

**Chemo- und biokatalytische Synthesestrategien zur Darstellung
und funktionellen Charakterisierung Aminosäure-basierter
Tenside aus biogenen Rohstoffen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Tristan Jolmes, M. Sc.

2023

Referent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Schörken

Tag der Promotion: 11.12.2023

*Für Hella und Finja,
ohne Euch wäre diese Arbeit noch immer eine Zettelsammlung*

*Chemistry, unlike other sciences,
sprang originally from delusions and superstitions,
and was at its commencement exactly on par with magic and astronomy.*

-Thomas Thomson (1773 – 1852)

Danksagung

Viele Projekte lassen sich nur durch die Hilfe und Unterstützung Anderer realisieren, so auch diese Doktorarbeit. An dieser Stelle möchte ich daher all den netten und hilfsbereiten Menschen danken, die ich im Lauf der Jahre getroffen habe und ohne die diese Arbeit nicht so wäre, wie sie nun existiert.

Mein besonderer Dank gilt apl. Prof. Dr. Sascha Beutel für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit als Doktorvater. Vielen Dank für die Unterstützung und Beratung auch in organisatorischen Belangen und im Umgang mit bürokratischen Hürden.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Ulrich Schörken für seine Betreuung und Unterstützung in wissenschaftlichen Fragestellungen und als mein Mentor bedanken. Vielen Dank für Deine Geduld und die Fähigkeit, mir auch bei ausfallender Vorarbeit, wechselnden Themen und nachlassender Motivation noch den nächsten Schritt zu weisen.

Ebenso möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen an der TH für die angenehme Zeit und viel Spaß im Labor, in Pausen und bei Kaffee und Kuchen bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinen mit-Doktoranden Anna und Valentin, die mein Unwissen als Chemiker ertragen und mich in biologischen Fragestellungen unterstützt haben, egal wie simpel und banal das Problem für einen Biologen war.

Genau so herzlich danke ich Stefan, Henrik und Nils aus dem 4. OG: Bei euch gab es immer die nötige Portion Normalität für einen Chemiker auf Bio-Abwegen.

Ich danke auch meinen Studierenden Lars, Frerik, Luisa, Melina, Rose und Abdo, die mit ihren Abschlussarbeiten einen wichtigen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben und mit Kuchen und Gesprächen einen großen Einfluss auf das Klima in unserem Arbeitskreis hatten.

Vor allem danke ich meinen Freunden und meiner Familie, die immer ein offenes Ohr hatten und mich während des Studiums und der Promotion sowohl unterstützt als auch wenn nötig vom Stress abgelenkt haben.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meiner Verlobten Hella und unserer Tochter Finja. Vielen Dank, dass ihr mich immer unterstützt, mich motiviert und einfach für mich da seid.

Kurzzusammenfassung

Der aktuelle Trend hin zu umweltfreundlicheren Produkten und grüneren Verfahren ist für die chemische Industrie von zunehmender Bedeutung und spielt bei der Synthese von Tensiden, die in großem Maßstab hergestellt werden, eine wichtige Rolle. Um diesem Trend gerecht zu werden, wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Strategien verfolgt: Einerseits die Entwicklung & Optimierung von grüneren Syntheserouten zur Herstellung von bereits etablierten Tensiden und andererseits wurden auch neue Tensid-Strukturen entwickelt, charakterisiert und evaluiert.

Acylaminosäuren werden technisch nach der Schotten-Baumann-Methode durch Acylierung mit Carbonsäurechloriden hergestellt, welche ihrerseits mit umweltschädlichen Chlorierungsreagenzien produziert werden müssen. In anfänglichen Untersuchungen wurden die chemische Kupplung mit Propylphosphonsäure-Anhydrid (T3P) und die enzymatische Acylierung mittels der neuen Aminoacylase aus *Paraburkholderia monticola* (PmAcy) als attraktive Alternativen identifiziert. Mit T3P konnte eine schutzgruppenfreie Synthese von Acylaminosäuren in guten Ausbeuten etabliert werden. Die Notwendigkeit des Einsatzes von organischen Basen qualifiziert T3P vor allem zur Synthese von Spezialchemikalien und potenziellen pharmazeutisch nutzbaren Peptid-Verbindungen. Mit PmAcy wurde erfolgreich die Kupplung von verschiedenen Aminosäuren und Fettsäuren demonstriert. Die Reaktion konnte in ein Puffer-freies System übertragen und ein Enzym-Recycling gezeigt werden. Die nachhaltige Synthese des antimikrobiellen Tensids *N*-Lauroyl-Arginin Ethyl Ester (LAE) gelang in einer zwei-schrittigen Kaskade mit PmAcy und immobilisierter *Pseudozyma antarctica* Lipase.

Neuartige Tensidstrukturen wurden in einer zweistufigen Reaktion aus vollständig biogenen Substraten erzeugt. Das Monoterpen Myrcen sowie konjugierte Linolsäure wurden in einem Mikrowellen-unterstützten Ansatz erfolgreich mit den zyklischen Anhydriden Maleinsäure-Anhydrid und Citraconsäure-Anhydrid verknüpft. Die ringöffnende Kupplung mit Aminosäuren liefert ein Portfolio an amphoteren und anionischen Tensiden, die in guten Ausbeuten erhalten wurden. Die anschließende physikochemische Charakterisierung zeigte hohe Schaumstabilitäten und minimale Oberflächenspannungen von bis zu 31 mN m^{-1} . Nach Veresterung mit Ethanol wurden kationische Tenside erhalten, die eine moderate antimikrobielle Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie Hefe zeigten.

Stichwörter: Aminosäure-Tenside, nachhaltige Synthese, Enzymkatalyse

Abstract

The current trend for greener products and processes has an increasing significance for the chemical industry and plays a major role in surfactant synthesis which are produced and released into the environment in large scale. To match this trend, this work follows two distinct strategies: Firstly, the development and subsequent optimization of greener synthesis routes for already established surfactants and secondly the development, characterisation, and evaluation of novel structures.

Usually, amino acids are acylated following the Schotten-Bauman-procedure via chlorinated carboxylic acids, which need to be synthesized by harmful and dangerous chlorination agents in the first hand. Initially, alternative routes were evaluated in hindsight of their applicability for the green synthesis of acyl-amino acids. Chemical coupling with propyl-phosphonic anhydride (T3P) and enzymatic acylation with novel aminoacylase from *Paraburkholderia monticola* (PmAcy) were found to be potentially viable candidates. The application of T3P allows synthesis of acyl-amino acids in good yields without further need for protective groups. The necessity for organic bases and the ability to easily produce tailor-made peptides qualifies the route for the application in the production of speciality chemicals and pharmaceutical active peptides.

The novel enzyme PmAcy accepts a variety of basic and hydrophobic amino acids as well as fatty acids in varying chain lengths. The application in a buffer-free system and a potential recycling strategy were demonstrated. The sustainable production of already established antimicrobial agent *N*-lauroyl-arginine ethyl ester (LAE) was demonstrated in a two-step enzymatic cascade with PmAcy and immobilized *Pseudozyma antarctica* lipase.

Successful development and synthesis of novel, completely bio-based surfactant structures was done in a two-step approach. Myrcene or conjugated linoleic acid were coupled to cyclic anhydrides maleic anhydride and citraconic anhydrides in a microwave-assisted reaction set-up. Subsequent coupling to amino acids gave access to a variety of amphoteric and anionic surfactants. Characterization of the surfactants showed good results with high foam stability over the course of 30 minutes and minimal surface tensions of 31 mN m⁻¹. Further examinations of ethyl-esterified products indicate a inhibitory effect against gram-positive and gram-negative bacteria as well as yeast.

Keywords: amino acid-surfactants, sustainable synthesis, terpene, enzyme catalysis

Inhaltsverzeichnis

WIDMUNG	I
ZITAT	II
DANKSAGUNG	III
KURZZUSAMMENFASSUNG	V
ABSTRACT	VI
INHALTSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XIV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XV
1 EINLEITUNG	1
1.1 EINFÜHRUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.2 TENSIDE	3
1.2.1 STRUKTUR- UND EIGENSCHAFTSPROFILE AMPHIPHILER MOLEKÜLE	3
1.2.2 HISTORISCHE ENTWICKLUNG VON TENSIDEN	5
1.2.3 NEUE ROUTEN ZU NACHHALTIGEN BIOBASIERTEN PRODUKTEN	7
1.2.4 AMINOSÄURE-TENSIDE: ACYLAMINOSÄUREN UND LIPOPEPTIDE	9
1.3 SYNTHESESTRATEGIEN ZU AMINOSÄURE-BASIERTEN TENSIDEN	13
1.3.1 SCHOTTEN-BAUMANN-ROUTE	13
1.3.2 T3P VERMITTELTE SYNTHESEN	15
1.3.3 BIODIENSYNTHESE SYNTHESEROUTEN	17
1.3.4 DIELS-ALDER-REAKTION	23
2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	28
2.1 SYNTHESESTRATEGIEN ZU BIOBASIERTEN AMINOSÄURE-TENSIDEN	28
2.2 REFERENZVERBINDUNGEN ÜBER SCHOTTEN-BAUMANN SYNTHESE	29
2.3 NACHHALTIGE ROUTEN FÜR DIE ACYLIERUNG VON AMINOSÄUREN	31
2.3.1 UNTERSUCHUNG VON NEUEN ANSÄTZEN FÜR DIE ACYLIERUNG	31
2.3.2 EVALUIERUNG DER T3P VERMITTELTEN SYNTHESE	34
2.4 ACYLIERUNG MIT AMINOACYLASE PMACY AUS <i>PARABURKHOLDERIA MONTICOLA</i>	37
2.4.1 EVALUIERUNG DES SYNTHETISCHEN POTENTIALS VON PMACY	37
2.4.2 REAKTIONSOPTIMIERUNG AM BEISPIEL VON <i>N</i> -LAUROYL-ARGININ	42
2.4.3 GRÜNE SYNTHESE DES ZUSATZSTOFFS ETHYL- <i>N</i> -LAUROYL-ARGINAT	49
2.5 CARBONYL-KONDENSATION & REDUKTIVE AMINIERUNG	52
2.6 LINKER-BASIERTE 3-KOMPONENTEN-TENSIDE	56
2.6.1 KOPPLUNG MIT ANHYDRIDEN UND MODIFIKATION	56
2.6.2 DIELS-ALDER VERMITTELTE SYNTHESE VON DREI-KOMPONENTEN-TENSIDEN	60
2.6.3 DIELS-ALDER-SYNTHESE VON TENSIDEN MIT LANGKETTIGEN DIENEN	74
3 ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK	80
4 MATERIAL UND METHODEN	84
4.1 ALLGEMEINE VORSCHRIFTEN	84
4.2 ANALYTIK & STRUKTURAUFKLÄRUNG	84
4.2.1 GC-ANALYTIK	84
4.2.2 HPLC- & LC-MS-ANALYTIK	85
4.2.3 NMR-SPEKTROSKOPIE	86

4.2.4	PRÄPARATIVE AUFREINIGUNG VON VERBINDUNGEN	86
4.2.5	SCHAUMMESSUNGEN.....	86
4.2.6	MESSUNG DER OBERFLÄCHENSpannung	87
4.2.7	UNTERSUCHUNG DER ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT.....	87
4.3	BIOKATALYTISCHE REAKTIONSVORSCHRIFTEN	87
4.3.1	MECHANOCHEMISCHE ACYLIERUNG MIT PAPAIN ODER CALB.....	87
4.3.2	GENERELLE REAKTIONSVORSCHRIFT FÜR DIE ENZYMKATALYTISCHE ACYLIERUNGSREAKTION MIT <i>PMACY</i>	88
4.3.3	SCALE-UP DER SYNTHES UND ISOLIERUNG VON <i>N</i> -LAUROYL-PHENYLALANIN....	88
4.3.4	ACYLIERUNG VON ARGININ IN EINEM PUFFER-FREIEN SYSTEM	89
4.3.5	RECYCLING-UNTERSUCHUNGEN FÜR <i>PMACY</i>	89
4.3.6	VERESTERUNG VON <i>N</i> -LAUROYL-ARGININ ZUR BILDUNG VON LAE	89
4.3.7	ENZYMATISCHE VERESTERUNG DER ORGANISCHEN LINKER	90
4.4	CHEMISCHE REAKTIONSVORSCHRIFTEN.....	90
4.4.1	ACYLIERUNG VON AMINOSÄUREN NACH DER SCHOTTEN-BAUMANN-METHODE...	90
4.4.2	SOLVOTHERMALE UMSETZUNG VON AMINOSÄUREN	90
4.4.3	SOLVOTHERMALE UMSETZUNG VON HEXYLAMIN.....	91
4.4.4	SYNTHES DES MONTMORILLONITE K-10 Fe^{3+} KATALYSATORS	91
4.4.5	ACYLIERUNG MIT MONTMORILLONIT K10- Fe^{3+} -KATALYSATOR	91
4.4.6	ACYLIERUNGSREAKTION MIT T3P.....	91
4.4.7	CHEMISCHE VERESTERUNG VON <i>N</i> -LAUROYL-ARGININ ZUR BILDUNG VON LAE .	92
4.4.8	KONDENSATION & REDUKTION VON AMINOSÄUREN MIT ALDEHYDEN.....	92
4.4.9	REDUKTIVE AMINIERUNG MIT Pd/C-ÜBERGANGSMETALL-KATALYSATOR	93
4.4.10	REDUKTIVE AMINIERUNG MIT Fe^{3+} -ÜBERGANGSMETALL-KATALYSATOR.....	93
4.4.11	REDUKTIVE AMINIERUNG MITTELS FESTER BASE.....	93
4.4.12	ALDEHYD-VERMITTELTE REDUKTIVE AMINIERUNG	94
4.4.13	KOPPLUNG MIT ORGANISCHEN ANHYDRIDEN.....	94
4.4.14	METATHESE VON ANHYDRID-MODIFIZIERTEN AMINOSÄUREN.....	94
4.4.15	DIELS-ALDER-REAKTION VON KONJUGIERTEN DIENEN UND ZYKLISCHEN ANHYDRIDEN.....	94
4.4.16	KONDENSATION DER DIELS-ALDER-ZWISCHENSTUFEN MIT AMINOSÄUREN.....	95
4.4.17	CHEMISCHE VERESTERUNG DER <i>N</i> -TERPEN-ANHYDRID-AMINOSÄUREN	95
4.4.18	HYDROLYSE UND UMESTERUNG VON DISTELÖL	95
4.4.19	ANREICHERUNG DER LINOLSÄURE	96
4.4.20	KONJUGATION DER DOPPELBINDUNGEN ZUR CLA.....	97
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	98
6	ANHANG	XVII
6.1	VERWENDETE CHEMIKALIEN	XVII
6.2	ERGÄNZENDE DATEN.....	XXII
6.2.1	ERGEBNISSE ZUR ACYLIERUNG MIT <i>PMACY</i>	XXII
6.2.2	ERGÄNZENDE DATEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER DREI-KOMPONENTEN- TENSIDE.....	XXIV
6.2.3	ERGÄNZENDE DATEN ZU DEN ANTIMIKROBIELLEN UNTERSUCHUNGEN	XXV
6.3	ANALYTISCHE DATEN.....	XXVI
6.3.1	<i>N</i> -ACYLAMINOSÄUREN	XXVI
6.3.1	<i>N</i> -ALKYLAMINOSÄUREN	XXVIII
6.3.2	LINKER-BASIERTE DREI-KOMPONENTEN TENSIDE	XXIX

6.4	CHROMATOGRAMME & SPEKTREN.....	XL
6.4.1	MS-SPEKTREN	XL
6.4.2	NMR-SPEKTREN	LVIII
6.5	LEBENS LAUF.....	LXVI
6.6	PUBLIKATIONS LISTE	LXVII
6.6.1	WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN WÄHREND DES STUDIUMS.....	LXVII
6.6.2	WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN AUS DER DOKTORARBEIT	LXVII
6.6.3	POSTER PUBLIKATIONEN	LXVIII

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: GEGENÜBERSTELLUNG DER SCHOTTEN-BAUMANN-ROUTE UND DER IM RAHMEN DER ARBEIT UNTERSUCHTEN GRÜNEREN ALTERNATIVEN.	2
ABBILDUNG 2: (A) AUFBAU UND EINTEILUNG IN HYDROPHILEN UND HYDROPHOBEN ANTEIL DES ANIONISCHEN TENSIDS <i>N</i> -LAUROYL-GLYCINAT UND (B) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON TENSIDEN MIT MEHR ALS EINER KOPFGRUPPE.	3
ABBILDUNG 3: SEIFENHERSTELLUNG MIT NATRIUMCARBONAT (A) UND GEGENÜBERSTELLUNG DES LEBLANC- (B) UND SOLVAY-VERFAHRENS (C). ^{1,3}	5
ABBILDUNG 4: SYNTHESE VON ABS ÜBER FRIEDEL-CRAFTS-ALKYLIERUNG UND SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON TPS UND LABS.	7
ABBILDUNG 5: STRUKTUREN CHEMISCH UND BIOTECHNOLOGISCH ERZEUGTER ZUCKER-TENSIDE.	8
ABBILDUNG 6: SYNTHESWEGE ZUR HERSTELLUNG VON AMINOSÄURE-TENSIDEN.	9
ABBILDUNG 7: STRUKTUR VON AUSGEWÄHLTEN NATÜRLICHEN UND SYNTHETISCHEN ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDEN.	12
ABBILDUNG 8: REAKTIONSSCHEMA DER SCHOTTEN-BAUMANN-REAKTION (BLAU) MIT KATALYSEZYKLUS DER DMF-VERMITTELTEN ACYLIERUNG EINER CARBONSÄURE MIT THIONYLCHLORID (GRÜN) UND DEM ZUGRUNDELIEGENDEN MECHANISMUS DER ACYLIERUNG EINER AMINOSÄURE MIT DEM GEBILDETEN CARBONSÄURECHLORID (ROT).	14
ABBILDUNG 9: STRUKTURFORMELN ORGANISCHER KUPPLUNGSGREAGENZIEEN.	15
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES T3P-VERMITTELTEN REAKTIONSSYKLUS.	17
ABBILDUNG 11: VON LIPASEN (A) UND PROTEASEN (B) KATALYSIERTE GLEICHGEWICHTSREAKTIONEN.	18
ABBILDUNG 12: VON AMINOACYLASEN BEEINFLUSSTES GLEICHGEWICHT ZWISCHEN ACYLAMINOSÄURE SOWIE FETTSÄURE UND AMINOSÄURE.	20
ABBILDUNG 13: SCHEMATISCHER AUFBAU DER ISOPREN-GRUNDSTRUKTUR VON TERPENOIDEN UND STRUKTURFORMELN VON AUSGEWÄHLTEN, BEKANNTEN VERTRETERN DER STOFFKLASSE.	24
ABBILDUNG 14: SCHEMATISCHER ABLAUF DER DIELS-ALDER-REAKTION UND DARSTELLUNG VON ENDO/EXO- PRODUKTEN AM BEISPIEL DER BILDUNG VON DCP.	25
ABBILDUNG 15: BEISPIELHAFTER DARSTELLUNG VON LITERATUR-BEKANNTEN VERBINDUNGEN AUS DER DIELS- ALDER-KOPPLUNG VON MALEINSÄURE UND MALEINSÄUREANHYDRID MIT TERPEN-EINHEITEN.	26
ABBILDUNG 16: UNTERSUCHTE TYPEN VERSCHIEDENER CHEMISCHER REAKTIONEN ZUR VERKNÜPFUNG VON HYDROPHOBEN RESTEN MIT DER AMIN-FUNKTION VON AMINOSÄUREN: ACYLIERUNGSREAKTION MIT FETTSÄUREN (BLAU), KONDENSATIONSREAKTION ZUR ALKYL-AMINOSÄURE (GELB) UND VERKNÜPFUNG HYDROPHOBER RESTE MITTELS ORGANISCHER LINKER (GRÜN).	28
ABBILDUNG 17: UNTERSUCHTE POTENZIELLE SYNTHESWEGE ZUR ACYLIERUNG VON AMINOSÄUREN.	31
ABBILDUNG 18: HPLC-CHROMATOGRAMM DER UMSETZUNG VON LAURINSÄURE MIT PHENYLALANIN (A) UND GLUTAMINSÄURE (B) UND MS-SPEKTRUM DER HAUPTPRODUKTE (C, D).	34
ABBILDUNG 19: CHROMATOGRAMM DER SEQUENZIELLEN KOPPLUNG VON LAURINSÄURE UND GLUTAMINSÄURE HYDROCHLORID UND DER FOLGENDEN UMSETZUNG MIT PHENYLALANIN.	35

ABBILDUNG 20: CHROMATOGRAMM DER PRODUKTMISCHUNG DER SEQUENZIELLEN VERBINDUNG VON (A) LAURINSÄURE, 5-ETHYL-GLUTAMAT HCL UND PHENYLALANIN UND (B) DER ANALOGEN REAKTION MIT GLU · HCL UND ARGOET · HCL.	36
ABBILDUNG 21: (A) VERGLEICH DER HPLC-ELSD-CHROMATOGRAMME VON <i>N</i> -LAUROYL-PHENYLALANIN AUS DER ENZYMATISCHEN (OBEN) UND CHEMISCHEN (UNTEN) SYNTHESE, (B) LC-MS-SPEKTRUM VON ENZYMATISCH SYNTHETISIERTEM <i>N</i> -LAUROYL-PHENYLALANIN.	38
ABBILDUNG 22: pH-OPTIMUM VON PMACY FÜR DIE SYNTHESE VON <i>N</i> -LAUROYL-PHENYLALANIN (A) SYNTHESEN VON pH = 6,0 – 9,0 WURDEN IN TRIS-HCL • DURCHGEFÜHRT, SYNTHESEN IM BEREICH VON pH = 9,0 – 13,0 IN NA-BORAT-PUFFER ■; SOWIE DIE PK _s -WERTE-BEREICHE DER SUBSTRATE (B). ^{199,200}	39
ABBILDUNG 23: AUSBEUTEN DER PMACY-VERMITTELTE UMSETZUNG VON VERSCHIEDENEN FETTSÄUREN MIT PHENYLALANIN (A) UND DARSTELLUNG DER HÖCHSTEN UMSÄTZE FÜR DIE PMACY-KATALYSIERTE SYNTHESE VON <i>N</i> -LAUROYL-AMINOSÄUREN: BASISCHE AMINOSÄUREN IN ORANGE, HYDROPHOBE IN GRÜN (B).	41
ABBILDUNG 24: ZEIT-AUSBEUTE-KURVEN FÜR DIE PMACY-KATALYSIERTE SYNTHESE VON LA BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN	43
ABBILDUNG 25: EINFLUSS VON VERSCHIEDENEN SUBSTRATVERHÄLTNISSEN AUF DIE ABSOLUTE PRODUKTKONZENTRATION (A) UND DIE RELATIVE AUSBEUTE BEZOGEN AUF DIE KOMPONENTE IM UNTERSCHUSS (B).	44
ABBILDUNG 26: ANTEIL DES <i>N</i> -LAUROYL-ARGININS AN DER ÜBERSTEHENDEN PHASE (A) UND AM, DURCH KÄLTE-FÄLLUNG ISOLIERTEN, FESTSTOFF (B).	46
ABBILDUNG 27: ZEIT-AUSBEUTE-VERLAUF DER SYNTHESE VON <i>N</i> -LAUROYL-ARGININ IM WÄSSRIGEN, PUFFER-FREIEN SYSTEM.	48
ABBILDUNG 28: GEGENÜBERSTELLUNG DER REAKTIONSPFADE ZUR ZWEISCHRITTIGEN SYNTHESE VON LAE.....	50
ABBILDUNG 29: VERESTERUNG VON <i>N</i> -LAUROYL-ARGININ MITTELS DOWEX-IONENTAUSSCHER: (A) HPLC-ELSD CHROMATOGRAMME DER ANFÄNGLICHEN MISCHUNG (OBEN), NACH 2 H (MITTIG) UND 24 H (UNTEN); (B) MS-SPEKTRUM DES ERHALTENEN PRODUKTS.	51
ABBILDUNG 30: SCHEMATISCHER DARSTELLUNG DER KONDENSATIONS- & REDUKTIONSREAKTION VON ALDEHYDEN MIT AMINOSÄUREN (OBEN) UND STRUKTURFORMELN DER EINGESETZTEN POTENZIELL REGENERATIVEN ALDEHYDE (UNTEN).	53
ABBILDUNG 31: SCHEMATISCHER ABLAUF DER REDUKTIVEN AMINIERUNG MIT ALKOHOLEN NACH DEM „BORROWING HYDROGEN“-MECHANISMUS.	54
ABBILDUNG 32: SCHEMATISCHE SYNTHESE VON DODECANOL-AMINOSÄURE-TENSIDEN ÜBER EINEN ORGANISCHEN LINKER (OBEN) UND STRUKTUREN DER BIO-BASIERTE CITRACONSÄURE- UND ITACONSÄURE-ANHYDRIDS.	57
ABBILDUNG 33: CHROMATOGRAMM MIT ZUORDNUNG DER SYNTHESE VON CITRACONYL-CYSTEIN.	58
ABBILDUNG 34: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER METATHESE-REAKTION EINER <i>N</i> -ITACONYL-AMINOSÄURE MIT LINALOOL UND STRUKTURFORMEL DES AQUA-MET-KATALYSATORS.	59
ABBILDUNG 35: REAKTIONSPFAD DER DIELS-ALDER-REAKTION VON MYRCEN UND MSA BZW. CA (A), VERGLEICH DER AUSBEUTEN DER REAKTION (B) UND GC-CHROMATOGRAMME FÜR MSA (C) UND CA (D) NACH 30 MIN. REAKTIONSZEIT.	61

ABBILDUNG 36: DARSTELLUNG DER REAKTION UND DER MÖGLICHEN PRODUKTISOMERE DER KONDENSATION AUS MYRCEN-MSA UND AMINOSÄUREN.	62
ABBILDUNG 37: VERGLEICH DES ¹ H-NMR-SPEKTRUMS DES PRODUKTS DER RINGÖFFNUNG MIT WASSER (OBEN) UND MIT PHENYLALANIN (UNTEN) DES MYRCEN-MSA-ANHYDRIDS.	62
ABBILDUNG 38: HPLC-CHROMATOGRAMM DES PRODUKTGEMISCH DER LYSIN-ACYLIERUNG (A); SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MONO- UND DI-ACYLIERTEN LYSIN (B) UND MASSEN-SPEKTREN DES MONO-ACYLIERTEN (C) UND DI-ACYLIERTEN LYSIN (D).	67
ABBILDUNG 39: MINIMALE OBERFLÄCHENSpannungen Σ_{MIN} UND SCHAUMHÖHEN DER DIELS-ALDER-TENSIDE BASIEREND AUF MYRCEN, MSA (A) BZW. CA (B) UND AMINOSÄUREN MIT DARSTELLUNG DER ANHYDRID-ZWISCHENSTUFEN.	68
ABBILDUNG 40: ENTWICKLUNG DER SCHAUMHÖHEN ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 30 MIN FÜR 4 mM LÖSUNGEN DER DIELS-ALDER-TENSIDE MIT MSA (A) UND CA (B) ALS LINKER.	70
ABBILDUNG 41: SYNTHESEROUTEN FÜR DIE DARSTELLUNG DES ZIELTENSIDS ÜBER DAS ANHYDRID-INTERMEDIAT AUSGEHEND VON DISTELÖL ZUR VERBESSERUNG DER ÜBERSICHT IST NUR JEWEILS EINS VON VIER MÖGLICHEN PRODUKT-ISOMEREN DARGESTELLT.	75
ABBILDUNG 42: GEGENÜBERSTELLUNG DER GC-CHROMATOGRAMME VON AUFGEREINIGTER UND HYDROLYSIERTER LINOLSÄURE (A) UND DEM LINOLSÄUREMETHYLESTER (B) SOWIE DIE ENTSPRECHENDEN PRODUKT-CHROMATOGRAMME NACH DER UMSETZUNG MIT MSA (C, D).	77
ABBILDUNG 43: HPLC-ELSD-CHROMATOGRAMM DER PRODUKTMISCHUNG AUS DER SYNTHESE VON CLA-OME-MSA-SER (A) UND MASSENSPEKTRUM DES ZUGEHÖRIGEN ZIELPRODUKTS (B).	78
ABBILDUNG 44: GENERELLE AUFTEILUNG DER ARBEIT MIT AUSGEWÄHLTEN ENZYMATISCH- (GRÜN) UND CHEMISCH- (BLAU) VERMITTELTEN ROUTEN.	80
ABBILDUNG A 1: DARSTELLUNG DER HEMMHOFTESTS DES VOLLSTÄNDIG VERESTERTEN DREIKOMPONENTEN-TENSIDS <i>N</i> -(MYRCEN-CA-)ARGININ-OEt BEI KONZENTRATIONEN VON 5 – 40 mM.	XXV
ABBILDUNG A 2: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -LAUROYL-PHENYLALANIN HERGESTELLT MITTELS ENZYMATISCHER ACYLIERUNG DURCH PMaCY.	XL
ABBILDUNG A 3: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -DODECANYL-ALANIN.	XL
ABBILDUNG A 4: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -DODECANYL-SERIN.	XLI
ABBILDUNG A 5: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -CITRONELLYL-ALANIN.	XLI
ABBILDUNG A 6: MS-SPEKTRUM VON MYRCEN-MSA-HYDROLYSAT.	XLII
ABBILDUNG A 7: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-ALANIN.	XLII
ABBILDUNG A 8: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-ARGININ.	XLIII
ABBILDUNG A 9: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-ASPARAGIN.	XLIII
ABBILDUNG A 10: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-ASPARAGINSÄURE.	XLIV
ABBILDUNG A 11: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-CYSTEIN.	XLIV
ABBILDUNG A 12: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-GLUTAMIN.	XLV
ABBILDUNG A 13: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-GLUTAMINSÄURE.	XLV
ABBILDUNG A 14: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-GLYCIN.	XLVI
ABBILDUNG A 15: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-HISTIDIN.	XLVI

ABBILDUNG A 16: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-ISOLEUCIN.....	XLVII
ABBILDUNG A 17: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-LEUCIN.....	XLVII
ABBILDUNG A 18: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-LYSIN.....	XLVIII
ABBILDUNG A 19: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA) ₂ -LYSIN.....	XLVIII
ABBILDUNG A 20: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-METHIONIN.....	XLIX
ABBILDUNG A 21: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-PHENYLALANIN.....	XLIX
ABBILDUNG A 22: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-SERIN.....	L
ABBILDUNG A 23: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-THREONIN.....	L
ABBILDUNG A 24: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-TRYPTOPHAN.....	LI
ABBILDUNG A 25: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-TYROSIN.....	LI
ABBILDUNG A 26: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-VALIN.....	LII
ABBILDUNG A 27: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-ARGININ-ETHYL ESTER.....	LII
ABBILDUNG A 28: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-LYSIN-ETHYL ESTER.....	LIII
ABBILDUNG A 29: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA) ₂ -LYSIN-ETHYL ESTER.....	LIII
ABBILDUNG A 30: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -MYRCEN-CA-HYDROLYSAT.....	LIV
ABBILDUNG A 31: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-CA)-ARGININ.....	LIV
ABBILDUNG A 32: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-CA)-CYSTEIN.....	LV
ABBILDUNG A 33: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-CA)-GLUTAMIN.....	LV
ABBILDUNG A 34: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-CA)-LYSIN.....	LVI
ABBILDUNG A 35: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-CA) ₂ -LYSIN.....	LVI
ABBILDUNG A 36: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-CA)-PHENYLALANIN.....	LVII
ABBILDUNG A 37: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-CA)-ARGININ-ETHYL ESTER.....	LVII
ABBILDUNG A 38: MS-SPEKTRUM VON <i>N</i> -(MYRCEN-CA)-LYSIN-ETHYL ESTER.....	LVIII
ABBILDUNG A 39: ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHz, CDCl ₃) VON <i>N</i> -LAUROYL-PHENYLALANIN HERGESTELLT MITTELS ENZYMATISCHER ACYLIERUNG DURCH PMACY.....	LVIII
ABBILDUNG A 40: ¹³ C-NMR-SPEKTRUM (100 MHz, CDCl ₃) VON <i>N</i> -LAUROYL-PHENYLALANIN HERGESTELLT MITTELS ENZYMATISCHER ACYLIERUNG DURCH PMACY.....	LIX
ABBILDUNG A 41: ¹ H- ¹ H-COSY-NMR-SPEKTRUM (400 MHz, CDCl ₃) VON <i>N</i> -LAUROYL-PHENYLALANIN HERGESTELLT MITTELS ENZYMATISCHER ACYLIERUNG DURCH PMACY.....	LIX
ABBILDUNG A 42: ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -DODECANYL-ALANIN.....	LX
ABBILDUNG A 43: ¹³ C-NMR-SPEKTRUM (100 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -DODECANYL-ALANIN.....	LX
ABBILDUNG A 44: ¹ H- ¹ H-COSY-NMR-SPEKTRUM (400 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -DODECANYL-ALANIN.....	LXI
ABBILDUNG A 45: ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -DODECANYL-ALANIN.....	LXI
ABBILDUNG A 46: ¹³ C-NMR-SPEKTRUM (100 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -DODECANYL-ALANIN.....	LXII
ABBILDUNG A 47: ¹ H- ¹ H-COSY-NMR-SPEKTRUM (400 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -DODECANYL-ALANIN.....	LXII
ABBILDUNG A 48: ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -CITRONELLYL-ALANIN.....	LXIII
ABBILDUNG A 49: ¹³ C-NMR-SPEKTRUM (100 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -CITRONELLYL-ALANIN.....	LXIII
ABBILDUNG A 50: ¹ H- ¹ H-COSY-NMR-SPEKTRUM (400 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -CITRONELLYL-ALANIN.....	LXIV
ABBILDUNG A 51: ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-PHENYLALANIN.....	LXIV
ABBILDUNG A 52: ¹ H- ¹ H-COSY-NMR-SPEKTRUM (400 MHz, D ₂ O) VON <i>N</i> -(MYRCEN-MSA)-PHENYLALANIN.....	LXV

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERBLICK ÜBER DIE ANWENDUNG UND AUSBEUTEN VON LIPASEN IN DER SYNTHESE VON ACYLIERTEN AMINEN UND AMINOSÄUREN	18
TABELLE 2: ÜBERBLICK ÜBER DIE ANWENDUNG UND AUSBEUTEN VON AMINOACYLASEN IN DER SYNTHESE VON ACYLIERTEN AMINOSÄUREN	21
TABELLE 3: ISOLIERTE AUSBEUTEN, REINHEITEN UND RETENTIONSZEITEN T_{RET} DER, MITTELS SCHOTTEN- BAUMANN-REAKTION SYNTHETISIERTEN, ACYLAMINOSÄUREN.	29
TABELLE 4: EINFLUSS DES pH-WERTS AUF DIE SYNTHESE VON <i>N</i> -LAUROYL-ARGININ.	42
TABELLE 5: AUSBEUTEN DER RECYCLING-RUNS FÜR PMACY.	47
TABELLE 6: ISOLIERTE AUSBEUTEN UND REINHEITEN DER KONDENSATIONSREAKTION VON MYRCEN-MSA UND MYRCEN-CA- MIT DEN 20 PROTEINOGENEN AMINOSÄUREN UND WASSER.	64
TABELLE 7: INHIBITIONSWIRKUNG FÜR DIE MYRCEN-ANHYDRID-BASIERTEN DREI-KOMPONENTEN-TENSIDE GEGEN GRAMPOSITIVE (<i>B. SUBTILIS</i> UND <i>C. GLUTAMICUM</i>) UND -NEGATIVE (<i>E. COLI</i>) BAKTERIENSTÄMME, SOWIE DIE HEFE <i>C. VISHWANATHII</i> BEI KONZENTRATIONEN VON 5 - 40 mM.	73
TABELLE 8: TEMPERATUR-GRADIENT DER GC-ANALYTIK.	85
TABELLE 9: LÖSUNGSMITTEL-GRADIENT DER HPLC-CHROMATOGRAPHIE	85
TABELLE 10: PRODUKTBILDUNG DURCH PMACY IN DER INITIALEN UNTERSUCHUNG DER <i>N</i> -LAUROYL- AMINOSÄURE-SYNTHESE	XXII
TABELLE 11: UNTERSUCHUNG DER UMSETZUNG VON ORGANISCHEN AMINEN DURCH PMACY MIT LAURINSÄURE UND ESSIGSÄURE.	XXIII
TABELLE 12: MINIMALE OBERFLÄCHENSINNUNGEN Σ_{MIN} UND SCHAUMHÖHEN DER DIELS-ALDER-TENSIDE BASIEREND AUF MYRCEN, CYCLISCHEN ANHYDRIDEN UND AMINOSÄUREN.	XXIV

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
[BMIM][PF ₆]	1-Butyl-3-Methylimidazolium-tetrachloroaluminat Phosphorhexafluorid
2M2B	2-Methyl-Butan-2-on
ABS	Alkylbenzylsulfonate
ACE	Angiotensin-Umwandelndes-Enzym
ACN	Acetonitril
AG	Alkylglucosid
APEO	Alkylphenolpolyethoxylate
CA	Citraconsäure Anhydrid
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration von engl. <i>critical micell concentration</i>
COMU	[(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholinocarbenium-hexafluorophosphat]
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EFSA	European Food Safety Authorization
EGD	European Green Deal
Et	Ethyl-Rest
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	generally recognized as safe - Einstufung der FDA für Lebensmittelzusatzstoffe
HATU	[O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat]
HBTU	(2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LA	<i>N</i> -Lauroyl-Arginin
LABS	lineare Alkylbenzylsulfonate
LAE	Ethyl- <i>N_α</i> -Dodecanoyl-Arginat

Abkürzung	Bedeutung
LC-MS	Liquid Chromatography coupled Mass spectrometry
Me	Methyl-Rest
Mio.	Millionen
mM	Millimolar
Mrd.	Milliarden
MSA	Maleinsäure Anhydrid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ÖSME	Ölsäuremethylester
p.a.	per annum
PmAcy	Aminoacylase aus <i>Paraburkholderia Monticola</i>
PyBOP	(Benzotriazol-1-yl-oxytripyrolidinophosphonium-hexafluorophosphat)
RL	Rhamnolipid
RMIM	<i>Rhizomucor Miehei</i> Lipase, immobilisiert
SAMP	short antimicrobial peptide
SL	Sophorolipid
SmAA	Aminoacylase aus <i>Streptomyces ambofaciens</i>
Syndet	Synthetische Tenside von engl. <i>Synthetic detergents</i>
T3P	Propylphosphonsäure Anhydrid
<i>t</i>-Bu	<i>tert</i> -Butyl-Rest
THF	Tetrahydrofuran
TPS	Tetrapropylenbenzylsulfonat

1 Einleitung

1.1 Einführung und Zielsetzung

Die Verwendung von Tensiden ist eng mit der Entwicklung der Menschheit verknüpft und erstreckt sich von der ersten dokumentierten Herstellung von Seifen aus pflanzlichen oder tierischen Fetten und Pottasche in der sumerischen Antike über die Entschlüsselung der Beziehung von Fettsäure und Ölen durch MICHEL EUGÈNE CHEVREUL bis in die Neuzeit.¹ Eine erste Revolutionierung der Synthese kam während der französischen Revolution mit der Einführung des LEBLANC-VERFAHRENS zur künstlichen Erzeugung von Soda und im 20. Jahrhundert mit der industriellen Einführung synthetischer Tenside auf, die eine hohe Verfügbarkeit mit geringen Preisen für weite Teile der Bevölkerung sicherstellte.^{2,3} Die Anzahl der verfügbaren Verbindungen und daraus resultierenden Produktmischungen hat sich in der weiteren Entwicklung systematisch erhöht, so dass sich Tenside heute in nahezu allen Bereichen des täglichen Lebens finden: vom Einsatz als Emulgatoren in der Produktion von Nahrungsmitteln, Kosmetika und Pharmazeutika über die Anwendung in Farben und Lacken bis hin zur klassischen Anwendung als waschaktive Substanzen in Körper- und Haushaltspflegeprodukten. Entsprechend sind Tenside nach Polymeren und Kunststoffen die zweitgrößte Produktgruppe der chemischen Industrie und in einer vielfältigen Bandbreite mit unterschiedlichen Kettenlängen und hydrophilen Kopfgruppen verfügbar.^{4,5} Die globale Marktgröße wurde 2019 mit circa 46 Mrd. Dollar beziffert und ein stetiges Wachstum von bis zu 4,5 % p.a. bis 2024 prognostiziert.⁶

In den letzten Jahren und Jahrzehnten fand im Denken der Anwender und Konsumenten ein zunehmender Wandel zu grüneren Produkten statt, der sich auch auf die Forschung übertragen hat. Erkenntnisse aus aktuellen Untersuchungen haben den Verdacht bestärkt, dass bisher großtechnisch hergestellte Tenside der Klasse der linearen Alkylbenzylsulfonate (LABS) durch ihre Toxizität gegenüber aquatischen Lebewesen einen gravierenden Einfluss auf die Artenvielfalt in Flüssen, Seen und Meeren haben, während Alkylphenoethoxylate (APEO) durch ihre östrogen-analoge Aktivität und Bioakkumulation einen starken Einfluss auf das Verhalten und die Fortpflanzung von Wasserorganismen haben.⁷⁻⁹ Verstärkt wird die Problematik dadurch, dass beide Stoffklassen petrochemische Erzeugnisse sind und somit eine hohe Abhängigkeit von der Erdölförderung aufweisen. Die Produktion und Förderung der Ausgangsstoffe ist mit hohem Energieaufwand und starker Umweltbelastung verbunden. Beide Aspekte wurden von der europäischen Kommission im „*European Green Deal*“ (EGD) adressiert, der die Etablierung einer von fossilen Rohstoffen unabhängigen, nachhaltigen und

energieeffizienten Kreislaufwirtschaft im europäischen Raum bis 2030 vorsieht.^{10,11} Daraus resultiert für die weitere Forschung und Produktion von Tensiden ein starker Druck, grünere Produktionsrouten und neue, biobasierte Verbindungen zu entwickeln.

Vor allem Acylaminosäure- und Acylpeptid-Tenside zeichnen sich nicht nur durch eine hohe Verfügbarkeit der nachhaltigen Substrate und Verträglichkeit der Produkte aus, sondern zeigen auch eine gute Bioabbaubarkeit durch die Spaltbarkeit der erzeugten Amidbindung. Dennoch weisen die Verbindungen bislang den gravierenden Nachteil auf, dass eine effiziente Synthese in größerem Maßstab nur chemisch nach der etablierten Schotten-Baumann-Route erfolgt. Der Einsatz von zuvor chlorierten Fettsäuren führt in Bezug auf die Gesamtreaktion zur Bildung von zusätzlichen Koppel- und Abfallprodukten und einer Verschlechterung der Umweltbilanz der Reaktion. Ausgehend von der dargelegten Problematik und den stetig wachsenden Anforderungen an oberflächen- und waschaktive Verbindungen und deren zugrundeliegender Chemie besteht ein ständiger Bedarf an Neuerungen und Innovationen im Bereich der Tensid-Forschung. Daraus resultiert die zweigeteilte Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit:

- 1) Etablierung neuer, nachhaltigerer Synthesewege zur Herstellung der bereits etablierten Tensidklasse der Acylaminosäuren (vgl. Abbildung 1) im Einklang mit den von ANASTAS und WARNER festgelegten *12 Prinzipien an die „Grüne Chemie“*¹²
- 2) Entwicklung und Charakterisierung neuartiger, grüner Tensid-Strukturen basierend auf nachwachsenden Rohstoffen

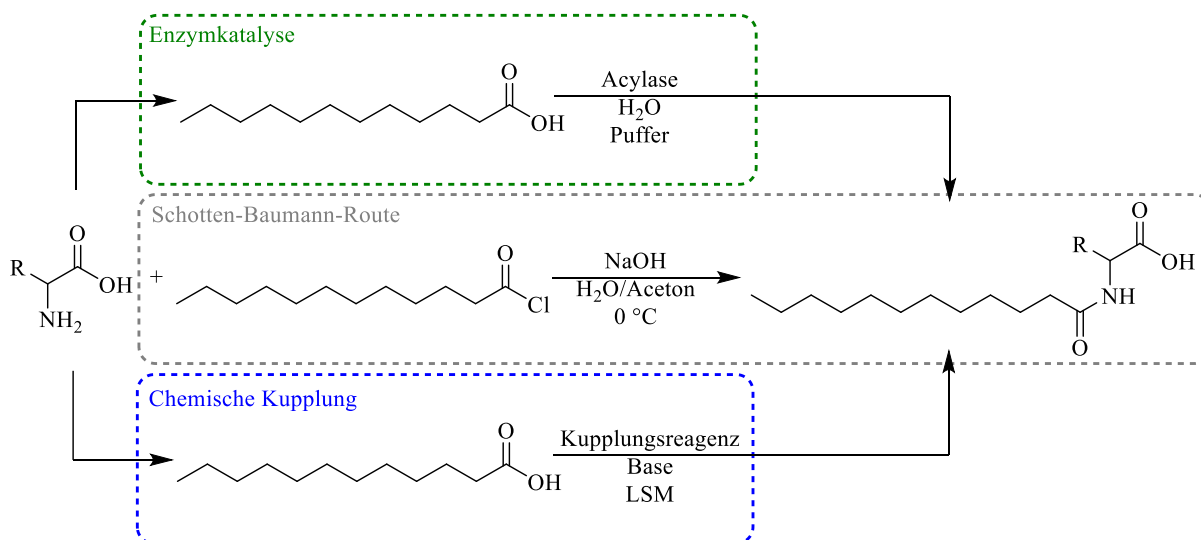


Abbildung 1: Gegenüberstellung der Schotten-Baumann-Route und der im Rahmen der Arbeit untersuchten grüneren Alternativen.

1.2 Tenside

1.2.1 Struktur- und Eigenschaftsprofile amphiphiler Moleküle

Tenside sind amphiphile Verbindungen, die sich in ein hydrophiles und ein hydrophobes Segment unterteilen lassen. Abbildung 2a zeigt den schematischen Aufbau und die Unterteilung von Tensiden in hydrophilen und hydrophoben Anteil am Beispiel der Acylaminosäure *N*-Lauroyl-Glycinat. Während der hydrophobe Part häufig durch lineare oder verzweigte Kohlenwasserstoffreste gebildet wird, kann die polar-hydrophile Kopfgruppe eine Vielzahl von Gestalten annehmen. Daher werden Tenside in der Regel nach den Eigenschaften der Kopfgruppe in anionische, kationische, nicht-ionische und amphotere Tenside unterteilt und klassifiziert.

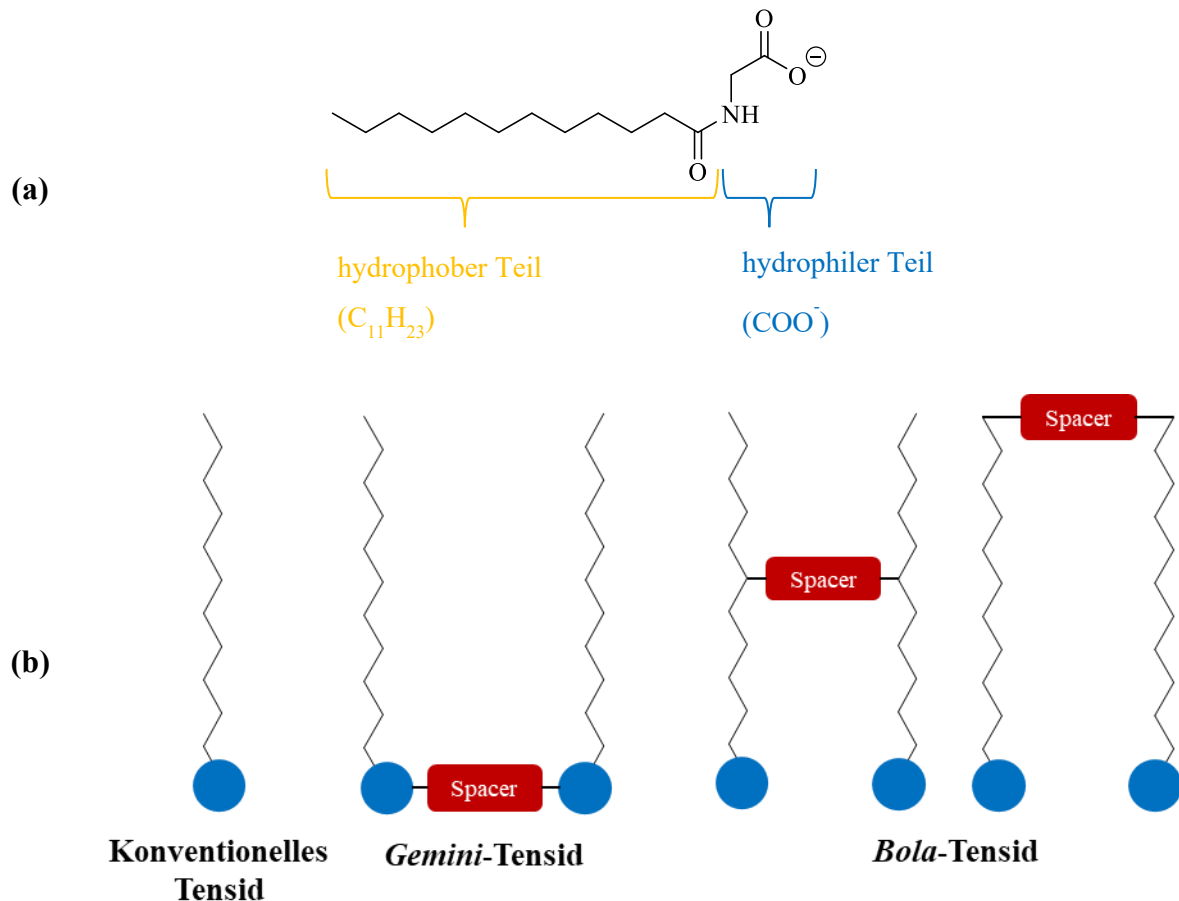


Abbildung 2: (a) Aufbau und Einteilung in hydrophilen und hydrophoben Anteil des anionischen Tensids *N*-Lauroyl-Glycinat und (b) schematische Darstellung von Tensiden mit mehr als einer Kopfgruppe.

Der amphiphile Charakter des Tensids ermöglicht die Anlagerung in die hydrophil-hydrophobe Grenzfläche und damit auch die direkte Beeinflussung der Grenzflächen- bzw. Oberflächenspannung. Der Polaritätsunterschied führt dabei zur Orientierung der Kopfgruppen

in Richtung der polaren Phase, während der hydrophobe Part sich zur unpolaren Phase ausrichtet, so dass der Kontakt zwischen hydrophobem Segment und wässriger Umgebung minimiert wird.^{13,14} Im niedrigkonzentrierten Bereich liegen die Moleküle dabei dispergiert an der Grenzfläche vor und bilden mit steigender Tensid-Konzentration durch Adsorption eine vollständig bedeckende Schicht an der Grenzfläche aus. Eine weitere Erhöhung der Konzentration resultiert in der Bildung von Mizellen, um den Kontakt des hydrophoben Segments mit dem wässrigen Medium zu vermeiden. Die hydrophoben Reste werden dabei zum Innern der Mizelle ausgerichtet, während die hydrophilen Kopfgruppen den Mantel der Mizelle bilden. Die Konzentration wird daher als kritische Mizellbildungskonzentration (engl. *critical micelle concentration*, CMC) bezeichnet. Die ausgebildeten Mizellen können dabei je nach Struktur und Konzentration des Tensids, der Temperatur und dem Salzgehalt der umgebenden Lösung Kugel-, Stäbchen- oder Scheibchenmizellen ausbilden, die bei weiterer Erhöhung der Tensid-Konzentration in die übergeordneten Strukturen von hexagonalen, kubischen oder lamellaren Systemen übergehen.^{15–17}

Neben den konventionellen, linearen Tensiden, aufgebaut aus einer Kopfgruppe mit einem hydrophoben Rest, wurden auch weitere Strukturen mit mehr als einem hydrophilen Segment (Abbildung 2b) entwickelt, die je nach Struktur und Verbindung der Tensid-Teile klassifiziert werden. Die Produkte der Verknüpfung von mindestens zwei amphiphilen Molekülen an oder nahe der hydrophilen Kopfgruppen mittels eines Linkers oder Spacers werden als *Gemini-Tenside* bezeichnet.^{18–20} *Gemini-Tenside* sind durch ihre starke Absenkung der Oberflächenspannung und sehr niedrige kritische Mizellbildungskonzentration verstärkt in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt. Diese Eigenschaften harmonisieren besonders mit der Struktur von Aminosäure-Tensiden, die durch die Seitenkette an der hydrophilen Kopfgruppe relativ simpel mit weiteren amphiphilen Molekülen oder Spacern verknüpft werden können.^{21–24} So genannte *Bola-Tenside* hingegen zeigen einen dazu analogen Aufbau, verbinden die amphiphilen Moleküle allerdings am hydrophoben Segment, so dass ein kettenartiges Molekül mit hydrophilen Gruppen an beiden Enden entsteht. *Bola-Tenside* zeigen vergleichbare Oberflächenaktivitäten und höhere CMC-Werte als nicht-verknüpfte Einzel-Tenside, weisen aber aufgrund der anspruchsvolleren Struktur eine deutliche stärkere Faltung an der Grenzfläche auf.^{25–27}

1.2.2 Historische Entwicklung von Tensiden

Tenside besitzen bedingt durch ihren amphiphilen Charakter die Fähigkeit, sich in hydrophil-hydrophobe Grenzflächen anzulagern und so die Eigenschaften der entsprechenden Grenzflächen zu beeinflussen. Diese Oberflächenaktivität erzeugt auch den waschaktiven Charakter der Verbindungen, die daher seit jeher Einsatz im Bereich der persönlichen Hygiene finden. Erste Nachweise der Seifenherstellung aus natürlich vorkommenden Fetten und den Aschen von Pflanzen finden sich bereits in der Antike und wurden bis weit in die Moderne in diesem Maße weitergeführt (vgl. Abbildung 3a). Die starke Abhängigkeit der Seifenherstellung von Soda oder Pottasche, welche bis dahin mit großem Aufwand und unter massiven ökologischen Auswirkungen gefördert werden mussten, wurde durch das von NICOLAS LEBLANC entwickelte Verfahren revolutioniert, mit dem Soda synthetisch aus Natriumchlorid, Schwefelsäure, Kalk

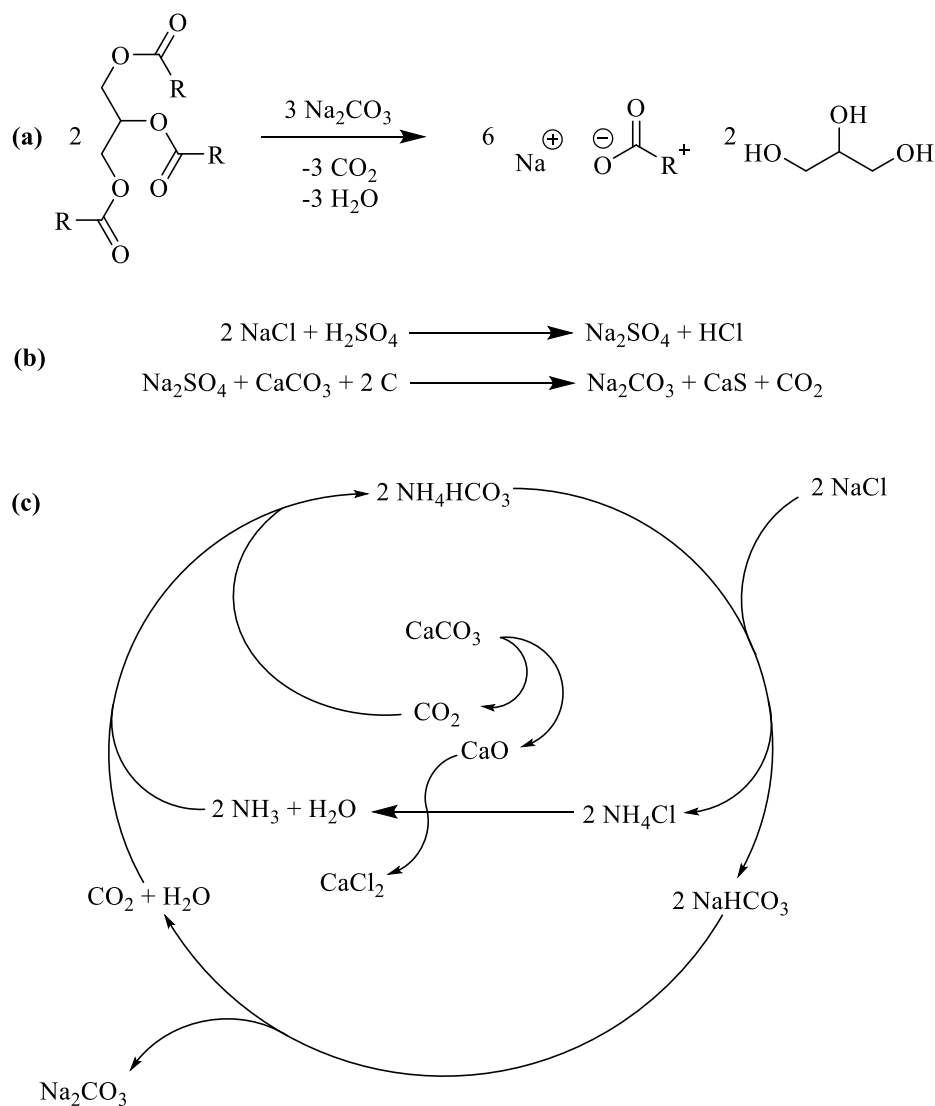


Abbildung 3: Seifenherstellung mit Natriumcarbonat (a) und Gegenüberstellung des LEBLANC- (b) und SOLVAY-VERFAHRENS (c).^{1,3}

und Kohle gewonnen werden konnte (vgl. Abbildung 3b).¹ Hierdurch wurde langfristig eine kostengünstige Herstellung von Seifen ermöglicht, die Seifen auch einer breiteren Masse der Bevölkerung zugänglich machte. Das später entwickelte SOLVAY-VERFAHREN ersetzte schließlich die Idee von NICOLAS LEBLANC durch Zugabe von Ammoniak und konnte als zyklischer Prozess die entstehende Umweltbelastung des LEBLANC-Verfahrens vermeiden sowie eine effizientere Synthese ermöglichen (Abbildung 3c).³

Ein Abweichen von der klassischen Formel des Kochens von natürlich vorkommenden Fetten mit basischen Verbindungen, in der Regel Hydroxide oder Carbonate von Alkalimetallen, kam erst mit dem ersten Weltkrieg auf, als es kriegsbedingt zu einer Verknappung von natürlichen Fetten zur Seifenherstellung kam. Die hierzu entwickelten synthetischen Tenside, auch als *Syndets*, von engl. „synthetic detergents“, bezeichnet, wurden zunächst durch die Sulfonierung von Naphthalen-Derivaten und ab den 1920ern durch die Hydrierung von langkettigen Estern zu den entsprechenden Alkoholen mit anschließender Veresterung mit Schwefelsäure gebildet. Die zunächst nur „aus der Not geborenen“ Alternativen für die konventionelle Seifenproduktion legten hiermit aber auch den Grundstein für den Erfolg von synthetischen Verbindungen wie den Alkylbenzolsulfonaten (ABS) ab den 1940er Jahren.^{28,29}

Zur Herstellung von Tetrapropylbenzylsulfonat (TPS) wurde zunächst Benzol über die FRIEDEL-CRAFTS-Alkylierung mit Propylentetramer, einer gemischten, verzweigten C₁₂-Fraktion, verknüpft und dann durch Zugabe von SO₃/H₂SO₄ und anschließende Neutralisation in die entsprechenden Sulfonate überführt. Die erhaltene Mischung von größtenteils verzweigten Dodecylbenzylsulfonaten lieferte exzellente Tensideigenschaften, allerdings kristallisierte sich dabei auch schnell heraus, dass die synthetischen Stoffe im Vergleich zu den natürlich gewonnenen Seifen eine deutlich schlechtere Bioabbaubarkeit besitzen, die in einer kontinuierlichen Anreicherung im Abwasser resultierte. Das Aufschäumen von Flüssen und Klärbecken, das bis zum Betriebsstopp von Klärwerken durch massive Schaumbildung führte, machte den Umstieg von verzweigten Alkylbenzolsulfonaten zu linearen Alkylbenzolsulfonaten (vgl. Abbildung 4) notwendig und reduzierte so die Problematik durch verbesserte Bioabbaubarkeit. Neben der Synthese über die FRIEDEL-CRAFTS-Alkylierung wurden in den Folgejahren auch weitere Syntheserouten entwickelt, die ausgehend von Olefinen eine gezielte Synthese linearer Produkte ermöglichen. Allerdings bilden auch hier in der Regel Chlor-Alkane und -Alkene den Grundstein für die Reaktion, so dass eine grüne Reaktionsführung nur bedingt möglich ist.^{1,29-31}

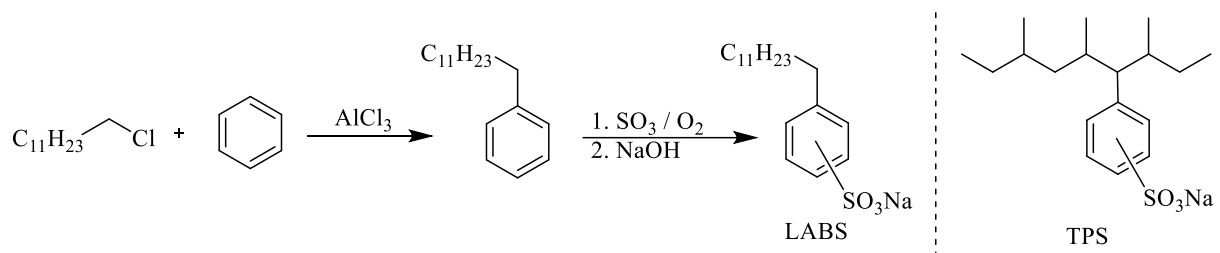


Abbildung 4: Synthese von ABS über Friedel-Crafts-Alkylierung und schematische Darstellung von TPS und LABS.

Weitere Einschränkungen in der generellen Anwendbarkeit zeigten sich in neuesten Untersuchungen, die unter Anderem nahelegten, dass die verbleibende Konzentration an LABS in Flüssen und Seen zu einer massiven Beeinträchtigung des aquatischen Lebens im entsprechenden Biom führt, da die LABS eine hohe Toxizität gegenüber den betroffenen Tieren besitzen. Daraus resultierte in den letzten Jahren zunächst eine Einschränkung und schlussendlich ein Verbot des Einsatzes in herkömmlichen Reinigungs- und Pflegeprodukten in der EU und den USA. Auch die zweite großtechnisch relevante Klasse an Tensiden, die Alkylphenolpolyethoxylate wurde im gleichen Zeitraum stark eingeschränkt, da sie einerseits ebenso aus mittlerweile limitierten, petrochemischen Rohstoffen gewonnen werden. Andererseits lieferten aktuelle Untersuchungen Hinweise auf eine Bioakkumulation im Fettgewebe von Fischen. Die Anreicherung im Körper der Tiere führte zu einer negativen Beeinflussung des Fortpflanzungsverhaltens und des Hormonhaushalts durch die östrogen-artige Aktivität der Tenside.^{7,9,32}

1.2.3 Neue Routen zu nachhaltigen biobasierten Produkten

Aufgrund der oben genannten Problematiken hat sich sowohl der Fokus der Forschung als auch das öffentliche Interesse der Konsumenten hin zu grüneren, nachhaltigeren Tensiden verschoben. Vermehrt wird dabei eine ressourceneffiziente Produktion aus nachwachsenden Rohstoffen angestrebt, deren Produkte bei hoher Leistung dennoch keinen negativen Einfluss auf die Umwelt haben sollen. Eine Entwicklung, der auch im *European Green Deal* Rechnung getragen wird. Von besonderem Interesse sind dabei zum einen natürlich vorkommende Tenside, die von Pflanzen und Mikroorganismen gebildet werden und oft Teil der natürlichen Abwehrmechanismen sind, und zum anderen Tenside, die auf biologischem oder chemischem Wege aus nachwachsenden Substraten hergestellt werden können. Analoga zu den bereits gezeigten LABS bilden dabei die Gruppen der Fettsäuresulfonate und der Fettalkoholsulfate. Hierbei werden die entsprechenden Substrate mit einer Kettenlänge von C_{10} - C_{18} analog zur

Methodik der LABS sulfoniert. Die erhaltenen anionischen Tenside zeigen sehr gute Tensideigenschaften, wobei mit steigender Kettenlänge auch die Waschleistung zunimmt und die Verbindungen hautfreundlicher werden. Das entsprechende Gegenion bildet, je nach Herstellungs- und Neutralisationsprozess, ein Alkali- oder Ammoniumkation.^{10,33–35}

Als nachhaltigere Alternativen, die auf den Sulphonierungs-Prozess und die damit verbundenen Chemikalien verzichten, seien an dieser Stelle Zucker- und Aminosäure-basierte Tenside genannt. Bei diesen bildet die namensgebende Gruppe die hydrophile Kopfgruppe und der hydrophobe Part wird in der Regel durch Addition von Fettalkoholen oder Fettsäuren gebildet. Beide Stoffgruppen dominieren gemeinsam derzeit den Markt für die vollständig biobasierten Tenside, auch in Hinblick auf die akademische Forschung.^{5,34} In den letzten Jahren wurden beide Verbindungsklassen auch von global agierenden Unternehmen, wie der BASF, Evonik und Unilever produziert.^{36,37} Dabei liefert der Einsatz der namensgebenden Saccharide vor allem nichtionischen Tenside (vgl. Abbildung 5) wie Alkylglucoside (AG), Rhamno- (RL) oder Sophorolipide (SL), die je nach verwendetem Fettalkohol und Zucker in ihren Eigenschaften variieren. AG und Fettsäuresulfonate werden dabei in der Regel chemisch hergestellt, wobei die Herkunft der Substrate nicht zwangsläufig zu 100 % nachwachsenden Ursprungs sein muss.^{1,5}

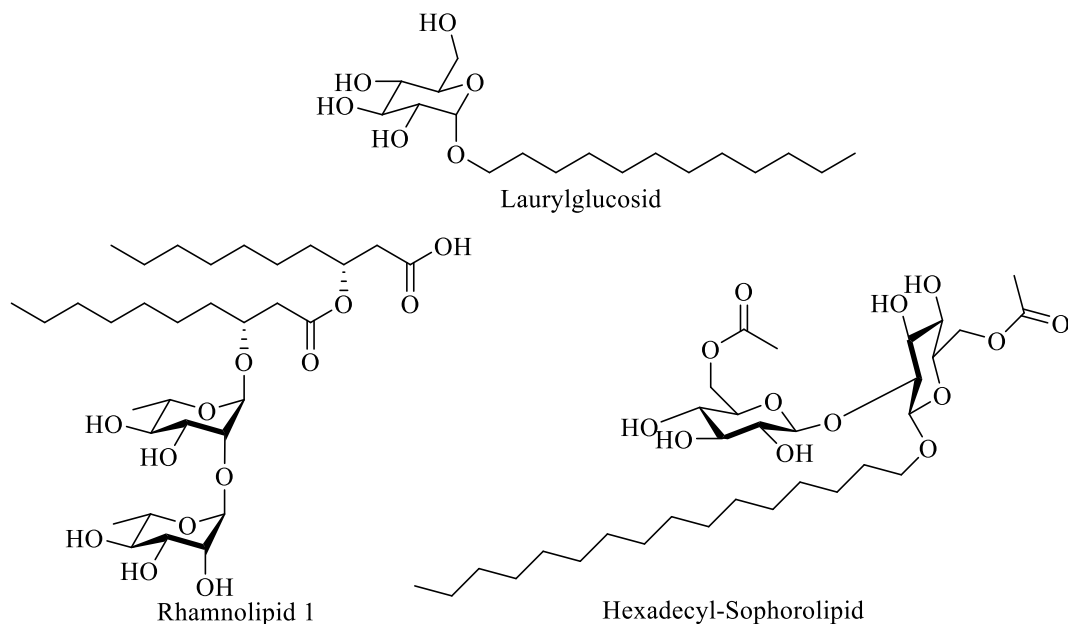


Abbildung 5: Strukturen chemisch und biotechnologisch erzeugter Zucker-Tenside.

Die RL- und SL-Verbindungen hingegen sind oft Teil der natürlichen biochemischen Prozesse von Mikroben und dort zum Beispiel Teil der Immunabwehr. Aktuelle Untersuchungen legen daher häufig den Fokus auf die Ganzzell-Katalyse, bei der Tenside in mikrobiellen Zellen

hergestellt werden und die mittlerweile sehr hohe Ausbeuten erlauben. Über weitere Identifizierung von Biotensid-produzierenden Mikroorganismen und genetische Optimierung der Produktionsstämme wird das technisch zugängliche Spektrum an verfügbaren Biotensiden kontinuierlich erweitert.³⁸⁻⁴¹

Die als Kopfgruppen eingesetzten Aminosäuren und kurzkettigen Peptidstrukturen erzeugen eine hohe Bandbreite von vor allem anionischen oder amphoteren Verbindungen.^{23,42-44} Die parallel zu den Zuckertensiden stehenden Verbindungen können, bedingt durch die Struktur der Aminosäuren, nach der Art der Verbindung von Aminosäure und hydrophobem Rest nochmals unterteilt werden. Hieraus ergeben sich beispielsweise die Ester- und Amid-Tenside, die durch die Reaktion der Säuregruppe mit einem Alkohol bzw. Amin erhalten werden. Darüber hinaus erzeugt die Reaktion der Amin-Funktion mit Alkylhaliden *N*-Alkyl-Aminosäure-Tenside und mit Acylhaliden entsprechend *N*-Acylaminosäuren und *N*-Acylpeptide (vgl. Abbildung 6).^{45,46}

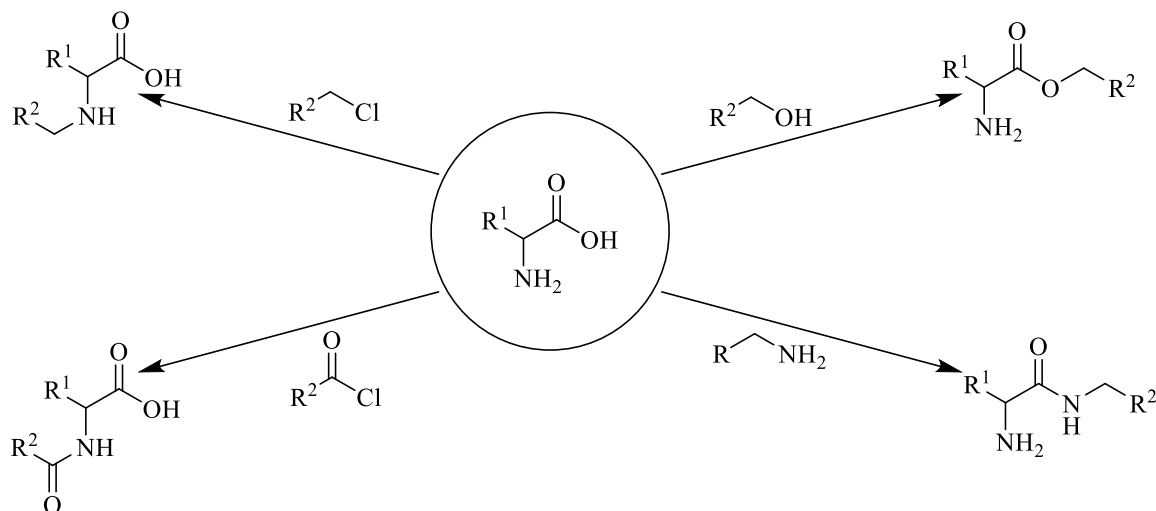


Abbildung 6: Synthesewege zur Herstellung von Aminosäure-Tensiden.

1.2.4 Aminosäure-Tenside: Acylaminosäuren und Lipopeptide

Aminosäuren sind wichtige Bausteine des Lebens und daher quasi omnipräsent im täglichen Leben. Ein Großteil der Aminosäuren ist dabei im Aufbau von Peptiden und Proteinen gebunden, die verschiedenste Funktionen in den Zellen und im Körper übernehmen können.⁴⁷⁻⁵⁰ Die Gewinnung und Synthese von Aminosäuren wurde aufgrund dieser vielfältigen Eigenschaften daher schon früh untersucht und weiterentwickelt. Erste Erfolge in der Synthese wurden von ADOLPH STRECKER bereits 1850 mit der nach ihm benannten Cyanhydrin- bzw. STRECKER-Synthese erzielt. Die Herstellung von Alanin gelang ausgehend von Acetaldehyd durch Reaktion mit Ammoniak und Blausäure. Allerdings liefert die Synthese durch mangelnde asymmetrische Induktion eine Mischung aus D- und L-Alanin.^{51,52} Auch die Synthese von

Cystein basierend auf der weiterentwickelten Methode von ASINGER und die Herstellung von Methionin aus Acrolein, Blausäure und Methylmercaptan benötigt nicht nur gesundheits- wie auch umweltschädliche Chemikalien, sondern liefert in der Regel racemische Mischungen von Aminosäuren, die nach der Synthese noch chromatographisch getrennt werden müssen. Attraktiver ist daher die Gewinnung von Aminosäuren aus natürlichen Peptid- und Proteinquellen, wodurch zwar je nach eingesetztem Substrat eine Mischung von Aminosäuren mit unterschiedlichen Anteilen erhalten wird, allerdings auch nur Isomeren-reine L-Aminosäuren erhalten werden. Die gängigste und auch großtechnisch angewandte Methode zur Spaltung der Peptidbindungen ist die saure Hydrolyse durch Zugabe von Salzsäure, der eine chromatographische Trennung der einzelnen Aminosäuren nachgeschaltet wird. Durch ihre unterschiedlichen Polaritäten kann eine gezielte Elution einzelner Aminosäuren erreicht werden.^{53–55}

Alternativ lassen sich die Aminosäuren gezielt auf fermentativem Wege erzeugen, wobei unter anderem *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt werden. Beide Bakterien-Gruppen finden vielfältige Anwendung in der Produktion von Aminosäuren und akzeptieren eine hohe Bandbreite an Zuckern als Substrate. Coryneforme Bakterien liefern bereits heute weltweit eine Produktion von circa 1 Mio. t/a an L-Glutaminsäure, das unter anderem in Form von Mononatrium Glutamat in der Lebensmittelindustrie und verestert als Detergens eingesetzt wird. *C. glutamicum* wird darüber hinaus für die Erzeugung von verschiedensten anderen Aminosäuren wie Phenylalanin, Serin, Prolin und Arginin eingesetzt. Mit genetisch modifizierten Strängen von *C. glutamicum* können Lysin und Glutaminsäure mit über 50 % Ausbeute hergestellt werden.^{56–60} Auch *E. coli* lässt sich als flexibles Werkzeug für die Herstellung von unter anderem Lysin, Methionin, Tyrosin und Threonin einsetzen. Durch Modifikation einzelner Gene ist PARK und LEE die selektive Herstellung der unpolaren Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin gelungen, während RODRIGUEZ ET AL. durch selektive Modifikationen die gezielte Produktion der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin erreichte.^{61–64}

1.2.4.1 Acylaminosäuren

N-acylierte Aminosäuren und Peptide sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit besonderer Aufmerksamkeit betrachtet werden, da sie mit *N*-Lauroyl-Glutamat bereits heute in der industriellen Produktion von Bedeutung sind und sich durch die variable Seitenkette interessante Möglichkeiten zur Strukturvariation bieten. Die Tenside werden dabei wegen ihrer

guten Bioabbaubarkeit und daraus resultierender geringen Ökotoxizität als attraktive Alternativen zu bisher etablierten, zumeist petrochemischen Tensiden betrachtet. Des Weiteren zeichnen sie sich durch milde und hautschonende Eigenschaften aus, die sie auch in der Anwendung von kosmetischen Produkten besonders verträglich machen. Die hohe technische Verfügbarkeit und der regenerative Charakter der benötigten Substrate in Form von Aminosäuren und Fettsäuren erlaubt eine grüne Produktion in großem Maßstab. Gleichzeitig ermöglicht dies die Synthese von Verbindungen mit hohem Diversitätsgrad. Die Fettsäuren können dabei in Kettenlänge, Verzweigung und Modifikation am Kohlenstoff-Gerüst variiert werden. Die Aminosäuren hingegen erlauben den Zugriff auf ein Set bestehend aus den 20 proteinogenen und weiteren nicht-proteinogenen Aminosäuren mit unterschiedlichen strukturellen Motiven in der Seitenkette.^{22,65–69}

Untersuchungen zu den kationischen Acylaminosäuren, die aus Arginin und Lysin gebildet werden können, zeigen hier neben guten physikochemischen Eigenschaften auch eine starke antimikrobielle Wirkung gegen verschiedenste für die Nahrungsmittelindustrie relevante Keime, aber auch gegen maritime Mikroben, die für Biofouling an osmotischen Membranen verantwortlich gemacht werden.^{70–76} Nachfolgende Evaluationen haben für *N*-Lauroyl-Arginin-Ethylester (LAE) zusätzlich eine exzellente Bioabbaubarkeit und nicht vorhandene Toxizität durch Metabolisierung zur Laurinsäure, Arginin und Ethanol ergeben. In Folge der Zulassung durch die amerikanische Lebensmittel- und Arzneistoffzulassungsbehörde (*Food and Drug Administration*, FDA) und die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) wird LAE auch großtechnisch als antimikrobielles Lebensmitteladditiv hergestellt und eingesetzt.^{75,77–80}

1.2.4.2 Lipopeptide

Ebenso nutzt auch die Natur Lipopeptide, also Strukturen aus kurzkettigen, oft zyklischen Peptiden im Verbund mit hydrophoben Lipid-Resten, um tensidische Verbindungen zu erzeugen. Prominente Beispiele hierfür sind die hepta-Peptid-Verbindungen Surfactin und die Gruppe der Iturine (vgl. Abbildung 7), deren Produktion durch Mikroorganismen der Gattung *Bacillus* nachgewiesen werden konnte. Die tensidischen Moleküle werden von den Zellen zur Abwehr von konkurrierenden Mikroben freigesetzt.^{34,81,82} Durch eine Zunahme der Resistenzen von Bakterien und der Entwicklung multiresistenter Keime, die vor allem die Behandlung von ohnehin schon erkrankten Menschen erschwert, sind die natürlich vorkommenden, Peptidbasierten Verbindungen als Alternative für etablierte Antibiotika in den Fokus gerückt.

Ausgehend von den vergleichsweise großen natürlichen Lipopeptiden wurde daher in den letzten Jahren auch vermehrt Entwicklungsarbeit zur Synthese und Etablierung von antimikrobiell wirkenden Verbindungen geleistet. Ziel ist dabei eine effiziente, chemische Synthese von so genannten kurzkettigen antimikrobiellen Peptiden (short antimicrobial peptides, SAMP). Genauere Untersuchungen von HAUG, ISAKSSON und STRØM zeigten dabei eine hohe Wirkung durch Kombination der positiv-geladenen Aminosäure Arginin mit der sterisch anspruchsvollen Aminosäure Tryptophan bzw. Derivaten von **Trp**. Vermutet wird die Wirksamkeit dabei durch die Kombination beider Faktoren. Die kationisch bzw. partiell positiv geladenen Aminosäuren begünstigen eine Anlagerung an die negativ geladenen Teile der Zellmembranmoleküle. Die ausgeprägten unpolaren und aromatischen Anteile hingegen wechselwirken effektiv mit dem Inneren, ebenfalls unpolaren Anteil der Doppellipidschicht. Die Einlagerung der Peptid-Verbindungen sorgt damit zur Ausbildung von Tunneln und Lücken in der Zellmembran, wodurch der lebensnotwendige Konzentrationsgradient von Salzen nicht aufrechterhalten werden kann und Peptide und Nährstoffe austreten, wodurch schlussendlich der Zelltod eintritt.⁸³⁻⁸⁷

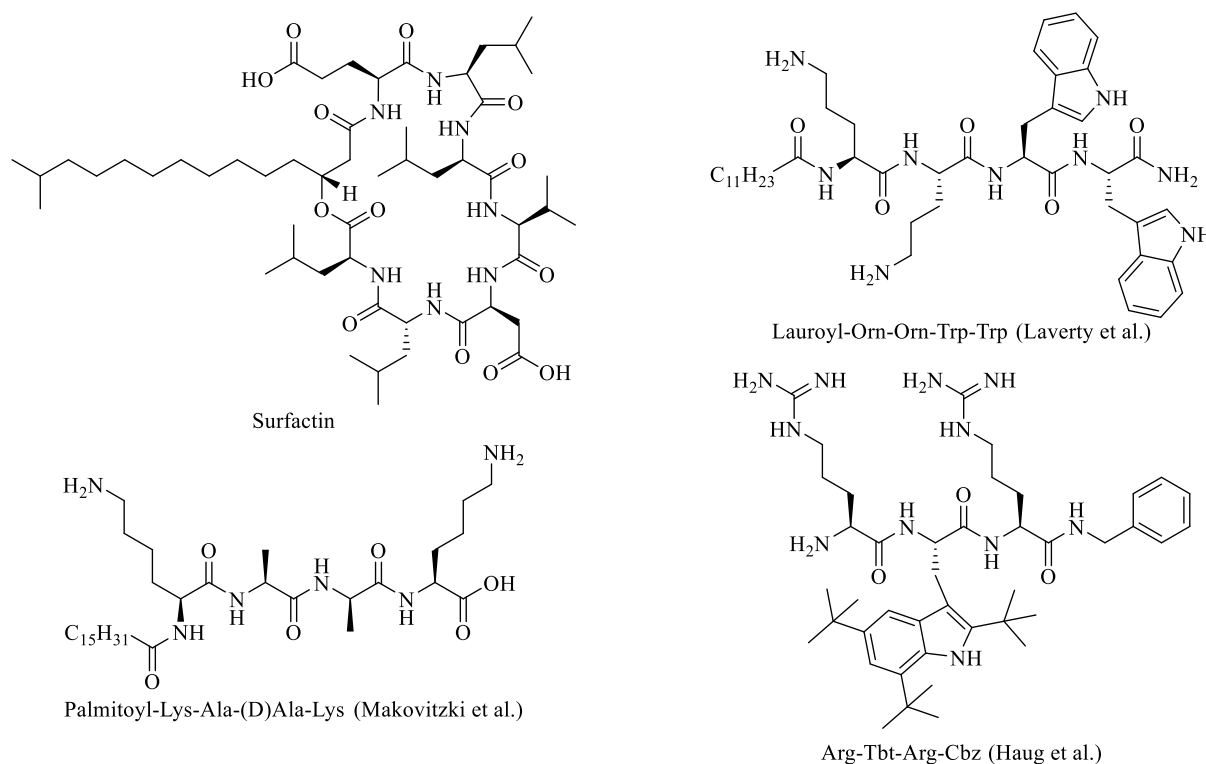


Abbildung 7: Struktur von ausgewählten natürlichen und synthetischen antimikrobiellen Peptiden.

Die Gruppe um MAKOVITZKI hingegen nutzte zur Verstärkung des Effekts die basische Aminosäure Lysin in Kombination mit Glycin oder Alanin zur Synthese kurzkettiger Peptide. Eine anschließende Acylierung am *N*-Terminus mit Palmitinsäure begünstigt das Verhalten zur

Einlagerung in Membranen.^{88,89} Die Gruppe um LAVERTY nutzte mit Laurinsäure oder Myristinsäure *N*-acylierte Peptide aus der nicht-proteinogenen Aminosäuren Ornithin und Tryptophan, um antimikrobielle Lipopeptide zu erzeugen.⁹⁰

1.3 Synthesestrategien zu Aminosäure-basierten Tensiden

Rein mechanistisch betrachtet werden die Verbindungen durch die Kondensationsreaktion der Amin-Funktion einer Aminosäure bzw. eines Peptids und der Säuregruppe einer Fettsäure gebildet. In der praktischen Anwendung hingegen führt die Kombination von hydrophoben Fettsäuren und hydrophilen Aminosäuren oft zu Löslichkeitsdifferenzen und der Konzentration der Substrate in unterschiedlichen Phasen. Auch bei erfolgreicher Solubilisierung in derselben Phase tritt in der Regel keine Produktbildung, sondern nur die Protonierung der Amin-Funktionen ein, wodurch eine unreaktive Mischung ausgebildet wird.^{5,46} Diese Hürden können durch Zugabe von lösungsvermittelnd wirkenden Stoffen reduziert werden, eine erfolgreiche Umsetzung erfordert allerdings häufig die vorherige Aktivierung der Säuregruppe. Zur Synthese von Aminosäure-basierten Tensiden stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden sollen.

1.3.1 Schotten-Baumann-Route

Die gängigste chemische und auch großtechnisch angewandte Methode zur Aktivierung der Fettsäuren ist der Einsatz von Säurechloriden im Rahmen der Schotten-Baumann-Route. Die ursprünglich von CARL SCHOTTEN und EUGEN BAUMANN zur Bildung von Benzoesäureestern aus Benzoylchlorid entwickelte Methode wird auch heute noch zur Umsetzung von Alkohol- und Amin-Nucleophilen zu den entsprechenden Estern und Amiden eingesetzt.^{91–93} Das Reaktionsschema der Schotten-Baumann-Reaktion für Lauroylchlorid mit einer Aminosäure ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Bildung der Carbonsäurechloride geschieht dabei über die Chlorierungsreagenzien Phosphortrichlorid, Phosgen oder Thionylchlorid.⁹⁴ In der theoretischen Betrachtung reicht die Zugabe des Chlorierungsagenten zur Carbonsäure aus, um unter Abspaltung von HCl das entsprechende Acylchlorid zu generieren. Dennoch wird zur Steigerung der Reaktivität und der Ausbeuten in der Regel DMF in katalytischem Maßstab zugesetzt, wodurch sich während der Chlorierung zunächst ein Chlor-Iminium-Ion, Vilsmeier-Reagenz genannt, bildet.^{95,96} Das Iminium-Ion wird im Anschluss von der Carbonsäure nucleophil angegriffen, das Chlorid-Anion abstrahiert und das Iminium-Ion wieder hergestellt.

Das freie Chlorid kann sich dann an den Carbonyl-Kohlenstoff anlagern und unter Spaltung des Esters DMF abspalten und in den Katalysezyklus einbringen.^{97,98}

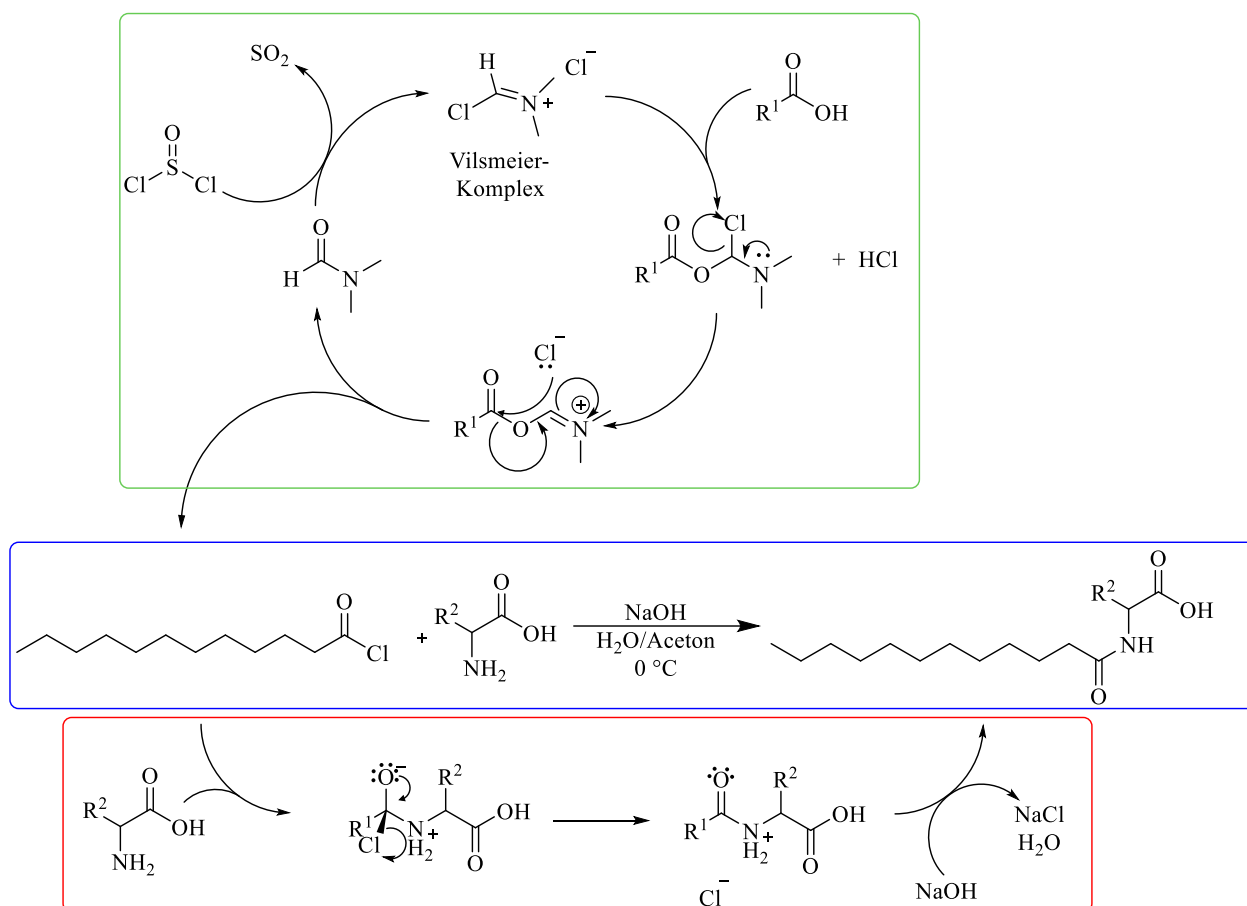


Abbildung 8: Reaktionsschema der Schotten-Baumann-Reaktion (blau) mit Katalysezyklus der DMF-vermittelten Acylierung einer Carbonsäure mit Thionylchlorid (grün) und dem zugrundeliegenden Mechanismus der Acylierung einer Aminosäure mit dem gebildeten Carbonsäurechlorid (rot).

Die mechanistische Betrachtung zeigt eine nucleophile Substitution durch Anlagerung der Amin-Funktion an das Carboxyl-Kohlenstoffatom. Durch Umlagerung des Elektronenpaares vom Oxid-Anion unter Wiederausbildung der Doppelbindung und konzertierte Abstraktion der Chlorid-Gruppe wird zunächst das protonierte Amid gebildet. Im anschließenden Schritt wird das *N*-protonierte Amin durch das Hydroxid-Anion der Base deprotoniert und das Chlorid-Anion bildet mit dem Natrium-Kation NaCl .^{93,99}

Die Anpassung der Syntheseroute zur *N*-Acylierung von Aminosäuren wurde von TAKEHARA in den 1970ern demonstriert und wird seitdem für die industrielle Produktion von Acylaminosäuren genutzt.¹⁰⁰ Während in der organischen Synthese oft Pyridin anstelle von Alkalihydroxiden eingesetzt wird, verbleibt die Synthese von Acylaminosäuren bei der Verwendung von NaOH zur Neutralisation. Einerseits wird dies durch den ohnehin stark hydrophilen

Charakter von Aminosäuren und die daraus resultierende Präsenz von Wasser im System begünstigt, andererseits kann so auf eine aufwändige Abtrennung des Pyridiniumhydrochlorids verzichtet werden und stattdessen das stöchiometrisch anfallende NaCl durch Waschen mit Wasser entfernt werden.^{51,100,101}

Besonders die stöchiometrische Bildung und damit notwendige Neutralisation von HCl im Verlauf der Reaktion als auch die initiale Chlorierung der Fettsäuren unter Einsatz von Phosgen, Thionylchlorid oder Phosphorchloriden und DMF bieten deutliches Verbesserungspotenzial in Hinblick auf die grünere Reaktionsführung.^{102–105}

1.3.2 T3P vermittelte Synthesen

Neben der initialen Chlorierung lassen sich Carbonsäuren auf chemischem Wege durch diverse Kupplungsreagenzien aktivieren. Das Überführen in einen aktivierten und reaktiveren Zustand funktioniert zwar mit einer Vielzahl erprobter Systeme, birgt aber den Nachteil, dass in der klassischen organischen Synthese verwendete Reagenzien oft überstöchiometrisch eingesetzt werden müssen, zusätzliche Additive benötigen und häufig gesundheits- oder umweltschädlich sind. Das Gefährdungspotenzial und die direkte Schädlichkeit von Kupplungsreagenzien wie HOBt, HATU, HBTU und PyBOP konnte durch Verwendung angepasster Reagenzien wie COMU (vgl. Abbildung 9) deutlich reduziert werden. Durch Anpassung der Reaktionsbedingungen, Lösungsmittelwechsel und Anwendung von Mikrowellenstrahlung konnten die Reaktionen zwar umweltfreundlicher und schonender gestaltet werden, allerdings verbleibt dennoch die Problematik der zumindest stöchiometrischen Anwendung der Reagenzien.^{106–108}

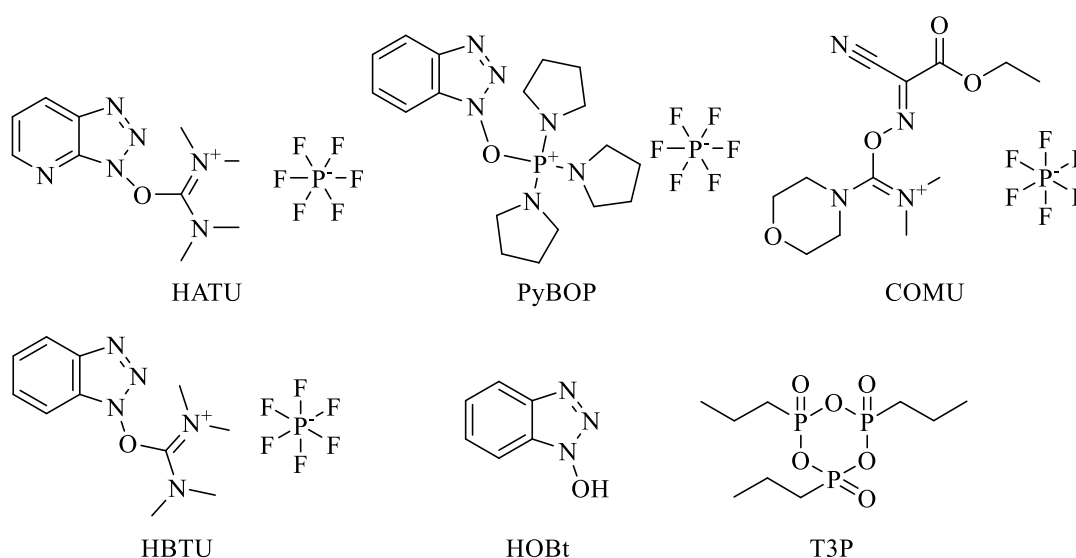


Abbildung 9: Strukturformeln organischer Kupplungsreagenzien.

Als attraktive Alternative bietet sich daher das Phosphor-basierte zyklische Propanphosphonsäure-Anhydrid (T3P) an, welches zwar ebenfalls stöchiometrisch angewandt werden muss, aber nach Abschluss der Reaktion mit der wässrigen Phase extrahiert und rezykliert werden kann.^{109,110} Vorteil des Reagenzes ist neben der hohen Stabilität bei Wasserausschluss auch die im Vergleich zu herkömmlichen Kupplungsreagenzien deutlich geringere Schädlichkeit für Mensch und Umwelt.¹¹¹ Generell wird T3P bislang zur gezielten chemischen Kupplung von Peptiden eingesetzt, wobei auch hier Schutzgruppen-Strategien zur Vermeidung von Nebenprodukten und zur Erhöhung der Selektivität genutzt werden. Darunter unter anderem Carboxy-Methyl-Dipeptide als Inhibitoren für das Angiotensin-Umwandelnde-Enzym (ACE). Dabei können auch sterisch anspruchsvolle Verbindungen synthetisiert und zyklisiert werden.¹¹²⁻¹¹⁴ Zusätzlich dazu erlaubt das Reagenz auch den Einsatz in einer Vielzahl anderer Reaktionen: Neben der Aktivierung von Carbonsäure-Gruppen und anschließender Amidierung bzw. Veresterung inklusive durch Ringspannung anspruchsvoller Lactame, wurde auch die Bildung von Nitrilen ausgehend von Carbonsäuren demonstriert.¹¹⁵⁻¹¹⁸ Ebenso wurde die Synthese von α -Aminophosphonsäuren, die Einsatz als Pflanzenschutzmittel oder in Antibiotika finden, im Rahmen der Kabachnik-Fields-Reaktion mit T3P erfolgreich demonstriert. Auch die Produktion von Coumarinen, die Anwendung in der Pharmaproduktion für die Krebstherapie, für die Behandlung von HIV-Medikamenten und als Antioxidantien finden, konnte durch die Perkin-Reaktion an Aldehyden und Ketonen sowie die Hydroxyaminierung der Carbonyle gezeigt werden.^{119,120} Zu diesem Zeitpunkt liegt allerdings noch kein Bericht über eine Anwendung in der gezielten Synthese von Acylaminosäuren und ihren Derivaten vor. T3P agiert dabei durch Anlagerung an die deprotonierte Carbonsäuregruppe (vgl. Abbildung 10). Dabei bildet T3P in dem Carbonsäure-Addukt eine bessere Abgangsgruppe und kann im Anschluss durch eine nucleophile Gruppe verdrängt werden. Im Verlauf der Reaktion nimmt das zyklische T3P mechanistisch betrachtet ein Äquivalent Wasser auf, welches im Anschluss thermisch entfernt und das T3P dabei rezykliert werden muss.^{112,113,117,118,120,121}

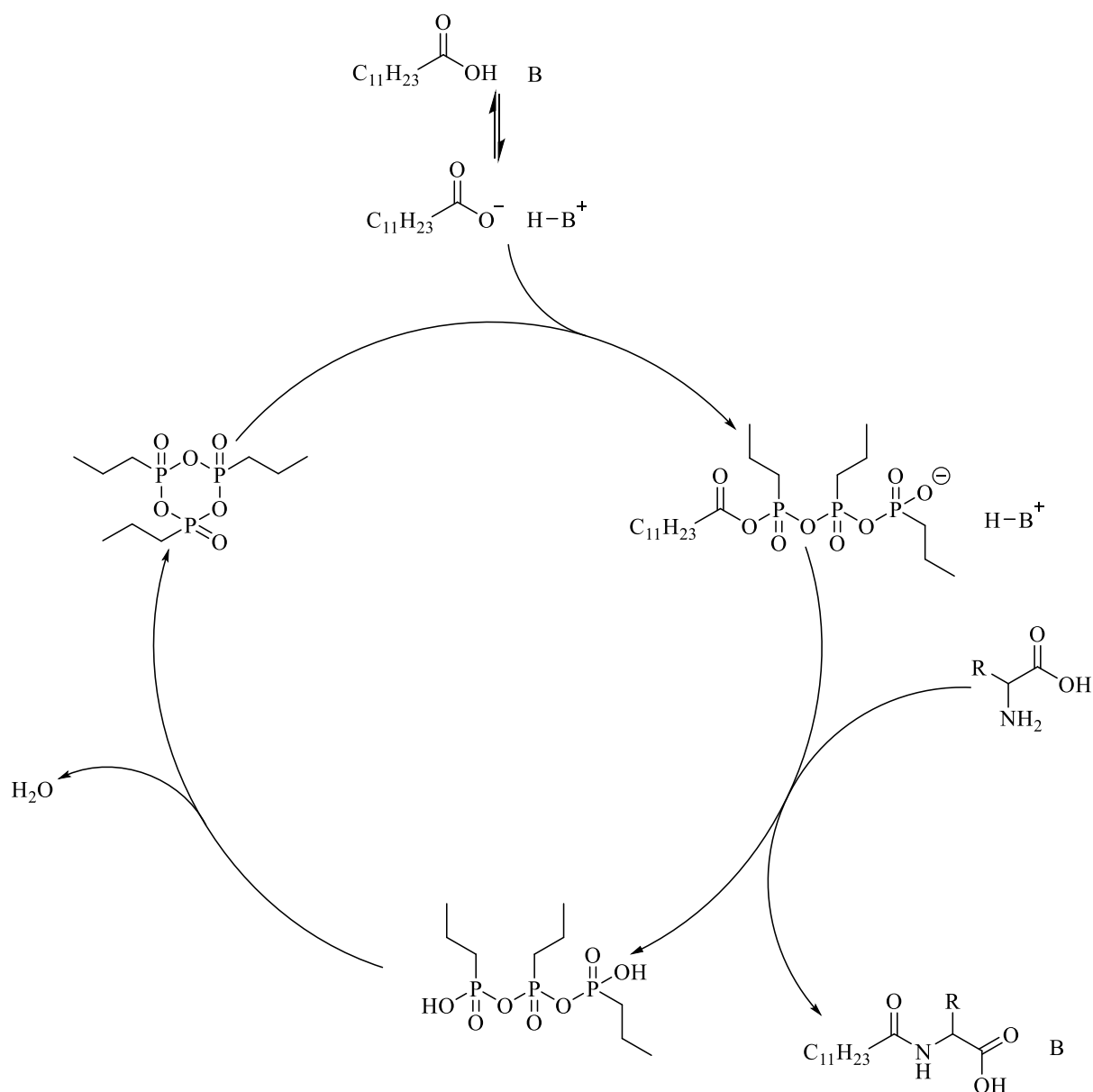


Abbildung 10: Schematische Darstellung des T3P-vermittelten Reaktionszyklus.

1.3.3 Biokatalytische Syntheserouten

1.3.3.1 Lipasen und Proteasen

In Hinblick auf die grünere Reaktionsführung bilden vor allem enzymatische Ansätze den Schwerpunkt der Forschung, da die Enzyme oft unter milderen Bedingungen und mit höherer Selektivität als chemische Reagenzien arbeiten. Generell wurden dabei auch Enzyme untersucht, die unter regulären Bedingungen nicht auf die Spaltung oder Verknüpfung von Carbonsäuren und Aminosäuren ausgelegt sind.

Hierbei wurden sowohl Peptidasen, die in der Natur vor allem in der Hydrolyse von Peptidbindungen Anwendung finden, als auch Lipasen in Betracht gezogen, die ihrerseits

Carbonsäureester spalten. Da die enzymatisch beeinflussten und katalysierten Reaktionen in beiden Fällen Gleichgewichtsreaktionen sind, sind in der theoretischen Betrachtung beide Enzymklassen in der Lage auch die Synthesereaktion unter Wasserabspaltung zu vermitteln (vgl. Abbildung 11).^{122–124}

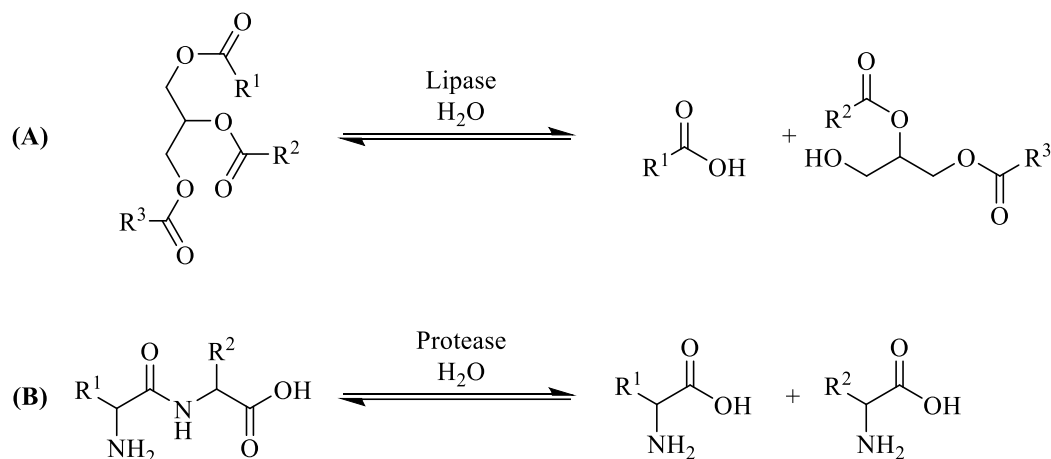


Abbildung 11: Von Lipasen (A) und Proteasen (B) katalysierte Gleichgewichtsreaktionen.

Die Anwesenheit von Wasser ermöglicht und begünstigt dabei das Ablaufen der Hydrolyse-Route. Die Untersuchungen beschränken sich vielfach auf die kommerziell immobilisiert verfügbaren und robusten Enzyme *Candida antarctica* Lipase B (CALB) und *Rhizomucor Miehei* Lipase (RMIM). In Tabelle 1 sind verschiedene Produkte und Ausbeuten aus der Literatur aufgeführt. Erste Experimente legten den Fokus auf die Verbindung von organischen Aminen mit Fettsäuren und den Übertrag der erfolgreichen Reaktion auf die polare Aminosäure Lysin. Dabei zeigte sich das unterschiedliche Reaktions- und Löslichkeitsverhalten von Aminosäuren bei deutlich geringerer Ausbeute von 35 %.^{125,126} In der weiteren Entwicklung erfolgte dann die Verbindung von Zucker-Aminen und Aminosäuren mit langkettigen Fettsäuren.

Tabelle 1: Überblick über die Anwendung und Ausbeuten von Lipasen in der Synthese von acylierten Aminen und Aminosäuren

	Enzym	Zielprodukt	Ausbeute Y [%]	Literatur
1	RMIM	<i>N</i> -Oleoyl-Lysin	35	125,126
2	CALB	<i>N</i> -Oleoyl-Glucamin	96	44,127,128
3	CALB	<i>N</i> -Oleoyl-Me-Glucamin	96	
4	CALB	1- <i>O</i> -(<i>N</i> -Cbz-L-Phe)-3- <i>O</i> -Myristoylglycerol	80	129

	Enzym	Zielprodukt	Ausbeute <i>Y</i> [%]	Literatur
5	CALB	1- <i>O</i> -lauroyl-rac-glycero-3- <i>O</i> - (<i>N</i> α -Boc-L-Arg)	84	130
6	RMIM	1(2)- <i>O</i> -lauroyl-rac-glycero- 3(2)- <i>O</i> -(<i>N</i> α - -acetyl-L-Tyr)	82	
7	CALB	<i>N</i> -Arachidonoyl-L-Gly	10	131
8		<i>N</i> -Arachidonoyl-L-Gly- <i>O</i> - <i>t</i> -Bu	75	
9	CALB	<i>N</i> -Oleoyl-L-Lys-Ser	57	132
10		<i>N</i> -Oleoyl-L-Carnosin	32	
11	Papain	Bis(<i>N</i> α -acyl-L-arginine) α,ω - dialkylamide dihydrochloride	70	133
12	<i>B. subtilis</i> Protease	<i>N</i> -Lauroyl-L-Glycin	40	134

Mit der Lipase B aus *C. antarctica* konnte der Amino-Zucker *N*-Methyl-Glucamin mit Ölsäure verbunden werden. Initiale Experimente zeigten eine maximale Ausbeute von bis zu 96 %, weitere Optimierungen und der Einsatz von Ölsäuremethylester (ÖSME) konnten die Reaktionszeit auf 10 h bei 90 °C reduzieren.^{44,127,128}

Eine Abwandlung der Reaktion nutzte die natürliche Substratkombination aus Fettsäuren und Glycerin der Lipasen aus. Dazu wurden die *N*-geschützten Aminosäuren zunächst *C*-terminal mit Glycerin verestert und anschließend das Glycerin-Derivat mit den Fettsäuren enzymatisch umgesetzt. Die Glycerin-Verlinkung von Arginin, Glutaminsäure und Tyrosin mit Laurinsäure lieferte so 75-85 % Ausbeute mit CALB und RMIM. Myristinsäure zeigte einen signifikant langsameren Reaktionsfortschritt, so dass Reaktionszeiten von 25 – 40 h benötigt wurden.^{129,130} Langkettige Arachidonoylglycine wurden erfolgreich mit immobilisierter CALB synthetisiert, wobei der größte Einflussfaktor hierbei die unterschiedliche Löslichkeit ist, so dass in Acetonitril ausgehend von freiem Glycin maximal 6 % Ausbeute erhalten wurde, mit *tert*-Butyl-veresteter Aminosäure hingegen, stieg die Ausbeute nach 24 h auf ca. 52 % an. Ein Wechsel auf das unpolare 2-Methyl-2-Butanon (2M2B) als Lösungsmittel erhöhte die erhaltene Produktmenge auf 10 % bzw. 75 %.¹³¹ Das Dipeptid **Lys-Ser** und Carnosin (**β -Ala-His**) konnten in 2M2B erfolgreich mit Ölsäure verbunden werden und lieferten Ausbeuten von 36 % bzw. 10 %. Der Wechsel auf die ionische Flüssigkeit [BMIM][PF₆] (1-Butyl-3-

Methylimidazolium-tetrachloroaluminat Phosphorhexa-fluorid) verbesserte die Löslichkeit von **Lys-Ser** deutlich und führte so zu erhöhten Ausbeuten von 57 %, Carnosin hingegen zeigte keine Löslichkeit in der ionischen Flüssigkeit.¹³² Eine Anwendung von Papain war vor allem zur Verknüpfung von zwei Acyl-Argininen zur Ausbildung von Gemini-Tensiden erfolgreich.¹³³ Mit der Protease aus *B. subtilis* hingegen verlief auch die Verknüpfung von Laurinsäure mit Glycin erfolgreich und lieferte bis zu 40 % Ausbeute.¹³⁴

1.3.3.2 Aminoacylasen

Biochemisch betrachtet wird die Umsetzung von kurz-, mittel- und langkettigen Carbonsäuren acylierten Aminen bzw. Aminosäuren durch die Klasse der Aminoacylasen (EC 3.5.1.14) katalysiert. Aminoacylasen lassen sich dabei als Hydrolasen mit dem Metall-Kofaktor Zink einteilen, die die Amidbindung zwischen Amin und Carbonsäure beeinflussen (vgl. Abbildung 12). Die Bandbreite der Enzyme, welche in vielen Organismen gefunden werden, reicht dabei von sehr eng ausgerichteten Enzymen, die nur bestimmte strukturelle Motive, ausgewählte Aminosäuren oder bestimmte Carbonsäuren, oft Essigsäure bzw. Acetyl-Reste, akzeptieren, bis hin zu sehr breit aufgestellten Enzymen, die einen weiten Bereich an Aminosäuren und mittel- bis langkettige Fettsäuren umwandeln können.^{135–137}

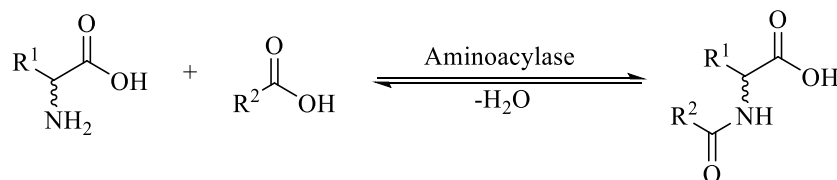


Abbildung 12: Von Aminoacylasen beeinflusstes Gleichgewicht zwischen Acylaminosäure sowie Fettsäure und Aminosäure.

Die Verschiebung dieses Gleichgewichts zur Synthese von acylierten Aminosäuren ist ein in der Literatur häufig beschriebener Ansatz, um die Fähigkeiten der Enzyme in der gezielten Synthese nutzbar zu machen. Erste Versuche zur Prozessentwicklung und -implementierung fokussierten sich vor allem auf kurzkettige Acetylreste und Fettsäuren im Bereich von C₁ - C₅. Ziel war dabei die gezielte Synthese kurzkettiger Acylaminosäuren als Ausgangsstoff für unter anderem Nahrungsmittelzusätze und Pharmazeutika.^{138,139} Eine Übersicht der verschiedenen Enzyme und Produkte ist in Tabelle 2 dargestellt. Vor allem der Einsatz von wasserfreien Lösungsmittelsystemen oder solchen mit minimalem Wasseranteil basierend auf DMF, Dioxan

oder Hexan zeigte sich vorteilhaft. Die Verschiebung des Gleichgewichts nach dem Prinzip von LE'CHATELIER lieferte in kurzer Zeit hohe Ausbeuten.^{140,141}

Tabelle 2: Überblick über die Anwendung und Ausbeuten von Aminoacylasen in der Synthese von acylierten Aminosäuren

Enzymquelle	Zielprodukt	Ausbeute Y [%]	Literatur
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>N</i> -Acetyl-L-Met	5	138
	<i>N</i> -Valeryl-L-Met	4	
Acylase I (Schweine Niere / Innereien)	<i>N</i> -Acetyl-L-Met	90	139–141
	<i>N</i> -Formyl-L-Met	>85	
	<i>N</i> -Propyl-L-Met	>85	
	<i>N</i> -Acetyl-L-Ala/Leu/Ser/Val	>80	
	<i>N</i> -Capryloyl-L-Glu	29	142
	<i>N</i> -Decanoyl-L-Glu	27	
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Glu	30	
	<i>N</i> -Myristoyl-L-Glu	0	
	<i>N</i> -Decanoyl-L-Arg	40	
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Arg	82	
	<i>N</i> -Myristoyl-L-Arg	70	
	<i>N</i> -Palmitoyl-L-Arg	19	
<i>Streptomyces mobaensis</i>	N_{ϵ} -Capryloyl-L-Lysin	59	143–146
	N_{ϵ} -Lauroyl-L-Lysin	>99	
	N_{ϵ} -Myristoyl-L-Lysin	>99	
	N_{ϵ} -Palmitoyl-L-Lysin	<5	
	N_{ϵ} -Oleoyl-L-Lysin	<5	
<i>S. ambofaciens</i>	N_{α} -Lauroyl-L-Lysin	40	147–149
	<i>N</i> -Capryloyl-L-Arg	20	
	<i>N</i> -10-Undecenoyl-L-Arg	24	
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Arg	24	
	<i>N</i> -Oleoyl-L-Arg	8	
	<i>N</i> -Capryloyl-L-Met	20	
	<i>N</i> -10-Undecenoyl-L-Met	22	
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Met	20	
	<i>N</i> -Oleoyl-L-Met	15	

Enzymquelle	Zielprodukt	Ausbeute Y [%]	Literatur
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Arg	89	
<i>Burkholderia sp.</i>	<i>N</i> -Lauroyl-L-Phe	51	150
	<i>N</i> -Lauroyl-L-Val	23	

In darauf aufbauenden Arbeiten wurde zunächst die Anwendbarkeit von Enzymen, die kurzkettige Fettsäuren als Substrate akzeptierten, auf die Acylierung mit Fettsäuren höherer Kettenlänge untersucht. Unter Einsatz der Aminoacylase I konnten so die tensidischen Verbindungen *N*-Lauroyl-L-Glutaminsäure und -Arginin mit einer maximalen Ausbeute von 44 % und 82 %, nach einer Reaktionszeit von 24 h bzw. 144 h erhalten werden. Fettsäuren mit einer Länge von 8 - 12 Kohlenstoffatomen lieferten für Glutaminsäure konstante Ausbeuten im Bereich von 40-50 %, für Tridecansäure (C13:0) hingegen nahm die Ausbeute stark ab und Myristinsäure (C14:0) zeigte keinerlei Umsatz. Arginin hingegen erzielte vor allem für Laurinsäure (82 %) und Myristinsäure (70 %) hohe Ausbeuten, während längere und kürzere Fettsäuren deutlich niedrigere Ausbeuten lieferten.^{141,142} Höhere Spezifitäten zeigten die Acylasen aus *Streptomyces*-Stämmen. Die ϵ -Lysin-Acylyase aus *Streptomyces mobaraensis* zeigt eine hohe Affinität zur Acetylierung der ϵ -Amin-Gruppe von Lysin (46:1 ϵ : α -NH₂) und akzeptiert dazu auch sterisch anspruchsvollere und unpolare Fettsäuren wie Benzoesäure, Octansäure und Laurinsäure, wobei für Laurinsäure keine α -Acylierung beobachtet werden konnte. Durch Temperaturerhöhung und Arbeiten mit hohem Lysin-Überschuss wurde ein annähernd quantitativer Umsatz zum *N* _{ϵ} -Lauroyl-Lysin nach 4 h erreicht. Decansäure und Myristinsäure konnten analog innerhalb von 24 h vollständig umgesetzt werden, während Octansäure 58 % Ausbeute und die langkettigen Fettsäuren Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0) weniger als 5 % Ausbeute lieferten. Durch weitere Optimierung und Einsatz einer rekombinanten Variante des Enzyms konnte die Substratkonzentration von 0,5 mM auf bis zu 500 mM gesteigert werden, während gleichzeitig der notwendige Überschuss an Fettsäure im Vergleich zum Lysin von 20:1 auf 2:1 reduziert werden konnte. Reaktionen mit 50 mM bzw. 100 mM Fettsäure sind nach 4 h bzw. 6 h abgeschlossen, während die Reaktion mit 250 mM Laurinsäure nach 24 h bis zu 90 % Ausbeute liefert.¹⁴³⁻¹⁴⁶ Die Acylase aus *S. ambofaciens*, lieferte in Tris-HCl Puffer nach 40 h bis zu 40 % Ausbeute in der Umsetzung von Laurinsäure mit Lysin, wobei nur *N* _{α} -acyliertes Produkt beobachtet werden konnte. 10-Undecensäure (C10:1) wird annähernd analog zur Laurinsäure akzeptiert, während Octansäure und Ölsäure geringere Umsätze zeigen. Eine detailliertere Untersuchung des Aminosäure-

Spektrums erwies, dass das Enzym unpolare (**Leu, Met, Phe**) und kationische (**Arg, Lys**) Aminosäuren als Substrate präferiert. Ester der Aminosäure Glycin (Me, Et, *t*-Bu) sowie andere kurzkettige polare-Verbindungen mit Amin und Säure- oder Alkoholgruppe am entgegengesetzten Ende wie Taurin, Ethanolamin und 6-Aminohexansäure werden nicht akzeptiert.^{147–149}

Die isolierte Aminoacylase aus *Burkholderia sp.* zeigte eine hohe Stabilität bis 60 °C und im pH-Bereich von 5-12, das sowohl in der Hydrolyse als auch in der Synthese langkettige Lauroylreste akzeptiert. Die Synthesereaktion von *N*-Lauroyl-Aminosäuren zeigte vor allem für Phenylalanin und Arginin hohe Ausbeuten von bis zu 51 % bzw. 81 % innerhalb von 60 h.¹⁵⁰

1.3.4 Diels-Alder-Reaktion

1.3.4.1 Terpene als nachwachsende Rohstoffe

Generell lassen sich mit den zuvor erläuterten Methoden vor allem solche nachwachsenden Rohstoffe einsetzen, die bereits eine nucleophile Gruppe tragen, die eine Bindung an eine Aminosäure ermöglicht. Neben den bereits gezeigten Fettsäuren und -alkoholen bietet aber auch eine Vielzahl weiterer grüner Substrate attraktive Eigenschaften, die sie zur Verwendung als hydrophoben Teil eines Tensids prädestiniert. Viele der ätherischen Öle von Pflanzen enthalten größere Fraktionen unpolarer Verbindungen, wobei signifikante Anteile dieser Fraktionen auf Terpen-Strukturen entfallen, die sich von der in Abbildung 13 gezeigten Isopren-Grundstruktur ableiten. Formale Verknüpfungen des 2-Methyl-1,3-Butadiens im pflanzlichen Organismus führen zur Bildung von verzweigten und zyklischen Olefin-artigen Molekülen der Zusammensetzung $(C_5H_8)_n$ mit oft charakteristischem Geruch. Häufig vorkommende Vertreter sind die Monoterpene ($C_{10}H_{16}$) Myrcen, Limonen und α -Terpinen aus den ätherischen Ölen von Pinien bzw. von Zitruspflanzen. Längerkettige Terpene wie das Farnesen ($C_{15}H_{24}$) sind ebenso Teil der ätherischen Öle bzw. wirken als Insektenpheromone und Squalen ($C_{30}H_{50}$) ist Teil der Hautlipide und kommt in vielen höheren Tieren vor.^{151–157}

Gemein ist den Terpenen durch die formale Synthese aus den Isopren-Einheiten eine hohe Dichte an C-C-Doppelbindungen bzw. durch das häufige Vorkommen als Biomolekül ein hoher Funktionalisierungsgrad wie im Beispiel der Farnesyl- und Geranylphosphate oder der Duftstoffe Citronellol und Geraniol. Für die chemische Synthese sind diese Gruppen ebenso von großem Interesse, da die enthaltenen Doppelbindungen eine Vielzahl an weiteren

Modifikationen erlauben. Die terminalen, konjugierten Doppelbindungen von Myrcen und Farnesen haben die nachwachsenden Terpene verstärkt in den Fokus der wissenschaftlichen

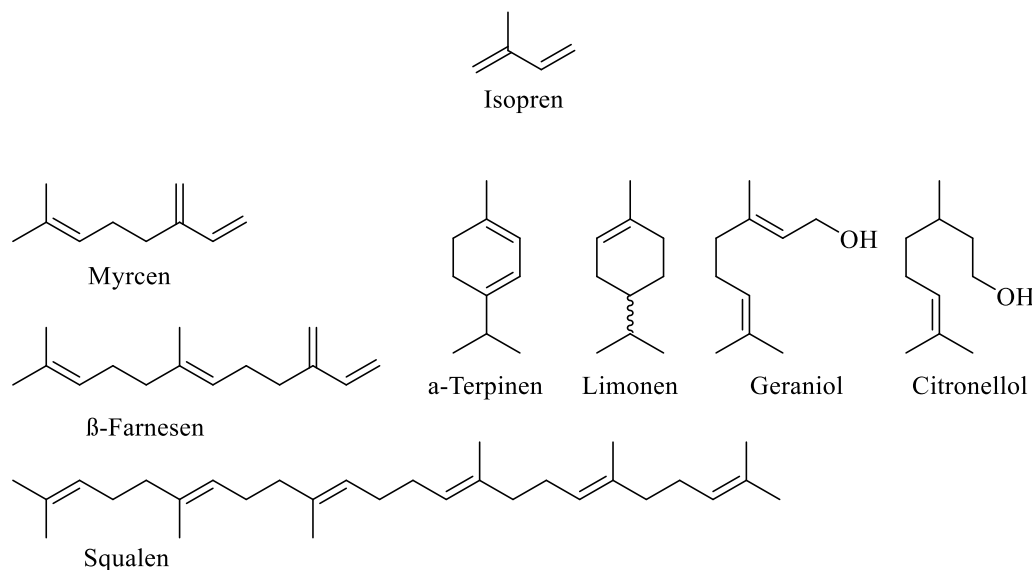


Abbildung 13: Schematischer Aufbau der Isopren-Grundstruktur von Terpenoiden und Strukturformeln von ausgewählten, bekannten Vertretern der Stoffklasse.

Untersuchungen gerückt und auch eine potenzielle Nutzung als grüne, nachwachsende Plattformchemikalien der Zukunft wurde evaluiert. Vielversprechend ist dabei neben der klassischen Isolation aus ätherischen Ölen und der Extraktion aus den entsprechenden Pflanzen die direkte Produktion der Terpene in modifizierten Mikroorganismen.^{158–164}

1.3.4.2 Mechanismus und Überblick

Die Verknüpfung von Dienen mit passenden Dienophilen erfolgt in einer konzertierten [4+2] Cycloaddition, die erstmals von OTTO DIELS und KURT ALDER beschrieben wurde. Nachfolgende Untersuchungen zeigten eine starke Abhängigkeit des Reaktionsverlaufs und der Geschwindigkeit vom Elektronenreichtum der benachbarten Gruppen sowohl im Dien als auch im Dienophil. Durch die Kombination aus Elektronendonatoren am Dien und Elektronenziehenden Gruppen am Dienophil kommt es zu einer Annäherung des höchsten besetzten Molekülorbitals (HOMO) des Diens und des niedrigsten unbesetzten Molekülorbitals (LUMO) des Dienophils. Die Überlappung der Elektronenorbitale der zwei Reaktanden führt zum Bindungsumorganisationsprozess und bildet dabei einen Sechsring aus. Die entsprechend gegensätzliche Verteilung aus Donatoren und Akzeptoren führt zur Absenkung des Dien-LUMO und Anheben vom Dienophil-HOMO und ermöglicht eine analoge Überlagerung der Orbitale unter Bindungsknüpfung.^{165–168}

Der mechanistische Ablauf der Orbitalüberlappung ist vor allem für die Anwendung in der organischen Synthese wichtig, da dieser dazu führt, dass sterische Informationen wie die (*E*)- oder (*Z*)-Ständigkeit von Substituenten erhalten bleibt. Ebenso essenziell ist für die Vorhersage und Beurteilung der Stereochemie die Orientierung von Dien und Dienophil während der Reaktion, die zur Bildung eines *endo*- oder *exo*-Produkts führen kann. Im konkreten Fall der Diels-Alder-Reaktion bezieht sich die *endo/exo*-Terminologie auf die Position des Substituenten mit dem höchsten Elektroneninduzierenden Effekt am Dienophil (vgl. Abbildung 14).^{169–172}

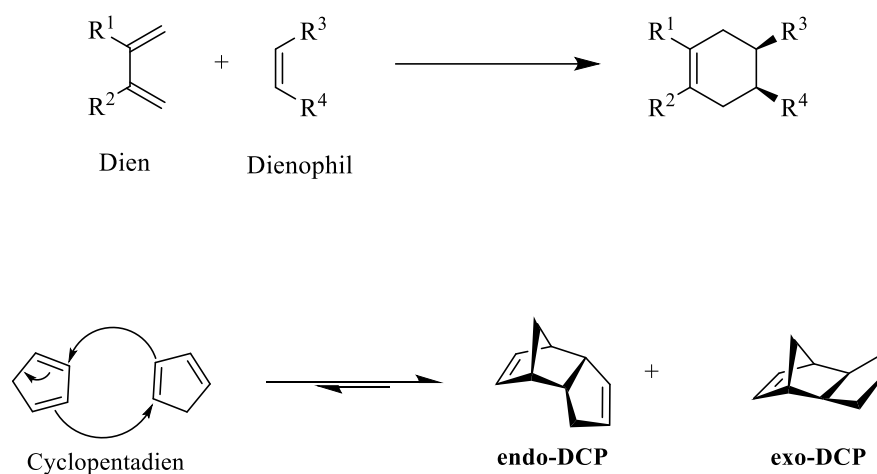


Abbildung 14: Schematischer Ablauf der Diels-Alder-Reaktion und Darstellung von *endo/exo*-Produkten am Beispiel der Bildung von DCP.

Obwohl aus sterischer Sicht hierbei oft das *exo*-Produkt am thermodynamisch günstigsten erscheint, werden Mischungen von Produkten mit hoher Tendenz zum *endo*-Produkt beobachtet. Entscheidendes Kriterium ist nach aktuellem Stand der Forschung die Anzahl an überlappenden Orbitalen, die während der Reaktion ausgebildet werden können. Für rigide Systeme, wie die Reaktion mit zyklischen Dienen und Dienophilen, wird in der Regel fast ausschließlich das *endo*-Produkt beobachtet. Namhafte Beispiele hierfür sind die Auto-Diels-Alder-Dimerisierung von Cyclopentadien zum Dicyclopentadien und Reaktionen von Maleinsäureanhydrid (MSA) mit Cyclopentadien oder Furan.^{173,174}

In der aktuelleren Forschung stellt die Diels-Alder-Reaktion nach wie vor einen interessanten Aspekt der organischen Synthese dar. Schwerpunkte sind dabei sowohl in der gezielten Synthese von komplexen Molekülen im Bereich der Wirkstoff-, Naturstoff- und Feinchemikaliensynthese vorhanden wie auch in Untersuchungen für eine Anwendung in größerem Maßstab, meist dem polymerchemischen Umfeld. Die Möglichkeit, die Produkte im

Rahmen einer Retro-Diels-Alder-Reaktion wieder spalten zu können, macht sowohl eine Anwendung als Schutzgruppe für Doppelbindungen möglich, als auch eine Addition von beispielsweise Maleinsäure zur Differenzierung von reaktiven Isomeren.^{168,171,175–181}

Gerade die Anwendung von Maleinsäure und Maleinsäureanhydrid als einfaches Verbindungsstück zwischen Dienen und Nucleophilen bietet diverse Anknüpfungspunkte für Untersuchungen. So lässt sich mit Maleinsäure und Maleinsäure-Derivaten eine Vielzahl an Produkten bilden (vgl. Abbildung 15), vor allem die Anwendung als Monomere für die Bildung von Polyestern und -amiden wurde schon früh untersucht. Die Verbindung von MSA mit der Gruppe der zyklischen Terpene liefert ein zyklisches Gerüst mit zwei benachbarten Säure- bzw. einer Anhydrid-Funktion.¹⁸²

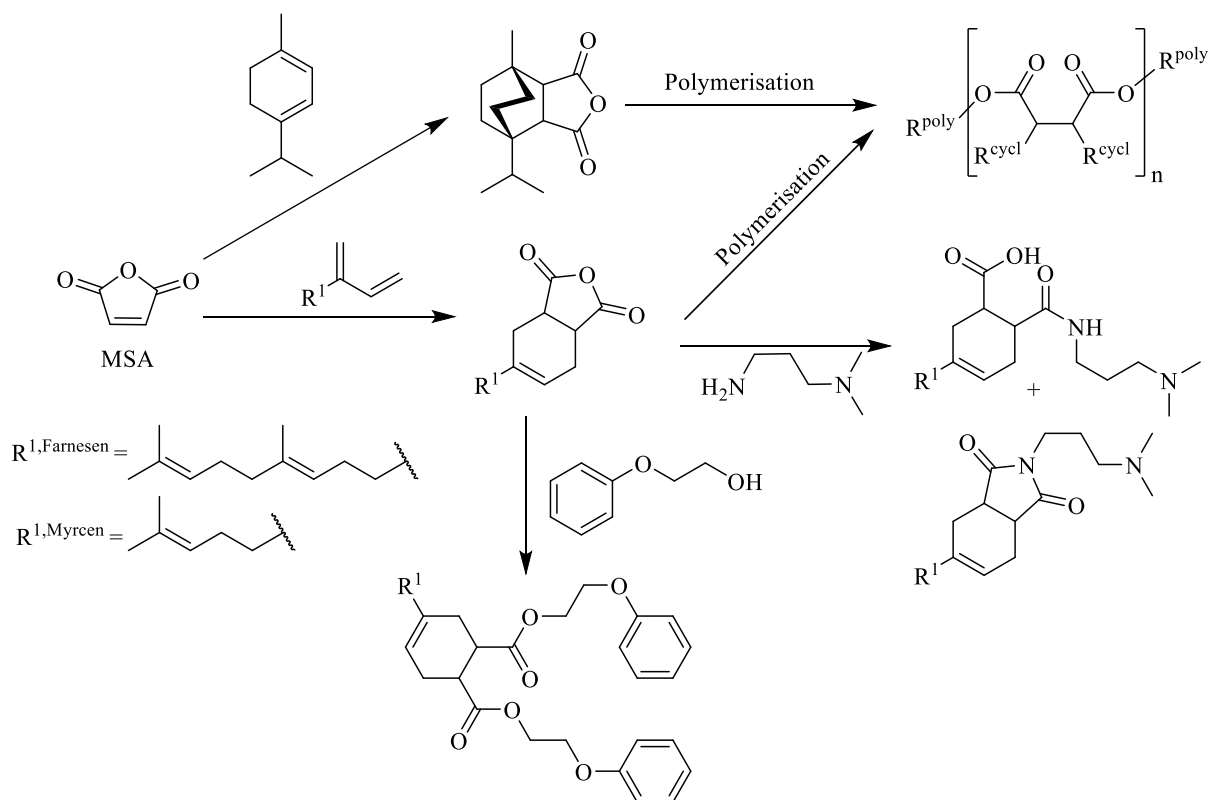


Abbildung 15: Beispielhafte Darstellung von Literatur-bekanntem Verbindungen aus der Diels-Alder-Kopplung von Maleinsäure und Maleinsäureanhydrid mit Terpen-Einheiten.

Spätere Arbeiten haben dieses Grundgerüst um weitere Dien-Verbindungen, unter anderem das Monoterpen Myrcen und das Sesquiterpen Farnesen, erweitert, um so Polymere mit ungesättigtem Rückgrat herzustellen und bei Bedarf weiter modifizieren zu können. Fortlaufende Entwicklung ermöglichte dabei die Etablierung eines Mikrowellen-unterstützten

kontinuierlichen Flussprozesses zur Synthese von Maleinsäure bzw. MSA basierten Diels-Alder-Verbindungen.¹⁸³⁻¹⁸⁵

Ebenso prädestiniert die Kombination aus hydrophober Terpen-Einheit mit der polaren Di-Säure oder der Kupplung an Nucleophile die Anwendung als Tenside. Dabei wurde sowohl die durch Hydrolyse ringgeöffnete Di-Säure als Tensid charakterisiert wie auch die durch Kopplung an organische Nucleophile modifizierte Version.^{186,187}

2.2 Referenzverbindungen über Schotten-Baumann Synthese

Referenz-Acylaminosäuren wurden nach der bekannten Schotten-Baumann-Route synthetisiert. Die Umsetzung der Aminosäuren mit ausgewählten Carbonsäurechloriden erfolgte analog zur von TAKEHARA ET. AL. beschriebenen Methode in alkalischer Wasser/Aceton-Mischung (vgl. 4.4.1).¹⁰⁰ Die Acylaminosäuren sollten sowohl zur Etablierung der HPLC-Analytik und von physikochemischen Methoden, als auch in der initialen Charakterisierung der Aminoacylasen eingesetzt werden. Daher wurde bei der Isolierung und Aufreinigung der Fokus auf die Gewinnung eines möglichst reinen Produkts gelegt. Die erhaltenen Ausbeuten, Reinheiten und Retentionszeiten für die verschiedenen Acylaminosäuren sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die Reaktion der Carbonsäurechloride mit proteinogenen Aminosäuren liefert hohe Ausbeuten von über 70-99 % mit sehr guten Reinheiten der Zielprodukte von über 82 %. Als Ausnahmen zeigen sich vor allem die Aminosäuren Histidin und Threonin, die bei Zugabe von HCl nur unvollständig ausgefällt wurden. Der suspendierte Feststoff konnte nur teilweise durch Filtration zurückgehalten werden, wodurch der anschließende Waschvorgang mit Ether und VE-Wasser nur unvollständig durchgeführt werden konnte, um zu vermeiden, dass das Produkt ausgewaschen wird. Dies resultiert in einer Limitierung der Ausbeuten auf 45 % (**His**) bzw. 5 % (**Thr**) und einer Reinheit des erhaltenen Produkts auf 60 bzw. 68 %.

Tabelle 3: Isolierte Ausbeuten, Reinheiten und Retentionszeiten t_{ret} der, mittels Schotten-Baumann-Reaktion synthetisierten, Acylaminosäuren.

Aminosäure	Ausbeute Y [%]	Reinheit [%]	t_{ret} [min]
<i>N</i> -Lauroyl-Alanin	72	94	13,3
<i>N</i> -Palmitoyl-Alanin	53	96	17,0
<i>N</i> -(<i>p</i> -Nitro-Benzoyl)-Alanin	28	95	4,2
<i>N</i> -Lauroyl-Arginin	74	98	8,7
<i>N</i> -Lauroyl-Asparaginsäure	79	89	8,5
<i>N</i> -Lauroyl-Cystein	86	99	13,6
<i>N</i> -Caproyl-Glutamin	69	98	7,7
<i>N</i> -Lauroyl-Glutamin	70	87	11,3
<i>N</i> -Palmitoyl-Glutamin	84	82	14,6
<i>N</i> -Lauroyl-Glutaminsäure	75	97	11,2

Aminosäure	Ausbeute <i>Y</i> [%]	Reinheit [%]	<i>t_{ret}</i> [min]
<i>N</i>-Lauroyl-Glycin	83	99	12,8
<i>N</i>-Lauroyl-Histidin	45	60	8,6
<i>N</i>-Lauroyl-Isoleucin	97	98	14,3
<i>N</i>-Lauroyl-Leucin	83	99	14,3
<i>N</i>-Lauroyl-Lysin	80 ^a	30/35 ^a	8,5
<i>N</i>-Capryloyl-Methionin	20	2	5,1
<i>N</i>-Decanoyl-Methionin	58	99	6,0
<i>N</i>-10-Undecenoyl-Methionin	36	99	5,9
<i>N</i>-Lauroyl-Methionin	99	99	13,8
<i>N</i>-Palmitoyl-Methionin	99	76	10,3
<i>N</i>-Oleoyl-Methionin	13	79	10,7
<i>N</i>-Zinnamoyl-Methionin	88	99	4,3
<i>N</i>-Lauroyl-Phenylalanin	90	80	14,2
<i>N</i>-Lauroyl-Prolin	0	-	-
<i>N</i>-Lauroyl-Serin	85	94	18,6
<i>N</i>-Palmitoyl-Serin	51	24	8,3
<i>N</i>-Lauroyl-Threonin	5	68	14,4
<i>N</i>-Lauroyl-Tryptophan	99	98	13,8
<i>N</i>-Lauroyl-Tyrosin	70	97	14,1
<i>N</i>-Lauroyl-Valin	91	99	13,9

a) Lysin wurde als Mischung aus Mono- und Di-acyliertem Produkt erhalten. Die Ausbeute wurde gravimetrisch bestimmt. Reinheitsbestimmung mittels HPLC-ELSD für Mono- (1. Wert) und Di-acyliertes Produkt (2. Wert).

Die Acylierung der sekundären, zyklischen Amin-Funktion von Prolin war unter den gewählten Standardreaktionsbedingungen nicht erfolgreich, so dass keine Produktbildung beobachtet werden konnte. Lysin hingegen wurde durch die zweite ϵ -Amin-Funktion als Mischung von mono- und di-acyliertem Produkt erhalten. In Hinblick auf Ausbeute und Reinheit der Produkte liegen die Resultate dabei in guter Übereinstimmung mit der Literatur. Sowohl die Untersuchungen von TAKEHARA ET. AL. als auch nachfolgende Synthesen von einzelnen Arbeitsgruppen zur Darstellung von Referenz- und Ausgangsverbindungen lieferten gute Ausbeuten von in der Regel über 50 % mit hoher Reinheit der Produkte.^{67,100,188} Besonders hervorzuheben ist allerdings die Abnahme der Ausbeute von Hexanoyl-Chlorid zur Acylierung

von Serin und Cystein durch QIAO, wohingegen die Ausbeute der C₁₂ – C₁₆ Derivate mit zunehmender Kettenlänge steigt.⁶⁹

2.3 Nachhaltige Routen für die Acylierung von Aminosäuren

2.3.1 Untersuchung von neuen Ansätzen für die Acylierung

Essenzieller Ansatzpunkt für die Etablierung von grüneren und nachhaltigeren Syntheserouten ist der reduzierte Einsatz von Lösungsmitteln und der Verzicht auf stöchiometrische Reagenzien zu Gunsten von katalytisch wirkenden Verbindungen. Im Rahmen der Suche nach neuen, grünen Synthesewegen zur Acylierung von Aminosäuren wurden verschiedene, aus der Literatur bekannte Synthesepfade auf ihre Übertragbarkeit untersucht und evaluiert (vgl. Abbildung 17). Dabei stützen sich die Reaktionen einerseits auf die Umwandlung der Fettsäure in einen Zustand, der in Kombination mit der Aminosäure keinen ionischen Komplex bildet (**a**, **b**) oder die Zugabe von nachhaltigen, aktivierend wirkenden Spezies zur Fettsäure, um so die Reaktion mit der Amin-Gruppe zu vermitteln (**c**, **d**).

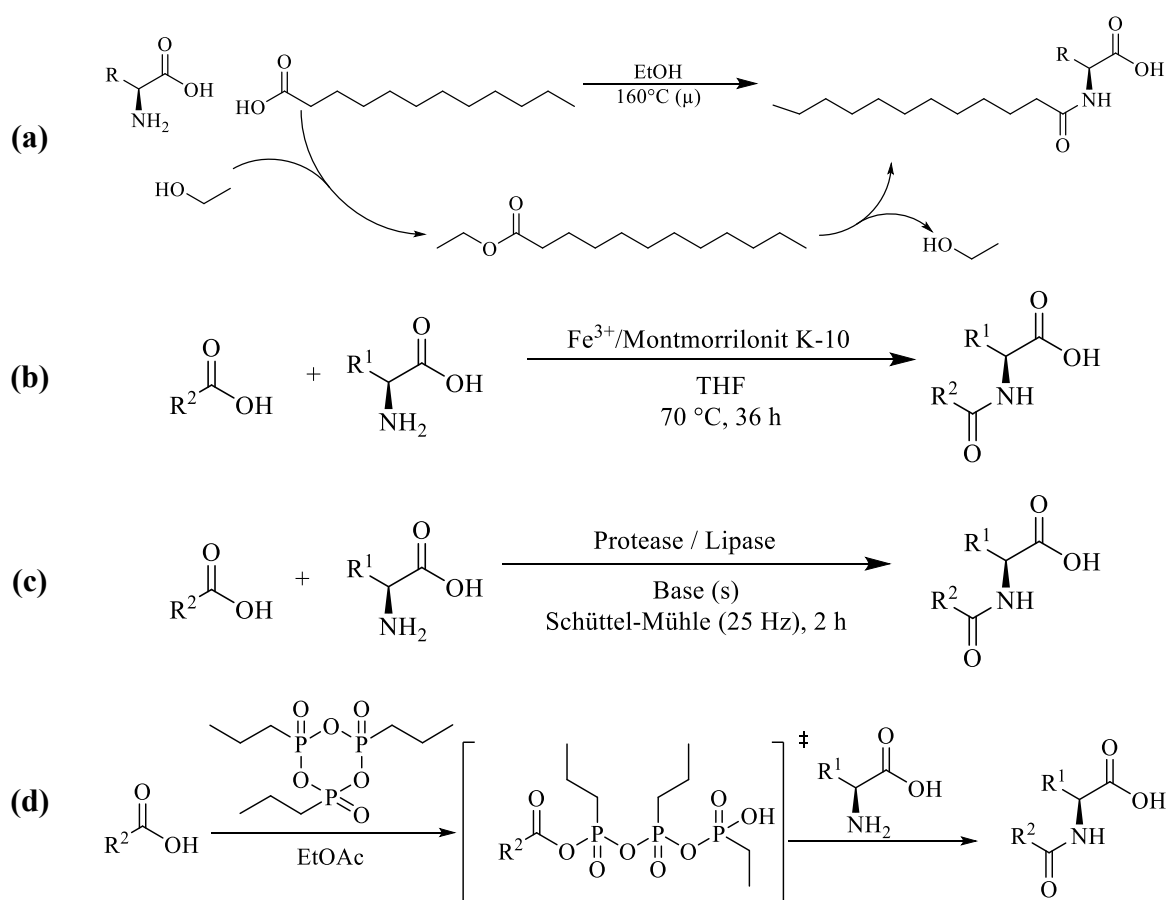


Abbildung 17: Untersuchte potenzielle Synthesewege zur Acylierung von Aminosäuren.

Die solvo-thermale Reaktion zwischen Fettsäuren mit Aminen (Abbildung 17a, vgl. 4.4.2) wurde für verschiedene Substrat-Kombinationen bereits beschrieben.¹⁸⁹ Die Reaktion setzt dabei auf die *in-situ* Veresterung der Säure-Gruppe mit dem Lösungsmittel Ethanol, woraufhin der entstandene Ethyl-Ester im Anschluss in einer Substitutionsreaktion zum Amid umgebildet wird. Die Reaktion wurde direkt in der Reaktionskomponente Ethanol als auch unter Zugabe von Toluol, 2M2B, DMSO und DMF mit Glutaminsäure und Lysin durchgeführt. In keiner der angewandten Kombinationen konnte eine Umsetzung erreicht werden, wohingegen die Umsetzung von Laurinsäure mit Hexylamin (vgl. 4.4.3) in Übereinstimmung mit der Originalliteratur erfolgreich verlief. Dabei wurde angenommen, dass die Unterschiede in der Reaktivität sich einerseits auf unterschiedliche Löslichkeit von organischen Aminen und Aminosäuren im organischen Medium zurückführen lassen. Andererseits bilden Aminosäuren auch interne Salze, die so eine höhere Reaktionsträgheit aufweisen als die organischen Amine. Alternativ zur *in-situ* Umwandlung können direkt Fettsäure-Ester eingesetzt werden, um das Problem der Bildung von ionischen Komplexen zu vermeiden. Die Ester sollten dann im Rahmen der solvo-thermalen Reaktionsführung mit den Aminosäuren eine Umesterung durchlaufen und die entsprechenden *N*-Acylaminosäuren bilden. Auch in der direkten Umsetzung des Laurinsäuremethylesters mit Glutaminsäure oder Lysin wurden unter Mikrowellen-Unterstützung keine Produkte erhalten.

Der Einsatz von Fe³⁺-Ionen auf Montmorillonit K-10-Träger (Abbildung 17b, vgl. 4.4.5) ist eine alternative Herangehensweise zur Acylierung von Aminen. Ebenso erfüllt der Ansatz die Kriterien ‚katalytische Reaktionsführung‘ sowie ‚nachhaltige Reagenzien‘ und ergänzt diese noch um den Vorteil, dass das verwendete Katalysator-Material ein vergleichsweise häufiges und preisgünstiges Element ist. Obwohl in der vorhandenen Literatur erfolgreiche Reaktionen demonstriert wurden, war die Reaktionsführung mit Glutaminsäure und Lysin mit Laurinsäure nicht erfolgreich.^{190,191} Dabei wurde zunächst eine Einschränkung der Löslichkeit in den organischen Lösungsmitteln 2M2B, DMSO und THF angenommen, so dass ein alternativer Ansatz unter Einsatz von Wasser und Wasser/EtOH als Lösungsmittel untersucht wurde. Im wässrigen Reaktionsmedium zeigten die Aminosäuren gute Löslichkeit, die Laurinsäure wurde allerdings nicht gelöst. Unter Einsatz von Wasser zur Lösung der Aminosäuren und Ethanol als Lösungsvermittler für die hydrophobe Komponente wurde eine Lösung beider Substrate erreicht, allerdings konnte dennoch keine Produktbildung beobachtet werden, was auf eine Inaktivierung des Katalysators durch Wasser zurückgeführt wurde.

Durch die Fähigkeit, Aminosäure-Amid-Bindungen hydrolytisch zu spalten und durch die Berichte von erfolgreichen Synthesen von Peptid-Bindungen sind auch Proteasen attraktive

Kandidaten für die Verknüpfung von Aminosäuren und Carbonsäuren.^{134,192} Die Lipase-vermittelte Acylierung von Aminosäuren mit Fettsäuren verschiedener Kettenlänge wurde in der Literatur bereits gezeigt.^{127,193,194} Dabei ist vor allem die Lösungsmittel-freie Reaktionsführung (Abbildung 17c, vgl. 4.3.1) in der Schüttelmühle interessant, da durch die Abwesenheit von Wasser die Synthese-Reaktion begünstigt und die hydrolytische Spaltung der Produkte unterdrückt werden sollte.^{195,196} Als Modellsubstrat wurde Laurinsäure mit Alanin oder Lysin eingesetzt, welches durch die N_α - und die N_ϵ -Amin-Gruppe verschiedene Zielfunktionen besitzt. Unter Einsatz von Papain und Novozyme 435 (CALB) und den Basen Na_2CO_3 , NaHCO_3 bzw. NaOH wurde für keine der eingesetzten Kombinationen die Bildung von Produkt nachgewiesen.

In Anlehnung an die klassische chemische Herangehensweise zur Acylierung mit Aktivierungsreagenzien wurde die Acylierung mit T3P (Abbildung 17d) untersucht. Das zyklische Phosphonsäure-Anhydrid bietet die Möglichkeit, als rezyklierbares Kupplungsreagenz Amidbindungen zu knüpfen und findet dabei vor allem in der Synthese von Peptiden Anwendung. Die Anwendung zur Herstellung von Acylaminosäuren wurde bislang noch nicht gezeigt, erscheint aber prinzipiell möglich.^{109,111,119}

Erste Anwendungsversuche zur Acylierung wurden im Lösungsmittel der aktiven Spezies EtOAc durchgeführt. Als Substrate wurden daher Laurinsäure und die unpolare Aminosäure Phenylalanin sowie Glutaminsäure (vgl. Abbildung 18a, b), die als *N*-Lauroylglutamat ein industriell relevantes Produkt darstellt, gewählt. Im zweistufigen Verfahren wird zunächst die Fettsäure durch die Base und T3P aktiviert und im Anschluss dann die Kopplung mit der Aminosäure durchgeführt (vgl. 4.4.6).

Dabei zeigte sich für Phenylalanin eine Mischung aus Produkten. Glutaminsäure hingegen konnte nur in Form des Glutaminsäure-HCl-Salzes in Lösung und zur Reaktion gebracht werden, formte dann aber ein vergleichbares Produktschema.

Die Hauptprodukte konnten dabei durch Vergleich mit den Schotten-Baumann-Referenzsubstanzen als *N*-Lauroyl-Phenylalanin bzw. *N*-Lauroyl-Glutaminsäure identifiziert werden. In der weiterführenden MS-Analyse der Produktmischung konnten die zusätzlichen Peaks den Lauroyl-Dipeptiden (*N*-Lauroyl-Phenylalanyl-Phenylalanin bzw. *N*-Lauroyl-**Glu-Glu**) und dem entsprechenden Lauroyl-Tripeptid zugeordnet werden. Dabei werden die Phenylalanin-Produkte zunehmend hydrophober, so dass die Nebenprodukt-Peaks höhere Retentionszeiten aufweisen, während das Glutaminsäure-Dipeptid hydrophiler ist als das Hauptprodukt und dadurch früher eluiert. Aus der erhaltenen Mischung kann geschlossen werden, dass nach der initialen Aktivierung der Fettsäure noch aktives, also zyklisches, T3P

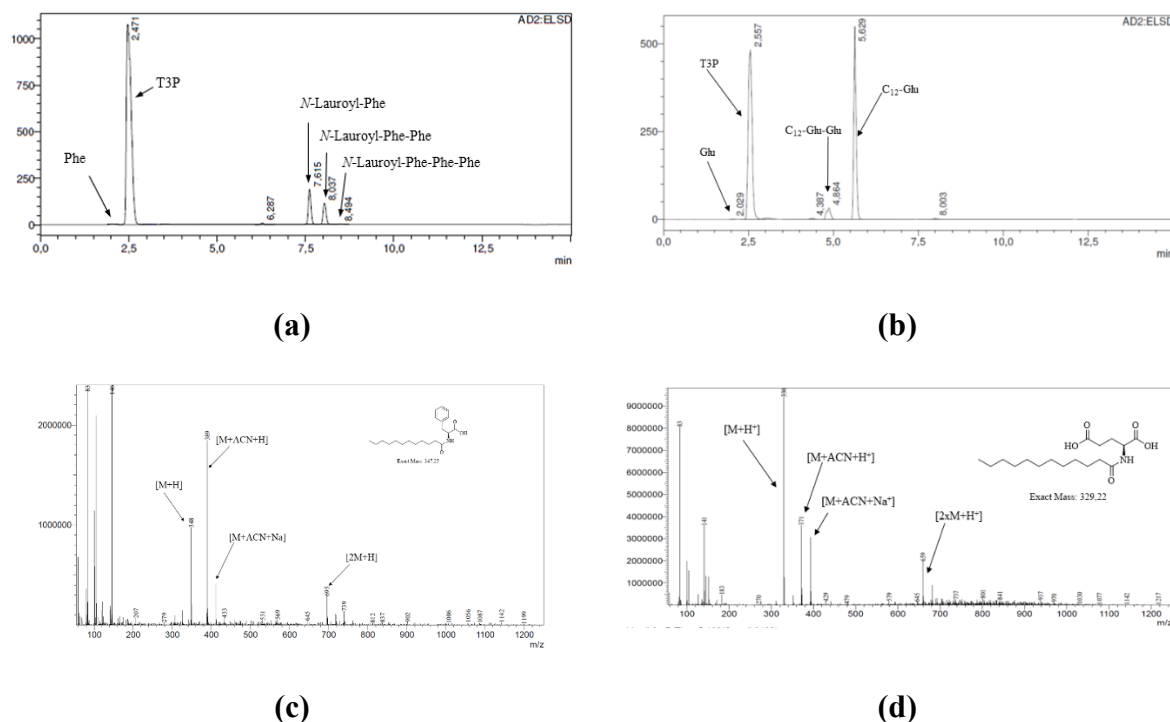


Abbildung 18: HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von Laurinsäure mit Phenylalanin (a) und Glutaminsäure (b) und MS-Spektrum der Hauptprodukte (c, d).

in der Reaktionsmischung vorhanden ist und so die Aminosäure im zweiten Schritt der Reaktion aktivieren kann.

2.3.2 Evaluierung der T3P vermittelten Synthese

Tiefere Untersuchungen lieferten für das Glutaminsäure Hydrochlorid maximale Ausbeuten von circa 45 %, wobei nur geringe Mengen an Nebenprodukt detektiert werden konnten. Die Anwendung der identischen Reaktionsbedingungen auf Phenylalanin lieferte leicht verringerte Umsatzgrade, so dass in EtOAc nur 37 % Produkt erhalten wurden, wohingegen im unpolaren Lösungsmittel Toluol zur Glutaminsäure vergleichbare Ausbeuten von 51 % erreicht wurden.

Im Vergleich zur Schotten-Baumann-Reaktion ermöglicht der Einsatz des Kupplungsreagens T3P in der Theorie eine sequenzielle Produktion von maßgeschneiderten Acylpeptiden. Die Verbindung von Aminosäure und gewünschtem Fettsäure-Rest initiiert die gewünschte Sequenz und kann dann am C-Terminus der Aminosäuren durch schrittweise Zugabe von T3P und weiteren Aminosäuren gezielt verlängert werden. Die schrittweise Addition der bereits verwendeten Aminosäuren Phenylalanin und Glutaminsäure wurde genauer untersucht, wobei nicht nur die gewünschten Reaktionsprodukte erhalten wurden, sondern auch eine Vielzahl an

Nebenprodukten, die in Konkurrenz-Reaktionen entstanden sind. In Abbildung 19 ist beispielhaft das Chromatogramm der Umsetzung von Laurinsäure in der sequenziellen Kopplung mit Glutaminsäure-Hydrochlorid und Phenylalanin dargestellt.

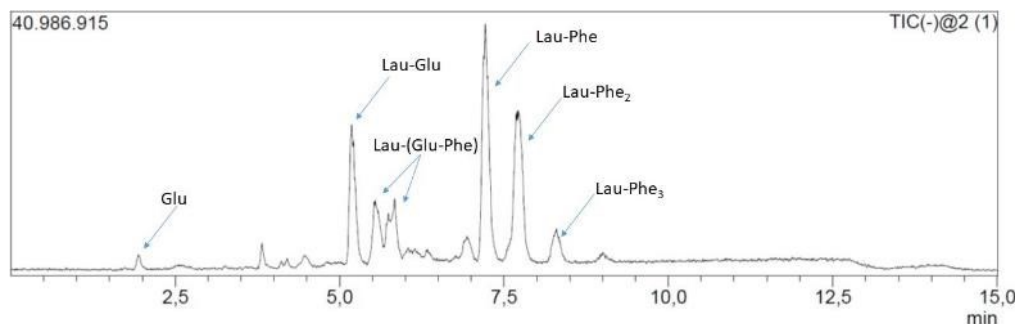


Abbildung 19: Chromatogramm der sequenziellen Kopplung von Laurinsäure und Glutaminsäure Hydrochlorid und der folgenden Umsetzung mit Phenylalanin.

Die Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Produkten erfolgte über Massenspektrometrie, wodurch allerdings nicht endgültig festgelegt werden kann, in welcher Reihenfolge gemischte Peptide sequenziert sind und an welche der freien Säuregruppen der Glutaminsäure das Phenylalanin gekoppelt wurde. Dabei wurden nicht nur die erwarteten Produkte erhalten, die Phenylalanin über eine verbrückende Glutaminsäure mit der Laurinsäure verbinden, sondern auch reine Lauroyl-Phenylalanin-Derivate. Daraus kann geschlossen werden, dass das verbleibende T3P in der Reaktionslösung nicht nur durch zu hohe Dosierung des Reagenzes erklärt werden kann, sondern auch die Aktivierung der Fettsäure nicht vollständig verläuft. Ebenso verbleibt auch Lauroyl-Glutamat in der Reaktionsmischung, so dass die Reaktion von Laurinsäure und Phenylalanin bevorzugt zu der Kondensation mit Glutaminsäure abzulaufen scheint. Das Zielprodukt *N*-Lauroyl-Glutamyl-Phenylalanin wurde ebenso gebildet und liefert eine mittlere Retention zwischen Lauroyl-Glutaminsäure und Lauroyl-Phenylalanin. Reaktionen, die mit Alanin oder Lysin unter analogen Bedingungen durchgeführt wurden, zeigten vergleichbare Produktgemische.

In der klassischen Synthesechemie und damit auch in den Einsatzbereichen von T3P findet an dieser Stelle vor allem der Einsatz von Schutzgruppen zur Steigerung der Selektivität Anwendung, wobei dieser in der Regel diametral den Anforderungen der grünen Chemie entgegensteht.^{113,115,121} Als potenziell grüner Mittelweg wurde daher der Einsatz von Aminosäure-Estern untersucht, wodurch C-terminale Folgereaktionen unterdrückt werden können. Die Ester können ausgehend von regenerativen Alkoholen wie EtOH gebildet werden und die Veresterung katalytisch über unter anderem die Methode von TURHANEN ET. AL.

durchgeführt werden.¹⁹⁷ Der Einsatz von zweifach geschützter Glutaminsäure liefert wie erwartet nur ein Produkt, das allerdings zunächst aufgearbeitet und hydrolysiert werden muss, bevor weitere Kupplungsreaktionen durchgeführt werden können. Der Einsatz von 5-Ethyl-Glutamat hingegen steigert die Selektivität in begrenztem Ausmaß, so dass zwar weiterhin beide möglichen Mono-Aminosäure-Produkte erhalten werden, aber auch vermehrt die gemischten Di- und Tripeptide (vgl. Abbildung 20a) gebildet wurden.

Generell wurden polare und hydrophile Aminosäuren für die Anwendung in Tensiden als vielversprechender als unpolare Aminosäuren betrachtet, so dass die Synthese ausgehend von *N*-Lauroyl-Glutamat und anschließender Kopplung mit Arginin-Ethylester durchgeführt wurde. Die Reaktionen liefern dabei analog zur Umsetzung mit Phenylalanin und Glutaminsäure Produktmischungen aus verschiedenen Acylaminosäuren und Acylpeptiden (b).

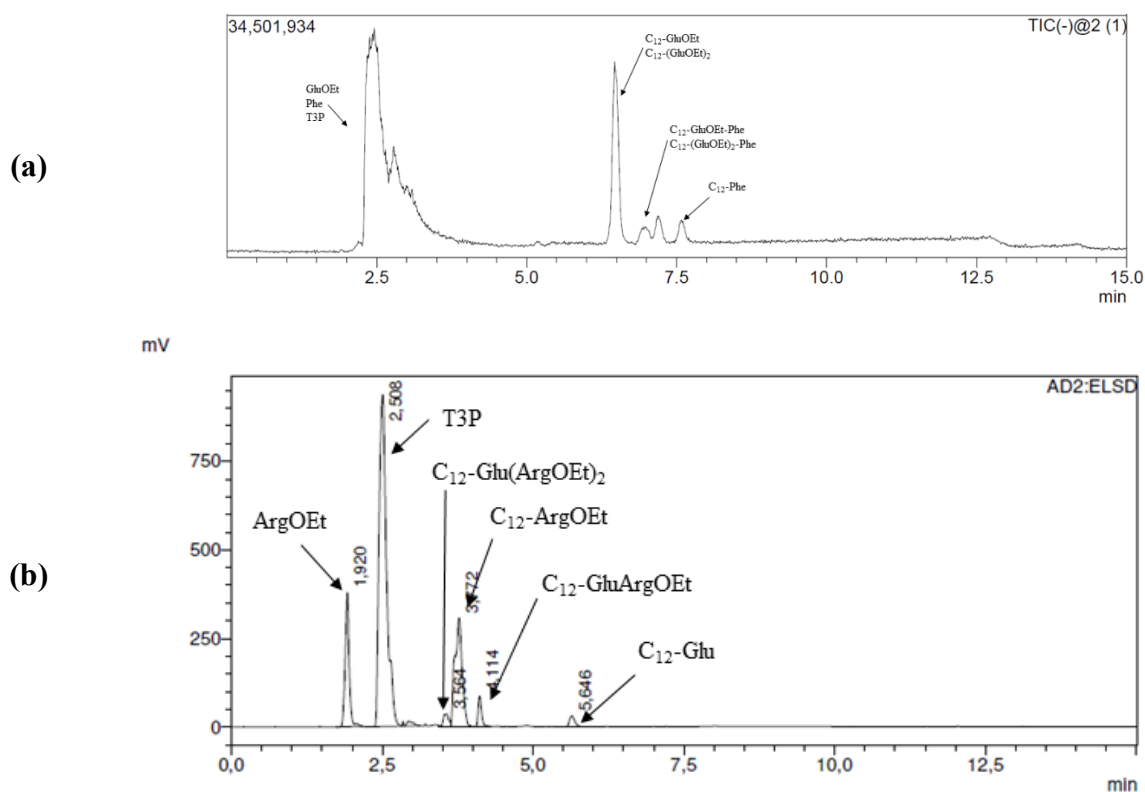


Abbildung 20: Chromatogramm der Produktmischung der sequenziellen Verbindung von (a) Laurinsäure, 5-Ethyl-Glutamat HCl und Phenylalanin und (b) der analogen Reaktion mit Glu · HCl und ArgOEt · HCl.

Insgesamt zeigt die Reaktion auch hier noch eine vergleichsweise geringe Selektivität mit hoher Tendenz zur Bildung von Nebenprodukten. Dabei fallen nicht nur kurze Peptide mit verschiedenen Zusammensetzungen an, sondern auch unterschiedliche Acylaminosäuren, die von unvollständiger Aktivierung der Fettsäure und Abreaktion des T3P herrühren. Wie zuvor

erläutert, soll in diesen Untersuchungen auf die Verwendung von Schutzgruppen verzichtet werden. In Kombination mit der Problematik, dass „grüne“ Basen wie Alkali-Salze nur schlecht in organischen Lösungsmitteln löslich sind, wodurch organische, meist toxische Basen in hohen Überschüssen eingesetzt werden müssen und die Reaktion generell in organischen Lösungsmitteln ablaufen muss, da mit Wasser die Hydrolyse von T3P auftritt, wurden die Arbeiten an dieser Stelle beendet. Weitere Untersuchungen zur gezielten Synthese von aktiven, pharmazeutischen Substanzen erscheinen als sinnvoll und mit T3P generell durchführbar, allerdings muss dazu eine andere Strategie verfolgt werden, die mit den Zielen und Anforderungen der vorliegenden Arbeit nicht in Einklang zu bringen ist.

2.4 Acylierung mit Aminoacylase PmAcy aus *Paraburkholderia monticola*

2.4.1 Evaluierung des synthetischen Potentials von PmAcy

Der Einsatz von Enzymen zur Katalyse von Reaktionen entspricht vielen der gewünschten Kriterien der grünen und nachhaltigen Reaktionsführung. Die Reaktion erfolgt oft in wässrigem Medium und bietet durch die hohe Spezifität der Enzyme effiziente Umsetzung mit hoher Selektivität. Die Arbeiten wurden im Rahmen des Hochschul-Verbundprojekts LipoPep gemeinsam mit der FH Aachen durchgeführt. Für die Evaluierung von Aminoacylasen wurden chemisch synthetisierte Referenzsubstanzen (vgl. Kapitel 2.2) und Analysenmethoden für die Reaktionsuntersuchung und Produktcharakterisierung bereitgestellt. Die rekombinant von GERRIT HAEGER hergestellte Aminoacylase aus *Paraburkholderia monticola* (PmAcy) wurde dann auf ihr synthetisches Potential untersucht. Die initiale Charakterisierung von PmAcy zeigte, dass es ein Metall-abhängiges Enzym mit hoher Temperaturstabilität von bis zu 70 °C ist und welches ein hydrolytisches pH-Optimum im Bereich von pH 5 – 12 aufweist, wobei auch bei pH 13 noch Aktivität verzeichnet werden konnte. In der Hydrolyse wird ein breites Substratspektrum von *N*-Lauroyl- und *N*-Palmitoyl-Aminosäuren akzeptiert, wohingegen acetylierte Aminosäuren nicht umgesetzt werden.¹⁹⁸ Aufbauend auf den synthetischen Arbeiten von TAKAKURA ET. AL. wurden die anfänglichen Reaktionsbedingungen mit Substratkonzentrationen von 200 mM Aminosäure und 100 mM Fettsäure gewählt (vgl. 4.3.2).¹⁵⁰ Initiale Synthese-Untersuchungen wurden mit Alanin und Phenylalanin durchgeführt, wobei nur mit Phenylalanin ein guter Umsatz erreicht wurde. Eine genauere Analyse der Produktmischung wurde im Vergleich zur chemisch hergestellten Referenzsubstanz durchgeführt (vgl. Abbildung 21). Die Analysen zeigten zunächst eine erfolgreiche Bildung eines Produkts mit identischer Retentionszeit.

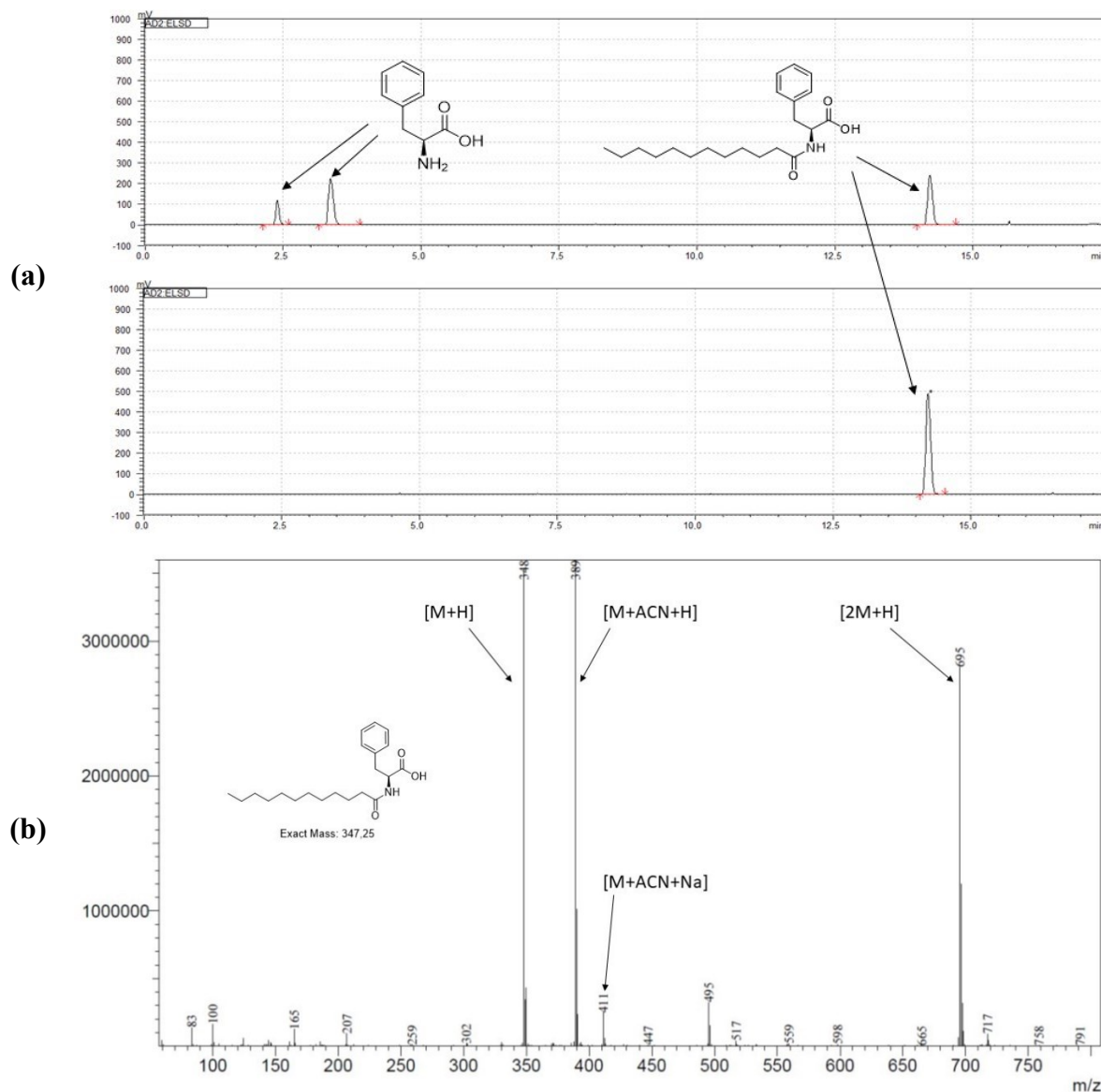


Abbildung 21: (a) Vergleich der HPLC-ELSD-Chromatogramme von *N*-Lauroyl-Phenylalanin aus der enzymatischen (oben) und chemischen (unten) Synthese, (b) LC-MS-Spektrum von enzymatisch Synthetisiertem *N*-Lauroyl-Phenylalanin.

Für weiterführende Untersuchungen wurde das Produkt analog zur etablierten Schotten-Baumann-Routine über Säurefällung in hoher Reinheit isoliert und mittels LC-MS und NMR-Analytik genauer identifiziert (vgl. Abbildung A 39 - Abbildung A 41).

Nachfolgende Experimente zur Untersuchung des optimalen pH-Werts für die Synthese von *N*-Lauroyl-Phenylalanin wurden bedingt durch die hohe Stabilität und Alkali-Toleranz des Enzyms bei der Hydrolyse im Bereich von pH 6 - 13 durchgeführt (vgl. Abbildung 22a), wobei eine maximale Ausbeute von circa 45 % erzielt wurde. Die höchste Ausbeute an *N*-Lauroyl-Phenylalanin wurde bei pH = 8 erreicht, während die Reduktion des pH-Werts auf pH = 7 in einem drastischen Abfall der Ausbeute auf 16 % resultiert. Eine weitere Absenkung des pH-

Wertes führt zunehmend zu einer Trübung der initialen Reaktionsmischung durch unvollständige Lösung der Substrate und wurde daher nur bis $\text{pH} = 6$ durchgeführt. Auch höhere pH -Werte führen zu einer konstanten Abnahme der Ausbeute, oberhalb von $\text{pH} = 12$ kann keine Synthese mehr beobachtet werden. In der Hydrolyse hingegen wurden die besten Resultate bei $\text{pH} = 12$ erzielt. Bei höheren pH -Werten bis $\text{pH} = 13$ zeigte das Enzym noch reduzierte Aktivität, ebenso sank die Hydrolyseaktivität bei niedrigeren pH -Werten.

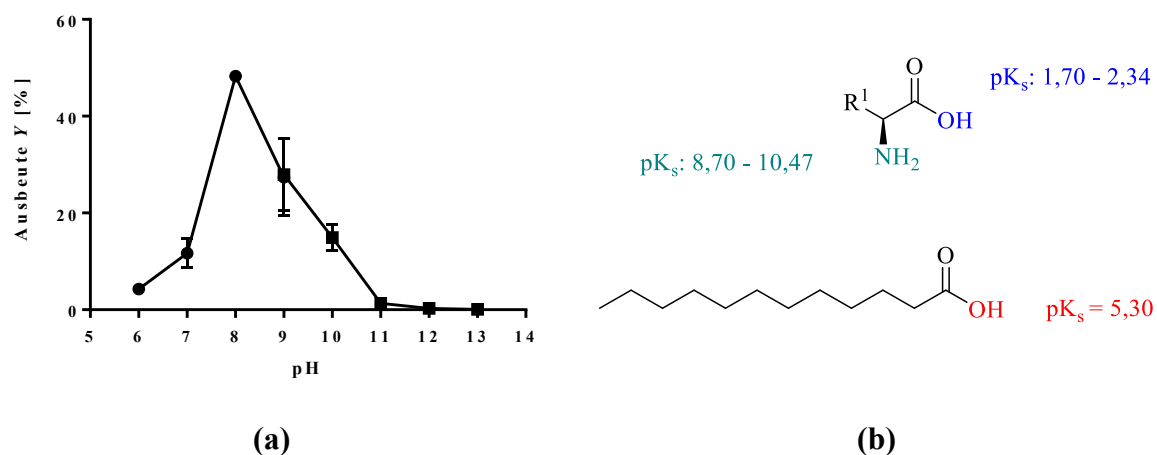


Abbildung 22: pH -Optimum von PmAcy für die Synthese von *N*-Lauroyl-Phenylalanin (a) Synthesen von $\text{pH} = 6,0 - 9,0$ wurden in Tris-HCl \bullet durchgeführt, Synthesen im Bereich von $\text{pH} = 9,0 - 13,0$ in Na-Borat-Puffer \blacksquare ; sowie die pK_s -Werte-Bereiche der Substrate (b).^{199,200}

Als mögliche Erklärung für das pH -Optimum der Synthese wird hierbei der ionische Zustand der Substrate und die daraus resultierende komplexe Mischung vermutet, die ein schmales Fenster für die erfolgreiche Koordination an das katalytisch aktive Zentrum des Enzyms benötigt. Die enzymatische Route setzt auf Fettsäuren bzw. Fettsäure-Alkali-Salze, deren Säure-Funktion bei niedrigen pH -Werten protoniert vorliegt, im alkalischen Bereich allerdings deprotoniert und als Carboxylat-Funktion zur schlechten Abgangsgruppe wird. Gleichzeitig sorgt ein niedriger Lösungs- pH auch für die Protonierung der Amin-Funktion, wodurch ein Ammonium-Kation ausgebildet wird und gegebenenfalls nicht mehr vom aktiven Zentrum koordiniert werden kann. Im Vergleich dazu setzt die chemische Route auf einen alkalischen pH -Wert im Bereich von 9 – 10, um ein freies Elektronenpaar an der Amin-Funktion der Aminosäure zu gewährleisten. Hierüber kann eine nucleophile Substitution am Acyl-Kohlenstoff erfolgen, wobei ein Chlorid-Anion abstrahiert wird, welches auch im alkalischen Bereich noch eine gute Abgangsgruppe darstellt. Bisher in der Literatur beschriebene Aminoacylasen besitzen in der Regel ihr pH -Optimum im neutralen bis leicht alkalischen Bereich von $\text{pH} 7 - 9$: Die Aminoacylase pAcy1 aus Schweine-Niere erzeugte die höchsten

Ausbeuten in der Umsetzung von Methionin und Lysin mit Laurinsäure bei $\text{pH} = 7,5$, während SmAA aus *S. ambofaciens* für die Umsetzung von Phenylalanin mit 10-Undecensäure ihr Optimum bei $\text{pH} = 8,0$ besitzt.^{142,146} Die zu PmAcy stark homologe Acylase aus *Burkholderia sp.* zeigt ähnliche Tendenzen und lieferte die höchsten Ausbeuten an *N*-Lauroyl-Phenylalanin bei $\text{pH} 9,0$.¹⁴⁹

Neben der Umsetzung von Fettsäuren verschiedener Kettenlängen spielt auch die Wahl der polaren Kopfgruppe eine entscheidende Rolle bei den Eigenschaften und der möglichen Anwendung des Tensids. Zusätzlich zur negativen Ladung der Säuregruppe kann über die Seitenkette der Aminosäure eine weitere negative oder positive Ladung beigesteuert werden. Somit kann die Kopfgruppe zweifach oder einfach negativ oder insgesamt neutral geladen sein. Durch eine Modifikation der Säuregruppe können zusätzlich nicht-ionische oder kationische Tenside generiert werden. Ebenso können aliphatische und aromatische hydrophobe Reste die Hydrophilie der Kopfgruppe abschwächen.^{24,46,201}

In der Folge wurde die Substratspezifität und Syntheseleistung des Enzyms für Fettsäuren verschiedener Kettenlängen genauer untersucht, wobei Kettenlängen im Bereich von $\text{C}_8 - \text{C}_{18}$ mit Phenylalanin als Aminosäure-Cosubstrat (vgl. Abbildung 23a) eingesetzt wurden. Kurzkettige Fettsäuren ($\text{C}_8 - \text{C}_{10}$) erzeugen hydrophilere Produkte, die vor allem lösungsvermittelnd wirken, während mittlere Kettenlängen ($\text{C}_{12} - \text{C}_{14}$) vor allem tensidische Verbindungen liefern. Im Bereich höherer Kettenlängen ($\text{C}_{16} - \text{C}_{18}$) hingegen überwiegt der hydrophobe Charakter und die Verbindungen wirken vor allem emulgierend.^{69,202,203} Der pH-Wert wurde in Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen für die folgenden Experimente auf $\text{pH} = 8,0$ festgelegt. Die Synthese mit der kurzkettigen Caprylsäure ($\text{C}_8:0$) zeigt vergleichbare Resultate wie die Umsetzung mit Laurinsäure. Die langkettigen Palmitin- ($\text{C}_{16}:0$), Stearin- ($\text{C}_{18}:0$) und Ölsäure ($\text{C}_{18}:1 \text{ cis}$) zeigten bedingt durch die höhere Hydrophobizität eine deutlich geringere Löslichkeit, so dass der Reaktionsmischung 10 % (v/v) Ethanol zugegeben werden musste, um eine vollständige Homogenisierung zu erreichen. Im Verlauf von 24 h erreichten die langkettigen Fettsäuren allerdings durchweg höhere finale Umsätze von 70 - 75 %. Vergleiche mit entsprechender Literatur zeigen einen deutlichen Unterschied der Akzeptanz von Fettsäuren verschiedener Kettenlängen je nach eingesetzter Aminoacylase. Viele Acylasen agieren in ihrem natürlichen Umfeld vor allem mit kurzkettigen Acetyl-Gruppen ($\text{C}_2:0$) und zeigen daher nur geringe oder keine Aktivität bei der Umsetzung von langkettigen Fettsäuren, wohingegen PmAcy die Acetyl-Aminosäuren nicht hydrolysiert. Andererseits liegen auch Nachweise für dedizierte „long-chain“-Acylasen vor, die vor allem

die Hydrolyse und Synthese von langkettigen Acylaminen und Acylaminosäuren katalysieren und ihrerseits nur geringe Aktivitäten mit Acetyl-Resten aufweisen.^{140,146,148,150}

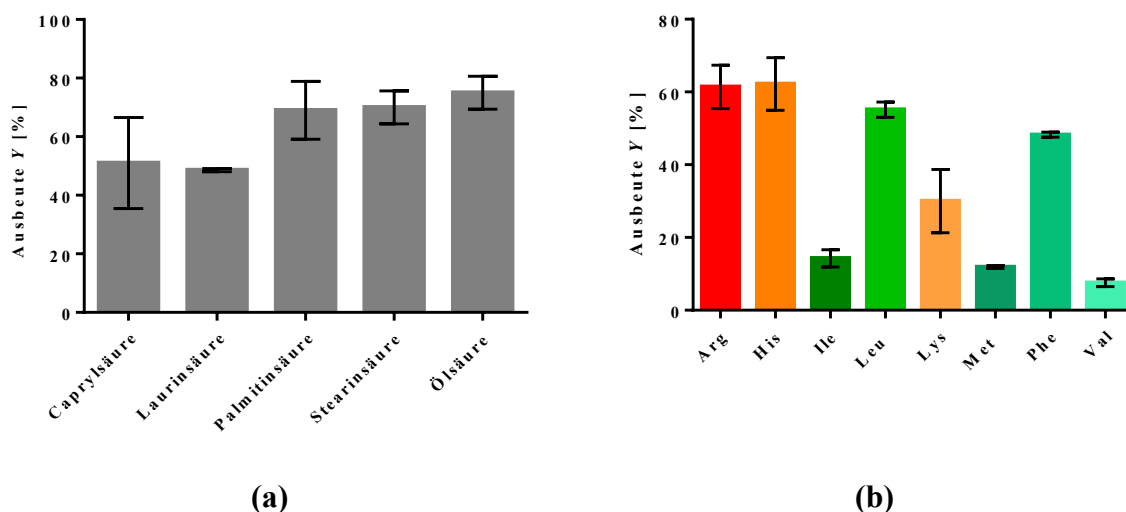


Abbildung 23: Ausbeuten der PmAcy-vermittelten Umsetzung von verschiedenen Fettsäuren mit Phenylalanin (a) und Darstellung der höchsten Umsätze für die PmAcy-katalysierte Synthese von N-Lauroyl-Aminosäuren: basische Aminosäuren in orange, hydrophobe in grün (b).

Im Anschluss an das Screening verschiedener Fettsäuren wurde daher das Aminosäure-Spektrum von PmAcy anhand der 20 proteinogenen Aminosäuren untersucht. Als Cosubstrat wurde Laurinsäure gewählt, welches solide Syntheseergebnisse liefert und im mittleren Bereich der Hydrophobizität der untersuchten und akzeptierten Fettsäuren liegt. Ebenso kann hierbei eine Beeinflussung der Aktivität oder Löslichkeit durch Ethanol ausgeschlossen werden. Abbildung 23b zeigt die Aminosäuren mit den höchsten erzielten Umsatzraten nach 24 h Reaktionszeit. Das Enzym zeigt damit eine deutliche Tendenz zur Umsetzung von hydrophoben (grün) und basischen (orange) Aminosäuren und liefert die höchsten Umsätze für Arginin und Histidin mit 61 % bzw. 62 % Umsatz, gefolgt von Leucin und Phenylalanin mit je 57 % bzw. 48 %.

Lysin hingegen liefert geringere Umsätze von nur circa 30 %, während die verbleibenden unpolaren, aliphatischen Aminosäuren (**Ile, Met, Val**) mit geringeren Umsätzen von 7 - 15 % deutlicher abfallen. Vor allem die Differenz zwischen Isoleucin und Leucin von circa 35 % zeigt eine starke Selektivität für einzelne Aminosäuren. Andere unpolare, polare und aromatische Aminosäuren (**Ala, Asn, Ser, Thr, Trp, Tyr**) wurden nur in Spuren zum Produkt umgesetzt (vgl. Tabelle 10). Die sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure, sowie Cystein, Glutamin und Prolin wurden nicht als Substrat akzeptiert und zeigten keine Produktbildung. Die Ergebnisse stehen damit im Einklang mit dem strukturell ähnlichen

Enzym, das TAKAKURA ET. AL. untersuchten, welches ebenso starke Selektivitäten zugunsten einzelner Aminosäuren zeigte.¹⁵⁰ Auch die von BOURKAIB ET. AL. untersuchte Acylase zeigte eine ausgeprägte Präferenz für bestimmte Aminosäuren und lieferte mit sauren Aminosäuren keine Ausbeute, während beispielsweise Arginin, Lysin und Phenylalanin mit verschiedenen Fettsäuren gute Aktivitäten zeigten.¹⁴⁹ Der Einsatz von Arginin-Ethylester Hydrochlorid als Substrat zeigte nach 24 h nur minimale Produktbildung, woraus ersichtlich wird, dass die protonierte Säuregruppe zwar nicht zwingend erforderlich ist, allerdings zu einer deutlichen Erhöhung der Enzymaktivität beiträgt. Die zur Amin-Funktion benachbarte Säuregruppe beeinflusst vermutlich sowohl die Koordination und die daraus resultierende räumliche Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum als auch den Ladungszustand durch Protonentransfereffekte. Dies deckt sich auch mit der Beobachtung, dass primäre und sekundäre Amine mit sowohl aliphatischen als auch aromatischen Resten nicht als Substrate akzeptiert werden (vgl. Anhang Tabelle 11).

2.4.2 Reaktionsoptimierung am Beispiel von *N*-Lauroyl-Arginin

2.4.2.1 Optimierung der Synthesebedingungen

Der Einfluss des pH-Werts auf die Synthese von *N*-Lauroyl-Arginin (LA) wurde aufbauend auf den vorherigen Untersuchungen und Überlegungen zur Synthese mit Phenylalanin und den etablierten Bedingungen der Schotten-Baumann-Reaktion im pH-Bereich zwischen 8 und 10 beleuchtet (vgl. Tabelle 4). Für die alkalischeren pH-Werte bei pH = 9 und 10 wurde erneut auf einen Na-Borat-Puffer gewechselt.

Tabelle 4: Einfluss des pH-Werts auf die Synthese von *N*-Lauroyl-Arginin.

pH	Puffer	Ausbeute Y [%]
8	Tris-HCl	61
9	Na-Borat	95
10	Na-Borat	21

Die Erhöhung des pH-Werts auf 9 und die Verwendung des 50 mM Na-Borat-Puffers führte zu einer deutlich schnelleren Lösung der eingesetzten Substrate und resultierte gleichzeitig auch in einem drastischen Anstieg der Ausbeute auf einen annähernd quantitativen Umsatz. Eine weitere Erhöhung auf pH = 10 führte hingegen analog zur Synthese mit Phenylalanin zu einem signifikanten Einbruch der Ausbeute auf nur noch 21 %. Der Vergleich mit den Resultaten von TAKAKURA ET AL. deutet auf einen Ausfall des gebildeten Produkts hin, der zu einer

Gleichgewichtsverschiebung zum Produkt führen könnte.¹⁵⁰ Nachfolgende Untersuchungen zeigten bei pH 8 und 9 eine Trübung der Lösung nach einigen Stunden Reaktionszeit, die bei pH 10 ausblieb. Ebenso konnte nach Beenden der Reaktion eine geringe Menge an ausgefallenem, weißen Feststoff bei der Reaktionsmischung mit pH 9 beobachtet werden.

Da die Löslichkeit in der Regel auch mit der Reaktionstemperatur korreliert, wurden in der Folge Experimente zur Temperaturabhängigkeit der Produktbildung durchgeführt. Gleichzeitig wurde die Ansatzgröße auf ein Gesamtvolumen von 5 ml bei Reaktionsbeginn vergrößert, um eine regelmäßige Probenahme über den Verlauf der Reaktion zu ermöglichen. Die Aufnahme der Zeit-Ausbeute-Kurven erfolgte bei pH 9 (Abbildung 24). Die Resultate zeigen hier deutlich, dass eine Erhöhung der Temperatur auf 65 °C zu einer deutlichen Abnahme der Ausbeute auf 77 % nach 24 h führt, was sich auf die höhere Löslichkeit des Produkts LA durch die höhere Temperatur zurückführen lässt. Die Reduktion der Temperatur auf 35 °C hingegen führt zu einem beschleunigten Reaktionsverlauf. So hat die Reaktion nach 24 h nach wie vor annähernd Vollumsatz erreicht, allerdings steigt die Ausbeute während der Reaktion deutlich schneller an, so dass nach 8 h bereits 77 % der möglichen Ausbeute erreicht wurden, während bei 50 °C und 65 °C nur 45 % bzw. 29 % vorliegen.

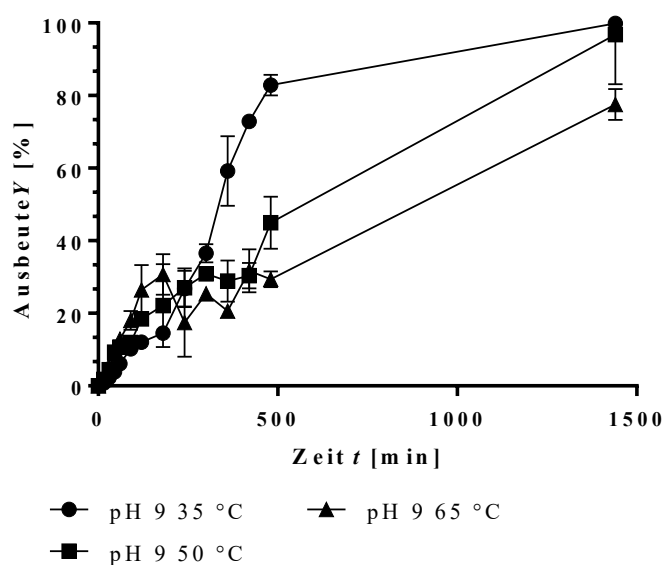


Abbildung 24: Zeit-Ausbeute-Kurven für die PmAcy-katalysierte Synthese von LA bei verschiedenen Temperaturen

Die bisherige Reaktionsführung mit einem Substratverhältnis von 200 mM Aminosäure und 100 mM Fettsäure bzw. Na-Laurat führt zu guten Ausbeuten, resultiert aber in circa 100 mM verbleibendem Arginin nach Abschluss der Reaktion. Daher wurden verschiedene Verhältnisse der beiden Substrate eingesetzt, um den Einfluss der Mengen zu ermitteln. Die Konzentrationen

der Aminosäure wurden jeweils in den Schritten 50, 100, 200 und 400 mM variiert, die Konzentration des Fettsäure-Salzes in den Schritten 100, 200 und 400 mM und die resultierende Produktmenge analysiert (vgl. Abbildung 25).

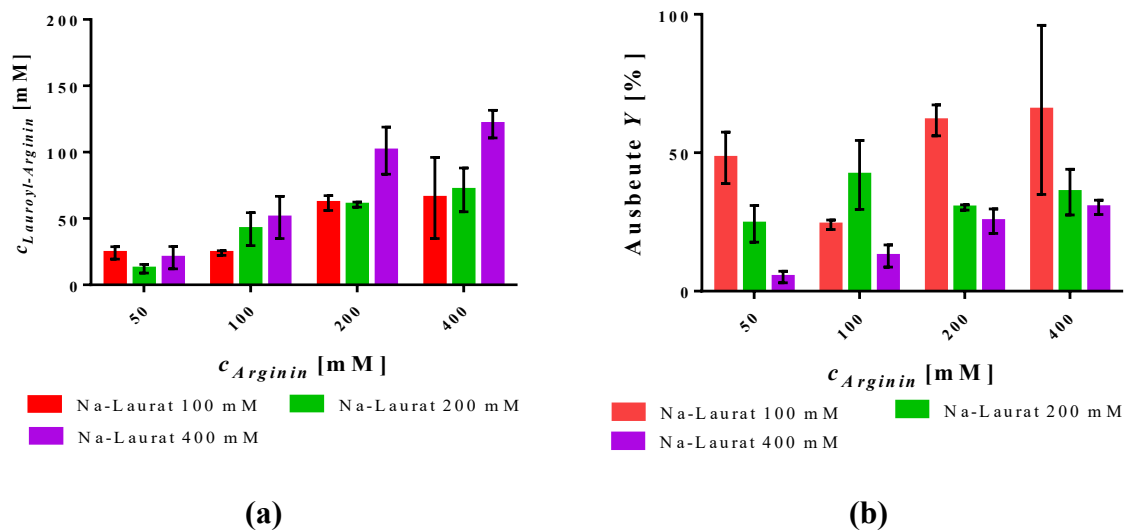


Abbildung 25: Einfluss von verschiedenen Substratverhältnissen auf die absolute Produktkonzentration (a) und die relative Ausbeute bezogen auf die Komponente im Überschuss (b).

Eine Modifikation des Substratverhältnisses führt dem Prinzip von LE'CHATELIER folgend direkt zu einer Veränderung der Gleichgewichtslage. Demnach resultiert die starke Erhöhung der Konzentration einer Komponente zwar in einer starken Zunahme der relativen Ausbeute, resultiert aber gleichzeitig darin, dass hohe Konzentrationen des zweiten Substrats in der Reaktionsmischung verbleiben und vom Produkt abgetrennt werden müssen. Die Erhöhung beider Konzentrationen hingegen führt zur Zunahme der absolut gebildeten Menge an Produkt, allerdings auch zum Absinken der relativen Ausbeute, da das Gleichgewicht nicht mehr so stark in Richtung des Produkts verschoben wird und sich das Reaktionsgleichgewicht zwischen Edukten und Produkt einstellt. Die höchsten Ausbeuten in Relation zur eingesetzten Substratkonzentration wurden mit 100 mM Na-Laurat und 200 bzw. 400 mM Arginin erzielt. Für eine anfängliche Na-Laurat-Konzentration von 100 mM werden bereits geringere relative Ausbeuten von 48 % (24 mM) bzw. 62 % (62 mM) erreicht, wenn Arginin im zweifachen Überschuss (200 mM) eingesetzt wird. Werden beide Komponenten äquimolar mit 100 mM eingesetzt werden 24 % relative Ausbeute (24 mM) erzielt. Bei Betrachtung der absoluten Ausbeuten steigt die Konzentration des Produkts mit erhöhter Substratmenge kontinuierlich an und erreicht maximale Werte für 400 mM Na-Laurat und 200 mM bzw. 400 mM Arginin. Hierbei werden Produktkonzentrationen von 100 mM bzw. 125 mM *N*-Lauroyl-Arginin erzielt.

Allerdings ist hierbei auch die hohe Konzentration an verbleibenden Substraten mit jeweils knapp 300 mM zu beachten. Ebenso darf für weitere Anpassungen der Reaktion nicht vernachlässigt werden, dass Substratkonzentrationen von 400 mM bereits zu einer merklichen Viskositätserhöhung der Reaktionsmischung führen und eine weitere Steigerung diesen Aspekt noch verstärkt bzw. die Löslichkeitsgrenze für eine oder beide Komponenten überschreiten kann.

Die erhaltenen Resultate durch die höhere Arginin-Konzentration bei 200 mM veranschaulichen allerdings die Vorzüge der Gleichgewichtsverschiebung. Eine analoge Anwendung sollte für ein Scale-Up zur Batch-Produktion möglich sein, wobei eine anschließende Trennung von Produkt, verbleibendem Substrat und Enzym beachtet werden muss. Hierbei wäre vor allem eine Isolierung des Produkts durch Ausfällung und Filtration attraktiv, da so die überstehende Phase mit Enzym und verbleibendem Substrat in einem neuen Reaktionsansatz wiederverwendet werden kann.

2.4.2.2 Produktisolierung und Evaluierung des Enzym-Recyclings

In Hinblick auf eine potenzielle technische Anwendung und eine möglichst hohe Effizienz der Reaktion stellt auch die einfache Isolierung und Abtrennung des Produkts einen wichtigen Aspekt dar. Zunächst wurde daher in Anlehnung an die Untersuchungen von Lauroyl-Phenylalanin und das beschriebene Vorgehen aus der Literatur zur chemischen Synthese eine Fällung mit HCl untersucht. Während die saure Aufreinigung von *N*-Lauroyl-Phenylalanin erfolgreich und in hoher Reinheit gelang (vgl. 4.3.3), fiel das analoge Arginin-Produkt lediglich in einer 50:50 Mischung mit nicht umgesetzter Aminosäure aus (vgl. Abbildung 26). Die Fällung als Mischung mit Arginin ist für die Anwendung als Lebensmittelzusatzstoff generell unbedenklich und wird auch bei der chemischen Synthese von *N*-Lauroyl-Arginin-Ethylester Hydrochlorid praktiziert,²⁰⁴ da sowohl das Produkt als auch die verbleibende Aminosäure im Körper problemlos metabolisiert werden.^{79,80} Allerdings resultiert die Verunreinigung mit nicht-umgesetztem Substrat natürlich in einer geringeren Wirksamkeit pro eingesetzter Menge Produkt. Zusätzlich dazu besteht im Fall der enzymatischen Katalyse die Gefahr, dass das eingesetzte Enzym durch das Ansäuern auf $\text{pH} < 2$ denaturiert und im Anschluss nicht mehr reaktiv ist. Da die bisherigen Ergebnisse ohnehin die Vermutung zulassen, dass die Löslichkeit des Produkts in Wasser begrenzt ist und im Verlauf der Reaktion ein Ausfallen des Lauroyl-Arginins auftritt, wurden Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde nach Ablauf der Reaktionszeit für 3 h auf 4 °C gekühlt, wobei eine

Zunahme der ausgefällten Menge an Feststoff beobachtet werden konnte. Feststoff und überstehende Lösung wurden durch Zentrifugation getrennt, der gewonnene Feststoff getrocknet und analysiert. Die Analyse des erhaltenen Rohprodukts zeigt eine Verteilung mit hoher Konzentration an *N*-Lauroyl-Arginin, das einen Anteil von circa 85 % am isolierten Feststoff hat.

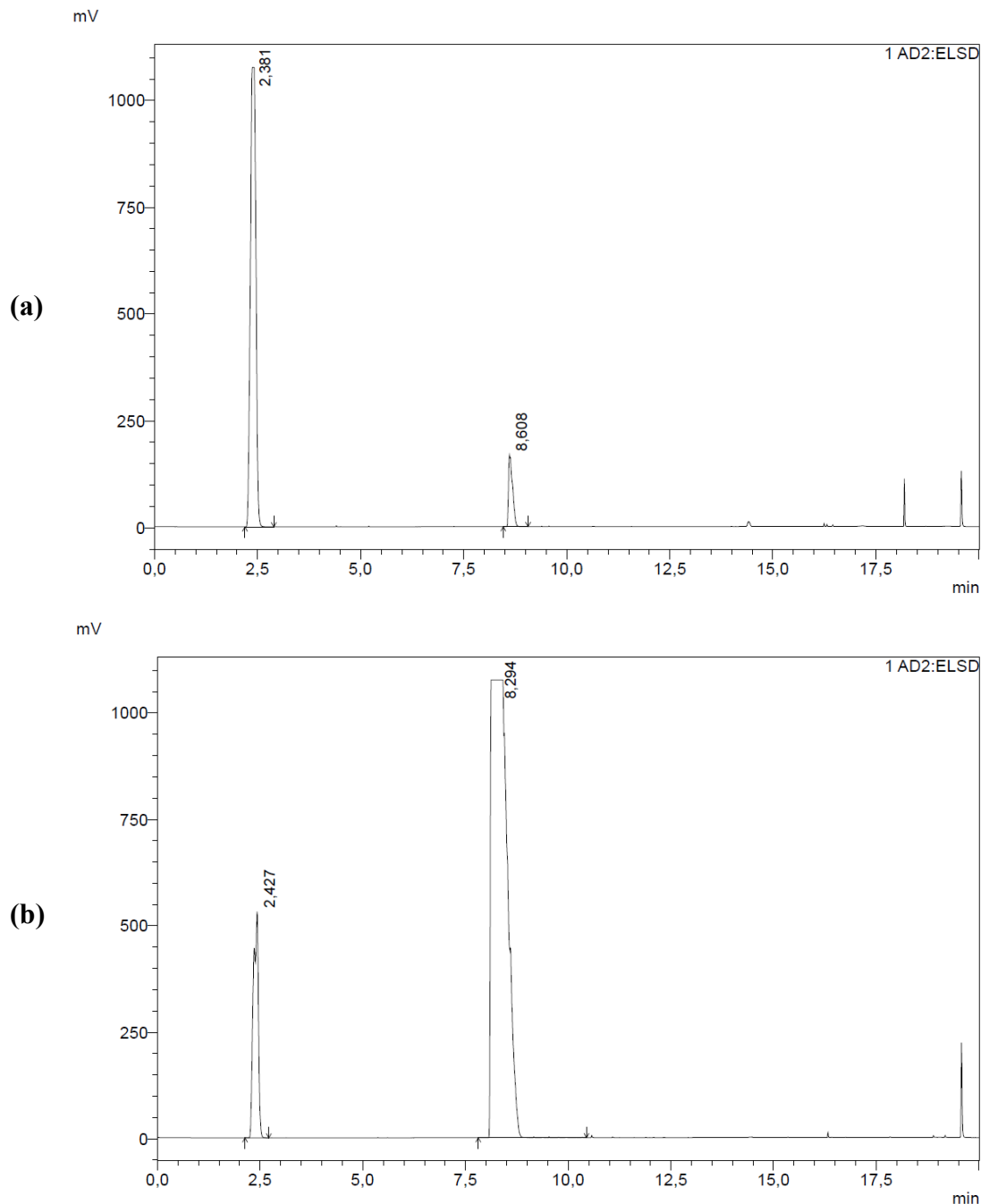


Abbildung 26: Anteil des *N*-Lauroyl-Arginins an der überstehenden Phase (a) und am, durch Kälte-Fällung isolierten, Feststoff (b).

Die erfolgreiche Abtrennung des Produkts aus der Reaktionsmischung sowie die hohe Stabilität des Enzyms sollten ein Recycling ermöglichen. Erste Untersuchungen zum Einsatz der

überstehenden Enzym-Lösung in einem neuen Reaktionsansatz zeigen auch hier noch eine erfolgreiche Produktbildung nach weiteren 24 h Reaktionszeit.

Anschließende Untersuchungen zur wiederholten Kälte-Fällung und Rezyklieren der überstehenden Lösung mit dem Enzym und verbleibenden Substraten wurden bei Konzentrationen von 200:200 mM und 200:100 mM Arginin:Na-Laurat (Bedingungen vgl. 4.3.5) durchgeführt. Die erhaltenen isolierten Ausbeuten sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Ausbeuten der Recycling-Runs für PmAcy

Run	Relative Ausbeute $Y(C_{Arg}:C_{Na-Laurat})$ [%]	
	200:100 mM	200:200 mM
1	95 ± 0.3	62 ± 3
2	2 ± 0.2	53 ± 4

Unter den gewählten Bedingungen zeigen sich zunächst vergleichbare Ergebnisse wie in den Einzel-Experimenten zur PmAcy-vermittelten Acylierung von Arginin. Nachdem im ersten Durchlauf bei 200:100 mM Arginin:Na-Laurat annähernd quantitativer Umsatz erzielt wurde, fällt der zweite Durchlauf allerdings drastisch ab und liefert nur noch minimale Ausbeuten. Bei äquimolarer Reaktionsführung hingegen werden sehr gute Ausbeuten von 62 % erzielt, wobei zwischen erstem und zweitem Durchlauf eine Ausbeute-Abnahme um circa 9 % beobachtet werden kann, die sich auch durch Verluste des Enzyms beim Überführen und Zentrifugieren sowie Schwankungen in der Analytik erklären lässt, zumal die Abweichung der Messungen untereinander vergleichsweise klein ausfällt.

Da während der Charakterisierung sowohl bei hohen Temperaturen als auch bei stark alkalischem pH keine starke Aktivitätsabnahme beobachtet wurde, sind möglicherweise die Recyclingbedingungen für die Inaktivierung verantwortlich.¹⁹⁸ Gegebenenfalls führt die Ausfällung des Produkts zur Co-Fällung des Enzyms, so dass hierbei ein Aktivitätsverlust auftritt. Ebenso könnte eine Veränderung der Salzkonzentrationen, z. B. durch Ausfallen der notwendigen Zn^{2+} -Ionen durch Abkühlen oder Komplexbildung, zum Aktivitätsverlust führen. Dabei ist besonders die Reaktionsführung mit einem Überschuss an Arginin betroffen, so dass gegebenenfalls das freie Arginin als Fehlerquelle betrachtet werden kann. Schlussendlich können negative Beeinflussungen des Enzyms durch Immobilisierung und Abtrennung reduziert bzw. gänzlich verhindert werden, da so nicht nur die Abtrennbarkeit verbessert werden, sondern auch die Stabilität des Enzyms erhöht werden kann.^{205,206} Allerdings ist dadurch ebenso eine Beeinflussung der pH-Optima und der Eigenschaften des Enzyms möglich, so dass eine erweiterte Untersuchung und Optimierung der Reaktion notwendig

wäre.¹⁴⁸ Ebenso wäre eine detailliertere Untersuchung der Salz-Gehalte nach der Reaktion und nach dem Abtrennen des Produkts möglich, um diesen Faktor ausschließen oder korrigieren zu können.

2.4.2.3 Etablierung eines Puffer-freien Systems

Einer der gravierendsten Nachteile des bislang entwickelten Systems ist die Verwendung des Borat-Puffers in der Reaktion. Die zur Herstellung verwendete und im Puffergleichgewicht noch vorhandene Borsäure wird als teratogen eingestuft und der Einsatz sollte daher sofern möglich reduziert oder gänzlich vermieden werden. Dies schlägt sich vor allem negativ in der Herstellung von Tensiden für die Anwendung an Lebensmitteln und in Kosmetika nieder. Daher wurde die Anwendung der Synthese in einem Puffer-freien wässrigen System untersucht. Da auch der möglichen Weiterentwicklung zu einer Anwendung im größeren Maßstab Rechnung getragen werden sollte, wurden die Untersuchungen mit Substrat-Konzentrationen äquimolar mit 200 mM und im etablierten Verhältnis 200 mM Arginin zu 100 mM Na-Laurat durchgeführt (vgl. Abbildung 27, Bedingungen in 4.3.4). Der pH-Wert wurde konstant überwacht und durch Nachdosieren von 1 M NaOH auf pH = 9 gehalten.

Die Resultate zeigen eine annähernd lineare Zunahme der Ausbeute über den Verlauf von 24 h und liegen nach Beenden der Reaktion bei 49 % und 41 % für die Substrat-Konzentrationen von 200:200 mM bzw. 200:100 mM Arginin zu Na-Laurat. Analog zu den vorherigen Reaktionen wurden zunächst eine Trübung der Reaktionsmischung und anschließend ein Ausfall des weißen Feststoffs beobachtet.

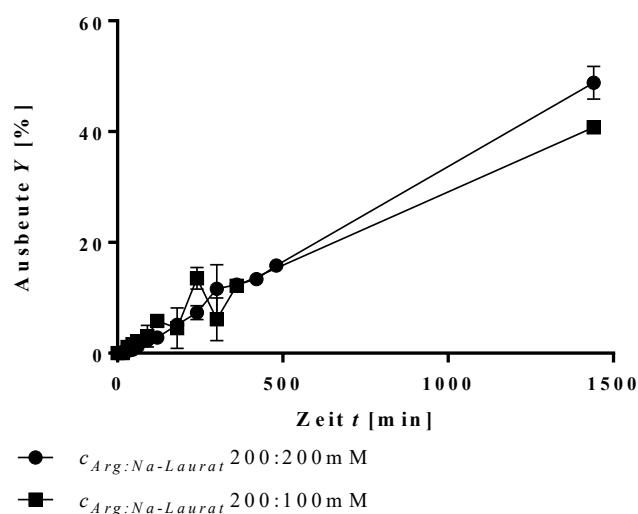


Abbildung 27: Zeit-Ausbeute-Verlauf der Synthese von *N*-Lauroyl-Arginin im wässrigen, Puffer-freien System.

Die Ergebnisse liegen allerdings unterhalb der Ausbeuten der Reaktionen im Na-Borat gepuffert System, was darauf hindeuten könnte, dass die zusätzlichen Ionen neben dem Stabilisieren des pH-Werts noch weitere Effekt auf den Reaktionsverlauf haben könnten. Einerseits könnte die Verfügbarkeit des Cofaktors ZnCl_2 durch die höhere Ionendichte verbessert werden, andererseits könnten die Natrium-Kationen und Borat-Anionen auch zur Stabilisierung des Enzyms bzw. des aktiven Zentrums beitragen.^{207,208} Dennoch stellt die Puffer-freie Reaktionsführung durch die Vermeidung der gesundheitsschädlichen Substanzen und die guten Ausbeuten eine attraktive Möglichkeit für zukünftige Entwicklungen dar.

2.4.3 Grüne Synthese des Zusatzstoffs Ethyl-*N*-Lauroyl-Arginat

Die gute Umsetzung von Arginin zum *N*-Lauroyl-Arginin bietet potenziell einen attraktiven, nachhaltigen Zugang zum antimikrobiellen Tensid Ethyl-*N*_α-Dodecanoyl-Arginat Hydrochlorid bzw. Lauroyl-Arginin Ethylester (LAE). LAE wurde in der Vergangenheit von der EFSA als auch von der FDA als sicher (*generally recognized as safe*, GRAS) eingestuft und als antimikrobieller und damit haltbarkeitsverlängernder Zusatzstoff für Lebensmittel eingestuft.^{77,78} Neben der hohen Wirksamkeit gegen nahrungsmittelassoziierte Bakterienstämme wie *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* und *Pseudomonas aeruginosa* wurde auch die Inhibition von gastrointestinal wirkenden Stämmen wie *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, sowie verschiedene *Salmonella*- (*S. enterica*, *S. typhimurium*) und *Listeria*-Stämme (*L. monocytogenes*, *L. innocua*) gezeigt.^{70,71,75,209}

Zur Herstellung von LAE mit PmAcy zeigen sich zwei verschiedene Ansätze auf: einerseits die direkte Acylierung von Argininethylester mit Laurinsäure und andererseits die Synthese von *N*-Lauroyl-Arginin mit PmAcy sowie die anschließende Veresterung mit verschiedenen Lipasen oder auf chemischem Wege (vgl. Abbildung 28). Der obere Reaktionspfad ist nach vorherigen Untersuchungen zum Einsatz der veresterten Aminosäure (2.4.1) zwar generell möglich, allerdings erscheint eine technische Anwendung durch den geringen Umsatz bzw. die zum Ausgleich der geringen Aktivität notwendige Enzymmenge nicht sinnvoll. Daher wurde die Route über Acylierung des Arginins mit Laurinsäure gefolgt von chemisch oder enzymatisch katalysierter Veresterung weiterverfolgt.

Als abschließender Schritt in der Synthese von LAE verbleibt die Veresterung der Carboxyl-Gruppe von *N*-Lauroyl-Arginin mit Ethanol. In der bisher angewandten industriellen und patentierten Synthese wird hierfür die Carbonsäure mit Thionylchlorid aktiviert und im Anschluss mit einem Überschuss Ethanol umgesetzt.²⁰⁴ Analog zur Schotten-Baumann-

Reaktion besteht dabei einerseits das Problem des Umgangs mit gesundheitsschädlichen Reagenzien sowie die Bildung von stöchiometrischen Mengen an HCl, die durch Zugabe einer Base neutralisiert und entsorgt werden müssen.

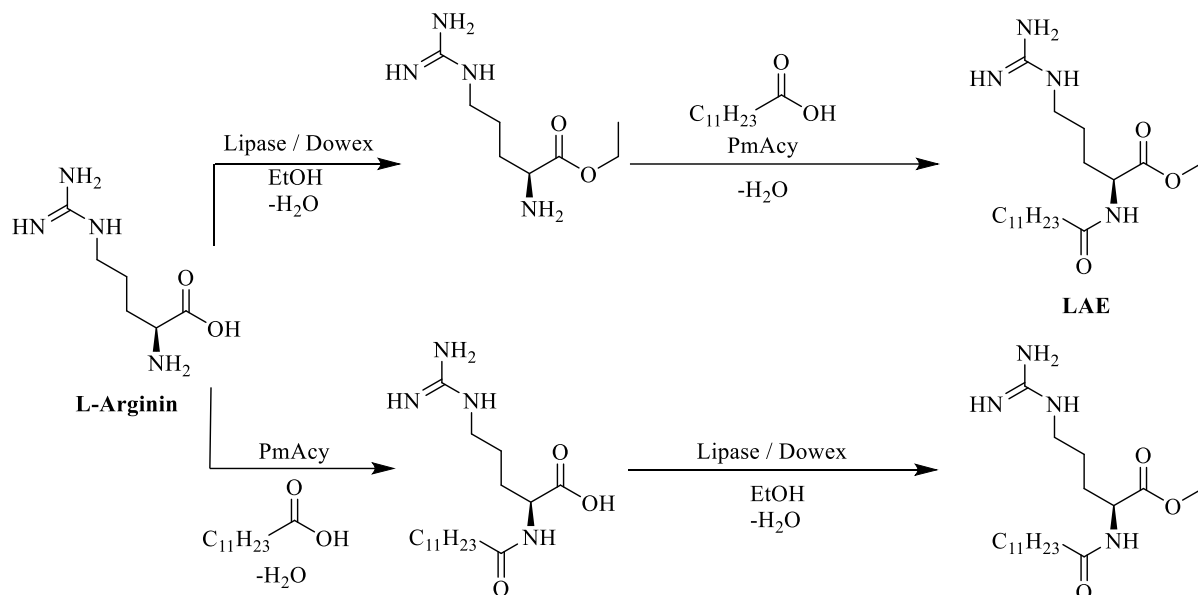


Abbildung 28: Gegenüberstellung der Reaktionspfade zur zweiseitigen Synthese von LAE.

Eine grüne Alternative stellt die katalytische Veresterung des Zwischenprodukts dar, wobei die kommerziell-verfügbaren und bereits immobilisierten Lipasen CALB und RMIM für erste Untersuchungen ausgewählt wurden. Für Lipasen wurde bereits berichtet, dass sie auch in annähernd wasserfreien Systemen aus organischen Lösungsmitteln aktiv sind.^{122,210,211} Veresterungen sollten unter diesen Bedingungen durch die Gleichgewichtsverschiebung sogar höhere Umsätze liefern. Dabei werden sowohl einfache Alkohole und Fettsäuren als auch anspruchsvollere Substrate wie Aminosäuren und Zucker akzeptiert.^{212–216} Ebenso wird die Veresterung auf chemischem Wege evaluiert, wobei ein Dowex-Ionenaustauscher eingesetzt wird, der von TURHANEN ET. AL. erfolgreich für die Bildung von Methylestern verschiedener Aminosäuren verwendet wurde.¹⁹⁷ Die genauen Reaktionsbedingungen für die enzymatische und chemische Katalyse sind in 4.3.6 bzw. 4.4.7 aufgeführt und verwenden in Hinblick auf Temperatur, Reaktionszeit und Durchmischung identische Bedingungen. Abbildung 29 zeigt den Verlauf der Veresterung exemplarisch an den Chromatogrammen der Umsetzung mit dem Ionenaustauscher.

Die Synthese von LAE ausgehend von per Schotten-Baumann-Route hergestelltem *N*-Lauroyl-Arginin verlief innerhalb von 24 h erfolgreich mit allen getesteten Katalysatoren. Bei Einsatz

von Substrat, welches enzymatisch mit PmAcy gewonnen wurde, konnte zunächst keine vollständige Lösung erreicht werden und die Reaktion verzeichnete keine Produktbildung.

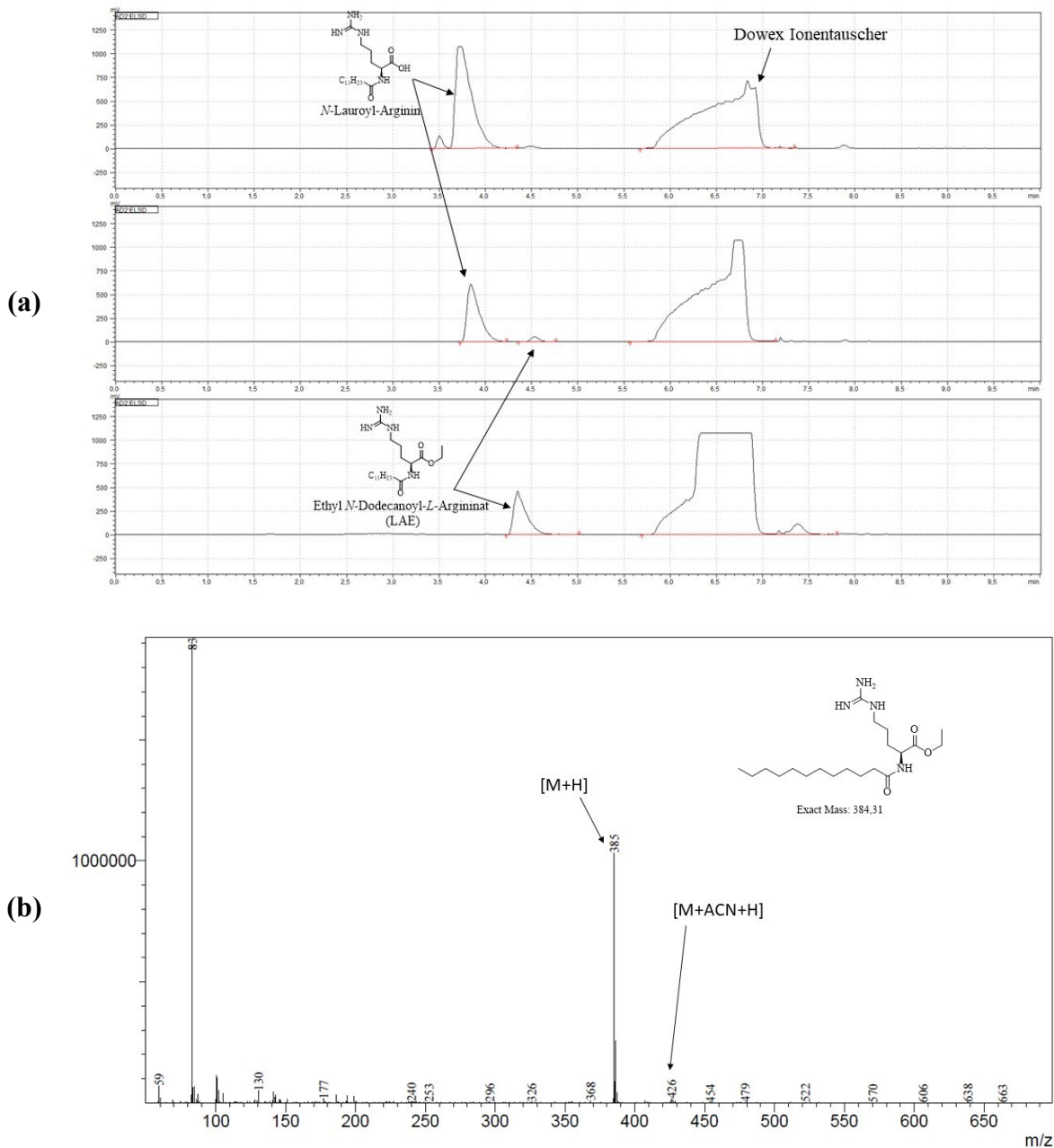


Abbildung 29: Veresterung von *N*-Lauroyl-Arginin mittels Dowex-Ionentauscher: (a) HPLC-ELSD Chromatogramme der anfänglichen Mischung (oben), nach 2 h (mittig) und 24 h (unten); (b) MS-Spektrum des erhaltenen Produkts.

Erst durch Zugabe von 10 μ l HCl in MeOH und die damit verbundene Senkung des pH-Werts konnte die Reaktion gestartet werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von TURHANEN ET. AL. und eigenen Experimenten mit dem Dowex-Ionentauscher, die aufzeigten, dass die

Aminosäuren nur dann erfolgreich mit MeOH und EtOH verestert werden konnten, wenn die Aminosäure in ihrer Hydrochlorid-Form eingesetzt wurde.¹⁹⁷ Ebenso decken sich die Ergebnisse mit früheren Berichten zur Veresterung und Umesterung durch Lipasen, die erfolgreich hohe Umsatzgrade bis zur annähernd quantitativen Produktion von Estern zeigten.^{212,217,218}

Insgesamt war die nachhaltige Synthese von Ethyl-*N*_α-Dodecanoyl-Arginat über zwei Schritte erfolgreich und bietet weiteres Verbesserungspotenzial in Hinblick auf Synthese-Verlauf, Verzicht auf Lösungsmittel, Immobilisierung des Enzyms und Optimierung der Gesamtreaktion.

2.5 Carbonyl-Kondensation & Reduktive Aminierung

Neben Fettsäuren sind auch Fettalkohole kommerziell verfügbar und stellen interessante Substrate für die Synthese von Aminosäuretensiden dar. Die daraus gebildeten *N*-Alkyl-Aminosäuren sind stabile Tenside, die unter Annahme der idealen Syntheseroute direkt durch katalytische reduktive Aminierung *in-situ* gebildet werden können.

Als Startpunkt für die Evaluierung des Reaktionspfads und für eine generelle Machbarkeitsstudie wurden zunächst die entsprechenden Aldehyde eingesetzt. Dabei wurde die Möglichkeit zur Kondensation von Aldehyden und Ketonen mit Nucleophilen, wie Amin-Gruppen, genutzt, um unter Wasserabspaltung eine neue Bindung zwischen Nucleophil und Carbonyl-Kohlenstoff zu bilden. Durch Zugabe des Carbonyls werden zunächst Imine unter Abspaltung von Wasser gebildet, die ihrerseits zum entsprechenden Amin reduziert werden können.

Die Reaktion wurde unter Auswahl verschiedener Aldehyde untersucht, wobei der Fokus zunächst auf der generellen Durchführbarkeit der Reaktion als auch auf der Verwendung von nachwachsenden und kommerziell verfügbaren Verbindungen lag. Zur Synthese der Alkylamine und -imine wurden dabei einerseits die linearen Fettaldehyde Octanal und Dodecanal eingesetzt, aber auch das aromatische Zimtaldehyd oder die Terpen-Aldehyde Citronellal und Citral bzw. das Terpen-Keton Pseudoionon (vgl. Abbildung 30).

Die Kondensationsreaktion wurde nach der Vorschrift unter 4.4.8 durchgeführt, wobei die entsprechenden Alkylamine aufgrund der höheren Stabilität und der Irreversibilität der Reduktion als eigentliches Produkt der Reaktion betrachtet wurden. In der initialen Untersuchung der Reaktion lieferte die Kondensation von Alanin und Serin mit Dodecanal innerhalb von kurzer Zeit die entsprechenden Imin-Zwischenprodukte, die allerdings nur in

empfindlich gegenüber Oxidation durch Luft-Sauerstoff zur entsprechenden Carbonsäure oder der Aldol-Reaktion, woraus langkettige Dimere mit interner Keton- bzw. β -Hydroxy-Carbonyl-Strukturmotiv erhalten werden.^{219,220}

Die attraktivere Alternative zum Einsatz von Aldehyden ist daher die direkte Reaktion mit Fettalkoholen. Dabei durchläuft der Alkohol eine *in-situ* Kaskade aus Oxidation zum Aldehyd, Kondensation mit dem Amin und anschließender Reduktion zum Alkylamin (vgl. Abbildung 31). Der Prozess der reduktiven Aminierung bzw. der zugrundeliegende „borrowing hydrogen“-Mechanismus ist auf vielfältige Weise in der Literatur beschrieben.^{221,222} In der Regel kommen dabei Übergangsmetall-Katalysatoren wie Rhenium, Ruthenium oder Palladium zum Einsatz, wobei in aktuellerer Forschung vermehrt auch der Blick auf die günstigeren Metalle Nickel, Eisen und Aluminium gefallen ist.^{223–227}

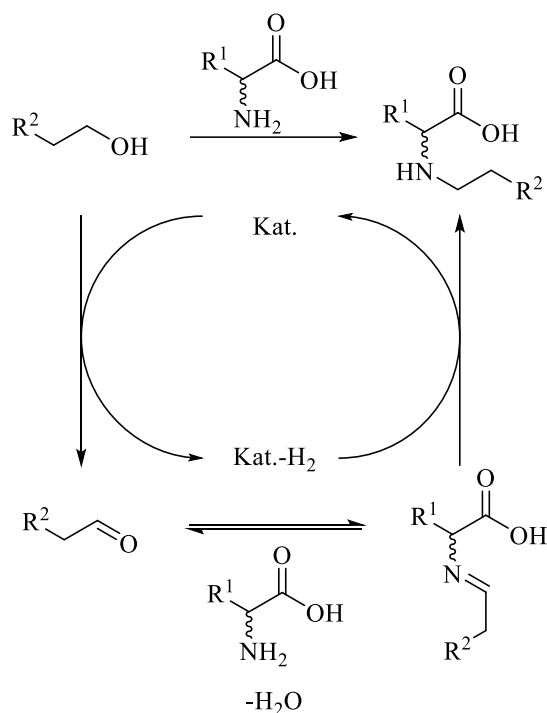


Abbildung 31: Schematischer Ablauf der reduktiven Aminierung mit Alkoholen nach dem „borrowing hydrogen“-Mechanismus.

Zur Übertragung der Synthesen auf langkettige Alkohole wurden daher zunächst flexible, bekannte Systeme ausgewählt. Besonders vielversprechend war der Einsatz von Eisen-Ionen, die nicht nur durch ihren geringen Materialpreis überzeugen, sondern auch für die Alkylierung von Aminosäuren beschrieben waren.²²⁸ Ebenso ist eine Fixierung in Montmorillonit-Granulat möglich, was einerseits das Separieren von Katalysator und Produkt ermöglichen soll und bereits als Trägermaterial für dreiwertige Aluminium-, Eisen- und Indium-Ionen beschrieben

wurde.^{190,191} Dennoch konnte unter Einsatz von Dodecanol in Kombination mit den Aminosäuren (vgl. 4.4.9) durch den Montmorillonit-K10-Fe³⁺-Katalysator kein Umsatz beobachtet werden. Auch die Alkylierung unter Druck mit Pd/C-Katalysator zeigte keine Reaktivität für die Alkylierung von Lysin mit Dodecanol. Im Vergleich zur zugrundeliegenden Literatur ist vor allem zu beachten, dass dort nur Phenol bzw. Cyclohexanol und Cyclohexanon eingesetzt wurden.²²⁹ Die Ringstruktur und der aromatischen Zustand des Phenols erzeugen eine höhere Elektronendichte und können auf diese Weise die Koordination an das katalytische Zentrum und die Amin-Funktion beeinflussen.

Ebenso wurde die direkte *in-situ* Alkylierung durch Zugabe von basischen Alkalimetall-Salzen und einem Überschuss des entsprechenden Alkohols untersucht (vgl. 4.4.11). Obwohl die erfolgreiche Alkylierung von aliphatischen und aromatischen Aminen mit Alkoholen verschiedener Kettenlänge und Struktur beschrieben ist, war die direkte *N*-Alkylierung von Glutaminsäure, Lysin und Serin nicht erfolgreich.^{230,231} Ausschlaggebend könnte in dieser Anwendung die unterschiedliche Struktur von organischen Aminen und Aminosäuren sein. Einerseits liegt die Löslichkeit der Aminosäure unter der Löslichkeit desamins im entsprechenden organischen Substrat, andererseits wird ein deutlicher Überschuss an Base benötigt, da diese zunächst die Säure-Funktion der Aminosäure deprotoniert, bevor die eigentlich erwünschte Reaktion katalysiert werden kann. Dazu kommt noch die stöchiometrische Bildung von Wasser durch Deprotonieren der Aminosäure, wodurch das in der Literatur beschriebene Gleichgewicht zwischen Aldehyd und Alkohol negativ beeinflusst werden könnte.^{223,232–235}

Den oben beschriebenen Mechanismus greift auch der Ansatz der Aldehyd-vermittelten reduktiven Aminierung (vgl. 4.4.12) auf, der die Reaktion durch eine geringe Menge an zugesetztem Aldehyd initiiert. Im Anschluss erfolgt ein Basen-unterstützter Übertrag der Protonen vom Fettalkohol auf das entstandene Imin, wodurch erneut Aldehyde durch formelle Oxidation des Alkohols gebildet werden und ein Fortlaufen der Reaktion stattfinden kann. Auch hier zeigt sich, trotz sehr guter Resultate und Selektivitäten in der Literatur, dass die Route nicht direkt auf Aminosäuren übertragen werden kann.²³⁶ Ebenso liegt hier die Vermutung nahe, dass die Säure-Gruppe der Aminosäure mit dem zugegebenen Kaliumcarbonat wechselwirkt und so die Protonen-Übertragung verhindert. Zusätzlich muss auch beachtet werden, dass die Literatur sich vor allem auf kompakte, elektronenreiche aromatische Substituenten an Amin und Alkohol stützt, die durch die Ausprägung des π -Elektronensystems die Reaktivität und Acidität der Komponenten maßgeblich beeinflussen können.

In Anbetracht der Notwendigkeit für stöchiometrische Reduktionsmittel und die geringe technische Verfügbarkeit und Einsetzbarkeit für Aldehyde auf der einen Seite und die schlechte Übertragbarkeit der *in-situ* Reaktion auf ein System aus Fettalkohol und Aminosäuren auf der anderen Seite wurden die Untersuchungen zur reduktiven Aminierung an diesem Punkt zu Gunsten von alternativen Ansätzen mit höheren Erfolgsaussichten beendet.

2.6 Linker-basierte 3-Komponenten-Tenside

2.6.1 Kopplung mit Anhydriden und Modifikation

Einer der größten Herausforderungen der Reaktion zwischen Fettsäuren und Aminosäuren ist die Bildung von ionischen Komplexen durch Protonierung der Amin-Funktion durch die Säure-Gruppe. Das gebildete Carboxylat-Anion kann im Anschluss nicht mehr mit dem protonierten Ammonium-Kation reagieren, so dass die Reaktion anderweitig vermittelt werden muss. Das Problem kann wie zuvor beschrieben durch Enzyme, Katalysatoren und Kupplungsreagenzien umgangen werden. Eine alternative Herangehensweise liegt in der Verwendung von „Linkern“ zwischen der Aminosäure und dem hydrophoben Fett-Rest, analog zur von MORÁN ET. AL. beschriebenen Methode, die zunächst C-terminal Glycerin-Ester von Aminosäuren hergestellt haben und diese im Anschluss enzymatisch mit Fettsäuren umgesetzt haben.^{130,237}

Zur Modifikation der Amin-Gruppe hingegen eignen sich vor allem Carbonsäure-Anhydride, die unter Ausbildung des entsprechenden Amids stabile Verbindungen mit der Aminosäure produzieren. Als besonders attraktive Substrate wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit cyclische Anhydride identifiziert, die nach der Ringöffnung eine weitere Säure-Gruppe besitzen, die dann mit Fettalkoholen oder Amiden modifiziert werden kann (vgl. Abbildung 32). Neben dem petrochemisch hergestellten Bernsteinsäure-Anhydrid sind vor allem das potenziell biobasierte Maleinsäure-Anhydrid und die methylierten Derivate Citraconsäure- und Itaconsäure-Anhydrid zu nennen. Itaconsäure wird klassischerweise durch Decarboxylierung aus Citronensäure gewonnen, wobei gute Ausbeuten, allerdings als Mischungen mit Citraconsäure-Anhydrid erhalten werden.^{238,239} Aktuellere Untersuchungen haben auch die potenzielle Nutzbarkeit von Itaconsäure als biobasierte Plattformchemikalie gezeigt, welche dann katalytisch zum Anhydrid dehydratisiert werden kann.^{240,241} Beide Derivate stehen im thermodynamischen Gleichgewicht, wobei die interne Doppelbindung des Citraconsäure-Anhydrids stark bevorzugt ist und so durch Temperaturerhöhung selektiv aus dem Itaconsäure-Anhydrid gewonnen werden kann.²⁴² Zunächst wurde die Verbindung der Aminosäuren mit

den zyklischen Anhydriden genauer untersucht, um in einem zweiten Schritt dann die Verknüpfung mit einem langkettigen Fettalkohol oder -amin durchführen zu können.

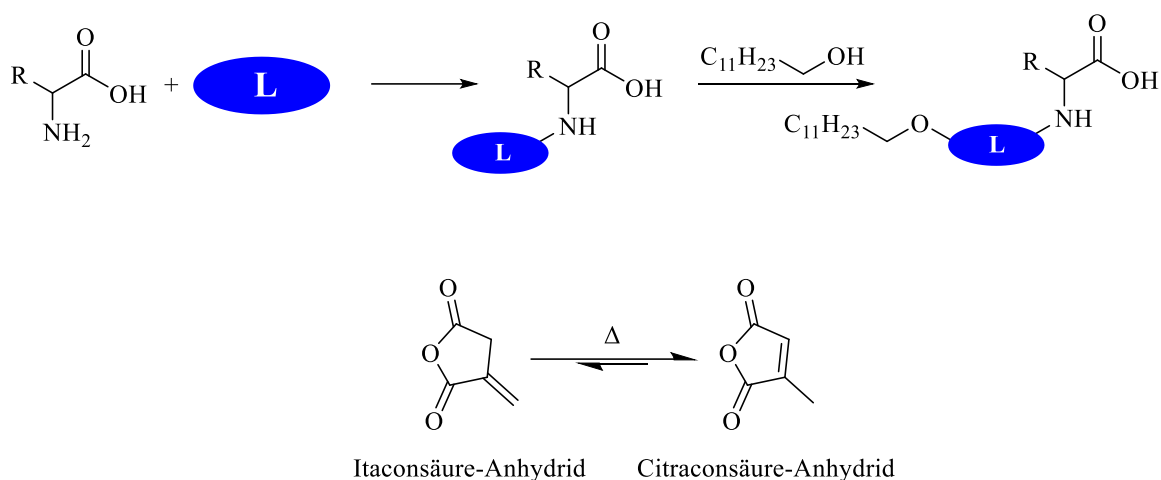


Abbildung 32: Schematische Synthese von Dodecanol-Aminosäure-Tensiden über einen organischen Linker (oben) und Strukturen der bio-basierten Citraconsäure- und Itaconsäure-Anhydrids.

Die Reaktionen wurden, angelehnt an die Bedingungen der Schotten-Baumann-Reaktion, zunächst in einem Wasser/Aceton-Gemisch durchgeführt, als weitere Lösungsmittel wurden Wasser, DCM, Aceton und Eisessig ausgewählt. Analog zur T3P-vermittelten Synthese ist auch hier die Nebenreaktion des Anhydrids mit einem nucleophilen Lösungsmittel eine starke Einschränkung in der Auswahl von potenziellen Lösungsmitteln. Nachteilig ist auch hier die geringe Löslichkeit der Aminosäuren in organischen Lösungsmitteln, so dass nur in Wasser sowie Wasser/Aceton gute Umsätze für alle eingesetzten Aminosäuren verzeichnet werden konnten, wobei allerdings auch die Hydrolyse-Nebenprodukte in Form der entsprechenden Di-Säuren beobachtet werden konnten. Auch der Einsatz der Natrium-Salze von Aminosäuren liefert keine höhere Löslichkeit. In Eisessig hingegen zeigten alle Aminosäuren mit Ausnahme von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Histidin, Tryptophan und Tyrosin eine hohe Löslichkeit bis 0,1 mmol l⁻¹. Dabei konnte in Eisessig allerdings nur für Cystein Produktbildung beobachtet werden, wobei ein annähernd quantitativer Umsatz und keine Nebenprodukt-Bildung beobachtet wurde (vgl. Abbildung 33).

Die erhaltenen Resultate decken sich mit Berichten zur Anwendung von cyclischen Anhydriden als Schutzgruppen für die Seitenketten der Aminosäuren in der Peptidchemie. Dabei wurden ebenfalls signifikante Teile an hydrolysiertem Nebenprodukt erhalten, die durch erhöhte Stöchiometrie und, sofern notwendig, nachgeschaltetes Waschen des Produkts ausgeglichen wurden.^{243–245}

Wegen der vergleichsweise hohen Isomerisierungstendenz von Itaconsäure und Itaconsäure-Anhydrid wurden die Folgesynthesen zur Kopplung mit Fettalkoholen und -aminen vor allem mit Citraconyl-Aminosäuren durchgeführt. Bernsteinsäure-Anhydrid wurde wegen der rein-petrochemischen Herkunft ausgeschlossen. Für die hergestellten *N*-Citraconyl-Aminosäuren bieten sich für die weitere Kopplung mit hydrophoben Resten sowohl eine Reaktion an der freien Säure-Gruppe des Anhydrids als auch an der Doppelbindung an.

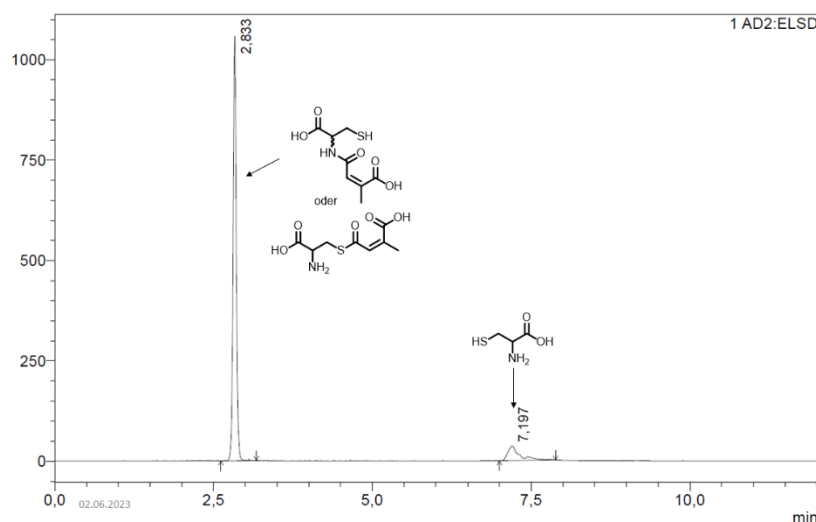


Abbildung 33: Chromatogramm mit Zuordnung der Synthese von Citraconyl-Cystein.

Vielversprechend ist dabei die Veresterung bzw. Amidierung der Carbonsäure-Gruppe mit Fettalkoholen oder -aminen oder die Umsetzung der Doppelbindung in Metathese oder Diels-Alder-Reaktionen. Die Untersuchungen wurden zunächst mit den kommerziell verfügbaren Lipasen CALB und RMIM durchgeführt (vgl. 4.3.7).

Aufgrund der stark unterschiedlichen Polaritäten und, damit einhergehend, Löslichkeiten der Citraconyl-Aminosäuren und Fettalkohole bzw. -amine konnte die Substrate der Folgereaktion nur in kurzkettigen Alkoholen oder dem Wasser/Aceton-Gemisch erfolgreich gelöst werden. In beiden Varianten konnte unter Einsatz von immobilisierter Lipase keine Produktbildung mit Alkoholen und Aminen im Bereich von C₄–C₁₂ erzielt werden. Wobei vermutet wurde, dass die verzweigte Umgebung der Säure-Funktion und der sterische Anspruch der Aminosäure-Linker Kombination die Akzeptanz des Linkers stark vermindert hat. Ebenso arbeiten die Lipasen vorwiegend mit längerkettigen Carbonsäuren, wohingegen hier ein stark polares Umfeld um die Säure-Funktion gebildet wurde. Obwohl auch die von MORÁN ET. AL. eingesetzten Glycero-Aminosäuren stark polar sind, wurden diese wiederum mit unpolaren,

langkettigen Fettsäuren acyliert, so dass gegebenenfalls der hydrophobe Part an der Säure-Funktion eine wichtige Rolle für die Substrat-Akzeptanz der Lipasen spielt.^{212,213,237}

Die Metathese mit Linalool und 1-Octen wurde sowohl mit Citraconyl-Lysin als auch, wegen der höheren Aktivität der terminalen Doppelbindung, mit Itaconyl-Lysin durchgeführt (vgl. Abbildung 34). Dabei konnten gängige Metathese-Katalysatoren, wie der Grubbs I und II-Katalysator, wegen der Empfindlichkeit gegenüber Wasser und Luftsauerstoff nicht eingesetzt werden, so dass auf spezialisierte Katalysatoren, wie etwa den kommerziell verfügbaren AquaMet-Katalysator (vgl. 4.4.14), zurückgegriffen werden musste.^{246,247} Der Katalysator wurde bereits mit hoher Aktivität in der Metathese von Olefinen beschrieben und erfolgreich in wässrigen Systemen angewandt.

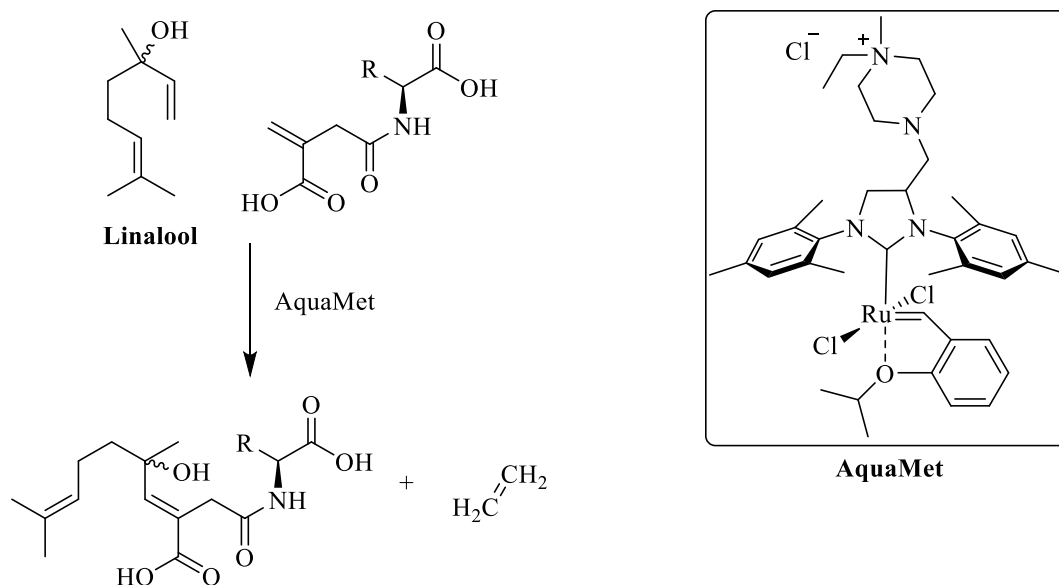


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Metathese-Reaktion einer *N*-Itaconyl-Aminosäure mit Linalool und Strukturformel des Aqua-Met-Katalysators.

Dennoch war die Umsetzung weder für die interne Doppelbindung der Citraconyl-Verbindung noch für die terminale Itaconyl-Doppelbindung erfolgreich und auch bei Verlängerung der Reaktionszeit auf 24 h konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Auch das lineare, petrochemische Modellsubstrat 1-Octen konnte nicht über die Linker an Aminosäuren angehängt werden. Dieses Verhalten kann durch die Präsenz von vielen, polaren Säure-Funktionen im Substrat erklärt werden, die ihrerseits an das metallische Zentrum koordinieren können und so die Aktivität des Katalysators stören könnten. Die zugrundeliegende Literatur demonstriert zwar die Toleranz des Katalysators gegenüber Alkoholen und Ammonium-Salzen, nicht jedoch gegenüber Säure-Gruppen.²⁴⁷ Durch die Struktur des Substrats entsteht zusätzlich

ein Molekül mit zwei Säure-Funktionen, die das Metallzentrum chelatisierend koordinieren. Die verbrückende Amid-Funktion, führt zur Bildung von besonders stabilen Komplexen analog zu den „Pincer-Type“ Liganden.²⁴⁸⁻²⁵⁰

2.6.2 Diels-Alder vermittelte Synthese von Drei-Komponenten-Tensiden

2.6.2.1 Diels-Alder-Synthese des hydrophoben Rests

Ausgehend von den cyclischen, ungesättigten Anhydrid-Linkern bietet die Diels-Alder-Reaktion eine gute Möglichkeit zur Verlängerung des hydrophoben Rests. Insbesondere der Verzicht auf zusätzliche Kupplungsreagenzien, Katalysatoren und Additive führt zu einer hohen Atomökonomie der Reaktion. Initiale Versuche zur Diels-Alder-Kopplung der, über das Anhydrid eingebrachten, Doppelbindung mit hydrophoben Dienen wie Myrcen scheiterten allerdings ebenso wie die Metathese und Veresterung mit Fettalkoholen an der konträren Löslichkeit der Citraconyl-Aminosäuren und der Diene. Daher wurde die entgegengesetzte Herangehensweise genauer beleuchtet und zunächst durch Verknüpfung von Dien und cyclischem Anhydrid-Dienophil eine Fettsäure-artige, reaktive Struktur erzeugt, die dann mit Aminosäuren weiter modifiziert werden kann (vgl. Abbildung 35).

Dabei wurde der Fokus auf das potenziell bio-basierte Maleinsäure-Anhydrid und das vollständig bio-basierte Citraconsäure-Anhydrid gelegt und diese mit dem Monoterpen Myrcen verbunden. Die verwendete Methode (vgl. 4.4.15) orientierte sich dabei an den Arbeiten von HORNING ET. AL. und konnte daher so wie beschrieben für die Kombination aus Myrcen und Maleinsäure-Anhydrid verwendet werden.¹⁸⁴ In Übereinstimmung mit der Literatur, konnte die Reaktion innerhalb weniger Minuten annähernd quantitative Umsätze erzielen. Das Übertragen der Reaktion auf das Citraconsäure-Anhydrid lieferte ebenso das gewünschte Produkt. Bedingt durch den asymmetrischen Aufbau wurde angenommen, dass beide möglichen Produkte erhalten wurden, die Konstitutionsisomere allerdings bedingt durch ihre hohe Ähnlichkeit in Hinblick auf Struktur und Polarität weder über GC- noch über LC-Analytik getrennt werden konnten.

Die Reaktion des methylierten und sterisch gehinderten CA liefert Ausbeuten von bis zu 90 %, wobei die Reaktion deutlich langsamer voranschreitet: Sind für Myrcen und MSA bereits nach 5 min. Umsatzgrade von circa 98 % erreicht, liegt der Umsatz des Citraconsäure-Anhydrids dort erst bei circa 45 %; der maximale Umsatz wird hingegen erst nach 30 Min. erreicht. Bemerkenswert ist an dieser Stelle, dass das MSA zunächst in einem Lösungsmittel wie THF aufgenommen werden muss, CA hingegen Lösungsmittelfrei verwendet werden kann und so

zusätzlich zur grüneren Reaktionsführung, höheren Atomökonomie und Abfallvermeidung beiträgt.

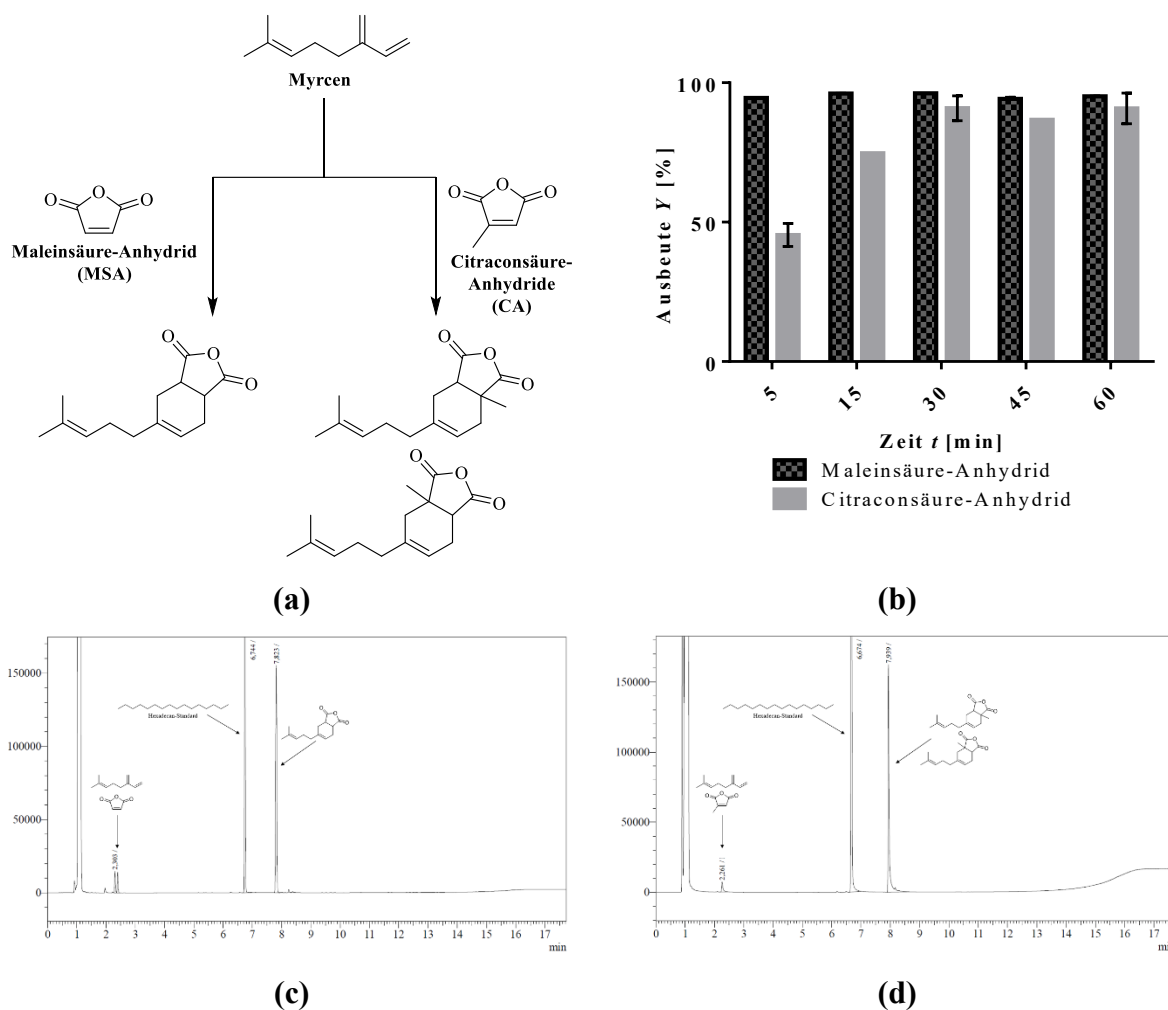


Abbildung 35: Reaktionspfad der Diels-Alder-Reaktion von Myrcen und MSA bzw. CA (a), Vergleich der Ausbeuten der Reaktion (b) und GC-Chromatogramme für MSA (c) und CA (d) nach 30 min. Reaktionszeit.

2.6.2.2 Kupplungsreaktion mit Aminosäuren

Die Reaktionsmischungen wurden im Anschluss zu Lösungen von Aminosäuren und NaOH in Wasser oder Wasser/Aceton-Mischungen zugetropft (4.4.16) und bilden so unter nucleophiler Ringöffnung die tensidischen Zielmoleküle aus (vgl. Abbildung 36).

Die Kondensationsreaktion mit dem modifizierten Anhydrid verläuft innerhalb der Reaktionszeit von 4 h vollständig, wobei neben der erwünschten Reaktion zum Zielmolekül durch das notwendige wässrige Reaktionsmedium die Ringöffnung auch durch Wasser auftritt, so dass dann als Nebenprodukt das Hydrolysat erzeugt wird. Die erfolgreiche Ringöffnung und Kopplung der Aminosäure konnten mittels NMR-Spektroskopie belegt werden. Zur besseren

Veranschaulicht sind in Abbildung 37 die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Hydrolyseprodukts und des Kopplungsprodukts mit Phenylalanin dargestellt.

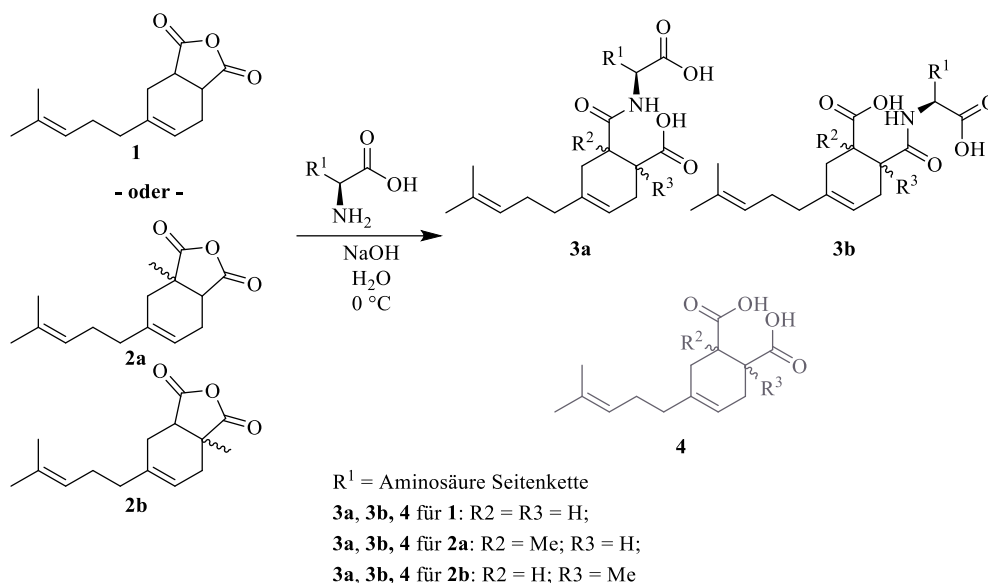


Abbildung 36: Darstellung der Reaktion und der möglichen Produktisomere der Kondensation aus Myrcen-MSA und Aminosäuren.

Bei der Anhydrid-Öffnung durch Wasser entstehen zwei chemisch annähernd identische Säuregruppen, so dass die Protonen an den benachbarten tertiären Kohlenstoffatomen als einzelnes Multiplett auftreten. In Folge der Ringöffnung durch die Aminosäure hingegen kommt es zur Veränderung des chemischen Umfelds, da eine der Carboxyl-Gruppen dann als Amid-Funktion vorliegt. Das Amid reduziert die Elektronendichte in der Gruppe, so dass es zu einer Tieffeld-Verschiebung kommt und das Multiplett in zwei Signale differenziert wird.

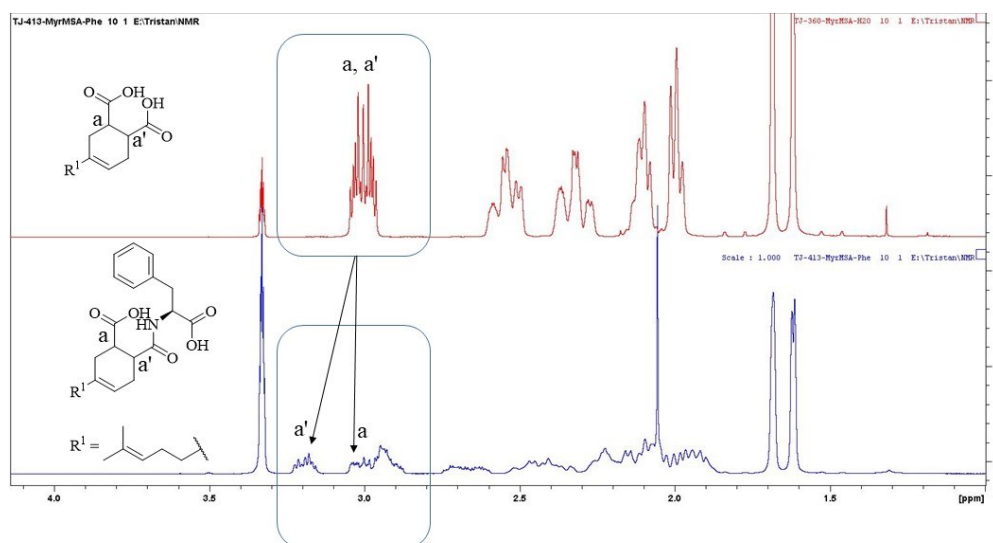


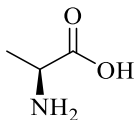
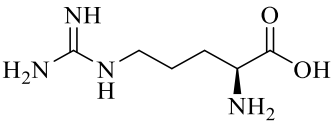
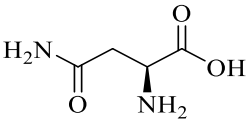
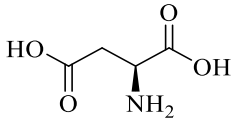
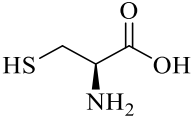
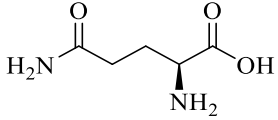
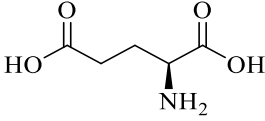
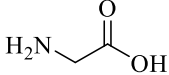
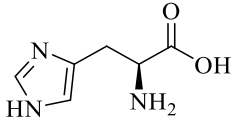
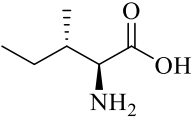
Abbildung 37: Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Produkts der Ringöffnung mit Wasser (oben) und mit Phenylalanin (unten) des Myrcen-MSA-Anhydrids.

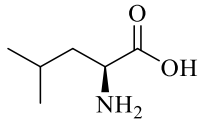
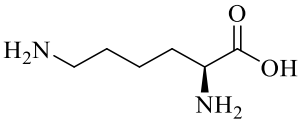
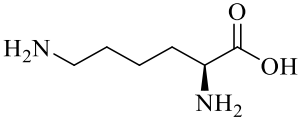
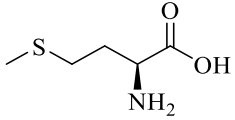
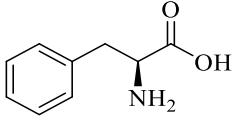
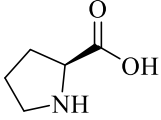
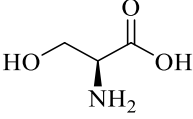
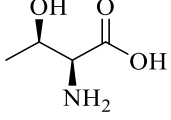
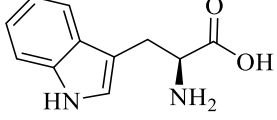
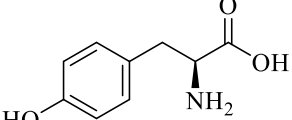
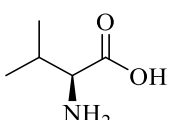
In nachfolgenden Experimenten konnten mit Ausnahme der zyklischen, sekundären Aminfunktion von Prolin alle Aminosäuren erfolgreich mit dem modifizierten Anhydrid-Intermediat umgesetzt werden. Die höchsten isolierten Reinheiten im Bereich von 80 – 90 % wurden für tendenziell eher polare Aminosäuren (**Gly, His, Lys, Met, Phe, Ser** und **Trp**) erhalten. Die sauren Aminosäuren (**4, 7**) Glutamin- und Asparaginsäure lieferten 61 % bzw. 71 % Reinheit im Produkt, wohingegen die entsprechenden Amide (**3, 6**) geringere Selektivität zeigten. In Hinblick auf die Literatur sind höhere Mengen an Nebenprodukten zu erwarten, da diese in der Regel mit nicht-nucleophilen Lösungsmitteln arbeitet und so die Nebenreaktion vermeiden kann.¹⁸⁶ Alternativ kamen bereits funktionalisierte Ester zum Einsatz, so dass die Reaktion auf SiO₂-Träger durchgeführt und mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden konnte.¹⁷⁷ Durch die schlechte Löslichkeit der Produkte in rein-organischen Systemen und die starke Affinität von Silica zu Wasser ist dieser Ansatz für die Aminosäure-Tenside allerdings nicht umsetzbar gewesen.

Die Reaktion konnte erfolgreich auf die Kopplung mit dem Myrcen-CA-Anhydrid (**23 - 27**) übertragen werden und wurde beispielhaft für eine Auswahl von Aminosäuren mit unterschiedlicher Seitenkette wiederholt: Die basischen Aminosäuren (**Arg, Lys**) unterscheiden sich deutlich, da Arginin in hoher Ausbeute isoliert werden konnte, die Reinheit der Mischung allerdings nur bei ca. 50 % lag. Die Mono- und Di-Acylierung von Lysin lieferte niedrigere isolierte Ausbeuten mit guten bis sehr guten Reinheiten von 95 bzw. 75 %. Dabei enthält der Ansatz zur Di-Acylierung vor allem das Mono-Acyl-Lysin als Nebenprodukt, wohingegen kein Hydrolysat beobachtet werden kann. Die saure Aminosäure Glutaminsäure liefert nur geringe isolierte Ausbeuten, dafür konnte eine hohe Reinheit von 82 % erhalten werden. Das unpolar-aromatische Phenylalanin wurde mit einer guten Reinheit von 68 % erhalten. Im Vergleich zur klassischen Methode der Synthese nach Schotten-Baumann-Route werden somit ähnliche Ausbeuten erhalten. Wie zuvor aufgezeigt liefert die Acylierung mit Fettsäurechloriden in Abhängigkeit von der Auswahl von Kettenlänge des Acyl-Chlorids und der Aminosäure Ausbeuten im Bereich von 24 – 95 %.^{69,100} Die Reinheiten der Schotten-Baumann-Produkte liegt im Durchschnitt insgesamt höher, was sich auf den zusätzlichen Fällungs- und Waschschrift zurückführen lässt, der die unpolaren Nebenprodukte und Teile der verbleibenden Aminosäure bzw. das entstandene NaCl entfernt. In Hinblick auf die Atomökonomie und das Ziel eine grünere Syntheseroute zu entwickeln, bilden diese Schritte allerdings einen Nachteil durch erhöhten Chemikalienaufwand und Abfallproduktion.^{37,251} Die isolierten Ausbeuten und Reinheiten der Myrcen-MSA- und Myrcen-CA-Aminosäuren sind in Tabelle 6 aufgeführt.

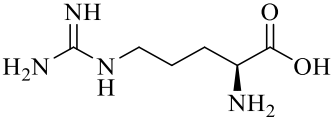
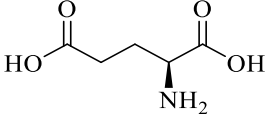
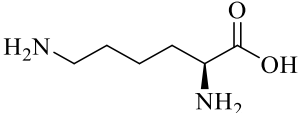
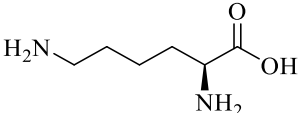
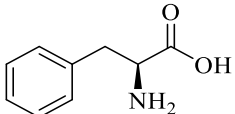
Bedingt durch die Struktur können theoretisch für MSA zwei und für CA insgesamt vier Produktisomere erhalten werden, die sich allerdings nur gering voneinander unterscheiden und daher nicht chromatographisch getrennt werden konnten, so dass nur jeweils ein Signal erhalten wurde.

Tabelle 6: Isolierte Ausbeuten und Reinheiten der Kondensationsreaktion von Myrcen-MSA und Myrcen-CA- mit den 20 proteinogenen Aminosäuren und Wasser.

Nr.	Nucleophil	Ausbeute Y_{isol} [%]	Reinheit [%]
Ausgehend vom Myrcen-MSA-Anhydrid:			
1		69	53
2		68	93
3		46	63
4		88	50
5		99	57
6		85	20
7		99	81
8		91	61
9		91	89
10		32	67

11		37	71
12		89	31/42 ^a
13		93 ^b	93
14		94	88
15		86	84
16		n.d.	n.d.
17		71	93
18		94	92
19		46	90
20		95	68
21		95	59
22	H ₂ O	83	99

Ausgehend vom Myrcen-CA-Anhydrid:

23		95	50
24		25	82
25		51	91
26		99 ^b	75
27		78	68
28	H ₂ O	99	99

a) Lysin wurde bei äquimolarer Umsetzung als Gemisch aus Mono- und Di-acyliertem Produkt erhalten;

b) Lysin wurde mit zweifachem Überschuss an Anhydrid umgesetzt, um das Di-acylierte Molekül zu erhalten; n.d. = nicht detektiert

Lysin hingegen kann durch die zweite Amin-Gruppe in der Seitenkette mit MSA bis zu vier bzw. acht Isomere mit CA bilden, die allerdings ebenso nur geringe Varianzen aufweisen, so dass die Mono-acylierten Produkte insgesamt in einem Peak resultieren. Des Weiteren wurde bei der Umsetzung von Lysin auch die Bildung des Di-acylierte Produkts (vgl. Abbildung 38) beobachtet, welches dann Ähnlichkeit zu Gemini-Typ Tensiden besitzt. Die zusätzliche hydrophobe Gruppe ermöglicht für Lysin die Synthese von Tensiden mit höherem hydrophobem Anteil, ohne dabei auf die Verlängerung der Terpen-Einheit angewiesen zu sein. Dementgegen zeigten die anderen Hydroxy-Gruppen von Serin, Threonin und Tyrosin sowie die Thiol-Gruppe von Cystein keine zweifache Acylierung. Weiterführende Untersuchungen zum Ablauf der Kopplung von Lysin wurden mit *tert*-Butoxycarbonyl (*boc*)-Schutzgruppen durchgeführt. Ausgehend von N_{α} - und N_{ϵ} -*boc*-Lysin wurde die Acylierung mit dem Myrcen-MSA-Anhydrid erneut durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Acylierung der freien N_{ϵ} -Gruppe erfolgreich durchgeführt werden konnte, wobei nur N_{α} -Myrcen-MSA-Lysin erhalten wurde. Die wiederholte Durchführung der gleichen Reaktion mit N_{ϵ} -*boc*-Lysin hingegen lieferte kein Produkt. Dadurch kann angenommen werden, dass die Bildung des di-

acylierten Lysins zunächst über Acylierung der N_ϵ -Gruppe und anschließende Acylierung der N_α -Amin-Gruppe abläuft.

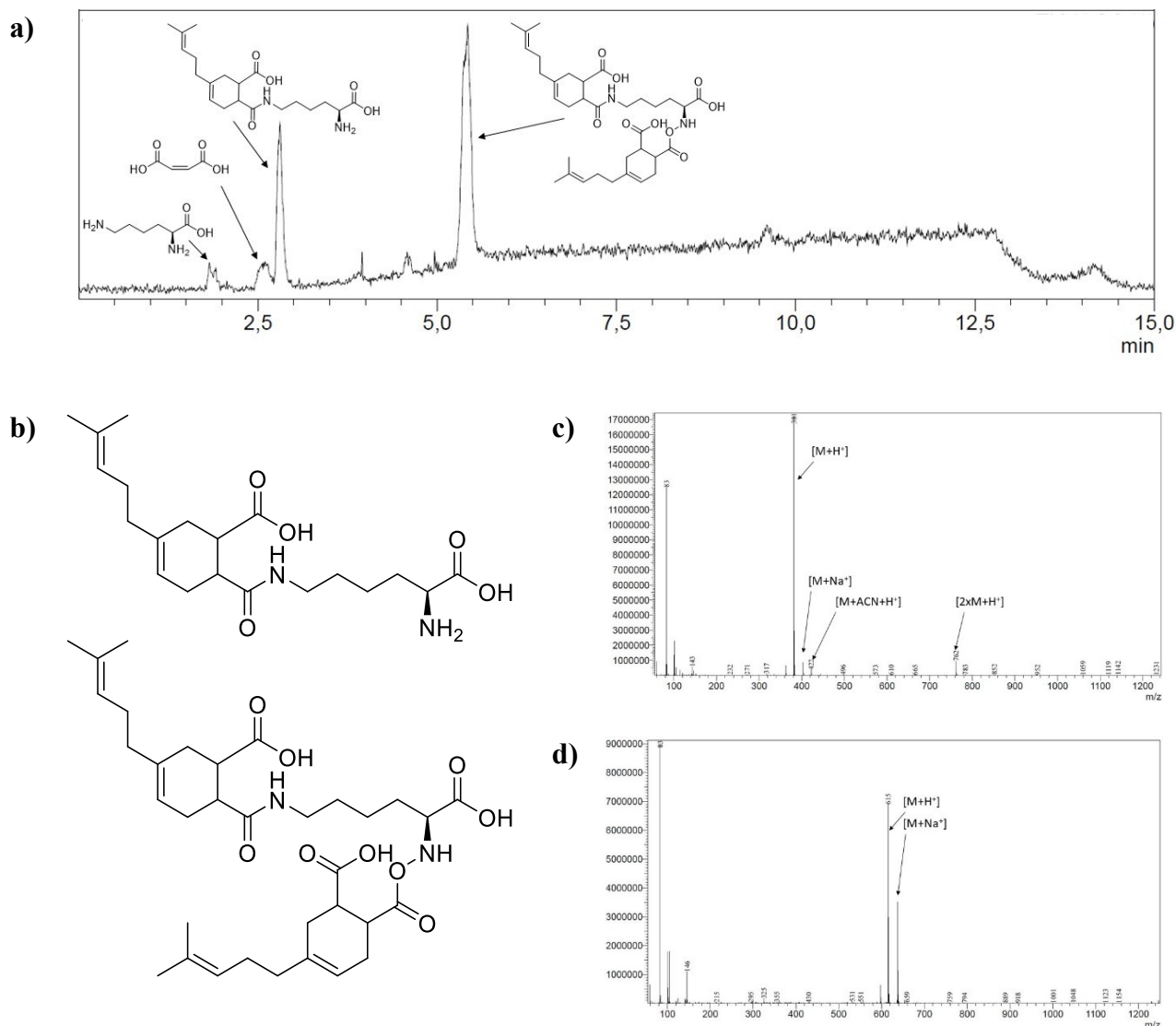


Abbildung 38: HPLC-Chromatogramm des Produktgemisch der Lysin-Acylierung (a); Schematische Darstellung des Mono- und Di-acylierten Lysin (b) und Massen-Spektren des Mono-acylierten (c) und di-acylierten Lysin (d).

2.6.2.3 Physikochemische Charakterisierung der Verbindungen

Für die Untersuchung und Bewertung der nachhaltig synthetisierten Tenside als Alternative zu etablierten Verbindungen sind vor allem ihre physikochemischen Eigenschaften von großer Bedeutung. Daher wurde im Anschluss an die chemische Charakterisierung das Schaumverhalten und die Oberflächenaktivität untersucht. Zur Vereinheitlichung der Ergebnisse wurde eine 4 mmol l^{-1} Mischung bezogen auf die Tensid-Komponente erzeugt und bei haut-freundlichem pH von 5,5 vermessen (vgl. 4.2.5 & 4.2.6). In Abbildung 39 sind die

Schaumhöhen zu Beginn der Messung und nach 5 min sowie die minimal-erreichten Oberflächenspannungen aufgeführt, die genauen Messwerte sind in Anhang in Tabelle 12 aufgeführt.

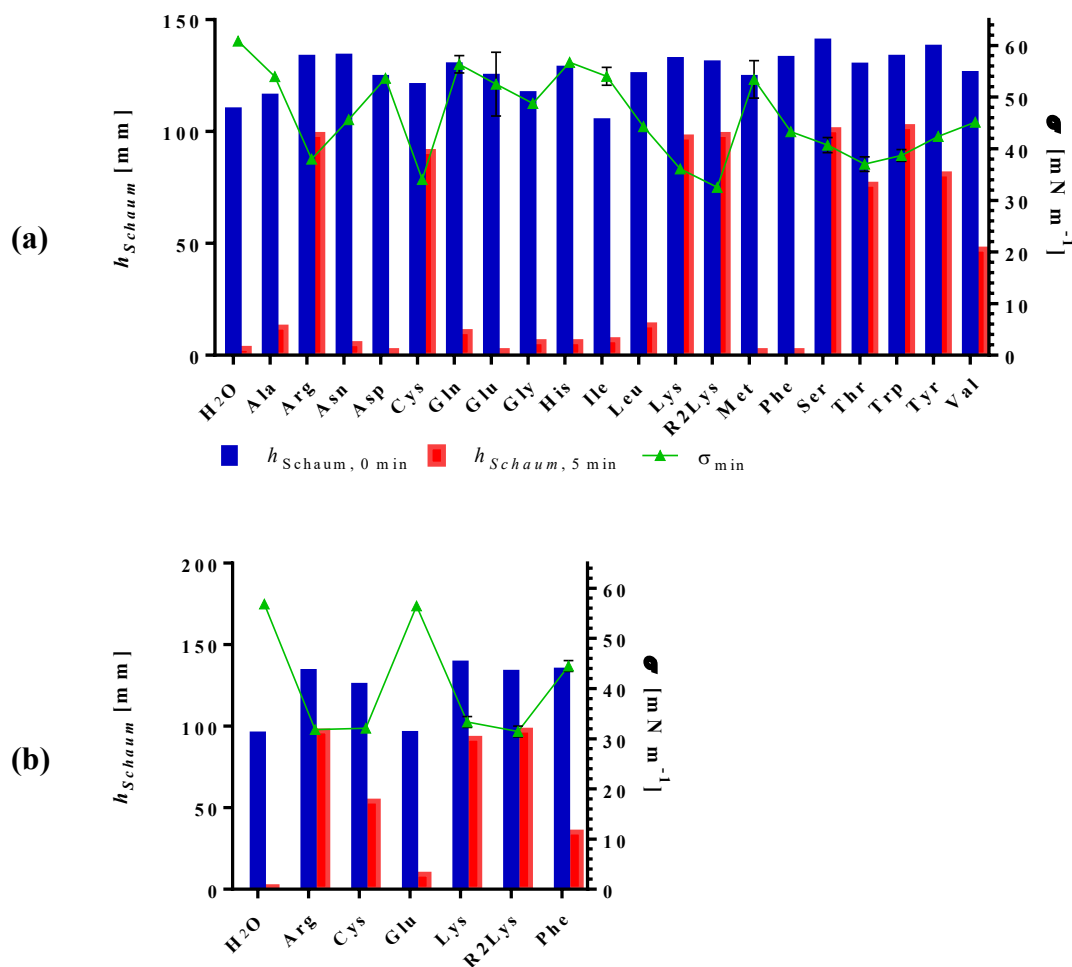


Abbildung 39: Minimale Oberflächenspannungen σ_{min} und Schaumhöhen der Diels-Alder-Tenside basierend auf Myrcen, MSA (a) bzw. CA (b) und Aminosäuren mit Darstellung der Anhydrid-Zwischenstufen.

Die Verbindung des Terpen-Anhydrid-Rückgrats mit Aminosäuren beeinflusst die Struktur und Ladung der Kopfgruppe maßgeblich, was in einer Zunahme der Oberflächenaktivität und sowohl der Aufschäumbarkeit als auch der Schaumstabilität resultiert. Die Lösung des Hydrolyse-Produkts liefert eine leichte Abnahme der Oberflächenspannung auf 61 mN m^{-1} , Schaum wird unter den gewählten Testbedingungen zwar gebildet, besitzt allerdings keine Stabilität, so dass mit Beenden des Luftstroms der erhaltene Schaum innerhalb von 20 Sekunden wieder vollständig kollabiert. Durch Addition einer Aminosäure wird die Aufschäumbarkeit um circa 30 % erhöht, wodurch initiale Schaumhöhen von 110 - 140 mm erreicht werden. Die Schaumstabilität hingegen nimmt deutlich zu, wodurch vor allem für

polare Aminosäuren nach 5 min Messzeit noch signifikante Schaumhöhen detektiert wurden. Dabei erzielten Arginin, Serin, Tryptophan und sowohl mono- als auch di-acyliertes Lysin Schaumhöhen von circa 120 mm, während Threonin und Tyrosin bei etwa 80 mm Schaumhöhe liegen. Valin liefert als einzige unpolare Aminosäure einen vergleichsweise stabilen Schaum mit einer Resthöhe von 40 mm nach 5 min Zerfallszeit.

Ebenso zeigen sich je nach eingesetzter Aminosäure auch drastische Unterschiede in der erreichten Oberflächenspannung. Die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure zeigen nur geringe Oberflächenaktivität und erreichen Werte von $\sigma_{\min} > 50 \text{ mN m}^{-1}$, wobei die Vermutung auftritt, dass die hohe Polarität durch zwei Säure-Gruppen in der Aminosäure zusätzlich zur freien Säure-Gruppe des Anhydrid-Rückgrats eine zu hohe Polarität für den kompakten hydrophoben Rest aufweist. Für einen Teil der unpolar, hydrophoben Aminosäuren (**Ala, Ile, Met**) werden ähnlich niedrige Aktivitäten erhalten, wobei die verbleibenden unpolaren Aminosäuren (**Leu, Phe, Trp, Val**) bessere Resultate von ca. 40 mN m^{-1} erreichen und vor allem Tryptophan mit $38,7 \text{ mN m}^{-1}$ in den Bereich der aktiven Tenside einzuordnen ist, was sich unter Umständen auf ein Wechselspiel des großen hydrophoben Rests und die darin enthaltene, polare Amin-Gruppe der Seitenkette zurückführen lässt. Auch die polaren Aminosäure-Kopfgruppen liefern Resultate mit hoher Streuung, während Glutamin eine geringe Aktivität aufweist, zeigen viele der Aminosäuren (**Asn, Gly, Ser, Tyr**) eine mittlere Senkung ($\sigma_{\min} \approx 45 \text{ mN m}^{-1}$) der Oberflächenspannung und die Aminosäuren Cystein und Threonin liefern gute Resultate mit $34,0$ bzw. $38,7 \text{ mN m}^{-1}$. Ebenso zeigt sich die Varianz auch bei den basischen Aminosäuren, wo Histidin nur wenig Aktivität zeigt ($56,7 \text{ mN m}^{-1}$), während Arginin zu einer signifikanten Absenkung der Oberflächenspannung führt ($38,0 \text{ mN m}^{-1}$) und mono- und di-acyliertes Lysin nochmals bessere Resultate mit $36,1$ bzw. $32,5 \text{ mN m}^{-1}$ erreichen.

Die Vermessung der Citraconsäure-Anhydrid-basierten Tenside wurde analog dazu durchgeführt. Dabei erzeugte das Hydrolysat niedrigeren Schaum als das MSA-Pendant mit ebenso geringer Schaum-Stabilität. Die erreichte minimale Oberflächenspannung lag mit $56,9 \text{ mN m}^{-1}$ marginal niedriger. Glutaminsäure zeigt auch hier geringe Schaumentwicklung als mit MSA-Linker, liefert aber eine vergleichbare, geringe Absenkung der Oberflächenspannung. Die polare Aminosäure Cystein und die basische Aminosäure Arginin zeigten leicht verbesserte Oberflächenspannungen mit $32,1$ bzw. $31,8 \text{ mN m}^{-1}$. Ebenso wurde die Schaum-Stabilität von Cystein durch den Wechsel auf das Citraconsäure-Anhydrid als Linker deutlich verbessert, während der verbleibende Schaum für Arginin auf die Hälfte reduziert wurde. Mono- und di-acyliertes Lysin zeigen unter Einsatz des CA-Linkers geringere

Schaumhöhen als die MSA-Lysin-Tenside. Die erhaltenen minimalen Oberflächenspannungen konnten nochmals leicht verbessert werden, so dass das mono-acylierte Lysin Resultate von $33,4 \text{ mN m}^{-1}$ liefert und das di-acylierte Lysin mit $31,5 \text{ mN m}^{-1}$ die niedrigste gemessene Oberflächenspannung in diesem Datensatz liefert. Phenylalanin liefert vergleichbare Daten wie das MSA-Pendant mit einer erreichten Oberflächenspannung von $44,5 \text{ mN m}^{-1}$ und nur bedingt stabilem Schaum.

Ausgewählte Aminosäuren mit guten Ergebnissen in Hinblick auf ihre Schaumstabilität wurden erneut eingesetzt, um das Schaumverhalten über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Dabei wurde erneut eine Konzentration von 4 mmol l^{-1} , bezogen auf die Tensid-Komponente eingesetzt. Der Verlauf der Schaumhöhen über einen Zeitraum von 30 min ist in Abbildung 40 dargestellt. Die Schaumhöhen für die Hydrolysate sind zum Vergleich der Stabilität und des Einflusses der Aminosäure-Kopfgruppe abgebildet.

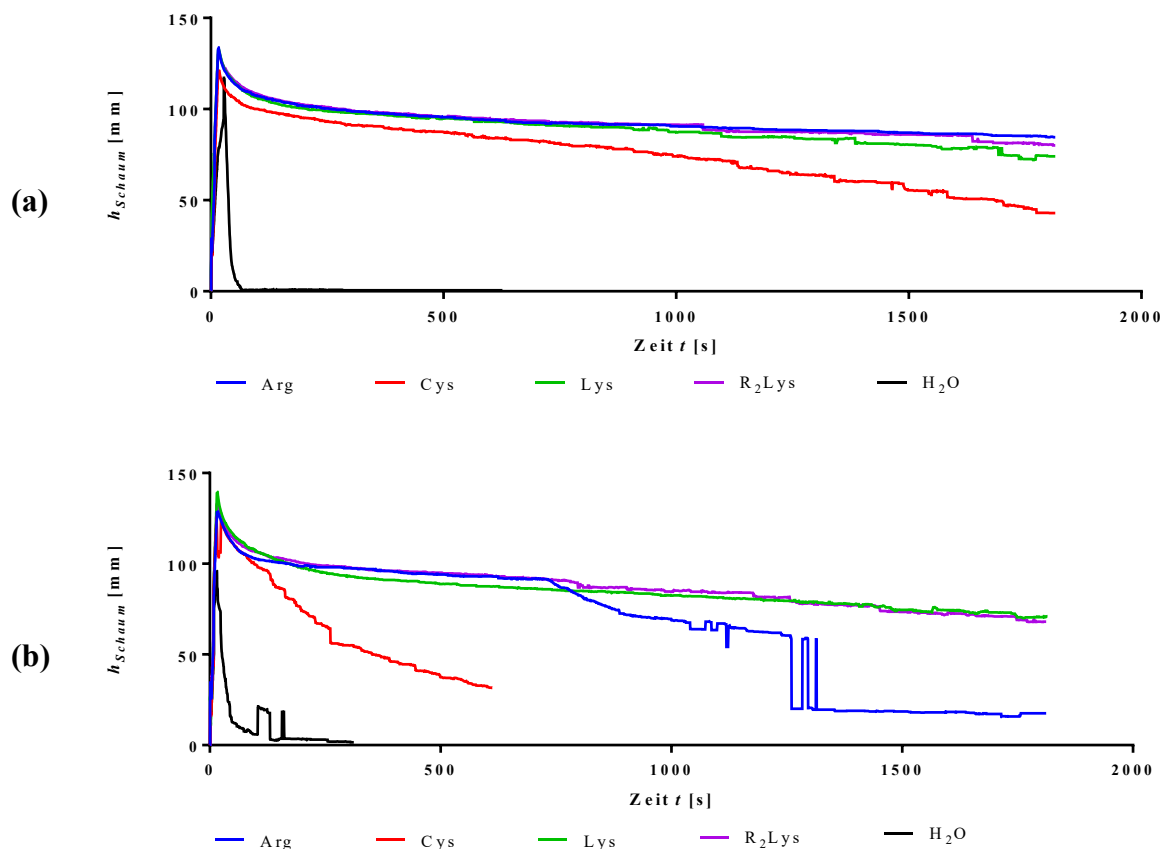


Abbildung 40: Entwicklung der Schaumhöhen über einen Zeitraum von 30 min für 4 mM Lösungen der Diels-Alder-Tenside mit MSA (a) und CA (b) als Linker.

Am Kurvenverlauf zeigt sich deutlich die Verbesserung der Schaumhöhe und -stabilität durch Addition von polaren Aminosäuren. Die Steigerung lässt sich durch die veränderte Ladungsverteilung im Molekül erklären, die die Balance zwischen hydrophilem und

hydrophobem Teil verbessert. Vor allem unter der Annahme, dass das Lysin vor allem an der ϵ -Amin-Funktion acyliert wird erzeugt sehr lineare Moleküle analog zu Acylaminosäuren. Die Myrcen-Maleinsäureanhydrid-basierten Tenside mit Arginin- und Lysin-Kopf zeigen annähernd identische Stabilität, wodurch nach 30 min Messzeit noch jeweils ca. 90 mm Schaumhöhe verbleiben. Cystein zeigt eine geringere Stabilität, wobei die Abnahme innerhalb der ersten 15 min nach Aufschäumen langsamer verläuft als in der zweiten Hälfte der Untersuchung. Der Effekt kann dadurch erklärt werden, dass das Schaummessgerät mittels Absorption die Schaumhöhe bestimmt, wodurch an der Außenwand des Glaszylinders haftender Schaum eine größere Schaumhöhe suggeriert, während der Schaum in der Mitte der Schaumsäule bereits begonnen hat, langsam zu kollabieren. Dennoch ist auch der für Cystein erreichte Wert von ca. 50 mm nach 30 min noch als gutes Ergebnis zu werten. Bei Untersuchung der Citraconsäure-Anhydrid-basierten Tenside zeigt sich eine vergleichbare Tendenz. Hierbei schneiden beide Lysin-Derivate allerdings deutlich besser ab, und bilden auch nach 30 min Messzeit noch eine stabile Schaumsäule von ca. 90 mm Höhe. Der Schaum des Arginin-Tensids hingegen ist bis zur Messung nach 12 min stabil und kollabiert danach zunehmend. Die Fragmente nach 20 min lassen sich durch nach-rutschenden Schaum erklären, der die Messung kurzfristig beeinflusst und dann ebenfalls in sich zusammenfällt.

Generell liefern vor allem die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin ebenso wie die polare Aminosäure Cystein sowohl in Hinblick auf die erreichte Oberflächenspannung im Bereich von $30 - 35 \text{ mN m}^{-1}$ als auch auf die Schaumhöhen und –Stabilitäten gute Resultate. Dennoch ist im Vergleich zu den bereits untersuchten und kommerziell verfügbaren, mit Fettsäuren acylierten, Aminosäure-Tensiden festzustellen, dass die Oberflächenspannung mit vergleichbarem C_{12} -Kohlenstoffgerüst in der Regel geringer ausfallen. So wurde unter anderem für *N*-Lauroyl-Serin und Glycin minimale Oberflächenspannungen von $29,9$ bzw. $41,2 \text{ mN m}^{-1}$ erhalten, diese zeigten allerdings auch eine starke Abnahme des Schaumvolumens innerhalb von 5 Minuten.⁶⁹ Die ursprünglichen Untersuchungen zur Synthese und Charakterisierung von Lauroyl-Glutamat resultieren sogar in Oberflächenspannungen von ca. 25 mN m^{-1} für eine 10 mM Lösung, mit sehr stabilem Schaum über einen Zeitraum von 30 min.²⁵² Das von TABOHASHI ET. AL. untersuchte $\text{C}_{12}\text{HEA-Glu}$ (*N*-[3-Lauroyloxy-2-hydroxypropyl]-L-Arginin L-Glutamat) als Glycerin-verlinktes Tensid liefert vergleichbare Oberflächenspannungen bei ca. 30 mN m^{-1} .²⁵³ Nachhaltige Tenside basierend auf Vanilin-Strukturen und Sarconisat als Kopfgruppe zeigen bei vergleichbaren Konzentrationen von $3,6 - 4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ähnliche Oberflächenspannungen im Bereich von $32 - 37 \text{ mN m}^{-1}$. Der initial von den Vanilin-Derivaten

gebildete Schaum zeigt eine ähnliche Höhe, wobei die Abnahme innerhalb von 5 min deutlich schneller verläuft, so dass dort nur etwa 50 - 60 mm Resthöhe verbleiben.^{32,66}

Während die erhaltenen Resultate und physikochemischen Eigenschaften der Myrcen-basierten Verbindungen mit basischen Aminosäuren interessante Ansatzpunkte für eine technische Anwendung zeigten, lieferten die Derivate mit anionischen Aminosäuren wie Glutaminsäure eine deutlich niedrigere Leistung als die vergleichbaren Lauroyl-Aminosäuren. Als mögliche Erklärung hierfür wird die abweichende Struktur der eingesetzten Linker-Tenside vermutet. Bei gleicher Kohlstoffzahl (C_{12}) wie die kommerziellen Laurinsäure-Tenside wird der erhaltene hydrophobe Rest durch die, während der Diels-Alder-Cycloaddition erzeugte, Ringstruktur deutlich kompakter. Ebenso bedingt der Einsatz von zyklischen Anhydriden den Nachteil, dass durch die Ringöffnung eine zusätzliche polare Säure-Gruppe am Anfang des hydrophoben Rests erzeugt wird, die so das Verhältnis aus hydrophilem zu hydrophobem Teil beeinflusst. Zusätzlich dazu ist das Packungsverhalten und die mögliche Flexibilität bei der Anordnung an der Oberfläche ein essenzieller Parameter bei der Beeinflussung der Oberflächenspannung und dem Schaumverhalten. Diese Anordnung kann bereits durch kleine Veränderungen der Struktur, wie durch den Sechsring oder die zusätzliche Methyl-Gruppe, beeinflusst werden.

2.6.2.4 Antimikrobielle Tests

Tenside mit Aminosäuren- oder kurzkettigen Peptid-Funktionen als Kopfgruppe besitzen häufig antimikrobielle Eigenschaften und können daher neben der primären Anwendung als wachaktive Substanz oder Emulgatoren auch zusätzlich Wirkung in der industriellen Anwendung finden. Besonders kationische und sterisch anspruchsvolle hydrophobe bzw. aromatische Aminosäuren zeigen das Potenzial, sich in mikrobielle Membranen einzulagern und mittels Zellwand-Ruptur zum Zelltod der Mikroben beizutragen.

Im Rahmen der Charakterisierung der neuentwickelten und hergestellten Tenside wurde daher die Wirkung sowohl gegen grampositive (*B. subtilis*, *C. glutamicum*) als auch gegen ein gramnegatives (*E. coli*) Bakterium sowie die Hefe *Candida vishwanathii* untersucht. *C. glutamicum* wurde zusätzlich zu *B. subtilis* als gram-positives Bakterium getestet, da es sich in der Struktur und dem Aufbau seiner Zellwand unterscheidet und durch das enthaltene Mycolat in der äußeren Membran dem pathogenen *Mycobacterium tuberculosis* ähnelt.²⁵⁴ Das Protokoll zu den antimikrobiellen Tests ist in 4.2.7 genauer beschrieben. Neben dem Einsatz der schon genauer charakterisierten Moleküle wurden auch die Ethyl-Ester der kationischen Aminosäuren Arginin, mono- & di-Acyl-Lysin hergestellt. Ziel war die Synthese von rein-

kationischen Tensiden durch Blockieren der freien Säure-Gruppen, wobei die Aktivierung für präparative Zwecke durch Zugabe von Chlor-(Trimethyl)Silan (TMS-Cl, vgl. 4.4.17) erreicht wurde. Als Alternative für zukünftige Synthesen ist die bereits für LAE erfolgreich demonstrierte, katalytische Veresterung über Lipasen oder Ionentauscher in Betracht zu ziehen. Durch Vergleich der erhaltenen Inhibitionsradien bei Konzentrationen von 5 - 40 mmol l⁻¹ (vgl. Tabelle 7) konnten Rückschlüsse auf die jeweilige Aktivität der Verbindungen gezogen werden.

Tabelle 7: Inhibitionswirkung für die Myrcen-Anhydrid-basierten Drei-Komponenten-Tenside gegen grampositive (*B. subtilis* und *C. glutamicum*) und -negative (*E. coli*) Bakterienstämme, sowie die Hefe *C. vishwanathii* bei Konzentrationen von 5 - 40 mM.

Anhydrid-Precursor	Kopf-gruppe	<i>B. subtilis</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. vishwanathii</i>
Myr-MSA	H ₂ O	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Arg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	ArgOEt ^a	40 + / 20 -	40 ++ / 20 + / 10 O / 5 -	40 x / 20 -	40 + / 20 O/ 10 -
	Phe	40 + / 20 -	40 + / 20 -	40 x / 20 -	n.d.
Myr-CA	H ₂ O	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Arg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	ArgOEt ^a	40 + / 20 -	40 ++ / 20 + / 10 + / 5 O	40 + / 20 -	40 + / 20 -

Erläuterung: a) Veresterung der Produkte wurde mit EtOH und TMS-Cl durchgeführt, wodurch alle vorhandenen Säuregruppen an Aminosäure und hydrophobem Rückgrat in die entsprechenden Ethyl-Ester umgewandelt wurden; ++ = deutlich erkennbarer Inhibitionsradius, + = deutlich erkennbarer Inhibitionsradius, o = erkennbarer, kleiner Inhibitionsradius, - = schwacher Inhibitionsradius, uneindeutiges Resultat, n.d. = keine Inhibition bei höchster Konzentration erkennbar.

Eine ergänzende Darstellung von Kulturen mit Hemmhof-Tests findet sich im Anhang in Abbildung A 1). In Untersuchungen der Drei-Komponenten-Aminosäure-Tenside zeigte das *N*-Myrcen-MSA-Phenylalanin eine schwache Inhibierung der drei getesteten bakteriellen Mikroorganismen, wohingegen die untersuchte Hefe nicht inhibiert wurde. Vergleichbare Resultate in Form einer schwachen Inhibition wurden mit dem strukturell ähnlich aufgebauten *N*-Lauroyl-Phenylalanin erzielt.²⁵⁵ Die verbleibenden Aminosäure-Tenside zeigen, ebenso wie die Hydrolysate keine Inhibition der untersuchten Mikroorganismen. Auch die amphoteren

Verbindungen, die durch die Umsetzung der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin erhalten werden, zeigten zunächst keine Wirksamkeit. Durch vollständige Veresterung konnten die Arginin-Derivate in deutlich aktivere Verbindungen überführt werden, die eine starke Inhibition des mikrobiellen Wachstums aufweisen. Die Veresterung der enthaltenen Säure-Funktionen liefert ein kationisches Tensid, das sich durch die positive Ladung an bzw. in die negativ geladenen Zellmembran einlagern kann, wodurch somit eine Schädigung der Bakterien und der eingesetzten Hefe eintritt.^{256–258} Unter Berücksichtigung der bekannten Wirkung von antimikrobiellen Tensiden wie LAE zeigt sich eine schwächere Wirkung bei den Drei-Komponenten-Tensiden. Auch im direkten Vergleich mit natürlich vorkommenden und synthetischen AMPs und SAMPs zeigt sich eine geringere Wirksamkeit. So zeigen die modifizierten und mit kurzkettigen Alkoholen bzw. Aminen C-terminal umgesetzten Tripeptid-Wirkstoffe basierend auf Tryptophan und Arginin bereits im Mikrogramm pro Milliliter effektive Inhibition von verschiedenen Pilzen und Bakterien.^{85,259} Analoges Verhalten wurde auch für die unmodifizierten und nicht-acylierten Hexapeptide aus Tryptophan und Arginin nachgewiesen.^{83,260} Ebenso besitzen auch die Lauroyl- und Palmitoyl-acylierten Tetrapeptide stärkere Wirkung gegenüber Bakterien und sind auch in höheren Verdünnungsgraden noch aktiv.^{89,90} Dennoch lässt sich der Nachweis von antimikrobieller Aktivität als positiver Ansatzpunkt für weitere Arbeiten deuten. Eine generell vorhandene Wirksamkeit kann durch Annäherung der erzeugten Strukturen an effektivere Substanzen gegebenenfalls ausgebaut und verstärkt werden. Analog zur Betrachtung der physikochemischen Eigenschaften zeigt sich auch hier, dass Substrate mit größerem hydrophilem Anteil effektivere Inhibitoren sein könnten. Auch die Kopplung von Peptiden an einen hydrophilen Rest, wie etwa die beschriebenen Benzyl-Tripeptide bringt bereits drastische Wirkung mit sich, so dass eine Kopplung eines Tripeptids an den Myrcen-Rest vergleichbare Wirkung erzielen könnte.

2.6.3 Diels-Alder-Synthese von Tensiden mit langkettigen Dienen

Als Hauptproblematik der bisher synthetisierten Strukturen war die, in Relation zum hydrophilen Teil und der zusätzlich erzeugten Säure-Gruppe, zu kurze hydrophobe Sektion der Tenside. Daher wurden weitere Untersuchungen mit langkettigen Dienen angestrebt, wobei als einfach zugängliche Ressource vor allem das Sesquiterpen β -Farnesen (C_{15}) und die konjugierte Linolsäure ($C_{18:2}$ *cis*) identifiziert wurden. Farnesen ist dabei vor allem als Isomeren-Gemisch kommerziell verfügbar, wobei das α -Isomer oft überwiegt. Erste Untersuchungen und Diels-Alder-Reaktionen zeigten, dass die kommerziell in größerem Maßstab verfügbaren Rohstoffe

nicht über die ausreichende Reinheit verfügten, um eine selektive Synthese zu erlauben. Daher wurden nachfolgende Untersuchungen auf die Synthese, Aufreinigung und Konjugation, sowie die Folgereaktionen von Linolsäure (Abbildung 41) fokussiert.

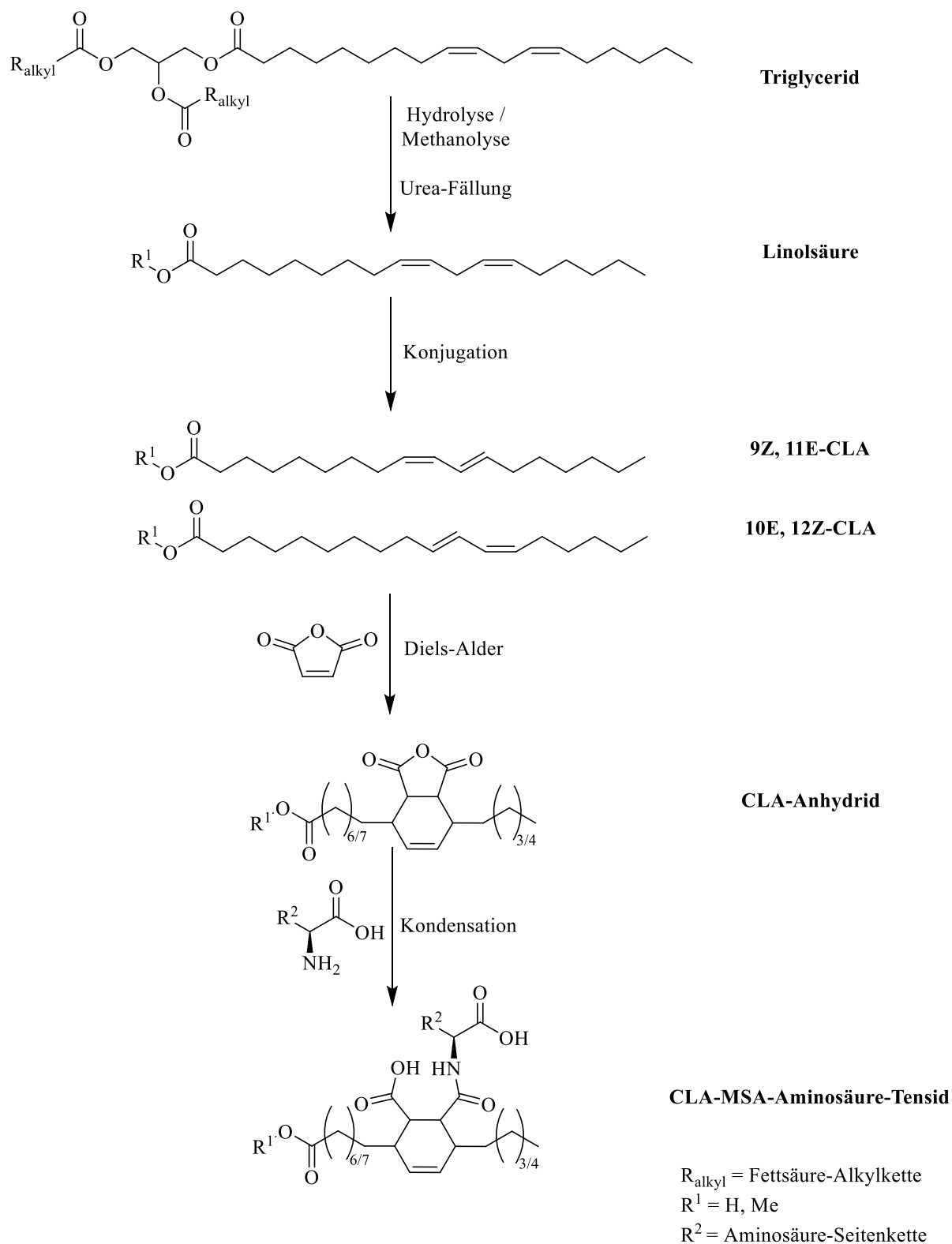


Abbildung 41: Syntheserouten für die Darstellung des Zieltensids über das Anhydrid-Intermediat ausgehend von Distelöl zur Verbesserung der Übersicht ist nur jeweils eins von vier möglichen Produkt-Isomeren dargestellt.

Diese kann aus Distelöl gewonnen und durch Fällung mit Harnstoff isoliert werden. Ausgehend von den Triglyceriden des Distelöls kann die Esterspaltung wahlweise hydrolytisch zur freien Fettsäure oder alkoholytisch zum entsprechenden Fettsäureester ablaufen. Die Herangehensweisen bieten für die Tensid-Synthese deutlich unterschiedliche Produkte, da das, aus der Fettsäure erzeugte Tensid eine freie Säure-Gruppe in einer der beiden Alkyl-Ketten trägt und so eine Bola-Tensid-Struktur erhält. Unter Einsatz von Fettsäureestern hingegen ist die polare Säure-Funktion hingegen geschützt und fügt sich in die hydrophobe Struktur der Kohlenwasserstoffkette ein, wodurch ein Gemini-Tensid gebildet wird.

Die anschließende katalytische Konjugation erzeugt dann eine Mischung des 9Z, 11E- oder des 10E, 12Z-Isomers.²⁶¹⁻²⁶³ Die Reaktion beider Isomere in der Diels-Alder-Reaktion mit Maleinsäure-Anhydrid und zyklischen Imiden zur anschließenden Trennung der Isomere wurde sowohl für die freie Linolsäure als auch für die entsprechenden Ester bereits beschrieben.^{175,176} Die sequenzielle Umsetzung des erhaltenen Anhydrid-Intermediats mit Aminosäuren liefert dann Gemini-Tensid-artige Strukturen mit zentral platzierter hydrophiler Kopfgruppe und zwei hydrophoben Resten.

Im Zuge der durchgeführten Synthesen wurde sowohl die Hydrolyse als auch die Methanolyse des Triglycerids betrachtet (vgl. 4.4.18). Die Hydrolyse mit KOH in einer Mischung aus Wasser und Ethanol verlief innerhalb von 90 min. und in Übereinstimmung mit der zugrundeliegenden Literatur vollständig.²⁶⁴ Aus der leichteren Öl-Phase wurden nach Trocknen und Entfernen des Lösungsmittels circa 480 g der Kalium-Seifen der Fettsäuren erhalten wurden. Kommerziell erhältliches, Linolsäure-reiches Distelöl hat einen Linolsäure Anteil von maximal 83 %, während durchschnittlich 68 % enthalten sind. Den Großteil der übrigen Fettsäuren an der Gesamt-Mischung machen Ölsäure und Palmitinsäure mit 5 – 22 % bzw. 5 – 8 % aus.^{265,266} Die enthaltenen ungesättigten und einfach gesättigten Fettsäuren wurden mit Harnstoff (vgl. 4.4.19) ausgefällt, so dass nach Trocknen des Filtrats sehr reine Linolsäure (96 %, vgl. Abbildung 42) in einer Ausbeute von 74 % (bezogen auf die theoretische Ausbeute bei einem durchschnittlichen Linolsäure-Anteil von 68 % im Distelöl) erhalten wurde.²⁶⁷ Die analoge Durchführung der Veresterung mit KOMe in Methanol und anschließende Aufreinigung lieferte den Linolsäuremethylester mit etwas geringerer Reinheit (88 %) in einer Ausbeute von 45 % (bezogen auf den theoretisch möglichen Wert). Dabei tritt bei $t_{ret} = 8,1$ min eine geringe Verunreinigung auf (ca. 6 %), die im Spektrum der Hydrolyse nicht beobachtet werden konnte. Bei der Verunreinigung handelt es sich voraussichtlich um eine kurzkettige und in der Folgereaktion unreaktive Fettsäure. Die insgesamt niedrigere Ausbeute wurde durch eine schlechtere Trennung im Rahmen des Ansäuerns vermutet. Ebenso kann es bei der Fällung zu

einer Co-Fällung des Methylesters gekommen sein, der so mit der Ölsäure eingeschlossen und verworfen wurde.

Die Konjugation der internen Doppelbindungen (Prozedur vgl. 4.4.20) erfolgte für die freie Linolsäure nach dem in der Literatur beschriebenen Protokoll von CHIN ET. AL. durch Zugabe von NaOH in Ethylenglycol.^{268,269} Bei der Konjugation des isolierten Methylesters muss hingegen der Ausschluss von Wasser beachtet werden, da bei Anwesenheit bereits geringer Mengen von Wasser die Spaltung des Esters vermutet wurde. Daher wurde zur Konjugation trockenes KOMe in Methanol anstelle von NaOH verwendet und die Substratmischung vor Zugabe des Katalysators zur Entfernung von Wasser unter leichtem Vakuum auf 120 °C erhitzt. Die gaschromatographische Untersuchung der Reaktionsprodukte zeigte keine Veränderung der Chromatogramme oder Retentionszeiten, was durch die minimale Änderung der Elektronenverteilung im Molekül erklärt werden kann.

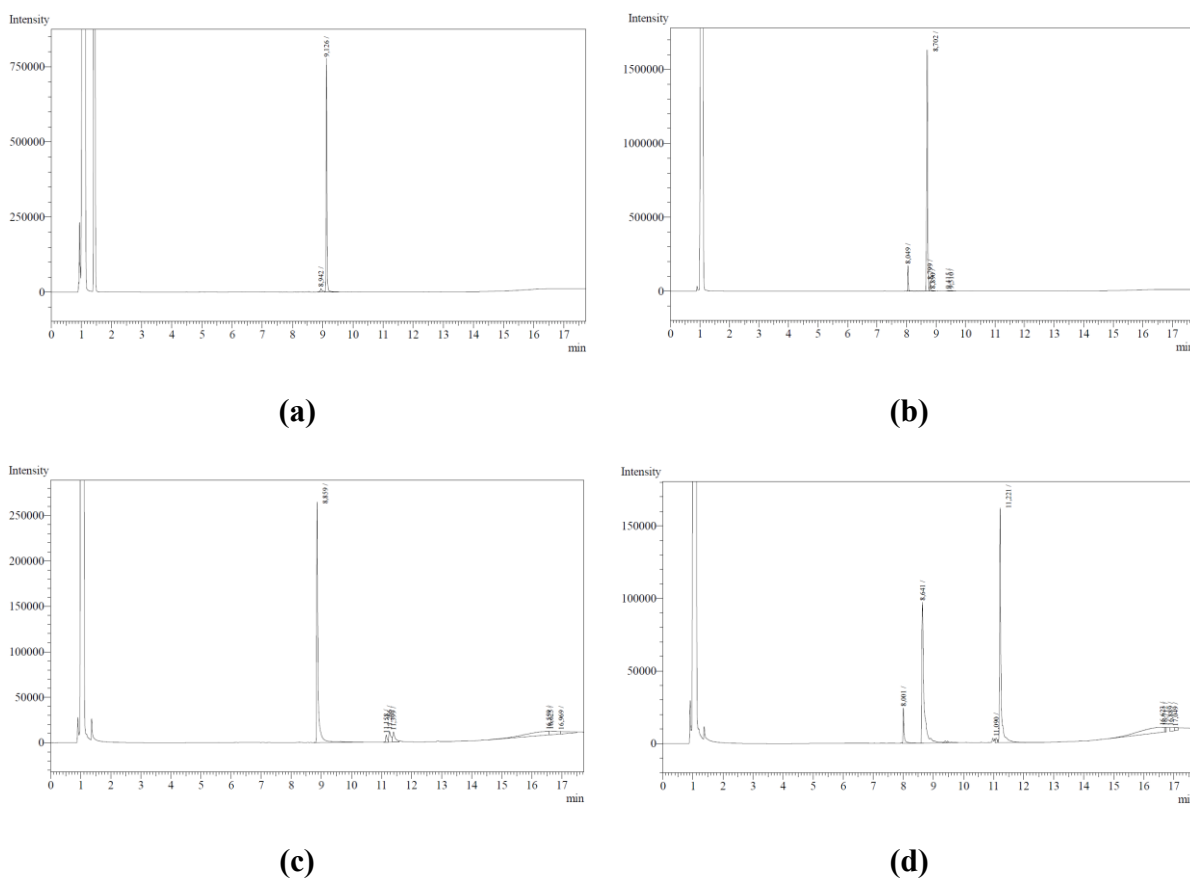


Abbildung 42: Gegenüberstellung der GC-Chromatogramme von aufgereinigter und hydrolysiertes Linolsäure (a) und dem Linolsäuremethylester (b) sowie die entsprechenden Produkt-Chromatogramme nach der Umsetzung mit MSA (c, d).

Die erhaltene CLA bzw. CLA-OMe wurden für die Folgereaktion mit MSA unter angepassten Bedingungen eingesetzt (vgl. 4.4.15). Die Reaktionstemperatur wurde in Übereinstimmung mit

der Literatur zur Isomerentrennung mittels MSA auf 160 °C erhöht.^{175,176} Die Analyse der Reaktionsmischung analog zu den Versuchen mit Myrcen über GC zeigte eine nur unvollständige Umsetzung ausgehend von der freien Säure, wohingegen die Peaks des Zwischenprodukts ausgehend vom CLA-Methylester deutlich stärker ausgeprägt waren. Bei der Bewertung der Ergebnisse für die freie Säure sind prinzipiell zwei Szenarien denkbar: Einerseits kann die freie Säure die Diels-Alder-Reaktion mit dem Anhydrid negativ beeinflussen, so dass optimierte Reaktionsbedingungen und eventuell verlängerte Reaktionszeiten notwendig sind. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die Isomerisierung der freien Säure deutlich schlechter verläuft und so für die Diels-Alder-Reaktion nur geringe Mengen an Substrat verfügbar sind. Die genaue Charakterisierung der Mischungen war allerdings durch sehr ähnliche Retentionszeiten nicht möglich und müsste in nachfolgenden Arbeiten mit spezialisierten Mitteln, wie etwa zur Trennung von Fettsäure-Isomeren entwickelten WAX-Säulen durchgeführt werden. Das erzeugte CLA-Anhydrid wurde im Anschluss exemplarisch sowohl mit der Aminosäure Serin als auch zur Referenzierung der Reaktion mit Wasser gekoppelt. Die in Abbildung 43 dargestellten Spektren zeigen die erfolg-

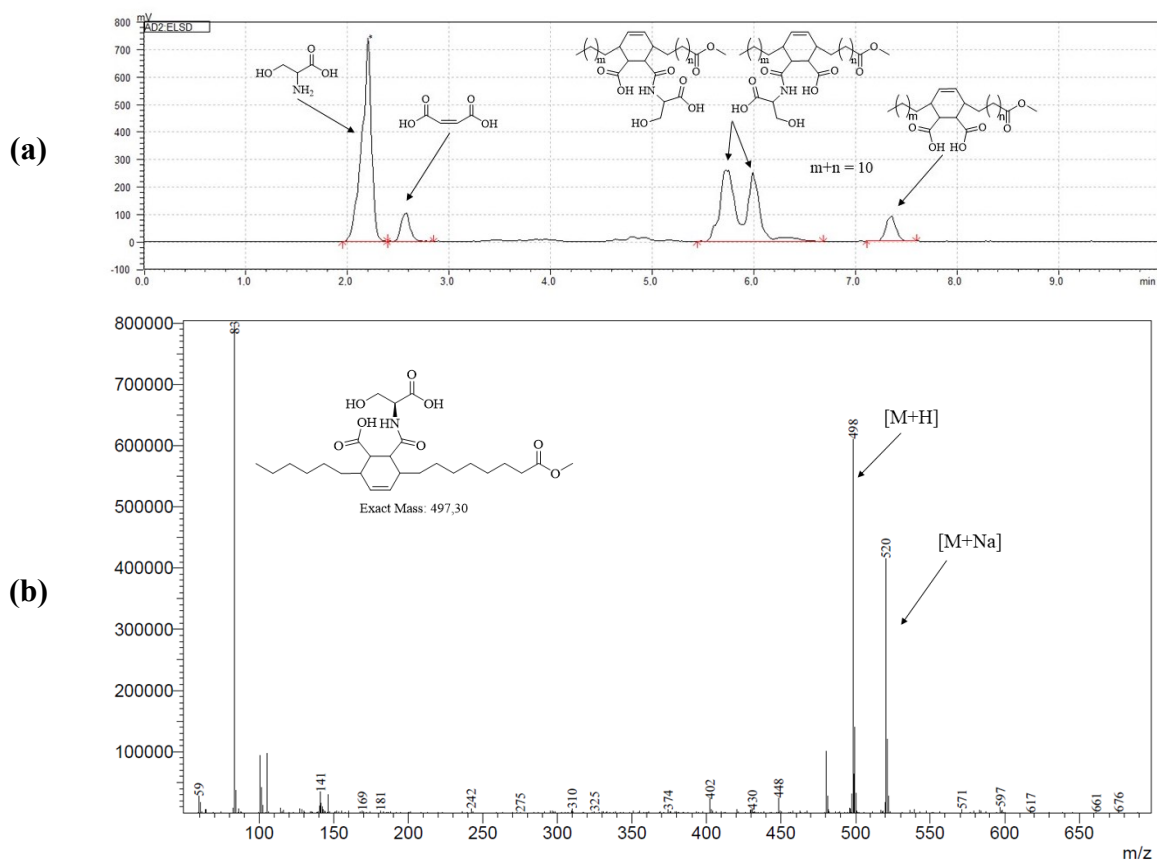


Abbildung 43: HPLC-ELSD-Chromatogramm der Produktmischung aus der Synthese von CLA-OMe-MSA-Ser (a) und Massenspektrum des zugehörigen Zielprodukts (b).

reiche Synthese des CLA-OMe-MSA-Serin-Tensids. Dabei werden zwei benachbarte Peaks für die Isomere erhalten, dennoch sind neben dem Hydrolyse-Produkt auch größere Mengen nicht-reagierten Serins und von Maleinsäure zu verzeichnen. Die direkte Hydrolyse des Anhydrid-Zwischenprodukts verlief erfolgreich, allerdings sind auch hier noch Restmengen von nicht reagierter MSA und des Linosäuremethylesters im Produkt vorhanden. Grundlegend ist der gewählte Syntheseansatz damit allerdings erfolgreich und bietet eine attraktive Route, um ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen in effizienten Prozessen grüne Tenside herzustellen.

Dabei muss die Optimierung aller einzelnen Schritte der gesamten Reaktionskette in nachfolgenden Arbeiten betrachtet werden, da sowohl die Ausbeuten der Diels-Alder-Reaktion von CLA und MSA niedriger liegen als die Reaktion zwischen Myrcen und MSA, als auch die Selektivitäten der CLA-Ester-Gewinnung sowie die der abschließenden Kondensation noch verbessert werden können. Auch der Einsatz von Methanol zur Veresterung muss noch evaluiert werden, da hier der Einsatz von Ethanol in Hinblick auf die Toxizität und die Problematik von im Produkt verbleibenden Reagenzien unbedenklicher ist.

3 Zusammenfassung & Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit und der zugehörigen Forschungsarbeit zum Themenkomplex von nachhaltigen Aminosäure-Tensiden wurde in einer zwei-geteilten Herangehensweise betrachtet (vgl. Abbildung 44). Einerseits bildet die Entwicklung und anschließende Evaluierung von neuen, grüneren und nachhaltigen Synthesestrategien für bereits etablierte Tenside einen Schwerpunkt. Das Synthesziel bildeten dabei Acylaminosäuren, die bereits seit Jahren als industriell relevante Produkte in den Tensidmarkt einfließen. Andererseits sollten ausgehend von Aminosäuren als polare Kopfgruppe auch komplett neue Synthesestrategien erarbeitet werden, wodurch die Vielfalt an strukturellen Motiven, wie auch die Anzahl potenzieller, biogener Substrate erhöht werden kann.

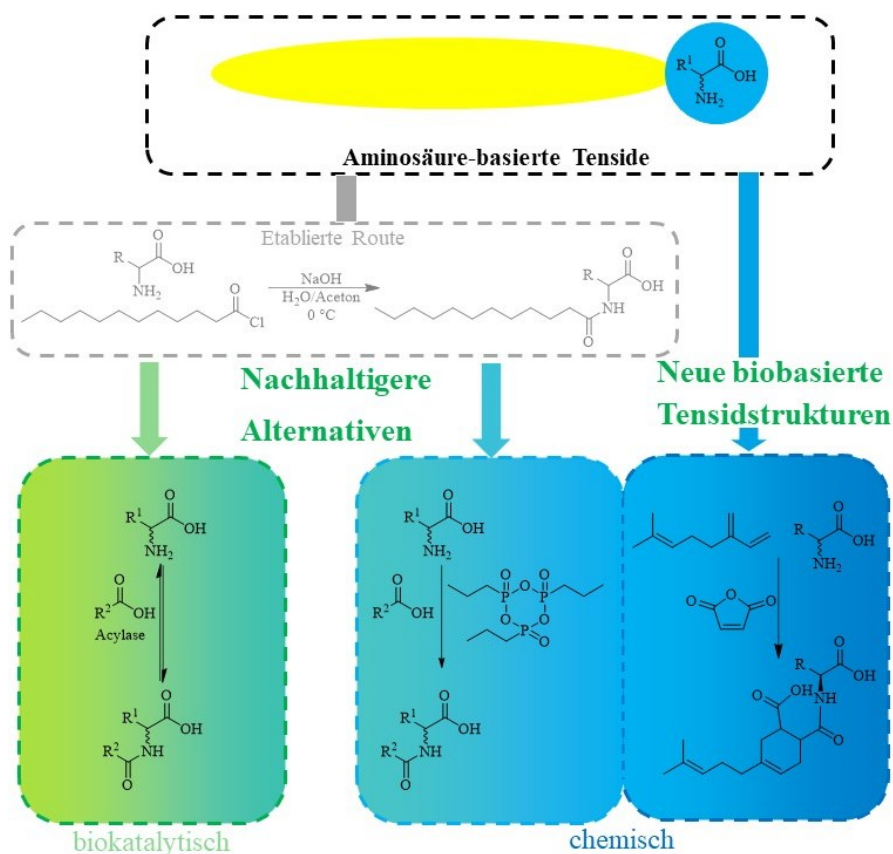


Abbildung 44: Generelle Aufteilung der Arbeit mit ausgewählten enzymatisch- (grün) und chemisch- (blau) vermittelten Routen.

Die offene Zielstellung bietet dabei das Potenzial verschiedener Herangehensweisen, die vor Beginn der Arbeit durch festgelegte Parameter genauer definiert wurden:

- Die entwickelten Synthesen sollten mit den Anforderungen der grünen Chemie vereinbar sein
- Die Kopfgruppe der Tenside sollte durch Aminosäuren gebildet werden
- Synthesestrategien wie auch neue Verbindungen sollten nach Möglichkeit komplett auf biogenen & nachwachsenden Rohstoffen basieren

Entwicklung nachhaltiger Syntheserouten

Die untersuchten Routen zur Synthese von Acylaminosäuren können dabei in zwei Kategorien eingeteilt werden: chemische und enzymatische Routen. Auf der chemischen Seite wurden verschiedene katalytische und direkte Kupplungsmethoden in Betracht gezogen, wobei die aus der Literatur-bekannteren Routen zwar als erfolgreich für die Verbindung von Fettsäuren und organischen Aminen beschrieben wurden, dieses Verhalten allerdings nicht direkt auf die anspruchsvollere Kombination aus Fettsäure und polar zwitterionischer Aminosäure übertragen werden konnte. Als effektive, in dieser Arbeit betrachtete, Routen wurden die bereits industriell angewandte Schotten-Baumann-Methode und die Kupplung mittels T3P identifiziert.

Die T3P vermittelte Synthese zeigte die erfolgreiche Bildung des gewünschten Produktes in Ausbeuten von bis zu 50 %, wobei auch die Folgereaktion mit weiteren Aminosäuren beobachtet wurde. Durch den zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus ergibt sich zudem der große Vorteil, dass die erhaltenen Acylaminosäuren in Folgesynthesen konsekutiv mit weiteren Aminosäuren verknüpft werden können, wodurch zielgerichtet Acylpeptid-Sequenzen erzeugt werden können und je nach Auswahl von zusätzlichen Faktoren auch weitere Modifikationen vorgenommen werden können. Als größte Herausforderungen haben sich dabei einerseits der Einsatz von organischen Basen im Überschuss erwiesen und andererseits die geringe Selektivität der Reaktion unter Verwendung von nicht-modifizierten Substraten. Dennoch steigt die Selektivität maßgeblich unter Verwendung von veresterten Aminosäuren, die ihrerseits mittels Ionentauschern grün und nachhaltig produziert werden können. Eine Anwendung in der gezielten Synthese von Spezialchemikalien und Pharmaka wird daher dennoch als sinnvoll umsetzbar erachtet. Vor allem modifizierte antimikrobielle Peptide, wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurden, bieten dabei attraktive Zielverbindungen.^{65,90,260} Im Anschluss müssten Untersuchungen zur Steigerung der Selektivität und zur Entwicklung eines effektiven Reaktionsprofils mit Aminosäure-Estern und deren Spaltung vor Initiierung der Folgereaktion stattfinden.

Das, im Rahmen des Verbundprojektes LipoPep entwickelte und exprimierte, Enzym PmAcy konnte erfolgreich charakterisiert und das akzeptierte Aminosäure- und Fettsäurespektrum identifiziert werden. Vor allem die hydrophoben Aminosäuren Phe und Leu liefern Umsätze von bis zu 50 %, während mit den basischen Aminosäuren Arg und His bis zu 60 % Umsatz bei hohen Substratkonzentrationen von 200 mM Aminosäure erreicht wurden. Auch Fettsäuren im Bereich von C₁₂–C₁₈ werden vom Enzym akzeptiert und wurden erfolgreich mit Phenylalanin verknüpft.

Tiefergehende Optimierungen der Reaktion konnten die Ausbeute mit Arginin auf bis zu 95 % steigern, wobei ein Teil des gebildeten Produkts bereits während der Reaktion ausfiel und mit einer entsprechenden Gleichgewichtsverschiebung einherging. Das Ausfällen und die Isolierung des Produkts konnten durch Kühlen auf 4 °C weiter erhöht werden, wodurch reines *N*-Lauroyl-Arginin (ca. 90 %) erhalten wurde. Im Zuge der Kältefällung konnte auch ein potenzielles Enzymrecycling untersucht werden, wobei eine äquimolare Reaktionsführung im zweiten Durchlauf höhere Ausbeuten von bis zu 55 % lieferte.

Ebenso konnte zur Vermeidung der Arbeiten mit gesundheitsschädlichem Borat-Puffer eine Puffer-freie, wässrige Durchführung der Reaktion erfolgreich demonstriert werden, wobei der pH-Wert des Reaktionsmediums durch automatisiertes zudosieren von NaOH stabilisiert wurde. Dabei konnte ebenso das Ausfallen des Produkts beobachtet und innerhalb von 24 h eine Ausbeute von ca. 50 % erreicht werden.

Das erhaltenen *N*-Lauroyl-Arginin wurde sowohl enzymatisch mit den kommerziell verfügbaren, immobilisierten Enzymen RMIM und CALB als auch chemisch mit dem Dowex 50WX8 Ionentauscher verestert, wodurch das antimikrobielle Nahrungs-Additiv *N*-Lauroyl-Arginin-Ethylester erhalten wurde. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte katalytische Syntheseroute bietet damit durch Kombination aus zwei katalytischen Schritten einen nachhaltigen Zugang zum industriell relevanten LAE, welches bislang unter Einsatz von stöchiometrischen Mengen von Chlorierungsreagenzien hergestellt wird.²⁷⁰

In folgenden Untersuchungen muss die Immobilisierung und das Enzymrecycling adressiert werden, um die Stabilität und Nutzbarkeit des Enzyms weiter zu erhöhen. Ebenso bietet die physikochemische Charakterisierung der Acylaminosäuren die Chance, weitere attraktive Zielverbindungen wie Acyl-Histidin mit Lauroyl-Rest oder langkettigen Fettsäuren zu identifizieren. Auch die Puffer-freie Synthese bietet Potenzial zur Optimierung, zumal das Ausfallen des *N*-Lauroyl-Arginins die Chance eine einfache Isolierung des Produkts verspricht.

Synthese von biobasierten Tensidverbindungen

Die erfolgreiche Verknüpfung von Linker-basierten Drei-Komponenten Tensiden über die Verbindung von Terpenen mit zyklischen Anhydriden und Aminosäuren ermöglicht den Zugriff auf ein breites Portfolio an vor allem anionischen und amphoteren Tensiden. Der Einsatz von MSA und CA erlaubt die Synthese von Anhydrid-Precursoren in hoher Selektivität mit Umsatzgraden von über 90 %, wobei das biobasierte CA zusätzlich den Vorteil einer Lösungsmittelfreien Synthese bietet.

Die Kupplung mit Aminosäuren bietet den einfachen Zugang zu vollständig biobasierten Tensiden mit Ausbeuten von bis zu 90 %. Die kationischen Aminosäuren Arginin und Lysin erreichen gute minimale Oberflächenspannungen von circa 31 mN m^{-1} und eine hohe Schaumstabilität von über 30 min. bieten. Damit sind die Resultate vergleichbar zu den erreichten Werten von Strukturell ähnlichen Tensiden. In ersten Tests konnte zudem die antimikrobielle Aktivität gegenüber den grampositiven Bakterienstämmen *B. subtilis* und *C. glutamicum* und dem gram-negativen *E. coli* durch das *N*-Myrcen-MSA-Phenylalanin gezeigt werden. Eine Veresterung der Säuregruppen erzeugt aus den amphoteren Arginin-Derivaten kationische Tenside, die eine gute Inhibition der untersuchten Bakterien erreichen und ebenso gegen die Hefe *C. vishwanathii* wirksam sind.

In aufbauenden Untersuchungen konnte bereits die erfolgreiche Synthese von Tensiden aus Aminosäure, Anhydrid und der konjugierten Linolsäure demonstriert werden, wobei ein großer Anteil an Hydrolyse-Nebenprodukt detektiert wurden. In Folge muss noch der Ablauf der Reaktion weiter optimiert werden, um den Umsatz und die Selektivität weiter zu erhöhen.

Eine Verlängerung der Kohlenstoffkette beeinflusst auch die physikochemischen und gegebenenfalls die antimikrobiellen Eigenschaften der Verbindungen, so dass nach der Optimierung der Reaktion mit CLA auch die Charakterisierung der Substanzen von hoher Wichtigkeit ist. Als Ziel für nachfolgende Untersuchungen bietet sich auch die Reaktion mit längeren Terpen-Derivaten wie Farnesen an, wodurch ebenfalls der hydrophobe Anteil des Tensides vergrößert würde. Darüber hinaus wird die technische Anwendbarkeit derzeit durch das Volumen der Mikrowellen-Reaktionsgefäße limitiert, so dass eine Übertragung in größere Volumina oder in einen kontinuierlichen Fließprozess eine sinnvolle Erweiterung darstellt.¹⁷⁵

4 Material und Methoden

4.1 Allgemeine Vorschriften

Alle beschriebenen Reaktionen wurden mit kommerziell erhältlichen Reagenzien und Lösungsmitteln durchgeführt (Sigma Aldrich, Merck, Acros, Carl Roth, TCI, Alfa Aesar) und sind im Detail unter 6.1 tabellarisch aufgeführt. Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. Aminoacylase aus *P. monticola* wurde von Gerrit Haeger synthetisiert, aufgereinigt und anschließend in der aufkonzentrierten Form verwendet.¹⁹⁸ Reaktionen unter Ausschluss von Luft oder Feuchtigkeit wurden, sofern notwendig, nach den bekannten Methoden der Schlenktechnik durchgeführt.²⁷¹ Trockene Lösungsmittel wurden entweder wie kommerziell erhältlich verwendet oder im durch Zugabe von Molsieb 3Å grundlegend von Wasser befreit, als Schutzgas wurde Stickstoff verwendet. Reaktionen mit Mikrowellenunterstützung wurden mit einer *CEM Discover* Labormikrowelle durchgeführt. Für die Reaktion wurden passende, temperatur- und druckstabile Mikrowellengefäße mit Septum verwendet. Reaktionen im Schüttler im Bereich von Raumtemperatur bis 65 °C wurden in einem *Infors HT Multitron* Laborschüttler durchgeführt, Reaktionen unterhalb der Raumtemperatur (5 - 20 °C) wurden in einem *Infors HT Ecotron* Laborschüttler durchgeführt. Lyophilisierung von Substraten und Produkten fand nach entfernen des Lösungsmittels und Einfrieren in flüssigem Stickstoff mit einem *Christ Alpha LSCbasic* Labor-Gefriertrockner statt.

4.2 Analytik & Strukturaufklärung

4.2.1 GC-Analytik

GC-Analytik wurde mit einem Shimadzu GC 2010 System durchgeführt, ausgestattet mit einer Restek GmbH MTX-Biodiesel TG Säule (0,16 µm Filmdicke, integra gap, 0,53 mm Durchmesser, 14 m Länge) und einem Shimadzu-FI-Detektor. Die chromatographische Trennung wurde über einen Temperatur-Gradienten von 45 -390 °C (vgl. Tabelle 8) und einer Gesamt-Flussrate von 1 ml min⁻¹, das Injektions-volumen betrug 1 µl, ein Split-Verhältnis von 1:12 wurde gewählt. Produkte wurden in Heptan oder EtOH gelöst und mit 2,5 µl Hexadekan als internem Standard versetzt.

Tabelle 8: Temperatur-Gradient der GC-Analytik

Zeit t [min]	Ziel-Temperatur T [°C]	Rampe [°C min⁻¹]
0	45	-
3.0	75	10
15.6	390	25
17.6	390	-

4.2.2 HPLC- & LC-MS-Analytik

HPLC-Analytik und Reaktionskontrolle wurde an einem Shimadzu Nexera XR System mit Hitachi LaChrom II Säule (C18, 5µm, 4.6 x 250 mm) und einem ELSD 100 (Evaporative Light Scattering Detektor) von VWR durchgeführt. Die Produkte wurden in einer 50:50 Mischung aus ACN und VE-Wasser mit je 0,1 Vol-% Ameisensäure gelöst; 20 µl der Lösung wurden injiziert. Die Säulentemperatur betrug 50 °C und die Produkte wurden mit einem Gradienten ausgehend von 50:50 % ACN:Wasser (vgl. Tabelle 9) bei einer Gesamt-Flussrate von 1 ml min⁻¹ getrennt.

Tabelle 9: Lösungsmittel-Gradient der HPLC-Chromatographie

Zeit t [min]	c_{ACN} [%]	c_{H_2O} [%]
0	50	50
1,5	75	25
3	85	15
5	90	10
10	90	10
12,5	50	50
15	50	50

LC-MS-Analytik wurde an einem Shimadzu Nexera XR System, ausgestattet mit einer Hitachi LaChrom II Säule (C18, 5µm, 4.6 x 250 mm) und einem Shimadzu LCMS-2020-Massenspektrometer durchgeführt. Die Säulentemperatur betrug 50 °C, die Flussrate 1 ml min⁻¹. Anwendung der gleichen Gradienten-Methode ermöglicht ein direktes Vergleichen der Chromatogramme und eine einfache Zuordnung der Spektren.

4.2.3 NMR-Spektroskopie

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance III HD 400 MHz System aufgezeichnet. 30 mg aufgereinigtes Produkt wurden in 650 μl deuteriertem Lösungsmittel gelöst und bei 400 MHz (^1H -NMR) bzw. 100 MHz (^{13}C -NMR) vermessen. Chemische Shift-Werte sind in δ -Einheiten (ppm) referenziert auf das interne Lösungsmittel-Signal δ (CDCl_3 : 7,26 ppm für ^1H - und 77,00 ppm für ^{13}C -Spektren; CD_3OD : 3,31 ppm für ^1H - und 49,00 ppm für ^{13}C -Spektren; D_2O : 4,79 ppm für ^1H -Spektren) oder TMS (0,00 ppm) angegeben. Alle Kopplungskonstanten (J) sind in Hz aufgeführt. Multiplizität wird durch ein oder mehrere der folgenden Buchstaben kodiert: s (Singulet), d (Doublet), t (Triplet), q (Quartet), m (Multiplet).

4.2.4 Präparative Aufreinigung von Verbindungen

Rohprodukte wurden vor der Untersuchung auf ihre antimikrobielle Wirkung mittels präparativer HPLC gereinigt. Verwendet wurde ein *Interchim Inc. PuriFlash 450-LC* System, ausgestattet mit einer präparativen *Kromasil*-Säule (C18, 5 μm , 250 x 200 mm) und PDA-Detektor. Die Rohprodukte wurden in einer 1:1 Mischung aus ACN und Wasser gelöst, und in den Injektor überführt. Die chromatographische Trennung wurde mit einer Gradientenmethode beginnend bei einem ACN-Anteil von 20 % und endend bei 90 % ACN durchgeführt. Beiden Laufmittel-Komponenten wurde 0,1 Vol-% Ameisensäure zugegeben, um die Trennleistung zu verbessern. Die gesuchten Fraktionen wurden gesammelt, vereint und das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der wässrige Rückstand wurde eingefroren und das verbleibende Wasser im Anschluss durch Lyophilisieren entfernt.

4.2.5 Schaummessungen

Schaummessungen wurden mit einem Krüss DFA100 bei 20 °C mit einer Lösung des Tensid-Rohprodukts durchgeführt. Die Konzentration der Lösung betrug 4 mmol l^{-1} bezogen auf die untersuchte Tensid-Komponente und beinhaltete auch das Hydrolyse-Nebenprodukt und die nicht-umgesetzte Aminosäure. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 0,1 mM Zitronensäure- bzw. 0,1 mM NaOH-Lösung auf pH = 5,5 eingestellt. Um die Lösung aufzuschäumen, wurde eine Krüss FL4551-Filter (12 – 25 μm) und ein Gesamt-Luftstrom von 0.4 l min^{-1} für 15 s eingesetzt. Die Stabilität des gebildeten Schaums wurde für insgesamt 5 min beobachtet, dabei wurde während der Aufschäum-Phase mit einer Frequenz von 5 Hz gemessen und mit 2 Hz während der Zerfalls-Phase.

4.2.6 Messung der Oberflächenspannung

Ein DataPhysics OCA Kontakwinkel-Messsystem wurde eingesetzt, um die Oberflächenspannung der Tensid-Lösungen über die Hängende-Tropfen-Methodik zu untersuchen. Das Volumen des hängenden Tropfens wurde mit einer Dosiergeschwindigkeit von $1 \mu\text{ s}^{-1}$ eingestellt und die Tropfenkontur wurde über einen Zeitraum von 10 min gemessen. Die Analyse und Evaluation des Tropfens wurde mit der zugehörigen SCA22-Software durchgeführt. Eine 4 mmol l^{-1} -Lösung, bezogen auf die Tensid-Komponente, wurde zur Messung der Oberflächenspannung eingesetzt. Der pH der Messlösung wurde vor Messbeginn mit $0,1 \text{ mM}$ Zitronensäure bzw. $0,1 \text{ mM}$ Natronlauge auf $\text{pH} = 5,5$ eingestellt.

4.2.7 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität

Die potenzielle, antimikrobielle Aktivität der Tensid-Verbindungen wurde gegen die grampositiven Bakterienstämme *C. glutamicum* (ATCC 13032) und *B. subtilis* (ATCC 6051) und das gramnegative *E. coli* (DSM 102052) getestet. Bakterienkulturen wurden initial auf LB-Medium angelegt und 3 Kolonien in $0,9 \%$ NaCl-Lösung auf $V_{\text{ges}} = 200 \text{ ml}$ verdünnt. 3 ml der verdünnten Kulturen wurden auf Platten mit LB-Medium (20 ml pro Platte, $h = 3 \text{ mm}$) ausgebracht, überstehende Kultur-Flüssigkeit entfernt und die Kulturen für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten durch Einstechen von Löchern mit dem breiteren Ende von Pasteurpipetten ($d = 5,5 \text{ mm}$) weiterbearbeitet. $30 \mu\text{ l}$ gereinigte Probensubstanz (vgl. 4.2.4, $c_{\text{max}} = 20 \text{ mg ml}^{-1}$ in $0,9 \%$ NaCl-Lösung) wurden in die Löcher pipettiert und die präparierten Platten für 24 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. The Inhibitionsradius wurde gemessen, um die Stärke der antimikrobiellen Wirksamkeit zu bestimmen. Alle Tests wurden bei verschiedenen Konzentrationen und in dreifach Bestimmung durchgeführt.

4.3 Biokatalytische Reaktionsvorschriften

4.3.1 Mechanochemische Acylierung mit Papain oder CALB

Laurinsäure ($16,6 \text{ mg}$, $0,08 \text{ mmol}$) und Alanin ($7,9 \text{ mg}$, $0,12 \text{ mmol}$, $1,5 \text{ eq.}$) bzw. Lysin ($16,9 \text{ mg}$, $0,12 \text{ mmol}$, $1,5 \text{ eq.}$) wurden mit Base ($0,24 \text{ mmol}$, 3 eq.) in ein $1,5 \text{ ml}$ -Mikroreaktionsgefäß eingewogen. Papain ($7,0 \text{ mg}$) oder immobilisierte CALB ($10,0 \text{ mg}$, Novozyme 435)) wurde hinzugefügt und das Gemisch mit Glasbeads auf das doppelte Volumen aufgefüllt. Die Gefäße wurden in eine *Retsch* Schüttelmühle eingebracht und für 2 h bei 25 Hz gemahlen.

Das Reaktionsgemisch wurde durch Aufnehmen mit 0,5 ml Wasser von den Glasbeads getrennt und im Anschluss getrocknet.

4.3.2 Generelle Reaktionsvorschrift für die enzymkatalytische Acylierungsreaktion mit *PmAcy*

Reaktionen zur Untersuchung des Reaktionsverhaltens der Aminoacylase aus *P. monticola* wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 200 mM Aminosäure, 100 mM Fettsäure und 500 μ M ZnCl₂ wurden in Tris-HCl Puffer (50 mM, pH = 8) in einem verschließbaren 25 ml Gefäß vorgelegt, das Gesamtvolumen der Reaktionsmischung betrug 1 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,6 U *PmAcy* gestartet und die Reaktion bei 50 °C und 250 rpm für 24 h geschüttelt. Fettsäuren, Aminosäuren und der pH-Wert der Mischung wurden in einem „one factor at a time“ (OFAT) Ansatz variiert. Alle 20 proteinogenen Aminosäuren wurden untersucht, Fettsäuren verschiedener Kettenlängen (C₈ - C₁₈) wurden mit Phenylalanin als Cosubstrat variiert, bei Einsatz der Fettsäuren mit Kettenlänge C₁₆ - C₁₈ wurde zusätzlich 10 Vol-% EtOH zugesetzt, um die Lösung der Fettsäure zu unterstützen. Der pH-Wert wurde im Bereich von pH 6 - 13 untersucht, als Puffer wurden Tris-HCl (pH 6 - 9) oder Natrium-Borat (pH 9 – 13) bei einer Konzentration von 50 mM verwendet. 10 μ l Probelösung wurde entnommen, die Reaktion durch Zugabe von 990 μ l ACN und anschließende Inkubation bei 100 °C für 30 min. beendet und anschließend mittels HPLC-ELSD und LC-MS analysiert. Quantifizierung von Arginin und Lauroyl-Arginin erfolgte per HPLC-ELSD durch Kalibrierung mit einer 1 mM TrpOEt • HCl als internem Standard.

4.3.3 Scale-Up der Synthese und Isolierung von *N*-Lauroyl-Phenylalanin

Die gezielte Synthese von *N*-Lauroyl-Phenylalanin wurde durch Vorlegen von 200 mM Phenylalanin, 100 mM Natrium-Laurat, 500 μ M ZnCl₂ und 3,0 U *PmAcy* in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH = 8) mit einem Gesamtvolumen von 5 ml durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei 50 °C und 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung analog zur Schotten-Baumann-Methode (vgl. 4.4.1) durch Zugabe von 5 N Salzsäure auf pH 1 eingestellt und der ausgefallene Feststoff durch Zentrifugation von der überstehenden Lösung getrennt. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet und analysiert.

4.3.4 Acylierung von Arginin in einem Puffer-freien System

Die Reaktion wurde analog zu 4.3.2 durch Lösen von 200 mM Arginin und 200 bzw. 100 mM Na-Laurat und 0,5 mM ZnCl_2 in destilliertem Wasser vorbereiten. Der pH-Wert der Lösung wurde manuell durch Addition von 1 M HCl auf pH = 9 eingestellt und das Gesamtvolumen auf 5 ml erhöht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,6 Units PmAcy gestartet und bei 35 °C und 250 rpm für 24 h gerührt. Der pH-Wert der Lösung wurde konstant mit einem *SI Analytics TitroLine 7000* überwacht und durch automatisiertes Nachdosieren von 1 M NaOH konstant gehalten. Die Probennahme, -vorbereitung und -analytik erfolgte wie in 4.3.2 beschrieben.

4.3.5 Recycling-Untersuchungen für PmAcy

Die Experimente wurden angelehnt an die optimierten Bedingungen basierend auf 4.3.2 durchgeführt. Der Maßstab wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 ml erhöht, die Zusammensetzung der Anfangsmischung bestand aus 200 mM Arginin, 100 mM bzw. 200 mM Na-Laurat, 500 μM ZnCl_2 in 50 mM Na-Borat-Puffer (pH = 9,0) eingewogen in ein verschließbares Glasgefäß mit einem Gesamtvolumen von 25 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,6 U PmAcy gestartet und bei 35 °C und 250 rpm für 21 h durchgeführt. Die Probennahme, -vorbereitung und -analytik erfolgte wie in 4.3.2 beschrieben. Die verbleibende auf 35 °C temperierte, Reaktionsmischung, wurde in 50 ml-Falcon-Tubes überführt und für 3 h auf 4 °C gekühlt. Der ausgefallene Feststoff wird durch Zentrifugation (4500 rpm, 4 °C, 20 min.) abgetrennt und die überstehende Lösung für einen neuen Reaktionsansatz verwendet. Mittels der kalibrierten Ergebnisse aus der HPLC-Analytik wird der Umsatzgrad bestimmt und anhand dessen die Substrat-Konzentrationen und das Gesamt-Volumen der Mischung für den Folgedurchlauf wieder auf den Anfangswert eingestellt (s.o.).

4.3.6 Veresterung von *N*-Lauroyl-Arginin zur Bildung von LAE

LAE wurde aus dem enzymatisch (4.3.2, 4.3.4) und chemisch (4.4.1) erhaltenen *N*-Lauroyl-Arginin hergestellt. Lauroyl-Arginin (178,3 mg, 0,5 mmol, 1,0 eq.) wurde in 10 ml EtOH in einem verschlossenen Gefäß vorgelegt und mit der immobilisierten Lipase *Novozyme 435* bzw. *Lipozyme RMIM* (80 mg) versetzt. Enzymatisch gewonnenes Lauroyl-Arginin muss mit geringen Mengen 1,25 M HCl in MeOH (10 μl) angesäuert werden, um eine Lösung und Produktbildung zu erzielen. Die Reaktionsmischung wurde dann für 24 h bei 55 °C bei 250 rpm

geschüttelt und im Anschluss auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lipase wurde durch Filtration abgetrennt, das Lösungsmittel entfernt und das Produkt durch Lyophilisation erhalten.

4.3.7 Enzymatische Veresterung der organischen Linker

Das aus 4.4.13 erhaltene Produktgemisch (50,0 mg, ca. 0,15 mmol) wird in 20 ml Aceton gelöst und mit Dodecanol (55,86 mg, 0,30 mmol, 2,0 eq.) versetzt. Zu dem Gemisch wird CALB (30 mg) gegeben und das Reaktionsgefäß verschlossen. Das Gefäß wird dann für 48 h bei 45 °C und 175 rpm. in den Schüttler gestellt. Das Produktgemisch wird durch Entfernen des Lösungsmittels erhalten und per HPLC analysiert.

4.4 Chemische Reaktionsvorschriften

4.4.1 Acylierung von Aminosäuren nach der Schotten-Baumann-Methode

In einem Becherglas werden Alanin (891,0 mg, 10,00 mmol) und feste Natriumhydroxid-Pellets (399,9 mg, 10,00 mmol, 1,0 eq.) vorgelegt und unter Kühlung im Eisbad in Wasser (7 ml) und Aceton (5 ml) gelöst. Ebenso wird separat Natriumhydroxid (599,8 mg, 15,00 mmol, 1,5 eq.) in Wasser (2 ml) gelöst. Zu der Lösung der Aminosäure werden unter Rühren und konstanter Kühlung im Eisbad über einen Zeitraum von 30 min. die Natronlauge und Lauroylchlorid (2405,2 mg, 11,00 mmol, 1,1 eq.) zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wird die Mischung für weitere 5 h bei 0 °C gerührt. Im Anschluss wird der pH-Wert der Mischung mit 6 N HCl langsam auf pH = 2 abgesenkt, wodurch das Produkt als weißer Feststoff ausfällt. Das Rohprodukt wird über eine Nutsche abfiltriert, dreimal mit je 25 ml Petrolether gewaschen und getrocknet.

4.4.2 Solvothermale Umsetzung von Aminosäuren

In einem Mikrowellengefäß wurde zu fester Laurinsäure (200,1 mg, 1,00 mmol) und Glutaminsäure (176,5 mg, 1,20 mmol) Ethanol (2,80 ml, 2,80 ml mmol⁻¹) gegeben. Das Gefäß wurde mit einem Septum verschlossen und das Gemisch durch Rühren homogenisiert. Die Reaktion wurde in der Mikrowelle durchgeführt. Als Reaktionsparameter wurden $T = 160$ °C, $p_{max} = 30$ bar, $P_{max} = 100$ W festgelegt und die Reaktionsmischung für 3 h gerührt. Das Gefäß wurde aus dem Mikrowellenreaktor entnommen und auf Raumtemperatur abgekühlt.

4.4.3 Solvothermale Umsetzung von Hexylamin

In einem Mikrowellengefäß wurde zu fester Laurinsäure (200,1 mg, 1,00 mmol) und Hexylamin (121,4 mg, 0,16 ml, 1,20 mmol) Ethanol (2,80 ml, 2,80 ml mmol⁻¹) gegeben. Das Gefäß wurde mit einem Septum verschlossen und das Gemisch durch Rühren homogenisiert. Die Reaktion wurde in der Mikrowelle durchgeführt. Als Reaktionsparameter wurden $T = 160\text{ °C}$, $p_{max} = 30\text{ bar}$, $P_{max} = 100\text{ W}$ festgelegt und die Reaktionsmischung für 3 h gerührt. Das Gefäß wurde aus dem Mikrowellenreaktor entnommen und auf Raumtemperatur abgekühlt.

4.4.4 Synthese des Montmorillonit K-10 Fe³⁺ Katalysators

Eisen-(III)-chlorid (10,20 g, 62,5 mmol) wurde in 62,5 ml VE-Wasser gelöst. Zur gelblichen Lösung wurde der Montmorillonit-K10-Lehm (5,00 g) gegeben. Die Lösung wurde für 70 h bei Raumtemperatur gerührt, die Lösung zentrifugiert und die überstehende Lösung dekantiert. Der Feststoff wurde durch wiederholte Zugabe von VE-Wasser, Suspension im Ultraschallbad und Zentrifugation gewaschen, bis keine Cl⁻-Ionen mehr in der überstehenden Lösung nachgewiesen werden konnten. Der verbleibende Feststoff wurde über Nacht bei 120 °C getrocknet. Das Produkt wurde als beiger Feststoff erhalten.

4.4.5 Acylierung mit Montmorillonit K10-Fe³⁺-Katalysator

Laurinsäure (42,9 mg, 0,2 mmol) wurde mit dem Montmorillonit-K10-Fe³⁺-Katalysator im Kolben vorgelegt. Die Glutaminsäure (32,0 mg, 0,2 mmol, 1,0 eq.) wird in 5 ml THF suspendiert und zu Laurinsäure und Katalysator zugegeben und mit 5 ml THF nachgespült. Das Gemisch wird unter Rühren für 12 h auf 70 °C erhitzt. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

4.4.6 Acylierungsreaktion mit T3P

Laurinsäure (200,0 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq.) und Pyridin (400,0 µl, 10,0 mmol, 10,0 eq.) werden in 1 ml EtOAc vorgelegt und gelöst. Zu der Mischung wird T3P in EtOAc (595,0 µl, 636,0 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq., 50 %) zugegeben und bei 30 °C und 250 rpm für 60 min geschüttelt. Im Anschluss wird die feste Aminosäure (1,0 mmol, 1,0 eq.) zugegeben und für weitere 120 min bei 30 °C geschüttelt.

Mehrschrittige Reaktionen wurden durch Zugabe von frischem T3P (595,0 μ l, 636,0 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq., 50 %) und Pyridin (400,0 μ l, 10,0 mmol, 10,0 eq.) zum Rohprodukt begonnen. Im Anschluss wurde die nächste Aminosäure (1,0 mmol, 1,0 eq.) zugegeben und erneut für 120 min bei 30 °C und 250 rpm geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 ml Wasser gestoppt. Nach Zugabe von HCl (12 N, 250 μ l), 4 ml EtOAc und 0,5 ml gesättigter NaCl-Lösung wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase weitere zweimal mit 4 ml EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

4.4.7 Chemische Veresterung von *N*-Lauroyl-Arginin zur Bildung von LAE

LAE wurde aus dem enzymatisch (4.3.2, 4.3.4) und chemisch (4.4.1) erhaltenen *N*-Lauroyl-Arginin, angelehnt an die Methode von TURHANEN ET AL., hergestellt. Der Dowex 50WX8-Ionenaustauscher wurde wie in der Literatur beschrieben präpariert.¹⁹⁷

Lauroyl-Arginin (111,3 mg, 0,31 mmol) wurde in 5 ml EtOH in einem verschlossenen Gefäß vorgelegt und mit dem Dowex50WX8-Ionenaustauscher (50 mg) versetzt. Enzymatisch gewonnenes Lauroyl-Arginin muss mit geringen Mengen 1,25 M HCl in MeOH (10 μ l) angesäuert werden, um eine Lösung und Produktbildung zu erzielen. Die Reaktionsmischung wurde dann für 24 h bei 55 °C bei 250 rpm geschüttelt und im Anschluss auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Dowex-Ionenaustauscher wurde durch Filtration abgetrennt, das Lösungsmittel entfernt und das Produkt durch Lyophilisation erhalten.

4.4.8 Kondensation & Reduktion von Aminosäuren mit Aldehyden

Die Aminosäure (20,0 mmol, 1,0 eq.) wird in 15 ml MeOH vorgelegt und mit NaOH (799,8 mg, 20,0 mmol, 1,0 eq.) in 20 ml MeOH versetzt und durch Rühren in Lösung gebracht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet und dann erneut in 50 ml EtOH aufgenommen. Zur Lösung wird der Aldehyd (20,0 mmol, 1,0 eq.) zugegeben und die Lösung für 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel und das im Verlauf der Reaktion entstandene Wasser wird im Vakuum entfernt und der Rückstand erneut in 30 ml MeOH aufgenommen. Die Mischung wird im Eisbad gekühlt, Natrium-Borhydrid (794,4 mg, 21,0 mmol, 1,05 eq.) langsam portionsweise zugefügt und die Reaktion für 1 h gerührt. Im Anschluss wird die Reaktionslösung auf RT erwärmt und für weitere 2 h gerührt. Die Reaktion

ist beendet, sobald keine Gasbildung mehr stattfindet. Das Lösungsmittel wird erneut entfernt und das Rohprodukt im Vakuum getrocknet.

Übergangsmetallkatalysierte Reduktion wurde durch Zugabe von Pd/C-Katalysator (35,0 mg, 10 % Pd) anstelle von Natrium-Borhydrid und anschließendes Aufpressen von 10 bar H₂ durchgeführt.

4.4.9 Reduktive Aminierung mit Pd/C-Übergangsmetall-Katalysator

Aminosäure (2,00 mmol, 1,0 eq.) der Katalysator (0,40 mmol, 0,2 eq.) und NaOH (79,9 mg, 2,00 mmol, 1,0 eq.) werden im Kolben unter Schutzgas vorgelegt und mit Dodecanol (558,6 mg, 3,00 mmol, 1,5 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird dann unter Rühren für 3 h auf 150 °C erhitzt, wobei eine Lösung des Lysins im Dodecanol beobachtet werden konnte. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt mit Ethanol versetzt und der Katalysator durch Filtration entfernt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

4.4.10 Reduktive Aminierung mit Fe³⁺-Übergangsmetall-Katalysator

Aminosäure (2,00 mmol, 1,0 eq.) der Montmorillonit-K10-Fe³⁺-Katalysator (40,0 mg, vgl. 4.4.4) und NaOH (79,9 mg, 2,00 mmol, 1,0 eq.) werden in 5 ml VE-Wasser gelöst. Zur Reaktionsmischung wird Dodecanol (763,9 mg, 4,10 mmol, 2,0 eq.) zugegeben und die Mischung unter Rühren für 30 min auf 90 °C erhitzt. Im Anschluss wird die Temperatur auf 155 °C erhöht, wodurch die Reaktionsmischung einphasig wird. Nach 6 h wird die Mischung auf RT abgekühlt, mit 20 ml EtOH versetzt und der Katalysator durch Filtrieren entfernt. Das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt als braunes Öl erhalten.

4.4.11 Reduktive Aminierung mittels fester Base

Lysin-Monohydrat (291,3 mg, 2,00 mmol) und NaOH (119,9 mg, 3,00 mmol, 1,5 eq.) werden im Kolben vorgelegt. Auf 60 °C vortemperiertes Dodecanol (3728,0 mg, 20,0 mmol, 10,0 eq.) wird gravimetrisch zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde im Ölbad unter Rühren für 6 h auf 160 °C erhitzt, wobei eine Lösung des Lysins im Dodecanol beobachtet werden konnte. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und die viskose Flüssigkeit per HPLC und LC-MS untersucht.

4.4.12 Aldehyd-vermittelte reduktive Aminierung

Lysin-Monohydrat (328,42 mg, 2,0 mmol, 1,0 eq.) und K_2CO_3 (331,84 mg, 2,4 mmol, 1,2 eq.) werden in 15 ml VE-Wasser vorgelegt. Im Anschluss werden Octanol (414,0 μ l, 333,39 mg, 2,6 mmol, 1,3 eq.) und Octanal (62,0 μ l, 52,09 mg, 0,4 mmol, 0,2 eq.) zugegeben und das Gemisch durch Zugabe von 15 ml *t*-BuOH homogenisiert. Das Reaktionsgemisch wird im Anschluss bei 250 rpm auf 100 °C erhitzt und für 2 h gerührt.

4.4.13 Kopplung mit organischen Anhydriden

Lysin-Monohydrat (82,5 mg, 0,5 mmol) wird mit 1 M Natronlauge (0,5 ml, 0,5 mmol, 1,0 eq.) in Lösung gebracht. Citraconsäureanhydrid (84,07 mg, 67,0 μ L, 0,75 mmol, 1,5 eq.) wird in 2 ml Aceton vorgelegt und bei Raumtemperatur gerührt. Die Lysin-Lösung wird in Schritten von je 20 μ L langsam zur Anhydrid-Lösung zugetropft. Das Reaktionsgefäß wird verschlossen und die Lösung für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbe Lösung wird zentrifugiert, um den entstandenen Feststoff abzutrennen. Das überstehende, viskose gelbe Öl wird dekantiert und getrocknet. Das Produkt wurde als viskoses Öl erhalten (105,5 mg, 82 %).

4.4.14 Metathese von Anhydrid-modifizierten Aminosäuren

Das nach 4.4.13 mit Itaconsäureanhydrid erhaltene Produkt (1,0 mmol) wird in einer Mischung aus VE-Wasser (3 ml) und Aceton (8 ml) gelöst und mit 1-Octen (313,0 μ l, 2,0 mmol, 2,0 eq) und dem Metathese-Katalysator AquaMet (10,8 mg, 5 mol-%) versetzt. Die Mischung wird im Anschluss auf 40 °C erwärmt und für 24 h bei 250 rpm gerührt. Der Reaktionsfortschritt wird durch regelmäßige Entnahme von Proben (10 μ l) per HPLC-ELSD und LC-MS überwacht.

4.4.15 Diels-Alder-Reaktion von konjugierten Dienen und zyklischen Anhydriden

In einem Mikrowellengefäß werden das Dien (5,36 mmol, 1,0 eq.) und Citraconsäureanhydrid (543,0 μ l, 666,8 mg, 5,95 mmol, 1,1 eq.) bzw. Maleinsäureanhydrid (666,8 mg, 5,36 mmol, 1,0 eq.) vorgelegt und das Gefäß mit einem Septum verschlossen. Maleinsäureanhydrid wird zuvor in 1 ml THF gelöst. Das Reaktionsgemisch wird in die *CEM Discover* Mikrowelle eingebracht und dort für 30 min auf 120 °C erhitzt ($P_{max} = 100$ W, $p_{max} = 20$ bar). Das Produkt wird als gelbliches Öl erhalten.

Konjugierte Linolsäure und die entsprechenden Ester können ohne Zugabe von THF auch mit MSA verwendet werden. Die Reaktionsbedingungen müssen auf 160 °C für 30 min. angepasst werden.

4.4.16 Kondensation der Diels-Alder-Zwischenstufen mit Aminosäuren

Aminosäure (5,36 mmol, 1,0 eq.) wird mit NaOH (214,35 mg, 5,36 mmol, 1,0 eq.) in einer Mischung aus Wasser und Aceton vorgelegt und im Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wird im Eisbad gekühlt und das flüssige Rohprodukt aus der Diels-Alder-Reaktion von Myrcen und Anhydrid (4.4.15) langsam über einen Zeitraum von 15 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wird nach Beenden der Zugabe für weitere 4 h gerührt, das Lösungsmittel unter Unterdruck entfernt und die verbleibende viskose Mischung lyophilisiert. Das Produkt wird als pulveriger Feststoff erhalten. Die Reaktionsvorschrift wurde analog für alle Aminosäuren verwendet, für Glutaminsäure und Asparaginsäure wurde die doppelte Menge NaOH (428,70 mg, 10,72 mmol, 2,0 eq.) eingesetzt, Lysin wurde sowohl in äquimolarem Verhältnis als auch im Unterschuss (Verhältnis Aminosäure:Anhydrid 1:2) zur Synthese des Diacylierten Produkts eingesetzt.

CLA bzw. CLA-Ester-Anhydrid-Intermediate mussten wegen der hohen Viskosität bei Rt zunächst in THF aufgenommen werden, bevor eine Zugabe zur Aminosäure-Lösung erfolgen konnte.

4.4.17 Chemische Veresterung der *N*-Terpen-Anhydrid-Aminosäuren

Die aus 4.4.16 erhaltenen Produkte wurden zur Untersuchung des antimikrobiellen Effekts in kleinem Maßstab, ausgehend von gereinigtem Produkt, verestert. Die Substrate (0,25 mmol, 1,0 eq.) wurden in EtOH (5 ml) vorgelegt und langsam mit Chlor(trimethyl)silan (TMS-Cl, 5,0 mmol, 20,0 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h auf 50 °C erwärmt, die Reaktion im Anschluss auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde vor Einsatz in den antimikrobiellen Untersuchungen wie zuvor beschrieben präparativ aufgereinigt (vgl. 4.2.4).

4.4.18 Hydrolyse und Umesterung von Distelöl

Die Hydrolyse erfolgte in einem 2,5 l Rundkolben mit angeschlossenem Rückflusskühler. Es wurden 0,5 kg Distelöl (kommerzielles Gemisch aus dem Supermarkt), Kaliumhydroxid

(125 g, 2,22 mol) sowie 0,5 l Ethanol und 0,5 l Wasser eingewogen und die Reaktionsmischung angelehnt an WU ET. AL. bei 105 °C über 90 min refluxiert.²⁶⁴ Das Reaktionsgemisch wurde auf Rt abgekühlt und mit rauchender Salzsäure auf pH-Wert von ca. 2,5 eingestellt. Die Lösung wurde in einen 6 l Scheidetrichter überführt und die entstandenen Phasen separiert. Die obere, gelbliche zunächst trübe Ölphase wurde dreimal mit je 1 l VE-Wasser gewaschen, wobei die Ölphase zunehmend aufklarte und die Trübung in die wässrige Phase überging. Das verbleibende Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt ($p = 40$ mbar, $T = 50$ °C). Die Methanolyse erfolgte angelehnt an die Biodieselproduktion mit Natrium-Methanolat von RASHID ET. AL. in einem 1 l Rundkolben mit angeschlossenem Rückflusskühler und aufgesetztem Calciumchlorid-Röhrchen.²⁷² 500 g Distelöl (kommerzielle Mischung aus dem Supermarkt) wurden eingewogen und auf 60 °C vortemperiert. Eine frisch angesetzte Lösung von Natrium-Methanolat in 440 mL über Molsieb 3 Å getrocknetem Methanol (99,8 %) wird zum Öl hinzugegeben und unter Rühren auf 70 °C erhitzt. Die Suspension wird unter Rückfluss für 120 min gerührt, wobei eine Klärung der Reaktionsmischung beobachtet werden konnte. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktionsmischung abgekühlt und zur Phasentrennung in einen 2 l Scheidetrichter überführt. Die untere, Glycerin-haltige Phase wurde abgetrennt und die obere Phase erneut mit frisch angesetzter Natrium-Alkoholat-Suspension zur Reaktion gebracht. Nach erneuter Reaktion und anschließender Phasentrennung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

4.4.19 Anreicherung der Linolsäure

Die Anreicherung der ungesättigten Fettsäuren aus dem Rohprodukt nach 4.4.18 wurde in Anlehnung an die Arbeiten von HAYES ET AL. und WU ET AL. durchgeführt.^{264,267} Zur Anreicherung von Linolsäure wurde die gesamte erhaltenen Fettsäuremischung (480 g) mit ca. 480 g (8,00 mmol) Harnstoff und 2,5 l Ethanol in einem 5 l Becherglas versetzt und auf 70 °C erwärmt. Nach vollständiger Lösung des Harnstoffs wurde das Gemisch für weitere 60 min bei 70 °C gerührt, auf Raumtemperatur abgekühlt und für 48 h zur Co-Kristallisation von Harnstoff und Fettsäuren auf 4 °C gekühlt. Mit einem Büchnertrichter wurde der kristalline Feststoff abfiltriert und das Filtrat mit 2,5 l Wasser versetzt und mit 37 % Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Die entstandenen Phasen wurden separiert und die Ölphase dreimal mit je 1 l VE-Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das verbleibende Lösungsmittel entfernt. Die Isolierung der Linolsäuremethylester erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

4.4.20 Konjugation der Doppelbindungen zur CLA

Die Konjugation der freien Linolsäure wurde nach der Methode von CHIN ET. AL. durch Zugabe von NaOH durchgeführt.²⁶⁸ In einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Thermometer und Stickstoffanschluss wurde 150 g NaOH in 2900 g Ethylenglycol gelöst. Die erhaltene Fettsäure (250 g) wurde zu der Mischung gegeben und unter inerten Bedingungen für 2 h auf 180 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 320 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben und für weitere 15 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit HCl auf pH 4 eingestellt, in einen Scheidetrichter überführt und zweimal mit je 500 ml n-Hexan extrahiert. Die vereinten Hexan-Phasen wurden dreimal mit je 250 ml 5% NaCl-Lösung extrahiert, mit 3 Å Molsieb getrocknet und über einen Büchner-Trichter filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand mit Eis gekühlt, bevor das Vakuum belüftet wurde. Es wurden 172 g eines gelben Öls erhalten.

Die Konjugation der Linolsäuremethylester erfolgte nach abgewandeltem Protokoll mit Kaliummethanolat. Das erhaltene Produkt (4.4.19; 150 g) wurde unter Rühren für 1 h auf 120 °C erhitzt. Im Anschluss wurde die Temperatur auf 130 °C erhöht und KOMe (9 g, 35 % in MeOH) zum Öl zugegeben. Nach vollständigem Verdampfen des Methanols zeigte die Reaktionsmischung dunkelrote Farbe und wurde für weitere 3 h bei 130 °C gerührt. Nach Ablauf der Zeit wurde die hochviskose Mischung auf 100 °C abgekühlt, mit Phosphorsäure (8 ml, 85 % in H₂O) versetzt und langsam Vakuum angelegt. Durch Zugabe der Säure wurde die Viskosität der Lösung stark herabgesetzt, wodurch eine wässrige, klare Konsistenz erhalten wurde. Die Mischung wurde im Vakuum für 2 h bei 100 °C gerührt und im Anschluss auf Raumtemperatur abgekühlt.

5 Literaturverzeichnis

1. Fabry, B. Tenside. *Chemie unserer Zeit* 214–222 (1991) doi:10.1002/ciuz.19910250407.
2. Gottmann, C. Das Portrait: Michel Eugene Chevreul. *Chemie unserer Zeit* **13**, 176–183 (1979).
3. Thieme, C. Sodium Carbonates. in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 299–317 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000). doi:10.1002/14356007.a24_299.
4. Kanlayavattanakul, M. & Lourith, N. Lipopeptides in cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* **32**, 1–8 (2010).
5. Le Guenic, S., Chaveriat, L., Lequart, V., Joly, N. & Martin, P. Renewable Surfactants for Biochemical Applications and Nanotechnology. *J. Surfactants Deterg.* **22**, 5–21 (2019).
6. Farias, C. B. B. *et al.* Production of green surfactants: Market prospects. *Electron. J. Biotechnol.* **51**, 28–39 (2021).
7. Hampel, M., Moreno-Garrido, I., Sobrino, C., Lubián, L. M. & Blasco, J. Acute toxicity of LAS homologues in marine microalgae: Esterase activity and inhibition growth as endpoints of toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **48**, 287–292 (2001).
8. Staples, C. A., Klecka, G. M., Naylor, C. G. & Losey, B. S. C8- and C9-Alkylphenols and Ethoxylates: I. Identity, Physical Characterization, and Biodegradation Pathways Analysis. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* **14**, 1007–1024 (2008).
9. Routledge, E. J. & Sumpter, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 241–248 (1996).
10. Fetting, C. *The European Green Deal. ESDN Report* (ESDN Office, 2020).
11. Thormann, L., Neuling, U. & Kaltschmitt, M. Opportunities and challenges of the european green deal for the chemical industry: An approach measuring innovations in bioeconomy. *Resources* **10**, (2021).
12. Anastas, P. T. & Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice.* (Oxford University Press, 1998).
13. Holmberg, K. Surfactants. in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 1–56 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2019). doi:10.1002/14356007.a25_747.pub2.
14. Dörfler, H. D. *Grenzflächen und kooloid-disperse Systeme.* (Springer Verlag, 2002).
15. Moroi, Y. *Micelles.* *Micelles* (1992). doi:10.1007/978-1-4899-0700-4.

16. Emrich, G. *Micelles, Membranes, Microemulsions, and Monolayers*. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* vol. 193 (1996).
17. Wennerström, H. & Lindman, B. Micelles. *Physical chemistry of surfactant association*. *Phys. Rep.* **52**, 1–86 (1979).
18. Zana, R. Gemini (dimeric) surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1**, 566–571 (1996).
19. Mir, M. U. H. *et al.* Molecular interaction of cationic gemini surfactant with bovine serum albumin: A spectroscopic and molecular docking study. *Process Biochem.* **49**, 623–630 (2014).
20. Menger, F. M. & Littau, C. A. Gemini Surfactants: A New Class of Self-Assembling Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10083–10090 (1993).
21. Joondan, N., Jhaumeer-Laulloo, S., Caumul, P. & Akerman, M. Synthesis, physicochemical, and biological activities of novel N-acyl tyrosine monomeric and Gemini surfactants in single and SDS/CTAB–mixed micellar system. *J. Phys. Org. Chem.* **30**, 1–13 (2017).
22. Tripathy, D. B., Mishra, A., Clark, J. & Farmer, T. Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: A review. *Comptes Rendus Chim.* **21**, 112–130 (2018).
23. Branco, M. A., Pinheiro, L. & Faustino, C. Amino acid-based cationic gemini surfactant-protein interactions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **480**, 105–112 (2015).
24. Pérez, L., Pinazo, A., Pons, R. & Infante, M. Gemini surfactants from natural amino acids. *Adv. Colloid Interface Sci.* **205**, 134–155 (2014).
25. Zana, R. Bolaform and dimeric (gemini) surfactants. in *Specialist Surfactants* vol. 320 81–88 (Blackie Academic & Professional; Chapman & Hall, 1997).
26. Palhano Zanela, T. M., Latczuk, I. F., Muniz, E. C. & Almeida, C. A. P. Synthesis of bolaform surfactants from recycled poly(ethylene terephthalate) waste. *J. Clean. Prod.* **320**, 128762 (2021).
27. Ismail, D. A., Ahmed, H. M., Ismail, A. R. & Ahmad, S. M. Cationic bola form metallosurfactants based on isothiuronium, synthesis and anti-microbial activity. *Tenside, Surfactants, Deterg.* **57**, 375–381 (2020).
28. Dee, F. & Snell, C. T. 50th ANNIVERSARY FEATURE—Fifty Years of Detergent Progress. *Ind. Eng. Chem.* **50**, 48A-51A (1958).
29. Kocal, J. A., Vora, B. V. & Imai, T. Production of linear alkylbenzenes. *Appl. Catal. A*

- Gen.* **221**, 295–301 (2001).
30. Scheibel, J. J. The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. *J. Surfactants Deterg.* **7**, 319–328 (2004).
 31. Sun, B. *et al.* Sulfonation of alkylbenzene using liquid sulfonating agent in rotating packed bed: Experimental and numerical study. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **119**, 93–100 (2017).
 32. Ding, F., Zhou, X., Wu, Z. & Xing, Z. Synthesis of a Cleavable Vanillin-Based Polyoxyethylene Surfactant and Its Pilot Application in Cotton Fabric Pretreatment. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, 5494–5500 (2019).
 33. de Groot, W. H. *Sulphonation Technology in the Detergent Industry*. (Springer, 1991).
 34. Moldes, A. B. *et al.* Synthetic and bio-derived surfactants versus microbial biosurfactants in the cosmetic industry: An overview. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–23 (2021).
 35. Bujak, T., Nizioł-Lukaszewska, Z. & Wasilewski, T. Sodium Lauryl Sulfate vs. Sodium Coco Sulfate. Study of the Safety of Use Anionic Surfactants with Respect to Their Interaction with the Skin. *Tenside Surfactants Deterg.* **56**, 126–133 (2019).
 36. Bhadani, A. *et al.* Current perspective of sustainable surfactants based on renewable building blocks. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **45**, 124–135 (2020).
 37. Jimoh, A. A. & Lin, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **184**, 109607 (2019).
 38. Nalini, S. & Parthasarathi, R. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. *Bioresour. Technol.* **173**, 231–238 (2014).
 39. Lan, G. *et al.* Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. *Biochem. Eng. J.* **101**, 44–54 (2015).
 40. Van Bogaert, I. N. A., Zhang, J. & Soetaert, W. Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochem.* **46**, 821–833 (2011).
 41. Zerhusen, C. *et al.* Microbial Synthesis of Nonionic Long-Chain Sophorolipid Emulsifiers Obtained from Fatty Alcohol and Mixed Lipid Feeding. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **122**, 1–12 (2020).
 42. Fagerland, J., Finne-Wistrand, A. & Numata, K. Short one-pot chemo-enzymatic synthesis of l-lysine and l-alanine diblock co-oligopeptides. *Biomacromolecules* **15**, 735–743 (2014).
 43. Wang, N. *et al.* Green Synthesis, Characterization, and Properties of Acyl Lysine, Serine,

- Threonine, and Methionine Derived from Three Types of Natural Oils. *J. Surfactants Deterg.* **23**, 239–250 (2020).
44. Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. & Monsan, P. Enzymatic amidification for the synthesis of biodegradable surfactants: Synthesis of N-acylated hydroxylated amines. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* **5**, 13–17 (1998).
 45. Joondan, N., Jhaumeer Laulloo, S. & Caumul, P. Amino acids: Building blocks for the synthesis of greener amphiphiles. *J. Dispers. Sci. Technol.* **39**, 1550–1564 (2018).
 46. Bordes, R. & Holmberg, K. Amino acid-based surfactants - Do they deserve more attention? *Adv. Colloid Interface Sci.* **222**, 79–91 (2015).
 47. Christina Leung, T. W., Williams, D. H., C J Barna, J., Foti, S. & Oelrichs, P. B. Structural studies on the peptide moroidin from *laportea moroides*. *Tetrahedron* **42**, 3333–3348 (1986).
 48. Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C. & Ames, B. N. Antioxidant Activity of Carnosine, Homocarnosine, and Anserine Present in Muscle and Brain. *PNAS* **85**, 3175–3179 (1988).
 49. Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H. & Amano, H. A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible Met-enkephalin releaser. *Nature* **282**, 410–412 (1979).
 50. Wisner, A. *et al.* Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17979–17984 (2006).
 51. Kürti, L. & Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. (Elsevier Academic Press, 2005).
 52. Strecker, A. Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper; *Ann. der Chemie und Pharm.* **75**, 27–45 (1850).
 53. Asinger, F. & Offermanns, H. Syntheses with ketones, sulfur, and ammonia or amines at room temperature. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **6**, 907–919 (1967).
 54. Martens, J., Offermanns, H. & Scherberich, P. Einfache Synthese von racemischem Cystein. *Angew. Chemie* **93**, 680–683 (1981).
 55. Hoppe, B. & Martens, J. Aminosäuren - Herstellung und Gewinnung. *Chemie unserer Zeit* **18**, 73–86 (1984).
 56. Becker, J., Zelder, O., Häfner, S., Schröder, H. & Wittmann, C. From zero to hero- Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for l-lysine production. *Metab. Eng.* **13**, 159–168 (2011).
 57. Ikeda, M. & Nakagawa, S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: Features and

- impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 99–109 (2003).
58. Utagawa, T. Production of Arginine by Fermentation. *J. Nutr.* **134**, 2854–2857 (2004).
59. Hermann, T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104**, 155–172 (2003).
60. Kumagai, H. *Amino Acid Production. The Prokaryotes* (SpringerReference, 2006).
61. Ikeda, M. & Takeno, S. *Corynebacterium glutamicum Biology and Biotechnology. Corynebacterium glutamicum* (2019).
62. Park, J. H. & Lee, S. Y. Fermentative production of branched chain amino acids: A focus on metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 491–506 (2010).
63. Rodriguez, A. *et al.* Engineering Escherichia coli to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microb. Cell Fact.* **13**, 1–15 (2014).
64. D’Este, M., Alvarado-Morales, M. & Angelidaki, I. Amino acids production focusing on fermentation technologies – A review. *Biotechnol. Adv.* **36**, 14–25 (2018).
65. Infante, M. R., Pinazo, A. & Seguer, J. Non-conventional surfactants from amino acids and glycolipids: Structure, preparation and properties. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **123–124**, 49–70 (1997).
66. Ray, G. B., Ghosh, S. & Moulik, S. P. Physicochemical studies on the interfacial and bulk behaviors of sodium N-dodecanoyl sarcosinate (SDDS). *J. Surfactants Deterg.* **12**, 131–143 (2009).
67. Sreenu, M., Prasad, R. B. N., Sujitha, P. & Kumar, C. G. Synthesis, surface active properties and cytotoxicity of sodium N-Acyl prolines. *J. Oleo Sci.* **64**, 1175–1184 (2015).
68. Sreenu, M., Nayak, R. R., Prasad, R. B. N., Poornachandra, Y. & Kumar, C. G. Surface and Antimicrobial Properties of N-Palmitoyl Amino Acid–Based Surfactants. *J. Dispers. Sci. Technol.* **36**, 765–771 (2015).
69. Qiao, W. & Qiao, Y. The relationship between the structure and properties of amino acid surfactants based on glycine and serine. *J. Surfactants Deterg.* **16**, 821–828 (2013).
70. Taormina, P. J. & Dorsa, W. J. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on hams shortly after vacuum packaging by spray application of lauric arginate. *J. Food Prot.* **72**, 2517–2523 (2009).
71. Becerril, R., Manso, S., Nerin, C. & Gómez-Lus, R. Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control* **32**, 404–408 (2013).

72. Zhuang, S. *et al.* Effects of ethyl lauroyl arginate hydrochloride on microbiota, quality and biochemical changes of container-cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fillets during storage at 4 °C. *Food Chem.* **324**, 126886 (2020).
73. Bonnaud, M., Weiss, J. & McClements, D. J. Interaction of a food-grade cationic surfactant (Lauric Arginate) with food-grade biopolymers (pectin, carrageenan, xanthan, alginate, dextran, and chitosan). *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9770–9777 (2010).
74. Aznar, M., Gómez-Estaca, J., Vélez, D., Devesa, V. & Nerín, C. Migrants determination and bioaccessibility study of ethyl lauroyl arginate (LAE) from a LAE based antimicrobial food packaging material. *Food Chem. Toxicol.* **56**, 363–370 (2013).
75. Coronel-León, J. *et al.* Assessment of antimicrobial activity of Na⁺-lauroyl arginate ethylester (LAE®) against *Yersinia enterocolitica* and *Lactobacillus plantarum* by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Food Control* **63**, 1–10 (2016).
76. Kim, T. S. & Park, H. D. Lauroyl arginate ethyl: An effective antibiofouling agent applicable for reverse osmosis processes producing potable water. *J. Memb. Sci.* **507**, 24–33 (2016).
77. FDA. GRAS Notice GRN000164. (2005).
78. Journal, T. E. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to an application on the use of ethyl lauroyl arginate as a food additive. *EFSA J.* **5**, 1–27 (2007).
79. Hawkins, D. R., Rocabayera, X., Ruckman, S., Segret, R. & Shaw, D. Metabolism and pharmacokinetics of ethyl N α -lauroyl-L-arginate hydrochloride in human volunteers. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 2711–2715 (2009).
80. Ruckman, S. A., Rocabayera, X., Borzelleca, J. F. & Sandusky, C. B. Toxicological and metabolic investigations of the safety of N- α -Lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride (LAE). *Food Chem. Toxicol.* **42**, 245–259 (2004).
81. Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J. & Oliveira, R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 609–618 (2006).
82. Patel, D. V., Patel, M. N., Dholakia, M. S. & Suhagia, B. N. Green synthesis and properties of arginine derived complexes for assorted drug delivery systems: A review. *Sustain. Chem. Pharm.* **21**, 100441 (2021).
83. Strøm, M. B. *et al.* The pharmacophore of short cationic antibacterial peptides. *J. Med. Chem.* **46**, 1567–1570 (2003).
84. Haug, B. E., Stensen, W. & Svendsen, J. S. Application of the Suzuki-Miyaura cross-

- coupling to increase antimicrobial potency generates promising novel antibacterials. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **17**, 2361–2364 (2007).
85. Haug, B. E., Stensen, W., Kalaaji, M., Rekdal, Ø. & Svendsen, J. S. Synthetic antimicrobial peptidomimetics with therapeutic potential. *J. Med. Chem.* **51**, 4306–4314 (2008).
 86. Nagarajan, K. *et al.* Assessment of Antimicrobial Activity for the Smaller Chain Dipeptides and Tripeptides. *J. Cell Tissue Res.* **8**, 1265–1269 (2008).
 87. Isaksson, J. *et al.* A synthetic antimicrobial peptidomimetic (LTX 109): Stereochemical impact on membrane disruption. *J. Med. Chem.* **54**, 5786–5795 (2011).
 88. Makovitzki, A., Avrahami, D. & Shai, Y. Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15997–16002 (2006).
 89. Vallon-Eberhard, A. *et al.* Efficient clearance of *Aspergillus fumigatus* in murine lungs by an ultrashort antimicrobial lipopeptide, palmitoyl-lys-ala-DAla-lys. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3118–3126 (2008).
 90. Laverty, G., McLaughlin, M., Shaw, C., Gorman, S. P. & Gilmore, B. F. Antimicrobial activity of short, synthetic cationic lipopeptides. *Chem. Biol. Drug Des.* **75**, 563–569 (2010).
 91. Schotten, C. Ueber die Oxydation des Piperidins. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **17**, 2544–2547 (1884).
 92. Baumann, E. Ueber eine einfache Methode der Darstellung von Benzoesäureäthern. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **19**, 3218–3222 (1886).
 93. Krauch, H. & Kunz, W. *Reaktionen der organischen Chemie.* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1997).
 94. Zuffanti, S. Preparation of acyl chlorides with thionyl chloride. *J. Chem. Educ.* **25**, 481 (1948).
 95. Vilsmeier, A. & Haack, A. Über die Einwirkung von Halogenphosphor auf Alkylformanilide. Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer p-Alkylaminobenzaldehyde. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)* **60**, 119–122 (1927).
 96. Scott, M. D. & Spedding, H. Vilsmeier adducts of dimethylformamide. *J. Chem. Soc. C Org.* 1603 (1968) doi:10.1039/j39680001603.
 97. Montalbetti, C. A. G. N. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).
 98. Cade, J. A. & Gerrard, W. Action of Thionyl Chloride on Carboxylic Acids in Presence
-

- of Pyridine. *Nature* **172**, 29–29 (1953).
99. Bentley, T. W., Llewellyn, G. & McAlister, J. A. SN2 mechanism for alcoholysis, aminolysis, and hydrolysis of acetyl chloride. *J. Org. Chem.* **61**, 7927–7932 (1996).
100. Takehara, M., Yoshimura, I., Takizawa, K. & Yoshida, R. Surface active N-acylglutamate: I. Preparation of long chain N-acylglutamic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **49**, 157–161 (1972).
101. Takehara, M. Properties and applications of amino acid based surfactants. *Colloids and Surfaces* **38**, 149–167 (1989).
102. Sonntag, N. O. V. The Reactions of Aliphatic Acid Chlorides. *Chem. Rev.* **52**, 237–416 (1953).
103. Allen, C. F. H., Byers, J. R. & Humphlett, W. J. Oleoyl Chloride. *Org. Synth.* **37**, 66 (1957).
104. Schneider, W. & Diller, W. F. Phosgene. in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 623–632 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012). doi:10.1002/14356007.a19.
105. Borak, J. & Diller, W. F. Phosgene exposure: Mechanism of injury and treatment strategies. *J. Occup. Environ. Med.* **43**, 110–119 (2001).
106. El-Faham, A., Funosas, R. S., Prohens, R. & Albericio, F. COMU: A safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 9404–9416 (2009).
107. Subiros-Funosas, R., Acosta, G. A., El-Faham, A. & Albericio, F. Microwave irradiation and COMU: a potent combination for solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **50**, 6200–6202 (2009).
108. Jad, Y. E. *et al.* Peptide synthesis beyond DMF: THF and ACN as excellent and friendlier alternatives. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 2393–2398 (2015).
109. Basavaprabhu, Vishwanatha, T. M., Panguluri, N. R. & Sureshbabu, V. V. Propanephosphonic acid anhydride (T3P®) - A benign reagent for diverse applications inclusive of large-scale synthesis. *Synth.* **45**, 1569–1601 (2013).
110. Llanes García, A. T3P: A Convenient and Useful Reagent in Organic Synthesis. *Synlett* **2007**, 1328–1329 (2007).
111. Waghmare, A. A., Hindupur, R. M. & Pati, H. N. Propylphosphonic anhydride (T3P®): An expedient reagent for organic synthesis. *Rev. J. Chem.* **4**, 53–131 (2014).
112. Escher, R. & Bünnig, P. Synthesis of N-(1-Carboxy-5-aminopentyl) dipeptides as

- Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **3**, 277–278 (1986).
113. Klose, J. *et al.* 2-Propanephosphonic acid anhydride (T3P)-mediated segment coupling and head-to-tail cyclization of sterically hindered peptides. *Chem. Commun.* 1847–1848 (1999) doi:10.1039/a905021c.
114. Wissmann, H. & Kleiner, H.-J. New Peptide Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **19**, 133–134 (1980).
115. Dunetz, J. R., Xiang, Y., Baldwin, A. & Ringling, J. General and scalable amide bond formation with epimerization-prone substrates using T3P and pyridine. *Org. Lett.* **13**, 5048–5051 (2011).
116. Augustine, J. K., Atta, R. N., Ramappa, B. K. & Boodappa, C. Propylphosphonic anhydride (T3P®): A remarkably efficient reagent for the one-pot transformation of aromatic, heteroaromatic, and aliphatic aldehydes to nitriles. *Synlett* 3378–3382 (2009) doi:10.1055/s-0029-1218388.
117. Reddy, S. S., Reddy, B. R. P. & Reddy, P. V. G. Propylphosphonic anhydride (T3P®) catalyzed one-pot synthesis of α -aminonitriles. *Chinese Chem. Lett.* **26**, 739–743 (2015).
118. Coulthard, G., Unsworth, W. P. & Taylor, R. J. K. Propylphosphonic anhydride (T3P) mediated synthesis of β -lactams from imines and aryl-substituted acetic acids. *Tetrahedron Lett.* **56**, 3113–3116 (2015).
119. Augustine, J. K., Bombrun, A., Ramappa, B. & Boodappa, C. An efficient one-pot synthesis of coumarins mediated by propylphosphonic anhydride (T3P) via the Perkin condensation. *Tetrahedron Lett.* **53**, 4422–4425 (2012).
120. Milen, M. *et al.* T3P®-promoted Kabachnik-Fields reaction: An efficient synthesis of α -aminophosphonates. *Tetrahedron Lett.* **54**, 5430–5433 (2013).
121. Pinzón Martín, S. M., Medina, R. F., Iregui Castro, C. A., Rivera Monroy, Z. J. & García Castañeda, J. E. Novel Synthesis of N-Glycosyl Amino Acids Using T3P®: Propylphosphonic Acid Cyclic Anhydride as Coupling Reagent. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **24**, 291–298 (2018).
122. Ansorge-Schumacher, M. B. & Thum, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6475–6490 (2013).
123. de Beer, R. J. A. C. *et al.* Papain-catalyzed peptide bond formation: Enzyme-specific activation with guanidinophenyl esters. *ChemBioChem* **12**, 2201–2207 (2011).
124. Morihara, K. Using proteases in peptide synthesis. *Trends Biotechnol.* **5**, 164–170

- (1987).
125. Montet, D., Pina, M., Graille, J., Renard, G. & Grimaud, J. Synthesis of N Lauryloleamide by the *Mucor miehei* Lipase in an Organic Medium. *Fett Wiss. Technol. Sci. Technol.* **91**, 14–18 (1989).
 126. Montet, D. *et al.* Enzymatic Synthesis of N- ϵ -Acyllysines. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, 771–774 (1990).
 127. Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. & Monsan, P. Enzymatic synthesis of glycamide surfactants by amidification reaction. *Tetrahedron* **53**, 5185–5194 (1997).
 128. Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. & Monsan, P. Lipase-catalysed synthesis of biosurfactants by transacylation of N-methyl-glucamine and fatty-acid methyl esters. *Tetrahedron* **53**, 7629–7634 (1997).
 129. Valivety, R., Jauregi, P., Gill, I. & Vulfson, E. Chemo-Enzymatic Synthesis of Amino Acid-Based Surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 879–886 (1997).
 130. Morán, C., Rosa Infante, M. & Clapés, P. Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 2. Lipase-catalysed synthesis of 1-O-lauroyl-rac-glycerol-3-O-(N α -acetyl-L-amino acid) and 1,2-di-O-lauroyl-rac-glycerol-3-O-(N α -acetyl-L-amino acid) derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2**, 1124–1134 (2002).
 131. Goujard, L., Figueroa, M. C. & Villeneuve, P. Chemo-enzymatic synthesis of N -arachidonoyl glycine. *Biotechnol. Lett.* **26**, 1211–1216 (2004).
 132. Husson, E. *et al.* Enzymatic acylation of polar dipeptides: Influence of reaction media and molecular environment of functional groups. *Process Biochem.* **44**, 428–434 (2009).
 133. Piera, E., Infante, M. R. & Clapés, P. Chemo-enzymatic synthesis of arginine-based gemini surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 323–331 (2000).
 134. Bernal, C., Guzman, F., Illanes, A. & Wilson, L. Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts. *Food Chem.* **239**, 189–195 (2018).
 135. Wardenga, R., Lindner, H. A., Hollmann, F., Thum, O. & Bornscheuer, U. Increasing the synthesis/hydrolysis ratio of aminoacylase 1 by site-directed mutagenesis. *Biochimie* **92**, 102–109 (2010).
 136. Mitta, M. *et al.* The primary structure of porcine aminoacylase 1 deduced from cDNA sequence. *J. Biochem.* **112**, 737–742 (1992).
 137. Gentzen, I., Löffler, H. & Schneider, F. Comparison with the Pig Kidney Enzyme. *Z. Naturforsch* **35c**, 544–550 (1980).

138. Kimura, Y., Kobayashi, Y., Adachi, S. & Matsuno, R. Aminoacylase-Catalyzed Synthesis of N-Acyl Amino Acid from Fatty Acid or Its Ethyl Ester and Amino Acid. *Biochem. Eng. 2001* 109–111 (1992) doi:10.1007/978-4-431-68180-9_27.
139. Kosáry, J., Sisak, C. S., Szajani, B. & Boross, L. Acylation of amino acids by aminoacylase in non-conventional media. *Biocatal. Biotransformation* **11**, 329–337 (1994).
140. Yokoigawa, K., Sato, E., Esaki, N. & Soda, K. Enantioselective synthesis of N-acetyl-L-methionine with aminoacylase in organic solvent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 287–289 (1994).
141. Ferjancic-Biagini, A., Giardina, T., Reynier, M. & Puigserver, A. Hog kidney and intestine aminoacylase-catalyzed acylation of L-methionine in aqueous media. *Biocatal. Biotransformation* **15**, 313–323 (1997).
142. Wada, E. *et al.* Enzymatic synthesis of N-acyl-L-amino acids in a glycerol-water system using acylase I from pig kidney. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **79**, 41–46 (2002).
143. Koreishi, M. *et al.* A novel acylase from *Streptomyces mobaraensis* that efficiently catalyzes hydrolysis/synthesis of capsaicins as well as N-acyl-L-amino acids and N-acyl-peptides. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 72–78 (2006).
144. Koreishi, M., Kawasaki, R., Imanaka, H., Imamura, K. & Nakanishi, K. A novel ϵ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis* for synthesis of N ϵ -acyl-L-lysines. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **82**, 631–637 (2005).
145. Koreishi, M. *et al.* Purification, characterization, molecular cloning, and expression of a new aminoacylase from *streptomyces mobaraensis* that can hydrolyze N-(Middle/Long)-chain-fatty-acyl-L-amino acids as well as N-Short-chain-acyl-L- amino acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1940–1947 (2009).
146. Koreishi, M. *et al.* Efficient N ϵ -lauroyl-L-lysine production by recombinant ϵ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *J. Biotechnol.* **141**, 160–165 (2009).
147. Dettori, L. *et al.* An aminoacylase activity from *Streptomyces ambofaciens* catalyzes the acylation of lysine on α -position and peptides on N-terminal position. *Eng. Life Sci.* **18**, 589–599 (2018).
148. Dettori, L. *et al.* N-A-acylation of lysine catalyzed by immobilized aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens* in aqueous medium. *Microporous Mesoporous Mater.* **267**, 24–34 (2018).
149. Bourkaib, M. C. *et al.* N-acylation of L-amino acids in aqueous media: Evaluation of the

- catalytic performances of *Streptomyces ambofaciens* aminoacylases. *Enzyme Microb. Technol.* **137**, (2020).
150. Takakura, Y. & Asano, Y. Purification, characterization, and gene cloning of a novel aminoacylase from *Burkholderia* sp. strain LP5_18B that efficiently catalyzes the synthesis of N-lauroyl-L-amino acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **83**, 1964–1973 (2019).
151. Breitmaier, E. *Terpene*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005). doi:10.1002/9783527623693.
152. Eggersdorfer, M. Terpenes. in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 29–45 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012). doi:10.1002/14356007.a26.
153. Šobotník, J. *et al.* (E,E)- α -farnesene, an alarm pheromone of the termite *Prorethia* *canalifrons*. *J. Chem. Ecol.* **34**, 478–486 (2008).
154. Ekanayake Mudiyansele, S., Hamburger, M., Elsner, P. & Thiele, J. J. Ultraviolet A induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids In Vitro and In Vivo. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 915–922 (2003).
155. Stepanyuk, A. & Kirschning, A. Synthetic terpenoids in the world of fragrances: Iso E Super® is the showcase. *Beilstein J. Org. Chem.* **15**, 2590–2602 (2019).
156. Dickschat, J. S. Bacterial Diterpene Biosynthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **58**, 15964–15976 (2019).
157. Oldfield, E. & Lin, F. Y. Terpene biosynthesis: Modularity rules. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 1124–1137 (2012).
158. Behr, A. & Johnen, L. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: A critical review. *ChemSusChem* **2**, 1072–1095 (2009).
159. Kim, E. M., Eom, J. H., Um, Y., Kim, Y. & Woo, H. M. Microbial synthesis of myrcene by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 4606–4612 (2015).
160. Wu, J., Cheng, S., Cao, J., Qiao, J. & Zhao, G. R. Systematic Optimization of Limonene Production in Engineered *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 7087–7097 (2019).
161. Pattharaprachayakul, N., Lee, H. J., Incharoensakdi, A. & Woo, H. M. Evolutionary Engineering of Cyanobacteria to Enhance the Production of α -Farnesene from CO₂. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 13658–13664 (2019).
162. Marmulla, R. & Harder, J. Microbial monoterpene transformations-a review. *Front. Microbiol.* **5**, 1–14 (2014).

163. Wilbon, P. A., Chu, F. & Tang, C. Progress in renewable polymers from natural terpenes, terpenoids, and rosin. *Macromol. Rapid Commun.* **34**, 8–37 (2013).
164. Zhang, S. *et al.* Investigation on synthesis and application performance of elastomers with biogenic myrcene. *Ind. Eng. Chem. Res.* **58**, 12845–12853 (2019).
165. Diels, O. & Alder, K. Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. *Justus Liebig's Ann. der Chemie* **460**, 98–122 (1928).
166. Diels, O. & Alder, K. Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. XII. Mitteilung. („Dien-Synthesen“ sauerstoffhaltiger Heteroringe. 2. Dien-Synthesen des Furans.). *Justus Liebig's Ann. der Chemie* **490**, 243–257 (1928).
167. Carey, F. A. & Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry. Advanced Organic Chemistry - Part A: Structure and Mechanisms* (Springer US, 2007). doi:10.1007/978-0-387-44899-2.
168. Dewar, M. J. S., Stewart, J. J. P. & Olivella, S. Mechanism of the Diels-Alder Reaction: Reactions of Butadiene with Ethylene and Cyanoethylenes. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5771–5779 (1986).
169. Kobuke, Y., Takuji, S. & Furukawa, J. The Role of Attractive Interactions on Endo-Exo Stereoselectivity of Diels-Alder-Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **10**, 3633–3635 (1972).
170. Kirmse, W. & Mönch, D. Umlagerungen von 1,4,4- und 2,2,5-Trimethylbicyclo[3.2.1]oct-6-yl-Kationen. *Chem. Ber.* **124**, 237–240 (1991).
171. Biermann, U., Butte, W., Eren, T., Haase, D. & Metzger, J. O. Regio- and stereoselective Diels-Alder additions of maleic anhydride to conjugated triene fatty acid methyl esters. *European J. Org. Chem.* 3859–3862 (2007) doi:10.1002/ejoc.200700243.
172. Loupy, A. & Monteux, D. Asymmetric Diels-Alder: Monobenzylated isosorbide and isomannide as highly effective chiral auxiliaries. *Tetrahedron Lett.* **37**, 7023–7026 (1996).
173. Claus, M. *et al.* Cyclopentadiene and Cyclopentene. in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 1–16 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016). doi:10.1002/14356007.a08_227.pub2.
174. Lukus, L. J. & Houk, K. N. The Influence of Steric Interactions on Endo Stereoselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **18**, 4606–4607 (1971).
175. Moreno, M. *et al.* Sustainable and efficient methodology for CLA synthesis and identification. *Green Chem.* **14**, 2584–2594 (2012).
176. Blasi, F. *et al.* Improved HRGC separation of cis, trans CLA isomers as diels-alder

- adducts of alkyl esters. *J. Chromatogr. Sci.* **49**, 379–383 (2011).
177. Oskooie, H. A. Diels-Alder reaction of myrcene with carbonyl containing dienophiles supported on silica gel under microwave irradiation. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **179**, 1165–1167 (2004).
178. Nicolaou, K. C., Snyder, S. A., Montagnon, T. & Vassilikogiannakis, G. The Diels-Alder reaction in total synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **41**, 1668–1698 (2002).
179. Pacheco, J. J. & Davis, M. E. Synthesis of terephthalic acid via Diels-Alder reactions with ethylene and oxidized variants of 5-hydroxymethylfurfural. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8363–8367 (2014).
180. Padwa, A., Dimitroff, M., Waterson, A. G. & Wu, T. Diels-Alder Reaction of 2-Amino-Substituted Furans as a Method for Preparing Substituted Anilines. *J. Org. Chem.* **62**, 4088–4096 (1997).
181. Braun, J. C. & Fisher, G. S. Diels-Alder Reactions of α -Terpinene with α,β -Unsaturated Nitriles. *J. Org. Chem.* **30**, 1478–1481 (1965).
182. Littmann, E. R. Terpene-Maleic Anhydride Resins. *Ind. Eng. Chem.* **28**, 1150–1152 (1936).
183. Galaverna, R., Fernandes, L. P., Browne, D. L. & Pastre, J. C. Continuous flow processing as a tool for the generation of terpene-derived monomer libraries. *React. Chem. Eng.* **4**, 362–367 (2019).
184. Hornung, C. H., Álvarez-Diéguéz, M. Á., Kohl, T. M. & Tsanaktsidis, J. Diels–Alder reactions of myrcene using intensified continuous-flow reactors. *Beilstein J. Org. Chem.* **13**, 120–126 (2017).
185. Yang, X. *et al.* Novel renewable resource-based UV-curable copolymers derived from myrcene and tung oil: Preparation, characterization and properties. *Ind. Crops Prod.* **63**, 17–25 (2015).
186. Walker, D. & Robert, E. Unsaturated Surfactants. (2004).
187. Tabor, R., Bernhardt, R. J., Luxem, F. J., Yao, C. & Wallace, G. J. Surfactants and Solvents containing Diels-Alder Adducts. vol. 1 (2012).
188. Bordes, R., Tropsch, J. & Holmberg, K. Counterion specificity of surfactants based on dicarboxylic amino acids. *J. Colloid Interface Sci.* **338**, 529–536 (2009).
189. Dalu, F. *et al.* A catalyst-free, waste-less ethanol-based solvothermal synthesis of amides. *Green Chem.* **20**, 375–381 (2018).
190. Srinivas, K. V. N. S. & Das, B. A highly convenient, efficient, and selective process for

- preparation of esters and amides from carboxylic acids using Fe³⁺-K-10 montmorillonite clay. *J. Org. Chem.* **68**, 1165–1167 (2003).
191. Choudhary, V. R., Patil, K. Y. & Jana, S. K. Acylation of aromatic alcohols and phenols over InCl₃/ montmorillonite K-10 catalysts. *J. Chem. Sci.* **116**, 175–177 (2004).
192. Miyazawa, T., Horimoto, T. & Tanaka, K. Kinetically controlled peptide synthesis mediated by papain using the carbamoylmethyl ester as an acyl donor. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **20**, 371–376 (2014).
193. Gardossi, L., Bianchi, D. & Klibanov, A. M. Selective Acylation of Peptides Catalyzed by Lipases in Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6328–6329 (1991).
194. Joubioux, F. Le *et al.* The control of Novozym® 435 chemoselectivity and specificity by the solvents in acylation reactions of amino-alcohols. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **95**, 99–110 (2013).
195. Hernández, J. G., Frings, M. & Bolm, C. Mechanochemical Enzymatic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols under Ball-Milling Conditions. *ChemCatChem* **8**, 1769–1772 (2016).
196. Ardila-Fierro, K. J. *et al.* Papain-catalysed mechanochemical synthesis of oligopeptides by milling and twin-screw extrusion: Application in the Juliá-Colonna enantioselective epoxidation. *Green Chem.* **20**, 1262–1269 (2018).
197. Turhanen, P. A., Leppanen, J. & Vepsäläinen, J. J. Green and efficient esterification method using dried Dowex H⁺/NAI approach. *ACS Omega* **4**, 8974–8984 (2019).
198. Haeger, G. *et al.* Novel recombinant aminoacylase from *Paraburkholderia monticola* DSM 100849 for synthesis of N-lauroyl-amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2023).
199. Serjeant, E. P. & Dempsey, B. *Ionisation Constant of Organic Acids in Aqueous Solution.* (Elsevier Science & Technology, 1979).
200. Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics.* (CRC Press, 2005).
201. Morán, M. C. *et al.* “Green” amino acid-based surfactants. *Green Chem.* **6**, 233–240 (2004).
202. Wang, C. *et al.* Effects of fatty acyl chains on the interfacial rheological behaviors of amino acid surfactants. *J. Mol. Liq.* **325**, 114823 (2021).
203. Sánchez-Vioque, R., Bagger, C. L., Larré, C. & Guéguen, J. Emulsifying properties of acylated rapeseed (*Brassica napus* L.) peptides. *J. Colloid Interface Sci.* **271**, 220–226 (2004).

204. Mehta, D. S. & Shastri, M. Process for the synthesis of highly pure cationic surfactant products. vol. 2 (2020).
205. Zhang, Y. *et al.* Solvent-Free Lipase-Catalyzed Synthesis: Unique Properties of Enantiopure d - And l - spartates and Their Complexation. *Biomacromolecules* **17**, 362–370 (2016).
206. Köhler, V. *et al.* Synthetic cascades are enabled by combining biocatalysts with artificial metalloenzymes. *Nat. Chem.* **5**, 93–99 (2013).
207. Park, C. & Raines, R. T. Quantitative analysis of the effect of salt concentration on enzymatic catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11472–11479 (2001).
208. Ru, M. T. *et al.* On the salt-induced activation of lyophilized enzymes in organic solvents: Effect of salt kosmotropicity on enzyme activity. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1565–1571 (2000).
209. Fu, Y., Deering, A. J., Bhunia, A. K. & Yao, Y. Pathogen biofilm formation on cantaloupe surface and its impact on the antibacterial effect of lauroyl arginate ethyl. *Food Microbiol.* **64**, 139–144 (2017).
210. Gatfield, I. L., Hilmer, J. M. & Bertram, H. J. The use of natural fatty acids for the biotechnological production of natural flavour compounds: Application to ethyl trans-2,cis-4-decadienoate. *Chimia (Aarau).* **55**, 397–400 (2001).
211. Sánchez-Muñoz, G. K. *et al.* Solvent-Free Lipase-Catalyzed Transesterification of Alcohols with Methyl Esters Under Vacuum-Assisted Conditions. *ChemistrySelect* **7**, (2022).
212. Larios, A., García, H. S., Oliart, R. M. & Valerio-Alfaro, G. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 373–376 (2004).
213. Arcens, D., Grau, E., Grelier, S., Cramail, H. & Peruch, F. Impact of Fatty Acid Structure on CALB-Catalyzed Esterification of Glucose. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **122**, 2–7 (2020).
214. Vijayakumar, G. R., Lohith, K., Somashekar, B. R. & Divakar, S. Lipase catalyzed synthesis of L-alanyl, L-leucyl and L-phenylalanyl esters of D-glucose using unprotected amino acids. *Biotechnol. Lett.* **26**, 1323–1328 (2004).
215. Kanerva, L. T., Csomós, P., Sundholm, O., Bernáth, G. & Fülöp, F. Approach to highly enantiopure β -amino acid esters by using lipase catalysis in organic media. *Tetrahedron Asymmetry* **7**, 1705–1716 (1996).

216. McCabe, R. W. & Taylor, A. Synthesis of novel polyurethane polyesters using the enzyme *Candida Antarctica* lipase B. *Green Chem.* **6**, 151–155 (2004).
217. Gandhi, N. N. Applications of lipase. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 621–634 (1997).
218. Bernardes, O. L., Bevilaqua, J. V., Leal, M. C. M. R., Freire, D. M. G. & Langone, M. A. P. Biodiesel Fuel Production by the Transesterification Reaction of Soybean Oil Using Immobilized Lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **136**, 105–114 (2007).
219. Heathcock, C. H. The Aldol Reaction: Acid and General Base Catalysis. in *Comprehensive Organic Synthesis* 133–179 (Elsevier, 1991). doi:10.1016/B978-0-08-052349-1.00027-5.
220. Buddrus, J. *Buddrus Grundlagen der Organischen Chemie 4. Auflage.* (2011).
221. Pinggen, D. & Vogt, D. Amino-alcohol cyclization: Selective synthesis of lactams and cyclic amines from amino-alcohols. *Catal. Sci. Technol.* **4**, 47–52 (2014).
222. Choi, J., MacArthur, A. H. R., Brookhart, M. & Goldman, A. S. Dehydrogenation and related reactions catalyzed by iridium pincer complexes. *Chem. Rev.* **111**, 1761–1779 (2011).
223. Hamid, M. H. S. A., Slatford, P. A. & Williams, J. M. J. Borrowing hydrogen in the activation of alcohols. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1555–1575 (2007).
224. Valot, F., Fache, F., Jacquot, R., Spagnol, M. & Lemaire, M. Gas-phase selective N-alkylation of amines with alcohols over γ - alumina. *Tetrahedron Lett.* **40**, 3689–3692 (1999).
225. Liu, H., Chuah, G. K. & Jaenicke, S. N-alkylation of amines with alcohols over alumina-entrapped Ag catalysts using the ‘borrowing hydrogen’ methodology. *J. Catal.* **292**, 130–137 (2012).
226. Abdukader, A., Jin, H., Cheng, Y. & Zhu, C. Rhenium-catalyzed amination of alcohols by hydrogen transfer process. *Tetrahedron Lett.* **55**, 4172–4174 (2014).
227. Shimizu, K. I. *et al.* N-alkylation of ammonia and amines with alcohols catalyzed by Ni-loaded CaSiO₃. *Catal. Today* **232**, 134–138 (2014).
228. Yan, T., Feringa, B. L. & Barta, K. Direct N-alkylation of unprotected amino acids with alcohols. *Sci. Adv.* **3**, 1–8 (2017).
229. Dominguez-Huerta, A., Perepichka, I. & Li, C.-J. Catalytic N-modification of α -amino acids and small peptides with phenol under bio-compatible conditions. *Commun. Chem.* **1**, 1–7 (2018).
230. Lu, X. H. *et al.* Solid base catalyzed highly efficient N-alkylation of amines with alcohols

- in a solvent-free system. *Catal. Commun.* **55**, 1–5 (2014).
231. Li, Q. Q., Xiao, Z. F., Yao, C. Z., Zheng, H. X. & Kang, Y. B. Direct Alkylation of Amines with Alcohols Catalyzed by Base. *Org. Lett.* **17**, 5328–5331 (2015).
232. Elangovan, S. *et al.* Efficient and selective N-alkylation of amines with alcohols catalysed by manganese pincer complexes. *Nat. Commun.* **7**, 1–8 (2016).
233. Matzel, P., Gand, M. & Höhne, M. One-step asymmetric synthesis of (R)- and (S)-rasagiline by reductive amination applying imine reductases. *Green Chem.* **19**, 385–389 (2017).
234. Scheller, P. N., Lenz, M., Hammer, S. C., Hauer, B. & Nestl, B. M. Imine Reductase-Catalyzed Intermolecular Reductive Amination of Aldehydes and Ketones. *ChemCatChem* **7**, 3239–3242 (2015).
235. Fuchs, S. *et al.* Synthesis of Industrial Primary Diamines via Intermediate Diols – Combining Hydroformylation, Hydrogenation and Amination. *ChemCatChem* **10**, 4126–4133 (2018).
236. Xu, Q., Li, Q., Zhu, X. & Chen, J. Green and scalable aldehyde-catalyzed transition metal-free dehydrative N-alkylation of amides and amines with alcohols. *Adv. Synth. Catal.* **355**, 73–80 (2013).
237. Morán, C., Infante, M. R. & Clapés, P. Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of rac-1-O-(N α -acetyl-L-aminoacyl)glycerol derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1**, 2063–2070 (2001).
238. Shriner, R. L., Ford, S. G. & Roll, L. J. Itaconic Anhydride and Itaconic Acid. *Org. Synth.* **11**, 70 (1931).
239. Crowell, J. H. PRODUCTION OF ITACONIC AND CITRACONIC ANHYDRIDES. 1–3 (1941).
240. Quod Erat Demonstrandum: Large scale demonstration for the bio-based bulk chemicals BDO and IA aiming at cost reduction and improved sustainability. *ETICA EU Project* 1–89 (2017).
241. Alas, M., Gubelmann, M. & Popa, J.-M. Process for producing itaconic anhydride. (1993).
242. Galanti, M. C. & Galanti, A. V. Kinetic study of the isomerization of itaconic anhydride to citraconic anhydride. *J. Org. Chem.* **47**, 1572–1574 (1982).
243. Dixon, H. B. F. & Perham, R. N. Reversible Blocking of Amino-Groups with Citraconic Anhydride. *Biochem. J.* **109**, 312–314 (1968).

244. Atassi, M. Z. & Habeeb, A. F. S. A. Reaction of Proteins with Citraconic Anhydride. *Methods Enzymol.* **25**, 546–553 (1972).
245. Cruickshank, W. H., Malchy, B. L. & Kaplan, H. Diagonal Chromatography for the Selective Purification of Tyrosyl Peptides. *Can. J. Biochem.* **52**, 1013–1017 (1974).
246. Hong, S. H. & Grubbs, R. H. Highly active water-soluble olefin metathesis catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3508–3509 (2006).
247. Skowerski, K. *et al.* Highly active catalysts for olefin metathesis in water. *Catal. Sci. Technol.* **2**, 2424–2427 (2012).
248. Morales-Morales, D. Pincer Complexes: Applications in Catalysis. *ChemInform* **36**, 338–346 (2005).
249. Gunanathan, C. & Milstein, D. Bond activation and catalysis by ruthenium pincer complexes. *Chem. Rev.* **114**, 12024–12087 (2014).
250. Iskander, M. F., El Sayed, L. & Lasheen, M. A. Coordination compounds of hydrazine derivatives with transition metals. X. Cobalt(II) aroylhydrazone complexes. *Inorganica Chim. Acta* **16**, 147–157 (1976).
251. Bolm, C. & Hernández, J. G. From Synthesis of Amino Acids and Peptides to Enzymatic Catalysis: A Bottom-Up Approach in Mechanochemistry. *ChemSusChem* **11**, 1410–1420 (2018).
252. Takehara, M., Moriyuki, H., Yoshimura, I. & Yoshida, R. Surface active N-acetylglutamate: II. Physicochemical properties of long chain N-acetylglutamic acids and their sodium salts. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **49**, 143–150 (1972).
253. Tabohashi, T. *et al.* Solution properties of amino acid-type new surfactant. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **20**, 79–86 (2001).
254. Marchand, C. H. *et al.* Biochemical disclosure of the mycolate outer membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **194**, 587–597 (2012).
255. Pérez, L. *et al.* Cationic Surfactants Based on Arginine-Phenylalanine and Arginine-Tryptophan: Synthesis, Aggregation Behavior, Antimicrobial Activity, and Biodegradation. *Pharmaceutics* **14**, (2022).
256. Park, Y. & Hahn, K.-S. Antimicrobial Peptides (AMPs) Peptide Structure and Mode of Action. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 507–516 (2005).
257. Dennison, S. R. *et al.* Interactions of an anionic antimicrobial peptide with *Staphylococcus aureus* membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 1006–1010 (2006).

258. Czakaj, A., Jarek, E., Krzan, M. & Warszyński, P. Ethyl lauroyl arginate, an inherently multicomponent surfactant system. *Molecules* **26**, (2021).
259. Stensen, W. *et al.* Short Cationic Antimicrobial Peptides Display Superior Antifungal Activities toward Candidiasis and Onychomycosis in Comparison with Terbinafine and Amorolfine. *Mol. Pharm.* **13**, 3595–3600 (2016).
260. Strøm, M. B., Rekdal, Ø. & Svendsen, J. S. Antimicrobial activity of short arginine- and tryptophan-rich peptides. *J. Pept. Sci.* **8**, 431–437 (2002).
261. Ma, D. W. L., Wierzbicki, A. A., Field, C. J. & Clandinin, M. T. Preparation of conjugated linoleic acid from safflower oil. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**, 729–730 (1999).
262. Philippaerts, A., Goossens, S., Jacobs, P. A. & Sels, B. F. Catalytic production of conjugated fatty acids and oils. *ChemSusChem* **4**, 684–702 (2011).
263. Saebo, A., Skarie, C., Jerome, D. & Haroldsson, G. US_6410761_B1_Conjugated Linoeleic acid compositions and methods of making same.pdf. (2002).
264. Wu, M., Ding, H., Wang, S. & Xu, S. Optimizing conditions for the purification of linoleic acid from sunflower oil by urea complex fractionation. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **85**, 677–684 (2008).
265. Ibrahim, W., Iverson, J. & Firestone, D. Safflower Oil: Physical and Chemical Properties, and Fatty Acid Composition. *J. AOAC Int.* **47**, 776–780 (1964).
266. Meyer-Pitroff, R., Alexander, D. & Lachenmaier, J. *Pflanzenölbetriebe Blockheizkraftwerke Teil 2*. (2002).
267. Hayes, D. G., Bengtsson, Y. C., Van Alstine, J. M. & Setterwall, F. Urea complexation for the rapid, ecologically responsible fractionation of fatty acids from seed oil. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**, 1403–1409 (1998).
268. Chin, S. F., Liu, W., Storkson, J. M., Ha, Y. L. & Pariza, M. W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* **5**, 185–197 (1992).
269. Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. W. & Pariza, M. W. Mammary Cancer Prevention by Conjugated Dienoic Derivative of Linoleic Acid. *Cancer Res.* **51**, 6118–6124 (1991).
270. Contijoch Mestres, A., Rodriguez Martinez, F. J. & Seguer Bonaventura, J. Process for the preparation of cationic surfactants. (2001).
271. Herzog, S. & Dehnert, J. Eine rationelle anaerobe Arbeitsmethode. *Zeitschrift für Chemie* **4**, 1–11 (2010).

272. Rashid, U. & Anwar, F. Production of biodiesel through base-catalyzed transesterification of safflower oil using an optimized protocol. *Energy and Fuels* **22**, 1306–1312 (2008).

6 Anhang

6.1 Verwendete Chemikalien

Substanz	Reinheit	CAS-Nummer	Hersteller
(10E,12Z)-Linolsäuremethylester	99%	21870-97-3	BioMol
(9E,11Z)-Linolsäuremethylester	99%	13058-52-1	BioMol
1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dodec-5-en	≥ 98%	5807-14-7	TCI
1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en	99%	3001-72-7	FisherScientific
1-Ethylimidazol	≥ 98%	7098-07-9	TCI
1-Hexen	99%	592-41-6	Acros Organics
1-Octen	99%	111-66-0	Acros Organics
2-Amin-4,6-Hydroxypyrimidin	98%	56-09-7	Sigma Aldrich
2-Ethylimidazol	98%	1072-62-4	TCI
2-Furansäure	≥ 98%	88-14-2	Alfa Aesar
2-Methylfuran	≥ 99%	534-22-5	Merck
2-Methyl-Tetrahydrofuran	≥ 98%	96-47-9	Merck
4-Chlorbenzylamin	98%	104-86-9	Sigma Aldrich
4-Nitrobenzoyl Chlorid	98%	122-04-3	Alfa Aesar
5-Ethyl-L-Glutamat	≥ 98%	1119-33-1	TCI
5-Methyl-L-Glutamat	≥ 97%	1499-55-4	TCI
6-Aminoindazol	98%	6967-12-0	BLD Phamatech
9-Fluorenmethoxycarbonylchlorid	98%	28920-43-6	Alfa Aesar
Aceton	99%	67-64-1	FisherScientific
Acetonitril	99%	75-05-8	FisherScientific
Aluminiumoxid, basisch	98%	1344-28-1	FisherScientific
Amberlyst 15 nass	-	9037-24-5	FisherScientific
Amberlyst 15 trocken	-	9037-24-5	FisherScientific
Ameisensäure	99%	64-18-6	Acros Organics
ArgOEt · HCl	-	36589-29-4	Bachem
Benzoylchlorid	≥ 99%	98-88-4	CarlRoth
Benzylamin	99%	100-46-9	Sigma Aldrich
Borsäure	≥ 99%	10043-35-3	FisherScientific
Bromelain	-	9001-00-7	Carl Roth
Calciumoxid	97%	1305-78-8	FisherScientific

Substanz	Reinheit	CAS-Nummer	Hersteller
Citraconsäure Anhydrid	97%	616-02-4	FisherScientific
Citronellol	95%	106-22-9	FisherScientific
COMU	97%	1075198-30-9	Acros Organics
Cyrene	≥ 98,5%	53716-82-8	Sigma Aldrich
Decanal	≥ 97,5%	112-31-2	TCI
Deuteriumoxid	≥ 99,8%	7789-20-0	TCI
Dicyclohexylamin	99%	101-83-7	Merck
Diethyl L-Glutamat · HCl	≥ 98%	1118-89-4	TCI
Diethylether	≥ 99%	60-29-7	FisherScientific
Dimethyl L-Glutmat · HCl	≥ 98%	23150-65-4	TCI
Di-<i>n</i>-Butylamin	99%	111-92-2	Acros Organics
Di-<i>t</i>-Butyl-Dicarbonat	99%	24424-99-5	FisherScientific
DMSO	≥ 99,5%	67-68-5	Carl Roth
Dodecanoylchlorid	98%	112-16-3	FisherScientific
Dodecyltrimethylammonium			
Bromid	≥ 98%	1119-94-4	TCI
Dowex-50Wx8-200 Mesh			
Ionentauscher	-	11119-67-8	FisherScientific
D-Phenylalanin	>98,5%	673-06-3	Carl Roth
Ethanol	96%	64-17-5	Carl Roth
Ethanolamin	99%	141-43-5	FisherScientific
Ethylacetat	99%	141-78-6	FisherScientific
Farnesen	-	502-61-4	Sigma Aldrich
Ficin	-	9001-33-6	TCI
Fmoc-L-Asp(Obz)-OH	≥ 98%	86060-84-6	TCI
Fmoc-L-Glycin	≥ 98%	29022-11-5	TCI
Fmoc-L-Lys(Z)-OH	≥ 98%	86060-82-4	TCI
Fmoc-L-Phenylalanin	≥ 98%	35661-40-6	TCI
Fmoc-L-Serin-OtBu	≥ 98%	71989-33-8	TCI
Fmoc-LysOH	95%	105047-45-8	Carl Roth
Fmoc-SerOH · H₂O	97%	73724-45-5	Carl Roth
Fmoc-SerOtBu	≥ 99%	71989-33-8	Carl Roth
Furfural	≥ 98%	98-01-1	TCI
Geraniol	97%	106-24-1	FisherScientific

Substanz	Reinheit	CAS-Nummer	Hersteller
HCl	37%	7647-01-0	Carl Roth
Hexanoylchlorid	97%	142-61-0	Sigma Aldrich
Hydroxychinolin	-	148-24-3	FisherScientific
Hydroxymethylfurfural	98%	67-47-0	ABCR
Isophorondiamin	95%	2855-13-2	Merck
Isopropylamin	99,5%	75-31-0	Sigma Aldrich
Kaliumcarbonat	99%	584-08-7	FisherScientific
Kaliummethanolat	99%	917-58-8	Acros Organics
Kaliumhydrogencarbonat	99,5%	298-14-6	FisherScientific
Kaliummethanolat	30-35%	865-33-8	Acros Organics
KOH	≥ 85%	1310-58-3	Carl Roth
Kupfer(II)acetat · H₂O	≥ 98%	6046-93-1	FisherScientific
L-Alanin	≥ 98,5%	56-41-7	Carl Roth
L-Ala-OEt · HCl	≥ 98%	1115-59-9	FisherScientific
L-Ala-OMe · HCl	99%	2491-20-5	FisherScientific
L-Arginin	>99%	74-79-3	Carl Roth
L-Arg-OMe · 2HCl	98%	26340-89-6	FisherScientific
L-Asparagin	>99%	70-47-3	Carl Roth
L-Asparaginsäure	>99%	56-84-8	Carl Roth
Laurinsäure	95%	143-07-7	Sigma Aldrich
Laurinsäuremethylester	≥ 99,5%	111-82-0	TCI
L-Cystein	>99%	52-90-4	Carl Roth
L-Arginin · HCl	>98,5%	1119-34-2	Carl Roth
L-Glutamin	>99%	56-85-9	Carl Roth
L-Glutaminsäure	>98,5%	56-86-0	Carl Roth
L-Glycin	>99%	56-40-6	Carl Roth
L-Histidin	>99%	5934-29-2	Carl Roth
Linolsäure	60%	60-33-3	FisherScientific
L-Isoleucin	>98,5%	73-32-5	Carl Roth
L-Leucin	>98,5%	61-90-5	Carl Roth
L-Leucin tert-Butylester	≥ 98%	2748-02-9	TCI
Hydrochlorid			
L-Lysin · HCl	>98,5%	657-27-2	Carl Roth
L-Lysin · H₂O	>98,5%	39665-12-8	Carl Roth

Substanz	Reinheit	CAS-Nummer	Hersteller
L-Lys-OEt · 2HCl	99%	3844-53-9	FisherScientific
L-Lys-OMe · 2HCl	99%	26348-70-9	FisherScientific
L-Methionin	>99%	63-68-3	Carl Roth
L-Phenylalanin	>98,5%	63-91-2	Carl Roth
L-Prolin	>98,5%	147-85-3	Carl Roth
L-Prolin-OtBu	≥ 98%	5497-76-7	TCI
L-Serin	>99%	56-45-1	Carl Roth
L-Ser-OEt · HCl	99%	26348-61-8	FisherScientific
L-Ser-OMe · HCl	≥ 98%	5680-80-8	TCI
L-Threonin	>99%	72-19-5	Carl Roth
L-Tryptophan	>99%	73-22-3	Carl Roth
L-Tyrosin	>99%	60-18-4	Carl Roth
L-Valin	>99%	72-18-4	Carl Roth
Magnesiumoxid	98%	1309-48-4	FisherScientific
Maleinsäureanhydrid	≥ 98%	108-31-6	FisherScientific
Methanol	99,8%	67-56-1	FisherScientific
Methanol-D4	99,90%	811-98-3	FisherScientific
Methyl-L-Phenylalanin · HCl	99%	7524-50-7	FisherScientific
Montomorillonit K-10 Granulat	-	1318-93-0	Acros Organics
Morpholin	99%	110-91-8	Carl Roth
Myrcen	90%	125-35-3	Acros Organics
N-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-Phenylalanin	≥ 98%	35661-40-6	TCI
Na₂CO₃ · 10 H₂O	≥ 99%	6132-02-1	FisherScientific
Na₂SO₄	≥ 99%	7757-82-6	Carl Roth
NaOH	≥ 98%	1310-73-2	Carl Roth
Na-Triacetoxyborhydrid	> 80%	56553-60-7	TCI
Natriumsilikat	-	6834-92-0	FisherScientific
n-Butylamin	99%	109-73-9	Alfa Aesar
n-Dodecylamin	≥ 97%	124-22-1	TCI
n-Hexadecylamin	> 95%	143-27-1	TCI
n-Hexylamin	99%	111-26-2	TCI
N-Lauroyl-Arginin	99,9%	181434-85-5	Sigma Aldrich

Substanz	Reinheit	CAS-Nummer	Hersteller
<i>N</i>-Lauroyl-Arginin-Ethylester	99,9%	48076-74-0	Sigma Aldrich
Nonanal	> 95%	124-19-6	TCI
<i>N</i>-α-Boc-Lysin	97%	13734-28-6	FisherScientific
<i>N</i>-ϵ-Boc-Lysin	97%	2418-95-3	FisherScientific
Octanal	99%	124-13-0	FisherScientific
Octanoylchlorid	99%	111-64-8	Sigma Aldrich
Petrolether	-	8032-32-4	FisherScientific
Piperidin	99,5%	110-89-4	FisherScientific
PyBOP	$\geq 98,5\%$	128625-52-5	Carl Roth
T3P in (DCM, EtOAc, ACN)	50%	68957-94-8	FisherScientific
Toluol	$\geq 99\%$	108-88-3	FisherScientific
Trans-Zimtaldehyd	$\geq 98\%$	14371-10-9	TCI
Trifluoressigsäure	>99,9%	76-05-1	Carl Roth
Tris-(2-Aminoethyl)-amin	96%	4097-89-6	Acros Organics
TrpOEt · HCl	-	2899-28-7	Bachem
Trypton	-	91079-40-2	Carl Roth
α-Terpinen	>90%	99-86-5	FisherScientific
δ-Dodecanolacton	$\geq 98\%$	713-95-1	TCI

6.2 Ergänzende Daten

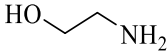

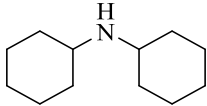
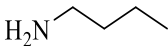
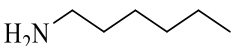
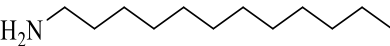
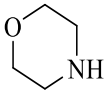
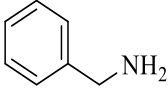
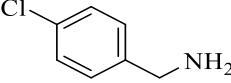
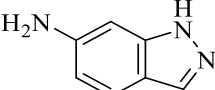
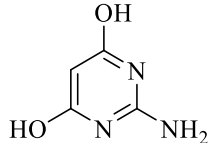
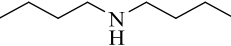
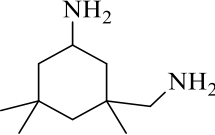
6.2.1 Ergebnisse zur Acylierung mit PmAcy

Tabelle 10: Produktbildung durch PmAcy in der initialen Untersuchung der *N*-Lauroyl-Aminosäure-Synthese

Eintrag	Aminosäure	pH = 9
1	Alanin	o
2	Arginin	+
3	Asparagin	-
4	Asparaginsäure	x
5	Cystein	x
6	Glutamin	-
7	Glutaminsäure	x
8	Glycin	x
9	Histidin	o
10	Isoleucin	o
11	Leucin	o
12	Lysin	+
13	Methionin	+
14	Phenylalanine	++
15	Prolin	x
16	Serin	x
17	Threonin	x
18	Tryptophan	x
19	Tyrosin	x
20	Valin	++

Reaktionsbedingungen: 200 mM Aminosäure bzw. Amin, 100 mM Na-Laurat, 10 μ l PmAcy (0,6 U), Tris-HCl-Puffer (pH = 8,0) mit 0,5 mM ZnCl₂, Gesamtvolumen 0,5 ml, 50 °C, 20 h 250 rpm. Bedeutung der Symbole: x = keine Produktbildung, - = minimale Aktivität, o : mittlere Aktivität, + = hohe Aktivität, ++ = sehr hohe Aktivität.

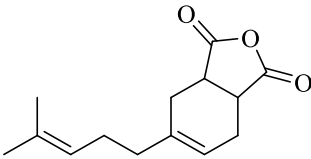
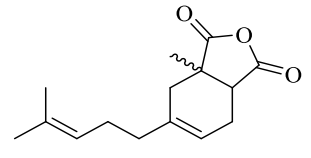
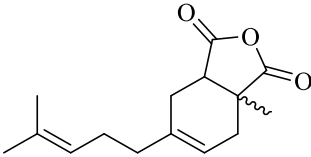
Tabelle 11: Untersuchung der Umsetzung von organischen Aminen durch PmAcy mit Laurinsäure und Essigsäure.

Amin	Struktur	Laurinsäure	Essigsäure
Ethanolamin		x	x
Isopropylamin		x	x
Dicyclohexylamin		x	x
<i>n</i> -Butylamin		x	x
<i>n</i> -Hexylamin		x	x
<i>n</i> -Dodecylamin		x	x
Morpholin		x	x
Benzylamin		x	x
Chlorbenzylamin		x	x
6-Aminoindazol		x	x
2-Amin-4,6-Hydroxypyrimidin		x	x
Di- <i>n</i> -Butylamin		x	x
Isophorondiamin		x	x

Reaktionsbedingungen: 200 mM Amin, 100 mM Na-Laurat bzw. Essigsäure, 10 µl PmAcy (0,6 U), Tris-HCl-Puffer (pH = 8,0) mit 0,5 mM ZnCl₂, Gesamtvolumen 0,5 ml, 50 °C, 20 h 250 rpm. Bedeutung der Symbole: x = keine Produktbildung, - = minimale Aktivität, o : mittlere Aktivität, + = hohe Aktivität, ++ = sehr hohe Aktivität.

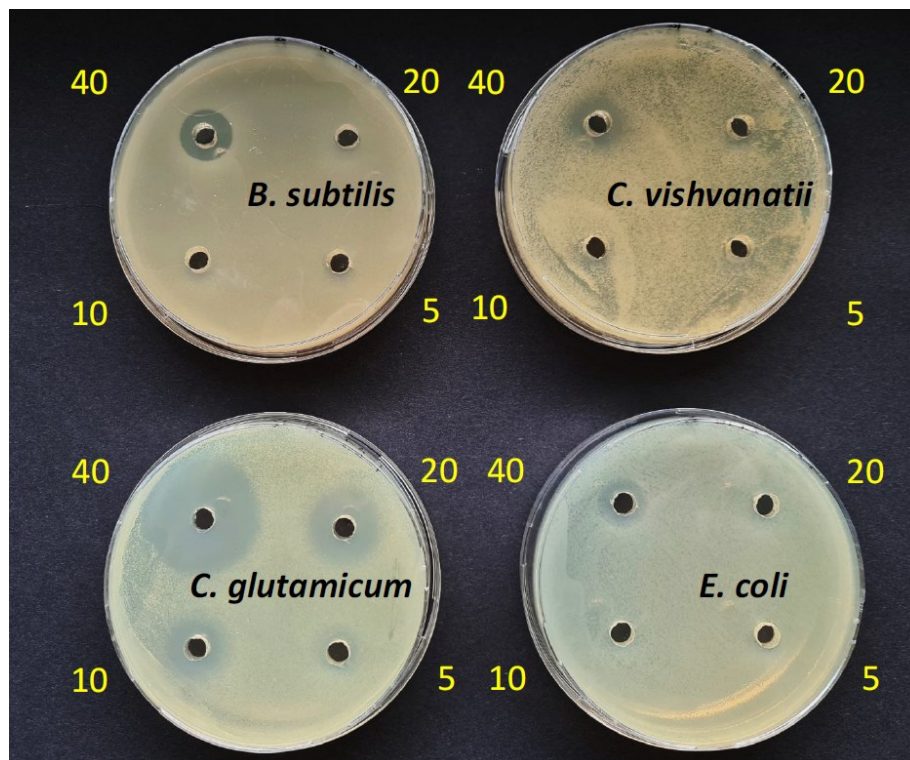
6.2.2 Ergänzende Daten zur Charakterisierung der Drei-Komponenten-Tenside

Tabelle 12: Minimale Oberflächenspannungen σ_{min} und Schaumhöhen der Diels-Alder-Tenside basierend auf Myrcen, cyclischen Anhydriden und Aminosäuren.

Anhydrid-Precursor	Kopfgruppe	σ_{min} [mN m ⁻¹]	$h_{0\ min}$ [mm]	$h_{5\ min}$ [mm]
	H ₂ O	60,9 ± 0,4	110,0	3,0
	Ala	54,0 ± 0,4	116,2	12,6
	Arg	38,0 ± 0,3	133,6	98,7
	Asn	45,7 ± 0,3	134,1	5,2
	Asp	53,7 ± 0,4	124,6	2,0
	Cys	34,0 ± 0,6	120,9	91,0
	Gln	56,4 ± 1,2	130,2	10,6
	Glu	52,5 ± 4,4	125,0	2,0
	Gly	48,8 ± 0,2	117,3	6,0
	His	56,7 ± 0,6	128,7	6,0
	Ile	54,0 ± 1,3	105,2	6,9
	Leu	44,3 ± 0,2	125,8	13,6
	Lys	36,1 ± 0,1	132,6	97,6
	R ₂ Lys	32,5 ± 0,1	131,1	98,7
	Met	53,4 ± 2,6	124,6	2,0
	Phe	43,3 ± 0,5	133,0	2,0
	Ser	40,7 ± 1,1	140,8	100,8
	Thr	37,1 ± 1,0	130,0	76,4
	Trp	38,7 ± 0,8	133,5	102,2
	Tyr	42,4 ± 0,6	138,0	81,1
Val	45,2 ± 0,5	126,3	47,4	
	H ₂ O	56,9 ± 0,2	95,7	1,6
	Arg	31,8 ± 0,2	134,0	46,9
	Cys	32,1 ± 0,5	125,6	54,1
	Glu	56,5 ± 0,4	96,0	9,2
	Lys	33,4 ± 0,8	139,3	92,5
	R ₂ Lys	31,5 ± 0,8	122,3	95,9
	Phe	44,5 ± 0,8	134,9	35,1

6.2.3 Ergänzende Daten zu den antimikrobiellen Untersuchungen

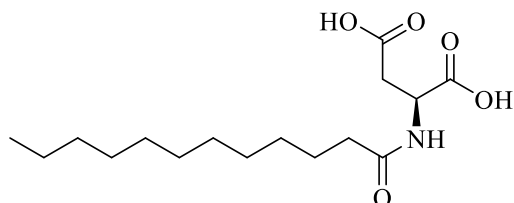
Abbildung A 1: Darstellung der Hemmhoftests des vollständig Veresterten Dreikomponenten-Tensids *N*-(Myrcen-CA-)Arginin-OEt bei Konzentrationen von 5 – 40 mM.



6.3 Analytische Daten

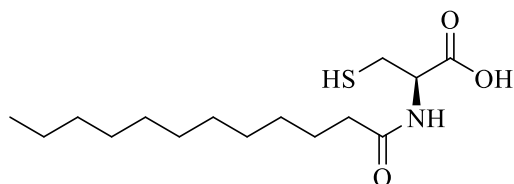
6.3.1 *N*-Acylaminosäuren

N-Lauroyl-Asparaginsäure



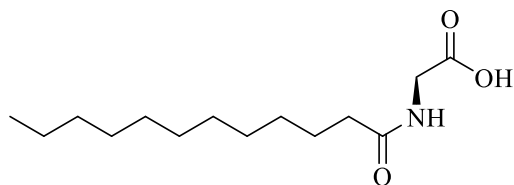
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 631 (2M+H, 10), 379 (M+ACN+Na, 3), 357 (M+ACN+H, 40), 316 (M+H, 100).

N-Lauroyl-Cystein



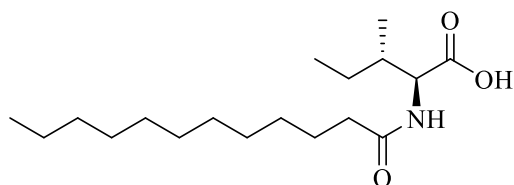
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 345 (M+ACN+H, 100), 304 (M+H, 33).

N-Lauroyl-Glycin

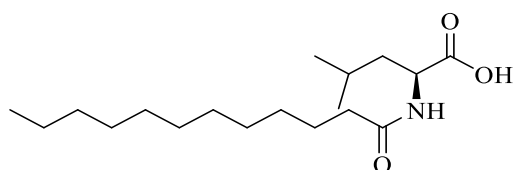


LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 515 (2M+H, 33), 299 (M+ACN+H, 100), 258 (M+H, 15).

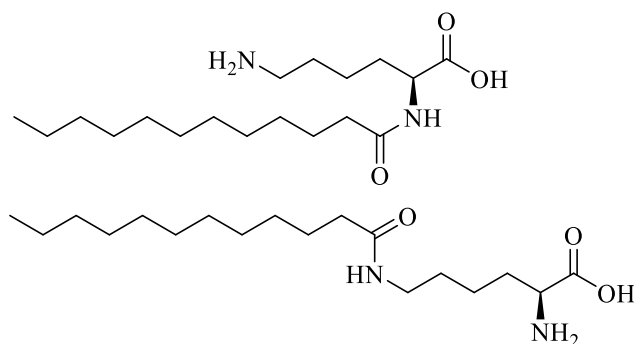
N-Lauroyl-Isoleucin



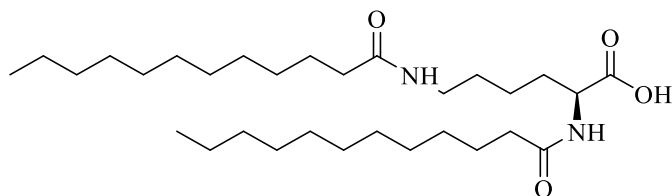
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 627 (2M+H, 100), 377 (M+ACN+Na, 10), 355 (M+ACN+H, 100), 314 (M+H, 75).

N-Lauroyl-Leucin

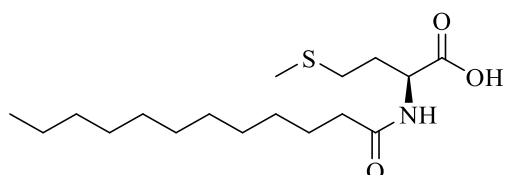
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 627 (2M+H, 66), 377 (M+ACN+Na, 8), 355 (M+ACN+H, 100), 314 (M+H, 50).

N-Lauroyl-Lysin (Mono-Acyl)

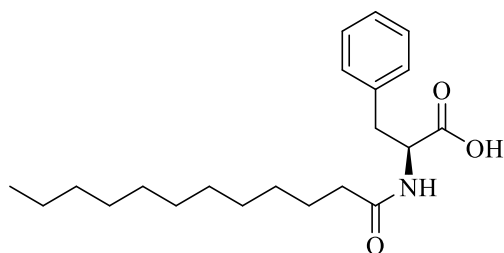
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 657 (2M+H, 5), 370 (M+ACN+H, 15), 314 (M+H, 100).

N-Lauroyl-Lysin (Di-Acyl)

LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 1044 (2M+Na, 4), 1022 (2M+H, 33), 552 (M+ACN+H, 5), 511 (M+H, 100).

N-Lauroyl-Methionin

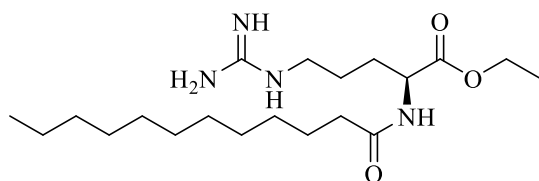
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 663 (2M+H, 25), 395 (M+ACN+Na, 5), 373 (M+ACN+H, 40), 332 (M+H, 100).

N-Lauroyl-Phenylalanin

LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 695 (2M+H, 80), 411 (M+ACN+Na, 10), 389 (M+ACN+H, 100), 348 (M+H, 100).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 0.88 (t, 3J = 7 Hz, 3H), 1.19 – 1.36 (m, 17 H), 1.48 – 1.59 (m, 2 H), 2.182 (dt, 2J = 3.2 Hz, 3J = 7.2 Hz, 2 H), 3.09 – 3.28 (m, 2 H), 4.88 (q, 3J = 5.9 Hz, 1 H), 6.09 (d, 3J = 7.5 Hz, 1 H), 7.13 – 7.18 (m, 2 H), 7.22 – 7.33 (m, 3 H).

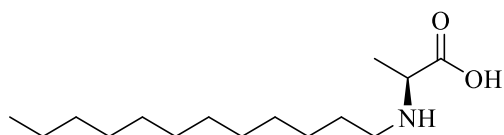
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ = 14.14, 22.70, 25.59, 29.16, 29.32, 29.35, 29.48, 29.63, 29.93, 36.44, 37.27, 53.14, 127.22, 128.64, 129.38, 135.69, 174.14, 174.62.

N-Dodecanoyl-Arginin-Ethylester (LAE)

LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 426 (M+ACN+H, 5), 385 (M+H, 100).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ =

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ =

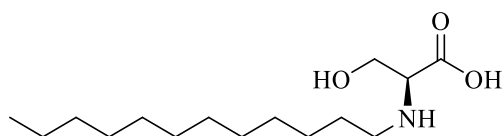
6.3.1 *N*-Alkylaminosäuren*N*-Dodecanyl-Alanin

LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 515 (2M+H, 6), 321 (M+ACN+Na, 3), 299 (M+ACN+H, 80), 258 (M+H, 100).

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz) δ = 0.84 (s, 3H), 1.11 – 1.39 (m, 20 H), 1.43 – 1.57 (s, 2 H), 2.51 (d, 3J = 6.6 Hz, 2 H), 3.07 – 3.16 (m, 1 H).

^{13}C -NMR (D_2O , 100 MHz) $\delta = 13.79, 17.51, 20.29, 22.67, 27.61, 29.33, 29.66, 29.83, 29.98, 30.06, 30.15, 32.05, 47.14, 58.26, 181.39$.

N-Dodecanyl-Serin

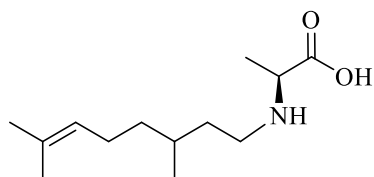


LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 547 (2M+H, 8), 337 (M+ACN+Na, 5), 315 (M+ACN+H, 29), 274 (M+H, 100).

^1H -NMR (D_2O , 400 MHz) $\delta = 0.72 - 0.80$ (m, 3H), 1.10 – 1.26 (m, 18 H), 1.40 – 1.50 (m, 2 H), 2.44 – 2.55 (m, 2 H), 3.10 (m, $^3J = 4.1$ Hz, 1 H), 3.68 (d, $^3J = 3.9$ Hz, 2 H).

^{13}C -NMR (D_2O , 100 MHz) $\delta = 13.76, 16.74, 22.65, 27.51, 29.25, 29.63, 29.85, 29.97, 30.06, 30.10, 32.03, 47.63, 57.53, 61.85, 64.57, 178, 18$.

N-Citronellyl-Alanin



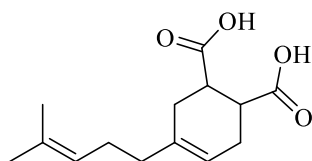
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 455 (2M+H, 9), 291 (M+ACN+Na, 4), 269 (M+ACN+H, 27), 228 (M+H, 100).

^1H -NMR (D_2O , 400 MHz) $\delta = 0.879$ (dd, $^2J = 2.2$ Hz, $^3J = 6.2$ Hz, 3 H), 1.10 – 1.18 (m, 1 H), 1.18 – 1.26 (m, 3 H), 1.27 – 1.38 (m, 2 H), 1.41 – 1.74 (m, 7 H), 1.85 – 2.06 (m, 2 H), 2.45 – 2.65 (m, 2 H), 3.15 (qd, $^2J = 1.8$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, 1 H), 5.13 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 1 H).

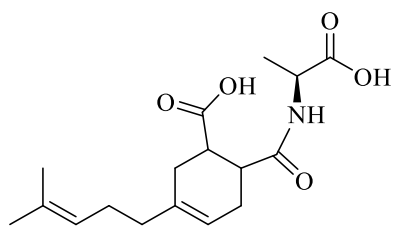
^{13}C -NMR (D_2O , 100 MHz) $\delta = 17.67, 19.13, 20.22, 25.20, 30.43, 35.89, 36.86, 44.94, 51.36, 58.41, 125.07, 131.44, 181.74$.

6.3.2 Linker-basierte Drei-Komponenten Tenside

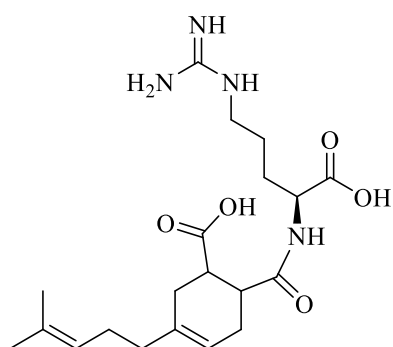
N-(Myrcen-MSA)-Hydrolysat



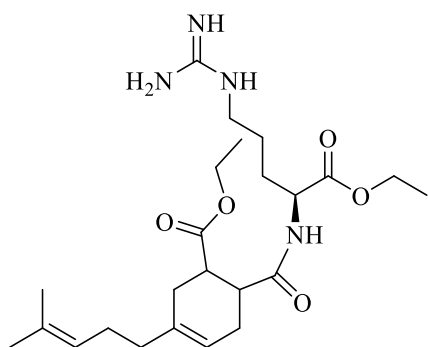
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 503 (2M-H, 30), 251 (M-H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Alanin

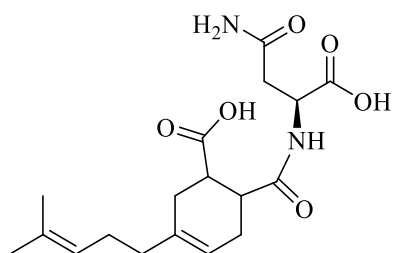
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 669 (2M+Na, 31), 647 (2M+H, 10), 387 (M+ACN+Na, 30), 365 (M+ACN+H, 6), 345 (M+Na, 22), 324 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Arginin

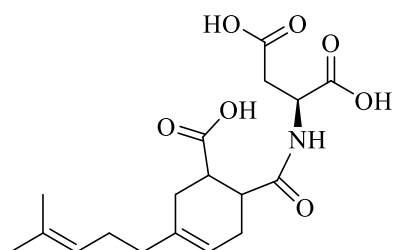
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 450 (M+ACN+H, 3), 409 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Arginin Ethylester

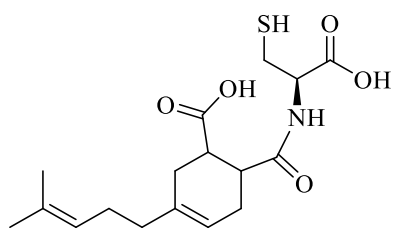
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 465 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Asparagin

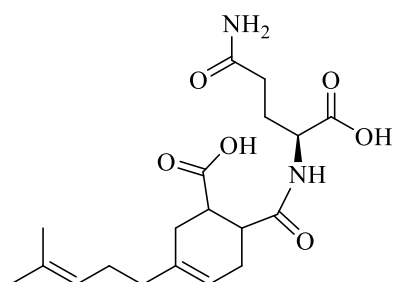
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 755 (2M+Na, 14), 733 (2M+H, 6), 430 (M+ACN+Na, 13), 408 (M+ACN+H, 3), 388 (M+Na, 25), 367 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Asparaginsäure

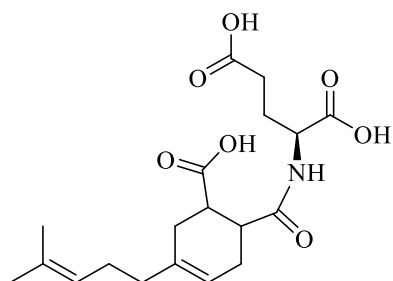
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 757 (2M+Na, 14), 735 (2M+H, 5), 431 (M+ACN+Na, 18), 409 (M+ACN+H, 6), 389 (M+Na, 21), 368 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Cystein

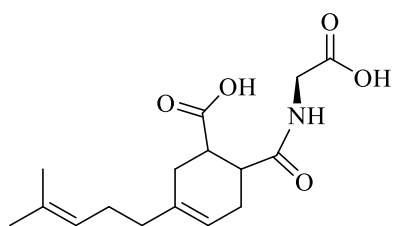
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 419 (M+ACN+Na, 13), 397 (M+ACN+H, 5), 379 (M+Na, 14), 356 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Glutamin

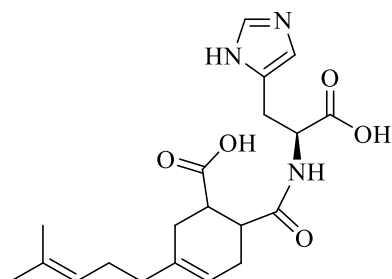
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 783 (2M+Na, 15), 762 (2M+H, 6), 444 (M+ACN+Na, 3), 403 (M+Na, 19), 381 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Glutaminsäure

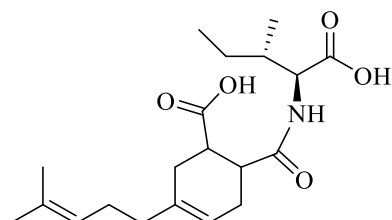
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 785 (2M+H, 7), 455 (M+ACN+H, 11), 405 (M+Na, 20), 382 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Glycin

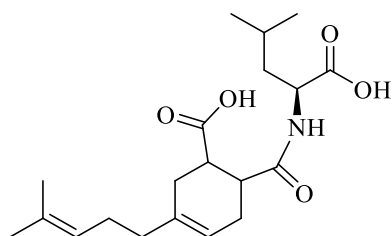
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 641 (2M+Na, 14), 373 (M+ACN+Na, 25), 333 (M+Na, 11), 310 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Histidin

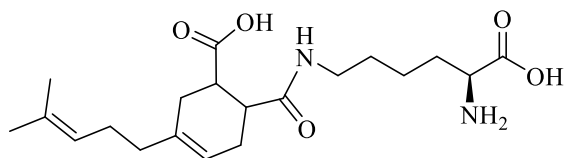
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 779 (2M+H, 5), 431 (M+ACN+H, 8), 412 (M+Na, 8), 390 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Isoleucin

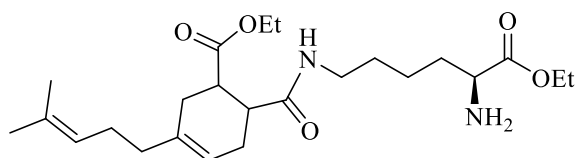
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 429 (M+ACN+H, 4), 388 (M+Na, 9), 366 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Leucin

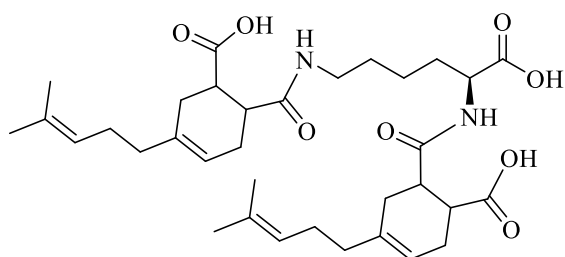
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 429 (M+ACN+H, 5), 388 (M+Na, 9), 366 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Lysin

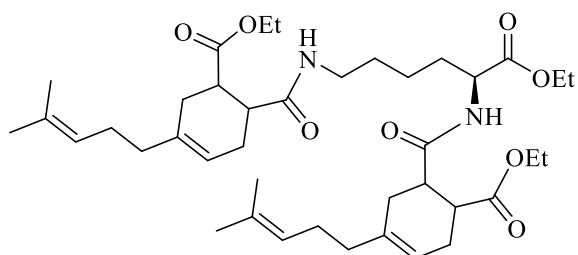
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 762 (2M+H, 7), 422 (M+ACN+H, 4), 403 (M+Na, 7), 381 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Lysin Ethylester

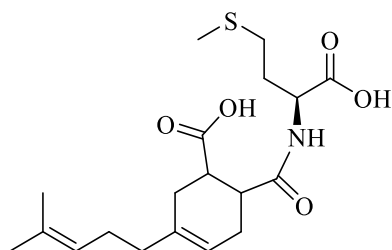
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 437 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)₂-Lysin

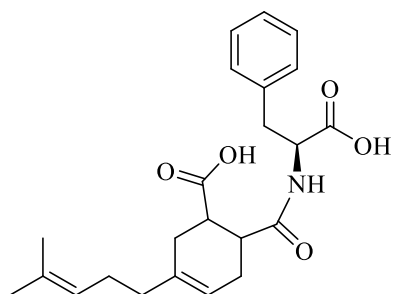
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 637 (M+Na, 48), 615 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)₂-Lysin Ethylester

LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 699 (M+H, 100).

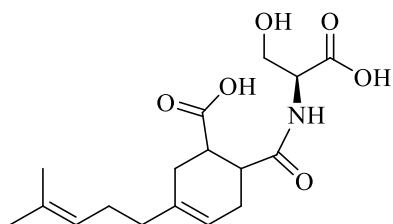
N-(Myrcen-MSA)-Methionin

LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 789 (2M+Na, 33), 767 (2M+H, 7), 447 (M+ACN+Na, 36), 406 (M+Na, 20), 384 (M+H, 100).

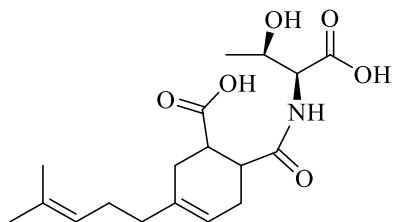
N-(Myrcen-MSA)-Phenylalanin

LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 821 (2M+Na, 54), 799 (2M+H, 7), 463 (M+ACN+Na, 39), 441(M+ACN+H, 7), 422 (M+Na, 33), 400 (M+H, 100).

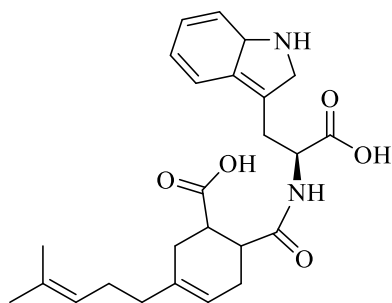
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz) δ = 1.50 (d, 3J = 3.6 Hz, 3 H), 1.56 (s, 3 H), 1.71 – 2.43 (m, 9 H), 2.47 – 2.63 (m, 1 H), 2.75 – 2.86 (m, 2 H), 2.86 – 2.94 (m, 1 H), 3.02 – 3.13 (m, 1 H), 4.30 – 4.14 (m, 1 H), 4.95 – 5.05 (m, 1 H), 5.15 – 5.31 (m, 1 H), 7.00 – 7.07 (m, 2 H), 7.08 – 7.19 (m, 3H).

N-(Myrcen-MSA)-Serin

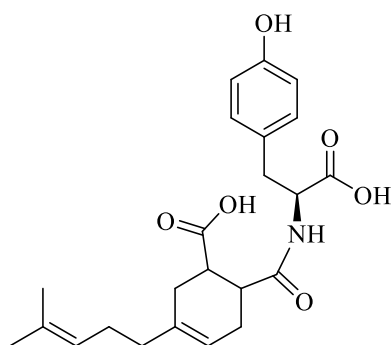
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 701 (2M+Na, 17), 679 (2M+H, 3), 403 (M+ACN+Na, 21) 362 (M+Na, 10), 340 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Threonin

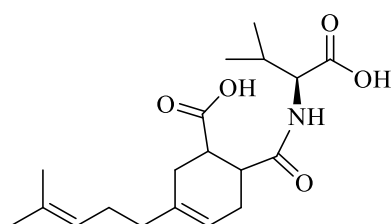
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 417 (M+ACN+Na, 7), 392 (M+ACN+H, 5), 376 (M+Na, 9), 354 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Tryptophan

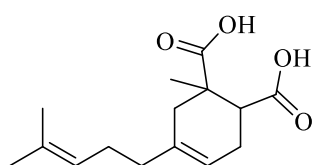
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 899 (2M+Na, 11), 878 (2M+H, 3), 502 (M+ACN+Na, 8), 461 (M+Na, 18), 439 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Tyrosin

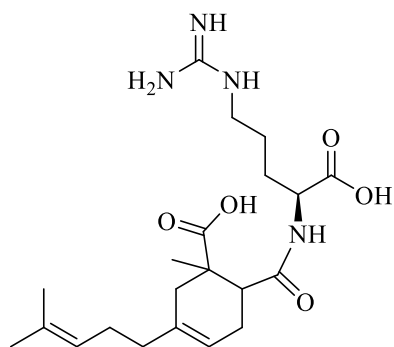
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 479 (M+ACN+Na, 2), 438 (M+Na, 2), 416 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Valin

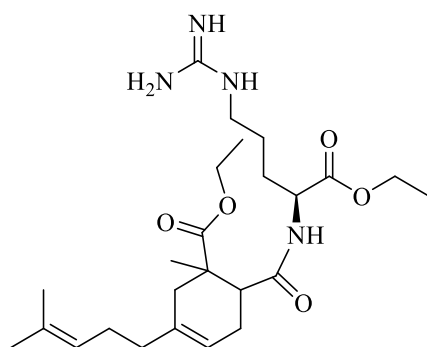
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 415 (M+ACN+Na, 10), 393 (M+ACN+H, 4), 374 (M+Na, 10), 352 (M+H, 100).

N-(Myrcen-CA)-Hydrolysat

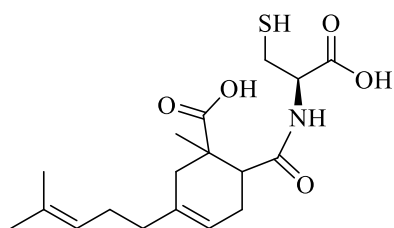
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 531 (2M-H, 55), 265 (M-H, 100).

N-(Myrcen-CA)-Arginin

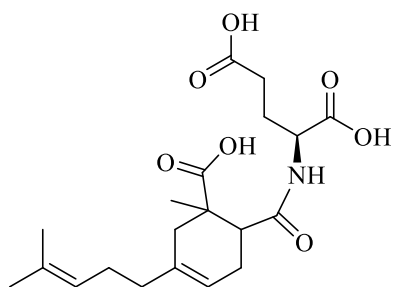
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 423 (M+H, 100).

N-(Myrcen-CA)-Arginin Ethylester

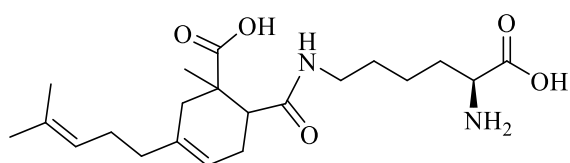
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 465 (M+H, 100).

N-(Myrcen-CA)-Cystein

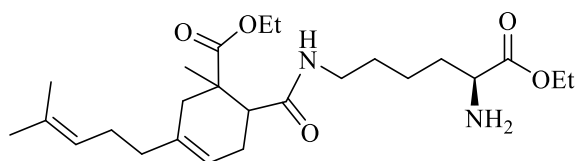
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 433 (M+ACN+Na, 7), 392 (M+Na, 16), 370 (M+H, 100).

N-(Myrcen-CA)-Glutaminsäure

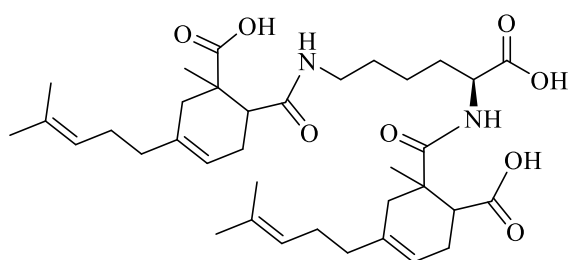
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 418 (M+Na, 20), 396 (M+H, 100).

N-(Myrcen-MSA)-Lysin

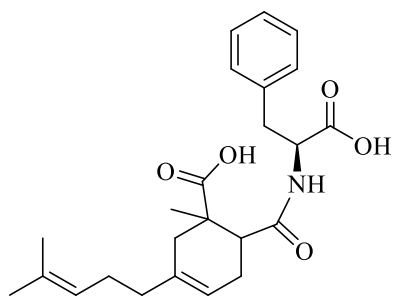
LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 417 (M+Na, 4), 395 (M+H, 100).

N-(Myrcen-CA)-Lysin Ethylester

LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 437 (M+H, 100)

N-(Myrcen-CA)₂-Lysin

LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 665 (M+Na, 20), 643 (M+H, 100).

N-(Myrcen-CA)-Phenylalanin

LC-MS (EI, 70 eV): m/z [%] = 477 (M+ACN+Na, 8), 436 (M+Na, 14), 414 (M+H, 100).

6.4 Chromatogramme & Spektren

6.4.1 MS-Spektren

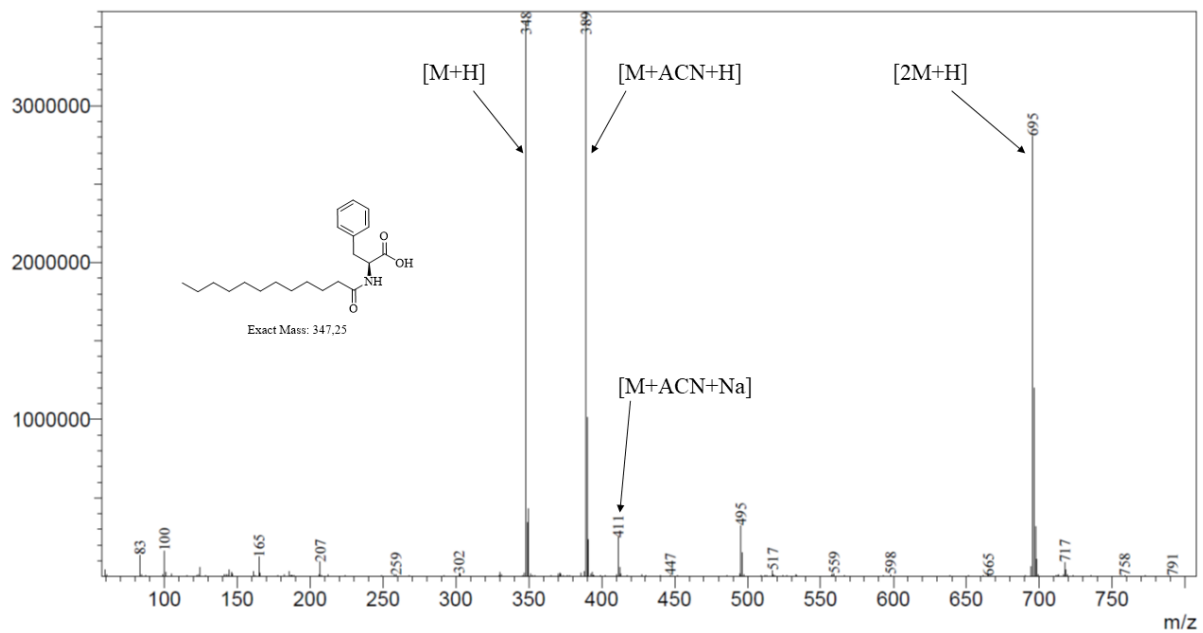


Abbildung A 2: MS-Spektrum von *N*-Lauroyl-Phenylalanin hergestellt mittels enzymatischer Acylierung durch PmAcy.

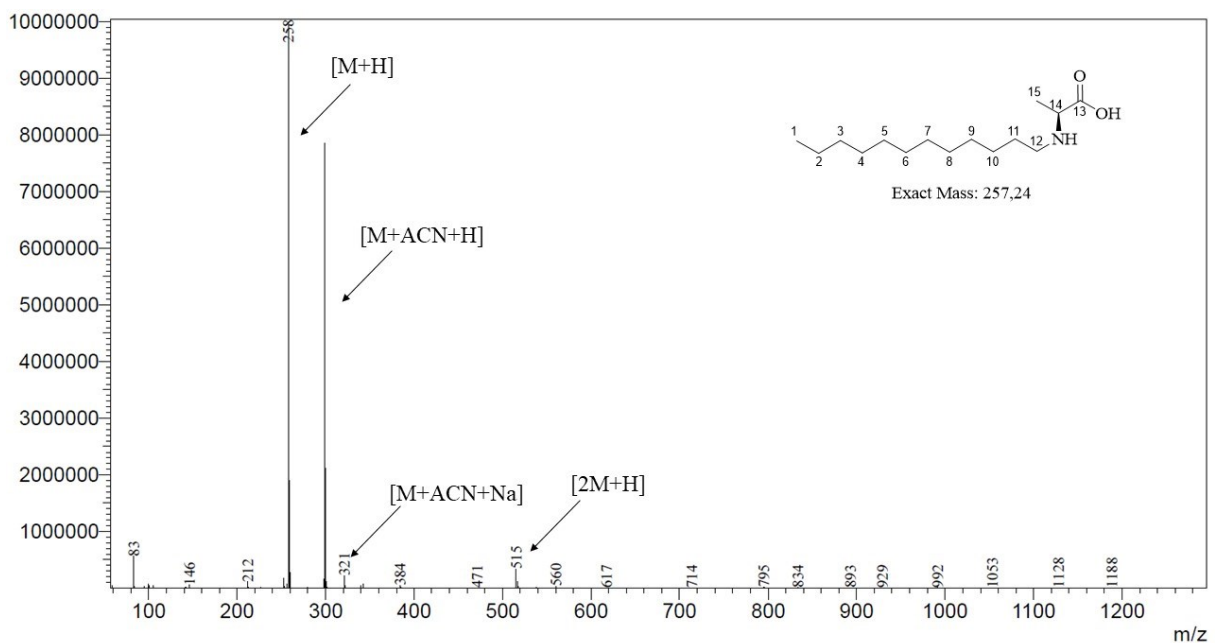
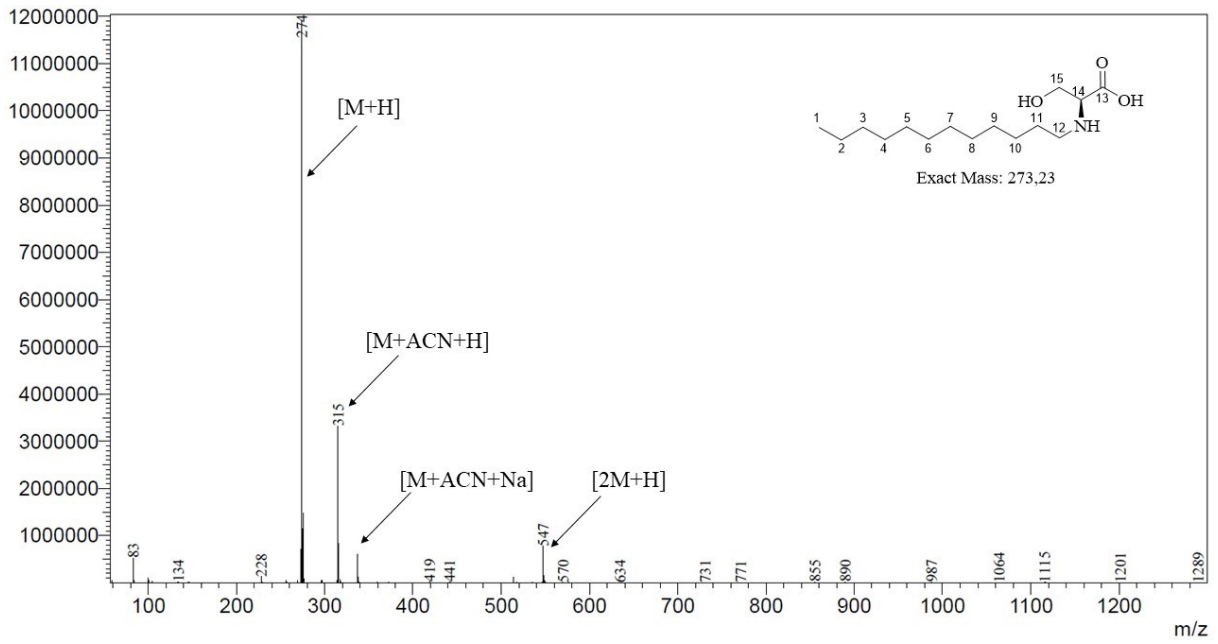
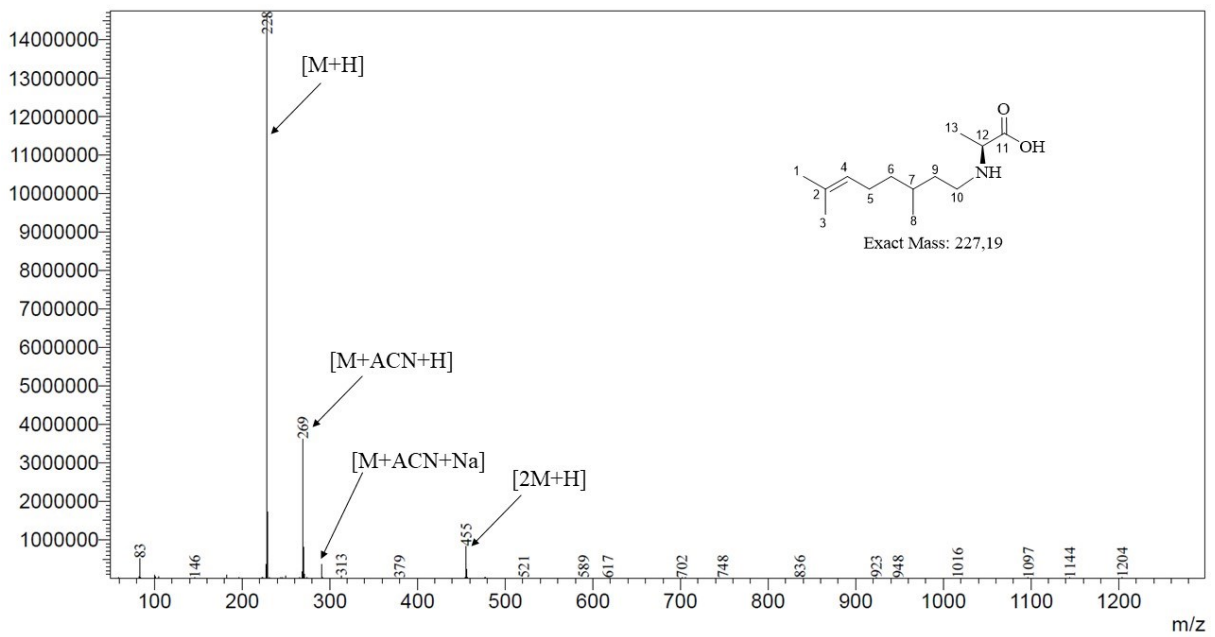


Abbildung A 3: MS-Spektrum von *N*-Dodecanyl-Alanin.

Abbildung A 4: MS-Spektrum von *N*-Dodecanyl-Serin.Abbildung A 5: MS-Spektrum von *N*-Citronellyl-Alanin.

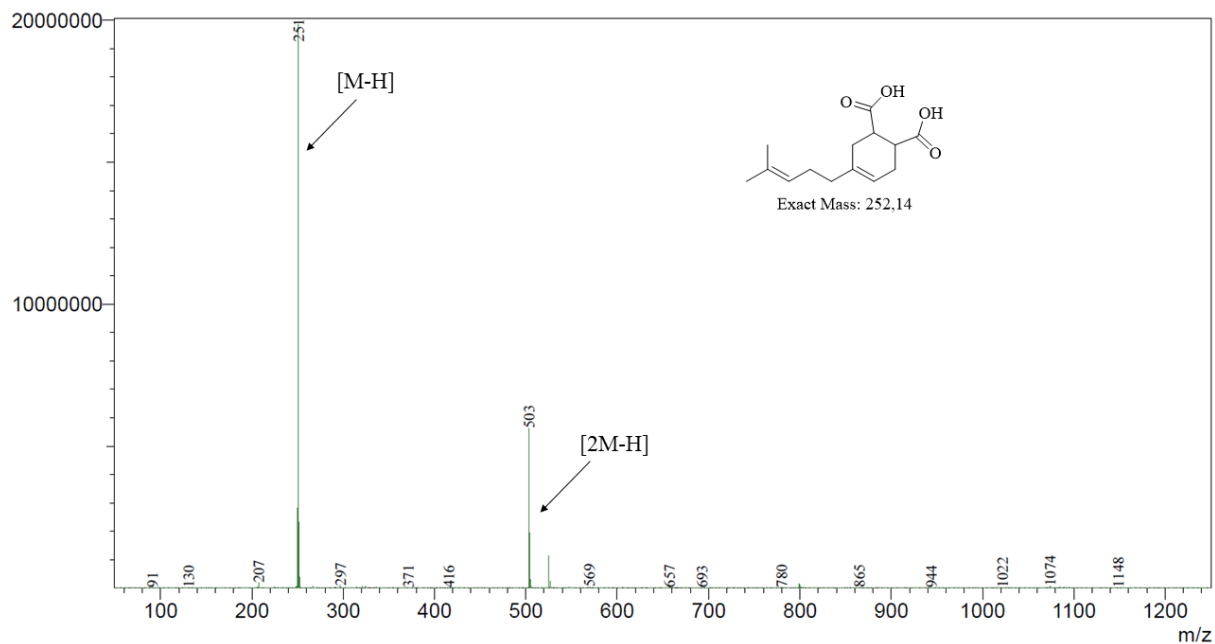


Abbildung A 6: MS-Spektrum von Myrcen-MSA-Hydrolysat.

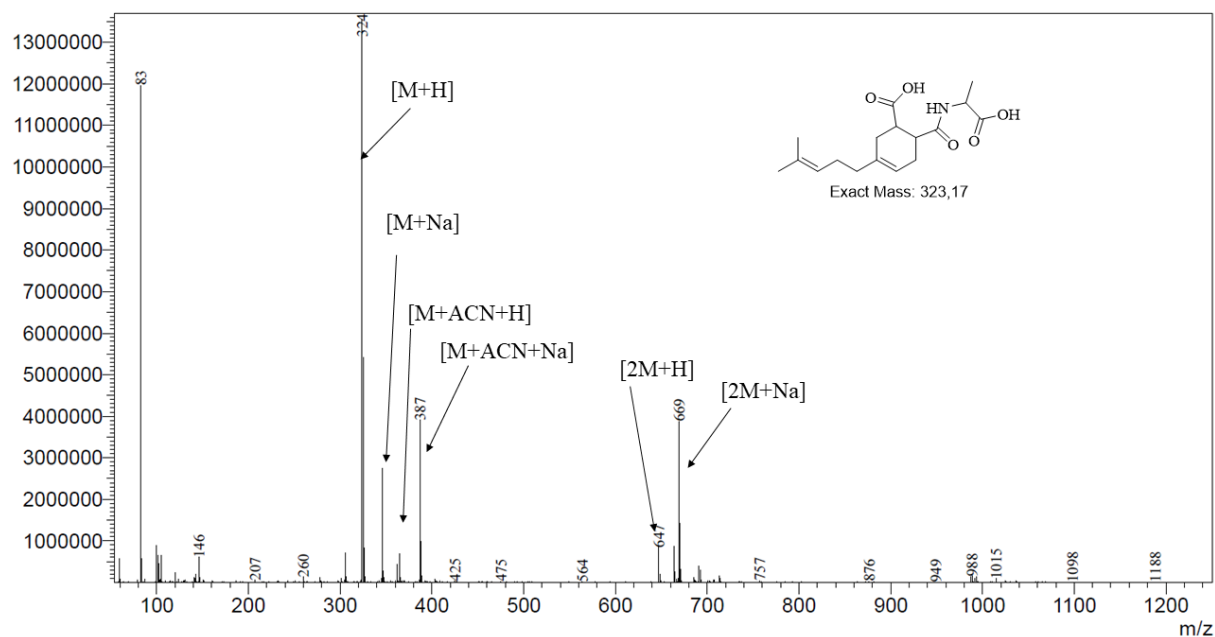
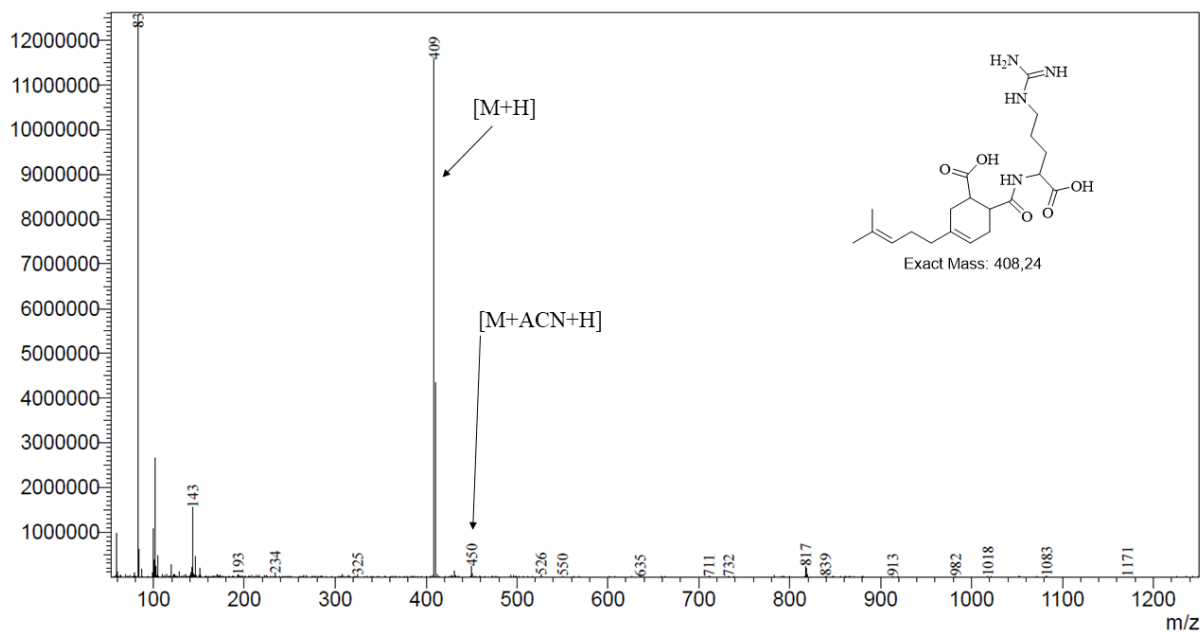
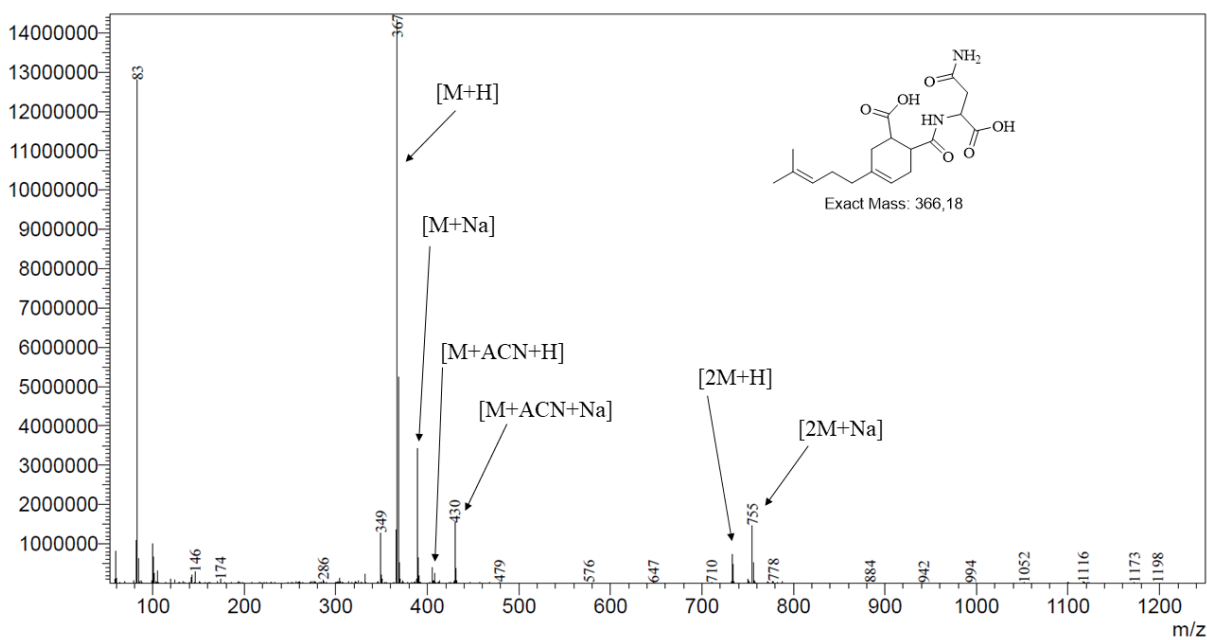
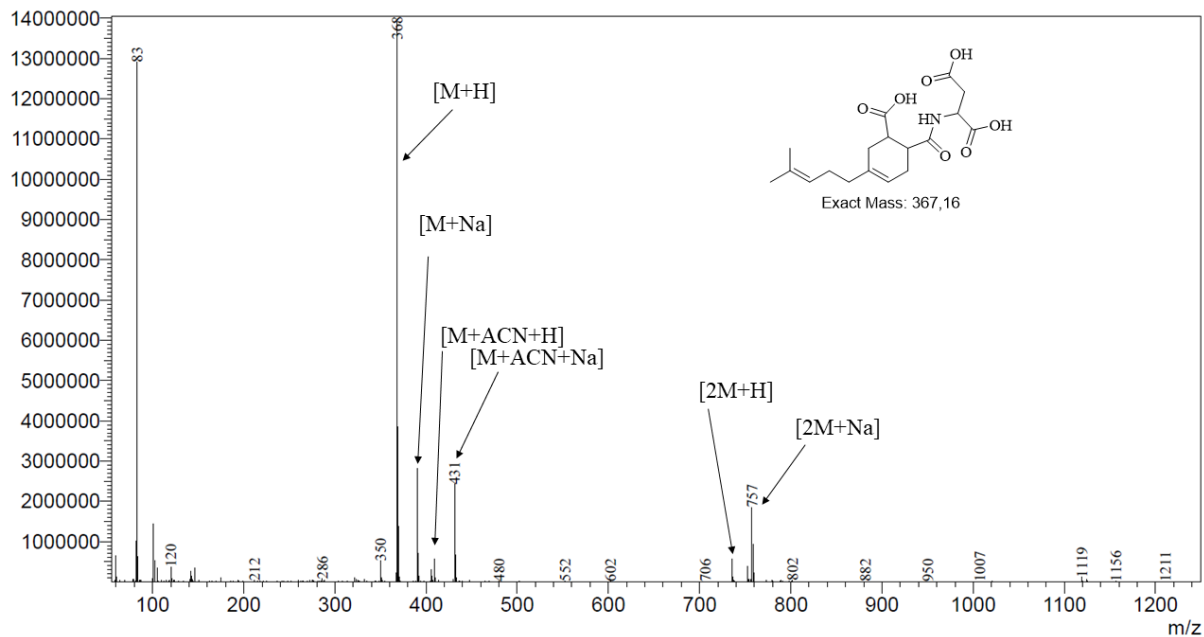
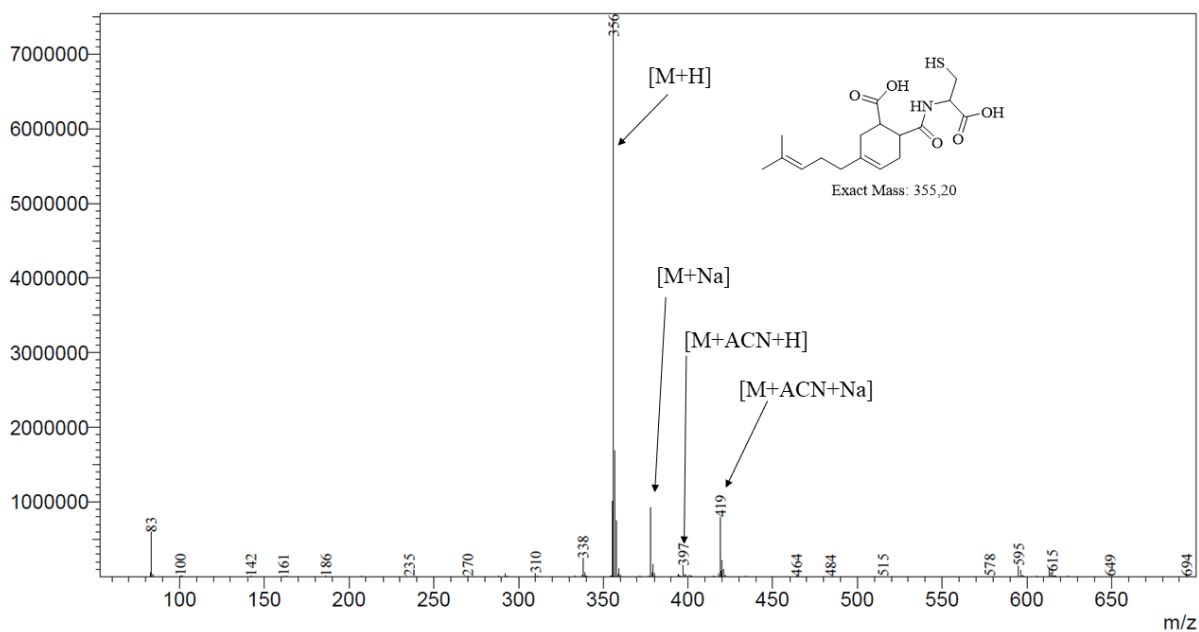
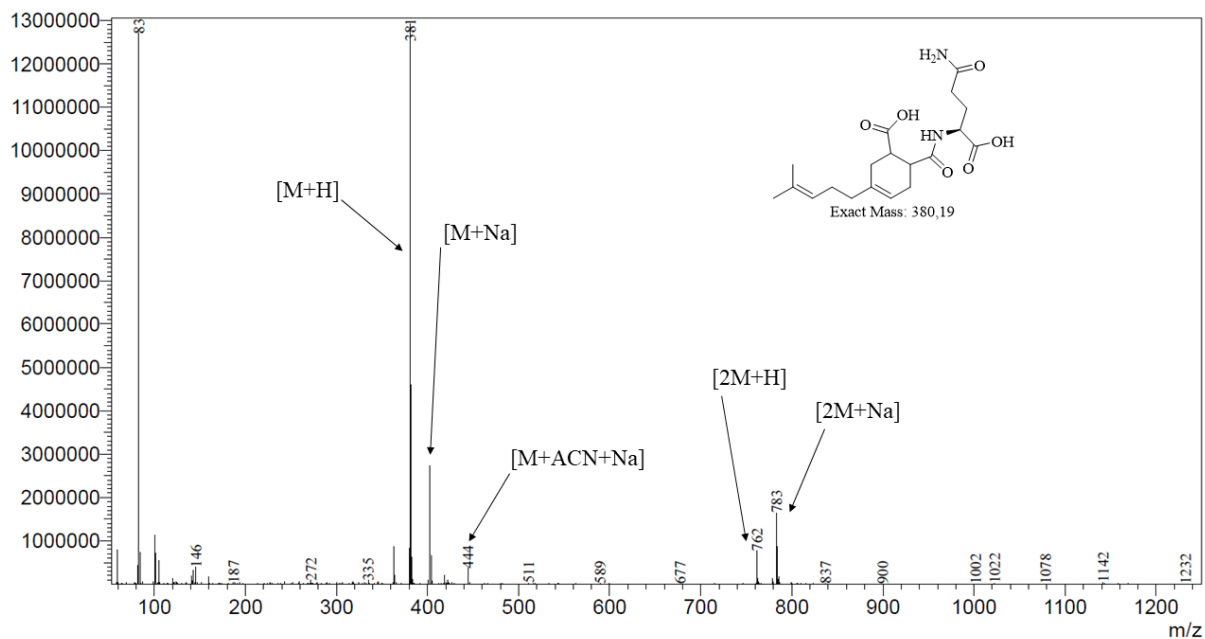
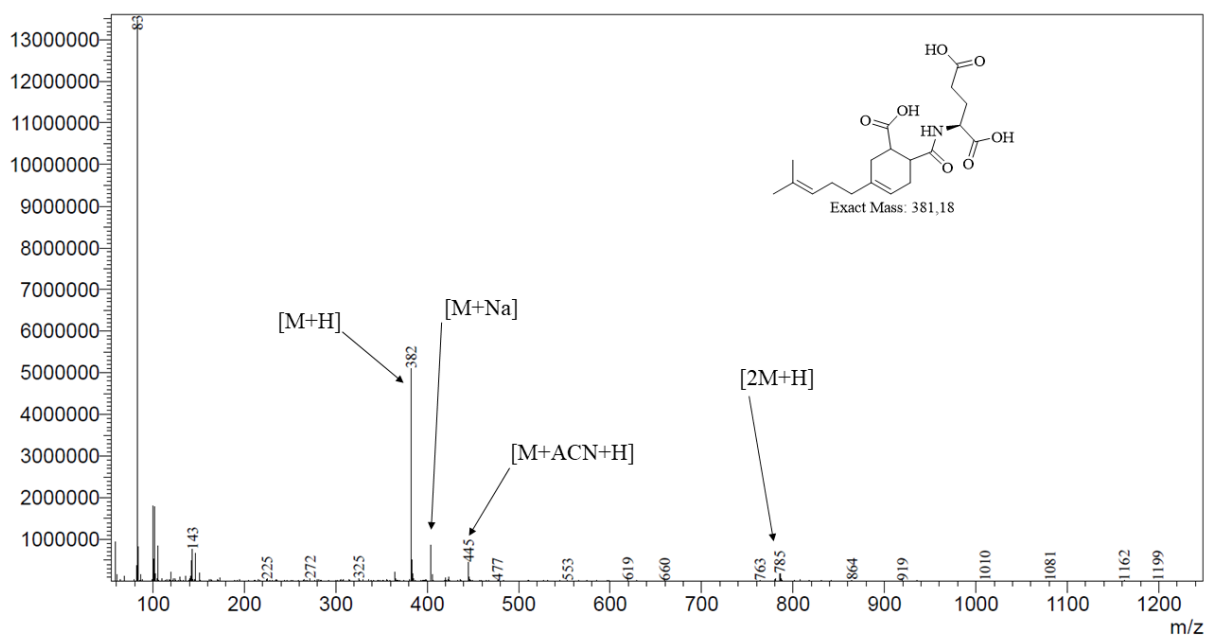
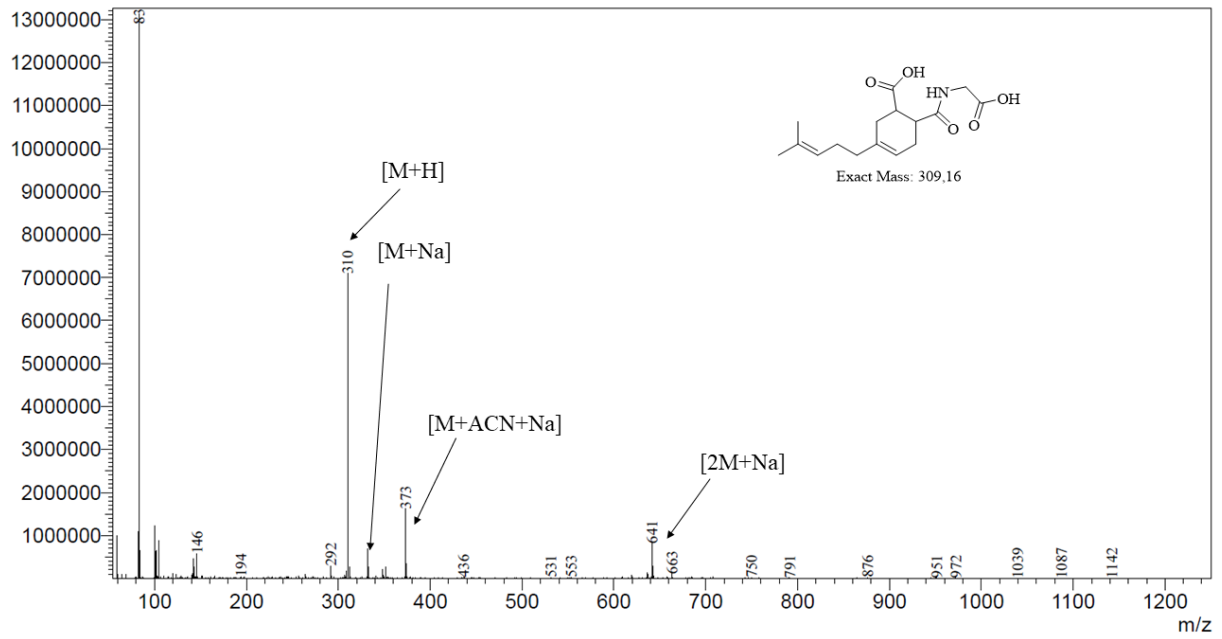
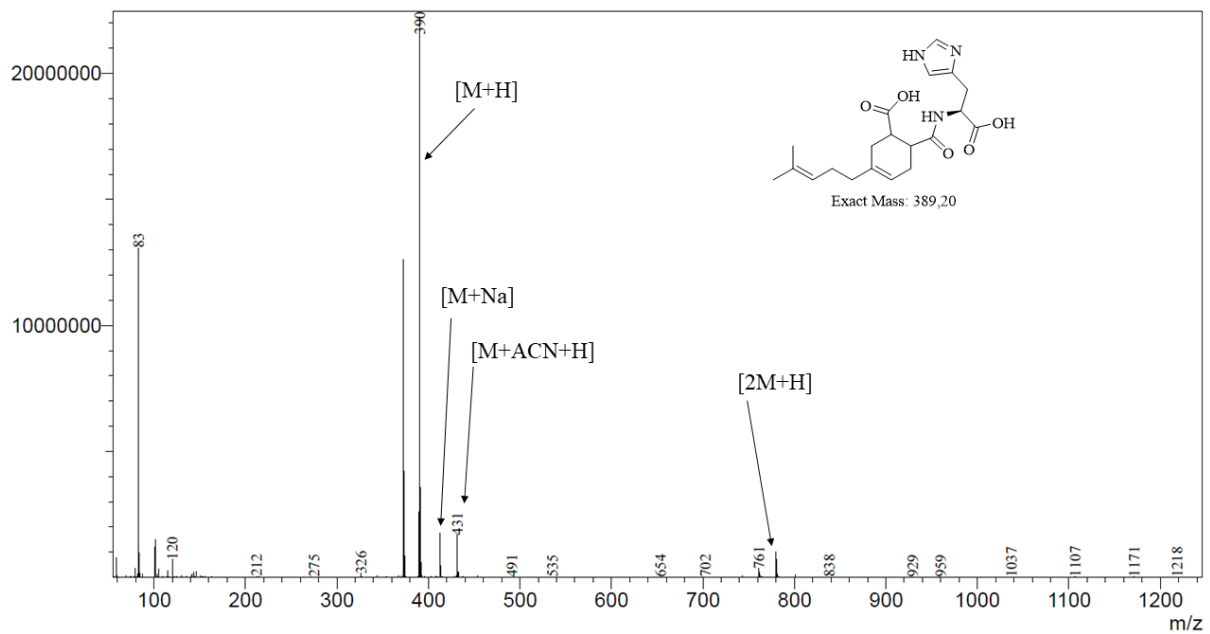


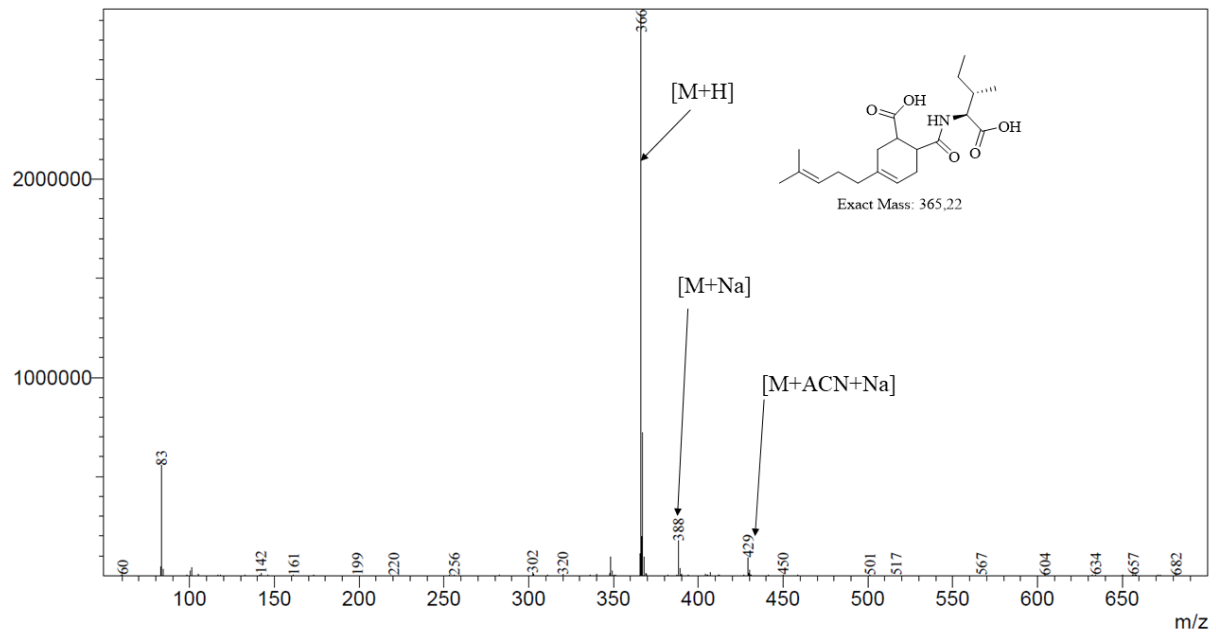
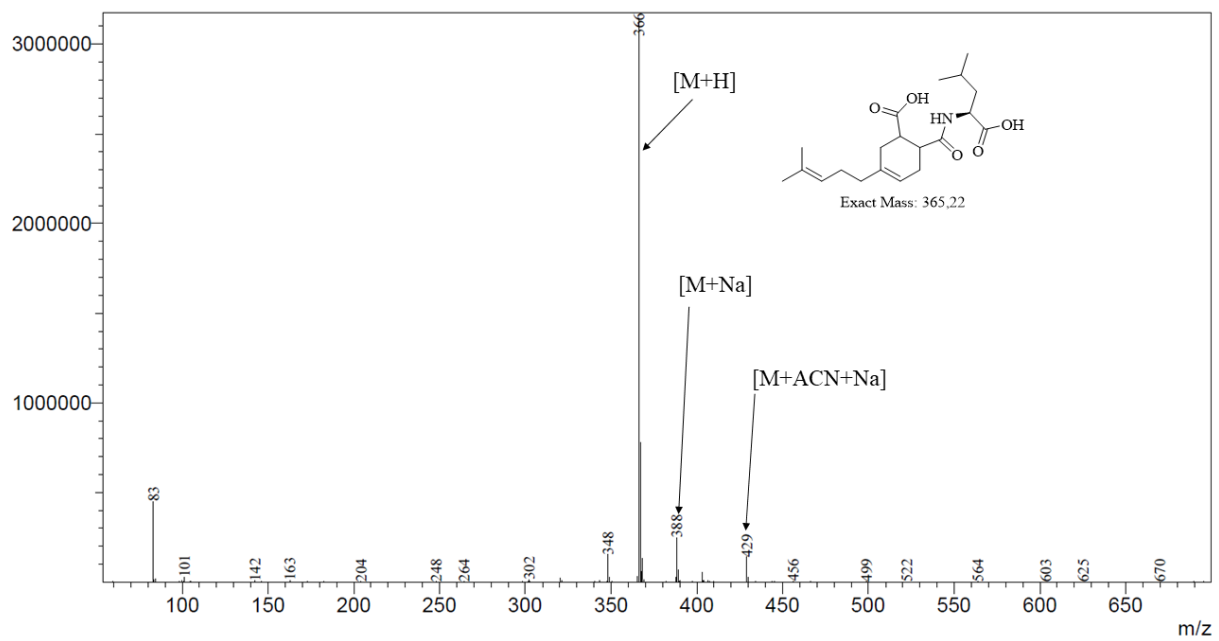
Abbildung A 7: MS-Spektrum von N-(Myrcen-MSA)-Alanin.

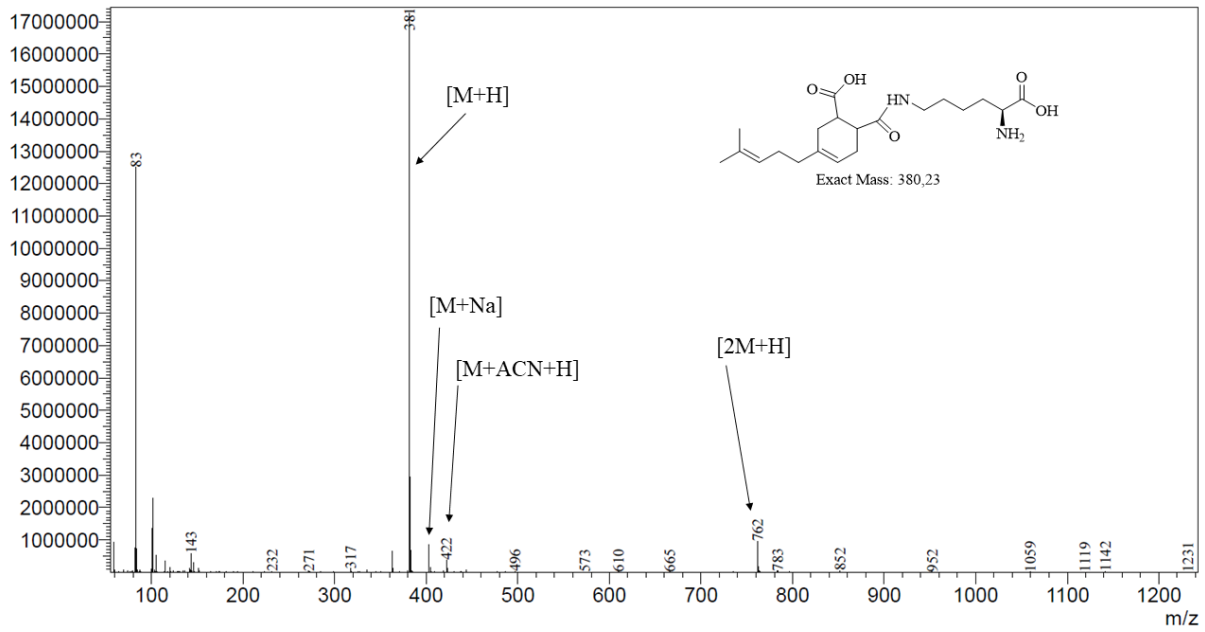
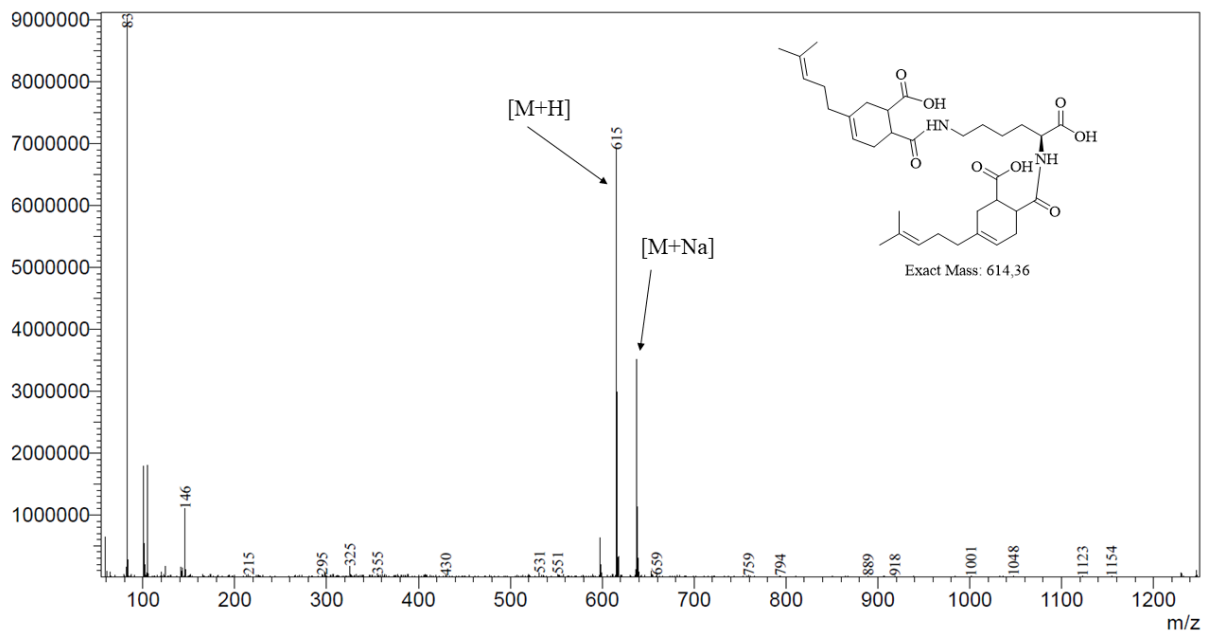
Abbildung A 8: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Arginin.Abbildung A 9: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Asparagin.

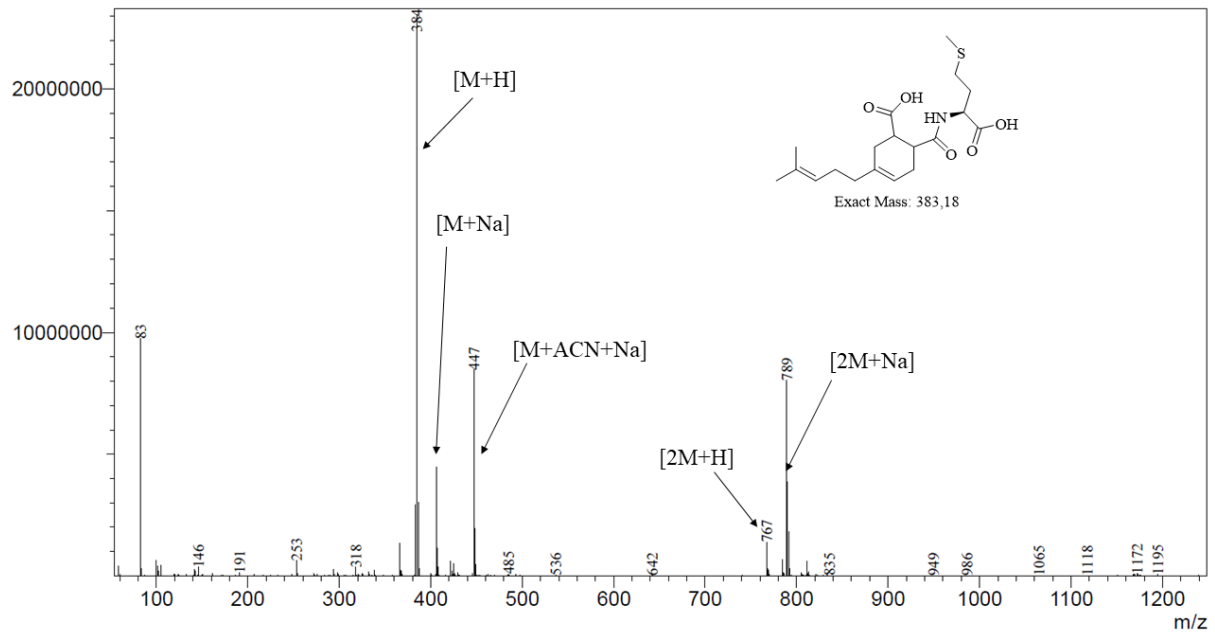
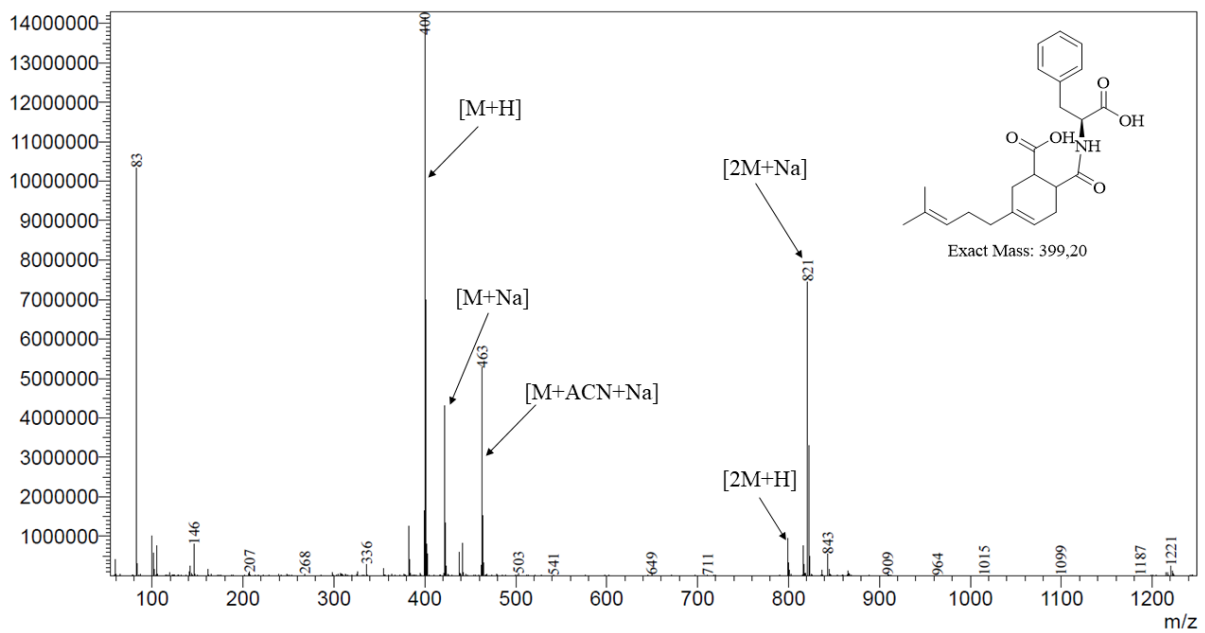
Abbildung A 10: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Asparaginsäure.Abbildung A 11: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Cystein.

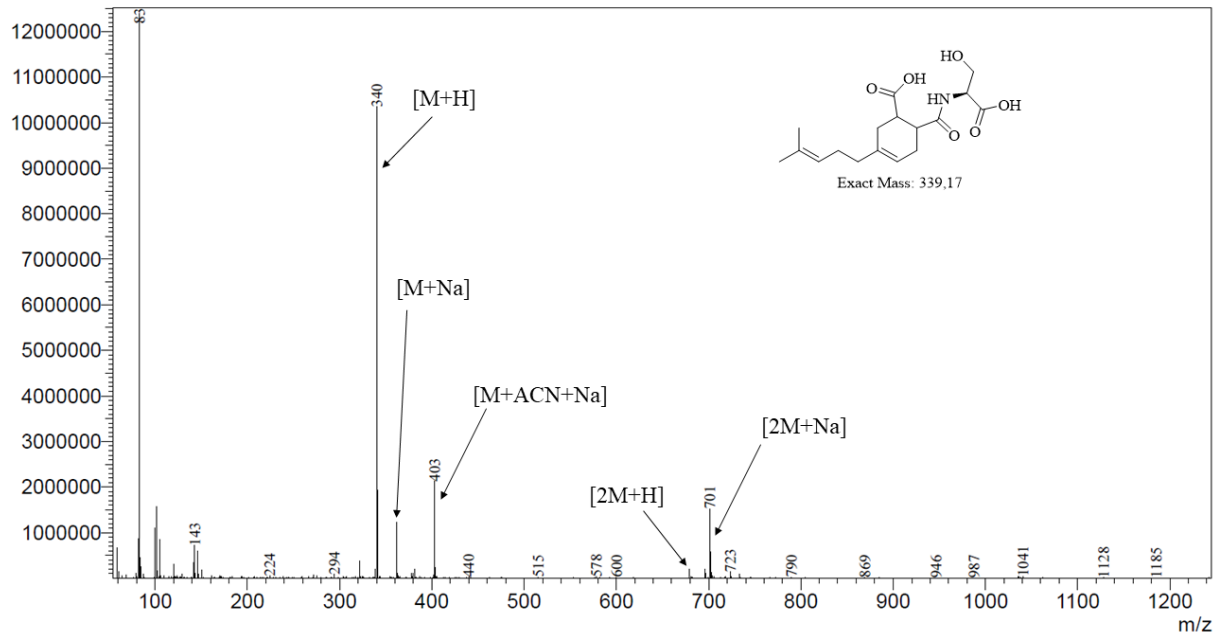
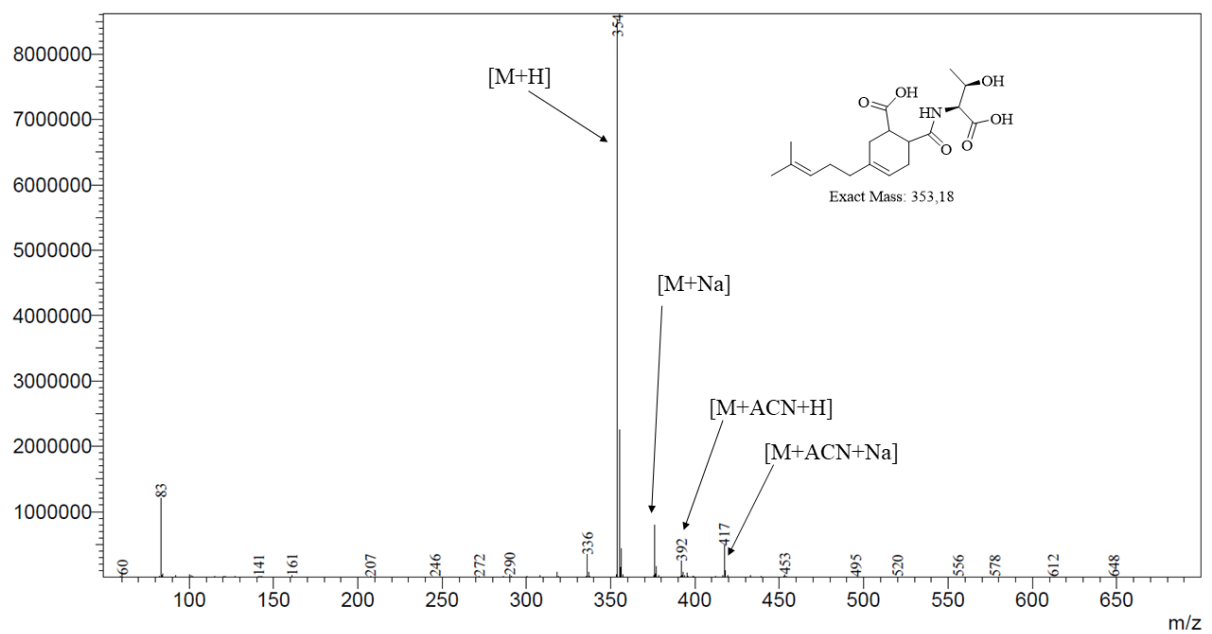
Abbildung A 12: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Glutamin.Abbildung A 13: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Glutaminsäure.

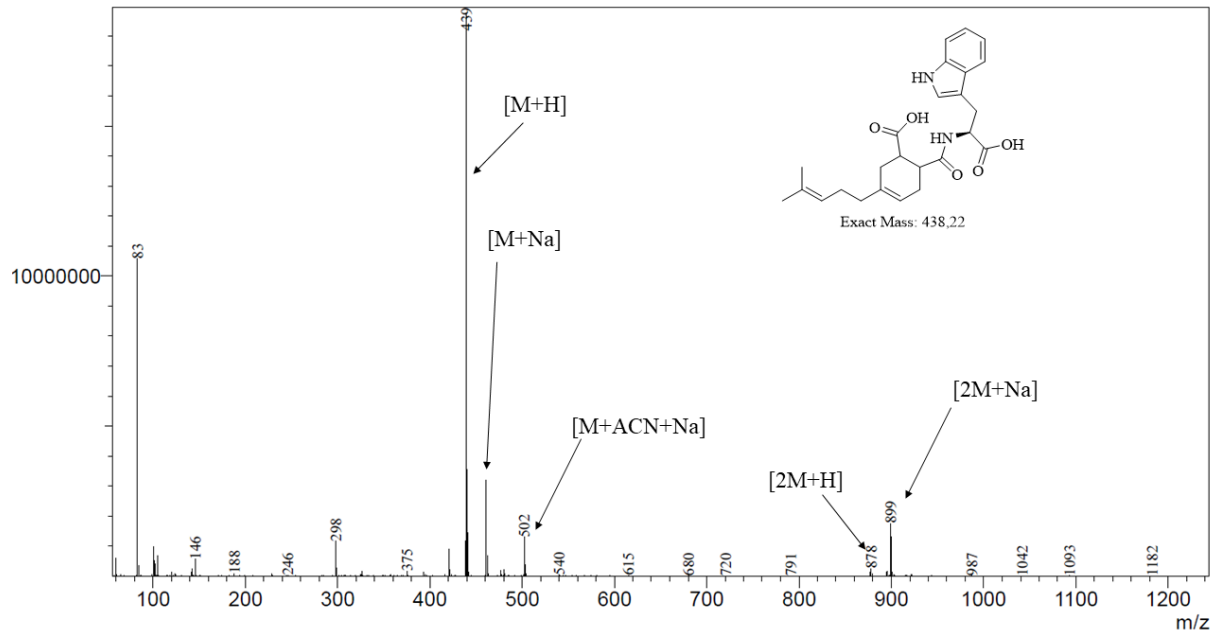
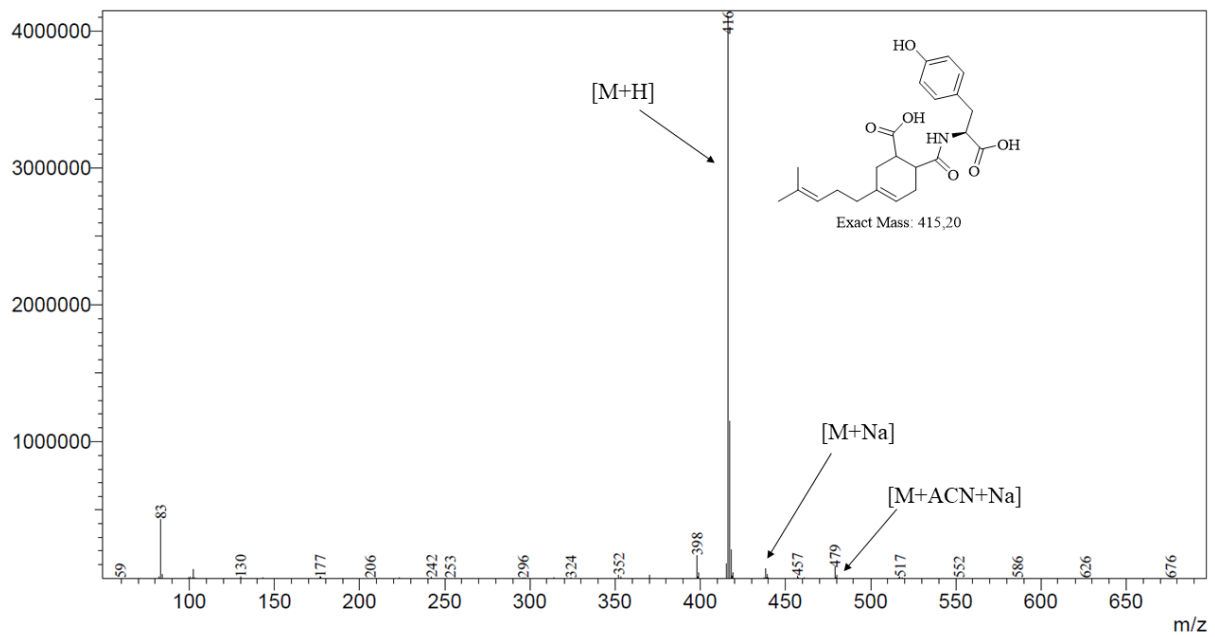
Abbildung A 14: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Glycin.Abbildung A 15: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Histidin.

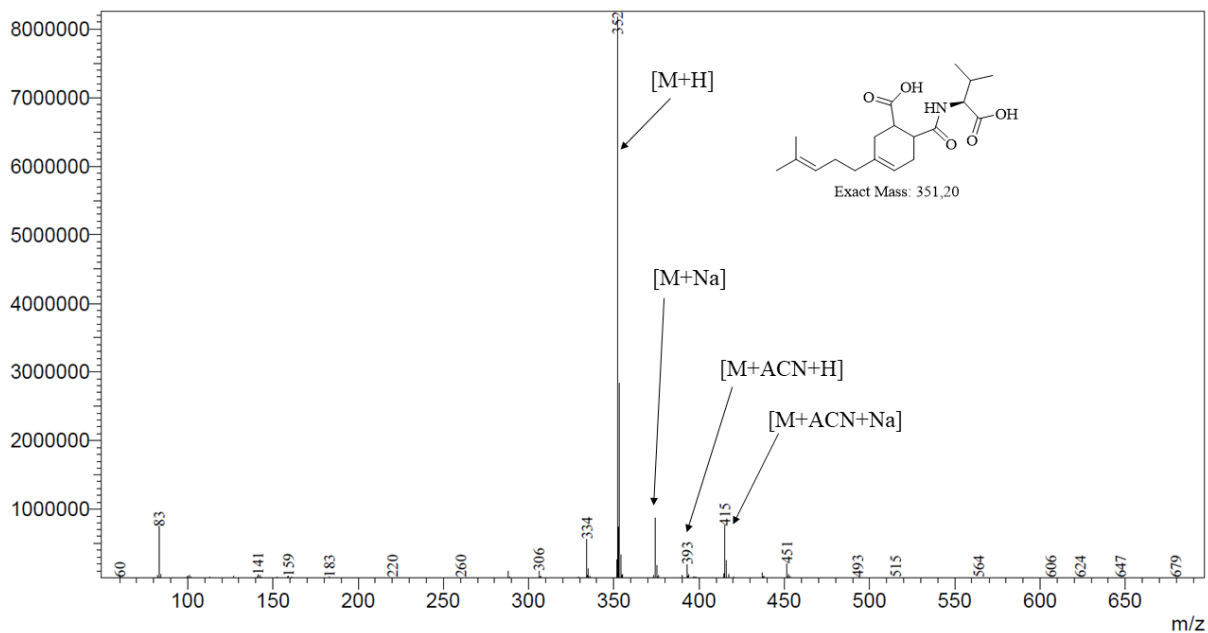
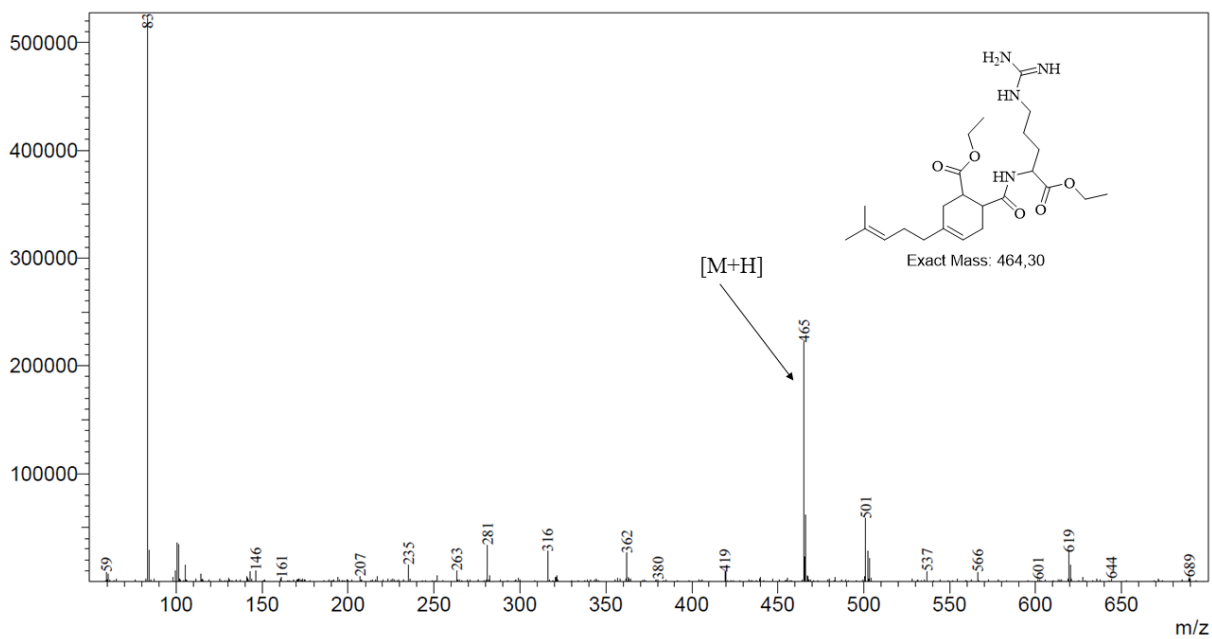
Abbildung A 16: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Isoleucin.Abbildung A 17: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Leucin.

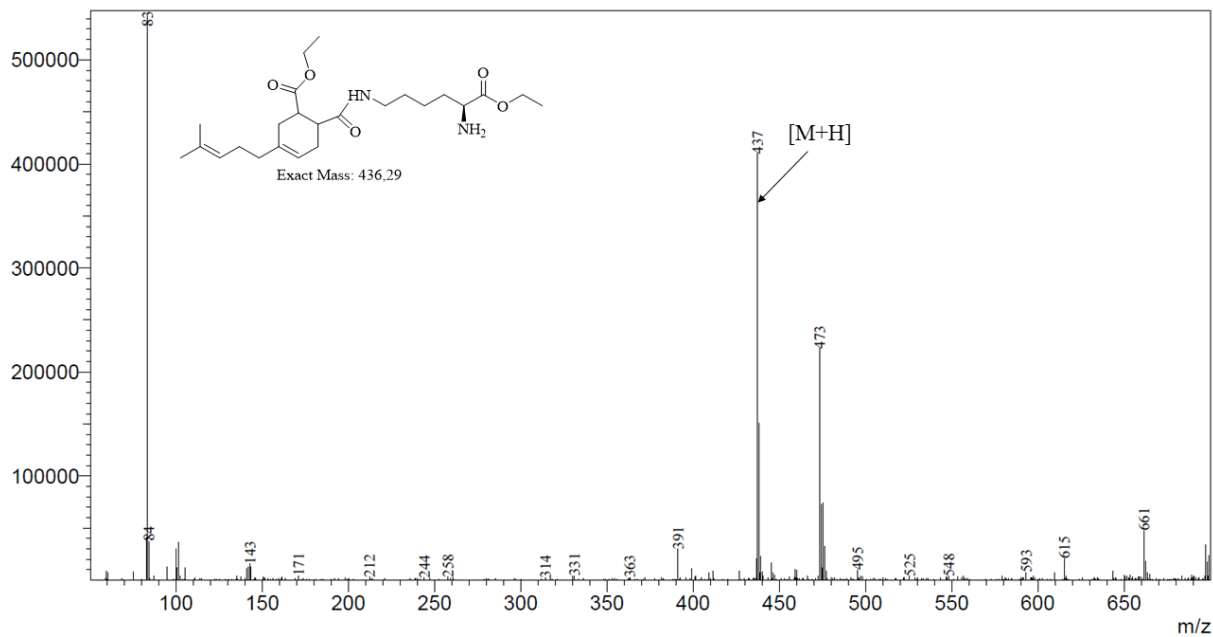
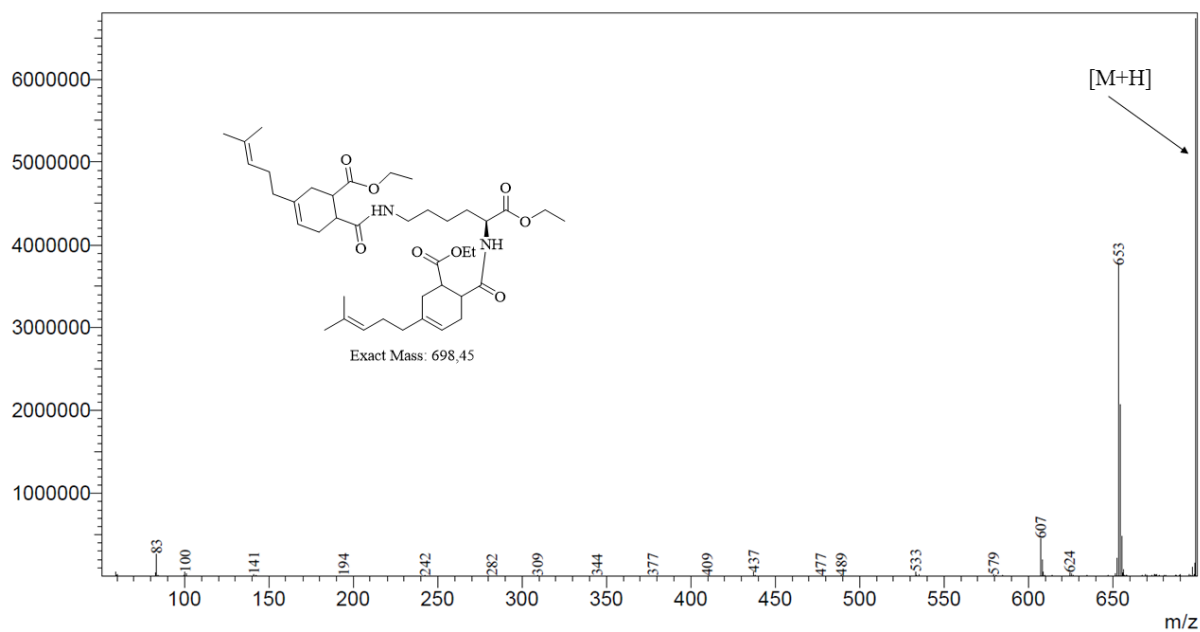
Abbildung A 18: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Lysin.Abbildung A 19: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)₂-Lysin.

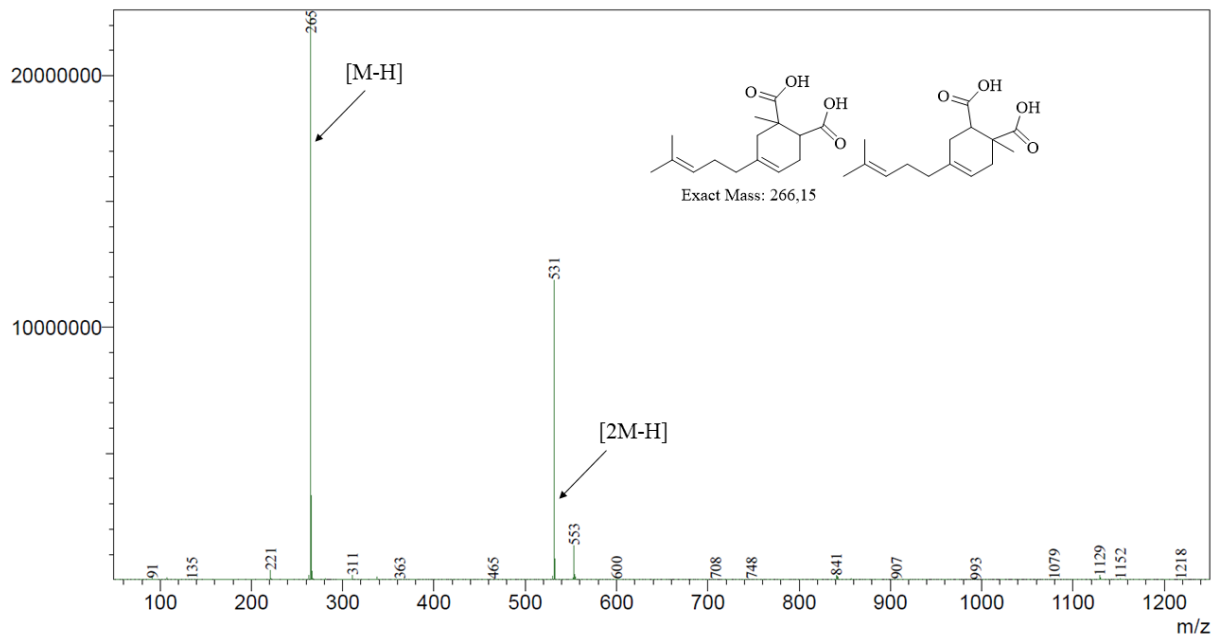
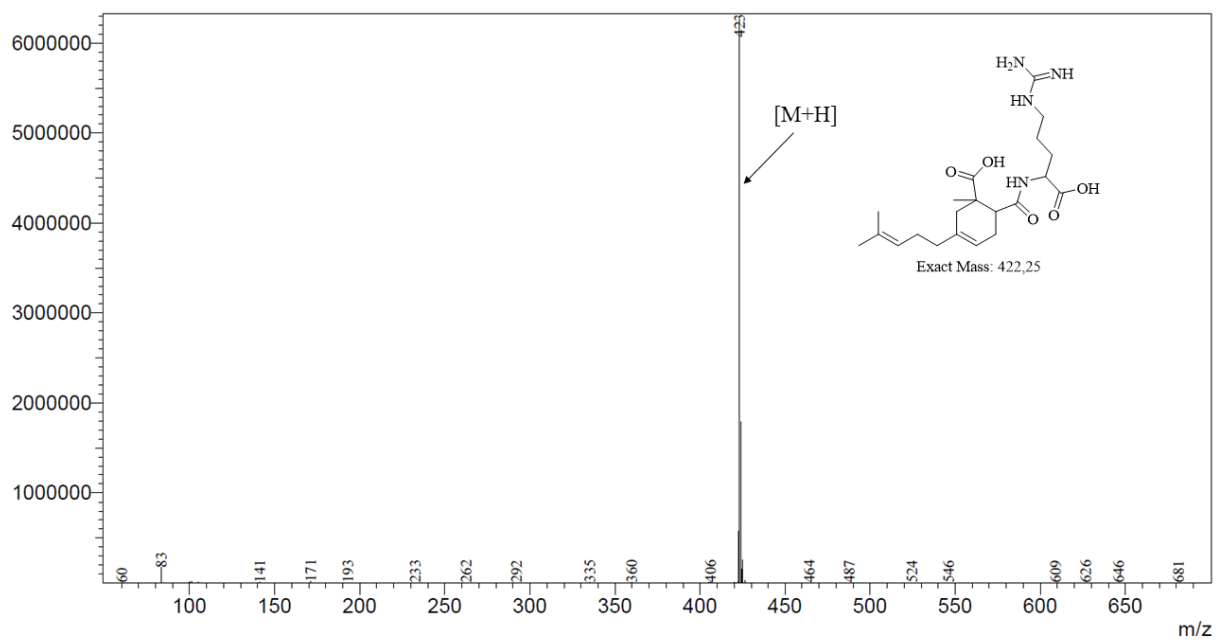
Abbildung A 20: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Methionin.Abbildung A 21: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Phenylalanin.

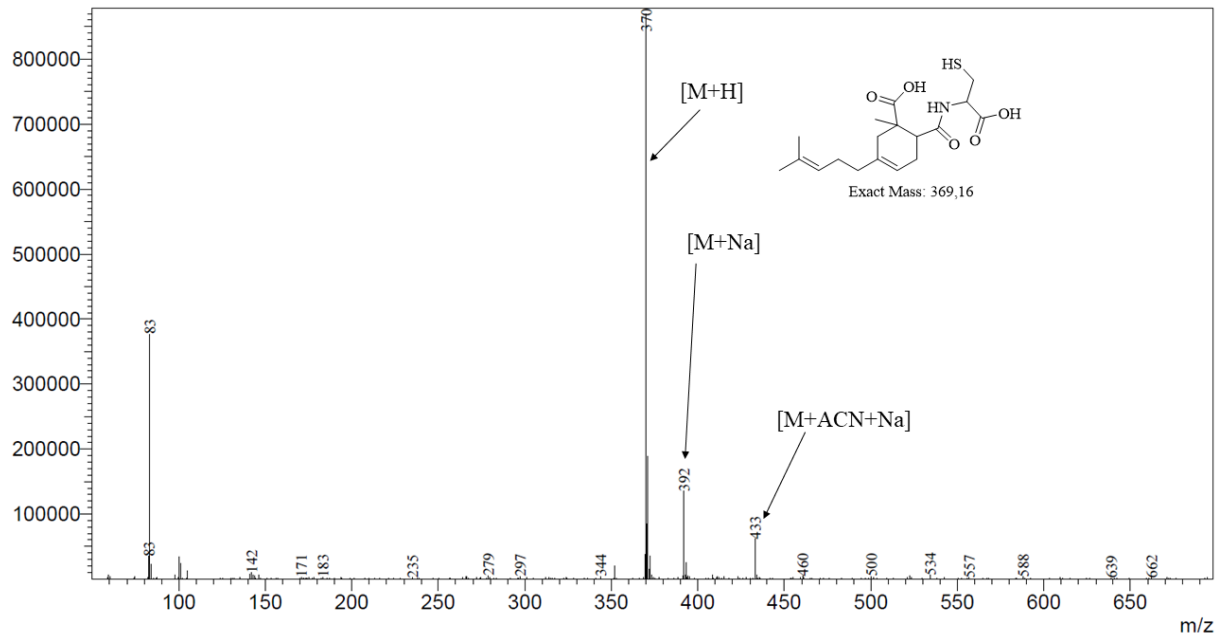
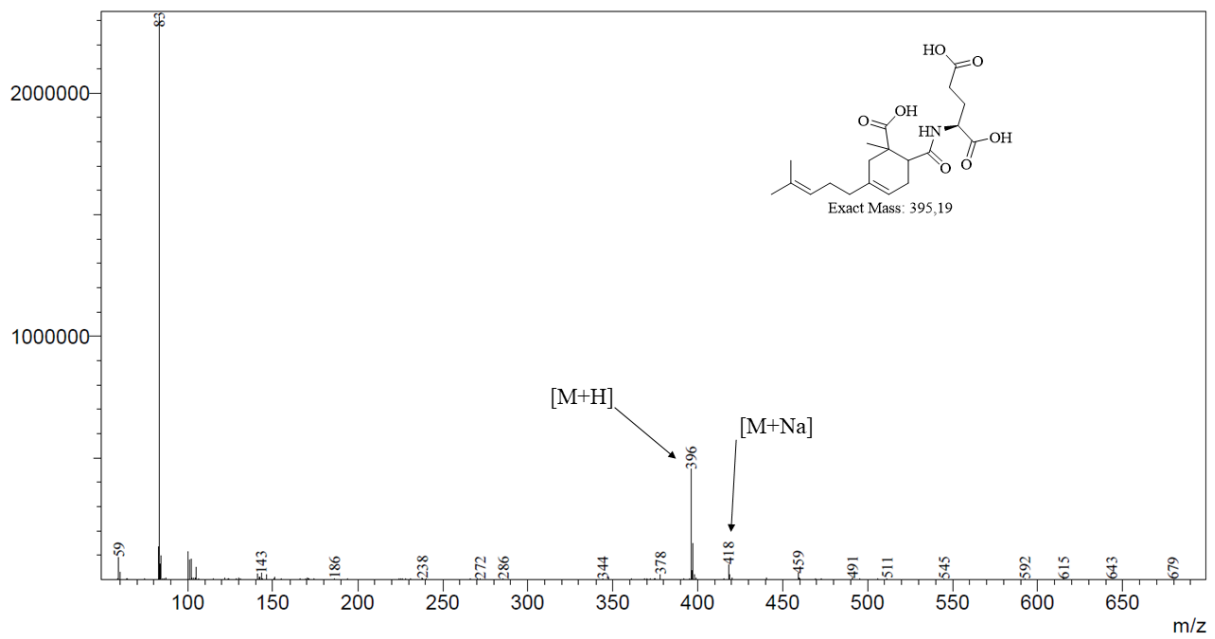
Abbildung A 22: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Serin.Abbildung A 23: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Threonin.

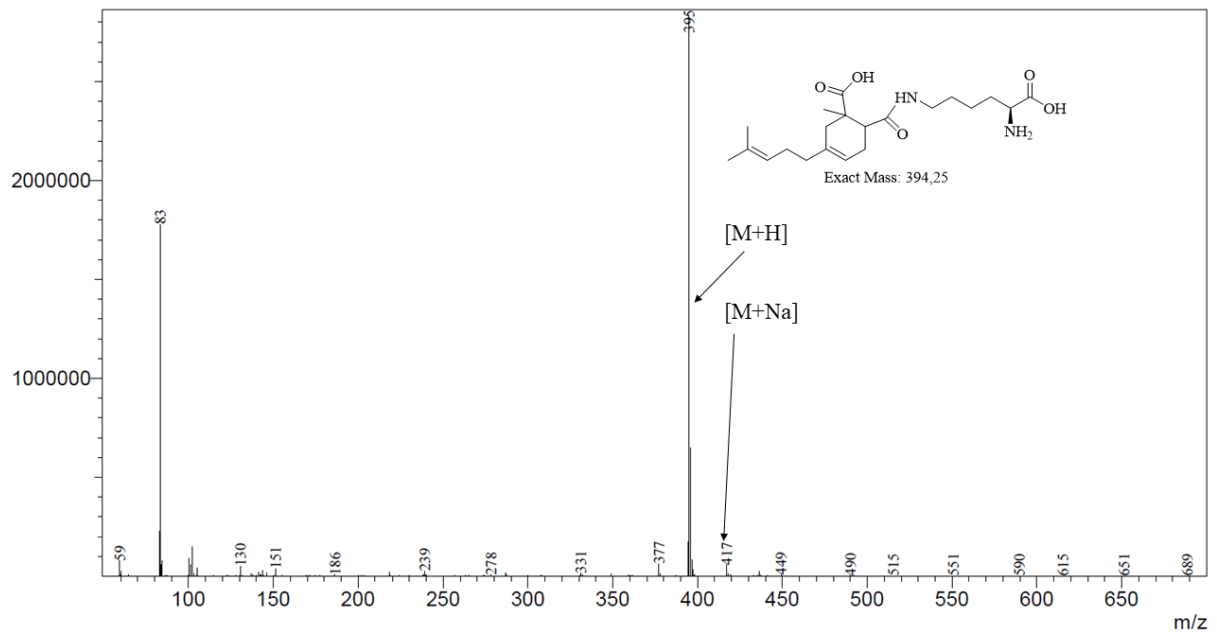
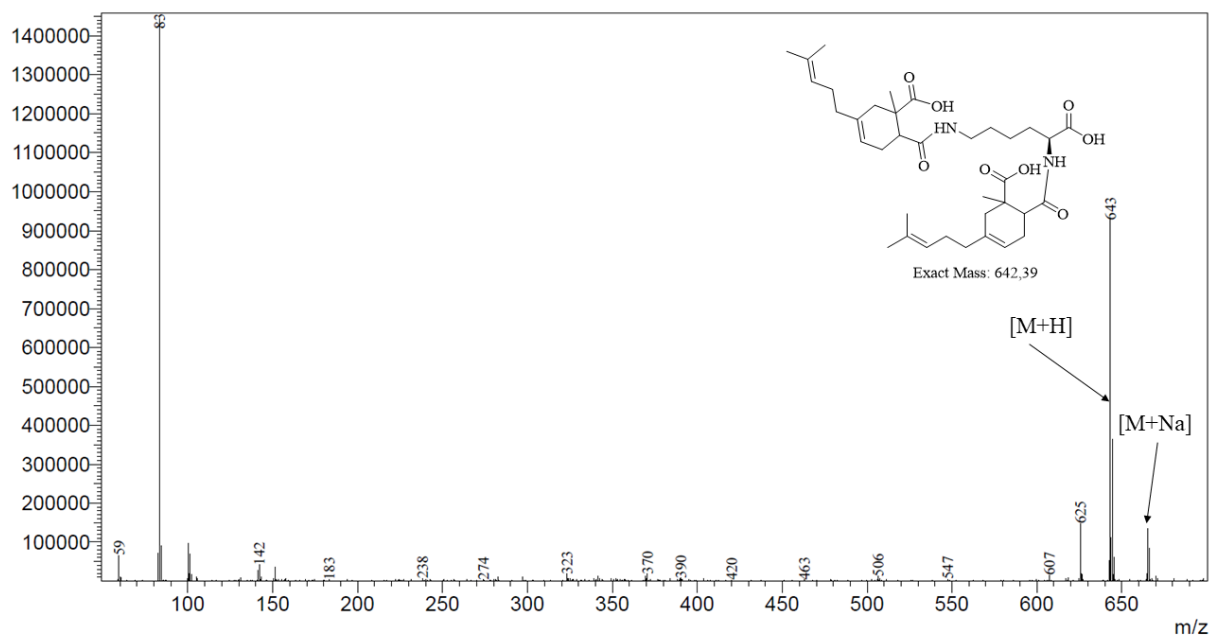
Abbildung A 24: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Tryptophan.Abbildung A 25: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Tyrosin.

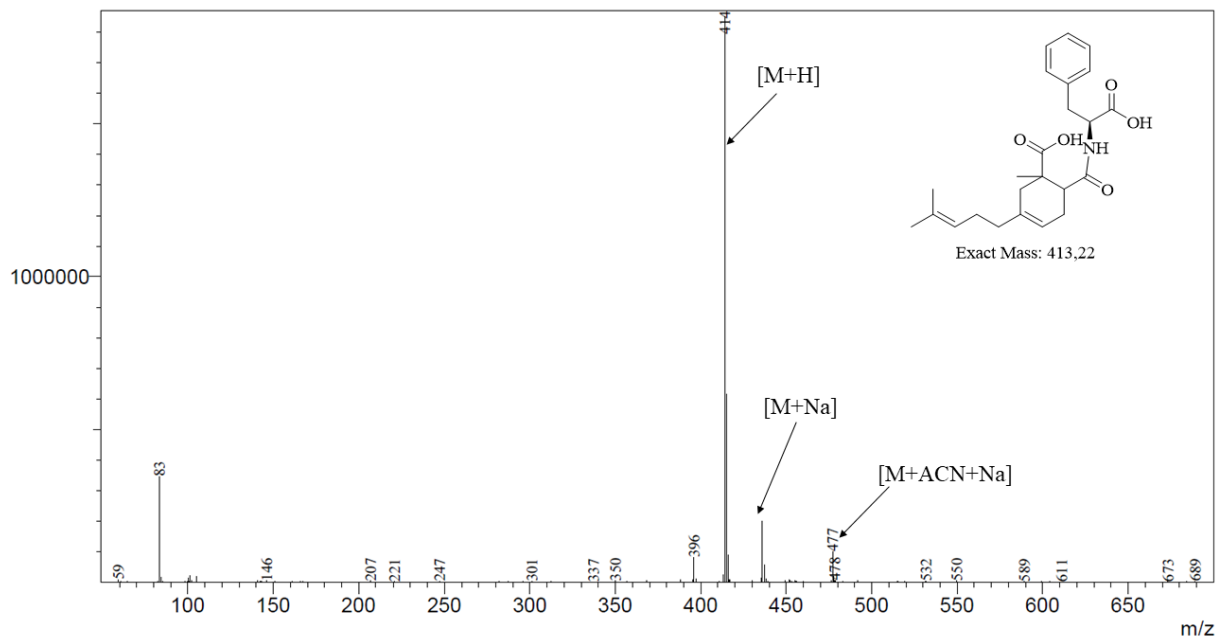
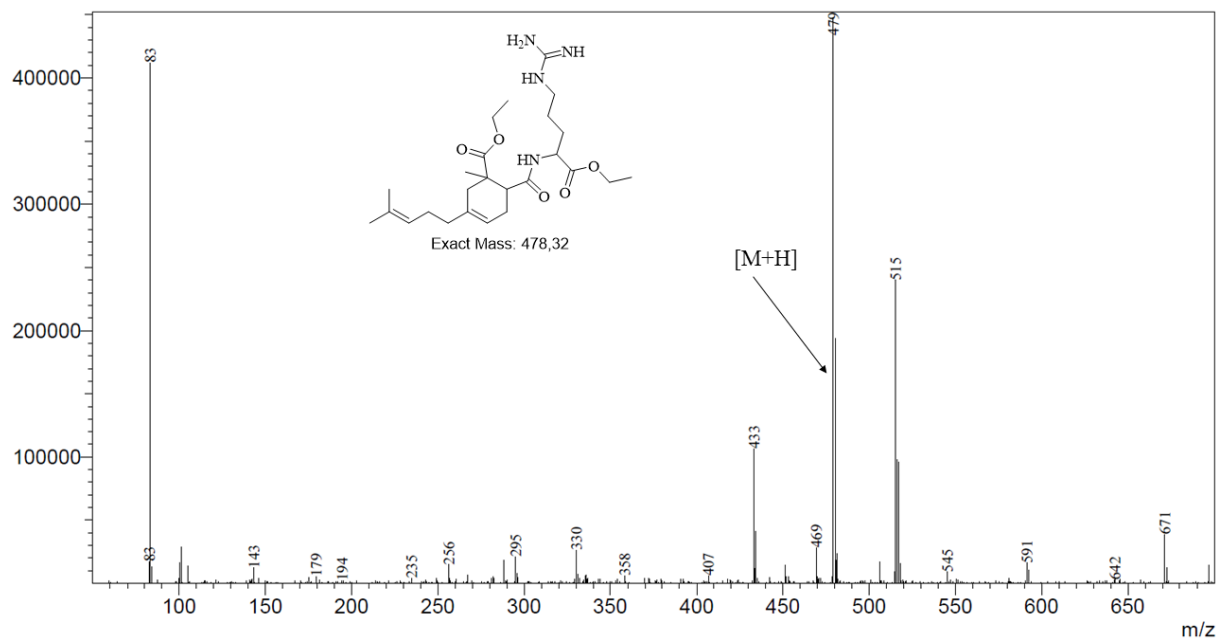
Abbildung A 26: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Valin.Abbildung A 27: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Arginin-Ethyl Ester.

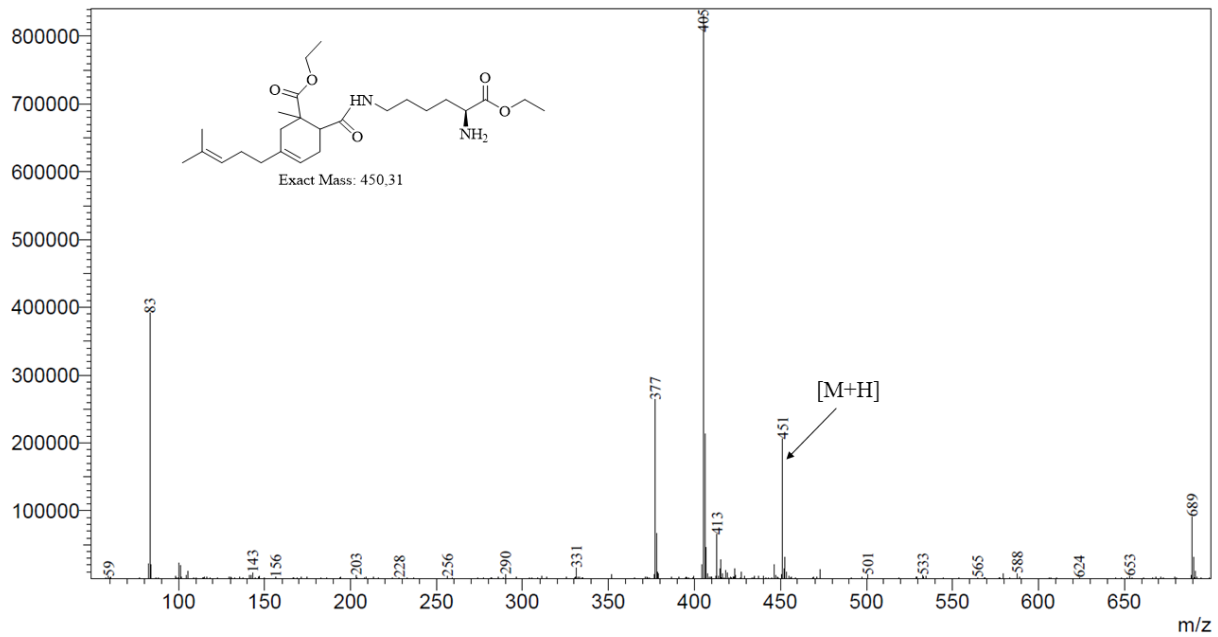
Abbildung A 28: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)-Lysin-Ethyl Ester.Abbildung A 29: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-MSA)₂-Lysin-Ethyl Ester.

Abbildung A 30: MS-Spektrum von *N*-Myrcen-CA-Hydrolysat.Abbildung A 31: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-CA)-Arginin.

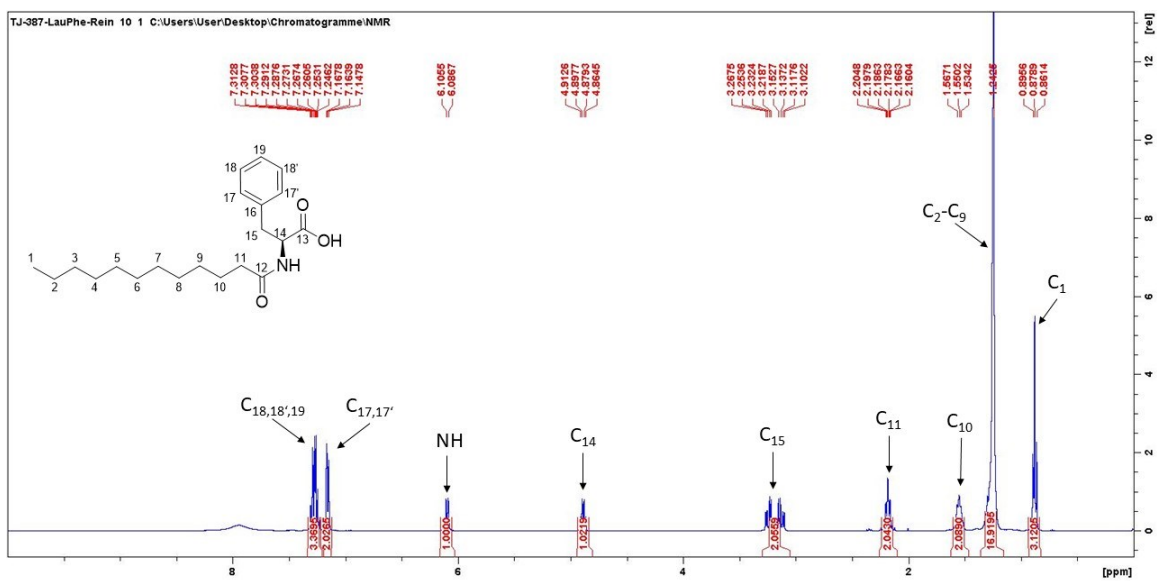
Abbildung A 32: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-CA)-Cystein.Abbildung A 33: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-CA)-Glutamin.

Abbildung A 34: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-CA)-Lysin.Abbildung A 35: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-CA)₂-Lysin.

Abbildung A 36: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-CA)-Phenylalanin.Abbildung A 37: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-CA)-Arginin-Ethyl Ester.

Abbildung A 38: MS-Spektrum von *N*-(Myrcen-CA)-Lysin-Ethyl Ester.

6.4.2 NMR-Spektren

Abbildung A 39: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von *N*-Lauroyl-Phenylalanin hergestellt mittels enzymatischer Acylierung durch PmAcy.

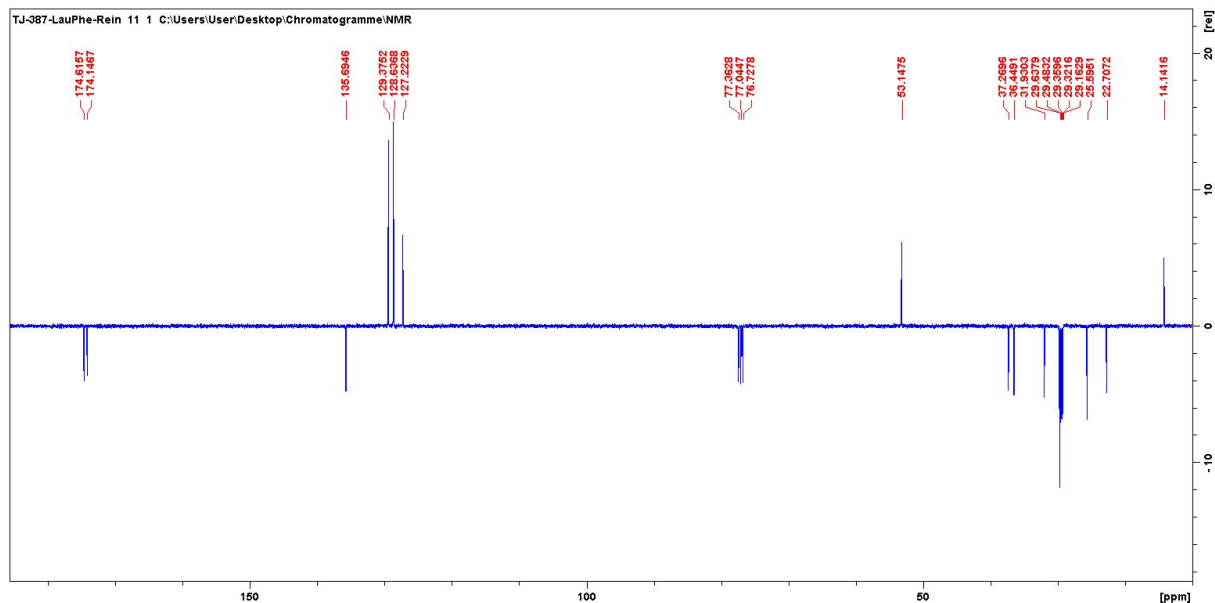


Abbildung A 40: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von *N*-Lauroyl-Phenylalanin hergestellt mittels enzymatischer Acylierung durch PmAcy.

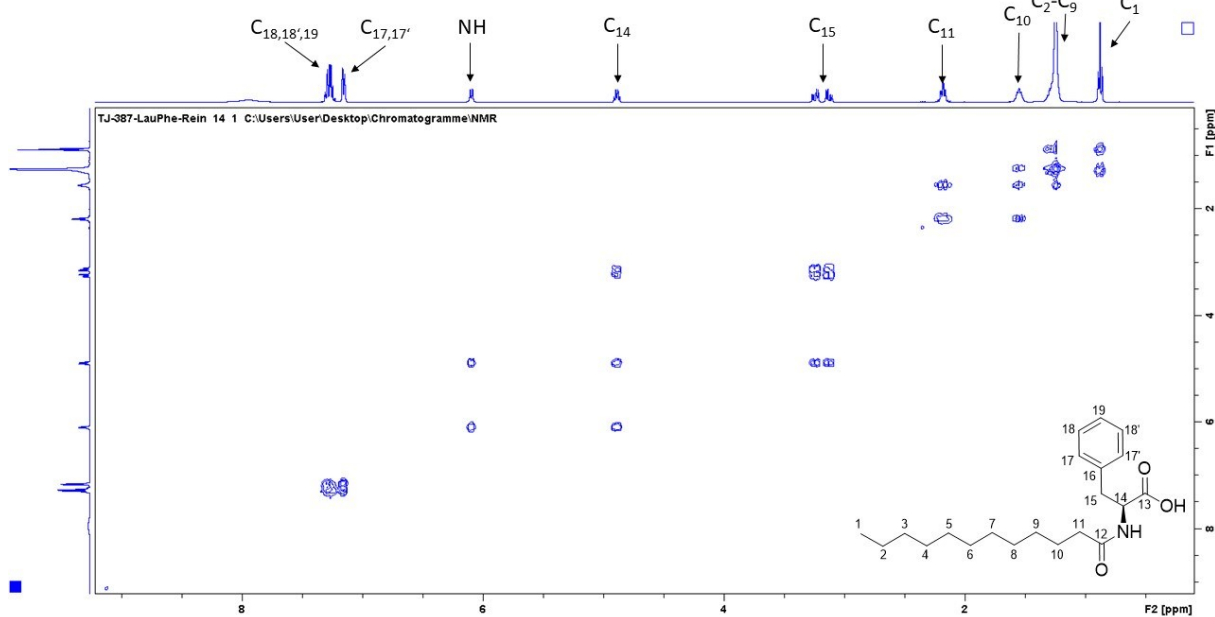


Abbildung A 41: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von *N*-Lauroyl-Phenylalanin hergestellt mittels enzymatischer Acylierung durch PmAcy.

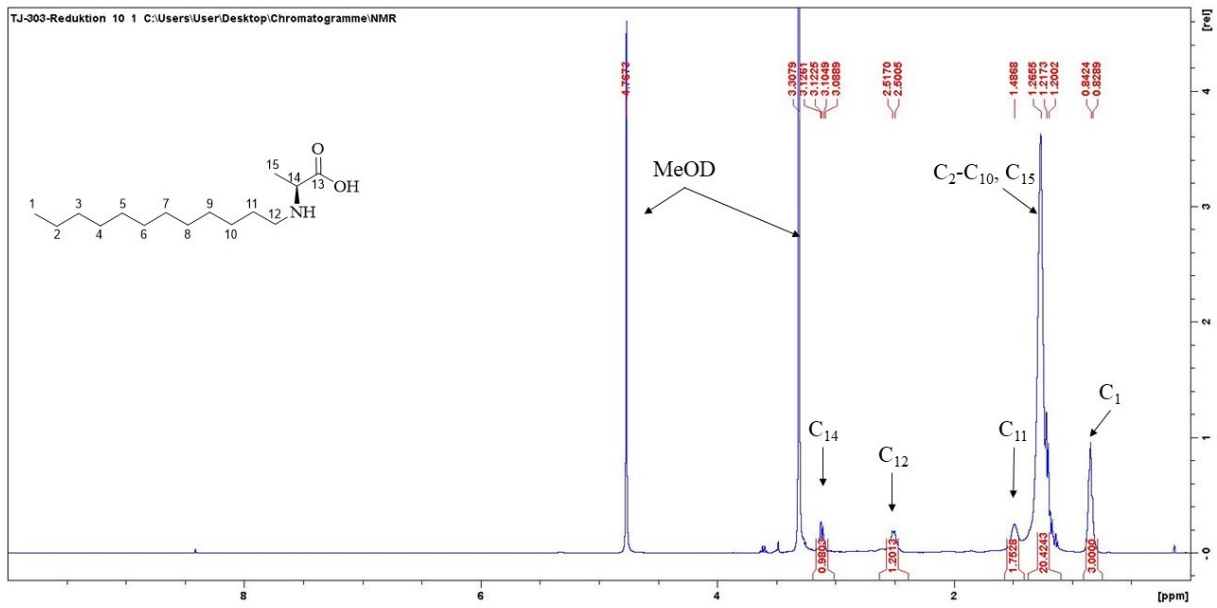


Abbildung A 42: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, D₂O) von *N*-Dodecanyl-Alanin.

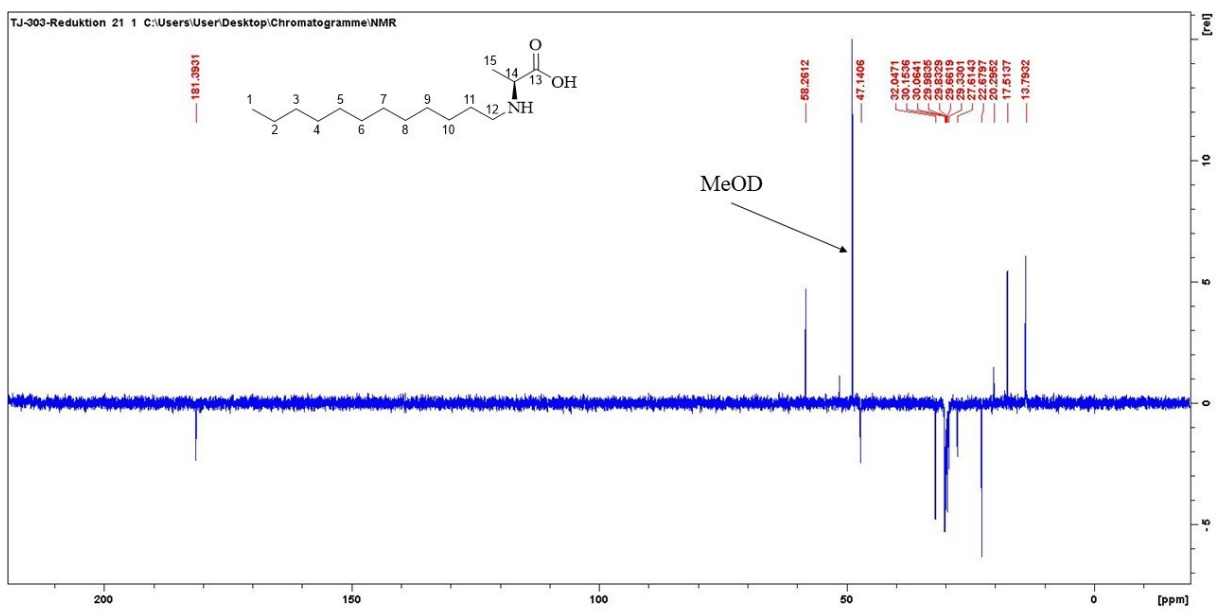


Abbildung A 43: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz, D₂O) von *N*-Dodecanyl-Alanin.

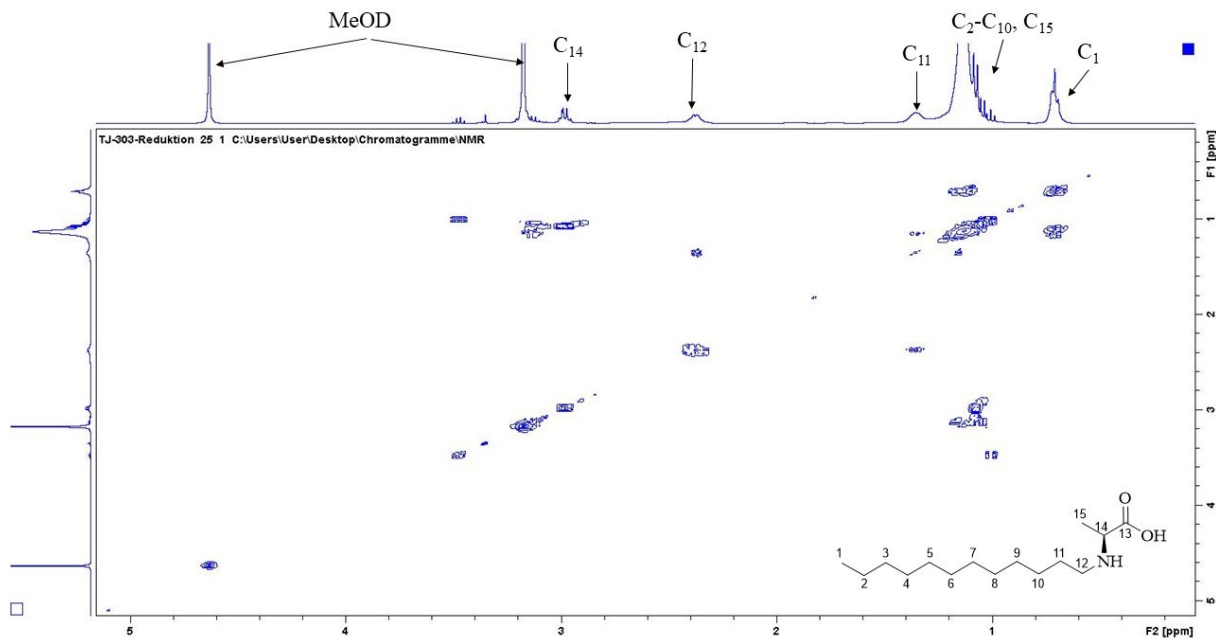


Abbildung A 44: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) von *N*-Dodecanyl-Alanin.

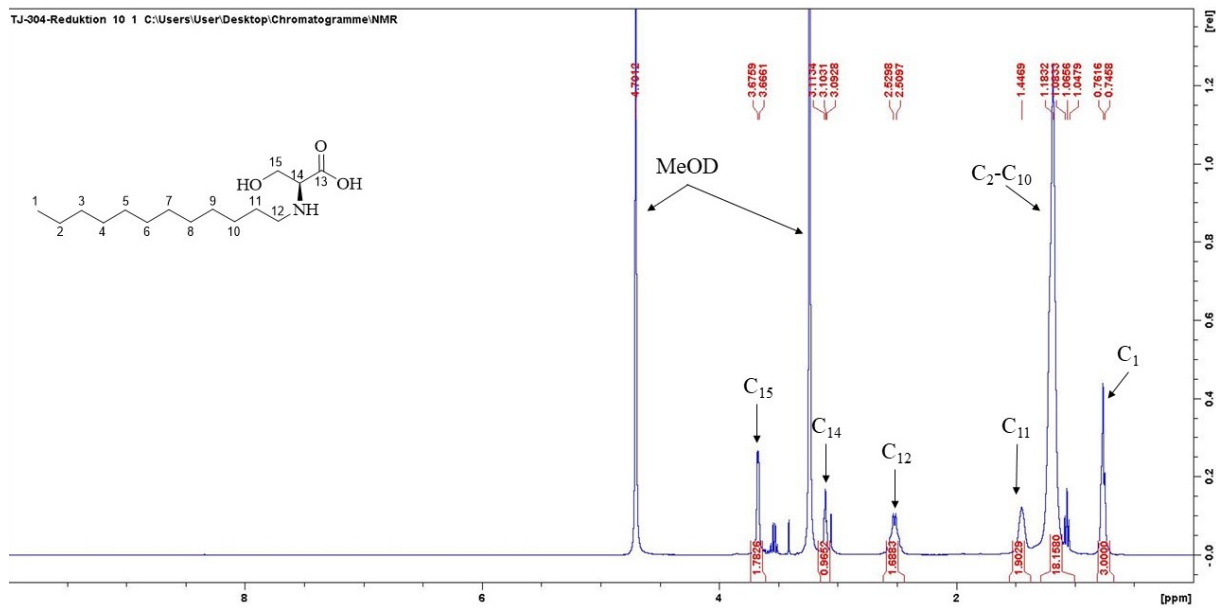


Abbildung A 45: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) von *N*-Dodecanyl-Alanin.

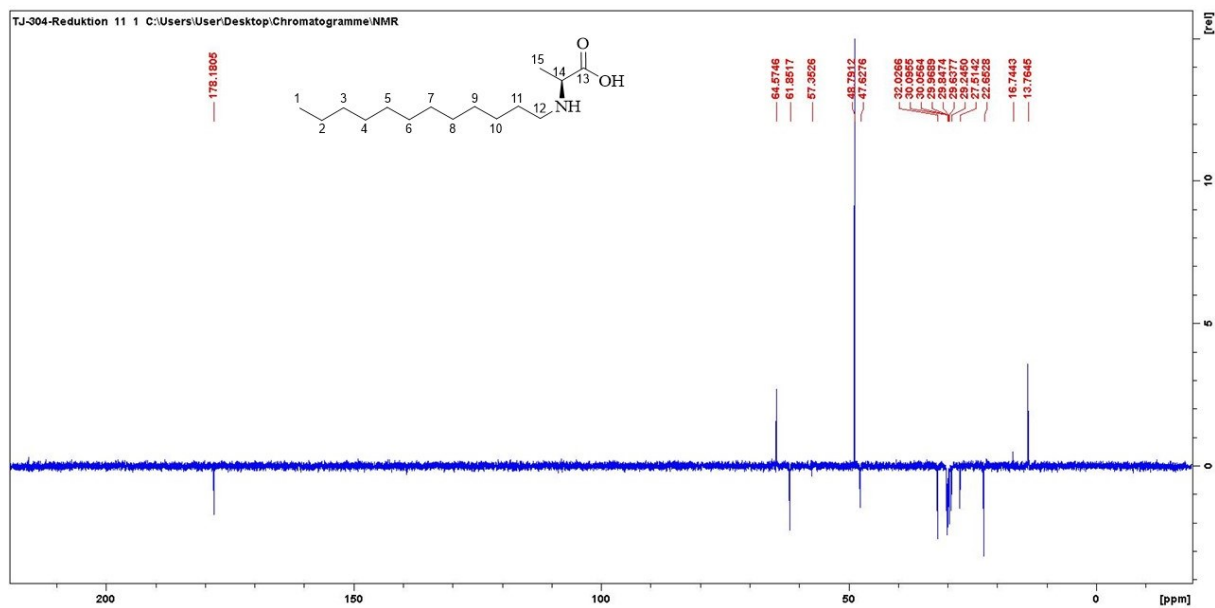


Abbildung A 46: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, D_2O) von *N*-Dodecanyl-Alanin.

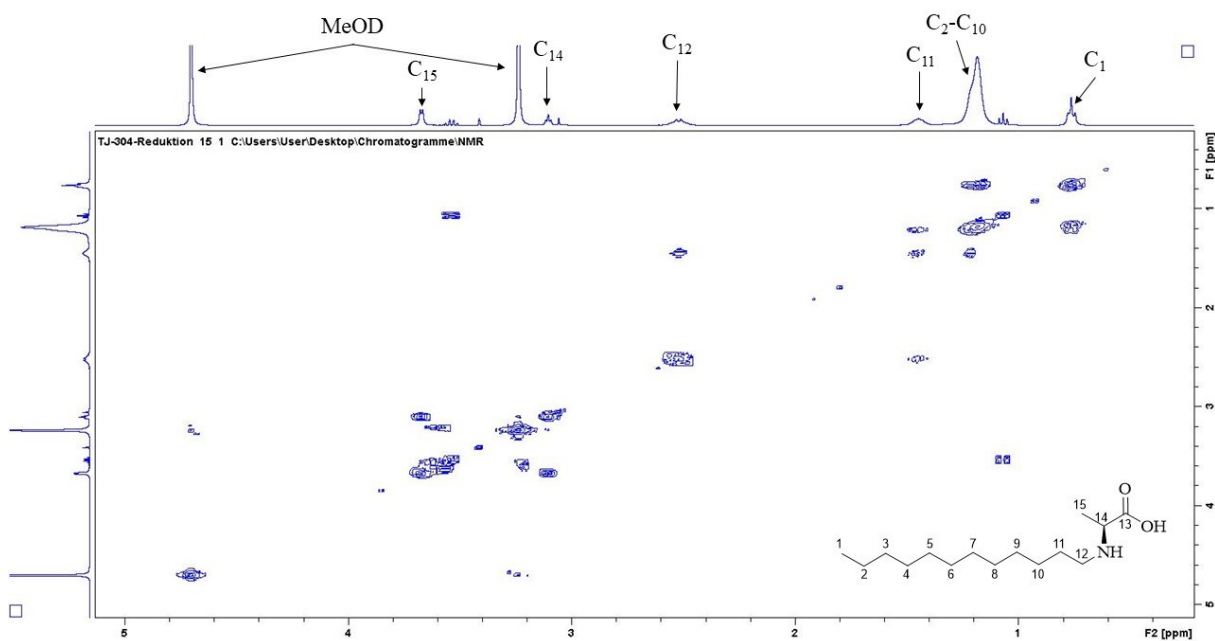
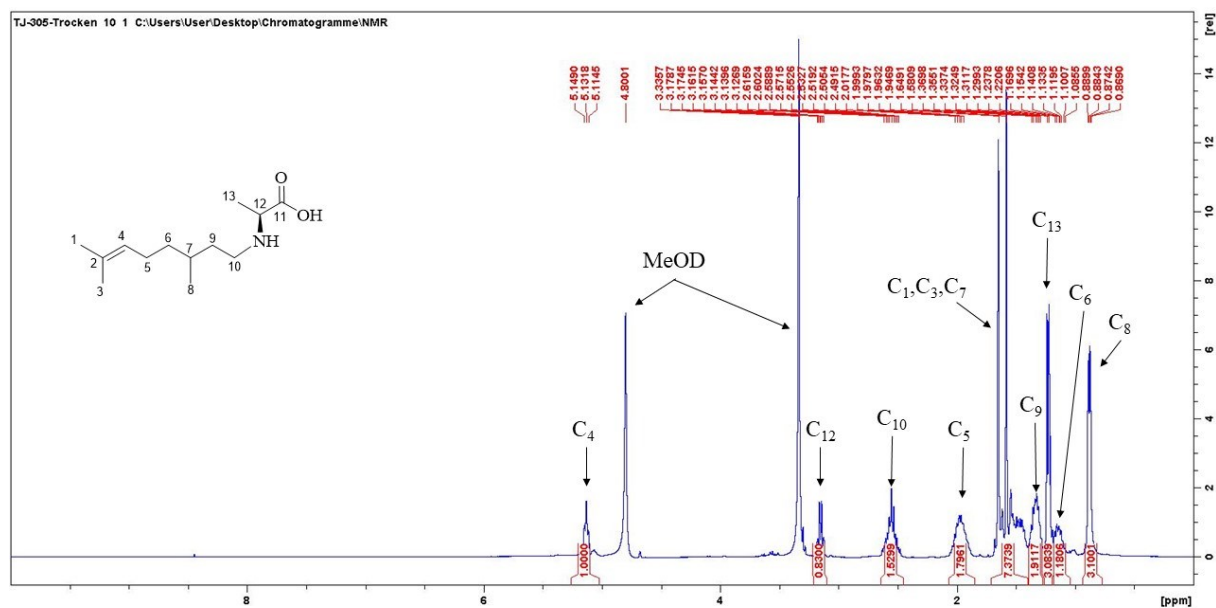
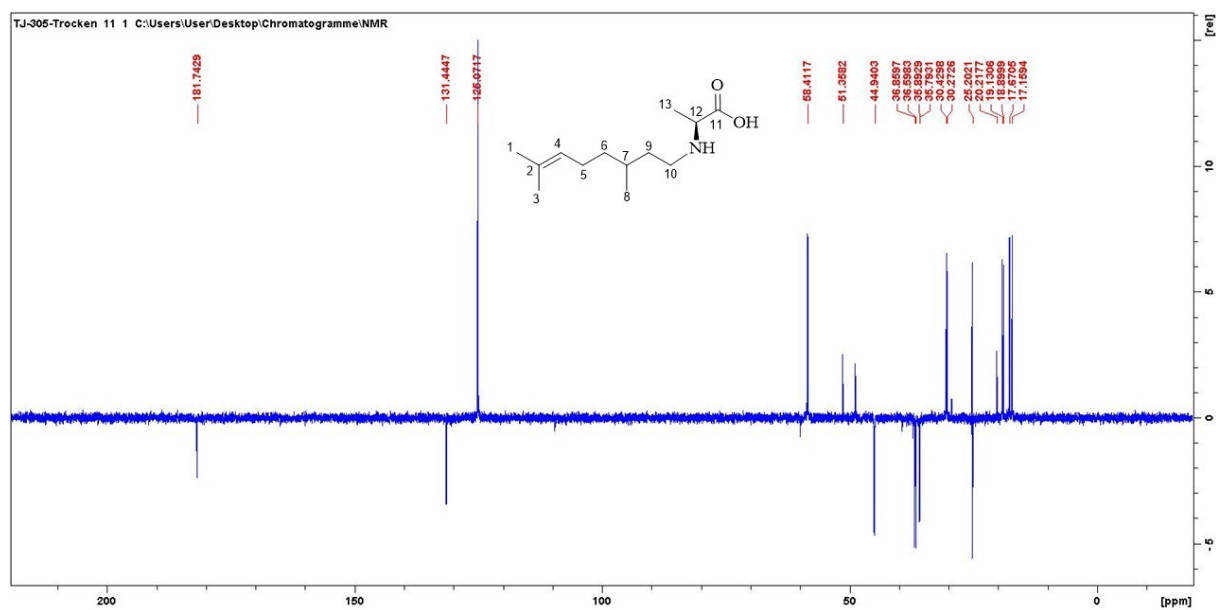
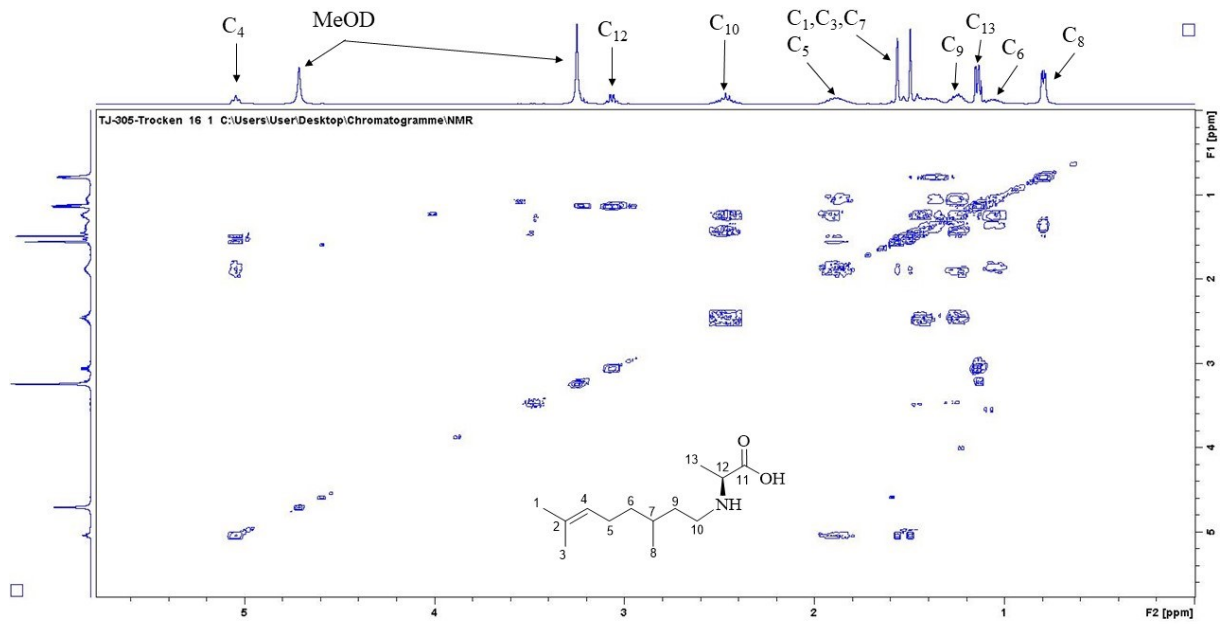
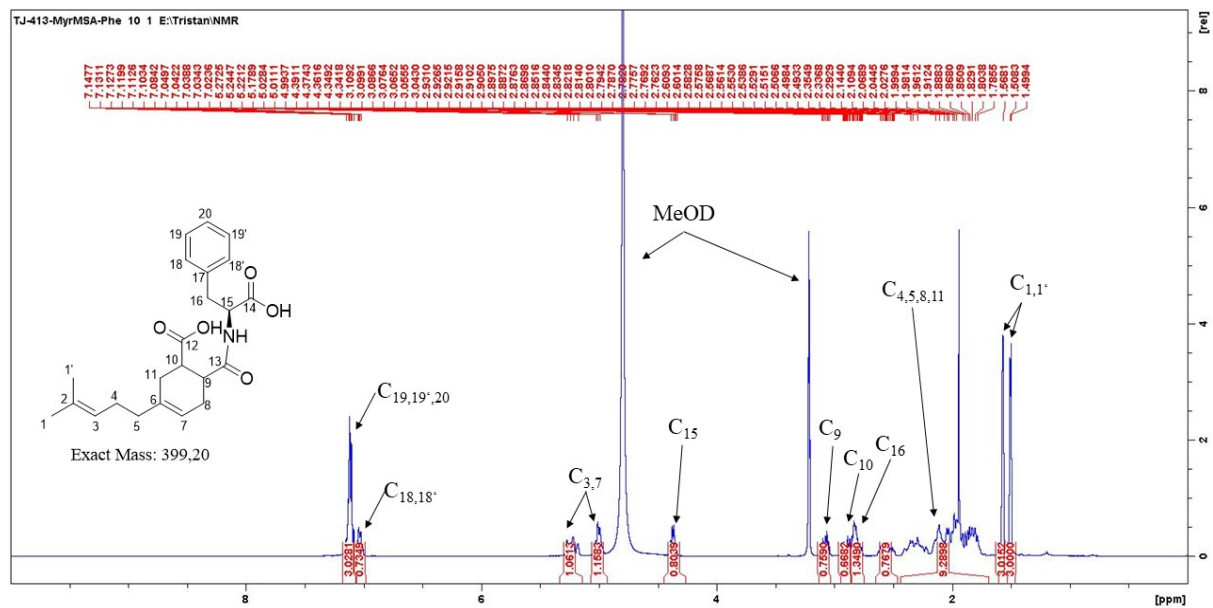


Abbildung A 47: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) von *N*-Dodecanyl-Alanin.

Abbildung A 48: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, D₂O) von *N*-Citronellyl-Alanin.Abbildung A 49: ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz, D₂O) von *N*-Citronellyl-Alanin.

Abbildung A 50: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) von *N*-Citronellyl-Alanin.Abbildung A 51: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) von *N*-(Myrcen-MSA)-Phenylalanin.

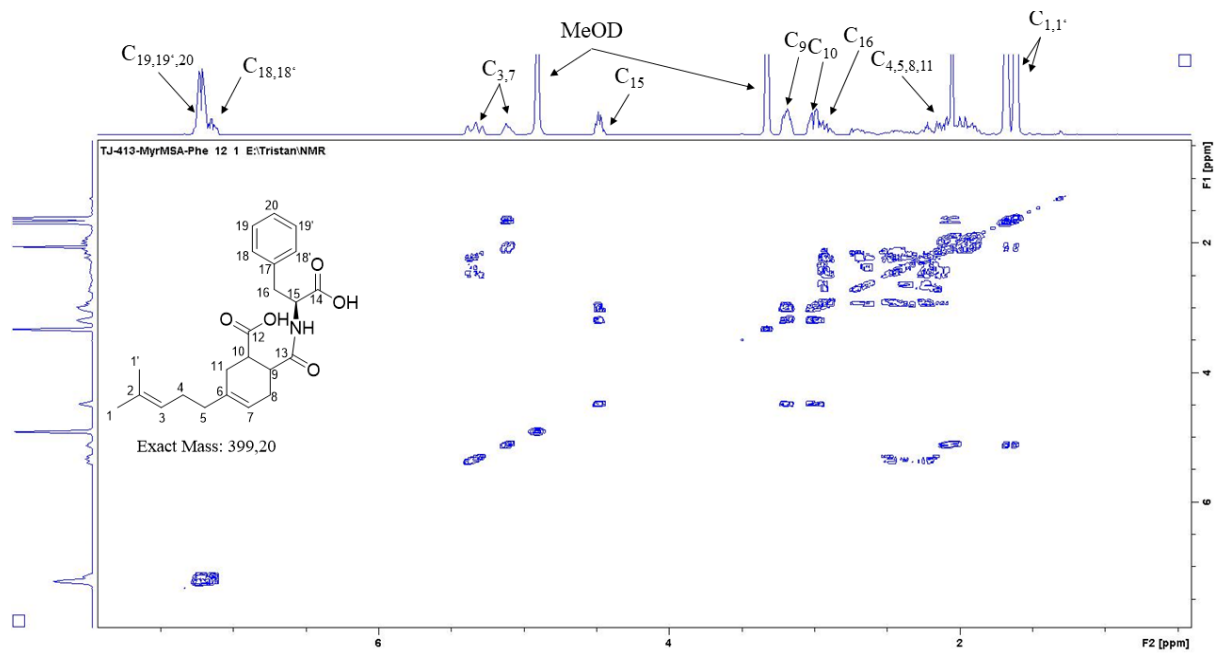


Abbildung A 52: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) von *N*-(Myrcen-MSA)-Phenylalanin.

6.5 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Tristan Jolmes
Geburtsdatum & -ort: 13.04.1992, Wickede-Wimbern
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

06/2023 – **Betriebsassistent mit Schwerpunkt SHE**
Heute *Ineos Manufacturing Deutschland GmbH*

02/2019 - **Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen der kooperativen**
10/2022 **Promotion**
Lehrstuhl für Grüne Chemie & Nachwachsende Rohstoffe, TH Köln
Unterbrechung durch Elternzeit von 04/2020 – 10/2020

Ausbildung

02/2019 - **Kooperative Promotion**
Heute *Leibniz-Universität Hannover (LUH) & Technische Hochschule Köln*

05/2016 - **Masterstudium Chemie**
08/2018 *Technische Universität Dortmund*

10/2012 - **Bachelorstudium Chemie**
04/2016 *Technische Universität Dortmund*

10/2011 - **Bachelorstudium Medizinphysik**
09/2012 *Technische Universität Dortmund*
Angestrebter Abschluss: Bachelor of Science

08/2002 - **Abitur**
09/2011 *St. Ursula-Gymnasium Arnsberg-Neheim*

08/1998 - **Grundschule**
07/2002 *St. Michael-Grundschule Arnsberg-Neheim*

6.6 Publikationsliste

6.6.1 Wissenschaftliche Publikationen während des Studiums

1. S. Fuchs, D. Lichte, **T. Jolmes**, T. Rösler, G. Meier, H. Strutz, A. Behr, A. J. Vorholt, ‘*Synthesis of Industrial Primary Diamines via Intermediate Diols – Combining of Hydroformylation, Hydrogenation and Amination*’, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 4126, doi:10.1002/cctc.201800950.
2. M. Terhorst, C. Plass, A. Hinzmann, A. Guntermann, **T. Jolmes**, J. Rösler, D. Panke, H. Gröger, D. Vogt, A. J. Vorholt, T. Seidensticker, ‘*One-pot synthesis of aldoximes from alkenes via Rh-catalysed hydroformylation in an aqueous solvent system*’, *GreenChem* **2020**, *22*, 7974, doi:10.1039/D0GC03141K.

6.6.2 Wissenschaftliche Publikationen aus der Doktorarbeit

3. G. Haeger, J. Wirges, N. Tanzmann, S. Oyen, **T. Jolmes**, K.-E. Jaeger, U. Schörken, J. Bongaerts, P. Siegert, ‘*Chaperone assisted recombinant expression of a mycobacterial aminoacylase in Vibrio natriegens and Escherichia coli capable of N-lauroyl-L-amino acid synthesis*’, *Microb. Cell Fact.* **22**, 77(2023), doi:10.1186/s12934-023-02079-1.
4. P. Siegert, G. Haerger, J. Bongaerts, **T. Jolmes**, U. Schörken ‘*Aminoacylase and methods of use thereof*’ (European Patent Application No. EP **23176331.9**, Filing Date 31 May 2023)
5. G. Haeger, **T. Jolmes**, S. Oyen, K.-E. Jaeger, J. Bongaerts, P. Siegert, ‘*Novel recombinant aminoacylase from Paraburkholderia monticola capable of N-acyl-amino acid synthesis*’ *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2023 (accepted)**
6. **T. Jolmes**, S. Tayari, M. Bresser, S. Müller, B. Glösen, U. Schörken, ‘*Comparative analysis of bio-based amino acid surfactants obtained via Diels-Alder reaction of cyclic anhydrides*’ *Green Process. Synth.*, **2023 (accepted)**
7. **T. Jolmes**, F. W. Jumpertz, M. E. Stieglat, A. Hesso, U. Schörken, ‘*Application of T3P as green coupling agent for the synthesis of N-acyl amino acid and acylated peptide surfactants*’ *AppliedChem*, (Manuskript in Vorbereitung).
8. **T. Jolmes**, G. Haeger, J. Bongaerts, P. Siegert, U. Schörken, ‘*Synthesis of antimicrobial food-additive N-lauroyl-arginine-ethyl ester (LAE) by novel aminoacylase from Paraburkholderia monticola*’ (Manuskript in Vorbereitung).

6.6.3 Posterpublikationen

1. **T. Jolmes**, C. Zerhusen, T. Bollmann, B. Glösen, U. Schörken, ‚*Biobased Sophorolipids and lipopeptides offer structural variety useful for application tailoring*‘, *Biosurfactants* **2019**, Stuttgart.
2. **T. Jolmes**, M. Bresser, B. Glösen, U. Schörken, ‚*Synthesis of bio-based-three-component amino acid surfactants via Diels-Alder reaction of renewable cyclic anhydrides*‘, *EuroFedLipids* **2021**, Dresden.
3. **T. Jolmes**, F. W. Jumpertz, M. E. Stieglat, A. Hesso, U. Schörken, ‚*Synthesis of bio-based N-Acyl amino acid surfactants utilizing sustainable T3P coupling*‘, *6th Green & Sustainable Chemistry Conference* **2021**, Leipzig.
4. **T. Jolmes**, S. Tayari, M. Bresser, B. Glösen, U. Schörken, ‚*Sustainable Synthesis of amino acid based three-component surfactants via Diels-Alder reaction with myrcene*‘, *ISGC* **2022**, La Rochelle.
5. **T. Jolmes**, S. Tayari, M. Bresser, B. Glösen, U. Schörken, ‚*Sustainable three-component surfactants derived from Diels-Alder linkage of amino acids with myrcene*‘, *Sepawa EDC* **2022**, Berlin (GDCH Posterpreis prämiert).