

**Überkritisches Kohlendioxid als Reaktionsmedium für die  
Naturstoffsynthese –  
Die enantioselektive Hydrolyse von 3-Hydroxysäureester**

**Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFT  
-Dr. rer. nat.-**

**genehmigte Dissertation  
von**

**Dipl. Chem. Thorsten Hartmann**

**geboren am 08. Februar 1971  
in Hannover**

**Hannover, November 1999**

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. em. Dr. Dr. H. c. Karl Schügerl

Tag der Prüfung: 25.11.1999

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

**Abstract:**

Thorsten Hartmann

Überkritisches Kohlendioxid als Reaktionsmedium für die Naturstoffsynthese –

Die enantioselektive Hydrolyse von 3-Hydroxysäureester

**Schlagwörter:** Überkritisches Kohlendioxid; Enantioselektive Hydrolyse; Lipase

Bei der Entwicklung von neuartigen Lösemitteln, insbesondere für enzymatische Reaktionen, traten überkritische Fluide in den letzten Jahren verstärkt in den Vordergrund des Interesses. Überkritisches Kohlendioxid (SCCO<sub>2</sub> = supercritical CO<sub>2</sub>) eignet sich besonders für chemisch-technische bzw. biologische Anwendungen, da es preisgünstig und weder brennbar noch explosiv ist. Durch einfache Druckreduzierung läßt es sich leicht von Substraten oder Produkten abtrennen, und seine niedrige kritische Temperatur von 31°C bei einem überkritischem Druck von 73,8 bar macht es zu einem idealen Lösemittel für biokatalytische Reaktionen. Überkritisches Kohlendioxid zeigt neben außergewöhnlichen Transporteigenschaften auch eine druckabhängige Dichte und somit ein unterschiedliches Löslichkeitsverhalten. Dadurch wird eine integrierte Substrat-Produkt-Trennung möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Hochdruckanlage konstruiert, in der die enantioselektive lipasekatalysierte Hydrolyse unterschiedlicher 3-Hydroxysäureethylester im Zwei-Phasen-System Wasser/überkritisches Kohlendioxid durchgeführt wird. Dabei ist ein Ziel, sich die Löslichkeitsunterschiede des Substrats und der Produktsäure zunutze zu machen. Ein Esterenantiomere wird durch das Enzym bevorzugt zur entsprechenden Säure hydrolysiert. Das verbleibende Substratenantiomer verbleibt in der Kohlendioxidphase, während sich das Produkt in der Wasserphase anreichert. Durch Druckreduktion erfolgt die Extraktion des Esters, so daß ein integrierter Reaktions-Separations-Prozeß möglich wird.

Als Beispielsubstrate werden 3-Hydroxy-4-pentensäureethylester (Sub (1)) und 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester (Sub (2)), beide Vorstufen pharmakologisch interessanter Naturstoffe, eingesetzt. Die Katalyse soll in Bezug auf Enantioselektivität, Enantiomerenüberschüsse, Umsatz und Reaktionszeit optimiert werden. Für Sub (1) zeigen sich moderate Enantiomerenüberschüsse mit einer Lipase aus *Chromobacterium viscosum*, während hohe Enantioselektivitäten für Sub (2) mit einer Lipase aus *Pseudomonas cepacia* erzielt werden.

Der Enantiomerenbestimmung erfolgt off-line mit Hilfe der chiralen Gaschromatographie, während zur on-line Verfolgung des Reaktionsablaufes die 2D-Fluoreszenzspektroskopie etabliert wird.

**Abstract:**

Thorsten Hartmann

Supercritical Carbon Dioxide as reaction medium for Synthesis of natural compounds –  
the enantioselective Hydrolysis of 3-Hydroxyacidesters**Key words:** Supercritical Carbon dioxide; Enantioselective hydrolysis; Lipase

In the last few years the interest in supercritical fluids, especially supercritical carbon dioxide (SCCO<sub>2</sub>) as new reaction medium for enzymatic reactions has increased. CO<sub>2</sub> is low-priced, neither combustible nor explosive and therefore suitable for chemical-technical respectively biological applications. By decreasing pressure substrates or products will be completely removed from the CO<sub>2</sub>. With a critical temperature of 31°C and a critical pressure of 73,8 bar, it is an ideal solvent for biocatalytic reactions. In addition to its exceptional transport properties carbon dioxide shows a pressure-depending density and solubility behavior, therefore an integrated Substrate-Product-Separation will be possible.

Within the scope of this work a new experimental High-Pressure-Unit will be constructed, in which the enantioselective enzymatic Hydrolysis of different 3-Hydroxyacidethylesters in a biphasic Buffer/SCCO<sub>2</sub>-Systems takes place. One objective is to take advantage of the solubility differences of the substrate and the produced acid. One Esterenantiomer is preferred hydrolyzed, the other remains in the supercritical phase. Against that the produced acidenantiomer is concentrated in the bufferphase. From decreasing the pressure follows an extraction process of the remaining substrateenantiomer, in consequence it will be possible to combine a enzymatic reaction with a separation step.

For example the compounds 3-Hydroxy-4-pentenoicacidethylester (Sub (1)) and 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentenoicacidethylester (Sub (2)), both Precursor of biological interesting natural substances, will be used. The catalysis should be optimized in relation to enantioselectivity, enantiomeric excess, conversion and reaction time.

For Sub (1) a lipase of *Chromobacterium viscosum* shows moderate enantiomeric excesses, while high enantioselectivity is achieved for Sub (2) with a lipase from *Pseudomonas cepacia*.

The detection of the enantiomers is followed by off-line analysis with help of the chiral gaschromatography while an on-line observation is established by 2D-Fluorescence-spectroscopy.

Für Marco

## **Danksagung:**

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom Januar 1997 bis Oktober 1999 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich für die mir gebotenen Möglichkeiten und Freiräume für die Durchführung der Arbeit danken.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei Herrn Prof. em. Dr. Dr. H. c. Karl Schügerl bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. H. H. Meyer vom Institut für Organische Chemie für die Synthese aller benötigten Substrate und die ständigen und anregenden Diskussionen im Bereich der enantioselektiven enzymatischen Hydrolyse.

Simona Becker und Torsten Knüttel, die mit ihren Beiträgen einen großen Anteil zum Gelingen dieses Projektes beisteuerten, möchte ich ganz besonders danken. Gerade die angenehme und freundliche Zusammenarbeit während und nach ihrer Diplomarbeit war immer sehr ermunternd.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Außerdem möchte ich mich bedanken bei ...

... Axel Pahl und Oliver Götz, die im Rahmen des Graduiertenkollegs „Chemische und Technische Grundlagen der Naturstofftransformation“ ebenfalls einige Substrate darstellten.

... Uwe Bornscheuer und Markus Tservistas für ihre anregenden Vorschläge und Diskussionen.

... Eckard Schwabe für die hervorragende Unterstützung im „Anlagenbau“.

... Meike Pfleging für die Aufnahmen der „MALDI-MS“ – Spektren und Michael Walden für die SDS-PAGE Gele.

... Frau Martina Weiß, die immer wußte, „wo was warum“ zu finden ist und wie es funktioniert.

- ... den Werkstätten des Instituts, insbesondere Herrn Wilhelm Behnsen für die ausgezeichnete Arbeit bei der Reaktorkonstruktion.
- ... allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie und insbesondere den Mitgliedern des IS- und Analysenlabors für das angenehme Arbeitsklima.
- ... allen Fußballspielern (nächstes Jahr schafft ihr's...)

Ganz besonders danke ich Anke, Guido, Miriam, Michael, Yasmin und Torsten, die mir zeigten, daß es auch ein Leben außerhalb der Universität gibt. Für die langjährige Unterstützung während des Studiums bedanke ich mich bei meinen Eltern.

1	Einleitung .....	1
2	Zielsetzung.....	6
3	Theorie .....	8
3.1	Enzyme .....	8
3.2	Enzymkinetik .....	9
3.2.1	Zwei-Substrat-Reaktionen.....	10
3.3	Lipasen und Esterasen.....	14
3.4	3-Hydroxysäureester – Omnipotente Synthesebausteine in der Naturstofftransformation .....	16
3.5	Überkritisches Kohlendioxid – Nicht nur ein Extraktionsreagenz.....	18
3.5.1	Die Besonderheiten von Kohlendioxid .....	19
3.5.2	Überkritisches Kohlendioxid als Reaktionsmedium für biokatalysierte Reaktionen .....	21
3.6	Hochdruckreaktionstechnik – Vom Labor in die industrielle Anwendung.....	24
3.6.1	Der technische Extraktionsprozeß von Koffein .....	29
3.7	Prozeßorientierte Analytik für 3-Hydroxysäuren und deren Ester.....	32
3.7.1	Verfahren zur on-line Analytik.....	33
3.7.1.1	UV-Absorptionsspektren .....	33
3.7.1.2	Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie .....	33
3.7.2	Verfahren zur off-line Analytik: Die Bestimmung der Enantiomere mittels chromatographischer Methoden.....	34
3.7.2.1	Die <i>High Performance Liquid Chromatography</i> .....	35
3.7.2.2	Die Gaschromatographie – Praktische Enantiomerenanalytik .....	35
4	Material und Methoden .....	37
4.1	Verwendete Substrate .....	37
4.2	Die Hochdruckanlage.....	37
4.2.1	Der allgemeine Aufbau .....	37
4.2.2	Die integrierte Probenahme bei Betriebsdruck .....	39
4.2.3	Die 2D-Fluoreszenzspektrometrie zur Hochdruckprozeßbeobachtung .....	41
4.3	Aktivitätsbestimmung mit der pH-Stat Methode .....	42
4.4	Gaschromatographische Enantiomerenanalytik.....	43
4.4.1	Aufarbeitung der Proben .....	43
4.4.2	Betriebsparameter .....	43
4.4.3	Bestimmung der Enantioselektivität, der Enantiomerenüberschüsse und des Umsatzes.....	45
5	Substratauswahl .....	47
6	Allgemeine Voruntersuchungen.....	48
6.1	Bestimmung der Löslichkeiten beider Substrate in verschiedenen Lösemittelsystemen .....	48
6.2	Die Protonierung der Produktsäureanionen.....	51
6.3	Reracemerisierungsversuche .....	52
7	Die enzymatische Hydrolyse von 3-Hydroxy-4-pentensäureethylester .....	53
7.1	Das Enzymscreening in Hexan .....	53
7.2	Die lipasekatalysierte Hydrolyse in Hexan/KPP bei pH 5,5 – Vergleichsmessungen zu Kohlendioxid .....	55
7.3	Die Hydrolyse in SCCO <sub>2</sub> - „Eintopf-Reaktion“ .....	57

7.4	Reaktionen mit Lipase aus <i>Chromobacterium viscosum</i> .....	59
7.4.1	Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität von CVL.....	59
7.4.2	Die pH-Abhängigkeit der Aktivität von CVL .....	60
7.4.3	Variation des Puffersystems .....	61
7.4.4	Die Aktivität der CVL in KPP unter Normal- und SCCO <sub>2</sub> -Atmosphäre.....	62
7.4.5	Optimierungsschritt I – Variation der Enzymmenge .....	64
7.4.6	Optimierungsschritt II – Variation der Substratmenge .....	65
7.5	Die Hydrolyse im „Source-Trap-Reaktor“ .....	66
7.6	Variation der Kettenlänge und der Esterfunktion .....	69
8	Die enzymatische Hydrolyse von 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester .....	70
8.1	Die enzymatische Katalyse von Sub (2) mit CVL .....	70
8.2	Die enzymatische Katalyse von Sub (2) mit PPL .....	71
8.2.1	Die Abhängigkeit der PPL-Aktivität von der Temperatur und dem pH-Wert .....	71
8.2.2	Die Katalyse in Hexan .....	72
8.2.3	Die Katalyse in SCCO <sub>2</sub> .....	74
8.3	Die enzymatische Katalyse von Sub (2) mit PSL .....	75
8.3.1	Die Aktivität der PSL in Abhängigkeit der Temperatur, des pH-Werts und des Drucks .....	76
8.3.2	„Eintopf-Reaktionen“ mit PSL.....	78
8.3.3	„Source-Trap-Reaktionen“ mit PSL .....	79
9	Die Optimierung der enzymatischen Katalyse in überkritischem Kohlendioxid.....	83
9.1	Variation der Substratkonzentration .....	83
9.2	Variation des Drucks.....	85
9.3	Variation der Temperatur.....	87
9.4	Umsatz-Enantioselektivitäts-Verläufe.....	89
9.5	Kinetische Betrachtungen der enzymatischen Hydrolyse mit PSL .....	90
10	Die Etablierung einer on-line Analytik für enzymatische Reaktionen in SCCO <sub>2</sub> .....	93
10.1	HPLC-Analytik – Integration in die Probenahme .....	93
10.2	UV-Absorptionsmessungen in SCCO <sub>2</sub> .....	94
10.3	Verschiedene Methoden zur on-line Analyse mittels der 2D-Fluoreszenz-spektroskopie .....	95
10.3.1	Derivatisieren der Produktsäure mit 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM).....	96
10.3.1.1	Die Derivatisierungsreaktion in KPP.....	96
10.3.1.2	Die Derivatisierungsreaktion in KPP/Hexan .....	98
10.3.1.3	Die Derivatisierung mit PDAM in überkritischem Kohlendioxid .....	100
10.3.2	Die Reaktionsverfolgung in der SCCO <sub>2</sub> -Phase mit Hilfe der Fluoreszenz-spektroskopie.....	102
10.3.2.1	Die Löslichkeit von Sub (2) in Abhängigkeit vom Druck.....	102
10.3.2.2	Eintopf-Hydrolyse mit PSL in SCCO <sub>2</sub> mit integrierter Fluoreszenzanalytik .....	103
10.3.2.3	Die Beobachtung der Reaktion mit definierten Startbedingungen.....	106
10.3.2.4	Source-Trap-Hydrolyse mit Fluoreszenzdetektion und Enantiomerenanalytik .....	108
11	Zusammenfassung und Diskussion .....	111
12	Ausblick.....	116
13	Anhang .....	118

---

13.1	Abkürzungen und Zeichenerklärung .....	118
13.2	Verwendete Chemikalien .....	119
13.3	Verwendete Enzyme.....	120
13.4	Vergleich der verwendeten Lipasen .....	120
13.5	Immobilisierung.....	121
13.6	Die Lipase aus <i>Chromobacterium viscosum</i> .....	121
13.6.1	MALDI-MS und SDS-PAGE Aufnahmen der <i>Chromobacterium viscosum</i> Lipase.....	121
13.7	Geräteverzeichnis.....	123
13.8	Ausgewählte Komponenten und Versuchsaufbauten .....	125
13.9	Physikalische Daten von Kohlendioxid.....	126
14	Literaturverzeichnis.....	128

# 1 Einleitung

Die Biotechnologie ist eine der ältesten Wissenschaften der Welt. Die ersten Gärungsprozesse, die vor etwa 6000 Jahren durchgeführt wurden, beruhten auf mikrobiellen Vorgängen [BMBF; 1995]. Ohne daß die Menschen es wußten, entwickelten sie immer weitere biotechnologische Verfahren und wendeten sie an. So wurden Hefen für die Sauerteigerstellung genutzt oder mit Hilfe von Lactobacillen Milch zu Käse, Kefir oder Joghurt weiterverarbeitet. Der große Durchbruch, um biotechnologische Prozesse zu verstehen, gelang schließlich Louis Pasteur und Sir Alexander Fleming. Gegenwärtig erfährt die Biotechnologie einen großen Aufschwung, selbst klassische Wissenschaftsbereiche wie die Physik, Fertigungstechnik und natürlich auch die Chemie setzen verstärkt auf biotechnologische Verfahren. Schätzungsweise wird sich das US-Marktvolumen im Jahr 2000 auf 150 Milliarden US-Dollar belaufen (1995 waren es 50 Milliarden) [BMBF; 1995]. Auch in Deutschland wird mit einem großen Wachstum gerechnet. Die Biotechnologie, so hoffen die Wirtschaftszweige, soll den immer höher werdenden Reinheits- und Umweltanforderungen, die an die Produkte gestellt werden, gerecht werden. Den großen Bereich, in den die Biotechnologie bereits Einzug gehalten hat, und der ständig erweitert werden soll, verdeutlicht Abbildung 1.1.

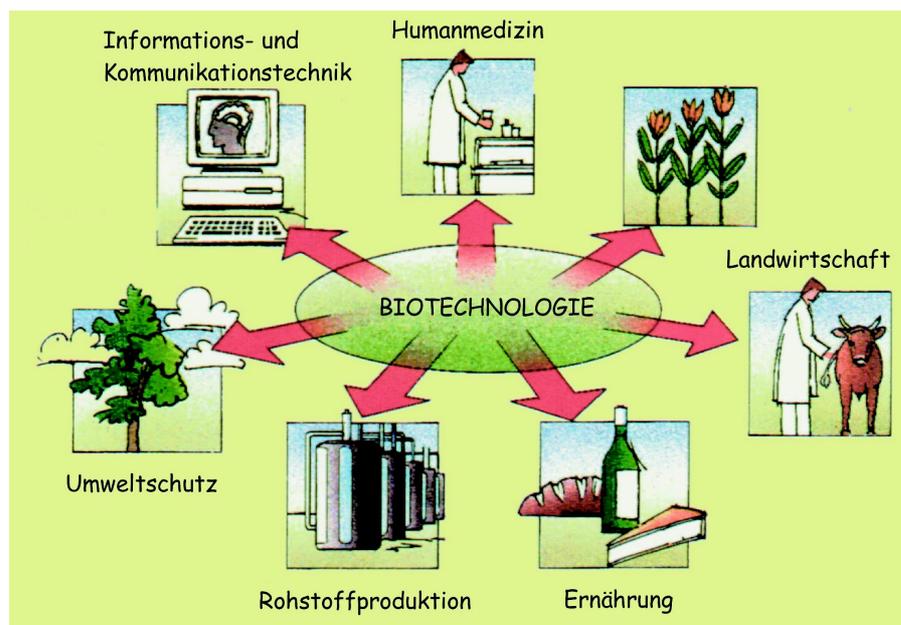


Abb. 1.1: Anwendungsgebiete der modernen Biotechnologie (nach [BMBF; 1995])

In der Großchemie, so das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF), wird es allerdings noch einige Zeit dauern, bis mit Hilfe der Biotechnologie oder Gentechnik signifikante Durchbrüche (z. B. Vollsynthese von Chemikalien mit Hilfe von Mikroorganismen oder Enzymen) erzielt werden. Alleine die steigende Anwendung von Enzympräparationen sei hier zu nennen (Waschmittel- und Textilindustrie). So werden Waschmitteln Amylasen, Proteasen und Lipasen zur Entfernung von Polysaccharid-, Protein- und Fettverschmutzungen zugesetzt [Bornscheuer; 1999]. Der rapide Anstieg der technischen Möglichkeiten (z. B. Bau größerer Fermenter) führte bei der Produktion von Enzymen zu immer niedrigeren Herstellungskosten, so daß sich ihr Einsatz in der Waschmittelindustrie rentiert, obwohl die Biokatalysatoren nicht zurückgewonnen werden können. Weitere industrielle Anwendungen finden sich in [Bornscheuer; 1999]. Beispielhaft sollen zwei Produktionsmodelle vorgestellt werden. 1996 kommerzialisierte die BASF AG die Darstellung optisch reiner Amine durch stereospezifische Acylierung der Racemate mit immobilisierter Lipase in einem Festbettreaktor [Balkenhohl; 1997]. *t*-Leucin und andere Aminosäuren werden bei der Degussa AG durch reduktive Aminierung von  $\alpha$ -Ketosäuren mit Alkoholdehydrogenasen in einem Enzymmembranreaktor dargestellt [Drauz und Waldmann; 1995].

Einen wesentlich größeren Einfluß haben biotechnologisch oder gentechnisch gewonnene Enzyme in der bereits genannten Pharma- und auch in der Lebensmittelindustrie. Diese Biokatalysatoren sind fähig, bestimmte Reaktionen unter milden Konditionen zu katalysieren. Durch geeignete, frei zu wählende Reaktionsbedingungen wie Substrat- oder Lösemittelvariationen, können chemische Umsetzungen direkt beeinflußt und sogar in bestimmte Produktrichtungen gelenkt werden. Ein weiterer Vorteil von Enzymen ist, daß sie wenig bis keine Nebenprodukte oder schädliche Substanzen produzieren und somit keine Abfallstoffe anfallen. Diese Punkte machen sie für die Arzneimittelentwicklung interessant, so daß die Tendenz bei der Synthese von Medikamenten immer mehr von der klassischen Chemie in Richtung Enzymtechnik abweicht. Einige dieser katalytisch aktiven Proteine wie Lipasen sind sowohl in Wasser als auch in einer Vielzahl von organischen Lösemitteln aktiv. Daher werden Enzyme auch immer wichtiger in der organischen Synthesechemie. Eine Übersicht findet sich in [Scheper; 1999]. Zu nennen ist hier auch der verstärkte Einsatz der Biokatalysatoren im Bereich der Naturstoffsynthese. In der vorliegenden und zahlreichen weiteren Arbeiten werden verschiedene 3-Hydroxycarbonsäureester mit Lipasen oder Esterasen hydrolysiert, umgeestert oder acyliert ([Bornscheuer; 1993 und 1999], [Capewell; 1994], [Herar; 1995], [Pahl; 1998]). Diese meist racemisch synthetisierten Hydroxyester sind

geeignete Bausteine zur Darstellung verschiedenster Naturstoffe und Pharmaka. Abbildung 1.2 zeigt sowohl einige Hydroxyester als auch die daraus gewonnenen Produkte.

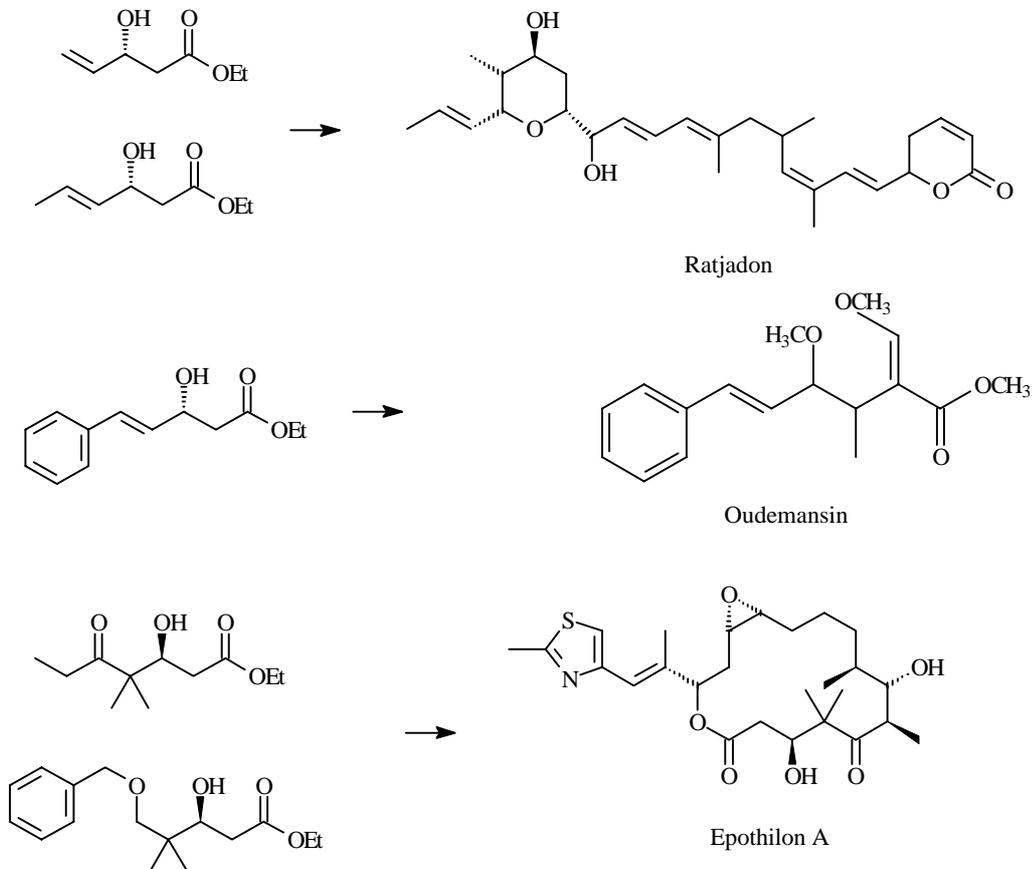


Abb. 1.2: 3-Hydroxyester als Vorstufen von Pharmaka und Naturstoffen ([Voß; 1990], [Wünsche; 1992], [Pahl; 1998])

Ratjadon zeigt neben antifungaler auch antibiotische Wirkung. Da es strukturell mit Leptomycin verwandt ist, welches Carrierprozesse in den Zellkern blockiert, wird es auf antiinflammatorische und cytotoxische Wirkungen untersucht [Schummer *et al.*; 1995]. Epothilon A zeigt Anti-Tumor-Eigenschaften, da es die Mikrotubuli der Zellen stabilisiert. Es ist im Wirkmechanismus mit dem Taxol<sup>®</sup> vergleichbar. Epothilon A zeigt aber einige Vorteile, z. B. ist dessen Löslichkeit und daher auch die Bioverfügbarkeit wesentlich besser. Weiterhin ist es bis zu 5000fach aktiver gegen mehrfach resistente Zelllinien [Pahl; 1998]. Epothilon A wird aus Myxobakterien der Gattung *Sorangium cellulosum* und Taxol<sup>®</sup> aus dem Rohextrakt der Rinde der pazifischen Eibe isoliert. Aufgrund dieser Rohstofflimitierung und gleichzeitigem umwelttechnischen Aspekt ist eine weitgehend chemische bzw. enzymatische Synthese von großem Interesse.

Die Oudemansine sind gegen pflanzenpathogene Pilze wirksam. Dem organischen Synthesechemiker dienen sie als Leitstrukturen in der Pflanzenschutzforschung. Dabei wird

die mitochondriale Ubihydrochinon-Cytochrom C Oxidoreduktase, ein Enzym in der Atmungskette von Pilzen, spezifisch gehemmt. Bei der in Abb. 1.2 gezeigten Verbindung handelt es sich um das Oudemansin A. In der Natur treten die Substanzen als Metabolite bestimmter Basidiomyceten auf [Römpp; 1995].

Allgemein sind  $\beta$ -Hydroxysäuren bzw. deren Ester nützliche Vorstufen für die Synthese sogenannter  $\beta$ -Blocker. Sie zeigen eine strukturelle Verwandtschaft zu den körpereigenen Katecholaminen wie Adrenalin oder Noradrenalin bzw. deren pharmakologischen Antagonisten, den  $\beta$ -Sympathomimetika. Bei diesen Verbindungen handelt es sich durchweg um Amine, welche in  $\beta$ -Position die Hydroxy-Gruppe aufweisen. In Abbildung 1.3 sind einige Substanzen skizziert. Bei den Antagonisten der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ( $\beta$ -Blocker) wie Propranolol handelt es sich um reversibel und kompetitiv wirkende Pharmaka. Unter therapeutischen Bedingungen werden ausschließlich die  $\beta$ -adrenergen Wirkungen des Noradrenalins aufgehoben [Forth *et al.*; 1996].

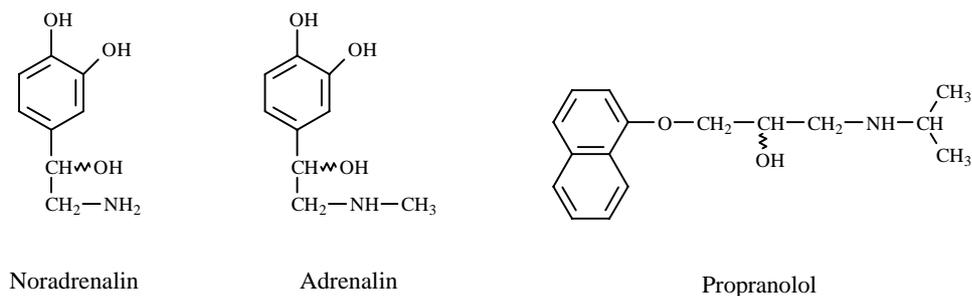


Abb. 1.3: Körpereigene und pharmakologische Substanzen, die den 3-Hydroxyestern ähnlich sind

3-Hydroxysäureester zeigen ein breites Anwendungspotential. In der Pharmakologie bzw. im Stoffwechsel sind gewünschte und unerwünschte Wirkung stark von dem entsprechenden Enantiomer der Substanz abhängig. Es ist also zwingend notwendig, die Medikamente enantiomerenrein darzustellen. Chemisch ist dies jahrelang nur schwer und unter unrentablem Aufwand durchzuführen gewesen. Alternativ sei hier erneut auf einen Einsatz von enantioselektiven substrat- und regiospezifischen Enzyme verwiesen. Lipasen und Esterasen sind in der Lage, jeweils nur ein Enantiomer der 3-Hydroxycarbonsäuren bzw. deren Ester umzusetzen. Wenn diese Reaktion noch auf ein Reaktionsmedium übertragen werden könnte, welches aufgrund seiner physiologischen Unbedenklichkeit in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie eingesetzt werden kann, würden zusätzlich umwelt- und gesundheitstechnische Aspekte mit berücksichtigt. Eine mögliche Reaktionsphase ist überkritisches Kohlendioxid.

Es zählt im Gegensatz zu den meisten konventionellen organischen Lösemitteln zu den natürlichen Medien und ist weder brennbar noch gesundheitsschädlich. Kohlendioxid wird häufig in Polarität und Solvatationskraft mit Hexan verglichen. Gelöste Substanzen lassen sich durch Druckreduzierung leicht von unlöslichen Reaktionspartnern abtrennen und liegen nach vollständiger Dekompression rückstandsfrei vor. Es ist also möglich, mit Hilfe von überkritischem Kohlendioxid eine Extraktion mit einer enzymatischen Transformation und anschließender Separation in einem Prozeß zu kombinieren. So kann die unterschiedliche Löslichkeit eines Substrats vor und nach der Transformation in den jeweiligen Phasen eines Zweiphasensystems wie z.B. Wasser/überkritisches Kohlendioxid für eine Substrat-/Produkttrennung genutzt werden.

## 2 Zielsetzung

In dieser Arbeit wird die enantioselektive enzymatische Hydrolyse verschiedener 3-Hydroxysäureester in einem Zweiphasensystem Wasser/Hexan bzw. Wasser/überkritisches Kohlendioxid untersucht. Neben einer Esterase werden mehrere Lipasen eingesetzt, dabei soll das Enzym gefunden werden, welches das entsprechende Substrat in bezug auf Substrat- und Produktenantiomerenüberschuß, Umsatz, Reaktionszeit und Enantioselektivität optimal umsetzt. Abbildung 2.1 zeigt das allgemeine Reaktionsschema.

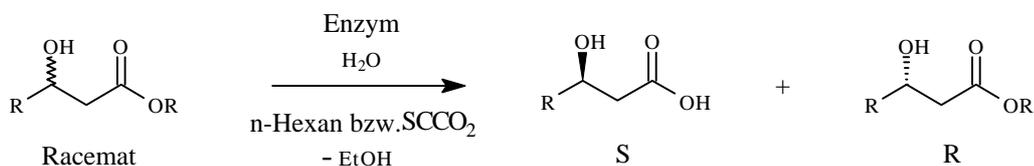


Abb. 2.1: Reaktionsschema der enzymatischen Hydrolyse von 3-Hydroxysäureestern

Eine anschließende Enantiomere separation soll durch die unterschiedlichen Löslichkeiten der „Produkte“ in den einzelnen Phasen ausgenutzt werden. Die sich bildende Säure wird in der Wasserphase durch Deprotonierung löslich, während sich das verbleibende, nicht umgesetzte Esterenantiomer bevorzugt in der organischen Phase anreichert. Die Trennung beider Phasen voneinander und somit auch die der Enantiomere ist im Fall des überkritischen Kohlendioxids (supercritical carbon dioxide = SCCO<sub>2</sub>) besonders leicht, da durch Druckreduktion Kohlendioxid wieder gasförmig wird und gelöste Substanzen außerhalb des eigentlichen Reaktionsraumes aufgefangen werden können.

Zunächst wird ein geeignetes Substrat gewählt. Es muß eine hohe Löslichkeit in Hexan bzw. SCCO<sub>2</sub> aufweisen, während die korrespondierende Säure möglichst ein entgegengesetztes Löseverhalten zeigen sollte. Für diesen Ester wird ein Enzymscreening durchgeführt, um einen Biokatalysator zu finden, der das Substrat mit einer hohen Enantioselektivität umsetzt. Für alle beteiligten Reaktionspartner sind die Verteilungskoeffizienten  $\alpha_i$  im jeweiligen Zweiphasensystem zu bestimmen. Ebenso wird eine Analytik für diese Komponenten etabliert.

Für das gewählte Enzym werden in weiteren Untersuchungen Aktivitätsprofile in Abhängigkeit des pH-Werts und der Temperatur bestimmt. Neben der Charakterisierung der kinetischen Parameter wie  $K_M$  und  $v_{\max}$  sollen auch die thermodynamischen Größen wie Verteilungskoeffizient oder Selektivität in Abhängigkeit von der Temperatur oder dem Druck

bestimmt werden. Der eigentliche Reaktionsprozeß wird zum Abschluß optimiert, d. h. daß durch Variation der Substrat- und Enzymmenge Enantioselektivität und Umsatz gesteigert werden sollen.

Für die Umsetzungen in überkritischem Kohlendioxid soll eine on-line Analytik entwickelt werden, um den Prozeß „in-time“ verfolgen und eventuell auftretende Probleme in der Reaktionsführung sofort erkennen zu können.

Das entwickelte System soll daraufhin mit weiteren 3-Hydroxysäureestern auf seine Funktionalität untersucht werden.

### 3 Theorie

#### 3.1 Enzyme

In dieser Arbeit werden ausschließlich Hydrolasen verwendet. Im folgenden soll daher neben den kinetischen Aspekten nur auf die verwendeten Lipasen und Esterasen eingegangen werden. Für einen weiterführenden Überblick über Enzyme allgemein, die „Ein-Substrat-Kinetik, Immobilisierungsmethoden und Hemmphanomenen sei auf die Fachliteratur verwiesen [Stryer; 1996].

Enzyme sind in der Regel Proteine, doch wurden neuerdings auch katalytisch aktive RNA-Moleküle entdeckt. Die Enzyme selbst bringen die Substrate in optimale Orientierung zueinander, so daß die Voraussetzungen für ein leichteres Brechen und Knüpfen von chemischen Bindungen geschaffen sind. Aufgrund des dreidimensionalen, komplexen Netzwerks aus Aminosäuren entsteht die eigentliche Reaktionsfähigkeit eines Biomoleküls, da sich die Eigenschaften der Seitenketten, bedingt durch ihre räumliche Nähe zueinander, verändern [Alberts *et al.*; 1995]. Im Chymotrypsin bewirkt die Asparaginsäure-Seitenkette, daß das benachbarte Histidin ein Proton vom Serin-Rest 195 anlagert (Abbildung 3.1) und im folgenden in der Lage ist, z.B. eine Peptidbindung zu hydrolysieren. Häufig wird dieses „Drei-Aminosäuren-System“ auch als katalytische Triade oder Troika bezeichnet.

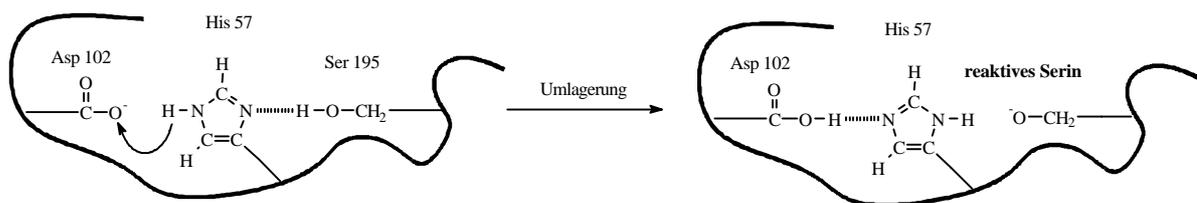


Abb. 3.1: Die Aktivierung von Serin in Chymotrypsin (nach [Alberts *et al.*; 1995])

Die Oberfläche eines jeden Proteinmoleküls zeigt durch die Exponierung spezifischer Seitenketten und deren Ausrichtung zueinander ihre ganz eigentümliche Reaktionsfähigkeit. Dadurch erklären sich auch die hohen Spezifitäten und Selektivitäten der Biokatalysatoren wie Reaktions- und Substratspezifität sowie Chemo-, Regio-, Diastereo- und Enantioselektivität.

Als aktives Zentrum wird der Bereich des Enzyms bezeichnet, an den das Substrat bindet. Verschiedene Aminosäurereste (= *katalytische Gruppe*) nehmen dort direkt an der Trennung

und Neuknüpfung der Bindungen teil (vgl. Abb. 3.1). Die Bindungskräfte zwischen Substrat und Enzym und auch zwischen Produkt und Enzym sind sehr gering, es wirken nur elektrostatische Bindungen, Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Kräfte. Der gerichtete Charakter der Wasserstoffbindungen zwischen Enzym und Substrat bewirkt oft die hohe Spezifität. Im Übergangszustand kann es aber auch zur Ausbildung kovalenter Bindungen kommen, insbesondere bei „Zwei-Substrat-Reaktionen“.

Die zu katalysierende Reaktion selbst wird beschleunigt, indem das Enzym ausgewählte energiereiche Übergangszustände, die sowohl die Aktivierungsenergie als auch die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmen, energetisch herabsetzt. Dabei wird am Ort der Katalyse die Substratkonzentration erhöht, es kommt zu einer Ausrichtung der Atome und die Substratmoleküle erfahren eine temporär veränderte Geometrie und Elektronenverteilung [Alberts *et al.*; 1995]. Daraus folgt eine erhöhte Affinität des Enzyms zum Substrat, welche die Energieerniedrigung zur Folge hat. Zu betonen ist aber, daß ein Enzym die Reaktion *nicht* energetisch begünstigt, die Unterschiede zwischen den Freien Energien der Substrate und Produkte ändern sich demnach nicht.

Die katalytische Aktivität der Enzyme kann vielfältig gehemmt werden, z. B. über die Feedbackhemmung einer Enzymkaskade. Als Beispiel läßt sich hier die Biosynthese von Isoleucin anführen. Bei diesem Stoffwechselkontrollprinzip wird das Enzym der Schrittmacherreaktion (Threonin-Desaminase) durch Isoleucin allosterisch gehemmt.

Eine reversible Enzymhemmung ist oft die Ursache für das Wirken von Pharmaka oder toxischen Substanzen. Die Hemmungsphänomene können allerdings auch irreversibel sein, so daß das Enzym erst neu produziert werden muß (Vergiftung mit Nervengasen wie Sarin, dabei wird die Acetylcholinesterase gehemmt).

### 3.2 Enzymkinetik

1913 entwickelten Leonor Michaelis und Maud Menten ein Modell zur Beschreibung der kinetischen Eigenschaften von Enzymen, das folgenden Reaktionsweg zugrunde legt:



Dieses Modell geht von vereinfachten Bedingungen wie z.B. einer Ein-Substrat-Reaktion oder einer konstanten Enzymkonzentration aus. Weiterhin wird kein Enzym-Produkt-

Komplex gebildet, sondern es erfolgt eine sofortige irreversible Dissoziation in Enzym und Produkt, was auch auf jeden Fall zu Beginn der Katalyse zutrifft. Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ES wird als konstant angenommen (*steady state*). Gleichung 3.1 gibt die *Michaelis-Menten-Gleichung* wieder:

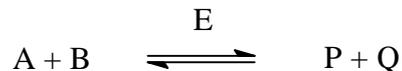
$$v = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (3.1)$$

$v_{\max}$  = maximale Geschwindigkeit

$K_M$  = Michaelis-Menten-Konstante

### 3.2.1 Zwei-Substrat-Reaktionen

Enzymatische Reaktionen folgen in den wenigsten Fällen einer Ein-Substrat-Reaktion, viel häufiger treten Mechanismen auf, bei denen zwei Edukte umgesetzt werden [Ahlers *et al.*; 1982]:



A = Substrat A      P = Produkt P      E = Enzym

B = Substrat B      Q = Produkt Q

Es werden dabei hauptsächlich drei Fälle unterschieden:

#### (1) Der zufällige Bi-Bi-Mechanismus

Es lagern sich beide Substrate A und B in zufälliger Reihenfolge an das Enzym an, ebenso erfolgt die Trennung der Produkte willkürlich. Es entsteht somit entweder der Übergangszustand  $ES_A$  oder  $ES_B$ . Es kann aber ohne weitere Bindung des zweiten Substrats an den entsprechenden Übergangszustand kein Zerfall in ein Produkt stattfinden. Erst durch die Anlagerung des fehlenden Edukts kommen die Substrate in eine räumliche Anordnung zueinander, die eine Reaktion ermöglicht. Die folgende, von [Cleland; 1970] eingeführte Darstellungsart (Abb. 3.2), verdeutlicht den Mechanismus. Die Pfeile geben lediglich den Reaktionsweg wieder. Es handelt sich bei allen Schritten um reversible Teilreaktionen [Ahlers *et al.*; 1982]:

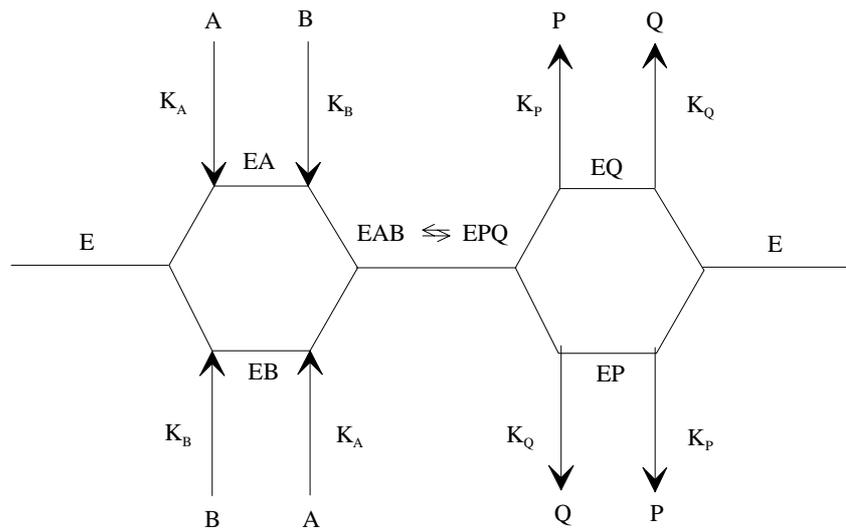


Abb. 3.2: Der zufällige Bi-Bi-Mechanismus

Die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion wird durch den Zerfall des [EAB]-Komplexes bestimmt. Zur Herleitung des Geschwindigkeitsgesetzes werden erneut einige vereinfachende Annahmen gemacht: Alle vorhandenen Enzymkomplexe befinden sich im *steady state*:

$$\frac{d[\text{EA}]}{dt} = \frac{d[\text{EB}]}{dt} = \frac{d[\text{EAB}]}{dt} = 0 \quad (3.2)$$

Die Gesamtmenge an Enzym (Enzymerhaltungsgleichung) setzt sich additiv aus allen beteiligten Enzymkomplexen und frei vorhandenem Enzym zusammen:

$$[\text{E}]_{\text{gesamt}} = [\text{E}] + [\text{EA}] + [\text{EB}] + [\text{EAB}] \quad (3.3)$$

Für das Geschwindigkeitsgesetz ergibt sich dann [Segel; 1975]:

$$\frac{v}{v_{\text{max}}} = \frac{[\text{A}][\text{B}]}{K_A K_B + K_B[\text{A}] + K_A[\text{B}] + [\text{A}][\text{B}]} \quad (3.4)$$

## (2) Der geordnete Bi-Bi-Mechanismus

Dieser Mechanismus ähnelt der zufälligen „Zwei-Substrat-Reaktion“. Allerdings ist die Anlagerung eines Substrats jetzt in der Reihenfolge festgelegt. Erst muß die Bildung des [EA]-Komplexes erfolgen, bevor B aufgrund einer durch A bewirkten Konformationsänderung des Enzyms binden kann.

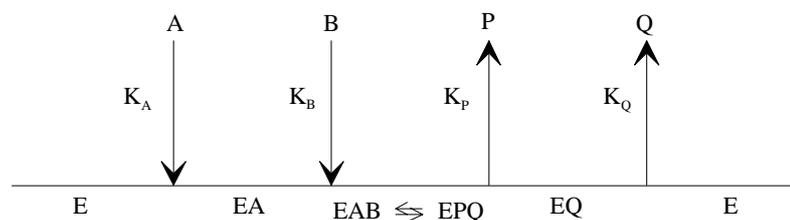


Abb. 3.3: Der geordnete Bi-Bi-Mechanismus

Für die Ableitung des Geschwindigkeitsgesetzes werden dieselben Betrachtungen wie für den zufälligen Bi-Bi-Mechanismus gemacht. Aufgrund der festgelegten Reaktionsreihenfolge der Substrate ergibt sich ein einfacheres Gesetz [Segel; 1975]:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_A K_B + K_B[A] + [A][B]} \quad (3.5)$$

Im Gegensatz zum zufälligen Mechanismus können hier nur das Substrat A und das Produkt Q mit dem freien Enzym reagieren, nicht B und P. Demnach wirken auch nur A und Q als kompetitive Inhibitoren.

Die in dieser Arbeit untersuchte lipasekatalysierte Hydrolyse verschiedener 3-Hydroxyester folgt einem Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus, der im folgenden genauer skizziert werden soll.

### (3) Der Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus

In diesem besonderen Fall erfolgt die Bindung von A an das Enzym, welches unter Eliminierung von P zu einer kovalent modifizierten Enzymform  $E^*$  reagiert. Erst diese neue Katalysatormodifikation ist fähig, das zweite Substrat B zu binden. Als letzter Schritt wird das Produkt Q unter Rückbildung der freien Enzymform E abgespalten [Ahlers *et al.*; 1982]:

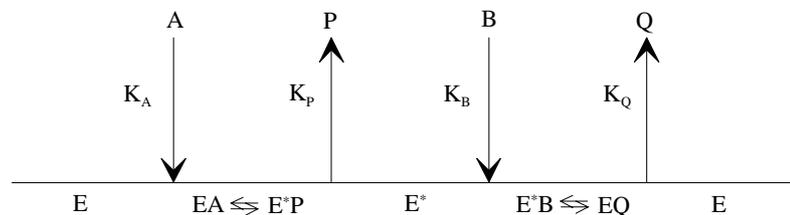


Abb. 3.4: Der Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus

Für die lipasekatalysierte Hydrolyse von 3-Hydroxyestern (vgl. Abb. 2.1) entspricht A dem Ester, P dem Alkohol, B dem Wasser und Q der komplementären Säure. Abbildung 3.5 zeigt den genauen Reaktionsmechanismus, der im aktiven Zentrum unter Einwirkung der katalytischen Triade (Kap. 3.1) durchlaufen wird. Zunächst wird der Ester vom Serin unter Ausbildung eines tetraedrischen Intermediates ( $T_d1$ ) nukleophil angegriffen. Die Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes erfolgt unter Abspaltung des Alkohols. Von entscheidender Bedeutung ist die Unterstützung des Imidazolrestes des Histidins, der zunächst das freiwerdende Proton des Serins abfängt. Es erfolgt der zweite nukleophile Angriff des Wassers unter Ausbildung des zweiten tetraedrischen Übergangszustands  $T_d2$ , der in die Produktsäure und das freie Enzym zerfällt. Es ist zu erkennen, daß ein Protonentransfer vom

Enzym auf den Alkohol und vom Wasser auf den Biokatalysator stattgefunden hat. Handelt es sich bei dem angreifenden Nukleophil um Wasser, so findet eine Hydrolyse statt, ist es dagegen ein Alkohol, so führt die Katalyse zu einer Ver- bzw. Umesterung. Hervorzuheben ist bei dem Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus, daß der Acyl-Enzym-Komplex (entsprechend E\*) erst wieder nach Beendigung der Reaktion, wenn das Biomolekül in seiner ursprünglichen Form vorliegt, als Enzym im eigentlichen Sinne wirken kann [Ahlers *et al.*; 1982].

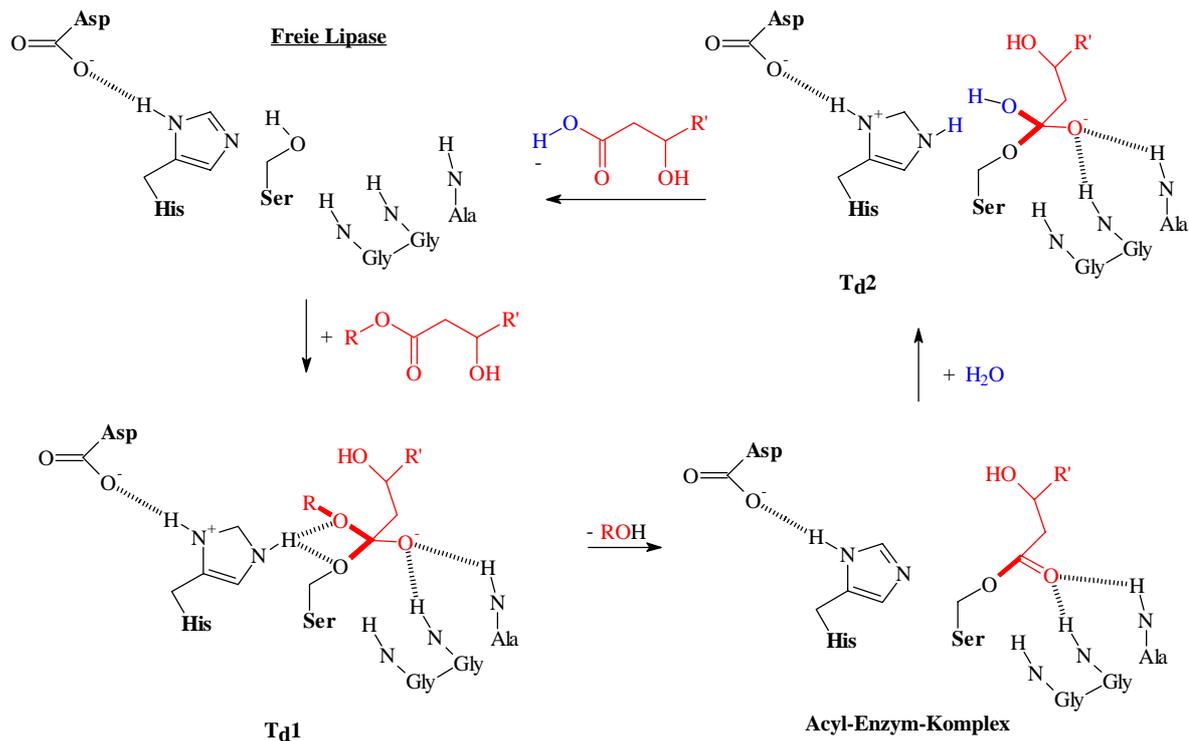


Abb. 3.5: Reaktionsmechanismus der lipasekatalysierten Hydrolyse eines 3-Hydroxyesters (nach [Kazlauskas und Bornscheuer; 1998])

Für das Geschwindigkeitsgesetz ergibt sich [Segel; 1975]:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_A[B] + K_B[A] + [A][B]} \quad (3.6)$$

Für „Zwei-Substrat-Reaktionen“ ergeben sich verschiedene Arten der graphischen Auswertung [Kreye; 1997], [Ahlers; 1982] und [Bisswanger; 1979]. Allen Mechanismen ist dabei gemeinsam, daß zur Bestimmung der kinetischen Parameter eine Substratkonzentration konstant gehalten wird. Dies wird in der Regel durch die Zugabe des Edukts im Überschuß realisiert und für beide Substrate einzeln durchgeführt. Für den Ping-Pong-Bi-Bi-

Mechanismus ergibt sich zum Beispiel aus Gl. (3.6) nach Erweiterung mit  $\frac{1}{[A]}$  folgender Ausdruck:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[B]}{\frac{K_A[B]}{[A]} + K_B + [B]} \quad (3.7)$$

Wird [A] jetzt im Überschuß eingesetzt, so geht  $\frac{K_A[B]}{[A]}$  gegen Null, woraus folgt:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[B]}{K_B + [B]} \quad (3.8)$$

Gleichung (3.8) entspricht der Form nach der Michaelis-Menten-Gleichung (3.1), so daß bei Vorhandensein einer Überschußkomponente die Bestimmung der kinetischen Parameter auch nach dieser vereinfachten Methode zulässig ist, wenn dabei keine Hemmung durch die Überschußkomponente auftritt.

### 3.3 Lipasen und Esterasen

Beide Enzyme zählen zu der Klasse der Hydrolasen. Die Lipasen (systematischer Name: Triacylglycerol-Acylhydrolasen, EC 3.1.1.3) finden sich in fast allen Organismen. Die natürlichen Substrate wie Triglyceride und von ihnen abgeleitete Substanzen wie Mono- und Diacylglyceride werden durch Lipasen und Esterasen zu hydrophileren Formen umgesetzt, die vom Organismus besser verwertet werden. Die Lipasen benötigen dazu wie alle Hydrolasen keine Coenzyme. Gerade die hohe Aktivität an einer Öl-Wasser-Grenzfläche (= Grenzflächenaktivierung, *interfacial activation*) zeichnet die Lipasen aus, da sie im Gegensatz zu anderen Hydrolasen auch langkettige, lipophile Fettsäuren umsetzen.

Die bis heute zahlreich isolierten Lipasepräparationen, die für die organische Synthese ein aufwendiges Screening notwendig machen, zeichnen sich durch zahlreiche, strukturelle Gemeinsamkeiten aus [Kreye; 1997]. [Ollis *et al.*; 1992] beschreiben für elf Lipasen die sogenannte  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung. Dabei wird ein Kern von parallelen  $\beta$ -Faltblättern von  $\alpha$ -Helices umgeben. Ebenfalls gemeinsam ist allen Lipasen die bereits in Kap. 3.1 erwähnte katalytische Triade aus Serin, Histidin und Asparaginat- oder Glutamatrest [Cyler *et al.*; 1994].

Die Grenzflächenaktivierung erklärt sich durch eine bewegliche Oligopeptideinheit (*lid*) aus  $\alpha$ -Helices, die das aktive Zentrum in polarer Umgebung bedeckt. Unter Einwirkung apolarer Medien bzw. Substrate richtet sich dieser „Deckel“ neu aus und gibt den Zugang zum aktiven Zentrum frei ([Winkler *et al.*; 1990], [Cycler *et al.*; 1994], [Kazlauskas; 1994]).

Lipasen können also ihre Konformation in Abhängigkeit von der Umgebung ändern. Das macht sie neben ihrer Aktivität in differenten organischen Lösemitteln zu typischen *induced-fit* Enzymen mit einem breiten Substratspektrum [Koshland; 1994]. Hier liegt ein Hauptgrund für die häufige Anwendung von Lipasen im Bereich der Biotransformation. Dabei lassen sich drei Hauptgebiete ausmachen [Bornscheuer; 1999]:

- Modifikation von Fetten und Ölen
- Acylierung/Deacylierung von Kohlenhydraten bzw. Schützen/Entschützen von Peptiden
- Synthese chiraler Verbindungen

Zahlreiche weitere Anwendungen von Lipasen in der organischen Synthese sind veröffentlicht worden (für Literaturliste siehe [Bornscheuer; 1999], S. 7).

Bei der Hydrolyse von 3-Hydroxyestern wird die Stereoselektivität des Biokatalysators ausgenutzt. Diese ist immer abhängig vom eingesetzten Substrat und kann somit von Lipase zu Lipase bei variierender Substratstruktur völlig unterschiedlich sein. Zur Vorhersage stellten [Kazlauskas *et al.*; 1991] empirische Regeln für sekundäre Alkohole für Lipasen aus *Pseudomonas cepacia* und *Candida rugosa* auf. Die Größe der Substituenten ist ausschlaggebend für die Unterscheidung der Enantiomeren im aktiven Zentrum des Enzyms. [Ahmed *et al.*; 1994] verfeinerten das Modell basierend auf Röntgenstrukturanalysen noch weiter. Demnach bildet das aktive Zentrum eine chirale Umgebung, in die die Enantiomere mit unterschiedlichen Aktivierungsenergien binden können. Daraus folgt eine kinetische Diskriminierung der Enantiomere [Kreye; 1997].

In dieser Arbeit werden Lipasen aus verschiedenen Stämmen, insbesondere aber zwei bakterielle (aus *Chromobacterium viscosum* und *Pseudomonas cepacia*) und eine tierische (aus Schweinepankreas) verwendet. Ein tabellarischer Vergleich dieser Hydrolasen findet sich im Anhang (Kap. 13.4).

Ein ausführlicher Übersichtsartikel über Lipasen in bezug auf ihr Vorkommen, ihre Charakterisierung und Aufreinigung, Struktur und Anwendung in der Technik und der organischen Synthesechemie wurde von [Schmid und Verger; 1998] verfaßt.

Der charakteristische Unterschied der Esterasen (systematischer Name: Carboxylester-Hydrolasen, EC 3.1.1.1) zu den Lipasen ist ihre Aktivität in homogener Lösung und die ihnen fehlende Grenzflächenaktivität. Außerdem setzen Esterasen keine Triacylglyceride langkettiger Säuren um.

Ansonsten sind die Esterasen den Lipasen in bezug auf Herkunft, Isolation, biochemischen Eigenschaften und strukturellen Merkmalen wie katalytische Triade und  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung gleich oder zumindest ähnlich. Aufgrund ihrer Inaktivität in hydrophoben Lösemitteln bzw. beim Einsatz hydrophober Substrate spielen sie in der Naturstoffsynthese nur eine untergeordnete Rolle. Weiterhin werden in der Regel nur Carbonsäuremethylester und Acetate hydrolysiert [Bornscheuer; 1999].

### 3.4 3-Hydroxysäureester – Omnipotente Synthesebausteine in der Naturstofftransformation

In der Einleitung (Kap. 1) wurde auf das Synthesepotential chiraler 3-Hydroxyester hingewiesen (Darstellung von  $\beta$ -Blockern), dessen Funktionalität an den zahlreichen Angriffspunkten dieser Substanzklasse für chemische und enzymatische Reaktionen liegt. In dieser Arbeit werden hauptsächlich ungesättigte Ester eingesetzt, um eine weitere funktionelle Gruppe einzuführen. Abbildung 3.6 skizziert einige prinzipielle Reaktionsmöglichkeiten.

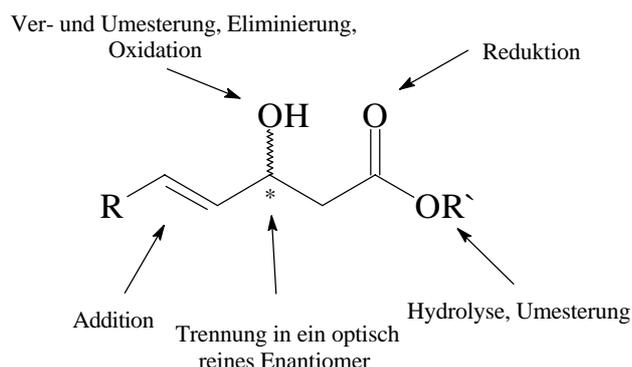


Abb. 3.6: Prinzipielle Reaktionsmöglichkeiten eines ungesättigten 3-Hydroxyesters

Für die enzymatische Enantiomerentrennung stehen vier Wege zur Verfügung: Die Hydrolyse der Esterfunktion, die Ver- bzw. Umesterung an der Hydroxylfunktion und schließlich die Umesterung an der Esterfunktion [Bornscheuer; 1993]. Auf die Bedeutung enantiomerenreiner Substanzen für die Pharmaindustrie [Herar; 1995] soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden.

Die entsprechenden Carbonsäuren treten im Organismus als Stoffwechselzwischenstufen auf. Kurzketige, aliphatische Verbindungen wurden in zahlreichen Früchten wie z. B. Orangen oder Ananas als Aromakomponenten gefunden. 3-Hydroxy-5-phenyl-pentansäure, ein direktes Derivat des in dieser Arbeit verwendeten 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylesters, wurde aus frischem Laub von *Populus balsamifera* isoliert. Die (R)-3-Hydroxydecansäure wird von Blattschneideameisen mit Phenylessigsäure und Indoleessigsäure als Sekret ausgeschieden [Voß; 1990].

Eine ausführliche Übersicht über die möglichen, aus chiralen 3-Hydroxysäurederivaten synthetisierten Naturstoffe gibt Abbildung 3.7 wieder. Bei [Voß; 1990] und [Wünsche; 1992] finden sich genauere Übersichten über die Synthesewege der einzelnen Derivate und die daraus gewonnenen optisch reinen Naturstoffe.

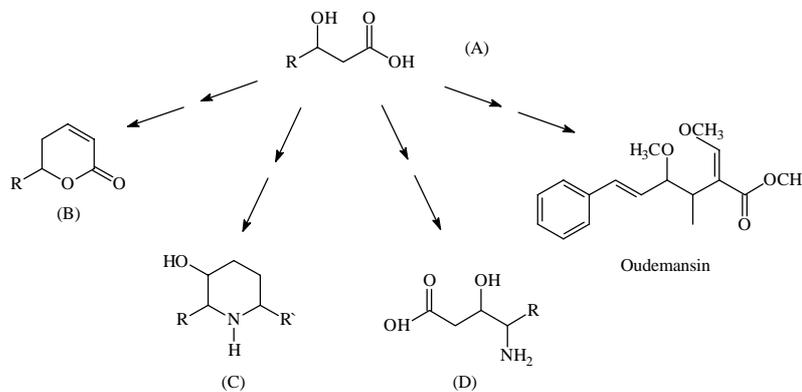


Abb. 3.7: 3-Hydroxysäure(derivate) als Ausgangssubstanz für Naturstoffe ([Voß; 1990] und [Wünsche; 1992])

Verbindung (B) entspricht mit R = trans-Styrol dem Goniotalamin, (C) mit R = Methyl- und R' = 11-Oxidodecyl- dem Cassin und (D) mit R = iso-Butyl- dem Statin. Wird mit (A) 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäure, die in dieser Arbeit aus dem entsprechendem Ethylester enzymatisch dargestellt wird, eingesetzt, so ist Oudemansin zugänglich. 3-Hydroxy-4-pentensäureethylester, die zweite hier hauptsächlich eingesetzte Verbindung, dient als Baustein in der Ratjadonsynthese.

Die Vielfalt der bekannten Naturstoffe, körpereigenen Verbindungen oder Pharmaka, die auf (enantiomerenreinen) 3-Hydroxyesterderivaten basieren, zeigt das erhebliche Forschungspotential dieser Verbindungsklasse. Dieses wird besonders deutlich, wenn bedacht wird, daß der steigende Bedarf von pharmazeutisch wirksamen Naturstoffen aus natürlichen Quellen wie Mikroorganismen oder auch Pflanzen immer schwerer zu decken ist (Rohstofflimitierung). Hier sei auf das in der Einleitung (Kap. 1) erwähnte Epothilon hingewiesen.

Die Reinheitsanforderungen an pharmazeutische oder lebensmittelrelevante Produkte lassen nur eine geringe Zahl an Reaktionsmedien wie Wasser, Ethanol oder auch Kohlendioxid zu.

### 3.5 Überkritisches Kohlendioxid – Nicht nur ein Extraktionsreagenz

Die Entdeckung, daß es neben den „klassischen“ Aggregatzuständen (fest, flüssig, gasförmig) eines Stoffes noch eine weitere Modifikation gibt, liegt fast 175 Jahre zurück [de Latour; 1825]. Dieser sogenannte „überkritische“ Zustand ist abhängig von der vorherrschenden Temperatur und dem eingestellten Druck. Aber trotz dieser frühen Entdeckung haben sich erst wenige industrielle Anwendungen etabliert, die sich überkritische Fluide (SCF = supercritical fluids) zunutze machen. Hervorzuheben sind hier folgende Prozesse (\* = noch in der Entwicklung bzw. Prozeß in Pilotversuch [Tservistas; 1997]):

Extraktion von:

- Koffein aus Kaffeebohnen [Lack und Seidlitz; 1993]
- Hopfenharz [Gardner; 1982]
- diversen Aromastoffen, Nikotin, Cholesterin oder Pflanzenölen aus geeigneten Medien bzw. von Schadstoffen aus kontaminierten Böden und Wasser [Taylor; 1996], [Krukonis; 1987]
- Sesquiterpenen aus *Tanacetum parthenium*\* [Beuscher und Willigmann; 1995]
- Sesquiterpenen aus *Magnolia grandiflora*\* [Fischer; 1990]
- Taxol aus der Rinde der Eibe\* [Taylor; 1996]

Weiterhin:

- Färbemedium für Synthesefasermaterial [Knittel und Schollmeyer; 1992]
- Mobile Phase in der Chromatographie (SFC = supercritical fluid chromatography) [Dean; 1993]; [Macherey-Nagel; 1997]
- Reaktionsmedium für die Synthese von Polymeren [Krukonis; 1987]
- Reaktionsmedium zur Darstellung von Methylethylketon [Clifford und Bartle; 1993]
- Trennung von Cholesterin, Sigmasterol und Ergosterol\* [Wong und Johnston; 1986]
- Reinigung des Proteins F<sub>1</sub>P aus Tabakpflanzen\* [Fantozzi *et al.*; 1993]
- Entfettung von Knochen\* [Fages *et al.*; 1994]

Eine Übersicht über weitere Verfahren und Firmen, die diese Prozesse anwenden, findet sich in [Tservistas; 1997]. Bei den Anwendungen handelt es sich hauptsächlich um Extraktionsverfahren, während überkritische Fluide als Reaktionsmedien nur sehr begrenzt eingesetzt werden, obwohl in den letzten Jahren mehrere Arbeiten hierzu veröffentlicht worden sind, die schwerpunktmäßig biokatalysierte Reaktionen zum Thema hatten (siehe Kap. 3.5.2).

Das bei diesen Applikationen am häufigsten genutzte Fluid ist überkritisches Kohlendioxid. Dieses soll im Weiteren näher charakterisiert werden. Auf die Beschreibung des überkritischen Zustands an sich wird hier verzichtet (siehe dazu Lehrbücher der Physikalischen Chemie und Veröffentlichungen von [Bornscheuer; 1993]; [Capewell; 1994] und [Tservistas; 1997]). Physikalische Parameter und das Phasendiagramm des CO<sub>2</sub> finden sich im Anhang (Kap. 13.9).

### **3.5.1 Die Besonderheiten von Kohlendioxid**

Der kritische Punkt für CO<sub>2</sub> wird bei 73,8 bar und 31,0°C erreicht. Im Gegensatz zu den kritischen Parametern anderer Medien (z.B. Wasser, Ethanol, Ammoniak [Klesper; 1978]) sind diese Werte sehr niedrig, so daß SCCO<sub>2</sub> besser für technische Prozesse geeignet ist. Gerade die niedrige Temperatur macht Kohlendioxid interessant für biotechnologische und pharmazeutische Anwendungen, bei denen thermolabile Komponenten eingesetzt oder produziert werden. Auch für den Einsatz der meisten Enzyme ist diese Temperatur in der Regel geeignet, da viele bis auf thermophile Biokatalysatoren bei dieser Temperatur stabil und aktiv sind. So zeigen Lipasen im allgemeinen zwischen 20 und 60°C maximale Aktivität [Schomburg und Salzmann; 1991].

Ein weiterer Hauptgrund für die Verwendung von Kohlendioxid in der industriellen Hochdruckextraktionstechnik ist die toxikologische Unbedenklichkeit dieser Substanz. Neben dem ausdrücklichen Ausschluß vom Zusatzstoffverbot für Lebensmittel (§11, Abs. 2, Nr. 2 LMG) gilt Kohlendioxid nach EG Vorschrift 88/344/EEC als GRAS-Solvens (Generally Regarded As Safe). Die U.S. Food & Drug Administration (Code of Federal Regulation 21.184.1240 CC) ordnet Kohlendioxid als direkte „Zutat“ für Lebensmittel ein [Taylor; 1996]. Außerdem läßt es sich vollständig rückstandsfrei aus Extraktions- oder Reaktionsprozessen entfernen, was es gerade für Anwendungen im Lebensmittel- und Pharmaziebereich sehr wertvoll macht. Außerdem ist es chemisch weitgehend inert, nicht brennbar und ungiftig. Kohlendioxid ist als Emissionsgas bei vielen Prozessen ein

Nebenprodukt, welches zurückgewonnen und somit nicht extra für technische Anwendungen hergestellt werden muß [Greenwood, Earnshaw; 1990]. Aus diesem Grunde ist es auch in hoher Reinheit kostengünstiger als herkömmliche organische Lösemittel. Die JAAST (Joint Association For The Advancement Of Supercritical Fluid Technology) schätzte 1990, daß zwischen 5 – 50 % aller für Reinigungsprozesse verwendeten Fluorchlorkohlenwasserstoffe gegen  $\text{SCCO}_2$  ausgetauscht werden könnten [Taylor; 1996].

Kohlendioxid ist ein selektives Extraktionsreagenz, bei gezielter Variation des Drucks (oder der Temperatur) lassen sich bestimmte Komponenten aus einem Stoffgemisch entfernen. Dies liegt daran, daß sich die Dichte und somit die direkt abhängige Solvatationskraft von  $\text{SCCO}_2$  im Bereich kurz unterhalb des kritischen Punkts bis ca. 150 bar stark ändert (Abbildung 3.8). In dieser Arbeit wurde die Druckabhängigkeit der Löslichkeit einzelner Substrate bestätigt.

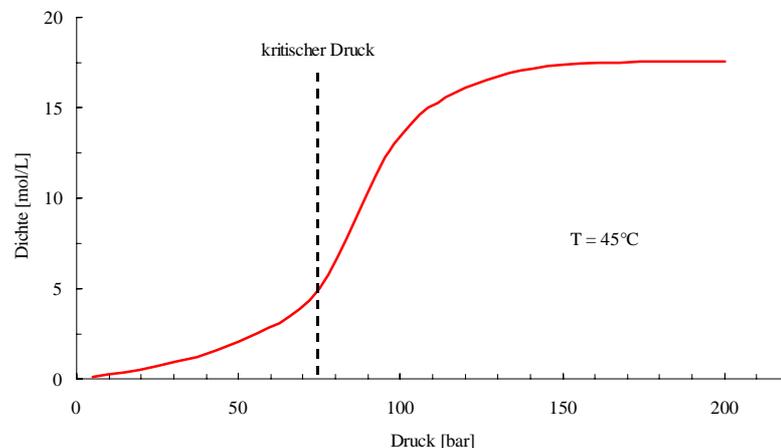


Abb. 3.8: Dichte von Kohlendioxid als Funktion des Drucks bei 45°C

Daraus ergibt sich z. B. folgender Separationsprozeß: Komponente (1) zeigt bereits ab ca. 80 bar ausreichende Löslichkeit in  $\text{SCCO}_2$ , Komponente (2) dagegen fast keine, sondern erst bei ca. 130 bar. Somit kann (1) von (2) leicht durch Variation des Arbeitsdrucks getrennt werden. Die Isolierung von (2) erfolgt danach durch Wahl eines höheren Drucks.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, polare Reagenzien, die aufgrund des unpolaren Charakters des Kohlendioxids nur schwer löslich sind, durch Zugabe geringer Mengen sogenannter „Modifier“ oder „Entrainer“ in ihrer Löslichkeit zu beeinflussen, da durch sie die Polarität im  $\text{SCCO}_2$  geändert wird.

Nachteilig ist dagegen der große präparative Aufwand für Anwendungen mit  $\text{SCCO}_2$ , bedingt durch den Druck von 73,8 bar oder höher. Weiterhin folgen daraus erhöhte Sicherheitsanforderungen für den Hochdruckbetrieb, was zu höheren Investitions- und Folgekosten führt. In Tabelle 3.1 werden die Vor- und Nachteile dieses außergewöhnlichen Lösemittels knapp zusammengefaßt, während Tabelle 3.2 einen Vergleich zwischen  $\text{CO}_2$  mit

herkömmlichen organischen Lösemitteln zeigt. In Kapitel 3.5.2 erfolgt die Betrachtung von enzymkatalysierten Reaktionen, die in überkritischen Medien durchgeführt werden.

Vorteile	Nachteile
niedrige Temperatur	mittlerer bis hoher Druck
flüchtiges Lösemittel	hohe Investitions- bzw. Fixkosten
niedriger Energieverbrauch	großer Aufwand für kontinuierliche Prozesse
hohe Selektivität	
ungiftig	
nicht brennbar	
Synthese kann mit Separation kombiniert werden	
billig und verfügbar	

Tab. 3.1: Vor- und Nachteile von (überkritischem) Kohlendioxid in der Prozeßtechnik [Brogle; 1982]

	organische Lösemittel	SCCO <sub>2</sub>
geringe Fixkosten	+	-
einfache kontinuierliche Verfahren	+	-
Handhabung / geringer Regelaufwand	+	-
Abtrennung des Lösemittels / Recycling	-	+
leichte Edukt-/Produktseparation	-	+
nicht brennbar	(-)	+
pharmakologische Unbedenklichkeit	-	+
günstige Verfügbarkeit in großen Mengen	-	+
Ausschluß vom Zusatzstoffverbot für Lebensmittel	(-)	+
unbegrenzte Mischbarkeit mit Gasen	-	+

Tab. 3.2: Vergleich zwischen organischen Lösemitteln und überkritischem Kohlendioxid; (-) = nicht allgemein gültig; nach [Capewell; 1994]

### 3.5.2 Überkritisches Kohlendioxid als Reaktionsmedium für biokatalysierte Reaktionen

Aufgrund der niedrigen kritischen Temperatur, den weiteren in Kap. 3.5.1 gezeigten Eigenschaften und den verbesserten Prozeß- und Regeltechniken, wird SCCO<sub>2</sub> immer interessanter für den Einsatz als Reaktionslösemittel. Gerade der apparative Aufwand war lange Zeit der limitierende Faktor. So wurden die ersten enzymatischen Umsetzungen erst Mitte der achtziger Jahre von [Randolph *et al.*; 1985] und [Hammond *et al.*; 1985]

durchgeführt. Im ersten Fall wurde die von *Alkalischer Phosphatase* katalysierte Umsetzung von di-Natrium-p-nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol und im zweiten Fall die Oxidation von p-Kresol und p-Chlorphenol mit *Polyphenoloxidase* untersucht. Als Reaktionsmedien dienten überkritisches Fluoroform und Kohlendioxid. Die genannten Oxidationen zeigen eine weitere interessante Eigenschaft von überkritischen Fluiden: Sie sind im Gegensatz zu organischen Lösemitteln mit Gasen wie Sauerstoff unbegrenzt mischbar, wodurch sie zu einem geeigneten Medium für weitere Oxidationsreaktionen werden [Tservistas; 1997].

In den folgenden Jahren nahmen die Veröffentlichungen auf dem Gebiet der enzymatischen Reaktionen deutlich zu, wobei hauptsächlich  $\text{SCCO}_2$  verwendet wurde. Auch der Anteil an Untersuchungen enantioselektiver Reaktionen stieg mit den Jahren. Untersucht wurden neben der Bestimmung kinetischer Daten vor allem die Einflüsse der Temperatur, des Drucks, des Wassergehalts, der Enzym- und Substratkonzentration, der Immobilisierung des Biokatalysators und der Zugabe von Modifizierern auf das Reaktionsverhalten. Tabelle 3.3 faßt einige neuere Untersuchungen zusammen. Dabei wird auch die zugrundeliegende Prozeßführung (vgl. Kap 3.6) aufgezählt. Die vollständige Übersicht findet sich in [Hartmann *et al.*; 1999].

Quelle	Enzyme	Reaktion, Substrate	Lösemittel	Reaktor
Adshiri <i>et al.</i> (1992)	Lipase	Umesterung	$\text{CO}_2$	Kontinuierlich, integrierte Produktgewinnung
Berg <i>et al.</i> (1993)	immobilisierte Lipase	Umesterung von eßbaren Fetten	$\text{CO}_2$	Festphasenextraktion
Bernard und Barth (1995)	Lipase	Veresterung von Myristinsäure	$\text{CO}_2$ , Hexan	Batch
Bornscheuer <i>et al.</i> (1996)	Lipase	Umesterung	$\text{CO}_2$	Batch
Cai (1992)	Lipase	Veresterung von Buttersäure	$\text{CO}_2$ , Hexan	
Capewell <i>et al.</i> (1996)	Lipase	Umesterung	$\text{CO}_2$ , Hexan	Batch
Cernia und Palocci (1997)	Review, Lipase	Veresterungen	$\text{CO}_2$ und andere	
Chrisochoou und Schaber (1996)	Verschiedene Enzyme	Umesterung von Ethylacetat und Isoamylalkohol	$\text{CO}_2$	Kaskade
Chrisochoou <i>et al.</i> (1997)	Lipase	Umesterung	$\text{CO}_2$	
Combes (1996)	Lipozym	Veresterung von Ölsäure	$\text{CO}_2$ , Hexan	
Diaz <i>et al.</i> (1997)	Review, verschiedene Enzyme	Enzymaktivität	$\text{CO}_2$	
Endo <i>et al.</i> (1994)	immobilisierte Lipase	Umesterung zwischen Tricaprylin und Methyloleat	$\text{CO}_2$	
Glowacz <i>et al.</i> (1996)	Lipase	Hydrolyse von Triolein und entsprechenden Glyceriden	$\text{CO}_2$	
Goddard <i>et al.</i> (1997)	Lipozym	Veresterung von Ölsäure mit Methanol	$\text{CO}_2$	Kontinuierlich, Festbett
Habulin <i>et al.</i> (1996)	Verschiedene Enzyme	Synthese von Oleat	$\text{CO}_2$	Rührkesselreaktor
Ikariya <i>et al.</i> (1995)	Review, verschiedene Enzyme	Unterschiedliche Reaktionen	$\text{CO}_2$ , Wasser	

Ikushima, Y. (1997)	Lipase	Estersynthesen	CO <sub>2</sub>	
Ishikawa und Osajima (1997)	Review	Enzyminaktivierung	CO <sub>2</sub>	
Ishikawa <i>et al.</i> (1995)	Glucoamylase, Saure und Alkalische Protease, Lipase	Enzymaktivität	SCCO <sub>2</sub>	
Jackson <i>et al.</i> (1997)	immobilisierte Lipase	Triglyceride, Palmöl, Sojabohnenöl	CO <sub>2</sub>	
Kamat <i>et al.</i> (1995)	Review	Enzymaktivität	Überkritische Fluide	
Lee <i>et al.</i> (1993)	α-Amylase, Glucoamylase	Hydrolyse	CO <sub>2</sub>	
Lin (1996)	Review, verschiedene Enzyme	Reaktionen, Aktivität, Stabilität von Enzymen, Reaktionsrate	Überkritische Fluide	
Lin <i>et al.</i> (1997)	Review, verschiedene Enzyme	Umesterung	CO <sub>2</sub>	
Lozano <i>et al.</i> (1996)	immobilisiertes α-Chymotrypsin	Enzymstabilität	CO <sub>2</sub>	
Martins <i>et al.</i> (1992)	Lipase	Veresterung	CO <sub>2</sub>	Batch
Marty <i>et al.</i> (1995)	Verschiedene Enzyme	Reaktions-Separationsprozeß	CO <sub>2</sub>	
Michor <i>et al.</i> (1996)	Verschiedene Lipasen und eine Esterase	Umesterung von racemischen Citronellol und Menthol	CO <sub>2</sub>	
Michor <i>et al.</i> (1997)	Lipasen, Esterase	Racemattrennung von D,L-Menthol	CO <sub>2</sub>	
Miller <i>et al.</i> (1991)	Lipase	Umesterung	CO <sub>2</sub>	Kontinuierlich
Nakamura (1996)	Review, Lipase	Um- und Veresterung	CO <sub>2</sub>	
Parve <i>et al.</i> (1997)	Lipase (Lipolase)	Hydrolyse von bicyclo- [3.2.0]-heptanolestern	CO <sub>2</sub>	
Rantakylä <i>et al.</i> (1996)	Lipase	Hydrolyse	CO <sub>2</sub>	Batch
Russell <i>et al.</i> (1994)	Review, verschiedene Enzyme	Aktivität, Spezifität und Stabilität der Enzyme	Überkritische Fluide	
Sereti <i>et al.</i> (1997)	<i>Fusarium Solani</i> Cutinase	Stabilität, Reaktivität, Veresterung von Hexensäure mit Hexanol	CO <sub>2</sub>	
Snyder <i>et al.</i> (1997)		Methylierung von Fetten	Überkritische Fluide	
Vija <i>et al.</i> (1997)	Lipase	Veresterung	CO <sub>2</sub> , Hexan	
Xu <i>et al.</i> (1996)	Review, verschiedene Enzyme	Enzymstabilität, Reaktionen	Überkritische Fluide und organische Lösemittel	
Yoon <i>et al.</i> (1996)	Lipase (Lipozyme)	Umesterung zwischen Triolein und Ethylbehenat	CO <sub>2</sub>	
Zheng und Tsao (1996)	Cellulase	Hydrolyse	CO <sub>2</sub>	

Tab. 3.3: Verschiedene enzymatische Reaktionen in überkritischen Lösemitteln. Vollständige Tabelle in [Hartmann *et al.*; 1999]

Für den Großteil der Reaktionen werden Kohlendioxid und Lipasen eingesetzt. Auch in dieser Arbeit ist diese Enzymklasse Gegenstand der meisten Untersuchungen. Im folgenden Kapitel wird die bisher angewandte Reaktionstechnik für Hochdruckversuche erläutert.

### 3.6 Hochdruckreaktionstechnik – Vom Labor in die industrielle Anwendung

In der Technischen Chemie werden Reaktoren hauptsächlich nach drei einfachen, grundlegenden Modellen charakterisiert [Baerns, Hofmann, Renken; 1992]:

- diskontinuierliche Reaktionsführung: - der „batch“-Betrieb
- kontinuierliche Reaktionsführung: - das „plug flow reactor“ Modell (PFR) und das „continuous stirred tank reactor“ Modell (CSTR)

Die am häufigsten für Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid beschriebene Methode ist die diskontinuierliche Reaktionsführung im einfachen Reaktor (batch). Alle Reaktanten werden in den Rührkessel gegeben, der daraufhin mit  $\text{SCCO}_2$  befüllt wird. Nach Beendigung der Reaktion wird der Reaktor dekomprimiert und das Produktgemisch analysiert. In modifizierter Form wird diese Art der Reaktionsführung auch für die Experimente in dieser Arbeit verwendet (vgl. Kap. 4.2.2).

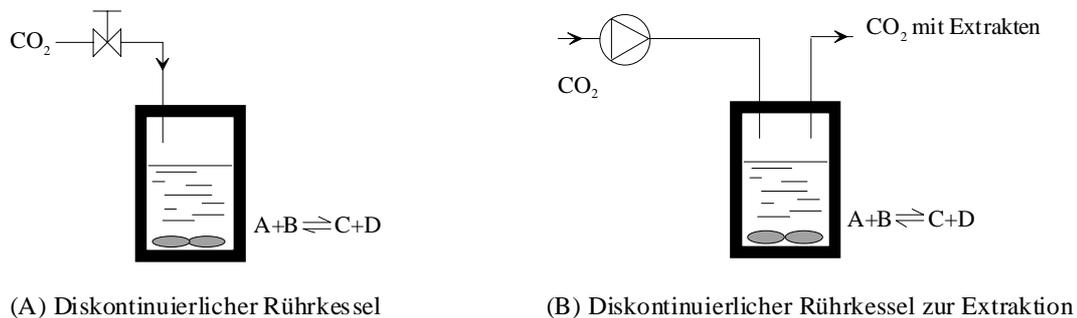


Abb. 3.9: Der batch-Betrieb

Im diskontinuierlichen Verfahren für Extraktionsprozesse (Abb. 3.9 (B)) wird der Reaktor erneut mit allen Reaktanten gefüllt. Entweder findet die Reaktion bereits ohne  $\text{SCCO}_2$  statt und dieses dient dann nur zur anschließenden Entfernung diverser Produkte oder es wird auch als Reaktionsmedium eingesetzt, so daß zunächst der Reaktor mit Kohlendioxid gefüllt wird und die Extraktion erst nach Abbruch der Reaktion beginnt. In Abb. 3.10 wird ein Verfahren ([Hammond *et al.*; 1985], [Randolph *et al.*; 1988], [Miller *et al.*; 1990]) beschrieben, bei dem ein Strömungsrohrreaktor verwendet wird.

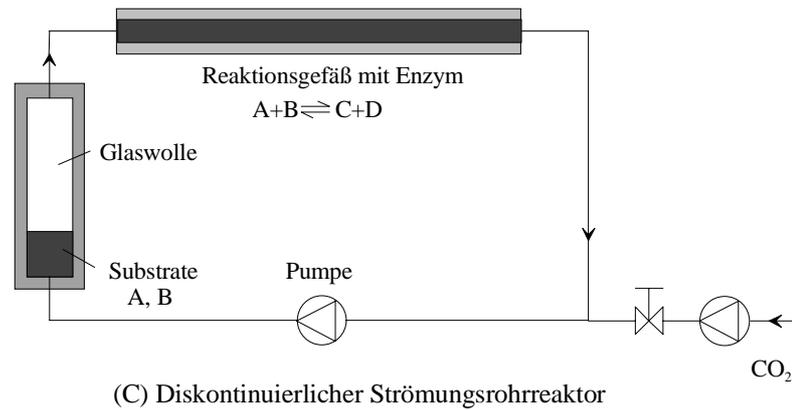


Abb. 3.10: Der diskontinuierliche Strömungsrohrreaktor für enzymatische Hochdruckreaktionen

Diese Reaktionsführung ist als diskontinuierlich anzusehen, da die Substrate (fest, flüssig oder auf z. B. Glaswolle „immobilisiert“) von Beginn an im Vorratsgefäß vorliegen. Dagegen wird  $CO_2$  kontinuierlich durch die Anlage gepumpt, löst dabei die Substrate und transportiert sie in das Gefäß, in dem die Reaktion mit dem Enzym stattfindet.

In Abbildung 3.11 ist ein ähnliches halb- bzw. semikontinuierliches Verfahren skizziert [Aaltonen und Rantakylä; 1991]. Auch hier liegen die Substrate von Beginn an in einem zweiten Gefäß vor, werden durch kontinuierlich umgepumptes Kohlendioxid gelöst und durch den Enzymreaktor transportiert. Die Produkte fallen anschließend in einem Separationsgefäß aufgrund der Fluidexpansion aus.

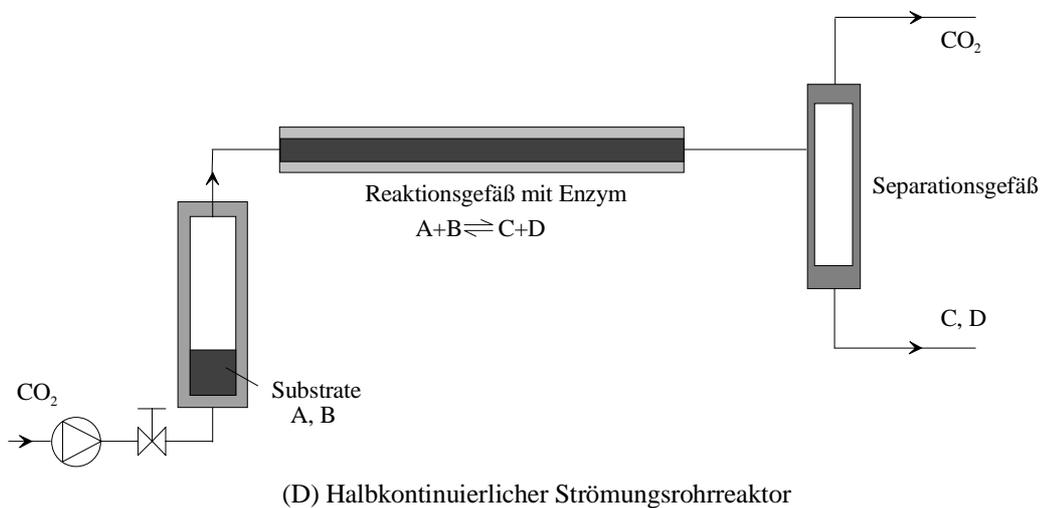


Abb. 3.11: Der semikontinuierliche Reaktionsprozeß

Wird im halbkontinuierlichen Prozeß das Vorratsgefäß entfernt und statt dessen eine zweite Pumpe verwendet, über die die Substrate in den Kohlendioxidstrom appliziert werden, so resultiert ein rein kontinuierlicher Prozeß (Abb. 3.12 [Aaltonen und Rantakylä; 1991]).

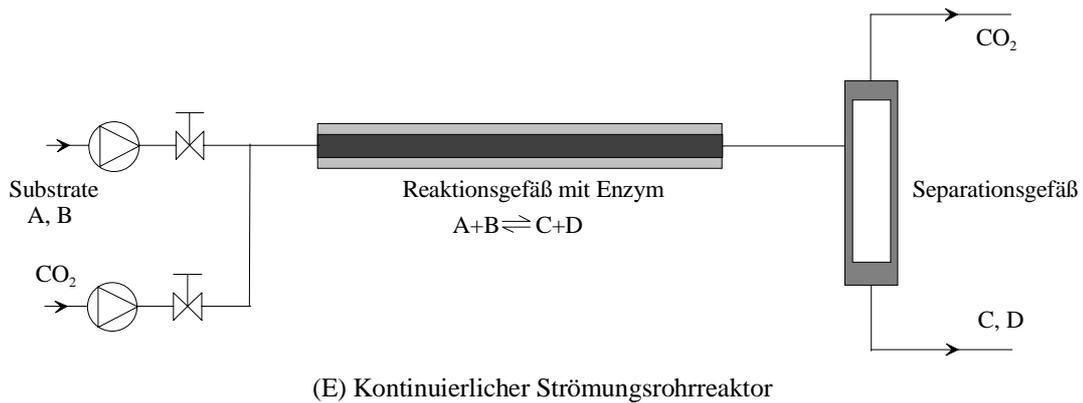
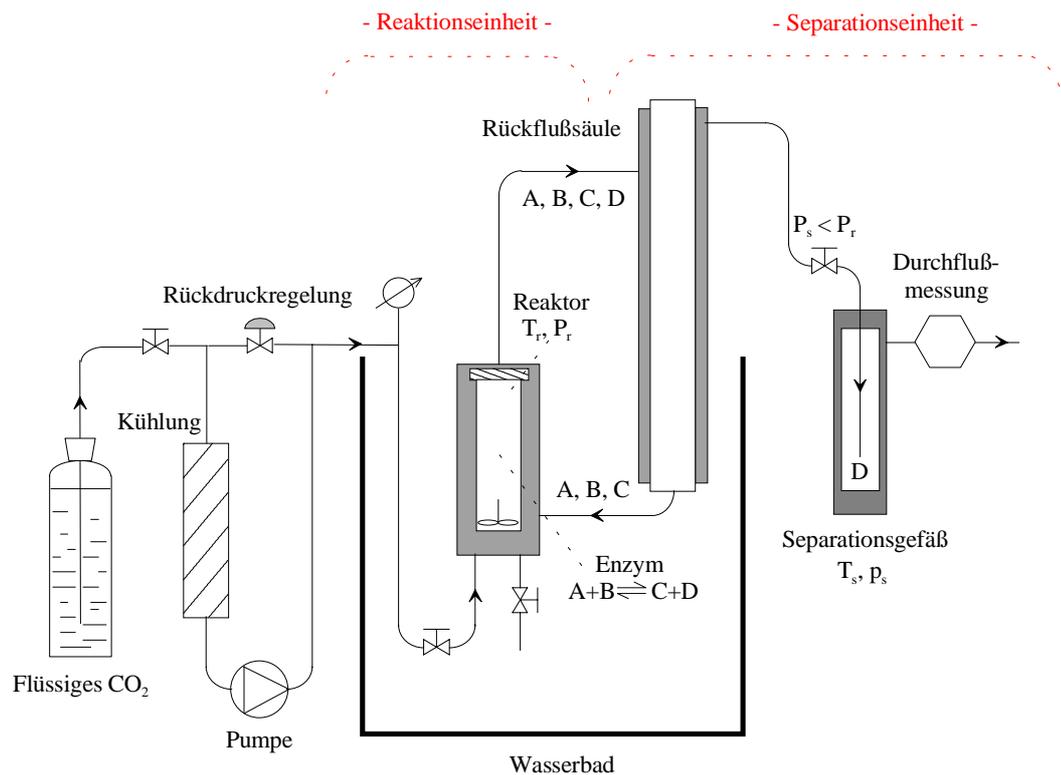


Abb. 3.12: Die kontinuierliche Reaktionsführung

Welche Art der vorgestellten Reaktionsführung für ein Experiment gewählt wird, ist immer von der zu untersuchenden Reaktion und dem gewünschten Ergebnis abhängig. Allgemein gesehen zeigen Enzymfestbettreaktoren (Strömungsrohr) Vorteile gegenüber einfachen Rührkesselreaktoren. Letztgenannte müssen mechanisch gerührt werden. Hierfür sind magnetisch betriebene Rührer sicherlich geeigneter als in die Reaktoren integrierte Rührwerke. Allerdings kann es aufgrund der Dickwandigkeit der Reaktoren bei Magnetrührern ebenfalls zu Problemen mit einer gleichmäßigen Vermischung über den gesamten Reaktionsverlauf kommen. Auch sind die Enzyme, vor allem wenn sie immobilisiert sind, scherstreßempfindlich. Das Mischverhalten von Strömungsrohrreaktoren kann über die Flußrate manipuliert werden. Hierin liegt allerdings der entscheidende Nachteil dieses Reaktionstyps: Ist das Fluid an Substrat gesättigt, kann es aufgrund von auftretenden Druckschwankungen im Enzyimbett zu einem Ausfallen der Substrate kommen, wodurch der Reaktionsfluß unterbrochen wird oder durch Verstopfen des Festbetts zum Erliegen kommen kann [Aaltonen und Rantakylä; 1991]. Dieser Druckverlust tritt häufig bei langen Festbettreaktoren auf. Ebenso kann er durch unterschiedliche Packungsdichten des Enzyms hervorgerufen werden. Ein weiterer Nachteil in der Flußrate ist, daß der Umsatz eines Zielprodukts oder aber auch eines Nebenprodukts von ihr direkt abhängig ist. Wird eine Nebenreaktion zum Beispiel nur vermieden, in dem eine hohe Flußrate eingestellt wird, so ist abzuwägen, ob die damit verbundene höhere Pumpleistung auf Dauer rentabel ist.

Im Folgenden werden noch zwei aufwendigere Verfahren erläutert, um die Komplexität von Hochdruckreaktionen darzustellen. [Adshiri *et al.*; 1992] untersuchten die lipasekatalysierte Umesterung von Tricaprylin mit Methyloleat. Dabei fand eine Rückreaktion statt. Durch eine kontinuierliche Extraktion von Methylcaprylat (D) mit Hilfe einer unterschiedlich temperierbaren Rückflußsäule, konnte das Gleichgewicht verschoben und die Rückreaktion begrenzt werden. Hier wurde die unterschiedliche, vom Kohlendioxiddruck und der

Temperatur abhängige Solvatationskraft von  $\text{SCCO}_2$  ausgenutzt, da am Separator ein niedrigerer Druck und eine andere Temperatur als im Pumpkreislauf herrschte. Der Reaktor hatte ein Volumen von  $800 \text{ cm}^3$ , und durch zwei entgegengesetzt integrierte Glasfenster war die Reaktion zu beobachten. Der eigentliche Prozeß ist diskontinuierlich. Allerdings wurden das Kohlendioxid, die verbleibenden Substrate und die Produkte kontinuierlich durch den Reaktor und die Rückflußsäule gepumpt. Abb. 3.13 verdeutlicht dieses.

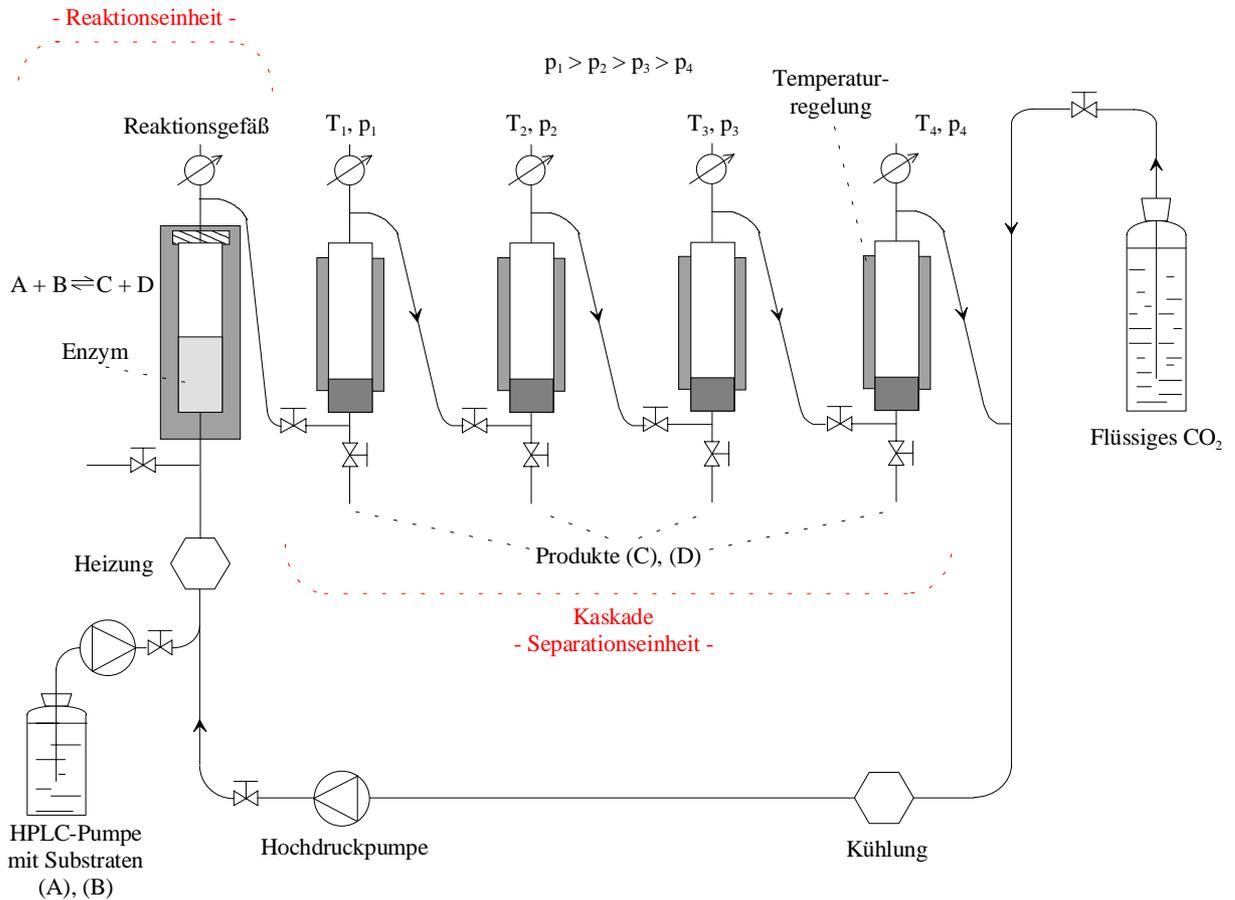


(F) Rezirkulationsreaktor mit integrierter Produktgewinnung

Abb. 3.13: Der semikontinuierliche Reaktions-Separationsprozeß

In Abbildung 3.14 wird ein kontinuierlicher Kaskadenreaktorprozeß dargestellt [Marty *et al.*; 1994]. Dabei wird die lipasekatalysierte Veresterung von Ölsäure mit Ethanol zugrunde gelegt. Das  $\text{SCCO}_2$  passiert zunächst den Reaktor. Daraufhin folgen bis zu vier Separationseinheiten, wobei jeweils über Nadelventile der nächstniedrige Druck eingestellt wird. Am Ende der Kaskade wird das Kohlendioxid durch Kühlung verflüssigt und dem Kreislauf erneut zugeführt. Über eine HPLC-Pumpe werden die entsprechenden Substrate in den  $\text{SCCO}_2$ -Strom injiziert und passieren den mit Enzym gefüllten Festbett-Reaktor. Am Ausgang befindet sich eine Probeschleife, über die einzelne Proben zur Analyse entnommen werden (nicht eingezeichnet). Je nach Wahl der Drücke in den Separationsgefäßen ist eine selektive Kondensation einzelner Substanzen und/oder Nebenprodukte möglich geworden, so

daß sie aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden können. Auch hier besteht die Möglichkeit, Gleichgewichtsreaktionen positiv zu verschieben und Aufreinigungsprozesse zu vereinfachen.



(G) Kontinuierliche Reaktionführung inkl. Fraktionierungsprozeß

Abb. 3.14: Das kontinuierliche Kaskadenmodell mit integriertem Reaktions-Extraktionsprozeß

In den letzten Jahren wurden im Bereich der Labortechnik große Fortschritte erzielt. Die „Miniaturisierung“ der Geräte kommt der Hochdrucktechnik zugute. Neue Dichtmaterialien ermöglichen z. B. längere und sichere Betriebszeiten, hochdruckstabile Gläser erlauben visuelle Kontrolle und Analyse der Reaktion und Sollbruchstellen erhöhen die Sicherheit. Die industrielle Anwendung kann durch elektronisch variabel kontrollierte Restriktoren oder automatische Modifier-Dosierapparate erleichtert werden [Taylor; 1996].

Probleme treten im technischen Maßstab vor allem durch das „scale up“ [Black; 1996] auf, da bei einem Druck von über 73 bar hohe Sicherheitsanforderungen an die Reaktoren gestellt werden und die Einhaltung dieser mit zunehmender Reaktorgröße deutlich schwieriger wird. Der komplette Reaktionsaufbau muß konstant temperiert werden können: Zur Förderung des Kohlendioxids, gerade bei kontinuierlichen Prozessen, muß eine stetige leistungsstarke

Kühlvorrichtung verwendet werden. Der komplette Reaktions- und/oder Extraktionsaufbau muß die gewählte Reaktionstemperatur konstant halten können, was durch die Wandstärke der Reaktoren nur schwer zu gewährleisten ist.

Es wurde bereits erwähnt, daß bei der Anwendung einer Hochdrucktechnik zusätzliche Investitions- und Fixkosten entstehen. Hier gilt es verstärkt, bereits bei der Planung den potentiellen Nutzen der Extraktions- oder Reaktionsmethode mit überkritischen Fluiden gegen die Kosten des Prozesses abzuwägen. Die Darstellung von z. B. Methylethylketon rentiert sich für eine japanische Firma nur aufgrund der hohen Produktionsrate von 40000 t pro Jahr [Clifford und Bartle; 1993]. Die hohen Investitionskosten können aber dadurch ausgeglichen werden, daß andere kostenverursachende Faktoren durch die Hochdrucktechnik reduziert oder sogar ausgeschlossen werden. So fällt z. B. bei technischen Färbeprozessen mit  $\text{SCCO}_2$  kein Brauch- oder Abwasser mehr an. Weiterhin entfällt ein Trocknungsprozeß, so daß ein Teil der Energiekosten wegfällt. Es müssen keine zusätzlichen Chemikalien wie Dispersionsmittel oder pH-Puffer eingesetzt werden und es wird die reduktive Nachreinigung und somit ein wasserverbrauchender Schritt eingespart [Knittel und Schollmeyer; 1992].

Der Ersatz von toxikologisch bedenklichen Substanzen macht den Einsatz überkritischer Medien noch zusätzlich interessant. Daher soll zum Abschluß die industrielle Entkoffeinierung grüner Kaffeebohnen mit überkritischem Kohlendioxid beschrieben werden.

### **3.6.1 Der technische Extraktionsprozeß von Koffein**

Nachdem von [Zosel; 1971] eine Methode zur Entkoffeinierung mit Kohlendioxid veröffentlicht wurde, nahm die Zahl der Patentierungen auf diesem Gebiet stetig zu. 1996 waren es über ein Dutzend [Taylor; 1996], wobei die Tendenz weiter steigend ist.

Kaffee ist weltweit eines der am häufigsten konsumierten Güter. Aufgrund verschiedener Anbaugebiete variiert der Koffeingehalt der einzelnen Sorten, und liegt zwischen 0,8 bis 2,0 Massenprozent. In den USA ist der Verbrauch an koffeinfreiem Kaffee von 1962 bis 1989 um das Vierfache angestiegen und belief sich 1993 auf 220000 Tonnen pro Jahr [Lack und Seidlitz; 1993]. In Deutschland betrug 1990 der Anteil an entkoffinierten Kaffee 12% vom gesamten Kaffeeumsatz. Diese wirtschaftlichen Aspekte erklären die Vielfalt von Extraktionsverfahren von Koffein. Bevor sich  $\text{SCCO}_2$  als Separationsmedium etablierte, wurden hauptsächlich Methylenchlorid oder Ethylacetat eingesetzt. Dabei wurden die Bohnen mit Wasser zum Quellen gebracht, mit den Lösemitteln extrahiert und diese dann vom Koffein abdestilliert. Die Bohnen mußten anschließend aufwendig vor der Weiterverarbeitung

von Lösemittelrückständen befreit werden. Weitere Aromakomponenten, die ebenfalls durch die organischen Lösemittel extrahiert worden sind, mußten den Bohnen anschließend wieder zugesetzt werden. Diese letzten beiden Schritte entfallen bei der Verwendung von  $\text{SCCO}_2$ , da hierbei Koffein selektiv extrahiert wird [Lack und Seidlitz; 1993].

Die gängigsten Verfahren beruhen auf drei grundlegenden Modellen, die z.B. in [Zosel; 1978] beschrieben werden und in Abbildung 3.15 a bis c skizziert sind.

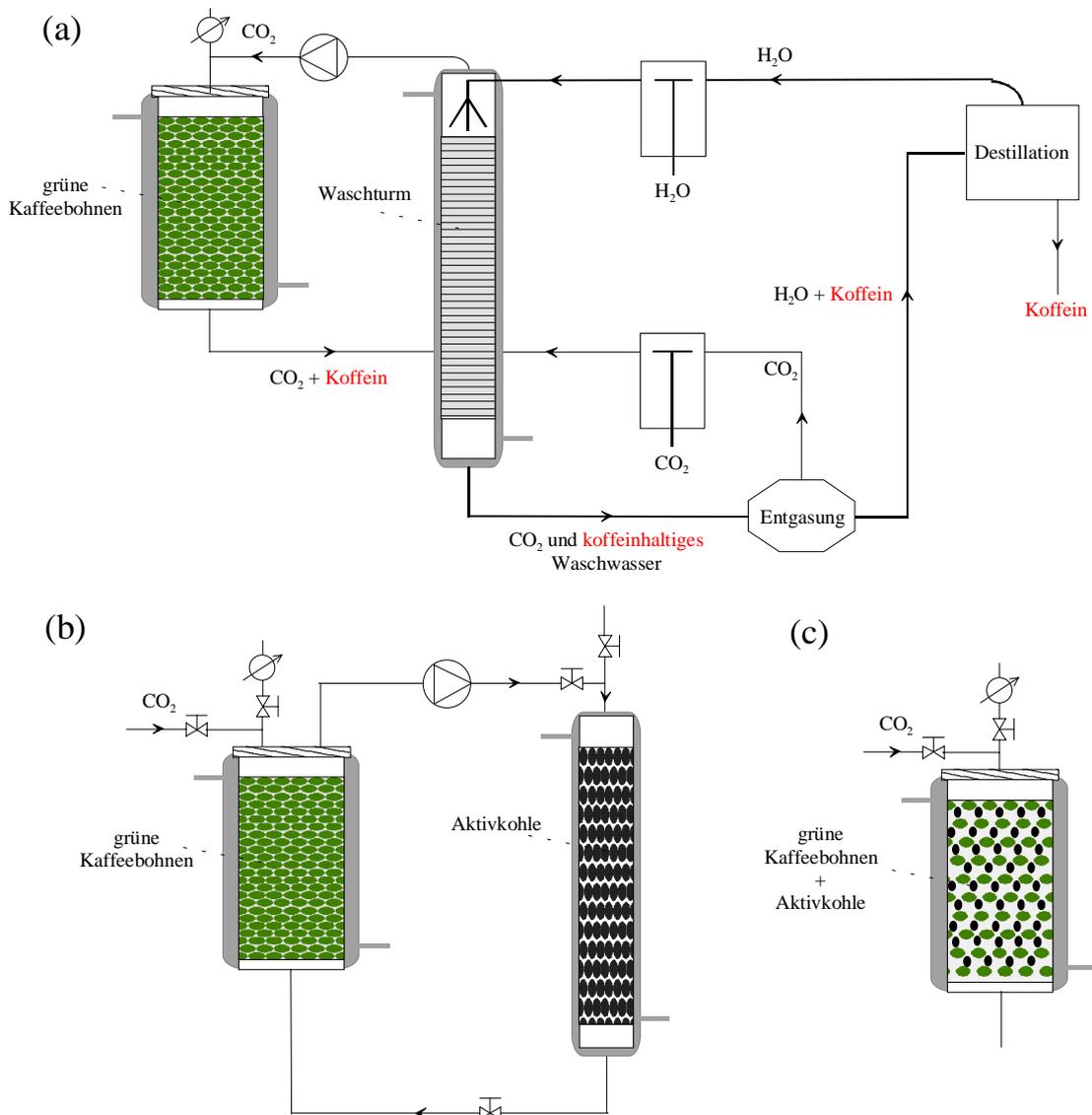


Abb. 3.15: Die Entkoffeinierung grüner Kaffeebohnen mit überkritischem Kohlendioxid; nach [Zosel; 1978]

Im Fall (a) werden die Kaffeebohnen durch Wasser vorgequollen. Bei  $70 - 90^\circ\text{C}$  und ca.  $160 - 220$  bar erfolgt die alleinige Extraktion des Koffeins durch  $\text{SCCO}_2$ . Im Waschturm geht das Koffein in eine wäßrige Lösung über. Bei  $90^\circ\text{C}$  ist das gesamte Koffein nach zehn Stunden im Waschwasser, welches entgast und abdestilliert wird. Das abgetrennte Kohlendioxid und Wasser gehen in den Kreislauf zurück, das reine Koffein verbleibt als rentabler

Destillationsrückstand. In den Bohnen sind nur noch 0,02 % Koffein vorhanden, diese Konzentration ist deutlich geringer als die für koffeinfreien Kaffee festgesetzte von 0,08 %.

Im Fall (b) erfolgt anstatt eines Waschvorgangs eine Adsorption des Koffeins an Aktivkohle, so daß ein Trocknungsprozeß des Koffeins entfällt. Allerdings muß es später von der Aktivkohle extrahiert werden. Das CO<sub>2</sub> wird im Kreislauf umgepumpt und tritt nach der Koffeinadsorption an der Aktivkohle erneut in den Extraktor ein. Der Prozeß wird bei 40 – 80°C und 120 bis 180 bar gefahren [Clarke, Macrae; 1987].

Bei der dritten Variante (c) wird die Aktivkohle direkt zu den Bohnen gegeben. Dabei wird der Aktivkohledurchmesser so gewählt, daß genau die Lücken zwischen den einzelnen Bohnen ausgefüllt werden, d. h. es liegt dieselbe Packungsdichte der Bohnen wie in Fall (a) und (b) vor (auf 3 kg Kaffeebohnen kommen 1 kg Aktivkohle). Das Kohlendioxid wird nicht im Kreislauf umgepumpt, so daß das Koffein alleine durch Diffusion extrahiert wird. Nach 5 h bei 90°C und 220 bar ist nahezu eine vollständige Entkoffeinierung erreicht. Aufgrund der unterschiedlichen Korngrößen der Bohnen und der Aktivkohle ist eine einfache Trennung der Komponenten auf einem Schüttelsieb möglich.

Die vorgestellten Beispiele sind alles diskontinuierliche Verfahren, die hohe Kosten durch Fehlzeiten für das Befüllen, Entladen und die Reinigung des Reaktors verursachen. Hier bieten sich kontinuierliche Methoden zur Steigerung der Wirtschaftlichkeit an. [Lack und Seidlitz; 1993] beschreiben solch einen Aufbau, der auf der in Abbildung 3.15 (a) skizzierten Methode beruht. Dabei werden vier Extraktoren mit Kaffeebohnen beschickt. Drei davon befinden sich jeweils im Extraktionskreislauf, allerdings immer zu verschiedenen Startzeiten. Der vierte ist entkoppelt und kann in der Zwischenzeit be- und entladen werden. Auch Kraft General Foods hat 1989 einen kontinuierlichen Extraktor patentieren lassen (European Patent Application No. 0331852), in dem koffeinhaltige Bohnen mittels einer druckreduzierten Zone von oben her beschickt werden, den Säulenreaktor passieren und am Boden erneut in einer druckreduzierten Zone entnommen werden können.

Obwohl diese Hochdruckanlagen um das Doppelte teurer sind als herkömmliche Extraktionsanlagen ([Lack und Seidlitz; 1993]), sind sie wirtschaftlich rentabel, da im Gegensatz zur Verwendung konventioneller organischer Lösemittel Reinigungsprozesse entfallen und die Produkte wie der entkoffeinerte Kaffee und das hochreine Koffein den höchsten Qualitätsansprüchen genügen. Bei diesen Prozessen liegen die Verluste bei ca. 10 % für das Koffein und 0,5 % für die Kaffeebohnen. Bei der Extraktion mit Ethylacetat bleiben nur 70 % verunreinigtes Koffein erhalten und der Verlust an Rohbohnen liegt zwischen 2 bis 3 %.

### 3.7 Prozeßorientierte Analytik für 3-Hydroxysäuren und deren Ester

Da in dieser Arbeit racemische Substrate eingesetzt werden, ist das Hauptaugenmerk auf eine analytische Erfassung dieser Enantiomere gerichtet, d. h. bei einem Substrat und einem entsprechendem Produkt sind je nach eingesetztem Enzym bis zu vier Verbindungen zu analysieren (Zwei Substrat- und zwei Produktenantiomere; Abb. 3.16).

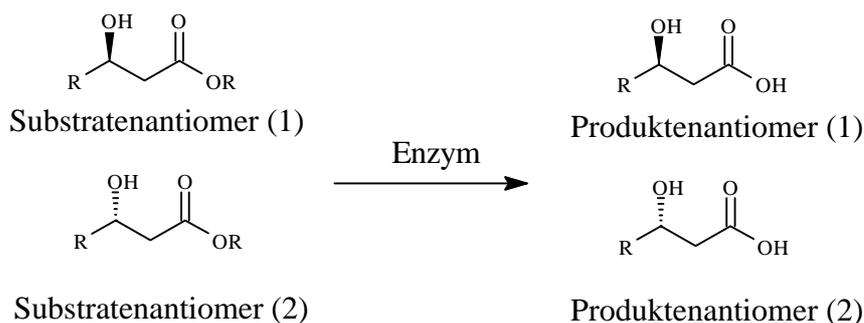


Abb. 3.16: Die vier zu erfassenden Verbindungen

Als charakteristische Größen dienen hierfür die Enantioselektivität  $E$  der enzymatischen Reaktion, die Enantiomerenüberschüsse  $ee$  (enantiomeric excess) des jeweiligen bevorzugten Substrat- und Produktenantiomers und der Umsatz  $U$ . Die Formeln zur Berechnung dieser Größen finden sich in (Kap. 4.4.3). Als Analytik kommen die chirale Gaschromatographie (GC) und die Hochleistungsflüssigchromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) in Frage. Bei diesen Analyseverfahren handelt es sich um off-line Methoden, d. h. eine direkte zeitlich korrekte Beobachtung des Experimentes ist nicht möglich. Eine Integration dieser Systeme in den eigentlichen Versuchsaufbau zur on-line Erfassung ist zwar prinzipiell möglich, kann aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Aus diesem Grund werden andere Verfahren zur Etablierung einer on-line Analytik untersucht. Die Erfassung des Umsatzes ohne Unterscheidung der Enantiomere ist hierfür ausreichend, d. h. es muß lediglich die Umsetzung des Substrats und/oder die Bildung von Produkt verfolgt werden können.

In dieser Arbeit werden zu diesem Themengebiet UV-Absorptionsmessungen durchgeführt und die 2D-Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt. Diese Methoden werden im Folgenden kurz beschrieben.

### 3.7.1 Verfahren zur on-line Analytik

#### 3.7.1.1 UV-Absorptionsspektren

Wird eine Substanz durch Licht geeigneter Frequenz angeregt, so kann das entsprechende Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand übergehen. Unter Emission von Lichtquanten charakteristischer Wellenlänge geht die Verbindung wieder in den Grundzustand über. Diese Emission kann mit geeigneten Verfahren gemessen werden. Bei der Erfassung der Ester bzw. freien Säuren bieten sich UV-Messungen an, da die Carboxylatgruppe als chromophore Gruppe allgemein im nahen UV-Bereich bei 200 bis 230 nm angeregt wird [Hesse, Meier, Zeeh; 1991]. Zusätzlich läßt sich auch die  $\beta$ -ständige Alkoholkomponente im fernen UV-Bereich anregen (ca. 180 nm). Die beiden hauptsächlich verwendeten Substrate 3-Hydroxy-4-pentensäureethylester und 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester (Abb. 4.1 in Kap. 4.1) sind beides ungesättigte Verbindungen, so daß noch weitere Anregungsmöglichkeiten bestehen. Mit Hilfe einer Hochdruckdurchflußzelle wird die UV-Messung in SCCO<sub>2</sub> möglich (vgl. Kap. 10.2).

#### 3.7.1.2 Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Dieses nicht invasive Meßsystem beruht ebenfalls auf Anregungsphänomene einzelner Elektronen. Dabei ist die Fluoreszenz die Emission von Licht, die nur so lange auftritt, wie die fluoreszierenden Moleküle durch Lichtabsorption angeregt werden. Für eine weitergehende Beschreibung dieser Methode sei auf Fachliteratur verwiesen ([Wedler; 1987] und [Guilbault; 1990]). Unter definierten Bedingungen sind die Anregungs- und Emissionswellenlängen jeder fluoreszierenden Verbindung charakteristisch. Die Einflüsse auf diese Größe sind allerdings komplex. Neben der Temperatur oder dem pH-Wert können auch verschiedene Lösemittel oder der sogenannte „Inner-Filter-Effekt“ (Reflexions- und Absorptionserscheinungen bei getrübbten Lösungen) diese Größen verändern. Bei Messungen in verschiedenen Lösemitteln ist es schwer, einen eindeutigen Vergleich der Ergebnisse zu erzielen. Bei der 2D-Fluoreszenzspektroskopie werden häufig nicht fluoreszierende Zielmoleküle mit geeigneten Fluorophoren derivatisiert und somit einer Detektion zugänglich gemacht. Organische Säuren lassen sich beispielsweise mit PDAM (1-Pyrenyldiazomethan) derivatisieren [Mukherjee; 1996]. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß sich der 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester im Gegensatz zu dem aliphatischen Substrat fluoreszenzspektroskopisch erfassen läßt. Ein Beispielspektrum ist in Abb. 3.17 dargestellt.

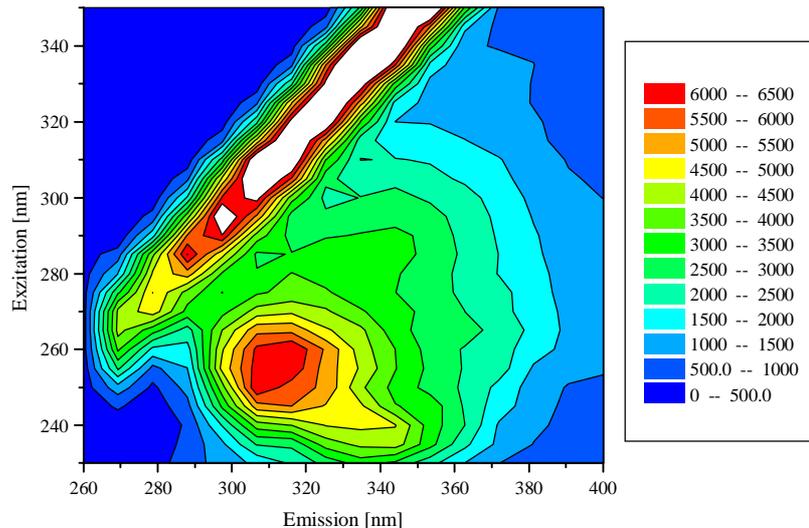


Abb. 3.17: 2D-Fluoreszenzspektrum von 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester in Ether

Die Kopplung des Spektrometers an die Hochdruckanlage wird in Kapitel 4.2.3 skizziert.

### 3.7.2 Verfahren zur off-line Analytik: Die Bestimmung der Enantiomere mittels chromatographischer Methoden

Die Bestimmung von Enantiomeren- oder Diastereomerenverhältnissen war lange Zeit ein komplexes und aufwendiges Verfahren, da optische Isomere in achiraler Umgebung nur durch chiroptische Methoden unterschieden werden konnten [Bornscheuer; 1993]. Zur Enantiomerenanalytik eignen sich neben der Chromatographie insbesondere folgende Methoden: Polarimetrie, differentielle Mikrokalometrie, NMR-Spektroskopie oder die Kapillarelektrophorese. Dabei erzielte allerdings die Chromatographie aufgrund der Entwicklung zahlreicher neuer chiraler stationärer Phasen den größten Aufschwung. Die Enantiomere können hierbei in der Regel ohne Derivatisierung oder Zugabe eines Shift-Reagenz getrennt werden, es sei denn, es erfolgt eine Kopplung mit massenspektroskopischen Methoden. Bei der Chromatographie alleine ist Derivatisieren nur noch nötig, um die Trennleistung der Verbindungsklasse zu verbessern, nicht, um die eigentlichen Enantiomere zu trennen. Weitere Vorteile der Chromatographie bestehen in einer sehr hohen Empfindlichkeit bei kurzer Analysendauer und hoher Reproduzierbarkeit trotz kleiner Probenmengen.

Allgemein beruht die Trennung eines Stoffgemisches bei der Chromatographie auf der unterschiedlichen Verteilung der Substanzen innerhalb zweier Phasen. Dabei wird eine bewegliche (mobile) Phase mit Gelegenheit zum Stoffaustausch an der zweiten stationären

Phase vorbeigeführt. Eine auf die stationäre Phase aufgebrachte Probe wandert im Strom der mobilen Phase mit. Ad- und Desorptionsprozesse führen zu einem ständigen Aufenthaltswechsel der Substanzmoleküle zwischen beiden Phasen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Probenmoleküle wird durch ihren Verteilungskoeffizienten zwischen beiden Phasen bestimmt. Hauptsächlich unterscheiden sich die Methoden aufgrund der Verwendung verschiedener mobiler Phasen und Trägermaterialien.

### **3.7.2.1 Die High Performance Liquid Chromatography**

Bei der HPLC wird unter hohem Druck die Probe in einen kontinuierlichen Strom der mobilen Phase injiziert. Dabei werden neben wässrigen Puffermedien häufig organische Lösemittel wie Acetonitril oder Methanol verwendet. Die Trennung erfolgt im Vergleich zur Gaschromatographie in einer kurzen, dichtgepackten Säule des Trägermaterials. Dabei ist die Trennleistung abhängig von der Fließgeschwindigkeit und der Zusammensetzung der mobilen Phase und natürlich vom verwendeten Träger. Bei der HPLC ist es möglich, Lösemittelgradienten zu verwenden und so die Trennung einzelner Stoffklassen wesentlich zu beeinflussen, da im Laufe der Analyse direkt die Verteilungskoeffizienten zwischen Analyt in der mobilen und stationären Phase geändert werden. Die Detektion erfolgt in der Regel mittels UV-, Brechungsindex- oder Fluoreszenzdetektoren. Der Vorteil gegenüber der Gaschromatographie besteht bei der HPLC in der Möglichkeit, die Trennung bei niedrigen Temperaturen durchzuführen. Für die Enantiomerenanalytik stehen vielfältige Säulen zur Verfügung, die aber hauptsächlich wie bei der Gaschromatographie aus modifizierten Cyclodextrinen bestehen (vgl. Kap. 3.7.2.2). Eine übersichtliche Zusammenfassung verschiedener HPLC-Techniken findet sich in [Meyer; 1992].

### **3.7.2.2 Die Gaschromatographie – Praktische Enantiomerenanalytik**

Ähnlich wie bei der HPLC wird bei der Gaschromatographie (GC) die Probe in den Strom der mobilen Phase injiziert. Dabei werden Trägergase wie Stickstoff, Wasserstoff oder Helium verwendet. Bei den hier eingesetzten Kapillarsäulen ist die stationäre Cyclodextrinphase direkt auf der Innenwand der bis zu 50 m langen Kapillare immobilisiert. Die Trennleistung und die Retentionszeiten hängen bei der GC neben der Art der stationären Phase von der Länge der Kapillarsäule, dem Innendurchmesser, der Temperatur und vom Trägergasstrom ab. Die Detektion erfolgt meistens mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Ein prinzipieller Aufbau der GC und tiefergehende Grundlagen finden sich in [Macherey-Nagel; 1997]. Als stationäre Phase werden in den meisten Fällen modifizierte Cyclodextrine für die

Enantiomertrennung verwendet. Dies sind cyclische Oligosaccharide aus sechs ( $\alpha$ -Cyclodextrin), sieben ( $\beta$ ) oder acht ( $\gamma$ )  $\alpha$ -1,4-verknüpften Glucoseeinheiten [ASTEC; 1999]. Aufgrund mehrerer unterschiedlich reaktiver Hydroxylgruppen der glykosidischen Einheiten sind Cyclodextrine leicht vollständig oder partiell zu alkylieren oder acetylieren, so daß eine Vielzahl verschiedener Trägermaterialien genutzt werden kann. Die Nachteile dieser Phasen gegenüber herkömmlichen GC-Säulen sind eine geringere thermische Belastbarkeit und die schwierige Vorhersage, welche Phase für ein gegebenes Trennproblem geeignet ist [Macherey-Nagel; 1997]. Die Cyclodextrine zeigen eine Art Käfigstruktur. Die einzelnen Enantiomere werden aufgrund sterischer Effekte unterschiedlich gut gebunden und damit letztendlich getrennt. Abb. 3.18 zeigt einige Cyclodextrinstrukturen.

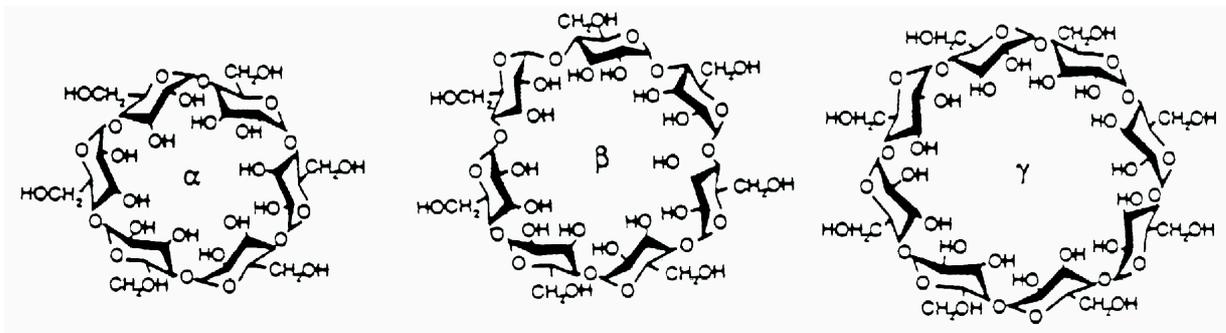


Abb. 3.18: Strukturformel von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin

Die Vorteile der GC gegenüber der HPLC liegt in der Möglichkeit, auch kleine, nicht aromatische chirale Moleküle zu trennen, sowie in der hohen Auflösung und Kapazität (komplexe Gemische mit zahlreichen Komponenten sind zu erfassen). Weiterhin fallen keine Lösemittelreste an, Verunreinigungen können besser erkannt werden und eine Kopplung an weitere Analysemethoden wie z. B. die Massenspektrometrie ist leichter möglich [ASTEC; 1999].

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Substrate

In dieser Arbeit werden für die lipasekatalysierte Hydrolyse hauptsächlich 3-Hydroxy-4-pentensäureethylester (HPE; Sub (1)) und 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester (HPPE; Sub (2)) eingesetzt. Aus Gründen der Namensähnlichkeit werden die Abkürzungen Sub (1) und Sub (2) für die folgenden Untersuchungen bevorzugt. Beide Substrate (Abb. 4.1) wurden als Racemate und als reine Enantiomere von Herrn Prof. H. H. Meyer (Institut für Organische Chemie, Universität Hannover) zur Verfügung gestellt.

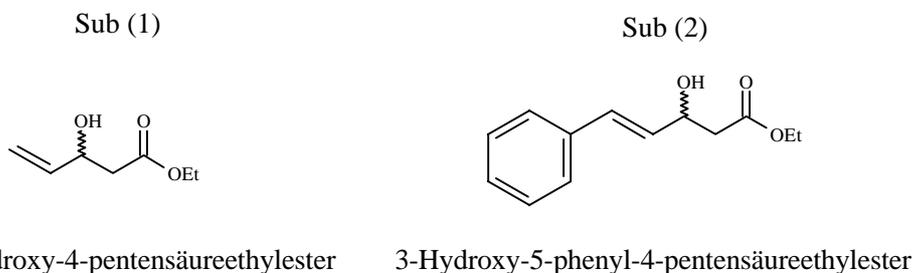


Abb. 4.1: Strukturformeln der verwendeten Substrate

Die Hydroxyester werden durch eine Aldol-Reaktion des entsprechenden Aldehyds (Acrolein für Sub (1) bzw. Zimtaldehyd für Sub (2)) mit Essigsäureethylester in THF bei ca.  $-70^{\circ}\text{C}$  dargestellt [Voß; 1990 und Pahl; 1998].

### 4.2 Die Hochdruckanlage

Im Folgenden werden die grundlegenden Hochdruckaufbauten für alle Experimente vorgestellt. In einigen Versuchen werden diese Aufbauten allerdings geringfügig modifiziert. Diese Änderungen werden in den entsprechenden Kapiteln erläutert.

#### 4.2.1 Der allgemeine Aufbau

Für eine leichte und flexible Durchführung aller Untersuchungen müssen einige Anforderungen an den Versuchsaufbau gestellt werden. Neben einer Druckfestigkeit von bis

zu 200 bar muß die komplette Anlage konstant temperierbar sein. Alle Anschlüsse und Ventile sollten austauschbar und frei miteinander kombinierbar sein. Die verwendeten Reaktoren unterschiedlicher Volumina bestehen durchweg aus druckfesten, korrosionsarmen Edelstahlzylindern mit einem Wanddurchmesser von 1 cm, die in der Werkstatt des Instituts für Technische Chemie angefertigt worden sind. An diese können aufgrund von „1/16“-Standardbohrungen“ handelsübliche Erweiterungen wie Manometer, Ventile oder optische Sensoren angeschlossen werden. Durch die Verwendung von käuflichen HPLC-Kapillaren und -Zubehör ist eine flexible Durchführung verschiedener Experimente möglich. Die Reaktoren können je nach Versuch über sechs Schrauben mit verschiedenen Deckeln verschlossen werden, die Dichtung erfolgt über O-Ringe aus Viton 500. In einer früheren Arbeit [Tservistas; 1997] und zum Teil auch in dieser wurden die Reaktoren noch durch Stahldeckel mit Innengewinde verschlossen, so daß kein flexibler Austausch der Reaktoren möglich war, da die Gewinde genau aufeinander abgestimmt waren. Zwei verwendete Deckel wurden mit druckstabilen Fenstern aus Quarzglas versehen, um optische Untersuchungen zu ermöglichen. Vor und hinter den Reaktoren werden Berstscheiben, die bei 170 bis 180 bar splitterfrei anbrechen, eingebaut, die im Notfall bei unkontrolliertem Druckanstieg als Sollbruchstellen fungieren.

Eine konstante Thermostatisierung erfolgt durch den Einbau der Anlage in einen handelsüblichen Trockenschrank. Lediglich die Kohlendioxidflasche, der Kryostat und die Förderpumpe werden außerhalb plazierte. Der Kryostat dient zur Kühlung des Kohlendioxids, da es nur im flüssigen Zustand gefördert werden kann. Über eine Edelstahlkapillare, die durch eine Bohrung im Trockenschrank in dessen Innenraum geleitet wird, gelangt das Kohlendioxid in den Reaktor. Vorher passiert sie im Trockenschrank ein Wasserbad, so daß das Kohlendioxid vorgewärmt wird. Um eine große Austauschfläche zu gewährleisten, wird die Kapillare gewandelt. Diese Vorwärmung ist nötig, da es durch sich ausdehnendes kaltes Kohlendioxid im Reaktor zu einem unkontrollierten Druckanstieg kommen kann. Dieser für fast alle Experimente grundlegende Aufbau und zwei verwendete Reaktorengrundmodelle sind in Abb. 4.2 skizziert.

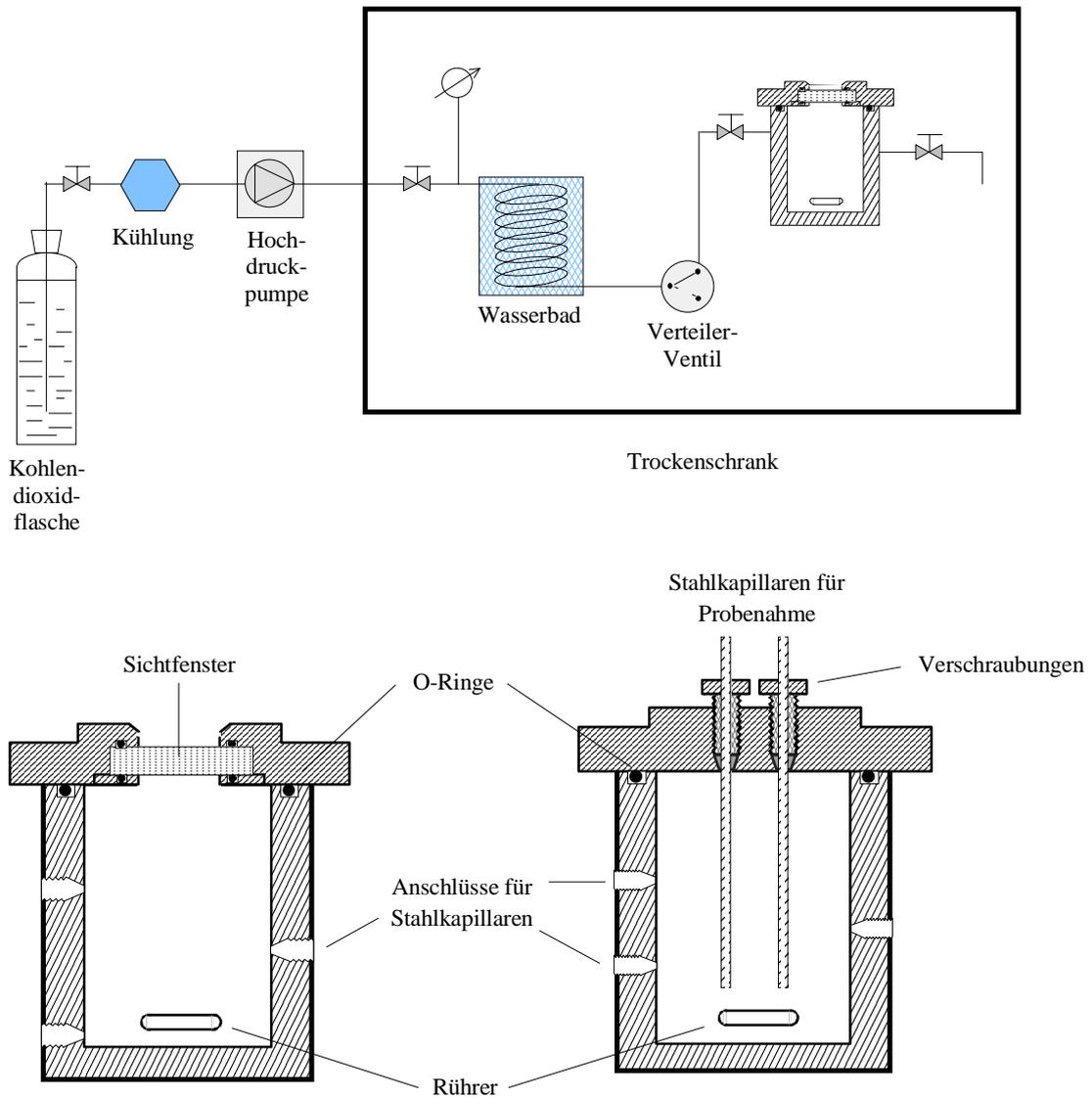


Abb. 4.2: Der grundlegende Versuchsaufbau der Hochdruckanlage und zwei Reaktormodelle

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Berstscheiben und die Verschlußschrauben in Abb. 4.2 nicht mit eingezeichnet. Bei folgenden Darstellungen werden zur besseren Überschaubarkeit auch die Kühlvorrichtung und das Wasserbad nicht skizziert, obwohl sie weiterhin Bestandteil der Apparatur sind.

#### 4.2.2 Die integrierte Probenahme bei Betriebsdruck

Zur Bestimmung der Enantioselektivität, der Enantiomerenüberschüsse und des Umsatzes in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer muß die Möglichkeit bestehen, definierte Proben aus dem unter Druck stehenden Reaktor zu entnehmen, ohne diesen zu öffnen bzw. hohe

Druckverluste zu riskieren. Mit Hilfe einer außerhalb des Trockenschanks platzierten HPLC-Pumpe wird daher der Reaktorinhalt kontinuierlich über ein Drei-Wege-Ventil durch eine 200  $\mu\text{l}$  Probeschleufe umgepumpt (Abb. 4.3).

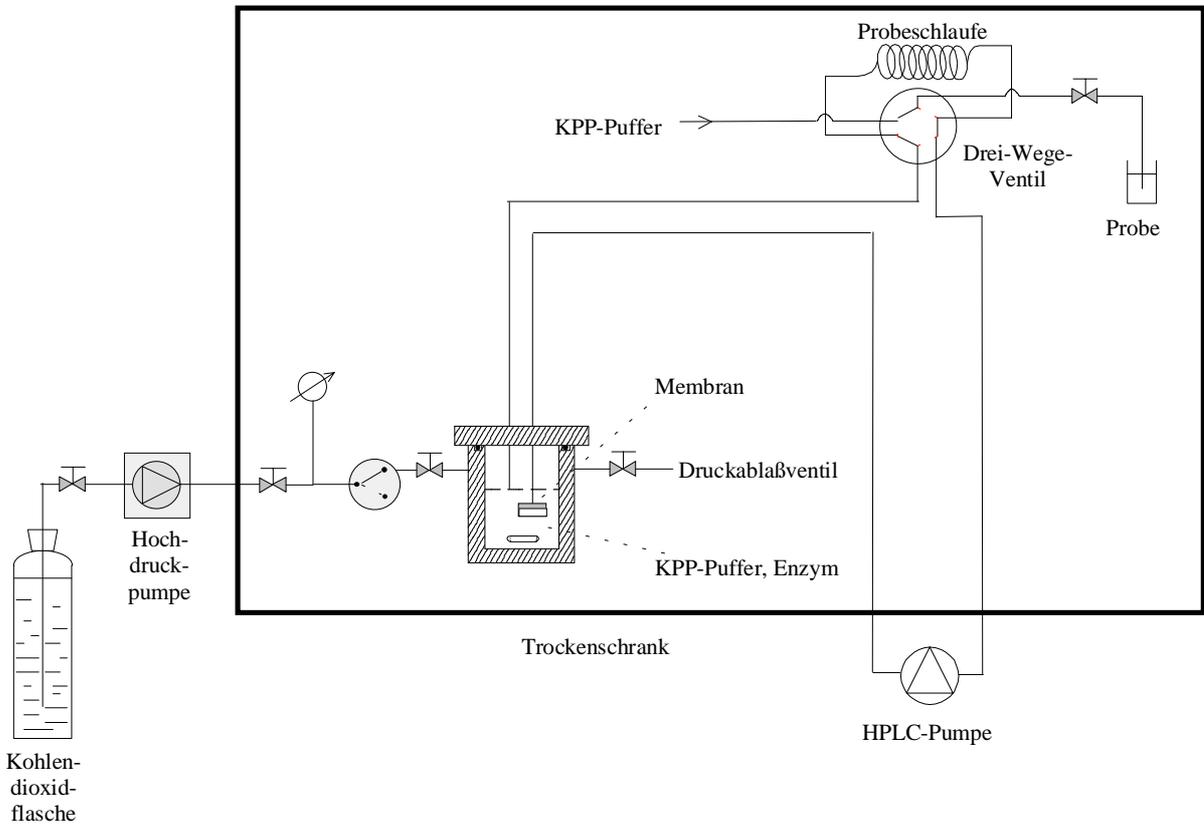


Abb. 4.3: „Kontinuierliche“ Probenahme bei Betriebsdruck

Zur Probenahme wird das Drei-Wege-Ventil umgelegt, dadurch wird die unter Druck stehende Probeschleufe abgekoppelt und der Reaktorinhalt strömt direkt wieder zurück (rot gestrichelte Linie). Durch vorsichtiges Entspannen des Nadelventils kann die Probe entnommen werden. Die Probevorrichtung wird mit einer definierten Menge an Puffer gespült, so daß das gesamte Probevolumen konstant bleibt. Gleichzeitig wird die Probeschleufe mit frischem Puffer gefüllt, der durch erneutes Umlegen des Drei-Wege-Ventils in den Reaktionsraum zurückgelangt. So wird eine nahezu druckverlustfreie Probenahme bei konstantem Reaktionsvolumen gewährleistet. Eine Membran mit geeignetem Cut-Off (10 bis 30 kDa) hält zudem das Enzym im Reaktor zurück.

Die Messungen für die UV-Absorptionsuntersuchungen werden in einer ähnlichen Anlage durchgeführt, nur wird dort die Kohlendioxidphase mit Hilfe einer zweiten Hochdruckpumpe im Kreislauf gefördert. Dabei wird die Probenahme durch eine Hochdruckdurchflußzelle

ersetzt, die sich in einem geeigneten UV-Photometer befindet. Die Absorption wird über einen Schreiber ausgegeben. Der genaue Aufbau ist in [Becker; 1998] beschrieben.

### 4.2.3 Die 2D-Fluoreszenzspektrometrie zur Hochdruckprozeßbeobachtung

Für Fluoreszenzmessungen in SCCO<sub>2</sub> wird das computergesteuerte Spektrometer F-4500 der Firma Hitachi in die Hochdruckanlage integriert. Dazu wird das Gerät mit einem Flüssiglichtleiter der Firma Lumatec umgerüstet ([Hilmer; 1995], [Knüttel; 1999]). Das von einer 150 Watt Xenonlampe ausgestrahlte Licht passiert den Exzitationsmonochromator, wo jeweils eine Wellenlänge herausgefiltert wird. Ein Strahlenteiler verteilt das Licht gleichmäßig auf einen Referenzphotomultiplier und den Lichtleiter. Von dort aus wird das Licht zum Reaktor geleitet. Über den zweiten „Strahlengang“ des Lichtleiters wird das den Reaktor verlassende Fluoreszenzlicht zum Spektrometer zurückgeführt. Nach Passieren eines Emissionsmonochromators, der nur eine bestimmte Wellenlänge durchläßt, trifft das Licht auf einen Photomultiplier.

Die Messung unter Hochdruck erfolgt durch ein für Fluoreszenzlicht durchlässiges Quarzglasfenster der Stärke 8,0 mm (Spindler & Hoyer), das in einem Deckel integriert ist (vgl. Abb. 4.4). Das Quarzglas liegt aus Schutz vor der mechanischen Druckbeanspruchung auf einem faserverstärkten Teflondichtring. Weiterhin befindet sich um die Quarzglasscheibe ein zusätzlicher Gummiring. Der Lichtleiter wird durch die Rückwand des Trockenschanks in das Innere geführt und mittels eines Kunststoffadapters (Werkstatt Institut für Technische Chemie) in einer Höhe von 0,1 mm über dem Fenster des Deckels aufgesetzt. Abbildung 4.4 verdeutlicht den Aufbau. Der Vorteil dieser optischen Analysenmethode liegt darin, daß in den zu untersuchenden Prozeß nicht direkt eingegriffen wird.

In allen vorgestellten Experimenten (Kap. 10) werden folgende Geräteeinstellungen gewählt:

- Scan-Geschwindigkeit: 12000 nm/sec
- Schrittweite der Exzitationswellenlänge: 5 nm
- Schrittweite der Emissionswellenlänge: 10 nm
- Exzitations-Slit: 10 nm
- Emissions-Slit: 20 nm
- Photomultiplierspannung: 700 Volt

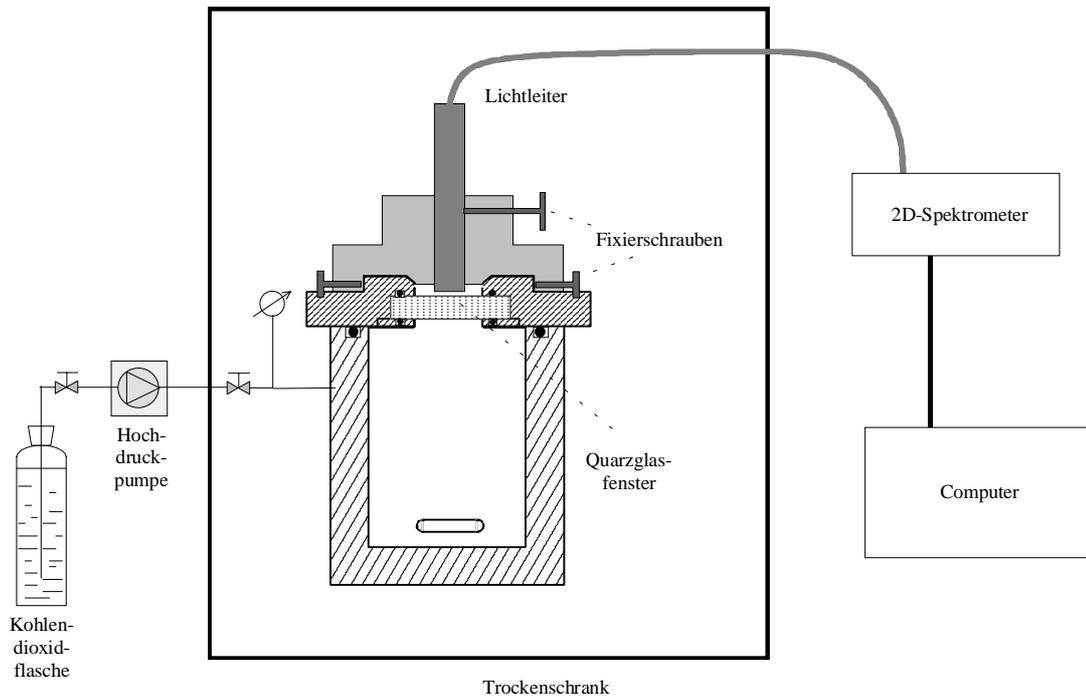


Abb. 4.4: Schematischer Aufbau für Fluoreszenzmessungen in SCCO<sub>2</sub>

### 4.3 Aktivitätsbestimmung mit der pH-Stat Methode

Für Experimente in SCCO<sub>2</sub> ist es wichtig, den geeigneten Temperatur- und pH-Wert-Bereich, in dem die Biokatalysatoren aktiv sind, zu bestimmen. Es wird hauptsächlich bei Temperaturen um 45°C gearbeitet. Aufgrund der unter Druck erhöhten Löslichkeit von CO<sub>2</sub> in wässrigen Puffersystemen sinkt der pH-Wert im Reaktionsgemisch von ca. pH 7,6 auf ca. 5,5 [Tservistas; 1997]. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt für Lipasen mit der pH-stat Methode. Dabei werden bei der enzymatischen Hydrolyse von Tricaprylin die frei werdenden Fettsäuren kontinuierlich mit Natronlauge bekannter Konzentration (0,1 N) neutralisiert.

In ein thermostatisierbares Rührgefäß werden 1,5 ml Tricaprylin mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) auf 25 ml aufgefüllt. Es erfolgt die Zugabe der Lipasepräparation. Das kann sowohl Enzym in fester (nativ oder immobilisiert) als auch in gelöster Form sein. Die eingesetzte Menge richtet sich nach erwarteter Aktivität und sollte zwischen 20 und 50 mg liegen, um den möglichen Meßbereich nicht zu überschreiten.

Die Spezifische Aktivität [U/mg oder U/μl] bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit ist der pro Zeiteinheit Δt verbrauchten Menge n an Natronlauge direkt proportional:

$$\text{Spez. Aktivität [U/mg]} = \frac{n_{\text{NaOH}} [\mu\text{mol}]}{\Delta t [\text{min}] \cdot m_{\text{Enzym}} [\text{mg}]} \quad (4.1)$$

## 4.4 Gaschromatographische Enantiomerenanalytik

### 4.4.1 Aufarbeitung der Proben

Alle zu analysierenden wäßrigen Proben müssen aufgearbeitet werden, bevor sie in den Gaschromatographen injiziert werden, da die  $\beta$ -Cyclodextrin-Phase der verwendeten Kapillarsäule  $\beta$ -Hydrodex 3P (Macherey-Nagel) wasserlöslich ist. Daher wird die Probe von jeweils 0,5 ml mit 100  $\mu$ l Salzsäure (6 N) und 100  $\mu$ l Methanol versetzt, um die enzymatische Katalyse abubrechen, die in der Pufferphase als Anion vorliegende Produktsäure zu protonieren und Proteinreste auszufällen. Es erfolgt viermaliges Extrahieren der Säure mit 1 ml Ether. Die notwendige Extraktionsanzahl wurde in Vorversuchen bestimmt. Die vereinigten organischen Phasen werden im Stickstoffstrom auf ca. 1,5 ml eingeengt. Im Falle von Sub (2) wird die Säure durch Zugabe von 250  $\mu$ l Diazomethan zum entsprechenden Methylester derivatisiert, da keine Detektion der 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäure im für die Säule zulässigen Temperaturbereich möglich ist. Überschüssiges Diazomethan (gelbe Färbung der Lösung) wird im Stickstoffstrom entfernt. Die Proben werden daraufhin über 200 mg Calciumchlorid getrocknet. Nach Abzentrifugieren des Trockenmittels werden 0,5 ml abgenommen und mit 10  $\mu$ l einer Dodecan : Hexan Mischung (1:100) als interner Standard versetzt. Das GC-Injektionsvolumen liegt zwischen 0,1 und 1,0  $\mu$ l.

### 4.4.2 Betriebsparameter

Abbildung 4.5 zeigt ein Beispielchromatogramm für Sub (1) und (2) inkl. Produktsäuren. Aufgrund der Derivatisierung von Sub (2) liegen die Methylesterenantiomere zeitlich vor den Substratpeaks. In beiden Fällen werden die jeweiligen R-Enantiomere zuerst detektiert. Das wurde durch Injektion entsprechender Reinsubstanzen verifiziert.

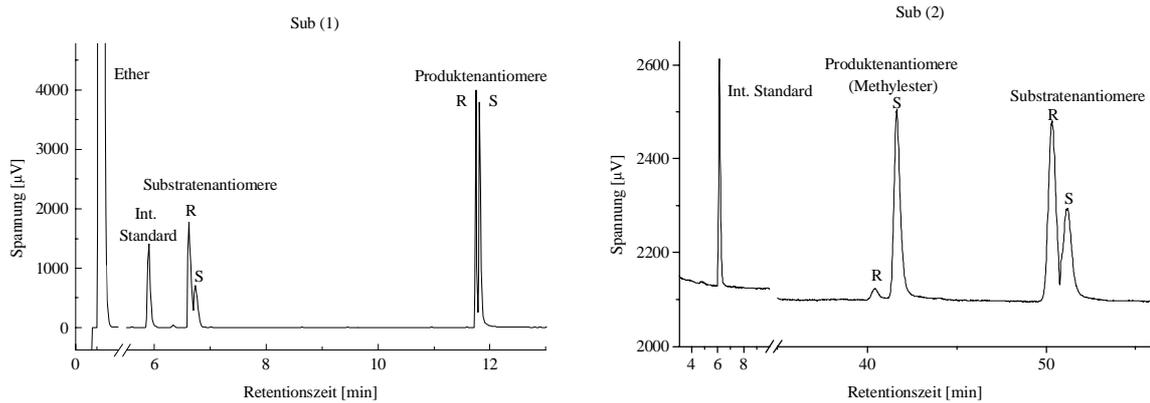


Abb. 4.5: Beispielchromatogramme für Sub (1) und Sub (2) und deren Produktenantiomere

Folgende Temperaturprofile und Geräteeinstellungen wurden verwendet:

Sub (1):

90°C/5 min → 10°C/min → 130°C/0 min

15°C/min → 160°C/0 min

10°C/min → 190°C/2 min

Gesamtdauer = 16 Minuten

Sub (2):

135°C/10 min → 5°C/min → 145°C/48 min

Gesamtdauer = 60 Minuten

Carriergas: Wasserstoff:	1,2 bar
Make-Up Gas: Stickstoff:	0,5 bar
FID: Wasserstoff:	0,65 bar
Luft:	0,5 bar
Injektortemperatur:	180°C
Detektortemperatur:	250°C

#### 4.4.3 Bestimmung der Enantioselektivität, der Enantiomerenüberschüsse und des Umsatzes

Die charakteristische Größe für die optische Reinheit einer Substanz ist der sogenannte Enantiomerenüberschuß  $ee$  [%]. Das ist der Anteil eines Enantiomers, der über das racemische Verhältnis der Gesamtmenge hinausgeht. Über die Molenbrüche  $x$  für die Enantiomere  $R$  und  $S$  ausgedrückt, wird er für Substrat (und analog auch für das Produkt) wie folgt berechnet:

$$ee = \frac{(x_R - x_S)}{(x_R + x_S)} \cdot 100\% \quad (4.2)$$

Bei einer chiralen chromatographischen Methode ist es allerdings möglich, die Enantiomerenüberschüsse direkt über die Peakflächen  $F$  zu berechnen:

$$ee = \frac{(F_R - F_S)}{(F_R + F_S)} \cdot 100\% \quad (4.3)$$

In einer kinetischen Racematspaltung sind die Enantiomerenüberschüsse allerdings abhängig vom Umsatz, d. h. sie verändern sich mit der Zeit. Sollen verschiedene Racematspaltungen verglichen werden, so wäre das nur sinnvoll bei gleichen Umsätzen. [Chen et al.; 1982] führten daher die Enantioselektivität  $E$  ein. Diese Größe, die direkt die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der umgesetzten Enantiomere definiert, kann auch als *Trennleistung* oder *Unterscheidungsfähigkeit* des Enzyms aufgefaßt werden. Im Idealfall ist die Enantioselektivität über den gesamten Reaktionsverlauf konstant. Gleichung (4.4) zeigt, daß sie sich aus dem Umsatz und den entsprechenden Substrat- oder Produkt-enantiomerenüberschüssen berechnen läßt:

$$E = \frac{\ln[(1-U)(1-ee_S)]}{\ln[(1-U)(1+ee_S)]} = \frac{\ln[1-U(1+ee_P)]}{\ln[1-U(1-ee_P)]} = \frac{\ln \left[ \frac{1-ee_S}{1+\frac{ee_S}{ee_P}} \right]}{\ln \left[ \frac{1+ee_S}{1+\frac{ee_S}{ee_P}} \right]} = \frac{\left( \frac{v_{\max}}{k_M} \right)_R}{\left( \frac{v_{\max}}{k_M} \right)_S} \quad (4.4)$$

Einem  $E$ -Wert von 1 entspricht eine unselektive Reaktion, einem Wert von  $> 100$  eine hochstereoselektive Umsetzung. Nur bei  $E > 100$  kann sowohl das Substrat als auch das Produkt bei 50% Umsatz optisch rein dargestellt werden. Ist die Enantioselektivität größer als 20, so läßt sich zumindest optisch reines Substrat oder Produkt bei einem bestimmten Umsatz erreichen [Bornscheuer; 1999]. Streng genommen gilt Gl. 4.4 nur für irreversible Reaktionen, bei dem ein chirales Substrat zu einem chiralen Produkt ohne Produktinhibierung umgesetzt wird. Ansonsten muß die Gleichgewichtskonstante  $K$  berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu den meisten enzymatischen Reaktionen kann die Hydrolyse als irreversibel betrachtet werden, da Wasser im Überschuß vorliegt und so die Rückreaktion unterdrückt wird [Bornscheuer; 1999]. Weiterhin liegt das Produkt in der Pufferphase als Anion vor und steht aufgrund seiner Ladung einer Rückreaktion nicht zur Verfügung. Nur die protonierte freie Säure wäre dazu imstande (vgl. Abb. 3.5).

Der in Gleichung (4.4) auftretende Umsatz läßt sich bei Kenntnis der Enantiomerenüberschüsse ( $ee_s$  für das Substrat und  $ee_p$  für das Produkt) wie folgt berechnen:

$$U = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (4.5)$$

Es ist zu erkennen, daß bei 50 % Umsatz  $ee_s$  und  $ee_p$  gleich sein müssen. Weiterhin zeigt sich, daß sich alle wichtigen Kenngrößen für die lipasekatalysierte Hydrolyse von 3-Hydroxysäureester alleine über die Peakflächen eines Chromatogramms bestimmen lassen.

## 5 Substratauswahl

In dieser Arbeit werden schwerpunktmäßig lipasekatalysierte Reaktionen in SCCO<sub>2</sub> untersucht. Dabei sollen die in Kap. 3.5.1 beschriebenen Vorteile dieses Mediums ausgenutzt werden, um die Möglichkeit der Substrat-/Produkttrennung mit der enzymatischen Reaktion zu verknüpfen. Das produzierte Säureanion sollte sich nicht bzw. kaum in SCCO<sub>2</sub> lösen. Dies ist der Fall, wenn noch keine Protonierung des Anions bei einem pH-Wert von 5,5 (pH-Wert von unter Druck gelöstem Kohlendioxid in Kaliumphosphatpuffer) stattfindet. Komplementär dazu sollte das gewählte Substrat eine hohe Löslichkeit in SCCO<sub>2</sub> zeigen, um es für eine integrierte Extraktion interessant zu machen. Aus diesen Gründen werden mittelkettige Substrate gewählt, die trotz ihrer beiden polaren Gruppen (Alkohol- und Esterfunktion) ausreichende Löslichkeit in unpolaren Medien wie Hexan zeigen. Für Sub (2) gilt dieses aufgrund des aromatischen Rests um so mehr. Außerdem wurden langkettige aliphatische Verbindungen in überkritischem Kohlendioxid bereits ausreichend untersucht ([Bornscheuer; 1993]; [Capewell; 1994]). Um die Funktionalität des gewählten Reaktionssystems mit konventionellen Lösemitteln wie Hexan zu vergleichen, ist es notwendig, die Substrate auch in diesen Solventien einzusetzen. Mehrere Arbeiten wurden zu diesem Themengebiet bereits durchgeführt ([Voß; 1990), [Herar; 1995], [Pahl; 1998]), und einige Reaktionen in Hexan werden auch in dieser Arbeit untersucht.

Ein Hauptgrund für die Wahl von Sub (1) und Sub (2) ist ihr bereits erwähntes Synthesepotential als Ausgangssubstanz für wichtige enantiomerenreine Naturstoffe. Sollte es möglich werden, diese Stoffe durch den Einsatz umweltfreundlicher, kombinierter Reaktions-Separationsmethoden leichter und sogar reiner herzustellen, würde die gesamte Synthese dieser Naturstoffe erleichtert und schonender ablaufen.

Zunächst werden einige allgemeine Vorversuche für beide Substrate durchgeführt. In Kapitel 7 wird darauf folgend die enzymatische Hydrolyse des aliphatischen und in Kapitel 8 die des aromatischen Esters untersucht. Kapitel 9 beschreibt Optimierungsversuche für Sub (2) in bezug auf Enantioselektivität und Enantiomerenüberschüsse einschließlich der Bestimmung der Zwei-Substrat-Kinetik. Die Etablierung einer geeigneten on-line Analytik wird in Kapitel 10 dargestellt.

## 6 Allgemeine Voruntersuchungen

### 6.1 Bestimmung der Löslichkeiten beider Substrate in verschiedenen Lösemittelsystemen

Bevor ein Enzymscreening (Kap. 7.1) stattfindet, wird geprüft, wie sich die Löslichkeit der Substrate in den verwendeten Lösemitteln bzw. Zwei-Phasen-Systemen SCCO<sub>2</sub>/Wasser und Hexan/Wasser verhält. Die qualitative Bestimmung der Löslichkeit der Substrate in SCCO<sub>2</sub> erfolgt über Gewichts-differenzmessungen. Die Substrate werden in Einzelversuchen in ein Gefäß bekannten Gewichts eingewogen und im Reaktor plaziert. Der 24 stündige Lösungsprozeß erfolgt in SCCO<sub>2</sub> bei ca. 100 bar für Sub (1) und 110 bar für Sub (2).

Die Drücke konnten nicht exakt identisch eingestellt werden. Neben Löslichkeitseffekten der Substrate in Kohlendioxid ist dafür die Temperaturdifferenz des Kohlendioxids verantwortlich. Zunächst muß es zur Förderung gekühlt werden. Um den überkritischen Zustand zu erreichen, wird daraufhin eine Erwärmung auf Reaktionstemperatur notwendig. Trotz des vorgeschalteten Wasserbads und aufgrund zusätzlich auftretender Flußschwankungen der Hochdruckpumpe ist es nicht möglich, das SCCO<sub>2</sub> jeweils mit identischen Temperaturen in den Reaktor zu leiten. Daher expandiert das Kohlendioxid bei weiterer Erwärmung auf die Versuchstemperatur, was einen weiteren Druckanstieg zur Folge hat. Dieser Effekt tritt auch bei einigen der folgenden Versuchen auf und wird dort als „Temperatureffekt“ bezeichnet.

Nach der Versuchsdauer wird der Reaktor vorsichtig entspannt und dabei das Kohlendioxid in Ether eingeleitet. Die Bestimmung der Löslichkeit erfolgt über die Gewichts-differenz und über eine gaschromatographische Analyse der Etherfraktion. In beiden Fällen wird Substrat gefunden. Die Gewichts-differenzmessungen zeigen, daß sich 90,6 % Sub (1) und 89,1 % Sub (2) in SCCO<sub>2</sub> gelöst haben. Da beim Entspannen auch gelöstes Substrat an den Reaktorwänden und in den Kapillaren ausfällt, wird die Löslichkeit zu 100% angenommen.

Für beide Substrate wird der Verteilungskoeffizient im System SCCO<sub>2</sub>/KPP (Kaliumphosphatpuffer) bestimmt. Im Gegensatz zu Sub (1) bildet der aromatische Ester bei Vorlage in KPP „Fettröpfchen“ auf der Wasserphase, d. h. die Löslichkeit ist in dem verwendeten Puffer gering. Der aliphatische Ester löst sich dagegen deutlich besser. Aus diesem Grund wird zu Vergleichszwecken auch der Verteilungskoeffizient in Hexan/KPP ermittelt.

Nachdem das Substrat in Puffer vorgelegt wurde, erfolgt die Zugabe des organischen Mediums. Nach 24 h wird aus jeder Phase eine Probe entnommen und gaschromatographisch analysiert. Im Falle des überkritischen Kohlendioxids wird die Bestimmung anders durchgeführt. Hier ist es nicht möglich, eine Probe vergleichbarer Menge wie aus der Pufferphase zu entnehmen, da das CO<sub>2</sub> wieder gasförmig wird. Aus diesem Grund wird das Substrat zunächst nur in der Wasserphase vorgelegt, der Reaktor verschlossen, 24 h lang gerührt und eine Probe über die Probenschlaufe entnommen (vgl. Abb. 4.3). Erst jetzt erfolgt die Befüllung mit Kohlendioxid. Nach weiteren 24 h wird eine zweite Probe aus der KPP-Phase entnommen und analysiert. Die Konzentrationen werden über die Peakflächen der Chromatogramme bestimmt. Aus der entsprechenden Konzentrationsdifferenz des Substrats läßt sich der Verteilungskoeffizient bestimmen:

$$\alpha = \frac{c_{\text{org. Phase}}}{c_{\text{KPP}}} = \frac{c_{\text{KPP}}^0 - c_{\text{KPP}}}{c_{\text{KPP}}} \quad (6.1)$$

$c_{\text{KPP}}^0$  = Konzentration des Substrats in der Pufferphase vor Zugabe des Kohlendioxids

$c_{\text{KPP}}$  = Konzentration des Substrats in der Pufferphase im System SCCO<sub>2</sub>/KPP

Der Verteilungskoeffizient für das System SCCO<sub>2</sub>/KPP gilt strenggenommen nur für den Druck, bei dem gemessen wird, da die Löslichkeit druckabhängig ist. Tabelle 6.1 listet die Ergebnisse auf. Dabei sei erneut auf die Temperatur- und Löslichkeitseffekte hingewiesen, die zu den verschiedenen Drücken führten.

Substrat	SCCO <sub>2</sub> /KPP	Hexan/KPP
1 (HPE)	1,54 (bei 95 bar)	1,948
2 (HPPE)	11,51 (bei 100 bar)	-

Tab. 6.1: Verteilungskoeffizienten der beiden Substrate in verschiedenen Zwei-Phasen-Systemen

Das Ergebnis für das aromatische Substrat ist fehlerhaft, da sich das Substrat bei der Messung in der reinen Pufferphase, wie bereits erwähnt, nicht vollständig gelöst hat, d. h. der Verteilungskoeffizient müßte noch höher liegen. Für die integrierte Substrat-/Produkttrennung ist aufgrund der ca. 11-fach besseren Löslichkeit in SCCO<sub>2</sub> das aromatische Substrat besser geeignet. Dennoch werden in den weiteren Untersuchungen zu Vergleichszwecken beide Substrate eingesetzt.

Für Sub (1) stellt sich zusätzlich die Frage, ob sich das gewählte System so weit optimieren läßt, daß trotz der geringen Löslichkeitsunterschiede in Kohlendioxid und KPP der Einsatz in

SCCO<sub>2</sub> möglich wird. Aus diesem Grund wird die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten bzw. der Löslichkeit bei verschiedenen Drücken und Temperaturen wiederholt. Dazu werden 0,5 ml Sub (1) in KPP vorgelegt und unter SCCO<sub>2</sub> gesetzt. Das Gemisch wird mit 800 U/min gerührt, die KPP-Phase wird kontinuierlich mit einem Volumenstrom von 0,1 ml/min umgepumpt. Nach jeder Druckerhöhung wird die entsprechende Meßreihe bei 40°C begonnen. Nach jeweils zwei Stunden wird eine Probe aus der Pufferphase entnommen und die Temperatur erhöht. Abb. 6.1 stellt das Ergebnis dar. Dabei wird qualitativ die aus den Gaschromatogrammen bestimmte Gesamtfläche der Substrat-enantiomerenpeaks gegen die Temperatur aufgetragen.

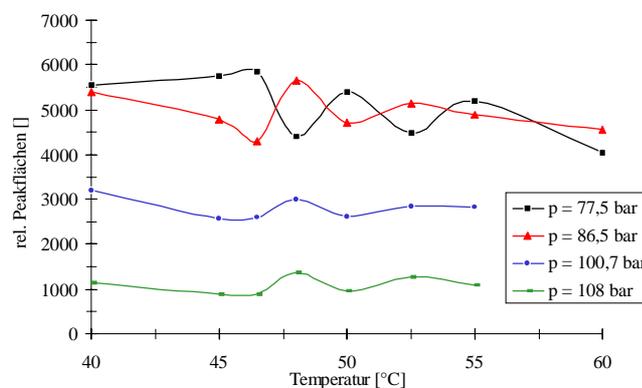


Abb. 6.1: Die Abhängigkeit der Löslichkeit von Druck und Temperatur für Sub (1)

Die Verteilungskoeffizienten bei 45°C sind in Tabelle 6.2 dargestellt.

Druck [bar]	Verteilungskoeffizient SCCO <sub>2</sub> /KPP [45°C]
77,5	0,81
86,5	1,15
95,0*	1,54
100,7	3,03
108	10,51

Tab. 6.2: Verteilungskoeffizienten für Sub (1) in Abhängigkeit vom Druck; \* = vgl. Tab. 6.1

In Abbildung 6.1 nehmen die relativen Peakflächen mit steigendem Druck ab, d. h. die Konzentration von Sub (1) nimmt in KPP ab und somit in SCCO<sub>2</sub> zu. Es wird deutlich, daß der Verteilungskoeffizient und damit auch die Löslichkeit von Sub (1) sehr stark von dem Druck anhängig ist. Der Einfluß der Dichte auf die Solvatationskraft gerade im Bereich zwischen 70 und 120 bar kann mit diesem Experiment bestätigt werden (vgl. Abb. 3.8). Bei 108 bar wird für Sub (1) ein ähnlich hoher Verteilungskoeffizient wie für Sub (2) bestimmt. Ein Temperatureinfluß kann nicht eindeutig erkannt werden. Mit Ausnahme der Messung bei

77,5 bar zeigen sich bei allen Drücken Löslichkeitsmaxima zwischen 45 und 50°C. Diese können nicht eindeutig erklärt werden, da die Dichte mit steigender Temperatur kontinuierlich abnimmt (Kap. 13.2, Tab. 13.2) und kein Maximum zeigt. Diese Abweichungen der Meßwerte lassen sich vermutlich neben Druckschwankungen im System oder unregelmäßigem Volumenstrom der Pumpe mit einem zu kurz gewählten Zeitraum für die Einstellung des Löslichkeitsgleichgewichts begründen.

## 6.2 Die Protonierung der Produktsäureanionen

Für eine einfache Substrat-Produkttrennung sollte sich die produzierte Säure nicht in  $\text{SCCO}_2$  lösen, was auf jeden Fall gewährleistet ist, solange sie als Anion vorliegt. Unter diesen Bedingungen kann die Hydrolyse als irreversibel betrachtet werden. Im System KPP/ $\text{SCCO}_2$  sinkt der pH-Wert von ursprünglichen 7,6 auf ca. 5,5 ab [Tservistas; 1998]. Daher wird geprüft, ob in dem pH-Bereich zwischen 5 und 6 eine Protonierung stattfindet.

Racemische Produktsäure (dargestellt aus 5 mg des entsprechenden Phenylethylamin-Salzes durch Ansäuern mit HCl) wird in 5 ml 0,5 M KPP (pH 7,6) gelöst und sukzessive mit 6 N Salzsäure angesäuert. Es erfolgt nach jeder weiteren Salzsäurezugabe jeweils eine zweimalige Extraktion mit 1 ml Ether, die Zugabe des Internen Standards Dodecan und die Analyse im GC. Abb. 6.2 stellt beispielhaft das Ergebnis für die 3-Hydroxy-4-pentensäure dar.

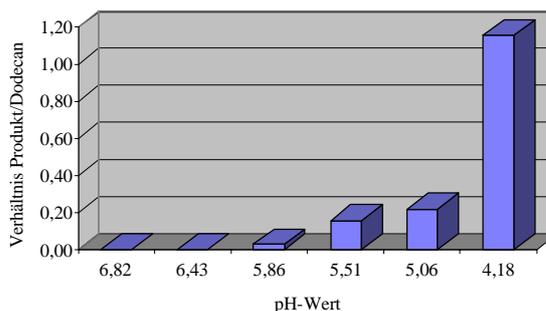


Abb. 6.2: Die Abhängigkeit des Protonierungsgrads vom pH-Wert für 3-Hydroxy-4-pentensäure

Es zeigt sich, daß erst bei pH-Werten  $< 5,06$  viel Säure extrahiert wird. Zwischen pH 5 und 6 liegt dagegen weniger „freie“ Säure vor. Für die aromatische Produktsäure wird ein ähnlicher Verlauf beobachtet. Auch in den späteren enzymatischen Hydrolysen wird nie Säure in Proben aus der  $\text{SCCO}_2$ -Phase nachgewiesen.

### 6.3 Reracemerisierungsversuche

Viele reine Enantiomere können abhängig von den am chiralen Zentrum sitzenden Gruppen unter Säure- oder Basenkatalyse über einen Eliminierungsschritt reracemerisieren. Aus diesem Grund wird untersucht, ob bei den hier verwendeten Substanzen eine Reracemerisierung stattfindet. Die reinen S-Enantiomere beider Substrate werden bei pH 5 für 24 h geschüttelt und anschließend gaschromatographisch analysiert. Die entsprechenden S-Enantiomere der Produktsäuren werden realen Versuchsbedingungen unterworfen: 0,3 g Phenylethylamin-Salz wird mit 0,5 ml 6 N Salzsäure versetzt und achtmal mit 1 ml Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nach Einengen auf ca. 1 ml zu einem Gemisch bestehend aus 15 ml Hexan, 19 ml 0,5 M KPP, 1 ml Ethanol (zweites Reaktionsprodukt bei der Hydrolyse) und 0,3 g Esterase gegeben. Alle sechs Stunden werden Proben aus der Pufferphase entnommen, aufgearbeitet (s. Kap. 4.4.1) und analysiert. Dabei wird auch bis zum Versuchsende nach 24 h sowohl für die Substratenantiomere als auch für die Säuren keine Reracemerisierung festgestellt.

## 7 Die enzymatische Hydrolyse von 3-Hydroxy-4-pentensäureethylester

### 7.1 Das Enzymscreening in Hexan

Bevor die enzymatische Hydrolyse von Sub (1) in SCCO<sub>2</sub> untersucht werden kann, muß eine geeignete Lipase in bezug auf Reaktionsgeschwindigkeit, Umsatz und erreichte Enantiomerenüberschüsse bzw. Enantioselektivität gefunden werden. Daher findet zunächst ein Enzymscreening mit 16 Lipasen und einer Esterase statt. Dieses Screening wird im Millilitermaßstab mit n-Hexan als Lösemittel durchgeführt und nicht im eigentlichen Kohlendioxid-Reaktionsmedium. Das ermöglicht eine schnellere Vorauswahl eines Enzyms. Es werden zu 750 µl KPP (0,5 M; pH 7,6) und 950 µl Hexan 50 µl Substrat und ca. 15 mg Enzym gegeben. Es werden nur Proben aus der Hexan-Phase entnommen, getrocknet und analysiert. Daher richtet sich dieses „erste“ Screening nur nach Reaktionsdauer, Substratenantiomerenverhältnis und bevorzugt umgesetztes Enantiomer. Tabelle 7.1 listet die Ergebnisse nach dem jeweiligen Reaktionsabbruch (keine weitere Peakauswertung mehr möglich) auf.

Lipase	Zeit [h]	ee <sub>S</sub>	bevorzugtes Enantiomer
<i>Alcaligenes species</i>	22,5	37,6	R
<i>Alcaligenes species</i> ( Lipase PL; Meito)	47,7	14,9	R
<i>Aspergillus niger</i> (Lipase A; Amano)	-	-	-
B (H&R)	46,5	20,6	S
<i>Candida cylindracea</i> (Amano)	70,0	20,6	S
<i>Candida rugosa</i> (Lipase AY; Amano)	46,3	10,7	S
CE (Amano)	22,3	20,2	S
<i>Chromobacterium viscosum</i> (Toyo Jozo)	23,2	45,2	S
Lipolase (Novo Nordisk)	-	-	-
Lipozyme (Novo Nordisk)	46,2	80,8	R
<i>Mucor miehei</i> (Röhm)	-	-	-
<i>Pseudomonas cepacia</i> (Lipase PS; Amano)	5,8	13,4	R
Porcine pancreas (Sigma)	48,0	55,7	S
<i>Penicillium camembertii</i> (Lipase G; Amano)	-	-	-
2212 F (Röhm)	-	-	-
7023 (Röhm)	47,7	26,3	S
Esterase			
<i>Mucor miehei</i>	22,5	69,8	R

Tab. 7.1: Enzymscreening für Sub (1); Reaktionsdauer, Substratenantiomerenüberschuß und bevorzugtes Enantiomer

Aus Tab. 7.1 wird ersichtlich, daß die Ergebnisse stark variieren. Fünf Enzyme setzen das R- und die restlichen das S-Enantiomer um. Enantiomerenüberschüsse von über 30 % werden ebenfalls nur mit fünf Enzymen (*Alcaligenes sp.*; *Chromobacterium visc.*; *Lipozyme*; Porcine pancreas und der Esterase) erreicht. Dabei sind die Reaktionszeiten allerdings mit ein bis zwei Tagen für eine enzymatische Katalyse relativ hoch. Die oben genannten Enzyme und die Lipase PS (Amano) werden erneut in Hexan eingesetzt, allerdings werden jetzt die Proben aus der Pufferphase entnommen und die Produktenantiomerenüberschüsse, der Umsatz und die Enantioselektivität bestimmt. Da das Substrat eine hinreichende Löslichkeit in KPP zeigt (Verteilungskoeffizient Hexan/KPP = 1,95; Kap. 6.1), wird keine zweite Probe aus der Hexanphase benötigt. Die Lipase PS wird hier zusätzlich eingesetzt, da sie die Reaktion bei moderatem Substratenantiomerenüberschuß mit 5,75 Stunden relativ schnell katalysierte. Folgender Reaktionsansatz gilt für alle sechs Untersuchungen (Reaktion im Rundkolben):

- 15 ml KPP (0,5 M; pH 7,6)
- 20 ml Hexan
- 1 ml Ester
- 300 mg Enzym
- Rührgeschwindigkeit 800 U/min

In Abb. 7.1 sind exemplarisch die Reaktionsverläufe für PSL (*Pseudomonas cepacia* Lipase; früher: *Pseudomonas species* Lipase) und CVL (*Chromobacterium viscosum* Lipase) graphisch dargestellt, Tab. 7.2 gibt die Ergebnisse insgesamt wieder. Dabei wird das „50 % Umsatz-Kriterium“ herangezogen. Theoretisch sollte bei einer stereoselektiven kinetischen Racematspaltung bei 50 % Umsatz genau ein Substratenantiomer komplett in das entsprechende Produktenantiomer umgesetzt worden sein.

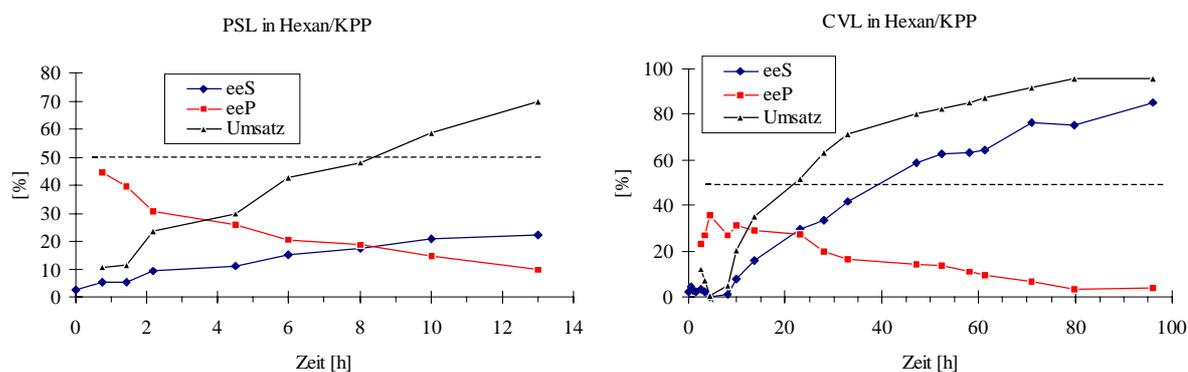


Abb. 7.1: Reaktionsverläufe der lipasekatalysierten Hydrolyse von Sub (1) mit PSL und CVL

Enzym	Umsatz [%]	Zeit [h]	ee <sub>s</sub> [%]	ee <sub>p</sub> [%]	E
<i>Alcaligenes sp.</i>	50,0	7,8	10,8	12,4	1,3
<i>CVL</i>	50,0	23	21,5	27,4	2,3
<i>Lipozyme</i>	50,0	6,5	12,6	11,6	1,4
<i>Porcine pancreas</i>	38,4	67,7	16,5	26,5	5,0
<i>PSL</i>	50,0	8,5	17,7	18,0	1,7
<i>Esterase</i>	50,0	1,6	11,3	11,8	1,4

Tab. 7.2: Ergebnisse der Hydrolyse von Sub (1) in Hexan/KPP

Bis auf die PPL (*Porcine pancreas* Lipase) erreichen alle Enzyme 50 % Umsatz, aber die Hydrolyse ist in allen Fällen nicht selektiv. Obwohl mit der PPL mit 5,0 die höchste Enantioselektivität erzielt wird, spricht die längste Reaktionszeit gegen den weiteren Einsatz. [Pahl; 1998] zeigte, daß die Hydrolyse mit insgesamt 3,25 g PPL und 85 g Sub (1) in 1M KPP ohne den Zusatz einer zweiten organischen Phase erst nach vier Wochen zu einem ee<sub>s</sub> Wert von > 98 % und einem ee<sub>p</sub>-Wert von 68 % (U = 59 %; E = 23) führte. Diese lange Reaktionszeit ist alleine wegen der Aktivitätsverluste (vgl. folgende Kapitel) in dem verwendeten Puffersystem für einen technischen Einsatz völlig indiskutabel.

Moderate Ergebnisse in bezug auf Enantiomerenüberschüsse und Enantioselektivität zeigen ansonsten die CVL und die PSL. Interessant ist auch der weitere Einsatz der Esterase aufgrund der kurzen Reaktionszeit.

Zu Vergleichszwecken werden zunächst alle sechs Enzyme nochmals in Hexan bei pH 5,5 und einmal in SCCO<sub>2</sub> eingesetzt. Für die anschließenden Optimierungsreaktionen wird trotz der höheren Reaktionszeit dagegen nur noch die CVL aufgrund der höchsten Enantioselektivität und Substratenantiomerenüberschüsse ausgewählt.

## 7.2 Die lipasekatalysierte Hydrolyse in Hexan/KPP bei pH 5,5 – Vergleichsmessungen zu Kohlendioxid

Bei einem Einsatz von KPP in SCCO<sub>2</sub> sinkt der pH Wert, abhängig vom gewählten Druck, von 7,6 auf ca. 5,5 ab. Aus diesem Grund wird die Hydrolyse von Sub (1) mit allen sechs Enzymen in Hexan/KPP bei pH 5,5 untersucht. Es wird der gleiche Reaktionsansatz wie in den vorigen Experimenten (Kap. 7.1) verwendet. Auch hier werden nur die Reaktionsverläufe für die CVL und die PSL wiedergegeben (Abb. 7.2). Zusätzlich wird vor und nach der Reaktion bis auf den Esterase-Versuch die Aktivität des eingesetzten Enzyms bestimmt. Dazu werden jeweils 0,5 ml des Reaktionsgemisches abgenommen. Im Falle der Anfangsaktivität

erfolgt die Abnahme vor der Substratzugabe. Die Aktivität wird mit der pH-stat-Methode ermittelt (Kap. 4.3). Die Gesamtergebnisse spiegelt Tab. 7.3 wieder.

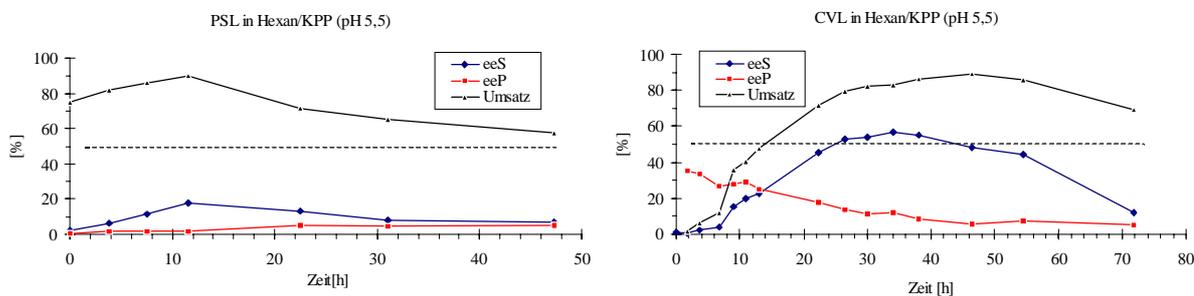


Abb. 7.2: Reaktionsverläufe der lipasekatalysierten Hydrolyse von Sub (1) mit PSL und CVL bei pH 5,5

Für die Enzyme, die nicht 50 % erreichen, werden die Werte für die Reaktionszeit analog zum vorigen Versuch (Kap. 7.1; Tab 7.2) aufgelistet, um so einen Vergleich erzielen zu können.

Enzym	U [%]	Zeit [h]	$ee_S$ [%]	$ee_P$ [%]	E	$U_{Anf}$ [U/ml]	$U_{End}$ [U/ml]
<i>Alcaligenes sp.</i>	50,0	99,8	17,7	18,6	1,7	72,9	13,1
CVL	50,0	14,0	24,2	23,8	2,1	355,2	231,1
Lipozyme	50,0	14,0	22,6	22,0	1,9	43,9	41,7
<i>Porcine pancreas</i>	7,5	67,7	3,0	34,7	2,1	87,1	12,0
PSL	-	8,5	13,1	2,5	1,1	215,2	126,4
Esterase	50,0	7,5	30,1	32,3	2,4	-	-

Tab. 7.3: Ergebnisse der Hydrolyse von Sub (1) in Hexan/KPP (pH 5,5)

In Abb. 7.2 wird im Fall der PSL deutlich, daß aufgrund der Berechnung des Umsatzes über die Enantiomerenüberschüsse (Formel (4.5); Kap. 4.4.3) bei nur geringen  $ee_S$ - und  $ee_P$ -Werten dennoch hohe Umsätze erzielt werden, obwohl dies nicht der Fall ist. Aus diesem Grund wird der Zusatz des Internen Standards um so wichtiger, da der Umsatz anhand der Verhältnisse der Peakflächen Enantiomer/Standard abgeschätzt werden kann. Die Substrat-enantiomere werden nicht selektiv umgesetzt, d. h. der Katalysator arbeitet zwar (bei pH 5,5 weist er eine relative Aktivität von ca. 85% bezogen auf die Maximalaktivität auf [AMANO; 1995]), kann aber nicht mehr zwischen den Enantiomeren unterscheiden. Daher ist der Umsatz in Tab. 7.3 nicht aufgeführt und die dargestellten Werte beziehen sich ebenfalls auf die Reaktionszeit analog zum vorigen Versuch.

Bei der Katalyse mit CVL zeigt sich, daß nach ca. 36 Stunden das Enzym anfängt, auch das nicht bevorzugte R-Enantiomer des Substrats schneller umzusetzen, da das Reaktionsgemisch an S-Enantiomer immer weiter verarmt. Somit sinkt der Umsatz wieder, da der Substratenantiomerenüberschuß nach anfänglicher Zunahme wieder abnimmt. Die

Berechnung des Umsatzes über die Enantiomerenüberschüsse ist also bei nichtselektiven Reaktionen problematisch.

Die höchsten Enantioselektivitäten werden erneut für die CVL und PPL bestimmt. Im Gegensatz zu dem Versuch bei pH 7,6 verkürzt sich bei der CVL die Reaktionszeit bis zu einem 50 %igen Umsatz von 23 auf 14 Stunden bei vergleichbaren Enantiomerenüberschüssen. Interessant ist der Anstieg der Enantioselektivität und der ee-Werte für die Esterase. Obwohl die Reaktionszeit um ca. 6 Stunden zunimmt, scheint das Enzym bei pH 5,5 besser zu arbeiten und wird somit für einen Einsatz in SCCO<sub>2</sub> interessant.

Bei den meisten Enzymen mit Ausnahme des immobilisierten Lipozyme und der CVL sinkt die Aktivität im Reaktionsverlauf bis zu 80 %. Die CVL scheint für die Hydrolyse des Sub (1) in SCCO<sub>2</sub> weiterhin am besten geeignet zu sein, da der Aktivitätsverlust trotz des Einsatzes von nativem Enzym nur 35 % beträgt. Dieses wird im nächsten Abschnitt verifiziert.

### 7.3 Die Hydrolyse in SCCO<sub>2</sub> - „Eintopf-Reaktion“

Für die lipasekatalysierte Reaktion in überkritischem Kohlendioxid wird der in Kap. 4.2.2 beschriebene Aufbau mit integrierter Probenahme verwendet. Das Enzym wird nativ eingesetzt und mit Hilfe der Membran im Reaktionsraum zurückgehalten. Das Volumen des Reaktors ( $V_{\text{ges}} = 66\text{ml}$ ) kann über „Einlegescheiben“ variiert werden. Der Reaktionsraum (inklusive des Kapillarvolumens) kann so auf 42 ml angepaßt werden. Da in den entsprechenden Hexanversuchen (Kap. 7.1 und 7.2) ein Gesamtvolumen von 36 ml vorlag, müssen hier, um einen Vergleich zu gewährleisten, die eingesetzten Mengen erhöht werden. Die Volumenverhältnisse bleiben aber identisch:

- 17,5 ml KPP (0,5 M; pH 7,6)
- 1,15 ml Sub (1)
- 350 mg Enzym
- Rührgeschwindigkeit 800 U/min

Der Puffer wird im Reaktor vorgelegt, dann erfolgt die Enzymzugabe und der Start des Rührers. Nach zwei Minuten werden 0,5 ml der Reaktionslösung für die Aktivitätsmessung abgenommen und das entwendete Volumen mit Pufferlösung aufgefüllt. Daraufhin wird das Substrat zugegeben und somit die Reaktion gestartet. Erst jetzt wird der Reaktor verschlossen, die Pumpe zur Probenahme gestartet und Kohlendioxid zugegeben. Diese Zwei-Phasen-

Reaktion wird im Weiteren als „Eintopf-Reaktion“ betitelt, um diese Art der Reaktionsführung deutlich von späteren Methoden abzuheben.

Durch die lange Reaktionsdauer von über zwei Tagen kann die Zeit zwischen Substratzugabe und Erreichen des überkritischen Zustandes vernachlässigt werden. Pro Versuch werden bis zu zwölf Proben entnommen. Der Reaktionsabbruch erfolgt, sobald mittels GC keine Substratpeaks mehr zu detektieren sind. Die Kohlendioxidphase wird bei der Dekompression vollständig in Hexan eingeleitet und ebenfalls analysiert. Für die Endaktivitätsbestimmung werden 0,5 ml Reaktionslösung entnommen. Auf den Einsatz von PSL wird aufgrund der vorherigen Erkenntnisse verzichtet. Das Ergebnis der Hydrolyse mit CVL ist beispielhaft in Abbildung 7.3 dargestellt, die weiteren in Tab. 7.4. Werden wieder keine 50 % Umsatz erreicht, werden die Werte zu den in Tab. 7.3 aufgelisteten Reaktionszeiten des Hexanversuchs abgelesen. Der Druck liegt in allen Versuchen zwischen 100 und 110 bar (aufgrund der bereits erwähnten Temperatur- und Löslichkeitseffekte konnte er nicht für alle Versuche gleich eingestellt werden).

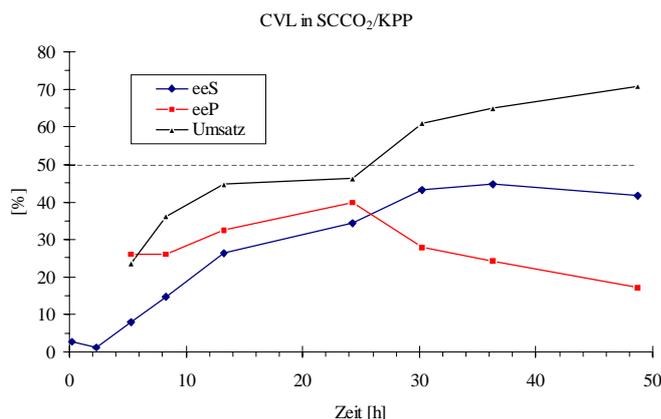


Abb. 7.3: Der Reaktionsverlauf der Hydrolyse mit CVL in SCCO<sub>2</sub>

Enzym	U [%]	Zeit [h]	ee <sub>S</sub> [%]	ee <sub>P</sub> [%]	E	U <sub>Anf</sub> [U/ml]	U <sub>End</sub> [U/ml]
<i>Alcaligenes sp.</i>	-	99,8	3,1	n.d.	-	100,7	18,3
CVL	50,0	28,0	32,7	32,6	2,6	579,1	119,2
Lipozyme	8,6	14,0	2,1	22,0	1,6	17,5	14,8
<i>Porcine pancreas</i>	11,9	67,7	2,6	20,4	1,6	139,8	7,4
Esterase	50,0	35,0	17,9	18,0	1,7	118,4	13,8

Tab. 7.4: Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse des 3-Hydroxy-4-pentensäureethylesters in SCCO<sub>2</sub>; n.d. = nicht detektiert

Nur noch die CVL und die Esterase erreichen in SCCO<sub>2</sub> einen Umsatz von 50 %. Dabei ist für die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* eine mit 2,6 um den Wert 0,5 höhere Enantioselektivität als in Hexan bei pH 5,5 gemessen worden. Demnach liegen auch die

Enantiomerenüberschüsse mit ca. 32,6 % deutlich über den in Hexan erzielten Werten. Die Esterase dagegen weist nur noch einen E-Wert von 1,7 auf, außerdem erhöhte sich die Reaktionszeit von 7,5 in Hexan/KPP (pH 5,5) auf 35 Stunden in SCCO<sub>2</sub>. Das entspricht sogar einer um 33,4 Stunden längeren Reaktionsdauer im System Hexan/KPP (pH 7,6). Auf die Esterase und die restlichen Enzyme scheint sich neben dem pH-Wert deutlich das Lösemittelsystem auszuwirken, da alle keine 50 % Umsatz mehr erreichen. Auch die Aktivität der Enzyme nimmt in SCCO<sub>2</sub> noch einmal ab. Bis auf die CVL und das Lipozyme betragen die Verluste bis zu 90 % und mehr. Der Einfluß des Lösemittelsystems auf die Enzymaktivität wird in späteren Untersuchungen bestätigt.

Aufgrund des Enzymscreenings war eine Vorauswahl der Biokatalysatoren möglich. Weitere Selektionsschritte wurden durch den Einsatz der Enzyme in Hexan/KPP und SCCO<sub>2</sub>/KPP erzielt. Für die weitergehende Optimierung der Hydrolyse und zur Auslegung eines geeigneten Hochdruckverfahrens wird daher nur noch die CVL eingesetzt. Dabei muß beachtet werden, daß von einer Enantiomerentrennung aufgrund einer Biokatalyse noch nicht gesprochen werden kann, da die Enantioselektivitäten nicht zufriedenstellend sind. Dennoch sollen einige weitere Untersuchungen folgen, um die allgemeine Funktionalität des Reaktionssystems zu testen, dieses zu charakterisieren und die Hydrolyse durch gezielte Parametervariation zu optimieren.

## **7.4 Reaktionen mit Lipase aus *Chromobacterium viscosum***

In diesem Kapitel wird ausschließlich die Katalyse der Hydrolyse von Sub (1) mit CVL beschrieben. Zunächst werden einige Vorversuche wie Aktivitätsmessungen in Abhängigkeit von der Temperatur, dem pH-Wert oder dem verwendeten Puffersystem durchgeführt. Anschließend werden verschiedene Versuche zur Reaktionsoptimierung vorgestellt.

### **7.4.1 Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität von CVL**

Lipasen reagieren sehr unterschiedlich auf Temperatur-, pH-Wert- oder Druckänderungen, jedes Enzym zeigt ein anderes Aktivitätsoptimum. Wird die Reaktionstemperatur zu hoch gewählt, kann das Enzym Änderungen in der Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur erleiden und schließlich denaturieren. Das gilt auch für die anderen erwähnten Parameter. Um zu überprüfen, ob die CVL bei der in der Regel in SCCO<sub>2</sub> verwendeten Reaktionstemperatur von

45°C noch ausreichend aktiv ist, wird die Aktivität mit der pH-stat-Methode bei verschiedenen Temperaturen in Doppelbestimmung ermittelt. Für die Hydrolysen in überkritischem CO<sub>2</sub> werden 45°C gewählt, um auf jeden Fall die überkritische Temperatur zu überschreiten, da mit Wärmeverlusten durch die Edelstahlwand des Reaktors zu rechnen ist. Pro Messung werden 2,5 mg Enzym zu 25 ml KPP (pH 8,0; 0,05M) und 1 ml Tricaprylin gegeben. Abbildung 7.4 zeigt die Temperaturabhängigkeit.

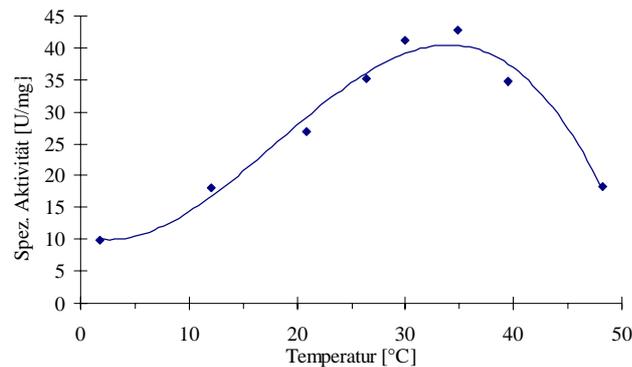


Abb. 7.4: Die Temperaturabhängigkeit der CVL-Aktivität; Mittelwerte aus Doppelbestimmungen

Die CVL hat ihr Aktivitätsmaximum bei 35°C mit 42,8 U/mg Enzym. Bei 45°C liegen noch ca. 24,5 U/mg vor. Für den Einsatz in SCCO<sub>2</sub> wird dieser Wert noch als ausreichend angesehen. Ein Einsatz bei 40°C würde sich anbieten, dieses wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

#### 7.4.2 Die pH-Abhängigkeit der Aktivität von CVL

Analog zu der Temperaturabhängigkeit wird die Aktivität bei verschiedenen Puffer-pH-Werten bestimmt. Das ist insbesondere aufgrund des in SCCO<sub>2</sub> sinkenden pH-Werts des eingesetzten Kaliumphosphatpuffers von Bedeutung. Der Einfluß des pH-Werts beruht auf der Änderung der Ionisation (Ladungsänderung) der Enzymaminoacids bzw. des Enzym-Substrat-Komplexes. Es werden 10 mg Enzym und 50 ml des jeweiligen Puffers eingesetzt [Knüttel; 1999].

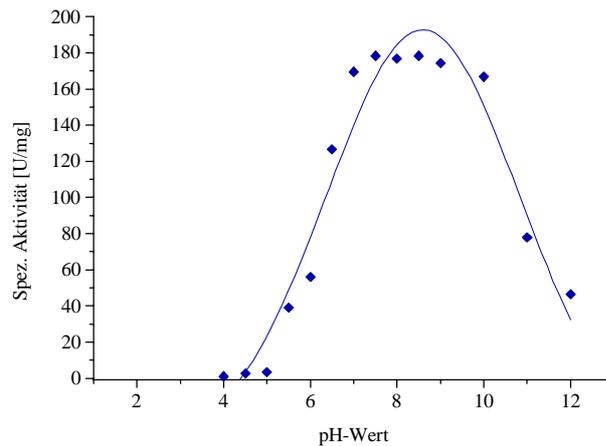


Abb. 7.5: Die Abhängigkeit der CVL-Aktivität vom pH-Wert [Knüttel; 1999]

Abbildung 7.5 zeigt das Aktivitätsmaximum im pH-Bereich zwischen 7,5 und 9 (180 U/mg). Dagegen treten im SCCO<sub>2</sub>-Meßbereich (pH = 5,5 bis 6) Aktivitätsverluste von ca. 72 – 80 % auf, die spezifische Aktivität liegt zwischen 40 bis 50 U/mg.

Obwohl weder die Temperatur noch der pH-Wert nach diesen Aktivitätsbestimmungen für einen Einsatz der CVL in SCCO<sub>2</sub> sprechen, wurde beim ersten Versuch in SCCO<sub>2</sub> (Kap. 7.3) festgestellt, daß eine Reaktion stattfand. Außerdem kann der pH-Wert in überkritischem Kohlendioxid nicht wesentlich beeinflusst werden.

### 7.4.3 Variation des Puffersystems

Die hohen Aktivitätsverluste, die bei allen bisherigen Versuchen auftraten, lassen sich nur zum Teil auf Temperatur- und pH-Effekte zurückführen. [Knüttel; 1998] konnte zeigen, daß die Lipase PS in KPP stark an Aktivität verliert. Dieser Einfluß wird jetzt für die CVL näher bestimmt. In den Versuchen werden 5 mg Lipase in folgenden 0,5 M Puffersystemen eingesetzt:

1. Zitronensäuremonohydrat / Dinatriumhydrogenphosphat (pH 7,8)
2. Kaliumhydrogenphthalat / Natronlauge (pH 5,8)
3. KPP als Referenz (pH 7,6)

Dabei wird in Doppelbestimmung die Aktivität sofort nach der Pufferzugabe, nach einem Tag unter Normalatmosphäre und nach einem Tag in SCCO<sub>2</sub> bei 100 bar ermittelt [Knüttel; 1999].

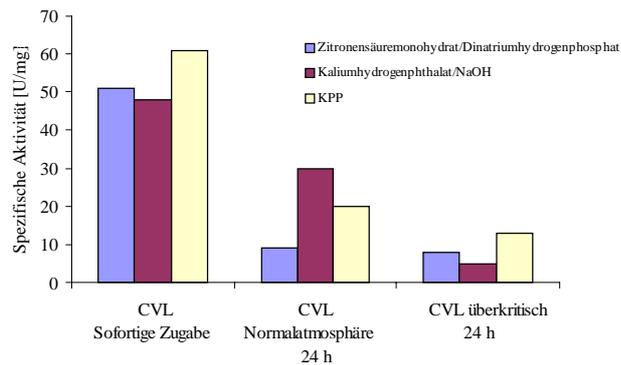


Abb. 7.6: Die Abhängigkeit der CVL-Aktivität vom Puffersystem [Knüttel; 1999]

Aus Abbildung 7.6 wird deutlich, daß die CVL in allen Puffersystemen an Aktivität verliert. Da unter  $\text{SCCO}_2$ -Atmosphäre in KPP die höchsten Werte erzielt werden, wird in diesem Puffersystem weitergearbeitet. Interessant sind die hohen Aktivitäten des Enzyms nach einem Tag in Kaliumhydrogenphthalat / Natronlauge unter Normalatmosphäre. Bei einem pH-Wert von 5,8 zeigte sich in Kap. 7.4.2 bereits ein Aktivitätsverlust in 0,05 M KPP um ca. 44% vom Maximalwert. Daraus folgt, daß auch die eigentliche Aktivitätsabhängigkeit vom pH-Wert direkt vom gewählten Puffersystem beeinflusst wird. In allen folgenden Versuchen wird, wenn nicht anders angegeben, 0,5 M KPP (pH 7,6) eingesetzt.

Im folgenden Kapitel wird der Einfluß des Drucks auf die Aktivität bestimmt.

#### 7.4.4 Die Aktivität der CVL in KPP unter Normal- und $\text{SCCO}_2$ -Atmosphäre

[Rademacher *et al.*; 1999] beschrieben den Aktivitätsverlust von Enzymen durch bevorzugte Dissoziation in Untereinheiten unter Druck. Dieser Zerfall ist abhängig von der räumlichen Struktur des Katalysators. Für die CVL wird ein möglicher Druckeinfluß untersucht. Dazu werden jeweils 5 mg CVL im Trockenschrank bei einer Temperatur von  $45^\circ\text{C}$  für ca. einen Tag wie folgt behandelt:

- Ungelöst unter Normalatmosphäre
- In 1 ml 0,5 M KPP gelöst unter Normalatmosphäre
- Ungelöst unter 100 bar  $\text{SCCO}_2$
- In 1 ml 0,5 M KPP gelöst unter 100 bar  $\text{SCCO}_2$

Als Referenz dient eine native CVL-Probe, die eine halbe Stunde lang im Trockenschrank unter Normalatmosphäre aufbewahrt wird. Abbildung 7.7 stellt das Ergebnis der in Doppelbestimmung ermittelten Aktivität dar. Die Ansätze, bei denen die CVL in Puffer gelöst ist, werden komplett bei der Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

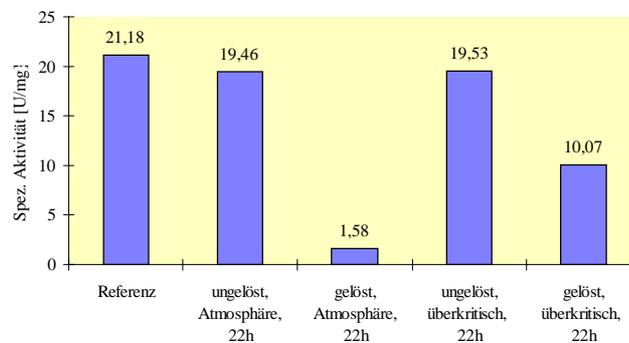


Abb. 7.7: Spezifische Aktivität der CVL in Abhängigkeit vom Druck

Eine Lagerung bei 45°C führt im Rahmen der Meßgenauigkeit weder unter Normalatmosphäre noch unter SCCO<sub>2</sub> zu keinen signifikanten Aktivitätsverlusten (19,46 U/mg und 19,53 U/mg gegen 21,18 U/mg der Referenz). Der bereits beobachtete Aktivitätsverlust in KPP zeigt sich auch bei dieser Untersuchung. Mit 1,58 U/mg liegen nur noch ca. 7 % der Referenzaktivität vor. Dabei fällt dieser Verlust unter SCCO<sub>2</sub> trotz erniedrigten pH-Werts und Druckeinfluß mit ca. 52 % wesentlich geringer aus. Wahrscheinlich führt im letzten Fall die Ausrichtung des Enzyms an der Phasengrenzfläche SCCO<sub>2</sub>/KPP zu einer Stabilisierung des Enzyms über den Versuchszeitraum.

Prinzipiell zeigen alle Aktivitätsuntersuchungen Einbußen bei einem Einsatz der CVL in SCCO<sub>2</sub> durch Temperatur-, pH- und Puffereinfluß, diese führen aber nicht so weit, daß gar keine Katalyse mehr stattfindet. Schließlich wirkt der in SCCO<sub>2</sub> auftretende Stabilisierungseffekt den Verlusten auch teilweise entgegen. Im folgenden werden keine Aktivitäten vor und nach den Versuchen mehr aufgelistet. Sie wurden zwar bestimmt, aber die Verluste waren weiterhin nahezu identisch. [Knüttel; 1998] immobilisierte einige der Lipasen und setzte sie ebenfalls zur Hydrolyse ein. Es zeigten sich geringere Aktivitätseinbußen, allerdings auch längere Reaktionszeiten, geringere Enantiomerenüberschüsse und Enantioselektivitäten. Aufgrund der Möglichkeit, natives Enzym mittels der Membran im Reaktor zurückzuhalten, wird daher weiterhin nur native Lipase eingesetzt.

### 7.4.5 Optimierungsschritt I – Variation der Enzymmenge

In zwei Ansätzen wird der Einfluß der Enzymmenge auf die Hydrolyse in  $\text{SCCO}_2$  bestimmt. Es werden 17,5 ml KPP, 0,6 ml Sub (1) und 350 mg bzw. 600 mg CVL eingesetzt. Beide Versuche werden bei 45°C und ca. 105 bar durchgeführt. In Abbildung 7.8 ist das Ergebnis skizziert.

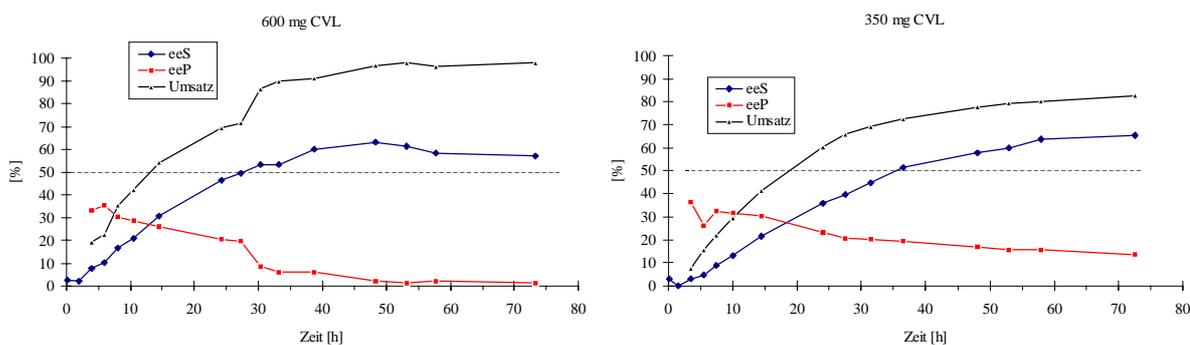


Abb. 7.8: Variation der Enzymmenge bei der Hydrolyse von Sub (1) mit CVL in  $\text{SCCO}_2$

In beiden Fällen werden 50 % Umsatz mit Enantiomerenüberschüssen von 27 bis 28 % nach 14,5 h (600 mg CVL) und 18,71 h (350 mg) erreicht. Auch sind die Enantioselektivitäten mit  $E = 2,2$  identisch. Lediglich zum Reaktionsende nach drei Tagen treten Unterschiede auf. So wird mit 600 mg Enzym 97,8 % Umsatz mit  $ee_S = 57,1$  % und  $ee_P = 1,3$  % erzielt. Mit 350 mg CVL wird die Reaktion bei einem Umsatz von 82,8 % ( $ee_S = 65,5$  % und  $ee_P = 13,6$  %) abgebrochen.

Da sich keine signifikanten Änderungen im Reaktionsverlauf beobachten lassen, wird auf eine weitere Variation der Enzymmenge verzichtet und statt dessen nur noch mit 350 mg CVL weitergearbeitet, da über den gesamten Reaktionsverlauf höhere  $ee_P$ -Werte erzielt worden sind.

Im Vergleich mit dem ersten CVL-Versuch in  $\text{SCCO}_2$  (vgl. Abb. 7.3 Kap. 7.3), bei dem bis auf die Substratmenge ein identischer Ansatz mit 350 mg CVL eingesetzt wurde, sind 50 % Umsatz mit 1,15 ml Substrat erst nach 25,8 h erreicht. Allerdings liegen die Enantiomerenüberschüsse mit ca. 36,6 % und die Enantioselektivität mit einem Wert von 2,6 etwas höher als in diesem Versuch mit 0,6 ml Substrat. Aus diesem Grund soll der Einfluß der Substratmenge weiter untersucht werden.

### 7.4.6 Optimierungsschritt II – Variation der Substratmenge

Es wird in vier weiteren Ansätzen die Substratmenge bei der Hydrolyse von CVL in  $\text{SCCO}_2$  variiert. Es werden jeweils 17,5 ml KPP und 350 mg Enzym eingesetzt. Tabelle 7.5 gibt die Ergebnisse bei 50 % Umsatz wieder. Die Resultate der ersten beiden Versuche mit 350 mg Enzym (Kap. 7.3 und Kap. 7.4.5) sind bei der Auswertung ebenfalls berücksichtigt. Da bei einem Umsatz von 50 % die Enantiomerenüberschüsse für das Substrat und das Produkt identisch sind (vgl. Formel 4.5), wird nur ein ee-Wert genannt. Einen exemplarischen Reaktionsverlauf gibt Abbildung 7.9 wieder.

Substrat [ml]	U [%]	Zeit [h]	ee [%]	E	Druck [bar]
0,10	50,0	20,1	28,2	2,4	112
0,15	50,0	17,8	30,3	2,5	107
0,40	50,0	16,0	28,8	2,3	106
0,60	50,0	18,7	27,3	2,2	105
0,80	50,0	21,3	25,5	2,1	111
1,15	50,0	25,8	36,7	2,6	100

Tab. 7.5: Ergebnisse der Variation der Substratmenge in bezug auf 50 %igen Umsatz

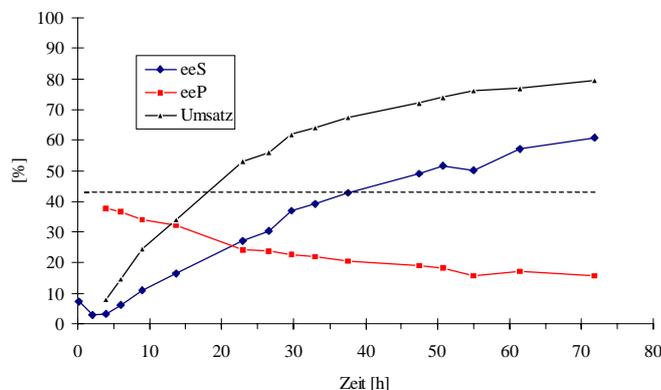


Abb. 7.9: Die enzymatische Hydrolyse mit CVL in  $\text{SCCO}_2$  mit 0,8 ml Substrat

Die Enantioselektivität nimmt mit zunehmender Substratmenge ab. Der Anstieg bei einem Einsatz von 1,15 ml Substrat auf 2,6 läßt sich nicht erklären. Ebenfalls läßt sich mit steigender Substratmenge tendenziell eine längere Reaktionsdauer bis zu 50 % Umsatz erkennen, was auf eine Substrathemmung schließen läßt. Dieses wurde von [Knüttel; 1999] bestätigt.

Insgesamt gesehen zeigen sich zu geringfügige Unterschiede der Ergebnisse, um von einer Optimierung der Hydrolyse zu sprechen. Auch die Enantiomerenüberschüsse zeigen über alle Reaktionsverläufe nur Werte bis zu maximal 80 %, so daß weder ein Substrat- noch ein Produktenantiomer rein dargestellt werden kann. Daher erfolgen keine weiteren

Optimierungsversuche. Lediglich das Substrat selbst wird in Kettenlänge und Esterfunktion variiert. Zunächst soll aber noch eine andere Reaktionsführung mit einem neu konstruierten Reaktor untersucht werden, um zu prüfen, ob diese prinzipiell für enzymatische Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid geeignet ist.

### 7.5 Die Hydrolyse im „Source-Trap-Reaktor“

[Tservistas; 1997] etablierte für Reaktionen in  $\text{SCCO}_2$  die sogenannte Source-Trap-Methode. Dabei wird das Substrat in einem Gefäß (Source = Quelle) innerhalb des Hochdruckreaktors plaziert. Dieses kann rein oder auch in Wasser oder einem organischen Solvens gelöst vorliegen. Aufgrund der außergewöhnlichen Stofftransporteigenschaften des  $\text{SCCO}_2$  kann die überkritische Phase als Trenn- und Transportmedium eingesetzt werden. Das Substrat löst sich in  $\text{SCCO}_2$  und wird so aus dem Source-Gefäß von unlöslichen Bestandteilen wie Verunreinigungen oder Lösemittel extrahiert. Über die überkritische Phase wird das Substrat zu einem zweiten Gefäß (Trap = Falle) befördert. In diesem ist das Enzym in der Pufferphase gelöst. Es erfolgt letztendlich eine Katalyse an der Phasengrenzfläche  $\text{SCCO}_2/\text{KPP}$ . So läßt sich leicht die Reaktion mit einer Separation verknüpfen. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Source-Trap-Reaktionen wurde ein neuer Reaktor konstruiert, um nicht mehr mit zusätzlichen Glasgefäßen, die als Source und Trap dienten [Tservistas; 1997], zu arbeiten (Abbildung. 7.10).

Das Gesamtvolumen des in drei Kammern aufgeteilten Reaktors beträgt 108 ml. Die Source weist ein Volumen von 10 ml und die Trap von 65 ml auf. Beide sind direkt aus dem Reaktorkörper gebohrt wurden, so daß eine Edelstahlwand die räumliche Trennung gewährleistet. Das restliche Volumen (die dritte Kammer) über der Source und der Trap beträgt 43 ml. Der Reaktor wird ebenfalls über sechs Schrauben verschlossen, was eine freie Wahl der Deckel gewährleistet.

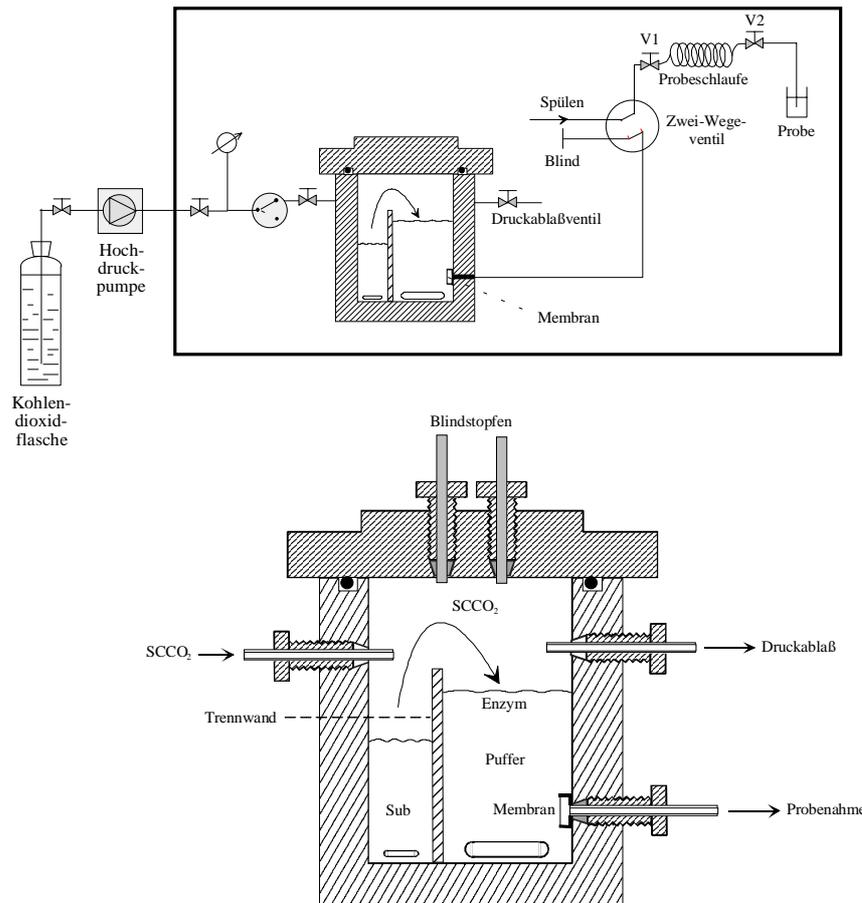


Abb. 7.10: Der schematische Aufbau der Anlage inkl. Source-Trap-Reaktor

Bei den folgenden Untersuchungen wird das Substrat bereits aufgereinigt in das Source-Gefäß vorgelegt, da der Prozeß lediglich auf Funktionalität geprüft werden soll. Die Probenahme erfolgt wieder aus der wäßrigen Phase des Trap-Reaktionsraums, allerdings werden die Proben nicht mittels einer Pumpe entnommen. Im Reaktor ist eine Kapillare mit einer Membran an der Seitenwand plaziert worden. Diese führt zu einem 2-Wege-Ventil. In der Grundstellung erfolgt die Abdichtung über einen Blindstopfen. Zur Probenahme wird das Ventil umgelegt, und ein definiertes Volumen von 200 µl strömt in die Probeschleife. Das Nadelventil V1 wird geschlossen, das 2-Wege-Ventil wird wieder umgelegt und die Probe durch vorsichtiges Öffnen des Nadelventils V2 entnommen. Nach Öffnen von V1 wird die Schlaufe mit KPP definierten Volumens und Sauerstoff gespült und mit der Probe vereinigt. Das Kapillarvolumen zwischen Reaktor und 2-Wege-Ventil ist klein gehalten, um die Fehler durch etwaige Reste der vorangegangenen Probe zu minimieren. Ein Nachteil dieser Methode ist die mit jeder Probe zunehmende Verringerung des Puffervolumens innerhalb des Reaktors. Daher wird in späteren Untersuchungen auch hier die „kontinuierliche“ Probenahme über die HPLC-Pumpe verwendet.

Ein Vorteil der Source-Trap-Methode ist ein definierter Startzeitpunkt. Erst wenn der überkritische Zustand erreicht ist, wird die Reaktion durch den Transport des Substrats zur Pufferphase möglich. Daher bezieht sich  $t = 0$  in allen Source-Trap-Ansätzen auf das Erreichen des überkritischen Zustands.

Es wird folgender Ansatz durchgeführt: 0,4 ml Sub (1) werden in die Source, 17,5 ml KPP und 350 mg CVL in die Trap gegeben. Der Druck beträgt 110 bar. Abbildung 7.11 zeigt das Ergebnis.

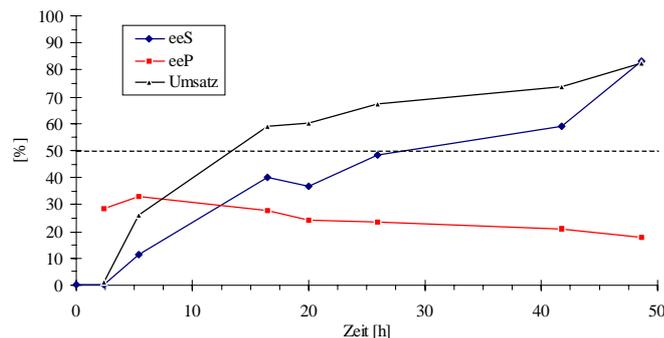


Abb. 7.11: Source-Trap-Hydrolyse mit der CVL

Die räumliche Trennung von Substrat und Enzym hat keinen Einfluß auf die Hydrolyse. Nachdem sich das Substrat in  $\text{SCCO}_2$  gelöst hat, wird es zu der wäßrigen KPP-Phase transportiert und umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion kann das in Kohlendioxid angereicherte Substrat durch Ablassen des  $\text{CO}_2$  extrahiert, die Säure aus der Wasserphase gewonnen und eventuelle unlösliche Verunreinigungen aus der Source entfernt werden. So ist es möglich, in einem Schritt eine Aufreinigung, eine Separation und die Reaktion durchzuführen.

Der 50 %ige Umsatz wird nach 12,5 h mit Enantiomerenüberschüssen von 29,6 und einer Enantioselektivität von 2,5 erreicht. Bei der analogen „Eintopf-Reaktion“ (Kap. 7.4.6) werden nahezu identische Werte erzielt. Die CVL zeigte dort nach 16 h 50 % Umsatz ( $ee = 28,8\%$  und  $E = 2,3$ ). In diesem Fall ist die Reaktion im Source-Trap-Reaktor sogar schneller, obwohl der Transportprozeß langwierig ist, da erst nach ca. zwei Stunden Substrat und Produkt gefunden werden. Auch hier wird auf weitere Versuche verzichtet, da die Enantioselektivität und die Enantiomerenüberschüsse zu gering sind.

## 7.6 Variation der Kettenlänge und der Esterfunktion

Im Rahmen ihrer Diplomarbeit setzte [Becker; 1998] drei weitere aliphatische Substrate ein, die mit Sub (1) strukturell verwandt sind. Abbildung 7.12 stellt diese ebenfalls vom Institut für Organische Chemie der Universität Hannover synthetisierten Verbindungen und ihre Bezeichnung dar:

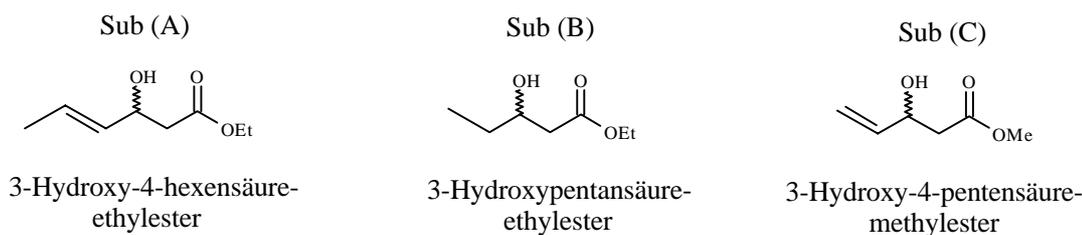


Abb. 7.12: Verwendete Substrate zum Vergleich der Kettenlänge und Esterfunktion [Becker; 1998]

Für alle Substrate erfolgte analog zu dieser Arbeit ein Enzymscreening und der Einsatz in Hexan und  $\text{SCCO}_2$ . Dabei ist ein interessantes Ergebnis hervorzuheben, denn die CVL erzielt im Vergleich zu Sub (1) mit (A), (B) und (C) nur geringe  $ee_S$ - und  $ee_P$ -Werte erzielt. Für geeignet wurde in allen Fällen die Lipase B (H&R) befunden, sie setzte den Hexensäureester innerhalb von 22 h bei einem  $ee_S$ -Wert von 97,1 % um. Im Fall von Sub (1) zeigte diese Lipase dagegen nach 22,6 h nur einen  $ee_S$ -Wert von 46,5 %.

In  $\text{SCCO}_2$  werden für den Hexensäureethylester Enantioselektivitäten von 1,7 (Lipase PS), 4,8 (Lipase B) und 5,4 (PPL) erreicht. In allen Fällen liegt in Hexan die Enantioselektivität noch höher, so wurde sie zu 33,3 mit PPL bestimmt. Für den Methylester wird in Hexan eine Enantioselektivität von 3,0 mit der Lipase AY von Amano erzielt. [Herar; 1995] stellte für lipasekatalysierte Umesterungen von 3-Hydroxyestern dagegen fest, daß Methylester schneller und mit höheren Enantiomerenüberschüssen umgesetzt werden.

Die Lipasen zeigen demnach eine ausgeprägte Substratspezifität, schon eine Kettenverlängerung um ein C-Atom oder die Variation der Estergruppe bewirkt eine deutliche Änderung im Reaktionsverlauf. Außerdem wird der gesättigte Hydroxypentansäureethylester kaum umgesetzt. Allerdings sind auch hier die Enantioselektivitäten mit maximal 5,4 nicht zufriedenstellend. Die lipasekatalysierte Hydrolyse kurzkettiger aliphatischer Ester in  $\text{SCCO}_2$  zeigt demnach nur moderate Enantioselektivität. Daher soll jetzt das aromatische Substrat untersucht werden.

## 8 Die enzymatische Hydrolyse von 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester

Auf ein Enzymscreening analog zu Sub (1) wird im Falle des Sub (2) verzichtet. Alle Experimente werden mit den *Porcine pancreas* -, *Chromobacterium viscosum* - und *Pseudomonas cepacia* Lipasen durchgeführt. Für die Hydrolyse dieser Enzyme in konventionellen organischen Medien liegen bereits Literaturdaten vor, hier wird eine potentielle Reaktion vorausgesetzt [Voß; 1990]. Außerdem wird die PSL gewählt, da sie in zahlreichen Um- und Veresterungsreaktionen aromatischer Substrate bereits eingesetzt wird [AMANO; 1995].

Nur für die PPL werden noch einige Versuche in Hexan durchgeführt, um einen direkten Vergleich der Lösemittel unter identischen Bedingungen zu gewährleisten. Die bekannten Literaturdaten unterscheiden sich in den eingesetzten Konzentrationen und in der Reaktionsführung.

Alle drei Enzyme setzen bevorzugt das S-Enantiomer des Substrats um.

### 8.1 Die enzymatische Katalyse von Sub (2) mit CVL

Zunächst soll die Hydrolyse von Sub (2) in SCCO<sub>2</sub> mit der bereits bekannten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* untersucht werden (vgl. Kap. 7.4). Das Substrat ist bei Raumtemperatur fest, wird aber bei ca. 40°C flüssig. In einem Vorversuch wurden 500 mg CVL, 150 mg Sub (2) und 20 ml KPP (0,5 M; pH 7,6) eingesetzt. Bei 150 bar wurde eine Enantioselektivität von 16,1 bestimmt. Der Umsatz betrug 60,7 % bei einem ee<sub>S</sub>-Wert von 96,2 und einem ee<sub>P</sub>-Wert von 62,2 %. Es wurden bei diesem Versuch keine Proben entnommen, d. h. der Reaktor wurde befüllt, unter Druck gesetzt und nach einer willkürlich bestimmten Reaktionszeit von 165 h dekomprimiert. Dabei wurde die SCCO<sub>2</sub>-Phase aufgefangen und ebenso wie eine aufgearbeitete Probe aus der KPP-Phase analysiert. Der hohe Druck ist mit Temperatur- und Löslichkeitseffekten zu erklären.

Da eine wesentlich bessere Katalyse als mit Sub (1) stattfand, wird die CVL nochmals in einer weiteren Eintopf-Reaktion in SCCO<sub>2</sub> eingesetzt. Bei diesem Versuch wird der Reaktionsverlauf durch die Entnahme mehrerer Proben verfolgt. Um das Ergebnis des Vorversuchs zu verifizieren, werden dieselben Mengen bei einer Rührgeschwindigkeit von 800 U/min eingesetzt. Abbildung 8.1 stellt das Ergebnis dar.

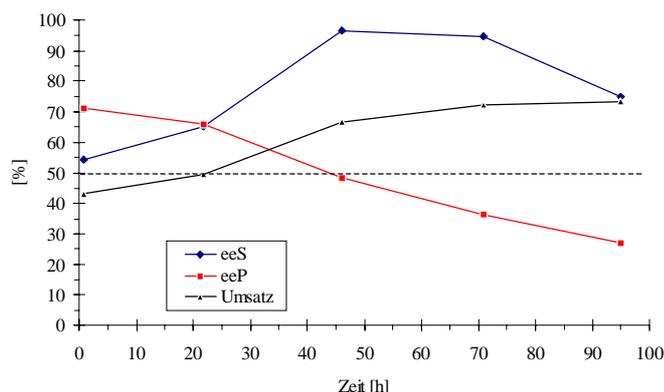


Abb. 8.1: Die Hydrolyse von Sub (2) mit CVL in  $\text{SCCO}_2$

Nach 22,4 h werden 50 % Umsatz bei Enantiomerenüberschüssen von ca. 65 % erreicht. Die Enantioselektivität beträgt 10,6. Nach 95 h muß der Versuch abgebrochen werden, da keine Substratpeakauswertung mehr möglich war. Da die  $ee_S$ -Werte zunächst ansteigen, wird ein Enantiomer bevorzugt umgesetzt. Daß aber bereits auch das R-Enantiomer umgesetzt wird, zeigen die fallenden  $ee_P$ -Werte. Nach 46 h wird der Maximalwert mit 96,5 %  $ee_S$  erreicht. Danach ist das Reaktionsgemisch an S-Substratenantiomer verarmt, das Verhältnis der Peaks gleicht sich aufgrund bereits umgesetzten S-Enantiomers an und der  $ee_S$ -Wert fällt.

Im Gegensatz zum Vorversuch wird eine geringere Enantioselektivität erzielt, was mit weniger gelöstem Substrat in der  $\text{SCCO}_2$ -Phase bei 110 bar zusammenhängen kann. Die Löslichkeit von Sub (2) wird noch genauer in Kap 10.3.2.1 untersucht.

## 8.2 Die enzymatische Katalyse von Sub (2) mit PPL

Zunächst soll das Aktivitätsverhalten dieser Lipase analog zur CVL in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert beschrieben werden. Danach werden verschiedene Reaktionen in Hexan und Kohlendioxid untersucht.

### 8.2.1 Die Abhängigkeit der PPL-Aktivität von der Temperatur und dem pH-Wert

Die Abhängigkeit der Aktivität von den einzelnen Parametern wird für 100 mg Enzym mit Hilfe der pH-Stat-Methode per Doppelbestimmung ermittelt. Im Falle der Temperaturvariation wird 0,05 M KPP mit einem pH-Wert von 8 eingesetzt. Die pH-

Aktivitätsmessungen erfolgen daraufhin bei einer Temperatur von 45°C, entsprechend den Versuchsbedingungen in SCCO<sub>2</sub>. Die Abbildung 8.2 verdeutlicht das Ergebnis.

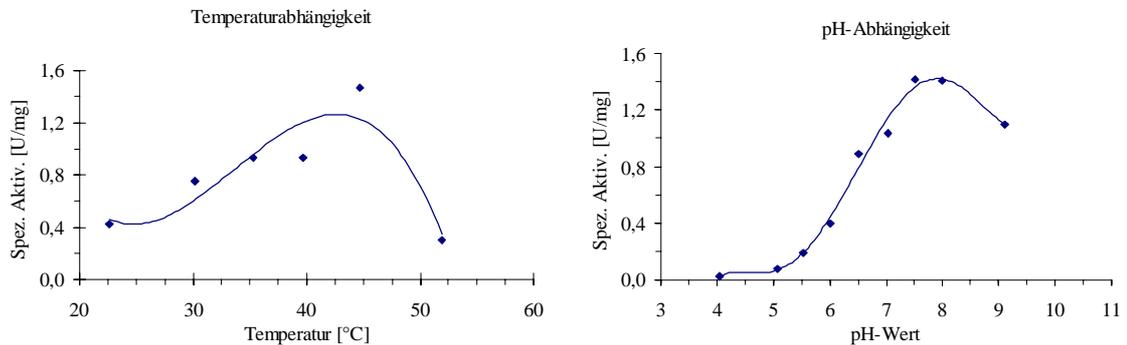


Abb. 8.2: Die Abhängigkeit der PPL-Aktivität von ausgewählten Parametern

Die PPL weist ihre höchste spezifische Aktivität im Bereich um 45°C auf. Dagegen ist sie im pH-Bereich zwischen 5 und 6 ausgesprochen gering, dort erreicht sie mit ca. 0,20 U/mg nur noch 13,4 % ihres Maximalwerts von 1,42 U/mg (pH 7,5). Auf einen Einsatz in SCCO<sub>2</sub> wird dennoch nicht verzichtet, da die Lipase bei 45°C sehr aktiv ist. Eventuell kompensiert dieser Effekt den Aktivitätsverlust aufgrund des niedrigen pH-Werts.

Der Druck sollte in den entsprechenden Versuchen nicht zu hoch gewählt werden, um den in SCCO<sub>2</sub> auftretenden pH-Shift gering zu halten und dadurch eine höhere Aktivität zu erzielen. Dagegen spricht dann allerdings die geringere Substratlöslichkeit in Kohlendioxid. Es wird hier sehr deutlich, daß die enzymatische Hydrolyse in SCCO<sub>2</sub> von vielfältigen Parametern abhängig und eine Vorhersage optimaler Reaktionsbedingungen äußerst schwierig ist. Um z. B. die oben erwähnten gegenläufigen Temperatur- und pH-Wert-Effekte näher zu beschreiben, wird in den folgenden Hexanversuchen die Hydrolyse den Reaktionsbedingungen in Kohlendioxid sukzessive angenähert.

### 8.2.2 Die Katalyse in Hexan

Es werden drei Meßreihen durchgeführt. Dabei werden identische Mengenverhältnisse verwendet und jeweils mehrere Proben aus der Hexan- und der KPP-Phase entnommen:

- 5 ml Hexan
- 4 ml KPP (0,5M)
- 200 mg Sub (2)
- 75 mg PPL

Der erste Ansatz erfolgt bei 24°C und pH 7,6. Im zweiten Fall wird der pH-Wert auf 5,5 erniedrigt. Der letzte Versuch wird dann bei 45°C und pH 5,5 durchgeführt. Die Reaktionsverläufe sind in Abbildung 8.3 dargestellt.

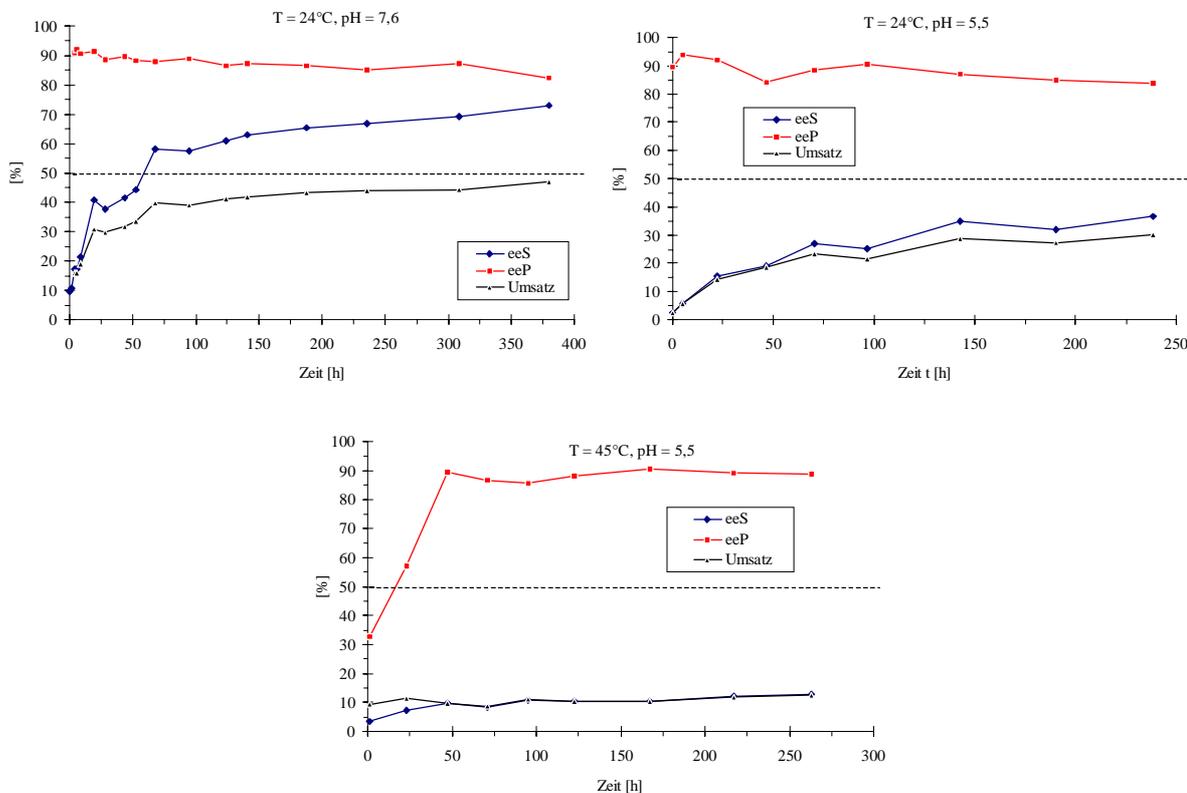


Abb. 8.3: Die Hydrolyse in Hexan bei verschiedenen Reaktionsbedingungen

Es zeigen sich sehr deutliche Unterschiede in den Reaktionsverläufen, die sich bei gleichen Ansätzen nur aufgrund differenter Aktivitäten bzw. Stabilitäten des Enzyms erklären lassen. In allen drei Fällen wird niemals 50 % Umsatz erreicht. Zur Beschreibung der Ergebnisse werden in Tabelle 8.1 neben den jeweils maximalen auch alle Werte nach 200 h Reaktionszeit, die willkürlich gewählt ist, aufgelistet.

Ansatz	Zeit [h]	ee <sub>S</sub> [%]	ee <sub>P</sub> [%]	U [%]	E <sup>MAX</sup>	ee <sub>S</sub> <sup>MAX</sup> [%]	ee <sub>P</sub> <sup>MAX</sup> [%]
T = 24°C, pH 7,6	200	65,9	85,8	43,5	30,7	72,9	92,1
T = 24°C, pH 5,5	200	32,3	84,2	28,6	25,9	36,8	93,7
T = 45°C, pH 5,5	200	11,5	89,9	12,0	22,6	12,9	90,7

Tab. 8.1: Ergebnisse der enzymatischen Katalyse des Sub (2) mit PPL in Hexan

Die Enantioselektivitäten bleiben über den gesamten Reaktionsverlauf nicht konstant, daher sind in Tabelle 8.1 die Maximalwerte beschrieben. Bei allen Ansätzen schwankt der Wert um ca. 5 – 7 Einheiten.

Entgegen der Vermutung, daß sich die Temperatur- und pH-Effekte im dritten Ansatz kompensieren, werden hier die geringsten Werte für Enantioselektivität, Umsatz und Enantiomerenüberschüsse erzielt. Die eindeutig besten Ergebnisse liefert der erste Ansatz. In allen Versuchen sind die Produktenantiomerenüberschüsse des S-Enantiomers mit  $\geq 80\%$  sehr hoch. Daraus folgt, daß trotz der geänderten Reaktionsbedingungen weiterhin das S-Enantiomer bevorzugt umgesetzt wird, und die Enantioselektivität im Rahmen der Bestimmungsgenauigkeit nur sehr wenig absinkt. Das spiegeln die einzelnen Werte von  $E = 22,6$  bis  $E = 30,7$  wieder. Unter anspruchsvolleren Versuchsbedingungen ( $T = 45^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,5$ ) für das Enzym nimmt hier hauptsächlich die Reaktionsgeschwindigkeit und kaum die Selektivität ab.

Mit der PPL werden noch einige Versuche in  $\text{SCCO}_2$  durchgeführt, um die Medien direkt zu vergleichen. Diese sind im nächsten Kapitel beschrieben.

### 8.2.3 Die Katalyse in $\text{SCCO}_2$

In mehreren Versuchen werden unterschiedliche Mengen an Puffer, Enzym und Substrat eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.2 beschrieben. Aus Gründen der langen Reaktionszeit und der zu erwartenden geringen Enantioselektivität werden bis auf die letzten beiden „Eintopf-Reaktionen“ (Ansatz 4) und 5)) alle anderen willkürlich abgebrochen und das Reaktionsgemisch analysiert. Um einen Vergleich der Reaktionszeiten mit den Ansätzen 1) bis 3) zu erzielen, werden für 4) und 5) mehrere Proben entnommen. Auf die graphische Darstellung des Reaktionsverlaufs soll aber verzichtet werden. Die Ansätze 6) und 7) sind Source-Trap-Versuche, bei Ansatz 8) wird auf VA-Epoxy immobilisierte PPL verwendet [Anhang Kap.13.5]. In der Tabelle werden für die Ansätze mit mehreren Proben jeweils die für alle Größen erzielten Maximalwerte dargestellt. Die angegebene Zeit ist die gesamte Reaktionsdauer.

Ansatz	KPP [ml]	SUB (2) [mg]	PPL [mg]	t [h]	ee <sub>s</sub> [%]	ee <sub>p</sub> [%]	U [%]	E	p [bar]
1	40	300	200	208,00	0,6	80,6	0,7	9,3	106
2	10	150	500	165,00	13,2	89,8	12,9	21,1	100
3	20	150	500	188,25	8,1	81,9	9,0	10,9	130
4 <sup>m.P.</sup>	15	300	300	212,25	12,4	68,4	19,5	5,5	107
5 <sup>m.P.</sup>	35	300	500	238,50	20,8	69,2	23,1	6,7	106
6 <sup>S-T</sup>	10	150	500	166,25	15,5	85,9	15,3	15,3	99
7 <sup>S-T</sup>	10	130	500	146,00	11,65	87,8	11,7	17,3	98
8 <sup>Immobilisat</sup>	10	150	700	144,00	23,61	81,0	22,6	12,0	99

Tab. 8.2: Die Ergebnisse der Hydrolyse mit PPL in SCCO<sub>2</sub>; m. P. = mehrere Proben; S-T = Source-Trap; Immobilisat = Enzymimmobilisat

In allen Versuchen wird trotz Variation der eingesetzten Mengen nur in Ansatz 2) annähernd die Enantioselektivität des Hexanversuchs bei 45°C und pH 5,5 mit 21,1 (statt 22,6) erreicht. In diesen Untersuchungen werden extrem geringe Enantioselektivitäten erzielt, sobald das Enzym-Substrat-Verhältnis gleich oder kleiner 1 ist (Ansätze 1) und 4)). Bei den Reaktionen in Hexan betrug das Verhältnis 1 : 2,7. In allen Fällen werden hohe Produkt-enantiomerenüberschüsse und geringe Substratenantiomerenüberschüsse erzielt, die mit den Ergebnissen in Hexan vergleichbar sind. Die Versuche 6) bis 8) sowie Ansatz 2) erreichen die höchsten Enantioselektivitäten. Diesen vier Experimenten ist eine geringe Puffermenge bei großem Enzym-Substratverhältnis (3,6 : 1 bis 4,6 : 1) gemeinsam. Das deutet neben dem pH-Wert auf weitere inaktivierende Einflüsse von SCCO<sub>2</sub> auf die PPL hin. Das in diesen Fällen eine Substrathemmung der ausschlaggebende Faktor ist, widerlegt das Ergebnis des Hexanversuchs, da dort trotz einer fast dreimal so hohen Menge an Substrat moderate Enantioselektivitäten erzielt werden konnten. Hier wäre eine unter Druck auftretende Carbamatbildung am Enzym zu diskutieren. CO<sub>2</sub> ist in der Lage, mit freien Aminogruppen an der Enzymoberfläche zu reagieren. Die folgende Konformationänderung des Enzyms kann durchaus zu einer Hemmung führen (vgl. Kap. 8.3.1). Für weitere Optimierungsversuche ist diese Lipase aufgrund dieser Ergebnisse und der langen Reaktionsdauer somit nicht geeignet.

### 8.3 Die enzymatische Katalyse von Sub (2) mit PSL

Als letztes Enzym wird die *Pseudomonas cepacia* Lipase untersucht. In Hexan zeigten sich in analogen Vorversuchen zu denen mit der PPL auch bei 45°C und pH 5,5 Enantioselektivitäten von 35 bis 45 bei 50 % Umsatz und Enantiomerenüberschüsse von über 80 %. Somit ist die

PSL ein geeignetes Enzym für den Einsatz in  $\text{SCCO}_2$ . Zunächst werden aber für diesen Biokatalysator wieder verschiedene Aktivitätstests durchgeführt.

### 8.3.1 Die Aktivität der PSL in Abhängigkeit der Temperatur, des pH-Werts und des Drucks

Zur Bestimmung der Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit wurden 30 mg Enzym eingesetzt. Die Aktivität wurde erneut in Doppelbestimmung mit der pH-Stat-Methode bestimmt [Knüttel; 1998]. In Abbildung 8.4 ist das Ergebnis dargestellt.

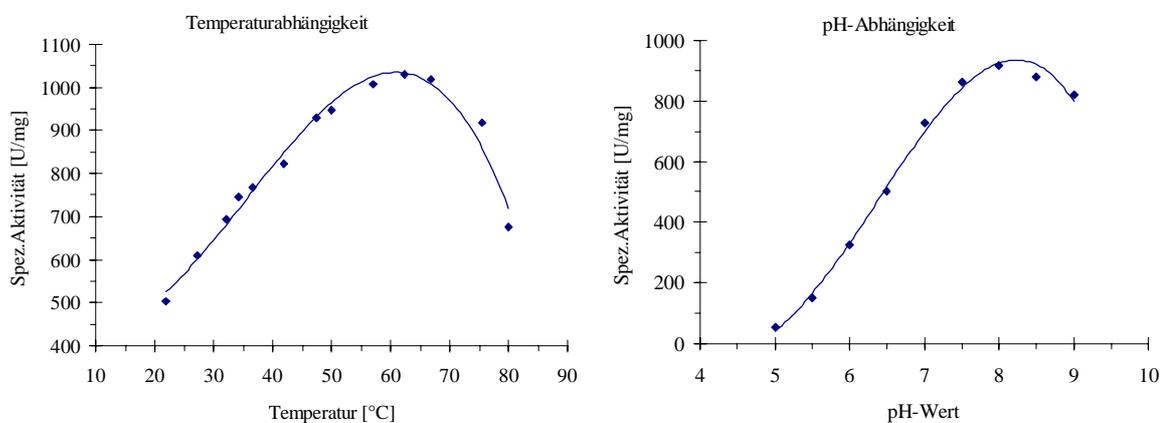


Abb. 8.4: Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der PSL von der Temperatur und dem pH-Wert [Knüttel; 1998]

Entsprechend der CVL und der PPL zeigen sich bei 45°C ausreichend hohe Aktivitäten. Der Maximalwert wird bei 62°C mit 1030 U/mg erzielt. Bei 45°C liegen noch ca. 850 U/mg vor. Der Einfluß des pH-Werts ist auch für diese Lipase höher. Bei pH 5,5 liegen nur noch 149 U/mg vor, entsprechend 16,25 % vom Maximalwert bei pH = 8 mit 916 U/mg. [AMANO; 1995] gibt dagegen für die PSL ein Temperaturoptimum von 50°C und den optimalen pH-Wert mit 6 an. Die Unterschiede machen deutlich, daß wahrscheinlich in beiden Fällen andere Versuchsbedingungen gewählt worden sind. Es liegt nahe, daß bei den Messungen von AMANO ein anderes Substrat als Tricaprylin eingesetzt worden ist und sich somit andere Optima ergeben (das Substrat wird in [AMANO; 1995] nicht angegeben).

Zur Untersuchung der Druckabhängigkeit werden vier Enzympräparate (50 mg) vorbereitet und die Aktivität anschließend in Doppelbestimmungen ermittelt:

- 30 Minuten bei 45°C, Normalatmosphäre (Referenz)
- 20 h bei 45°C, Normalatmosphäre
- 20 h bei 45°C unter 100 bar SCCO<sub>2</sub>
- 20 h bei 45°C unter 150 bar SCCO<sub>2</sub>

Das Ergebnis ist in Abbildung 8.5 dargestellt.

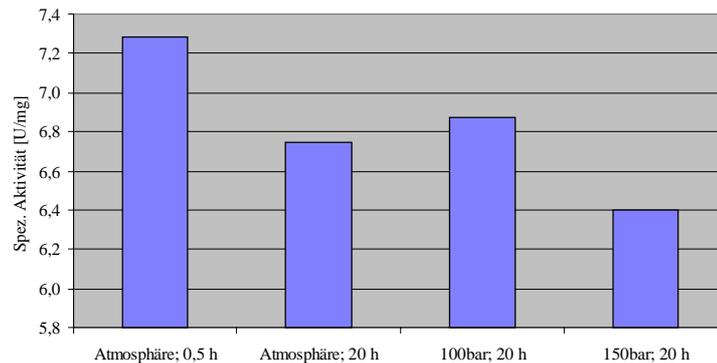


Abb. 8.5: Die Druckabhängigkeit der spezifischen PSL-Aktivität

Insgesamt führt eine längerfristige Aufbewahrung des Enzyms bei 45°C nur zu geringen Einbußen in der Aktivität. Im Vergleich zu der Referenzprobe mit 7,3 U/mg ist die Aktivität nach 24 h auf 6,7 U/mg abgesunken. Bei 100 bar werden 6,9 U/mg und bei 150 bar 6,4 U/mg gemessen. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ist hier kein großer irreversibler Aktivitätsverlust durch höhere Drücke für die PSL zu beobachten. Eine reversible Konformationsänderung durch Carbamatbildung oder direkt durch den Druck (vgl. Kap. 7.4.4 [Rademacher *et al.*; 1999]) wäre mit dieser Methode nicht feststellbar.

[Kamat *et al.*; 1995 (II)] fanden eine reversible Inaktivierung einiger Enzyme in SCCO<sub>2</sub>. Sie stellten eine These vor, in der freie Aminogruppen an der Enzymoberfläche mit Kohlendioxid kovalente Komplexe bilden, die z. B. an Lysinresten zu Ladungsverschiebungen führen können. Diese Komplexe bzw. der „Ladungsshift“ führen zur Inhibierung. Die Carbamatbildung ist reversibel und hängt direkt von der Enzymstruktur bzw. den auf der Oberfläche exponierten Aminosäuren, dem pH-Wert, der Temperatur und vom Wassergehalt ab. Dabei wirken die Effekte sich teilweise entgegen, die Carbamatbildung wird bei hohen Temperaturen erschwert, allerdings mit steigendem pH-Wert und Wassergehalt erleichtert. Da die Aktivität auch ohne den Einfluß des Kohlendioxids direkt von diesen Parametern abhängt, ist eine Vorhersage, ob eine Carbamatbildung und dadurch bedingte Inhibierung auftritt, sehr schwierig. Der sinnvollste Weg ist, die Parameter einzeln zu variieren und das so veränderte

Reaktionsverhalten zu studieren. Vielversprechend ist für die PSL-katalysierte Hydrolyse eine Temperaturerhöhung auch wegen der festgestellten gesteigerten Aktivität bei Temperaturen über 45°C. Weiterhin sollte der Druck aufgrund des geänderten Löslichkeitsverhaltens des Substrats und der wahrscheinlich bei höheren Drücken bevorzugten Carbamatbildung variiert werden.

### 8.3.2 „Eintopf-Reaktionen“ mit PSL

Zunächst wird in einem Einzelversuch bei 102 bar, bei dem 20 ml KPP, 200 mg PSL und 150 mg Sub (2) eingesetzt worden sind, die Enantioselektivität nach 168,5 h bestimmt. Die Probe wird nach Dekompression aus der KPP-Phase entnommen. Die Zeit wird willkürlich festgelegt und bezieht sich auf die Versuche mit der PPL, die alle zwischen 140 und 200 Stunden beendet wurden. Es wird eine geringe Enantioselektivität von 4,9 bei 71,54 % Umsatz und Enantiomerenüberschüssen von 96,6 % für das Substrat und 33,6 % für das Produkt erzielt. Der weit über 50 % liegende Umsatz und der geringe Wert für  $ee_p$  legen die Vermutung nahe, daß die Reaktion bereits zu weit fortgeschritten ist. Aufgrund des aber immer noch sehr hoch liegenden Substratenantiomerenüberschusses wird trotz der geringen Enantioselektivität ein neuer Ansatz mit „kontinuierlicher“ Probenahme durchgeführt, um möglichst den kompletten Reaktionsverlauf zu erfassen. Allerdings wird ein anderer Ansatz gewählt. Statt 200 mg werden 500 mg PSL eingesetzt. Ein erhöhtes Enzym-Substrat-Verhältnis in den entsprechenden PPL-Versuchen zeigte einen direkten Einfluß auf die Katalyse. Für Umesterungsreaktionen mit dem entsprechenden Methylester des hier verwendeten Substrats in konventionellen organischen Medien fand [Herar; 1995] außerdem ein ähnliches Ergebnis heraus. Es wurden die besten Ergebnisse für Enzym-Substrat-Verhältnisse zwischen 2 : 1 bis 3 : 1 erzielt. Eine weitere Erhöhung brachte keine Verbesserung mehr ein. Der Reaktionsverlauf wird in Abbildung 8.6 wiedergegeben.

Bereits nach ca. 15,5 h beträgt der Umsatz 50 %. Für alle untersuchten Enzyme und Substrate wird hier die schnellste Reaktionszeit beobachtet. Auch werden die bis jetzt höchsten Enantiomerenüberschüsse ( $ee = 83 \%$ ) und die beste Enantioselektivität ( $E \approx 40$ ) für eine Hydrolyse in überkritischem Kohlendioxid erzielt.

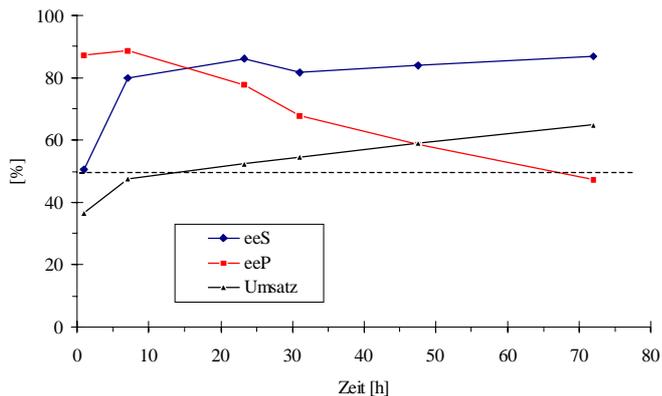


Abb. 8.6: PSL in SCCO<sub>2</sub>, 500 mg Enzym und 150 mg Sub (2)

Zunächst bleibt die Enantioselektivität über den Reaktionsverlauf annähernd konstant. Nachdem allerdings 50 %iger Umsatz erreicht worden ist, fällt sie kontinuierlich auf einen Wert von 7 bei Reaktionsabbruch ab. Nach Erreichen eines Substratenantiomerenüberschusses von 83 % bleibt dieser Wert über den gesamten Zeitraum gleich. Dagegen fällt der Wert für den Produktenantiomerenüberschuß von anfangs 88,5 % auf letztendlich 47 % ab. Da  $ee_S$  konstant bleibt,  $ee_P$  aber abnimmt, erklärt sich nach Formel (4.4) der fallende Wert für die Enantioselektivität. Anscheinend wird für das Substrat eine Sättigung der aktiven Zentren des Enzyms erreicht (Substrathemmung), da kein weiterer Umsatz anhand der  $ee_S$ -Werte und der Peakflächenverhältnisse zum Internen Standard für das Substrat registriert wird. Gegen diese Hemmung spricht allerdings, daß das Produkt kontinuierlich weitergebildet wird, was anhand der sinkenden  $ee_P$ -Werte deutlich wird.

Aufgrund der bei 50 % Umsatz erzielten relativ hohen Enantiomerenüberschüssen wird die Hydrolyse mit PPL in „Source-Trap-Versuchen“ durchgeführt.

### 8.3.3 „Source-Trap-Reaktionen“ mit PSL

Ebenfalls in einem Vorversuch werden in der Source 150 mg Substrat und in der Trap 10 ml KPP und 500 mg Enzym vorgelegt. Die Hydrolyse findet bei 110 bar statt. Nach 72 h wird der Versuch abgebrochen und sowohl die Kohlendioxidphase als auch eine Probe aus der Pufferphase analysiert.

Erstmals wird der  $ee_S$  Wert der SCCO<sub>2</sub>-Phase zu 99 % bestimmt. Dagegen liegt der Produktenantiomerenüberschuß mit 35,6 % erneut sehr niedrig. Der Umsatz beträgt 73,8 % bei einem E-Wert von 17,5.

Dieser in Hinsicht auf eine enantiomerenreine Substratdarstellung vielversprechende Versuch wird unter Beobachtung des gesamten Reaktionsverlaufs wiederholt. Dabei müssen allerdings 45 ml Puffer verwendet werden, da der Reaktionsaufbau modifiziert worden ist. Anstatt des in Abbildung 4.3 (Kap. 4.2.2) verwendeten Reaktors wird jetzt der Source-Trap-Reaktor für eine „kontinuierliche“ Probenahme verwendet. Bei der in Kap. 7.5 in Abbildung 7.10 skizzierten Probenahme für Source-Trap-Reaktionen kam es gelegentlich zu Problemen bei der Probenahme durch verstopfte Nadelventile (entsprechende Versuche wurden nicht dargestellt). Außerdem verringerte sich mit jeder Probenahme stetig das Puffervolumen. Abbildung 8.7 zeigt den neuen Versuchsaufbau.

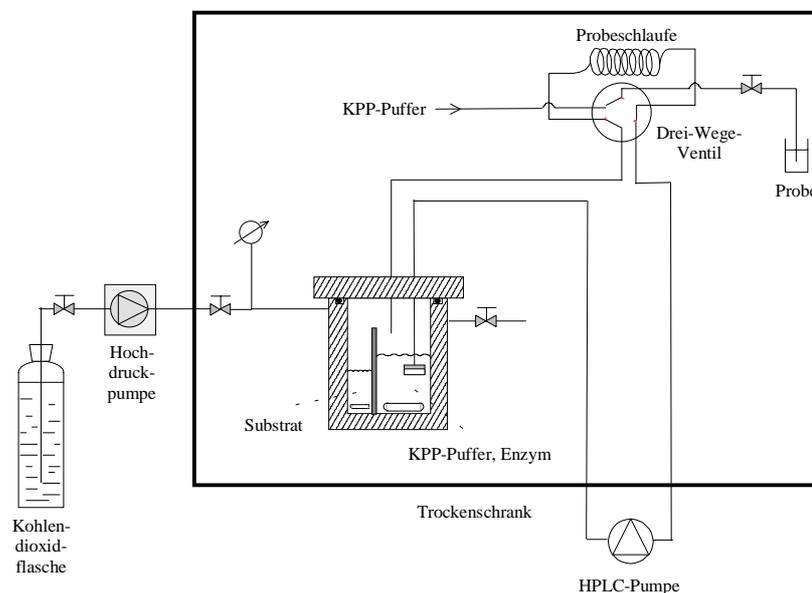


Abb. 8.7: Die „kontinuierliche“ Probenahme bei der „Source-Trap-Reaktionsführung“

Aufgrund des größeren Source-Trap-Reaktors tauchte bei Verwendung von 10 ml Puffer die Kapillare mit der Membran nicht mehr in die wässrige Phase, da sie durch ein Ferrule mit der „Deckelschraube“ fixiert ist und sich nicht mehr in ihrer Länge variieren läßt. In diesem Fall liegt eine Beeinträchtigung der freien Kombinierbarkeit der Komponenten vor. Somit mußten 45 ml Puffer eingesetzt werden, um ein komplettes Eintauchen der Kapillare und der Membran in die Pufferphase zu gewährleisten.

Zur Entwicklung einer on-line Analytik wird später (Kap. 10.3.2.3) ein analoger Source-Trap-Versuch mit PSL durchgeführt. Dabei müssen allerdings die Proben wieder nach dem in Abbildung 7.10 skizzierten Aufbau entnommen werden, da gleichzeitig über dem im Deckel befindlichen Quarzglas die Fluoreszenz gemessen wird. In diesem speziellen Fall konnten daher 20 ml Puffer eingesetzt werden. Der Druck betrug für 45 ml KPP 109 bar und für 20 ml KPP 116 bar.

Die Reaktionsverläufe gibt Abbildung 8.8 wieder.

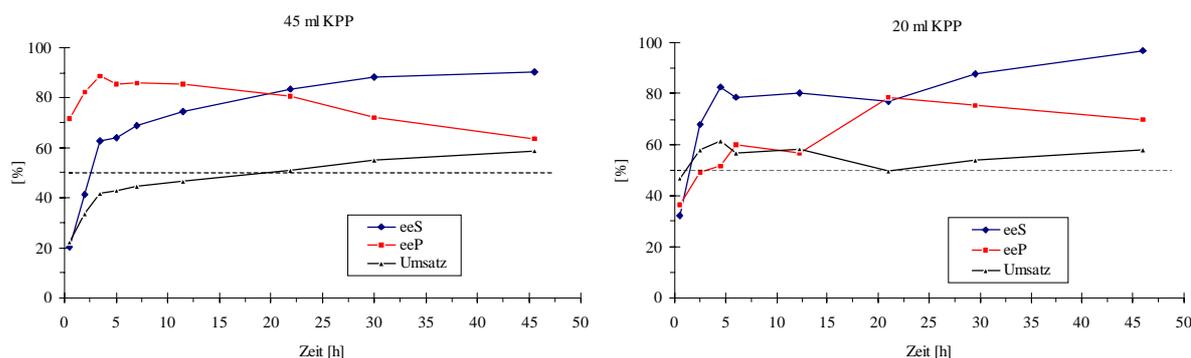


Abb. 8.8: Source-Trap-Reaktionsverläufe bei Einsatz von 45 und 20 ml KPP

Erwartungsgemäß zeigen sich analoge Reaktionsverläufe. Bei der Katalyse mit 45 ml KPP werden 50 % Umsatz nach 19,9 h ( $ee = 81,5\%$ ;  $E = 28$ ) erzielt. Im Fall von 20 ml Puffer werden 50 % Umsatz bereits nach ca. einer Stunde überschritten. Nach 20,5 h werden 50 % Umsatz mit  $ee$ -Werten von 77,6 % bei einer Enantioselektivität von 20 erreicht. Diese Zeit ist mit dem Ansatz mit 45 ml KPP vergleichbar. Das mehrmalige und frühe Erreichen von 50 % Umsatz bei Einsatz von 20 ml Puffer läßt sich durch die anfangs niedrigen  $ee_p$ -Werte erklären. Diese müßten eigentlich höher liegen, wie der Verlauf der „Eintopf-Reaktion“ und des ersten Pufferansatzes nahe legt.

Bei der Analyse der  $SCCO_2$ -Phase zeigen sich für beide Ansätze geringe Unterschiede. Bei Einsatz von 45 ml Puffer wird ein  $ee_s$ -Wert von 98,0 % und bei 20 ml ein Wert von 99,9 % bestimmt. In beiden Fällen ist noch Substrat in der Source vorhanden. Das heißt, daß es zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen Lösevorgang des Substrats, Transport zur KPP-Phase und der Reaktion kam. Für die Darstellung enantiomerenreinen Substrats scheint somit die „Source-Trap-Methode“ geeigneter zu sein, da nicht nur hohe  $ee_s$ -Werte erreicht werden, sondern auch noch ausreichend Substrat vorhanden ist. Bei den „Eintopf-Reaktionen“ wurden erst hohe Substratenantiomerenüberschüsse erzielt, wenn insgesamt bereits viel Substrat abreagiert war. Dies ließ sich durch den Vergleich der Peakflächen mit denen des Internen Standards feststellen.

Unter Berücksichtigung des „50 % Umsatz-Kriteriums“ zeigt sich, daß die Katalyse für Sub (2) mit der *Pseudomonas cepacia* Lipase in  $SCCO_2$  vielversprechend ist. Aus diesem Grund wird sie für die folgenden Optimierungstrategien eingesetzt. Dabei werden „Eintopf-Reaktionen“ untersucht, da die Reaktionszeit bis zum 50 %igen Umsatz kürzer und die Enantioselektivität höher als bei den Source-Trap-Reaktionen war, obwohl diese wie erwähnt günstiger in Hinblick der Substratenantiomerenüberschüsse sind. Die Optimierungs-

experimente in  $\text{SCCO}_2$  werden in Hinsicht auf die Enantioselektivität durchgeführt. Auch zeigt ein Literaturvergleich, daß deutlich höhere Enantioselektivitäten beim Einsatz des aromatischen 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylesters in  $\text{SCCO}_2$  erreicht werden. [Voß; 1990] untersuchte ebenfalls mehrere Enzyme auf ihre Einsatzmöglichkeiten in der Hydrolyse dieses Substrats in 1 M KPP ohne Zusatz einer weiteren organischen Phase. Dabei wurden folgende Enantioselektivitäten bei  $38^\circ\text{C}$  und 103 h Reaktionsdauer erzielt:

CVL:  $E = 23 - 40$  ( $U = 48\%$ )

PPL:  $E = 15 - 17$  ( $U = 27\%$ )

PSL:  $E = 22 - 30$  ( $U = 48\%$ )

Bei der Hydrolyse in  $\text{SCCO}_2$  wurde mit der CVL eine Enantioselektivität von 10,6 (Kap. 8.1), mit der PPL von 21,1 (Kap. 8.2.3) und mit der PSL zunächst von 40,2 (Kap. 8.3.2) und später (Kap. 9.1) sogar von 66,1 nach nur 4,9 h erzielt.

## 9 Die Optimierung der enzymatischen Katalyse in überkritischem Kohlendioxid

In diesem Kapitel soll für die mit PSL katalysierte Hydrolyse des 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylesters die Enantioselektivität durch Variation der Reaktionsparameter Substratkonzentration, Druck und Temperatur in „Eintopfreaktionen“ in SCCO<sub>2</sub> untersucht bzw. optimiert werden. In allen Experimenten werden 20 ml KPP (0,5 M, pH 7,6) und 500 mg Enzym eingesetzt. Die Rührgeschwindigkeit beträgt immer 800 U/min, um eine hinreichende Vermischung zu gewährleisten. In allen Fällen wird ein 66 ml Hochdruckreaktor verwendet. Im nächsten Kapitel wird die optimale Substratmenge bzw. -konzentration bestimmt.

### 9.1 Variation der Substratkonzentration

In 5 Ansätzen wird die Substratkonzentration (bezogen auf 20 ml KPP) und damit das Enzym-Substrat-Verhältnis variiert. Dabei wird der Ansatz mit der ermittelten optimalen Substratkonzentration zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wiederholt. Die Reaktionsverläufe werden in der Regel über zwei Tage durch Entnahme von sieben bis zehn Proben verfolgt. Die Entnahme der ersten Proben erfolgt bis auf einige Ausnahmen jeweils zu definierten Zeiten (0,5 h; 2 h; 3,5 h; 5 h; 7 h), um einen besseren Vergleich und die Bestimmung der kinetischen Parameter (vgl. Kap 9.5) zu gewährleisten. Abweichende Probenahmezeiten aufgrund einer früheren Versuchsdurchführung werden bei Darstellung der Ergebnisse gekennzeichnet. Da die Reaktionen alle tendenziell identisch verlaufen, wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ein Verlauf dargestellt (Abb. 9.1) und die restlichen Ergebnisse bei 50 % Umsatz tabellarisch wiedergegeben (Tab. 9.1). Bei der Enantioselektivität wird der Höchstwert über den Reaktionsverlauf angegeben. Dieser wird in allen Fällen bei ca. 50 % Umsatz erreicht (vgl. Kap. 9.4). Zusätzlich wird bei Abbruch der Reaktionen auch eine Probe aus der Kohlendioxidphase entnommen und der Substratenantiomerenüberschuß ebenso wie die maximal erzielten Werte aller Enantiomerenüberschüsse angegeben. Die eingestellten Drücke variieren aufgrund der bereits erwähnten Temperatureffekte beim Befüllen des Reaktors. Die Reaktionstemperatur beträgt jeweils 45°C.

Ansatz	$n_{\text{Sub (2)}}$ [mg]	$c_{\text{Sub (2)}}$ [mmol]	$t$ [h] bei 50 % Umsatz	ee [U=50%] [%]	ee <sub>SCCO<sub>2</sub></sub> [%]	E	p [bar]	ee <sub>S</sub> <sup>Max</sup>	ee <sub>P</sub> <sup>Max</sup>
1	75	17,0	4,1	86,3	99,9	52,4	104	96,5	91,3
2	100	22,7	3,3	87,8	87,0	49,1	107	93,3	91,4
3	130	29,5	3,5	86,9	92,7	50,2	107	90,6	90,8
4*	150	34,1	15,5	83,0	85,0	40,2	112	86,7	88,5
5	200	45,4	4,1	88,0	96,8	61,7	108	96,0	92,0
6	200	45,4	4,9	89,6	95,7	66,3	103	95,1	94,3

Tab. 9.1: Variation der Substratkonzentration bei der enzymatischen Hydrolyse durch PSL in SCCO<sub>2</sub>;  
\* = Proben zu anderen Zeiten genommen

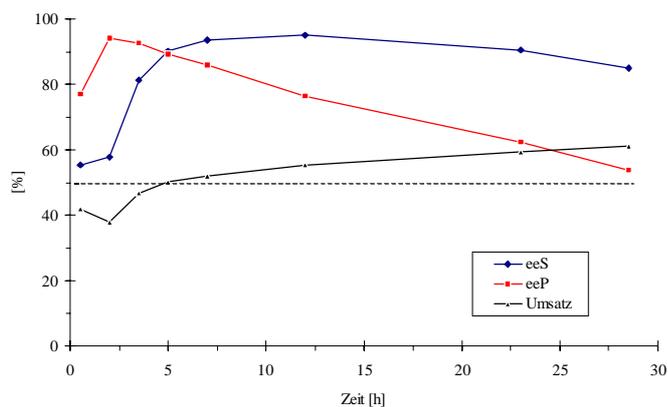


Abb. 9.1: Die Hydrolyse mit 200 mg Substrat

Aus Tab. 9.1 wird deutlich, daß zunächst bis zu einer Substratkonzentration von 29,5 mmol die Enantioselektivitäten relativ konstant bleiben. Dabei wird der höchste Enantiomerenüberschuß der SCCO<sub>2</sub>-Phase mit 99,9 % für Ansatz 1) bestimmt. Nahezu identisch sind für die ersten drei Ansätze auch die maximal erzielten Produktenantiomerenüberschüsse von ca. 91 %. Dagegen sinken zunächst die entsprechenden maximalen ee<sub>S</sub>-Werte. Für die Reaktionszeit und die ee-Werte bei 50 % Umsatz läßt sich keine klare Tendenz finden. Die Reaktionszeit wurde direkt mit Hilfe des Programms „Origin 5.0“ aus den Kurvenverläufen bestimmt. 50 % Umsatz liegen genau am Schnittpunkt der Kurven für die Enantiomerenüberschüsse vor. Dieser läßt sich markieren und die entsprechende Zeit ablesen. Da aber die Verläufe idealisiert als Geraden zwischen einzelnen Meßwerten dargestellt werden, ist diese Interpolierung ungenau, so daß das Kriterium „Reaktionszeit“ gerade bei diesen schnellen Zeiten fehlerbelastet ist. Eigentlich hätten innerhalb der ersten fünf Stunden noch mehr Proben entnommen werden müssen, dieses ist aber aufgrund der notwendigen Aufarbeitung (vgl. 4.4.1) zeitlich nicht möglich.

Die besten Ergebnisse werden für 200 mg [45,4 mmol] Substrat gefunden. In beiden Fällen werden Enantioselektivitäten von über 60 erzielt. Vergleichbar hohe Werte sind für

Hydrolysereaktionen in  $\text{SCCO}_2$  nicht bekannt. Der Enantiomerenüberschuß der  $\text{SCCO}_2$ -Phase liegt mit jeweils über 95 % am zweithöchsten für alle Ansätze. Ebenso werden die höchsten maximalen Produktenantiomerenüberschüsse von 92 bzw. 94,3 % erzielt. Unter Vorbehalt läßt sich sagen, daß mit steigender Substratkonzentration die Enantioselektivität und die  $e_{\text{P}}$ -Werte bei zunehmender Reaktionszeit und konstanten Substratenantiomerenüberschüssen ansteigen. Eine Ausnahme bildet Ansatz 4) mit 150 mg Substrat. Da dieser Versuch der erste mit der PSL in  $\text{SCCO}_2$  war (vgl. Kap. 8.3.2), wurden zu anderen Zeiten Proben genommen. Allerdings erklärt das nicht die lange Reaktionszeit von 15,5 h und die niedrigste Enantioselektivität von 40,2. Der Versuch wurde allerdings bei 112 bar durchgeführt und liegt damit um 4 bar höher als Ansatz 5) mit 200 mg Substrat. Gerade der Druck hat, wie im nächsten Kapitel beschrieben, einen erheblichen Einfluß auf Reaktionszeit und Enantioselektivität.

Höhere Substratkonzentrationen wurden nicht mehr untersucht, da die  $e_{\text{P}}$ -Werte mit steigender Substratkonzentration schnell mit fortschreitender Zeit abnahmen (nicht dargestellt) und somit der maximale Produktenantiomerenüberschuß immer früher erreicht wurde. Eventuell wäre es also möglich, noch höhere Enantioselektivitäten durch Variation der Substratkonzentration zu erzielen.

Im folgenden soll der Einfluß des Drucks auf die Hydrolyse untersucht werden.

## 9.2 Variation des Drucks

Es soll eine Optimierung der Hydrolyse in bezug auf die Enantioselektivität durch Variation des Drucks erfolgen. Im vorherigen Kapitel 8.3 konnte bereits die entscheidende Rolle dieser Größe bei der Katalyse mit PSL erläutert werden. Neben der höheren Löslichkeit des Substrats mit steigendem Druck kann es aber zu der Katalyse entgegenwirkenden Inhibierungsvorgängen durch Carbamatbildung und zur Enzyminaktivierung durch den absinkenden pH-Wert kommen. Dieser Einfluß wird in den folgenden sechs Ansätzen näher untersucht. Dabei werden jeweils bei 800 U/min 200 mg Substrat in 20 ml KPP durch 500 mg PSL in  $\text{SCCO}_2$  bei verschiedenen Drücken hydrolysiert. Eine Reaktion unter Normalatmosphäre dient als Referenz. In diesem Fall bildet das Substrat ähnlich der Aktivitätsmessung mit Tricaprylin selber die für die Lipase notwendige zweite Phase. Dabei wird erneut ein besonderes Augenmerk auf die Reaktionszeit und die Enantioselektivität gerichtet. In Tabelle 9.2 werden die Ergebnisse dargestellt, Abbildung 9.2 zeigt den Reaktionsverlauf der Referenz unter Normalatmosphäre und eine Beispielmessung bei 80 bar.

Für die Enantioselektivität sind wiederum die Maximalwerte angegeben. Alle Versuche werden bei 45°C durchgeführt. Auch hier beziehen sich die Reaktionszeiten auf 50 % Umsatz. Ebenso wird erneut eine Probe bei Abbruch der Reaktion aus der Kohlendioxidphase entnommen.

Ansatz	p [bar]	t [h] bei 50 % Umsatz	ee [U=50%] [%]	ee <sub>SCCO<sub>2</sub></sub> [%]	E	ee <sub>S</sub> <sup>Max</sup>	ee <sub>P</sub> <sup>Max</sup>
1 <sup>Referenz</sup>	1	1,9	87,4	-	46,9	93,7	94,1
2	80	4,9	86,7	94,3	54,0	94,5	92,8
3*	103	4,9	89,6	95,7	66,3	95,1	94,3
4*	108	4,1	88,0	96,8	61,7	96,0	92,0
5	125	14,8	82,8	92,6	46,0	92,2	91,7
6	159	37,9	80,6	89,0	42,7	91,2	91,5

Tab. 9.2: Die Abhängigkeit der Hydrolyse des Sub (2) vom Druck; \* = Ergebnisse aus Kap. 9.1

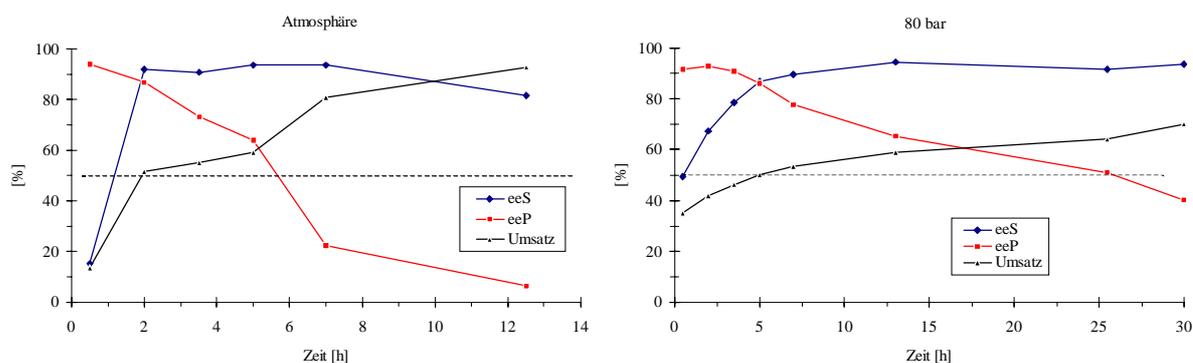


Abb. 9.2: Die Reaktionsverläufe der Hydrolyse mit PSL unter Atmosphärendruck und bei 80 bar

Mit den Versuchen kann belegt werden, daß die Enantioselektivität vom Druck abhängig ist. Diese erhöht sich zunächst mit steigendem Druck, durchläuft bei 103 bar mit einem Wert von 66,3 ein Maximum und fällt dann kontinuierlich ab, wie Abbildung 9.3 zeigt. Die Referenz bei Normalatmosphäre ergibt außer der kürzesten Reaktionszeit keine Vorteile gegenüber SCCO<sub>2</sub>. Da die höchsten Enantioselektivitäten und Enantiomerenüberschüsse unter Druck erreicht werden, ist es günstiger, das Substrat nicht direkt als zweite Phase vorzulegen, sondern es in einer zusätzlichen Phase wie SCCO<sub>2</sub> zu lösen. Dadurch entfällt nach erfolgter Reaktion auch die Extraktion des entsprechenden Substratenantiomers aus dem Reaktionsgemisch. Wird die Katalyse ohne SCCO<sub>2</sub> durchgeführt, käme es zu einer Verarmung des Gemisches an Substrat. Im ungünstigsten Fall kann die Sättigungskonzentration des Substrats in Wasser unterschritten werden. Sobald dies geschieht, liegt das Substrat nicht mehr als für eine Lipasenkatalyse notwendige zweite Phase vor und die Reaktion wird eingestellt. Zusätzlich bietet SCCO<sub>2</sub> die Möglichkeit einer on-line Analytik,

die aber erst in Kap. 10.3.2 vorgestellt wird. Bei höheren Drücken ist der Einsatz von  $\text{SCCO}_2$  nicht mehr effektiv. Es werden zwar weiterhin maximale Enantiomerenüberschüsse von über 90 % erzielt, doch verlängert sich die Reaktionszeit deutlich.

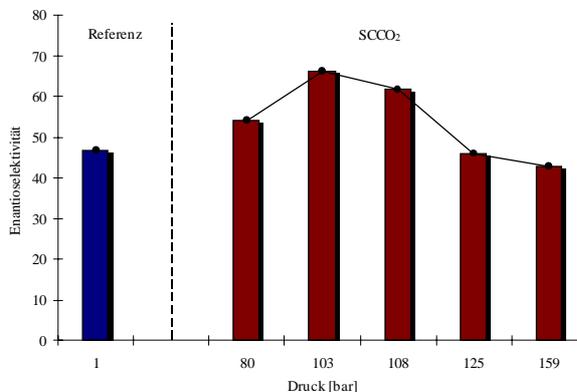


Abb. 9.3: Die Druckabhängigkeit der Enantioselektivität

Folgende Hypothese läßt sich aus diesen Ergebnissen schließen: Sobald der überkritische Zustand erreicht wird, löst sich das Substrat bevorzugt in Kohlendioxid und die Katalyse wird erleichtert. Mit steigendem Druck erhöht sich diese Löslichkeit weiter. Dieser Effekt wirkt zunächst dem stärker werdenden Einfluß der pH-Wert Erniedrigung und einer wahrscheinlichen Carbamatbildung entgegen. Ab einem bestimmten Druck kehrt sich dieser Zustand allerdings um, da die Substratlöslichkeit stagniert. Ebenso kann auch der pH-Wert bei Einsatz von Puffer einen bestimmten Wert nicht unterschreiten [Tservistas; 1997]. Dagegen gibt jetzt die Bildung von Carbamat bzw. die direkte Konformationsänderung des Enzyms durch Druck den Ausschlag und die Reaktionsrate und Enantioselektivität fallen deutlich ab. Somit läßt sich diese Meßreihe auch als Beweis für eine reversible Enzyminhibierung durch Druck betrachten.

Als letzter Optimierungsschritt wird der Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsrate bestimmt.

### 9.3 Variation der Temperatur

In drei Ansätzen wird das Temperaturverhalten der Hydrolyse untersucht. Es werden erneut 200 mg Substrat mit 500 mg PSL in 20 ml KPP bei 800 U/min umgesetzt. Der Druck wird auf ca. 103 bar eingestellt. Neben der bisherigen Versuchstemperatur von 45°C werden noch 40°C und 50°C untersucht. Tabelle 9.3 listet die Ergebnisse auf.

Ansatz	T [°C]	t [h] bei 50 % Umsatz	ee <sub>[U=50%]</sub> [%]	ee <sub>SCCO<sub>2</sub></sub> [%]	E	ee <sub>S</sub> <sup>Max</sup>	ee <sub>P</sub> <sup>Max</sup>
1	40	4,0	86,8	94,2	53,4	87,6	91,4
2*	45	4,9	89,6	95,7	66,3	95,1	94,3
3	50	3,1	83,8	92,5	29,6	91,0	87,0

Tab. 9.3: Die Abhängigkeit der Hydrolyse des Sub (2) von der Temperatur; \* = Ergebnisse aus Kap. 9.1

In Kap. 8.3 wurde gezeigt, daß bei 50°C die Aktivität der PSL höher ist als bei 40°C und 45°C. Daß dadurch auch die Enantioselektivität mit steigender Temperatur zunimmt, konnte hier nicht belegt werden. Analog zu den Untersuchungen des Druckeinflusses durchläuft hier die Enantioselektivität bei 45°C ein Maximum. Allenfalls die schnelle Reaktionszeit von 3,1 h bis zum Erreichen von 50 % Umsatz korreliert mit der temperaturbedingten Aktivitätssteigerung, die Enantioselektivität sinkt dagegen auf 29,6 ab. Das kommt in dem Temperaturbereich zwischen 45°C und 50°C einer Abnahme von über 50 % gleich. Bei einer Betrachtung der Ansätze 1) und 2) wird ein positiver Temperatureinfluß deutlich. Alle Größen wie Enantioselektivität, Enantiomerenüberschüsse und maximale ee-Werte nehmen zu. Aufgrund dieser Einbußen der Enantioselektivität werden keine höheren Temperaturen mehr untersucht.

Zusammenfassend wird die höchste Enantioselektivität für die PSL-katalysierte Hydrolyse von Sub (2) unter folgenden Bedingungen erzielt:

200 mg (45,4 mmol) Substrat

500 mg PSL → Enzym-Substratverhältnis = 2,5 : 1

45°C

103 bar

Diese Parameter sollten für alle folgenden Versuche verwendet werden. Für die Etablierung einer on-line Analytik (Kap. 10) werden dagegen auch abweichende Bedingungen gewählt. Die Begründung findet sich bei den entsprechenden Ansätzen.

## 9.4 Umsatz-Enantioselektivitäts-Verläufe

Es wurde bereits erwähnt (Kap. 4.1.3), daß die Enantioselektivität eine für das Enzym charakteristische Größe ist, die über den gesamten Reaktionsverlauf konstant sein sollte. In den meisten Untersuchungen fällt die Enantioselektivität nach Erreichen von 50 % Umsatz schnell ab, da das bevorzugte Enantiomer abreagiert ist und das weniger bevorzugte verstärkt umgesetzt wird. Für vier ausgewählte Ansätze der Meßreihe „Variation der Substratkonzentration“ (Kapitel 9.1) erfolgt in Abb. 9.4 die graphische Darstellung der Enantioselektivität in Abhängigkeit vom Umsatz.

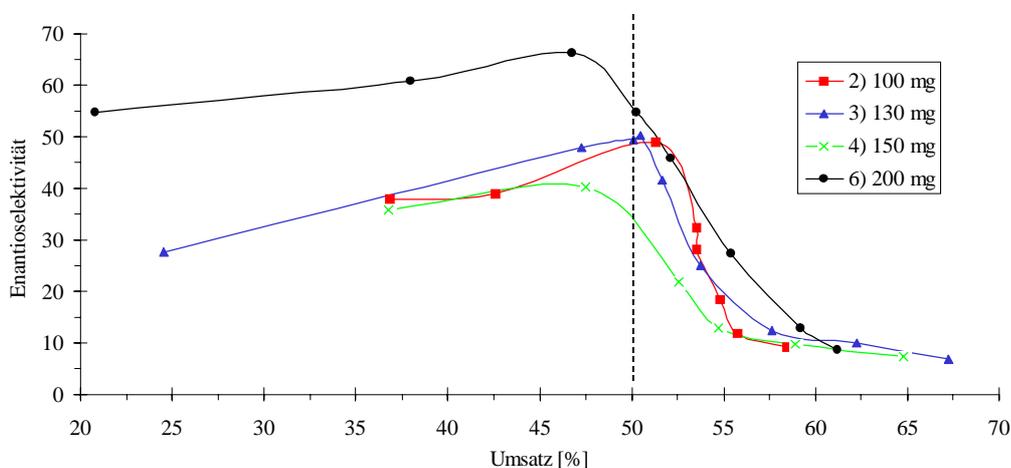


Abb. 9.4: Verlauf der Enantioselektivität in Abhängigkeit vom Umsatz in  $\text{SCCO}_2$

In allen vier Fällen steigt die Enantioselektivität zunächst leicht mit zunehmendem Umsatz an. Im Bereich um 50 % Umsatz findet dann ein rascher Abfall statt. Jetzt wird auch verstärkt das nicht bevorzugte Enantiomer umgesetzt, da das andere zum größten Teil abreagiert ist (vollständige Abreaktion bei 50 % Umsatz nur bei einer Enantioselektivität  $> 100$ ). Das Enzym kann nicht mehr zwischen den Enantiomeren unterscheiden. Das dieses Absinken nicht genau bei 50 % Umsatz sondern bei ca. 55 % stattfindet, liegt daran, daß auch schon seit Beginn der Reaktion teilweise das nicht-bevorzugte Enantiomer umgesetzt wird. Würde die Enantioselektivität über 100 liegen, so müßte der Abfall genau bei 50 % Umsatz auftreten.

Da die Enantioselektivität während der gesamten Reaktionsverlaufs eigentlich konstant sein müßte und eine Änderung nur mit einer Veränderung in der Umgebung des Enzyms zu erklären ist, wird zusätzlich das Auftreten einer Hemmung vermutet.

Ein von [Becker; 1998] postulierter Einfluß aufgrund der Aktivitätsabnahme der Lipase in KPP-Puffer läßt sich hier nicht als weitere Erklärung der Abnahme heranziehen, da sonst der

Abfall der Enantioselektivität geringer und langsamer ausfallen müßte. [Capewell; 1994] und [Tservistas; 1997] schlugen dagegen Nebenreaktionen vor, die die Enantioselektivität beeinflussen. Auch das ist in diesem Fall unwahrscheinlich, da die Hydrolyse irreversibel ist und auf die Seite der Produkte gezogen wird.

Als letztes erfolgt die Bestimmung der kinetischen Parameter für die PSL-katalysierte Hydrolyse.

## 9.5 Kinetische Betrachtungen der enzymatischen Hydrolyse mit PSL

Da die Hydrolyse des 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylesters mit PSL die einzige Reaktion war, die Enantioselektivitäten von  $> 20$  (Darstellung entweder des optisch reinen Substrats oder Produkts möglich) aufwies, sollen für diese Katalyse die kinetischen Parameter bestimmt werden.

Nach Kapitel 3.2.1 gilt für lipasekatalysierte „Zwei-Substrat-Reaktionen“ häufig der „Ping-Pong-Bi-Bi“ Mechanismus, der sich analog zu den anderen Mechanismen bei Einsatz eines Substrats als Überschußkomponente zu einer „Michaelis-Menten“ analogen Gleichung (3.8) vereinfachen läßt. Die Variation der Substratmenge bei konstanter Enzymkonzentration ist ein gängiges Verfahren zur Bestimmung der Kinetik (Kap. 9.1). In den dort durchgeführten Versuchen wird die Enzym- und die Wasserkonzentration konstant gehalten, letzteres ist gleichzeitig die Überschußkomponente (in allen Ansätzen ist das Verhältnis Wassermenge : Substratmenge  $\geq 100$ ). Eine graphische Auswertung z. B. nach Lineweaver-Burk ist mit Schwierigkeiten verbunden, da aufgrund der bereits erwähnten, durch die Aufarbeitung limitierten Probenanzahl zu Reaktionsbeginn zu wenig Meßpunkte für eine Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wird eine andere Methode zur Bestimmung der notwendigen Daten angewandt.

Unter Berücksichtigung der Überschußkomponente Wasser folgt nach Gl. (3.8) mit Sub (2):

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[\text{Sub (2)}]}{K_B + [\text{Sub (2)}]} \quad (9.1)$$

Nach Trennung der Variablen und anschließender Integration folgt:

$$v_{\max} \cdot \int_0^t dt = - \int_{[\text{Sub}(2)]^0}^{[\text{Sub}(2)]} \frac{K_M + [\text{Sub}(2)]}{[\text{Sub}(2)]} d[\text{Sub}(2)] \quad (9.2)$$

Nach Aufspaltung des Integrals folgt:

$$K_M \cdot \ln \frac{[\text{Sub}(2)]}{[\text{Sub}(2)]^0} + [\text{Sub}(2)]^0 - [\text{Sub}(2)] = v_{\max} \cdot t \quad (9.3)$$

Die momentane Substratkonzentration  $[\text{Sub}(2)]^0$  läßt sich über den Umsatz nach  $[\text{Sub}(2)] = [\text{Sub}(2)]^0 \cdot (1 - U)$  ausdrücken, woraus aus Gl. (9.3) folgt:

$$\frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \left[ \frac{1}{U} \ln \left( \frac{1}{1-U} \right) \right] + \frac{[\text{Sub}(2)]^0}{v_{\max}} = \frac{t}{U} \quad (9.4)$$

In diesem Fall kann U über Gl. (4.5) aus den Enantiomerenüberschüssen bestimmt werden.

Wird  $\frac{t}{U}$  gegen  $\left[ \frac{1}{U} \ln \left( \frac{1}{1-U} \right) \right]$  aufgetragen, so resultiert bei Gültigkeit der Michaelis-Menten-

Beziehung eine Gerade, aus der sich aus der Steigung  $\frac{K_M}{v_{\max}}$  und aus dem Achsenabschnitt

$\frac{[\text{Sub}(2)]^0}{v_{\max}}$  ermitteln lassen. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, daß bei der betrachteten

Hydrolyse eine Zwei-Phasen-Reaktion vorliegt und Stoffübergangsphänomene in Gl. (9.4) vernachlässigt werden. Der Vorteil dieser Integralmethode ist, daß hier bei Kenntnis der Umsatz-Zeit-Verläufe nur eine Messung bei einer Substratkonzentration nötig ist. Für zwei Ansätze soll dies exemplarisch geschehen:

Die optimale Substratkonzentration wird zu 45,4 mmol bestimmt (Kap. 9.1). Daher sollen graphisch für Ansatz 5) aus diesem Abschnitt die kinetischen Parameter ermittelt werden. Ansatz 5) wird gewählt, da eine Probe mehr als bei Ansatz 6) entnommen wurde. Ebenfalls erfolgt die Bestimmung für den Atmosphärenversuch in Kap. 9.2 (Ansatz 1), Referenzmessung ohne  $\text{SCCO}_2$ ). Abbildung 9.5 stellt das Ergebnis dar.

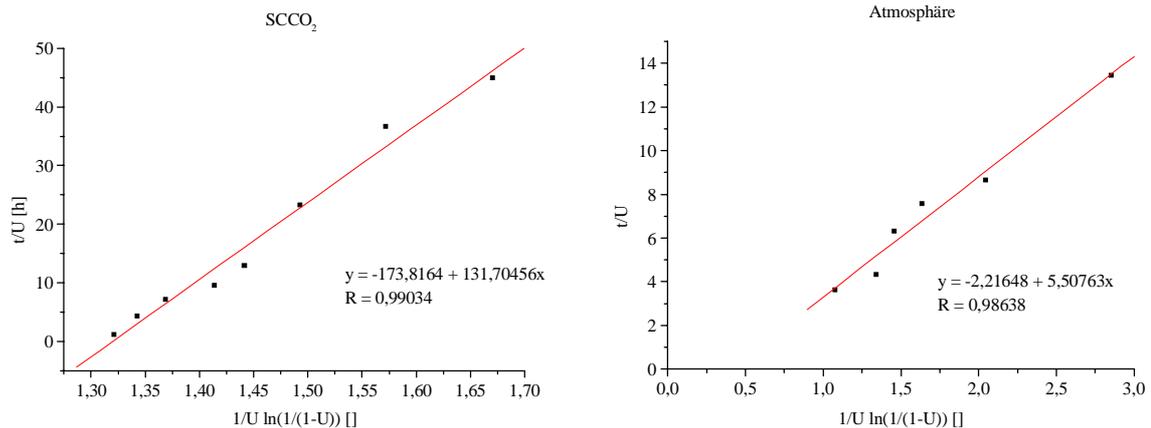


Abb. 9.5: Die Bestimmung kinetischer Daten der Hydrolyse von Sub (2) mit PSL

In beiden Fällen werden negative Achsenabschnitte und damit ein negativer Quotient für  $K_M$  und  $v_{\max}$  erhalten. Da aber Geraden resultieren, ist zumindest bewiesen, daß die Katalyse der Michaelis-Menten-Kinetik mit Überschußkomponente folgt. Der negative Achsenabschnitt tritt bei allen hier untersuchten Reaktionen bei beiden Substraten auf (Ergebnisse nicht dargestellt) und ebenso für die in Kap. 7.6 beschriebenen Hydroxyester [Becker; 1998]. Daraus folgt, daß Stofftransportlimitierungen, die nur schwer zu berücksichtigen und zu berechnen sind, einen erheblichen Einfluß auf die Reaktion ausüben. Auch bei der Reaktion ohne SCCO<sub>2</sub> muß interessanterweise solch eine Limitierung vorliegen. Wahrscheinlich ist dort das Passieren des Substrats durch die Grenzschicht Wasser-Enzym und umgekehrt für das Produkt ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt. Zusätzlich treten in SCCO<sub>2</sub> weitere Transporthemmungen aufgrund des Passierens der SCCO<sub>2</sub>/KPP-Grenzfläche auf. Neben diesem Phasenübergang verteilt sich das Substrat im Kohlendioxid. Daher ist auch noch die Konzentration des Substrats am Enzym verringert. Bei Atmosphärenmessungen ist dies nicht der Fall.

Eine Verminderung der Transporthemmungen könnte durch höhere Rührgeschwindigkeiten erreicht werden. Dagegen sprechen dann aber die steigenden mechanischen Scherkraftbelastungen auf das Enzym. Ein mathematisches Modell, daß auch alle Stoffübergangskoeffizienten bei der Reaktion berücksichtigt, wird zur Zeit in dieser Arbeitsgruppe entwickelt [Aydemir; 1999].

Neben den Stofftransportlimitierungen ist das Vorliegen einer Hemmung wahrscheinlich, da die erwähnten Transportmechanismen gerade im Fall der Atmosphärenmessung keine großen Einflüsse auf die Geschwindigkeit haben können.

## 10 Die Etablierung einer on-line Analytik für enzymatische Reaktionen in $\text{SCCO}_2$

In diesem Kapitel werden drei Methoden auf ihre Eignung zur on-line Überwachung der enzymatischen Hydrolyse in  $\text{SCCO}_2$  getestet. Neben 2D-Fluoreszenzmessungen werden HPLC- und UV-Absorptionsverfahren untersucht.

### 10.1 HPLC-Analytik – Integration in die Probenahme

Für die Enantiomerenanalytik existieren neben Kapillarsäulen für die GC auch zahlreiche, ebenfalls auf Cyclodextrinen beruhende HPLC-Trennsäulen. Daher entstand die Idee, eine geeignete wasserunlösliche HPLC-Phase in das in Abb. 4.3 (Kap. 4.2.2) skizzierte Probenahmemodul zu integrieren, so daß mit Hilfe eines automatischen Injektionsventils eine wäßrige Probe definierten Volumens aus dem Reaktor direkt in den Strom eines HPLC-Systems injiziert werden kann. Abbildung 10.1 soll den Aufbau verdeutlichen.

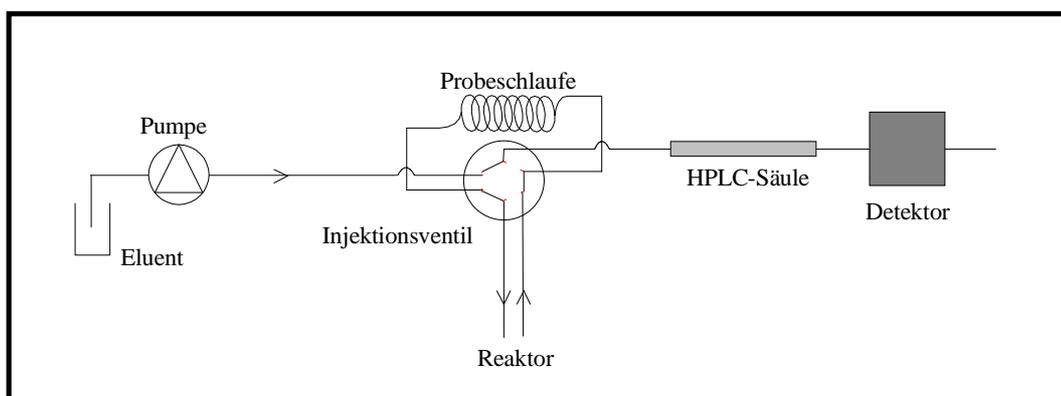


Abb. 10.1: Schematischer Aufbau einer möglichen HPLC on-line Analytik

Das Injektionsventil und die Pumpe wären computergesteuert, so daß zu definierten Zeiten eine Probe analysiert und direkt über ein an den Detektor angeschlossenes Ausgabegerät der Reaktionsverlauf beobachtet werden könnte. Dabei wäre es für eine Prozeßbeobachtung völlig ausreichend, entweder das Substrat oder das Produkt zu analysieren. Es galt also in Vorversuchen eine geeignete Säule zu finden. Zu Testzwecken wurde von Macherey-Nagel freundlicherweise die Nucleodex  $\beta$ -PM zur Verfügung gestellt. Es ließen sich aber weder die Substrat- noch die Produktenantimere trennen. Nach Rücksprache mit dem Hersteller wurde vermutet, daß es zu einem intramolekularen Ringschluß zwischen der  $\beta$ -Hydroxy- und der

Carboxylatfunktion kommt, der eine Trennung verhindert. Dieses wäre auch bei weiteren Säulen der Fall. Bei der GC verhindert die hohe Analysentemperatur diesen Ringschluß. Ein Alternative wäre, die HPLC-Säule auf höhere Temperaturen zu erwärmen.

## 10.2 UV-Absorptionsmessungen in SCCO<sub>2</sub>

[Becker; 1998] versuchte, basierend auf den Arbeiten von [Bornscheuer; 1993] und [Capewell; 1994], eine on-line UV-Absorptionsmethode für 3-Hydroxysäureester in SCCO<sub>2</sub> zu entwickeln (vgl. Kap. 3.7.1.1). Die überkritische Phase wird dabei kontinuierlich durch eine Hochdruckdurchflußzelle gepumpt, die Absorption über ein Photometer bestimmt und die entsprechenden Spannungswerte über ein Voltmeter ausgegeben. Dabei wird das Spektrum der Substrate zwischen 170 und 350 nm aufgenommen. Die Konzentration der Ester ist der Absorption und damit der Spannung proportional. In Abbildung 10.2 ist sowohl das Referenzspektrum des Kohlendioxid bei zwei verschiedenen Drücken als auch ein Meßspektrum des 3-Hydroxy-4-hexensäureethylesters (vgl. Kap. 7.6) wiedergegeben.

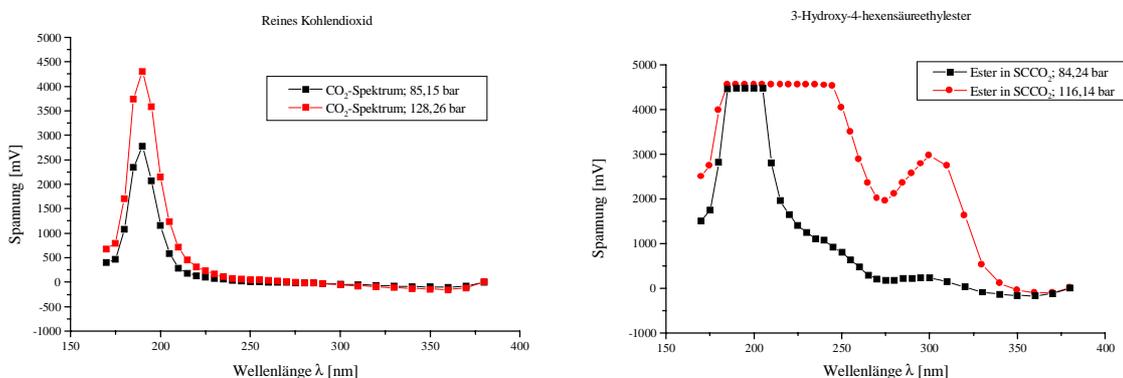


Abb. 10.2: UV-Absorptionsspektren von reinem Kohlendioxid und von 3-Hydroxy-4-hexensäureethylester bei zwei verschiedenen Drücken [Becker; 1998]

Es wird deutlich, daß die Absorption des reinen Kohlendioxid (ca. 200 nm) mit zunehmendem Druck steigt, da höhere Konzentrationen vorliegen. Sobald nur 1 µl Substrat zugegeben wird, erhöht sich ebenfalls aufgrund additiver Effekte die Absorption des Kohlendioxids. Dabei wird bereits bei dieser sehr geringen Substratmenge der Meßbereich des Photometers überschritten. Wird der Druck erhöht, ist die Ausbildung eines Substratabsorptionsmaximums bei 300 nm zu beobachten. Damit ist eine qualitative Beobachtung der Reaktion zwar möglich, doch verhindert der geringe Meßbereich des

Photometers einen Einsatz zur on-line Analyse. Die Messung zeigt allerdings gut die steigende Löslichkeit eines Substrats mit zunehmendem Druck. Analoge Ergebnisse ergeben sich mit allen Substraten, die aber nicht weiter dargestellt werden.

Es war nicht möglich, den Meßbereich des Photometers zu vergrößern, so daß auf einen weiteren Einsatz dieser einfachen Analysenmethode verzichtet werden mußte.

### **10.3 Verschiedene Methoden zur on-line Analyse mittels der 2D-Fluoreszenzspektroskopie**

Zwei Strategien zur Erfassung des Reaktionsverlaufes bei der Hydrolyse des 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylesters mit PSL sollen verfolgt werden. In Vorversuchen (nicht beschrieben) wurde festgestellt, daß Sub (2) und die Produktsäure fluoreszieren. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit macht sich die abgehende Ethylgruppe im Fluoreszenzspektrum nicht bemerkbar, so daß sich Ester und Säure in ihrer Lage im Spektrum nicht unterscheiden und in ihrer Fluoreszenzintensität (FI) addieren. In Hexan wird das Fluoreszenzmaximum zu  $E_m/E_x = 310/260$  nm und in  $SCCO_2$  im Bereich um  $E_m/E_x = 310/255$  bestimmt. Leichte Wellenlängenverschiebungen, die auch in den folgenden Versuchen auftreten, liegen an Lösemittel-, Druck- bzw. pH- und Temperatureffekten, die die Lage der Substanzen im Spektrum und die Fluoreszenzintensität direkt beeinflussen. Daher unterscheiden sich die Wellenlängen für das Substrat bzw. die Säure in den folgenden Versuchen. Das Enzym fluoresziert nicht, ein basischer Aufschluß und anschließende Bestimmung der Aminosäuren zeigte, daß keine der drei Fluoreszenz zeigenden Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin im Enzym zu finden sind.

Zunächst wird versucht, die produzierte Pentensäure mit Hilfe eines geeigneten Fluorophors zu derivatisieren. Ziel dabei ist, daß sich das Substrat, der Fluoreszenzmarker und das Säurederivat in ihrer Lage im Spektrum unterscheiden.

Im zweiten Teil soll die unterschiedliche Löslichkeit von Substrat und Produkt für Fluoreszenzmessungen ausgenutzt werden. Da sich die Säureenantiomere nicht in  $SCCO_2$  lösen, sollte es möglich sein, das Substrat bei ausschließlichen Messungen durch die Kohlendioxidphase analytisch zu erfassen. So lange der Strahlengang nicht die Pufferphase passiert, kann auch kein Produkt detektiert werden. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß hier nur das Substrat bzw. das Produkt als Summe ihrer Enantiomere erfaßt werden, da mittels Fluoreszenzmessung keine Enantiomerenunterscheidung möglich ist. Es geht nur um die qualitative Erfassung des Reaktionsverlaufes. Bei einer enantioselektiven Reaktion ( $E > 100$ )

Reaktion müßte demnach bei Detektion des Substrats in der überkritischen Phase die FI im Laufe der Katalyse genau um die Hälfte fallen, d. h. ein Enantiomer wurde umgesetzt, das andere verbleibt im SCCO<sub>2</sub> und bestimmt die restliche Fluoreszenzintensität. Bei Reaktionen geringerer Enantioselektivität wird die FI mit der Zeit auch weiterhin fallen, allerdings sollte zumindest ein Abflachen der Kurve zu erkennen sein.

### 10.3.1 Derivatisieren der Produktsäure mit 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM)

Im Rahmen seiner Diplomarbeit untersuchte [Knüttel; 1999] bereits für die Produktsäure von Sub (1) einige Derivatisierungsreaktionen mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern. Vielversprechende Ergebnisse wurden mit 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM) erzielt, welches auch hier eingesetzt wird. Die Derivatisierung erfolgt durch einfache Esterbildung mit der Produktsäure (Abb. 10.3).

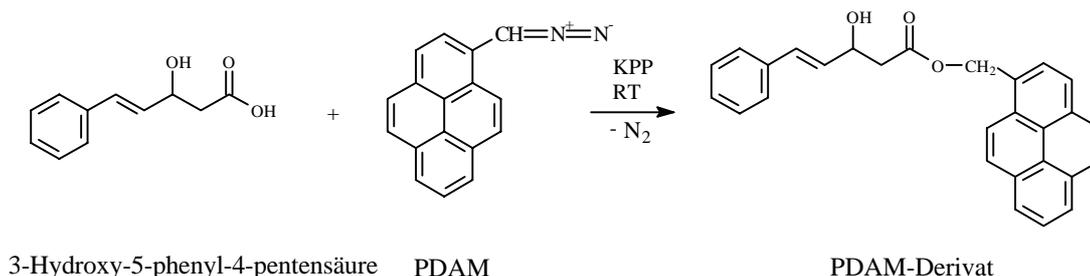


Abb. 10.3: Derivatisierungsreaktion der Produktsäure mit PDAM

Das PDAM fluoresziert sowohl in KPP/Hexan als auch in KPP/SCCO<sub>2</sub> bei  $\lambda_{EM} = 380$  und  $\lambda_{EX} = 340$  nm. Damit unterscheidet es sich zumindest von der Lage des Sub (2) und dessen Säure. Sollten sich dagegen das PDAM und das Derivat nicht unterscheiden, wäre es auch hier theoretisch möglich, daß sich die FI des Substrat-Produkt-Gemisches sowohl aufgrund der Enzymkatalyse als auch durch die Reaktion des PDAM mit der Säure verringert und so eine Verfolgung der Reaktion möglich wird. Optimal wäre, wenn das Derivat ebenfalls andere Fluoreszenzmaxima als das PDAM und die Säure aufweist. Da das Enzym keine Fluoreszenz zeigt, ist in diesem Fall mit höchstens drei ausgeprägten Maxima im Spektrum zu rechnen.

#### 10.3.1.1 Die Derivatisierungsreaktion in KPP

Zunächst wird nur in KPP die reine Produktsäure mit PDAM eingesetzt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt durch eine in einen seitlichen Einlaß eingefäßte Quarzglasscheibe in

einem 15 ml Edelstahlzylinder. Die innere Reaktorwand wird mit einer schwarzen Teflonmanschette bedeckt, um Reflexionen an der Edelstahlwand zu vermeiden. Für die Hochdruckreaktoren existieren solche Manschetten noch nicht, da aufgrund der zahlreichen Kapillarbohrungen die Herstellung einer paßgenauen Manschette erschwert ist. Zu 10 ml einer  $2,4 \cdot 10^{-6}$  molaren PDAM-Lösung (in 0,5 M KPP, pH 7,6) werden 1,15 mg reine racemische Produktsäure gegeben. Es werden über zwei Stunden Spektren aufgenommen. In Abbildung 10.4 sind die Spektren zu Reaktionsbeginn, nach 120 min und das Differenzspektrum dargestellt, Abbildung 10.5 gibt den FI-Verlauf über die Zeit wieder. Die skizzierten FI-Verläufe werden aus den aufgenommenen Spektren bei einem bestimmten Wellenlängenpaar ( $E_m/E_x = 320/250$  Säure;  $E_m/E_x = 380/335$  PDAM und  $E_m/E_x = 330/290$  Neuer Peak) ermittelt. Leichte Wellenlängenverschiebungen der Peakmaxima liegen im Folgenden an der Abhängigkeit der FI vom Lösemittelsystem, von der Temperatur und vom Druck. Auf diese Änderungen wird nicht jedesmal explizit hingewiesen. Auch wird später aufgrund der Ähnlichkeit auf die Darstellung von Einzelspektren zu bestimmten Zeiten verzichtet.

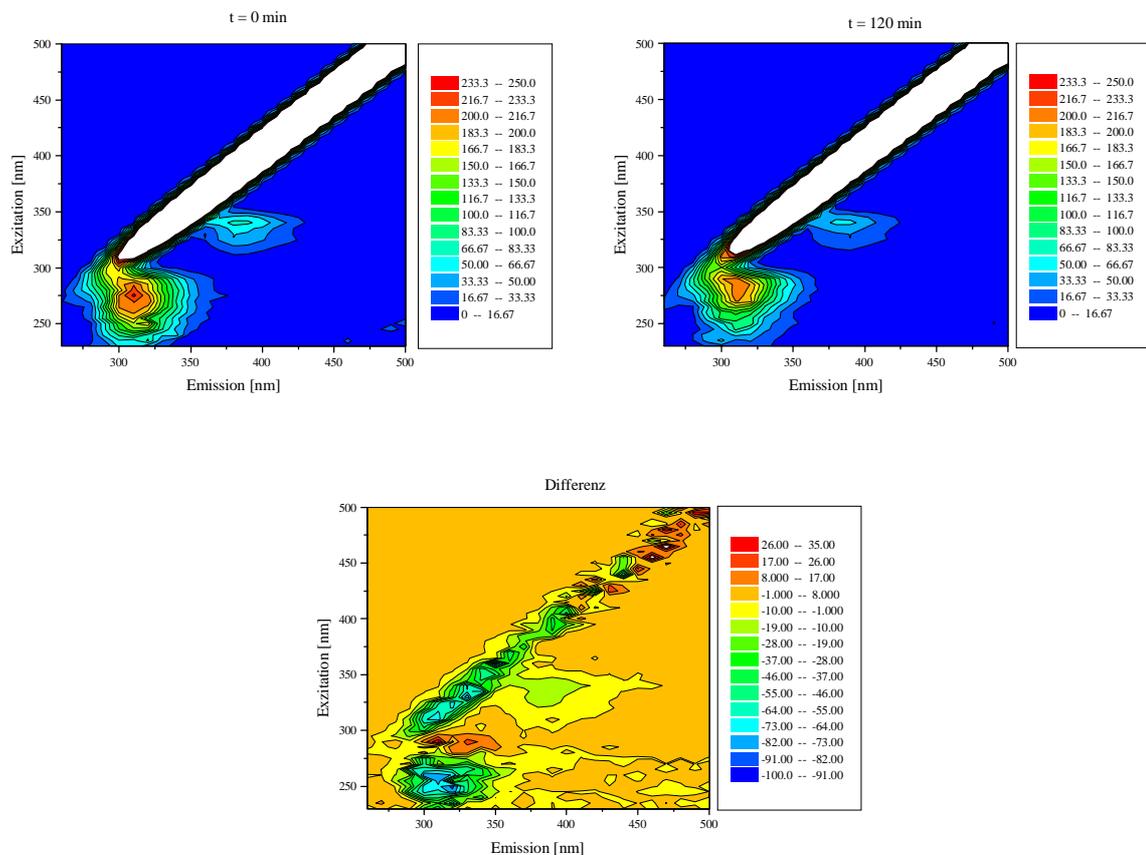


Abb. 10.4: Fluoreszenzspektren der Derivatisierungsreaktion in KPP

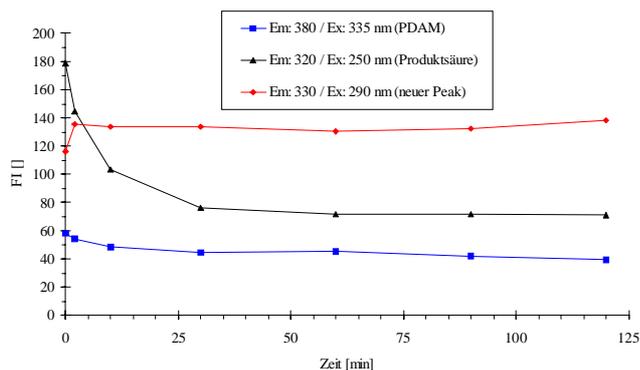


Abb. 10.5: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität

Sowohl der Säurepeak als auch der PDAM-Peak nehmen in ihrer FI mit der Zeit ab. Bei  $Em/Ex = 330/290$  wird erst im Differenzspektrum ein „zunehmender“ Peak sichtbar. Aus den FI-Verläufen wird deutlich, daß die Fluoreszenzintensität für den neuen Peak nur gering zunimmt. Dabei kann es sich nicht um das Derivat handeln. Erstens liegt dieses Wellenlängenpaar zu nah am Maximum der Säure und zweitens wird bereits zu Beginn der Reaktion bei  $Em/Ex = 330/290$  eine hohe FI von ca. 118 gemessen. Für ein neues Produkt sollte sie aber wesentlich geringer sein, vor allem, wenn bedacht wird, daß daraufhin keine Zunahme mehr stattfindet. Auf jeden Fall kann die erwartete Abnahme der Peaks für die Säure und das PDAM beobachtet werden. Auffällig daran ist, daß die FI des PDAM nur gering abfällt, die der Säure dagegen sehr stark. Daher wird ein Zusammenfallen der Peaks im Spektrum von PDAM und vom neuen Derivat vermutet.

Wie sich die Derivatisierungsreaktion in KPP/Hexan bzw. KPP/SCCO<sub>2</sub> bei einer Katalyse des Substrats verhält, wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

### 10.3.1.2 Die Derivatisierungsreaktion in KPP/Hexan

Zu 9 ml KPP (0,5M, pH 7,6) werden 5 ml Hexan und 4 mg racemisches Sub (2) gegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von 13 mg PSL gestartet. Die Fluoreszenzmessung erfolgt durch die wäßrige Phase hindurch. Nach 207 Minuten wird 1 ml einer  $2,4 \cdot 10^{-5}$  molaren PDAM-Lösung zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Das Ergebnis ist in den Abbildungen 10.6 und 10.7 skizziert. Hierbei ändert sich die Lage des Substrat- bzw. Säurepeaks aufgrund von Lösemittelleffekten geringfügig ( $Em/Ex = 310/255$ ).

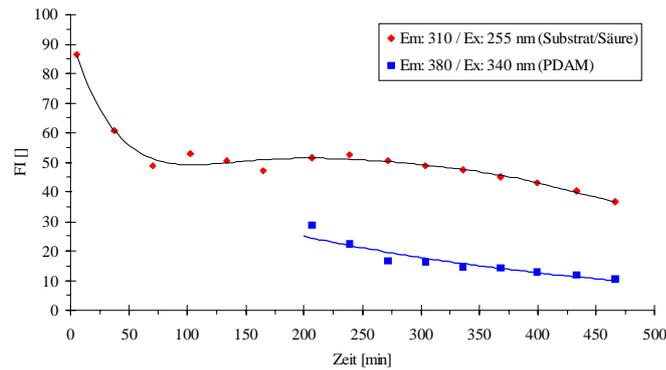


Abb. 10.6: FI-Verlauf der Reaktion des Sub (2) mit PSL in KPP/Hexan unter Zusatz von PDAM

Zunächst sinkt die FI für das Substrat bzw. die zu produzierende Säure ( $\lambda = 310/255$ ) fast um 50 % von 87 auf 48 ab. In diesem Fall ist das auf ein Lösen des Substrats in der Hexanphase zurückzuführen. Nach ca. 60 Minuten bleibt die FI konstant bzw. steigt sogar langsam an. Die abfallende FI des abreagierenden Substrats wird durch die in der Pufferphase gebildete Säure kompensiert. Erst nach Zugabe von PDAM wird ein weiterer Abfall beobachtet, da das Substrat weiterhin von der PSL katalysiert und jetzt die Produktsäure vom Fluorophor abgefangen wird. Das korreliert mit der ebenfalls sinkenden Fluoreszenzintensität des PDAM-Peaks. Aufgrund des unpolaren Charakters des 1-Pyrenyldiazomethan ist es wahrscheinlich, daß sich dieses auch in Hexan löst und auch dadurch die FI verringert wird. Das würde den anfänglich schnelleren Abfall der FI des PDAM direkt nach der Zugabe erklären. Ein neuer Peak wurde nicht gefunden, dies wird im Differenzspektrum (Abb. 10.7) deutlich.

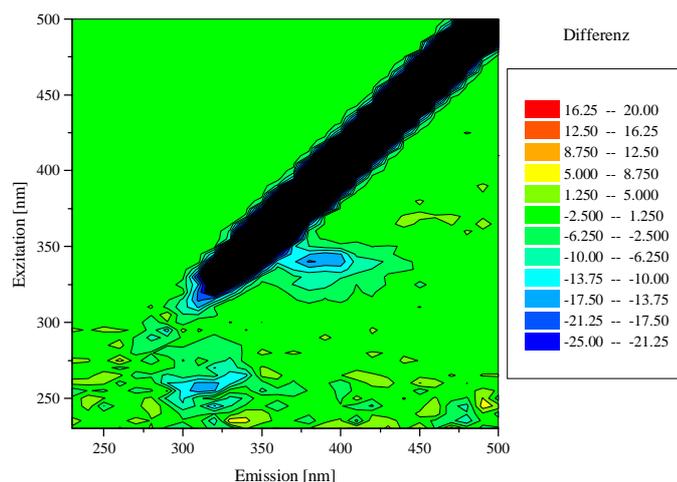


Abb. 10.7: Differenzspektrum (466 min – 207 min) bei Reaktion des Sub (2) mit PSL in KPP/Hexan

Im nächsten Abschnitt der Derivatisierungsuntersuchungen wird die Reaktion auf Kohlendioxid übertragen.

### 10.3.1.3 Die Derivatisierung mit PDAM in überkritischem Kohlendioxid

Die Reaktion findet in der in Abbildung 4.4 (Kap. 4.2.3) skizzierten Anlage statt. Allerdings wird der Reaktor waagrecht gelegt, da hier nur in der Pufferphase gemessen werden soll. Um das Quarzglas vollständig mit KPP zu bedecken, müssen 40 ml PDAM-Lösung ( $2,4 \cdot 10^{-6}$  molar) verwendet werden. Nachdem 250 mg PSL und 75 mg Sub (2) zu der Reaktionslösung gegeben worden sind, wird der Reaktor verschlossen, hingelegt und sofort mit der Fluoreszenzmessung begonnen. Der Druck beträgt während des Versuches ca. 93 bar. Das Substrat bzw. die Säure werden bei einem Wellenlängenpaar von  $E_m/E_x = 310/275$  nm detektiert. Ein Differenzspektrum (240 min – 2 min) ist in Abbildung 10.8 und der FI-Verlauf in Abbildung 10.9 dargestellt. Der Säure- bzw. Substratpeak ist aufgrund des  $SCCO_2$ -Einflusses deutlich zur Streubande hin verschoben.

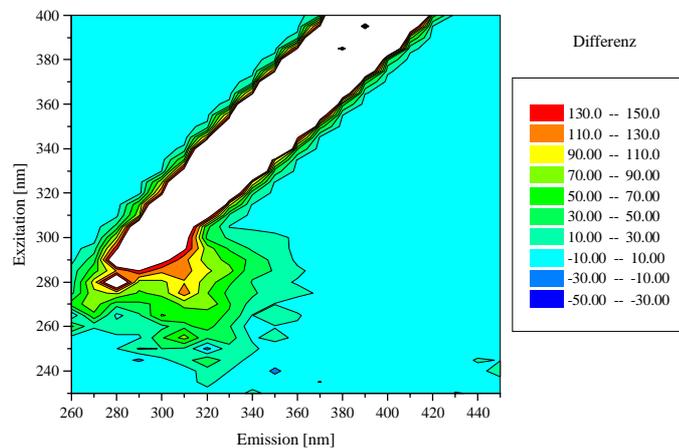


Abb. 10.8: Differenzspektrum (240 min – 2 min) der Katalyse mit PSL in  $SCCO_2$

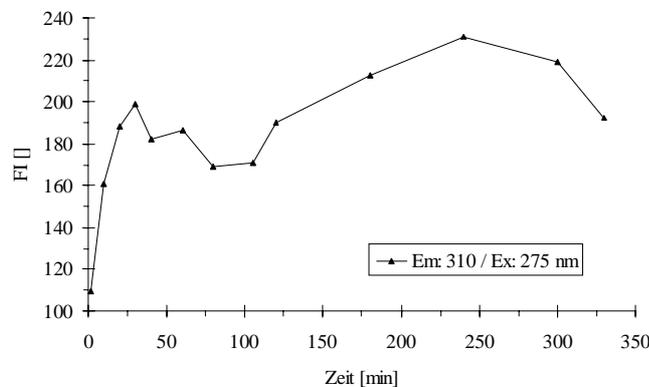


Abb. 10.9: FI-Verlauf bei  $E_m/E_x = 310/275$  nm

Zunächst steigt die FI von 109 innerhalb der ersten 30 Minuten auf 199 an. Danach ist bis zur 115. Minute ein Abfall zu beobachten, der nicht zu erklären und wahrscheinlich auf Lösemittel- und Temperatureffekte zurückzuführen ist. Danach steigt die FI kontinuierlich an, um dann nach 240 Minuten von 231 auf 192 wieder abzufallen. Das ist wie folgt zu erklären: Zunächst wird sehr schnell ein Säureenantiomer produziert, das ausschlaggebend für den ersten FI-Anstieg ist. Das Substrat trägt nicht zur Fluoreszenz bei, da davon ausgegangen wird, daß es fast vollständig in der  $\text{SCCO}_2$ -Phase gelöst ist. Es erfolgt der langsame Anstieg bis zur 240. Minute aufgrund der auch auftretenden Umsetzung des zweiten, nicht bevorzugten Enantiomers. Gleichzeitig wird die produzierte Säure bereits von PDAM abgefangen. Nach vier Stunden ist die Reaktion nahezu abgeschlossen, nur die Säure wird weiter derivatisiert. In den entsprechenden Umsatzverläufen mit der PSL wurde festgestellt, daß 50 % Umsatz teilweise bereits nach 3,1 Stunden vorlagen und dieser danach aufgrund der Reaktion des weniger bevorzugten Enantiomers nur noch sehr langsam fortschritt (Kap. 9.1). Hier wird nach Reaktionsabbruch eine Probe entnommen, aufgearbeitet und analysiert. Dabei wurden Enantiomerenüberschüsse von 90,5 % für das Substrat und 87,9 % für das Produkt bei übereinstimmenden 50,73 % Umsatz und einer Enantioselektivität von 48,4 bestimmt. Es kann also davon ausgegangen werden, daß, wie vermutet, die Reaktion nach knapp vier Stunden stagniert und nur noch die Säure von PDAM abgefangen wird (Verringerung der FI). Im Gegensatz zu den vorigen Derivatisierungsreaktionen verläuft die Reaktion mit dem Fluorophor hier sehr langsam. Da im Differenzspektrum kein PDAM-Peak gefunden wird, liegt die Vermutung nahe, daß sich das unpolare 1-Pyrenyldiazomethan in  $\text{SCCO}_2$  löst und sich aufgrund einer jetzt auftretenden Zwei-Phasen-Reaktion die Derivatisierung durch Stoffübergangsphänomene verlangsamt. Die Löslichkeit des PDAM in  $\text{SCCO}_2$  wurde in einem Referenzversuch bestätigt. Dazu wurde eine  $1,2 \cdot 10^{-5}$  molare PDAM-Lösung in KPP unter  $\text{SCCO}_2$  gesetzt und die FI der wäßrigen Phase bestimmt (Abbildung 10.10).

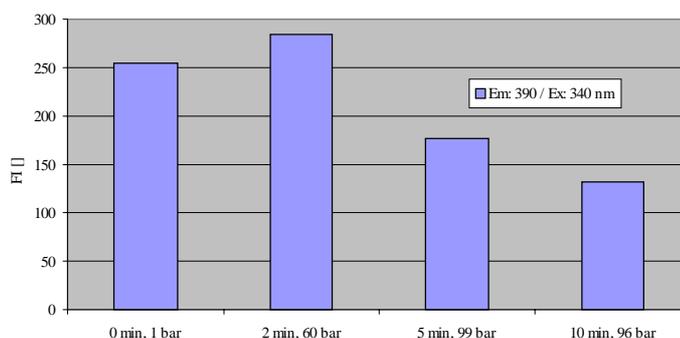


Abb. 10.10: Die Fluoreszenzintensität von PDAM in  $\text{SCCO}_2$  in Abhängigkeit vom Druck und Zeit

Bereits nach zehn Minuten ist die FI des PDAM um 50 % auf 131,7 gefallen. Damit ist bewiesen, daß sich PDAM in  $\text{SCCO}_2$  löst.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Verfolgung der Reaktion in  $\text{SCCO}_2$  mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie möglich ist. Dabei führen weniger die Derivatisierungsstrategien aufgrund der ebenfalls unterschiedlichen Löslichkeiten des Fluorophors und der Produktsäure und die damit auftretenden Reaktionslimitierungen zum Erfolg. Vielmehr wird deutlich, daß die direkte Detektion der Säure in KPP möglich ist, da sich das Substrat fast vollständig in  $\text{SCCO}_2$  löst. Noch vielversprechender ist allerdings die direkte Detektion des Substrats in der Kohlendioxidphase, da die produzierte Säure in  $\text{SCCO}_2$  vollständig unlöslich ist und somit überhaupt keine störenden Einflüsse anderer Reaktionspartner auftreten sollten.

### **10.3.2 Die Reaktionsverfolgung in der $\text{SCCO}_2$ -Phase mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie**

#### **10.3.2.1 Die Löslichkeit von Sub (2) in Abhängigkeit vom Druck**

Zunächst soll die 2D-Fluoreszenzspektroskopie dazu verwendet werden, die Druckabhängigkeit des aromatischen Esters in  $\text{SCCO}_2$  zu bestätigen. Dazu werden 300 mg Sub (2) in 10 ml Kaliumphosphatpuffer im Hochdruckreaktor vorgelegt. Bei 310/260 nm wird die Fluoreszenz in der  $\text{SCCO}_2$ -Phase mit Hilfe sogenannter „Timescale“-Aufnahmen verfolgt. Dabei wird jede Sekunde die FI bei dem oben genannten Wellenlängenpaar bestimmt. Aufgrund einer gerätebedingten Einschränkung sind immer nur Messungen von einer Stunde möglich, so daß direkt nach Beendigung einer Aufnahme die nächste gestartet wird und anschließend die Einzelmessungen zusammengefügt werden müssen. Der Reaktor wird erneut waagrecht gelegt, nur wird in diesem Fall die Glasscheibe aufgrund des geringen KPP-Volumens nicht durch Puffer bedeckt. So ist in diesem Fall eine ausschließliche Detektion in der Kohlendioxidphase gewährleistet. Bei jeder Timescaleaufnahme wird der Druck erhöht. Der genaue Zeitpunkt wird in Abbildung 10.11 aus Übersichtsgründen nicht eingezeichnet, sondern nur das entsprechende Druckintervall skizziert.

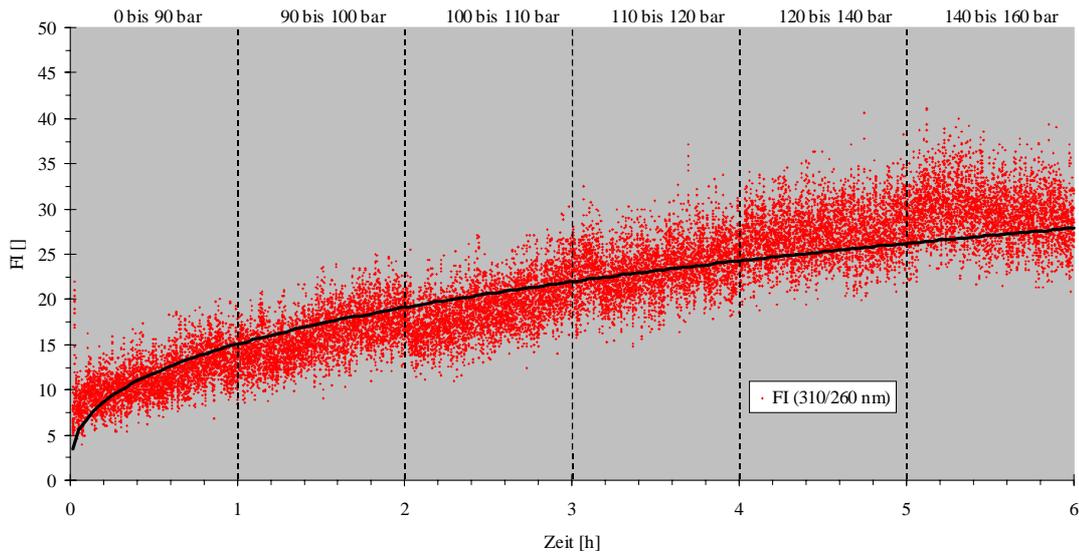


Abb. 10.11: Löslichkeitsverlauf von Sub (2) in SCCO<sub>2</sub>

Die Änderung der FI und damit die Änderung der Löslichkeit mit dem Druck wird deutlich. Im Intervall 100 bis 110 bar beträgt die mittlere FI 22,3, im Bereich zwischen 140 und 160 bar bereits 30,5. Die Löslichkeit nimmt also um ca. 36,8 % zu. Die Detektion des Substrats in SCCO<sub>2</sub> ist möglich, dieses wird jetzt direkt in einer lipasekatalysierten Hydrolyse ausgenutzt.

### 10.3.2.2 Eintopf-Hydrolyse mit PSL in SCCO<sub>2</sub> mit integrierter Fluoreszenzanalytik

In 20 ml KPP werden 500 mg PSL und 150 mg Substrat vorgelegt. Es erfolgt sofortiger Verschluss des Reaktors mit anschließender Spektrenaufnahme. In diesem Fall werden aufgrund der langen Beobachtungsdauer keine Timescaleverläufe aufgenommen, sondern die FI direkt aus den Spektren bestimmt. Diese werden anfänglich alle zwei, später dann alle 20 Minuten und zuletzt jede Stunde aufgenommen. Das Gemisch wird bei 800 U/min gerührt. In Abbildung 10.12 ist der FI-Verlauf bei Em/Ex = 310/260 nm und der entsprechende Druck dargestellt.

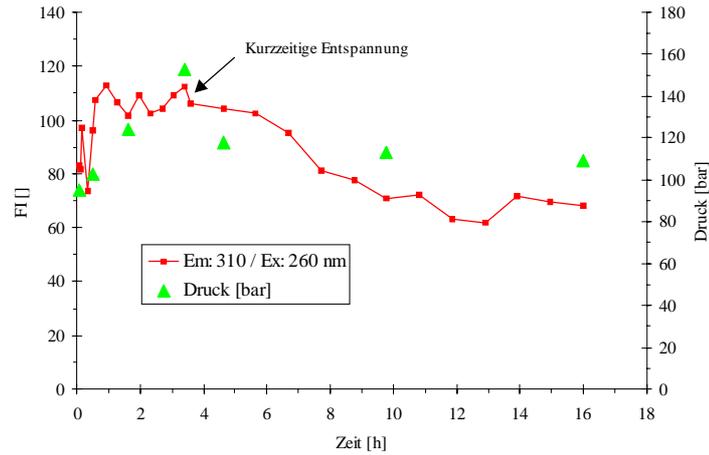


Abb. 10.12: FI-Verlauf des Sub (2) in SCCO<sub>2</sub> bei der Hydrolyse mit PSL

Zunächst steigt die FI von ca. 80 bis 90 auf ungefähr 115 an. Das ist mit einem Druckanstieg bis auf 150 bar aufgrund starker Temperatureffekte des kalt einströmenden Kohlendioxids in den Reaktor zu erklären. Aus diesem Grund wurde nach 3,5 h bis auf ca. 110 bar entspannt, wodurch Substrat verloren geht und die FI um einen Wert von ca. 8 absinkt. Der weitere Abfall, beginnend nach ca. 4 h, ist mit der Hydrolyse des Esters zu erklären. Nach 5,5 h Stunden beträgt die FI 102, zum Ende (16 h) fällt sie auf 66 ab. Das korreliert mit dem nach Reaktionsabbruch bestimmten Umsatz von 52,22 % ( $ee_S = 91,5\%$ ,  $ee_P = 83,8\%$ ,  $E = 36,2$ ). Der Abfall der FI wird auch im Differenzspektrum nach 16 h (Abb. 10.13) deutlich.

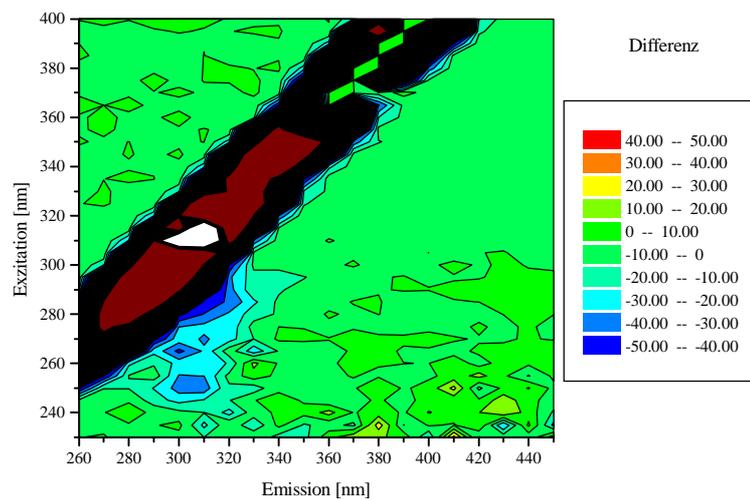


Abb. 10.13: Differenzspektrum (16 h – 0,16 h)

Um die Druckschwankungen aufgrund von Temperatureffekten zu minimieren, wird der Versuch mit auf 45°C vortemperierten Lösungen wiederholt. Dabei wird zusätzlich die Substratmenge auf 300 mg erhöht. Aus den Spektren wird hier die FI des Substrats für

Em/Ex = 310/260 nm bestimmt und in Abbildung 10.14 gegen die Zeit aufgetragen. Zusätzlich wird auch der Druckverlauf skizziert.

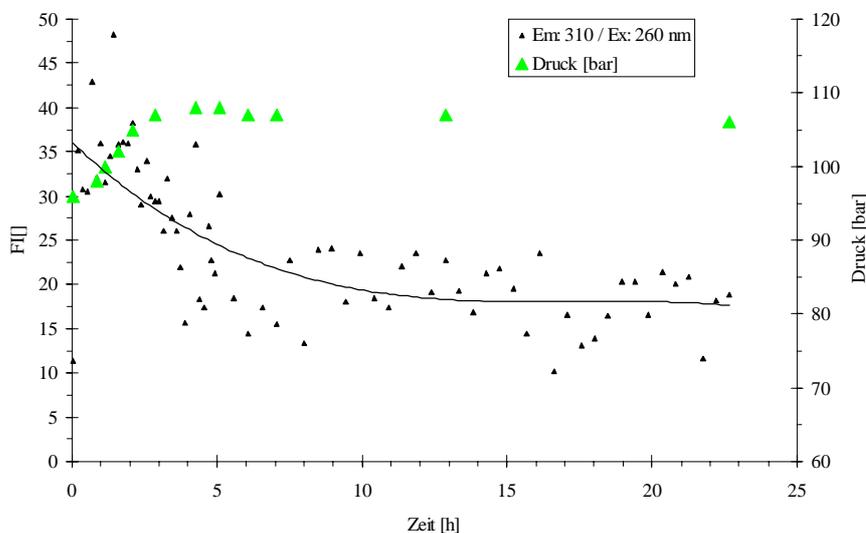


Abb. 10.14: FI-Verlauf des Sub (2) in SCCO<sub>2</sub> bei der Hydrolyse mit PSL

Über den gesamten Reaktionszeitraum von 22,7 h bleibt der Druck annähernd konstant bei 105 - 107 bar. Nur innerhalb der ersten fünf Stunden steigt er von 96 auf 105 bar an. Damit sind die Druckschwankungen wesentlich geringer als im Versuch davor. Die FI steigt aufgrund des Substratlösungsprozesses von ca. 8 auf 35 innerhalb der ersten 25 Minuten an. Danach fällt sie mit einigen Ausnahmen kontinuierlich ab und beträgt nach ca. 4 h nur noch ca. 17 bis 20. Das entspricht einer erwarteten Abnahme um 50 %, d. h. das bevorzugte Enantiomer ist umgesetzt, die Hydrolyse des zweiten Esterenantiomer schreitet nur langsam voran. Nach Reaktionsabbruch beträgt die FI immer noch ca. 16 bis 18. Bei der Dekompression wird eine Probe aus dem Reaktor entnommen und aufgearbeitet. Der Umsatz wird bei ee-Werten von 96,8 % für das Substrat und 76,8 % für das Produkt zu 55,3 % bestimmt. Die Enantioselektivität beträgt 27,8.

Dieses Experiment zeigt bereits deutlich, daß eine on-line Beobachtung des Reaktionsverlaufs anhand der Detektion des Substratabbaus in der SCCO<sub>2</sub>-Phase möglich ist. Um die Schwierigkeiten bei der Druckeinstellung aufgrund von Löslichkeits- und Temperaturphänomenen weiter zu minimieren, wird der Versuchsaufbau modifiziert.

### 10.3.2.3 Die Beobachtung der Reaktion mit definierten Startbedingungen

Da in den vorigen Versuchen alle Reaktionskomponenten bereits unter Normalatmosphäre in Berührung traten, begann die Reaktion bereits vor der eigentlichen Detektionsphase. Um die Reaktion bei definiertem Druck zu starten, wird das Enzym außerhalb des Reaktors plaziert und erst später dazugegeben. Dadurch wird auch der genaue Startzeitpunkt festgelegt. Abbildung 10.15 skizziert den neuartigen Aufbau.

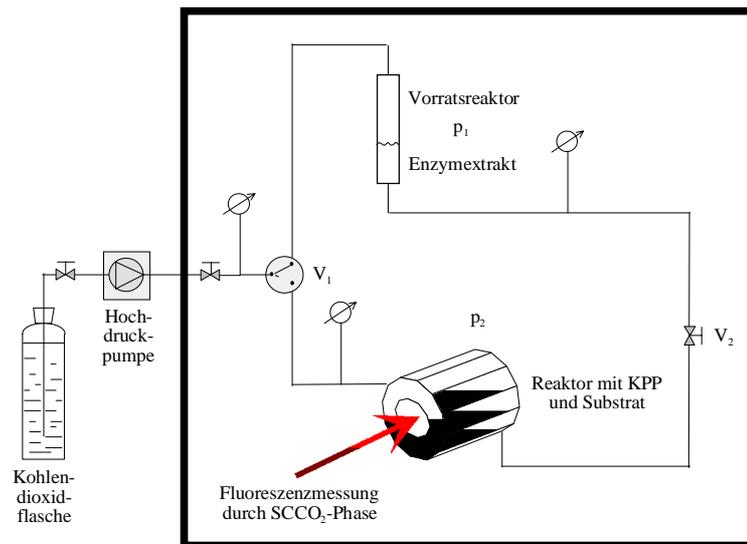


Abb. 10.15: Versuchsaufbau mit Vorratsreaktor und Fluoreszenzdetektion

Über ein Zwei-Wege-Ventil  $V_1$  können der Vorratsreaktor mit Enzymextrakt und der Reaktor mit KPP und Substrat unter Druck gesetzt werden. Dabei bleibt das Nadelventil  $V_2$  geschlossen. Sobald die FI und der Druck  $p_2$  im Reaktor konstant sind, wird  $V_2$  geöffnet. Der Enzymextrakt strömt unter der Voraussetzung, daß  $p_1 > p_2$  ist, in den Reaktor und die Reaktion wird gestartet. Ein ebenfalls im Vorratsreaktor eingebautes Glas erlaubt die visuelle Kontrolle der Extraktzugabe. Das Volumen des Vorratsreaktors wird mit 6 ml wesentlich kleiner als das des eigentlichen Reaktors gewählt, damit der Druck im Reaktionsraum nach der Zugabe nicht allzu stark ansteigt. Die Kapillare, die vom Extraktgefäß in den eigentlichen Reaktionsraum führt, wird im hinteren Bereich des Reaktors angeschlossen, um ein Spritzen von KPP an die Quarzglasscheibe zu verhindern. Die Abnahme der Substratfluoreszenzintensität erfolgt durch Aufnahme von Timescaleverläufen bei  $Em/Ex = 310/260$  nm. Aus Gründen der Übersicht wird ab hier nicht mehr der gesamte Timescaleverlauf dargestellt, sondern nur noch ein Mittelwert der FI über 5 Sekunden zu bestimmten Zeiten. Der Gesamtverlauf setzt sich erneut aus einzelnen Timescales zusammen.

Es werden insgesamt 20 ml KPP, 530 mg Enzym und 400 mg Substrat eingesetzt. Die Extrakterstellung erfolgt durch dreistündiges Schütteln des Enzyms in 4 ml Puffer. Danach wird der Überstand abzentrifugiert und in den Vorratsreaktor gegeben. Unlösliche Restbestandteile werden verworfen. Nach 6,5 h bleibt der Druck mit 115 bar und einer FI von ca. 53 annähernd konstant. Der Extrakt wird unter 150 bar gestellt. Daraufhin wird  $V_2$  geöffnet und somit die Reaktion gestartet. Dabei ist zu beobachten, daß sich der Vorratsreaktor komplett leert. Im Reaktionsraum steigt der Druck durch die Zugabe des Extrakts sprunghaft auf 119 bar an und erhöht sich trotz der abgewandelten Versuchsdurchführung im Laufe der Zeit noch auf 122 bar. Die FI steigt ebenfalls bis zur neunten Stunde auf 61,5 an. Danach ist deutlich ein Abfall zu beobachten (Abb. 10.16).

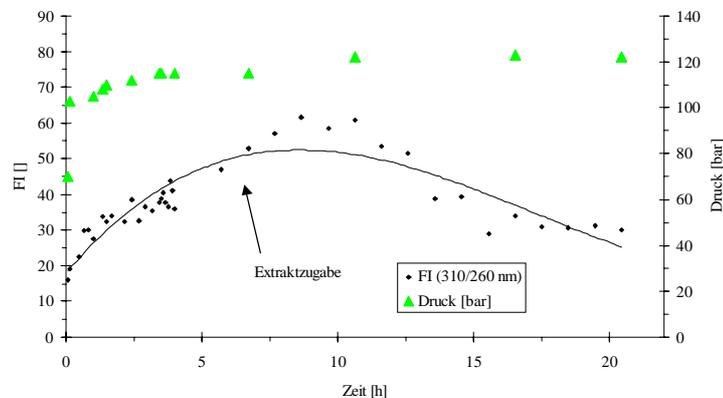


Abb. 10.16: FI-Verlauf des Substratabbaus in  $SCCO_2$  mit einem PSL-Enzymextrakt

In Vorversuchen (nicht dargestellt) wurde festgestellt, daß ein so hergestellter Enzymextrakt zu Aktivitätseinbußen von ca. 60 - 70 % im Vergleich zur Aktivität des „rohen“ Enzyms führt. Damit ist erklärt, warum die FI im Vergleich zu den vorigen Versuchen nur langsam abfällt und erst nach ca. 15,5 h (entsprechend einer Reaktionszeit von 9 h) mit 31 konstant bleibt. Somit sinkt die FI erneut um die hypothetischen 50 %. Auch hier bestätigt die nach Reaktionsabbruch entnommene Probe, daß der Umsatz 48,11 % ( $ee_S = 84,1$  % und  $ee_P = 90,7$  %) beträgt und die FI demnach mit der Umsetzung genau eines Enantiomers korreliert. Gleichzeitig wird eine hohe Enantioselektivität von 54,6 bestimmt. Abbildung 10.17 zeigt das Differenzspektrum nach neun Stunden Reaktionszeit. Die Abnahme der FI des Substrats ist deutlich zu erkennen.

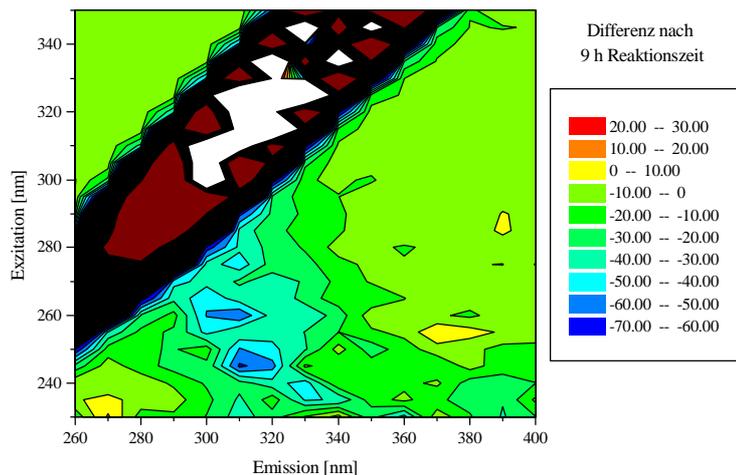


Abb. 10.17: Das Differenzspektrum der Hydrolyse mit PSL-Extrakt in SCCO<sub>2</sub> (15 h – 6 h (Extraktzugabe))

Im nächsten Kapitel wird der Fluoreszenzverlauf für das Substrat bei einer Source-Trap-Hydrolyse verfolgt. Es soll beobachtet werden, ob anhand des Fluoreszenzintensitätsverlaufs der anfängliche Löse- und Transportprozeß und der spätere Reaktionsverlauf beobachtet werden kann. Zusätzlich werden während der Reaktion Proben entnommen, aufgearbeitet und off-line gaschromatographisch analysiert.

#### 10.3.2.4 Source-Trap-Hydrolyse mit Fluoreszenzdetektion und Enantiomerenanalytik

Im senkrecht stehenden Source-Trap-Reaktor wird durch die SCCO<sub>2</sub>-Phase die Fluoreszenzintensität bei  $\lambda = 310/260$  nm verfolgt. Dadurch geht der Strahlengang zuerst durch die Kohlendioxidphase und dann durch den in dem Trap-Gefäß vorgelegten KPP-Puffer. Demnach wäre es möglich, daß auch produzierte Säure detektiert wird und sich die FI demnach additiv aus der des Substrats und der Säure zusammensetzt. In einem Vorversuch wurde daher reine Säure in 20 ml KPP vorgelegt, unter SCCO<sub>2</sub> gesetzt und die Fluoreszenzintensität durch beide Phasen gemessen. Dabei wurde keine relevante Fluoreszenz beobachtet. Das bedeutet, daß die Säure durch die SCCO<sub>2</sub>-Phase nicht detektiert wird. Wahrscheinlich ist der Weg innerhalb des Reaktors zu lang. Zusätzlich treten Brechungseffekte an der Reaktorwand auf, die zu einer FI-Abschwächung führen können. Demnach ist auch mit diesem Versuchsaufbau eine ausschließliche Detektion des Substrats in der Kohlendioxidphase möglich.

Da hier gleichzeitig GC-Proben entnommen werden sollen, muß die in Kap. 7.5 in Abb. 7.10 skizzierte Analge verwendet werden, weil die Fluoreszenzmessung durch das sich im Deckel befindliche Quarzglas stattfinden muß. In die Source-Vorlage werden 150 mg Substrat und in

das Trap-Gefäß 500 mg PSL zu 20 ml KPP gegeben. Der Startpunkt der Reaktion wird mit Erreichen des überkritischen Zustands festgelegt. Dabei erfolgt die Fluoreszenzmessung bereits nach Verschließen des Reaktors durch Timescaleaufnahmen bei  $\text{Em/Ex} = 310/260 \text{ nm}$ . Die Reaktion wird über zwei Tage durchgeführt. Allerdings sind bereits nach einem Tag keine Änderungen mehr zu beobachten. Deswegen wird der Reaktionsverlauf in Abbildung 10.18 nur bis zur 22. Stunde dargestellt. Der erste Teil der Grafik setzt die FI in Relation zum Druck, im zweiten Teil dagegen wird die FI neben dem Umsatz und der gemessenen Substratenantiomerenüberschüsse dargestellt.

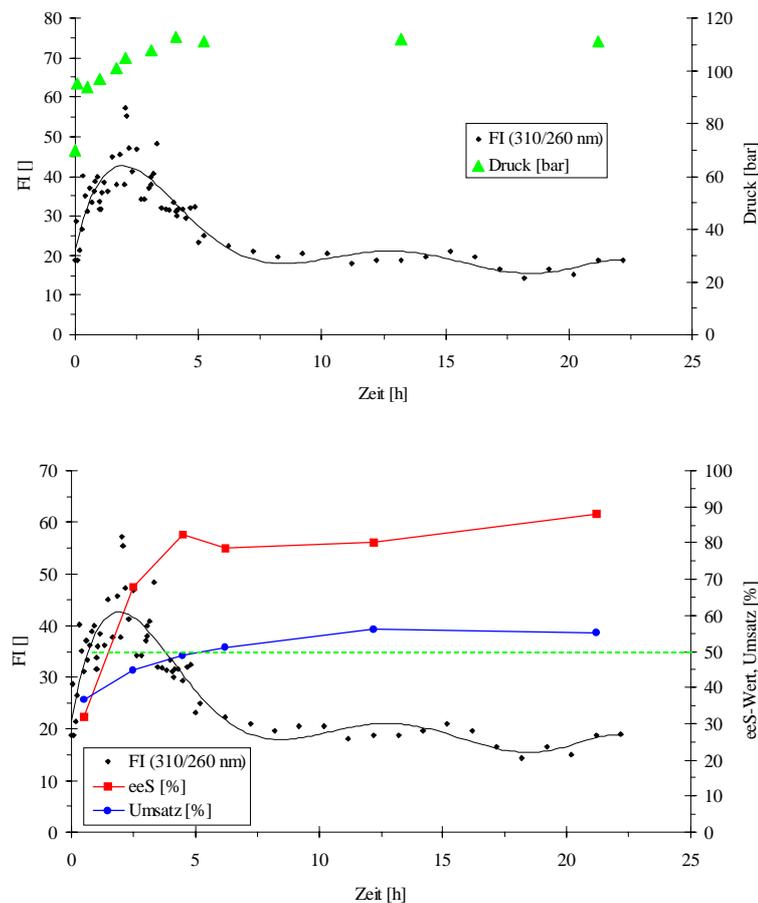


Abb. 10.18: Reaktions- und FI-Verläufe der Source-Trap-Hydrolyse

Anhand des FI-Verlaufes ist gut zu erkennen, wie sich zunächst das Substrat in  $\text{SCCO}_2$  löst und anreichert. Dabei ist ein schneller Transport zur Trap gewährleistet, da bereits nach 0,5 h ein Umsatz und demnach Produktbildung beobachtet wird. Zunächst wird mehr Substrat gelöst als abreagiert, da die FI weiter ansteigt. Ein Maximum wird nach ca. 2 h mit einem Wert von 57 durchlaufen. Danach fällt die FI kontinuierlich ab. Im Moment des Maximums ist entweder kein Substrat mehr in der Source vorhanden oder ein weiterer Löseprozeß ist genauso schnell wie die Reaktion zum Produkt. Danach überwiegt die Reaktion und die FI

fällt ab. Auch hier zeigt sich anhand des Umsatzverlaufs, daß die FI bei 50 % Umsatz ca. um die Hälfte abgenommen hat (von ca. 55 auf 25). Dies ist nach ungefähr 5,5 h der Fall. Danach bleiben Umsatz,  $ee_S$  und FI annähernd konstant. Die Enantioselektivität wird zum Reaktionsabbruch zu 22,2 bestimmt.

Es zeigt sich, daß mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion des Substrats in der  $SCCO_2$ -Phase eine on-line Reaktionsverfolgung sowie qualitative Aussagen über den Katalyseverlauf möglich sind. Diese korrelieren mit den über off-line Daten bestimmten Umsätzen der Reaktion.

## 11 Zusammenfassung und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden lipasekatalysierte Hydrolysen von zwei 3-Hydroxyestern in überkritischem Kohlendioxid untersucht. Als Substrate wurden der aliphatische 3-Hydroxy-4-pentensäureethylester (Sub (1)) und der aromatische 3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester (Sub (2)) untersucht. Ziel war es, die enzymatische Racematspaltung auf  $\text{SCCO}_2$  zu übertragen und in bezug auf Umsatz, Enantiomerenüberschüsse und Enantioselektivität zu optimieren. Die ausgezeichneten Eigenschaften des Kohlendioxids sollten dabei für eine gleichzeitige Substrat-Produkt-Separation aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten beider Stoffklassen in  $\text{SCCO}_2$  ausgenutzt werden.

Aus diesem Grund wurden zunächst Löslichkeitsversuche der Substrate in  $\text{SCCO}_2$  durchgeführt und anschließend die entsprechenden Verteilungskoeffizienten im Zwei-Phasen-System  $\text{SCCO}_2/\text{KPP}$  bestimmt. Für beide Ester wurden hohe, vom Druck abhängige Löslichkeiten in Kohlendioxid ermittelt. Die Verteilungskoeffizienten wurden bei Drücken über 100 bar zu Werten  $> 10$  bestimmt. Dabei ist die Löslichkeit von Sub (2) in KPP deutlich schlechter als die des aliphatischen Esters. Die produzierten Säuren waren aufgrund einer Deprotonierung vollständig unlöslich in  $\text{SCCO}_2$ . Auch bei pH-Werten zwischen 5 und 5,5 lag nur ein geringer Teil der protonierten Säure vor, der theoretisch in Kohlendioxid löslich sein könnte. Das Vorliegen des Säureanions und ein Wasserüberschuß führten zu einer irreversiblen Reaktion, bei der keine Nebenreaktionen festgestellt worden sind. Auch kam es unter den gewählten Versuchsbedingungen zu keinen Reracemisierungen, so daß die lipasekatalysierte Hydrolyse für einen Einsatz in  $\text{SCCO}_2$  in Frage kam.

Für das Substrat (1) wurde zunächst ein Enzymscreening durchgeführt, um eine Lipase zu finden, die die Hydrolyse schnell und mit geeigneter Enantioselektivität katalysiert. Dabei wurden 17 Enzyme zunächst in Hexan bei verschiedenen pH-Werten eingesetzt. Nach dieser Vorauswahl erfolgten erste Experimente in  $\text{SCCO}_2$ . Für eine hoch stereoselektive Reaktion wurde allerdings kein Enzympräparat gefunden, der höchste Wert von 2,6 wurde für die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* (CVL) bei Enantiomerenüberschüssen von 36,6 % bei 50 % Umsatz gefunden. Um das entwickelte Hochdruckverfahren zu testen, wurden dennoch Folgeuntersuchungen mit der CVL durchgeführt.

Zunächst erfolgten Aktivitätsuntersuchungen des Enzyms in Abhängigkeit von der Temperatur, dem Druck, dem Puffersystem und dem pH-Wert. Maximale spezifische Aktivität wurde in KPP bei einer Temperatur von 35°C und einem pH-Wert von 7,5 bis 9 gefunden. Der Druck hatte keinen großen Einfluß. Liegt das Enzym in KPP gelöst vor, so ist der Aktivitätsverlust nach 22 h mit 52 % in SCCO<sub>2</sub> sogar geringer als unter Normalatmosphäre (93 %). Hier wurde eine Stabilisierung des Enzyms durch die Ausrichtung an der Phasengrenzfläche postuliert.

Daraufhin sollte die eigentliche Hydrolyse in SCCO<sub>2</sub> durch Parametervariation wie Enzym- bzw. Substratkonzentration optimiert werden. Aufgrund der ohnehin geringen Enantioselectivität zeigte die eingesetzte Enzymmenge keine signifikanten Änderungen in Selektivität und Reaktionsverhalten. Die Variation der Substratmenge führte ebenfalls zu keiner Steigerung, es wurde lediglich erkannt, daß im Rahmen der Meßgenauigkeit eine Erhöhung der Substratkonzentration zu geringeren Enantioselectivitäten und längerer Reaktionszeit führten, was auf eine Substrathemmung schließen läßt.

Als letztes wurde die Hydrolyse nach der Source-Trap-Methode durchgeführt. Diese wurde etabliert, um durch räumliche Trennung der Reaktanten das Transportvermögen des Kohlendioxids für eine spätere prozeßtechnische Separation der Enantiomere bzw. von Verunreinigungen oder Nebenprodukten zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß es zu keiner Einschränkung in der Reaktion kam. Nachdem sich das Substrat in SCCO<sub>2</sub> gelöst hatte, erfolgte der Transport zur Puffer-Enzym-Phase mit anschließender Katalyse.

Insgesamt wurde keine enantioselective Hydrolyse mit Sub (1) erzielt. Auch andere aliphatische Ester zeigten ähnlich geringe Enantioselectivitäten.

Daraufhin wurde das aromatische Substrat in analogen Untersuchungen eingesetzt. Als Enzym eignete sich für die Hydrolyse die Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (PSL). Obwohl das Enzym bei 45°C und pH 5,5 hohe Aktivitätseinbußen im Vergleich zu den Optimalwerten bei 62°C und pH = 8 erlitt, zeigte sich in Vorversuchen in Hexan (45°C; pH = 5,5) bereits eine relativ hohe Enantioselectivität von 35 bis 45.

Zusätzlich wurden noch die CVL und die *Porcine pancreas* Lipase (PPL) eingesetzt. Diese zeigten aber geringere Enantioselectivitäten und längere Reaktionszeiten als die PSL. Die PPL wäre aber für weitere Untersuchungen mit anderen Substraten in überkritischem Kohlendioxid durchaus interessant, da ihr Temperaturaktivitätsoptimum bei 45°C liegt.

In ersten Eintopf-Versuchen in SCCO<sub>2</sub> wurden mit der PSL Enantioselectivitäten von ca. 40 (ee ≈ 83 %) bei einer Reaktionszeit von ungefähr 15 Stunden bis zum 50 %igen Umsatz erzielt. Diese lagen wesentlich höher als die mit der CVL erzielten Werte für Sub (1). 50 %

Umsatz wurde als Reaktionskriterium gewählt, da bei enantioselektiven Reaktionen dann das bevorzugte Enantiomer umgesetzt sein sollte. Eine Enantioselektivität von  $> 20$  bedeutet, daß zumindest entweder das Substrat oder das Produkt enantiomerenrein dargestellt werden kann. Das wurde in zwei Source-Trap-Ansätzen bestätigt.

Dort konnten in beiden Fällen erstmals Substratenantiomerenüberschüsse in der überkritischen Phase von über 98 % erzielt werden. In einem Versuch betrug der  $ee_S$ -Wert sogar 99,9 % in  $SCCO_2$ . Die Enantioselektivitäten lagen dagegen aufgrund niedrigerer  $ee_S$ -Werte ( $\approx 77 - 82$  %) in der Pufferphase zwischen 20 und 28. Nach Dekompression wurde in der Source noch Substrat gefunden, es kam zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen abreagierendem und in Lösung gehendem Substrat. Aufgrund des Enantiomerenüberschusses von 99,9 % kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß das bevorzugte Enantiomer abreagiert ist, und daß sich im Gegensatz zur Eintopf-Reaktion das zweite Enantiomer angereichert hat. Im Vergleich zur Eintopf-Reaktion zeigte die GC-Analyse (Interner Standard), daß hohe Substratenantiomerenüberschüsse von  $> 90$  % erst erzielt worden sind, wenn die Reaktion schon weit fortgeschritten war. Für eine Separation des Enantiomers wäre die Ausbeute zu gering gewesen. Das nicht bevorzugte Substratenantiomer wird in der Source-Trap-Reaktionsführung langsamer umgesetzt als in der Eintopf-Reaktion. Für eine prozeßtechnische Optimierung bietet die Source-Trap-Methode gute Ansätze, für die reaktionstechnische Optimierung werden hingegen weitere Eintopf-Reaktionen durchgeführt, da dort höhere Enantioselektivitäten erzielt worden sind.

Die Optimierung erfolgte durch die Variation einzelner reaktionsrelevanter Parameter wie Substratkonzentration, Temperatur und Druck. Die höchste Enantioselektivität für die PSL-katalysierte Hydrolyse von Sub (2) von 66,3 wurde bei Einsatz von 500 mg Enzym und 200 mg Substrat erzielt. Der Versuch wurde bei ca. 100 bar und 45°C durchgeführt. Bei der Untersuchung des Druckeinflusses wurde ein Maximum der Enantioselektivität bei ca. 103 bar durchlaufen. Bei höheren Drücken wird eine Inaktivierung der PSL durch Carbamat-Bildung und Absinken des pH-Werts postuliert, die einer größeren Löslichkeit des Substrats und damit verbundener erhöhter Reaktivität aufgrund einer vergrößerten Phasengrenzfläche entgegenwirkt. Bei Drücken unter 100 bar wird eine Carbamatbildung erschwert, allerdings steht weniger Substrat in der  $SCCO_2$ -Phase zur Verfügung. Die zunehmende Löslichkeit mit steigendem Druck wurde über Fluoreszenzmessungen bestätigt. Aus den Untersuchungen zur Druckvariation wird weiterhin deutlich, daß  $SCCO_2$  als Lösemittel die Katalyse begünstigt. Das Substrat bildet analog zu den Aktivitätsmessungen mit Tricaprylin zwar selbst die

notwendige zweite Phase, doch zeigt ein entsprechender Referenzversuch ohne Kohlendioxid geringere Enantioselektivität ( $E = 46,9$ ) bei allerdings kürzerer Reaktionsdauer als bei den Meßreihen in überkritischem Kohlendioxid.

Die Optimierungsversuche bei verschiedenen Temperaturen zeigten, daß die in den meisten Untersuchungen gewählte Temperatur von  $45^{\circ}\text{C}$  bereits die optimale war.

Bei Betrachtung der Enantioselektivitäts-Umsatz-Verläufe wird deutlich, daß die Enantioselektivität über den Reaktionsverlauf nicht konstant war, sondern ab ca. 50 % Umsatz fiel. Hier wurde eine Substrat- oder Produkthemmung angenommen, die um so deutlicher wurde, sobald das bevorzugte Enantiomer abreagiert war. Weiterhin sank die Enantioselektivität aufgrund des nahezu vollständig abreagierten bevorzugten Esterenantiomers.

Kinetische Betrachtungen waren bei allen Untersuchungen schwierig, da aufgrund der Zwei-Phasen-Reaktion Stoffübergangsprozesse eine entscheidende Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden negative Werte für  $K_M$  bzw.  $v_{\max}$  gemessen. Allerdings gehorchte die Katalyse an sich einer Michaelis-Menten-Kinetik mit Überschußkomponente.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß für die lipasekatalysierte Hydrolyse von Sub (2) in einer Eintopf-Reaktion in  $\text{SCCO}_2$  die höchste Enantioselektivität bei  $45^{\circ}\text{C}$ , 100 bar und einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 2,5 : 1 erzielt wird. Abbildung 11.1 faßt schematisch die verschiedenen Optimierungsstrategien für eine festgelegte Reaktionsführung in bezug auf die Enantioselektivität schematisch zusammen.

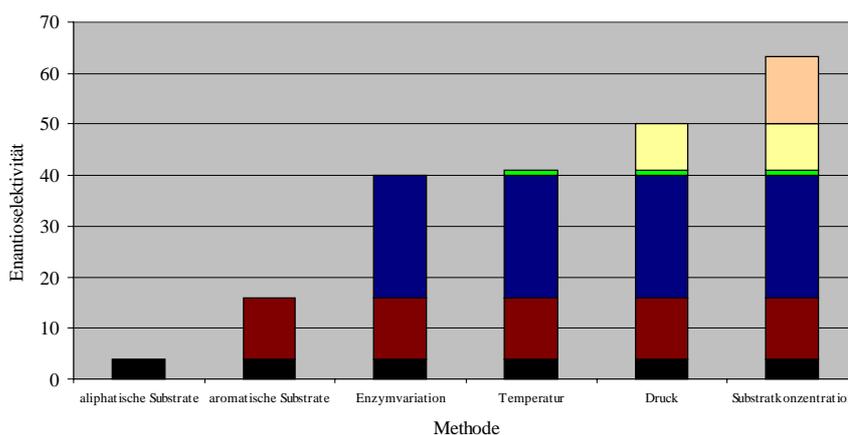


Abb. 11.1: Optimierungsstrategien: Die Abhängigkeit der Enantioselektivität von den Prozeßparametern

Eine Methode zur on-line Prozeßbeobachtung der Katalyse mit PSL konnte etabliert werden. Neben der Möglichkeit, die Reaktanten über UV-Absorptionsspektren zu bestimmen, war die

Entwicklung einer Fluoreszenzmethode erfolgreich. Die UV-Analytik scheiterte letztendlich nur an einer Gerätelimitierung, prinzipiell konnten Hydroxyester in SCCO<sub>2</sub> detektiert werden. Allerdings war es dazu nötig, die Kohlendioxidphase umzupumpen, und somit in den Reaktionsprozeß einzugreifen. Daher ist die Messung der Fluoreszenz direkt durch eine in den Reaktordeckel integrierten Glasscheibe vorteilhafter, da der Prozeß nicht gestört wird. Die direkte Messung der Substratabnahme in der SCCO<sub>2</sub>-Phase bei Em/Ex = 310/260 nm war möglich und korrelierte mit den entsprechenden Umsatzverläufen.

Anhand dieser Arbeit wird deutlich, daß enzymatische Hydrolysen von 3-Hydroxyestern in SCCO<sub>2</sub> möglich sind. Dabei kann eine integrierte Substrat-Produkt-Separation durchgeführt und analytisch erfaßt werden. Im Vergleich zum Einsatz konventioneller Lösemittel ist die Methode milder und umweltfreundlicher, außerdem werden höhere Enantioselektivitäten erzielt.

## 12 Ausblick

Diese Arbeit bietet trotz der erfolgreichen Optimierung einer enzymatischen Reaktion in SCCO<sub>2</sub> zahlreiche Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen. Zu nennen ist hier ein weiteres Enzymscreening, da die hier untersuchten Enzyme nur einen kleinen Teil der kommerziell erhältlichen Biokatalysatoren darstellen.

Neben natürlichen Quellen bietet es sich mit Hilfe der Gentechnologie an, sowohl vorhandene Enzyme zu verbessern (*Protein Engineering*) als auch neue Lipasen zu kreieren. [Bornscheuer; 1999] dokumentierte die Darstellung einer Esterase durch *Gerichtete Evolution*, die einen Hydroxyester für die Epothilonsynthese umsetzte. Dieser Ester wurde von keinem weiteren herkömmlichen Enzym akzeptiert. Weiterhin sollten auch Immobilisate untersucht werden, die hier bis auf eine Ausnahme nicht verwendet wurden, da zunächst die Funktionalität des Systems geprüft werden sollte. Neben der leichteren Rückgewinnung und der Möglichkeit zum mehrmaligen Einsatz ist es denkbar, daß immobilisierte Enzyme wesentlich unempfindlicher auf den Druck und die Temperatur reagieren.

Weiterhin müßten zusätzliche aromatische Substrate untersucht werden, ob mit ihnen ähnliche oder sogar höhere Enantioselektivitäten erreichbar sind. Auch die genaue Charakterisierung des vermuteten Hemmphänomens müßte erfolgen, um den Prozeß zu optimieren.

Eventuell ließe sich die Löslichkeit des Substrats durch geschickten Zusatz eines geeigneten Modifiers auch bei niedrigeren Drücken als 100 bar verbessern. Das hätte den Vorteil, die druckabhängige Carbamatbildung zurückzudrängen und trotzdem ausreichend Substrat in Kohlendioxid vorliegen zu haben.

Ein technischer Aspekt wäre die Änderung der Reaktionsführung. Es zeigten sich bei den Source-Trap-Versuchen sehr hohe Substratenantiomerüberschüsse. Hier müßte analog zu dieser Arbeit eine Variation der Substratkonzentration, des Drucks und anderer Parameter erfolgen, um die Enantioselektivität zu verbessern. Die Source-Trap-Methode bietet schließlich aufgrund der hohen  $ee_S$ -Werte eine geeignete Methode, das Substratenantiomer optisch rein zu erhalten. Überhaupt wäre es sinnvoll, kontinuierliche Methoden zu untersuchen, da das überkritische Fluid eine vereinfachte Extraktion des Esters durch Druckreduktion im Gegensatz zu herkömmlichen Lösemitteln eröffnet. Eine Möglichkeit bietet die kontinuierliche Zufütterung des Substratracemats mittels SCCO<sub>2</sub> bei konstantem Druck. Am Ausgang des Reaktors würde die Dekompression und das Auffangen des

verbleibenden Substratenantiomers folgen. So erfolgt eine Reaktion mit stetiger Extraktion, wobei beide vom gewählten SCCO<sub>2</sub>-Volumenstrom abhängig wären.

Ein Nachteil der kinetischen Racematspaltung ist, daß das gewünschte Enantiomer bei enantioselektiven Reaktionen nur zu 50 % erhalten wird. Hier bietet sich die Möglichkeit einer „geplanten“ Reracemerisierung an. Das unbedeutende Substratenantiomer müßte entweder chemisch oder durch andere Enzyme wie z. B. Epimerasen wieder racemerisieren. Damit stehen der Hydrolyse erneut 25 % des gewünschten Enantiomers zur Verfügung. Das ließe sich bis zu einem 100 %igen Umsatz weiterführen.

Werden dagegen beide Säureenantiomere für z. B. zwei verschiedene enantiomerenreine Synthesen benötigt, ließe sich Kohlendioxid erneut als Reaktions- und Extraktionsmedium nutzen. In zwei Reaktoren, die miteinander verbunden sind, werden jeweils zwei Enzyme mit entgegengesetzter Stereospezifität gegeben, d. h. Lipase I setzt das R- und Lipase II das S-Substrat um. Wird das Esterracemat jetzt in SCCO<sub>2</sub> vorgelegt und dieses kontinuierlich im Kreislauf umgepumpt, so ließen sich beide reinen Produktenantiomere getrennt in den entsprechenden Reaktoren anreichern. Es zeigt sich, daß das Potential von überkritischem Kohlendioxid noch lange nicht ausgeschöpft ist.

Zum Schluß soll nochmals auf die Analytik eingegangen werden. Bis jetzt war es schwer, das pH-Verhalten von Kohlendioxid unter Druck on-line zu verfolgen. Hier eröffnet ebenfalls die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zusätzliche Möglichkeiten. Analog zu den durchgeführten Derivatisierungsreaktionen mit PDAM wäre es denkbar, dem Reaktionsgemisch ein pH-sensitives Fluorophor zuzusetzen und so den augenblicklich vorherrschenden pH-Wert zu messen. [Tservistas; 1997] schlug vor, einen entsprechenden Fluoreszenzmarker direkt mit dem Enzym zu koppeln, um so Informationen über den pH-Wert direkt in der Enzymhydrathülle zu erhalten.

Zur direkten Reaktionsverfolgung des Substratabbaus wäre eine weitere on-line Methode denkbar, die auf den Fluoreszenz- und UV-Absorptionsmessungen beruht. Wäre es möglich, in den SCCO<sub>2</sub>-Kreislauf anstatt des UV-Photometers einen Fluoreszenzdetektor wie z. B. für die HPLC zu integrieren, ließe sich die Abnahme der Substratfluoreszenz analytisch erfassen.

## 13 Anhang

### 13.1 Abkürzungen und Zeichenerklärung

[ ]	Konzentration eines Stoffes (x)
$\alpha$	Verteilungskoeffizient
$\eta$	Viskosität
$\rho$	Dichte
$\lambda_{EM}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{EX}$	Exzitationswellenlänge
2D	zweidimensional
Abb	Abbildung
b	Schichtdicke Meßzelle
°C	Grad Celcius
c	Konzentration
BMBF	Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie
CSTR	Continous Stirred Tank Reactor; der kontinuierliche Rührkesselreaktor
CVL	<i>Chromobacterium viscosum</i> Lipase
D	Diffusionskoeffizient
Da	Dalton
ee	Enantiomeric Excess; Enantiomerenüberschuß
E	Enantioselektivität oder Enzym
Em	Emissionswellenlänge
EP	Enzym-Produkt-Komplex
ES	Enzym-Substrat-Komplex
EtOH	Ethanol
Ex	Exzitationswellenlänge
FI	Fluoreszenzintensität
Gl	Gleichung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPE	3-Hydroxy-4-pentensäureethylester
HPPE	3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; Hochleistungsflüssig-chromatographie
I	Intensität
$I_0$	Intensität Exzitationslicht
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
KPP	Kaliumphosphatpuffer
MeOH	Methanol
min	Minute
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
p	Druck
P	Produkt
[P]	Produktkonzentration
PDAM	1-Pyrenyldiazomethan

PFR	Plug Flow Reactor; der Kolbenströmungsreaktor
PPL	<i>Porcine pancreas</i> Lipase
PSL	<i>Pseudomonas cepacia</i> Lipase; früher: <i>Pseudomonas species</i> Lipase
S	Substrat
[S]	Substratkonzentration
sek	Sekunde
SCCO <sub>2</sub>	Supercritical CO <sub>2</sub> = überkritisches Kohlendioxid
SCF	Supercritical Fluid = überkritisches Fluid
SFC	Supercritical Fluid Chromatography = überkritische Fluidchromatographie
Sub (1)	3-Hydroxy-4-pentensäureethylester
Sub (2)	3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester
Sub (A)	3-Hydroxy-4-hexensäureethylester
Sub (B)	3-Hydroxy-4-pentensäureethylester
Sub (C)	3-Hydroxy-4-pentensäuremethylester
t	Zeit
T	Temperatur
Tab	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
U	Umsatz oder Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
v	Geschwindigkeit
v <sub>max</sub>	Maximalgeschwindigkeit
V	Volumen
vgl	vergleiche
x	Molenbruch

### 13.2 Verwendete Chemikalien

1-Pyrenyldiazomethan	MoBiTec
3-Hydroxy-4-pentensäureethylester	Institut für Organische Chemie, Hannover
3-Hydroxy-5-phenyl-4-pentensäureethylester	Institut für Organische Chemie, Hannover
Calciumchlorid	Fluka
Diethylether	Fluka
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dodecan	Merck
EtOH	Fluka
Hexan	Fluka
Isopropanol	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogenphthalat	Merck
Kohlendioxid	Linde
Methanol	Merck
Natronlauge	Sigma
Salzsäure	Fluka
Tricaprylin	Fluka
VA-Epoxy	Riedel de Haen
Zitronensäuremonohydrat	Merck

### 13.3 Verwendete Enzyme

Lipasen:	Anbieterabkürzung	Anbieter:
<i>Alcaligenes species</i>		-
<i>Alcaligenes species</i>	Lipase PL	Meito
<i>Aspergillus niger</i>	2212 F	Röhm
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase A	Amano
B		H&R
<i>Candida cylindracea</i>		Amano
<i>Candida rugosa</i>	Lipase AY	Amano
<i>Chromobacterium viscosum</i>	CVL	Toyo Jozo Co.
<i>Humicola laniginosa</i>	Lipase CE	Amano
Lipolase		Novo Nordisk
Lipozyme		Novo Nordisk
<i>Mucor miehei</i>		Röhm
<i>Penicillium camembertii</i>	Lipase G	Amano
Pig pancreas liver	7023	Röhm
Porcine pancreas		Sigma
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase PS	Amano
Esterase:		
<i>Mucor miehei</i>		Gist-Brocades

### 13.4 Vergleich der verwendeten Lipasen

	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Schweinepankreas
Erhältlich bei	Amano	Toyo Jozo	Sigma
Spezifität	unspezifisch <sup>b</sup>	unspezifisch	regio 1,3
Molekulargewicht [d]	34100 <sup>c</sup> ; 33000 <sup>e</sup>	30000; 26000 <sup>e</sup>	52000; 49859 <sup>e</sup>
Isoelektrischer Punkt	-	7,3	5,2
pH-Optimum <sup>a</sup>	7,0 <sup>d</sup>	6,5-7	-
T-Optimum <sup>a</sup>	50 <sup>d</sup>	70	-
Quartärstruktur	monomer <sup>c</sup>	dimer <sup>e</sup>	-
Stabilität [4°C]	mehrere Monate <sup>e</sup>		

Tab. 13.1: Charakteristische Eigenschaften einiger Lipasen [Lazar *et al.*; 1986]; a = Olivenöl; b = [Li zu yi und Ward; 1994]; c = [Bornscheuer *et al.*; 1994]; d = [Amano Produktinformation; 1995]; e = [Schomburg und Salzmann; 1991]; - = keine Angaben

### 13.5 Immobilisierung

In Ansatz 8) (Kap. 8.2.3) wurde in einem Fall die PPL immobilisiert eingesetzt. Das Immobilisat wurde wie folgt dargestellt:

50 mg PPL werden für 2 bis 3 h in 1 ml KPP (0,5 M; pH 7,6) geschüttelt. Es erfolgt ein langsames Absetzen der unlöslichen Bestandteile. Der Überstand wird abgenommen und zu 250 mg Trägermaterial gegeben. Das Gemisch wird für ein bis zwei Tage geschüttelt. Nach Abzentrifugieren wird das Immobilisat zweimal mit 1 ml KPP gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet.

### 13.6 Die Lipase aus *Chromobacterium viscosum*

Die hauptsächlich für die Hydrolyse von Sub (1) eingesetzte Lipase aus *Chromobacterium viscosum* stammte von der Firma „Toyo Jozo Co“. Es war nicht möglich, Angaben über das Enzym bzw. die Firma zu bekommen. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe eines „Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation“ (MALDI) Massenspektrums und eines SDS-Gels zur Charakterisierung die Molmasse des Enzyms bestimmt. Andere kommerziell erhältliche Lipasen aus *Chromobacterium viscosum* weisen ein Gewicht von ca. 33 kDa auf.

#### 13.6.1 MALDI-MS und SDS-PAGE Aufnahmen der *Chromobacterium viscosum* Lipase

MALDI-Einstellungen:

Matrix:  $\alpha$ -Cyanozimtsäure in AcnTFA (Acetonitril/Trifluoressigsäure) (2:1) gelöst,  
15 mg/ml

Auftragung: "Dried-droplet-Methode", d.h. Matrix und Analyt werden nacheinander aufgetragen, 0,5 $\mu$ l Matrix, 0,5 $\mu$ l Analyt und dann wieder 0,5 $\mu$ l Matrix

Kalibration: mit Cytochrom C 1mg/ml, in AcnTFA gelöst  
charakteristische Peaks des Cytochroms C: 24655 (2M); 12328 (M+);  
6164,5 (M2+)

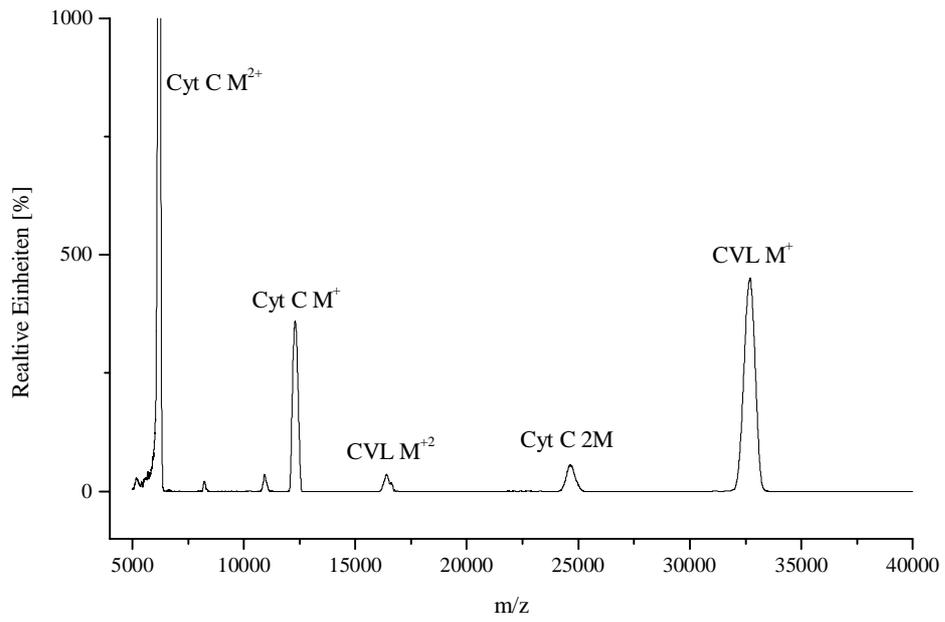


Abb. 13.1: MALDI-MS von CVL

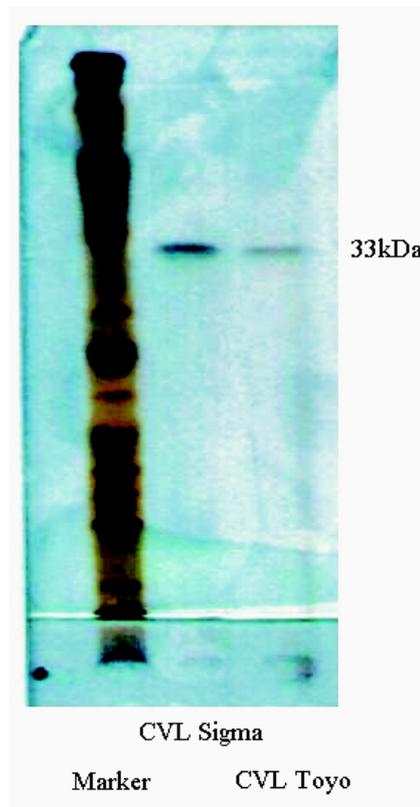


Abb. 13.2: SDS-PAGE der CVL von Toyo Jozo und von Sigma (Referenz)

Die Struktur der CVL gibt Abbildung 13.3. wieder.

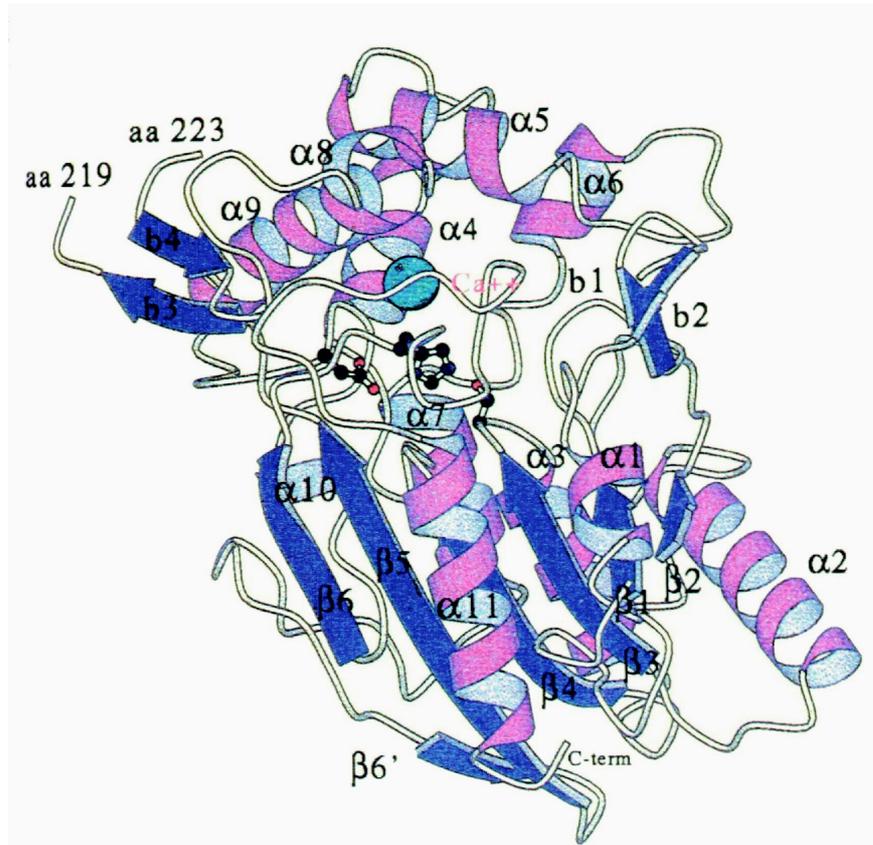


Abb. 13.3: Kristallstruktur der CVL ATCC 6918 [Lang *et al.*; 1996]

### 13.7 Geräteverzeichnis

#### Hochdruckanlage:

Berstscheiben, P17mn170-09 (170bar)	Schlesinger GmbH
Drei-Wege-Ventil	Knauer
Edelstahlreaktoren	Werkstatt Technische Chemie Hannover
Ferrules, Edelstahl	Knauer
Ferrules, PEEK	Upchurch
Hochdruckpumpe mini-pump duplex, NSI 33R	Milton-Roy
Hochdruckpumpe SDS 9404	Schambeck SFD GmbH
Kapillare Edelstahl 1/16" AD, 10 mm ID	Knauer
Kryostat RM 6 (-15°C – 100°C)	mgw Lauda
Manometer	Hensinger & Salmon
Nadelventile 1/16"	Hoke
Nadelventile, Two Way	SSI
O-Ringe, Viton 500	Balster
Probeschlaufen	Knauer
Totvolumenarme Kupplungsstücke 1/16"	Knauer
Trockenschränke (Modell 500)	Memmert

**Aufarbeitung**

Vortexer	Heidolph
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf

**Gaschromatograph**

Detektoreinsatz GC-14 A	Shimadzu
Gaschromatograph GC-14 A	Shimadzu
Integrator C-R4 AX CHROMATOPAC	Shimadzu
Kapillarinjektor SLH-14	Shimadzu
Software: Class-VP	Shimadzu
Trennsäule FS-Hydrodex <sup>®</sup> $\beta$ -3P	Macherey-Nagel
25 m x 0,25 mm	

**HPLC**

Datenaufnahme 162 CSI-Box	Autochrom
Datenverarbeitung APEX	Autochrom
Injektionsventil, 20 $\mu$ l	Valco
Pumpe SDS 9404	Schambeck SFD GmbH
Säule ET 200/4 Nucleodex $\beta$ -PM	Macherey-Nagel
UV-Detektor ERC-7215	ERMA
Ventilsteuerung CIM	Autochrom

**UV-Messungen**

Hochdruckpumpe mini-pump duplex, NSI 33R	Milton-Roy
Hochdruckzelle	Kratos Division
UV-Photometer Spectroflow 757	ABI

**2D-Fluoreszenzspektrometrie**

Atmosphärenreaktor	Werkstatt Technische Chemie Hannover
Fluoreszenzspektrophotometer Modell F-4500	Hitachi
Lichtleiter	Lumatec
Quarzscheibe $\varnothing$ 40 mm, d 8 mm	Spindler & Hoyer
Reaktoreinsatz	Werkstatt Technische Chemie Hannover
Software	Hitachi

**Titrationanlage (pH-Stat)**

Dosimat 665	Metrohm
Impulsomat 614	Metrohm
pH-Meter 605	Metrohm
Rührer E 649	Metrohm
Schreiber SE 120	BBC
Thermostat M 3	mgw Lauda
thermostatisierbares Reaktionsgefäß	Metrohm

### 13.8 Ausgewählte Komponenten und Versuchsaufbauten

In Abbildung 13.4 ist ein Teil der Hochdruckanlage dargestellt. Links befindet sich das Thermostatisiergefäß, rechts daneben steht der Reaktor auf einem Magnetrührer. Über dem Edelstahlreaktor ist das Drei-Wege-Ventil zu erkennen.



Abbildung 13.4: Darstellung des Reaktors mit integrierter Probenahme

In Abbildung 13.5 ist der verwendete Edelstahlreaktor im offenen und im geschlossenen Zustand mit angeschlossenen Kapillaren abgebildet. Daneben befinden sich zwei Einlegescheiben und der Deckel zur Fluoreszenzmessung.



Abb. 13.5: Der Hochdruckreaktor

In Abbildung 13.6 wird der Reaktor mit aufgestecktem Lichtleiter für die Fluoreszenzmessungen skizziert (zur Analyse der Kohlendioxidphase wird das System allerdings waagrecht gelegt).



Abb. 13.6: Der Reaktor inkl. Lichtleiter und Fixieraufsatz [Knüttel; 1999]

### 13.9 Physikalische Daten von Kohlendioxid

Kohlendioxid erreicht bei 73,8 bar und 31,0 °C seinen überkritischen Zustand (vgl. Phasendiagramm Abbildung 13.7), an diesem Punkt weisen flüssige und gasförmige Phase dieselbe Dichte auf, so daß eine Unterscheidung der einzelnen Phasen nicht mehr möglich ist. Die Unterschiede zu den Aggregatzuständen „gasförmig“ und „flüssig“ verdeutlicht Tabelle 13.2.

Parameter	Einheit	Gas	Flüssigkeit	Überkritisch
Dichte	g/cm <sup>3</sup>	10 <sup>-3</sup>	0,6 bis 1,6	0,4 - 1,0
Diff.koeff.	cm <sup>2</sup> /s	10 <sup>-1</sup>	2 · 10 <sup>-6</sup>	7 · 10 <sup>-3</sup>
Viskosität	g/(cm · s)	10 <sup>-4</sup>	3 · 10 <sup>-2</sup>	3 · 10 <sup>-4</sup>

Tab. 13.2: Physikalische Eigenschaften von Kohlendioxid

Hervorzuheben ist, daß SCCO<sub>2</sub> ungefähr eine Dichte hat, die der der flüssigen Phase entspricht. Dagegen liegt der Wert für die Viskosität in der Größenordnung der Gasphase und der Diffusionskoeffizient zwischen der gasförmigen und flüssigen Phase. Es wird deutlich, daß im überkritischen Medium Stofftransport- und Lösungsvorgänge aufgrund niedriger Viskosität, hoher Dichte und kleiner Strömungswiderstände begünstigt werden.

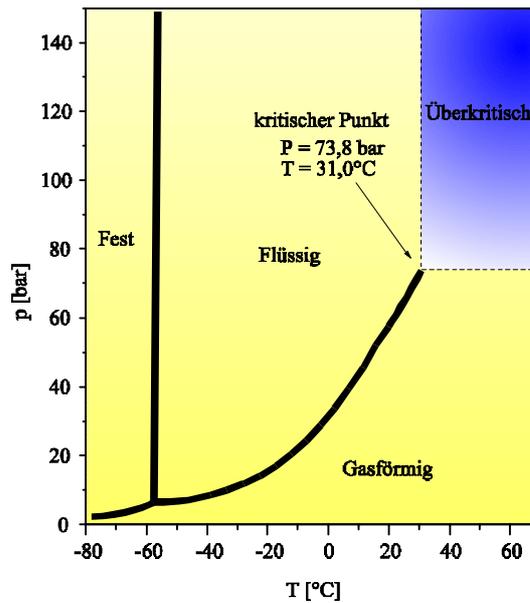


Abb. 13.7: Das Phasendiagramm von Kohlendioxid

Für die Hydrolyse in  $\text{SCCO}_2$  ist es wichtig, den Anteil der Wasserlöslichkeit von Kohlendioxid zu kennen. Dieser liegt in der Größenordnung von 0,1% (w/w) und ist von der Dichte des  $\text{SCCO}_2$  abhängig [Taylor; 1996].

Tabelle 13.3 gibt die in Kap. 3.5.1 gezeigte Dichte-Druck-Temperatur-Beziehung für  $\text{CO}_2$  wieder.

Dichte (g/mL)	Temperatur [°C]								
	40	50	60	70	80	90	100	110	120
1,00	526	618	-	-	-	-	-	-	-
0,95	383	463	544	644	680	-	-	-	-
0,90	281	350	429	489	518	-	-	-	-
0,85	211	269	329	401	447	-	-	-	-
0,80	164	213	264	314	365	416	467	-	-
0,75	134	175	218	261	305	348	392	436	510
0,70	115	150	187	223	260	297	334	372	425
0,65	104	133	165	196	227	259	290	322	354
0,60	97	122	149	176	203	229	256	284	311
0,55	93	115	138	161	183	206	230	252	276
0,50	91	109	129	148	168	188	207	227	246
0,45	89	104	122	138	155	172	188	205	221
0,40	87	100	115	129	143	157	171	185	197
0,35	84	96	108	120	132	144	155	167	178
0,30	81	90	101	111	121	130	140	149	158
0,25	77	84	93	100	108	116	123	130	137
0,20	70	75	82	88	88	99	105	110	116

Tab. 13.3: Dichte-Druck-Temperatur-Beziehung für Kohlendioxid. Druck p [bar] [Taylor; 1996]

Bei konstanter Temperatur nimmt die Dichte mit dem Druck zu, bei konstantem Druck nimmt sie mit steigender Temperatur ab.

## 14 Literaturverzeichnis

- Aaltonen, O.; Rantakylä, M.; 1991  
Biocatalysis in supercritical CO<sub>2</sub>  
Chemtech, April; 240-248
- Adshiri, T.; Akiya, H.; Chin, L. C.; Arai, K.; Fujimoto, K.; 1992  
Lipase-catalyzed interesterification of triglyceride with supercritical carbon dioxide extraction  
*J. Chem. Eng. of Japan*, **25**, 104 - 105
- Ahlers, J.; Arnold, A.; von Döhren, Fr. R. und Peter, H. W.; 1982  
Enzymkinetik  
Zweite Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 102 ff.
- Ahmed, S. N.; Kazlauskas, R. J.; Morinville, A. H.; Grochulski, P.; Schrag, J. D. und Cygler, M.; 1994  
Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward carboxylic acids: A predictive rule from substrate mapping and X-ray crystallography  
*Biocatalysis*, **9**, 209-225
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson., J. D.; 1995  
Molekularbiologie der Zelle  
Dritte Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 149 ff
- AMANO ENZYME EUROPE LTD; 1995  
Milton Keynes, Großbritannien, Produktinformation
- ASTEC; 1999  
Short Course on Chiral Separations  
Tagungsunterlagen, Berlin
- Aydemir, A.; 1999  
Laufende Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
- Baerns, M.; Hofmann, H.; Renken, A.; 1992  
Chemische Reaktionstechnik, Band I  
Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Balkenhohl, F.; Ditrich, K.; Hauer, B.; Ladner, W.; 1997  
Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation  
*J. Pract. Chem.* **339**, 381 – 384
- Becker, S.; 1998  
Enantioselektive Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid  
Diplomarbeit; Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
- Berg, B. E.; Hansen, E. M.; Gjørven, S; Greibrokk, T.; 1993  
Online enzymatic reaction, extraction, and chromatography of fatty acids and triglycerides with supercritical carbon dioxide  
*J. High Resolut. Chromatogr.*, **16** (6), 358-363
- Bernard, P. und Barth, D.; 1995  
Internal mass transfer limitation during enzymatic esterification in supercritical carbon dioxide and hexane  
*Biocatal. Biotransform.*, Volume Date 1995, **12** (4), 299-308
- Beuscher, N. und Willigmann, I.; 1995  
US Patent No. 5, 466, 451
- Bisswanger, H.; 1979  
Theorie und Methoden der Enzymkinetik  
Verlag Chemie, Weinheim, S. 102 ff.
- Black, H.; 1996  
Supercritical Carbon Dioxide: The „Greener“ Solvent  
*Environm. Sci. Techn.*; **30** (3); 124A-127A
- BMBF; 1995  
Was bringt uns die Biotechnologie?  
Infoschrift; Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie; Referat Öffentlichkeitsarbeit; Bonn
- Bornscheuer, U.; 1993  
Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen Racematspaltung verschiedener 3-Hydroxyester in unkonventionellen Lösungsmittelsystemen  
Fortschrittberichte VDI; VDI-Verlag GmbH; Düsseldorf

- Bornscheuer, U.; Reiff, O.-W.; Lausch, R.; Freitag, R.; Scheper, T.; Kollisis, F. N.; Menge, U.; 1994  
Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization  
*Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 1201f.
- Bornscheuer, U.; Capewell, A.; Wendel; Scheper, T.; 1996  
On-line determination of the conversion in a lipase-catalyzed kinetic resolution in supercritical carbon dioxide  
*J. of Biotechnol.*, **46**, 139 - 143
- Bornscheuer, U.; 1999  
Neue Strategien zum Einsatz von Lipasen und Esterasen in der organischen Synthese  
Habilitationsschrift; Shaker-Verlag; Aachen
- Brogge, H.  
CO<sub>2</sub> as a solvent: it's properties and applications  
*Chem. Ind.*; Juni, 385-396
- Cai, W.; 1992  
Experimental research on enzyme-catalyzed esterification in n-hexane and super-critical carbon dioxide  
*Shiyu Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, **16** (3), 122-5
- Capewell, A.; 1994  
Untersuchungen zu enantioselektiven enzymatischen Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid  
Fortschrittberichte VDI; VDI-Verlag GmbH; Düsseldorf
- Capewell, A.; Wendel, V.; Bornscheuer, U.; Meyer, H.H.; Scheper, T.; 1996  
Lipase-catalyzed kinetic resolution of 3-hydroxyesters in organic solvents and supercritical carbon dioxide  
*Enzyme and Microbial Technol.*, **19**, 181 - 186
- Cernia, E. und Palocci, C.; 1997  
Lipases in supercritical fluids  
*Methods Enzymol.*, **286** (Lipases, Part B), 495-508
- Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.; 1982  
Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers  
*J. Am. Chem. Soc.*; **104**, 7294-7299
- Chrischoou, A.; Schaber, K.; 1996  
Design of a supercritical fluid extraction process for separating mixtures incurred in enzyme-catalyzed reactions  
*Chem. Eng. and Proc.*; **35**; 271 – 282
- Chrischoou, A.; Schaber, K.; Stephan, K., (1997)  
Phase equilibria with supercritical carbon dioxide for the enzymic production of an enantiopure pyrethroid component  
*J. Chem. Eng. Data*, **42** (3), 551-557
- Clarke, R. J.; Macrae, R.; 1987  
Coffee  
Vol. 2: Technology; Elsevier Applied Science
- Cleland, W. W.; 1970  
The enzymes: Kinetics and mechanism  
Hrsg.: Boyer, Academic Press, New York
- Clifford, T.; Bartle, K.; 1993  
Chemistry goes supercritical  
*Chemistry in Britain*, **29**, 499-502
- Combes, D.; 1996  
Reaction / separation process in supercritical CO<sub>2</sub> using lipases  
*NATO ASI Ser., Ser. E*, **317** (Engineering of/with Lipases), 613-618
- Cycler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R.J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N und Gupta, A.K.; 1994  
A structural basis for the chiral preference of lipases  
*J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 3180 - 6
- de Latour, C.; 1825  
(Eds.: Gay-Lussac; Arago)  
Sur les effets qu'on obtient par l'application simultanée de la chaleur et de la compression à certain liquids  
*Ann. chim. phys.*; **22**, 410
- Dean, J. R.; 1993  
Applications of Supercritical Fluids in Industrial Analysis  
Blackie Academic & Professional, Glasgow

- Diaz, O.; Cobos, A.; de la Hoz, L.; Ordonez, J. A.; 1997  
Supercritical carbon dioxide in the production of food from plants. Other application Aliment.,  
*Equipos Tecnol.*, **16** (8), 55-63
- Drauz, K. und Waldmann, H. (Hrsg.); 1995  
Enzyme catalysis in organic synthesis  
Band 1 & 2; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Endo, Y.; Fujimoto, K.; Arai, K.; 1994  
Enzyme reaction in supercritical fluid  
*Dev. Food Eng.*, Proc. Int. Congr., Eng. Food, 6th, Meeting Date 1993, Volume Pt. 2,  
849-51. Edited by: Yano, Toshimasa; Matsuno, Ryuichi; Nakamura, Kozo. Blackie: Glasgow, UK.
- Fantozzi, P.; Rossi, M.; Schiraldi, A.; Montanari, L.; 1993  
*Ital. J. Food Sci.*, **4**, 333-339
- Fages, J.; Marty, A.; Delga, C.; Condoret, J.; Combes, D.; Frayssinet, P.; 1994  
Use of supercritical CO<sub>2</sub> for bone delipidation  
*Biomaterials*, **15** (9), 650-656
- Fischer, N. H.; 1990  
*Phytochemistry*, **29**, 2479-2483
- Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W. und Starke, K.; 1996  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie  
Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford
- Gardner, G. S. J.; 1982  
Industrial Scale Hops Extraction  
Presented at the Soc. Chem. Ind. Food Engineering Panel Symposium, CO<sub>2</sub> in Solvent Extraction,  
London
- Glowacz, G.; Bariszlovich, M.; Linke, M.; Richter, P.; Fuchs, C.; Mörsel, J.-T.; 1996  
Stereoselectivity of lipases in supercritical carbon dioxide. I. Dependence of the regio and enantio-  
selectivity of porcine pancreas lipase on the water content during hydrolysis of triolein and partial  
glycerides  
*Chem. and Phys. of lipids*, **79**, 101 - 106
- Goddard, R. D.; Bosley, J. A.; Al-Duri, B.; 1997  
The application of supercritical carbon dioxide as a solvent in lipase catalyzed reactions using a  
continuous packed bed reactor  
*Jubilee Res. Event, Two-Day Symp.*, Volume 2, 993-996.
- Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.; 1990  
Chemie der Elemente  
VCH, Weinheim
- Guilbault, G. G.; 1990  
Practical Fluorescence  
Marcel Dekker Inc. New York
- Habulin, M.; Krmelj, V.; Knez, Z.; 1996  
Supercritical carbon dioxide as a medium for enzymically catalyzed reaction  
*Process Technol. Proc.*, **12** (High Pressure Chemical Engineering), 85-90
- Hammond, D. A.; Karel, M.; Klibanov, A. M.; Krukonis, V. J.; 1985  
Enzymatic reactions in supercritical gases  
*Appl. Biochem. Biotechnol.*; **11**, 393-400
- Hartmann, T.; Schwabe, E.; Combes, D.; Scheper, T.; 1999  
Enzymatic Reactions in Supercritical Carbon Dioxid (In: Patel, R.: Stereoselective Biocatalysis)  
In Print (Marcel Dekker, New York)
- Herar, A., 1995  
Untersuchungen zur enzymkatalysierten Razematspaltung aryl-aliphatischer  $\beta$ -Hydroxyester in  
organischen Lösungsmitteln als Vorstufen zur Herstellung enantiomerenreiner Pharmaka  
Dissertation; Institut für Technische Chemie; Hannover
- Heese, M.; Meier, H.; Zeeh, B.; 1991  
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie  
Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Hilmer, J. M.; 1995  
In-situ-Bioprozeßkontrolle am Beispiel der In-vivo-Biolumineszenz und der 2D-Fluoreszenz-  
spektroskopie  
Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
- Ikariya, T.; Jessop, P. G.; Noyori, R.; 1995  
Chemical reactions in supercritical fluids  
*Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi*, **53** (5), 358-369

- Ikushima, Y.; 1997  
Supercritical fluids: an interesting medium for chemical and biochemical processes  
*Adv. Colloid Interface Sci.*, **71-72**, 259-28
- Ishikawa, H.; Shimoda, M.; Kawano, T.; Osajima, Y.; 1995  
Inactivation of enzymes in an aqueous solution by micro-bubbles of supercritical carbon dioxide  
*Biosci. Biotech. Biochem.*; **59** (4), 628 - 631
- Ishikawa, H.; Osajima, Y.; 1997  
Application of supercritical carbon dioxide method to aqueous system. Novel sterilization and enzyme inactivation technique  
*Kagaku to Seibutsu*, **35** (9), 632-637
- Jackson, M. A.; King, J. W.; List, G. R.; Neff, W. E.; 1997  
Lipase-catalyzed randomization of fats and oils in flowing supercritical carbon dioxide  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74** (6), 635-639
- Kamat, S.; Beckman, E. J.; Russell, A. J.: 1995  
Enzyme activity in supercritical fluids  
*Crit. Rev. Biotechnol.*, **15** (1), 41-71
- Kamat, S.; Critchley, G.; Beckman, E. J.; Russell, A. J.; 1995 (II)  
Biocatalytic Synthesis of Acrylates in Organic Solvents and Supercritical Fluids:  
III. Does Carbon Dioxide Covalently Modify Enzymes?  
*Biotechnol. & Bioeng.*; **46**, 610-620
- Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A.N.E.; Rappaport, A. T. und Cuccia, L.A.; 1991  
A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*  
*J. Org. Chem.*, **56**, 2656-2665
- Kazlauskas, R. J.; 1994  
Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties  
*Trends Biotechnol.*, **12**, 464- 472
- Kazlauskas, R. J. und Bornscheuer, U. T.; 1998  
Biotransformations with lipases. In: *Biotechnology-Series* (Hrsg.: Rehm, H. J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P. J. W. und Kelly, D. R.)  
Wiley-VCH, Weinheim, 8a, 37-191
- Klesper, E.; 1978  
Chromatographie mit überkritischen fluiden Phasen  
*Angew. Chem.*, **90**, 785 - 793
- Knittel, D. und Schollmeyer, E.; 1992  
Farbstoffe in überkritischem CO<sub>2</sub> und supramolekulare Chemie  
*GIT Fachz. Lab.*, **10**, 993-996
- Knüttel; T.; 1998  
Aktivitätsuntersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse von 3-Hydroxy-4-pentensäureethylester in Hexan und überkritischem Kohlendioxid  
Schwerpunktarbeit; Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
- Knüttel, T.; 1999  
Grundlegende Untersuchungen zur online 2D-Fluoreszenzanalyse von enzymatisch katalysierten Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid  
Diplomarbeit; Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
- Koshland, D. E.; 1994  
Das Schlüssel-Schloß-Prinzip und die Induced-fit-Theorie  
*Angew. Chem.*, **106**, 2468-2472
- Kreye, L., 1997  
Enzymatische Prozesse in konventionellen und nicht konventionellen Lösungsmitteln  
Fortschrittberichte VDI; VDI-Verlag GmbH; Düsseldorf
- Krukonis, V. J.; 1987  
Processing with supercritical fluids, Overview and applications  
*ACS Symp. Ser. (Supercrit. Fluid Extr. Chromatogr.)*, 26-43
- Lack, E. und Seidlitz, H., 1993  
Commercial scale decaffeination of coffee and tea using supercritical CO<sub>2</sub> (in: King, M. B.; Bott, T. R.: Extraktion of natural products using near-critical solvents)  
Blackie Academic & Professional, Glasgow

- Lang, D.; Hofmann, B.; Haalck, L.; Hecht, H.-J.; Spener, F.; Schmid, R. D.; Schomburg, D.; 1996  
Crystal Structure of a Bacterial Lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918  
Refined at 1.6 Å Resolution  
*J. Mol. Biol.*, **259**, 704 - 717
- Lazar, G.; Weiss, A.; Schmid, R. D.; 1986  
Synthesis of esters by lipases  
Proc. World Conf. Emerg. Tech. Fats. Oils Ind., Cannes, Nov. 3-8, 1985  
*J. Am. Oil Chem Soc.*, 346-354
- Lee, H. S.; Lee, W. G.; Park, S. W.; Lee, H.; Chang, H.; 1993  
Starch hydrolysis using enzyme in supercritical carbon dioxide  
*Biotechnol. Tech.*, **7** (4), 267-70
- Li zu yi; Ward, O.; 1994  
Synthesis of monoglyceride containing omega-3 fatty acids by microbial lipase in organic solvent  
*J. Ind. Microbiol.*; **13**, 49 – 52
- Lin, C.; 1996  
Enzymic reactions in supercritical fluid  
*Zhejiang Gongye Daxue Xuebao*, **24** (4), 335-342
- Lin, Z.; Qiu, A.; Wang, X.; 1997  
Advances of enzymic interesterification in supercritical carbon dioxide  
*Zhongguo Youzhi*, **22** (2), 26-28
- Lozano, P.; Avellaneda, A.; Pascual, R.; Iborra, J. L.; 1996  
Stability of immobilized- $\alpha$ -chymotrypsin in supercritical carbon dioxide  
*Biotechnol. Lett.*, **18** (11), 1345-1350
- Macherey-Nagel GmbH & Co. Kg; 1997  
GC – Gas-Chromatographie, Produktkatalog; Düren
- Martins, J. F.; Sampaio, T. C.; Carvalho, I. B.; da Ponte, M. N.; Barreiros (Eds: Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K.; Masson, P.); 1992  
Lipase catalyzed esterification of Glycidol in chloroform and in supercritical carbon dioxide  
*High Press. Biotechnol.*; **224**, 411 - 415
- Marty, A.; Combes, D.; Condoret, J.-S.; 1994  
Continuous Reaction-Separation Process for Enzymatic Esterification in Supercritical Carbon Dioxide
- Marty, A.; Manon, S.; Ju, D. P.; Combes, D.; Condoret, J.-S.; 1995  
The enzymic reaction-fractionation process in supercritical carbon dioxide  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **750** (Enzyme Engineering XII), 408-11
- Meyer, V. R.; 1992  
Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie  
Salle und Sauerländer, Frankfurt (Main)
- Michor, H.; Marr, R.; Gamse, T.; Schilling, I.; Klingsbichel, E.; Schwab, H.; 1996  
Enzymatic catalysis in supercritical carbon dioxide: Comparison of different lipases and a novel esterase  
*Biotechnol. Lett.*; **18** (1), 79 – 84
- Michor, H.; Gamse, T.; Marr, R.; 1997  
Enzymkatalyse in überkritischem Kohlendioxid: Racematspaltung von D,L-Menthol,  
*Chemie Ingenieurtechnik*; **69**, 5197, 690 - 694
- Miller, D. A.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M.; 1990  
Enzymatic interesterification of triglycerides in supercritical carbon dioxide  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*; **613**, 534-537
- Miller, D. A.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M.; 1991  
Enzyme-catalyzed interesterification of triglycerides in supercritical carbon dioxide  
*Ind. Eng. Chem. Res.*; **30** (5), 939 - 946
- Mukherjee, P.S.; Karnes, H. T.; 1996  
Ultraviolet and Fluorescence Derivatisation Reagents for Carboxylic Acid Suitable for High Performance Liquid Chromatography: A Review  
*Biomed. Chromatography*, **10**, 193
- Nakamura, K.; 1996  
Enzymic Synthesis in Supercritical Fluids  
*Supercrit. Fluid Technol. Oil Lipid Chem.*, 306-320. Edited by: King, Jerry W.; List, Gary R. AOCS Press: Champaign, Ill.

- Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cyler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M. Harel, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J.; Sussmann, J. L.; Verschuere, K. H. G. und Goldman, A.; 1992  
The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold  
*Protein Eng.*, **5**, 197-211
- Pahl, A., 1998  
Synthesen und absolute Konfigurationen von Piperidinolalkaloiden – Arbeiten zur Darstellung von Epothilon  
Dissertation; Institut für Organische Chemie; Hannover
- Parve, O.; Vallikivi, I.; Lahe, L.; Metsala, A.; Liile, U.; Tougu, V.; Vija, H.; Pehk, T.; 1997  
Lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of bicyclo[3.2.0]heptanol esters in supercritical carbon dioxide  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7** (7), 811-816
- Rademacher, B.; Pfeiffer, B.; Brinker, C.; Lechner, E.; Kessler, H.-G.; 1999  
Kinetik der Inaktivierung milcheigener Enzyme durch Ultrahochdruck  
*Chemie Ingenieur Technik*, **4** (71), 392 – 396
- Randolph, T. W.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M.; Wilke, C. R.; 1985  
Enzymatic catalysis in supercritical fluid  
*Biotechnol. Lett.*, **7**, 325-328
- Randolph, T. W.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M.; 1988  
Enzyme-catalyzed oxidation of cholesterol in supercritical carbon dioxide  
*AIChE J.*, **36** (2), 1354-1360
- Rantakylä, M.; Alkio, M.; Aaltonen, O.; 1996  
Stereospecific hydrolysis of 3-(4-methoxyphenyl)glycidic ester in supercritical carbon dioxide by immobilized lipase  
*Biotechnol. Lett.*, **18** (9), 1089 – 1094
- Römpp Chemikalienlexikon, CD-Rom Version 1.0; 1995  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Russell, A. J.; Beckman, E. J.; Chaudhary, A. K.; 1994  
Studying enzyme activity in supercritical fluids  
*CHEMTECH*, **24** (3), 33-7
- Scheper, T.; 1999  
New Enzymes for Organic Synthesis – Screening, Supply and Engineering  
Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York
- Schmid, R. D.; Verger, R.; 1998  
Lipasen: Grenzflächen-Enzyme mit attraktiven Anwendungen  
*Angew. Chem.*, **110**, 1694-1720
- Schomburg, D. und Salzmann, M.; 1991  
Enzyme Handbook 3, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
- Schummer, D.; Gerth, K.; Reichenbach, H. und Höfle, G.; 1995  
*Liebigs Ann.* 685 - 688
- Segel, I. H.; 1975  
Biochemical Calculations (2<sup>nd</sup> Edition)  
Wiley & Sons, New York, S. 293 ff
- Sereti, V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N.; 1997  
Improved stability and reactivity of *Fusarium solani* cutinase in supercritical CO<sub>2</sub>  
*Biotechnol. Tech.*, **11** (9), 661-665
- Snyder, J. M.; King, J. W.; Jackson, M. A.; 1997  
Analytical supercritical fluid extraction with lipase catalysis: conversion of different lipids to methyl esters and effect of moisture  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74** (5), 585-588
- Stryer, L.; 1996  
Biochemie  
4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford
- Taylor, L. T., 1996  
Supercritical Fluid Extraction  
John Wiley & Sons, Inc. New York
- Tservistas, M.; 1997  
Untersuchungen zum Einsatz von überkritischem Kohlendioxid als Medium für biokatalysierte Reaktionen  
Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover

- Vija, H.; Telling, A.; Tougu, V.; 1997  
Lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide and in hexane  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7** (3), 259-262
- Voß, E.; 1990  
Enantioselektive Hydrolysen von  $\beta$ -Hydroxycarbonsäuren mit Lipasen  
Diplomarbeit, Institut für Organische Chemie, Hannover
- Wedler, G.; 1987  
Lehrbuch der Physikalischen Chemie  
VCH Verlagsgesellschaft Weinheim
- Winkler, F. K.; D`Arcy, A. und Hunziker, W.; 1990  
Structure of human pancreatic lipase  
*Nature*, **343**, 771 – 774
- Wong, J. M.; Johnston, K.P.; 1986  
*Biotech. Prog.*, **2**, 29
- Wünsche, K.; 1992  
Die enzymatische enantioselektive Esterhydrolyse zur Synthese chiraler Naturstoffbausteine – Formale Synthese von optisch reinem (-)-(S)-Propranolol  
Diplomarbeit, Institut für Organische Chemie, Hannover
- Xu, H.; Zhu, Z.; Yang, L.; 1996  
Enzymic catalysis in supercritical fluids  
*Huaxue Fanying Gongcheng Yu Gongyi*, **12** (3), 232-237
- Yoon, S.-H.; Miyawaki, O.; Park, K.-H.; Nakamura, K.; 1996  
Transesterification between triolein and ethylbehenate by immobilized lipase in supercritical carbon dioxide  
*J. Ferment. Bioeng.*, **82** (4), 334-340
- Zheng, Y.; Tsao, G. T.; 1996  
Avicel hydrolysis by cellulase enzyme in supercritical CO<sub>2</sub>  
*Biotechnol. Lett.*, **18** (4), 451-4
- Zosel, K.; 1971  
French Patent 2.079.261
- Zosel, K.; 1978  
Praktische Anwendungen der Stofftrennung mit überkritischen Gasen  
*Angew. Chem.*, **90**, 748-755

## Lebenslauf

Name Thorsten Hartmann  
Geburtstag 08.02.1971 in Hannover

### Schulbildung

1977 - 1981 Grundschule Schwarmstedt  
1981 - 1983 Orientierungsstufe Schwarmstedt  
1983 - 1990 Gymnasium Walsrode  
1990 Allgemeine Hochschulreife  
  
1990 - 1991 Allgemeiner Wehrdienst in Munster

### Hochschulbildung

1991 - 1996 Studium der Chemie an der Universität Hannover  
1993 Vordiplom  
1996 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie an der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper  
1996 Im November Abschluß als Diplom-Chemiker  
1997 Februar 1997 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Technische Chemie an der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper