

Prozessentwicklung für die kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. (FH)
Christoph Roosen
aus Viersen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Walter Leitner
Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. Marion Ansorge-Schumacher

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Für Jutta und meine Familie

*Früher starben die Menschen mit 35 Jahren,
heute schimpfen sie bis 95 auf die Chemie!*

Carl H. Krauch *1931 †2004

Der präparative Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von November 2005 bis Dezember 2008 am Institut für Technische und Makromolekulare Chemie der RWTH Aachen University und am Institut für Angewandte Polymerchemie der FH Aachen angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Artikel in Fachzeitschriften

C. Roosen, M. Ansorge-Schumacher, T. Mang, W. Leitner, L. Greiner, *Green Chem.* **2007**, *9*, 455: Gaining pH-control in water/carbon dioxide biphasic systems.

C. Roosen, J.-L. Muller, M. Kaefer, H. Kronenberg, R. Thelen, S. Aey, T. Harwardt, F. Zayed, W. Leitner, L. Greiner, *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *48*, 33: Reactor Concept for Continuous Reactions and Extractions in Supercritical Fluids at Minimum Flow Rates.

Vorträge

C. Roosen, L. Greiner, W. Leitner, T. Mang, *RENACOM*, Marrakech, Marokko, **03.-04. Mai 2007**: Kinetic resolution in water/scCO₂ biphasic Systems.

C. Roosen, N. Bieler, D. Geier, M. Ansorge-Schumacher, T. Mang, L. Greiner, W. Leitner, *Jahrestreffen Reaktionstechnik*, Würzburg, Deutschland, **18.-20. Mai 2008**: Continuous enzymatic reactions in water/supercritical CO₂ biphasic systems.

C. Roosen, N. Bieler, Daniel Geier, M. Ansorge-Schumacher, Th. Mang, L. Greiner, W. Leitner, *2nd International Conference „Biocatalysis in Non-Conventional Media“*, Moscow, Russland, **12.-15. Juni 2008**: Continuous enzymatic reactions in water/supercritical CO₂ biphasic systems.

Posterpräsentationen

C. Roosen, M. Ansorge-Schumacher, T. Mang, L. Greiner, W. Leitner, *Green Solvents for Processes*, Friedrichshafen, Deutschland, **8.-11. Oktober 2006**: pH-control in Water / scCO₂ biphasic systems.

C. Roosen, L. Kalender, N. Bieler, M. Ansorge-Schumacher, T. Mang, L. Greiner, W. Leitner, *European Congress of Chemical Engineering (ECCE 6)*, Kopenhagen, Dänemark, **16.-21. September 2007**: Enzymatic reactions in water / scCO₂ biphasic systems.

Des Weiteren wurden in der Promotionszeit folgende Artikel in Fachzeitschriften veröffentlicht:

M. F. Eckstein, J. Lembrecht, J. Schumacher, M. Peters, C. Roosen, L. Greiner, W. Eberhard, A. C. Spiess, W. Leitner, U. Kragl, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 1597: Maximise your equilibrium conversion in biphasic catalyzed reactions: How to obtain equilibrium constants for reactions of practical relevance.

C. Roosen, P. Müller, L. Greiner, *Appl. Microbiol. Biot.* **2008**, 81, 607: Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations.

S. K. Karmee, C. Roosen, C. Kohlmann, S. Lütz, W. Leitner, L. Greiner, *Green Chem.* **2009**, 11, 1052: Chemo-enzymatic cascade oxidation in supercritical carbon dioxide/water biphasic media.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in enger Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Technische und Makromolekulare Chemie der RWTH Aachen, dem Institut für Angewandte Polymerchemie der Fachhochschule Aachen sowie dem Lehrstuhl für Biotechnologie an der RWTH Aachen angefertigt. Mein besonderer Dank gilt dabei:

- meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. W. Leitner für das in mich gesetzte Vertrauen und der Möglichkeit zur Promotion sowie die sehr guten Arbeitsbedingungen,
- Frau Prof. Dr. M. Ansorge-Schumacher für die Übernahme des Koreferats,
- Herrn Prof. Dr. T. Mang für die Möglichkeit einer kooperativen Promotion, die Betreuung der Arbeit und für die Möglichkeit Teile meiner Arbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen,
- Herrn Prof. Dr. W. Leitner, Herrn Prof. Dr. T. Mang, Herrn Dr. L. Greiner sowie Frau Prof. Dr. M. Ansorge-Schumacher für die interessante Themenstellung, das rege Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die hervorragende Betreuung,
- Herrn Dr. L. Greiner für die Möglichkeit weite Teile meiner praktischen Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und die aufbauenden Gespräche in schweren Zeiten,
- Herrn M. Kaefer für die reaktionstechnische Unterstützung und die angenehme Atmosphäre im Technikum,
- den Mitarbeitern Herrn R. Thelen, Herrn H. Kronenberg, Herrn S. Gasterich, Herrn J. Fischer, Herrn G. Wirtz, Herrn S. Aey und Herrn T. Müller der mechanischen und der elektrischen Werkstatt für die Unterstützung bei der Realisierung des Konzeptes,
- Frau H. Eschmann und Herrn W. Falter für die Unterstützung in analytischen Fragestellungen,
- Frau M. Peters für die Berechnungen der CO₂-Löslichkeiten und Frau K. Dimoula für die Unterstützung bei der Prozesssimulation,

- Herrn D. Geier, Herrn L. Kalender, Frau N. Bieler und Herrn M. Raue die mich im Rahmen von Forschungs- und Diplomarbeiten mit großem Einsatz und Begeisterung unterstützten,
- Frau P. Cremer für die starke Unterstützung bei der Hydrogelenentwicklung,
- meinen Laborkollegen und -kolleginnen Frau Dr. D. Müller, Frau P. Müller, Frau Dr. M. Hörstemeier und Herrn T. Harwardt danke ich für das stets angenehme Laborklima sowie für viele interessante fachliche und private Gespräche,
- Frau M. Roosen, Frau J. Janiel und Herrn F. Pontzen für die Korrekturen,
- dem Graduiertenkolleg DFG 1166 „BioNoCo“ für die ergänzende finanzielle Unterstützung sowie für die hervorragende zusätzliche Ausbildung,
- dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Unterstützung.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des Institutes für Angewandte Polymerchemie, der Arbeitsgruppe Greiner und dem gesamten Lehrstuhl für Technische Chemie und Petrolchemie für das angenehme Arbeitsklima, die Unterstützung sowie die kollegiale Zusammenarbeit.

Meiner Freundin Jutta danke ich besonders für ihre große Geduld sowie dem privaten Rückhalt und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre großartige Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Chiralität	1
1.1.1	Bedeutung von Chiralität	1
1.1.2	Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen	4
1.1.2.1	Die zugrunde liegenden Prinzipien	4
1.1.2.2	Die dynamisch kinetische Racematspaltung	6
1.2	Überkritische Fluide	7
1.2.1	Historische Entwicklung	7
1.2.2	Eigenschaften	9
1.3	Zweiphasensysteme	11
1.3.1	Allgemeines	11
1.3.2	Das Zweiphasensystem Wasser/CO ₂	12
1.4	Industrielle Biokatalyse	16
1.4.1	Allgemeines	16
1.4.2	Enzymkatalyse in nicht konventionellen Medien	17
1.4.3	Lipasen	19
1.5	Motivation und Zielsetzung	21
2	Ergebnisse und Diskussion	23
2.1	Simulation	23
2.1.1	Stand der Technik	23
2.1.2	Zielsetzung	25
2.1.3	Modellentwicklung	26
2.1.4	Validierung der Simulation	31
2.1.5	Simulation einer kontinuierlichen dynamisch kinetischen Ra- cematspaltung im Schlaufenreaktor	32

2.1.6	Vergleich von Schlaufenreaktor und Strömungsrohr	34
2.1.7	Zusammenfassung	36
2.2	Untersuchungen zur Racemisierung	37
2.2.1	Stand der Technik	37
2.2.2	Zielsetzung	43
2.2.3	Dowex-Marathon MSC als Racemisierungskatalysator	43
2.2.3.1	Charakterisierung	43
2.2.3.2	Simulation des Einflusses des Katalysators auf eine kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung	46
2.2.4	VOSO ₄ als Racemisierungskatalysator	48
2.2.4.1	Charakterisierung	48
2.2.4.2	Simulation des Einflusses des Katalysators auf eine kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung	49
2.2.5	Zusammenfassung	51
2.3	pH-Kontrolle im Zweiphasensystem Wasser/CO ₂	52
2.3.1	Einleitung und Stand der Technik	52
2.3.2	Zielsetzung	53
2.3.3	Theoretische Beschreibung der Änderung des pH-Wertes . . .	54
2.3.4	pH-Wert Messungen	57
2.3.5	Diskussion der pH-Messungen	61
2.3.6	Computergestützte Simulation der pH-Werte	64
2.3.7	Zusammenfassung	66
2.4	Batchversuche im Hochdruck-Zweiphasensystem	67
2.4.1	Einleitung	67
2.4.2	Zielsetzung	67
2.4.3	Ergebnisse	67
2.4.4	Zusammenfassung	74
2.5	Katalyse mit immobilisierten Enzymen in Hydrogelen	75
2.5.1	Einleitung	75
2.5.1.1	Immobilisierung von Enzymen	75
2.5.1.2	Hydrogele in Zweiphasensystemen	77
2.5.1.3	Maschenweite und Enzymgrößen	79
2.5.2	Zielsetzung	81
2.5.3	Durchführung und Kontrolle der Immobilisierung	82

2.5.4	Ionische Immobilisierungsmatrix	83
2.5.4.1	Polymerisation	83
2.5.4.2	Immobilisierung	85
2.5.4.3	Katalyse	87
2.5.5	Nicht ionische Immobilisierungsmatrix	89
2.5.5.1	Polymerisation	89
2.5.5.2	Immobilisierung	90
2.5.5.3	Katalyse	91
2.5.6	Vergleich von ionischer und nicht ionischer Immobilisierungsmatrix	95
2.5.7	Zusammenfassung	98
2.6	Entwicklung einer kontinuierlichen Hochdruckanlage	99
2.6.1	Einleitung	99
2.6.2	Zielsetzung	100
2.6.3	Dosierung	101
2.6.4	Analytik	104
2.6.5	Umlauf der kontinuierlichen Phase	105
2.6.6	Überprüfung der Anlage	106
2.6.7	Zusammenfassung	108
2.7	Kontinuierliche Hochdruck-Versuche	111
2.7.1	Stand der Technik	111
2.7.2	Zielsetzung	111
2.7.3	Kontinuierliche kinetische Racematspaltung	112
2.7.4	Dynamisch kinetische Racematspaltung	113
2.7.5	Zusammenfassung	119
3	Zusammenfassung und Ausblick	121
3.1	Zusammenfassung	121
3.2	Ausblick	124
4	Experimenteller Teil	127
4.1	Material und Methoden	127
4.1.1	Verwendete Chemikalien	127
4.1.2	Methoden	128
4.1.2.1	GC-Methoden	128

4.1.2.2	SFC-Methoden	129
4.1.2.3	Proteingehaltsbestimmung nach Bradford	130
4.1.2.4	UV-Messungen zur Verfolgung der Immobilisierung	130
4.2	Arbeitsvorschriften	130
4.2.1	Racemisierungsversuche	130
4.2.1.1	Racemisierung mit Dowex-Katalysator	130
4.2.1.2	Racemisierung mit VOSO_4	131
4.2.2	pH-Messungen	132
4.2.3	Batchversuche im Zweiphasensystem Wasser/scCO ₂	133
4.2.3.1	SFC-Kalibrierung	133
4.2.3.2	Durchführung der Versuche	133
4.2.3.3	Statistische Versuchsplanung	135
4.2.4	Immobilisierung der <i>Candida rugosa</i> Lipase	136
4.2.4.1	Herstellung der ionischen Hydrogele	136
4.2.4.2	Immobilisierung an ionischen Hydrogelen	137
4.2.4.3	Herstellung der nicht ionischen Hydrogele	138
4.2.4.4	Herstellung der nicht ionischen Hydrogele mit eingeschlossenem Hühnerserum Albumin	139
4.2.4.5	Immobilisierung an nicht ionischen Hydrogelen	139
4.2.5	Durchführung einer kontinuierlichen kinetischen Racematspaltung	141
4.2.6	Durchführung einer kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung	141
4.2.6.1	Übersicht der einzelnen Versuche	141
4.2.6.2	Durchführung	142
4.2.6.3	Regelparameter	144
A	Herleitungen	145
A.1	Herleitung zur Beschreibung der Racemisierung für die Simulation	145
A.2	Herleitung zur Ermittlung der Racemisierungsgeschwindigkeitskonstanten	148

Abbildungsverzeichnis

1.1	Chiralität eines sp^3 -hybridisierten C-Atoms (*) am Beispiel von Thalidomid.	1
1.2	Schematische Darstellung des Phasendiagramms für Kohlenstoffdioxid.	9
1.3	Veranschaulichung der Zweifilmtheorie.	13
1.4	Vereinfachte Darstellung einer Reaktion im Zweiphasensystem.	14
1.5	Darstellung einer dynamisch kinetischen Racematspaltung mit entkoppelten Reaktionsbedingungen.	22
2.1	Simulation einer dynamisch kinetischen Racematspaltung nach Noyori.	24
2.2	Darstellung des zugrunde liegenden Modells zur Simulation des Reaktorkonzeptes.	27
2.3	Nomenklatur in dem verwendeten Modell.	27
2.4	Vergleich von Literaturwerten für eine kinetische Racematspaltung in einem kontinuierlichen Rührkessel mit der eigenen Simulation für einen Schlaufenreaktor.	32
2.5	Vergleich von Literaturwerten für eine dynamisch kinetische Racematspaltung im Batchversuch mit der eigenen Simulation für einen Kaskadenreaktor.	33
2.6	Simulation ohne Nebenreaktionen.	34
2.7	Verhältnis der Ausbeuten in einem Schlaufenreaktor zu einem Strömungsrohr als Funktion des eep	35
2.8	Katalysatoren zur Racemisierung.	41
2.9	Reaktionsverlauf für die Racemisierung.	45
2.10	Anfangs-Geschwindigkeitskonstanten für die Racemisierung mit Dowex-Katalysator bei verschiedenen Temperaturen.	45
2.11	Simulation für Dowex-Racemisierungskatalysator.	47
2.12	Reaktionsverlauf für die Racemisierung mit $VOSO_4$	49

2.13	Simulation von VOSO_4 als Racemisierungskatalysator für die dynamisch kinetische Racematspaltung.	50
2.14	Bildung von Kohlensäure.	52
2.15	pH-Bestimmung unter Verwendung von Indikatoren.	58
2.16	pH-Sonde.	59
2.17	Autoklavenaufsatz zur pH-Messung.	60
2.18	Autoklav zur pH-Messung.	61
2.19	pH-Messung ohne Zugabe von Puffersalzen.	62
2.20	Messung der pH-Verschiebung durch Hydrogencarbonat bei 22 °C. . .	62
2.21	Messung der pH-Verschiebung durch Hydrogencarbonat bei 60 °C. . .	63
2.22	pH-Parity-Plot.	64
2.23	Vergleich der berechneten und der gemessenen pH-Werte.	65
2.24	pH-Stabilität der <i>Candida rugosa</i> Lipase.	68
2.25	Wechselwirkungsdiagramm für die Löslichkeit von Butanol in der nicht reaktiven Phase.	69
2.26	Reaktionsverlauf für die Veresterung von Butanol mit Propionsäure im Zweiphasensystem.	71
2.27	Wechselwirkungsdiagramm für die Reaktionsgeschwindigkeit.	73
2.28	Schematische Darstellung eines Ausschnittes zur Hydrogelquellung. .	79
2.29	Maschenweiten im Polymernetzwerk.	81
2.30	Schema zum Versuchsablauf der Immobilisierung.	82
2.31	Verteilung der Partikeldurchmesser aus der Suspensionspolymerisation der ionischen Hydrogele.	85
2.32	Absorption von Hühnereiweiß Albumin durch ionisches Hydrogel. . .	86
2.33	Abhängigkeit der Beladung vom pH-Wert.	89
2.34	Reaktionsgeschwindigkeiten verschiedener ionischer Immobilisate. . .	89
2.35	Auswaschen von Albumin aus nicht ionischem Hydrogel.	90
2.36	Immobilisierung von Hühnereiweiß Albumin in nicht ionisches Hydrogel.	90
2.37	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration. . .	92
2.38	pH-Optimum der enzymatischen Veresterung von 1-Phenylethanol mit Butansäure.	92
2.39	Aktivität der an ein nicht ionisches Hydrogel immobilisierten <i>Candida rugosa</i> Lipase in Abhängigkeit der Partikeldurchmesser.	93
2.40	Abhängigkeit der Proteinbeladung von der Ausgangskonzentration. .	94

2.41	Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Proteinbeladung. . .	94
2.42	Rezyklierungsversuche bei der Veresterung von 1-Phenylethanol mit Butansäure.	96
2.43	Rezyklierungsversuche bei der Veresterung von 1-Butanol mit Propi- onsäure.	96
2.44	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration. . .	97
2.45	Fließbild der kontinuierliche Anlage.	103
2.46	Das Probenventil.	106
2.47	Darstellung des Drucks und des Massenflusses als Funktion der Zeit. .	107
2.48	Sprungantworten des CO ₂ -Flusses	107
2.49	Antworten des Systemdrucks auf Sollwertänderung.	108
2.50	Bild der Versuchsanlage zur Durchführung kontinuierlicher Reaktio- nen mit scCO ₂	110
2.51	Kontinuierliche kinetische Racematspaltung.	113
2.52	Kontinuierliche dynamische kinetische Racematspaltung; Versuchs- nr.: DRK 3.	115
2.53	Kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung; Versuchsnr.: DKR 5.	118
2.54	Kontinuierliche kinetische Racematspaltung mit anschließender Ra- cemisierung; Versuchsnr.: DKR 6.	119
2.55	Versuche zur Stabilität von VOSO ₄	120
4.1	Versuchsaufbau für pH-Messungen.	132
4.2	Aufbau zur Messung der Enzymkinetik im Zweiphasensystem Was- ser/scCO ₂	134
4.3	Schema der statistischen Versuchsplanung.	135
4.4	Strömungsrohr für die enzymatische kinetische Racematspaltung. . .	143

Tabellenverzeichnis

1.1	Eigenschaften einiger typischer Fluide für überkritische Fluid Prozesse.	10
1.2	Industrielle Prozesse mit Biotransformationen.	17
2.1	Debye-Hückel-Parameter bei verschiedenen Temperaturen.	55
2.2	Ergebnisse zu den Kinetikmessungen im Zweiphasensystem Wasser /scCO ₂	72
2.3	Berechnete Maschenweiten bei unterschiedlichen Vernetzerkonzentra- tionen.	85
2.4	Enzym- und Proteingrößen.	86
4.1	Chemikalienliste Teil A.	127
4.2	Chemikalienliste Teil B.	128
4.3	Kalibrierung der SFC.	133
4.4	Versuche zur Messung der Kinetik im Zweiphasensystem Wasser/scCO ₂ .	136
4.5	Versuchsbedingungen der einzelnen kontinuierlichen Versuche zur dy- namisch kinetischen Racematspaltung.	142
4.6	Regelparameter für die Regelung der Temperaturen, Volumenströme und Drücke.	144

Symbolverzeichnis

β_0	Anfängliche Proteinmassenkonzentration der Quelllösung [$g \cdot L^{-1}$]
β_2	Proteinmassenkonzentration der Quelllösung nach der Quellung des Hydrogels [$g \cdot L^{-1}$]
β_{Hyd}	Beladung des Hydrogels [$g \cdot L^{-1}$]
C_N	charakteristisches Verhältnis (Maß für die Ausdehnung der Polymerkette im ungestörten Zustand) [-]
$C_{PR}; C_{PS}$	Produktkonzentrationen des R bzw. S Enantiomeren [$mol \cdot L^{-1}$]
$C_R; C_S$	Substratkonzentrationen des R bzw. S Enantiomeren [$mol \cdot L^{-1}$]
E	Enantiomerenverhältnis
ee	Enantiomerenüberschuss, engl.: enantiomeric excess [%]
K_1	Erste Dissoziationskonstante der Kohlensäure [$mol \cdot kg^{-1}$]
K_2	Zweite Dissoziationskonstante der Kohlensäure [$mol \cdot kg^{-1}$]
$k_A; k_P$	Geschwindigkeitskonstante für den Phasentransfer [$1 \cdot min^{-1}$]
K_B	Gleichgewichtskonstante zur Bildung von Kohlensäure [$kg \cdot mol^{-1}$]
$k_R; k_S$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Racematspaltung für das R bzw. S Enantiomere [$1 \cdot min^{-1}$]

k_{rac}	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Racemisierung [$1 \cdot min^{-1}$]
$k_{rac,R}; k_{rac,S}$	Racemisierungsgeschwindigkeit des R bzw. S Enantiomeren [$1 \cdot min^{-1}$]
k_v	Durchflusskoeffizient [$m^3 \cdot h^{-1}$]
k_{ver}	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der nicht enantioselektiven Veresterung [$1 \cdot min^{-1}$]
l	Länge allgemein [m]
l_{cc}	Bindungslänge einer C-C Einfachbindung [nm]
L	Liter
m	Masse [g]
M	Molmasse [$g \cdot mol^{-1}$]
M_c	Molmasse zwischen zwei Vernetzungsstellen [$g \cdot mol^{-1}$]
NL	Normliter
p	Druck, engl.: Pressure [bar]
p_c	kritischer Druck, engl.: critical pressure [bar]
p_{Tr}	Druck am Tripelpunkt [bar]
$q_{3*}(x)$	Massenverteilungsdichte [$1 \cdot mm^{-1}$]
$Q_{3*}(x)$	Massensummenkurve [-]
R	Umlaufverhältnis [-]
R_{St}	Stokesradius [nm]
r	Reaktionsgeschwindigkeit [$mol \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$]
$(\bar{r}_0^2)^{\frac{1}{2}}$	Abstand von zwei Vernetzungspunkten im ungequollenen Zustand [nm]
ρ_c	kritische Dichte, engl.: critical density [$g \cdot L^{-1}$]
S	Rührergeschwindigkeit [-]
T	Temperatur [K]
ϑ	Temperatur [°C]

T_c	kritische Temperatur, engl.: critical temperature [K]
T_{Tr}	Temperatur am Tripelpunkt [K]
U	Unit; 1 U entspricht dem Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$]
V	Volumen [L]
V_0	Volumen der Ausgangslösung zur Immobilisierung [L]
$\dot{V}_0$	Feed Volumenstrom [$L \cdot \text{min}^{-1}$]
v_{2s}	reziproker Gleichgewichtsquellgrad [$g \cdot g^{-1}$]
V_{Hyd}	Vom Hydrogel aufgenommene Lösung [L]
$\dot{V}_{KR}$	Volumenstrom durch Reaktor für die Racematspaltung [$L \cdot \text{min}^{-1}$]
$\dot{V}_R$	Volumenstrom durch Racemisierungsreaktor [$L \cdot \text{min}^{-1}$]
X	Löslichkeit [$\text{mol} \cdot L^{-1}$]
ξ	Maschenweite des gequollenen Hydrogelnetzwerkes [nm]

Abkürzungsverzeichnis

BPR	Staudruckregler, engl.: Back Pressure Regulator
BSA	Rinderserum Albumin, engl.: Albumin from bovine serum
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CHP	Curtin-Hammet-Prinzip
CRL	<i>Candida rugosa</i> Lipase
CSTR	kontinuierlicher Rührkessel engl.: continuous stirred tank reactor
DKR	dynamisch kinetische Racematspaltung, (engl.: dynamic kinetic resolution)
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
GC	Gaschromatographie, engl.: Gas Chromatography
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie, engl.: High Performance Liquid Chromatographie
LM	Lösungsmittel
M	Molmasse der Monomere im Hydrogel
MFC	Massenflussregler, engl.: Massflow Controller
NP	Nebenprodukt
PEGDMA	Polyethylenglykoldimethacrylat
PFR	Strömungsrohr engl.: plug flow reactor
PTFE	Polytetrafluorethylen
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
scCO ₂	überkritisches CO ₂ , engl.: supercritical CO ₂

scF	überkritisches Fluid, engl.: supercritical fluid
S. T. P.	bei Standardtemperatur und -druck
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WEA	Hühnerserum Albumin, engl.: Albumin from chicken egg white

Kapitel 1

Einleitung und Problemstellung

1.1 Chiralität

1.1.1 Bedeutung von Chiralität

Als chiral* werden Gegenstände oder Systeme bezeichnet, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten und sich durch Drehung nicht zur Deckung bringen lassen.^[2] Aus dem täglichen Leben bekannte chirale Gegenstände sind z. B. Hände oder Schrauben. Ein Beispiel für Chiralität aus der organischen Chemie ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

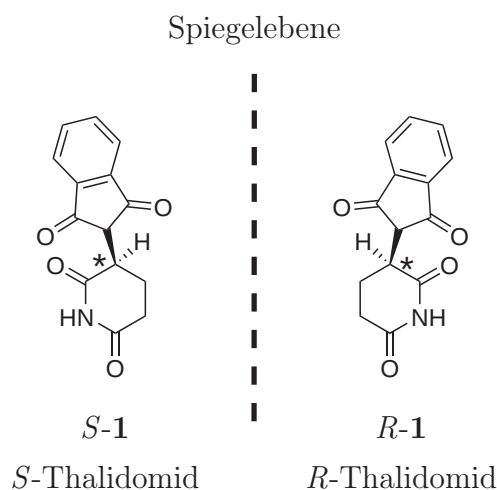


Abbildung 1.1: Chiralität eines sp^3 -hybridisierten C-Atoms (*) am Beispiel von Thalidomid.

* Abgeleitet vom griechischen Wort für Hand $\rightarrow$ cheir^[1]

Bild und Spiegelbild einer chiralen chemischen Verbindung nennt man Enantiomere. Eine 1:1-Mischung der Enantiomere bezeichnet man als Racemat. Enantiomere sind in all ihren Eigenschaften (z. B. Siedepunkt, Schmelzpunkt, Dichte, Löslichkeit, Reaktivität) in einer achiralen Umgebung identisch.^[2] Einzige Ausnahme ist die Änderung des Drehwinkels von linear polarisiertem Licht. Zu unterscheiden sind sie durch Wechselwirkungen mit anderen chiralen Molekülen. Da Chiralität ein grundlegendes Element der Natur ist, kommen erst viele biologische und physische Abläufe durch eine genaue molekulare Erkennung zustande und bedürfen deshalb genau zusammenpassende Chiralitäten.^[3] Dadurch bedingt können die einzelnen Enantiomere einer chiralen Verbindung stark unterschiedliche physiologische Wirkungen hervorrufen.

Einen der bekanntesten und tragischsten Fälle ist der Einsatz von Thalidomid **1** als Wirkstoff des Sedativums Contergan[®]. Der Wirkstoff **1** wurde als Racemat in den Jahren 1957 bis 1961 in fast 50 Ländern unter verschiedenen Namen verkauft und speziell schwangeren Frauen als Sedativum verschrieben. Im gleichen Zeitraum wurden ca. 10 000 Kinder mit schweren Missbildungen als Folge der Einnahme von **1** geboren.^[4] Spätere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine teratogene Wirkung besteht, die wahrscheinlich hauptsächlich vom *S*-Enantiomer ausgeht. Da der Wirkstoff jedoch sehr schnell im Körper racemisiert (Im Plasma findet eine vollständige Racemisierung in weniger als 2 Stunden statt.^[4]), ist eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Effekte fast unmöglich*.^[5]

Auch wenn für viele chirale Wirkstoffe der Unterschied der beiden Enantiomere nicht so drastisch ausfällt wie in dem oben beschriebenen Beispiel, so ist es nicht selten, dass ein Enantiomer die gewünschte pharmakologische Wirkung zeigt, während das andere größtenteils inaktiv bleibt. Da aber die gezielte Herstellung enantiomerenreiner Substanzen bzw. die Racematspaltung lange Zeit technisch sehr

*Ebenso verbietet sich wegen der schnellen Racemisierung die Verabreichung des reinen *R*-Enantiomeren. Dennoch wird dieser Wirkstoff aufgrund seiner entzündungshemmenden Wirkung und immunmodulatorischen Eigenschaften u. a. zur Behandlung von Leprareaktionen (nicht der Lepra selbst) und chronischen Entzündungen der Haut und der Schleimhäute eingesetzt, wenn andere Medikamente versagen. Auch gibt es erste Anwendungen und Untersuchungen zur Bekämpfung von Infektionen und Erkrankungen, die durch HIV entstehen sowie zur Krebsbekämpfung.^[4, 5, 6]

schwierig war, wurde auch weiterhin viele Jahre die Entwicklung von Racematen vorangetrieben.^[7] Insbesondere durch die Regulierung der „US Food and Drug Administration“ (FDA)^[7] im Jahre 1992 und wenig später durch die Regulierung der „European Committee for Proprietary Medicinal Products“^[8] hat sich dies grundlegend geändert.

Die Regulierungen besagen, dass jedes der beiden Enantiomere eines pharmazeutischen Produktes separat charakterisiert werden muss. Darüber hinaus besagt sie, dass die reine Enantiomerenform eines Wirkstoffes im Vergleich zum Racemat als ein neues Produkt angesehen^{[8]*} und somit auch neu patentiert werden kann. Diese Umstellung eines Wirkstoffes von einem Racemat auf ein enantiomerenreines Produkt wird als „chiral switch“ bezeichnet und erlaubt den Pharmaherstellern seit 1997 eine schnellere Registrierung.^[9] Dadurch wird der Vertrieb enantiomerenreiner Substanzen unterstützen und die Risiken möglicher Nebenwirkungen werden reduziert. Für die Hersteller von Pharmaka haben die oben beschriebenen Tatsachen eine enorme Wichtigkeit, da nun Patente verlängert^[10] oder Konkurrenzpatente vergeben werden können.

Bereits 2004 waren ca. 80 % aller Wirkstoffe, welche die Pharmafirmen in Vorbereitung hatten, chiral und man kann davon ausgehen, dass dieser Anteil in Zukunft noch weiter steigen wird.^[9] Somit ist für Pharmafirmen die direkte Entwicklung enantiomerenreiner Arzneimittel, welche bereits 2005 mit 225 Mrd US\$ einen Anteil von 37 % am gesamten Markt für fertige pharmazeutische Formulierungen hatten^[11], ein wichtiges Ziel. Ein weiteres Einsatzgebiet für enantiomerenreine Wirkstoffe ist die Agrarwirtschaft.^[12] Die Gründe sind ähnlich gelagert wie im Pharmasektor. Die Ökonomie eines Prozesses kann verbessert werden, es müssen geringere Mengen Wirkstoff eingesetzt werden und dadurch wird der Umwelteinfluss vermindert.^[3, 9] Im Folgenden wird auf die verschiedenen Herstellungsmöglichkeiten von enantiomerenreinen Produkten eingegangen.

*Insofern der exakte Nachweis für die Wirkung des einzelnen Enantiomeren geführt wird.

1.1.2 Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen

1.1.2.1 Die zugrunde liegenden Prinzipien

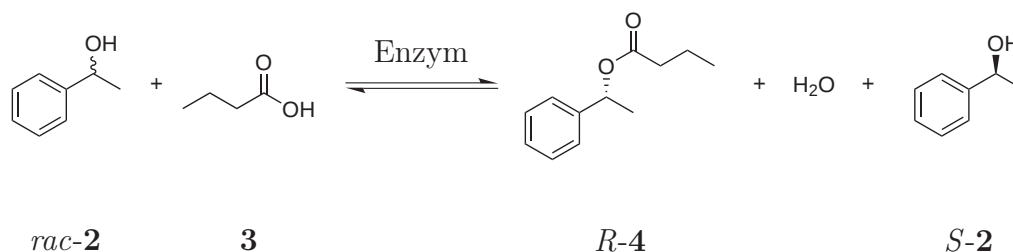
Aufgrund des stetig wachsenden Interesses an chiralen Verbindungen für die Pharmaindustrie und auch für die Landwirtschaft hat sich in den letzten beiden Dekaden die Synthese von enantiomerenreinen oder -angereicherten Stoffen zu einem wichtigen Zweig der organischen Chemie entwickelt. Die verschiedenen Methoden zu deren Gewinnung lassen sich dabei nach ihren zugrunde liegenden Prinzipien in fünf Klassen einteilen:^[13]

- **Chiral Pool:** Hierbei werden enantiomerenreine, natürlich vorkommende Verbindungen als Ausgangsstoffe verwendet, die sich leicht isolieren lassen. Die chirale Information ist im Ausgangsmolekül enthalten.
- **Chirale Reagenzien:** Für die Reaktion wird ein chirales Reagenz verwendet, welches die chirale Information auf das Zielmolekül überträgt.
- **Chirale Auxilare:** Nach der Einführung eines chiralen Hilfsreagenzes in das achirale Substrat erfolgt eine diastereoselektive Umsetzung zum Zwischenprodukt. Als diastereoselektive Umsetzung wird eine Reaktion bezeichnet, bei der die Bildung eines einzelnen Diastereomeren bevorzugt wird. Diastereomere sind Stereoisomere, die sich nicht wie Bild und Spiegelbild verhalten. Wird also, wie bei dieser Methode, ein zweites Chiralitätszentrum in das Molekül eingeführt, so wird ein Diastereomer gebildet. Die Abtrennung des Hilfsreagenzes führt zum enantiomerenreinen Endprodukt. Die chirale Information des Hilfsreagenzes wird übertragen.
- **Asymmetrische Katalyse:** Ein enantiomerenreiner Katalysator beschleunigt selektiv die Bildung eines der beiden Enantiomeren, d. h. die chirale Information des Katalysators wird übertragen.
- **Racematspaltung:** Ein racemisches Gemisch wird in seine Enantiomere getrennt. Diese Trennung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen:
 - *physikalische Wechselwirkung:*
 - a) Durch die diastereomere Wechselwirkung mit einer chiralen Phase werden die Enantiomere getrennt (Funktionsprinzip chiraler Chromatographiesäulen).

b) In einer reversiblen Reaktion wird das Substrat mit einem enantiomerenreinen Reagenz zu zwei Diastereomeren umgesetzt, die sich in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden. Häufig wird die Salzbildung zwischen Säuren und Basen genutzt. Diese Diastereomere können anschließend durch thermische Verfahren (Kristallisation, Destillation) getrennt werden.^[1]

– *kinetische Trennung:*

Durch den Einsatz von chiralen Katalysatoren oder Enzymen reagiert eines der beiden Enantiomere bevorzugt zum Folgeprodukt (vgl. Schema 1.1).



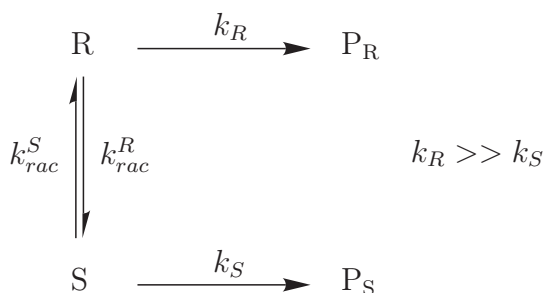
Schema 1.1: Herstellung von *R*- α -Methylbenzylbutyrat **4** bzw. *S*-1-Phenylethanol **2** durch enzymatisch kinetische Racematspaltung.

Obwohl die oben genannten Methoden alle im industriellen Maßstab eingesetzt werden^[14], ist die klassische Racematspaltung (Kristallisation) die am häufigsten genutzte Variante zur Gewinnung enantiomerenreiner oder -angereicherter Stoffe. Begründet wird dies vor allem durch die einfache, zuverlässige und praktikable Durchführbarkeit.^[15] Neben der klassischen Variante haben sich jedoch weitere Möglichkeiten zur Racematspaltung etabliert, wie z. B. die kinetische Racematspaltung. Der wesentliche Nachteil aller einfachen Racematspaltungen ist aber, dass maximal eine Ausbeute von 50 % erreicht werden kann. Wie später in Kapitel 2.1.1 näher erläutert, ist für hohe ee-Werte des Produktes selbst eine Ausbeute von nahezu 50 % nur in wenigen Ausnahmen möglich. Im Fall der kinetischen Racematspaltung muss zusätzlich noch das Produkt vom ungenutzten Edukt abgetrennt werden. Somit sind Racematspaltungen nicht die Methode der Wahl, wenn ein anderer asymmetrischer Syntheseweg möglich ist.^[10]

Um die Wirtschaftlichkeit einer Racematspaltung zu steigern, muss eine Möglichkeit gefunden werden, die es erlaubt das nicht umgesetzte Edukt zu verwerten. Dies kann z. B. durch dessen Racemisierung erfolgen. Diese Methode wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

1.1.2.2 Die dynamisch kinetische Racematspaltung

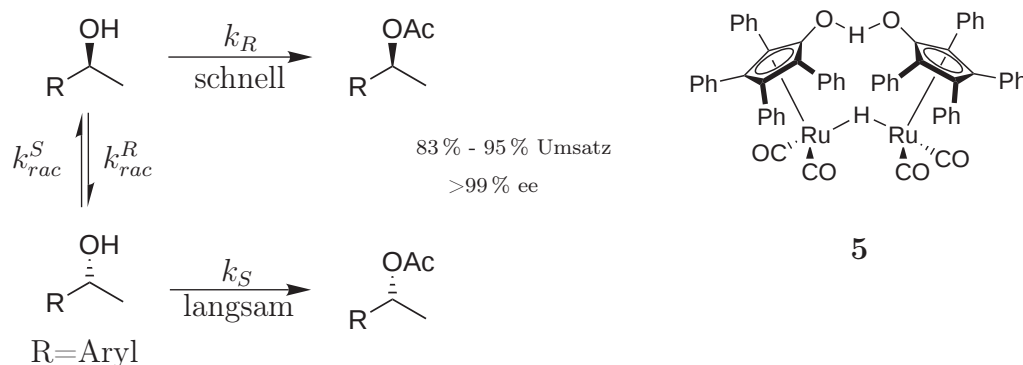
Bei der dynamisch kinetischen Racematspaltung (DKR) handelt es sich um eine Methode, die theoretisch eine quantitative Ausbeute erlaubt.^[12] Dazu wird während der kinetischen Racematspaltung das verbleibende Substrat kontinuierlich *in situ* racemisiert. Dies ist in Schema 1.2 schematisch dargestellt. Somit liegt im idealen Fall während der gesamten Reaktion eine 1:1-Mischung der Ausgangsenantiomere vor, was sowohl einen positiven Effekt auf die Kinetik als auch auf den Produkt ee hat (Siehe Kapitel 2.1.1).



Schema 1.2: Prinzip einer DKR.

Obwohl das Prinzip der DKR bereits seit Mitte des 20. Jahrhunderts bekannt ist, wurde in den Anfängen der technischen Herstellung von optisch aktiven Substanzen häufig versucht, das verbleibende Substrat in einem externen Schritt zu racemisieren und dem eigentlichen Prozess wieder zuzuführen. Dies lag vorwiegend daran, dass bis dahin eine Verbindung der beiden benötigten Reaktionen (i. e. Racemisierung und Racematspaltung) in einer so genannten Eintopfsynthese kaum möglich war. Somit verwundert es auch nicht, dass die ersten Beispiele einer DKR an Substraten durchgeführt wurden, die bekanntermaßen leicht racemisieren.^[16] Das heißt, dass die Substrate bereits unter den Bedingungen zur kinetischen Racematspaltung ohne einen zusätzlichen Katalysator racemisieren. Insbesondere durch die Arbeiten von Williams,^[17] Reetz^[18] sowie Bäckvall^[19] und deren Mitarbeitern ist das Konzept der DKR auch auf Substrate ausgeweitet worden, welche nicht leicht zur Racemisierung

neigen. Dies gelang durch die Kombination von Enzymen (zur Racematspaltung) und Metallkatalysatoren (zur Racemisierung). Mit Hilfe dieser Methode konnten bereits für spezielle Substrate Reaktionen mit Umsätzen von 95 % bei ebenfalls sehr hohen Selektivitäten erreicht werden.^[20] Dies ist in Schema 1.3 für verschiedene Arylalkohole nach Bäckvall et al. dargestellt.



Schema 1.3: Beispiel zur dynamisch kinetischen Racematspaltung von sekundären Alkoholen nach Bäckvall und Mitarbeitern^[20]; Verwendete Reagenzien: CALB, Isopropenyl Acetat, Wasserstoffquelle, Shvo-Katalysator **5** (2 mol%), LM: Toluol.

Die Nachteile dieser direkt gekoppelten DKR sind, dass sie sowohl für die Racemisierungskatalysatoren als auch für die Enzyme zur Racematspaltung eine gezielte Entwicklung benötigen. So müssen diese Katalysatoren nicht nur in Hinblick auf die gewünschte Reaktion optimiert oder gescreent werden, sondern beide Katalysatoren müssen auch unter den gleichen Bedingungen ausreichend stabil und aktiv sein und dürfen sich darüber hinaus gegenseitig nicht negativ beeinflussen. Diese Bedingungen machen die Entwicklung einer DKR sehr aufwändig und sind somit für viele industrielle Prozesse ein Ausschlusskriterium.

1.2 Überkritische Fluide

1.2.1 Historische Entwicklung

Die Existenz überkritischer Fluide (scF*) konnte bereits 1822 von Baron Charles Cagniard de la Tour experimentell gezeigt werden.^[21] Mittlerweile ist der Einsatz

*engl.: supercritical Fluids

überkritischer Fluide zum festen Bestandteil einiger industrieller Prozesse geworden, so dass im Jahr 2000 bereits mehr als 100 Anlagen scF nutzten (exclusive Ethylen Polymerisationen).^[22] Die Einsatzgebiete lassen sich dabei vornehmlich in folgende vier Kategorien einteilen:^[22]

- Extraktionen mit überkritischen Fluiden,
- Polymerisationen und Polymertechnik,
- Reinigung,
- Herstellung von feinen Partikeln durch Einsatz von überkritischem Kohlenstoffdioxid (scCO₂).

Hierbei zählt der Einsatz als Extraktionsmittel wohl zu den häufigsten Einsatzgebieten. Dabei sei insbesondere der Einsatz von scCO₂ als Extraktionsmittel für Koffein aus Kaffeebohnen erwähnt, welcher nicht nur der älteste sondern auch der profitabelste Prozess unter Einsatz von scF ist.^[22] Entwickelt wurde dieser Prozess zunächst von Kurt Zosel^[23] zur Extraktion von Naturstoffen. Heute findet scCO₂ u. a. ebenfalls Einsatz zur Extraktion von Nikotin oder Hopfenharz.

Des weiteren wurden kommerzielle Prozesse entwickelt, die scF als Reaktionsmedium verwenden. Hier sei beispielhaft die Industriekooperation zwischen Thomas Swan and Co. Ltd. und der University of Nottingham erwähnt, in der 2001* eine kommerzielle Anlage für unterschiedliche heterogen katalysierte Reaktionen mit einer Kapazität von ca. 1000 jato entwickelt wurde.^[24] Diese Anlage soll demonstrieren, dass Prozesse mit scF kommerziell konkurrenzfähig sein können und so den Weg für weitere kommerzielle Anlagen ebnen.

Überkritische Fluide zeigen sowohl aus chemischer als auch aus technischer Sicht viele interessante Eigenschaften als Reaktionsmedium für chemische Prozesse. Auf diese Eigenschaften wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

*<http://www.thomas-swan.co.uk/ASP/ProductsAndServices/ProductsAndServices.asp?Type=SupercriticalProcessing>

1.2.2 Eigenschaften

In Abbildung 1.2 sind die Aggregatzustände für Kohlenstoffdioxid in Abhängigkeit von Druck und Temperatur schematisch dargestellt. Bei Normaldruck sublimiert festes CO_2 bereits bei -78°C . Unter erhöhtem Druck lässt sich Kohlenstoffdioxid jedoch auch verflüssigen, so dass jeder Temperatur oberhalb des Tripelpunktes ein bestimmter Druck zugeschrieben ist, an dem sich Kohlenstoffdioxid verflüssigt. An dem so genannten kritischen Punkt ändert sich dieses Verhalten jedoch und die beiden Phasen „gasförmig“ und „flüssig“ verschmelzen zu einer „überkritischen Phase“.^[26] Ein überkritisches Fluid ist nach IUPAC „The defined state of a compound, mixture or element above its critical pressure and critical temperature.“^[27] Der kritische Punkt stellt das Maximum in Temperatur und Druck dar, an dem Gas und Flüssigkeit koexistieren können.^[28] Der überkritische Bereich ist sowohl zu höheren Temperaturen durch das Auftreten chemischer Umwandlungsprozesse (Fragmentierung, Ionisierung) als auch zu wesentlich höheren Drücken durch die Schmelzdruckkurve begrenzt.^[29, 30] In Tabelle 1.1 sind Werte einiger typischer Fluide aufgelistet, die in Prozessen eingesetzt werden.

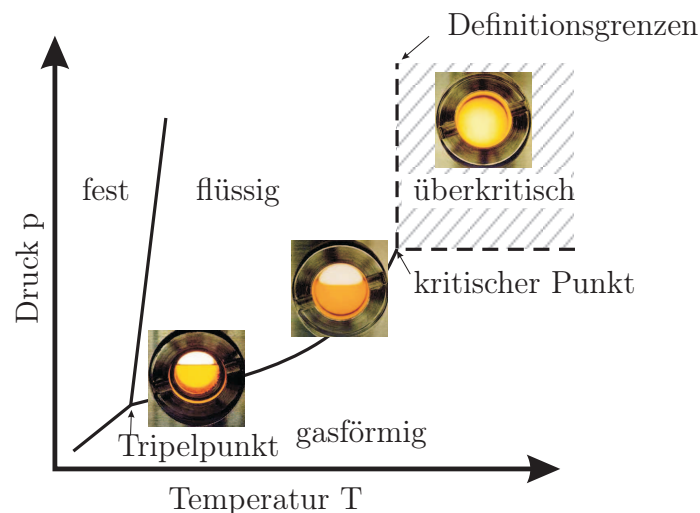


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Phasendiagramms für Kohlenstoffdioxid; Tripelpunkt bei $\vartheta_{Tr} = -56,6^\circ\text{C}$ und $p_{Tr} = 5,19\text{ bar}$; kritischer Punkt bei $\vartheta_c = 31,0^\circ\text{C}$ und $p_c = 73,75\text{ bar}$, Grafik nach Leitner^[25] (Es wurde ein oranger „CO₂-philer“ Rhodiumkomplex für besseren Kontrast dazu gegeben und um die Lösungsmiteileigenschaften des flüssigen und des überkritischen CO_2 zu illustrieren).

Tabelle 1.1: Eigenschaften einiger typischer Fluide für überkritische Fluid Prozesse.^[28]

Fluid	T_c / K	p_c / bar	ρ_c / $kg \cdot L^{-1}$
Ethylen	282	50	0,21
Distickstoffmonoxid	290	58	1,10
Fluroform	299	49	0,53
Kohlenstoffdioxid	304	74	0,47
Ethan	305	49	0,21
Ammoniak	310	72	0,43
Propan	370	43	0,22
Xenon	406	114	0,24
Wasser	647	221	0,32

Die Eigenschaften einer solchen überkritischen Phase lassen sich am besten als eine Überlagerung der Eigenschaften beider Phasen (Gas und Flüssigkeit) beschreiben. Das scF nutzt gasähnlich den gesamten ihm zur Verfügung stehenden Raum und zeichnet sich durch schnelle Diffusion, geringe Viskosität und äußerst geringe Oberflächenenergie aus. Gleichzeitig weisen überkritische Fluide zum Teil flüssigkeit-sähnliche Lösungskräfte auf. Die Dichte dieser Phase liegt dabei zwischen der von Flüssigkeiten und Gasen und lässt sich allein durch die Änderung von Temperatur oder Druck zu flüssigkeits- oder gasähnlichen Werten variieren.^[31] Wie der Tabelle 1.1 zu entnehmen ist, gehen verschiedene Stoffe bereits bei milden Bedingungen in den überkritischen Zustand über und werden auch bereits in technischen Prozessen eingesetzt. Dem überkritischen CO₂ kommt dabei eine besondere Bedeutung beim Einsatz als chemisches Lösungs- und Extraktionsmittel zu. Es ist nicht toxisch oder gesundheitsschädlich, nicht brennbar und nicht umweltschädlich^[30] und damit nahezu allen organischen Lösemitteln in diesen Eigenschaften überlegen. Des Weiteren ist Kohlenstoffdioxid unter den meisten Prozessbedingungen nicht korrosiv und sehr preisgünstig.^[29]

CO₂ verhält sich zwar in vielen Reaktionen inert, dennoch ist der Aspekt der Reaktivität von Kohlenstoffdioxid nicht zu vernachlässigen. So gibt es zurzeit wie-

der verstärkte Aktivitäten zur Nutzung von Kohlenstoffdioxid als C₁-Synthesebaustein.^[32, 33] Insbesondere sei hier aber die Reaktion mit Wasser unter Bildung von Kohlensäure sowie die Reaktion mit Aminen unter Bildung von Carbamaten erwähnt. Auf beide Aspekte wird in späteren Kapiteln näher eingegangen.

Zur Synthese von enantiomerenreinen Substanzen bietet der Einsatz überkritischer Fluide weitere potenzielle Vorteile. Dies konnte in den letzten Jahren von Leitner und Mitarbeitern am Beispiel der Acylierung von sekundären Alkoholen gezeigt werden.^[34] In einer kontinuierlichen Reaktion wird der racemische Alkohol und das Acylierungsmittel mit scCO₂ als mobile Phase dem Reaktor zugeführt. Im Reaktor erfolgt in einem Zweiphasensystem die selektive Veresterung des Alkohols. Am Reaktorausgang beinhaltet die mobile Phase sowohl den Ester als auch den nicht umgesetzten Alkohol. Durch anschließende kontrollierte Reduzierung der Dichte in einem zweiten Autoklaven erfolgt eine Trennung von Ester und Alkohol. Durch die Verwendung des scF kann somit die Produktaufbereitung direkt in den Prozess integriert werden.

1.3 Zweiphasensysteme

1.3.1 Allgemeines

Aus verfahrenstechnischer Sicht ist die effiziente Katalysatorabtrennung eine entscheidende Prozessgröße. Da sich die Abtrennung für die meisten heterogenen Katalysatoren einfacher gestaltet als für homogene Katalysatoren, werden erstere für viele industrielle Prozesse bevorzugt.

Zur Synthese von Produkten mit hohen Enantiomerenüberschüssen werden aber in der Regel homogene bzw. Biokatalysatoren benötigt, da die erreichbaren Enantioselektivitäten im Allgemeinen für diese Katalysatorklassen höher sind. Die Zurückhaltung homogener Katalysatoren in kontinuierlichen Reaktionen ist aber nicht trivial, so dass verschiedene Ansätze entwickelt wurden, um dieses Problem zu lösen. Eine mögliche Variante ist der Aufbau einer physikalischen Barriere durch die Verwendung von Zweiphasensystemen. Hier ist der Katalysator nur in einer der beiden Phasen löslich. Auch der Einsatz von Biokatalysatoren in kontinuierlichen

Reaktionen bedarf häufig eines Zweiphasensystems, da für viele Enzyme Wasser das bevorzugte Reaktionsmedium ist (vgl. Kapitel 1.4.1).

In Zweiphasensystemen tritt jedoch das intrinsische Problem auf, dass einerseits ein guter Kontakt von Reaktanden und Katalysator im Reaktionsschritt erwünscht ist, andererseits aber eine ausreichende Selektivität während der Extraktion benötigt wird.^[28] Eines der bekanntesten Beispiele für dieses Problem ist das Zweiphasensystem zur Hydroformylierung mit wasserlöslichen Katalysatoren. Während kurzkettige Olefine gut umgesetzt werden, kann das System für länger-kettige nicht mehr verwendet werden, da die Löslichkeiten im Wasser nicht ausreichend sind.^[28] Allgemein muss folgenden Punkten bei der Verwendung von Zweiphasensystemen spezielle Beachtung geschenkt werden:^[28]

1. Große Mischungslücke,
2. Inertheit der Lösungsmittel,
3. Thermodynamik; Partitionskoeffizienten,
4. Kinetik; Massentransfer zwischen den Phasen.

Bezüglich Punkt eins sind für ein Zweiphasensystem mit überkritischen Fluiden insbesondere Wasser sowie (niedrig schmelzende) Polymere und ionische Flüssigkeiten interessant.^[28] Im Folgenden soll jedoch nur auf die Verwendung von Wasser und scCO₂ als Zweiphasensystem eingegangen werden.

1.3.2 Das Zweiphasensystem Wasser/CO₂

Die Kreuzlöslichkeit von Wasser und CO₂ wurde schon früh untersucht. Hier seien die Pionierarbeiten von Wiebe und Gaddy^[35, 36] erwähnt, die bereits Ende der 1930er Jahre dieses System untersucht haben. Die Löslichkeit von Wasser in CO₂ liegt dabei unterhalb von 1 mol%.^[28] Wasser ist somit eine interessante stationäre Phase beim Einsatz von CO₂ als kontinuierliche Phase. Dennoch muss diese Löslichkeit bei der Prozessauslegung beachtet werden. Zum einen können bereits kleine Mengen Wasser im Produktstrom die weitere Verarbeitung des Produktes signifikant beeinflussen (Trocknung, Isolierung, etc), zum anderen führt die Kreuzlöslichkeit der

beiden Phasen zu einer Veränderung der Löslichkeiten^[37] und damit auch zu einer Verschiebung der Partitionskoeffizienten. Werden keine entsprechenden Maßnahmen getroffen, muss auch der Verlust an Wasser aus der stationären Phase beachtet werden.

Die Löslichkeit von Kohlenstoffdioxid in der Wasserphase liegt mit bis zu 5 mol% ein wenig höher und muss insbesondere hinsichtlich der Reaktivität beachtet werden. Wie in Kapitel 2.3.2 detailliert diskutiert wird, führt das Lösen von CO_2 in reinem Wasser zu einer Absenkung des pH-Wertes, was einen erheblichen Einfluss auf die Reaktion ausüben kann. Die Löslichkeiten sowie die Partitionskoeffizienten der Substrate und Produkte in diesem speziellen Zweiphasensystem werden durch eine Änderung des Druckes sowie der Temperatur beeinflusst. Somit kann durch eine Änderung dieser Parameter eine Änderung des Umsatzes oder auch der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden.

Einen weitaus größeren Einfluss auf die effektive Reaktionsgeschwindigkeit kann der Massentransfer zwischen den Phasen haben. Da die Substrate aus der nicht reaktiven Phase (CO_2) in die reaktive Phase (Wasser) übergehen müssen, spielt bei der effektiven Reaktionsgeschwindigkeit die Diffusion oft eine Rolle.^[38] Die Diffusion zwischen zwei Fluiden kann mit der Zweifilmtheorie beschrieben werden (Abbildung 1.3).

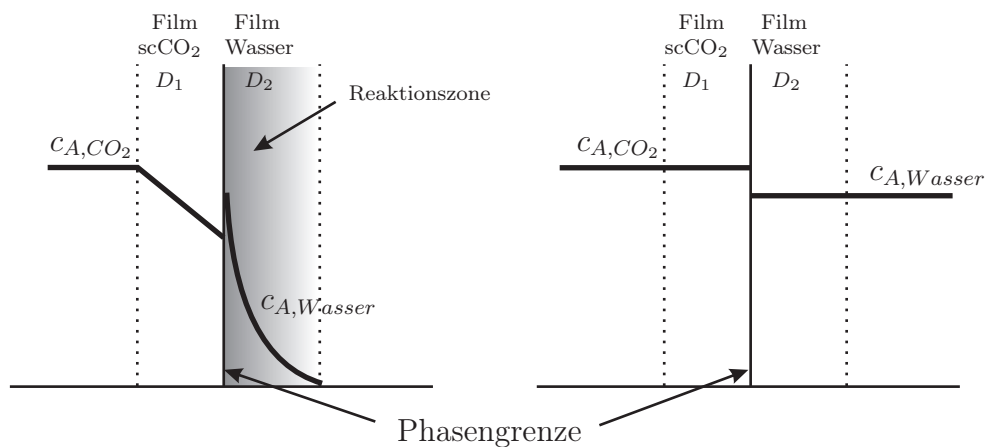


Abbildung 1.3: Veranschaulichung der Zweifilmtheorie nach Levenspiel.^[38] Links: langsame Diffusion; Rechts: schnelle Diffusion.

In dieser Theorie wird angenommen, dass zu beiden Seiten der Grenzschicht jeweils ein dünner Film der Dicke D_1 bzw. D_2 existiert, in der sich die Konzentrationen aufgrund von Diffusion ändern. An der Phasengrenze selber baut sich für den Stofftransport kein Widerstand auf, so dass sich die Phasengrenzkonzentrationen im Gleichgewicht befinden.^[1, 39] Jenseits dieser Filme werden die Konzentrationen als konstant angenommen (Stofftransport ausschließlich aufgrund von Konvektion). Die linke Grafik beschreibt nun den Fall, dass die Reaktion (in der reaktiven Wasserphase) schneller abläuft als der Massentransfer. In der nicht reaktiven Phase nimmt die Substratkonzentration c_A innerhalb des Filmes durch Diffusion ab. In der reaktiven Phase ändert sich die Konzentration in dem Film aufgrund der schnellen Reaktion. Hinter dem Film ist die Reaktion bereits vollständig abgeschlossen, hier findet keine Reaktion statt. Die rechte Grafik hingegen zeigt das andere Extrem, in dem der Massentransport viel schneller ist als die Reaktion. In diesem Fall ist die Diffusion zu vernachlässigen und die Reaktion findet in der gesamten reaktiven Phase statt.

Abbildung 1.4 veranschaulicht dieses Verhalten in erster Näherung. Der Stofftransfer ist bestimmt durch den Koeffizienten (k_A bzw. k_P) und den Konzentrationsgradienten. Der Koeffizient ist unter anderem auch durch die spezifische Pha-

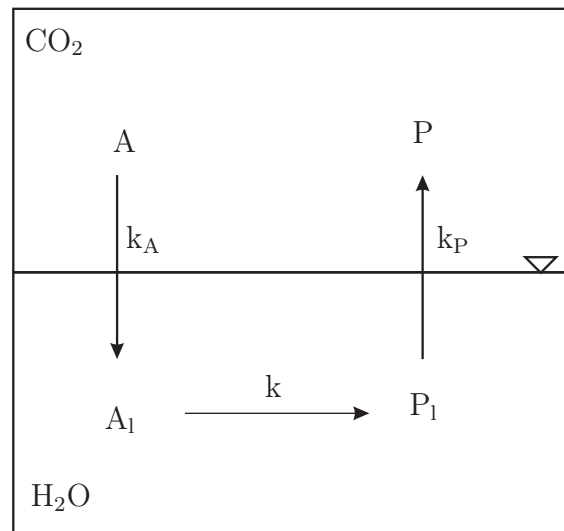


Abbildung 1.4: Vereinfachte Darstellung einer Reaktion im Zweiphasensystem. k_A und k_P sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Diffusion über die Phasengrenze. Hier sei schon die spezifische Phasengrenzfläche enthalten. k ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante.

sengrenzfläche bestimmt. Aus beiden Abbildungen (1.4 und 1.3) ist deutlich zu erkennen, wie wichtig die spezifische Phasengrenze (Grenzfläche pro Volumen) ist. Im linken Beispiel der Abbildung 1.3 ist die Reaktion wesentlich schneller als die Diffusion, d. h. dass das Substrat schneller verbraucht wird als es durch Diffusion in die Phase diffundieren kann ($k_A \gg k$). Diese Reaktion ist somit diffusionskontrolliert. Im rechten Beispiel kann das Substrat schneller in die reaktive Phase diffundieren als es durch die Reaktion verbraucht werden kann ($k_A \ll k$). Hier ist die Reaktion durch die Reaktionsgeschwindigkeit kontrolliert (also bei katalysierten Reaktionen durch die Katalysatoraktivität). Für die technische Anwendung bedeutet dies, dass im Fall A durch eine Vergrößerung der spezifischen Phasengrenzfläche eine Steigerung der effektiven Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden kann. Im anderen Fall hingegen kann eine schnellere Reaktion ausschließlich durch eine Variation kinetischer Parameter (k, c_A, c_B, c_{kat}) erzielt werden.

Um dieses Problem für ein reaktives CO_2 / wässriges Zweiphasensystem für schnelle Reaktionen zu lösen, wurde die Bildung von Emulsionen und Mikroemulsionen mit einer hohen spezifischen Grenzfläche bereits intensiv untersucht.^[37] Mikroemulsionen sind im Gegensatz zu Emulsionen thermodynamisch stabile Dispersionen. Die Tropfengröße der Mikroemulsionen ($< 100 \text{ nm}$) ist dabei unabhängig vom Energieeintrag sondern wird durch oberflächenaktive Substanzen beeinflusst. Emulsionen, auch Makroemulsionen genannt, sind im Gegensatz dazu nicht thermodynamisch stabil und die Tropfengrößen ($> 1 \mu\text{m}$) sind abhängig vom Energieeintrag.^[37] Makroemulsionen bedürfen nicht zwangsläufig der Verwendung von Tensiden. Kombinationen werden zum Teil angewendet.

Durch die Verwendung von (Mikro-) Emulsionen können die Reaktionszeiten um ein Vielfaches verringert werden, wenn k_A limitierend ist. Deren Verwendung in kontinuierlichen Reaktionen ist aber insbesondere aufgrund der Phasentrennung sowie dem Auswaschen der Tenside schwierig. Um dennoch einen Flüssig-Flüssig Prozess mit einer großen spezifischen Phasengrenzfläche zu erhalten, können z. B. Hydrogele eingesetzt werden. Diese werden im Kapitel 2.5.1 näher beschrieben.

1.4 Industrielle Biokatalyse

1.4.1 Allgemeines

Der Einsatz von Biokatalysatoren wird sowohl von der akademischen Welt als auch von der Industrie als ein wichtiger Bestandteil zur Entwicklung von nachhaltigen Prozessen angesehen.^[40] Begründet wird dies vorwiegend durch die Eigenschaften, die Biokatalysatoren mit sich bringen. Zu den wichtigsten Eigenschaften zählen dabei:

- **Selektivität:** Biokatalysatoren weisen häufig hohe Selektivitäten auf. Dabei sind nicht nur hohe Chemo- und Regioselektivitäten zu erreichen, sondern auch sehr hohe Enantioselektivitäten. So sind Enantiomerenüberschüsse von $> 99\%$ keine Seltenheit, allerdings auch nicht die Regel.^[41]
- **Reaktionsbedingungen:** Eine weitere Eigenschaft von Biokatalysatoren sind die milden benötigten Reaktionsbedingungen, wie z. B. Temperatur und pH-Wert, die für eine effiziente Katalyse benötigt werden.^[41]
- **Reaktionsgeschwindigkeit:** Auch zeigen viele Biokatalysatoren unter optimalen Bedingungen sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeiten.^[42]

Die positive Eigenschaft der hohen Selektivitäten führt zu einer Reduzierung der nötigen Produktaufbereitung, sowie zu einer besseren Ausnutzung der verwendeten Substrate. Hohe Selektivitäten sind also gleichzusetzen mit einer hohen ökologischen sowie einer hohen ökonomischen Effizienz. Allerdings ist der Preis einer solch hohen Selektivität, dass spezielle Enzyme nicht alleine das breite Spektrum chemischer Reaktionen abdecken können^[42], zumindest nicht unter Erhaltung sehr hoher Stereoselektivitäten. Das heißt, dass für jedes Substrat und jedes gewünschte Produkt das passende Enzym gesucht oder die Enzyme angepasst werden müssen.

Die weit verbreitete Meinung, dass Biokatalysatoren generell langsame Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen ist falsch.^[41] Aber auch das Gegenteil, dass Biokatalysatoren generell hohe Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen ist nicht richtig, sondern die Geschwindigkeit ist immer abhängig vom verwendeten Katalysator und dem Reaktionssystem sowie den Reaktionsbedingungen. Der Grund für die häufig beobachteten geringen Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) liegt vielmehr an den häufig

verwendeten geringen Konzentrationen von Substrat und Enzym. So sind Prozesse mit RZA von $60 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ bekannt.^[41, 43] Möglichkeiten zur Erhöhung der RZA werden im Kapitel 1.4.2 beschrieben.

Unter anderem aufgrund dieser Eigenschaften erhalten Biokatalysatoren vermehrt Einzug in industriellen Prozessen. So wurden alleine zwischen 1980 und 2002 mehr als 100 Prozesse auf Basis von Biotransformationen entwickelt und industriell umgesetzt.^[14] In Tabelle 1.2 sind einige wichtige industrielle Prozesse, die Biotransformationen beinhalten, mit ihrer Produktionskapazität dargestellt. Viele dieser Prozesse bevorzugen ganze Zellen als Biokatalysatoren.^[14] Freie oder immobilisierte Enzyme machen knapp 40 % der Prozesse aus.

Tabelle 1.2: Beispiele für industrielle Prozesse mit Biotransformationen.^[44]

Produkt	Biokatalysator	Firma	Produktionskapazität $t \cdot a^{-1}$
HFCS	Amylase, u. a.	verschiedene	> 10 000 000
Ethanol	Amylase	verschiedene	> 10 000 000
Acrylamid	Nitrilase	Nitto, DSM	> 10 000
6-Aminopenicillin			
Säure	Penicillin Amidase	verschiedene	> 10 000
Aspartam	Thermolysin	Toso, DSM	> 1 000
(S)-Aminosäuren	Aminoacylasen	Degussa, Tanabe	> 1 000
(S)-DOPA	β -Thyrosinase	Ajinomoto	1 000 > 10

1.4.2 Enzymkatalyse in nicht konventionellen Medien

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, zeigen viele biokatalytische Prozesse nur geringe RZA, was in vielen Fällen auf geringe Substratkonzentrationen in der wässrigen Lösung zurückzuführen ist.^[41, 43] Ebenso ist das thermodynamische Gleichgewicht vieler chemischer Reaktionen in wässrigem Medium ungünstig, so dass der Einsatz von organischen Lösungsmitteln oder anderen für Biokatalysatoren unkonventionellen Medien attraktiv ist. Dazu gibt es prinzipiell drei verschiedene Ansätze.^[42] Einsatz von Enzymen in

- mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln,
- Zweiphasensystemen oder
- wassermischbaren Lösungsmitteln und Zugabe von Wasser.

Der Einsatz von Enzymen in reinen organischen Lösungsmitteln wurde erstmalig bereits in den 1930ern demonstriert,^[41] blieb aber mehrere Dekaden weitestgehend unbeachtet. Erst durch die Arbeiten von Klibanov *et al.*^[45] wurde zunächst das akademische und schließlich auch das industrielle Interesse an Biotransformationen in organischen Lösungsmitteln geweckt. Der Einsatz organischer Lösungsmittel* für Biokatalysen bietet neben den oben erwähnten Vorteilen noch weitere. Da Enzyme in hydrophoben organischen Lösungsmitteln in der Regel nicht gelöst sind, ist deren Abtrennung meist durch einfache Filtration oder Ähnliches möglich. Die so abgetrennten Enzyme können zum Teil wiederverwendet werden. Des Weiteren zeigen Enzyme in reinen organischen Phasen zum Teil eine erhöhte Stabilität und zum Teil andere Selektivitäten.^[44] Allerdings weisen Enzyme in organischen Lösungsmitteln meistens eine wesentlich geringere spezifische Aktivität auf als in wässrigen Reaktionslösungen. Dieser Effekt kann jedoch in vielen Fällen durch verschiedene Vorkehrungen minimiert werden. Dazu zählen unter anderem eine ausreichende Wasseraktivität, Lyophilisation des Enzyms beim optimalen pH-Wert, Zusatz von Kronenethern, etc..^[41] Ebenso kann versucht werden durch Techniken wie z. B. der "Gerichteten Evolution" die Aktivität zu steigern.

Dennoch gibt es verschiedene Reaktionen oder Enzyme, die nur in wässriger Phase aktiv sind. In diesen Fällen ist eine Zweiphasenkatalyse das Mittel der Wahl. Durch eine optimale Auswahl der verwendeten, nicht reaktiven organischen Phase kann der Umsatz und damit auch die RZA um ein Vielfaches gesteigert werden.^[47, 48]

Nachdem der Einsatz von Biokatalysatoren nicht mehr auf die Verwendung rein wässriger Systeme beschränkt ist, finden Enzyme vermehrt Einsatz als Alternative zu chemischen Katalysatoren, so dass sich das Gebiet der Biokatalyse in unkonven-

*Geringe Mengen an Wasser werden nach heutigem Kenntnisstand für alle Enzymreaktionen benötigt, um eine gewisse Flexibilität der Enzyme zu gewährleisten. Die Mengen an Wasser, die das Lösungsmittel dabei enthält, sollten nicht in Form von Konzentrationen, sondern als s.g. Wasseraktivitäten angegeben werden.^[46]

tionellen Reaktionsmedien zu einem wichtigen Forschungsgebiet entwickelt hat und verschiedene industrielle Prozesse entwickelt wurden.^[49] Dennoch gibt es nur wenige industrielle Prozesse, die Biokatalyse in reinen organischen Lösungsmitteln durchführen. Der Einsatz von Zweiphasensystemen ist häufiger anzutreffen. Hier besteht die nicht reaktive Phase entweder aus einem organischen Lösungsmittel oder auch direkt aus dem flüssigen Substrat bzw. Produkt.^[14]

Die Biokatalyse in nicht konventionellen Medien ist dabei nicht nur auf die Verwendung von organischen Lösungsmitteln beschränkt, sondern auch der Einsatz von ionischen Flüssigkeiten^[50], Gasphasen^[51] sowie überkritischen Fluiden^[52] ist möglich. Letztere werden in dieser Arbeit eingesetzt.

1.4.3 Lipasen

In dieser Arbeit werden ausschließlich Lipasen als Biokatalysatoren eingesetzt. Lipasen* gehören zu der Gruppe der Triacylglycerin-Hydrolasen,^[44] welche in industriellen biotechnologischen Anwendungen den häufigsten Einsatz finden.^[14] Begründet wird dies durch ihre hohe Stabilität im Vergleich zu vielen anderen Enzymen, insbesondere in organischen Lösungsmitteln, ihre ausgeprägte Regio- und Stereoselektivität, ihr breites Substratspektrum, sowie der Tatsache, dass sie keine Cofaktoren benötigen.^[53] Des Weiteren sind Lipasen in vielen nicht wässrigen Lösungsmitteln sehr aktiv und akzeptieren andere Nukleophile als Wasser.^[44]

Lipasen sind in der Natur weit verbreitet (in Menschen, Tieren, Pflanzen, Bakterien, usw.), wobei ihre Hauptaufgabe in der Hydrolyse und Umesterung von Fetten und Ölen liegt.^[44] Neben der Hydrolyse vermögen Lipasen sowohl die Veresterung von Alkoholen als auch die Umesterung zu katalysieren.^[53] Um das thermodynamische Gleichgewicht auf die Seite der Produkte zu verschieben und auch um die Löslichkeiten der Substrate und Produkte zu erhöhen, finden viele von Lipasen katalysierte Reaktionen in organischen Lösungsmitteln statt.

Lipasen zeigen häufig eine so genannte Grenzflächenaktivierung. Dies bedeutet, dass die Enzymaktivität sprunghaft ansteigt, sobald sich eine Grenzfläche ausbildet.

*Enzymklasse: EC 3.1.1.3

Diese Grenzfläche kann entweder durch ein Übersteigen der Substratlöslichkeit oder durch die Zugabe von nicht mischbaren Lösungsmitteln verursacht werden. Erklärt wird dieses Verhalten durch die 3-D Struktur von Lipasen. Lipasen besitzen einen hydrophoben Rest aus Oligopeptiden, den sogenannten „Lid“ welcher das aktive Zentrum der Lipase bedeckt.^[53] An der Grenzfläche zwischen den Phasen erfährt die Lipase eine Konformationsänderung und das aktive Zentrum wird für das Substrat frei gegeben.^[44] Allerdings muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass auch Lipasen bekannt sind, die zwar eine Lid-Struktur aufweisen, aber dennoch nicht durch eine Grenzfläche aktiviert werden.^[53] Ebenso existieren Lipasen, die an einer Grenzfläche aktiviert werden, aber keinen „Lid“ aufweisen.

1.5 Motivation und Zielsetzung

Wie in den einleitenden Kapiteln beschrieben ist die dynamisch kinetische Racematspaltung eine interessante Möglichkeit zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit einfacher Racematspaltungen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine reaktionstechnische Lösung entwickelt werden, die es erlaubt beide Katalysatoren unabhängig von Einschränkungen, die sich durch die Kombination der Bedingungen ergeben, zu wählen. Dies sollte durch eine Trennung der Reaktionsräume für die Racemisierung und die kinetische Racematspaltung erreicht werden. Dadurch können Entwicklungszeiten für eine DKR drastisch reduziert werden, was zu einer erhöhten Akzeptanz in der Industrie führen sollte. Da die Tendenz moderner chemischer Reaktionen immer stärker zur kontinuierlichen Reaktionsführung geht,^[54] sollte der entwickelte Prozess ebenfalls kontinuierlich erfolgen. Durch die Verwendung von überkritischem Kohlenstoffdioxid als mobile Phase in einem solchen Prozess kann der Aufwand für eine abschließende Produktaufbereitung enorm reduziert oder auch direkt integriert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines reaktionstechnischen Konzeptes zur kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung. Dabei sollten die Bedingungen für die kinetische Racematspaltung und die Racemisierung durch eine räumliche Trennung entkoppelt und überkritischer Kohlenstoffdioxid als mobile Phase verwendet werden. (Abbildung 1.5).

Zur Entwicklung eines solchen Prozesses sind folgende Ziele ableitbar:

- Durch Simulation des Konzeptes sollten erreichbare Umsätze und Selektivitäten aufgezeigt und die Möglichkeiten einer solchen Prozessführung demonstriert werden (Kapitel 2.1).
- Geeignete Katalysatoren zur Racemisierung sollten aus der Literatur identifiziert und hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit untersucht werden (Kapitel 2.2).
- Um den Prozess einer kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung in Verbindung mit scCO_2 für verschiedene Enzyme zugänglich zu machen, sollte darüber hinaus die Entwicklung eines Zweiphasensystems mit Wasser als reaktiver Phase und CO_2 als nicht reaktiver Phase vorangetrieben werden.

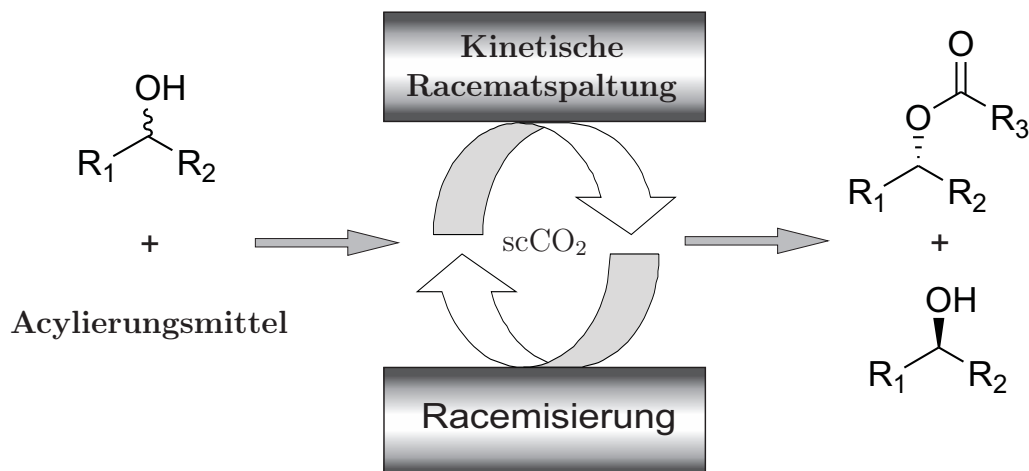


Abbildung 1.5: Darstellung einer dynamisch kinetischen Racematspaltung mit entkoppelten Reaktionsbedingungen.

- Dazu musste zunächst die Möglichkeit geschaffen werden, den pH-Wert der wässrigen Phase zu bestimmen und kontrolliert zu variieren (Kapitel 2.3).
- Anschließend musste der Einfluss verschiedener Reaktionsbedingungen in diesem Zweiphasensystem auf die Enzymaktivität untersucht werden (Kapitel 2.4).
- Durch eine geeignete Immobilisierungsmethode für Enzyme in Form von „festem Wasser“ sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, dieses Zweiphasensystem für kontinuierliche Reaktionen zugänglich zu machen (Kapitel 2.5).
- Für die Durchführung der kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung sollte unter Einhaltung verschiedener Voraussetzungen eine Versuchsanlage konzipiert und gebaut werden. Dazu sollte auch eine geeignete online Analytik etabliert werden (Kapitel 2.6).
- Die Durchführung einer kontinuierlich dynamisch kinetischen Racematspaltung in dieser Versuchsanlage sollte das in dieser Arbeit entwickelte Konzept der getrennten Reaktionsräume demonstrieren (Kapitel 2.7).

Kapitel 2

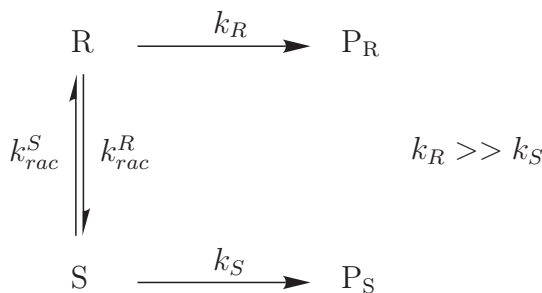
Ergebnisse und Diskussion

2.1 Simulation einer kontinuierlichen DKR

2.1.1 Stand der Technik

Die Modellierung und Simulation chemischer parallel oder in Reihe ablaufender Reaktionen kann nicht nur zu einem besseren Verständnis der Reaktion selbst führen, sondern kann helfen experimentelle Ergebnisse zu deuten und weiterführende Synthesen oder Prozesse zu optimieren. „Die theoretischen Beschreibungen konventioneller Racematspaltungen begannen mit Breiding und Fajans^[55] numerischer Formulierung im Jahr 1908, gefolgt von einer graphischen Beschreibung von Kuhn^[56] und Mislow^[57] und mündeten in Kagans diagnostischen System^[58]. Später erweiterten Sharpless^[59] und Sih^[60] das System in genereller anwendbare Gleichungen“^[61] in denen das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten als Funktion der Enantiomerenüberschüsse und des Umsatzes beschrieben werden.

Das Prinzip der dynamisch kinetischen Racematspaltung (siehe Schema 2.1) wurde zwar bereits Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts in Verbindung mit dem Curtin-Hammett-Prinzip erkannt, dennoch kam es erst deutlich später zu dessen mathematischer Beschreibung. Hier seien insbesondere die Arbeiten von Zefirov *et al.*^[62] und Seeman *et al.*^[63] Ende der 1980er Jahre erwähnt. Noyori *et al.*^[61, 64] waren die ersten, die eine exakte mathematische Beschreibung speziell für die DKR vorstellten, um dadurch das Verständnis für eine solche Parallelreaktion zu verbessern. Sie konnten so die Abhängigkeit der Enantiomerenüberschüsse bei verschiedenen Umsätzen und



Schema 2.1: Prinzip einer DKR.

verschiedenen Verhältnissen von $\frac{k_{rac}}{k_S}$ grafisch darstellen.

Die Abbildung 2.1(a) zeigt die Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des Produktes von der relativen Racemisierungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Umsätzen. Abbildung 2.1(b) zeigt diese Abhängigkeit bezogen auf das verbleibende Substrat. Bei einer sehr kleinen relativen Racemisierungsgeschwindigkeit kommt das Verhalten des Systems dem einer klassischen, kinetischen Racematspaltung sehr nahe. Es lässt sich für diesen Fall deutlich die Abhängigkeit der Enantiomerenüberschüsse von den Umsätzen erkennen. Dies ist der Grund für den Abbruch einer klassischen, kinetischen Racematspaltung bevor 50 % Umsatz erreicht sind, wenn

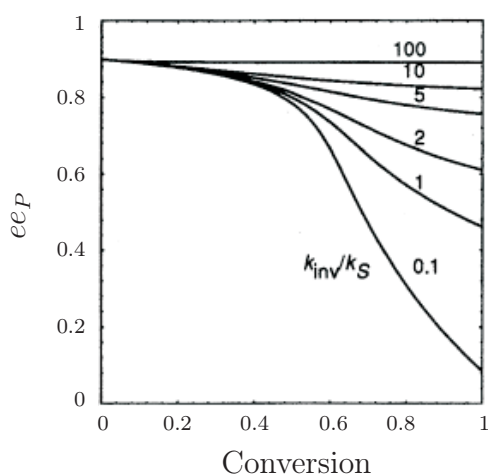
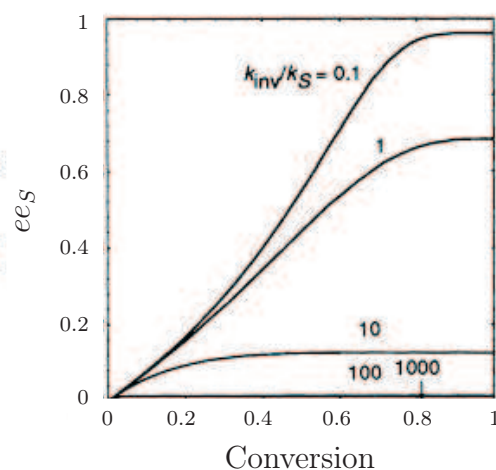
(a) $k_R/k_S = 19$ (b) $k_R/k_S = 6, 14$

Abbildung 2.1: Simulation einer DKR im Batchreaktor nach Noyori *et al.*^[61]; k_{inv} entspricht der Bezeichnung k_{rac} in dieser Arbeit, k_S ist die Geschwindigkeitskonstante der langsameren Reaktion.

sehr hohe ee-Werte gefordert sind. Dieses Verhalten verbessert sich mit der Zunahme der Racemisierungsgeschwindigkeit, so dass bei hohen Geschwindigkeiten der Enantiomerenüberschuss des Produktes nur noch minimal vom Umsatz abhängt.

Später hat Andraos eine weitere analytische Lösung zur Beschreibung des Systems unter Verwendung von Laplace-Transformationen entwickelt, die zusätzlich auch auf ähnliche Systeme wie die DKR anwendbar sind.^[65] Er konnte den Enantiomerenüberschuss in Abhängigkeit von der Zeit für verschiedene Energiebarrieren simulieren.^[65] Im Jahr 2006 entwickelten Zimmermann *et al.*^[66] ein weiteres Modell zur Beschreibung des zeitabhängigen Verlaufs einer DKR von Phenylalaninethylester unter Einbeziehung von Katalysatordeaktivierungen. Anhand dieses Modells verbesserten die Autoren ihr Reaktionssystem.

2.1.2 Zielsetzung

Die oben genannten Arbeiten beziehen sich alle auf so genannte direkt gekoppelte Batchsynthesen, was bedeutet, dass die Gleichgewichtseinstellung parallel zur Produktbildung *in situ* erfolgt. Auf die modellgestützte Beschreibung von kontinuierlichen Systemen wird bei Zimmermann *et al.*^[66] zwar kurz eingegangen, jedoch lediglich unter dem Aspekt der Katalysatordeaktivierung. Der Einfluss von Nebenreaktionen auf den Enantiomerenüberschuss und die Ausbeute findet in keiner der Veröffentlichungen Beachtung.

In diesen Punkten liegt die wesentliche Abgrenzung zu dem in dieser Arbeit vorgestellten Konzept. Dieses sieht eine kontinuierliche Reaktion mit getrennten Reaktionsräumen für die beiden Reaktionen vor, die durch eine Kreislaufpumpe miteinander verbunden sind. Somit ist die Rezyklierungsgeschwindigkeit ein weiterer Faktor, der das System beeinflussen kann. Auch ist der Einfluss von Nebenreaktionen auf das System von besonderem Interesse. Um ein solches System hinsichtlich Umsatz, Ausbeute (Chemoselektivität) und Stereoselektivität zu beschreiben, sollte ein neues Modell entwickelt werden. Dieses sollte das Verhalten des Systems in Abhängigkeit der verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten inkl. möglicher Nebenreaktionen, sowie in Abhängigkeit von der Rezyklierungsgeschwindigkeit beschreiben. Anhand der Simulation sollten potentielle Katalysatoren identifiziert und zu erwartende Ausbeu-

ten und Enantioselektivitäten erkannt werden.

2.1.3 Modellentwicklung

Zur Beschreibung des Systems wurden zunächst analog zu Noyori *et al.*^[61] folgende Randbedingungen gewählt:

- **Kinetische Racematspaltung**

- Die Reaktionen vom *R*-Substrat und *S*-Substrat mit den Geschwindigkeitskonstanten k_R und k_S verlaufen pseudo-erster Ordnung.
- Das *R*-Substrat wird schneller umgesetzt als das *S*-Substrat.
- Die kinetische Racematspaltung ist irreversibel.
- Die Produkte sind unter den Reaktionsbedingungen stabil.

- **Racemisierung**

- Die Racemisierung mit der Konstanten k_{rac} folgt einem Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung.
- Das *R*-Substrat racemisiert gleich schnell wie das *S*-Substrat.

Enzyme zeigen in der Regel eine sehr hohe Chemo-selektivität, so dass die Betrachtung von enzymkatalysierten Nebenreaktionen vernachlässigt werden kann. Der Racemisierungskatalysator jedoch weist unter Umständen keine vollständige Chemo-selektivität auf, so dass dieses Verhalten auch in der Simulation beschrieben werden muss.

Die Beschreibung von parallel ablaufenden Reaktionen ist häufig sehr komplex, da sie sich gegenseitig beeinflussen. Dies kann in diesem System jedoch durch eine getrennte Betrachtung der Reaktionen (Racemisierung und Bildung von Nebenprodukten) beschrieben werden (Abbildung 2.2). Die Änderung des Umsatzes der Racemisierung mit der Zeit ist unabhängig von der Substrat- und Produktkonzentration, die Nebenproduktbildung wiederum ist unselektiv (bezogen auf die Substratenantiomere). Dies bedeutet, dass beide Reaktionen voneinander unabhängig sind und somit in Reihe betrachtet werden können.

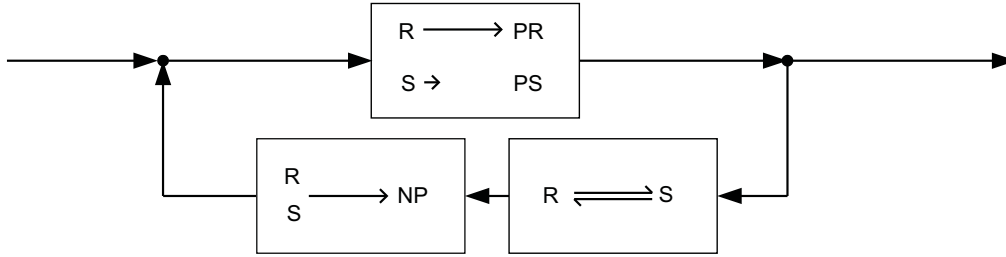


Abbildung 2.2: Darstellung des zugrunde liegenden Modells zur Simulation des Reaktorkonzeptes.

Die Abbildung 2.3 zeigt die Nomenklatur, welche das System beschreibt. Darin beschreiben C_R und C_S die einzelnen Substratkonzentrationen und C_{PR} und C_{PS} die jeweiligen Produktkonzentrationen. Das Rezyklierungsverhältnis $\mathbf{R}$ ist definiert als

$$\mathbf{R} = \frac{\text{Volumenstrom durch Racemisierungsreaktor}}{\text{Zugeführter Volumenstrom}} = \frac{\dot{V}_R}{\dot{V}_0} \quad (2.1)$$

mit $\dot{V}_0 > 0$.

Das Verhältnis $\mathbf{R}$ kann in der Simulation zwischen Null und Unendlich variiert werden. Mit Blick auf das bekannte Verhalten von Schlaufenreaktoren^[38] kann an-

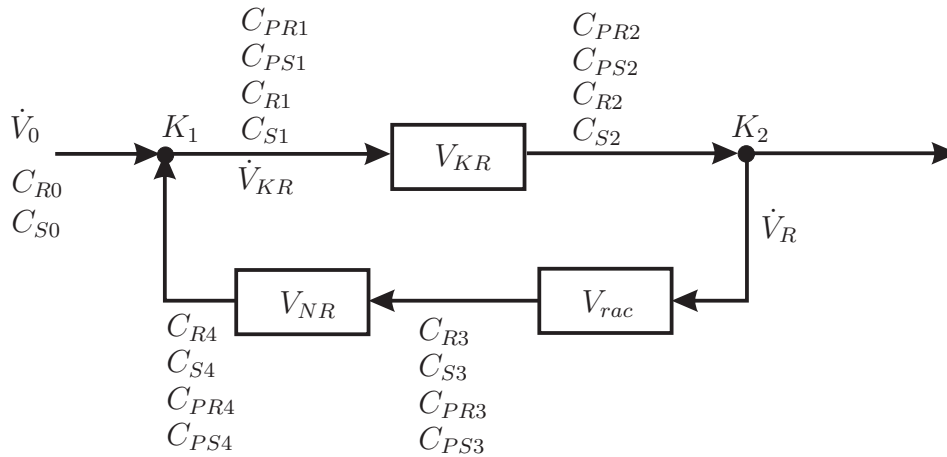


Abbildung 2.3: Nomenklatur in dem verwendeten Modell.

genommen werden, dass sich das Verhalten des Systems mit steigendem Rezyklierungsverhältnis vom Strömungsrohr (PFR) ($\mathbf{R} = 0$) zum kontinuierlichen Rührkessel (CSTR) ($\mathbf{R} = \infty$) ändern wird. Die Enantioselektivität E des Enzyms wird durch das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten k_R und k_S beschrieben:

$$E = \frac{k_R}{k_S}. \quad (2.2)$$

Zur Beschreibung der verschiedenen Konzentrationen am Reaktoreingang zur kinetischen Racematspaltung wird ein Bilanzraum um den Knoten K_1 gezogen. Zur Vereinfachung wird im Folgenden stets von einem konstanten Druck in der gesamten Anlage, sowie von volumenbeständigen Reaktionen ausgegangen*. Nun muss zunächst der Volumenstrom $\dot{V}_{KR}$ berechnet werden. Dieser ergibt sich unter Einbeziehen von Gleichung 2.1 aus

$$\dot{V}_{KR} = \dot{V}_0 + \dot{V}_R = \dot{V}_0 + \dot{V}_0 \cdot \mathbf{R} = \dot{V}_0 \cdot (1 + \mathbf{R}). \quad (2.3)$$

Die Konzentrationen der einzelnen Substratenantimere am Reaktoreingang zur kinetischen Racematspaltung lassen sich über folgende Gleichungen beschreiben.

$$C_{R1} = \frac{C_{R0} \cdot \dot{V}_0 + C_{R4} \cdot \dot{V}_0 \cdot \mathbf{R}}{\dot{V}_0 \cdot (1 + \mathbf{R})} = \frac{C_{R0} + C_{R4} \cdot \mathbf{R}}{(1 + \mathbf{R})} \quad (2.4)$$

$$C_{S1} = \frac{C_{S0} \cdot \dot{V}_0 + C_{S4} \cdot \dot{V}_0 \cdot \mathbf{R}}{\dot{V}_0 \cdot (1 + \mathbf{R})} = \frac{C_{S0} + C_{S4} \cdot \mathbf{R}}{(1 + \mathbf{R})} \quad (2.5)$$

Auch die Konzentrationen der Produkte lassen sich über eine Bilanzierung bestimmen. Die Gleichungen fallen simpler aus, da keine Produkte am Feed zugeführt werden.

$$C_{PR1} = \frac{\dot{V}_0 \cdot \mathbf{R} \cdot C_{PR4}}{\dot{V}_0 \cdot (1 + \mathbf{R})} = \frac{\mathbf{R} \cdot C_{PR4}}{(1 + \mathbf{R})} \quad (2.6)$$

$$C_{PS1} = \frac{\dot{V}_0 \cdot \mathbf{R} \cdot C_{PS4}}{\dot{V}_0 \cdot (1 + \mathbf{R})} = \frac{\mathbf{R} \cdot C_{PS4}}{(1 + \mathbf{R})} \quad (2.7)$$

Am Knoten K_2 ändern sich die Konzentrationen nicht. Der Volumenstrom teilt sich analog zu Gleichung 2.3 wieder in $\dot{V}_0$ und $\dot{V}_R$ auf.

*Aufgrund der geringen Viskosität (und dem damit geringen Druckabfall in der Anlage) sowie den geringen Konzentrationen ist dies eine akzeptable Vereinfachung.

Im nächsten Schritt werden Bilanzräume um die einzelnen Reaktoren gelegt. Die allgemeine Vorgehensweise zur Bilanzierung ist dabei folgende:

$$C_{i(Ausgang)} = C_{i(Eingang)} \pm C_{i(Reaktion)}. \quad (2.8)$$

Da bei geringen Konzentrationen gearbeitet wird, kann, wie bereits oben erwähnt, für die enzymatische kinetische Racematspaltung eine Reaktion erster Ordnung angenommen werden. Die Bestimmung der Konzentrationen am Ausgang des Reaktors erfolgt dann über:

$$C_{R2} = C_{R1} \cdot \exp\left(-k_R \cdot \frac{V_{KR}}{\dot{V}_0 \cdot (1 + \mathbf{R})}\right) \quad (2.9)$$

$$C_{S2} = C_{S1} \cdot \exp\left(-k_R \cdot \frac{V_{KR}}{E \cdot \dot{V}_0 \cdot (1 + \mathbf{R})}\right) \quad (2.10)$$

$$C_{PR2} = C_{PR1} + C_{R1} - C_{R2} \quad (2.11)$$

$$C_{PS2} = C_{PS1} + C_{S1} - C_{S2}. \quad (2.12)$$

Im Racemisierungsreaktor tritt lediglich eine Änderung der Substratkonzentrationen auf, wobei die Summe der Substratkonzentrationen für R und S konstant bleibt:

$$C_{R2} + C_{S2} = C_{R3} + C_{S3}. \quad (2.13)$$

Die Änderungen der Substratkonzentrationen werden beschrieben durch:

$$C_{R3} = \left(\frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}\right) + \left(\frac{C_{R2} - C_{S2}}{2}\right) \cdot \exp\left(-2 \cdot k_{rac} \cdot \frac{V_{rac}}{\dot{V}_0 \cdot \mathbf{R}}\right) \quad (2.14)$$

$$C_{S3} = \left(\frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}\right) + \left(\frac{C_{S2} - C_{R2}}{2}\right) \cdot \exp\left(-2 \cdot k_{rac} \cdot \frac{V_{rac}}{\dot{V}_0 \cdot \mathbf{R}}\right), \quad (2.15)$$

wobei k_{rac} die Geschwindigkeitskonstante der Racemisierung ist*. Die Abnahme der Substratkonzentrationen durch die Nebenreaktionen kann, wie später experimentell bestätigt wurde, ebenfalls über eine Kinetik erster Ordnung beschrieben

*Die Herleitungen für die Gleichungen 2.14 und 2.15 können im Anhang A.1 auf Seite 145 nachgelesen werden.

werden. Die Nebenreaktionen wurden dabei in zwei unterschiedliche Reaktionen aufgeteilt. Zum einen in eine nicht enantioselektive Veresterung, was die Produkt- und Substratkonzentration verändert, und in eine generelle Nebenreaktion, die nur die Substratkonzentration beeinflusst. Die Änderung der Substratkonzentration wird dann beschrieben über:

$$C_{R4} = C_{R3} \cdot \exp \left(-(k_N + k_{ver}) \cdot \frac{V_{rac}}{\dot{V}_0 \cdot \mathbf{R}} \right) \quad (2.16)$$

$$C_{S4} = C_{S3} \cdot \exp \left(-(k_N + k_{ver}) \cdot \frac{V_{rac}}{\dot{V}_0 \cdot \mathbf{R}} \right), \quad (2.17)$$

wobei k_{ver} für die nicht selektive Veresterung steht und k_N für die generellen Nebenreaktionen. Die Beschreibung der Produktkonzentration erfolgt durch:

$$C_{PR4} = C_{PR2} + \frac{(C_{R3} + C_{S3})}{2} \cdot \left(1 - \exp \left(-k_{ver} \cdot \frac{V_{rac}}{\dot{V}_0 \cdot \mathbf{R}} \right) \right) \quad (2.18)$$

$$C_{PS4} = C_{PS2} + \frac{(C_{R3} + C_{S3})}{2} \cdot \left(1 - \exp \left(-k_{ver} \cdot \frac{V_{rac}}{\dot{V}_0 \cdot \mathbf{R}} \right) \right). \quad (2.19)$$

Da nun alle relevanten Konzentrationen im System definiert sind, lässt sich die Ausbeute bestimmen über:

$$A = \frac{C_{PS2} + C_{PR2}}{C_{R0} + C_{S0}}. \quad (2.20)$$

Der Umsatz lässt sich berechnen über:

$$U = \frac{\frac{C_{(R0)} - C_{R2}}{C_{(R0)}} + \frac{C_{(S0)} - C_{S2}}{C_{(S0)}}}{2} = \frac{C_{R0} - C_{R2} + C_{S0} - C_{S2}}{C_{S0} + C_{R0}}. \quad (2.21)$$

Die Enantiomerenüberschüsse für das Produkt und das Substrat sind gegeben durch:

$$ee_P = \frac{C_{PR2} - C_{PS2}}{C_{PR2} + C_{PS2}} \quad (2.22)$$

$$ee_S = \frac{C_{R2} - C_{S2}}{C_{R2} + C_{S2}}. \quad (2.23)$$

Diese Gleichungen können nun in speziellen Programmen verwendet werden, um das Reaktorsystem zu simulieren. In dieser Arbeit wurde zum einen die Simulation über LabView realisiert, da dieses Programm eine anschauliche grafische Oberfläche

bietet. Zum anderen wurde die Simulation in der speziell auf Simulationen ausgelegten Software *gProms* durchgeführt. Die Ergebnisse beider Simulationen waren identisch.

2.1.4 Validierung der Simulation

Um nun die Gültigkeit des Modells zu untersuchen, wurden die Simulationsergebnisse mit Literaturwerten verglichen. Dies war jedoch nur begrenzt möglich. Es existiert nur wenig Literatur zu kontinuierlich durchgeführten DKR und diese wurden ausschließlich im PFR durchgeführt.^[67, 68, 69] Das in dieser Arbeit verwendete Reaktorsystem zeigt jedoch bei hohen Rezyklierungsgeschwindigkeiten $\mathbf{R}$ ein Verhalten wie ein CSTR,^[38] so dass die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind. Ebenso sind in kaum einer Veröffentlichung die benötigten Parameter (wie z. B. E-Wert oder Geschwindigkeitskonstanten) vermerkt, um eine Simulation zu ermöglichen. Ein weiteres Problem stellt die Vergleichbarkeit von Batch-Reaktionen mit kontinuierlichen Reaktionen dar. Wie bereits aus einschlägiger Literatur bekannt,^[38] ist das Verhalten von Batch-Reaktoren eher mit dem Verhalten eines Strömungsrohres zu vergleichen als mit dem eines CSTR. Analog dazu konnten Heijnen und Mitarbeiter^[70] zeigen, dass für eine kinetische Racematspaltung die Änderung des Enantiomerenüberschusses des Substrates mit dem Umsatz in einem CSTR von einem Batchversuch abweicht.

Die Validierung des Systems durch Literaturdaten musste somit für einzelne Punkte separat erfolgen. Zunächst wurde die Simulation ohne die Racemisierung für unterschiedliche Verweilzeiten bei hohen Rezyklierungsgeschwindigkeiten ($\mathbf{R} = 10^6$) durchgeführt, um das Verhalten eines CSTR zu erhalten. Die Simulationsergebnisse wurden mit den experimentellen und simulierten Werten von Rakels *et al.*^[70] für einen CSTR verglichen. Die Werte von Rakels *et al.* für die Änderung des Enantiomerenüberschusses des Substrates mit dem Umsatz (für einen definierten E-Wert) entsprachen im Rahmen der Ablesegenauigkeit den eigenen simulierten Ergebnissen (Abbildung 2.4), so dass die Beschreibung der kinetischen Racematspaltung korrekt ist. Auch konnte dadurch die Beschreibung der Rezyklierung in weiten Teilen bestätigt werden.

Für eine vollständige DKR waren lediglich ausreichend Daten aus Batchversu-

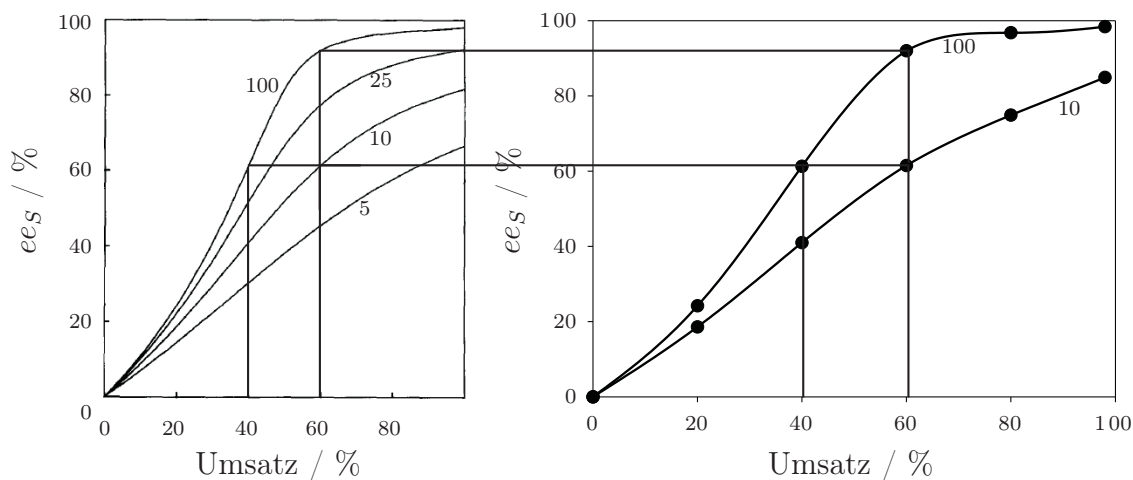
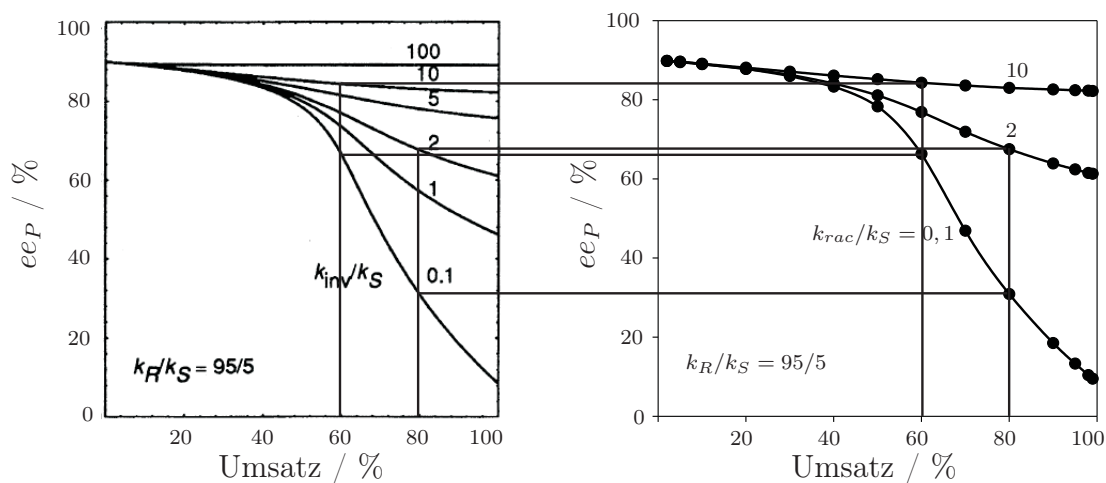


Abbildung 2.4: Vergleich der Lösung von Rakels *et al.*^[70] für eine kinetische Racematspaltung in einem CSTR (links) mit der eigenen Simulation für einen Schlaufenreaktor (rechts). Grafik links: Copyright (1994) with permission from Elsevier.

chen zugänglich. Wie bereits erwähnt, lässt sich das Verhalten eines Batchversuches weitestgehend mit einem Versuch im PFR und nicht in einem CSTR vergleichen. Um nun die Beschreibung der Racemisierung zu validieren, wurde die unter Kapitel 2.1.3 aufgestellte Simulation für die Beschreibung eines Strömungsrohres angepasst und die dadurch erzielten Simulationsergebnisse mit den Ergebnissen von Noyori *et al.*^[61, 64] und von Indlekofer *et al.*^[71] verglichen. Die eigenen Ergebnisse waren erneut konform mit den Literaturwerten (siehe Abbildung 2.5 am Beispiel von Noyori), so dass auch die Beschreibung der Racemisierung im System bestätigt wurde.

2.1.5 Simulation einer kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung im Schlaufenreaktor

Die Simulation wurde zunächst ohne das Auftreten von Nebenreaktionen durchgeführt (sowohl für die Racemisierung als auch für die kinetische Racematspaltung ist die Chemoselektivität $S=1$), so dass $U = A$ ist. Dadurch war es möglich den Einfluss der Rezyklierungsgeschwindigkeit $\mathbf{R}$ auf den Umsatz und den Enantiomerenüberschuss zu bestimmen. Dabei ist zu erkennen, dass mit steigender Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_R bei konstantem E-Wert die Ausbeute der Reaktion



Abbildungung 2.5: Vergleich der Lösung von Noyori *et al.*^[61] für eine dynamisch kinetische Racematspaltung im Batchreaktor (links) mit der eigenen Simulation für einen Kaskadenreaktor (rechts).

steigt, dass sich jedoch der Enantiomerenüberschuss des Produktes verringert (Abbildung 2.6(a)). Durch ein Erhöhen von **R** kann sowohl die Ausbeute als auch der ee-Wert des Produktes gesteigert werden. Aus Abbildung 2.6(b) wird deutlich, dass die Erhöhung der Geschwindigkeit der Racemisierung sowohl zu einer Verbesserung der Ausbeute als auch des ee-Wertes führt. Auch ist in dieser Grafik zu erkennen, dass möglichst hohe **R**-Werte benötigt werden. Ebenso zeigt sich in diesen Grafiken deutlich das Potential des Reaktorsystems. Bei ausreichend hohen Reaktionsgeschwindigkeiten sowohl für die kinetische Racematspaltung als auch für die Racemisierung können für hohe **R**-Werte bereits bei einem E-Wert von 200 hohe Ausbeuten ($A > 97\%$) mit ebenfalls sehr hohen Enantiomerenüberschüssen des Produktes ($ee_p > 98\%$) erzielt werden.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten können entweder direkt über die Wahl des Katalysators bzw. des Enzyms oder über deren Menge variiert werden. Eine Vergrößerung der einzelnen Reaktorvolumina und damit der Verweilzeiten τ hat den gleichen Effekt (vgl. Gleichung 2.9 und 2.10 sowie Gleichung 2.14 und 2.15).

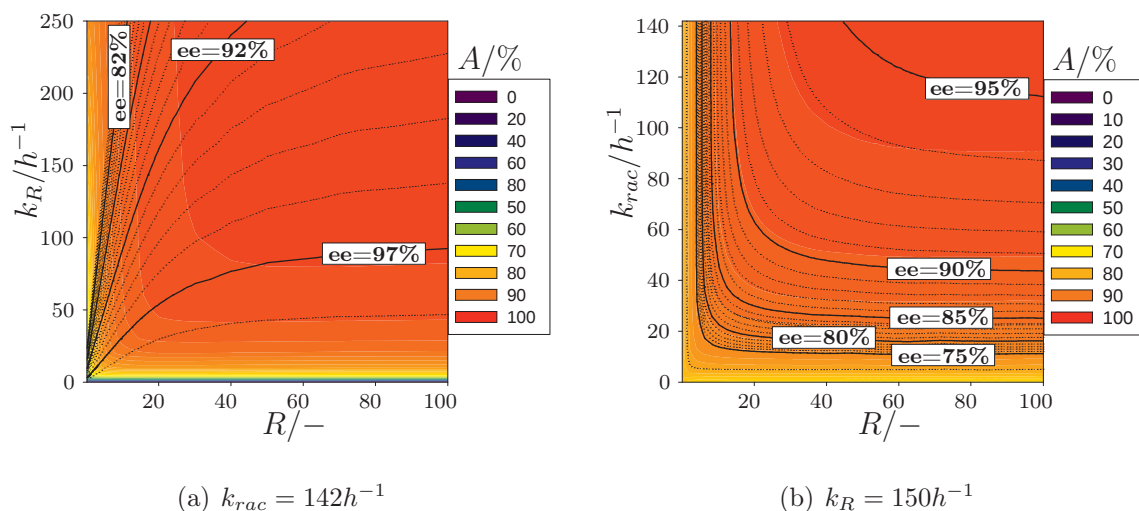


Abbildung 2.6: Simulation der Abhängigkeit der Ausbeute und des Produkt ee von den Reaktionsgeschwindigkeiten und von $\mathbf{R}$. Die Farben beschreiben den Umsatz, die Linien sind Isolinien mit gleichem Produkt ee. Sonstige Bedingungen: $E = 200$; $\dot{V}_0 = 10 \frac{mL}{h}$; $V_{KR} = 10mL$; $V_{rac} = 1,6mL$.

2.1.6 Vergleich von Schlaufenreaktor und Strömungsrohr

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, wurde die Simulation auf die Anwendbarkeit auf ein PFR ausgeweitet, um einen Vergleich zwischen den beiden grundlegend verschiedenen Konzepten zu erhalten. Aus der Literatur ist bekannt, dass ein Schlaufenreaktor für hohe $\mathbf{R}$ -Werte einem CSTR entspricht.^[38] Aus den Arbeiten von Rakels *et al.*^[70] ist bekannt, dass das Verhalten eines PFR mit dem Verhalten eines Batchversuches vergleichbar ist. Für eine klassische, kinetische Racematspaltung konnten sie zeigen, dass das Verhalten eines CSTR im Vergleich zum Batchversuch (und damit auch zum PFR) bezogen auf die Enantioselektivität des verbleibenden Substrates schlechter ist. Ein solches Verhalten wurde an dieser Stelle für eine kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung simuliert.

Die Ergebnisse in Abbildung 2.7 A zeigen für kleine Racemisierungsgeschwindigkeiten, dass bei gegebener Enantioselektivität des Produktes die erreichbaren Ausbeuten in einem PFR stets höher oder gleich denen in einem Schlaufenreaktor sind. Dieses Verhalten ist umso stärker, je kleiner der E-Wert des Enzyms ist. Für sehr hohe E-Werte ist über weite Bereiche kein Unterschied zu erkennen. Abbildung B vergleicht den Einfluss der Racemisierungsgeschwindigkeit. Es ist deutlich zu erken-

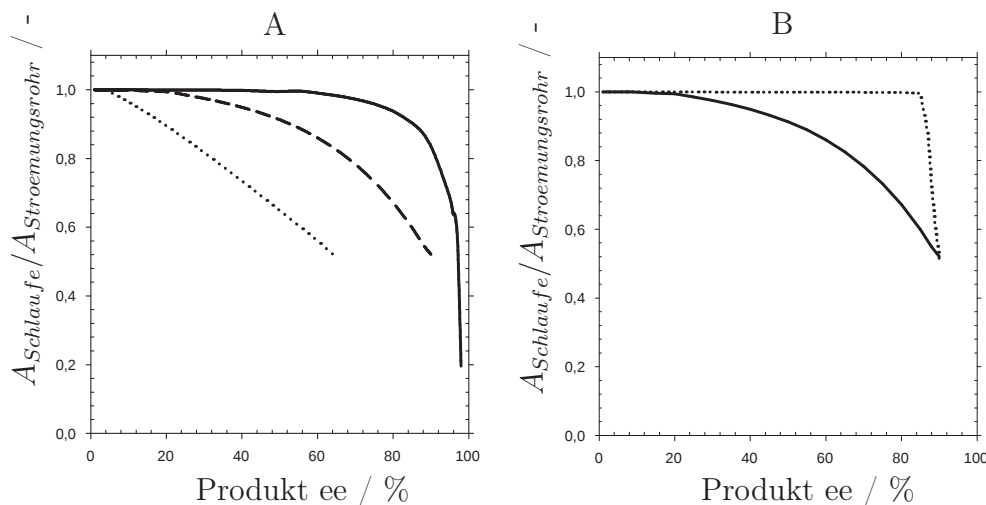


Abbildung 2.7: Verhältnis der Ausbeuten in einem Schlaufenreaktor zu einem Strömungsrohr als eine Funktion des Produkt ee . A: Für verschiedene E -Werte bei $k_{rac}/k_R = 0,01$; durchgezogene Linie $E=100$, gestrichelte Linie: $E=20$, gepunktete Linie $E=5$. B: Für verschiedene Racemisierungsgeschwindigkeiten bei $E = 20$; durchgezogene Linie: $k_{rac}/k_R = 0,01$; gepunktete Linie: $k_{rac}/k_R = 1$.

nen, dass bei einem Verhältnis von $\frac{k_{rac}}{k_R} = 0,01$ der Unterschied in den Ausbeuten sehr groß ist. Wird jedoch die Racemisierungsgeschwindigkeit auf ein Verhältnis von 1 erhöht, so ist zu erkennen, dass die Ausbeuten nahezu identisch sind. Erst wenn der ee maximal wird (begrenzt durch den E -Wert), ist ein Unterschied erkennbar.

Dies bedeutet, dass die Durchführung von DKR mit kleinen E -Werten und langsamen Racemisierungsgeschwindigkeiten in einem PFR vorteilhafter sind. Der Unterschied im Verhalten der beiden Reaktortypen für eine DKR mit hohen E -Werten und schnellen Racemisierungen ist jedoch vernachlässigbar. Der Schlaufenreaktor hat im Vergleich zum Strömungsrohr den Vorteil, dass beide Reaktionen getrennt unter optimalen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden können. Somit ist ein Schlaufenreaktor universeller einsetzbar als ein Strömungsrohr, da wesentlich mehr unterschiedliche Katalysatoren verwendet und somit ebenfalls mehr verschiedene Reaktionen realisiert werden können.

2.1.7 Zusammenfassung

Es konnte eine Simulation entwickelt werden, welche den Gesamtprozess sehr gut beschreibt. Die Gültigkeit der aufgestellten Gleichungen sowie Teile des Gesamtprozesses konnten durch einen Vergleich mit Literaturwerten in weiten Teilen bestätigt werden. Der Vergleich eines Schlaufenreaktors mit einem Strömungsrohr zeigte, dass der Schlaufenreaktor in vielen Bereichen bei gleichem ee nur unwesentlich geringere Ausbeuten erzielt. Unter Beachtung der reaktionstechnischen Vorteile eines Schlaufenreaktors ist dieses Konzept gegenüber dem Strömungsrohr zu bevorzugen.

Die weiteren Simulationen konnten für Chemoselektivitäten von $S=1$ zeigen, dass der in dieser Arbeit verwendete Prozess eines Schlaufenreaktors bereits bei einem E -Wert von 200 sehr hohe Ausbeuten ($A > 97\%$) bei ebenso sehr hohen Enantioselektivitäten ($ee_p > 98\%$) ermöglicht. Voraussetzung dafür sind hohe Geschwindigkeitskonstanten für beide Reaktionen und eine hohe Umlaufgeschwindigkeit **R**.

In den bisher durchgeführten Simulationen wurde stets von Racemisierungskatalysatoren ausgegangen, die keine Nebenreaktionen begünstigen. Da aber viele dieser Katalysatoren keine 100%ige Chemoselektivität zeigen, wurden im folgenden Kapitel aus der Literatur bekannte Katalysatoren ausgesucht und hinsichtlich ihrer Selektivität untersucht. Die dabei erhaltenen Werte wurden für weitere Simulationen von kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltungen verwendet.

2.2 Untersuchungen zur Racemisierung

2.2.1 Stand der Technik

Thermodynamisch ist die Racemisierung ein begünstigter Prozess, da die Mischung der Enantiomere eine höhere Entropie besitzt.^[12] Aus kinetischen Gründen aber werden häufig, abhängig von der zu racemisierenden Komponente, relativ harsche Bedingungen benötigt. Dazu gehören z. B. hohe Temperaturen oder extreme pH-Werte. Somit können viele Methoden der Racemisierung in der dynamisch kinetischen Racematspaltung nicht zum Einsatz kommen, da unter solchen Bedingungen Enzyme vielfach nicht eingesetzt werden können. Auch in der hier vorgestellten reaktionstechnischen Idee der getrennten Reaktionsräume kann die Racemisierung durch die Zersetzung der Edukte schnell zum ökonomischen und ökologischen „Flaschenhals“ werden.

Die Wahl der Racemisierungsmethode hängt naturgemäß stark von der chemischen Reaktivität der zu racemisierenden Substanz ab. Ebbers *et al.*^[72] haben eine Klassifizierung verschiedener Techniken vorgeschlagen, die hier kurz vorgestellt werden soll und im Hinblick auf ihre Anwendungsmöglichkeit für den speziellen Fall sekundärer Alkohole diskutiert werden.

Racemisierung über Schiff'sche Basen: Diese Racemisierungsmethode ist nur zugänglich für freie primäre Aminogruppen am chiralen Zentrum.

Nucleophile Substitution: Diese ist aus der Literatur nur für Halogenide und Nitrile bekannt. Diese Methode benötigt einen Substituenten am chiralen Zentrum, das sowohl eine gute Austrittsgruppe als auch ein starkes Nukleophil ist. Somit ist diese Methode für diese Arbeit nicht relevant.

Photochemisch: Die photochemische Racemisierung findet in der Literatur nur für spezielle Verbindungen Anwendung (z. B. Cyclopropan Derivate oder Allene).

Racemisierung ohne Reaktion am chiralen Zentrum: Diese Art der Racemisierung besteht darin, dass eine der funktionellen Gruppen am chiralen Zentrum so reagiert, dass sich ein achirales Produkt bildet. Befindet sich z. B. eine Carbonsäure- und eine Estergruppe am chiralen Zentrum, so kann die

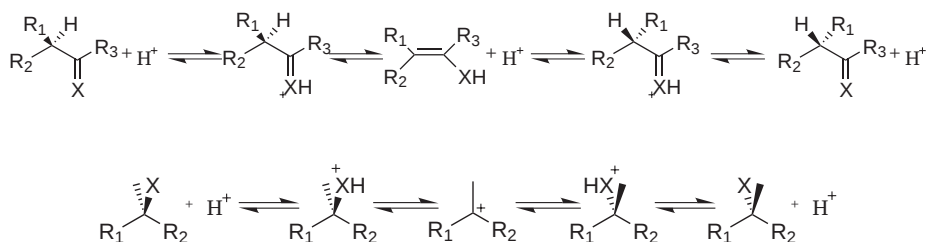
Carbonsäure verestert werden, so dass sich zwei gleiche Estergruppen am nun achiralen Zentrum befinden. Nach erneuter, nicht stereochemisch kontrollierter Herstellung der ursprünglichen funktionellen Gruppen entsteht ein Racemat des Ausgangsmaterials. Somit ist diese sehr spezielle Methode für die hier eingesetzten Substrate nicht möglich, da sich keine der Gruppen in eine andere überführen lässt.

Enzymkatalysiert: Als Racemasen werden Enzyme bezeichnet, die eine Racemisierung katalysieren. Diese so genannten Racemasen benötigen häufig Kofaktoren und sind in ihrem Prozessfenster sehr eingeschränkt. Die möglichen Substrate für die Racemasen haben gemeinsam, dass sie ein Proton am chiralen Zentrum besitzen und dass das chirale Zentrum benachbart zu einer elektronenziehenden Gruppe steht. Fast alle bekannten Beispiele bestehen aus Aminosäuren, α -Hydroxycarbonsäuren und verwandten Strukturen.

Thermische Racemisierung: Die thermische Racemisierung ist auf viele Substanzen anwendbar und industriell attraktiv, da sie eine einfache Methode darstellt. Grundsätzlich ist das Hauptproblem dieser Methode jedoch die mögliche Zersetzung der Substrate. Darüber hinaus kann in der vorliegenden Aufgabenstellung nicht jede beliebige Temperatur (unabhängig von der Zersetzungstemperatur) aufgebracht werden, da die Dichte der scF-Phase und somit auch die Löslichkeiten der Reaktanden stark von der Temperatur abhängig sind.

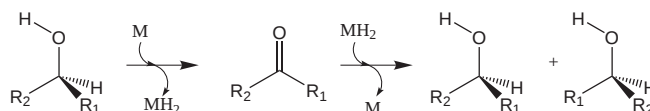
Basenkatalysiert: Anwendbar für Substanzen, die an ihrem chiralen Zentrum ein acides Proton tragen (z. B. in α -Position zu einer elektronenziehenden Gruppe, wie beispielsweise einem Keton). Für diese Substanzen ist die basenkatalysierte Racemisierung meist die Methode der Wahl (vgl. auch ^[12]).

Säurekatalysiert: Die sauer katalysierte Racemisierung wird vielfach angewendet für Verbindungen die eine Keto-Enol-Tautomerie eingehen können (Schema 2.2 oben). Sie ist aber auch anwendbar auf Verbindungen, die am chiralen Zentrum einen Substituenten besitzen, der nach einer Protonierung eine gute Abgangsgruppe bildet (Schema 2.2 unten). Die reversible Bildung eines planaren Carbeniumions führt zur Racemisierung. Das Carbeniumion sollte dabei durch weitere funktionelle Gruppen im Molekül stabilisiert sein, um dadurch Nebenreaktionen zu vermeiden.



Schema 2.2: Säurekatalysierte Racemisierung.

Redox: Diese Methode beruht hauptsächlich auf der reversiblen Abspaltung und Anlagerung von Wasserstoff (Schema 2.3). Diese Methode wird für sekundäre Alkohole häufig angewendet.



Schema 2.3: Redox Racemisierung.

Somit sind für den in dieser Arbeit verwendeten Prozess generell zwei Racemisierungsmethoden von Interesse, die säurekatalysierte Variante und die Redox Racemisierung. Letztere wird auch als „reversible Wasserstoffübertragungsreaktion“ bezeichnet und ist der typische Reaktionsweg für Übergangsmetall katalysierte Racemisierungen.^[73] Der Stand der Technik für die Racemisierung mit Übergangsmetall-Katalysatoren für die DKR von sekundären Alkoholen ist im Übersichtsartikel von Ahn *et al.* wiedergegeben.^[73] Im Folgenden werden die wichtigsten Katalysatoren kurz erläutert und ihre Anwendbarkeit für diese Arbeit diskutiert.

Das mit Abstand am meisten verwendete Übergangsmetall für die Racemisierung ist Ruthenium, es gibt aber auch Arbeiten zu Palladium, Rhodium, Iridium oder Vanadium und dem Metall Aluminium. In den Pionierarbeiten zur DKR durch Kombination von Enzymen und Metallkatalysatoren verwendeten Williams und Mitarbeiter Palladium für die Racemisierung von Allylacetaten^[17] und Aluminium-, Iridium- oder Rhodiumkomplexe für die Racemisierung von sekundären Alkoholen.^[74] Palladium wird auch heute fast ausschließlich für die Racemisierung von Allylestern* und

*Die Racemisierung läuft in diesem Fall über eine reversible Umwandlung zwischen einem η^1 - und einem η^3 - Palladium Komplex.

Aminen, nicht aber von sekundären Alkoholen verwendet. Von den getesteten Racemisierungskatalysatoren für die DKR von sekundären Alkoholen zeigten lediglich die Rhodiumkatalysatoren $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ und $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$ annehmbare Aktivitäten.^[73] Der Einsatz von KOH und stöchiometrische Mengen an Keton sind für diese Katalysatoren nötig. Die erzielten Umsätze für die DKR sind moderat. Neuere Arbeiten zu dem Einsatz von Rhodium Katalysatoren auf diesem Gebiet zeigten gute Ergebnisse unter Verwendung eines Katalysators des Typs **12** ($\text{M}=\text{Rh}$, Ir und $\text{X}=\text{F}$ oder $\text{M}=\text{Ir}$ und $\text{X}=\text{H}$) ohne den Einsatz einer Base oder eines Ketons.^[75] Viele der entsprechenden Rhodiumkomplexe lassen sich auch mit Iridium herstellen. Diese zeigen jedoch im Vergleich zu den Rhodiumanalogen meist schlechtere Aktivitäten.^[76]

Wie bereits erwähnt finden Rutheniumbasierte Katalysatoren die breiteste Anwendung zur Racemisierung. Die wichtigsten dieser Katalysatoren sind in Abbildung 2.8 von **5** bis **11** dargestellt. Der Shvo-Katalysator **5** wurde von Bäckvall und Mitarbeitern für die DKR eingeführt und brachte den Durchbruch für die chemoenzymatische DKR.^[77] Das Besondere dieses Katalysators ist, dass er keine zusätzliche Base benötigt und dass er ein breites Substratspektrum akzeptiert. Nachteile sind allerdings die benötigten hohen Temperaturen (80°C) sowie die zwingende Zugabe des aus dem Alkohol zu bildenden Ketons, um eine ausreichende Reaktionsgeschwindigkeit zu erzielen. Ebenso können keine Vinylverbindungen als Acylierungsreagenz eingesetzt werden,^[73] da die gebildeten Aldehyde ebenfalls von **5** als Substrat akzeptiert werden.

Der Katalysator **6** wird durch KOH oder 5 mol% O_2 aktiviert. Zu viel Sauerstoff führt zur Desaktivierung. Insgesamt sind die Aktivitäten relativ niedrig, so konnte nach 5 h keine vollständige Racemisierung erreicht werden.^[78] Der Katalysator **7** erwies sich als stabil gegenüber molekularem Sauerstoff und Wasser. Eine solche Stabilität macht ihn prinzipiell interessant für kontinuierliche Anwendungen. Die Aktivierung des Katalysators erfolgt beispielsweise durch Et_3N ^[79] oder andere komplexierende Amine^[80]. Die Aktivitäten sind jedoch auch für diesen Katalysatortyp niedrig. So werden für eine vollständige Racemisierung 5 h benötigt, für eine vollständige DKR sogar 2 – 3 Tage.

2002 wurde von Park und Mitarbeitern ein Katalysator **10** entwickelt, der bereits

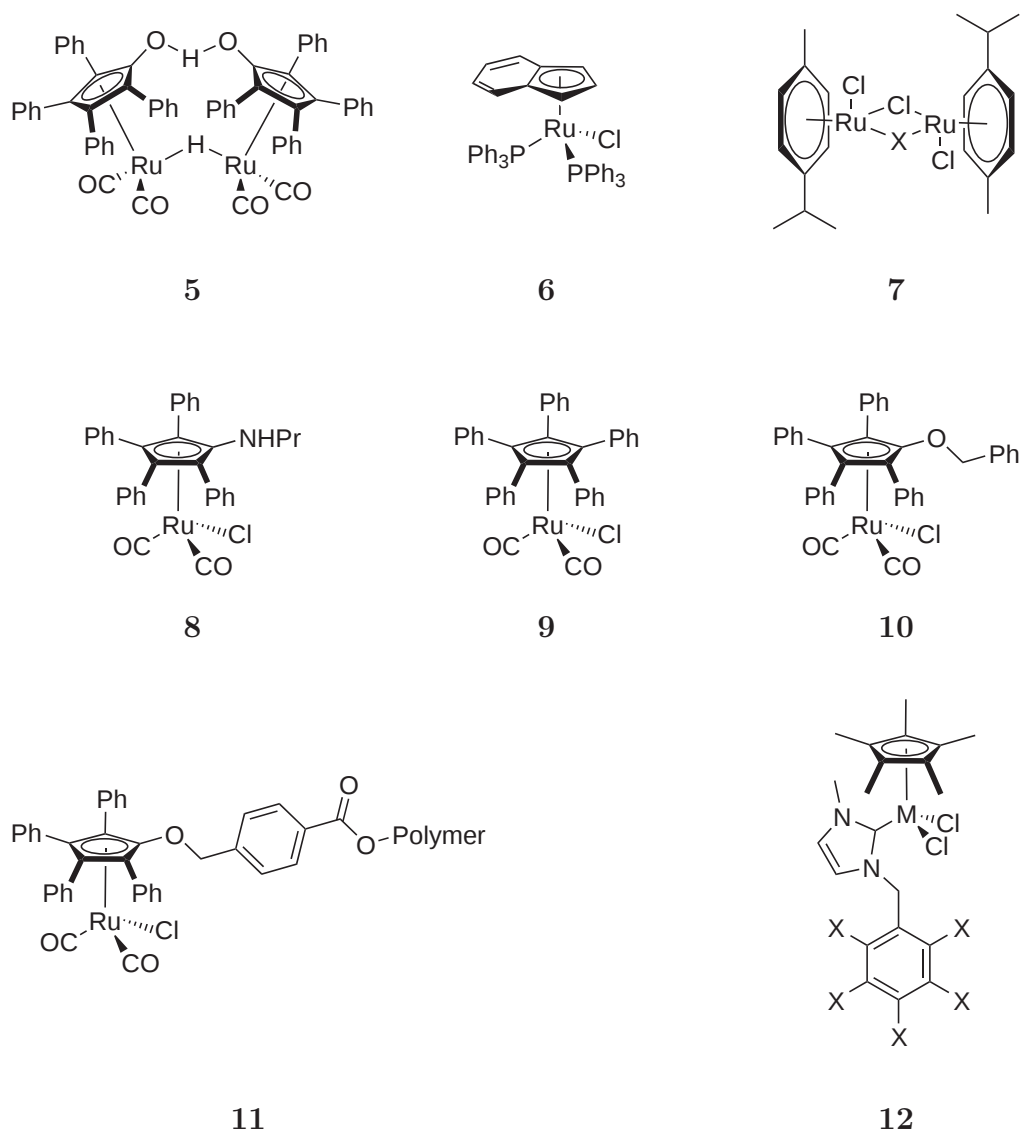


Abbildung 2.8: Aus der Literatur bekannte Katalysatoren zur Racemisierung in einer dynamisch kinetischen Racematspaltung.

bei Raumtemperatur eine sehr hohe Aktivität zeigt.^[81] Die Aktivierung erfolgt über ein Butanolat und es wird kein zusätzliches Keton als Wasserstoffakzeptor benötigt. Für den Einsatz in CO₂ ist dieser Katalysator jedoch aufgrund seiner Aminogruppe ungeeignet. Bäckvall und Mitarbeiter berichten über einen ähnlichen Katalysator **9**, der diese Gruppe nicht benötigt und dennoch bereits bei RT eine sehr hohe Aktivität aufweist. Die Aktivierung erfolgt analog über ein Butanolat und es wird kein Keton benötigt. Strukturell und auch in den Eigenschaften sehr ähnlich sind Katalysator **10** und dessen immobilisierte Variante **11**, die ebenfalls hohe Aktivitäten zeigen und stabil gegenüber molekularem Sauerstoff sind. Die Aktivierung erfolgt über K₃PO₄. Aus den Arbeiten von Bäckvall *et al.*^[82] ist zumindest für den Katalysator **9** bekannt, dass bei Raumtemperatur kein Keton gebildet wird. Es ist jedoch anzunehmen, dass bei erhöhten Temperaturen die Bildung von Ketonen signifikant zunehmen wird.

Die zweite interessante Methode zur Racemisierung im Rahmen dieser Arbeit ist die Säurekatalyse über den in Schema 2.2 (unten) dargestellten Mechanismus. Zur Säurekatalyse können viele verschiedene Säuren als Katalysator verwendet werden. Aus reaktionstechnischer Sicht sind aber insbesondere heterogene Katalysatoren interessant. Beispielsweise entwickelten Wuyts *et al.*^[83, 84] eine erfolgreiche DKR mit Zeoliten in einem Zweiphasensystem. Die Verwendung eines Zweiphasensystems aus Wasser und organischem Lösungsmittel war nötig, um unerwünschte Nebenreaktionen des Carbeniumions zu unterdrücken. Dadurch war jedoch nur die Verwendung bestimmter löslicher Substrate möglich. Im Jahr 2005 zeigten Bornscheuer und Mitarbeiter die Verwendung vom sauren Ionentauscher Amberlyst 15* zur DKR von Acyloinen in rein organischem Lösungsmittel. Das Problem der Bildung von unerwünschten Nebenprodukten lösten sie durch eine optimierte Reaktionsführung. Ebenso haben Lozano *et al.*^[68] mit Benzylsulfonsäuren modifizierte Silicapartikel für eine DKR von Phenylethanol in überkritischem CO₂ erfolgreich eingesetzt.

Der heterogene Katalysator Vanadiumoxidsulfat (VOSO₄*xH₂O), der 2007 erstmals erfolgreich von Wuyts *et al.* zur DKR in einer rein organischen Phase eingesetzt wurde,^[85] funktioniert nach dem gleichen Mechanismus. Wuyts *et al.* konnten zeigen, dass der Reaktionsweg ebenfalls über ein Carbeniumion läuft, dass die Bildung von Nebenprodukten in rein organischer Phase jedoch wesentlich geringer ausfällt.

*Amberlyst 15 besteht aus einer Polystyrolmatrix mit Sulfonsäuregruppen.

Sie konnten ebenfalls zeigen, dass es sich dabei um eine rein heterogene Katalyse handelt, was aus reaktionstechnischer Sicht sehr wichtig ist.

2.2.2 Zielsetzung

Von den oben beschriebenen Katalysatoren lassen sich aus reaktionstechnischen Gründen vor allem die festen Säuren für kontinuierliche Reaktionen verwenden. Diese sollten auf ihre Anwendbarkeit zur Racemisierung in einer dynamisch kinetischen Racematspaltung untersucht werden. Dabei war die Ermittlung der Selektivität und die Überprüfung der möglichen Einsetzbarkeit über die im Kapitel 2.1 aufgestellte Simulation von besonderem Interesse.

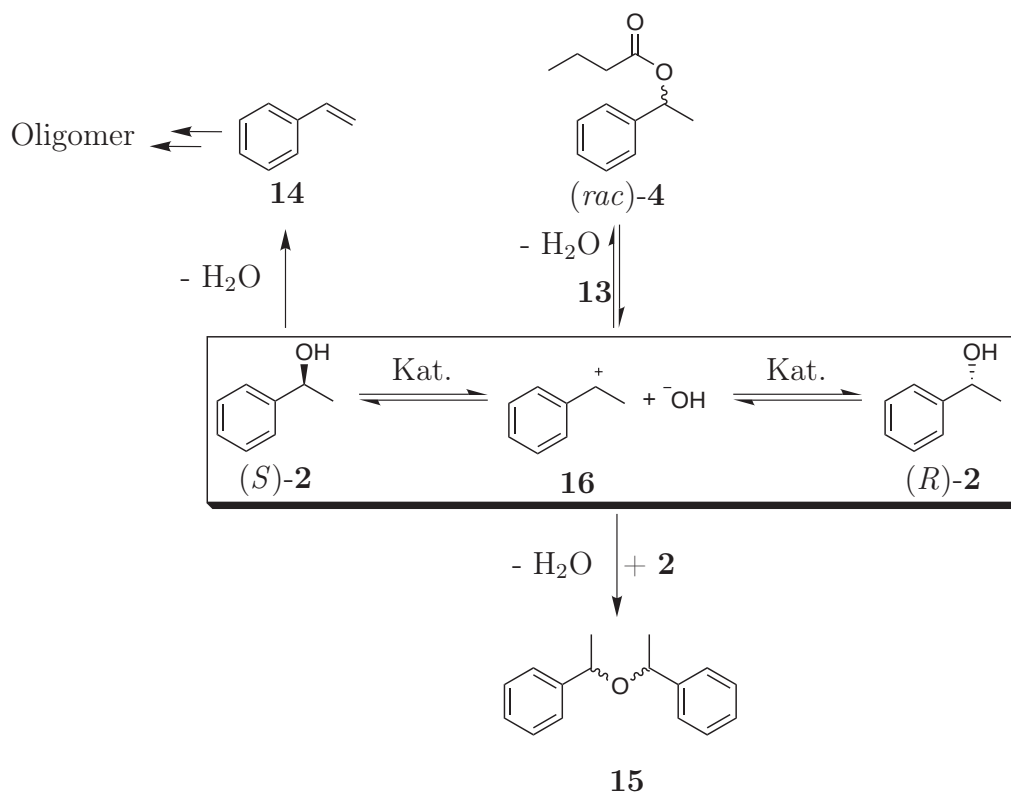
2.2.3 Dowex-Marathon MSC als Racemisierungskatalysator

2.2.3.1 Charakterisierung

Mit Blick auf die spätere Reaktionsführung wurden aus reaktionstechnischen Gründen heterogene Katalysatoren untersucht. In den ersten Versuchen wurde der Katalysator Dowex-Marathon MSC als Katalysator für die Racemisierung von Phenylethanol **2** näher charakterisiert. Dieser Katalysator besteht, ebenso wie Amberlyst 15, aus einer Polystyrolmatrix, welche mit Sulfonsäuregruppen (RSO_3H) modifiziert ist.

Für die Charakterisierung wurde zu dem Katalysator die Reaktionslösung, bestehend aus $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (*S*)-1-Phenylethanol (*S*)-**2** und $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vinylbutyrat **13** in Heptan, gegeben. Diese Lösung wurde unter ständigem Rühren aufgeheizt und in regelmäßigen Abständen wurden Proben genommen und analysiert. Die Zugabe von **13** erfolgte, um beurteilen zu können, ob der Katalysator neben der Racemisierung auch die Veresterungsreaktion beschleunigt. Das Schema 2.4 veranschaulicht im Kasten die gewünschte Racemisierungsreaktion. Desweiteren sind in diesem Schema auch die Veresterungsreaktion zu (*rac*)-**4** sowie weitere mögliche Nebenreaktionen dargestellt.

Der Racemisierungsversuch in Abbildung 2.9(a) zeigt, dass Phenylethanol **2** durch die Verwendung vom Dowex-Katalysator bereits bei 40°C in rein organischem Lösungsmittel racemisiert werden kann. Allerdings ist ebenso zu erkennen, dass die



Schema 2.4: Schema zur Racemisierung von $(S)\text{-}2$ und Bildung möglicher Nebenprodukte.

Reaktion nicht sehr selektiv verläuft. Über die Auftragung in Abbildung 2.9(b) können die Geschwindigkeitskonstanten für die Racemisierung, die Abnahme der Substratkonzentration und die Bildung des Esters bestimmt werden (zur Beschreibung der Racemisierung siehe Kapitel A.2). Die Halbierung des ee-Wertes erfolgt unter diesen Bedingungen in 21 min. Die Halbwertszeit für die Abnahme der Phenylethanolkonzentration **2** durch Nebenreaktionen (in der Grafik bezeichnet als Selektivität) beträgt 40 min. Auch der Umsatz zum Ester **4** durch den Dowex-Katalysator beträgt nach 60 min bereits ca. 2,5 %. Genauere Analysen (Massenspektroskopie) der entstehenden Produkte bestätigten die Bildung von Styrol **14** und Di- α -phenylethylether **15** (Abbildung 2.4).

Um den Einfluss der Temperatur auf die Selektivität zu betrachten, also dem Verhältnis zwischen Racemisierungsgeschwindigkeit und Abnahme der Substratkonzentration durch Nebenreaktionen, wurden weitere Versuche bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. In Abbildung 2.10 ist zu erkennen, dass die Racemisierungs-

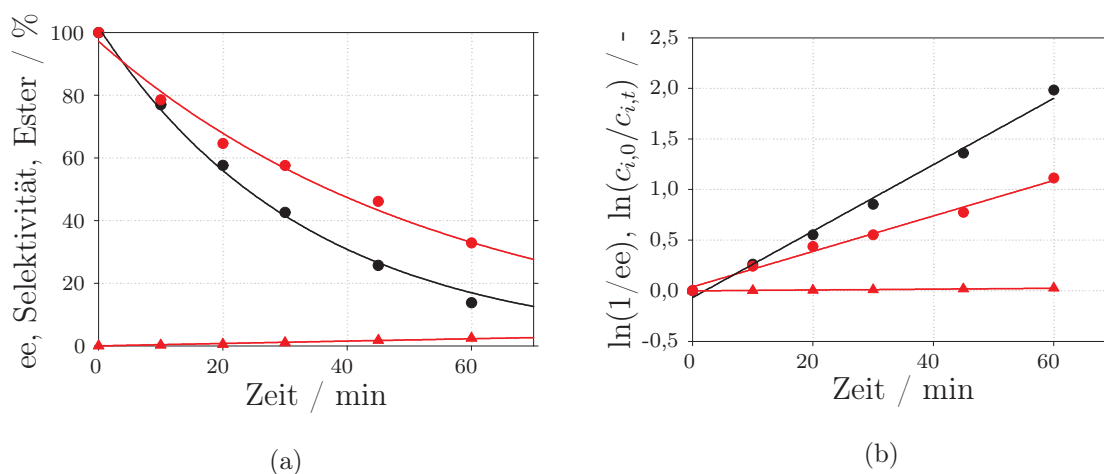


Abbildung 2.9: (a) Reaktionsverlauf für die Racemisierung von **2** mit dem Dowex-Katalysator bei 40 °C und Anwesenheit von **13**; ● Änderung des ee, ● Änderung der Substratkonzentration $c_{\text{Substrat},t}/c_{\text{Substrat},0} \cdot 100\%$ (Selektivität), ▲ Bildung von Ester **4**. (b) Auftragung zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten; ● Für die Racemisierung, ● für die Abnahme der Substratkonzentration insgesamt, ▲ für die Veresterung.

geschwindigkeit wie zu erwarten mit der Temperatur zunimmt, allerdings die Selektivität der Reaktion stark abnimmt. Da ein wesentlicher Bestandteil der Nebenreaktionen die Bildung von Styrol ist (Schema 2.4), war dieses Verhalten zu erwarten, da

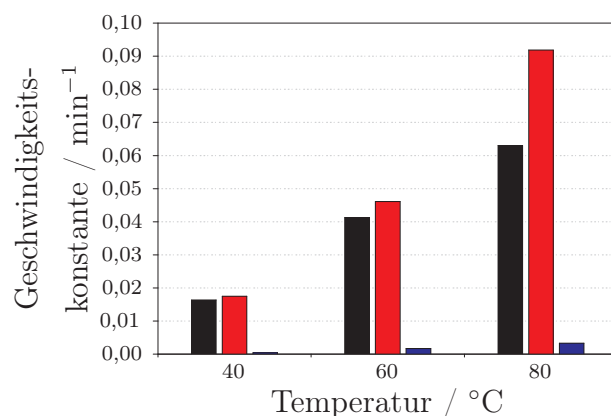


Abbildung 2.10: Anfangs-Geschwindigkeitskonstanten für die Racemisierung mit Dowex bei verschiedenen Temperaturen. Schwarz: Racemisierung, Rot: Nebenreaktionen, Blau: Veresterung.

die Eliminierungsreaktion relativ zu einer S_N1 Reaktion immer durch höhere Temperaturen begünstigt wird. Da die besten Ergebnisse für diesen Katalysator bei 40 °C erzielt werden konnten, wurden diese Ergebnisse u. a. für die folgende Simulation in Kapitel 2.2.3.2 verwendet. Wesentlich tiefere Temperaturen sind in einer späteren Anwendung in $scCO_2$ aufgrund dessen kritischen Punktes nicht möglich.

2.2.3.2 Simulation des Einflusses des Katalysators auf eine kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung

In Kapitel 2.1.5 wurde gezeigt, dass ein Schlaufenreaktor unter idealen Bedingungen für eine kontinuierliche DKR sowohl hohe Umsätze als auch hohe Enantiomerenüberschüsse erlaubt. Der Dowex-Katalysator zeigt jedoch kein ideales Verhalten sondern katalysiert verschiedene Nebenreaktionen. Diese Nebenreaktionen können sowohl den ee des Produktes als auch den Umsatz und die Ausbeute beeinflussen. Aus diesem Grund wurde der kontinuierliche Prozess mit den Selektivitäten des Dowex-Katalysators bei 40 °C simuliert, um zu beurteilen, ob ein Einsatz dieses Katalysators den gewünschten Erfolg verspricht.

Dazu wurden die zuvor ermittelten Werte für die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten (Racemisierung, unselektive Veresterung und Bildung von Nebenprodukten) verwendet. Das bedeutet, dass bei einer Variation der Racemisierungsgeschwindigkeit die beiden unerwünschten Reaktionen ebenso variiert wurden, um das Verhältnis der Geschwindigkeiten konstant zu halten. In Abbildung 2.11 sind die simulierten Ergebnisse für zwei unterschiedliche Enzymselektivitäten grafisch dargestellt. In beiden Fällen ist deutlich zu erkennen, dass eine Erhöhung der Racemisierungsgeschwindigkeit (und damit ebenfalls der unerwünschten Nebenreaktionen) zwar zu der gewünschten Steigerung des Umsatzes führt, dass jedoch der Prozess deutlich an Selektivität verliert. Eine Erhöhung des Rezyklisierungsverhältnisses führt bei kleinen **R**-Werten zunächst zu einer Verschlechterung der Selektivität, durchläuft ein Minimum und stellt sich bei hohen **R**-Werten dann auf einen festen Wert ein. Für die Ausbeute bedeutet dies, dass sich hohe Umlaufgeschwindigkeiten positiv auf den Prozess auswirken, dass ab einem **R**-Wert von ca. 50 jedoch keine weitere Verbesserung in der Ausbeute zu erkennen ist. Der Einfluss der Reaktionsgeschwindigkeit der Racemisierung auf die Ausbeute ist komplexer. So ist für beide Fälle zu erkennen, dass die Ausbeute mit der Racemisierungsgeschwindigkeit

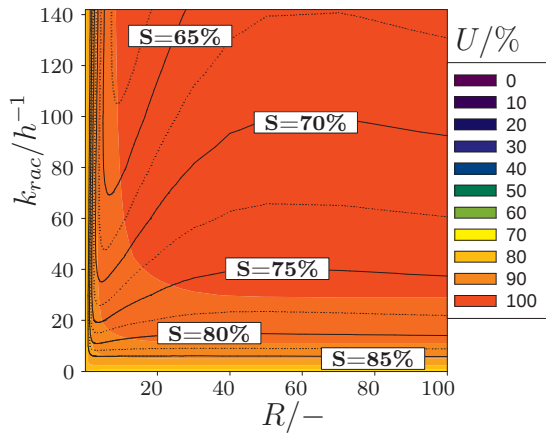
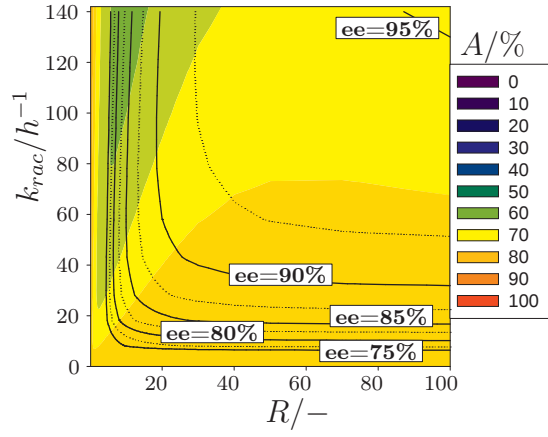
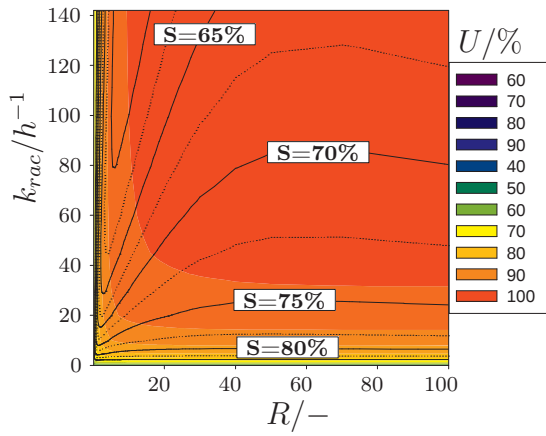
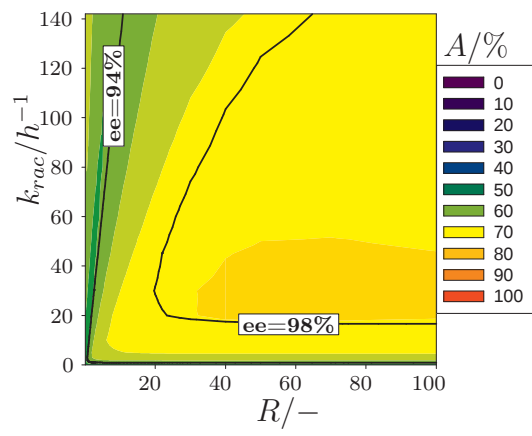
(a) $E = 200$ (b) $E = 200$ (c) $E = 3500$ (d) $E = 3500$

Abbildung 2.11: (a), (c): Simulation der Abhängigkeit des Umsatzes U und der Selektivität S von der Racemisierungsgeschwindigkeit und von R . (b), (d): Simulation der Abhängigkeit der Ausbeute A und des Produktes ee von der Racemisierungsgeschwindigkeit und von R . Sonstige Bedingungen: $\frac{k_{rac}}{k_{NR}} = 0,986$; $\frac{k_{rac}}{k_{ver}} = 33,023$; $\dot{V}_0 = 10 \frac{mL}{h}$; $V_{KR} = 10 mL$; $V_{rac} = 1,6 mL$; $k_R = 150 h^{-1}$.

ein Maximum durchläuft. Der Enantiomerenüberschuss hingegen steigt in sämtlichen simulierten Bereichen mit der Reaktionsgeschwindigkeit des Racemisierungskatalysators an (Abbildung 2.11(b)). In der Simulation zu Abbildung D hingegen wirken sich zu hohe Geschwindigkeiten wieder negativ aus. Eine Erhöhung von **R** hat in beiden Fällen einen positiven Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss.

Insgesamt kann somit gesagt werden, dass die genaue Einstellung und Kenntnis sowohl der Reaktionsgeschwindigkeit der Racemisierung als auch des Umlaufverhältnisses enorm wichtig sind, um am Optimum des Prozesses arbeiten zu können. Die Ergebnisse, die durch den Einsatz des Dowex-Katalysators maximal erzielt werden können, sind jedoch unbefriedigend. Der Grund für eine erfolgreiche Anwendung von Säurekatalysatoren in den Arbeiten von Bornscheuer^[86] liegt in der Reaktionsführung, da der Racemisierungskatalysator erst zu einem späteren Zeitpunkt hinzugefügt wurde. In den Arbeiten von Lozano^[68] wird beschrieben, dass durch die Verwendung von ionischen Flüssigkeiten die Selektivität des Säurekatalysators erhöht werden kann und so der Einsatz für DKR ermöglicht wird. Allerdings wird dabei nur auf die Veresterung durch den Racemisierungskatalysator eingegangen, nicht aber auf sonstige Nebenreaktionen. Es ist aber aufgrund der Ergebnisse anzunehmen, dass Nebenreaktionen signifikant auftreten. Auch die Verwendung stark verdünnter Lösungen (50 mM Phenylethanol in Hexan plus Verdünnung durch den CO₂-Strom) für die kontinuierlichen Reaktionen wird vermutlich durch die auftretenden Nebenreaktionen begründet sein.

2.2.4 VOSO₄ als Racemisierungskatalysator

2.2.4.1 Charakterisierung

Aufgrund der nicht ausreichenden Selektivität des Dowex-Katalysators wurde im nächsten Schritt der ebenfalls heterogen einsetzbare Katalysator Vanadiumoxidsulfat VOSO₄ getestet.^[85] Dabei zeigen die Ergebnisse (Abbildung 2.12), dass bei 80 °C die Racemisierung von **2** katalysiert wird, die Bildung von Nebenprodukten im Vergleich zum Dowex-Katalysator aber um das 7-fache langsamer ist. So halbiert sich unter den gegebenen Bedingungen der ee-Wert innerhalb von ca. 1,6 min während sich die Substratkonzentration erst in 16 min halbiert hat. Ebenso tritt die uner-

wünschte Veresterung in einem deutlich geringerem Umfang auf, so dass auch hier eine Verbesserung um den Faktor fünf erfolgt.

Auffällig bei den Ergebnissen ist, dass die Racemisierung im Vergleich zu den Arbeiten von Wuyts *et al.*^[85] nicht durch eine Induktionsperiode gekennzeichnet ist, sondern die Racemisierung von Beginn an über eine reversible Kinetik erster Ordnung beschrieben werden kann (siehe Kapitel A.2). Wuyts *et al.* begründen die Induktion mit der benötigten Desorption vom Oberflächenwasser.

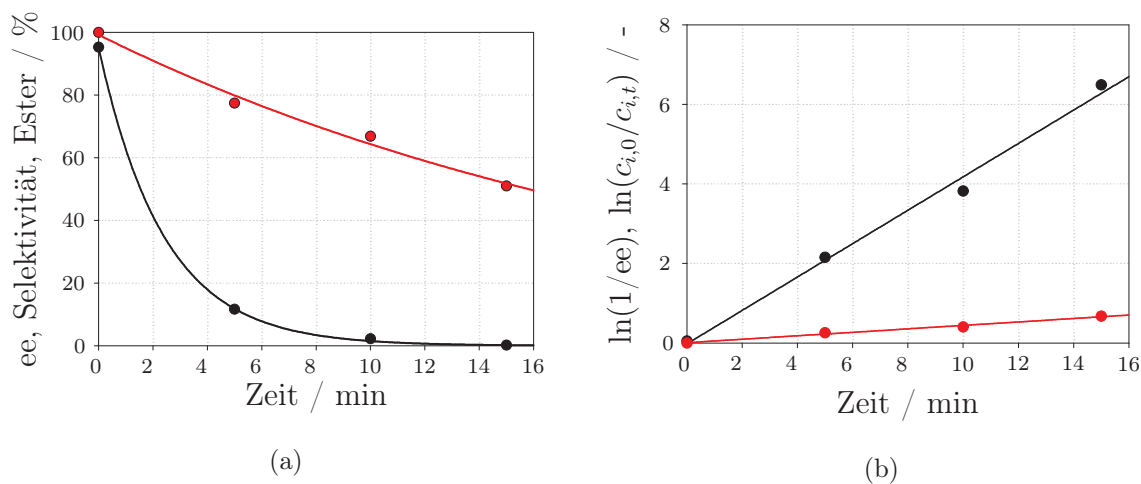


Abbildung 2.12: (a) Reaktionsverlauf für die Racemisierung von **2** mit VOSO_4 bei 80°C und Anwesenheit von **13**; ● Änderung des ee, ● Änderung der Substratkonzentration $c_{\text{Substrat},t}/c_{\text{Substrat},0} \cdot 100\%$ (Selektivität). (b) Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten; ● Für die Racemisierung, ● für die Abnahme der Substratkonzentration insgesamt.

2.2.4.2 Simulation des Einflusses des Katalysators auf eine kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung

Da die Selektivität des VOSO_4 deutlich besser ist als die des Dowex-Katalysators wurden die erhaltenen Werte erneut für die Simulation verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.13 dargestellt. Das Verhalten des Systems gegenüber einer Änderung der Racemisierungsgeschwindigkeit (und damit ebenso der Nebenreaktionen) sowie gegenüber einer Veränderung der Umlaufgeschwindigkeit ist ähnlich der Simulation mit dem Dowex-Katalysator, allerdings auf einem wesentlich höherem

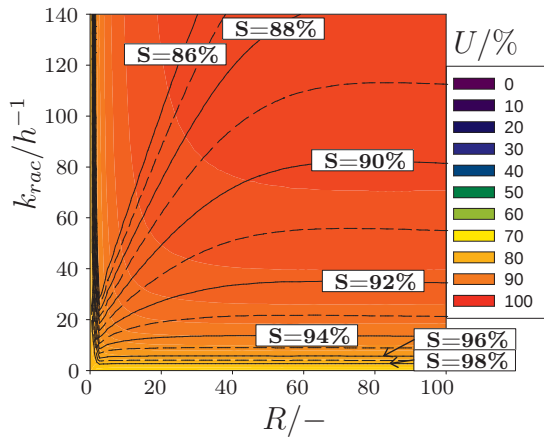
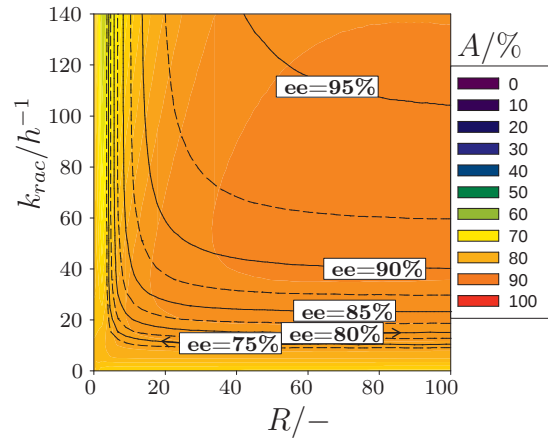
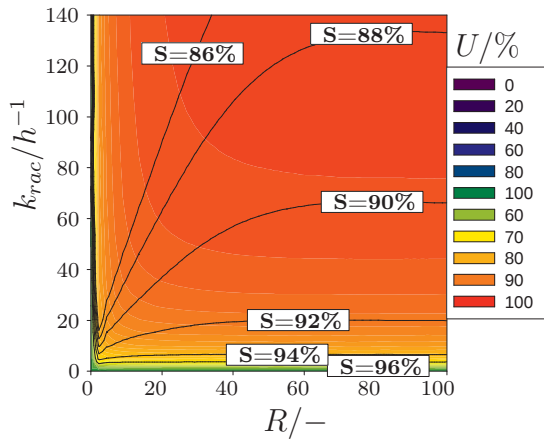
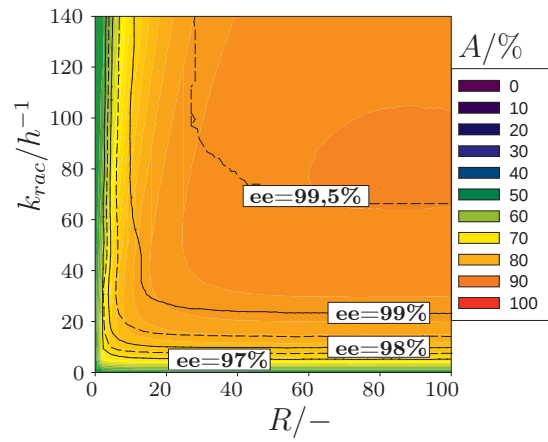
(a) $E = 200$ (b) $E = 200$ (c) $E = 3500$ (d) $E = 3500$

Abbildung 2.13: A, C: Simulation der Abhängigkeit des Umsatzes U und der Selektivität S von der Racemisierungsgeschwindigkeit und von $\mathbf{R}$. B, D: Simulation der Abhängigkeit der Ausbeute A und des Produkt ee von der Racemisierungsgeschwindigkeit und von $\mathbf{R}$. Sonstige Bedingungen: $\frac{k_{rac}}{k_{NR}} = 4,836$; $\frac{k_{rac}}{k_{ver}} = 700$; $\dot{V}_0 = 10 \frac{mL}{h}$; $V_{KR} = 10mL$; $V_{rac} = 1,6mL$; $k_R = 150h^{-1}$.

Niveau. So können bereits bei den hier simulierten Werten Ausbeuten von bis zu 85 % bei ebenfalls sehr hohen Enantioselektivitäten erreicht werden. Allerdings ist auch für diesen Fall zu erkennen, dass es eine optimale Racemisierungsgeschwindigkeit gibt, an der die Ausbeute maximal wird (Abbildung 2.13(b) und 2.13(d)).

Eine Steigerung des Umlaufverhältnisses **R** führt auch hier zu einer Verbesserung des Umsatzes und der Enantioselektivität. Die Chemoselektivität nimmt bei sehr kleinen **R**-Werten zunächst ab, da in diesem Bereich der Einfluss der Nebenreaktionen sehr groß ist. Zu höheren **R**-Werten steigt die Selektivität dann wieder an bis sie einen konstanten Wert erreicht.

Da die simulierten Ergebnisse den Anforderungen für die Durchführung einer kontinuierlichen DKR genügen und die Aktivität des Katalysators erfolgreich in einem Batchversuch mit überkritischem Kohlenstoffdioxid getestet wurde, konnte dieser Katalysator anschließend für die kontinuierlichen Versuche genutzt werden.

2.2.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zur Verwendung des Dowex-Marathon MSC als Racemisierungskatalysator haben gezeigt, dass die Racemisierung von (*S*)-1-Phenylethanol (*S*)-**2** bereits bei 40 °C katalysiert wird. Jedoch ist die Selektivität dieses Katalysators nicht sehr hoch, so dass in Kombination mit den Simulationen gezeigt werden konnte, dass der Einsatz dieses Katalysators für eine kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung nicht sinnvoll ist.

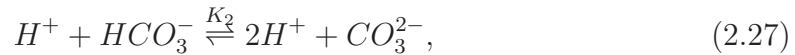
Der ebenfalls heterogen einsetzbare Katalysator VOSO₄ zeigte hingegen bei einer guten Aktivität eine ausreichende Selektivität. So konnte gezeigt werden, dass bereits bei einem E-Wert von 200 für die kinetische Racematspaltung ee-Werte des Produktes von 95 % und mehr bei Ausbeuten größer 85 % erreicht werden können. Bei einem E-Wert von 3500 können bei ähnlichen Ausbeuten sogar ee-Werte des Produktes von größer 99 % erreicht werden. Somit konnte dieser Katalysator für die kontinuierlichen Versuche verwendet werden.

2.3 pH-Kontrolle im Zweiphasensystem Wasser/CO₂

2.3.1 Einleitung und Stand der Technik

Der pH-Wert ist für alle in wässriger Phase durchgeführten chemischen Reaktionen von Bedeutung. Insbesondere enzymkatalysierte Reaktionen benötigen die genaue Einstellung und Kontrolle des pH-Wertes, da der pH generell die Protonierung verschiedener funktioneller Gruppen bestimmt.^[87] Die Protonierung bestimmt wiederum unter anderem die Aktivität eines Enzyms^[88] und kann ebenfalls dessen Stabilität entscheidend beeinflussen.

Dies erschwert den Einsatz von Kohlenstoffdioxid in Kombination mit Wasser zur enzymatischen Katalyse, da durch die Bildung von Kohlensäure (Abbildung 2.14) und deren Dissoziation der pH-Wert der Wasserphase auf ca. 3 abgesenkt wird:^[89]



mit $K_B \approx 3,26 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$

$K_1 = 1,32 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$

$K_2 = 4,69 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Die Löslichkeit von CO₂ in Wasser (Gleichung 2.24) ist nicht proportional zum

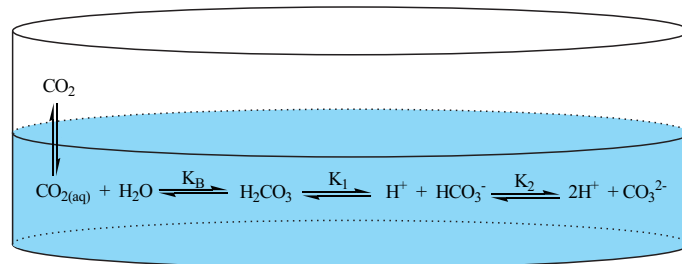


Abbildung 2.14: Die Bildung von Kohlensäure im System Wasser - Kohlenstoffdioxid.

Partialdruck des CO₂.

Um nun dennoch dieses Zweiphasensystem nutzen zu können muss zum einen der pH-Wert der Wasserphase bekannt sein, zum anderen muss eine Möglichkeit gegeben sein, die den pH-Wert kontrolliert verändert. Erste grundlegende Arbeiten zu diesem Problem wurden schon in den dreißiger Jahren von Wiebe und Gaddy^[36, 35] durchgeführt, die die Löslichkeit von CO₂ im Wasser untersuchten. Über zusätzliche Arbeiten zu den Dissoziationskonstanten^[90, 91] konnte so der pH-Wert bei verschiedenen Bedingungen (Drücke bis 200 bar) berechnet werden.^[92] Erste Messungen des pH-Wertes unter Druck wurden von Toewes *et al.*^[92] durchgeführt. Dazu wurden die Farbänderungen verschiedener pH-Indikatoren spektroskopisch gemessen und ausgewertet.

Um nun den pH-Wert zu variieren wurden in vielen Publikationen spezielle Puffer eingesetzt, obwohl bereits im Jahr 1998 und 1999 Holmes und Mitarbeiter gezeigt haben, dass die einfachste Möglichkeit zur pH-Änderung in der Verschiebung der Gleichgewichte (Gleichungen 2.26 und 2.27) durch Zugabe von Bicarbonaten liegt.^[93, 94] Ebenso wurde die pH-Wert Änderung durch Zugabe verschiedener Puffer für Mikroemulsionen über mehrere Bilanzierungen modelliert.

2.3.2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten Enzyme zur kinetischen Racematspaltung eingesetzt werden. Da nicht alle Enzyme als Lyophilisat oder als weitestgehend wasserfreies Immobilisat verwendet werden können, sollte die Entwicklung eines Zweiphasensystems mit Wasser als reaktiver Phase und CO₂ als nicht reaktiver Phase voran getrieben werden. Enzymaktivitäten und -stabilitäten sind stark vom pH-Wert abhängig und die Kombination von Wasser mit CO₂ führt zur Bildung von Kohlensäure. Deshalb sollte untersucht werden, ob es möglich ist, den pH-Wert in diesem System (Wasser/scCO₂) zu kontrollieren und diesen auch für gegebene Bedingungen theoretisch zu beschreiben. Danach sollte eine Möglichkeit entwickelt werden, den pH-Wert unter hohen Drücken ohne die Zugabe von Indikatoren genau bestimmen zu können. Anschließend sollte die theoretische Beschreibung durch experimentelle Befunde belegt werden.

2.3.3 Theoretische Beschreibung der Änderung des pH-Wertes

Die Gleichungen 2.24 bis 2.27 zeigen, dass der pH-Wert von der Konzentration an Kohlensäure in der Wasserphase abhängt. Deren Konzentration hängt wiederum ab vom gelösten CO₂, welches eine Funktion der Temperatur und des CO₂ Partialdrucks ist. Somit ist die Konzentration der Kohlensäure bei gegebenem Druck und gegebener Temperatur konstant.

Die erste Dissoziationskonstante ist mit $1,32 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ mehr als 6 Zehnerpotenzen größer als die Zweite, so dass in einer guten Näherung Letztere für die Beschreibung des pH-Wertes vernachlässigt werden kann. Da die Kohlensäurekonzentration eine direkte Funktion der Temperatur und des Partialdrucks ist, kann die Bildung von Protonen und damit der pH-Wert lediglich über die Dissoziation, also über die Konzentration an Bicarbonat verändert werden:^[94, 95, 93]

$$[H^+] = \frac{K_1 \cdot [H_2CO_3]}{a(HCO_3^-)}. \quad (2.28)$$

Anhand dieser Gleichung ist zu erkennen, dass ein Anstieg der Bicarbonatkonzentration bei konstanter Kohlensäurekonzentration zu einer Senkung der Protonenkonzentration und damit zu einer pH-Erhöhung führt. Um nun die Änderung des pH-Wertes durch die Zugabe von Bicarbonaten zu beschreiben, muss die Abhängigkeit der Säurekonstante K_1 und der HCO₃⁻-Konzentration von der Ionenstärke der Lösung beachtet werden. Die Ionenstärke kann beschrieben werden durch:

$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum (c_i \cdot z_i^2), \quad (2.29)$$

worin c_i die Konzentration und z_i die Ladung der ionischen Spezies ist. Die erste Dissoziationskonstante ist des Weiteren abhängig von der Ladung der konjugierten Säureart z_a . Die resultierende Säurekonstante kann beschrieben werden durch:^[96]

$$-\log(K'_1) = pK'_1 = pK_1 + (2z_a - 1) \cdot \left[\frac{A\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,1 \cdot I \right] \quad (2.30)$$

und

$$K'_1 = 10^{-pK'_1}, \quad (2.31)$$

mit pK'_1 als der modifizierte pK_1 -Wert und A als der Debye-Hückel-Parameter von ungefähr 0,5 (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Debye-Hückel-Parameter bei verschiedenen Temperaturen.^[96]

Temperatur	A
°C	-
0	0,4918
10	0,4989
20	0,5070
25	0,5114
30	0,5161
37	0,5321
40	0,5262
50	0,5373
60	0,5494
70	0,5625
80	0,5767
90	0,5920
100	0,6086

Die Aktivität der Bicarbonationen kann beschrieben werden durch:

$$a(\text{HCO}_3^-) = f(\text{HCO}_3^-) \cdot c(\text{HCO}_3^-), \quad (2.32)$$

wobei der Aktivitätskoeffizient f definiert ist als:

$$\log(f) = -0,5 \cdot \frac{z_i^2 \cdot \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}. \quad (2.33)$$

Durch Entlogarithmieren und Einsetzen in Gleichung 2.32 ergibt sich für a :

$$a(\text{HCO}_3^-) = 10^{\left(-0,5 \cdot \frac{z_i^2 \cdot \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}\right)} \cdot c(\text{HCO}_3^-). \quad (2.34)$$

Durch Einsetzen der entlogarithmierten Gleichung 2.30 (über 2.31) sowie der Gleichung 2.34 in Gleichung 2.28 ergibt sich:

$$c(\text{H}^+) = \frac{10^{\left(-pK_1 - (2 \cdot z_a - 1) \cdot \left[A \cdot \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,1 \cdot I\right]\right)}}{10^{\left(-0,5 \cdot z_i^2 \cdot \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}\right)}} \cdot \frac{c(\text{H}_2\text{CO}_3)}{c(\text{HCO}_3^-)}. \quad (2.35)$$

Hier ist $z_a = 0,5$ und $z_i = 1$. Durch Zusammenziehen des ersten Bruchs ergibt sich:

$$c(H^+) = 10^{\left(-pK_1 + A \cdot \frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0,1 \cdot I + 0,5 \cdot \frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}}\right)} \cdot \frac{c(H_2CO_3)}{c(HCO_3^-)}. \quad (2.36)$$

Durch Zusammenfassen und Logarithmieren ergibt sich:

$$\begin{aligned} \log c(H^+) &= \left(-pK_1 + (A + 0,5) \cdot \frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0,1 \cdot I\right) \\ &\quad + \log c(H_2CO_3) - \log c(HCO_3^-). \end{aligned} \quad (2.37)$$

Da die Konzentration an Kohlensäure lediglich abhängig ist von der Temperatur und dem Partialdruck an CO₂ (die Änderung der Gaslöslichkeit von CO₂ im Wasser durch Zugabe von Salzen kann vernachlässigt werden), kann diese aus den pH-Messungen von reinem Wasser berechnet werden:

$$K_1 = \frac{c(H^+)_{ungepuffert} \cdot c(HCO_3^-)_{ungepuffert}}{c(H_2CO_3)} \quad (2.38)$$

$$\Leftrightarrow c(H_2CO_3) = \frac{c(H^+)_{ungepuffert} \cdot c(HCO_3^-)_{ungepuffert}}{K_1}. \quad (2.39)$$

Der tiefgestellte Zusatz „ungepuffert“ beschreibt die jeweiligen Konzentrationen im Wasser, die bei einem bestimmten Druck und einer bestimmten Temperatur entstehen, wenn kein Hydrogencarbonat oder eine andere Base bzw. Puffer dazugegeben wird. Da die Konzentrationen an Hydrogencarbonat und Protonen in diesem Fall äquivalent sind, kann geschrieben werden:

$$c(H_2CO_3) = \frac{c(H^+)_{ungepuffert}^2}{K_1}. \quad (2.40)$$

daraus folgt wiederum:

$$\log(c(H_2CO_3)) = \log \frac{c(H^+)_{ungepuffert}^2}{K_1} \quad (2.41)$$

$$= \log c(H^+)_{ungepuffert}^2 - \log K_1 \quad (2.42)$$

$$= 2 \cdot \log c(H^+)_{ungepuffert} - \log K_1. \quad (2.43)$$

Dies kann geschrieben werden als:

$$\log(c(H_2CO_3)) = -2 \cdot pH_{ungepuffert} + pK_1. \quad (2.44)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 2.44 in Gleichung 2.37 folgt:

$$\begin{aligned} pH &= -\log c(H^+) \\ &= -((-pK_1 + (A + 0,5) \cdot \frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0,1 \cdot I) + (-2 \cdot pH_{ungepuffert} + pK_1) \\ &\quad - \log c(HCO_3^-)). \end{aligned} \quad (2.45)$$

Somit lässt sich der resultierende pH-Wert als eine Funktion des ungepufferten pH, der anfänglichen Konzentration an Bicarbonat $c(HCO_3^-)_{zugegeben}$ und I beschreiben:

$$pH = 2 \cdot pH_{ungepuffert} + \log c(HCO_3^-) - \left(A + \frac{1}{2}\right) \cdot \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} + 0,1 \cdot I. \quad (2.46)$$

In dieser Gleichung sowie in sämtlichen vorangegangenen Gleichungen ist $c(HCO_3^-)$ die durch die Einwaage an Hydrogencarbonat eingestellte Konzentration.

Da der Logarithmus von 0 nicht definiert ist, und es sich bei dieser Gleichung um eine Näherung handelt, muss der Gültigkeitsbereich für die Hydrogencarbonatkonzentration eingeschränkt werden. Als sinnvolle Grenzen haben sich ergeben: $0,003 \text{ M} < c(HCO_3^-) < \text{Löslichkeitsgrenze des Salzes}$.

2.3.4 pH-Wert Messungen

Um nun den pH-Wert unter hohem Druck direkt zu bestimmen gibt es verschiedene Ansätze. Holmes *et al.*^[94, 95] und Toews *et al.*^[93] setzten dabei auf die Verwendung von pH-Indikatoren und deren Absorptionsänderung im UV-VIS Bereich. Indikatoren zur pH-Bestimmung ändern ihre Farbe kontinuierlich bei Änderung des pH-Wertes. Durch Messen der Absorptionsmaxima der beiden Farben kann aus deren Verhältnis der pH über eine Kalibriergerade bestimmt werden. pH-Indikatoren wurde in ersten orientierenden Versuchen auch in dieser Arbeit verwendet (Abbildung 2.15). Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass der pH-Wert durch den Einsatz von Hydrogencarbonat über einen weiten Bereich variiert werden kann und der resultierende pH-Wert von dem anfänglichen pH-Wert abhängt.

Diese Methode kann allerdings nicht für kontinuierliche, inline oder *in situ* pH-Messungen unter Hochdruck eingesetzt werden, da der Einsatz von pH-Indikatoren unvermeidbar ist. Ebenso kann der pH-Wert bereits durch den Einsatz der Indikatoren verfälscht werden, auch wenn diese in nur sehr geringen Konzentrationen

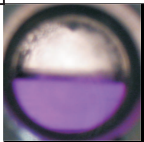
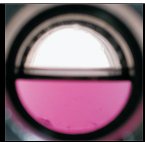
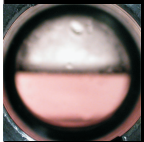
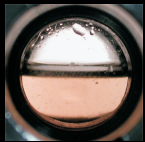
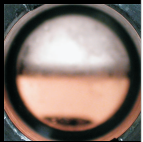
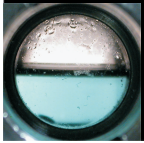
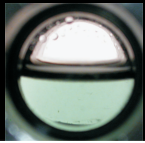
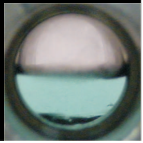
Ausgangs lösung	Druck			pH der Kalibrierung
	100 bar	250 bar	Kalibrierung	
a) NaHCO ₃ - gesättigt				6.2
b) pH=13.14				5.7
c) pH=12.33				4.9

Abbildung 2.15: pH-Bestimmungen bei CO₂-Drücken bis 250 bar unter Verwendung von pH-Indikatoren. b) und c) pH-Wert der Ausgangslösung wurde mit NaOH eingestellt. Verwendete Indikatoren a) und b): Bromkresol Purpur, c) Bromkresol Grün.

eingesetzt werden müssen. Aus diesen Gründen sollte eine Messmethode etabliert werden, die eine Messung des pH-Wertes ohne die Verwendung von Indikatoren unter sehr hohen Drücken ermöglicht. Eine Möglichkeit dazu ist den pH-Wert direkt über eine pH-Sonde zu messen (Abbildung 2.16).

Dies kann wiederum auf zwei verschiedene Arten realisiert werden. Die erste Variante ist eine spezielle Elektrode zu nutzen, die als Bezugsselektrolyten ein Gel verwendet, so dass sie keine Nachfüllöffnung benötigt. Einige Ausfertigungen dieser Elektroden sind laut Hersteller für Drücke bis 50 bar einsetzbar. In den hier durchgeführten Messungen wurde eine solche Elektrode (Polilyte Pro XP 120 der Firma Hamilton) für die Messungen bei 22 °C verwendet. Da jedoch auch im Bereich von überkritischem Kohlendioxid gemessen werden sollte, wurde nach einer Variante gesucht, um den pH-Wert mit einer Sonde unter noch höheren Drücken messen zu können. Um jedoch den pH unter hohem Druck mit einer üblichen pH-Sonde zu messen, sind verschiedene Dinge zu beachten. Es muss stets gewährleistet sein, dass der Bezugsselektrolyt nicht durch das Messmedium verunreinigt wird. Um dies auszuschließen, muss in Standardelektroden stets ein geringer Fluss an Bezugsselektrolyt durch das Diaphragma stattfinden. Für Messungen unter hohen Drücken bedeutet dies, dass auf den Bezugsselektrolyten mindestens der gleiche Druck wirken muss

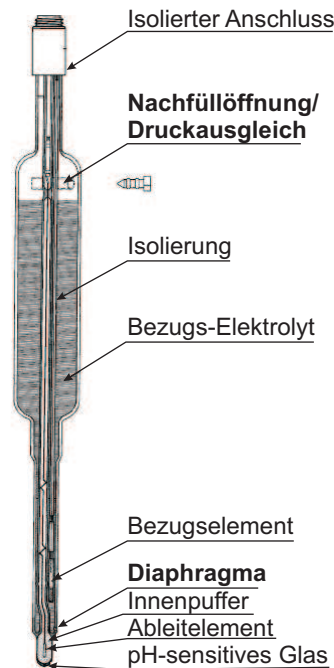


Abbildung 2.16: Aufbau einer pH-Einstabmesskette (Graphik nach Mettler-Toledo GmbH, Wien).

wie auf die zu messende Probe. Dies kann über die Nachfüllöffnung erreicht werden. Durch diese Maßnahme wird gleichzeitig erreicht, dass die Elektrode bei einer Druckdifferenz von Null betrieben wird ($\Delta p = 0$ bar). Somit kann die Elektrode bei höheren absoluten Drücken als üblich eingesetzt werden.

Da in dieser Arbeit jedoch der Druck mit CO₂ aufgebracht wird, ist es nicht möglich die Elektrode vollständig in die Druckkammer / den Autoklaven zu montieren, da dadurch auch der Bezugselektrolyt mit CO₂ beaufschlagt würde und somit sich der pH-Wert des Bezugselektrolyten verändern würde. Um dieses Problem zu lösen, muss die Elektrode in zwei verschiedenen Zellen angebracht werden. In der unteren Zelle befindet sich lediglich die in die zu messende Lösung eintauchende Messstelle. In der oberen Zelle befindet sich der Rest der Elektrode, so dass diese, und damit auch der Bezugselektrolyt, mit einem Inertgas (Stickstoff) beaufschlagt werden kann (Abbildung 2.17 und 4.1).

Für die Verwirklichung dieser Messaufgabe wurde ein spezieller Autoklavenaufsatz entwickelt (Abbildung 2.17), der zusammen mit einem 20 mL Fensterautoklav

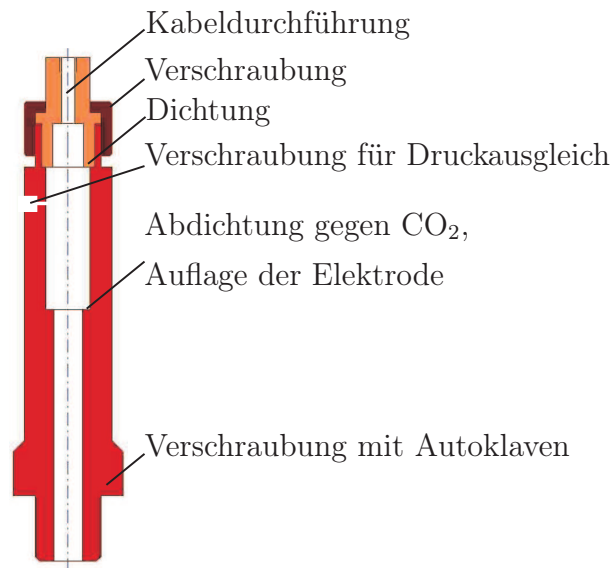


Abbildung 2.17: Autoklavenaufsatz zur pH-Messung.

verwendet werden kann (Abbildung 2.18). Die Fenster erlaubten die Kontrolle, dass die Elektrode stets sicher weit genug in die zu messende Lösung eintauchte. In Abbildung 2.17 ist die technische Zeichnung des Autoklavenaufsatzes zu sehen. Die eingesetzte Elektrode ist ähnlich der Elektrodenzeichnung in Abbildung 2.16. Die Abdichtung der beiden Kammern untereinander erfolgt über die Unterseite des Baues der Elektrode. Mit dieser Seite wird sie auf eine Teflondichtung am Autoklavenaufsatz gepresst. Die Abdichtung der oberen Kammer nach außen erfolgt sowohl über das Kabel selber, als auch über den Anschlussstecker der Elektrode. Wie sich in den folgenden Versuchen zeigte, brachte die Abdichtung nach Außen keine weiteren Probleme. Die Abdichtung der beiden Zellen untereinander war jedoch bei hohen Drücken nicht mehr ausreichend. Der Grund für die Undichtigkeit zwischen den Zellen ist, dass die Kammern untereinander über die Elektrode abgedichtet werden müssen. Dazu wird wie oben beschrieben der „Bauch“ der Elektrode auf die Teflondichtung gepresst. Da die Elektrode jedoch aus Glas besteht, kann nicht ein beliebig großer Anpressdruck aufgebracht werden. Werden nun beide Kammern mit Kohlenstoffdioxid bzw. Stickstoff aufgepresst, so wird die Elektrode leicht nach oben gedrückt. Dies führt zur Undichtigkeit der Kammern untereinander bei Drücken > 90 bar.

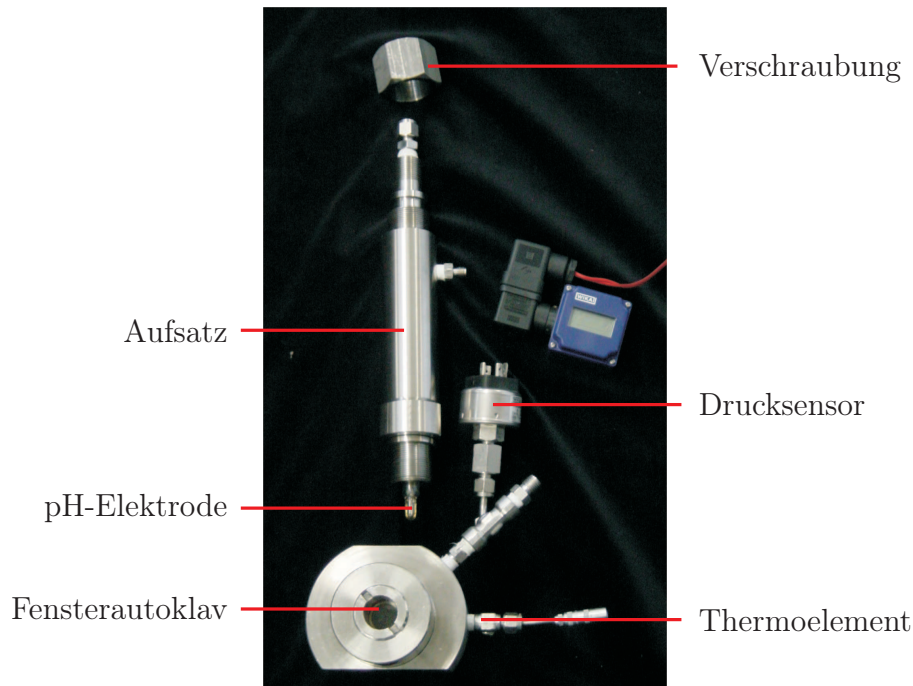


Abbildung 2.18: Autoklav zur Messung des pH-Wertes unter hohen Drücken.

2.3.5 Diskussion der pH-Messungen

Die ersten Messungen bei 22 °C wurden wie oben beschrieben mit der Elektrode Polylite Pro XP 120 durchgeführt. Da diese Elektrode keine Öffnung besitzt, über die ein Druckausgleich erfolgen kann, konnten die ersten Versuche nur bis zu Drücken von 50 bar durchgeführt werden (nach Herstellerangaben Maximaldruck). Die Elektrode zeigte bei der Kalibrierung bei einem pH von 7 eine Spannung von 1 mV und eine Steigung von $58,33 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$. Da diese Messungen dem vom Hersteller angegebenen Nullpunkt und Steigung der Elektrode entsprechen (nach Nernst $59 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$) konnte gezeigt werden, dass der Autoklav keinen Einfluss auf die Messwerterfassung hat, so dass die relevanten Messungen erfolgen konnten.

Bereits bei der ersten Messung fiel auf, dass der pH-Wert der Wasserphase bereits bei niedrigen Drücken rapide abnimmt (Abbildung 2.19). So liegt bei einem Druck von 10 bar nur noch ein pH-Wert von 3,5 vor, der zu höheren Drücken zwar noch weiter sinkt, aber wesentlich langsamer.

Anhand dieser Messungen wurden nun zunächst die theoretischen pH-Werte bei

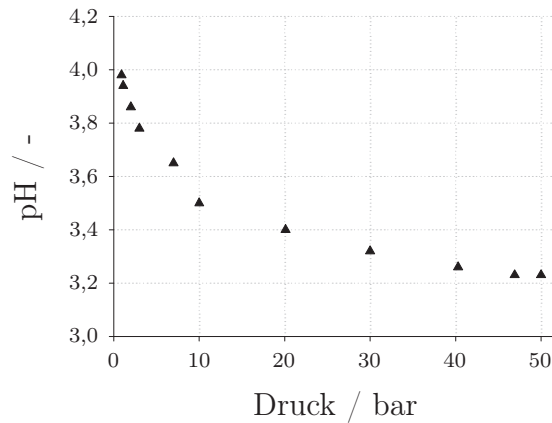


Abbildung 2.19: Änderung des pH-Wertes in Abhängigkeit des Druckes ohne die Zugabe von Puffersalzen bei einer Temperatur von 22 °C.

unterschiedlichen Natriumhydrogencarbonat Konzentrationen bestimmt und anschließend mit praktischen Messungen bei den verschiedenen Hydrogencarbonat Konzentrationen verglichen. Wie in Abbildung 2.20 zu erkennen, stimmen die praktisch ermittelten pH-Werte sehr gut mit den theoretisch berechneten Werten überein.

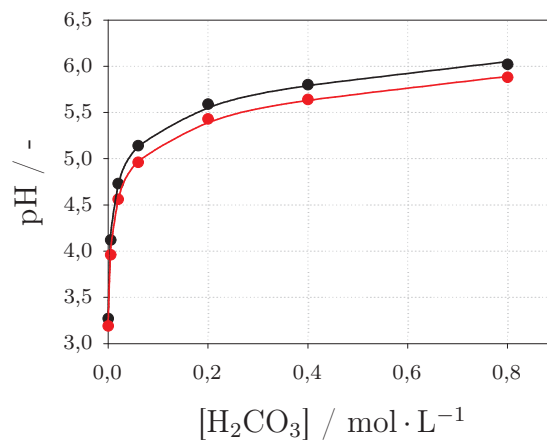


Abbildung 2.20: Änderung des pH-Wertes in Abhängigkeit von der Natriumhydrogencarbonat Konzentration bei 22 °C für ● 50 bar und ● 30 bar. Die Punkte sind experimentelle Werte, die Linien zeigen die Berechnung nach Gleichung 2.46.

Nachdem die Messungen bei 22 °C abgeschlossen waren, wurden weitere Messungen bei höheren Temperaturen durchgeführt. Für diese Versuche wurde die Elektrode „HA 405-60-RB/230“ der Firma Mettler-Toledo mit dem oben beschriebenen

Autoklavenaufsatz verwendet. Mit dieser Elektrode war es nun möglich, Messungen bei 60 °C und hohen Drücken durchzuführen. Da jedoch bei hohen Drücken z.T. zu erkennen war, dass die beiden Zellen des Autoklaven nicht mehr untereinander abdichteten, wurden die Messungen nur bis max. 90 bar durchgeführt.

Die Messungen mit dieser Elektrode bei 60 °C bestätigten ebenso die unter Kapitel 2.3.3 aufgestellten Gleichungen, wie zuvor die Messungen bei 22 °C. In Abbildung 2.21 ist der pH-Wert gegen den Druck für unterschiedliche Konzentrationen an Hydrogencarbonat aufgezeigt. Dabei zeigen die Symbole die jeweiligen Messwerte und die durchgezogenen Linien die jeweiligen berechneten Werte. Die Quadrate stehen für die Messung ohne Zugabe an Hydrogencarbonat. Somit konnte die aufgestellten Gleichungen, wie auch in Abbildung 2.22 zu erkennen, sehr gut bestätigt werden. In der Abbildung 2.22 sind die gemessenen pH-Werte gegen die berechneten Werte aufgetragen. Die Nähe sämtlicher Werte zur Diagonalen zeigt die gute Übereinstimmung zwischen der Berechnung und den Experimenten.

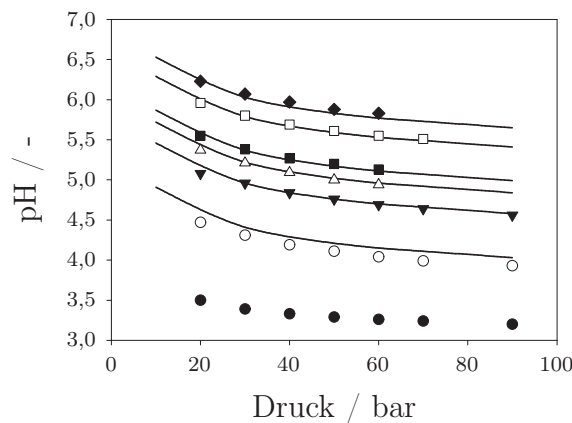


Abbildung 2.21: Änderung des pH-Wertes in Abhängigkeit des Druckes bei 60 °C für verschiedene Hydrogencarbonat Konzentrationen (von unten nach oben: 0 M, 0,005 M, 0,01 M, 0,02 M, 0,04 M, 0,06 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M). Punkte sind experimentelle Werte, die Linien zeigen die Berechnung nach Gleichung 2.46.

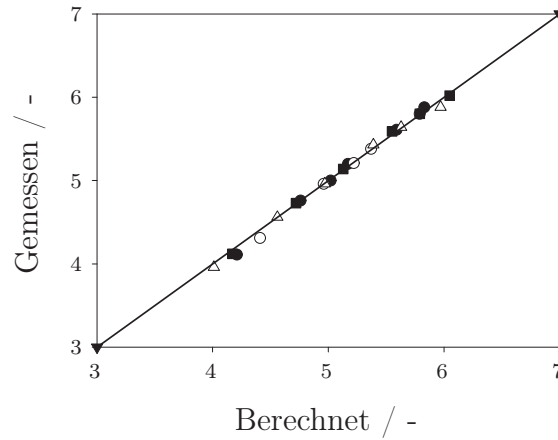


Abbildung 2.22: pH-Parity-Plot; eingetragene Werte: je 30 bar und 50 bar bei 22 °C und bei 60 °C für verschiedene Bicarbonatkonzentrationen.

2.3.6 Computergestützte Simulation der pH-Werte

Um den experimentellen Aufwand für die Bestimmung des pH-Wertes noch weiter zu senken, wurde in einem nächsten Schritt versucht, die pH-Werte für VE-Wasser bei unterschiedlichen Drücken und Temperaturen theoretisch zu beschreiben. Dazu wurde eine computergestützte Simulation (COSMO) der Löslichkeit von CO₂ im Wasser bei verschiedenen Drücken und Temperaturen durchgeführt*. Über die Konzentration des Kohlenstoffdioxids im Wasser können dann die pH-Werte berechnet werden, sofern die Werte für K_B und K_1 bzw. deren Produkt bekannt sind†. Nach Ziegler *et al.*^[95] kann deren Produkt, also die scheinbare Dissoziationskonstante, in Abhängigkeit von der Temperatur ausgedrückt werden über:

$$\begin{aligned} \log K_s &= \log (K_B \cdot K_1) \\ &= \frac{134737,5}{T} - 2211,492 - 0,30004 \cdot T + 785,768 \cdot \log T - \frac{9036500}{T^2}, \end{aligned} \quad (2.47)$$

wobei die Temperatur T in Kelvin angegeben ist. Über diese Gleichung kann ein K_s von $4,02 \cdot 10^{-7}$ bei 22 °C und von $5,97 \cdot 10^{-7}$ bei 60 °C berechnet werden.

*In Kooperation mit Martina Peters.

†Wie bereits erwähnt, kann die zweite Dissoziationskonstante vernachlässigt werden.

Die berechneten Löslichkeiten von CO₂ im Wasser liegen im Vergleich zu den Werten von Spycher *et al.*^[97] um ca. zwei Zehnerpotenzen niedriger. Der Grund dafür ist wahrscheinlich die fehlerhafte Berechnung der Löslichkeit durch COSMO, da dieses Programm in der verwendeten Version (C2.1, Revision 01.07) bekannterweise Probleme mit der Berechnung von Wasserstoffbrückenbindungen aufweist. Diese Bindungen spielen aber gerade bei der Löslichkeit von Kohlenstoffdioxid im Wasser eine überaus wichtige Rolle. Dennoch wurden die berechneten Werte als Grundlage der theoretischen pH-Wert Berechnung verwendet, um zu überprüfen ob sich der Trend der pH-Werte berechnen lässt.

Die Berechnung erfolgte über:

$$pH = \log(\sqrt{K_S \cdot X}), \quad (2.48)$$

wobei X die Löslichkeit von CO₂ im Wasser beschreibt. Vergleicht man die auf diese Weise ermittelten Werte mit den experimentellen, so ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen (Abbildung 2.23(a)). Es zeigt sich allerdings ebenso, dass der Trend sehr genau übereinstimmt. Subtrahiert man nun von den jeweiligen berechneten Werten einen bestimmten, festen Wert (bei 60 °C 2,1), so zeigt sich, dass die korrigierte Berechnung mit den gemessenen pH-Werten bis 90 bar sehr genau übereinstimmt (Abbildung 2.23(b)). Ähnliches ist auch für die hier untersuchten Werte bei 22 °C möglich. In diesem Fall müssen die berechneten Werte um den Wert 1,6 nach unten korrigiert werden.

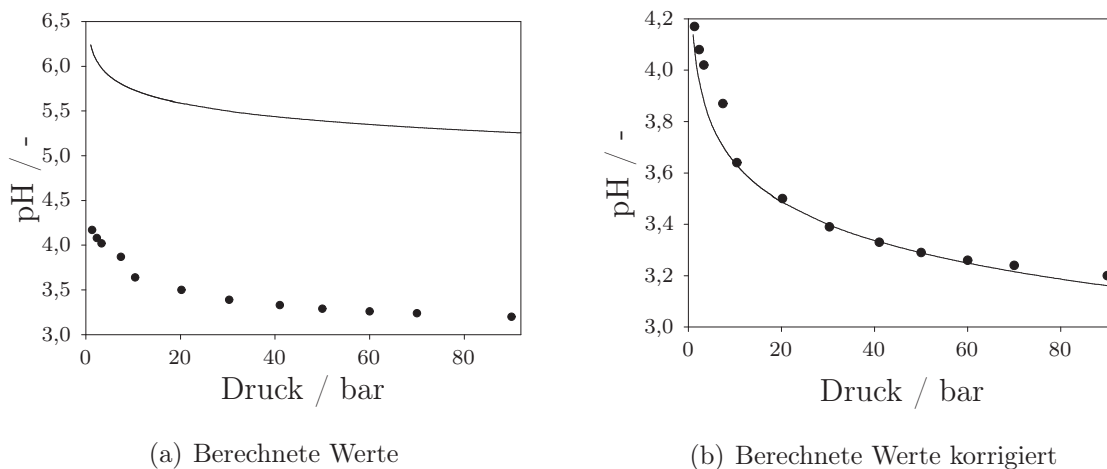


Abbildung 2.23: Vergleich der berechneten (Linien) und der gemessenen (Kreise) pH-Werte bei 60 °C.

2.3.7 Zusammenfassung

Es konnte ein Reaktoraufbau entwickelt werden, der es ermöglicht, den pH-Wert einer wässrigen Phase unter CO₂-Drücken bis 90 bar direkt mit einer pH-Elektrode zu messen. So konnte eine neue Methode etabliert werden, die es ermöglicht, den pH-Wert zu messen, ohne dass ein Indikator zugegeben werden muss.

Des Weiteren konnte eine Gleichung hergeleitet werden, die es ermöglicht, den pH-Wert bei einem bestimmten Druck und einer bestimmten Temperatur als Funktion der Hydrogencarbonatkonzentration zu berechnen. Diese Gleichung konnte durch Messungen bei unterschiedlichen Hydrogencarbonatkonzentrationen bestätigt werden, so dass es in Zukunft möglich ist, denn pH-Wert in wässrigen Systemen in Kombination mit Kohlenstoffdioxid gezielt einzustellen.

Die Erkenntnis, dass der pH-Wert in diesem System bereits auf einfache Weise bis auf Werte von ca. 6 durch die Zugabe von Hydrogencarbonaten variiert und gezielt eingestellt werden kann, eröffnet die Möglichkeit für eine Vielzahl weiterer Reaktionen in diesem interessanten Zweiphasensystem.

Die vollständige computergestützte Simulation des pH-Wertes ergab Ergebnisse, die wesentlich höher lagen als die tatsächlichen Werte. Begründet wird dies durch die fehlerbehafteten a priori Berechnungen der CO₂-Löslichkeiten. Dennoch konnte der Trend des pH-Wertes in Abhängigkeit vom Druck sehr gut simuliert werden.

2.4 Batchversuche im Hochdruck-Zweiphasensystem

2.4.1 Einleitung

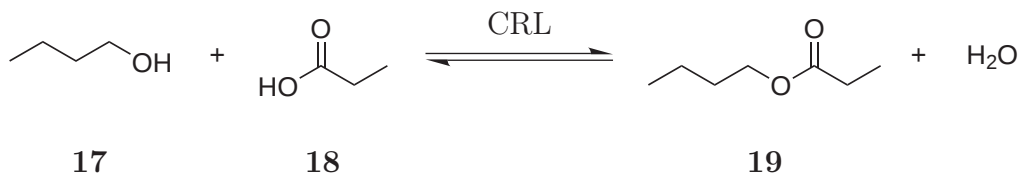
Das Gebiet der Enzymkatalyse in überkritischen Fluiden, insbesondere Kohlenstoffdioxid, ist von wachsendem Interesse (für Reviews siehe [52, 98, 99, 100]), dabei wird in der Literatur fast ausschließlich auf Einphasensysteme eingegangen. Der Einsatz von Enzymen im Zweiphasensystem bestehend aus Wasser und überkritischem Kohlenstoffdioxid wird nur vereinzelt im Zusammenhang mit Reaktionen in Mikroemulsionen beschrieben.^[93] Der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die Enzymaktivität wird dabei nicht genauer beschrieben. Die Ursache für die geringen Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet liegt sicherlich an der Komplexität von Zweiphasensystemen. Es sind z. B. Verteilungskoeffizienten und der Stofftransport zu beachten und die gebildete Grenzfläche kann zusätzlich zu einer Enzymdesaktivierung führen. Ein weiterer Faktor ist sicherlich der niedrige pH-Wert solcher Systeme,^[101] auch wenn u. a. in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass pH-Werte von >5 möglich sind.

2.4.2 Zielsetzung

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Einfluss verschiedener Parameter auf die Enzymaktivität der *Candida rugosa* Lipase (CRL) als Modellsystem im Zweiphasensystem $\text{H}_2\text{O}/\text{scCO}_2$ zu bestimmen. Dabei waren neben der Temperatur insbesondere die Einflüsse der nicht reaktiven Phase von Interesse. Die Temperatur hat neben dem Einfluss auf die Eigenschaften der überkritischen Phase auch einen direkten Einfluss auf die Enzymaktivität und -stabilität. Da die Eigenschaften überkritischer Fluide durch eine Änderung des Drucks stark variieren können, sollte der Einfluss des Drucks auf die Enzymaktivität genauer betrachtet werden. Um die Dichte der überkritischen Phase bei konstanter Temperatur und konstantem Druck zu variieren, wurde ebenfalls der Einfluss eines Cosolvents (Pentan) getestet.

2.4.3 Ergebnisse

Als Modellreaktion wurde die aus der Literatur für die CRL bekannte Veresterung von Butanol **17** mit Propionsäure **18** verwendet (Schema 2.5).^[53] Aus eben dieser Veröffentlichung war auch bekannt, dass die CRL für diese Reaktion ein breites pH-



Schema 2.5: Modellreaktion für die Untersuchungen im Zweiphasensystem Wasser/scCO₂ (CRL: *Candida rugosa* Lipase).

Optimum im Bereich zwischen 3 – 4 aufweist. Ebenso konnte von Montero *et al.*^[102] gezeigt werden, dass diese Lipase nach einer Stunde Inkubation bei einem pH-Wert von 3 kaum an Aktivität verliert. Somit wurde angenommen, dass der Einsatz dieser Lipase in dem angestrebten Zweiphasensystem möglich ist. Um dies genauer zu beurteilen, wurde zunächst die Langzeitstabilität bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 2.24 zeigen dabei deutlich, dass die CRL bei einem $pH > 3$ auch über einen Zeitraum von 40 h keine signifikante Desaktivierung erkennen lässt. Somit konnten die Prozessparameter Druck, Temperatur und die Zugabe eines Cosolvents (Pentan) mit Hilfe einer statistischen Versuchsplanung untersucht werden.

Eine Änderung der nicht reaktiven Phase geht immer mit einer Veränderung der Partitionskoeffizienten einher. Um den Einfluss der veränderten Partitionsko-

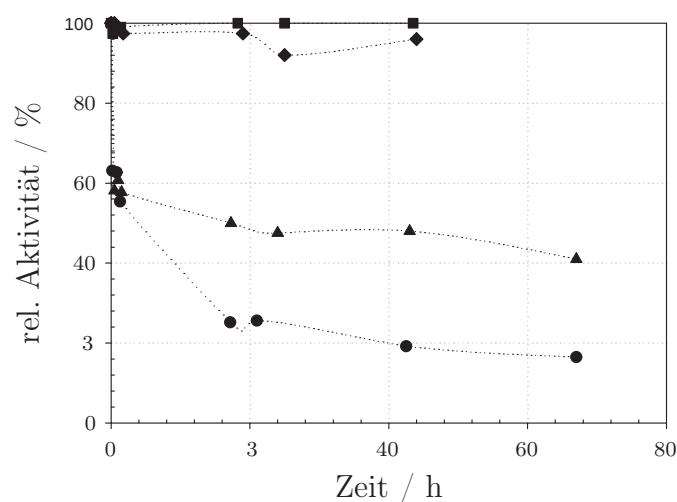


Abbildung 2.24: pH-Stabilität der *Candida rugosa* Lipase. ● $pH = 2$, ▲ $pH = 2,5$, ■ $pH = 3,0$, ◆ $pH = 3,5$.

effizienten auf die Kinetik genauer bestimmen zu können, wurde in einem ersten Schritt die Substratkonzentration in der nicht reaktiven Phase bei den unterschiedlichen Bedingungen gemessen. Dabei konnte in keinem Fall Propionsäure **18** in der überkritischen Phase detektiert werden. Die Konzentration des Butanol **17** in der überkritischen Phase war von allen drei Faktoren abhängig. Die Auswertung der statistischen Versuchsplanung ergab, dass alle Faktoren in signifikante Wechselwirkungen eingebunden sind, so dass nicht die einzelnen Einflüsse betrachtet werden dürfen. Daher werden im Folgenden jeweils die Einflüsse in Abhängigkeit eines zweiten Faktors beschrieben.

In Abbildung 2.25 sind die Wechselwirkungen der einzelnen Parameter zueinander dargestellt. Es ist eine starke Wechselwirkung sämtlicher Parameter zu erkennen. Je größer die Differenz in den Steigungen der Geraden, desto größer ist die jeweilige Wechselwirkung. So ist der Einfluss der Zugabe des Cosolvents bei höheren

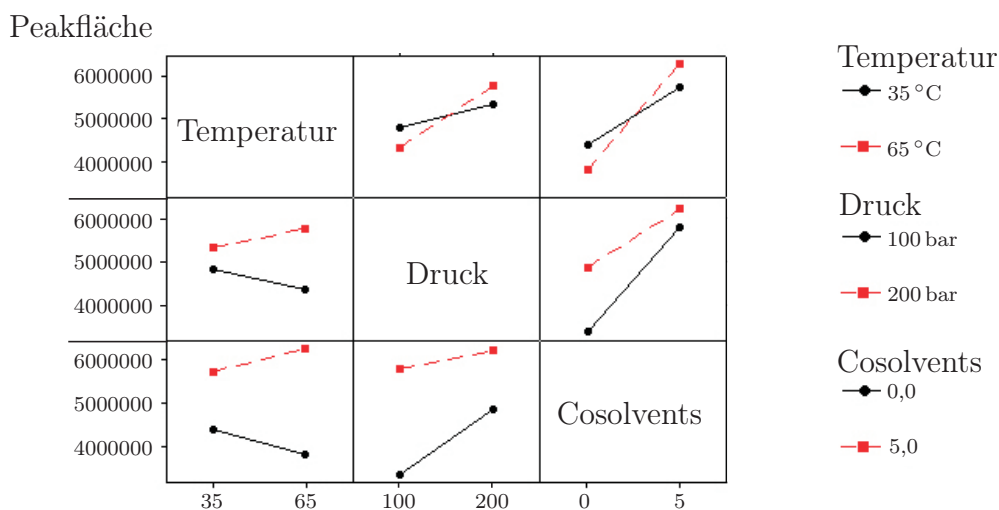
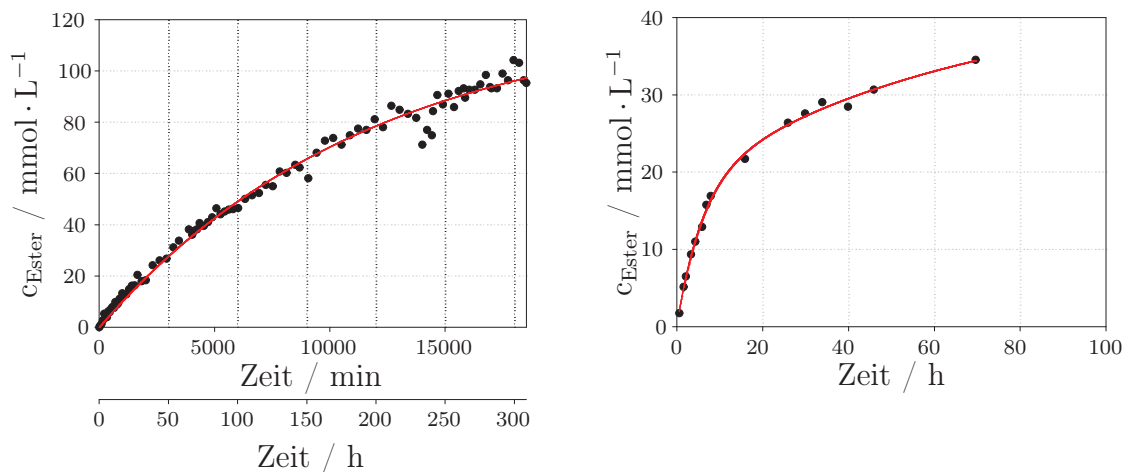


Abbildung 2.25: Wechselwirkungsdiagramm für die Löslichkeit von Butanol **17** in der nicht reaktiven Phase. Die Auswertung erfolgte direkt über die Peakflächen aus den Chromatogrammen, welche auf der Ordinate aufgetragen sind. Die Peakflächen sind direkt proportional zur Konzentration. Auf der Abszisse sind die jeweiligen Bedingungen für die Temperatur in °C, den Druck in bar und das Volumen an Cosolvents in mL aufgetragen.

Temperaturen wesentlich stärker ausgeprägt als bei niedrigen. Das Gleiche gilt für den Druck. Der Einfluss bei 100 bar ist größer als der Einfluss bei 200 bar. Dies ist auch plausibel, da z. B. die Änderungen der Dichte (und damit meist auch der Lösungskraft) durch die Zugabe von Cosolvents bei hohen Temperaturen und niedrigen Drücken wesentlich stärker ausfällt. Ähnliches gilt für den Einfluss des Druckes. So ändert sich die Dichte mit dem Druck bei tiefen Temperaturen und 5 mL Cosolvents weniger als bei hohen Temperaturen und keinem Cosolvents. Die Löslichkeit in der CO₂-Phase verhält sich analog.

Die Betrachtung der Wechselwirkungen mit der Temperatur sind schwieriger, da die Temperatur zwei gegenläufige Effekte bedingt. Niedrige Temperaturen bedeuten bei gleichem Druck eine höhere Dichte. Hingegen steigt mit der Temperatur auch der Dampfdruck der betrachteten Substanz, was sich positiv auf die Löslichkeit in der überkritischen Phase auswirkt. Entsprechendes ist auch bei den Wechselwirkungen zu beobachten. Bei 100 bar ist die Abnahme der Dichte mit der Temperatur wesentlich stärker ausgeprägt als bei 200 bar, so dass bei den hohen Drücken die Löslichkeit in der CO₂-Phase steigt, bei den niedrigen Drücken die Löslichkeit aber aufgrund der stark sinkenden Dichte abnimmt. Ähnlich verhält es sich bei der Zugabe von Cosolvents. Die Dichteänderung mit der Temperatur ist bei Zugabe von Cosolvents geringer als ohne, so dass auch hier die Temperatur wieder einen unterschiedlichen Effekt hat.

Nachdem die Einflüsse der unterschiedlichen Systembedingungen auf die Substratverteilung hinreichend betrachtet worden waren, wurde im nächsten Schritt das reaktive System untersucht. Anhand der Substratverteilung kann später abgeschätzt werden, ob gemessene Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit indirekt durch die Partitionskoeffizienten bestimmt werden oder direkt durch die veränderten Bedingungen. Zur Untersuchung des reaktiven Systems wurde zunächst ein Langzeitversuch durchgeführt, um eine Aussage über die Stabilität des Enzyms in dem Zweiphasensystem treffen zu können. In Abbildung 2.26(a) ist der Reaktionsverlauf für eine Reaktion bei 35 °C, 200 bar und unter Zusatz von 5 mL Cosolvents gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die *Candida rugosa* Lipase über die gesamte Reaktionsdauer von 300 h aktiv ist. Aufgrund des langsamen Verlaufes der Gesamtreaktion kann angenommen werden, dass die enzymkatalysierte Reaktion



(a) 35 °C, 200 bar und Zugabe von 5 mL Cosolvents.

(b) 65 °C, 100 bar und ohne Cosolvents.

Abbildungung 2.26: Reaktionsverlauf für die Veresterung von Butanol **17** mit Propionsäure **18** im Zweiphasensystem.

der limitierende Faktor ist und nicht die Diffusion. Somit wäre die Stabilität unter diesen Reaktionsbedingungen ausreichend, um mit der CRL eine kontinuierliche Reaktion durchzuführen. In den Versuchsreihen bei höheren Temperaturen (z. B. Abbildung 2.26(b)) ist hingegen deutlich zu erkennen, dass die Kurve sehr viel früher und bei geringeren Konzentrationen abflacht, was eine kontinuierliche Reaktion unter diesen Bedingungen nicht sinnvoll erscheinen lässt.

Zur Bestimmung des Einflusses der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen auf die Enzymaktivität wurden die Versuche mit statistischer Versuchsplanung geplant und der Verlauf der Produktkonzentration in der CO₂-Phase mit der Reaktionszeit gemessen.

Durch Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit erhält man aus der Anfangssteigung die initiale Enzymaktivität (Abbildung 2.26). Aus den so ermittelten Aktivitäten (Tabelle 2.2) lassen sich die Einflüsse der drei Faktoren Druck, Temperatur und Cosolvents bestimmen. Über die Auswertung der statistischen Versuchsplanung erhält man dabei nicht nur die Haupteffekte, sondern auch die Wechselwirkungseffekte der Faktoren. Dabei zeigte sich, dass nur die Temperatur und

Tabelle 2.2: Ergebnisse zu den Kinetikmessungen im Zweiphasensystem Wasser/scCO₂.

Durchlauf Reihenfolge	Temperatur	Druck	Heptan	Anfangssteigung
/ -	/ °C	/ bar	/ mL	/ Peakfläche · min ⁻¹
1	65	200	5,0	292
2	65	100	0,0	624
3	35	100	5,0	172
4	35	200	0,0	118
5	50	150	2,5	390
6	35	200	5,0	177
7	35	100	0,0	156
8	65	100	5,0	642
9	65	200	0,0	183

der Druck einen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben. Da diese beiden Faktoren jedoch miteinander wechselwirken, werden erneut ausschließlich die Wechselwirkungseffekte betrachtet (Abbildung 2.27). Dabei ist zu erkennen, dass bei 65 °C der Druck einen starken negativen Effekt auf die Enzymaktivität ausübt, während der Einfluss bei 35 °C minimal ausfällt. Ähnlich verhält es sich in der umgekehrten Betrachtung. Bei hohen Drücken wirkt sich die Temperatur wesentlich geringer auf die Aktivität aus als bei niedrigen Drücken. Jedoch kann allgemein gesagt werden, dass bei den betrachteten Bedingungen die Temperatur erwartungsgemäß einen positiven Einfluss auf die Aktivität hat. Der Druck hingegen wirkt negativ auf die Aktivität. Dieser Effekt wurde auch schon zuvor für die *Pseudomonas species* Lipase berichtet.^[103]

Eine mögliche Begründung für diesen Effekt liegt in der Verschiebung des Partitionskoeffizienten. Bedenkt man aber, dass es ebenfalls zu einer Verschlechterung der Aktivität mit dem Druck kommt, wenn Cosolvents verwendet wird, so wird klar, dass die Verschiebung der Partitionskoeffizienten nicht die einzige Begründung ist, da sich in diesem Fall die Löslichkeiten kaum verschieben. Auch die Verringerung des pH-Wertes mit dem Druck erklärt dieses Verhalten nicht. Aus den Arbeiten von Buthe^[53] ist bekannt, dass die CRL für eben diese Reaktion ein sehr breites Optimum

Δ Peakfläche
pro Minute

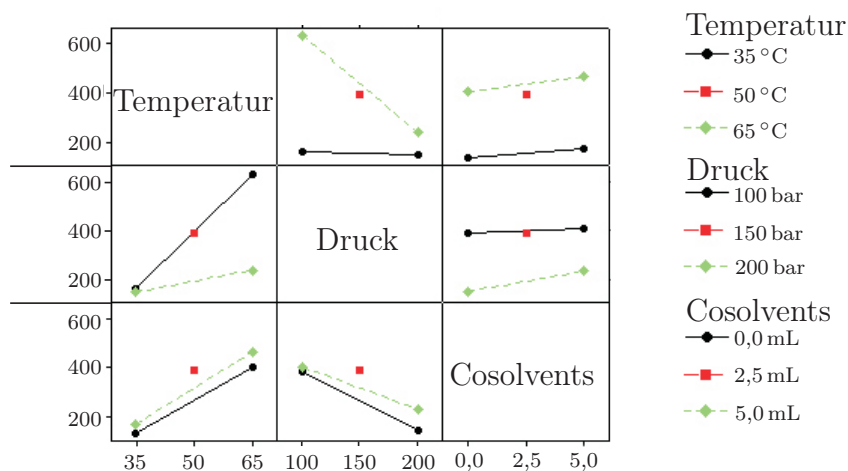


Abbildung 2.27: Wechselwirkungsdiagramm für die Reaktionsgeschwindigkeit r der Veresterung von **17** mit **18** im Zweiphasensystem. Auf der Ordinate ist die Reaktionsgeschwindigkeit r als Änderung der Peakfläche pro Minute aufgetragen.

zwischen pH 3 und 4 aufweist. Die Druckerhöhung von 100 bar auf 200 bar würde lediglich zu einer pH-Änderung führen (0,1-0,2 pH-Einheiten, Kapitel 2.3), die nur eine geringe Variation in der Aktivität begründen würde. Weitere mögliche Einflussfaktoren sind die Bildung von Carbamaten an Aminosäureresten des Enzyms^[100]. Es finden sich in der Literatur verschiedene Studien zur Reaktionen zwischen CO₂ und Aminen^[104, 105, 106] in wässriger Phase, jedoch sind keine Angaben über das Carbat/Amin Verhältnis bei unterschiedlichen Drücken und Temperaturen zu finden. Aus den Arbeiten von Dijkstra *et al.*^[107] ist aber für Einphasensysteme bekannt, dass das Verhältnis selbst bei Drücken > 100 bar noch sehr stark vom Druck abhängig ist. Somit kann die Carbatbildung am Enzym und die damit verbundene Desaktivierung eine Begründung für die Abhängigkeit der Aktivität vom Druck sein.

Eine andere Möglichkeit besteht in einer Änderung der Proteinkonzentration an der (reaktiven) Phasengrenzfläche. So konnte z. B. von Tewes und Boury^[108] gezeigt werden, dass die Adsorption eines Albumins an die Phasengrenzfläche zwischen Wasser und CO₂ bei 40 °C vom Druck abhängig ist (im Bereich zwischen 50 und 90 bar untersucht). Da die betrachtete Reaktion vorwiegend an der Grenzfläche katalysiert wird,^[53] ist dies eine weitere Möglichkeit für die veränderte Aktivität.

Weitere mögliche Gründe sind die Steigerung der Carbonsäurenkonzentration mit Folge einer stärkeren kompetitiven Enzymhemmung sowie eine stärkere Bildung von Butylcarbonsäure durch die Reaktion von Butanol **17** mit CO_2 ^[109, 110] und damit einer Verringerung der Substratkonzentration.

2.4.4 Zusammenfassung

Die Batchversuche im Zweiphasensystem Wasser/scCO₂ haben gezeigt, dass die *Candida rugosa* Lipase bei 35 °C über eine Reaktionsdauer von mindestens 300 h aktiv ist und somit in einem solchen Zweiphasensystem eingesetzt werden kann. Die Untersuchungen zu dem Einfluss der verschiedenen Prozessparameter haben wie erwartet gezeigt, dass die Temperatur einen positiven Einfluss auf die Aktivität hat. Der Einfluss des Drucks auf die Aktivität erwies sich als negativ, was in dem betrachteten Druckbereich zwischen 100 bar und 200 bar nicht erwartet worden war. Dabei scheint die Änderung der Verteilungskoeffizienten nicht die einzige Erklärung für dieses Verhalten zu sein, sondern ein direkter Einfluss der nicht reaktiven Phase auf die Enzymaktivität ist wahrscheinlich.

Nachdem in diesen Versuchen auch gezeigt werden konnte, dass die *Candida rugosa* Lipase in diesem Zweiphasensystem eine ausreichende Stabilität zeigt wurde im Folgenden nach einer Möglichkeit gesucht, die es ermöglicht, bestehende reaktionstechnische Probleme dieses Systems durch den Einsatz von Hydrogelen zu lösen.

2.5 Katalyse mit immobilisierten Enzymen in Hydrogelen

2.5.1 Einleitung

2.5.1.1 Immobilisierung von Enzymen

Die Immobilisierung ist definiert als der Vorgang, in dem Teilchen chemisch durch Kopplung oder physikalisch durch Einschluss in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden.^[111] In Bezug auf Biokatalysatoren wird unterschieden zwischen der Bindung an einem Träger, der Quervernetzung untereinander sowie dem Festhalten in einer Matrix oder einer Membran.^[112] Dabei ist wichtig, dass die Fixierung künstlich erfolgt ist und nicht bereits von der Natur vorgegeben ist (wie z. B. bei Zellen).^[111]

Die Vorteile der Immobilisierung sind dabei vielfältig und von der Anwendung abhängig. So kann eine geeignete Immobilisierung nicht nur zu einer besseren Stabilität der Katalysatoren gegenüber Lösungsmitteln führen, sondern es kann auch zu einer verbesserten Stabilität gegenüber Temperatur und pH-Einflüssen kommen.^[113] Neben dieser verbesserten Stabilität kann durch die richtige Wahl einer Immobilisierungstechnik auch die spezifische Aktivität eines Enzyms bei gegebenen Bedingungen um ein Vielfaches verbessert werden.^[114] Auch aus reaktionstechnischer Sicht bietet die Immobilisierung viele Vorteile.^[112] So liegt in wässrigen Systemen z. B. das Enzym homogen gelöst vor, so dass Enzym und Produkt nur thermisch oder extraktiv voneinander getrennt werden können. Dies entspricht jedoch einem großen technischen Aufwand und das Enzym ist in vielen Fällen nicht erneut einsetzbar, da es durch den Trennprozess irreversibel deaktiviert wird. Die damit verbundene zu niedrige Produktivität sowie die hohen Enzymkosten stehen aber der Etablierung enzymatischer Prozesse auf industrieller Ebene entgegen. Beim Einsatz von Enzymen in organischen Medien ist eine Filtration zwar möglich,^[115] aber großtechnisch aufgrund der feinen Enzympartikel nicht wünschenswert. Durch die Enzymimmobilisierung, die meistens einer Heterogenisierung gleich kommt, kann dem Abhilfe geschaffen werden. So wird es dadurch möglich, Enzyme in kontinuierlichen Prozessen einzusetzen und somit sehr hohe Produktivitäten der Enzyme zu erreichen, was mit reinen Enzymen fast unmöglich ist,^[116]. Aus diesen Gründen ist es nicht verwunderlich, dass ca. 80 % der industriellen Biotransformationsprozesse unter Einsatz

von immobilisierten Biokatalysatoren durchgeführt werden.^[53]

Die Wahl der Immobilisierungsmethode muss an den gewünschten Prozess und an das jeweilige Enzym angepasst werden. Bei der ionischen Immobilisierung werden die Enzyme über ionische Bindungen an einen polyionischen Träger gebunden. Der Vorteil dieser Immobilisierungsmethode ist, dass sie im Vergleich sehr einfach, preisgünstig ist und gewöhnlich nicht die katalytisch aktive Enzymstruktur zerstört.^[117] Die Nachteile sind, dass aufgrund der vergleichsweise schwachen Bindung die tertiäre Struktur des Enzyms kaum stabilisiert wird und es leicht zur Desorption der Enzyme kommen kann. Aus diesem Grund ist es für diese Immobilisierungsmethode bei wässrigen Systemen unumgänglich auf sehr konstante pH-Werte und Ionenstärken zu achten, um die Desorptionsgeschwindigkeit so gering wie möglich zu halten.

Ähnlich der ionischen Immobilisierung erfolgt bei der nicht ionisch, adsorptiven Immobilisierung die Bindung der Enzyme an einen festen Träger über Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen. Aufgrund der üblicher Weise schwächeren Bindungen im Vergleich zur ionischen Immobilisierung kommt es zu geringeren Einflüssen auf die Enzymaktivität und Stabilität. Darüber hinaus führt die schwächere Bindung zu einer schnelleren Desorption und leichterem Auswaschen.

Durch eine kovalente Bindung der Enzyme an einen Träger kann die Desorption auf ein Minimum reduziert werden. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch der wesentlich größere Aufwand, sowie die häufig auftretende Reduzierung der Aktivität^[112] und/oder Selektivität aufgrund von Bindungen in der Nähe des aktiven Zentrums oder aufgrund von enzyschädigenden Reaktionsbedingungen während der Immobilisierung. Eine Quervernetzung von Enzymen untereinander führt zur Ausbildung von unlöslichen Aggregaten, deren Eigenschaften (sowohl die katalytischen als auch die mechanischen) durch das zusätzliche Einbringen von nicht katalytisch wirksamen Komponenten noch verbessert werden können. Der Nachteil dieser Methode, dem Crosslinking (bzw. Co-Crosslinking), sind jedoch die geringe mechanische Stabilität der Aggregate und die häufigen Aktivitätsverluste. Auch sinkt dadurch zum Teil drastisch die mögliche Produktivität der Enzyme, da nur die äußeren Enzyme katalytisch wirken können.

Bei der Immobilisierung von Enzymen durch Einschluss gibt es zum einen die Membranabtrennung, bei der die Enzyme in ihrer Beweglichkeit durch eine Membran eingeschränkt werden. Zum anderen gibt es die Matrixeinhüllung, bei der das Enzym in ein dreidimensionales polymeres Netzwerk immobilisiert wird.^[111] Handelt es sich dabei um wässrige Netzwerke, werden diese auch als Hydrogele bezeichnet. Der Vorteil dieser Immobilisierung ist, dass das Enzym beim Einsatz in nicht wässrigen Medien vor dem inaktivierenden Einfluss des Reaktionsmediums weitestgehend geschützt wird, ein Vorteil der bei der Immobilisierung durch Kopplung nicht gegeben ist. Ein Nachteil der Matrixeinhüllung besteht in einem eingeschränkten Massentransfer, da die Matrix eine Diffusionsbarriere für Substrate und Produkte darstellt und so deren Diffusionsgeschwindigkeiten negativ beeinflusst. In diesem Zusammenhang sind neben Katalysatordichte, Konzentration und Zusammensetzung der Matrix auch noch Schichtdicke, Form und Größe der Immobilisate von Bedeutung.^[53] Als Immobilisierungsmatrix sind aus der Literatur sowohl natürliche als auch synthetische Polymere bekannt. Die natürlichen Polymere zeichnen sich in der Regel durch eine hohe Biokompatibilität und Aktivität der Enzyme aus, da diese Polymere meist nur geringe Wechselwirkungen zwischen Enzym und Matrix aufweisen.^[118] Ihre Vernetzung erfolgt meistens entweder durch Kältegelierung (z. B. Agar oder Gellan)^[53] oder (z. B. bei Alginaten) durch ionotrope Gelbildung, d.h. die Polymere werden durch multivalente Ionen vernetzt.^[53] Die synthetischen Polymere zeichnen sich hingegen dadurch aus, dass sie in einem gewissen Rahmen an die Anforderungen besser angepasst werden können (Steifigkeit, Maschenweite, Hydrophilie, etc.) und zum Teil die einzelnen Ketten auch kovalent untereinander vernetzt sind.

2.5.1.2 Hydrogele in Zweiphasensystemen

Der Einsatz von Hydrogelen ist heutzutage weit verbreitet. Sie finden insbesondere Verwendung als sogenannte Superabsorber in vielen Hygieneartikeln^[119] wie z. B. in Windeln oder Damenbinden. Neben diesem größten Einsatzgebiet gibt es einige speziellere Anwendungen für Hydrogele, z. B. in der Bauindustrie als Bestandteil von Abdichtmaterialien gegen drückendes Wasser.^[120, 121] Ein weiteres mögliches Einsatzgebiet für Hydrogele ist die Verwendung zur Immobilisierung von Biokatalysatoren, die ein Bestandteil dieser Arbeit ist.

Hydrogele sind vernetzte, dreidimensionale Makromoleküle mit hydrophilen Gruppen. Als hydrophile Gruppen werden meist Carbonsäurensalze eingesetzt, aber auch der Einsatz nicht ionischer Monomere mit hydrophilen Seitengruppen ist möglich. Die Vernetzung zwischen den Polymerketten kann dabei sowohl durch chemische Bindungen als auch durch physikalische Wechselwirkungen erfolgen.^[119] Des Weiteren treten nahezu immer Verschlaufungen der einzelnen Ketten auf. Die physikalische Vernetzung erfolgt dabei durch mehrwertige Ionen, die mit entgegengesetzt geladenen Ionen wechselwirken,^[122] oder durch Wasserstoffbrückenbindungen. Von großem technischen Interesse und insbesondere auch für diese Arbeit wichtig sind die chemisch vernetzten Hydrogele auf Basis von Natriumacrylat. Die chemische Vernetzung hat dabei den Vorteil einer irreversiblen Bindung, die wesentlich stärker ist als die physikalische.

Hydrogele können ein Vielfaches ihres eigenen Gewichtes an Wasser aufnehmen und binden dabei das Wasser über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, so dass sie selbst unter Druck das Wasser fest binden. Diese Gewichtszunahme wird als Quellung bezeichnet und wird beschrieben durch:

$$Quellung = \frac{m_{Wasser}}{m_{Hydrogel}}. \quad (2.49)$$

Das Quellungsgleichgewicht zwischen dem Hydrogel und der koexistierenden Phase wird durch den Aufbau des Hydrogels (d. h. Vernetzungsgrad, Anzahl hydrophiler Gruppen, Art des Vernetzers, etc.) beeinflusst. Darüber hinaus haben je nach eingesetztem Hydrogel die Umgebungsbedingungen Temperatur, pH-Wert und Salzgehalt einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Einfluss auf das Quellungsgleichgewicht.^[122]

Thermodynamisch betrachtet ist die Triebkraft der Quellung bei ionischen Hydrogelen im Wesentlichen der osmotische Druck. Da das Hydrogel eine sehr hohe Konzentration an (z. B. Natrium-)Ionen aufweist, besteht ein Konzentrationsgradient zwischen dem Hydrogel und der koexistierenden Phase.^[119] Zum Konzentrationsausgleich können die Ionen das Hydrogel jedoch nicht verlassen, da dies zur Ladungstrennung führen würde. Daher diffundiert das Wasser in das Hydrogel ein,

setzt so die Konzentration im Gel herab und erhöht dadurch die Entropie. Das Hydrogel quillt und die einzelnen Ketten werden gestreckt (Abbildung 2.28).

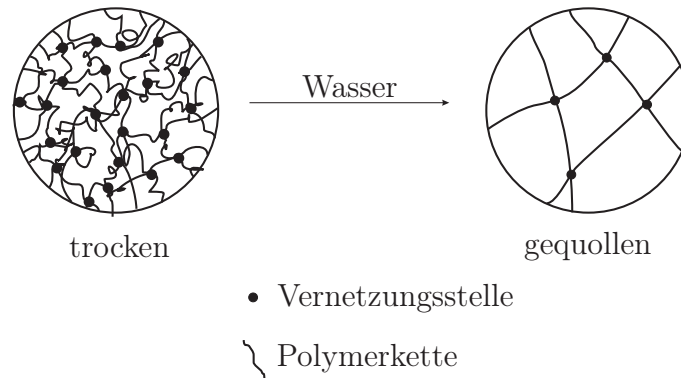


Abbildung 2.28: Schematische Darstellung eines Ausschnittes zur Hydrogelquellung.

Weitere Triebkräfte sind die gegenseitige Abstoßung der geladenen Gruppen und die Hydratation des Hydrogels. Die Streckung der Ketten kommt dabei allerdings einer Entropieabnahme gleich. Da das System jedoch bestrebt ist, die Entropie möglichst groß zu halten, stellt sich eine Rückstellspannung ein, ähnlich wie bei der Entropieelastizität. Sobald diese Kraft den übrigen Kräften gleich ist, befindet sich die Quellung im Gleichgewicht. Eine Erhöhung des Salzgehaltes in der koexistierenden Phase erniedrigt somit den osmotischen Druck, so dass die Quellung vermindert wird. Die Zugabe von mehrwertigen Ionen wie z. B. Mg^{2+} führt zu einem partiellen Austausch mit den einwertigen Ionen des Gels, so dass Vernetzungen über ionische Wechselwirkungen zu einer zusätzlichen Reduzierung der Quellung führen. Auch der pH-Wert beeinflusst die Quellung ionischer Hydrogele sehr stark, da durch den pH das Gleichgewicht zwischen der Säure und dem Carboxylat verschoben wird. Dies führt zu einer Abnahme der ionischen Gruppen und somit zur Reduktion der Quellung. Hydrogele auf Basis nicht ionischer Monomere werden kaum in ihrer Quellung durch den pH-Wert oder den Salzgehalt des Quellmediums beeinflusst.^[121, 123]

2.5.1.3 Maschenweite und Enzymgrößen

Damit ein Enzym generell die Möglichkeit besitzt in ein polymeres Netzwerk zu diffundieren, muss sein Radius kleiner sein als die Maschenweite des Netzwerkes. Da häufig die genauen Ausmaße eines Enzyms nicht bekannt sind, kann als Näherung

der Stokesradius (auch hydrodynamischer Radius genannt) verwendet werden. Dieser beschreibt den Radius einer festen Kugel, die dieselben Diffusionseigenschaften besitzt wie das entsprechende Teilchen. Dabei wird neben dem eigentlichen Teilchen auch seine Solvathülle betrachtet. Der Stokesradius R_{St} kann für globuläre Enzyme durch Gleichung 2.50 angenähert werden.^[124]

$$R_{St} = 0,72 \cdot M^{\frac{1}{3}} \quad (2.50)$$

Die exakte mittlere Maschenweite in einem Hydrogelnetzwerk lässt sich nicht ohne Weiteres experimentell bestimmen. Zwar kann über die mechanischen Eigenschaften, wie z. B. dem E-Modul, eine Abhängigkeit vom Vernetzungsgrad erkannt werden, für Hydrogele aus Polynatriumacrylat kann dieser daraus jedoch noch nicht genau bestimmt werden. Die genaue Bestimmung des Vernetzungsgrades und damit der Maschenweite kann des Weiteren über NMR Messungen bestimmt werden, was zurzeit Bestandteil verschiedener Forschungsprojekte ist. Zur Abschätzung des Abstandes zweier Vernetzungspunkte im ungequollenen Zustand des Hydrogels kann folgende Beziehung genutzt werden:^[125]

$$(\bar{r}_0^2)^{\frac{1}{2}} = l_{cc} \cdot \left[\frac{2 \cdot M_c}{M} \right]^{\frac{1}{2}} \cdot C_N^{\frac{1}{2}}, \quad (2.51)$$

mit $(\bar{r}_0^2)^{\frac{1}{2}}$ =Abstand der beiden Vernetzungspunkte im ungequollenen Zustand,

l_{cc} =Bindungslänge einer C-C Einfachbindung (0,154 nm),

M_c =Molmasse zwischen zwei Vernetzungsstellen,

M =Molmasse des Monomeren,

C_N =charakteristisches Verhältnis (Maß für die Ausdehnung der Polymerkette im ungestörten Zustand, 6,9 für Acrylate.^[126]).

Unter der Annahme eines ideal statistischen Einbaus des Vernetzers kann M_c aus dem molaren Verhältnis von Vernetzer zu Monomer berechnet werden. Aus Gleichung 2.51 lässt sich die mittlere Maschenweite im gequollenen Zustand berechnen über:^[125]

$$\xi = \frac{(\bar{r}_0^2)^{\frac{1}{2}}}{v_{2s}^{\frac{1}{3}}}, \quad (2.52)$$

wobei ξ = Maschenweite des gequollenen Netzwerks (Abbildung 2.29),
 $(\bar{r}_0^2)^{\frac{1}{2}}$ = Abstand der beiden Vernetzungspunkte im ungequollenen Zustand,
 v_{2s} = reziproker Gleichgewichtsquellgrad.

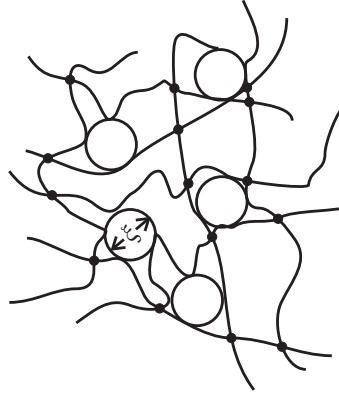


Abbildung 2.29: Veranschaulichung der Maschenweite im Polymernetzwerk.

Damit nun ein Enzym in das Hydrogel eindringen kann, muss die Bedingung $R_{St} < \xi$ erfüllt sein. Es ist jedoch zu beachten, dass beide Größen nur theoretische Berechnungen/Näherungen sind und dass bei der Berechnung der Maschenweite von einem ideal statistischen Einbau des Vernetzers ausgegangen wird. Dies bedeutet, dass real aber sowohl kleinere als auch größere Maschen im Netzwerk auftreten können und dass vernetzende Nebenreaktionen während der Polymerisation bei der Berechnung nicht in Betracht gezogen werden. Dennoch kann auf diese Weise abgeschätzt werden, ob ein Enzym gut oder weniger gut in ein Netzwerk diffundieren kann oder nicht.

2.5.2 Zielsetzung

Im Hinblick auf kontinuierliche Reaktionen im Zweiphasensystem Wasser/CO₂ sollte eine Technik entwickelt werden, die es ermöglicht, bestehende reaktionstechnische Probleme dieses Systems durch den Einsatz von Hydrogelen zu lösen. Die Verwendung von Hydrogelen als eine Art „festes Wasser“ ermöglicht hohe spezifische Phasengrenzflächen und bietet dennoch, im Gegensatz zu Emulsionen, die Möglichkeit einer guten Rückhaltung.

Aus der Literatur bekannte Hydrogele zur Immobilisierung von Enzymen haben meist den Nachteil, dass der Einschluss der Enzyme während der Bildung der Par-

tikel erfolgt und dadurch das Risiko einer Desaktivierung besteht. Somit sollte in dieser Arbeit eine Technik entwickelt werden, die es erlaubt, Enzyme nachträglich in bestehende Hydrogelpartikel zu immobilisieren. Die erfolgreiche Immobilisierung sollte zunächst im Zweiphasensystem mit Heptan überprüft werden. Dabei stand insbesondere neben einer hohen Aktivität der Partikel eine gute Dispergierbarkeit im Vordergrund. Auch sollte die Immobilisierungstechnik möglichst einfach und damit prinzipiell großtechnisch durchführbar sein.^[116]

2.5.3 Durchführung und Kontrolle der Immobilisierung

Die Beladung der Immobilisate erfolgte stets auf die gleiche Weise, wie es in Abbildung 2.30 schematisch dargestellt ist. Dazu wurde zunächst eine Proteinelösung angesetzt und deren genaue Konzentration über den Bradford-Assay bestimmt (c_0). Anschließend wurde zum Zeitpunkt t_0 das Hydrogel zu der Lösung gegeben. Durch Bestimmen der Konzentration in der Lösung zu späteren Zeitpunkten kann auf die Menge an immobilisiertem Enzym zurückgeschlossen werden. Hat nach einer bestimmten Zeit die Lösung wieder die gleiche Konzentration wie zum Zeitpunkt t_0 , kann davon ausgegangen werden, dass das Enzym (Protein) in das Hydrogel diffundiert ohne dass das Netzwerk einen Effekt auf das Enzym auswirkt. Bleibt die Konzentration jedoch über der Ausgangskonzentration c_0 , so ist ausschließlich, oder zumindest vermehrt, Wasser ohne Enzym in das Hydrogel diffundiert. Mögliche Gründe dafür sind zu enge Maschenweiten oder abstoßende Kräfte zwischen Protein und Netzwerk. Sinkt die Konzentration jedoch unter c_0 , so ist dies ein eindeutiger Beleg für eine anziehende Wechselwirkung des Netzwerkes auf das Protein.

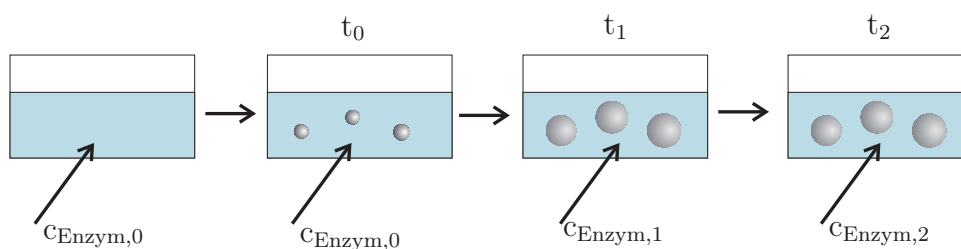


Abbildung 2.30: Schema zum Versuchsablauf der Immobilisierung.

Aus der Bilanz 2.53:

$$\beta_0 \cdot V_0 = \beta_2 \cdot V_2 + \beta_{Hyd} \cdot V_{Hyd} \quad (2.53)$$

kann durch Umstellen auf die Beladung des Hydrogels geschlossen werden:

$$\beta_{Hyd} = \frac{\beta_0 \cdot V_0 - \beta_2 \cdot (V_2)}{V_{Hyd}}, \quad (2.54)$$

wobei β_{Hyd} =Beladung des Hydrogels,

β_0 =anfängliche Proteinmassenkonzentration der Quelllösung,

β_2 =Proteinmassenkonzentration der Quelllösung nach der
Quellung des Hydrogels,

V_{Hyd} =vom Hydrogel aufgenommene Lösung,

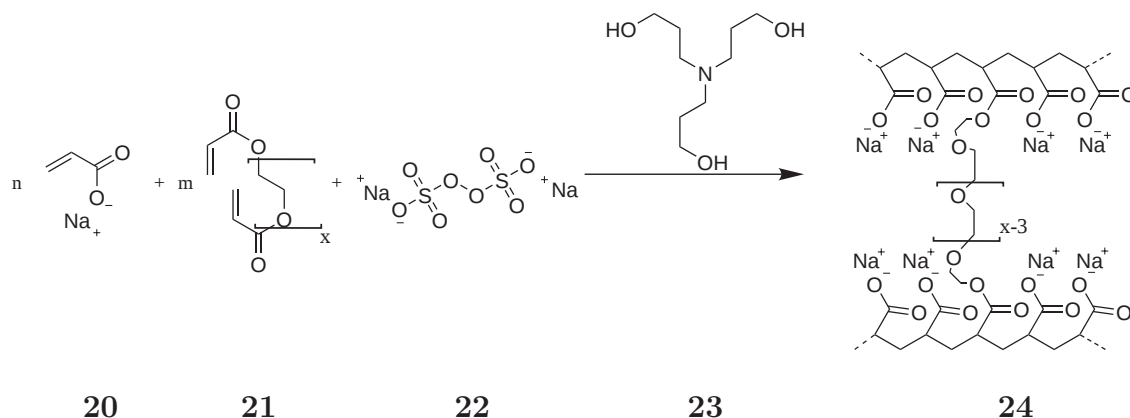
V_0 =Volumen der Ausgangslösung,

V_2 =Volumen der überstehenden Flüssigkeit.

2.5.4 Ionische Immobilisierungsmatrix

2.5.4.1 Polymerisation

Für die Entwicklung von ionischen Hydrogelen als Immobilisierungsmatrix von Enzymen wurde ein vernetztes Polymersystem aus Natriumacrylat **20** ausgewählt, welches über Polyethylenglykoldimethacrylat **21** vernetzt ist (Schema 2.6).



Schema 2.6: Synthese des ionischen Hydrogels.

In einem ersten Schritt wurde die Polymerisation in Lösung durchgeführt und das fertige Polymer nachträglich zerkleinert, um entsprechende Partikel zu erhalten. Das so erhaltene Hydrogel konnte jedoch im gequollenen Zustand nicht in einem organischen Lösungsmittel (Heptan) dispergiert werden, was aber für den späteren Einsatz wichtig war. Die Hydrogelpartikel agglomerierten umgehend und ließen sich auch nicht durch Rühren voneinander trennen. Um im Folgenden eine Dispergierbarkeit der Partikel zu erreichen, wurden drei verschiedene Maßnahmen getroffen.

- **Steifigkeit:** Eine Erhöhung der Steifigkeit der gequollenen Partikel sollte zu einer besseren Dispergierbarkeit führen. Die höhere Steifigkeit kann unter anderem durch eine Steigerung der Vernetzerkonzentration erreicht werden. Dies führt vor allem zu einer Verringerung des Quellgrades und damit zu einer besseren Steifigkeit.
- **Sphärisch:** Durch die Synthese von sphärischen Partikeln sollte die mögliche Kontaktfläche zwischen den einzelnen Partikeln verringert werden, um so ebenfalls eine bessere Dispergierbarkeit zu erreichen. Ein weiterer Vorteil von kugelförmigen Partikeln ist die genauere und bekannte Partikeloberfläche, was zu besseren Ergebnissen in Bezug auf die Reproduzierbarkeit führt.
- **Tenside:** Eine bessere Dispergierbarkeit kann durch die Zugabe von Tensiden erreicht werden.

Somit wurde im nächsten Schritt erfolgreich eine Suspensionspolymerisation von sphärischen Hydrogelpartikeln mit unterschiedlichen Vernetzerkonzentrationen entwickelt. Die so erhaltenen Partikelgrößen lagen, wie in Abbildung 2.31 zu sehen, hauptsächlich zwischen 0,150 μm und 0,315 μm .

Trotz der gesteigerten Vernetzung und damit der geringeren Quellung, sowie der Synthese kugelförmiger Partikel, konnten diese Partikel nicht ausreichend in Heptan dispergiert werden, so dass auf den Einsatz von Tensiden an dieser Stelle nicht verzichtet werden konnte. Der Einsatz verschiedener Tenside erlaubte die Dispergierung der Partikel. Der Einfluss der dieser Tenside auf die Aktivität des Enzyms wurde an späterer Stelle überprüft.

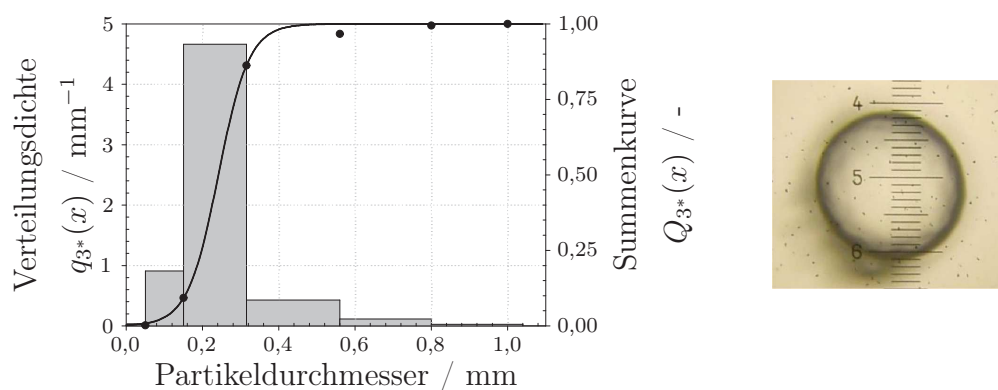


Abbildung 2.31: Verteilung der Partikeldurchmesser aus der Suspensionspolymerisation der ionischen Hydrogele mit einer Vernetzerkonzentration von 6 %. Bild eines gequollenen Hydrogelpartikels. (Skala mit relativer Gradierung.)

2.5.4.2 Immobilisierung

Die ersten Immobilisierungsversuche wurden mit den Proteinen BSA (Rinderserum Albumin) und WEA (Hühnereiweiß Albumin) durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine Lösung der jeweiligen Albumine in Wasser hergestellt und anschließend die trockenen Hydrogelpartikel dazugegeben. Dabei konnte gezeigt werden, dass keines der beiden Proteine immobilisiert werden konnte. Vergleicht man die nach Kapitel 2.5.1.3 berechneten Maschenweiten des Hydrogels in Tabelle 2.3 mit den Proteingrößen in Tabelle 2.4, so ist zu erkennen, dass dies aber theoretisch möglich sein sollte.

Tabelle 2.3: Berechnete Maschenweiten bei unterschiedlichen Vernetzerkonzentrationen nach Gleichung 2.52.

Anteil Vernetzer	Quellgrad	M_c	$(\bar{r}_0^2)^{1/2}$	Maschenweite ξ
mol%	$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	g/mol	nm	nm
0,75	320	10 483	6,63	45,4
1,5	221	5679	4,70	28,4
3,0	172	3277	3,34	18,6
6,0	109	2076	2,38	11,4

Bedenkt man allerdings, dass das Hydrogel bei neutralen pH-Werten anionische Gruppen besitzt und dass die Albumine mit einem isoelektrischen Punkt von

Tabelle 2.4: Enzym- und Proteingrößen.

Protein	Molare Masse	Größe
	kDa	nm
Rinderserum Albumin (BSA)*	67	14 x 4 x 4
Hühnereiweiß Albumin (WEA)**	43	5,05
<i>Candida Rugosa</i> Lipase (CRL)**	57	5,54

* nach [127]; ** nach Gleichung 2.50

$pI = 4,7$ ebenfalls bei neutralen pH-Werten in der Summe negativ geladen sind, so wird schnell deutlich, dass eine Immobilisierung erst bei pH-Werten kleiner oder gleich des isoelektrischen Punktes möglich sein kann. Somit wurde im nächsten Versuch die gleiche Immobilisierung bei $pH=pI=4,7$ durchgeführt. Wie in Abbildung 2.32 zu erkennen, führte dies aufgrund der schnellen und starken Quellung zu einem kurzzeitigen Anstieg der Konzentration im Überstand, die dann aber rasch wieder abnahm. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Konzentration im Überstand unter die Ausgangskonzentration sank, was auf eine Beladung der Hydrogele schließen lässt, die größer als die Konzentration der Ausgangslösung ist. Für die Immobilisierung bedeutet dies, dass eine Wechselwirkung zwischen dem Hydrogel und

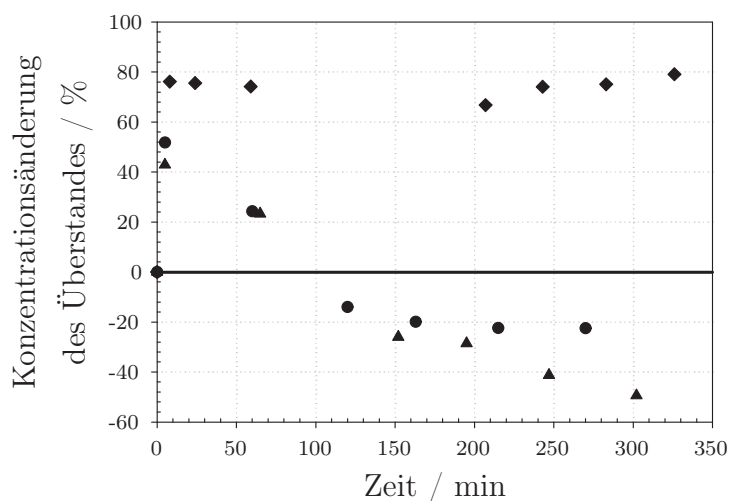


Abbildung 2.32: Absorption von Hühnereiweiß Albumin (WEA) durch ionisches Hydrogel. Rechtecke: bei $pH = 5,5$, Kreise und Dreiecke bei $pH = 4,7$; Vernetzung: $\blacklozenge$ und $\bullet$ 1,5 %, $\blacktriangle$ 3 %.

dem Protein stattfindet. Nach einer Stunde Immobilisierungszeit liegt die Beladung des feuchten Hydrogels mit WEA bei ca. $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Im nächsten Schritt sollte nun die Immobilisierung der *Candida rugosa* Lipase erfolgen. Aus der Literatur ist bekannt, dass deren isoelektrischer Punkt bei einem pH-Wert von 4,2 liegt.^[128] Somit muss die Immobilisierung zwangsläufig bei einem $pH \leq pI = 4,2$ erfolgen. Diese Voraussetzung steht nicht dem pH-Wert der später betrachtete Veresterung entgegen. Nach Buthe ist es für lipasenkatalysierte Veresterungsreaktionen immer empfehlenswert, bei pH-Werten unterhalb des pKs Wertes der jeweiligen Säure zu arbeiten, zumindest „sofern nicht pH-bedingte inaktivierende Effekte auf die Enzymkonformation überwiegen“.^[53] Erklärt wird dies dadurch, dass bei niedrigen pH-Werten die Säure größtenteils in ihrer protonierten Form vorliegt. Aufgrund von negativen Ladungen am aktiven Zentrum der Lipase wird die deprotonierte Form der Säure nicht als Substrat akzeptiert. Somit wurde von Buthe für die Veresterung von 1-Butanol **17** mit Propionsäure **18** ein (breites) pH-Optimum zwischen 3 und 4 gefunden.^[53] Dies bedeutet, dass der relativ niedrige pH-Wert, welcher für die Immobilisierung benötigt wird, keine negative Auswirkung auf die Enzymaktivität hat. Die Frage, ob die *Candida rugosa* Lipase eine ausreichende Stabilität bei pH-Werten am Aktivitätsoptimum aufweist, konnte bereits im Kapitel 2.4.3 geklärt werden (siehe auch Abbildung 2.24). Abbildung 2.24 zeigt, dass die Lipase bei pH-Werten von kleiner 3 schnell an Aktivität verliert, aber dass sie bereits ab einem $pH = 3$ eine gute Stabilität aufweist. Somit kann die Immobilisierung ohne signifikant negative Einflüsse auf die Stabilität bei einem pH-Wert zwischen 3 und 4 durchgeführt werden. Dies entspricht dem pH-Optimum der Lipase für diese Reaktion und wird für die Immobilisierung favorisiert.

2.5.4.3 Katalyse

Die ersten Versuche zur Immobilisierung der CRL zeigten nach einer Stunde eine Beladung von $0,3 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{feuchtes Hydrogel}}^{-1}$. Beim Einsatz dieses Hydrogels zur Veresterung von **17** mit **18** im Zweiphasensystem mit Hexan wurde ohne Zugabe von Tensid unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine Reaktionsgeschwindigkeit von $0,024 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ erreicht. Dabei agglomerierte das Hydrogel, wie bereits zuvor erwähnt, sehr stark. Durch Rühren bildete sich jedoch nicht nur ein einzelnes

Agglomerat sondern das Hydrogel klebte an der Wand des Gefäßes. Um dies zu vermeiden wurde nach einem geeigneten Tensid gesucht, welches die Partikel dispergiert, jedoch keinen negativen Einfluss auf das Enzym ausübt. Analog zu den Arbeiten von Doumèche *et al.*^[129] wurde dabei festgestellt, dass das Tensid AOT zwar zu einer guten Dispersion der Partikel in Hexan führt, dass aber die Lipase bzw. das Immobilisat vollständig deaktiviert wird. Unter den getesteten Tensiden erwies sich ein Gemisch aus Igepal CA-520 und Igepal CA-210 als Bestes. Durch dessen Verwendung konnte die Reaktionsgeschwindigkeit geringfügig auf $0,031 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ gesteigert werden. Die Haftung des nicht stabilisierten Hydrogels an der Wandung des Reaktionsgefäßes und die somit vorhandene relativ große Oberfläche erklärt den nur geringen Aktivitätszuwachs.

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass eine Immobilisierung an einem solchen Hydrogel möglich ist und bereits recht gute Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht werden können. Die Immobilisierung sollte daher in zwei Richtungen weiter verbessert werden. Zum einen sollte die Aktivität (z. B. durch eine Erhöhung der Beladung) der Immobilisate weiter gesteigert werden, zum anderen sollte eine Möglichkeit gefunden werden, die es erlaubt, die Partikel ohne Zugabe von Tensiden zu dispergieren. Dazu wurde die Immobilisierungstechnik weiterentwickelt. Durch eine Verlängerung der Immobilisierungsdauer von 1 h auf 48 h, permanente Kontrolle und Einstellung des pH-Wertes im Autotitrator sowie einer Steigerung der Konzentration der verwendeten CRL-Lösung (von $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), konnte die Beladung der Partikel um einen Faktor von ca. 50 erhöht werden (Abbildung 2.33). Durch die Zugabe von CaCl_2 zur Immobilisierungslösung konnte die Quellung der Partikel ein wenig reduziert und die Festigkeit der Partikel erhöht werden. Ein weiterer wichtiger Faktor zur Stabilisierung der Partikel im Zweiphasensystem war das Entfernen von Oberflächenwasser, was häufig schnell zu einem Verkleben der Partikel führt. Durch kurzes Schleudern der Partikel konnte dies sehr gut realisiert werden. Durch eine Kombination dieser Verbesserungen wurde erreicht, dass die Partikel ohne Zusatz von Tensiden in Hexan dispergiert werden konnten. Zusammen mit der Erhöhung der Beladung konnte so die Aktivität um fast zwei Zehnerpotenzen gesteigert werden (Abbildung 2.34).

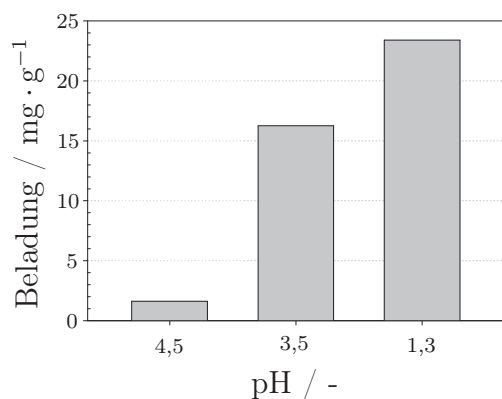


Abbildung 2.33: Abhängigkeit der Beladung vom pH-Wert.

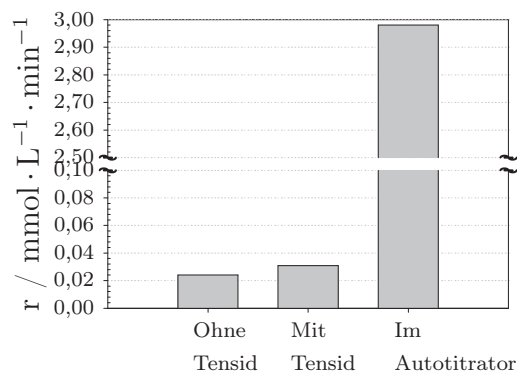
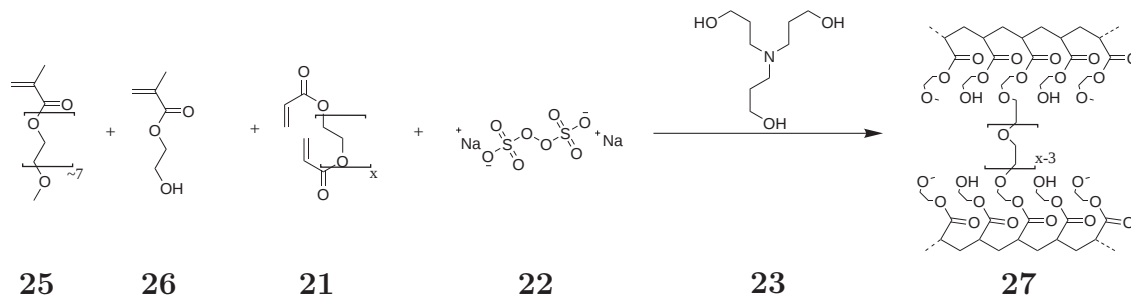


Abbildung 2.34: Reaktionsgeschwindigkeiten verschiedener ionischer Immobilisate.

2.5.5 Nicht ionische Immobilisierungsmatrix

2.5.5.1 Polymerisation

Die ionischen Hydrogele im vorherigen Abschnitt zeigten bereits eine sehr gute Aktivität. Nachteilig an diesen Immobilisaten ist allerdings, dass sie nur für Reaktionen eingesetzt werden können, die ihr Optimum bei pH-Werten unterhalb des pI-Wertes des entsprechenden Enzyms besitzen. Für alle anderen Reaktionen ist eine ausreichende Immobilisierung nicht möglich. Auch ist diese Technik nur auf Enzyme anwendbar, die bei den niedrigen pH-Werten eine ausreichende Stabilität aufweisen. Somit sollte im Folgenden versucht werden ein Hydrogel zu finden, welches eine Immobilisierung unabhängig vom pH-Wert erlaubt. Daher wurde ein Hydrogel auf Basis von 2-Hydroxyethylmethacrylat **26** und Methoxypolyethylenglykol 350-methacrylat **25** entwickelt (Schema 2.7). Als Vernetzer wurde erneut Polyethylenglykoldimethacrylat **21** verwendet. Copolymere auf Basis dieser Monomere zeigen Quellungen von bis zu 1000 %, abhängig von ihrer Zusammensetzung. Dadurch eignen sie sich als eine mögliche Matrix zur Immobilisierung von Enzymen. Die Polymerisation erfolgte als Lösungspolymerisation in Wasser. Das Hydrogel wurde im Anschluss an die Polymerisation zerkleinert, getrocknet und fraktioniert.



Schema 2.7: Synthese eines nicht ionischen Hydrogels.

2.5.5.2 Immobilisierung

In einem ersten Versuch sollte überprüft werden, ob das Enzym aufgrund seiner Größe die Möglichkeit hat durch die Maschen eines solchen Hydrogels zu diffundieren. Dazu wurde zunächst das Protein WEA während der Polymerisation in das Hydrogel eingebaut. Anschließend wurde das zerkleinerte Hydrogel in VE-Wasser gegeben und das Auswaschen des Proteins betrachtet. Dieser Vorgang wurde zehn Mal wiederholt. Wie aus Abbildung 2.35 ersichtlich, konnte das Protein WEA ohne große Widerstände durch das Hydrogel diffundieren. Dies zeigte, dass eine Diffusion des Proteins innerhalb des Hydrogels möglich ist und somit auch der umgekehrte Prozess möglich sein sollte.

Dies wurde nun im nächsten Versuch bestätigt. Abbildung 2.36 zeigt die Beladung

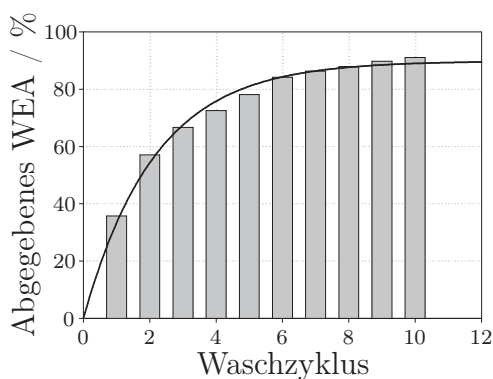


Abbildung 2.35: Auswaschen von WEA aus nicht ionischem Hydrogel.

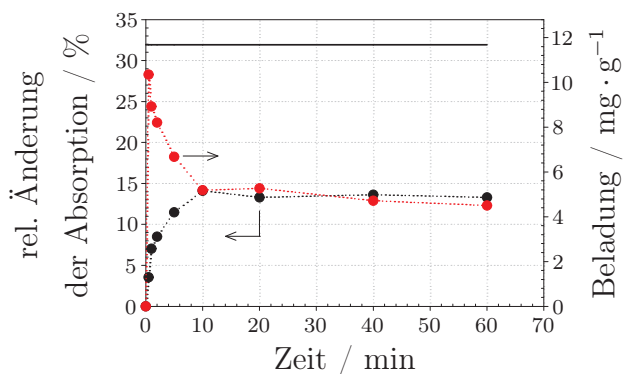


Abbildung 2.36: Immobilisierung von Hühnereiweiß Albumin (WEA) in ein nicht ionisches Hydrogel.

eines nicht ionischen Hydrogelpartikels der gleichen Zusammensetzung über die Zeit. Auf der linken Ordinatenachse ist die relative Änderung der Proteinkonzentration in der Immobilisierungslösung zu sehen, auf der Rechten ist die Beladung dargestellt. Die Linie deutet die maximale relative Änderung und die maximale Beladung an. Die maximale relative Änderung beschreibt den Fall, dass kein Protein aufgenommen wurde. Die maximale Beladung zeigt den Fall, wenn im Hydrogel sowie in der Immobilisierungslösung gleiche Konzentrationen vorliegen. Die Grafik zeigt, dass eine Diffusion des Proteins WEA in das Hydrogel stattfindet, dass jedoch nicht die volle Beladung der Partikel erfolgt. Zu Beginn der Immobilisierung der Partikel ist die Beladung scheinbar größer als im Gleichgewicht. Dies liegt daran, dass schon ab der ersten Messung für die Berechnung die volle Quellung angenommen wurde. Das Erreichen des Quellgleichgewichtes dauert jedoch einige Minuten. Für alle getesteten Hydrogelzusammensetzungen wurde festgestellt, dass das Protein nicht vollständig in die Matrix eindiffundiert. Die Beladungseffizienz beträgt ca. 50 %. Eine genaue Erklärung konnte bisher nicht identifiziert werden.

2.5.5.3 Katalyse

Nachdem anhand der Diffusion von WEA in ein nicht ionisches Hydrogel erfolgreich gezeigt werden konnte, dass eine Immobilisierung durch nachträgliches Eindiffundieren in ein solches Gel möglich ist, wurde im Folgenden die CRL immobilisiert. Die Aktivität wurde direkt anhand der für den eigentlichen Prozess interessanten Veresterung von 1-Phenylethanol **2** mit Butansäure **3** getestet. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration im Zweiphasensystem Wasser/Heptan betrachtet. Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt in denen einmal nur die Konzentration an **2** variiert wurde und das andere Mal simultan beide Konzentrationen. Abbildung 2.37 zeigt in beiden Fällen einen Anstieg der Aktivität mit der Konzentration bis zu einer Konzentration von $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, danach nimmt die Aktivität langsam wieder ab. Es ist lediglich ein leichter Unterschied in der Höhe der Aktivität zu beobachten (Abbildung 2.37). Somit wurde im Folgenden bei einer Säurenkonzentration von 250 mM und einer Phenylethanolkonzentration **2** von 75 mM gearbeitet.

Anschließend wurde das pH-Optimum für diese Reaktion im Zweiphasensystem

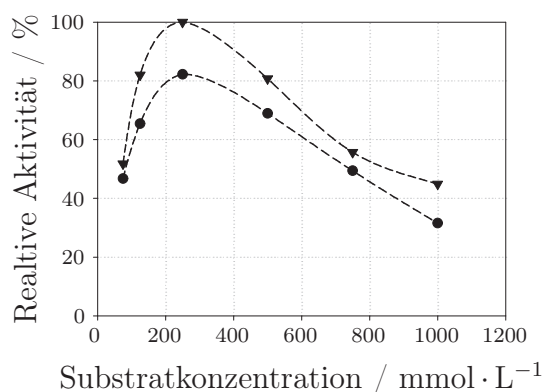


Abbildung 2.37: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration. ● $c_2 = 75 \text{ mM}$; ▲ beide Substrate gleich variiert.

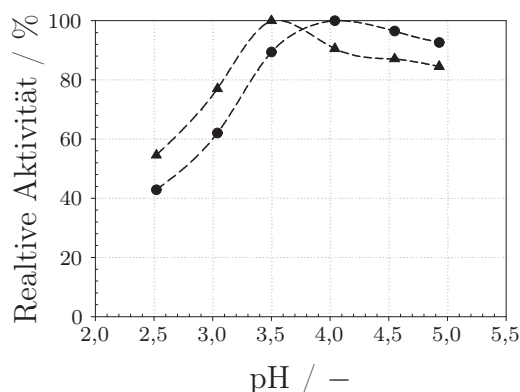


Abbildung 2.38: pH-Optimum der enzymatischen Veresterung von **2** mit **3** im Zweiphasensystem (●) und im nicht ionischen Immobilisat (▲).

Wasser/Heptan bestimmt (Abbildung 2.38). Wie aus der Literatur für Veresterungen bekannt,^[53] liegt auch dieses Optimum im sauren Bereich und zeigt ein relativ breites Optimum um einen pH von 4. Mit dieser Kenntnis wurde anschließend die Immobilisierung bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt und darauffolgend die Aktivität der Immobilisate betrachtet. Dieses Verhalten ist ebenso in Abbildung 2.38 zu sehen. Dabei ist zu erkennen, dass sich das Optimum leicht zu niedrigeren pH-Werten um 3,5 verschiebt, was auf einen Einfluss der Immobilisierungsmatrix auf das Enzym hindeutet. Dies wäre auch eine Begründung dafür, dass das Enzym nicht bis zur theoretisch maximalen Beladung in das Hydrogel diffundiert.

Nach der Optimierung dieser beiden Parameter wurde als nächstes der Einfluss der Partikeldurchmesser auf die Aktivität der Partikel betrachtet. Dazu wurde eine der hergestellten Hydrogelchargen gesiebt und die unterschiedlichen Partikelfraktionen zur Immobilisierung eingesetzt. Wie in der Abbildung 2.39 zu sehen, existiert eine deutliche Abhängigkeit zwischen dem Partikeldurchmesser und der Aktivität. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde aus der Produktbildung innerhalb der ersten 5 h bestimmt. Da innerhalb dieser Zeit lediglich ein Umsatz von weniger als 2 % erreicht wurde, ist eine Massentransferlimitierung als Begründung für die Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser auszuschließen. Vielmehr ist diese Beobachtung analog zu den Ergebnissen von Buthe zu sehen, der als Begründung postuliert, dass nur die

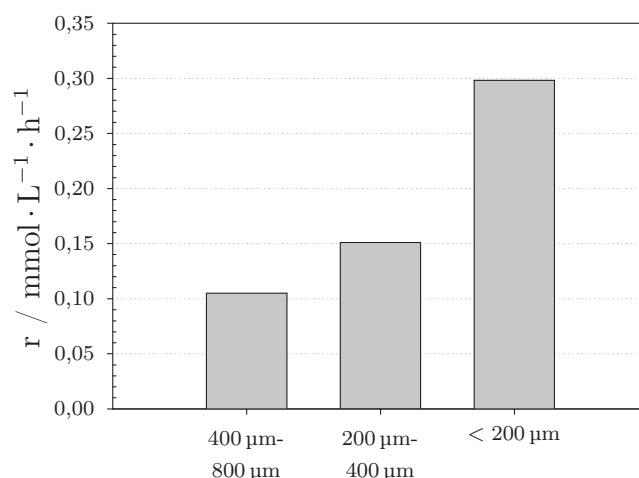


Abbildung 2.39: Aktivität der an ein nicht ionisches Hydrogel immobilisierten *Candida rugosa* Lipase bei der Veresterung von 1-Phenylethanol **2** mit Butansäure **3** in Abhängigkeit der Partikeldurchmesser.

Enzyme an der Grenzfläche für die Produktbildung verantwortlich sind. Dies resultiert jedoch wahrscheinlich nicht aus der viel diskutierten Grenzflächenaktivierung der CRL sondern aus thermodynamischen Gründen.^[53] Buthe ist der Meinung, dass die Enzyme an der direkten Phasengrenzfläche formal der organischen Phase zugeordnet werden können, was sich positiv auf das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion ausübt. Für die Enzyme in der Bulkphase liegt das Gleichgewicht stark auf der Seite der Edukte. Somit können bei einer Vergrößerung der Phasengrenzfläche mehr Enzyme effektiv die Reaktion katalysieren.

Eine Betrachtung der unterschiedlichen Zusammensetzung der Hydrogele, d. h. eine Variation der Vernetzerkonzentration sowie eine Änderung des Verhältnisses 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) **26** zu Methoxypolyethylenglykol 350-methacrylat (MPEG 350 MA) **25** zeigt zwar eine Abhängigkeit der Aktivität von diesen Parametern, es lässt sich jedoch kein eindeutiger Trend erkennen. Begründet wird dies durch verschiedene gegenläufige Effekte. So führt eine Steigerung der Vernetzerkonzentration zunächst den Erwartungen entsprechend zu einer leichten Abnahme des Quellgrades (bis 10 mol% Vernetzer), jedoch steigt dieser später wieder an. Die Ursache dafür ist die relativ hohe Molmasse des Vernetzers, weshalb bei Vernetzerkonzentrationen von $> 10 \text{ mol\%}$ die Eigenschaften des Vernetzers überwiegen.

Hinzu kommen direkte Einflüsse der Polymerzusammensetzung auf die Enzymaktivität. Aus diesen Gründen kann keine allgemeine Aussage über die Auswirkungen der Hydrogelzusammensetzung auf die Aktivität getroffen werden.

Führt man jedoch die Immobilisierung bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen durch, so kann zunächst beobachtet werden, dass die Beladung der Partikel linear mit der Proteinkonzentration in der Ausgangslösung ansteigt. Abbildung 2.40 zeigt diese Abhängigkeit bezogen auf die Gesamtmasse des Immobilisates und auf die Masse des eingeschlossenen Wassers. Im letzteren Fall ist zu erkennen, dass die Effizienz der Beladung auch für die CRL ca. 50 % beträgt, ähnlich wie es auch zuvor für das WEA beobachtet wurde. Abbildung 2.41 zeigt die Aktivität der Immobilisate in Abhängigkeit von der Beladung. Dabei zeigt sich deutlich, dass bei steigender Beladung die Aktivität pro Gramm Immobilisat nahezu linear mit der Beladung zunimmt. Anhand dieses Trends kann angenommen werden, dass es bei einer weiteren Steigerung der Beladung zu einer weiteren Steigerung der Aktivität kommt. Dies war jedoch bei dem verwendeten Lyophilisat aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht praktikabel, sollte jedoch durch die Verwendung einer weiter aufgereinigten Lipase möglich sein. Aus der gleichen Abbildung ist jedoch auch zu erkennen, dass die höchste spezifische Aktivität bei der geringsten Beladung gemessen wird. Somit

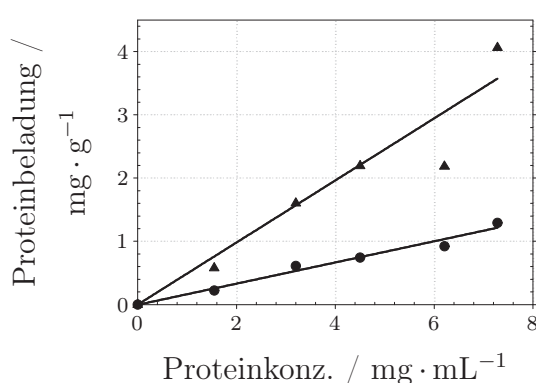


Abbildung 2.40: Abhängigkeit der Proteinbeladung von der Ausgangskonzentration. ● Bezogen auf das gesamte Immobilisat; ▲ bezogen auf das im Hydrogel enthaltene Wasser.

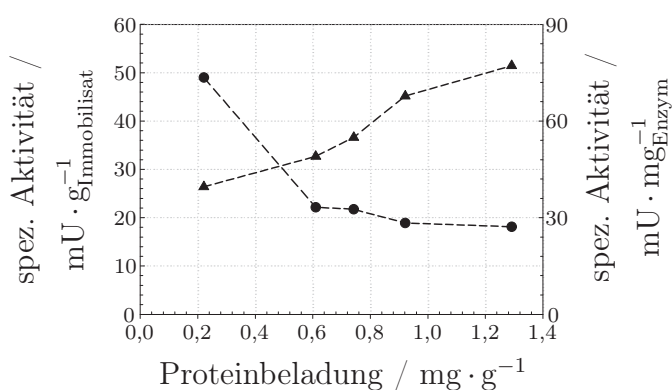


Abbildung 2.41: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Proteinbeladung. ▲ Aktivität pro Gramm Immobilisat; ● Aktivität pro Milligramm Enzym.

muss im Fall einer praktischen Anwendung solcher Immobilisate ein guter Kompromiss zwischen beidem gefunden werden.

2.5.6 Vergleich von ionischer und nicht ionischer Immobilisierungsmatrix

Nachdem beide Immobilisierungstechniken weitestgehend optimiert waren, wurde die Qualität beider Techniken untereinander verglichen. Dabei war zum einen die Aktivität der Partikel von Interesse, zum anderen auch die Möglichkeit der Rezyklierung, also die Stabilität. Abbildung 2.42 zeigt die Aktivität der Immobilisate in Abhängigkeit der Rezyklierung für die Veresterung von 1-Phenylethanol **2** mit Butansäure **3**. Dabei ist zunächst zu erkennen, dass die Aktivität der ionischen Immobilisate knapp viermal höher liegt als die Aktivität der nicht ionischen Immobilisate. Dies ist zum Einen dadurch begründet, dass die Beladung der ionischen Hydrogele mit ca. $20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ höher liegt als die Beladung der nicht Ionischen (ca. $1,2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Zum anderen ist auch zu vermuten, dass im Fall der ionischen Hydrogele vermehrt eine Immobilisierung an der Partikeloberfläche stattfindet, was die Reaktionsgeschwindigkeit begünstigen würde. REM-Untersuchungen an der Partikeloberfläche der ionischen Hydrogele zeigten zum Teil eine veränderte Oberfläche, was auf eine starke Immobilisierung an dieser Stelle hindeuten könnte. Jedoch konnte diese Vermutung bisher nicht sicher belegt werden.

Die bevorzugte Immobilisierung an der Partikeloberfläche würde auch eine Erklärung dafür bieten, dass die Stabilität der CRL im Fall der ionischen Hydrogele um ein Vielfaches geringer ist als für die nicht ionischen Hydrogele. So ist für diese Reaktion kein Rezyklieren der ionischen Hydrogele möglich. Die nicht ionischen Hydrogele zeigen hingegen im zweiten Durchlauf noch 44 % der ursprünglichen Aktivität und selbst nach dem vierten Durchlauf sind noch 13 % der Aktivität messbar.

Da zunächst angenommen wurde, dass die Desaktivierung stark von der Reaktion abhängig ist, wurde ein weiterer Vergleich der beiden Immobilisate mit der Veresterung von 1-Butanol **17** mit Propionsäure **18** durchgeführt. In Abbildung 2.43 ist zu erkennen, dass es auch in diesem Fall zu einer starken Desaktivierung kommt, allerdings in einem geringeren Ausmaß als zuvor. So ist diesmal für das ionische

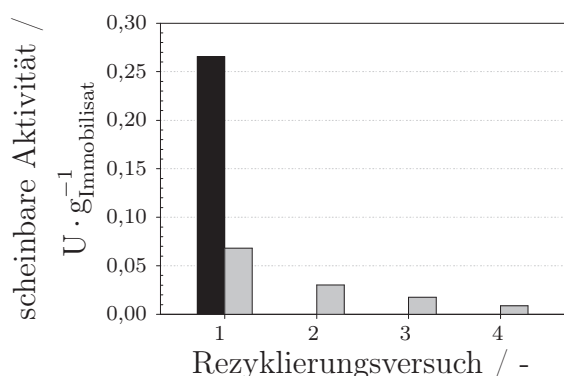


Abbildung 2.42: Aktivität der Immobilisate für die Veresterung von 1-Phenylethanol **2** mit Butansäure **3** in Abhängigkeit des Rezyklierungsversuches. Schwarze Balken: ionisches Hydrogel; graue Balken: nicht ionisches Hydrogel.

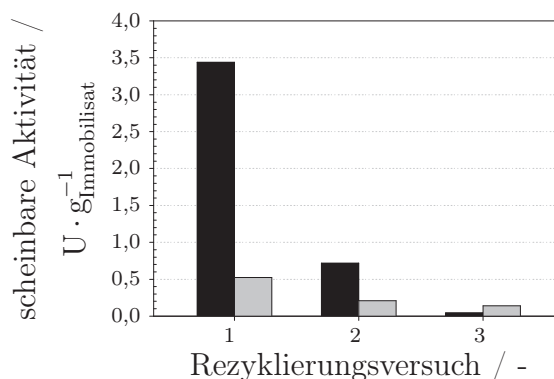


Abbildung 2.43: Aktivität der Immobilisate für die Veresterung von 1-Butanol **17** mit Propionsäure **18** in Abhängigkeit des Rezyklierungsversuches. Schwarze Balken: ionisches Hydrogel; graue Balken: nicht ionisches Hydrogel.

Hydrogel noch eine Aktivität von 21 % der ursprünglichen Aktivität messbar. Für das nicht ionische Hydrogel ist erneut zu erkennen, dass die Aktivität geringer ist als für das ionische Hydrogel, allerdings weist es auch erneut eine bessere Stabilität auf. So fällt dessen Aktivität im zweiten Durchlauf auf 40 % und im Dritten auf 27 %. Somit ist eine deutlich bessere Stabilität der nicht ionischen Hydrogele erkennbar.

Um zu bestimmen, welchen Anteil eines der Substrate oder das Produkt an der Stabilität hat, wurden im Folgenden drei Vergleiche gemacht. Zunächst wurde eine gewisse Menge an CRL nicht ionisch immobilisiert. Ein Teil dieses Immobilisates wurde dann wie bisher für die Veresterung zu **19** verwendet. Nach 5 h Reaktionszeit wurde das Immobilisat gewaschen und bei 8 °C aufbewahrt. Ein zweiter Teil des Immobilisates wurde den gleichen Bedingungen ausgesetzt wie der erste Teil, jedoch wurden keine Substrate zugegeben. Zu dem dritten Teil wurde nach der Immobilisierung die organische Phase zugefügt und anschließend ohne weitere Behandlung im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde erneut mit jedem dieser Immobilisaten die Veresterung durchgeführt. Für das Immobilisat, welches bereits für die Reaktion verwendet wurde, war eine Abnahme der Aktivität von 86 % festzu-

stellen*. Die beiden anderen Proben zeigten lediglich eine Abnahme der Aktivität um 20 %. Zwischen dem zweiten und dritten Teil der Probe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Das bedeutet, dass ein Teil der Desaktivierung zwar durch das Immobilisat verursacht wird, dass aber die Kombination mit der Reaktion eine weitaus stärkere Desaktivierung herbeiführt.

Dieses Verhalten ist auch zu erkennen, wenn man sich erneut die Abhängigkeit der Aktivität der nicht ionischen Hydrogelimmobilisate von der Substratkonzentration anschaut. Abbildung 2.44 zeigt deutlich, dass es zu einer leichten Verschiebung des Optimums zu geringeren Konzentrationen kommt und dass die Kurve zu höheren Konzentrationen wesentlich stärker abfällt.

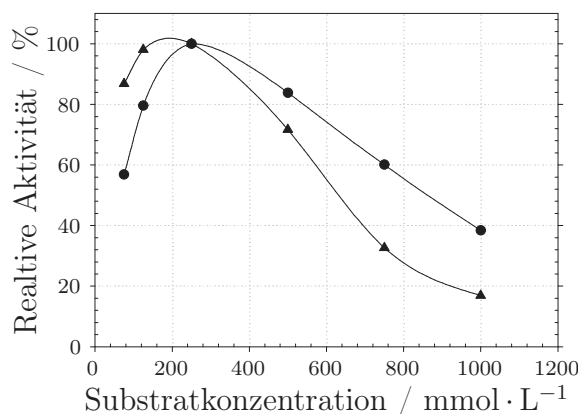


Abbildung 2.44: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration.

● Zweiphasensystem; ▲ mit Immobilisat.

In einem letzten Schritt wurde die Anwendbarkeit der Immobilisate in überkritischem CO₂ getestet. Dabei war es aus apparatetechnischen Gründen nicht möglich, das gleiche Verhältnis von Immobilisat zur nicht reaktiven Phase wie zuvor zu wählen. Dennoch konnte für die Veresterung von **17** mit **18** ein Umsatz für beide Immobilisate gemessen werden. Die gefundenen Aktivitäten waren jedoch um ein Vielfaches kleiner als in Heptan. So betrug die Aktivität der ionischen Hydrogele

*Die Abnahme ist größer als in den zuvor beschriebenen Stabilitätsmessungen, da die Reaktion statt bei RT bei 30 °C im Schüttelbad durchgeführt wurde. Dies war zuvor zum Vergleich mit den ionischen Hydrogelen nicht möglich, da diese gerührt werden müssen.

$0,043 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{Immobilisat}}^{-1}$ und die der nicht ionischen $0,027 \text{ U} \cdot \text{g}_{\text{Immobilisat}}^{-1}$. Die Aktivitäten in dem System mit überkritischem Kohlenstoffdioxid sind somit um ein Vielfaches langsamer als in dem System mit Heptan (lediglich 1 % für das ionische Hydrogel und 5 % für das nicht ionische Hydrogel).

2.5.7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei unterschiedliche Techniken entwickelt werden, die eine nachträgliche Enzymimmobilisierung in zuvor hergestellten Hydrogelpartikeln erlauben. Die erste Technik nutzt zur Immobilisierung ionische Hydrogele auf Basis von Acrylsäure. Die Vorteile dieser Variante sind insbesondere die höheren möglichen Beladungen sowie die damit verbundenen weitaus höheren Aktivitäten. Nachteil dieser Variante ist allerdings die lange Immobilisierungszeit von 48 h. Die Immobilisierung kann je nach verwendetem Enzym nur bei niedrigen pH-Werten erfolgen. Dies ist kein Nachteil für Reaktionen, die, wie in diesem Fall, einen niedrigen pH benötigen, jedoch ist die generelle Anwendbarkeit dieser Technik dadurch eingeschränkt.

Die Immobilisierung an nicht ionischem Hydrogel ist genereller einsetzbar und benötigt nur sehr kurze Immobilisierungszeiten von einer halben Stunde. Diese Immobilisate zeigen eine deutlich bessere Stabilität, wenn auch bei insgesamt niedrigerer Aktivität. Der Einsatz von beiden Hydrogelen als Immobilisierungsmatrix für die *Candida rugosa* Lipase zur kinetischen Racematspaltung in der kontinuierlichen Anlage scheint dennoch bisher aufgrund zu geringer Aktivitäten und Stabilitäten nicht erfolgversprechend. Aus diesem Grund wurde für die Demonstration der kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung zunächst auf das kommerzielle Enzymimmobilisat Novozym[®]435 zurückgegriffen.

2.6 Entwicklung einer kontinuierlichen Hochdruckanlage

2.6.1 Einleitung

In vielen chemischen Projekten entscheidet der verwendete Katalysator über die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses. Aufgrund der häufig sehr hohen Katalysatorkosten ist dabei das Zusammenspiel von Aktivität und Stabilität des Katalysatorsystems unter Prozessbedingungen ausschlaggebend. Diese beiden Faktoren können durch verschiedene Parameter beeinflusst werden. So führt z. B. eine erhöhte Temperatur in der Regel zu einer erhöhten Anfangsaktivität, jedoch auch häufig zu einer verminderten Katalysatorstabilität und Selektivität. Aber auch andere Faktoren wie beispielsweise die Substratkonzentrationen können die Katalysatoreigenschaften entscheidend verändern. So bedeuten zu geringe Substratkonzentrationen eine nicht optimale Ausnutzung des Katalysators, während zu hohe Konzentrationen zum Teil zu reversiblen oder irreversiblen Inhibierungen führen.

Reaktionstechnische Fragestellungen lassen sich zu Beginn der Entwicklungen von neuen Prozessen häufig aufgrund von mangelnden Katalysatormengen schwer beantworten.^[130] Das Testen der Katalysatorperformance in Batchversuchen ist oft nicht ausreichend, um Rückschlüsse auf eine kontinuierliche Anwendbarkeit zu ziehen. Durch die Miniaturisierung oder den „Scale-Down“ von kontinuierlichen Prozessen lassen sich Katalysatoren in frühen Projektphasen unter Prozessbedingungen testen und beurteilen. Ebenfalls werden dadurch geringere Mengen an Chemikalien benötigt, was aus ökonomischer und ökologischer Sicht von Vorteil ist. Für das in dieser Arbeit vorgestellte Reaktorkonzept für eine kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung mit scCO_2 als mobile Phase beinhaltet der „Scale Down“ darüber hinaus die Steigerung der Sicherheit aufgrund eines geringeren Produktes aus Druck und Volumen.

Für die Konzipierung einer solchen kontinuierlich betriebenen Versuchsanlage sind in der Literatur verschiedene Arbeiten zu finden (für Beispiele siehe ^[25, 69, 131]). Verbesserungen im Bereich der präzisen Einstellung von Prozessbedingungen (z. B. Druck, Temperatur, Verweilzeit), der Implementierung einer online Analytik und

der Automatisierung sind nicht nur möglich sondern zum Teil auch nötig, um die Qualität und Quantität der erzielbaren Ergebnisse zu steigern.

2.6.2 Zielsetzung

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit eine Anlage entwickelt, die insbesondere die folgenden Kriterien erfüllen sollte:

- **Präzision**

- Um ein Überschreiten der Löslichkeitsgrenzen sowie Konzentrations- und Verweilzeitänderungen zu vermeiden, ist auf einen sehr genauen und konstanten Systemdruck zu achten.
- Um stets eine definierte Verweilzeit sowie eine konstante Substratkonzentration zu gewährleisten, sind die Volumenströme des CO_2 und des Substrats sehr genau einzustellen.
- Zum Arbeiten unter optimalen Reaktionsbedingungen müssen die Reaktortemperaturen genau einstellbar sein. Um homogene Lösungen in der gesamten Anlage und damit stabile Prozesse zu ermöglichen, ist die genaue Einstellung der Temperaturen in allen Bereichen der Anlage äußerst wichtig.

- **Minimierung**

- Geringe Reaktorvolumina sind sowohl aus Sicherheitsgründen als auch aus Kostengründen bezüglich der einzusetzenden Mengen an Chemikalien von Vorteil. Um aber dennoch ausreichende Verweilzeiten ermöglichen zu können, werden sehr kleine Volumenströme benötigt.

- **Experimentelle Bedingungen**

- Die Anlage soll für Drücke von bis zu 400 bar ausgelegt sein.
- Auch die kontinuierliche Zuführung von Substraten mit Schmelzpunkten leicht oberhalb der Raumtemperatur soll gewährleistet sein.
- Es ist auf ein breites Spektrum an möglichen Reaktionen zu achten. So soll auch die Zuführung weiterer Gase wie z. B. H_2 möglich sein.

- **Analytik**

- Um möglichst viele Informationen zu erhalten, soll eine inline- oder online-Analytik etabliert werden.

- **Modular**

- Die Anlage soll modular aufgebaut sein, um so auch den Einsatz verschiedener Reaktortypen zu erlauben.
- Es soll die Möglichkeit gegeben sein, während einer laufenden Reaktion von einem Strömungsrohr auf einen Schlaufenreaktor umzustellen.

- **Prozessüberwachung und Automatisierung**

- Die vollständige Automatisierung soll die Sicherheit des Prozesses erhöhen und die Reproduzierbarkeit der Versuche verbessern.
- Die genaue Überwachung und Registrierung sämtlicher entscheidender Prozessparameter soll das Einhalten aller Bedingungen über die gesamte Versuchsdauer sicherstellen und so die Qualität der Ergebnisse weiter steigern und helfen mögliche Fehlerquellen zu beseitigen.

- **Mobil**

- Die Anlage soll möglichst einfach beweglich und auch an anderen Plätzen installierbar sein.

2.6.3 Dosierung

In Abbildung 2.45 ist das Fließbild zu der entwickelten Anlage zu sehen. Nach bestem Wissen sind bis heute keine kommerziell verfügbaren Massenflussregler für CO₂ für die erforderlichen Bedingungen erhältlich. Der Grund dafür liegt in der Quellung der Polymerdichtungen durch CO₂ als auch in der Natur von überkritischen Fluiden und ihrem inhärenten nicht idealen Verhalten. Kompressibilität im flüssigen und überkritischen Bereich verbietet den Einsatz von Kolbenpumpen wie für die HPLC-Technik. Der Einsatz von Kolbenpumpen, wie z. B. in der überkritischen Fluidchromatographie eingesetzt, ergibt zwar reproduzierbare aber nicht genau zu kontrollierende Fließgeschwindigkeiten. Der Einsatz von manuell zu bedienenden

Nadelventilen ist nicht ausreichend. Vorarbeiten zeigten Oszillation und nicht vorhersagbare Flussraten in Abhängigkeit von Zeit, Temperatur und Druckdifferenz.^[130]

Um diese Aufgabe der CO₂-Dosierung unter hohen Drücken und geringen Fließgeschwindigkeiten zu lösen, wurde ein eigener Massenflussregler entwickelt. Dazu wurde ein Massenflussmessgerät (FM 1) verwendet, um den Massenstrom an CO₂ auf der Hochdruckseite vor dem eigentlichen Regelventil zu messen. Aufgrund der Stoffeigenschaften erfolgt diese Messung mit flüssigen CO₂. Der Vordruck wurde über einen Druckminderer (V1-1) um ca. 40 bar über dem gewünschten Systemdruck gehalten. Dadurch wurden die Auswirkungen von Druckschwankungen in der Ringleitung auf das System minimiert. Hinter dem Massenflussmessgerät befindet sich das Regelventil (V1-2). Um den benötigten Wärmefluss für die Expansionsarbeit des CO₂ am Ventil sicherzustellen, wurde das Regelventil von außen über einen Heizblock auf konstanter Temperatur gehalten. Das verwendete Nadelventil wurde pneumatisch angesteuert und besaß einen möglichst kleinen K_v -Wert, um geringe Flüsse realisieren zu können ($K_v = 0,01 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). Die Regelung des CO₂ Flusses erfolgte über die Regelung der Druckluft, die den Kolben des Regelventils anhebt. Für die besten Ergebnisse sollte der Druck der Druckluft in einem Bereich von 3 bar - 4,5 bar liegen.

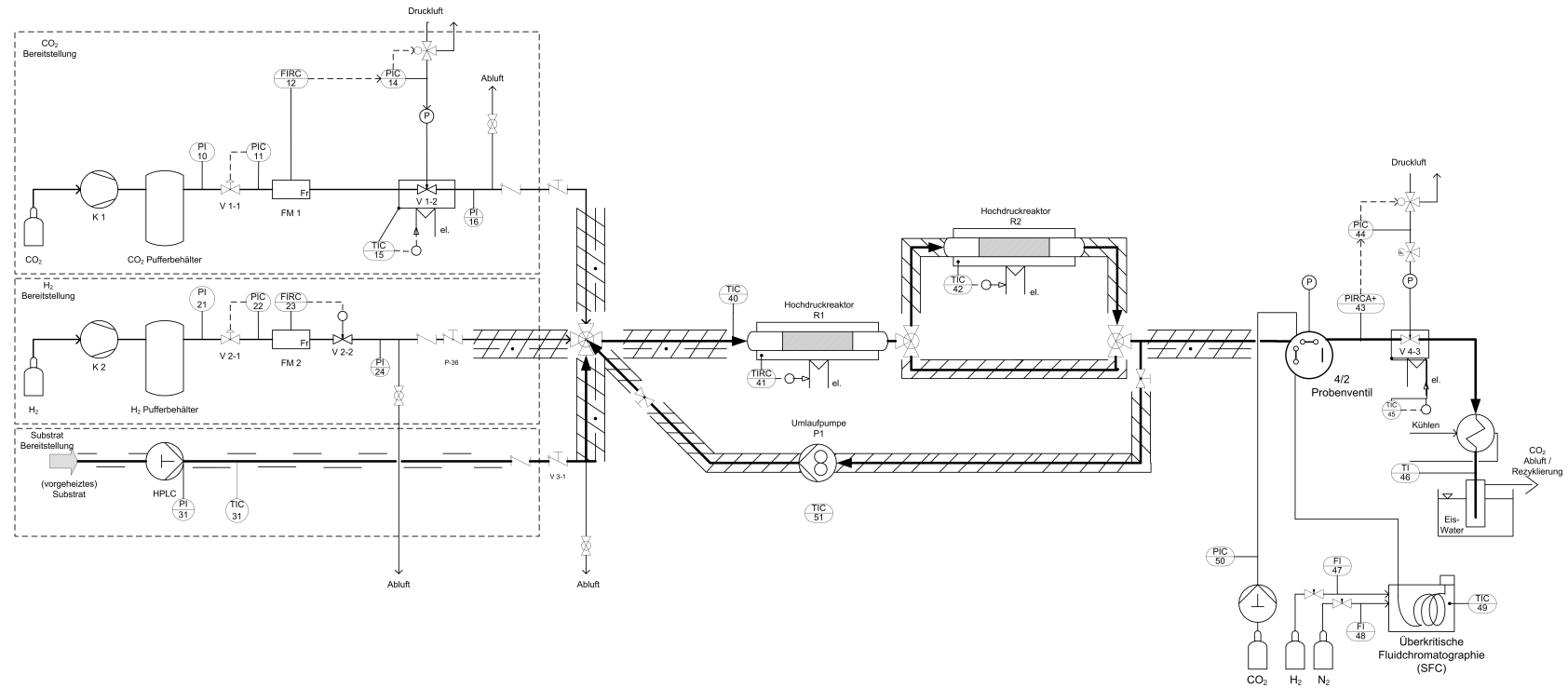


Abbildung 2.45: Fließbild der kontinuierlichen CO₂-Anlage. Kennbuchstaben für Messstellenbezeichnungen: C: geregelt, F: Durchfluss, I: Istwertanzeige, R: registriert.

Dies wurde durch eine Anpassung der Temperatur am Regelventil realisiert.

Für die Dosierung von zusätzlichen Gasen wurden kommerzielle Durchflussregler (FM 2) verwendet. Vor dem Regler befindet sich ein weiterer Druckminderer (V2-1). Die Dosierung der Substrate erfolgte durch eine HPLC-Pumpe, die mit einem beheizbaren Pumpenkopf ausgestattet war, wodurch die Förderung von Stoffen mit hohen Schmelzpunkten ermöglicht wurde. Um sicher zu stellen, dass die Substrate vor und hinter der Pumpe ebenfalls flüssig vorlagen, wurden die Zu- und Ableitungen der Pumpe mit einem Doppelmantel versehen, so dass diese Leitungen mit einem Thermostaten beheizt werden konnten.

Alle drei Leitungen (Kohlenstoffdioxid-, Gas- und Substratleitung) führten in einen dynamischen und statischen Mischer, welcher ebenfalls beheizbar war. Dadurch wurde eine homogene und vollständige Mischung der Substrate mit der mobilen Phase gesichert. Sämtliche Leitungen in der Anlage sowie die Reaktoren und der Mischer wurden elektrisch geheizt und geregelt. Die Temperaturen wurden an verschiedenen Stellen mit Pt-100 Elementen gemessen.

Die Kontrolle des Systemdruckes erfolgte ebenfalls über ein pneumatisches Ventil (V4-3), das auf eine definierte Temperatur beheizt wurde, um die Temperaturabsenkung durch CO₂-Expansion zu kompensieren. Die Regelung des Rückdrucks wurde wieder über die Regelung der Druckluft realisiert. Der Unterschied zur Regelung des CO₂ Volumenstroms bestand darin, dass das Ventil zusätzlich über ein Magnetventil getacktet wurde, was ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Regelung und das Funktionsprinzip hatte. Um die Produkte und die restlichen Substrate quantitativ am Ende der Anlage aufzufangen, wurde der CO₂-Strom zunächst durch einen Wärmetauscher geleitet und anschließend das Produkt und die verbleibenden Substrate in einer Kühlfalle gesammelt.

2.6.4 Analytik

Um dem System möglichst viele Informationen in geringen Zeitabständen zu entnehmen, wurde eine online Analytik benötigt, die in relativ kurzen Frequenzen die Produktzusammensetzung analysiert. In Hochdrucksystemen ist die Realisierung ei-

ner solchen Analytik nicht trivial. Prinzipiell kann diese Aufgabe durch spektroskopische (UV-Vis, IR, etc.)^[132] oder chromatographische Methoden gelöst werden. Da zum Teil bei geringen Konzentrationen und mit Mehrstoffgemischen gearbeitet wurde, wurde die chromatographische Methode gewählt. Eine solche Methode erlaubt vom Messprinzip auch eine online Bestimmung von Enantioselektivitäten, was durch spektroskopische Methoden nur extrem aufwändig realisierbar wäre.

Chromatographische Analysen lassen sich grob in drei Klassen einteilen.^[133] Die beiden bekanntesten und am weitesten verbreiteten Methoden sind die Flüssig- und die Gaschromatographie. Die dritte Klasse stellt die überkritische Fluidchromatographie (SFC) dar, die sich in ihren Eigenschaften zwischen den beiden anderen Klassen befindet*. Die allgemeinen Vorteile der SFC sowie ein historischer Rückblick und eine genauere Einteilung sind bei Taylor^[134] nachzulesen. In Bezug auf das vorliegende Trennproblem in dieser Arbeit bietet die Nutzung einer SFC verschiedene Vorteile. Im Gegensatz zu den beiden anderen chromatographischen Systemen arbeitet die SFC mit CO₂ bei Drücken von bis zu 500 bar als mobile Phase. Somit kann die SFC mit der gleichen mobilen Phase betrieben werden, die auch für die kontinuierliche Reaktion genutzt wird. Vor allem die Probennahme kann diskriminierungsfrei erfolgen. Dadurch kann ein Ausfallen des Analyten vermieden werden, was zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen oder auch zu einer defekten Probenschleife führen würde. Die chromatographische Anlage wurde so eingebaut, dass das Probenventil direkt mit der mobilen Phase des Prozesses gespült wird (Abbildung 2.46). So war es möglich, dass automatisch geringe Mengen (typisch 2 µL) auf die Trennsäule gegeben werden konnten, ohne einen signifikanten Einfluss auf das System auszuüben.

2.6.5 Umlauf der kontinuierlichen Phase

Die Anordnung der Reaktoren im System ist ebenfalls in Abbildung 2.45 zu sehen. Im ersten Hochdruckreaktor (R1) fand die enzymatische kinetische Racematspaltung statt. Im zweiten Reaktor (R2) wurde die Racemisierung durchgeführt. Der Racemisierungsreaktor verfügte über einen Bypass. Auf diese Weise konnte zwischen einer klassischen, kinetischen Racematspaltung und einer dynamisch kinetischen Racematspaltung gewechselt und die kinetische Racematspaltung getrennt von der Ge-

*Neben dieser groben Einteilung gibt es noch weitere, feinere Einteilungen.^[134]

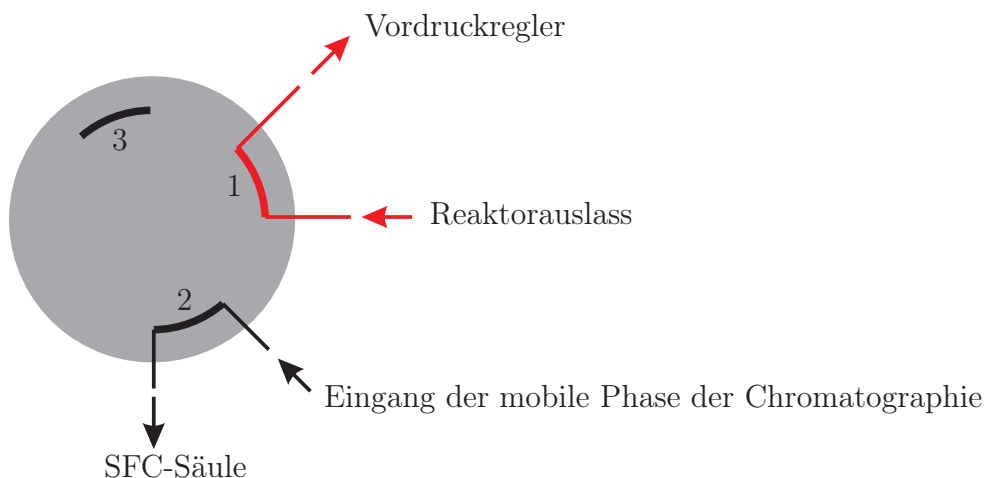


Abbildung 2.46: Funktionsweise des Probenventils der SFC. Zum Einspritzen erfolgt die Schaltung des Ventils so, dass die interne Probenschleife 1 automatisch für eine vorgegebene Zeit um eine Position im Uhrzeigersinn weiter gedreht wird.

samtreaktion charakterisiert werden. Die Zyklierung in dem System wurde durch eine Mikro-Zahnradpumpe realisiert. Die zurückgeführte mobile Phase wurde in den Mischer geführt, da so bei hohen Umlaufgeschwindigkeiten eine bessere Temperierung der mobilen Phase erreicht werden konnte.

Die gesamte Regelung sowie die Aufzeichnung aller wichtiger Daten wurde über LabviewTM bzw. mit A/D-Wandlern von National Instruments realisiert. Die Einstellung der Regelparameter erfolgte zum Teil nach bekannten Regeln sowie nach empirischen Erfahrungswerten (Kapitel 4.2.6.3, Tabelle 4.6).

2.6.6 Überprüfung der Anlage

Zur Charakterisierung der Anlage wurden die besonders kritischen Parameter Systemdruck und CO₂-Fluss über einen längeren Zeitraum aufgezeichnet. Darüber hinaus erfolgte eine Betrachtung der Antworten des Systems auf Sollwertsprünge. Die Grafik in Abbildung 2.47(a) zeigt den Verlauf des CO₂-Flusses sowie des Systemdrucks mit der Zeit. Auf den Achsen sind die gesamten Bereiche aufgetragen, in denen die Sollwerte variiert werden können. Ein genauerer Blick auf den Verlauf (Abbildung 2.47(b)) zeigt die geringe Abweichung des jeweiligen Istwertes vom Sollwert. So liegen die Standardabweichungen für den Druck bei 0,16 bar und für den

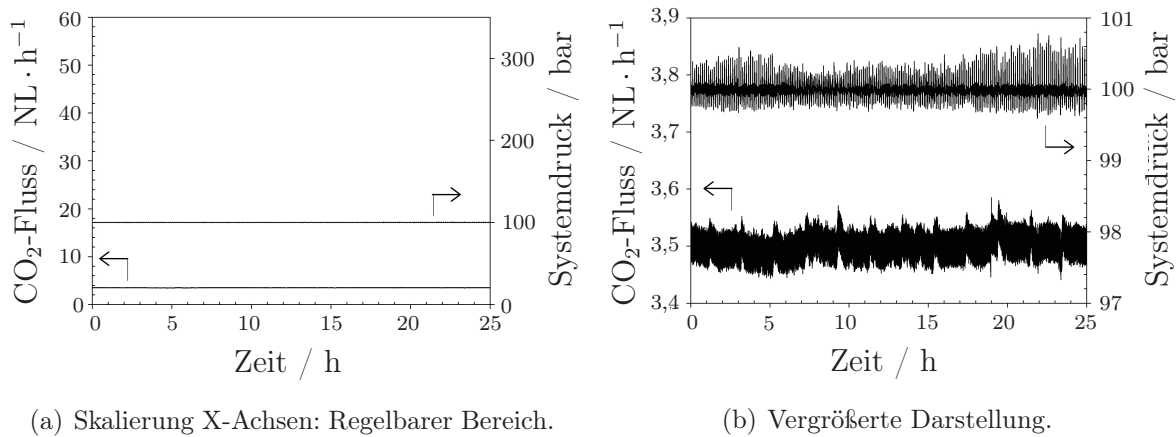
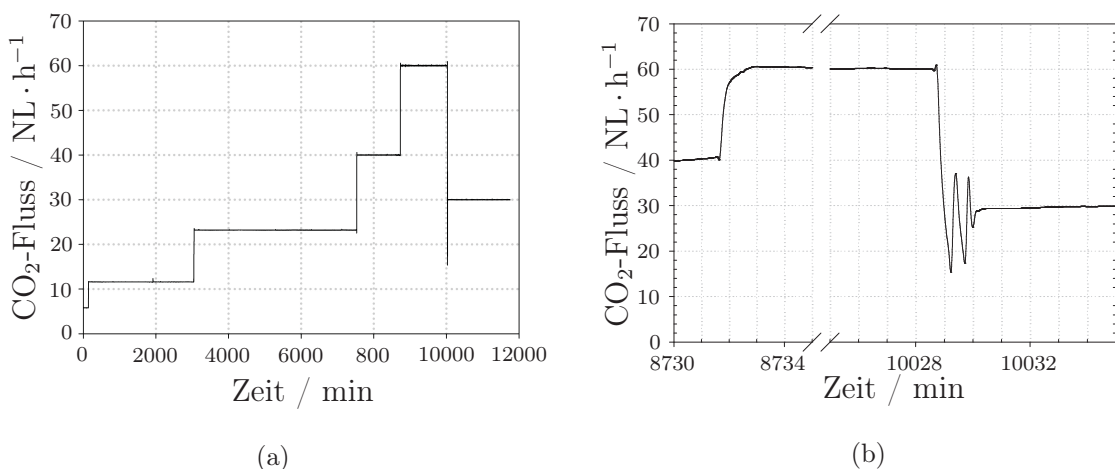


Abbildung 2.47: Darstellung des Drucks und des Massenflusses als Funktion der Zeit.

CO₂ Fluss bei $0,023 \text{ NL} \cdot \text{h}^{-1}$.

In den Abbildungen 2.48 sind die Sprungantworten des CO₂-Volumenstroms dargestellt. Diagramm A zeigt, dass Sprünge im Volumenstrom im gesamten Bereich bis $60 \text{ NL} \cdot \text{h}^{-1}$ möglich sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich extrem kleine Volumenströme ebenso gut einstellen lassen wie große Volumenströme von bis zu $60 \text{ NL} \cdot \text{h}^{-1}$. Die genauere Betrachtung in Abbildung B zeigt sowohl für einen positiven als auch für einen negativen Sollwertsprung, dass der Istwert in weniger als 2 min in den neuen stationären Zustand übergeht. Für einen Reaktor mit einem Volumen von 10 mL bedeutet dies, dass sich bereits bei Bedingungen im nahen

Abbildung 2.48: Sprungantworten des CO₂-Flusses

überkritischen Bereich ($\vartheta = 40\text{ °C}$ und $p = 80\text{ bar}$; $\delta_{CO_2} = 0,277\text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$) Verweilzeiten zwischen 1,5 min und 60 s einstellen lassen. Durch eine Druckerhöhung auf 350 bar ($\delta_{CO_2} = 0,935\text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$) können sogar Verweilzeiten von 3,5 h erreicht werden.

Die Abbildung 2.49 zeigt das Verhalten des Systems auf eine Sollwertänderung des Systemdrucks. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass es sich in diesem Fall um keinen Sollwertsprung handelt, sondern dass der Sollwert mit einer Rate von $1\text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$ verringert wurde. Ein negativer Sollwertsprung von 100 bar würde ansonsten bei unveränderten Regelparametern zu einem zu schnellen Druckabfall führen, was u. a. schlecht für die Katalysatorfüllung wäre. Als Folge könnten z. B. mechanische Schädigungen an der Katalysatorfüllung entstehen oder dieser agglomerieren.

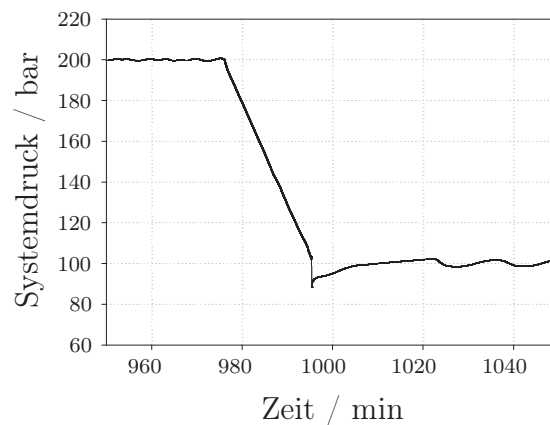


Abbildung 2.49: Antworten des Systemdrucks auf Sollwertänderung. Sollwertänderung $1\text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$ von 200 bar auf 100 bar.

2.6.7 Zusammenfassung

Die in der Zielsetzung 2.6.2 aufgeführten Ziele zur Konzeption einer kontinuierlichen Hochdruckanlage konnten alle erreicht werden. So ist es gelungen, durch eigene Konzepte für die CO_2 -Dosierung und für die Druckregelung im System die Standardabweichungen deutlich unter 1 % vom Mittelwert zu halten und dennoch die Möglichkeit eines großen Prozessfensters zu bieten. So konnten für einen 10 mL Autoklaven je nach Prozessbedingungen Verweilzeiten von 60 s bis 3,5 h erreicht werden.

Die Regelung der Temperaturen wurde durch die Verwendung von Heizschnüren realisiert und genau geregelt. Durch den Einbau eines dynamischen und statischen Mischers wurde eine homogene Vermischung der Substrate mit der mobilen Phase gewährleistet. Durch die Verwendung eines beheizbaren Pumpenkopfes sowie von Doppelmantelrohren können zukünftig Substrate verwendet werden, deren Schmelzpunkte oberhalb der Raumtemperatur liegen.

Die Bauteile der Anlage wurden für Drücke bis 400 bar ausgelegt. Durch den Aufbau der Anlage in einen Aluminiumrahmen wurde eine verbesserte Übersicht und Handhabung sowie die Möglichkeit des Transportes geschaffen. Ebenfalls ist dadurch der gesamte Aufbau wesentlich flexibler geworden, was einen verbesserten Einsatz verschiedener Reaktoren und Reaktorsysteme ermöglicht (Abbildung 2.50).

Durch den Einbau einer überkritischen Fluid Chromatographie konnte eine effiziente online Analytik etabliert werden, was in den Kapiteln 2.4 und 2.7 näher erläutert wird. Die vollständige Automatisierung und Prozessüberwachung konnte durch den Einsatz von LabviewTM realisiert werden.

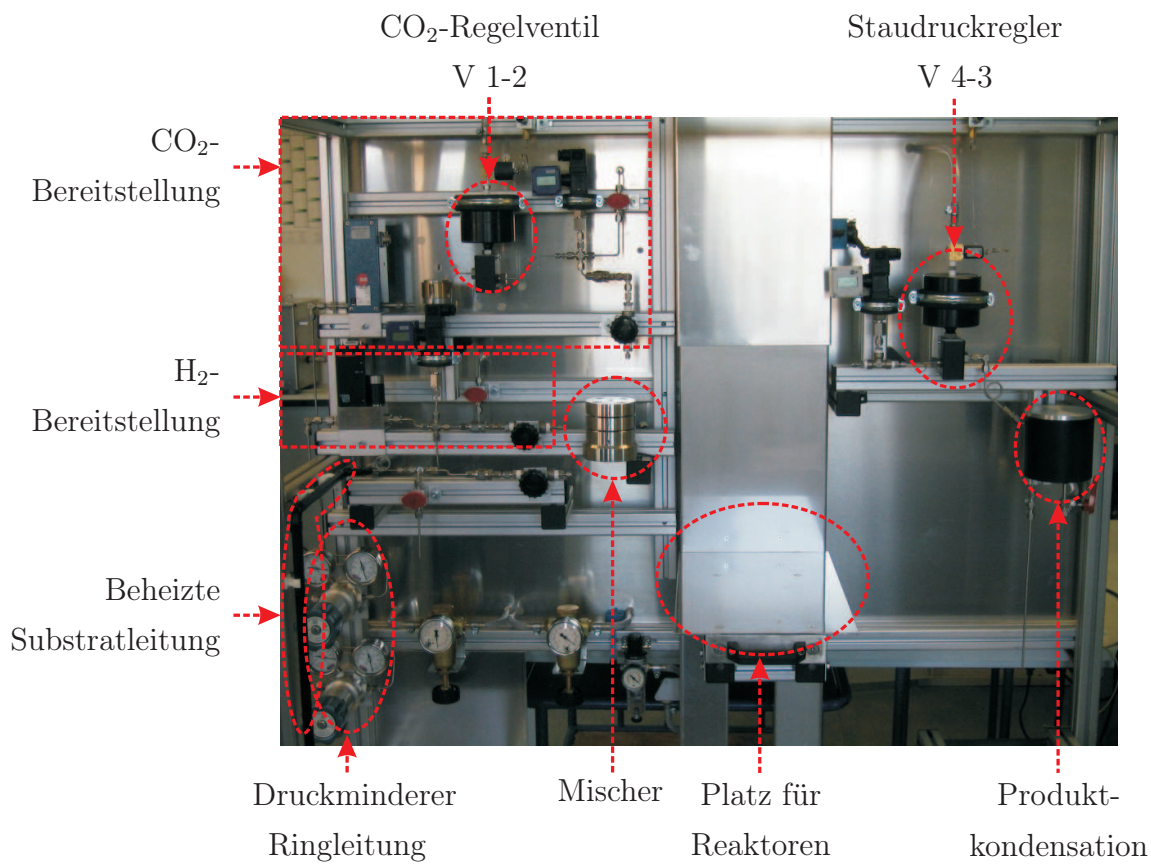


Abbildung 2.50: Kontinuierliche CO₂-Anlage, nicht im Bild: SFC, Heizbänder und Reaktor mit Umlaufpumpe.

2.7 Kontinuierliche Hochdruck-Versuche

2.7.1 Stand der Technik

Der Einsatz von Biokatalysatoren in scCO_2 ist attraktiv, da sowohl die Biokatalysatoren als auch das Lösungsmittel CO_2 als viel versprechende Bausteine für nachhaltige Prozesse angesehen werden.^[52, 131] Daher sind seit den ersten Veröffentlichungen von Enzym katalysierten Reaktionen in überkritischem Kohlenstoffdioxid im Jahr 1985^[135, 136] viele weitere Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht worden.^[136] Speziell zu kontinuierlichen Reaktionen in scF seien insbesondere die Arbeiten von Leitner^[34, 137], Reetz^[138] und Iborra^[139, 68, 67] hervorgehoben.

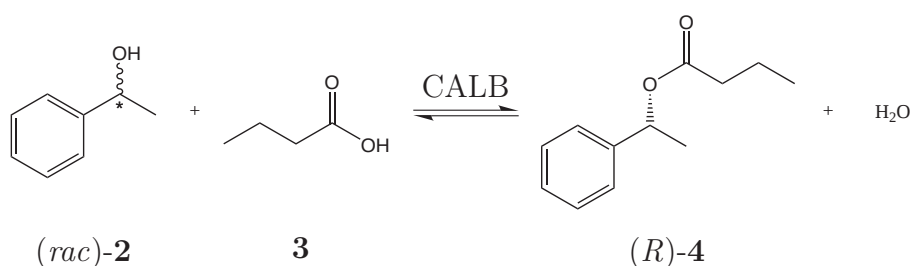
Leitner und Iborra entwickelten parallel den Einsatz von Enzymen in kontinuierlichen Zweiphasensystemen mit ionischen Flüssigkeiten.^[50] Leitner *et al.* erweiterten dabei das Konzept um eine integrierte Trennung von Produkt und Substrat durch eine zweistufige Entspannung der CO_2 -Phase. Reetz *et al.* verwendeten statt einer ionischen Flüssigkeit Polyethylenglykol als stationäre Phase. Iborra *et al.* erweiterten das Konzept später mit dem Einsatz von IL behandelten Enzymimmobilisaten, wodurch Ihnen die Möglichkeit der Reaktionsführung in einem Strömungsrohr ermöglicht wurde. Durch eine Kombination mit sauren Silicapartikeln konnten sie eine kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung in einer dreistufigen Kaskade realisieren. Die erreichten Ausbeuten lagen bei ungefähr 78 %. Der Enantiomerenüberschuss des Produktes fiel allerdings im Vergleich zu einer reinen kinetischen Racematspaltung von > 99 % auf 92 %.

2.7.2 Zielsetzung

Durch verschiedene Versuche in der hier entwickelten Anlage sollte das Konzept der getrennten Reaktionsräume zur kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung praktisch umgesetzt und versucht werden die Ergebnisse der Simulationen aus den Kapiteln 2.1 und 2.2 zu bestätigen. Gleichzeitig sollte die erfolgreiche Umsetzung der Konzepte zum Aufbau einer kontinuierlichen Versuchsanlage aus dem Kapitel 2.6 bestätigt werden.

2.7.3 Kontinuierliche kinetische Racematspaltung

In einem ersten Versuch wurde getestet, ob die in dieser Arbeit entwickelte Hochdruckanlage den Anforderungen für Hochdruckreaktionen gerecht wird und ob die hier verwendete SFC eine gute Möglichkeit der online Analytik darstellt. Dazu diente die kinetische Racematspaltung von *rac*-1-Phenylethanol **2** durch die Veresterung mit Butansäure **3** katalysiert durch die *Candida antarctica* Lipase B (CALB) als Modellreaktion (Schema 2.8).



Schema 2.8: Reaktion der kontinuierlichen kinetischen Racematspaltung.

Wie aus der Abbildung 2.51 ersichtlich, konnten die eingestellten Versuchsparmeter über die gesamte Versuchsdauer sehr genau geregelt werden. Dies ist die Grundvoraussetzung dafür, dass die Anlage den stationären Zustand erreicht. Die Betrachtung der SFC-Messungen zeigt, dass die Peakflächen für Phenylethanol **2** und für das Produkt α -Methylbenzylbutyrat **4** die ersten 8 – 10 h ansteigen und erst danach der stationäre Zustand der Anlage erreicht wird. Dies lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Verweilzeitverteilung im eigentlichen Reaktor zu, da auf diese Ergebnisse die gesamte Anlage inkl. Mischer, Rohrleitungen, usw. einen Einfluss hat. Aus den gemessenen Peakflächen lässt sich der Umsatz der Reaktion berechnen. Hier ist zu erkennen, dass der Umsatz bereits nach ca. 3 h bei knapp 30 % konstant ist. Erst durch eine Verdoppelung der Verweilzeit erhöht sich der Umsatz von anfänglich 29 % auf 37 %. Die Einstellung des neuen stationären Zustandes dauert ca. 5 h, was knapp zwei Verweilzeiten entspricht ($\tau \approx 2 \text{ h } 40 \text{ min}$). Ein konstanter Umsatz ist erneut früher (nach ca. 3 h) erreicht.

Da die Reaktion nicht bei maximalem Umsatz stattfindet, sondern der Umsatz durch die Aktivität des Enzyms begrenzt ist, ist aus den Diagrammen ebenfalls die hohe Stabilität der CALB in scCO_2 ersichtlich. So konnte während der gesamten Versuchszeit keine Desaktivierung festgestellt werden. Die Produktivität des Enzyms

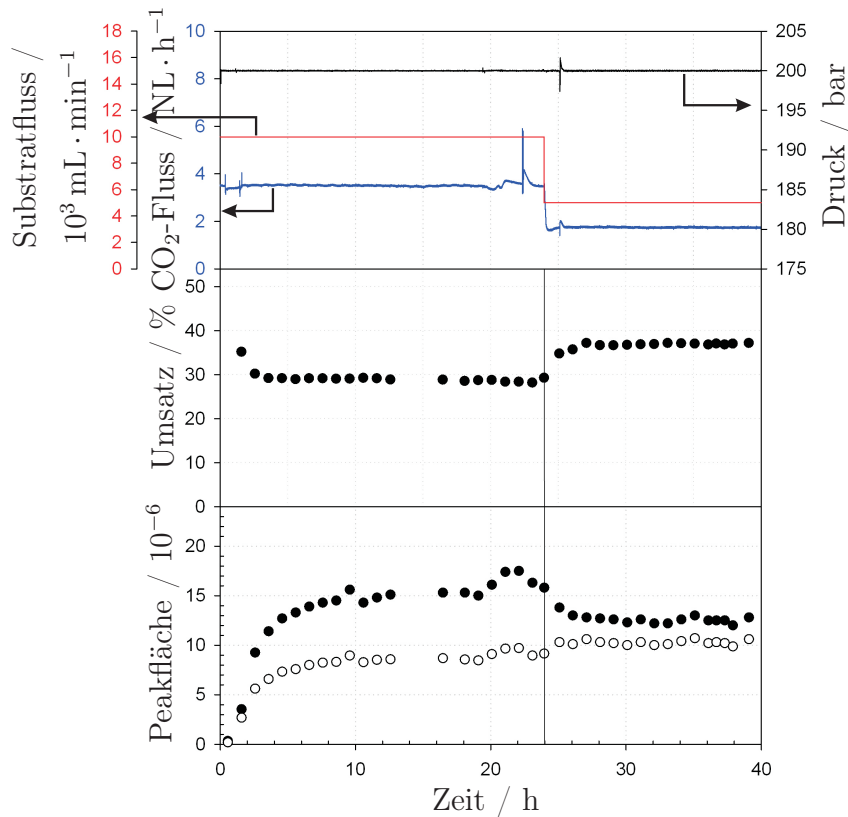


Abbildung 2.51: Kontinuierliche kinetische Racematspaltung. Unteres Diagramm: ○ Fläche 4; ● Fläche 2.

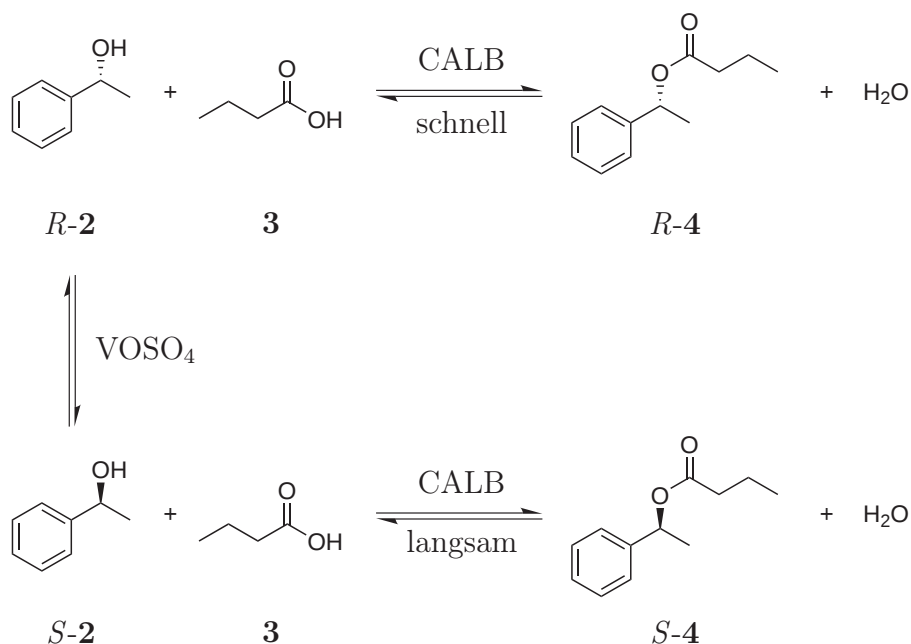
in diesem Versuch betrug damit 52 g/g, die mittlere spezifische Aktivität betrug $120 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ und die Raumzeitausbeute* (RZA) betrug ca. $9,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

2.7.4 Dynamisch kinetische Racematspaltung

Nachdem im vorangegangenen Kapitel 2.7.3 zum einen erfolgreich die kinetische Racematspaltung in scCO_2 und zum anderen auch die Effizienz der Anlage und der Analytik gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt versucht eine dynamisch kinetische Racematspaltung durchzuführen (Schema 2.9). Dazu wurde für die Racemisierung der unter Kapitel 2.2.4 charakterisierte Katalysator VOSO_4 verwendet.

Für die Durchführung wurde in den folgenden Versuchen zunächst immer mit

*Berechnet über das gesamte Reaktorvolumen, obwohl das Enzym nur ca. 10 % des Reaktors einnimmt.



Schema 2.9: Reaktion der kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung.

einer klassischen, kinetischen Racematspaltung gestartet, um zu testen, ob eine ausreichende Aktivität des Enzyms vorhanden ist. Anschließend konnte durch Öffnen der Ventile und Anschalten der Umlaufpumpe die Racemisierung im Kreislauf betrieben werden. Da im vorherigen Versuch (Kapitel 2.7.3) der Umsatz bei max. 37 % lag, wurde für die nächsten Versuche die Enzymmenge erhöht. Dies brachte jedoch nicht den gewünschten Erfolg, da zunächst der Umsatz niedriger lag als im vorangegangenen Versuch. Zwar konnte auch hier eine Erhöhung des Umsatzes mit der Verweilzeit festgestellt werden, allerdings erneut nicht über einen Umsatz von 35 % hinaus. Auch wurde in diesem Versuch eine Desaktivierung des Enzyms beobachtet. Es wurde zunächst angenommen, dass die geringen Umsätze dadurch begründet sind, dass das Enzym über Nacht ohne Substrat mit scCO_2 gespült wurde, da aus der Literatur bekannt war, dass Enzymdesaktivierungen ohne Substrat um ein Vielfaches größer sein können als mit Substrat.^[140]

Somit wurde im nächsten Versuch die Zeit, in der das Enzym ohne Substrat dem Kohlenstoffdioxid ausgesetzt ist, so kurz wie möglich gehalten. Dies hatte allerdings zur Folge, dass die Umsätze noch weiter absanken als zuvor. Wie sich später herausstellte, war dies aber nicht durch eine Desaktivierung des Enzyms auf molekularer Ebene begründet, sondern vorwiegend durch Agglomeration des Enzymlyophilisa-

tes. Diese Vermutung wurde durch einen visuellen Befund des Lyophilisates nach Abbruch der Reaktionen erhärtet. Trotz der geringen Umsätze im Vorlauf der Reaktionen wurde in beiden Versuchen nach einer bestimmten Zeit der dynamische Teil dazugeschaltet. In beiden Fällen führte dies zu einem Sprung in den Umsätzen (Versuch 1: Steigerung von 8 % auf 35 %; Versuch 2: Steigerung von 30 % auf maximal 51 %). Da ein solch großer Sprung in den Umsätzen nicht durch die zusätzliche Racemisierung alleine begründet sein kann, liegt die Vermutung nahe, dass es durch das Zuschalten der Racemisierung und dem damit verbundenen leichten Druckabfall zu einer Auflockerung des Enzyms kommt, was die effektive Aktivität des Enzyms erhöht.

Um im nächsten Versuch eine Agglomeration des Enzyms zu vermeiden, wurde dieses möglichst fein auf Glaswolle verteilt und der Aufpressvorgang beim Starten des Versuches wurde mit einem konstanten Volumenstrom an CO_2 von $\dot{V} = 3,5 \text{ NL} \cdot \text{h}^{-1}$ kontrolliert und langsam durchgeführt. Auf diese Weise konnten Umsätze von 40 – 45 % erreicht werden, die für bis zu 140 h stabil waren (Abbildung 2.52). Der Enantiomerenüberschuss des Produktes lag während der gesamten Zeit bei 93 – 95 %, der des Substrates bei ca. 60 %. Nachdem der dynamische Teil dazugeschaltet wurde (Linie in Abbildung 2.52), konnten verschiedene Effekte beobachtet werden. Der Umsatz reduzierte sich um knapp 15 % auf 27 %, stieg im Folgenden

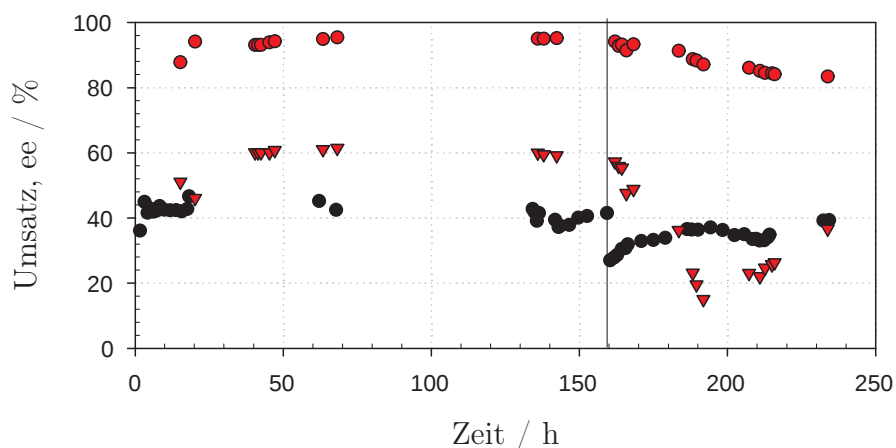


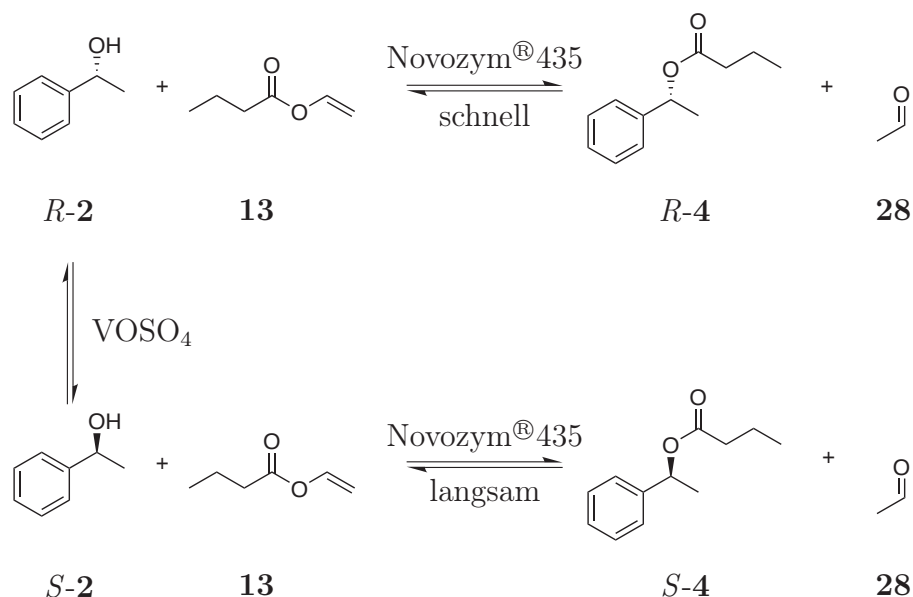
Abbildung 2.52: Kontinuierliche dynamische kinetische Racematspaltung; Versuchsnr.: DRK 3 (siehe Kapitel 4.2.6.1). ● Umsatz, ● Produkt ee, ▼ Substrat ee.

aber wieder langsam an. Der ee des Substrates fiel bis auf 15 %, allerdings sank auch der ee des Produktes um ca. 10 %.

Ein Absinken des Umsatzes lässt sich zunächst dadurch erklären, dass sich das Verhalten des Reaktors verändert. Durch die Umlaufpumpe verändert sich das Verhalten des Reaktorsystems von einem PFR zu einem CSTR, was zunächst eine Abnahme des Umsatzes zur Folge hat. Durch die allmählich hinzukommende Racemisierung steigt der Umsatz anschließend wieder an. Die erfolgreiche Racemisierung des Substrates lässt sich an der Abnahme des Enantiomerenüberschusses des Substrates erkennen. Der gravierendste negative Effekt ist jedoch die Abnahme des Enantiomerenüberschusses des Produktes. Eine gewisse Abnahme könnte zwar erneut über das veränderte Reaktorverhalten erklärt werden, dennoch sollte es bei einer erfolgreichen Racemisierung des Substrates zu einer Steigerung des Produkt ee kommen. Wie sich in anschließenden Laborversuchen zeigte, lag die Begründung darin, dass der Racemisierungskatalysator ebenfalls die Veresterung katalysierte und somit den ee des Produktes herabsetzt.

Aufgrund dieser unerwünschten Veresterungsreaktion des Racemisierungskatalysators VOSO_4 wurde für die nächsten Versuche von Butansäure **3** auf Vinylbutyrat **13** umgestellt (Schema 2.10). Die Umesterungsreaktion wird nur in geringem Maße durch VOSO_4 katalysiert. In der Literatur zu diesem Katalysator und ähnlichen Reaktionen findet sie keine Erwähnung.^[85] Des Weiteren wurde in den nächsten Versuchen vom CALB Lyophilisat auf das kommerzielle Immobilisat Novozym[®] 435 umgestellt.

Durch diese Veränderungen konnte erreicht werden, dass zu Beginn des nächsten Versuches der Umsatz zunächst bei 55 – 65 % bei moderaten ee-Werten von 80 %-90 % für das Produkt lag. Nach einem längeren Betrieb der Anlage stellte sich ein recht konstanter Umsatz von 55 % ein (Abbildung 2.53). Der ee-Wert des Produktes lag bei 91 % der des Substrates bei 98 %. Somit waren die Voraussetzungen für eine dynamisch kinetische Racematspaltung gut und die Racemisierung konnte zugeschaltet werden. Dadurch wurde ein Anstieg des Enantiomerenüberschusses des Produktes auf ca. 96 % erreicht. Der ee-Wert des Substrates fiel nur leicht, was auf eine Limitierung durch VOSO_4 hindeutet. Der Umsatz der Reaktion stieg auf unge-



Schema 2.10: Reaktion der kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung.

fähr 70 %, allerdings nahm die Selektivität stark ab, so dass bei der Ausbeute keine signifikante Veränderung festzustellen war. Eine spätere Reduzierung des Substratflusses zeigte erneut einen Anstieg im Umsatz bei sinkender Selektivität. Insgesamt stieg die Ausbeute minimal an, was aber aufgrund fehlerhafter Substratdosierung (technischer Mangel) nicht näher diskutiert werden kann.

Da auch in diesem Versuch noch nicht der gewünschte Erfolg für eine kontinuierliche DKR erreicht werden konnte, sollte im nächsten Versuch die Racemisierung getrennt betrachtet werden. Dafür wurde die Racemisierung in Reihe dazugeschaltet, ohne Einsatz der Umlaufpumpe (Abbildung 2.54). Zu Beginn der Reaktion wurde erneut nur die kinetische Racematspaltung durchgeführt. Die Umsätze lagen wieder bei ca. 55 %, die Enantioselektivitäten für das Produkt und das Substrat lagen bei 90 % bzw. bei 99 %. Nachdem die Racemisierung dazugeschaltet worden war (nach 122 Stunden), wurden aufgrund von Nebenreaktionen sehr schnell Umsätze von 97 % gemessen, wobei die Selektivität lediglich bei knapp über 60 % lag. Der ee des Substrates sank auf weniger als 8 %, was die effektive Racemisierung zeigte. Diese Racemisierung war eine gewisse Zeit zu beobachten. Danach kam es wieder zu einem Anstieg des Enantiomerenüberschusses. Die Selektivität zeigte qualitativ den gleichen Verlauf, was ebenfalls auf eine Desaktivierung hinweist.

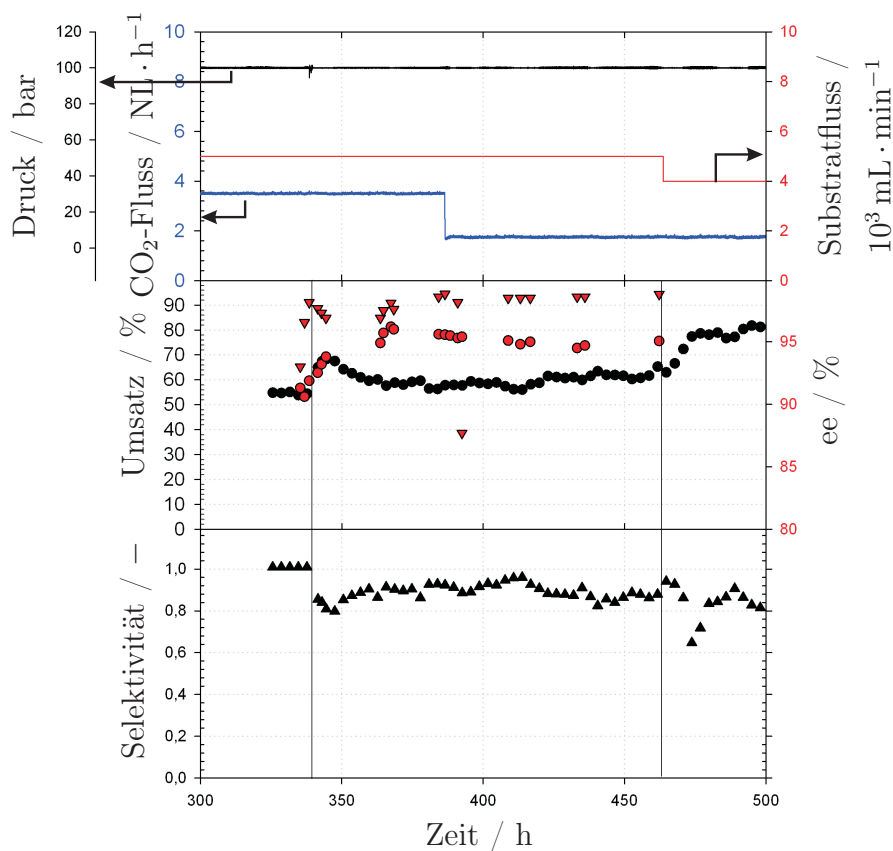


Abbildung 2.53: Kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung; Versuchsnr.: DKR 5 (siehe Kapitel 4.2.6.1). Mittleres Diagramm: ● Umsatz, ● Produkt ee, ▼ Substrat ee.

Diese geringe Stabilität des Racemisierungskatalysators ist die Begründung dafür, dass in den vorherigen Versuchen nicht die gewünschten Erfolge für die kontinuierliche DKR erzielt werden konnten. Vermutungen über eine Desaktivierung des Katalysators durch CO_2 konnten nicht bestätigt werden. Versuche bei denen der zuvor in den kontinuierlichen Versuchen eingesetzte Katalysator weiter verwendet wurde zeigten eine deutlich verminderte Aktivität im Gegensatz zum frisch verwendeten Katalysator (Abbildung 2.55, weiße Kreise). Weitere Untersuchungen ohne CO_2 in Heptan zeigten, dass es mit zunehmenden Verhältnis von Substrat zu Katalysator zu einer schnelleren Desaktivierung des Katalysators kommt.

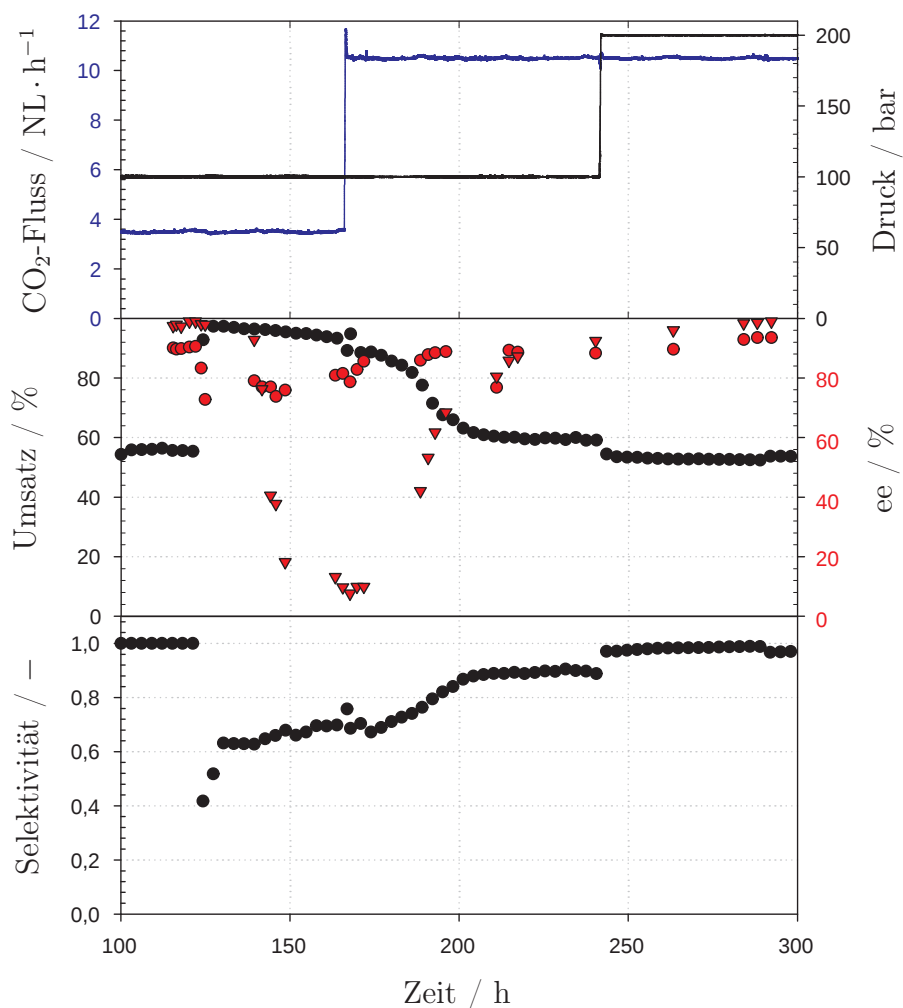
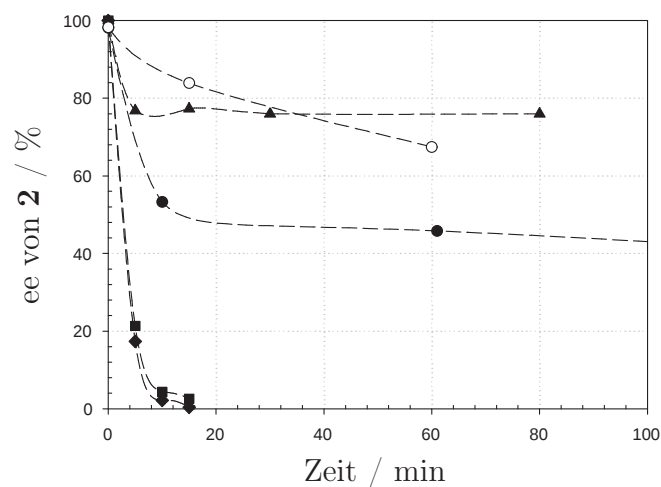


Abbildung 2.54: Kontinuierliche kinetische Racematspaltung mit nachgeschalteter Racemisierung. Die Racemisierung wurde ab der 122 Stunde in Reihe dazu geschaltet; Versuchsnr.: DKR 6 (siehe Kapitel 4.2.6.1). Mittleres Diagramm: ● Umsatz, ● Produkt ee, ▼ Substrat ee.

2.7.5 Zusammenfassung

Die Versuche zur kontinuierlichen kinetischen Racematspaltung haben gezeigt, dass durch die in dieser Arbeit entwickelte Dosiertechnik sowie durch die verbesserte Druckregelung des gesamten Systems ein stabiler und stationärer Prozess erreicht werden kann. Durch die Etablierung einer online Analytik in Form einer überkritischen Fluidchromatographie konnte die Reaktion rund um die Uhr in kurzen Intervallen verfolgt werden. Dabei zeigten die Ergebnisse, dass in einem Zeitraum



Abbildungung 2.55: Racemisierungsaktivität von VOSO_4 . ee als Funktion der Zeit. ▲ 20 mg VOSO_4 , 100 mM **2**; ● 20 mg VOSO_4 , 50 mM **2**; ■ 70 mg VOSO_4 , 100 mM **2**; ◆ 175 mg VOSO_4 , 100 mM **2**; jeweils in 10 mL Heptan bei 80 °C; ○ 170 mg VOSO_4 nach Einsatz in kontinuierlicher Reaktion, 100 mM **2**.

von 3 h nach Reaktionsbeginn oder nach einer Änderung der Reaktionsbedingungen ein konstanter Umsatz erreicht werden kann. Die online Analytik zeigte, dass 10 h nach Reaktionsbeginn unter den vorliegenden Bedingungen ein stationärer Zustand erreicht wird. Des Weiteren zeigten die Versuche zur kontinuierlichen kinetischen Racematspaltung, dass maximal ein Umsatz von rd. 37 % erreicht werden konnte. Als Ursache, dass nicht die geforderten 50 % Umsatz erzielt worden waren, stellte sich die Agglomeration des verwendeten Enzymlyophilisates im Reaktor heraus. Deshalb wurde in späteren Versuchen auf das kommerzielle Immobilisat Novozym[®]435 umgestellt.

Eine Reihe kontinuierlicher Versuche zur dynamisch kinetischen Racematspaltung zeigten, dass das verwendete Enzymimmobilisat zwar auch zur Agglomeration neigte, dass aber die enzymatische kinetische Racematspaltung nicht den limitierenden Schritt des untersuchten Prozesses darstellt. Eine vollständige Etablierung des Gesamtprozesses und der Vergleich mit der entsprechenden Simulation konnte aufgrund einer nicht ausreichenden Stabilität des Racemisierungskatalysators VOSO_4 nicht vollständig erreicht werden.

Kapitel 3

Zusammenfassung und Ausblick

3.1 Zusammenfassung

Die dynamisch kinetische Racematspaltung stellt eine interessante und sinnvolle Ergänzung zur einfachen Racematspaltung dar. Insbesondere für die Verbindung von Enzymkatalysen zur Racematspaltung mit Chemokatalysen zur Racemisierung sind aus der Literatur Beispiele mit sehr hohen Enantioselektivitäten bei gleichzeitig hohen Ausbeuten bekannt. Häufige Kompatibilitätsprobleme zwischen beiden Reaktionen sowie Wechselwirkungseffekte zwischen den beiden Katalysatoren erfordern lange Entwicklungszeiten, was für viele industrielle Prozesse ein Ausschlusskriterium ist.

Zur Lösung dieses Problems wurde ein Reaktorkonzept entwickelt, das eine räumliche Trennung der Reaktionsräume in einem kontinuierlichen Prozess erlaubt. Anhand von Simulationen konnte gezeigt werden, dass das hier vorgestellte Konzept eines Schlaufenreaktors mit getrennten Reaktionsräumen hohe Umsätze bei ebenfalls sehr hohen Enantioselektivitäten erlaubt. Der Vergleich mit einem Strömungsrohr zeigte, dass das Konzept des Schlaufenreaktors in vielen Bereichen bei gleichem ee nur unwesentlich geringere Umsätze erzielt. Da aber nur der Schlaufenreaktor vollständig voneinander unabhängige Prozessbedingungen für beide Reaktionen erlaubt, hat dieses Konzept ein weitaus größeres Potential und lässt den Einsatz vieler verschiedener Katalysatoren zu. (Kapitel 2.1)

Zur Racemisierung wurden zwei verschiedene heterogene Katalysatoren getes-

tet und hinsichtlich ihrer Selektivität beurteilt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Säurekatalysatoren wie beispielsweise der Dowex Katalysator zwar eine sehr hohe spezifische Aktivität zeigen, allerdings die Selektivität für eine kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung nicht ausreichend ist. Der Katalysator VOSO_4 hingegen zeigte eine gute Selektivität als Racemisierungskatalysator. Anhand der Simulation konnte gezeigt werden, dass die Verwendung dieses Katalysators in dem hier vorgestellten Schlaufenreaktor zu hohen Umsätzen und Enantioselektivitäten führen kann, so dass dieser für die verschiedenen kontinuierlichen Reaktionen verwendet wurde. (Kapitel 2.2)

Das hier vorgestellte Reaktorkonzept sollte für verschiedene Enzyme zugänglich gemacht werden. Da viele Enzyme eine wässrige Phase benötigen um ausreichend aktiv oder stabil zu sein, sollte die Entwicklung eines Zweiphasensystems mit Wasser als reaktiver Phase und CO_2 als nicht reaktiver Phase voran getrieben werden. Dazu musste zunächst eine Möglichkeit geschaffen werden, den pH-Wert der wässrigen Phase zu bestimmen und kontrolliert zu variieren. Diese Ergebnisse brachten neue Erkenntnisse über dieses viel versprechende System. So konnte nicht nur eine neue Methode entwickelt werden, die es erlaubt pH-Messungen mit einer kommerziellen pH-Elektrode unter hohen Drücken durchzuführen, sondern es konnte auch nachgewiesen werden, dass durch die simple Zugabe von Bicarbonaten der pH-Wert kontrolliert und auf Werte über pH 6 variiert werden kann. Des Weiteren konnte eine Gleichung aufgestellt werden, mit welcher der pH-Wert für verschiedene Hydrogencarbonatkonzentrationen berechnet werden kann. Erste computergestützte Berechnungen zur *ab initio* Bestimmung des pH-Wertes in diesem Zweiphasensystem in Abhängigkeit von Druck und Temperatur zeigten eine gute Vorhersage über den Trend der Änderung des pH-Wertes mit dem Druck. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Wasserstoffbrückenbindungen in diesem System nicht ausreichend von der Software kalkuliert werden und es dadurch zu Abweichungen im absoluten Wert der Berechnung kommt. (Kapitel 2.3)

Für die Untersuchungen des Einflusses verschiedener Reaktionsbedingungen auf die *Candida rugosa* Lipase in dem Zweiphasensystem konnte ein Reaktoraufbau entwickelt werden, der es ermöglicht, die Kinetik in diesem speziellen System zu verfolgen. Dabei wurde eine Abhängigkeit der Aktivität vom Druck im gesamten

System nachgewiesen. Eine Variation der Eigenschaften der nicht reaktiven Phase durch Zusatz von Pentan zeigte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität. Somit kann angenommen werden, dass der CO_2 -Druck einen direkten Einfluss auf die Enzymaktivität nimmt und die Aktivitätsänderung nicht nur durch die veränderten Eigenschaften der nicht reaktiven Phase zustande kommt. Langzeitmessungen in diesem System zeigten eine ausreichende Stabilität der Lipase, so dass der Einsatz dieser in einem kontinuierlichen Zweiphasensystem Wasser/ CO_2 möglich ist. (Kapitel 2.4)

Für die optimale Durchführung von kontinuierlichen Reaktionen im Zweiphasensystem Wasser/ CO_2 sollten Enzymimmobilisate entwickelt werden, die aus „festem Wasser“ bestehen und gleichzeitig das Enzym immobilisieren. Dazu konnten zwei verschiedene Hydrogele entwickelt werden, die es durch Quellung in einer Enzymlösung ermöglichen sowohl das Wasser als auch das entsprechende Enzym zu absorbieren. Die so erhaltenen Immobilisate wurden zunächst im Zweiphasensystem mit Heptan getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die ionischen Immobilisate, vornehmlich aufgrund von höher erreichbaren Beladungen, eine höhere Aktivität ermöglichen. Nachteil dieser Immobilisate ist jedoch, dass ihre Anwendbarkeit auf Enzyme beschränkt ist, die eine ausreichende Stabilität unterhalb ihres isoelektrischen Punktes zeigen und auf Reaktionen die entsprechend niedrige pH-Werte benötigen. Hier konnten die nicht ionischen Hydrogelimmobilisate eine breitere Anwendbarkeit zeigen, da ihre Beladung unabhängig vom pH-Wert ist. (Kapitel 2.5)

Zur technischen Realisierung des Konzeptes konnte eine Pilotanlage entwickelt werden, die es erlaubt, unter hohen Drücken von bis zu 350 bar sehr geringe und äußerst konstante Volumenströme an CO_2 einzustellen, so dass trotz kleiner Reaktorvolumina lange Verweilzeiten erreicht werden konnten. Trotz größtmöglicher Flexibilität konnten sämtliche wichtige Prozessparameter gemessen und geregelt werden. Durch den Einsatz einer überkritischen Fluidchromatographie konnte eine online Analytik etabliert werden, die eine genaue Beurteilung der Reaktion über die gesamte Reaktionsdauer erlaubte. (Kapitel 2.6)

Die kontinuierlichen Versuche in der entwickelten Anlage zeigten, dass sowohl die reaktionstechnische Seite als auch die online Analytik sämtliche Anforderungen an

einen kontinuierlichen Prozess erfüllen. Mehrere Versuche in dieser Anlage haben gezeigt, dass der Einsatz von reinem Enzymlyophilisat (CALB) in kontinuierlichen Prozessen zwar möglich, aber aufgrund von Agglomerierungsproblemen nur schwer zu realisieren ist. Der Einsatz von kommerziellen Immobilisaten (Novozym[®]435) zeigte ebenfalls Probleme mit Agglomerationen. Diese konnten allerdings durch eine optimierte Reaktionsführung weitestgehend unterdrückt werden. Die dadurch erzielten Ergebnisse zeigten eine gute Aktivität des Enzymimmobilisates sowie eine ausreichende Stabilität über die gesamte Prozessdauer. Der zur Racemisierung verwendete Katalysator VOSO_4 zeigte zunächst eine ausreichende Aktivität in diesem System. Jedoch konnte aufgrund von Stabilitätsproblemen dieses Katalysators der Prozess nicht in vollem Umfang realisiert werden. (Kapitel 2.7)

3.2 Ausblick

Mit denen in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnten die Grundlagen für ein neuartiges reaktionstechnisches Konzept für eine kontinuierliche dynamisch kinetische Racematspaltung gelegt werden. Das Konzept erlaubt für beide Reaktionen die freie Katalysatorwahl, unabhängig von Einschränkungen, die sich durch die Kombination der Bedingungen ergeben.

Die Simulation einer kontinuierlichen DKR sowohl für den hier vorgestellten Schlaufenreaktor als auch für ein Strömungsrohr konnte realisiert werden. Dabei wurde bisher von geringen Substratkonzentrationen ausgegangen, was eine Beschreibung des Systems über eine Kinetik erster Ordnung erlaubt. Um den Prozess jedoch auch im Hinblick von möglichen Raum-Zeit-Ausbeuten zu untersuchen und beide Konzepte zu vergleichen, sollte die Simulation dahingehend erweitert werden, dass der Einfluss der Substratkonzentration auf die Kinetik genauer simuliert wird. Des Weiteren wurden bisher nur stationäre Zustände simuliert. Durch eine zusätzliche Erweiterung auf das dynamische Verhalten kann der Einfluss von verschiedenen Desaktivierungsmechanismen genauer untersucht werden.

Zur erfolgreichen Durchführung einer kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung muss ein Racemisierungskatalysator gefunden werden, der nicht nur

eine gute Aktivität zeigt, sondern ebenso eine gute Selektivität und vor allem auch eine ausreichende Stabilität aufweist. Dazu können entweder weitere heterogene Katalysatoren untersucht werden oder es kann versucht werden homogen einzusetzen- de Katalysatoren in geeigneter Weise zu immobilisieren. Letzteres kann dabei z. B. durch den Einsatz sogenannter SILP*-Partikel versucht werden. Als heterogene Katalysatoren können z. B. verschiedene modifizierte Zeolithe untersucht werden, deren katalytische Aktivität entsprechend angepasst wird.

Die pH-Messungen in diesem System sind abgeschlossen. Weitere Softwareentwicklungen und neue, sowie verbesserte Computermodelle werden zukünftig eine genauere *ab initio* Vorhersage des pH-Wertes bei unterschiedlichen Drücken und Temperaturen erlauben, wodurch die benötigten Versuche für eine gute pH-Kontrolle auf ein Minimum reduziert werden können.

Die Einflüsse verschiedener Prozessparameter auf die Aktivität konnten für die CRL in überkritischem CO₂ gezeigt werden. Um ein genaueres Verständnis für die auftretenden Effekte zu bekommen sind weitere Versuche nötig. Dazu müssen die Prozessbedingungen über einen weiteren Bereich variiert werden und dieses Verhalten auch für andere Enzyme überprüft werden. Genauere Analysen des Verhaltens, insbesondere an der Phasengrenzfläche, und durch Analysen auf molekularer Ebene am Enzym können neue Erkenntnisse für dieses viel versprechende System liefern.

Die Entwicklung der Hydrogele zur Stabilisierung der Wasserphase und zur Enzymimmobilisierung zeigten gute Ergebnisse im Hinblick auf die Aktivität. Hier muss in weiteren Untersuchungen eine Begründung für die nicht ausreichende Stabilität im reaktiven System gefunden werden und diese durch weitere Entwicklungen verbessert werden.

Die Ergebnisse in Kapitel 2.2 haben die starke Abhängigkeit der Ergebnisse von der Umlaufgeschwindigkeit gezeigt. Eine genaue Einstellung dieses Verhältnisses war bisher nicht zu realisieren, da keine Möglichkeit bestand den Volumenstrom unter den gegebenen Bedingungen zu messen. Abhilfe kann möglicherweise durch den Einsatz eines Coriolis-Messgerätes geschaffen werden, welches seit neustem kommerziell

*supported ionic liquid phase

auch für die hier benötigten Bedingungen erhältlich ist.

Die Demonstration des Gesamtprozesses der kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung mit getrennten Reaktionsräumen wird bereits durch den Einsatz eines geeigneten Racemisierungskatalysators möglich sein.

Kapitel 4

Experimenteller Teil

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Verwendete Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien ohne weitere Aufbereitung direkt verwendet. Lösungsmittel wurden vor Gebrauch unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer destilliert.

Tabelle 4.1: Chemikalienliste Teil A.

Nr.	Substanz	CAS	Firma
1	Acrylsäure > 99 % zur Synthese	79-10-7	Merck
2	Bradford Reagenz		Sigma-Aldrich
3	1-Butanol > 99,5 % zur Analyse	71-36-3	Merck
4	Butansäure > 99 % zur Synthese	107-92-6	Merck
5	Butylpropionat > 98 %	590-01-2	Merck
6	<i>Candida rugosa</i> Lipase Typ VII	9001-62-1	Sigma-Aldrich
7	2-Hydroxy-4'-hydroxyethoxy-2 -methylpropiophenon (Irgacure 2959)	106797-53-9	CIBA- Spezialitätenchemie GmbH
8	Dowex-Marathon MSC	53025-53-9	Sigma-Aldrich
9	Heptan	142-82-5	technisch
10	n-Hexan (Wasser SI<0,1%)	110-54-3	Merck KGaA

Tabelle 4.2: Chemikalienliste Teil B.

Nr.	Substanz	CAS	Firma
11	2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) > 97 %	868-77-9	Merck KGaA
12	Kohlenstoffdioxid 4.5	124-38-9	Westfalen Gas
13	Methoxypolyethylenglykol 350-methacrylat (MPEG 350 MA; Bisomer)	26915-72-0	Cognis UK Ltd.
14	(±)-1-Phenylethanol, purum 98 %	98-85-1	Fluka
15	Polyethylenglykoldimethacrylat (PEGDMA)	25852-47-5	Sigma-Aldrich
16	Rinderserumalbumin BSA	9048-46-8	Sigma-Aldrich
17	Stickstoff 5.0	7727-37-9	Westfalen Gas
18	Triethanolamin 97 % (TEA)	102-71-6	VWR-Prolabo
19	Vanadiumoxidsulfat 97 %	12334-20-3	Sigma-Aldrich
20	Wasserstoff 5.0	1333-74-0	Westfalen Gas

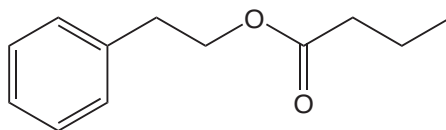
4.1.2 Methoden

4.1.2.1 GC-Methoden

Quantitativer Nachweis von 1-Phenylethanol **2** und α -Methylbenzylbutyrat

4, chiral Zum Enantiomerennachweis von 1-Phenylethanol **2** und α -Methylbenzylbutyrat **4** wurde der Gaschromatograph 21 (Siemens Sichromat, zentrale Analytik, ITMC) verwendet: Säule: 25 m Chirasil-Dex-CB Varian; Innendurchmesser: 0,25 mm; Schichtdicke df: 0,25 μ m; Trägergas H₂ (2 bar); VDT: 250 °C; Detektor FID 300 °C; Analysenbedingungen: 14 min isotherm bei 100 °C, dann wird mit 10 °C · min⁻¹ auf 180 °C aufgeheizt.

Analysenzeiten: **2**: 5,03 min und 5,37 min; **4**: 11,39 min und 11,74 min. Als interner Standard wurde unter Einbeziehung des entsprechenden Korrekturfaktors ggf. β -Phenylethylbutyrat **29** verwendet.

**29**

Quantitativer Nachweis von α -Methylbenzylbutyrat **4, nicht chiral** Der Nachweis α -Methylbenzylbutyrat **4** ohne Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen erfolgte auf einem GC-MS von Shimadzu (GC-17A; MS QP-500U): Säule 25m-FS-SE-54-CB-0,25 CS-Chromatographie; Innendurchmesser: 0,20 mm; Schichtdicke df: 0,25 μm ; Trägergas N_2 (2 bar); Injektor: 200 °C; Interface: 230 °C; Analysenbedingungen: isotherm bei 145 °C.

Analysenzeiten: **4**: 2,82 min.

Quantitativer Nachweis von Butylpropionat **19** Der Nachweis von Butylpropionat **19** erfolgte auf einem GC-MS von Shimadzu (GC-17A; MS QP-500U): Säule 25m-FS-SE-54-CB-0,25 CS-Chromatographie; Innendurchmesser: 0,20 mm; Schichtdicke df: 0,25 μm ; Trägergas N_2 (1,1 bar); Injektor: 220 °C; Interface: 230 °C; Analysenbedingungen: isotherm bei 80 °C.

Analysenzeiten: **19**: 2,62 min.

4.1.2.2 SFC-Methoden

Quantitativer Nachweis von 1-Phenylethanol **2 und α -Methylbenzylbutyrat **4**** Zur online Analytik von 1-Phenylethanol **2**, Butansäure **3** und α -Methylbenzylbutyrat **4** wurde eine überkritische Fluidchromatographie der Firma Carlo Erba verwendet (SFC3000): Säule: 10 m Permabond OV1701 Macherey-Nagel; Innendurchmesser: 0,05 mm; Schichtdicke df: 0,25 μm ; Trägergas CO_2 ; Probenventil: 40 °C; Detektor FID 280 °C; Make Up Gas N_2 150 kPa; Brenngas: H_2 70 kPa und Pressluft 120 kPa; Split 300 °C; Analysenbedingungen: Druck: 0,5 min isobar bei 110 bar, Druckerhöhung mit 0,6 bar $\cdot$ min⁻¹ auf 210 bar, dann isobar für 5 min, Druckerniedrigung mit 8 bar $\cdot$ min⁻¹ auf 110 bar; Temperatur: 2 min isotherm bei 120 °C, Aufheizen auf 140 °C mit 5 °C $\cdot$ min⁻¹, dann 27 min isotherm.

Analysenzeiten: 12,8 min; **2**: 15,8 min; **4**: 17,2 min.

Quantitativer Nachweis von 1-Butanol **17 und Butylpropionat **19**** Zur online Analytik von 1-Butanol **17** und Butylpropionat **19** wurde eine überkritische Fluidchromatographie der Firma Carlo Erba verwendet (SFC3000): Säule: 10 m Permabond OV1701 Macherey-Nagel; Innendurchmesser: 0,05 mm; Schichtdicke df: 0,25 μm ; Trägergas CO_2 ; Probenventil: 56 °C; Detektor FID 280 °C; Make Up Gas N_2 ; Brenngas: H_2 (70 kPa) und Pressluft (120 kPa); Split 300 °C; Analysenbedingun-

gen: Druck: 5 min isobar bei 100 bar, Druckerhöhung mit $0,6 \text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$ auf 170 bar, dann isobar für 7 min; Temperatur: isotherm bei 150°C . Analysenzeiten: **17**: 8,5 min; **19**: 10,7 min.

4.1.2.3 Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

Die Proteingehaltsbestimmung für die CRL erfolgt relativ zu BSA. Dazu wird eine Kalibrierung mit BSA im Konzentrationsbereich von $0 \mu\text{g/mL}$ und $25 \mu\text{g/mL}$ durchgeführt. Zur Gehaltsbestimmung werden $33 \mu\text{L}$ der Probenlösung in eine $1,5 \text{ mL}$ Einwegküvette vorgelegt und anschließend $1000 \mu\text{L}$ Bradford-Reagenz dazugegeben. Die Lösung wird homogenisiert, 10 min unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend im UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Proben mit Absorptionen außerhalb des kalibrierten Bereiches werden geeignet verdünnt.

4.1.2.4 UV-Messungen zur Verfolgung der Immobilisierung

Es wird zunächst eine Kalibrierung mit dem verwendeten Enzym bzw. Protein durchgeführt. Für die CRL wird die Kalibrierung im Bereich zwischen $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ bis $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ durchgeführt, für das WEA im Bereich von $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ bis $1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die Extinktion wird in einer $1,5 \text{ mL}$ Einwegküvette bei einer Wellenlänge von 279 nm gemessen. Es ist darauf zu achten, dass die Extinktion unter 1 liegt, ggf. wird entsprechend verdünnt. Es wurde das Spektrometer „Lambda 2S“ von Perkin Elmer verwendet.

4.2 Arbeitsvorschriften

4.2.1 Racemisierungsversuche

4.2.1.1 Racemisierung mit Dowex-Katalysator

Unter Schutzgas werden in einem 50 mL Schlenkkolben (*S*)-1-Phenylethanol (*S*)-**2** ($60,5 \mu\text{L}$, $0,5 \text{ mmol}$) und Vinylbutyrat **13** ($95,2 \mu\text{L}$, $0,75 \text{ mmol}$) in 10 mL getrocknetem Heptan als Substratlösung angesetzt.

Von dieser Lösung wird 1 mL zu dem Dowex-Katalysator (5 mg) gegeben und im vorgeheizten Ölbad auf 80°C (bzw. je nach Versuch auf 60°C oder 40°C) temperiert. In 5 min-Abständen werden $75 \mu\text{L}$ Proben genommen, 1:1 mit dem Standard gemischt

und gaschromatographisch analysiert. Der Standard besteht aus einer $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lösung von β -Phenylethylbutyrat **29** in Heptan.

4.2.1.2 Racemisierung mit VOSO_4

Unter Schutzgas werden in einem 50 mL Schlenkkolben (*S*)-1-Phenylethanol (*S*)-**2** (60,5 μL , 0,5 mmol) und Vinylbutyrat **13** (95,2 μL , 0,75 mmol) in 10 mL getrocknetem Heptan vorgelegt und im Ölbad auf 80°C temperiert. Anschließend wird unter Rühren der Katalysator VOSO_4 (51,8 mg) dazugegeben. In 5 min-Abständen werden 100 μL Proben genommen, 1:1 mit dem Standard gemischt und gaschromatographisch analysiert. Der Standard besteht aus einer $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lösung von β -Phenylethylbutyrat **29** in Heptan.

4.2.2 pH-Messungen

In Abbildung 4.1 ist der Aufbau zur Bestimmung des pH-Wertes dargestellt. Zu Beginn eines jeden Tages wird die pH-Elektrode mit den pH-Maßlösungen 4,1 $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ und 7,1 $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ bei benötigter Temperatur im Autoklaven drucklos kalibriert. Zur pH-Messung wird zunächst die sich noch im Autoklaven befindliche Lösung mit einer Spritze und einem Siliconschlauch entfernt. Anschließend wird je dreimal mit VE-Wasser und der zu messenden Lösung gespült. Zuletzt wird der Autoklav soweit mit der zu messenden Lösung befüllt, dass die Membran der Elektrode mit Flüssigkeit bedeckt ist. Nach Anbringen aller Kapillaren werden beide Autoklavenhälften langsam und gleichmäßig bis zum Erreichen des gewünschten Druckes mit Stickstoff (obere Hälfte) bzw. Kohlenstoffdioxid (untere Hälfte) beaufschlagt. Dabei ist darauf zu achten, dass in der oberen Hälfte stets ein leichter Überdruck von ca. 0,5 bar im Vergleich zur unteren Zelle herrscht. Unter starkem Rühren der zu messenden Lösung wird der Autoklav solange bei gleichem Druck gehalten, bis sich ein stabiler und konstanter pH-Wert einstellt (zum genaueren Ablesen des pH-Wertes wird kurzzeitig die Rührgeschwindigkeit verlangsamt). Anschließend kann auf einen beliebig höheren Druck aufgespresst werden.

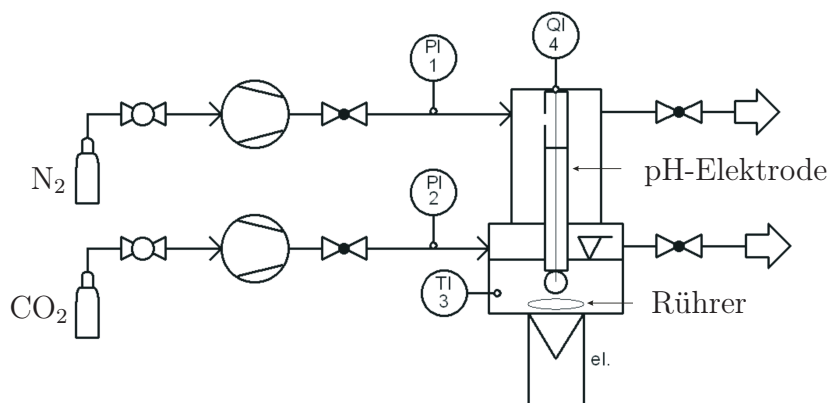


Abbildung 4.1: Versuchsaufbau für pH-Messungen.

4.2.3 Batchversuche im Zweiphasensystem Wasser/scCO₂

4.2.3.1 Kalibrierung der SFC

Folgende Lösungen werden mit Pentan als Lösungsmittel in einem 10 mL Messkolben angesetzt. Jede einzelne dieser Lösungen wird dreimal über die Probenschleife direkt in die überkritische Fluidchromatographie injiziert und gemessen.

Tabelle 4.3: Eingesetzte Konzentrationen und Massen für die Kalibrierung der SFC.

Nr.	Konzentration 17 mmol · L ⁻¹	Masse 17 mg	Konzentration 19 mmol · L ⁻¹	Masse 19 mg
1	145	107,3	5	6,5
2	135	99,9	15	19,5
3	120	88,8	30	39,0
4	75	55,5	70	91,0

4.2.3.2 Durchführung der Versuche

Das reaktive System In Abbildung 4.2 ist der Aufbau für die Versuche im Zweiphasensystem Wasser/scCO₂ dargestellt. In einen 100 mL Messkolben werden 2,220 g Butanol **17** (300 mmol · L⁻¹) und 2,236 g Propionsäure **18** (300 mmol · L⁻¹) sowie 2,688 g NaHCO₃ (320 mmol · L⁻¹) eingewogen und mit VE-Wasser aufgefüllt.

In einen 20 mL Fensterautoklaven werden 300 mg *Candida rugosa* Lipase gegeben. Anschließend werden 10 mL der zuvor hergestellten Substratlösung zugefügt und die Lipase vorsichtig gelöst. Die Zugabe wird als Beginn der Reaktion gewählt. Je nach Versuchsbedingungen wird nun das Pentan als Cosolvents dazugegeben. Anschließend wird der Autoklav zügig verschlossen und an den Versuchsaufbau angeschlossen. Der Autoklav wird über einen beheizbaren Magnetrührer auf die gewünschte Innentemperatur eingestellt und mit CO₂ auf den gewünschten Druck gebracht. Die Reaktionslösung wird über Magnetrührer gerührt. Sobald der gewünschte Druck erreicht ist, wird die Umlaufpumpe auf eine Geschwindigkeit von 300 min⁻¹ eingestellt. Die Funktion der Umlaufpumpe kann anhand der aufsteigenden Blasen am Tauchrohr überprüft werden. In regelmäßigen Abständen werden Messungen mit der SFC durchgeführt.

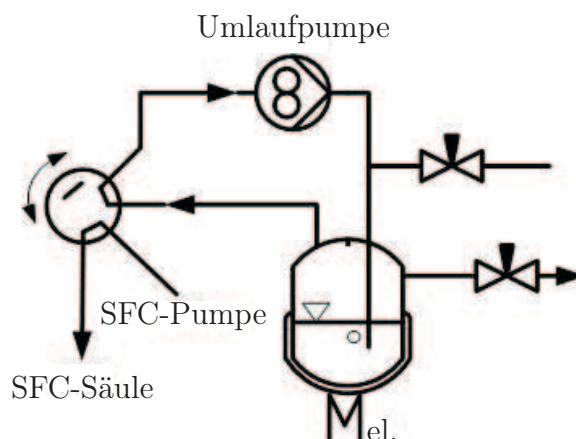


Abbildung 4.2: Aufbau zur Messung der Enzymkinetik im Zweiphasensystem Wasser/scCO₂.

Nach jedem Versuch wird der Autoklav gründlich mit VE-Wasser gereinigt. Die Umlaufpumpe wird durch das Pumpen von mind. 200 mL VE-Wasser gründlich gereinigt und anschließend kurz „trocken gepumpt“. Anschließend wird der leere Autoklav angeschlossen, auf 100 bar aufgepresst und die Pumpe für kurze Zeit eingeschaltet, um restliches Wasser aus der Pumpe und den Leitungen in den Autoklaven zu fördern. Nach Ablassen des Drucks wird der Autoklav erneut gereinigt und getrocknet.

Bestimmung der Verteilung Für die Betrachtung der Substratverteilung in diesem Zweiphasensystem wird derselbe Versuchsaufbau verwendet (Abbildung 4.2). In einen 100 mL Messkolben werden 2,220 g Butanol **17** ($300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) und 2,236 g Propionsäure **18** ($300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) sowie 2,688 g NaHCO₃ ($320 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) eingewogen und mit VE-Wasser aufgefüllt. 10 mL dieser Lösung werden in den Autoklaven gegeben. Je nach Versuchsbedingungen wird Pentan (5 mL) dazugegeben. Anschließend wird der Autoklav zügig verschlossen und an den Versuchsaufbau angeschlossen. Der Autoklav wird über einen beheizbaren Magnetrührer auf die gewünschte Innentemperatur eingestellt und mit CO₂ auf den gewünschten Druck gebracht. Die Reaktionslösung wird über einen Magnetrührer gerührt. Sobald der gewünschte Druck erreicht ist, wird die Umlaufpumpe auf eine Geschwindigkeit von 300 min^{-1} eingestellt. Die Funktion der Umlaufpumpe kann anhand der aufsteigenden Blasen am Tauchrohr überprüft werden. Nach ca. einer halben Stunde wird die erste Mes-

sung mit der SFC durchgeführt. Es sind mindestens vier Messungen notwendig, um sicher zu stellen, dass die Verteilung im Gleichgewicht ist. Aus diesen vier Messungen wird der Mittelwert gebildet.

Nach jedem Versuch wird der Autoklav gründlich mit VE-Wasser gereinigt. Die Umlaufpumpe wird durch das Pumpen von mind. 200 mL VE-Wasser gründlich gereinigt und anschließend kurz „trocken gepumpt“. Anschließend wird der leere Autoklav angeschlossen, auf 100 bar aufgepresst und die Pumpe für kurze Zeit eingeschaltet, um restliches Wasser aus der Pumpe und den Leitungen in den Autoklaven zu fördern. Nach Ablassen des Drucks wird der Autoklav erneut gereinigt und getrocknet.

4.2.3.3 Statistische Versuchsplanung

Es werden zunächst für jeden Faktor zwei Einstellungen festgelegt und anschließend ein vollfraktioneller Versuchsplan mit Zentralpunkt erstellt, so wie es in Abbildung 4.3 bildlich dargestellt ist. Für die Temperatur werden 35 °C und 65 °C, für den Druck werden 100 bar und 200 bar und für das Volumen an Cosolvents (Pentan) werden 0 mL und 5 mL ausgewählt. Die Versuche werden in zufälliger Reihenfolge durchgeführt (Tabelle 4.4) um verfälschte Ergebnisse durch z. B. driftende Messwerte auszuschließen.

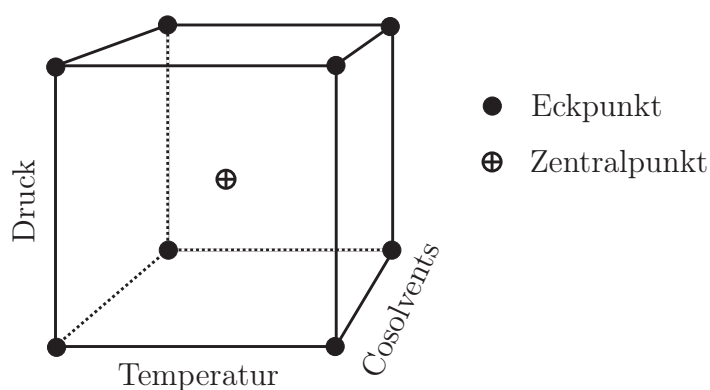


Abbildung 4.3: Schema der statistischen Versuchsplanung.

Tabelle 4.4: Versuche zur Messung der Kinetik im Zweiphasensystem Wasser/scCO₂.

Durchlauf Reihenfolge	Temperatur °C	Druck bar	Pentan mL
1	65	200	5,0
2	65	100	0,0
3	35	100	5,0
4	35	200	0,0
5	50	150	2,5
6	35	200	5,0
7	35	100	0,0
8	65	100	5,0
9	65	200	0,0

4.2.4 Immobilisierung der *Candida rugosa* Lipase

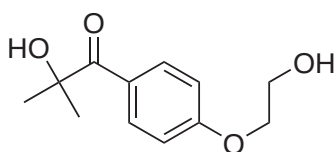
4.2.4.1 Herstellung der ionischen Hydrogele

Herstellung der Natriumacrylat-Lösung Vor der Herstellung eines Superabsorbers aus Natriumacrylat wird zunächst die zu verwendende Acrylsäure mit NaOH neutralisiert. Da Natriumacrylat **20** nur mit $w = 35\%$ in Wasser löslich ist, muss zunächst das Natriumhydroxid in soviel Wasser gelöst werden, dass die am Ende resultierende Lösung die gewünschte Konzentration besitzt. Anschließend wird die Natriumhydroxidlösung langsam zu der mit Eis gekühlten Acrylsäure getropft. Dabei ist darauf zu achten, dass die Temperatur nicht über ca. 35 °C steigt um eine vorzeitige, ungewollte Polymerisation zu verhindern.

Lösungspolymerisation 297,9 g NaOH (7,44 mol) werden in 1166 g VE-Wasser gelöst und diese Lösung wie oben beschrieben langsam zu 536,2 g Acrylsäure (7,44 mol) getropft. Anschließend wird der pH-Wert kontrolliert und ggf. mit NaOH oder Acrylsäure auf pH=7 eingestellt.

Zu 182,2 g dieser Natriumacrylatlösung (678 mmol) werden 17,8 g Polyethylenglykoldimethacrylat **875** (20,4 mmol) sowie 1,117 g 25 %iger TEA Lösung (1,872 mmol) und weitere 81,4 g VE-Wasser gegeben. Diese Lösung wird 0,5 h mit Stickstoff begast um Sauerstoff weitestgehend aus der Lösung zu entfernen. Gleichzeitig werden separat 547 mg NPS **22** (2,278 mmol) und 26 mg Irgacure **30** (0,114 mmol) in jeweils

6,781 g bzw. 10,171 g VE-Wasser im Ultraschallbad gelöst. Anschließend werden diese Starterlösungen der Monomerlösung kurz untergerührt und schließlich mit UV Licht bestrahlt. Der Temperaturanstieg der Reaktion wird beobachtet. Nachdem der Temperaturanstieg beendet ist, wird 0,5 h weiter mit UV Licht bestrahlt. Nach beendeter Reaktion wird das Polymer zunächst leicht zerkleinert, 1 h im Trockenschrank bei 50 °C getrocknet und anschließend zermahlen.

**30**

Inverse Suspensionspolymerisation In einen Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Gaseinleitungsrohr und Rührwerk werden 300 mL Cyclohexan gegeben und 0,5 h entgast (mit Stickstoff oder Argon). Anschließend werden 800 mg Bentonid SD-1 dazugegeben und mit dem KPG-Rührer für 10 min fein verteilt. Danach werden unter Inertgasatmosphäre und weiterem Rühren ($350 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$) 26,00 g Na-Acrylat Lösung (35 %ig, 96,7 mmol) und 5,08 g Polyethylenglykoldimethacrylat **875 21** (5,8 mmol) dazugegeben. Nach weiteren 15 min werden 270 mg NPS (1,126 mmol), 160 mg TEA Lösung (25 %ig, 0,268 mmol) und 1,1 g dest. Wasser dazugegeben. Diese Dispersion wird im Wasser- oder Ölbad auf 60 °C aufgeheizt. Der Inertgasstrom und der Rührer werden während der gesamten Reaktion nicht ausgeschaltet. Die Temperatur wird für 1,5 h gehalten. Anschließend wird das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und mit einem Metallfiltertuch Maschenweite ca. 50 µm abfiltriert. Die Partikel werden zweimal mit je 60 mL Cyclohexan gut gewaschen. Die abfiltrierten Partikel werden tiefgefroren (−18 °C für 12 h) und anschließend lyophilisiert.

4.2.4.2 Immobilisierung an ionischen Hydrogelen

Immobilisierung von WEA Es werden 0,2 g vernetztes Hydrogel in eine wässrige 120 mL $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ WEA (Lyophilisat) Lösung gegeben und die Enzymkonzentration als Filtrat über den Bardford-Nachweis bestimmt. Dabei wird vor der Messung der pH-Wert immer mit 1 M Salzsäure auf 4,7 eingestellt.

Immobilisierung von CRL In einem 200 mL Messkolben werden 4,00 g CRL Lyophilisat ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) und 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (24,6 mmol) vorgelegt und mit VE-Wasser aufgefüllt. Anschließend wird ca. die Hälfte dieser Lösung in ein 200 mL fassendes doppelwandiges Gefäß gegeben. Die Lösung wird über einen Kryostaten auf 4°C gekühlt. Danach werden 0,45 g des Hydrogels vorsichtig unter Rühren dazugegeben und mit der restlichen Enzymlösung aufgefüllt. Nun wird der pH-Wert langsam mit dem Autotitrator (716 DMS Titrino, Metrohm) auf 3,0 eingestellt (1 M HCl , minimale Geschwindigkeit $1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, maximale Geschwindigkeit $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) und für 48 h auf diesem Wert gehalten (Messintervall 2 s). Nach Abschluss der Immobilisierung wird die Lösung über ein Metallsieb (Porendurchmesser ca. $50 \mu\text{m}$) abfiltriert und für eine Minute mit 2800 min^{-1} geschleudert um das Oberflächenwasser zu entfernen (Schleuder der Firma AEG Electrolux; SV 3528, Typ 775 SEK 120 mit 3,7 kg Fassungsvermögen).

Bestimmung der Aktivität Es wird zunächst eine Lösung von je $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 1-Butanol **17** und Propionsäure **18** in Hexan angesetzt. Von dieser Lösung werden 3 mL zu 1 g des Immobilisates gegeben. Die Reaktion wird bei 30°C im Schüttelbad (Firma Kottermann) durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wird eine Probe von $75 \mu\text{L}$ aus der organischen Phase entnommen und die Produktkonzentration gaschromatographisch bestimmt.

4.2.4.3 Herstellung der nicht ionischen Hydrogele

Herstellung durch Lösungspolymerisation Zunächst wird die Monomerlösung bestehend aus 4,81 g Methoxypolyethylenglykol 350-methacrylat **25** (11,2 mmol), 27,62 g 2-Hydroxyethylmethacrylat **26** (212,5 mmol), 3,35 g Polyethylenglykoldimethacrylat **21** (4,47 mmol), 1,60 g TEA (25 %ig in VE-Wasser, 2,69 mmol) und zusätzliche 78,27 g VE-Wasser angesetzt und 0,5 h mit Stickstoff entgast. Parallel werden separat 780 mg NPS **22** (3,245 mmol) und 37 mg Irgacure **30** (0,165 mmol) in jeweils 11,18 g bzw. 22,36 g VE-Wasser im Ultraschallbad gelöst. Anschließend werden die NPS- und Irgacure-Lösungen zu der Monomerlösung gegeben und die Polymerisation wird durch UV Bestrahlung gestartet. Die Reaktionstemperatur wird verfolgt. Nachdem die Temperatur nicht weiter ansteigt wird noch 30 min weiter bestrahlt. Anschließend wird das Hydrogel zerkleinert, dann zunächst für 5 h bei 100°C vortrocknet und anschließend bei 40°C vollständig getrocknet. Zum Abschluss wird

das Hydrogel gemahlen und fraktioniert.

4.2.4.4 Herstellung der nicht ionischen Hydrogele mit eingeschlossenem Hühnerserum Albumin

Zunächst wird die Monomerlösung bestehend aus 4,34 g Methoxypolyethylenglykol 350-methacrylat **25** (10,1 mmol), 7,44 g 2-Hydroxyethylmethacrylat **26** (57,2 mmol), 0,50 g Polyethylenglykoldimethacrylat **21** (0,66 mmol), 0,47 g TEA (25 %ig in VE-Wasser, 0,79 mmol) und zusätzliche 46,91 g VE-Wasser angesetzt. Zu dieser Monomerlösung werden 1,90 g WEA gegeben und die Lösung 0,5 h mit Stickstoff entgast. Parallel werden separat 230 mg NPS **22** (0,966 mmol) und 11 mg Irgacure **30** (0,049 mmol) in jeweils 3,36 g bzw. 6,73 g VE-Wasser im Ultraschallbad gelöst. Anschließend werden die NPS- und Irgacure-Lösungen zu der Monomerlösung gegeben und die Polymerisation wird durch UV Bestrahlung gestartet. Die Reaktionstemperatur wird verfolgt. Nachdem die Temperatur nicht weiter ansteigt wird noch 30 min weiter bestrahlt. Anschließend wird das Hydrogel zerkleinert, dann zunächst für 5 h bei 100 °C vorgetrocknet und anschließend bei 40 °C vollständig getrocknet. Zum Abschluss wird das Hydrogel auf eine Größe von < 800 µm gemahlen.

4.2.4.5 Immobilisierung an nicht ionischen Hydrogelen

Immobilisierung von WEA - Verfolgung der Absorption Zunächst wird eine 15 mg · mL⁻¹ WEA Lösung in VE-Wasser hergestellt und die genaue Konzentration durch eine UV Messung bestimmt. Anschließend werden zu 10 mL dieser Lösung 0,5254 g des nicht ionischen Hydrogels gegeben. In gewissen Abständen wird eine Probe von 0,5 mL abgenommen und deren Konzentration bestimmt. Die entnommene Lösung wird durch die gleiche Menge an Ausgangslösung ersetzt. Die Konzentrationsänderung durch den Austausch wird in der Berechnung beachtet.

Immobilisierung von CRL Es werden 750 mg CRL in 15 mL VE-Wasser gelöst, dessen pH-Wert zuvor bereits mit HCl auf 3,5 eingestellt worden war. Anschließend wird der pH-Wert erneut kontrolliert und mit 0,1 M HCl ggf. nachgebessert. Danach wird die Lösung zur Abtrennung nicht gelöster Salze abfiltriert. 10 mL dieser Lösung werden zu 1 g Hydrogel gegeben und 0,5 h unter Rühren bei RT quellen gelassen. Abschließend werden die Immobilisate abfiltriert und 1 min mit 2800 min⁻¹

zur Abtrennung des Oberflächenwassers geschleudert (Schleuder der Firma AEG Electrolux; SV 3528, Typ 775 SEK 120 mit 3,7 kg Fassungsvermögen).

Bestimmung der Aktivität in Heptan Zunächst wird die Substratlösung bestehend aus 916 mg 1-Phenylethanol (7,5 mmol) **2** und 2,217 g Buttersäure **3** (25,0 mmol) in 100 mL Heptan hergestellt. Anschließend wird zu 1 g der Immobilisate 9 mL der Substratlösung gegeben. Die Reaktion wird bei 30 °C im Schüttelbad (Firma Kottmann) durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wird eine Probe von 75 µL aus der organischen Phase entnommen und die Produktkonzentration gaschromatographisch bestimmt.

Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Bildung von Butylpropionat erfolgt analog. Die Substratlösung besteht aus 556 mg 1-Butanol **17** (7,5 mmol) und 1,852 g Propionsäure **18** (25,0 mmol) in 100 mL Heptan.

Bestimmung der Aktivität in scCO₂ In einen 20 mL Autoklaven werden 114,2 mg Butanol **17** (1,54 mmol) und 370,8 mg Propionsäure **18** (5,01 mmol) gegeben. Anschließend wird auf die Fritte des Einsatzes das Enzymimmobilisat aufgebracht (entweder 1,5 g vom nicht ionischen Hydrogel oder 0,5 g vom ionischen Hydrogel). Die Fritte des Einsatzes befindet sich ungefähr in der Mitte des Autoklaven, so dass das Immobilisat nicht bereits vor dem Aufpressen mit dem Substrat in Berührung kommt. Anschließend wird der Autoklav vorsichtig verschlossen, im Ölbad auf 40 °C (Öltemperatur) aufgeheizt und vorsichtig auf 200 bar aufgepresst. Nach 4,5 h wird der Autoklav im Eisbad abgekühlt. Anschließend wird der Druck über einen Zeitraum von ca. 1 h langsam abgelassen. Das entweichende CO₂ wird dabei durch 8 mL Heptan geleitet. Sobald kein Überdruck mehr im Autoklaven vorliegt, wird der Autoklav geöffnet und mit Heptan gespült, um das verbleibende Substrat und das Produkt aufzunehmen. Der Umsatz wird aus dem Verhältnis von Produkt zu Substrat bestimmt. Die Aktivität wird über den Umsatz berechnet.

4.2.5 Durchführung einer kontinuierlichen kinetischen Racematspaltung

Zunächst wird die Substratmischung aus Buttersäure **3** und Phenylethanol **2** im molaren Verhältnis von 2:1 hergestellt. Diese Mischung wird durch einen Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert und anschließend an die HPLC Pumpe der Anlage angeschlossen.

In ein Glasröhrchen (Innendurchmesser 1,2 cm) mit einer Fritte am unteren Ende wird das Enzymlyophilisat der CALB (70,1 mg) gegeben. Das restliche Volumen des Glasröhrchens wird vorsichtig mit Glaswolle aufgefüllt. Anschließend wird der Glaseinsatz in das Strömungsrohr für die kontinuierlichen Versuche gegeben. Die Außenwand des Glaseinsatzes liegt eng an der Innenwand des Strömungsrohres. Nach dem Verschrauben des Strömungsrohres wird dieses in die Anlage eingebaut und über dem Thermostat auf 40 °C beheizt. Gleichzeitig wird der Rest der Anlage ebenfalls auf 40 °C beheizt und mit einem CO₂-Volumenstrom von 3,5 NL · h⁻¹ auf 200 bar aufgespresst. Sobald der Druck erreicht ist, wird die HPLC Leitung mit der Substratmischung zunächst gespült, dann wird die Druckleitung der HPLC auf einen Druck leicht über 200 bar gebracht und anschließend das Ventil zum Mischer geöffnet. Der Verlauf der Reaktion wird über die SFC kontrolliert.

4.2.6 Durchführung einer kontinuierlichen dynamisch kinetischen Racematspaltung

4.2.6.1 Übersicht der einzelnen Versuche

In den Versuchen DKR 1 bis DKR 4 wurde im Strömungsrohr für die Enzymreaktion ein Glaseinsatz (ID=1,2 cm) verwendet, der eng an der Autoklaveninnenwand anliegt und am unteren Ende eine Fritte besitzt. In diesen Fällen wurde das Enzym in diesen Glaseinsatz gegeben und nicht direkt in den Autoklaven. Die unterschiedlichen Bedingungen der einzelnen Versuche sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

Tabelle 4.5: Versuchsbedingungen der einzelnen kontinuierlichen Versuche zur dynamisch kinetischen Racematspaltung.

Versuch Nr.	Enzym	m_{Enzym}	$m_{VOSO_4 \cdot 6H_2O}$	Acylierungsmittel	sonstiges
-	-	mg	mg	-	-
DKR 1	CalB	81,6	575	Buttersäure	*1
DKR 2	CalB	89,6	616	Buttersäure	*2
DKR 3	CalB	89,5	598	Buttersäure	
DKR 4	Novozym [®] 435	1764	750	Vinylbutyrat	
DKR 5	Novozym [®] 435	1845	692	Vinylbutyrat	
DKR 6	Novozym [®] 435	2062	723	Vinylbutyrat	
*1	Zu Beginn 24 h ohne Substrat gespült				
*2	Sehr schnell innerhalb 1 h aufgedrückt und gleichzeitig Substrat zugeführt				

4.2.6.2 Durchführung

In einem 20 mL Strömungsrohr (Durchmesser 1,5 cm, Länge 8,0 cm, Abbildung 4.4) wird der Ausgang mit Glaswolle zur Zurückhaltung des Enzymimmobilisates verschlossen. Anschließend wird ca. die Hälfte des Enzymimmobilisates Novozym[®]435 eingefüllt. Darauf folgt erneut eine dünne Schicht Glaswolle, bevor das restliche Immobilisat eingefüllt wird. Nun wird der Eingang des Strömungsrohres ebenfalls mit Glaswolle versehen und der Autoklav verschraubt.

Der Racemisierungskatalysator $VOSO_4$ wird in ein Strömungsrohr mit einem Volumen von 1,63 mL (Durchmesser 4,0 mm, Länge 130,0 mm) gegeben und zu beiden Seiten durch Glaswolle und Gitternetzen immobilisiert. Beide Strömungsrohre werden an entsprechender Stelle in die Anlage eingebaut. Anschließend wird die Anlage mit einem Volumenstrom von $1,75 \text{ NL} \cdot \text{h}^{-1}$ zunächst auf 35 bar aufgedrückt und das erste Mal auf Dichtigkeit geprüft. Anschließend wird die gesamte Anlage auf die gewünschten Temperaturen (40°C für den Enzymreaktor und 80°C für den Racemisierungsreaktor, sonstige Leitungen und der Mischer ebenfalls 40°C) gebracht ($2^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$). Die Temperatur des Racemisierungsreaktors wird am Reaktoreingang gemessen und geregelt. Danach wird die Anlage mit dem gleichen CO_2 -Volumenstrom auf einen Druck von 100 bar gebracht.

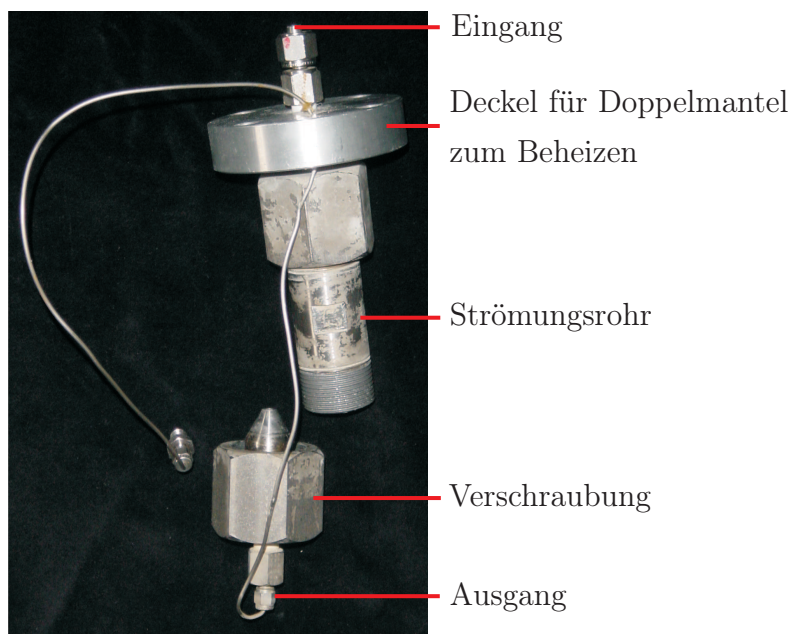


Abbildung 4.4: Strömungsrohr für die enzymatische kinetische Racematspaltung.

Das Substrat 1-Phenylethanol **2** (50 mL) wird zunächst über 0,5 g MgSO_4 getrocknet (mind. 3 h unter Rühren), anschließend über eine mit 30 g Molsieb gefüllte Säule dynamisch getrocknet und weiterhin über Molsieb unter Schutzgas gelagert (Restwassergehalt von ca. 220 ppm). Die Buttersäure für die Versuche DKR 1-DKR 3 und das Vinylbutyrat **13** für den Versuch DKR 4 (Tabelle 4.5) werden ohne weitere Aufbereitung verwendet. Für die Versuche DKR 5 und DKR 6 wird das Vinylbutyrat über K_2CO_3 vorgetrocknet und über Molsieb unter Schutzgas gelagert. Die Substrate 1-Phenylethanol und Butansäure werden in einem Molverhältnis von **2/3**=1,0/2,0 gemischt und die Substrate 1-Phenylethanol und Vinylbutyrat im Verhältnis **2/13**=1,0/1,5. Anschließend wird die Substratmischung durch einen Spritzenfilter (Porengröße 0,2 μm) filtriert und an die HPLC Pumpe der Anlage angeschlossen.

Zum Starten der Reaktion werden zunächst die Leitungen vor und hinter der HPLC gespült, dann die Hochdruckseite auf einen Druck von ca. 110 bar gebracht und anschließend, nach genauem Einstellen des gewünschten Volumenstroms, das Ventil zum Mischer geöffnet. Die Reaktion wird durch regelmäßige SFC-Messungen verfolgt. Ebenso werden regelmäßig Proben zur Bestimmung des Enantiomerenüber-

schusses gezogen. Dazu wird ein Ventil hinter dem Vordruckregler der Anlage geöffnet und der CO₂-Strom durch 2 mL Heptan geleitet. Diese Probe wird anschließend gaschromatographisch analysiert.

4.2.6.3 Regelparameter

Tabelle 4.6: Regelparameter für die Regelung der Temperaturen, Volumenströme und Drücke.

Regelgröße	Stellgröße	Regelparameter		
		P	I	D
-	-			
Temperatur Enzymreaktor	Über Thermostaten beheizt			
Temperatur Racemisierungsreaktor	Über externen Regler beheizt			
Temperatur MFC	% Heizrate	1,500	3,500	0,000
Temperatur BPR	% Heizrate	2,000	4,000	0,000
Temperatur Vorheizung ^{*1}	% Heizrate	3,000	8,000	0,000
Temperatur Mischer	% Heizrate	6,000	10,00	0,000
Temperatur Nachheizung ^{*2}	% Heizrate	3,000	8,000	0,000
Massenfluss CO ₂	Druckluft	0,400	4,000	0,025
Systemdruck ^{*3}	Druckluft	0,100	4,000	0,200
*1	Leitungen vor den Reaktoren			
*2	Leitungen hinter den Reaktoren			
*3	Taktung 1,2			

Anhang A

Herleitungen

A.1 Herleitung zur Beschreibung der Racemisierung für die Simulation

Die Änderung der Konzentration an *R*-Substrat im Racemisierungsreaktor kann beschrieben werden über:

$$\frac{dC_{R3}}{dt} = k_{rac,S} \cdot C_{S3} - k_{rac,R} \cdot C_{R3}. \quad (\text{A.1})$$

Für die Zeit t kann die Verweilzeit τ eingesetzt werden, die über den Volumenstrom $\dot{V}_R$ und dem Reaktorvolumen V_{rac} beschrieben wird:

$$\tau = \frac{V_{rac}}{\dot{V}_R}. \quad (\text{A.2})$$

Somit ergibt sich aus Gleichung A.1 und Gleichung A.2:

$$\dot{V}_R \cdot \frac{dC_{R3}}{dV_{rac}} = k_{rac,S} \cdot C_{S3} - k_{rac,R} \cdot C_{R3}. \quad (\text{A.3})$$

Zu Beginn der Reaktion liegt eines der Enantiomere im Überschuss vor, so dass durch diastereomere Wechselwirkungen möglicherweise $k_{rac,S} \neq k_{rac,R}$ ist. Dies mag in fester Phase der Fall sein, ist jedoch in verdünnten Lösungen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, zu vernachlässigen. Es kann also angenommen werden, dass $k_{rac,S} = k_{rac,R} = k_{rac}$ ist. Somit ergibt sich:

$$\dot{V}_R \cdot \frac{dC_{R3}}{dV_{rac}} = k_{rac} \cdot (C_{S3} - C_{R3}). \quad (\text{A.4})$$

Umgestellt ergibt sich:

$$\frac{dC_{R3}}{C_{S3} - C_{R3}} = \frac{k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot dV_{rac}. \quad (\text{A.5})$$

Da sich nicht nur C_R verändert, sondern auch C_S , wird letztere Konzentration durch folgende Bilanz ersetzt:

$$C_{R3} + C_{S3} = C_{R2} + C_{S2}. \quad (\text{A.6})$$

Umgestellt nach C_{S3} :

$$C_{S3} = C_{R2} + C_{S2} - C_{R3}, \quad (\text{A.7})$$

so dass sich aus Gleichung A.5 ergibt:

$$\frac{dC_{R3}}{C_{R2} + C_{S2} - 2 \cdot C_{R3}} = \frac{k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot dV_{rac}. \quad (\text{A.8})$$

Durch Ausklammern von -2 auf der linken Seite und multiplizieren mit -2 erhält man:

$$\frac{dC_{R3}}{C_{R3} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}} = -\frac{2 \cdot k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot dV_{rac}. \quad (\text{A.9})$$

Nach Einsetzen der Integrationsgrenzen

$$\int_{C_{R2}}^{C_{R3}} \frac{dC_{R3}}{C_{R3} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}} = -\frac{2 \cdot k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot \int_0^{V_{rac}} dV_{rac} \quad (\text{A.10})$$

kann das Integral gelöst werden

$$\ln\left(C_{R3} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}\right) - \ln\left(C_{R2} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}\right) = \frac{2 \cdot k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot V_{rac} \quad (\text{A.11})$$

$$\ln \frac{C_{R3} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}}{C_{R2} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}} = \frac{2 \cdot k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot V_{rac} \quad (\text{A.12})$$

$$\frac{C_{R3} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}}{C_{R2} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}} = \exp\left(\frac{2 \cdot k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot V_{rac}\right) \quad (\text{A.13})$$

$$C_{R3} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2} = \left(C_{R2} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2}\right) \cdot \exp\left(\frac{2 \cdot k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot V_{rac}\right) \quad (\text{A.14})$$

$$C_{R3} = \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2} + \left(C_{R2} - \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2} \right) \cdot \exp \left(\frac{2 \cdot k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot V_{rac} \right) \quad (\text{A.15})$$

$$C_{R3} = \frac{C_{S2} + C_{R2}}{2} + \left(\frac{2 \cdot C_{R2} - C_{S2} - C_{R2}}{2} \right) \cdot \exp \left(\frac{2 \cdot k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot V_{rac} \right) \quad (\text{A.16})$$

$$C_{R3} = \left(\frac{C_{S2} + C_{R2}}{2} \right) + \left(\frac{C_{R2} - C_{S2}}{2} \right) \cdot \exp \left(\frac{2 \cdot k_{rac}}{\dot{V}_R} \cdot V_{rac} \right). \quad (\text{A.17})$$

Die Änderung der Konzentration an *S*-Substrat im Racemisierungsreaktor kann analog zu oben hergeleitet werden.

A.2 Herleitung zur Ermittlung der Racemisierungsgeschwindigkeitskonstanten

Die Racemisierung wird in der Literatur im Allgemeinen durch den in einer bestimmten Zeit erreichten Enantiomerenüberschuss ee^* quantifiziert:

$$ee(R) = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]}. \quad (\text{A.18})$$

Das Fortschreiten der Racemisierung kann dabei auf zwei verschiedene Arten beschrieben werden, entweder als Geschwindigkeit der Racematbildung, oder als Geschwindigkeit der gegenseitigen Umwandlung [72]. Letzteres lässt sich dabei mit einer reversiblen Kinetik erster Ordnung beschreiben:

$$-\frac{d[R]}{dt} = k_1[R] - k_{-1}[S], \quad (\text{A.19})$$

wobei $[R]$ und $[S]$ die Konzentrationen der einzelnen Enantiomere, k_1 und k_{-1} die scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten und t die Zeit sind. Zu Beginn der Reaktion liegt eines der Enantiomere im Überschuss vor, so dass durch diastereomere Wechselwirkungen möglicherweise $k_1 \neq k_{-1}$ ist. Dies mag in fester Phase der Fall sein, ist jedoch in verdünnten Lösungen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, zu vernachlässigen, so dass angenommen werden kann, dass $k_1 = k_{-1} = k$ ist. Wird nun weiter angenommen, dass mit einer Lösung gestartet wird, die nur Enantiomer R enthält, so lässt sich das Differential in Gleichung A.19 mit $[S]_t = [R]_0 - [R]_t$ auflösen zu:

$$\ln \left[\frac{[R]_0}{2[R]_t - [R]_0} \right] = 2kt, \quad (\text{A.20})$$

wobei $[R]_0$ als die Konzentration von R zum Zeitpunkt Null und $[R]_t$ zum Zeitpunkt t ist [72].

Durch Umformen der Gleichung A.18 auf Seite 148 zu:

$$ee = \frac{2[R]_t - [R]_0}{[R]_0} \quad (\text{A.21})$$

*engl.: enantiomeric excess, häufig angegeben in %

und Einsetzen in Gleichung A.20 ergibt sich:

$$\ln \left[\frac{1}{ee} \right] = 2kt. \quad (\text{A.22})$$

Die Auftragung des natürlichen Logarithmus des inversen Enantiomerenüberschusses gegen die Zeit ergibt somit eine Gerade mit der doppelten Geschwindigkeitskonstanten als Steigung.

Die charakteristische Halbwertszeit $t_{1/2}$ als die Zeit, die benötigt wird um einen ee von 50 % zu erreichen, lässt sich beschreiben durch

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{2k}. \quad (\text{A.23})$$

Literaturverzeichnis

- [1] U. T. Bornscheuer, W. Streit, B. Dill, F. R. Heiker, A. Kirschning, G. Eisenbrand, P. Schreier, B. Fugmann, G. Pohnert, T. Gamse, *Römpf Chemie Lexikon*, 2. Aufl., (Hrsg.: U. T. Bornscheuer, W. Streit, B. Dill, F. R. Heiker, A. Kirschning, G. Eisenbrand, P. Schreier, B. Fugmann, G. Pohnert, T. Gamse), Thieme, Stuttgart, **1999**.
- [2] F. A. Carey, R. J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms*, 5. Aufl., Advanced Organic Chemistry, Springer Science & Business Media, LLC, New York, **2007**.
- [3] R. Noyori, *Asymmetric Catalysis In Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Inc., New York, **1994**.
- [4] M. Espinosa Bosch, A. J. Ruiz Sanchez, F. Sanchez Rojas, C. Bosch Ojeda, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 46, 9.
- [5] T. Eriksson, S. Björkman, B. Roth, P. Höglund, *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, 52, 807.
- [6] K. Sembongi, M. Tanaka, K. Sakurada, M. Kobayashi, S. Itagaki, T. Hirano, K. Iseki, *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, 31, 497.
- [7] „Food, D. Administration“, FDA’S Policy Statement for the development of new Stereoisomeric Drugs, **1992**.
- [8] European Union, *Directive 75/318/EEC - Investigation of Chiral Active Substances* **1994**.
- [9] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 788.

- [10] D. J. Ager, in *Handbook of Chiral Chemicals*, (Hrsg.: D. J. Ager), 2nd Aufl., CRC Press, Boca Raton, 1–10.
- [11] K. Gadamasetti, in *Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry, Challenges in an Ever Changing Climate.*, Bd. 2, (Hrsg.: K. Gadamasetti, T. Braish), CRC Press, Boca Raton, **2008**, 1–12.
- [12] F. F. Huerta, A. B. E. Minidis, J. E. Bäckvall, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 321.
- [13] J. Seyden-Penne, *Chiral auxiliaries and ligands in asymmetric synthesis*, 2. Aufl., John Wiley & Sons, New York [u.a], **1995**.
- [14] A. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548.
- [15] W. Liu, in *Handbook of Chiral Chemicals*, (Hrsg.: D. J. Ager), 2. Aufl., CRC Press, Boca Raton, 75–96.
- [16] G. Fülling, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2845.
- [17] J. V. Allen, J. M. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1859.
- [18] M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, *50*, 668–669.
- [19] O. Pàmies, J. E. Bäckvall, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 407.
- [20] O. Pàmies, J. E. Bäckvall, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247.
- [21] T. Clifford, *Fundamentals of supercritical Fluids*, 1. Aufl., Oxford Univ. Press, Oxford [u. a.], **1999**.
- [22] N. Theyssen, in *Multiphase Homogeneous Catalysis*, Bd. 2, (Hrsg.: B. Cornils, W. A. Herrmann, I. T. Horvath, W. Leitner, S. Mecking, H. Oliver-Bourbigou, D. Vogt), 1. Aufl., VCH/Wiley, Weinheim, **2005**, 630–643.
- [23] K. Zosel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 702.
- [24] P. Licence, M. Poliakoff, in *Multiphase Homogeneous Catalysis*, Bd. 2, (Hrsg.: B. Cornils, W. A. Herrmann, I. T. Horvath, W. Leitner, S. Mecking, H. Oliver-Bourbigou, D. Vogt), 1. Aufl., VCH/Wiley, Weinheim, **2005**, 607–629.
- [25] W. Leitner, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 746.

- [26] W. Leitner, *Chemie unserer Zeit* **2003**, 37, 32.
- [27] A. D. McNaught, A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book")*, 2nd Aufl., Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1997**.
- [28] A. M. Scurto, in *Multiphase Homogeneous Catalysis*, Bd. 2, (Hrsg.: B. Cornils, W. A. Herrmann, I. T. Horvath, W. Leitner, S. Mecking, H. Oliver-Bourbigou, D. Vogt), 1. Aufl., VCH/Wiley, Weinheim, **2005**, 607–629.
- [29] K. Burgemeister, Dissertation, RWTH Aachen University, **2006**.
- [30] P. G. Jessop, W. Leitner, *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*, Bd. 1, VCH/Wiley, Weinheim, **1999**.
- [31] W. Leitner, in *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds, A Comprehensive Handbook in Three Volumes*, Bd. 2 von *Developments*, (Hrsg.: B. Cornils, W. A. Herrmann), 2. Aufl., VCH/Wiley, **2002**, 851–872.
- [32] T. Sakakura, J.-C. Choi, H. Yasuda, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2365.
- [33] K. M. K. Yu, I. Curcic, J. Gabriel, S. C. E. Tsang, *ChemSusChem* **2008**, 1, 893.
- [34] M. T. Reetz, W. Wiesenhöfer, G. Franciò, W. Leitner, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 1221.
- [35] R. Wiebe, V. L. Gaddy, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 815.
- [36] R. Wiebe, V. L. Gaddy, *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, 61, 315.
- [37] W. Leitner, K. Burgemeister, in *Multiphase Homogeneous Catalysis*, Bd. 2, (Hrsg.: B. Cornils, W. A. Herrmann, I. T. Horvath, W. Leitner, S. Mecking, H. Oliver-Bourbigou, D. Vogt), 1. Aufl., VCH/Wiley, Weinheim, **2005**, 716–733.
- [38] O. Levenspiel, *Chemical Reaction Engineering*, 3. Aufl., John Wiley & Sohn, New York, **1999**.

- [39] D. S. Christen, *Praxiswissen der chemischen Verfahrenstechnik*, Verfahrenstechnik, Springer, Berlin [u. a.], **2005**.
- [40] H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science* **2003**, *299*, 1694.
- [41] A. S. Bommarius, B. Riebel, *Biocatalysis*, 1. Aufl., VCH/Wiley, Weinheim, **2004**.
- [42] M.-R. Kula, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldman), 2. Aufl., VCH/Wiley, Weinheim, **2002**, 1–40.
- [43] D. J. Rozzell, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2253.
- [44] K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysis and Enzyme Technology*, VCH/Wiley, Weinheim, **2005**.
- [45] A. M. Klivanov, *Chemtech* **1986**, *16*, 54.
- [46] R. H. Valivety, P. J. Hailing, A. R. Macrae, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1118*, 218.
- [47] M. F. Eckstein, J. Lembrecht, J. Schumacher, W. Eberhard, A. Spiess, M. Peters, C. Roosen, L. Greiner, W. Leitner, U. Kragl, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1597.
- [48] M. F. Eckstein, M. Peters, J. Lembrecht, A. Spiess, L. Greiner, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1591.
- [49] D. Vasic-Racki, in *Industrial Biotransformations*, (Hrsg.: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey), 1st Aufl., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2000**.
- [50] C. Roosen, P. Müller, L. Greiner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 607.
- [51] R. Mikolajek, A. C. Spiess, M. Pohl, S. Lamare, J. Buechs, *Chembiochem* **2007**, *8*, 1063.
- [52] S. K. Karmee, L. Casiraghi, L. Greiner, *J. Biotechnol.* **2008**, *3*, 104.
- [53] A. Buthe, Dissertation, RWTH Aachen University, **2006**.
- [54] G. Emig, E. Klemm, *Technische Chemie*, 5. Aufl., Springer, Berlin [u. a.], **2005**.

-
- [55] G. Breiding, K. Fajans, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1908**, *41*, 752.
- [56] W. Kuhn, E. Z. Knopf, *Z. Physik. Chem.* **1930**, *7*(Abt. B), 292.
- [57] P. Newman, P. Rutkin, K. Mislow, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *80*, 465.
- [58] G. Balavoine, A. Moradpour, H. B. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5152.
- [59] V. S. Martin, S. S. Woodard, T. Katsuki, Y. Yamada, M. Ikeda, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6237.
- [60] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294.
- [61] R. Noyori, M. Tokunaga, M. Kitamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 36.
- [62] N. S. Zefirov, *Tetrahedron* **1977**, *33*, 2719.
- [63] J. I. Seeman, E. B. Sanders, W. A. Farone, *Tetrahedron* **1979**, *36*, 1173.
- [64] M. Kitamura, M. Tokunaga, R. Noyori, *Tetrahedron* **1993**, *49*(9), 1853.
- [65] J. Andraos, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *13*, 2374.
- [66] V. Zimmermann, M. Beller, U. Kragl, *Org. Process. Res. Dev.* **2006**, *3*, 622.
- [67] P. Lozano, T. D. Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Int. J. Chem. Reactor Eng.* **2007**, *5*, A53.
- [68] P. Lozano, T. D. Diego, M. Larnicol, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1599.
- [69] P. Lozano, T. D. Diego, T. Sauer, M. Vaultier, S. Gmouh, J. L. Iborra, *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *40*, 93.
- [70] J. L. L. Rakels, H. T. Paffen, A. J. Straathof, J. J. Heijnen, *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 791.
- [71] M. Indlekofer, F. Brotz, A. Bauer, M. Reuss, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *52*, 459.

- [72] E. J. Ebbers, G. J. A. Ariaansa, J. P. M. Houbiersa, A. Bruggink, B. Zwanenburg, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9417.
- [73] Y. Ahn, S.-B. Ko, M.-J. Kim, J. Park, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 647.
- [74] P. M. Dinh, J. A. Horwarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623.
- [75] A. C. Marr, C. L. Pollock, G. C. Saunders, *Organometallics* **2007**, *26*, 3283.
- [76] O. Pàmies, J. E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5052.
- [77] A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J. E. Bäckvall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *36*, 1211.
- [78] J. H. Koh, H. M. Jung, M.-J. Kim, J. Park, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6281.
- [79] D. Lee, E. A. Huh, M.-J. Kim, H. M. Jung, J. H. Koh, J. Park, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2377.
- [80] T. H. Riermeier, P. Gross, A. Monsees, M. Hoff, H. Trauthwein, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3403.
- [81] M.-J. Kim, Y. Ahn, J. Park, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 578.
- [82] B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogár, B. Kaynak, J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8817.
- [83] S. Wuyts, K. D. Temmerman, D. D. Vos, P. Jacobs, *Chem. Commun.* **2003**, 1928.
- [84] S. Wuyts, K. De Temmerman, D. E. De Vos, P. A. Jacobs, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 386.
- [85] S. Wuyts, P. A. Jacobs, D. E. D. Vos, *Green Chem.* **2007**, *10*, 1104.
- [86] P. Ödman, L. A. Wessjohann, U. T. Bornscheuer, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9551.
- [87] P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 178.
- [88] M. Heinemann, Dissertation, RWTH Aachen University, **2003**.

-
- [89] J. Zappe, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **1997**.
- [90] A. J. Ellis, *J. Chem. Soc.* **1959**, 3689.
- [91] A. J. Read, *J. Solution Chem.* **1975**, *4*, 53.
- [92] K. L. Toews, R. M. Shroll, N. G. Smart, C. M. Wai, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4040.
- [93] J. D. Holmes, D. C. Steytler, G. D. Rees, B. H. Robinson, *Langmuir* **1998**, *14*, 6371.
- [94] J. D. Holmes, K. J. Ziegler, M. Audriani, C. T. J. Lee, P. A. Bhargava, D. C. Steytler, K. P. Johnston, *J. Chem. Phys.* **1999**, *103*, 5703.
- [95] K. J. Ziegler, J. P. Hanrahan, J. D. Glennon, J. D. Holmes, *J. Supercrit. Fluids* **2003**, *27*, 109.
- [96] R. J. Beynon, J. S. Easterby, *Buffer Solutions*, 1 Aufl., The Basics, IRL Press, Oxford, **1996**.
- [97] N. Spycher, K. Pruess, J. Ennis-King, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2003**, *67*, 3015.
- [98] A. J. Mesiano, E. J. Beckman, A. J. Russell, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 623.
- [99] T. Matsuda, T. Harada, K. Nakamura, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 909.
- [100] H. R. Hobbs, N. R. Thomas, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2786.
- [101] C. Roosen, M. Ansorge-Schumacher, T. Mang, W. Leitner, L. Greiner, *Green Chem.* **2007**, *9*, 455.
- [102] S. Montero, A. Blanco, M. D. Virto, L. C. Landeta, I. Agud, R. Solozabal, J. M. Lascaray, M. d. Renobales, M. J. Llama, J. L. Serra, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 239.
- [103] T. Hartmann, H. Meyer, T. Scheper, *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 653.
- [104] M. Caplow, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6795.

- [105] S. P. Ewing, D. Lockshon, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3072.
- [106] M. H. Jamroz, J. C. Dobrowolski, M. A. Borowiak, *J. Mol. Struct.* **1999**, *483*, 633.
- [107] Z. J. Dijkstra, A. R. Doornbos, H. Weyten, M. J. Ernsting, J. C. Elsevier, J. T. F. Keurentijes, *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *41*, 109.
- [108] F. Tewes, F. Boury, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 1874.
- [109] K. N. West, C. Wheeler, J. P. McCarney, K. N. Griffith, D. Bush, C. L. Liotta, C. A. Eckert, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 3947.
- [110] C. A. Eckert, C. L. Liotta, D. Bush, J. S. Brown, J. P. Hallett, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18108.
- [111] W. Hartmeier, *Immobilisierte Biokatalysatoren, Eine Einfuehrung.*, Springer, Berlin, **1986**.
- [112] R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289.
- [113] M. T. Reetz, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 943.
- [114] M. T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 527.
- [115] R. Saxena, P. Gosh, R. Gupta, W. Davidson, S. Bradoo, R. Gulati, *Curr. Sci.* **1999**, *77*, 101.
- [116] H. Wack, G. Deerberg, U. Bergstedt, J. Büchs, M. Heinemann, M. Ansorge-Schumacher, *Deutsches Patent- und Markenamt* **2003**, *DE 102 07 557 A1*.
- [117] J. Lalonde, A. Margolin, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), 2nd Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, 1559.
- [118] P. Mc Morn, G. Hutchings, *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *33*, 108.
- [119] F. L. Buchholz, A. T. Graham, *Modern Superabsorbent Polymer Technology*, VCH/Wiley, **1997**.
- [120] T. Mang, *GdCh-Monographie* **2002**, *24*, 65.
- [121] T. Mang, *Kautsch. Gummi Kunstst.* **2004**, *57*, 172.

-
- [122] A. Hüther, *Experimentelle und theoretische Untersuchungen zum Quellungs-gleichgewicht von Hydrogelen in wässrigen Lösungen*, Bd. Fortschr.-Berichte VDI Reihe 3. (Verfahrenstechnik) Nr. 688, VDI Verlag GmbH, Düsseldorf, **2001**.
- [123] T. Mang, *Deutsches Patent- und Markenamt* **2004**, DE 103 14 599 A1.
- [124] K. Welzel, Dissertation, Technischen Universität Carola-Wilhemina Braun-schweig, **2003**.
- [125] T. Canal, N. A. Peppas, *J. Biomed. Mater. Re.* **1989**, 23, 1183.
- [126] C. Faenger, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, **2005**.
- [127] G. B. Sigal, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3462.
- [128] M. A. Geluk, W. Norde, H. K. A. I. Kalsbeek van, K. Van't Riet, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 14, 748.
- [129] B. Doumeche, M. Heinemann, J. Buechs, W. Hartmeier, M. Ansorge-Schumacher, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 18, 19.
- [130] C. Roosen, J.-L. Muller, M. Kaefer, H. Kronenberg, R. Thelen, S. Aey, T. Harwardt, F. Zayed, W. Leitner, L. Greiner, *J. Supercrit. Fluids* **2009**, 48, 33.
- [131] H. R. Hobbs, B. Kondor, P. Stephenson, R. A. Sheldon, N. R. Thomas, M. Po-liakoff, *Green Chem.* **2006**, 8, 816.
- [132] U. Bornscheuer, A. Capewell, V. Wendel, T. Scheper, *J. Biotechnol.* **1996**, 46, 139.
- [133] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Instrumentelle Analytik, Grundlagen, Geräte, An-wendungen*, 1. Aufl., Springer, **1996**.
- [134] L. T. Taylor, *J. Supercrit. Fluids* **2008**, 47, 566.
- [135] D. A. Hammond, M. Karel, A. M. Klibanov, V. J. Krukonis, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1985**, 11, 393.

- [136] T. W. Randolph, H. W. Blanch, P. J. M, C. R. Wilke, *Biotechnol. Lett.* **1985**, 7, 325.
- [137] M. T. Reetz, W. Wiesenhöfer, G. Francio, W. Leitner, *Chem. Commun.* **2002**, 992.
- [138] M. T. Reetz, W. Wiesenhöfer, *Chem. Commun.* **2004**, 23, 2750.
- [139] P. Lozano, T. d. Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Chem. Commun.* **2002**, 692.
- [140] P. Lozano, T. D. Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Biotechnol. Lett.* **2001**, 1529.

Lebenslauf

Zur Person

Name:	Christoph Roosen
Geburtsdatum	08. Dezember 1979
Geburtsort	Viersen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

08/1986–06/1990	Kath. Grundschule Brüggen-Bracht
08/1990–06/2000	Werner-Jaeger-Gymnasium, Nettetal Abschluss: Abitur
10/2001–11/2005	Studium zum Diplom Chemieingenieur (FH), FH Aachen
03/2003	Vordiplom
07/2004–10/2004	Auslandssemester am RMIT in Melbourne, Australien
03/2005–11/2005	Diplomarbeit am Institut für Angewandte Polymerchemie, FH Aachen, Prof. Dr. T. Mang und am Institut für Technische und Makromolekulare Chemie, RWTH Aachen, Prof. Dr. W. Leitner
11/2005–12/2008	Dissertation am Institut für Technische und Makro- molekulare Chemie, RWTH Aachen, Prof. Dr. W. Leitner, in Kooperation mit dem Institut für Angewandte Polymer- chemie, FH Aachen, Prof. Dr. T. Mang