

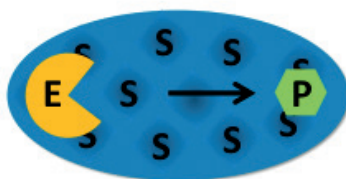
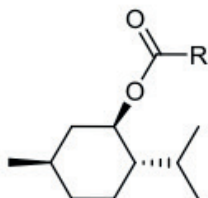
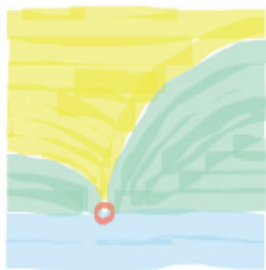
Forschungsberichte

Nr. 21

Magdalena Pätzold

2020

## Evaluation of Deep Eutectic Solvents as Alternative Reaction Media in Biocatalysis



# Evaluation of Deep Eutectic Solvents as Alternative Reaction Media in Biocatalysis

**Vom Promotionsausschuss der  
Technischen Universität Hamburg**  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor-Ingenieurin  
genehmigte Dissertation

von  
MAGDALENA PÄTZOLD

aus  
Forchheim

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese

2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Dirk Holtmann

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Stefan Heinrich

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2020

Schriftenreihe des DECHEMA-Forschungsinstituts

Band 21

**Magdalena Pätzold**

**Evaluation of Deep Eutectic Solvents as Alternative  
Reaction Media in Biocatalysis**

Shaker Verlag  
Düren 2020

**Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek**

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Hamburg, Techn. Univ., Diss., 2020

Copyright Shaker Verlag 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-7598-4

ISSN 2197-6155

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Phone: 0049/2421/99011-0 • Telefax: 0049/2421/99011-9

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

*You live and learn. At any rate, you live.*

— Douglas Adams



## Publications

M. Hümmer, S. Kara, A. Liese, I. Huth, J. Schrader, D. Holtmann:  
Synthesis of (–)-menthol fatty acid esters in and from (–)-menthol and fatty acids  
— novel concept for lipase catalyzed esterification based on eutectic solvents  
Molecular Catalysis (2018), vol. 458, pp. 67-72  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.08.003>

M. Pätzold, A. Weimer, A. Liese, D. Holtmann:  
Optimization of solvent-free enzymatic esterification in eutectic substrate reaction  
mixture  
Biotechnology Reports (2019), vol. 22, e00333  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00333>

M. Pätzold, B. O. Burek, A. Liese, J. Z. Bloh, D. Holtmann:  
Product recovery of an enzymatically synthesized (–)-menthol ester in a deep eu-  
tectic solvents  
Bioprocess and Biosystems Engineering (2019), vol. 42, pp. 1385–1389  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02125-6>

M. Pätzold, S. Siebenhaller, S. Kara, A. Liese, C. Syldatk, D. Holtmann:  
Deep eutectic solvents as efficient solvents in biocatalysis  
Trends in Biotechnology (2019), vol. 37, pp. 943-959  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.007>

M. Pätzold, D. Holtmann:  
Eutektische Lösungsmittel in der Biokatalyse  
Biospektrum (2019), vol. 25, pp. 458-460  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12268-019-1074-2>

## Other publications

M.-L. R. W. Hansen, M. A. Petersen, J. Risbo, M. Hümmer, A. Clausen:  
Implications of modifying membrane fatty acid composition on membrane oxida-  
tion, integrity, and storage viability of freeze-dried probiotic, *Lactobacillus aci-*  
*dophilus* LA-5  
Biotechnology Progress (2015), vol. 31, pp. 799-807  
DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.2074>

J. Taucher, S. Baer, P. Schwerna, D. Hofmann, M. Hümmer, R. Buchholz, A.  
Becker:  
Cell disruption and pressurized liquid extraction of carotenoids from microalgae  
Journal of Thermodynamics and Catalysis (2016), vol. 7, pp. 158-165  
DOI: [10.4172/2158-7544.1000158](https://doi.org/10.4172/2158-7544.1000158)



S. Milker, M. Pätzold, J. Z. Bloh, D. Holtmann:  
Comparison of deep eutectic solvents and solvent-free reaction conditions for aldol  
production  
Molecular Catalysis (2019), vol. 466, pp. 70-74  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.01.012>

## Conference talks

M. Hümmner, D. Holtmann, J. Schrader, S. Kara, A. Liese:  
One-for-two — Use of menthol-based deep eutectic solvents for lipase-catalyzed  
esterifications  
5<sup>th</sup> International Conference on Biocatalysis in Non-Conventional Media  
9 – 11 May 2017, Rostock, Germany

M. Hümmner, K. Schoppel, J. Schrader, S. Kara, A. Liese, D. Holtmann:  
Deep eutectic solvents in der Biokatalyse — 2-in-1 Reaktionsmedien für die Ver-  
esterung von Menthol  
6. Stiftungstag, DECHEMA Research Institute  
6 December 2017, Frankfurt a.M., Germany

M. Hümmner, J. Schrader, D. Holtmann, S. Kara, A. Liese:  
Two-in-one reaction media — Menthol-based deep eutectic solvents for lipase-  
catalyzed esterifications  
Himmelfahrtstagung  
7 – 9 May 2018, Magdeburg, Germany

M. Hümmner, J. Schrader, D. Holtmann, S. Kara, A. Liese:  
(-)-Menthol-based DES as substrate and solvent for the lipase-catalysed esterifi-  
cation of (-)-menthol  
ACHEMA Congress  
11 – 15 June 2018, Frankfurt a.M., Germany

## Poster presentations

M. Hümmner, J. Schrader, D. Holtmann:  
Evaluation of deep eutectic solvents as reaction media for biotransformation  
4. Stiftungstag, DECHEMA Research Institute  
9 December 2019, Frankfurt a.M., Germany

M. Hümmner, D. Holtmann:  
Deep eutectic solvents as novel reaction media for biotransformations  
4<sup>th</sup> Workshop of the FSP "Integrierte Biotechnologie und Prozesstechnik"  
17 February 2016, Hamburg, Germany

M. Hümmer, D. Holtmann:

Rheological characterization of deep eutectic solvents as alternative reaction media for biocatalysis

8<sup>th</sup> International Congress on Biocatalysis

28 August – 1 September 2016, Hamburg, Germany

M. Hümmer, J. Schrader, A. Liese, D. Holtmann:

Deep eutectic solvents as novel reaction media for biotransformations

ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen

12 – 15 September 2016, Aachen, Germany

M. Hümmer, D. Holtmann:

Rheological characterization of deep eutectic solvents as alternative reaction media for biocatalysis

8<sup>th</sup> Green Solvents Conference

16 – 19 October 2016, Kiel, Germany

M. Hümmer, J. Schrader, A. Liese, S. Kara, D. Holtmann:

Deep eutectic solvents as novel reaction media for biotransformations

5. Stiftungstag, DECHEMA Research Institute

7 December 2016, Frankfurt a.M., Germany

M. Hümmer, K. Schoppel, D. Holtmann, J. Schrader, S. Kara, A. Liese:

(-)-Menthol:lauric acid deep eutectic solvent — substrate and solvent for the biotransformation of menthol in a rotating bed reactor

4<sup>th</sup> Summer School Biotransformations

16 – 19 July 2017, Hannover, Germany

M. Hümmer, J. Schrader, A. Liese, S. Kara, D. Holtmann:

(-)-Menthol-based deep eutectic solvents — substrate and solvent for the biotransformation of (-)-menthol

6. Stiftungstag, DECHEMA Research Institute

6 December 2017, Frankfurt a.M., Germany

M. Hümmer, J. Schrader, A. Liese, S. Kara, D. Holtmann:

(-)-Menthol-based deep eutectic solvents — substrate and solvent for the biotransformation of (-)-menthol

7. Stiftungstag, DECHEMA Research Institute

5 December 2018, Frankfurt a.M., Germany



## Acknowledgements

The present study entitled "Evaluation of Deep Eutectic Solvents (DES) as Alternative Reaction Media in Biocatalysis" was performed in the Industrial Biotechnology (IBT) research group of the DECHEMA Research Institute (Frankfurt a.M.) in cooperation with the Institute of Technical Biocatalysis (ITB) of the Hamburg University of Technology (TUHH) from August 2015 until December 2018. At the end of an exciting journey, I would like to dedicate this page to a few people, who accompanied me during my PhD project.

First, I would like to thank Dr.-Ing. Dirk Holtmann (now professor at THM Gießen), my supervisor and team leader of the IBT group at the DECHEMA Research Institute. Thank you for the great opportunity to become part of the DECHEMA family, for guiding me scientifically through the project, and in general for your positive thinking, encouragements and creative ideas.

I would like to acknowledge my DECHEMA colleagues for various contributions to this thesis. Thank you to my office mates Angelika Horst, Laura Drummond and Florence Schmepp for your motivation, good discussions and our amazing capital cities quiz during coffee breaks. I would also like to thank Prof. Dr. Jens Schrader for the opportunity to brew our own beer (and in this context, thank you to the brewing team for unforgettable beer making weekends). Special thanks go to Bastien Burek for helping me with product purifications and valuable conversations on DESs. I would also like to acknowledge Thomas Krieg for his post-DECHEMA support on design of experiments. Thank you to my students, Natalie Müller, Kristin Schoppel and Anna Weimer, who were excellent co-workers for diverse DES projects and their contribution. Many thanks go to all IBT colleagues for their support in- and outside of the lab, and to the colleagues of the other working groups, who contributed to inspiring discussions on DESs.

Anton Paar GmbH is acknowledged for the opportunity to measure DES viscosities and flow behaviour with a powerful rheometer. Thank you to Viktor Heinrichs for this contribution.

Special thanks also go to Prof. Dr. Andreas Liese and Dr. Selin Kara for an extremely valuable cooperation, profound discussions on biocatalysis in DESs and for great scientific input to this thesis, despite the physical distance between Frankfurt and Hamburg. I would also like to thank the staff and students at the ITB for meaningful discussions and inspirations after my seminar presentations.

Finally, I would like to thank my family and friends for their understanding, for their motivating words to finish this project and for cheering me up at any time. A very special word of thanks goes to my husband Jan-Lukas, who promised to follow me not only on this PhD journey, but on every journey this life will bring – thank you for all your love.



## Abstract

Enzyme catalysis is often associated with aqueous reaction media, but water is rather an inadequate solvent for hydrophobic substrates. In this study ‘deep eutectic solvents’ (DESs) were evaluated as novel reaction media for biocatalysis. For instance, a DES composed of both substrates, i.e. a DES made of (–)-Menthol:lauric acid, was used as combined solvent and substrate for the lipase catalysed synthesis of (–)-menthyl laurate, so that no additional solvent was necessary. The optimisation of the reaction resulted in a batch productivity of  $443 \text{ g}_{\text{ester}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  at 95 % conversion (24 h). Excess (–)-menthol was separated in a vacuum distillation step and was reused for a second enzymatic DES reaction.

Die Enzymkatalyse wird häufig mit wässrigen Reaktionsmedien assoziiert, aber Wasser ist ein eher unzureichendes Lösungsmittel für hydrophobe Substrate. In dieser Arbeit wurden tief eutektische Lösungsmittel (DES) als neuartige Reaktionsmedien für die Biokatalyse evaluiert. Für die Lipase katalysierte (–)-Menthyllaurat Synthese wurde beispielsweise ein DES, das aus beiden Substraten besteht, d.h. ein DES aus (–)-Menthol:Laurinsäure, als Solvens und Substrat verwendet, so dass kein Zusatzlösungsmittel nötig war. Die Reaktionsoptimierung führte zu einer Produktivität von  $443 \text{ g}_{\text{ester}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  bei 95 % Umsatz (24 h). Überschüssiges (–)-Menthol wurde destillativ abgetrennt und in einer zweiten DES Enzymreaktion wiederverwendet.

## Zusammenfassung

Enzymreaktionen werden häufig mit Wasser basierten Reaktionsmedien verbunden, wobei die Biotransformation hydrophober Substrate aber aufgrund von geringen Substratkonzentrationen häufig nicht effizient in Wasser durchführbar ist. Während ‘unkonventionelle’ Reaktionsmedien, wie z.B. organische Lösungsmittel oder ionische Flüssigkeiten, schon länger für Biotransformationen eingesetzt werden, sind sogenannte tief eutektische Lösungsmittel (DES, engl. ‘deep eutectic solvents’) relativ neue Reaktionsmedien in der Biokatalyse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DES als alternative Lösungsmittel evaluiert. Neben der physikochemischen Charakterisierung einiger DES, lag der Fokus auf der Untersuchung Lipase katalysierter Reaktionen in DES. Für die Veresterung des Duft- und Aromastoffs (–)-Menthol mit verschiedenen Fettsäuren konnten die DES direkt aus den Substraten hergestellt werden. Eine *Candida rugosa* Lipase war geeignet, um (–)-Menthylfettsäureester in (–)-Menthol:Caprylsäure, (–)-Menthol:Caprinsäure und (–)-Menthol:Laurinsäure DES ohne weiteren

Lösungsmittelzusatz zu synthetisieren. Für das DES Reaktionssystem aus (-)-Menthol:Laurinsäure (3:1 mol/mol) war die Reaktion unter kontrollierter Wasseraktivität ( $a_w$ ) effizienter als die Veresterung in DES-Wasser Gemischen oder im reinen DES. Bei einem konstanten  $a_w$  (0,32) konnte eine Batch-Produktivität für (-)-Menthylaurat von  $287 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und ein Fettsäureumsatz von 65 % erreicht werden (24 h). Die Esterbildung im DES (-)-Menthol:Laurinsäure (3:1 mol/mol) konnte mittels statistischer Versuchsplanung hinsichtlich der Reaktionstemperatur ( $45^\circ\text{C}$ ), der Enzymmenge (60 mg) und des  $a_w$  (0,55) optimiert werden, so dass die Batch-Produktivität auf  $443 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und der Umsatz auf 95 % (24 h) gesteigert werden konnten. Durch den Einsatz des DES als 2-in-1 Reaktionsmedium, d.h. als verflüssigte Substrate und gleichzeitig als Lösungsmittel, konnte die Veresterung mit hohen Substratkonzentrationen durchgeführt werden. Die Esterkonzentration erreichte dabei  $1,36 \pm 0,04 \text{ M}$  (2,25 d) bei einer maximalen Esterbildung von  $174 \text{ mM h}^{-1}$  innerhalb von 6 h. Die Reduktion des Molverhältnisses des (-)-Menthol:Laurinsäure DES bewirkte eine weitere Steigerung der Esterbildung.

Das (-)-Menthol:Laurinsäure (3:1 mol/mol) DES-Reaktionssystem konnte so optimiert werden, dass die Fettsäure praktisch vollständig umgesetzt wird (3 d,  $35^\circ\text{C}$ ,  $a_w$  0,16). Überschüssiges (-)-Menthol aus zwei Reaktionen konnte durch Vakuumdestillation abgetrennt werden. Der Ester (735 mg) wurde mit einer Reinheit von 94 % gewonnen, während das abgetrennte (-)-Menthol (622,5 mg, 4 mmol) für die Herstellung eines neuen DES genutzt wurde. Bei der anschließende Veresterung mit recyceltem (-)-Menthol erreichte der Fettsäureumsatz 98,7%. Anhand der Reaktions- und Prozessoptimierung dieser Beispielreaktion konnte gezeigt werden, wie DES effizient für die Biokatalyse genutzt werden können. DES sind insbesondere als 2-in-1 Reaktionsmedien vorteilhaft und können als Alternative zu anderen 'unkonventionellen' Reaktionsmedien für die Biokatalyse angesehen werden.







# Contents

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1.1	Biocatalysis - using enzymes as catalysts . . . . .	1
1.2	Enzymes - naturally occurring biocatalysts . . . . .	2
1.3	Enzyme classes . . . . .	4
1.4	Lipases for enzymatic ester synthesis . . . . .	6
1.5	Deep eutectic solvents . . . . .	9
1.5.1	Origin and definition of deep eutectic solvents . . . . .	9
1.5.2	Application of DESs . . . . .	13
1.5.3	DESs and biocatalysis . . . . .	16
1.6	The concept of 2-in-1 reaction media . . . . .	17
<b>2</b>	<b>Objective of the study</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Physicochemical properties of different DESs</b>	<b>23</b>
3.1	Introductory words . . . . .	23
3.2	Density . . . . .	24
3.3	DES pH . . . . .	25
3.4	Water content and water activity . . . . .	27
3.5	Rheological characterisation and DES viscosity . . . . .	32
3.6	Summary . . . . .	35
<b>4</b>	<b>Lipase catalysed reactions in DESs</b>	<b>37</b>
4.1	Introductory words . . . . .	37
4.2	Aminolysis . . . . .	37
4.3	Aldol reaction . . . . .	38
4.4	Transesterification in hydrophobic DESs . . . . .	44
4.5	Transesterification of terpenes in terpene-based DESs . . . . .	48
4.6	Summary . . . . .	50
<b>5</b>	<b>DESs as 2-in-1 reaction media</b>	<b>53</b>
5.1	Introductory words . . . . .	53
5.2	Preparation of different 2-in-1 DESs . . . . .	54
5.3	DES and lipase screening . . . . .	55
5.3.1	Esterification of (-)-menthol:benzoic acid DES . . . . .	55
5.3.2	Esterification of (-)-menthol:acetic and lactic acid DESs . . . . .	56
5.3.3	Esterification of (-)-menthol:fatty acid DESs . . . . .	57
5.4	Esterification of (-)-menthol:fatty acid DESs with CRL . . . . .	59
5.4.1	Biphasic DES-water reaction systems . . . . .	59

5.4.2	DES esterification at controlled water activity . . . . .	65
5.4.3	Comparison of reaction systems . . . . .	66
5.4.4	Reaction optimisation by response surface methodology . . . . .	68
5.4.5	Variation of DES molar ratio . . . . .	76
5.4.6	CRL selectivity . . . . .	77
5.5	Summary . . . . .	79
<b>6</b>	<b>Product purification</b>	<b>82</b>
6.1	Introductory words . . . . .	82
6.2	CRL catalysed synthesis of (-)-menthyl laurate . . . . .	83
6.3	Separation of (-)-menthyl laurate . . . . .	84
6.4	Re-use of recovered (-)-menthol . . . . .	86
6.5	Process outline . . . . .	87
6.6	Summary on DES reaction systems and benchmark . . . . .	89
6.7	Summary . . . . .	92
<b>7</b>	<b>Discussion and outlook</b>	<b>94</b>
7.1	Biotransformation of menthol with 2-in-1 DESs . . . . .	94
7.2	Evaluation of DESs for enzymatic reactions . . . . .	99
<b>8</b>	<b>Summary</b>	<b>108</b>
<b>A</b>	<b>Supplementary information</b>	<b>111</b>
A.1	Rheological characterisation of ChCl:U . . . . .	111
A.2	Lipase characterisation . . . . .	113
A.3	Identification of menthyl esters by LC-MS . . . . .	116
A.4	Esterification at controlled water activity . . . . .	117
A.5	Reaction optimisation - CCD experimental plan . . . . .	119
<b>B</b>	<b>Materials and methods</b>	<b>122</b>
B.1	Materials . . . . .	122
B.2	Enzymatic syntheses and product purification . . . . .	127
B.3	Analytical Methods . . . . .	134
<b>C</b>	<b>Abbreviations</b>	<b>142</b>
<b>D</b>	<b>Symbols</b>	<b>144</b>
<b>E</b>	<b>List of Figures</b>	<b>146</b>
<b>F</b>	<b>List of Schemes</b>	<b>149</b>
<b>G</b>	<b>List of Tables</b>	<b>150</b>
<b>H</b>	<b>References</b>	<b>152</b>