,20$ (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{HC}(6)\underline{\text{H}}$), $4,67$ (d, 1H, $\text{C}(2)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $4,79$ (s, br, 1H, $\text{C}(3)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $4,79$ (d, 1H, $\text{C}(1)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $4,98$ (d, 1H, $\text{C}(4)\underline{\text{H}}\text{OH}$).

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 14,4$ (2 x $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), $22,6$ (2 x ω -2-C), $25,1$ (2 x β -C), $28,9$ - $29,2$ (2 x γ - und 2 x δ -C), $31,7$ (2 x ω -3-C), $34,1$ (2 x α -C), $63,7$ (2 x $\underline{\text{C}}(6)\text{HOH}$), $70,3$ (2 x $\underline{\text{C}}(5)\text{HOH}$), $70,8$ (2 x $\underline{\text{C}}(4)\text{HOH}$), $72,1$ (2 x $\underline{\text{C}}(2)\text{HOH}$), $73,4$ (2 x $\underline{\text{C}}(3)\text{HOH}$), $94,0$ (2 x $\text{C}(1)\text{HOH}$), $172,7$ (2 x $\underline{\text{C}}\text{OOR}$).

5.5.2.18 6,6'-O,O'-Dimyristinoyl- α - α' -trehalose (18,

M = 763,02 g/mol)

10 mmol (3,42 g) α - α' -Trehalose und 30 mmol Myristinsäurevinylester (7,64 g) wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 24 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch RP-HPLC. Nach erfolgter Reaktion wurde der Reaktionsansatz filtriert, im Membranpumpenvakuum eingengt und anschließend aus Isopropanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 5,80 g (76 % bezogen auf Trehalose). Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp. 159 °C).

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1):

$R_T = 9,1$ min

IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):

$\bar{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2920 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 0,85$ (t, 3H, CH_3 , $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,23 (m, 20H, CH_2 -Kette), 1,50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), 2,26 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,2$ Hz), 3,08 (ddd, 1H, C(4) HOH), 3,22 (m, 1H, C(2) HOH), 3,52 (ddd, 1H, C(3) HOH), 3,85 (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5) HCH_2), 3,99 (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H), 4,20 (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H), 4,67 (d, 1H, C(2) HOH), 4,79 (s, br, 1H, C(3) HOH), 4,79 (d, 1H, C(1) HOH), 4,98 (d, 1H, C(4) HOH).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 14,2$ (2 x CCH_3), 22,8 (2 x ω -2-C), 24,8 (2 x β -C), 29,2-29,8 (2 x 7 Signale, CH_2 -Kette), 32,1 (2 x ω -3-C), 34,1 (2 x α -C), 63,7 (2 x C(6)HOH), 70,3 (2 x C(5)HOH), 70,8 (2 x C(4)HOH), 72,1 (2 x C(2)HOH), 73,4 (2 x C(3)HOH), 94,0 (2 x C(1)HOH), 172,7 (2 x COOR).

5.5.2.19 6,6'-O,O'-Dipalmitoyl- α - α' -trehalose (19,

M = 819,13 g/mol)

10 mmol (3,42 g) α - α' -Trehalose und 30 mmol Palmitinsäurevinylester (8,48 g) wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 24 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch RP-HPLC. Nach erfolgter Reaktion wurde der Reaktionsansatz filtriert, im Membranpumpenvakuum eingeeengt und anschließend aus Isopropanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 5,57 g (68 %). Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp. 162 °C (Zers.)).

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1):

$R_T = 11,8$ min

IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2920 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta = 0,85$ (t, 3H, CH_3 , $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,30 (m, 24H, CH_2 -Kette), 1,50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), 2,26 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,2$ Hz), 3,08 (ddd, 1H, C(4) HOH), 3,22 (m, 1H, C(2) HOH), 3,52 (ddd, 1H, C(3) HOH), 3,85 (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5) HCH_2), 3,99 (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H), 4,20 (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H), 4,67 (d, 1H, C(2) HOH), 4,79 (s, br, 1H, C(3) HOH), 4,79 (d, 1H, C(1) HOH), 4,98 (d, 1H, C(4) HOH).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta = 14,2$ (2 x CCH_3), 22,8 (2 x $\omega\text{-2-C}$), 24,8 (2 x $\beta\text{-C}$), 29,2-29,8 (2 x 8 Signale, CH_2 -Kette), 32,1 (2 x $\omega\text{-3-C}$), 34,1 (2 x $\alpha\text{-C}$), 63,7 (2 x C(6)HOH), 70,3 (2 x C(5)HOH), 70,8 (2 x C(4)HOH), 72,1 (2 x C(2)HOH), 73,4 (2 x C(3)HOH), 94,0 (2 x C(1)HOH), 172,7 (2 x COOR).

5.5.2.20 6,6'-O,O'-Distearoyl- α - α' -trehalose (20, $M = 875,23$ g/mol)

10 mmol (3,42 g) α - α' -Trehalose und 30 mmol Stearinsäurevinylester (9,34 g) wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 24 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch RP-HPLC. Nach erfolgter Reaktion wurde der Reaktionsansatz filtriert, im Membranpumpenvakuum eingeeengt und anschließend aus Isopropanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 5,69 g (65 % bezogen auf Trehalose). Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp. 164 °C (Zers.)).

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1): $R_T = 16,2$ min**IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):**

$\bar{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2920 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 0,85$ (t, 3H, $\underline{\text{CH}_3}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,23 (m, 28H, CH_2 -Kette), 1,50 (m, 2H, $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -COOR), 2,26 (t, 2H, CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -COOR, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,2$ Hz), 3,08 (ddd, 1H, C(4) $\underline{\text{H}}\text{OH}$), 3,22 (m, 1H, C(2) $\underline{\text{H}}\text{OH}$), 3,52 (ddd, 1H, C(3) $\underline{\text{H}}\text{OH}$), 3,85 (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5) $\underline{\text{H}}\text{CH}_2$), 3,99 (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\underline{\text{H}}\text{C}(6)\text{H}$), 4,20 (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{HC}(6)\underline{\text{H}}$), 4,67 (d, 1H, C(2) $\underline{\text{H}}\text{OH}$), 4,79 (s, br, 1H, C(3) $\underline{\text{H}}\text{OH}$), 4,79 (d, 1H, C(1) $\underline{\text{H}}\text{OH}$), 4,98 (d, 1H, C(4) $\underline{\text{H}}\text{OH}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 14,2$ (2 x $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22,8 (2 x ω -2-C), 24,8 (2 x β -C), 29,2-29,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette), 32,1 (2 x ω -3-C), 34,1 (2 x α -C), 63,7 (2 x $\underline{\text{C}}(6)\text{HOH}$), 70,3 (2 x $\underline{\text{C}}(5)\text{HOH}$), 70,8 (2 x $\underline{\text{C}}(4)\text{HOH}$), 72,1 (2 x $\underline{\text{C}}(2)\text{HOH}$), 73,4 (2 x $\underline{\text{C}}(3)\text{HOH}$), 94,0 (2 x C(1)HOH), 172,7 (2 x $\underline{\text{C}}\text{OOR}$).

5.5.2.21 6,6'-O,O'-Dioleoyl- α - α' -trehalose (21**, $M = 871,20$ g/mol)**

10 mmol (3,42 g) α - α' -Trehalose und 30 mmol Ölsäurevinylester (9,26 g) wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 24 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch RP-HPLC. Nach erfolgter Reaktion wurde der Reaktionsansatz filtriert, im Membranpumpenvakuum eingeeengt und anschließend aus Isopropanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 6,10 g (70 % bezogen auf Trehalose). Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp. 165 °C (Zers.)).

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1): $R_T = 11,6$ min**IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):**

$\tilde{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2920 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$), 1650 (w, $\nu(\underline{\text{C=C}})$), 1460 (w, $\delta(\underline{\text{C-H}})$), 1050 (s, $\nu(\underline{\text{C-O}})$), 960, 875 (sw, $\nu(\underline{\text{C-C}})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta =$ 0,85 (t, 3H, CH_3 , $^3\text{J}(\text{H}-\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,23 (m, 20H, CH_2 -Kette), 1,50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), 1,90 (m, 4H, Allylprotonen), 2,26 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3\text{J}(\text{H}-\text{H}) = 7,2$ Hz), 3,08 (ddd, 1H, C(4) HOH), 3,22 (m, 1H, C(2) HOH), 3,52 (ddd, 1H, C(3) HOH), 3,85 (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5) HCH_2), 3,99 (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{HC}(6)\text{H}$), 4,20 (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{HC}(6)\text{H}$), 4,67 (d, 1H, C(2) HOH), 4,79 (s, br, 1H, C(3) HOH), 4,79 (d, 1H, C(1) HOH), 4,98 (d, 1H, C(4) HOH), 5,23 (m, 2H, olefinische Protonen (Kette)).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta =$ 14,2 (2 x CH_3), 22,8 (2 x $\omega\text{-C}$), 24,8 (2 x $\beta\text{-C}$), 27,4 (Allyl-C), 29,2-29,8 (2 x 7 Signale, CH_2 -Kette), 32,1 (2 x $\omega\text{-C}$), 34,1 (2 x $\alpha\text{-C}$), 63,7 (2 x C(6) HOH), 70,3 (2 x C(5) HOH), 70,8 (2 x C(4) HOH), 72,1 (2 x C(2) HOH), 73,4 (2 x C(3) HOH), 94,0 (2 x C(1) HOH), 97,5 (2 x $\text{CH}_2=\text{CHR}$), 141,4 (2 x $\text{CH}_2=\text{CHR}$), 172,7 (2 x COOR).

5.5.2.22 6,6'-O,O'-Dierucaoyl- α - α' -trehalose (22, $M = 983,42$ g/mol)

10 mmol (3,42 g) α - α' -Trehalose und 30 mmol Erucasäurevinylester (10,94 g) wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 24 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch RP-HPLC. Nach erfolgter Reaktion wurde der Reaktionsansatz filtriert, im Membranpumpenvakuum eingeeengt und anschließend aus Isopropanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 6,49 g (66 % bezogen auf Trehalose). Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp. 160 °C (Zers.)).

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1): $R_T = 25,6$ min**IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):**

$\tilde{\nu} =$ 3450 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2920 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta =$ 0,85 (t, 3H, CH_3 , $^3\text{J}(\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,23 (m, 28H, CH_2 -Kette), 1,50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), 1,90 (m, 4H, Allylprotonen), 2,26 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3\text{J}(\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}) = 7,2$ Hz), 3,08 (ddd, 1H, C(4) HOH), 3,22 (m, 1H, C(2) HOH), 3,52 (ddd, 1H, C(3) HOH), 3,85 (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5) HCH_2), 3,99 (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{HC}(6)\text{H}$), 4,20 (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{HC}(6)\text{H}$), 4,67 (d, 1H, C(2) HOH), 4,79 (s, br, 1H, C(3) HOH), 4,79 (d, 1H, C(1) HOH), 4,98 (d, 1H, C(4) HOH), 5,23 (m, 2H, olefinische Protonen (Kette)).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta =$ 14,2 (2 x CH_3), 22,8 (2 x ω -2-C), 24,8 (2 x β -C), 27,4 (Allyl-C), 29,2-29,8 (2 x 11 Signale, CH_2 -Kette), 32,1 (2 x ω -3-C), 34,1 (2 x α -C), 63,7 (2 x C(6) HOH), 70,3 (2 x C(5) HOH), 70,8 (2 x C(4) HOH), 72,1 (2 x C(2) HOH), 73,4 (2 x C(3) HOH), 94,0 (2 x C(1) HOH), 97,5 (2 x $\text{CH}_2=\text{CHR}$), 141,4 (2 x $\text{CH}_2=\text{CHR}$), 172,7 (2 x COOR).

5.5.2.23 6,6'-O,O'-Dilinoyl- α - α' -trehalose (23**, $M = 867,17$ g/mol)**

10 mmol (3,42 g) α - α' -Trehalose und 30 mmol Linolsäurevinylester (9,20 g) wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 24 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch RP-HPLC. Nach erfolgter Reaktion wurde der Reaktionsansatz filtriert, im Membranpumpenvakuum eingeengt und anschließend aus Isopropanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 6,16 g (71 % bezogen auf Trehalose). Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp. 161 °C (Zers.)).

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1): $R_T = 16,2$ min**IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):**

$\tilde{\nu} =$ 3450 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2920 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta = 0,85$ (t, 3H, CH_3 , $^3\text{J}(\text{H}-\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,23 (m, 8H, CH_2 -Kette), 1,50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), 2,26 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3\text{J}(\text{H}-\text{H}) = 7,2$ Hz), 3,08 (ddd, 1H, C(4) HOH), 3,22 (m, 1H, C(2) HOH), 3,52 (ddd, 1H, C(3) HOH), 3,85 (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5) HCH_2), 3,99 (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{HC}(6)\text{H}$), 4,20 (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\text{HC}(6)\text{H}$), 4,67 (d, 1H, C(2) HOH), 4,79 (s, br, 1H, C(3) HOH), 4,79 (d, 1H, C(1) HOH), 4,98 (d, 1H, C(4) HOH).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100,61 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta = 14,4$ (2 x CH_3), 22,6 (2 x $\omega\text{-2-C}$), 25,1 (2 x $\beta\text{-C}$), 28,9-29,2 (2 x $\gamma\text{-}$ und 2 x $\delta\text{-C}$), 31,7 (2 x $\omega\text{-3-C}$), 34,1 (2 x $\alpha\text{-C}$), 63,7 (2 x C(6) HOH), 70,3 (2 x C(5) HOH), 70,8 (2 x C(4) HOH), 72,1 (2 x C(2) HOH), 73,4 (2 x C(3) HOH), 94,0 (2 x C(1) HOH), 172,7 (2 x COOR).

5.5.2.24 6,6'-O,O'-Di(12-Hydroxystearoyl)- $\alpha\text{-}\alpha'$ -trehalose (24,

$$M = 907,23 \text{ g/mol}$$

10 mmol (3,42 g) $\alpha\text{-}\alpha'$ -Trehalose und 30 mmol 12-(R)-Hydroxystearinsäurevinylester (9,80 g) wurden in 100 ml THF suspendiert und mit 1,00 g Novozym SP 435TM versetzt. Die Umsetzung erfolgte über 24 h bei 60 °C unter Ausschluss von Wasser. Die Verfolgung des Umsatzes erfolgte durch RP-HPLC. Nach erfolgter Reaktion wurde der Reaktionsansatz filtriert, im Membranpumpenvakuum eingeeengt und anschließend aus Isopropanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 5,44 g (60 % bezogen auf Trehalose). Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp. 169 °C (Zers.)).

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1): $R_T = 6,9$ min**IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):**

$\tilde{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2950 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2920 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2860 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1730 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta = 0,85$ (t, 3H, CH_3 , $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,23 (m, 22H, CH_2 -Kette), 1,46 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2$), 1,50 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), 2,26 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,2$ Hz), 3,08 (ddd, 1H, C(4)HOH), 3,22 (m, 1H, C(2)HOH), 3,52 (ddd, 1H, C(3)HOH), 3,61 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2$), 3,85 (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5)HCH₂), 3,99 (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H), 4,20 (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6)H), 4,67 (d, 1H, C(2)HOH), 4,79 (s, br, 1H, C(3)HOH), 4,79 (d, 1H, C(1)HOH), 4,98 (d, 1H, C(4)HOH).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$ [ppm]):

$\delta = 14,4$ (2 x CCH_3), 22,6 (2 x $\omega\text{-C}$), 24,7-25,8 (2 x 3 Signale, $\beta\text{-C}$ und $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-CH}_2$), 29,2-29,8 (2 x 6 Signale, CH_2 -Kette), 34,1 (2 x $\alpha\text{-C}$), 63,7 (2 x C(6)HOH), 70,3 (2 x C(5)HOH), 70,8 (2 x C(4)HOH), 72,1 (2 x C(2)HOH), 73,4 (2 x C(3)HOH), 94,0 (2 x C(1)HOH), 172,7 (2 x COOR).

5.5.2.25 Caprylsäurevinylester (25, $M = 170,25$ g/mol)

Es wurden 26,0 g (150 mmol) Caprylsäure und 1,5 l Vinylacetat eingesetzt und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur für 48 h gerührt. Anschließend wurden Vinylacetat und entstandene Essigsäure am Rotationsverdampfer zur Hälfte abdestilliert.

Nach Zugabe von 50 g Kieselgel zu dem Destillationskolben wurde weiter bis zur Trockne destilliert. Das nun so auf Kieselgel gezogene Rohprodukt wurde säulenchromatografisch gereinigt (Hexan/Essigester: 4/1, Glassäule 60 cm, 2 cm Durchmesser).

Man erhielt 20,17 g (79 %) (DC-rein) einer viskosen, farblosen Flüssigkeit von angenehm charakteristischem Geruch.

DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer):

$R_F = 0,62$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3050$ (w, ν C=C-H), 2980, 2940, 2865 (s, ν C-H), 1765 (s, ν C=O), 1650 (w, ν C=C), 1460 (w, δ C-H), 1050 (s, ν C-O), 960, 875 (sw, ν C-C).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 0,92 (t, 3H, Methylprotonen, $^3\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^1\text{H}) = 6,7$ Hz), 1,33 (m, 8H, CH_2 -Kette), 1,70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOR}$), 2,42 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOR}$, $^3\text{J}(\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}) = 7,5$ Hz), 4,59 (dd, B-Teil eines ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), 4,90 (dd, A-Teil des ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), 7,30-7,35 (4 Linien, X-Teil des ABX-Systems, 1H, Endomethylenproton).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta =$ 14,1 (CH_3), 22,7 (ω -2-C), 24,8 (β -C), 29,0-29,1 (γ - und δ -C), 31,8 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 97,5 ($\text{CH}_2=\text{CHR}$), 141,4 ($\text{CH}_2=\text{CHR}$), 171,0 (COOR).

MS (EI):

m/z (%) = 170 (fehlt) [M^+], 127 (100) [Acyliumion], 112 (3) [$127 - \text{C}_2\text{H}_5$], 98 (3) [$127 - \text{C}_3\text{H}_7$], 85 (20) [$\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_{13}$ und $\text{C}_6\text{H}_{13}^+$], 84 (20) [$127 - \text{C}_4\text{H}_9$], 71 (62) [$\text{C}_5\text{H}_{11}^+$], 70 (4) [$127 - \text{C}_5\text{H}_{11}$], 69 (19) [$\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^+$], 57 (15) [C_4H_9^+ und $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$], 55 (27) [$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}^+$], 43 (46) [C_3H_7^+], 42 (11) [$127 - \text{C}_6\text{H}_{13}$], 41 (46) [McLafferty, Allylsplaltung].

5.5.2.26 Caprinsäurevinylester (26, $M = 198,30$ g/mol)

Es wurden 31,0 g (200 mmol) Caprinsäure (99 %) und 250 ml Vinylacetat mit 400 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ und 170 mg (3,0 mmol) gepulvertem KOH bei RT gerührt. Nach 24 h wurde mittels DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer) der Umsatz geprüft. Bei vollständig abgelaufener Reaktion wurde über Celite 545 filtriert und das überschüssige Vinylacetat im Vakuum (Membranpumpe) abdestilliert. Zur weiteren Aufreinigung und vollständigen Abtrennung überschüssiger Caprinsäure erfolgte zweimalige Filtration an trockenem Kieselgel 60 mesh (Glassäule 60 cm, 2 cm Durchmesser).

Man erhielt 32,52 g (82 %, DC-rein) einer viskosen, farblosen Flüssigkeit.

DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer):

$R_F = 0,65$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu}$ = 3050(w, ν C=C-H), 2980, 2940, 2865 (s, ν C-H), 1765 (s, ν C=O), 1650 (w, ν C=C), 1460 (w, δ C-H), 1050 (s, ν C-O), 960, 875 (sw, ν C-C).

 $^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3 [ppm]):

δ = 0,92 (t, 3H, Methylprotonen, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,7$ Hz), 1,31 (m, 12H, CH_2 -Kette), 1,70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOR}$), 2,41 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,5$ Hz), 4,59 (dd, B-Teil eines ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), 4,90 (dd, A-Teil des ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), 7,29-7,35 (4 Linien, X-Teil des ABX-Systems, 1H, Endomethylenproton).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3 [ppm]):

δ = 14,2 (CH_3), 22,8 (ω -2-C), 24,8 (β -C), 29,1-29,5 (4 Signale, CH_2 -Kette), 32,0 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 97,5 ($\text{CH}_2=\text{CHR}$), 141,4 ($\text{CH}_2=\text{CHR}$), 171,0 (COOR).

MS (EI):

m/z (%) = 198 (fehlt) [M^+], 155 (100) [Acyliumion], 156 (11) [$155 + \text{H}$], 126 (3) [$155 - \text{C}_2\text{H}_5$], 112 (3) [$155 - \text{C}_3\text{H}_7$], 98 (4) [$155 - \text{C}_4\text{H}_9$], 85 (35) [$\text{M}^+ - \text{C}_8\text{H}_{17}$ und $\text{C}_6\text{H}_{13}^+$], 84 (4) [$155 - \text{C}_5\text{H}_{11}$], 71 (62) [$\text{C}_5\text{H}_{11}^+$], 69 (22) [$\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^+$], 57 (64) [C_4H_9^+ und $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$], 55 (39) [$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}^+$], 43 (53) [C_3H_7^+], 41 (32) [McLafferty, Allylsplaltung].

5.5.2.27 Myristinsäurevinylester (27, $M = 254,41$ g/mol)

Es wurden 41,1 g (88 mmol) Myristinsäure (97 %) und 200 ml Vinylacetat mit 200 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ und 1,00 g (18 mmol) gepulvertem KOH bei RT gerührt. Nach 24 - 48 h wurde mittels DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer) der Umsatz geprüft. Bei vollständig abgelaufener Reaktion wurde über Celite 545 filtriert und das überschüssige Vinylacetat im Vakuum (Membranpumpe) abdestilliert. Zur weiteren Aufreinigung und vollständigen Abtrennung überschüssiger Myristinsäure erfolgte Filtration des in Heptan gelösten, zunächst flüssigen Produkts an trockenem Kieselgel 60 mesh (Glassäule 60 cm, 2 cm Durchmesser). Der Myristinsäurevinylester wurde durch Umkristallisation aus Hexan nochmals gereinigt.

Man erhielt 16,82 g (75 %, Reinheit > 98 % (HPLC)) farblose, blättrige Kristalle (Schmp.: 23 °C).

HPLC (RP-18, s. AAV 3):

$R_T = 8,4$ min

DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer):

$R_F = 0,73$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3050$ (w, ν $\text{C}=\underline{\text{C}}-\text{H}$), 2980, 2940, 2865 (s, ν $\underline{\text{C}}-\text{H}$), 1765 (s, ν $\underline{\text{C}}=\underline{\text{O}}$), 1650 (w, ν $\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}$), 1460 (w, δ $\underline{\text{C}}-\text{H}$), 1050 (s, ν $\underline{\text{C}}-\underline{\text{O}}$), 960, 875 (w, ν $\underline{\text{C}}-\underline{\text{C}}$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 0,92$ (t, 3H, Methylprotonen, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,30 (m, 20H, CH_2 -Kette), 1,70 (m, 2H, $\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{-COOR}$), 2,42 (t, 2H, $\underline{\text{CH}}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,2$ Hz), 4,59 (dd, B-Teil eines ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), 4,91 (dd, A-Teil des ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), 7,30-7,35 (4 Linien, X-Teil des ABX-Systems, 1H, Endomethylenproton).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 14,2$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22,8 (ω -2-C), 24,8 (β -C), 29,2-29,8 (7 Signale, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette), 32,1 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 97,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CHR}$), 141,4 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{HR}$), 171,0 ($\underline{\text{C}}\text{OOR}$).

MS (EI):

m/z (%) = 254 (fehlt) [M^+], 211 (94) [Acyliumion], 212 (20) [$211 + \text{H}$], 137 (5) [$\text{C}_{10}\text{H}_{19}^+$], 123 (8) [$\text{C}_9\text{H}_{17}^+$], 111 (11) [$\text{C}_8\text{H}_{15}^+$], 109 (16) [$\text{C}_8\text{H}_{13}^+$], 99 (5) [$\text{C}_7\text{H}_{15}^+$], 98 (6) [$211 - \text{C}_8\text{H}_{17}$], 95 (27) [$\text{C}_7\text{H}_{11}^+$], 85 (29) [$\text{M}^+ - \text{C}_{12}\text{H}_{25}$ und $\text{C}_6\text{H}_{13}^+$], 83 (18) [$\text{C}_5\text{H}_7\text{O}^+$], 81 (18) [C_6H_9^+], 71 (55) [$\text{C}_5\text{H}_{11}^+$], 69 (30) [$\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^+$], 57 (100) [$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$ und C_4H_9^+], 55 (49) [$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}^+$], 43 (79) [C_3H_7^+], 41 (50) [McLafferty, Allylsplaltung].

5.5.2.28 Palmitinsäurevinylester (**28**, $M = 282,46$ g/mol)

Es wurden 46,2 g (100 mmol) Palmitinsäure (97 %) und 200 ml Vinylacetat mit 400 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ und 100 mg (1,8 mmol) gepulvertem KOH bei 60 °C gerührt. Nach 24 h wurde mittels DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer) der Umsatz geprüft. Nach erfolgter Reaktion wurde über Celite 545 filtriert und das überschüssige Vinylacetat im Vakuum (Membranpumpe) abdestilliert. Die Essigsäure wurde bei 60 °C im Ölpumpenvakuum abgezogen. Zur weiteren Aufreinigung und vollständigen Abtrennung überschüssiger Palmitinsäure erfolgte Filtration des in Heptan gelösten, zunächst flüssigen Produkts an trockenem Kieselgel 60 mesh (Glassäule 60 cm, 2 cm Durchmesser).

Man erhielt 18,10 g (64 %, Reinheit > 98 % (HPLC)) eines farblosen Feststoffs (Schmp.: 27 °C).

HPLC (RP-18, s. AAV 3):

$R_T = 9,3$ min

DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer):

$R_F = 0,74$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3050$ (w, ν C=C-H), 2980, 2940, 2865 (s, ν C-H), 1765 (s, ν C=O), 1650 (w, ν C=C), 1460 (w, δ C-H), 1050 (s, ν C-O), 960, 875 (sw, ν C-C).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 0,92$ (t, 3H, Methylprotonen, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,30 (m, 24H, CH_2 -Kette), 1,70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOR}$), 2,42 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,5$ Hz), 4,59 (dd, B-Teil eines ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), 4,90 (dd, A-Teil des ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), 7,30-7,35 (4 Linien, X-Teil des ABX-Systems, 1H, Endomethylenproton).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 14,2$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22,8 (ω -2-C), 24,8 (β -C), 29,2-29,8 (8 Signale, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette), 32,1 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 97,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CHR}$), 141,4 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{HR}$), 171,0 ($\underline{\text{C}}\text{OOR}$).

MS (EI):

m/z (%) = 282 (fehlt) [M^+], 239 (100) [Acyliumion], 240 (20) [239 + H], 137 (4) [$\text{C}_{10}\text{H}_{19}^+$], 123 (8) [$\text{C}_9\text{H}_{17}^+$], 111 (5) [$\text{C}_8\text{H}_{15}^+$], 109 (15) [$\text{C}_8\text{H}_{13}^+$], 99 (7) [$\text{C}_7\text{H}_{15}^+$], 98 (7) [239 - C_8H_{17}], 97 (7) [$\text{C}_6\text{H}_9\text{O}^+$], 95 (25) [$\text{C}_7\text{H}_{11}^+$], 85 (31) [$\text{M}^+ - \text{C}_{14}\text{H}_{29}$ und $\text{C}_6\text{H}_{13}^+$], 83 (27) [$\text{C}_5\text{H}_7\text{O}^+$], 81 (17) [C_6H_9^+], 71 (50) [$\text{C}_5\text{H}_{11}^+$], 69 (30) [$\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^+$], 57 (87) [$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$ und C_4H_9^+], 55 (49) [$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}^+$], 43 (71) [C_3H_7^+], 41 (43) [McLafferty, Allylsplaltung].

5.5.2.29 Stearinsäurevinylester (**29**, $M = 310,52 \text{ g/mol}$)

Es wurden 51,2 g (100 mmol) Stearinsäure (Reinheit 90 %) und 400 ml Vinylacetat mit 300 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ und 200 mg (3,6 mmol) gepulvertem KOH bei 60 °C gerührt. Nach 24 h wurde mittels DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer) der Umsatz geprüft. Bei weitgehend vollständig verlaufener Reaktion wurde das überschüssige Vinylacetat am Rotationsverdampfer abgezogen und danach die Essigsäure im Ölpumpenvakuum (0,001 bar) bei 60 °C gründlich entfernt. Anschließend wurde der feste Rückstand in Ether gelöst, 20 g basisches Aluminiumoxid zugefügt, aufgekocht und über Celite 545 filtriert. Zur weiteren Aufreinigung und vollständigen Abtrennung überschüssiger Stearinsäure erfolgte Filtration des in Hexan gelösten Vinylesters an trockenem Kieselgel 60 mesh (Glassäule 60 cm, 2 cm Durchmesser). Der Stearinsäurevinylester wurde durch Umkristallisation aus Hexan nochmals gereinigt.

Man erhielt 23,29 g (75 %, Reinheit > 98 % (GC)) eines farblosen Feststoffs (Schmp.: 45 °C).

HPLC (RP-18, s. AAV 3): $R_T = 12,3 \text{ min}$

GC (s. Abschnitt 5.1): $R_T = 17,0 \text{ min}$

DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer): $R_F = 0,75$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\bar{\nu} = 3050$ (w, ν $\text{C}=\underline{\text{C}}-\text{H}$), 2980, 2940, 2865 (s, ν $\underline{\text{C}}-\text{H}$), 1765 (s, ν $\underline{\text{C}}=\text{O}$), 1650 (w, ν $\underline{\text{C}}=\text{C}$), 1460 (w, δ $\underline{\text{C}}-\text{H}$), 1050 (s, ν $\underline{\text{C}}-\text{O}$), 960, 875 (sw, ν $\underline{\text{C}}-\text{C}$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 0,92$ (t, 3H, Methylprotonen, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8 \text{ Hz}$), 1,30 (m, 28H, CH_2 -Kette), 1,70 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{-COOR}$), 2,42 (t, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,2 \text{ Hz}$), 4,59 (dd, B-Teil eines ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), 4,91 (dd, A-Teil des ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), 7,30-7,35 (4 Linien, X-Teil des ABX-Systems, 1H, Endomethylenproton).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 14,2$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22,8 (ω -2-C), 24,8 (β -C), 29,2-29,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette), 32,1 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 97,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CHR}$), 141,4 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{HR}$), 171,0 ($\underline{\text{C}}\text{OOR}$).

MS (EI):

m/z (%) = 311 (fehlt) $[M^+]$, 267 (87) [Acyliumion], 268 (16) $[267 + H]$, 239 (4) $[M^+ - C_5H_{11}]$, 196 (2) $[267 - C_5H_{11}]$, 182 (2) $[267 - C_6H_{13}]$, 151 (2) $[C_{11}H_{19}]$, 137 (6) $[C_{10}H_{19}^+]$, 123 (10) $[C_9H_{17}^+]$, 111 (10) $[C_8H_{15}^+]$, 109 (15) $[C_8H_{13}^+]$, 99 (8) $[C_7H_{15}^+]$, 98 (8) $[267 - C_{10}H_{21}]$, 97 (25) $[C_6H_9O^+]$, 95 (25) $[C_7H_{11}^+]$, 85 (31) $[M^+ - C_{16}H_{33} \text{ und } C_6H_{13}^+]$, 83 (27) $[C_5H_7O^+]$, 81 (17) $[C_6H_9^+]$, 71 (50) $[C_5H_{11}^+]$, 69 (30) $[C_4H_5O^+]$, 67 (14) $[C_5H_7]$, 57 (87) $[C_3H_5O^+ \text{ und } C_4H_9^+]$, 55 (49) $[C_3H_3O^+]$, 43 (71) $[C_3H_7^+]$, 41 (43) [McLafferty, Allylsplaltung].

5.5.2.30 12-(*R*)-Hydroxystearinsäurevinylester (**30**,

$M = 326,51 \text{ g/mol}$)

Es wurden 30,0 g (100 mmol) 12-(*R*)-Hydroxystearinsäure (Reinheit 85 %) und 400 ml Vinylacetat mit 300 mg $Pd(OAc)_2$ und 100 mg (1,8 mmol) gepulvertem KOH bei 75 °C gerührt. Nach 24 h wurde mittels DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer) der Umsatz geprüft. Bei vollständig abgelaufener Reaktion wurde das überschüssige Vinylacetat am Rotationsverdampfer abgezogen und danach die Essigsäure im Ölpumpenvakuum (0,001 bar) bei 60 °C gründlich entfernt. Anschließend wurde der feste Rückstand in Ether gelöst, 20 g basisches Aluminiumoxid zugefügt, aufgekocht und über Celite 545 filtriert. Zur weiteren Aufreinigung und vollständigen Abtrennung überschüssiger 12-(*R*)-Hydroxystearinsäure erfolgte Filtration des in Hexan gelösten Vinylesters an trockenem Kieselgel 60 mesh (Glassäule 60 cm, 2 cm Durchmesser). Der 12-(*R*)-Hydroxystearinsäurevinylester wurde durch Umkristallisation aus Ether nochmals gereinigt.

Man erhielt 22,6 g (70 %, > 98 % (HPLC)) eines farblosen Feststoffs (Schmp.: 44-45 °C).

HPLC (RP-18, s. AAV 3):

$R_T = 8,6 \text{ min}$

DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer):

$R_F = 0,41$

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -0,8$ ($c = 1$, EtOH)

IR (Film, in cm^{-1}):

$\bar{\nu} = 3600-3100$ (vs, $\nu(OH)$), 3050 (w, $\nu C=C-H$), 2980, 2940, 2865 (s, $\nu C-H$), 1765 (s, $\nu C=O$), 1650 (w, $\nu C=C$), 1460 (w, $\delta C-H$), 1050 (s, $\nu C-O$), 960, 875 (sw, $\nu C-C$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 0,92$ (t, 3H, Methylprotonen, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,7$ Hz), $1,32$ (m, 22H, CH_2 -Kette), $1,46$ (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2$), $1,69$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOR}$), $2,41$ (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,5$ Hz), $3,61$ (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2$), $4,59$ (dd, B-Teil eines ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), $4,90$ (dd, A-Teil des ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton), $7,29\text{-}7,34$ (4 Linien, X-Teil des ABX-Systems, 1H, Endomethylenproton).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 14,2$ (CH_3), $22,7$ ($\omega\text{-}2\text{-C}$), $24,7\text{-}25,8$ (3 Signale, $\beta\text{-C}$ und $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-CH}_2$), $29,2\text{-}29,8$ (6 Signale, CH_2 -Kette), $32,0\text{+}32,1$ ($\omega\text{-}3\text{-C}$ und CH_2 -Kette), $34,1$ ($\alpha\text{-C}$), $37,6\text{+}37,7$ ($\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2$), $72,1$ (HCOH), $97,5$ ($\text{CH}_2\text{=CHR}$), $141,4$ ($\text{CH}_2\text{=CHR}$), $171,0$ (COOR).

MS (EI):

m/z (%) = 327 (fehlt) [M^+], 283 (11) [Acyliumion], 284 (3) [$283 + \text{H}$], 265 (9) [$283 - \text{H}_2\text{O}$], 151 (4) [$\text{C}_{11}\text{H}_{19}^+$], 137 (6) [$\text{C}_{10}\text{H}_{19}^+$], 123 (3) [$\text{C}_9\text{H}_{17}^+$], 111 (12) [$\text{C}_8\text{H}_{15}^+$], 109 (14) [$\text{C}_8\text{H}_{13}^+$], 99 (7) [$\text{C}_7\text{H}_{15}^+$], 98 (14) [$283 - \text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{OH}$], 97 (37) [$\text{C}_6\text{H}_9\text{O}^+$], 95 (43) [$\text{C}_7\text{H}_{11}^+$], 85 (13) [$\text{M}^+ - \text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{OH}$ und $\text{C}_6\text{H}_{13}^+$], 83 (29) [$\text{C}_5\text{H}_7\text{O}^+$], 81 (31) [C_6H_9^+], 71 (16) [$\text{C}_5\text{H}_{11}^+$], 69 (50) [$\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^+$], 67 (25) [C_5H_7], 57 (31) [$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$ und C_4H_9^+], 55 (100) [$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}^+$], 43 (55) [C_3H_7^+], 41 (40) [McLafferty, Allylsplaltung].

5.5.2.31 Ölsäurevinylester (31, $M = 308,50$ g/mol)

Es wurden 5,08 g (10 mmol) Ölsäure (99,9 %, Sigma-Aldrich) und 50 ml Vinylacetat mit 30 mg Pd(OAc)_2 und 5,6 mg (0,1 mmol) gepulvertem KOH bei RT gerührt. Nach 24 h wurde mittels DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer) der Umsatz geprüft. Bei vollständig abgelaufener Reaktion wurde filtriert und das überschüssige Vinylacetat im Vakuum (Membranpumpe) abdestilliert. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte Filtration an trockenem Kieselgel 60 mesh (Glassäule 5 cm, 1 cm Durchmesser). Letztlich wird überschüssige Ölsäure durch Chromatografie an Kieselgel 60 mesh (Heptan, Glassäule 60 cm, 2 cm Durchmesser) abgetrennt.

Man erhielt 2,35 g (76 %, HPLC) einer viskosen, farblosen Flüssigkeit. Der Vinylester wird unter Licht und Luftausschluss aufbewahrt.

HPLC (RP-18, s. AAV 3):

$R_T = 21,4$ min

DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer):

$R_F = 0,59$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3100, 3010$ (w, v $\text{C}=\underline{\text{C}}-\text{H}$), 2980, 2940, 2865 (s, v $\text{C}-\text{H}$), 1765 (s, v $\text{C}=\text{O}$), 1650 (w, v $\text{C}=\text{C}$), 1460 (w, δ $\text{C}-\text{H}$), 1050 (s, v $\text{C}-\text{O}$), 960, 875 (sw, v $\text{C}-\text{C}$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 0,92$ (t, 3H, Methylprotonen, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,34 (m, 20H, CH_2 -Kette), 1,70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOR}$), 2,06 (m, 4H, Allylprotonen), 2,42 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,5$ Hz), 4,59 (dd, B-Teil eines ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton (Vinyl), $|^2J_{\text{AB}}| = 1,5$ Hz, $|^3J_{\text{AX}}| = 12,5$ Hz, $|^3J_{\text{BX}}| = 4,7$ Hz), 4,91 (dd, A-Teil des ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton (Vinyl)), 5,39 (m, 2H, olefinische Protonen (Kette)), 7,30-7,34 (4 Linien, X-Teil des ABX-Systems, 1H, Endomethylenproton (Vinyl)).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 14,2$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22,8 (ω -2-C), 24,7 (β -C), 27,3+27,4 (Allyl-C), 29,2-29,9 (7 Signale, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette), 32,0 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 97,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CHR}$), 129,8+130,2 (Olefin-C (Kette)), 141,4 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{HR}$), 170,9 ($\underline{\text{C}}\text{OOR}$).

MS (EI):

m/z (%) = 308 (2) [M^+], 265 (59) [α -Spaltung, $M^+ - CH_2=CHO$], 264 (20) [265 - H], 236 (2) [α -Spaltung, McLafferty, 264 - CO], 193 (2) [Sekundärspaltung, 265 - C_5H_{11}], 165 (5) [165 - CO - C_5H_{11}], 67 (43) [265 - CO - $C_{12}H_{23}$], 41 (62) [McLafferty, Allylspaltung]; Typische Fragmente für Ölsäurefragmente aus 181 (2) [McLafferty, Allylspaltung]: 165 (3), 151 (4), 138 (7), 123 (12), 109 (23), 95 (47), 81 (72), 67 (100), 53 (9); Typische Fragmente für Ölsäurefragmente aus 163 (5) [193 - CO]: 149 (7), 135 (9), 121 (11), 107 (10), 93 (18), 79 (33), 65 (5).

5.5.2.32 Linolsäurevinylester (32, $M = 306,48$ g/mol)

Es wurden 15,4 g (55 mmol) Linolsäure (99,9 %) und 500 ml Vinylacetat mit 30 mg $Pd(OAc)_2$ und 5,6 mg (0,1 mmol) gepulvertem KOH bei RT gerührt. Nach 24 h wurde mittels DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer) der Umsatz geprüft. Nach weitgehend vollständig verlaufener Reaktion wurde filtriert und das überschüssige Vinylacetat im Vakuum (Membranpumpe) abdestilliert. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte Filtration an trockenem Kieselgel 60 (Heptan, Glassäule 5 cm, 1 cm Durchmesser). Letztlich wird überschüssige Linolsäure durch Chromatografie an Kieselgel 60 (HE/EE = 8/2, Glassäule 60 cm, 2 cm Durchmesser) abgetrennt.

Man erhielt 13,82 g (82 %, HPLC) einer viskosen, farblosen Flüssigkeit. Der Vinylester wird unter Licht- und Luftausschluss aufbewahrt.

HPLC (RP-18, s. AAV 3):

$R_T = 16,4$ min

DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer):

$R_F = 0,61$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3090, 3005$ (w, ν $C=C-H$), 2980, 2920, 2855 (s, ν $C-H$), 1760 (s, ν $C=O$), 1645 (w, ν $C=C$), 1460 (w, δ $C-H$), 1145 (s, ν $C-O$), 950, 870 (sw, ν $C-C$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 0,93$ (m, 3H, CH_3), 1,29-1,44 (m, 14H, CH_2 -Kette), 1,70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOR}$), 2,09 (m, 4H, monoallylische Protonen), 2,42 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOR}$, $^3\text{J}(\text{H}^1\text{H}) = 7,5$ Hz), 2,81 (dd als t, 2H, biallylische Protonen, $^3\text{J}(\text{H}^1\text{H}) = 6,3$ Hz), 4,59 (dd, B-Teil eines ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton (Vinyl)), 4,90 (dd, A-Teil des ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton (Vinyl)), 5,34-5,46 (m, 4H, olefinische Protonen (Kette)), 7,30-7,35 (4 Linien, X-Teil des ABX-Systems, 1H, Endomethylenproton (Vinyl)).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3 [ppm]):

$\delta = 14,2$ (CH_3), 22,8 (ω -2-C), 24,7+25,8 (β -C und Biallyl-C), 27,32+27,35 (Monoallyl-C), 29,2-31,7 (7 Signale, CH_2 -Kette), 32,0 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 97,5 ($\text{CH}_2=\text{CHR}$), 128,1+128,2 (C-10 und C-12), 130,1+130,3 (C-9 und C-13), 141,4 ($\text{CH}_2=\text{CHR}$), 170,9 (COOR).

MS (EI):

m/z (%) = 306 (8) [M^+], 263 (17) [α -Spaltung, $\text{M}^+ - \text{CH}_2=\text{CHO}$], 262 (20) [263 – H], 234 (3) [262 – CO], 191 (3) [Sekundärspaltung, 262 – C_5H_{11}], 41 (63) [McLafferty, Allylspaltung]; Typische Fragmente für Linolsäurefragmente aus 179 (2) [McLafferty, Allylspaltung]: 165 (3), 151 (4), 138 (7), 123 (12), 109 (23), 95 (47), 81 (72), 67 (100), 53 (9); Typische Fragmente für Linolsäurefragmente aus 163 (5) [191 - CO]: 149 (7), 135 (9), 121 (11), 107 (10), 93 (18), 79 (33), 65 (5).

5.5.2.33 Erucasäurevinylester (33, $M = 364,61$ g/mol)

Es wurden 33,96 g (100 mmol) Erucasäure (95 %) und 250 ml Vinylacetat mit 100 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ und 56 mg (1 mmol) gepulvertem KOH bei RT gerührt. Nach 24 h wurde mittels DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer) der Umsatz geprüft. Bei vollständig abgelaufener Reaktion wurde filtriert und das überschüssige Vinylacetat im Vakuum (Membranpumpe) abdestilliert. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte zweimalige Filtration an trockenem Kieselgel 60 mesh (Heptan, Glassäule 60 cm, 2 cm Durchmesser).

Man erhielt 29,17 g (80 %) einer viskosen, farblosen Flüssigkeit. Der Vinylester wird unter Licht und Luftausschluss aufbewahrt.

HPLC (RP-18, s. AAV 3): $R_T = 50,5$ min**DC (HE/EE = 8/2, Iodkammer):** $R_F = 0,67$

IR (Film, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu}$ = 3090, 3000 (w, ν C=C-H), 2920, 2855 (s, ν C-H), 1760 (s, ν C=O), 1645 (w, ν C=C), 1460 (w, δ C-H), 1050 (s, ν C-O), 950, 870 (w, ν C-C).

 $^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3 [ppm]):

δ = 0,93 (t, 3H, Methylprotonen, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,32-1,35 (m, 28H, CH_2 -Kette), 1,70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COOR}$), 2,06 (m, 4H, Allylprotonen), 2,42 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,5$ Hz), 4,60 (dd, B-Teil eines ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton (Vinyl)), 4,91 (dd, A-Teil des ABX-Systems, 1H, Exomethylenproton (Vinyl)), 5,39 (m, 2H, olefinische Protonen (Kette)), 7,30-7,35 (4 Linien, X-Teil des ABX-Systems, 1H, Endomethylenproton (Vinyl)).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3 [ppm]):

δ = 14,2 (CH_3), 22,8 (ω -2-C), 24,7 (β -C), 27,4 (Allyl-C), 29,2-29,9 (11 Signale, CH_2 -Kette), 32,0 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 97,5 ($\text{CH}_2=\text{CHR}$), 130,01+130,05 (Olefin-C (Kette)), 141,4 ($\text{CH}_2=\text{CHR}$), 171,0 (COOR).

5.5.2.34 1,4-Dilauroyl-meso-erythritol (34**, $M = 486,73$ g/mol)**

Gemäß AAV 1 wurden 2,723 g (10 mmol) meso-Erythritol mit 6,78 g (30 mmol) Laurinsäurevinylester in 100 ml Dimethoxyethan bei 50 °C in Gegenwart von 1,50 g Novozym SP 435TM 24 h umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz heiß filtriert, der Filtrerrückstand mit 60 ml heißem THF gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum (Membranpumpe) am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Diisopropylether umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 121 °C).

Ausbeute: 4,14 g (85 % bezogen auf Erythritol)

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1):

$R_T = 16,1$ min

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5/1$, H_2O):

$R_F = 0,82$

IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu}$ = 3450 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2930 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2900 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2880 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2830 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1720 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 0,89$ (t, 2 x 3H, CH_3 , $^3\text{J}(\text{H}^1\text{H}^1\text{H}) = 6,8$ Hz), 1,27 (m, 2 x 16H, CH_2 -Kette), 1,63 (m, 2 x 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), 2,37 (t, 2 x 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3\text{J}(\text{H}^1\text{H}^1\text{H}) = 7,4$ Hz), 2,73 (m, 2 x 1H, CHOH), 3,78 (m, 2 x 1H, CHOH), 4,33 (m, 2 x 2H, CH_2OAcyl).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 14,5$ (2 x CH_3), 22,7 (2 x ω -2-C), 25,1 (2 x β -C), 29,0-29,4 (6 Signale, 2 x CH_2 -Kette), 31,9 (2 x ω -3-C), 34,1 (2 x α -C), 65,5 (2 x CH_2OAcyl), 70,6 (2 x CHOH), 173,2 (2 x COOR).

5.5.2.35 1(4)-sn-Lauroyl-meso-erythritol (35, $M = 304,43$ g/mol)

In einem 250-ml-Rundkolben wurden 13,62 g (50 mmol) meso-Erythritol mit 2,26 g (10 mmol) Laurinsäurevinylester in 100 ml DME in Gegenwart von 1,50 g Novozym SP 435TM bei 50 °C 24 h umgesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz heiß abfiltriert, der Filtrerrückstand mit 60 ml heißem THF gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum (Membranpumpe) am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zweifach aus Isopropanol umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 127 °C).

Ausbeute: 2,37 g (78 % bezogen auf Laurinsäurevinylester)

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1):

$R_T = 6,6$ min

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5/1$, Vanillin/ H_2SO_4):

$R_F = 0,69$

IR (KBr-Pressling, in cm^{-1}):

$\tilde{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2930 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2900 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2880 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2830 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1720 (vs, $\nu(\text{C=O})$).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, d_4 -MeOH [ppm]):

$\delta = 0,87$ (t, 3H, CH_3), 1,20-1,35 (m, 16H, CH_2 -Kette), 1,61 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), 2,35 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3\text{J}(\text{H}^1\text{H}^1\text{H}) = 7,2$ Hz), 3,58 (m, 2H, CH_2OAcyl), 3,72 (m, 2H, CH_2OH), 4,14 (m, 1H, $\text{CHCH}_2\text{OAcyl}$), 4,29 (m, 1H, CHCH_2OH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, d_4 -MeOH [ppm]):

$\delta = 14,4$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), $23,7$ (ω -2-C), $26,0$ (β -C), $30,2$ - $30,7$ (5 Signale, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette), $33,0$ (ω -3-C), $35,0$ (α -C), $64,6$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$), $67,1$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OAcyl}$), $71,4$ ($\underline{\text{C}}\text{HCH}_2\text{OAcyl}$), $73,5$ ($\underline{\text{C}}\text{HCH}_2\text{OH}$), $175,6$ (2 x $\underline{\text{C}}\text{OOR}$).

5.5.2.36 2-Desoxi-2-*t*-butyloxycarbonylamino-D-glucose (*N*-BOC-Glucosamin) (**36**, $M = 279,29$ g/mol)

In einem 250-ml-Rundkolben wurden 10.0 g (46 mmol) Glucosaminhydrochlorid ($M = 215,64$ g/mol) mit 100 ml wasserfreien Methanol sowie mit 10 ml (72 mmol) Triethylamin ($M = 101,19$ g/mol, $d_{20}=0,73$ g/cm³) versetzt. Daraufhin wurden unter Eiskühlung 12,0 g (55 mmol) Di-*t*-butyl-dicarbonat ((BOC)₂O) ($M = 218,25$ g/mol) vorsichtig hinzugefügt und die Mischung 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand aus Ethylacetat/Ethanol (2:1 (v/v)) und wenig Wasser umkristallisiert. Man erhielt nach Trocknung 9,16 g (32,8 mmol, Ausbeute = 71 %) farblose blättchenförmige Kristalle ($M = 279,29$ g/mol) mit einem Schmp. von 192 - 194 °C (Zers.).

IR (KBr-Pressling, in cm⁻¹):

$\tilde{\nu} = 3450$ (ss, br, $\nu(\text{O-H})$, $\nu(\text{N-H (Urethan)})$), 2930 (m), 2915 (m, sh), 2870 (w, $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 1685 (vs, $\nu(\text{C=O (Urethan)})$), 1530 (s, $\delta(\text{N-H (Urethan)})$), 1440 (m), 1415 (m, $\delta_{\text{as,s}} \text{CH}_2$, $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1385 (m), 1365 (s, $\delta_{\text{s}}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$), 1240 (s, $\delta(\text{OH})$), 1115 (s, $\nu(\text{C-O})$), 1075 (m), 1045 (m), 1025 (s), 1000 (m), 910 (m), 860 (s), 780 (m), 680 (m).

 ^1H -NMR (400,132 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 1,38$ (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), $3,01$ - $3,11$ (m, 1H, $\text{C}(4)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $3,13$ - $3,25$ (m, 1H, $\text{C}(2)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $3,34$ - $3,5$ (m, 2H, $\text{C}(3)\underline{\text{H}}\text{OH}$ und $\underline{\text{H}}\text{C}(6)\text{HOH}$), $3,50$ - $3,60$ (m, 2H, $\text{HC}(6)\underline{\text{H}}\text{OH}$ und $\text{C}(5)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $4,27$ - $4,35$ (m, 1H, $\text{HC}(6)\text{HOH}$), $4,57$ (d, 1H, $^3\text{J}=5,6$ Hz, $\text{C}(3)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $4,83$ (d, 1H, $^3\text{J}=5,2$ Hz, $\text{C}(4)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $4,94$ (m, 1H, $\text{C}(1)\underline{\text{H}}\text{OH}$), $6,10$ (d, 1H, $^3\text{J}=8,0$ Hz, $\text{C}(2)\underline{\text{H}}\text{NH}$), $6,29$ (d, 1H, $^3\text{J}=4,0$ Hz, $\text{C}(1)\underline{\text{H}}\text{OH}$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,625 MHz, d_6 -DMSO [ppm]):

$\delta = 29,1$ ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), $56,8$ ($\underline{\text{C}}(2)\text{H}\underline{\text{N}}\text{H}$), $62,5$ ($\underline{\text{C}}(6)\text{H}_2\text{OH}$), $71,4$ ($\underline{\text{C}}(3)\text{HOH}$), $71,9$ ($\underline{\text{C}}(4)\text{HOH}$), $73,0$ ($\underline{\text{C}}(5)\text{HOH}$), $91,6$ ($\text{C}(1)\text{HOH}$), $156,0$ ($\text{C}=\text{O (Urethan)}$).

5.5.2.37 6-O-Lauroyl-2-desoxi-2-t-butyl-oxycarbonylamino-D-glucose

(6-O-Lauroyl-N-BOC-glucosamin) (**37**, $M = 445,60 \text{ g/mol}$)

Gemäß AAV 1 wurden 2,793 g (10 mmol) 2-Desoxi-2-t-butyl-oxycarbonylamino-D-glucose (N-BOC-Glucosamin) **10** mit 2,26 g (10 mmol) Laurinsäurevinylester in 100 ml THF bei 50 °C 24 h umgesetzt. Nach positiv verlauener Umsatzkontrolle, wurde der Reaktionsansatz heiß filtriert, der Filtrerrückstand mit 60 ml heißem THF gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum (Membranpumpe) am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Isopropanol umkristallisiert. Das so erhaltene kristalline, farblose Produkt (3,88 g, 87 %) hatte eine Reinheit größer 98 % (HPLC, Schmp.: 127 °C).

HPLC (RP-18, Bed. wie AAV 1): $R_T = 6,4 \text{ min}$

DC (CH₂Cl₂/MeOH = 5/1, Vanillin/H₂SO₄): $R_F = 0,62$

IR (KBr-Pressling, in cm⁻¹):

$\tilde{\nu} = 3450$ (ss, br, $\nu(\text{O-H})$, $\nu(\text{N-H (Urethan)})$), 2930 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2915 (m, sh), 2870 (w, $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$), 2850 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2830 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1720 (vs, $\nu(\text{C=O (Ester)})$) 1685 (vs, $\nu(\text{C=O (Urethan)})$), 1530 (s, $\delta(\text{N-H (Urethan)})$), 1440 (m), 1415 (m, $\delta_{\text{as,s}} \text{CH}_2$, $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1385 (m), 1365 (s, $\delta_s(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$), 1240 (s, $\delta(\text{OH})$), 1115 (s, $\nu(\text{C-O})$), 1075 (m), 1045 (m), 1025 (s), 1000 (m), 910 (m), 860 (s), 780 (m), 680 (m).

¹H-NMR (400,132 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 0,81$ (t, 3H, $\underline{\text{CH}}_3$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,8 \text{ Hz}$), 1,20 (m, 16H, $\underline{\text{CH}}_2$ -Kette), 1,34 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 1,48 (m, 2H, $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -COOR), 2,23 (t, 2H, $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -COOR, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,3 \text{ Hz}$), 3,01-3,11 (m, 1H, $\text{C}(4)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 3,21 (m, 1H, $\text{C}(2)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 3,40 (m, 1H, $\text{C}(3)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 3,64 (m, 1H, $\text{C}(5)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 3,97 (dd, 1H, $\underline{\text{H}}\text{C}(6)\underline{\text{H}}$), 4,25 (dd, 1H, $\text{H}\underline{\text{C}}(6)\underline{\text{H}}$), 4,67 (d, 1H, $^3J=5,7 \text{ Hz}$, $\text{C}(3)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 4,89 (m, 1H, $\text{C}(1)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 5,06 (d, 1H, $^3J=5,2 \text{ Hz}$, $\text{C}(4)\underline{\text{H}}\text{OH}$), 6,12 (d, 1H, $^3J=8,0 \text{ Hz}$, $\text{C}(2)\underline{\text{H}}\text{NH}$), 6,41 (d, 1H, $^3J=4,0 \text{ Hz}$, $\text{C}(1)\underline{\text{H}}\text{OH}$).

¹³C{¹H}-NMR (100,625 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 14,5$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22,7 (ω -2-C), 25,1 (β -C), 29,0-29,4 (7 Signale, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette und $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 31,9 (ω -3-C), 34,1 (α -C), 56,8 ($\underline{\text{C}}(2)\text{HNH}$), 62,5 ($\underline{\text{C}}(6)\text{H}_2\text{OAcyl}$), 71,4 ($\underline{\text{C}}(3)\text{HOH}$), 71,9 ($\underline{\text{C}}(4)\text{HOH}$), 73,0 ($\underline{\text{C}}(5)\text{HOH}$), 91,6 ($\underline{\text{C}}(1)\text{HOH}$), 156,0 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$ (Urethan)).

5.5.2.38 *N*-Lauroyl-6-desoxi-6-amino-D-glucose (**38**,

$$M = 361,48 \text{ g/mol})$$

In einem 250-ml-Rundkolben werden 10,0 mmol (1,79 g) 6-Desoxi-6-amino-D-glucose in 100 ml über Kalium getrocknetem THF suspendiert und dazu 10 mmol (2,26 g) Laurinsäurevinylester und 400 mg Novozym SP 435TM zu der Reaktionsmischung hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 bei Raumtemperatur magnetisch gerührt und danach rasch filtriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer im Membranpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit und der verbleibende amorphe Rückstand zweimal aus Aceton umkristallisiert. Man erhält 3,16 g (88 %) eines hellgelben, kristallinen Feststoffes (Schmp. = 131 °C).

HPLC (RP-18): $R_T = 5,4 \text{ min}$

DC (CH₂Cl₂/MeOH = 5/1, Vanillin/H₂SO₄): $R_F = 0,54$

IR (KBr-Pressling, in cm⁻¹):

$\tilde{\nu} = 3450$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3320 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3140 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2930 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2900 (s, $\nu(\text{C-H})$), 2880 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2850 (w, $\nu(\text{C-H})$), 2830 (s, $\nu(\text{C-H})$), 1650 (vs, $\nu(\text{C=O})$), 1635 (s, $\delta(\text{N-H})$).

¹H-NMR (400,13 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 0,82$ (t, 3H, CH_3 , $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 6,7 \text{ Hz}$), $1,20$ (m, 16H, CH_2 -Kette), $1,47$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$), $2,23$ (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$, $^3J(^1\text{H}-^1\text{H}) = 7,3 \text{ Hz}$), $3,00$ (ddd, 1H, C(4) $\underline{\text{H}}$ OH), $3,10$ (ddd, 1H, C(2) $\underline{\text{H}}$ OH), $3,40$ (m, 1H, C(3) $\underline{\text{H}}$ OH), $3,72$ (X-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, C(5) $\underline{\text{H}}$ CH₂), $3,95$ (A-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, $\underline{\text{H}}$ C(6)H), $4,22$ (B-Teil eines ABX-Spinsystems, 1H, HC(6) $\underline{\text{H}}$), $4,45$ (m, 1H, C(2)HO $\underline{\text{H}}$), $4,69$ (m, 1H, C(3)HO $\underline{\text{H}}$), $4,85$ (m, 1H, C(1)HO $\underline{\text{H}}$), $4,96$ (m, 1H, C(4)HO $\underline{\text{H}}$), $6,26$ (m, 1H, C(1)HO $\underline{\text{H}}$).

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, d₆-DMSO [ppm]):

$\delta = 13,9$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$), $22,0$ (ω -2-C), $24,4$ (β -C), $28,4$ - $28,9$ (6 Signale, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -Kette), $31,2$ (ω -3-C), $33,4$ (α -C), $63,8$ ($\underline{\text{C}}$ (6)HOH), $69,1$ ($\underline{\text{C}}$ (5)HOH), $70,5$ ($\underline{\text{C}}$ (4)HOH), $72,2$ ($\underline{\text{C}}$ (2)HOH), $72,9$ ($\underline{\text{C}}$ (3)HOH), $92,2$ (C(1)HOH), $172,8$ ($\underline{\text{C}}$ OOH).

5.5.3 β -Glycoside

5.5.3.1 1-O-Allyl-*b*-D-glucopyranosid (**39**, $M = 220,22$ g/mol)

Gemäß AAV 5 (EXtrelut-Variante) wurden 1,00 mmol (0,18 g) D-Glucose mit 2,00 mmol (0,116 g, Überschuss wegen Verdunstung!) Allylalkohol umgesetzt. Umsatz (HPLC, 38 %). Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung unmittelbar auf eine Kieselgelsäule gegeben und chromatografisch gereinigt (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/5). Ausbeute: 0,066 g (30 %).

Schmp.:	100-102 °C.
HPLC (NH₂-Phase, s. AAV 5):	R _T = 36,7 min
Drehwert:	$[\alpha]_D^{20} = -41,6^\circ$ (c = 1, MeOH)

¹H-NMR (400,13 MHz, D₂O [ppm]):

$\delta = 3,21$ (dd, 1H, H-2, ³J(¹H-2-¹H-3) = 9,2 Hz, ³J(¹H-1-¹H-2) = 8,0 Hz), 3,30 (dd, 1H, H-4, ³J(¹H-4-¹H-5) = 9,6 Hz, ³J(¹H-3-¹H-4) = 9,0 Hz), 3,38 (m, 1H, H-5), 3,41 (b, 1H, H-3, ³J(¹H-2-¹H-3) = ³J(¹H-3-¹H-4) = 9,1 Hz), 3,64 (dd, 2H, H-6, ³J(¹H-5-¹H-6) = 5,9 Hz, ³J(¹H-6-¹H-6') = 12,3 Hz), 3,84 (dd, 1H, H-6', ³J(¹H-5-¹H-6') = 2,2 Hz), 4,15 (m, 1H, H-1*), 4,32 (m, 1H, H-1*), 4,43 (d, 1H, H-1, ³J(¹H-1-¹H-2') = 7,9 Hz), 5,21 (m, 1H, H-3'), 5,31 (m, 1H, H-3*), 5,59 (m, 1H, H-2*).

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, D₂O [ppm]):

$\delta = 61,4$ (C-6), 70,3 (C-4), 71,2 (C-1*), 73,7 (C-2), 76,4 + 76,5 (C-3, C-5), 101,8 (C-1), 119,4 (C-3*), 133,9 (C-2*).

5.5.3.2 1-O-Allyl-*b*-D-galactopyranosid (**40**, $M = 220,22$ g/mol)

Gemäß AAV 5 wurden 1,00 mmol (0,180 g) D-Galactose mit 2,00 mmol (0,116 g, Überschuss wegen Verdunstung!) Allylalkohol umgesetzt. Umsatz (HPLC, 30 %). Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung unmittelbar auf eine Kieselgelsäule gegeben und chromatografisch gereinigt (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/5). Ausbeute: 0,048 g (22 %).

Schmp.:	102-103 °C
HPLC (NH₂-Phase, s. AAV 5):	R _T = 31,1 min

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -11,2^\circ$ (c = 1, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, D_2O [ppm]):

$\delta = 3,46$ (dd, 1H, H-2, $^3\text{J}(\text{H-2-}^1\text{H-3}) = 9,9$ Hz, $^3\text{J}(\text{H-1-}^1\text{H-2}) = 7,9$ Hz), 3,59 (m, 2H, H-3 + H-5), 3,76 (m, 2H, H-6 + H-6'), 3,85 (d, 1H, H-4, $^3\text{J}(\text{H-}^1\text{H}) = 2,9$ Hz), 4,16 (m, 1H, H-1*), 4,33 (m, 1H, H-1*), 4,37 (d, 1H, H-1, $^3\text{J}(\text{H-1-}^1\text{H-2}) = 7,8$ Hz), 5,22 (m, 1H, H-3*), 5,32 (m, 1H, H-3*), 5,91 (m, 1H, H-2*).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, D_2O [ppm]):

$\delta = 61,6$ (C-6), 69,2 (C-4), 71,2 (C-1*), 71,4 (C-2), 73,4 (C-3), 75,7 (C-5), 102,4 (C-1), 119,3 (C-3*), 133,0 (C-2*).

5.5.3.3 1-O-Benzyl-*b*-D-glucopyranosid (41, $M = 270,28$ g/mol)

Gemäß AAV 5 (Extrelut-Variante) wurden 1,00 mmol (0,180 g) D-Glucose mit 1,00 mmol (0,108 g) Benzylalkohol umgesetzt. Umsatz (HPLC, 47 %). Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung unmittelbar auf eine Kieselgelsäule gegeben und chromatografisch gereinigt (MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1/5$). Ausbeute: 0,113 g (42 %).

Schmp.: 116-117 °C

HPLC (NH_2 -Phase, s. AAV 5): $R_T = 22,9$ min

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -60,6^\circ$ (c = 1, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, D_2O [ppm]):

$\delta = 3,24$ (dd, 1H, H-2, $^3\text{J}(\text{H-2-}^1\text{H-3}) = 9,0$ Hz, $^3\text{J}(\text{H-1-}^1\text{H-2}) = 7,9$ Hz), 3,35 (m, 3H, H-3 + H-4 + H-5), 3,66 (dd, 1H, H-6, $^3\text{J}(\text{H-5-}^1\text{H-6}) = 5,7$ Hz, $^3\text{J}(\text{H-6-}^1\text{H-6}') = 12,3$ Hz), 3,86 (dd, 1H, H-6', $^3\text{J}(\text{H-5-}^1\text{H-6}') = 2,0$ Hz), 4,46 (d, 1H, H-1, $^3\text{J}(\text{H-1-}^1\text{H-2}) = 7,9$ Hz), 4,69 (d, 1H, H-1*', $^3\text{J}(\text{H-1*'-}^1\text{H-2}) = 11,6$ Hz), 4,87 (d, 1H, H-1*), 7,37 (m, 5H, Aryl).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, D_2O [ppm]):

$\delta = 61,4$ (C-6), 70,3 (C-4), 72,1 (C-1*), 73,7 (C-2), 76,4 + 76,5 (C-3, C-5), 101,8 (C-1), 129,1, 129,3 - 129,4, 137,2 (Aryl).

5.5.3.4 *1-O-(6'-Hydroxyhexyl)- β -D-glucopyranosid (42,*
M = 280,32 g/mol)

Gemäß AAV 5 (Extrelut-Variante) wurden 1,00 mmol (0,180 g) D-Glucose mit 1,00 mmol (0,118 g) 1,6-Dihydroxyhexanol umgesetzt. Umsatz (HPLC, 50 %). Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung unmittelbar auf eine Kieselgelsäule gegeben und chromatografisch gereinigt (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/5). Ausbeute: 0,126 g (45 %).

Schmp.:	115-116 °C
HPLC (NH₂-Phase, s. AAV 5):	R _T = 21,2 min
Drehwert:	[α] _D ²⁰ = - 37° (c = 0,3, MeOH)

¹H-NMR (400,13 MHz, D₂O [ppm]):

δ = 1,21-1,31 (m, 4H, GlcO-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-), 1,50-1,64 (m, 4H, GlcO-CH₂-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-), 3,20 (dd, 1H, H-2, ³J(¹H-1-¹H-2) = 8,0 Hz, ³J(¹H-2-¹H-3) = 9,4 Hz), 3,30-3,47 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3,57 (t, 2H, GlcO-(CH₂)₅-CH₂OH, ³J(¹H-¹H) = 6,7 Hz), 3,62-3,67 (m, 2H, GlcO-CH₂-(CH₂)₅OH), 3,69 (dd, 1H, H-6, ³J(¹H-5-¹H-6) = 5,8 Hz, ³J(¹H-6-¹H-6') = 12,3 Hz), 3,89 (m, 1H, H-6'), 4,41 (d, 1H, H-1, ³J(¹H-1-¹H-2') = 7,8 Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, D₂O [ppm]):

δ = 25,4 (GlcO(CH₂)₂-CH₂-), 25,4 (GlcO(CH₂)₃-CH₂-), 29,3 (GlcO-CH₂-CH₂-), 31,8 (GlcO(CH₂)₄-CH₂-), 61,4 (C-6), 62,5 (GlcO(CH₂)₅-CH₃), 71,1 (GlcOCH₂-), 70,3 (C-4), 73,7 (C-2), 76,4 + 76,5 (C-3, C-5), 102,8 (C-1).

5.5.3.5 *1-O-(6'-Hydroxyhexyl)- β -D-galactopyranosid (43,*
M = 280,32 g/mol)

Gemäß AAV 5 (Extrelut-Variante) wurden 1,00 mmol (0,18 g) D-Galactose mit 1,00 mmol (0,118 g) 1,6-Dihydroxyhexan umgesetzt. Umsatz (HPLC, 44 %). Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung unmittelbar auf eine Kieselgelsäule gegeben und chromatografisch gereinigt (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/5). Ausbeute: 0,101 g (36 %).

Schmp.:	117-118 °C
HPLC (NH₂-Phase, s. AAV 5):	R _T = 19,9 min
Drehwert:	[α] _D ²⁰ = - 4,9° (c = 0,8, MeOH)

¹H-NMR (400,13 MHz, D₂O [ppm]):

$\delta = 1,23-1,31$ (m, 4H, GalO-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-), 1,48-1,61 (m, 4H, GalO-CH₂-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-), 3,43 (dd, 1H, H-2, ³J(¹H-1-¹H-2) = 7,9 Hz, ³J(¹H-2-¹H-3) = 9,8 Hz), 3,56 (t, 2H, GalO-(CH₂)₅-CH₂OH, ³J(¹H-¹H) = 6,6 Hz), 3,60-3,69 (m, 5H, H-3, H-5, H-6, H-6'), GalO-CH₂-(CH₂)₅OH), 3,83 (d, 1H, H-4, ³J(¹H-¹H) = 2,1 Hz), 3,85-3,89 (m, 1H, GalO-CH₂-(CH₂)₅OH), 4,32 (d, 1H, H-1, ³J(¹H-1-¹H-2') = 7,9 Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, D₂O [ppm]):

$\delta = 25,4$ (GalO(CH₂)₂-CH₂-), 25,4 (GalO(CH₂)₃-CH₂-), 29,3 (GalO-CH₂-CH₂-), 31,8 (GalO(CH₂)₄-CH₂-), 61,5 (C-6), 62,3 (GalO(CH₂)₅-CH₃), 69,1 (C-4), 71,1 (GalOCH₂-), 71,4 (C-2), 73,4 (C-3), 75,7 (C-5), 103,5 (C-1).

5.5.3.6 1-O-(Pent-4-enyl)- β -D-glucopyranosid (44,

M = 248,28 g/mol)

Gemäß AAV 5 wurden 1,00 mmol (0,180 g) D-Glucose mit 1,00 mmol (0,861 g) Pent-4-en-1-ol umgesetzt. Umsatz (HPLC, 42 %) farbloses Öl. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung unmittelbar auf eine Kieselgelsäule gegeben und chromatografisch gereinigt (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/5). Ausbeute: 0,082 g (45 %).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -34^\circ$ (c = 0,1, MeOH)

HPLC (NH₂-Phase, s. AAV 5): $R_T = 16,8$ min

¹H-NMR (400,13 MHz, D₂O [ppm]):

$\delta = 1,63-1,69$ (m, 2H, GlcO-CH₂-CH₂-), 2,06-2,15 (m, 2H, GlcO-(CH₂)₂-CH₂-), 3,20 (dd, 1H, H-2, ³J(¹H-2-¹H-3) = 9,1 Hz, ³J(¹H-1-¹H-2) = 8,0 Hz), 3,30 (dd, 1H, H-4, ³J(¹H-4-¹H-5) = 9,6 Hz, ³J(¹H-3-¹H-4) = 8,9 Hz), 3,37 (m, 1H, H-5), 3,41 (dd, 1H, H-3, ³J(¹H-2-¹H-3) = 8,9, ³J(¹H-3-¹H-4) = 9,1 Hz), 3,59-3,66 (dd, 2H, H-6 + GlcO-H'CH-, ³J(¹H-5-¹H-6) = 5,9 Hz, ³J(¹H-6-¹H-6') = 12,3 Hz), 3,82-3,88 (dd, 2H, H-6' + GlcO-HCH'-), 4,40 (d, 1H, H-1, ³J(¹H-1-¹H-2') = 8,1 Hz), 4,94-5,01 (m, 2H, H-4, GlcO-(CH₂)₃-CH=CH₂), 5,82-5,92 (m, 1H, H-4, GlcO-(CH₂)₃-CH=CH₂).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, D_2O [ppm]):

$\delta = 28,6$ (GlcOCH $_2$ -CH $_2$ -), $30,0$ (GlcO(CH $_2$) $_2$ -CH $_2$ -), $61,4$ (C-6), $70,3$ (C-4), $70,5$ (GlcO-CH $_2$ -), $73,7$ (C-2), $76,4 + 76,5$ (C-3, C-5), $102,8$ (C-1), $115,3$ (GlcO-(CH $_2$) $_3$ -CH=CH $_2$), $139,6$ (GlcO-(CH $_2$) $_3$ -CH=CH $_2$).

5.5.3.7 1-O-(Pent-4-enyl)- β -D-galactopyranosid (45,
 $M = 248,28$ g/mol)

Gemäß AAV 5 (Extrelut-Variante) wurden 1,00 mmol (0,180 g) D-Galactose mit 1,00 mmol (0,861 g) Pent-4-en-1-ol umgesetzt. Umsatz (HPLC, 34 %) farbloses Öl. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung unmittelbar auf eine Kieselgelsäule gegeben und chromatografisch gereinigt (MeOH/CH $_2$ Cl $_2 = 1/5$). Ausbeute: 0,065 g (26 %).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -21^\circ$ (c = 0,1, MeOH)

HPLC (NH $_2$ -Phase, s. AAV 5): $R_T = 14,3$ min

 ^1H -NMR (400,13 MHz, D_2O [ppm]):

$\delta = 1,64$ - $1,71$ (m, 2H, GalO-CH $_2$ -CH $_2$ -), $2,07$ - $2,14$ (m, 2H, GalO-(CH $_2$) $_2$ -CH $_2$ -), $3,45$ (dd, 1H, H-2, $^3J(^1\text{H}-1-^1\text{H}-2) = 8,1$ Hz, $^3J(^1\text{H}-2-^1\text{H}-3) = 9,5$ Hz), $3,56$ - $3,72$ (m, 5H, H-3, H-5, H-6, H6', GalO-H'CH-CH $_2$), $3,85$ - $3,90$ (m, 2H, H-4, GalO-HCH'-CH $_2$ -), $4,33$ (d, 1H, H-1, $^3J(^1\text{H}-1-^1\text{H}-2') = 7,9$ Hz), $4,97$ - $5,04$ (m, 2H, H-4, GalO-(CH $_2$) $_3$ -CH=CH $_2$), $5,82$ - $5,94$ (m, 1H, H-4, GalO-(CH $_2$) $_3$ -CH=CH $_2$).

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, D_2O [ppm]):

$\delta = 28,6$ (GalOCH $_2$ -CH $_2$ -), $30,0$ (GalO(CH $_2$) $_2$ -CH $_2$ -), $61,5$ (C-6), $69,3$ (C-4), $70,5$ (GalO-CH $_2$ -), $71,4$ (C-2), $73,4$ (C-3), $75,6$ (C-5), $103,4$ (C-1), $115,3$ (GalO-(CH $_2$) $_3$ -CH=CH $_2$), $139,5$ (GalO-(CH $_2$) $_3$ -CH=CH $_2$).

5.5.3.8 1-O-(2-(Trimethylsilyl)ethyl)- β -D-glucopyranosid
(46, $M = 280,39$ g/mol)

Gemäß AAV 5 (Extrelut-Variante) wurden 1,00 mmol (1,80 g) D-Glucose mit 1,00 mmol (0,118 g) 2-(Trimethylsilyl)ethanol umgesetzt. Umsatz (HPLC, 34 %) farbloses Öl. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung unmittelbar auf eine Kieselgelsäule gegeben und chromatografisch gereinigt (MeOH/CH $_2$ Cl $_2 = 1/5$). Ausbeute: 0,67 g (24 %).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ (c = 0,1, MeOH)

HPLC (NH₂-Phase, s. AAV 5): $R_T = 23,6$ min

¹H-NMR (400,13 MHz, D₂O [ppm]):

$\delta = 0,01$ (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0,90-0,97 (m, 2H, GlcOCH₂-CH₂), 3,18 (dd, 1H, H-2, ³J(¹H-2-¹H-3) = 9,2 Hz, ³J(¹H-1-¹H-2) = 8,0 Hz), 3,29-3,43 (m, 3H, H-3 + H-4 + H-5), 3,64 (dd, 2H, H-6, ³J(¹H-5-¹H-6) = 5,6 Hz, ³J(¹H-6-¹H-6') = 12,2 Hz), 3,69-3,73 (m, 1H, GlcOCH₂-), 3,84 (dd, 1H, H-6', ³J(¹H-5-¹H-6') = 2,1 Hz, ³J(¹H-6-¹H-6') = 12,2 Hz), 3,94-4,02 (m, 1H, GlcOCH₂-), 4,41 (d, 1H, H-1, ³J(¹H-1-¹H-2') = 7,9 Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100,61 MHz, D₂O [ppm]):

$\delta = -1,8$ ((CH₃)₃), 18,2 (GlcO-CH₂-CH₂-), 61,3 (C-6), 69,0 (GlcOCH₂-), 70,3 (C-4), 73,7 (C-2), 76,5 (2 Signale, C-3 + C-5), 102,0 (C-1).

6 Anhang

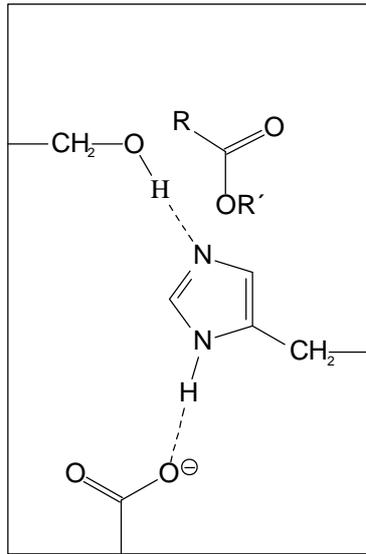
6.1 Lipasen

Enzyme, die Bindungen hydrolytisch spalten und bilden können, gehören zur Klasse der Hydrolasen [EC 3]. Die Gruppe der Carbonsäure-Esterasen [EC 3.1.1] ist eine Untergruppe. Zu ihr gehören sämtliche Esterasen [EC 3.1.1.1] und Lipasen [3.1.1.0]. Esterasen zeigen ihre höchste Aktivität, wenn sie in Wasser gelöst sind. Lipasen sind unter diesen Bedingungen weitgehend inaktiv: Sie werden erst an Phasengrenzflächen, so z.B. an der Oberfläche von Micellen oder Lipidbodies aktiv. Man spricht von Grenzflächenaktivierung (siehe Abschnitt 6.1.1).

Lipasen sind relativ substratunspezifische Enzyme. *In vivo* sind Lipasen zuständig für die Hydrolyse von Triglyceriden. Sie initiieren somit die Mobilisierung des Speicherfettes sowohl tierischer als auch pflanzlicher Organismen. Die Hydrolyse der Triglyceride ist dabei im Wesentlichen unabhängig von der Fettsäurezusammensetzung. Die Lipasen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer spezifischen Aktivitäten in Bezug auf die Kettenlänge der Fettsäuren und den Grad der Ungesättigtheit.

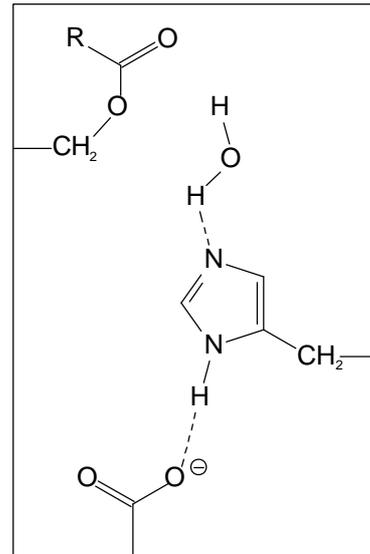
6.1.1 Struktur und Wirkungsmechanismus von Lipasen

Wie Serinproteasen werden auch viele Lipasen durch Diisopropylfluorophosphat irreversibel inhibiert. Man nahm daher schon frühzeitig an, dass auch hier Serin eine Schlüsselrolle im aktiven Zentrum des Enzyms spielt und der Reaktionsmechanismus dem der Serinproteasen ähnlich ist. Tatsächlich zeigen die Röntgenstrukturanalysen der Lipasen GcL (*Geotrichum candidum*), hPL (*Homo sapiens*, Lipase aus Pankreasextrakt), RmL (*Rhizomucor miehei*) und CaL-B (*Candida antarctica*) ein katalytisches Zentrum, welches – wie bei Serin-Proteasen – die katalytische Triade Asparaginsäure, Histidin und Serin enthält [145]. Die Hydrolyse einer Amid- oder Esterbindung erfolgt wie in zwei Schritten:

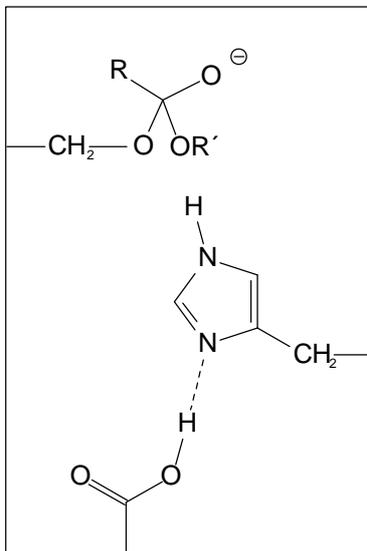


Der erste Schritt (li.) besteht in einem nucleophilen Angriff der Hydroxylgruppe des aktivierten Serinrestes auf den Carbonylkohlenstoff.

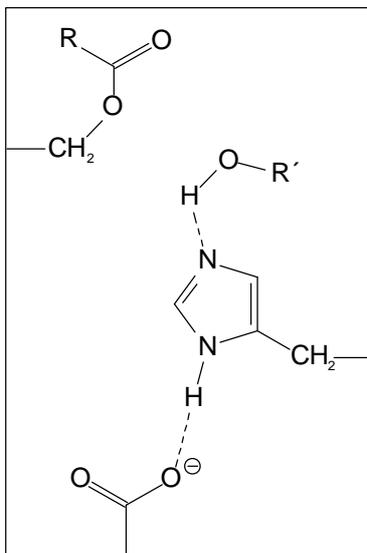
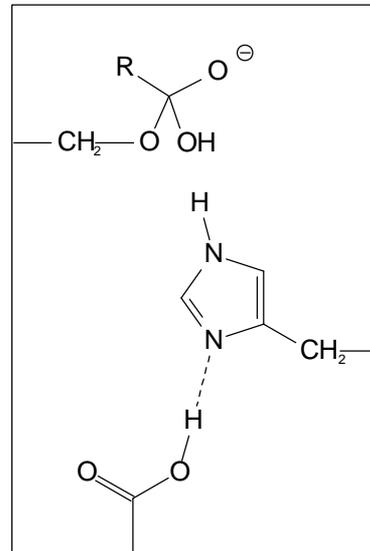
Diese Aktivierung kommt durch die sog. katalytische Triade zustande: Die Carboxylgruppe des Aspartats deprotoniert



über das Histidin die Hydroxylgruppe des Serins. Es bildet sich die tetraedrische Zwischenstufe, die sich unter Abspaltung der Alkohol- bzw. Aminkomponente zum Acylenzym stabilisiert.



Im zweiten Schritt, der Deacylierung des Enzyms (re.), greift das Nucleophil Wasser im Sinne der reversen Reaktion am Acyl-Enzym an und spaltet es so unter Freisetzung der Carbonsäure und des Enzyms.



An die Stelle des Wassers können auch andere Nucleophile treten, die dann ebenfalls zur Freisetzung des Enzyms führen (s.u.).

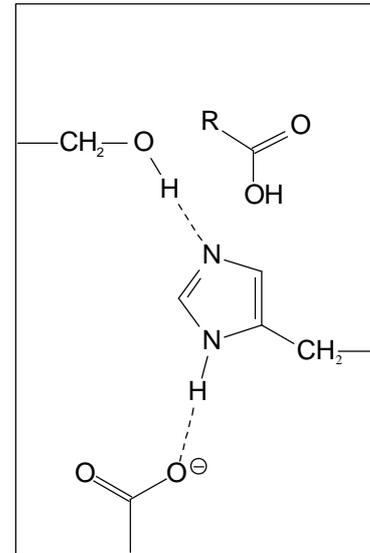


Abbildung 6-1. Mechanismus der Hydrolyse durch Lipasen und Proteasen

Zusätzlich zu dem oben beschriebenen Katalysemechanismus wirkt der so genannte Oxyanion-Hohlraum stabilisierend: Er senkt, durch seine zum Oxyanion komplementären Gestalt, die freie Enthalpie der tetraedrischen Zwischenstufe. Diese Komplementarität begründet sich in zwei vicinalen NH-Gruppen oder seltener, wie bei der Lipase B aus *Candida antarctica*, in einer NH- und einer OH-Gruppe, die durch ihre Fähigkeit Wasserstoffbrücken auszubilden das Oxyanion stabilisieren.

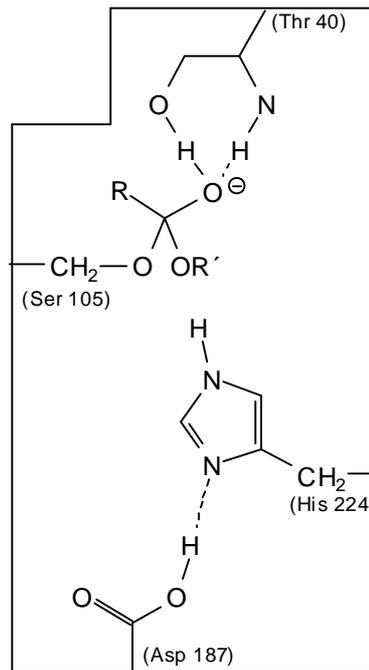


Abbildung 6-2. Oxyanion-Hohlraum in Lipase B aus *Candida antarctica*

Wird das Acylenzym durch andere Nucleophile als Wasser gespalten (s.o.), wie z.B. durch Alkohole, Ammoniak, Amine, Wasserstoffperoxid, Oxime oder Hydrazin, so können Lipasen auch zur enzymatischen Synthese von Carbonsäureestern [130], Amiden [131, 132], Persäuren [133], Hydraziden [134] bzw. Oximestern [135] herangezogen werden (Abbildung 6-3).

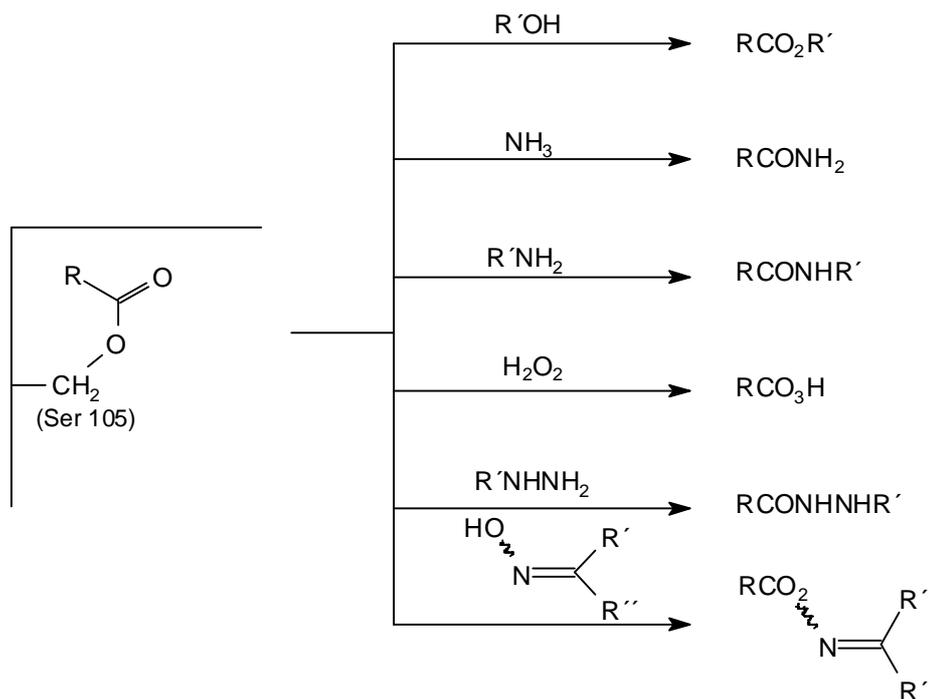
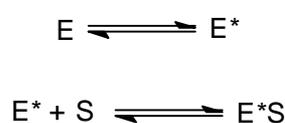


Abbildung 6-3. Reaktionen des Acylenzymts mit unnatürlichen Nucleophilen

6.1.2 Die Enzymkinetik beim Spezialfall der lipasekatalysierten Reaktion – Grenzflächenaktivierung

Lipasekatalysierte Reaktionen beobachtet man in der Natur weitgehend nur an Grenzflächen. Die natürlichen Substrate der Lipasen sind Triglyceride. Wasserlösliche Lipasen besitzen meist eine *hydrophobe Klappe* (engl. *lid*), die das *aktive Zentrum* bedeckt und erst bei Kontakt mit einem (emulgierten) Fetttröpfchen eine Konformationsänderung des gesamten Enzyms hervor ruft: Das Enzym wechselt von der „geschlossenen“ in die „geöffnete“ Konformation. Die hydrophobe Klappe öffnet sich bei diesem Vorgang genauso wie der gesamte Bereich um das aktive Zentrum. Nun kann ein Triglyceridmolekül in das aktive Zentrum eintreten und an das Enzym binden.

Deshalb ist dem Gleichgewicht der Enzym-Substrat-Komplex-Bildung ein weiteres Gleichgewicht vorgelagert: Die Anbindung des Enzyms (E) an die Phasengrenzfläche (angelagertes Enzym E*) – die sog. Grenzflächenaktivierung:



6.1.2.1 *Lipase B aus Candida antarctica* (CaL-B)

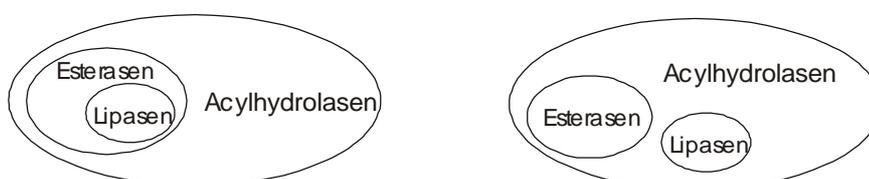
Bei den vorliegenden Arbeiten erwies sich die Lipase B aus *Candida antarctica* als mit am Abstand besten geeigneter Biokatalysator. Die vielseitige Einsetzbarkeit dieser Lipase sowohl zur regio- als auch enantioselektiven Hydrolyse [136] und Synthese [137] ist vielfach belegt. Bemerkenswert ist insbesondere die Stabilität der Lipase in relativ polaren Medien wie Aceton, ^tBuOH und THF. Zudem zeigt sie sehr hohe thermische Stabilität. So beobachtet man selbst bei 60-80 °C nach tausenden Betriebsstunden keinen nennenswerten Aktivitätsverlust [138].

Eine Besonderheit ist die Toleranz von *Candida antarctica* Lipase B gegenüber wasserarmen Konditionen: Während alle anderen Lipasen (und Enzyme überhaupt) ein Minimum an Wasser im Reaktionsmedium zum Erhalt ihrer Aktivität benötigen, behält die Lipase B aus *Candida antarctica* selbst in Gegenwart aktivierten Molekularsiebes ihre volle Umesterungsaktivität. Andere Enzyme verlieren ihre Aktivität unter solchen Bedingungen vollständig, da diese dann auch die letzte Monoschicht Wasser verlieren, welche zum Erhalt der Konformation des Enzyms in organischen Lösungsmitteln notwendig ist [139]. Das gleiche beobachtet man bei der Verwendung hochpolarer organischer Lösungsmittel: Das Lösungsmittel konkurriert mit dem Enzym um die letzten Wassermoleküle, wodurch das Enzym seine Wasserhülle verliert [140].

Die Hefe *Candida antarctica* produziert u.a. zwei Lipasen: Typ A und Typ B. Die Lipase A (CaL-A, 45 kDa) ist unspezifisch gegenüber Triglyceriden und thermostabiler als die Lipase B (CaL-B) [141]. Die häufig zur stereoselektiven Hydrolyse und Synthese eingesetzte Lipase B hat ein Molekulargewicht von 33 kDa und besteht aus 317 Aminosäuren. Sie enthält wie die meisten strukturell aufgeklärten Esterasen bestimmte Bauelemente wie das α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv und die katalytische Triade im aktiven Zentrum [142]. Eine kurze Helix (α 5-Loop) wurde als potentielle *hydrophobe Klappe* (engl. *lid*) identifiziert [143].

Trotzdem wurde bei *Candida antarctica* Lipase B – im Gegensatz zu den meisten anderen Lipasen – keine Grenzflächenaktivierung gefunden [144]. Das Enzym bevorzugt eine offene Konformation. Die Lipase B nimmt somit eine gewisse Zwischenposition bei der Einteilung der Acylhydrolasen in Esterasen und Lipasen* ein. Der Katalysemechanismus ist s_N -artig und somit demjenigen der Serinproteasen ähnlich [145]. Das α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv besteht aus sieben, größtenteils parallel angeordneten, β -Faltblatt-Strukturen, die von zwei hydrophilen Helices eingefasst sind. Die schmale (1,0 nm x 0,4 nm), aber tiefe (1,2 nm) Substratbindungsstelle [143] weist – verglichen mit anderen Lipasen – nur sehr beschränkte Möglichkeiten der Substrateinpassung auf und lässt daher ein hohes Maß an Stereo- und Regioselektivität erwarten. Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass das aktive Zentrum aus zwei Taschen besteht, von denen die eine für die Bindung des Acylrestes und die andere für die Bindung des Alkohols zuständig ist. Dabei bietet die Acyl-Tasche wesentlich mehr Raum als die alkoholbindende Tasche [143]. Erstere besteht aus einer hydrophilen Region – in der sich auch die katalytische Triade befindet – und einer hydrophoben Region (engl. *hydrophobic crevice*), an die normalerweise die Alkylkette der Fettsäure bindet. Die hydrophile Region besteht aus den Aminosäuren Asp134, Thr138, Gln157 und den Aminosäuren der katalytischen Triade: Ser105, Asp187 und His224. Die hydrophobe Region wird von den Aminosäuren Ala141, Leu144, Val149 und Ile285 gebildet. Die alkoholbindende Tasche wird im Wesentlichen durch hydrophobe Aminosäurereste definiert (Trp104, Leu278, Ala281, Ala282 und Ile285) [146].

* Es gibt zwei Sichtweisen der Einteilung der Acylhydrolasen in Lipasen und Esterasen: Während die eine davon ausgeht, dass die Lipasen nur ein Spezialfall der Esterasen sind, geht die andere davon aus, dass Lipasen keine Esterasen sind. Wenn in dieser Arbeit von „Esterasen“ die Rede ist, so soll dies (entsprechend der zweiten Sichtweise) heißen: „Esterasen die keine Lipasen sind“.



6.2 Glycosidasen

Die natürliche Aufgabe der Glycosidasen ist die hydrolytische Spaltung von Glycosiden. Oftmals dient dies der Verteidigung, beispielsweise von Pflanzen gegen Tierfraß: Die in den Vakuolen enthaltenen Glycosidasen werden bei einer Verletzung des Gewebes freigesetzt und kommen mit Glycosiden in Kontakt, die sich im Cytosol befinden. Die Aglykone dieser Glycoside sind toxisch oder setzen Toxine frei, wie dies beispielsweise bei dem, in Bittermandeln vorkommenden *cyanogenen Glycosids* Amygdalin der Fall ist (siehe Abbildung 6-4). Hier entsteht durch jedes hydrolysierte Molekül Amygdalin ein Molekül Blausäure.

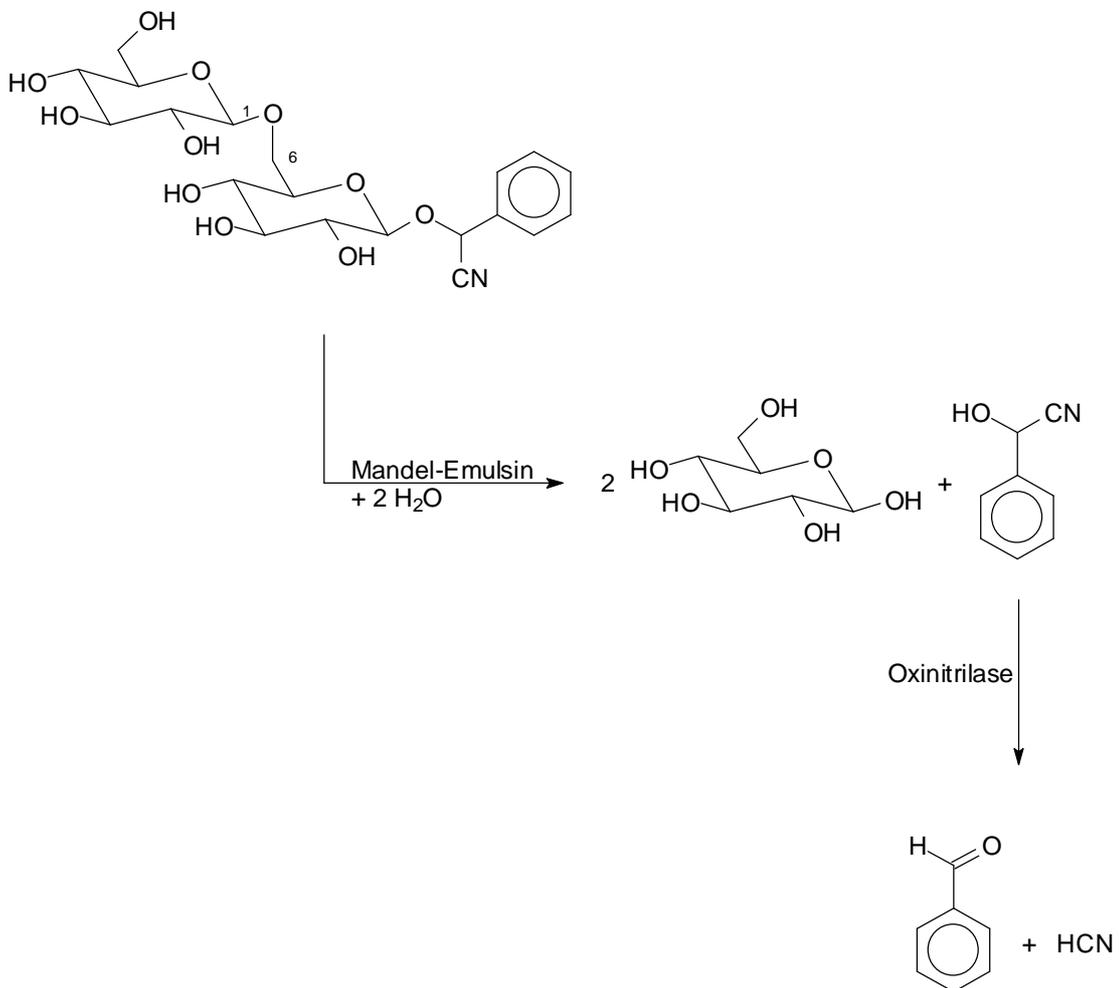


Abbildung 6-4. Hydrolyse von Amygdalin durch Mandel-Emulsin.

Ein weiteres wichtiges Beispiel ist die Aktion von Glycosidasen bei der Fermentation von Vanilleschoten: Das Aroma der Vanille entsteht während eines mehrmonatigen Fermentationsprozesses der noch unreif geernteten Früchte. Dabei entsteht aus dem Glucosid Coniferin zunächst das geruchlose Glycosid Vanillosid und daraus durch enzymatische Spaltung Vanillin und Glucose (vgl. Abbildung 6-5).

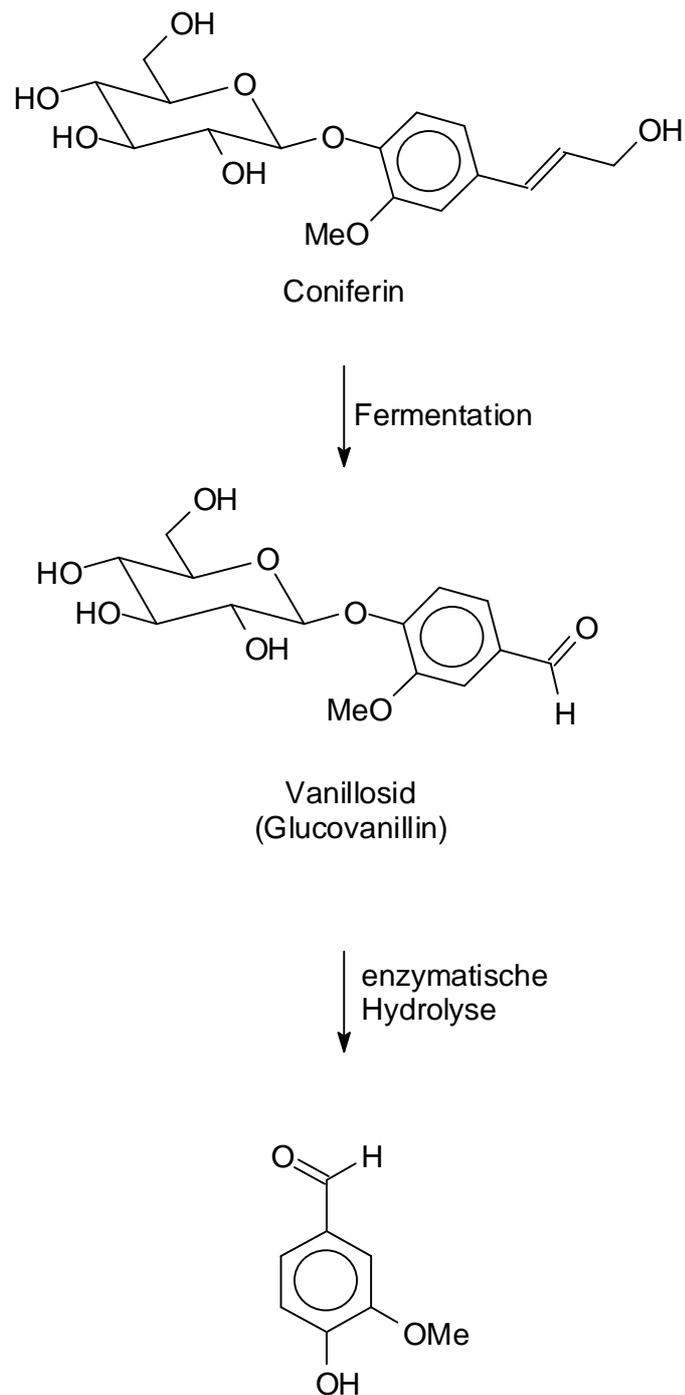


Abbildung 6-5. Die fermentative Aufarbeitung unreifer Vanilleschoten – glucosidase-katalysierte Bildung von Vanillin

Glycosidasen werden danach unterteilt, ob die von ihnen katalysierte Hydrolyse unter Retention oder Inversion des anomeren Zentrums verläuft. Sie werden daher auch als retentiv oder invertierend bezeichnet.

6.2.1 Der Mechanismus der retentiven β -Glucosidase-katalysierten β -Glucosidspaltung

Die glycosidasekatalysierte Glycosidspaltung basiert – ähnlich wie die säurekatalysierte, nichtenzymatische Glycosidspaltung – auf einer säurekatalysierten Acetalspaltung, wobei hier intermediär – wie bei der lipasekatalysierten Reaktion – ein Enzym-Substratkomplex – das Glycosylenzym – gebildet wird.

Im Wesentlichen beruht die enzymatische retentive β -Glycosidhydrolyse immer noch auf dem 1953 von Koshland [147] vorgeschlagenen Mechanismus:

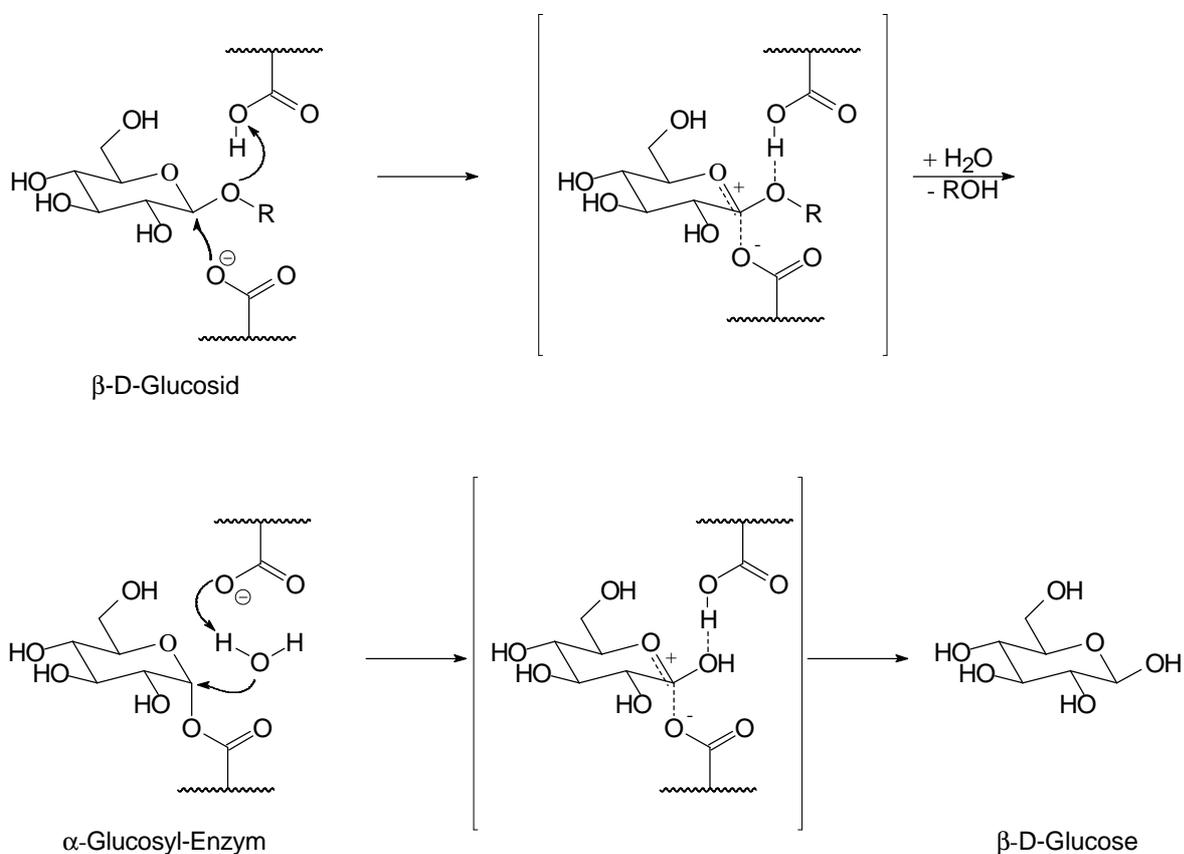


Abbildung 6-6. Mechanismus der Glucosidhydrolyse mit β -Glucosidase aus *Agrobacterium* [148]

Die Hydrolyse beginnt mit der Annäherung des Glycosidmoleküls an das aktive Zentrum, in welchem die glycosidische Bindung durch zwei Carboxylatreste polarisiert* wird. Im nächsten Schritt wird das Monosaccharid durch den Angriff einer bestimmten Carboxylatgruppe des Enzyms – des *katalytischen Nucleophils* – und aktiviert durch eine partielle Protonierung durch eine bestimmte Carboxylgruppe – der *katalytischen Säure* – in einem mehr oder minder konzertierten Reaktionsschritt [149] und unter Abspaltung des Alkohols in eine stabile Zwischenstufe – das α -Glycosyl-Enzym[†] – überführt [150].

Der anschließende nucleophile Angriff eines Wassermoleküls unter gleichzeitiger Deprotonierung durch die korrespondierende Base der *katalytischen Säure* spaltet nun das α -Glycosyl-Enzym unter Bildung des Monosaccharids. Dieser Vorgang ist ebenso durch die Polarisierung durch die beiden Carboxylatreste begünstigt, wie die vorangegangene Spaltung des β -Glucosids – eine Folge des *Mikroreversibilitätsprinzips*. Am Ende des katalytischen Zyklus steht die Freisetzung des – durch die zweifache Inversion – wiederum β -konfigurierten freien Monosaccharids.

In letzter Zeit häufen sich aber die Belege, dass die Protonierung des Substrats, anders als bisher angenommen [151], nicht axial von oben erfolgt. Stattdessen befindet sich die katalytische Säure in der Ringebene, von wo aus sie dann das freie – parallel zur Ringebene angeordnete – freie Elektronenpaar des Lactol-Sauerstoffatoms protoniert [148 c] (siehe Abbildung 6-7).

* entsprechend einer Stabilisierung des partiellen Carbokation-/Oxoniumioncharakters

† es handelt sich dabei um einen Glycosylester

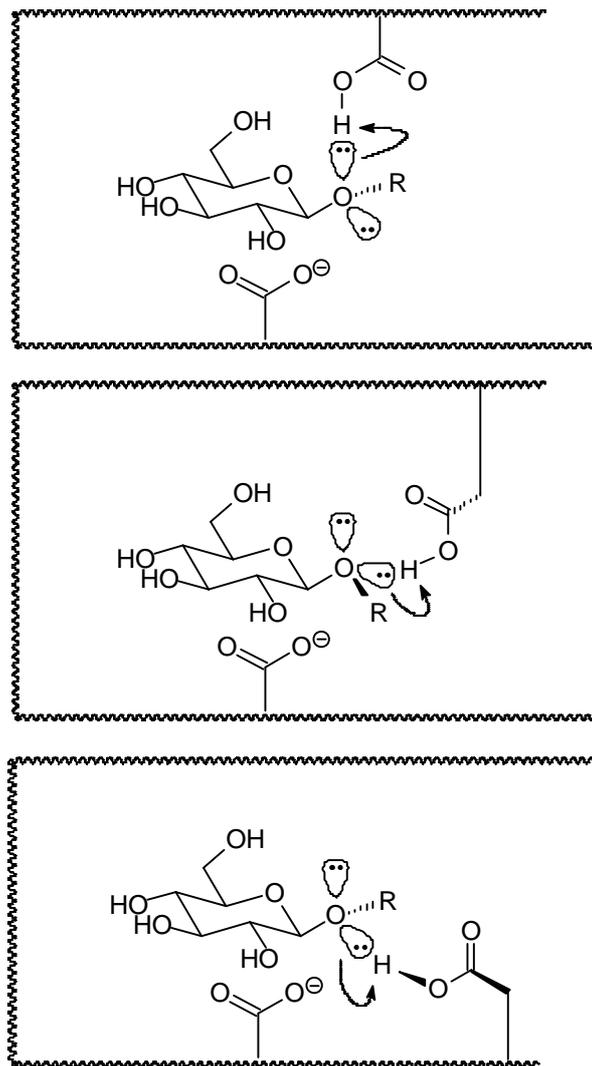


Abbildung 6-7. Vergleich herkömmlicher (axiale Protonierung, oben) und in jüngster Zeit postulierter Protonierungsrichtungen (laterale Protonierung, mitte: *anti*-Protonierung, unten: *syn*-Protonierung) retentiver β -Glucosidasen [148 c]

Einen umfassenden Überblick über den der Stand der Wissenschaft in der Erforschung der Glycosidase-Mechanismen, gibt die kürzlich erschienene Publikation von Vasella *et al.* [152].

6.2.1.1 Die Bedeutung der Wasseraktivität

Zur Beschreibung der Abhängigkeit der Enzymaktivität und der Lage des Reaktionsgleichgewichtes vom Wassergehalt ist die Wasseraktivität ein wesentlich besserer Parameter als die Wasserkonzentration.

Der dramatische Einfluss der Wasseraktivität sowohl auf die Lage des Reaktionsgleichgewichtes (vgl. auch Abschnitt 4.2.5) als auch die Aktivität von Enzymen, ist in einer Vielzahl von Publikationen dokumentiert [153].

Der Aktivitätskoeffizient f des Wassers ist immer ein Wert zwischen 0 und 1 und entspricht genau dem Anteil des Wassers im Reaktionssystem, der auch im Sinne des Massenwirkungsgesetzes wirksam ist. Entsprechend muss die Gleichgewichtskonzentration im Massenwirkungsgesetz mit dem Aktivitätskoeffizient multipliziert werden. Die Wasseraktivität ist das Produkt aus dem Aktivitätskoeffizienten f und der Gleichgewichtskonzentration des Wassers. Demnach ist die Wasseraktivität genau der Parameter, der uns bei den betrachteten Problemen interessiert. Alles andere Wasser ist zwar physikalisch im Reaktionssystem enthalten, aber gewissermaßen durch die Wechselwirkung mit den anderen Systemkomponenten „maskiert“. Ein f -Wert von 1 entspricht damit einer hundertprozentigen Wirksamkeit des Wassers im Sinne des Massenwirkungsgesetzes. Ein Aktivitätskoeffizient von 1 wird allerdings nur in reinem Wasser gemessen, da die Zugabe sämtlicher Substanzen die Wasseraktivität erniedrigt.

Kasten 1. Theorie der Wasseraktivität

Das Massenwirkungsgesetz für die Kondensationsreaktion:



ist nur in erster Näherung – man spricht dann von einer *idealen Lösung* – in folgender Form formulierbar.

$$K_{\text{rev.}} = \frac{[\text{Wasser}] \cdot [\text{Glucosid}]}{[\text{Glucose}] \cdot [\text{Alkohol}]}$$

In *realen Lösungen* muss hingegen eine Korrektur mit Hilfe des Aktivitätskoeffizienten f erfolgen:

$$K_{\text{rev.}} = \frac{f \cdot [\text{Wasser}] \cdot [\text{Glucosid}]}{[\text{Glucose}] \cdot [\text{Alkohol}]}$$

Ersetzt man gemäß:

Kasten 1. Theorie der Wasseraktivität

$$a_w = f \cdot [\text{Wasser}]$$

So verändert sich das Massenwirkungsgesetz zu:

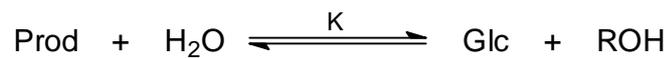
$$K_{\text{rev.}} = \frac{a_w \cdot [\text{Glucosid}]}{[\text{Glucose}] \cdot [\text{Alkohol}]}$$

Die Bezeichnung für den Term a_w ist *Wasseraktivität*. Die Wasseraktivität ist proportional zum Partialdruck von Wasser über der entsprechenden Lösung. Auf diese Weise wird die Wasseraktivität auch gemessen.

6.2.1.2 Gleichgewichtsumsätze für hydrolytische Reaktionen in Abhängigkeit von der Wasseraktivität a_w

Kasten 2. Thermodynamische Betrachtung des Einflusses der Wasseraktivität auf die Lage des Reaktionsgleichgewichtes

Bei der Reaktionsgleichung einer Glycosidhydrolyse



handelt es sich Gleichgewichtsreaktion.

Zu Beginn der Reaktion sind die Eduktkonzentrationen durch den Reaktionsansatz gegeben. Die Produktkonzentrationen sind gleich null. Demnach gilt:

Die Reaktandenkonzentrationen betragen zu Beginn der Reaktion:

$$\begin{aligned} c(\text{Glucosid}) &= [\text{Prod}]_0 \\ c(\text{H}_2\text{O}) &= a_w/f \\ c(\text{ROH}) &= 0 \\ c(\text{Glc}) &= 0 \end{aligned}$$

Aus diesen Bedingungen und der Reaktionsgleichung folgt, dass die Produktkonzentration (Glucosidkonzentration) in direkter Weise mit der Glucosekonzentration verbunden ist und dass die Glucosekonzentration zwingend immer identisch mit der Alkoholkonzentration sein muss:

$$[\text{Prod}] = [\text{Prod}]_0 - [\text{Glc}] \quad \text{und} \quad [\text{Glc}] = [\text{ROH}]$$

Gleichung 1

Das Massenwirkungsgesetz führt zu:

$$K = \frac{[\text{ROH}] \cdot [\text{Glc}]}{[\text{Prod}] \cdot [\text{H}_2\text{O}]}$$

Kasten 2. Thermodynamische Betrachtung des Einflusses der Wasseraktivität auf die Lage des Reaktionsgleichgewichtes

oder exakter – unter Berücksichtigung des Aktivitätskoeffizienten für Wasser (f) und der Definition $a_w = f \cdot [\text{H}_2\text{O}]$ zu:

$$K = \frac{[\text{ROH}] \cdot [\text{Glc}]}{[\text{Prod}] \cdot a_w}$$

$$\Leftrightarrow [\text{Prod}] = \frac{[\text{ROH}] \cdot [\text{Glc}]}{K \cdot a_w} \quad \left\| \text{mit Gleichung 1 folgt:} \right.$$

$$[\text{Prod}] = \frac{([\text{Prod}]_0 - [\text{Prod}]^2)}{K \cdot a_w}$$

$$\Leftrightarrow [\text{Prod}] = \frac{[\text{Prod}]_0^2 - 2[\text{Prod}]_0[\text{Prod}] + [\text{Prod}]^2}{K \cdot a_w}$$

$$\Leftrightarrow K \cdot a_w \cdot [\text{Prod}] = [\text{Prod}]_0^2 - 2[\text{Prod}]_0 \cdot [\text{Prod}] + [\text{Prod}]^2$$

$$\Leftrightarrow [\text{Prod}]^2 + [\text{Prod}] \cdot (-K \cdot a_w - 2 \cdot [\text{Prod}]_0) + [\text{Prod}]_0^2 = 0$$

Die letzte Gleichung enthält nur noch die Produktkonzentration im Reaktionsgleichgewicht, die Produktkonzentration bei Reaktionsbeginn $[\text{Prod}]_0$, die Wasseraktivität a_w und die Gleichgewichtskonstante K . Dabei ist $[\text{Prod}]_0$ gegeben. Da es sich um eine polynomische Gleichung 2. Grades (quadratische Gleichung) handelt, muss die Lösung mit den Mitteln der klassischen Mathematik gefunden werden:

1. Berechnen der Diskriminante:

$$\frac{(K \cdot a_w + 2 \cdot [\text{Prod}]_0)^2}{4} - [\text{Prod}]_0^2 = \frac{K^2 \cdot a_w^2 + 4 \cdot K \cdot a_w \cdot [\text{Prod}]_0}{4}$$

Kasten 2. Thermodynamische Betrachtung des Einflusses der Wasseraktivität auf die Lage des Reaktionsgleichgewichtes

2. Einsetzen in die quadratische Lösungsformel gibt die beiden Lösungen:

$$[\text{Prod}] = \frac{K \cdot a_w}{2} + [\text{Prod}]_0 \pm \frac{\sqrt{K^2 \cdot a_w^2 + 4 \cdot K \cdot a_w \cdot [\text{Prod}]_0}}{2}$$

wobei nur die Lösung

$$[\text{Prod}] = \frac{K \cdot a_w}{2} + [\text{Prod}]_0 - \frac{\sqrt{K^2 \cdot a_w^2 + 4 \cdot K \cdot a_w \cdot [\text{Prod}]_0}}{2}$$

sinnvolle Ergebnisse liefert.

Diese Gleichung beschreibt ohne die Nutzung von Näherungen vollständig die Gleichgewichtskonzentration des Produktes $[\text{Prod}]$ als Funktion der Wasseraktivität a_w und der Gleichgewichtskonstanten für die Glycosidhydrolyse K .

Uns interessiert aber die umgekehrte Reaktion: die reverse Hydrolyse!

Demnach ist die Gleichgewichtskonstante für die Glycosidbildung K_{rev} . *per definitionem* gleich K^{-1} .

Die Auftragung der Gleichgewichtsumsätze gegen die Wasseraktivität ergibt somit die folgenden Kurvenverläufe (dargestellt für verschiedene Produktbildungsgleichgewichtskonstanten K_{rev}).

Kasten 2. Thermodynamische Betrachtung des Einflusses der Wasseraktivität auf die Lage des Reaktionsgleichgewichtes

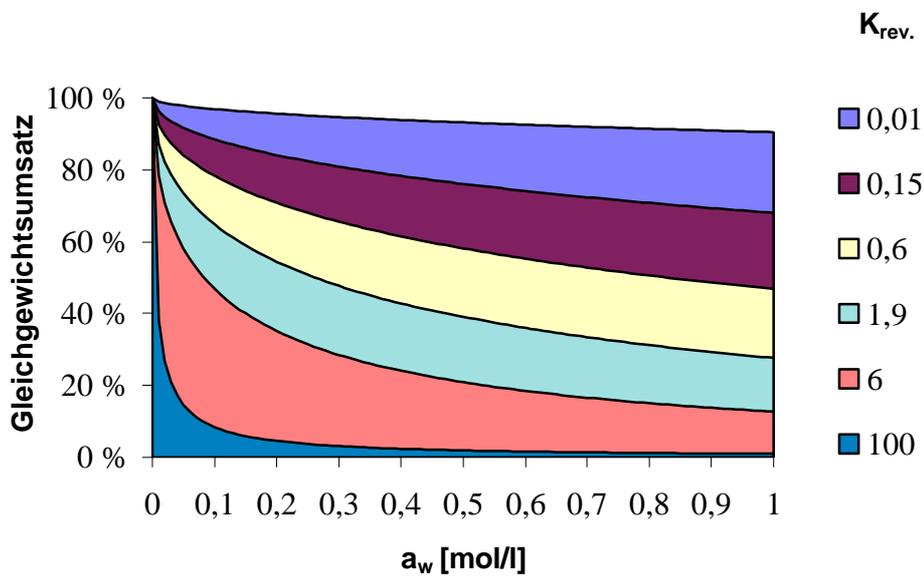


Abbildung 6-8. Lage des Reaktionsgleichgewichts bei Hydrolysereaktionen in Abhängigkeit von der Wasseraktivität a_w und der Gleichgewichtskonstante K_{rev} .

Wie bereits erwähnt, beträgt K_{rev} für die Hydrolyse von Alkyl- β -D-glycosiden bei 60 °C ca. 1,9 – unabhängig von der Kettenlänge des Aglykons [154].

Entsprechend, muss die Wasseraktivität auf 0,26 gesenkt werden, um einen Umsatz von 50 % zu erzielen, immer vorausgesetzt, der Katalysator ist unter diesen Bedingungen noch ausreichend aktiv.

7 Abkürzungen und Symbole

Abkrzng.	Bedeutung
[A]	Gleichgewichtskonzentration von A
Asp	- Asparaginsäure
¹ H	- ¹ H-NMR-Spektrum
{ ¹³ C} ¹ H	- ¹ H-breitbandenkoppeltes ¹³ C-NMR-Spektrum
abs.	- Absolut
Ac	- Acetyl
ACN	- Acetonitril
ANS	- 8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure-Ammoniumsalz
Ala	- Alanin
a _w	- Wasseraktivität
^t Bu	- <i>t</i> -Butyl
br.	- Breit
c(A)	- Konzentration von A
c ₀ (A)	- Anfangskonzentration von A
CaL	- <i>Candida antarctica</i> Lipase
CMC	- kritische Micellbildungskonzentration
δ	- chemische Verschiebung [ppm]
δ _s	- symmetrische Deformationsschwingung
δ _{as}	- asymmetrische Deformationsschwingung
DC	- Dünnschichtchromatografie
de	- Diastereomeren-Überschuss
dest.	- destilliert
DG	- Diglycerid
dm	- Dezimeter
DMA	- <i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMF	- <i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	- Dimethylsulfoxid
E	- Enzym
EE	- Essigsäureethylester
ee	- Enantiomeren-Überschuss
ES	- Enzym-Substrat-Komplex
Et	- Ethyl

Abkrzng.	Bedeutung
<i>et al.</i>	- <i>et aliter</i> (und andere)
<i>f</i>	- Aktivitätskoeffizient
farbl.	- farblos
Festst.	- Feststoff
FID	- Flammenionisationsdetektor
g	- Gramm
GC	- Gaschromatografie
ges.	- gesättigt
Gln	- Glutamin
H	- Stunde
HE	- <i>n</i> -Hexan
His	- Histidin
HLB	- Hydrophil-Lipophile Balance
HOMO	- höchstliegendes besetztes Molekülorbital
hPL	- <i>human</i> pancreatic lipase
HPLC	- Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
Hz	- Hertz [s ⁻¹]
Ile	- Isoleucin
immob.	- immobilisiert
IR	- Infrarotspektroskopie
ⁿ J	- Kopplungskonstante über <i>n</i> Bindungen [Hz]
K	- Gleichgewichtskonstante
konz.	- Konzentriert
L	- Liter
Leu	- Leucin
M	- molar [mol/l]
m	- IR: mittel
m	- NMR: Multiplett
M ⁺	- Molekülion
Me	- Methyl
MG	- Monoglycerid
Mg	- Milligramm
MHz	- Megahertz

Abkrzng.	Bedeutung
min	- Minute
mind.	- mindestens
ml	- Milliliter
μ l	- Mikroliter
μ m	- Mikrometer
mmol	- Millimol
μ mol	- Mikromol
mM	- millimolar
MS	- Massenspektroskopie
MTBE	- Methyl- <i>t</i> -butylether
ν	- Valenzschwingung
n.a.	- nicht aufgelöst
n.b.	- nicht bestimmt
nm	- Nanometer
NMR	- Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
n.s.	- nicht signifikant
o/w	- Öl-in-Wasser(-Emulsion)
p_a	- Partialdruck von a
P	- Produkt
<i>p</i> -NP	- <i>para</i> -Nitrophenyl
<i>p</i> -NPG	- <i>para</i> -Nitrophenylglucopyranosid
Pd/C	- Palladium auf Kohle
PPL	- Schweinepankreaslipase
<i>i</i> Pr	- Isopropyl
Q	- Quartett
<i>rac</i>	- racemisch
rev.	- revers
R_f	- ratio of fronts
RP	- reversed phase
RT	- Raumtemperatur
R_t	- Retentionszeit

Abkrzng.	Bedeutung
S	- Substrat
s	- IR: stark
	- NMR: Singulett
Schmp.	- Schmelzpunkt
Sdp.	- Siedepunkt
SDS	- Natriumdodecylsulfat
Ser	- Serin
sh.	- Schulter
<i>Sn</i>	- stereochemical numbering
spez.	- spezifisch
T	- Triplett
TG	- Triglycerid
THF	- Tetrahydrofuran
Thr	- Threonin
TMS	- Tetramethylsilan
-TMS	- Trimethylsilyl
Trp	- Tryptophan
U	- Unit [μ mol/min]
unges.	- ungesättigt
v(x)	- Volumen von Substanz x
v/v	- Volumen pro Volumen
Val	- Valin
VE	- Vinylester
verd.	- verdünnt
vs	- sehr stark
vw	- sehr schwach
w	- schwach
w/o	- Wasser-in-Öl(-Emulsion)
w/v	- Gewicht pro Volumen
w/w	- Gewicht pro Gewicht

8 Index

A

Abgangsgruppen.....	33
Acyldonatoren.....	34
Acylierungsposition	65
Akzeptoren.....	24
Alkylpolyglycoside.....	21
alpha-5-Loop.....	189
Amygdalin	191
Anhydrozucker.....	43
Antioxidans	18
APG.....	21
Atomeffizienz	23
Autoxidation	71

C

<i>Candida antarctica</i>	
Lipase A.....	189
Lipase B.....	189, 190
<i>Candida rugosa</i>	41
Celite	113
cyanogene Glycoside	
Amygdalin	191
Cyclodextrin.....	40, 101, 102

D

Diacylierungsprodukte.....	20
Diisopropylfluorophosphat.....	185
Donatoren	24, 32, 37

aktivierte	32, 37
------------------	--------

E

Entfettungsmittel.....	18
------------------------	----

F

Fischer-Synthese.....	23
-----------------------	----

G

Glycosylester	22
Glycosylierung.....	24
Glycosylierungen	30
Grenzflächenaktivierung	190

H

Helferich-Methode.....	22
Hochfeldverschiebung	65
Hydrolyse.....	30
reverse.....	30
hydrophobe Klappe.....	189
hydrophobic crevice.....	190

K

Katalysemechanismus.....	190
katalytische Säure.....	195
katalytische Triade.....	189
katalytisches Nucleophil.....	195
Kieselalgen.....	113

Kieselgur 112, 113
 Klappe
 hydrophobe..... 189
 Klibanov.....40, 44
 Koenigs-Knorr-Reaktion..... 21
 Kondensationsreaktionen 29
 Kosmetikgrundstoffe 18

L

Lebensmitteltechnologie 17
 Lebensmittelzusatzstoffe 18
 LeChatelier 101
 lid 189
 Lipase-Tensid-Agglomerat..... 104
 Lösungen
 metastabile 94
 übersättigten..... 94
Lösungsmittel 29
 lösungsmittelfrei..... 19

M

Massenwirkungsgesetz..... 33
 Microemulsionsmethode..... 19

N

N-Methylpyrrolidon.....72, 92, 96
 NMP Siehe N-Methylpyrrolidon
 Nucleophilie 33

O

Olestra..... 18
 Oligosaccharide..... 24
 Oxyisopropanyl..... 33
 Oxyvinyl..... 33

P

Problemstellung.....28

R

Reaktionen
 konkurrierende.....37
 Reaktionssystem
 einphasiges98
 zweiphasiges50, 51, 59, 95, 97, 98,
 111, 128
 Reste
 elektronenziehende33
 Röntgenstrukturanalysen.....190

S

Schmelze
 homogene19
 Serin.....185
 Serinproteasen185
 Solubilisierungstenseide18

T

Tautomerisierung.....33
 Tieffeldverschiebung65, 75
 Transglycosidierungen.....31, 35
 Triade186
 katalytische.....185
Trichloracetimidatmethode.....22

U

Umsatz
 maximaler.....32, 37

W

Wasseraktivität 51, 105, 106, 107, 111,
196, 197, 198, 199, 203

Z

Zuckeralkohole 17

9 Literaturverzeichnis

- [1] K. Prasad, M. D. Sørensen, V. S. Parmar, J. Wengel, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 6163.
- [2] a) L. Chalmers, *Soap, Perfumery & Cosmetics*, **1977**, 50, 191;
b) P. Salajka, Dissertation, TU Wien, Institut für Organische Technologie, **1976**.
- [3] a) N. Ata, T. Oku, M. Hattori, H. Fuji, M. Nakajima, I. Saiki, *Oncol. Res.*, **1996**, 8, 503.
b) G. T. Liu, T. M. Zhang, B. E. Wang, Y.W. Wang, *Biochem. Pharmacol.*, **1992**, 43, 147;
c) Y. Kimura, H. Okuda, S. Nishibe, S. Arichi, *Planta Med.*, **1987**, 53, 148;
d) R. S. Bhimani, W. Troll, D. Grunberger, K. Frenkel, *Cancer Res.*, **1993**, 53, 4528.
- [4] E. Cower, *Paint & Ink Internat.*, **1991**, 2, 24.
- [5] F. Björkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 934;
K. Adelhorst, F. Björkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Synthesis* **1990**, 112;
European Patent 0 394 280 B1 (18.08.1988) Novo Nordisk A/S
- [6] F. Björkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, S. A. Patkar, O. Andresen, *Microbial reagents in organic synthesis*, S. Servi (ed.), Kluwer Academic publishers, Netherlands, **1992**, 249
- [7] O. Andresen, O. Kirk, in *Proceedings Symposium Carbohydrate Bioengineering in Progress in Biotechnology* (Hrsg.: S. B. Petersen, B. Svensson, S. Pedersen), Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo, **1995**, S. 343-349.
- [8] a) G. W. Stubbs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, 46, 426.
b) G. W. Stubbs, *Biochemistry*, **1978**, 17, 215.
c) J. S. Lazlo, D. E. Quinn, *Anal. Biochem.*, **1980**, 102, 68.
d) S. Han, M. L. Tanzer, *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 10438.
e) S. Saito, T. Tsuchiya, *Biochem. J.*, **1984**, 222, 829.
f) S. Saito, T. Tsuchiya, *J. Biochem.*, **1984**, 96, 1593.
- [9] a) D. L. Dorset, J. P. Rosenbusch, *Dev. Bioenerg. Biomembr.*, **1983**, 6, 199.
b) B. Lorber, L. J. DeLucas, *J. Cryst. Growth*, **1991**, 110, 103.
c) S. Saito, T. Tsuchiya, *Biochem. J.*, **1984**, 222, 829.
d) S. Saito, T. Tsuchiya, *J. Biochem.*, **1984**, 96, 1593.

- [10] P. Lo Nostro, *Internet Journal of Science - Biological Chemistry*, <http://www.netsci-journal.com/97v4/97014/>
- [11] C. Waldinger, Dissertation, BUGH Wuppertal, **1995**.
- [12] L. I. Osipow, F. D. Snell, W. C. York, A. Finchler, *Ind. Eng. Chem.*, **1956**, 48, 1459.
- [13] L. I. Osipow, W. Rosenblatt, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 44, 307.
- [14] R. O. Feuge, H. J. Zeringue, T. J. Weiss, M. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 47, 56.
- [15] H. J. W. Nieuwenhuis, G. M. Vianen, European patent Application 86200059.
- [16] M. E. A. P. Jaspers, F. F. Leeuwen, H. J. W. Nieuwenhuis, G. M. Vianen, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1987**, 64, 7, 1020.
- [17] G. P. Rizzi, H. M. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 55, 398.
- [18] N. B. Bashir, S. J. Pythian, A. J. Reason, S. M. Roberts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1995**, 2203.
- [19] a) C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in synthetic organic chemistry* (1st edn) Tetrahedron Organic series Volume 12 Pergamon, **1994**
b) E. J. Toone, E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *Tetrahedron* 1989, 45, 5365.
c) A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, 33, 2, 178.
d) K. G. I. Nilsson, *TIBTECH*, 1988, 6, 256.
e) A. M. Blinkovski, J. S. Dordick, *Tetrahedron:Asymmetry*, 1993, 6, 1221.
f) J. S. Dordick, *TIBTECH*, 1992, 10, 287.
- [20] a) L. van Hoof, J. Totte, J. Corthout, L. A. Pieters, F. Mertens, D. A. van den Berghe, A. J. Vlietinck, R. Dommissie, E. Esmans, *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52, 875;
b) S. Matsumura, K. Imai, K. Kawada, T. Uchibori, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1990**, 67, 996;
c) W. L. Norton, M. A. P. Meisinger, *Inflammation*, **1977**, 2, 37.
- [21] a) J. Gigg, R. Gigg, *J. Chem. Soc., C*, **1996**, 82;
b) P. A. Manthorpe, R. Gigg, *Methods Carbohydr. Chem.*, **1980**, 8, 305;
c) Y. Nishida, J. Thiem, *J. Carbohydr. Chem.*, **1994**, 13, 1059;
d) N. Takeo, M. Kitajima, T. Fukatsu, *Carbohydr. Res.*, **1983**, 112, 158.
- [22] a) B. H. Lipshutz, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 46093.
b) K. Jansson, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 5629.
- [23] a) K. Kobayashi, N. Nakishita, M. Okada, T. Akaike, T. Usui, *J. Carbohydr. Chem.*, **1994**, 753;
b) R. Roy, F. D. Tropper, A. Romanowska, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 1611.
- [24] E. A. Talley, M. D. Vale, E. Yanovski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**, 2037.
- [25] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.*, **1901**, 34, 957.

- [26] J. Lehmann, Kohlenhydrate: Chemie und Biologie – 2., Neubearb. und erw. Aufl. – Stuttgart; New York: Thieme, 1996. (1. Aufl. u. d. T. : J. Lehmann, Chemie der Kohlenhydrate, 1976).
- [27] B. Helferich, E. Schmitz-Hillebrecht, *Chem. Ber.*, **1933**, 66,378.
- [28] R. R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1994**, 50, 21.
- [29] a) B. Fraser-Reid, P. Konradsson, D. R. Mootoo, U. J. Udodong, *Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1988**, 823;
b) D. R. Mootoo, V. Date, B. Fraiser-Raid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 2662.
- [30] L.-F. Tietze; R. Fischer, H.-J. Guder, *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 4661.
- [31] a) K. Wallenfels, J. Lehmann, *Liebigs Ann. Chem.*, **1960**, 635, 166;
b) R. J. Ferrier, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **1965**, 20, 67;
c) K. Toshima, K. Tatsuta, *K. Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1503;
d) J. Thiem, H. Karl, J. Schwentner, *Synthesis*, **1978**, 696;
e) D. A. Griffith, S. J. Danishevsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 5811;
f) D. A. Griffith, S. J. Danishevsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 5863.
- [32] a) P. Fügedi, P. J. Garegg, H. Lönn, T. Norberg, *Glycoconjugate J.*, **1987**, 4, 97;
b) F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.*, **1988**, 177, C 13;
c) C. Murakata; T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 2439;
d) F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.*, **1990**, 202, 225;
e) P. Fügedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.*, **1986**, 149, C 9.
- [33] a) A. F. Bochkov, G. E. Zaikov in *Chemistry of the O-Glycosidic Bond: Formation and Cleavage*. Pergamon Press: Oxford 1979;
b) H. Paulsen, *Angew. Chem.*, **1982**, 94, 184;
c) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.*, **1986**, 98, 213;
d) H. Paulsen, *Angew. Chem.*, **1990**, 102, 851;
e) P. Sinay, *Pure Appl. Chem.*, **1991**, 63, 519;
f) K. Toshima, K. Tatsuda, *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1503;
g) F. Barres, O. Hindsgaul, *Glycosylation Methods in Oligosaccharide Synthesis* in B. Ernst, C. Leumann (Hrsg.), *Modern Synthetic Methods 1995*, S. 281, Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel 1995.
- [34] C. A. A. van Boeckel, *Protective Group Strategies in the Synthesis of Functionalized Carbohydrates* in R. Scheffold (Hrsg.), *Modern Synthetic Methods 1992*, S. 439, Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, 1992.
- [35] a) H. Paulsen, *Angew. Chem.*, **1990**, 102, 851;
b) J. Thiem, T. Wiemann, *Angew. Chem.*, **1990**, 102, 78.
- [36] G. Ljunger, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, 16, 751.

- [37] J. E. Beecher, A. T. Andrews, E. N. Vulfson, *Enzyme Microb. Technol.*, **1990**, 12, 955.
- [38] M. Therisod, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 85, 3977.
- [39] Y.-F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 7200.
- [40] a) A. Chogare, J. Sudesh-Kumar, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 1533;
b) A. Chogare, J. Sudesh-Kumar, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 134;
c) V. Gotor, R. Pulido, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1991**, 491.
- [41] a) D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 5531.
b) A. Uemura, K. Nozaki, J. Yamashita, M. Yasumoto, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 3817;
c) B. Berger, C. G. Rabiller, K. Königsberger, K. Faber, H. Griengl, *Tetrahedron Asymm.*, **1990**, 1, 541.
- [42] H. Frykman, N. Öhrner, T. Norin, K. Hult, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 1367.
- [43] a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 7072;
b) A. Belan, J. Bolte, A. Fauve, J. G. Gourcy, H. V. Veschambre, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 256.
- [44] H. Seino, T. Uchibori, T. Nishitani, S. Inamasu, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 61, 1761.
- [45] R. G. Lorica, C. V. Venzon, D. L. Bernardo, A. C. Martinez, P. A. D. Sanchez, *Phillipp. J. Sci.*, **1990**, 119, 1.
- [46] M. Therisod, A.M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 5638.
- [47] S. Riva, J. Chopineau, A. P. G. Kieboom, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 584.
- [48] J. Chopineau, F. D. McCafferty, M. Therisod, A. M. Klivanov, *Biotech. Bioeng.*, **1988**, 31, 208.
- [49] A. E. M. Janssen, C. Klabbers, M. C. R. Franssen, K. van't Riet, *Enzyme Microb. Technol.*, **1991**, 13, 565.
- [50] N. Khaled, D. Montet, M. Pina, J. Graille, *Biotech. Lett.*, **1991**, 13, 167.
- [51] D. Mukesh, D. Sheth, A. Mokashi, J. Wagh, J. M. Tilak, A. A. Banerji, K. R. Thakkar, *Biotech. Lett.*, **1993**, 13, 1243.
- [52] G. B. Oguntimein, H. Erdmann, R. D. Schmid, *Biotech. Lett.*, **1993**, 15, 167.
- [53] A. Ducret, A. Giroux, M. Trani, R. Lortie, *Biotech. Bioeng.*, **1995**, 48, 214.
- [54] A. Ducret, A. Giroux, M. Trani, R. Lortie, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1996**, 73, 109.
- [55] M. Woudenberg-van Oosterom, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Biotech. Bioeng.*, **1996**, 49, 328.
- [56] D. B. Sarney, M. Virto, M. Bernard, E. N. Vulfson, *Biotech. Bioeng.*, **1997**, 50, 351.

- [57] L. Cao, A. Fischer, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, *Biocatal. Biotrans.*, **1997**, 14, 169.
- [58] A. E. M. Janssen, A. G. Lefferts, K. van't Riet, *Biotechnol. Lett.* **1990**, 12, 711
- [59] a) K. Adelhorst, F. Björkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Synthesis*, **1990**, 112.
b) F. Björkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 14, 934;
c) Kirk O. et al., EP 0394 280.
- [60] F. Björkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Trends Biotechnol.*, **1991**, 9, 360.
- [61] R. R. Pouline, A. R. Macrae, World Patent 95/23871 to Unilever, **1995**.
- [62] a) M. Lobell, Enzymatische Synthese von Estern: Direkte Veresterung, reversibler und irreversibler Acyltransfer, Diplomarbeit, BUGH-Wuppertal, **1989**.
- [63] a) G. Fregapane, D. B. Sarney, S. G. Greenberg, D. J. Knight, E. N. Vulfson, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1994**, 71, 87;
b) G. Fregapane, D. B. Sarney, E. N. Vulfson, *Biocatalysis*, **1994**, 11, 9.
c) G. Fregapane, D. B. Sarney, E. N. Vulfson, *Enzyme Microb. Technol.*, **1991**, 13, 796.
- [64] a) D. B. Sarney, H. Kapeller, G. Fregapane, E. N. Vulfson, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1994**, 71, 711;
b) D. B. Sarney, M. J. Barnard, D. A. MacManus, E. N. Vulfson, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1996**, 73, 1481.
- [65] a) R. Pulido, V. Gotor, *Carbohydr. Res.*, **1994**, 252, 55;
b) C. Chon, A. Heisler, N. Junot, F. Levayer, C. Rabiller, *Tetrahedron Asymm.*, **1993**, 4, 2441.
- [66] a) Schlotterbeck A., S. Lang, V. Wray, F. Wagner, Lipase-catalysed monoacylation of fructose, *Biotechnol. Lett.*, **1993**, 15, 61-4;
b) Ikeda I., A. M. Klivanov, Lipase-catalysed acylation of sugars solubilized in hydrophobic solvents by complexation, *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, 42, 788-91.
- [67] M. Berger, K. Laumen, M. P. Schneider, *Biotechnol. Lett.* **1992**, 14, 553.
- [68] A. Sharma, S. Chattopadhyay, *Biotechnol. Lett.*, **1993**, 15, 1145.
- [69] a) N. Kadi, L. Belloy, P. Chalier, *J. Agr. Food Chem.*, **2002**, 50, 20, 5552;
b) A. Ducret, J. F. Carriere, M. Trani, *Can. J. Chem.*, 2002, 80, 6, 653
c) G. H. Meulenbeld, B. M. De Roode, S. Hartmans, *Biocatal. Biotransform.*, **2002**, 20, 4, 251;
d) A. Ducret, M. Trani, R. Lortie, *Biotechnol. Bioeng.*, **2002**, 77, 7, 752;
e) K. Kita, T. Kurita, M. Ito, *Eur. J. Biochem.*, **2001**, 268, 3, 592;
f) M. Garcia-Garibay, A. Lopez-Munguia, E. Barzana, *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, 70, 6, 647;
g) B. M. de Roode, H. Zuilhof, M. C. R. Franssen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2000**, 2, 11, 2217;

- h) M. Garcia-Garibay, A. Lopez-Munguia, E. Barzana, *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, 69, 6, 627;
- i) S. Singh, M. Scigelova, D. H. G. Crout, *Tetrahedron Asymmetry*, **2000**, 11, 1, 223;
- j) M. Zarevucka, M. Vacek, Z. Wimmer, *Biotechnol. Lett.*, **1999**, 21, 9, 785;
- k) A. Ismail, S. Soultani, M. Ghoul, *J. Biotechnol.*, **1999**, 69, 2-3, 145;
- l) F. van Rantwijk, M. W. V. Oosterom, R. A. Sheldon, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **1999**, 6, 6, 511;
- [70] A. J. Croft-Hill, *J. Chem. Soc.*, **1898**, 634.
- [71] a) E. Bourquelot, H. Hérissey, J. C. R., *Acad. Sci.*, **1913**, 157, 732;
b) E. Bourquelot, *Ann. Chim.*, **1913**, 29, 145;
c) E. Bourquelot, *J. Pharm. Chem.*, **1914**, 10, 361;
- [72] a) K. Wallenfels, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **1960**, 42, 1715;
b) K. Ajisaka, H. Nishida, H. Fujimoto, *Biotechnol. Lett.*, **1987**, 9, 387.
- [73] a) E. Johansson, L. Hedbys, K. Mosbach, P.-O. Larsson, A. Gunnarsson, S. Svensson, *Biotechnol. Lett.*, **1986**, 8, 421;
b) K. Ajisaka, H. Nishida, H. Fujimoto, *Biotechnol. Lett.*, **1987**, 9, 243.
- [74] E. N. Vulfson, R. Patel, B. A. Law, *Biotechnol. Lett.*, **1990**, 12, 397.
- [75] G. Vic, D. Thomas, D. H. G. Crout, *Enzyme Microb. Tech.*, **1997**, 20, 8, 597;
G. Vic, J. J. Hastings, D. H. G. Crout, *Tetrahedron Asymmetr.*, **1996**, 7, 7, 1973;
G. Vic, D. H. G. Crout, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 279: 315-319 DEC 27 1995;
G. Vic, J. Biton, D. Lebeller, *Biotech. Bioeng.*, **1995**, 46, 2, 109;
G. Vic, D. H. G. Crout, *Tetrahedron Asymmetr.*, **1994**, 5, 12, 2513.
- [76] Handbook of Chemistry and Physics.
- [77] D. E. Stevenson, R. A. Stanley and R. H. Fumeaux, *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, 42, 657.
- [78] D. H. Crout and D. A. MacManus, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **1990**, 1865.
- [79] W. Boos, *Methods Enzymology*, **1982**, 89, 59.
- [80] F. Björkling and S. E. Godtfredsen, *Tetrahedron*, **1988**, 44, 2957.
- [81] K. G. I. Nilsson, *Carbohydr. Res.*, **1988**, 780, 53.
- [82] H.-J. Gais, A. Zeissler and P. Maidonis, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 5743.
- [83] D. H.G. Crout, D. A. MacManus and P. Critchley, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 376.
- [84] J. Lehmann and B. Rob, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 276, 199.
- [85] J. E. Beecher, A.T. Andrews and E.N. Vulfson, *Enzyme Microb. Technol.*, **1990**, 72, 955.

- [86] Z. Chahid, D. Montet, M. Pina, F. Bonnot and J. Graille, *Biotechnol. Lett.* **1994**, 76, 795.
- [87] D. H. G. Crout, S. Davies, R. J. Heath, C. O. Miles, D. R. Rathbone and B. E. P. Swoboda, *Biocatalysis*, **1994**, 9, 1.
- [88] S. Matsumura, H. Kubokawa and S. Yoshikawa, *Chem. Lett.*, **1991**, 6, 945.
- [89] D. E. Stevenson, A. D. Woolhouse, R. H. Fumeaux, D. Batcheler and C. T. Eason, *Carbohydr. Res.*, **1994**, 256, 185.
- [90] D. E. Stevenson, R. A. Stanley and R. H. Fumeaux, *Enz. Microb. Technol.*, **1996**, 18, 642.
- [91] D. E. Stevenson and R. H. Fumeaux, *Enz. Microb. Technol.*, **1996**, 18, 297.
- [92] M. A. Hassan, F. Ismail, S. Yamamoto, H. Yamada and K. Nakanishi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1995**, 59, 543.
- [93] A. Trincone, B. Nicolaus, L. Lama and A. Gambacorta, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1991**, 2841.
- [94] A. Trincone, B. Nicolaus, L. Lama, P. Morzillo, M. De Rosa and A. Gambacorta, *Biotechnol. Lett.*, **1991**, 13, 235.
- [95] A. Trincone, R. Improta, R. Nucci, M. Rossi and A. Gambacorta, *Biocatalysis*, **1994**, 10, 195.
- [96] A. Trincone, E. Pagnotta and G. Sodano, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 1415.
- [97] A. Trincone and E. Pagnotta, *Biotechnol. Lett.*, **1995**, 77, 45.
- [98] M. Santin, F. Rosso, A. Sada, G. Peluso, R. Improta and A. Trincone, *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, 49, 217.
- [99] A. M. Blinkovsky and J. S. Dordick, *Tetrahedron: Asymm.*, **1993**, 4, 1221.
- [100] P. Christakopoulos, M. K. Bhat, D. Kekos and B. J. Macris, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1994**, 16, 331.
- [101] Y. Ooi, N. Mitsuo and T. Satoh, *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, 33, 5547.
- [102] G. Vic and D. Thomas, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 4567.
- [103] K. Itano, K. Yamasaki, C. Kihara and O. Tanaka, *Carbohydr. Res.*, **1980**, 87, 27.
- [104] N. Mitsuo, H. Takeichi and T. Satoh, *Chem. Pharm. Bull.*, **1984**, 32, 1183.
- [105] Y. Gueguen, P. Chemardin, P. Pommères, A. Amaud and P. Galzy, *Bioresource Technol.*, **1995**, 353, 263.
- [106] E. N. Vulfson, R. Patel, J. E. Beecher, A. T. Andrews and B. A. Law, *Enzyme Microb. Technol.*, **1990**, 12, 950.
- [107] L. Fischer, R. Bromann, F. Wagner, *Biotechnol. Lett.*, **1995**, 77, 1169.
- [108] N. Taubken and J. Thiem, *Synthesis*, **1992**, 517.
- [109] N. Taubken, B. Sauerbrei und J. Thiem, *J. Carbohydr. Chem.*, **1993**, 72, 651.
- [110] A. Holazo, H. Shinoyama, Y. Kamiyama and T. Yasui, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1992**, 56, 822.
- [111] H. Itoh and Y. Kamiyama, *J. Ferment. Bioeng.*, **1995**, 80, 510.

- [112] P. Drouet, M. Zhang and M. D. Legoy, *Biotechnol. Bioeng.*, **1994**, 43, 1075.
- [113] A. J. J. Straathof, J. P. Vrijenhoef, E. P. A. T. Sprangers, H. van Bekkum and A. P. G. Kieboom, *J. Carbohydr. Chem.*, **1988**, 7, 223.
- [114] a) D. K. Allen, B. Y. Tao, *J. Surfactants Deterg.*, **2002**, 5, 3, 245;
b) X. M. Zhang, T. Kobayashi, S. Adachi, *Biotechnol. Lett.*, **2002**, 24, 13, 1097;
c) M. V. Flores, P. J. Halling, *Biotechnol. Bioeng.*, **2002**, 78, 7, 794;
d) M. V. Flores, K. Naraghi, J. M. Engasser, *Biotechnol. Bioeng.*, **2002**, 78, 7, 814
e) Y. C. Yan, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, *Biotechnol. Bioeng.*, **2002**, 78, 1, 31
f) Y. C. Yan, U. T. Bornscheuer, G. Stadler, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2001**, 103, 9, 583;
g) P. Degn, W. Zimmermann, *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 74, 6, 483;
h) J. A. Arcos, C. G. Hill, C. Otero, *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 73, 2, 104;
i) S. Sultani, J. M. Engasser, M. Ghoul, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2001**, 11, 4-6, 725, Sp. Iss. SI;
j) F. Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2001**, 11, 4-6, 949, Sp. Iss. SI;
k) D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, *Process Biochem.*, **1999**, 34, 9913;
l) Z. Y. Li, J. J. Liu, *Chinese J. Org. Chem.*, **1999**, 19, 2, 121;
m) L. Q. Cao, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **1999**, 6, 3, 279;
n) L. Q. Cao, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, *Biocatal. Biotransform.*, **1998**, 16, 4, 249,
- [115] Y.-C. Yeh, E. Gulari, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 75, 643.
- [116] G. Machmüller, Diplomarbeit, BUGH-Wuppertal, **1996**.
- [117] a) A. Fürst, E. Pretsch, A. Badertscher, R. Bürgin, M. E. Munk, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1992**, 32, 291;
b) A. Fürst, E. Pretsch, *Anal. Chem. Acta*, **1990**, 229, 17;
c) A. Fürst, E. Pretsch, *Anal. Chem. Acta*, **1990**, 233, 213.
- [118] K. Yoshimoto, Y. Itatani, Y. Tsuda, *Chem. Pharm. Bull.*, **1980**, 28, 2065.
- [119] M. Kitagawa, H. Fan, T. Raku, S. Shibatani, Y. Maekawa, Y. Hiraguri, R. Kurane, Y. Tokiwa, *Biotechnol. Lett.*, **1999**, 21, 355.
- [120] K.-H. Wagner, Dissertation 08. 1999, Universitaet Wien; Formal- und Naturwissenschaftliche Fakultae; Institut fuer Haushalts- und Ernaehrungswissenschaften
- [121] a) P. J. Halling, U. Eichborn, P. Kuhl, H.-D. Jakubke, *Enzyme Microb. Technol.*, **1995**, 17, 601;
b) M. P. Bemquerer, F. C. Theobaldo, M. Tominga, *Biomed. Biochim. Acta*, **1991**, 50, 94;

- c) P. Kuhl, P. J. Halling, H.-D. Jakubke, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 5213.
- d) P. Kuhl, U. Eichborn, H.-D. Jakubke in *Biocatalysis in Non-Conventional Media: Proceedings of the International Symposium, Noordwijkerhout* (J. Tramper, M. H. Vermüe, H. H. Beeftink, U. von Stockar, eds.). Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, **1992**, 513;
- e) I. Gill, E. N. Vulfson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3348;
- f) I. Gill, E. N. Vulfson, *Trends Biotechnol.*, **1994**, 12, 118;
- g) R. López-Fandiño, I. Gill, E. N. Vulfson, *Biotechnol. Bioeng.*, **1994**, 43, 1016.
- [122] G. Ljunger, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Biocatalysis*, **1993**, 7, 279-288;
- S. Basheer, J. Snape, K. Mogi, M. Nakajima., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1995**, 72, 231-237;
- S. Basheer, K. Mogi, M. Nakajima, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1995**, 72, 511-518;
- S. Basheer, K. Mogi, M. Nakajima, *Biotechnol. Bioeng.*, **1994**, 45, 187-195;
- S. Basheer, K. Mogi, M. Nakajima, *Process Biochem.*, **1994**, 30, 531-536;
- S. Basheer, M. Nakajima, U. Cogan, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1996**, 1475-1479;
- M. Nakajima, S. Ichikawa, R. Subramanian, K. K. Reddy, J. B. Snape, S. Basheer, K. Mogi, H. Nabatani, *INFORM.*, **1997**, 7, 951;
- S. Basheer, M. Nakajima, U. Cogan, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1998**, 75, 1-6;
- A. Fishman, S. Basheer, Shimon Shatzmiller, U. Cogan., *Biotechnol. Lett.* **1998**, 20, 535-538.
- [123] P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, 16, 178.
- [124] C. Panintrarux, S. Adachi, Y. Araki, Y. Kimura, R. Matsuno, *Enzyme Microb. Technol.*, **1995**, 17, 32.
- [125] a) P. J. Halling, *Biotechnol. Tech.*, **1992**, 6, 271;
- b) P. Kuhl, P. J. Halling, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1078, 326;
- c) L. Kvittingen, B. Sjursnes, T. Anthonsen, P. J. Halling, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 2793.
- [126] J. E. Kim, J. J. Han, J. H. Yoon, J. S. Rhee, *Biotechnol. Bioeng.*, **1998**, 57, 121.
- [127] Communications, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 5241-2.
- [128] M. Gelo-Pujic, E. Guibé-Jampel, A. Loupy, A. Trincone, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1001-2.
- [129] M. Lobell, M. Schneider, Synthesis of carboxylic vinyl esters, *Synthesis*, **1994**, 4, 375;
- C. Waldinger, *Dissertation*, BUGH Wuppertal **1995**.
- [130] a) A. M. Klivanov, *Acc. Chem. Res.*, **1990**, 23, 114;

- b) U. Bornscheuer, S. Schapöhler, T. Scheper, K. Schügerl, *Tetrahedron Asymm.*, **1991**, 2, 1011.
- [131] a) M. C. de Zoete, A. C. Kock-van Dalen, F. van Rabtwijk, R. A. Sheldon, *Biocatalysis*, **1994**, 10, 307;
b) M. C. de Zoete, A. C. Kock-van Dalen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 1831.
- [132] V. Gotor, R. Brieva, C. Gonzalez, F. Rebolledo, *Tetrahedron*, **1991**, 47, 9207.
- [133] a) F. Björkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 1301;
b) F. Björkling, H. Frykman, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 4587;
c) M.C. de Zoete, A. C. Kock-van Dalen, F. van Rantwijk, L. Maat, R. A. Sheldon, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1993**, 112, 462.
- [134] a) C. Astorga, F. Rebolledo, V. Gotor, *Synthesis*, **1991**, 350;
a) C. Astorga, F. Rebolledo, V. Gotor, *Synthesis*, **1993**, 287.
- [135] E. Menéndez, V. Gotor, *Synthesis*, **1993**, 72.
- [136] E. Rogalska, C. Cudrey, F. Ferrato, R. Verger, *Chirality*, **1993**, 5, 24.
- [137] a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas in *Hydrolases in Organic Synthesis – Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**;
b) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1998**, 37, 1608;
c) E. M. Anderson, K. M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal. Biotransform.*, **1998**, 16, 181;
d) H. Frykman, N. Öhrner, T. Norin, K. Hult, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 1367
e) V. Partali, V. Waagen, T. Alvik, T. Anthonsen, *Tetrahedron Asymm.*, **1993**, 4, 961;
f) C. Orrenius, A. Mattson, T. Norin, N. Öhrner, K. Hult, *Tetrahedron Asymm.*, **1994**, 5, 1363.
- [138] M. Arroyo, J. V. Sinisterra, *J. Org. Chem*, **1994**, 59, 4410.
- [139] a) A. M. Klibanov, *Chem. Tech.*, **1986**, 6, 354;
b) A. Zaks, A. M. Klibanov, *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 8017;
c) R. H. Valivety, P. J. Halling, A. R. Macrae, *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1118, 218.
- [140] L. A. S. Gorman, J. S. Dordick, *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, 39, 391.
- [141] a) M. Michiyo, WO Patent 8802775, **1986**, *Chem. Abstr.* 110: 20529;
b) H. P. Heldt-Hansen, M. Ishii, S. A. Patkar, T. T. Hansen, P. Eigtved in *ACS Symposium Series 389*, **1989**, S. 157.
- [142] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. D. Schrag, J. L. Sussman, K. H. G. Verschueren, A. Goldman, *Protein Eng.*, **1992**, 2, 197.

- [143] J. Uppenberg, N. Öhrner, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleytwegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T. A. Jones, *Biochemistry*, **1995**, 34, 16838.
- [144] M. Martinelle, M. Holmquist, K. Hult, *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, 1258, 272.
- [145] a) Brady L., A. M. Brzozowski, U. Derewenda, E. Dodson, S. Dodson, G. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, F. Björkling, B. Huge-Jensen, L. Norskov, L. Thim, U. Menge, *Nature*, **1990**, 343, 767;
b) Winkler F. K., A. D´Arcy, W. Hunziker, *Nature*, **1990**, 343, 771.
- [146] J. Pleiss, M. Fischer, R. D. Schmid, *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, 93, 67.
- [147] D. E. Koshland, *Biol. Rev.*, **1953**, 28, 416.
- [148] a) Q. Wang, S.G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 10137;
b) F. Theil, Enzyme in der Organischen Synthese, *Spektrum – Akademischer Verlag* 1997, Heidelberg; Berlin; Oxford, S. 189;
c) T. D. Heightman, A. T. Vasella, *Angew. Chem.*, **1999**, 111, 794 – *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, No. 6, 750;
d) A. E. Stütz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, No. 17, 1926.
- [149] W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, 1969.
- [150] a) S. G. Withers, R. A. J. Warren, I. P. Street, K. Rupitz, J. B. Kempton, R. Aebersold, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 5887;
b) S. G. Withers, R. Aebersold, *Protein Sci.*, **1995**, 4, 361.
- [151] a) C. A. Vernon, *Proc. R. Soc. London B*, **1967**, 167, 389;
b) D. C. Phillips, *Sci. Am.*, **1966**, 215(5), 78;
c) A. J. Kirby, *Nat. Struct. Biol.*, **1996**, 3, 107.
- [152] A. Vasella , G. J. Davies, M. Bohm, *Curr. Opinion in Chem. Biol.*, **2002**, 6, 5, 619.
- [153] a) J. M. Cassel, P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.*, **1988**, 10, 486;
b) M. Goldberg, D. Thomas, *Enzyme Microb. Technol.*, **1990**, 12, 1976;
c) P. Clapés, G. Valencia, P. Adlercreutz, *Enzyme Microb. Technol.*, **1992**, 14, 575.
- [154] C. Panintrarux, S. Adachi, Y. Araki, Y. Kimura, R. Matsuno, *Enzyme Microb. Technol.*, **1995**, 17, 32.

