



Institut für Biotechnologie

***Prozessentwicklung für die katalytische
Reduktion mit molekularem Wasserstoff***

***Membranverfahren für die homogene
Katalyse mit Enzymen und Chemzymen***

Lasse Greiner

***Prozessentwicklung für die katalytische
Reduktion mit molekularem Wasserstoff***

***Membranverfahren für die homogene
Katalyse mit Enzymen und Chemzymen***

Lasse Greiner

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4055

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4055

D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Process development for the catalytic reduction with molecular hydrogen

Homogeneous catalysis is an indispensable tool for synthetic organic chemistry. So far it has proved to be the only means for achieving high selectivity and asymmetric induction, deriving enantiomeric highly enriched compounds by catalytic means. Among the most successful systems for homogeneous catalysis, hydrogenation catalysts capable of activating molecular hydrogen, take outstanding roles in research laboratories and in industry.

Nevertheless, the generation of catalysts is highly specialized, laborious, and cost-intensive. Their rational usage implies optimization by reaction engineering. These efforts aim for the acceleration of reaction rate (turnover frequency: tof), and increase capacity of the number of catalyzed reactions per catalyst (total turnover number: ttn). For the latter, this is achieved easily if means are available for the selective separation of catalyst from the other reaction partners. One possibility is exploited by immobilization methods; but restricting the catalyst to one phase creates problems associated with phase barriers.

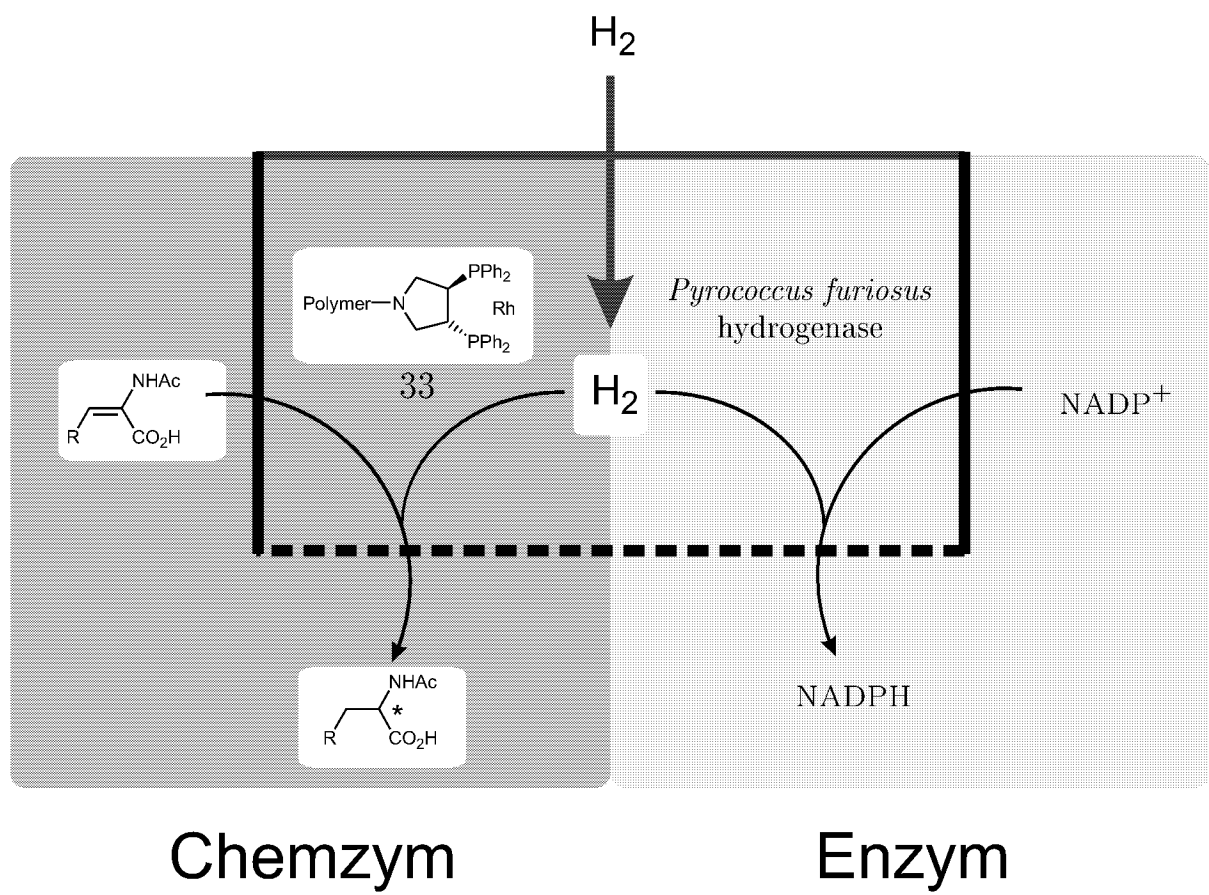
Another approach has been demonstrated by utilizing membrane filtration, selectively retaining high molecular weight homogeneous soluble catalysts. This has been especially successful for catalysts, for which the macromolecular property is intrinsic to their catalytic activity: enzymes, the catalysts of biological systems. Examples for transferring this principle to man-made chemical catalysts using soluble polymers as support –so called chemzymes– are capable of taking advantage of non-aqueous solvents. This principle of continuous recycling is realized in the enzyme or in the chemzyme membrane reactor (EMR or CMR, respectively)

A major goal of this work was to open up the vast field of catalytic hydrogenation with molecular hydrogen for the scope of possible reactions in the membrane reactor. This has been demonstrated by two catalytic systems:

1. Chemical: Asymmetric hydrogenation with the Pyrrhos catalyst **21** -Rh, and the polymer bound catalyst **33**, deriving enantiomerically enriched amino acids.
2. Enzymatic: Hydrogenation with the hydrogenase from *Pyrococcus furiosus* (PfH), deriving NADPH (38), an important redox equivalent for biological systems.

A new technique for hydrogen supply via dense membranes was developed, thus allowing the decoupling gas and liquid phase pressures. By this means the development of a continuously operated membrane reactor for the employment of both enzyme and chemzyme was possible. Besides their usage in other reactor systems, both catalysts were employed in this newly developed membrane reactor. This was especially beneficial for the enzyme, with unmatched ttn of more than 60,000 and a space-time-yield of more than $130 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Both systems were investigated kinetically. The chemical catalyst proved to be strongly dependent on the hydrogen concentration; whereas the enzyme showed a time-dependent activation of catalytic activity whereby the initial activity was more than doubled. Furthermore it could be shown that adhesive properties of the enzyme preparation, discovered during electrochemical investigations, could be applied for immobilization and consequent utilization in a continuous fluidized bed reactor.



Prozessentwicklung für die katalytische Reduktion mit molekularem Wasserstoff

Die homogene Katalyse ist ein unverzichtbares Werkzeug der modernen organischen Chemie. Vor allem ist bisher kein anderer katalytischer Zugang zur chiralen Amplifikation mit hinreichender Enantioselektivität gefunden worden. Unter den erfolgreichsten homogenen Katalysatoren nehmen diejenigen Systeme, die in der Lage sind, molekularen Wasserstoff zu aktivieren, mit Abstand die wichtigste Stellung ein; dies zeigt sich sowohl in der Forschung als auch in der industriellen Anwendung. Allerdings ist die Gewinnung von homogenen Katalysatoren hoch spezialisiert, arbeits- und kostenintensiv. Daher impliziert die rationelle Verwendung solcher Systeme deren reaktionstechnische Optimierung. Diese zielt zum einen auf die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit (ausgedrückt als Zyklenzahl: *tof*), und zum anderen auf die Erhöhung der Anzahl von katalysierten Reaktionen pro Katalysator (Wechselzahl: *ttn*). Die *ttn* lässt sich besonders dann leicht steigern, wenn ein einfaches Verfahren zur Verfügung steht, das die selektive Abtrennung des Katalysators von den anderen Reaktionspartnern ermöglicht. Eine Möglichkeit ist die Immobilisierung, erkauft jedoch durch die damit assoziierten Probleme von Phasengrenzen.

Eine andere Möglichkeit ist die Rückhaltung von homogen löslichen Katalysatoren ausreichender Größe durch Membranfiltration. Dies ist insbesondere für solche Katalysatoren erfolgreich, deren Aktivität untrennbar mit makromolekularen Eigenschaften verbunden ist: Enzyme, die Katalysatoren biologischer Systeme. Beispiele für das analoge Prinzip mit Homogenkatalysatoren –sogenannten Chemzymen– zeigen die Vorteile von nicht-wässrigen Lösungsmitteln. Die kontinuierliche Reaktionsführung mit Rückhaltung des Katalysators durch geeignete Membranen bezeichnet man als Enzym-Membran-Reaktor beziehungsweise als Chemzym-Membran-Reaktor (EMR bzw. CMR).

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Reaktionen mit molekularem Wasserstoff als Reaktionspartner im EMR und CMR zu ermöglichen. Dies konnte anhand von zwei katalytischen Systemen demonstriert werden:

- Chemisch: Die asymmetrische Hydrierung mit dem PyrPhos-Katalysator **21** beziehungsweise mit dem polymervergrößerten Katalysators **33**, die zu chiralen Aminosäuren führt.
- Enzymatisch: Durch Hydrierung mit der Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* (*PfH*) erhält man NADPH, ein wichtiger reduktiver Kofaktor biologischer Systeme.

Es wurde eine neue Technik der Wasserstoffversorgung durch eine dichte Polymermembran entwickelt. Dies ermöglicht die Entkoppelung der Drücke auf Gas- und Flüssigseite, und die Grundlage für den Aufbau eines Reaktors für den Einsatz für Enzym und Chemzym. Unter anderem wurden beide Katalysatoren in diesem neu entwickelten Reaktor eingesetzt. Dieser erwies sich besonders für das Enzym als vorteilhaft. Die *tof* konnte auf mehr als 60.000 gesteigert werden; und es wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von mehr als $130 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht.

Es wurden auch herkömmliche Reaktorsysteme angewandt und verglichen. Beide System wurden kinetisch untersucht, wobei für das chemische System besonders die lineare Druckabhängigkeit auffiel; beim Enzym wurde eine zeitabhängige Aktivierung auf mehr als das Doppelte der Anfangsaktivität beobachtet. Weiterhin konnte ein bei der elektrochemischen Untersuchung festgestelltes Adhäsionsphänomen zur Immobilisierung des Enzyms und zum Einsatz im kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktor eingesetzt werden.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt. Eine solche Arbeit ist nur mit der Unterstützung vieler durchführbar, bei einigen möchte ich mich besonders bedanken:

- Prof. C. Wandrey als meinem Doktorvater für die interessante Themenstellung, die Aufrechterhaltung der besonderen Arbeitsbedingungen und das in mich gesetzte Vertrauen,
- Prof. J. Bargon für die freundliche Übernahme des Korreferats,
- Dr. Eyke van den Ban, Hans Waasink, Dr. Huub Haaker, Prof. Colja Laane for the fruitful collaboration, discussion and insights into 'de ziedende vuurbal', and for the kind gifts of enzyme preparation,
- Daniela Müller für die qualifizierte und engagierte Unterstützung, unentbehrliche Hilfe und die Möglichkeit ein wenig zu ihrer Ausbildung beizutragen,
- Rita Mertens für Fleiß und Durchhaltevermögen bei der Anfertigung ihrer Diplomarbeit,
- Christian Reimers für die qualifizierte und engagierte Hilfe in allen Lebenslagen und der Möglichkeit sich ausbilden zu lassen,
- Iris Schröder für anregende Diskussionen, Experimentierfreude, qualifizierte Beratung –besonders in elektrochemischem Neuland– und die richtungsweisenden Korrekturen der vorliegenden Arbeit,
- Stephan Laue für das „vis à vis“ und das in mich gesetzte Vertrauen,
- Murillo de Villela Filho, Christoph Hoh und Arne Buchholz für Diskussion und die Hilfe bei folgeschweren Entscheidungen,
- Dr. A. Liese für die stetige Diskussionsbereitschaft und die Korrekturarbeit,
- der „Enzymgruppe“, insbesondere Ursula Mackfeld, Heike Offermann, Lilia Härter, Jürgen Haberland und Thomas Stillger für Unterstützung und das offene Wort,
- Hubert Ruhrig, Hein Milz und die Mitarbeiter der mechanischen Werkstätten, ohne deren kompetente Beratung und schnelle Unterstützung vieles unversucht geblieben wäre,
- Jürgen Paulzen, Dietrich Bauer vor allem für die Hilfe im Kampf mit den Pumpen,
- Michel Brik Ternbach, der beweisen konnte, was ich mir schon gedacht hatte,
- Prof. M. Bott und Dr. Kai Vuorilehto für die freundliche Durchsicht des Kapitels zur Berechnung der Gleichgewichtskonstanten,
- meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung,
- Mareen für Alles.

Inhaltsverzeichnis

I	Allgemeiner Teil	1
1	Einleitung	3
1.1	Chiralität	3
1.1.1	Beispiel Pharmaka	5
1.2	Membranreaktor	7
1.2.1	Enzym Membranreaktor	8
1.2.2	Chemzym Membranreaktor	8
2	Übergreifende Problemstellung und Zielsetzung	11
3	Dosierung	13
3.1	Problemstellung und Zielsetzung	13
3.2	Flüssigkeiten	13
3.2.1	Ergebnis	15
3.3	Gase	15
3.3.1	Mathematische Behandlung des Stoffübergangs	17
3.3.2	Test verschiedener Polymere	17
3.3.3	Volumenbegaste Reaktion	18
3.4	Volumenbegaster Membranreaktor	19
3.4.1	Rektoraufbau	19
3.4.2	Druckfestigkeit	21
3.4.3	Abschätzung der Strömungsbedingungen	22
3.4.4	Technische Daten	23
3.5	Zusammenfassung	24
II	Homogenkatalytische Hydrierung	27
4	Einleitung	29
4.1	Asymmetrische katalytische Hydrierung	29
4.1.1	Wilkinson-Katalysator	29
4.1.2	Asymmetrische Hydrierung	31
4.1.3	Allgemeiner Reaktionsmechanismus	36
5	Aufgabenstellung und Zielsetzung	39
6	Reaktionssystem	41

6.1	Reaktionen im Satzreaktor	42
6.1.1	Konstantdruckautoklav	43
6.1.2	Charakterisierung des Katalysatorsystems	43
6.2	Charakterisierung des polymervergrößerten Katalysators	49
6.2.1	Katalysatorkonzentration	49
6.2.2	Wasserstoffdruck	51
6.3	Produktaufarbeitung	51
6.4	Zusammenfassung	51
7	Kontinuierliche Synthese im Membranreaktor	55
7.1	Zusammenfassung	56
III	Enzymkatalytische Hydrierung	59
8	Einleitung	61
8.1	<i>Pyrococcus furiosus</i>	61
8.2	Hydrogenase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	62
8.2.1	Zur Struktur der Hydrogenase	63
8.3	Reduktive Kofaktor(re)generierung	65
8.3.1	Substratgekoppelte Regenerierung	67
8.3.2	Formiatdehydrogenasen	68
8.3.3	Hydrogenasen	68
8.3.4	Homogenkatalysatoren	69
9	Stabilität der Nikotinamidkofaktoren	71
9.1	Reduzierte Form	71
9.2	Oxidierter Form	73
10	Aufgabenstellung und Zielsetzung	75
11	Reduktive Generierung	77
11.1	Thermodynamik	77
11.2	Einfluss des Substrats NADP^+	78
11.3	Temperatur	79
11.4	Versuche im Satzreaktor	80
11.5	Durchführung als repetitive batch	83
11.5.1	Aktivierung	85
11.6	Kontinuierliche Synthese von NADPH	88
11.6.1	Volumenbegaster EMR	88
11.6.2	Wirbelschichtreaktor	90
11.7	Zusammenfassung: NADPH-Produktion	92
12	Reduktive Regenerierung	95
12.1	Thermodynamik	95
12.1.1	Exkurs: Substratgekoppelte Kofaktorregenerierung	97
12.2	Durchführung im Satzreaktor	98

12.3	Durchführung als repetitive batch	99
12.4	Zusammenfassung: Kofaktorregenerierung	103
13	Mechanistische Untersuchungen	105
13.1	Reaktionen mit Deuterium	105
13.1.1	Molekulares Deuterium	105
13.1.2	Deuteriumoxid	106
13.2	Elektrochemische Untersuchungen	106
13.3	Zusammenfassung	108
IV	Zusammenfassung und Ausblick	109
14	Zusammenfassung und Vergleich	111
14.1	Dosiertechnik	111
14.2	Hydrogenase	111
14.2.1	Reduktive Generierung von NADPH	111
14.2.2	Reduktive Regenerierung	111
14.3	Homogene Katalyse	111
14.4	Gemeinsamkeiten und Unterschiede	112
15	Diskussion und Ausblick	113
15.1	Chemischer Membranreaktor	113
15.1.1	Zugang zu geeigneten Katalysatoren	113
15.2	Hydrogenase	115
15.2.1	NADPH-Synthese	116
16	Material und Methoden	119
16.1	Apparate und Bauteile	119
16.2	Thermische Massenflussmessung	119
16.2.1	Wasserstoffflussmessung	120
16.2.2	Modifikation an der Wechsellkolbenpumpe P-500	120
16.3	Arbeitsvorschriften	122
16.3.1	Allgemeines	122
16.3.2	Chemikalien	122
16.3.3	Hydrierungen im Konstantdruckautoklaven	123
16.3.4	Hydrierung mit limitierendem Wasserstoffeintrag	123
16.3.5	Hydrierungen im volumenbegasten Umlaufreaktor	123
16.3.6	Bestimmung der Wasserstofflöslichkeiten	124
16.4	Satzreaktorversuche zur NADPH-Synthese und zur Kofaktorregenerierung	124
16.4.1	Repetitive Batch mit <i>PfH</i>	124
16.4.2	Kontinuierlicher Wirbelschichtreaktor mit <i>PfH</i>	125
16.4.3	Analytik	125
16.4.4	Cyclovoltammetrie	128

V	Anhang	129
A	Herleitung der Gleichgewichtskonstanten	131
A.1	Betrachtung zum pH	131
A.2	Das Redoxpotential der Wasserstoffhalbzelle	132
A.3	Das Redoxpotential der $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -Halbzelle	133
A.4	Freie Reaktionsenergie und Gleichgewichtskonstante	133
A.5	Maximaler Umsatz	134
A.6	Substratgekoppelte Kofaktorregenerierung	135
B	Enantiomerenüberschuss und Enantiomerenverhältnis	139
B.1	Enantiomerenverhältnis	140
B.2	ΔG und der Enantiomerenüberschuss	142
B.3	Weiterführende Betrachtungen	144
B.4	Zusammenfassung	145
C	Phasenübergang und Löslichkeit von Gasen	147
C.1	Löslichkeit und reiner Stofftransport	148
C.2	Löslichkeit von Wasserstoff	149
D	Retention	153
E	Formelverzeichnis: Nummerierung und Nomenklatur	157
	Literaturverzeichnis	161

Abbildungsverzeichnis

1.1	Enantiomere des Medikaments Dopa	4
1.2	Methoden der asymmetrischen Synthese	5
1.3	Anteil von Chiralika an vermarkteten Wirkstoffen	6
1.4	Kontinuierliche Reaktionsführung mit Katalysatorrückhaltung	8
1.5	Einteilung von Membranverfahren nach Rückhaltevermögen	8
2.1	Kosten ausgewählter Reduktionsmittel	12
3.1	P-500 Wechselkolbenpumpe	14
3.2	Vorher-nachher Vergleich der modifizierten Wechselkolbenpumpe	15
3.3	Entkopplung der Parameter durch die Membranbegasung	16
3.4	Kenngrößen von Schlauchmembranen	18
3.5	Stoffübergang für ausgewählte Polymere	18
3.6	Hydrierung mit Membranbegasung	19
3.7	Fließschema des volumenbegasteten Membranreaktors	20
3.8	Foto der Versuchsanlage	20
4.1	Synthese von L-Dopa mit DIPAMP	30
4.2	Synthese von Naproxen mit BINAP	30
4.3	Katalysezyklen nach Wilkinson	30
4.4	Entwicklung der Literaturzitate	33
4.5	Enamid-Motiv	33
4.6	Enamin-Reduktion zu Metolachlor mit xyliphos	34
4.7	Vereinfachter Katalysezyklus der asymmetrischen Hydrierung	37
6.1	PyrPhos-Katalysator	41
6.2	Reaktionssystem	42
6.3	Typischer Reaktionsverlauf der Hydrierung	43
6.4	Schematischer Aufbau des Konstantdruckautoklaven	44
6.5	Reaktionsgeschwindigkeit versus Katalysatorkonzentration	45
6.6	Reaktionsgeschwindigkeit/Druck bzw. Wasserstoffkonzentration	46
6.7	Konkurrenzreaktion	47
6.8	Satzreaktorversuch mit langsamer Aktivierung	48
6.9	Fed-batch	49
6.10	Polymervergrößerter PyrPhos-Katalysator	50
6.11	Reaktionsgeschwindigkeit <i>versus</i> Katalysatorkonzentration (Polymer)	51
6.12	Reaktionsgeschwindigkeit <i>versus</i> Druck (polymerer Katalysator)	52
6.13	Probe von <i>N</i> -Acetylphenylalanin (11)	52

7.1	Kontinuierliche Hydrierung mit Poly-PyrPhos	56
7.2	Ultrafiltrationsmembran	57
8.1	rRNA-Domänen und Bild von <i>Pyrococcus furiosus</i>	62
8.2	Struktur der Hydrogenase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	64
8.3	Enzymatische Hexanoatreduktion	65
8.4	Kosten der Nikotinamidkofaktoren in reduzierter und oxidierte Form	66
8.5	Formale Reduktion der Nikotinamidkofaktoren	67
8.6	1,4- und 1,6-Hydridaddition an Nikotinamid	67
8.7	FDH-Reaktion	68
8.8	Katalysatoren nach Steckhan und Hembre	69
9.1	Desaktivierung in Abhängigkeit vom pH (doppeltlogarithmisch)	72
9.2	Säurekatalysierte Cyclisierungsreaktion von NADPH und NADH	72
9.3	Elektrophile Addition an NADPH und NADH	73
9.4	Zerfallsgeschwindigkeit von NADPH als Funktion des pH	74
9.5	Reaktion von NADP^+ und NAD^+ mit Enolen	74
11.1	Reduktion von NADP^+ mit molekularem Wasserstoff	78
11.2	Aktivität als Funktion der Enzym- bzw. NADP^+ -Konzentration	79
11.3	Aktivierungsenergie der NADP^+ -Reduktion mit <i>PfH</i>	80
11.4	Satzreaktorversuch (EPPS)	82
11.5	Satzreaktorversuch (Tris)	82
11.6	Prinzip des repetitive batch	84
11.7	Umsätze und maximale Ausbeuten der NADPH-Synthesen	84
11.8	Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten beim repetitive batch	85
11.9	Verlauf der kontinuierlichen NADPH-Synthese	89
11.10	Wirbelschichtreaktor für immobilisierte <i>PfH</i>	90
11.11	Kontinuierliche Synthese mit immobilisierter <i>PfH</i> (Glas)	91
11.12	Kontinuierliche Synthese mit immobilisierter <i>PfH</i> (Graphit)	92
11.13	Vergleich der ttn und STY der NADPH-Synthese	93
12.1	Kofaktorregenerierung der Ketonreduktion	95
12.2	Satzreaktorversuche zur reduktiven Kofaktorregenerierung	99
12.3	Repetitive batch der Reduktion von Acetophenon	100
12.4	Repetitive batch: Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten	101
12.5	Repetitive batch der Reduktion des Hydroxyketons 52	102
12.6	Reduktion von <i>S</i> -2-Hydroxy-1-phenylpropanon (52)	102
12.7	Substratgekoppelte Kofaktorregenerierung zur Reduktion von 52	102
13.1	Reaktionswege der <i>PfH</i> mit Deuterium	107
13.2	Exemplarische Cyclovoltammogramme der <i>PfH</i>	108
15.1	Synthesestrategie für molekulargewichtsvergrößerte Katalysatoren	114
15.2	Rührkesselskaskade	117
16.1	Schematischer Aufbau der Gasverbrauchsmessung	121
16.2	Untersetzungsgetriebe	121

16.3	Elektropherogramm der Nukleotidtrennung	127
16.4	Probenstabilität NADP^+ und NADPH	127
A.1	Substratgekoppelte Kofaktorregenerierung	135
A.2	Anfangsverhältnis gegen Potentialdifferenz	138
B.1	Schema für Parallelreaktion	141
B.2	Enantiomerenüberschuss ee als Funktion des er	142
B.3	er als Funktion von $\Delta\Delta G$	143
B.4	$\Delta\Delta G$ in Abhängigkeit vom Enantiomerenüberschuss ee	144
B.5	Ableitung des ee nach er	145
C.1	Wasserstofflöslichkeiten in Methanol	150
C.2	Wasserstofflöslichkeiten in Akanolen	150
C.3	Wasserstofflöslichkeiten in Alkanen und ausgewählten Aromaten	151
C.4	Wasserstofflöslichkeiten für ausgewählte Verbindungen	151
D.1	Restanteil als Funktion der Anzahl der Verweilzeiten	154
D.2	Halbwertszeit $t_{1/2}$ als Funktion der Retention r	155

Tabellenverzeichnis

1.1	Exklusive Reaktionsklassen der metallvermittelten Katalyse	9
3.1	Mindestflüsse für turbulente Strömung	23
3.2	Technische Daten des membranbegasten Membranreaktors	24
4.1	Kinetische Konstanten der Hydrierung	31
4.2	Ausgewählte Hydrierungs-Liganden	35
6.1	Vergleich der Katalysatoren	53
8.1	Enzymeckdaten	64
11.1	Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die NADP^+ Reduktion	83
11.2	Parameter der Aktivierung der <i>PfH</i>	86
12.1	Redoxpotentiale verschiedener Carbonylverbindungen	96
14.1	Vergleich der makromolekularen Katalysatoren	112

Abkürzungen und Symbole

*When I use a word it means just what I choose it to mean –
neither more nor less.*

Humpty Dumpty
in Lewis Carroll, *Through the Looking-Glass*

Chemische Formeln werden in den Abbildungen fortlaufend nummeriert. Ist im Text ein rationeller Name gegeben, steht der Verweis in Klammern, sonst erscheint die Referenz hervorgehoben, zum Beispiel für 2-Acetylamino-3-(3,4-dihydroxy-phenyl)-propionsäure (1) oder Dopa 1. Ein Verzeichnis der verwendeten chemischen Formeln und der zugehörigen Nummern findet sich im Anhang E auf Seite 157.

Die Gleichungen und Ausdrücke sind in der Form

$$a^2 + b^2 = c^2 \quad (0.1)$$

kapitelweise nummeriert, und werden im Text in runden Klammern als (0.1) referenziert.

Abk.	Abkürzung
Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
Akt.	Aktivität
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonylrest
Bz	Benzylrest, Phenylmethylenrest
CMR	Chemischer/Chemzym Membranreaktor
COD	1,5-Cyclooctadien (29)
CSTR	kontinuierlich betriebener Rührkessel (<i>engl.</i> continuously operated stirred tank reactor)
CV	cyclische Voltammetrie
D	Deuterium, Abkürzung für das Wasserstoffisotop ^2H
Diss.	Dissertation
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss, <i>engl.</i> enantiomeric excess
EMR	Enzym Membranreaktor
<i>engl.</i>	englisch
EPSP	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -3-propansulfonsäure
<i>er</i>	Enantiomerenverhältnis, von <i>engl.</i> enantiomeric ratio
FDA	Federal Drug Administration, Gesundheitsbehörde der USA
FDH	Formiatdehydrogenase
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -Propylrest
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

Fortsetzung nächste Seite

Abk.	Abkürzung
<i>lat.</i>	lateinisch
<i>Lb</i> ADH	ADH aus <i>Lactobacillus brevis</i>
Me	Methylrest
MFM	thermischer Massenflussmesser
NHE	Normalwasserstoffzelle
NMR	Kernspinresonanz, von <i>engl.</i> nuclear magnetic resonance
PEEK	Polyetheretherketon
<i>Pf</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PFA	Perfluoralkoxypolymer
<i>Pf</i> H	Hydrogenase aus <i>Pf</i>
Ph	Phenylrest
pH	Maß für die Protonenkonzentration $[H^+]$
PID	Proportional-Integral-Differential
PTFE	Polytetrafluorethylen
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SI	Système International d'Unités (International System of Units)
σ	Selektivität
STY	Raum-Zeit-Ausbeute, <i>engl.</i> space time yield $[mol\ m^{-3}\ s^{-1}]$
Tab.	Tabelle
<i>t</i> Bu	<i>tertiär</i> -Butylrest
TEA	Triethanolamin
<i>tert</i>	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
tof	Zyklenfrequenz, <i>engl.</i> turnover frequency $[mol\ s^{-1}\ mol^{-1}]$
Tris	1,1,1-Tris(hydroxymethyl)-methylamin
ttn	Zyklenzahl, <i>engl.</i> total turnover number $[mol\ mol^{-1}]$
UV	Ultraviolett

Symbol	Einheit	Verwendung
[A]	$mol\ L^{-1}$	Konzentration der Komponente A
<i>A</i>	m^2	Fläche
<i>a</i>	$m^2\ m^{-3}$	Phasengrenzfläche pro Volumen
A_m	m^2	mittlere logarithmische Fläche
c_g	$mol\ L^{-1}$	Volumenbezogene Grenzlöslichkeit
<i>d</i>	m	Durchmesser
Δ		Differenz
d_m	m	mittlerer logarithmischer Dicke
<i>e</i>		Elementarladung $e = 1,602\ 10^{-19}C$
E_0	mV	Normalpotential
E_A	bar	Elastizitätsmodul
η	Pa s	dynamische Viskosität
<i>F</i>		Faraday-Konstante $F = e\ N_A = 96,5\ 10^4 kJ\ mol^{-1}V^{-1}$
H_A	$Pa\ m^3\ mol^{-1}$	Henry-Konstante der Komponente A
<i>K</i>	–	Gleichgewichtskonstante
<i>k</i>	$mM\ s^{-1}$	Geschwindigkeitskonstante; 1.Ordnung:

Fortsetzung nächste Seite

Symbol	Einheit	Verwendung
κ	$\text{mol m s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{bar}^{-1}$	Stoffübergangskoeffizient
k_{fl}	$\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$	Übergangskoeffizient
L	$\text{mol Pa}^{-1} \text{m}^{-3}$	Ostwald-Löslichkeit
l	m	Länge
M	g mol^{-1}	molare Masse
M	mol L^{-1}	Molarität
η	–	Ausbeute
n	mol	Stoffmenge
N_A		Avogadro-Konstante $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{mol}^{-1}$
$\dot{n}$	mol s^{-1}	Stofffluss
ν_e	–	Anzahl der übertragenen Elektronen
p	bar	Druck, <i>engl.</i> pressure
p_A	bar	Partialdruck der Komponente A
R		allgemeine Gaskonstante $R = 8314,3 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
r	–	Retention
r_0	–	Überschussverhältniss
Re	–	Reynoldszahl
ρ	kg m^{-3}	Dichte
T	K	absolute Temperatur
t	s	Zeit, <i>engl.</i> time
$t_{1/2}$	s	Halbwertszeit
τ	s^{-1}	mittlere Verweilzeit
θ	$^{\circ}\text{C}$	Temperatur $\theta = T - 273,15 \text{ K}$
U	$\mu\text{mol min}^{-1}$	katalytische Aktivität, Unit
U	–	Umsatz
V	m^3	Volumen
V_M	mol m^{-3}	Molvolumen
v_A	$\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$	Reaktionsgeschwindigkeit bezüglich der Komponente A
x	m	Strecke
x_g	mol mol^{-1}	Molenbruch der Grenzlöslichkeit
ξ	–	Poissonsche Querkontraktionszahl

Teil I.

Allgemeiner Teil

1. Einleitung

*So far as I remember, I have never seen an Author's Preface
which had any purpose but one
– to furnish reasons for the publication of the book.*

Mark Twain

1.1. Chiralität

Sind Bild und Spiegelbild eines Gegenstands nicht deckungsgleich, so besitzt dieser Gegenstand die Eigenschaft chiral¹ zu sein. Von van t'Hoff wurde theoretisch vorhergesagt, dass dies bei chemischen Molekülen auftreten kann [259]. Die von ihm vorgeschlagene Erweiterung der Strukturformeln in die dritte Dimension ist sein besonderer Verdienst.² Für die organische Chemie zog er den Schluss, dass jedes Kohlenstoffatom mit vier unterschiedlichen Substituenten chiral ist, da Bild und Spiegelbild nicht deckungsgleich sein können. Dieses Kohlenstoffatom stellt ein sogenanntes Stereozentrum oder Chiralitätszentrum des Moleküls dar [76].

Bild und Spiegelbild eines Moleküls bezeichnet man als Enantiomere. Sie unterscheiden sich in der Regel in ihren physikalischen Eigenschaften nicht.³ Bei Wechselwirkung mit anderen chiralen Molekülen sind sie jedoch unterscheidbar,⁴ und es ergeben sich bei diesen sogenannten diastereomeren Wechselwirkungen energetische Unterschiede. Da die belebte Natur aus enantiomerenreinen Stoffen aufgebaut ist, ergeben sich beim Einsatz von chiralen Molekülen als pharmakologische Wirkstoffe Unterschiede in der Wirksamkeit der Enantiomere. Im besten Falle ist die 1:1-Mischung der spiegelbildlichen Moleküle –das sogenannte Racemat– genauso wirksam. Aber die pharmakologische Wirkung von Enantiomeren kann sich grundlegend unterscheiden [77], als Beispiel sei hier das Parkinson-Medikament Dopa **1** angeführt (Abbildung 1.1 auf der nächsten Seite). Bei dieser Verbindung hat nur die sogenannte L-Form beziehungsweise das *S*-Enantiomer⁵ die gewünschte Wirkung, und das *R*-Enantiomer ruft unerwünschte und zum Teil schwere Nebenwirkungen hervor. Dopa **1** wird daher ausschließlich in der *S*-Form verabreicht. Es wird unter verschiedenen Handelsnamen⁶ als enantiomerenreiner Stoff –fast ausschließlich als Kombinationspräparat mit anderen Wirkstoffen– vermarktet [92].

Da die spiegelbildlichen Molekülen keine physikalischen Unterschiede aufweisen, sondern nur durch diastereomere Wechselwirkungen mit anderen chiralen Molekülen unterscheidbar

¹von *χείρ* dem griechischen Wort für Hand

²Es gibt allerdings keinen Zweifel darüber, dass er mit den Vorlesungen von Kekulé vertraut war, der tetraedrische Modelle mit Kugeln und Stäben verwandte.

³Ausnahme ist die Änderung des Drehwinkels von linear polarisiertem Licht.

⁴Man versuche dem Gegenüber die falsche spiegelbildliche Hand zu schütteln.

⁵Zur rationellen Nomenklatur von Enantiomeren sei auf Lehrbücher der organischen Chemie verwiesen.

⁶zum Beispiel Madopar®, Roche

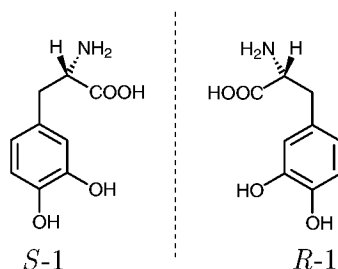


ABBILDUNG 1.1.: Die Enantiomere des Parkinson-Medikaments Dopa **1** mit angedeuteter Spiegelebene. Nur das (*S*)-Enantiomer beziehungsweise die L-Form wird als Wirkstoff vertrieben.

sind, kann die Homochiralität wie sie in der Natur für viele Verbindungen gefunden wird, nicht aus dem Nichts entstanden sein. Die Ursache für diese Bevorzugung eines bestimmten Enantiomers ist Gegenstand aktueller Forschung und Spekulationen. Unter anderem wird ein „sergeant and soldier principle“ diskutiert [137]. Dabei haben zum Beispiel die Untersuchungen zur ligandenbeschleunigten Katalyse gezeigt, dass schon minimale Enantiomerenüberschüsse bzw. Enantiomerenverhältnisse⁷, zur weiteren Anreicherung und somit selbstverstärkenden Selektivitätseffekten führen können [137]. Andere Untersuchungen zeigen, dass in supramolekularen Systemen sogar die Rührrichtung einen Einfluss auf die bevorzugte Ausbildung chiraler Aggregate haben kann [220]. Andere Versuche der asymmetrischen Induktion durch physikalische Effekte gehören jedoch leider in den Bereich der Fiktion [15].

Die gezielte Darstellung enantiomerenreiner Verbindungen wird in der modernen Chemie als besondere Herausforderung begriffen [77]. Es werden prinzipiell verschiedene Ansätze verfolgt, dieses Ziel zu erreichen. Das Repertoire der chemischen Synthese umfasst verschiedene Methoden zur Gewinnung chiraler Moleküle (Abbildung 1.2 auf der nächsten Seite). Diese lassen sich nach dem zugrundeliegenden Prinzip in vier Klassen unterteilen:

- „Chiral pool“ – Dabei bedient man sich eines enantiomerenreinen Stoffes, der aus der Natur meist leicht isoliert werden kann. Die chirale Information ist bei diesem Ansatz im Ausgangsmolekül enthalten.
- Chirale Reagenzien – Ein chirales Reagenz wird zur Umsetzung verwendet. Die chirale Information wird durch das Reagenz übertragen. Zu vielen klassischen organischen Reaktionen gibt es eine asymmetrische Variante.
- Racematspaltung – Die Auftrennung einer 1:1-Mischung von Enantiomeren durch:
 - chemische Reaktion – Durch Reaktion mit einem chiralen Katalysator wird nur ein Enantiomer umgesetzt.
 - physikalische Wechselwirkung – Durch diastereomere Wechselwirkung mit einer chiralen Phase können die Enantiomere getrennt werden.
- Asymmetrische Katalyse – Ein chiraler Katalysator beschleunigt die selektive Bildung eines Enantiomers. Die chirale Information des Katalysators wird amplifiziert.

⁷vergleiche auch Anhang B auf Seite 139

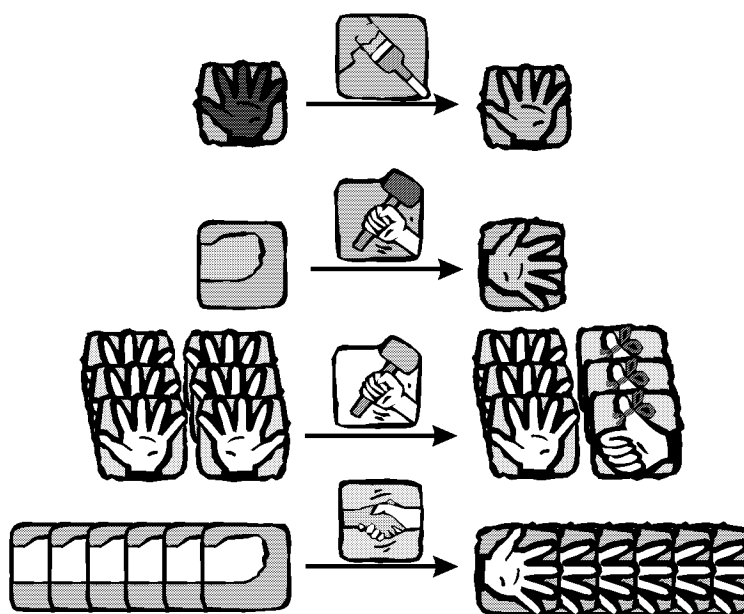


ABBILDUNG 1.2.: Methoden der asymmetrischen Synthese, von oben nach unten: „Chiral pool“, Chirale Reagenzien, Racematspaltung, Asymmetrische Katalyse; die Hände stehen dabei für chirale Moleküle.

Alle Verfahren werden auch in industriellem Maßstab zur Darstellung von enantiomerenreinen und angereicherten Stoffen genutzt [6, 32, 60, 236]. Man sollte meinen, dass die asymmetrische Katalyse das attraktivste Verfahren darstellt. Schließlich erlaubt es die Multiplikation der chiralen Information des Katalysators im katalytischen Schritt, da der Katalysator unverändert aus der Reaktion hervorgeht und so viele Reaktionen bewirken kann. Tatsächlich sind die am häufigsten angewandten Verfahren jedoch die Synthese aus dem „chiral pool“ oder die Racematspaltung. Dies hat verschiedene Ursachen, die im folgenden am Beispiel der Pharmaka veranschaulicht werden sollen.

1.1.1. Chirale Synthese am Beispiel Pharmaka

Am Beispiel der als pharmazeutischen Wirkstoffe vermarkteten Substanzen lässt sich zeigen, dass die Anwendung asymmetrischer Katalysatoren für industrielle Synthese nicht durchgesetzt ist. Die synthetische organische Chemie stellt zwar viele Methoden zur Vervielfältigung von chiraler Information durch asymmetrische Katalyse zur Verfügung [32, 128, 218], trotzdem ist der Anteil enantiomerenrein vermarkteter Stoff aus synthetischer Quelle gering. Wie sich aus der Abbildung 1.3 auf der nächsten Seite ablesen lässt, ist die Anzahl beziehungsweise der Anteil der synthetischen enantiomerenreinen Stoffe gegenüber der direkten Verwendung oder Modifikation von natürlicher chiraler Information gering. Obwohl mehr als 72% aller Substanzen synthetisch hergestellt werden, ist dabei der Anteil enantiomerenreiner Stoffe synthetischen Ursprungs mit etwa 3% gegenüber dem Anteil der aus natürlichen Quellen stammenden enantiomerenreinen Substanzen mit 28% gering. Die Natur als Quelle für enantiomerenreine Stoffe ist bei der industriellen Darstellung von Feinchemikalien mehr als acht Mal so erfolgreich wie die asymmetrische Katalyse.

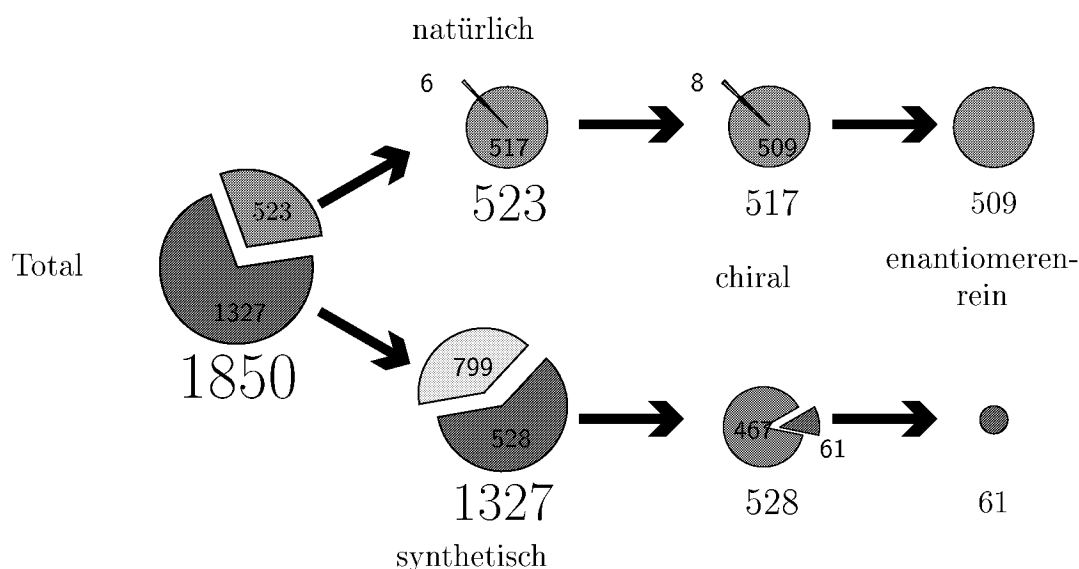


ABBILDUNG 1.3.: Von allen als Pharmaka vermarkteten Substanzen wird zwar mehr als zwei Drittel synthetisch hergestellt, trotzdem ist der Anteil enantiomerenreiner Stoffe aus dem „chiral pool“ mehr als acht Mal so groß, wie der aus synthetischer Quelle [176].

Die Gründe hierfür sind sehr verschieden und oft untrennbar miteinander verbunden [31, 50, 199, 204]:

- Katalysator

- Know-how – Der Einsatz von asymmetrischen Katalysatoren erfordert Vorwissen und andere Denkrouten als die klassische organische Synthese.
- Leistung – Die Zahl der vom Katalysator erbrachten Katalysezyklen (ausgedrückt durch die Zyklenzahl ttn) muss möglichst groß sein; ebenso ist eine hohe Aktivität in der Reaktion (ausgedrückt durch die Zyklenfrequenz tof) für die Wirtschaftlichkeit entscheidend.
- Selektivität – Sowohl an die Chemo- als auch die Regio- und Stereo-Selektivität werden hohe Ansprüche gestellt.
- Verfügbarkeit – Ein entsprechender Katalysator muss leicht in größeren Mengen verfügbar sein.
- Kosten – Die produktbezogenen Katalysatorkosten müssen niedrig sein.
- Abtrennung – Die Abtrennung eines homogenen Katalysators erfordert meist eine auf das jeweilige System maßgeschneiderte Lösung.
- Empfindlichkeit – Neben der Empfindlichkeit gegenüber Luft- und Feuchtigkeit sind Katalysatoren gegenüber vielen anderen Faktoren sensitiv. Dies erschwert eine empirische Optimierung der Synthese erheblich.

- Ausgangsstoffe

- Übertragbarkeit – Veränderungen im Ausgangstoff haben schwer antizipierbare Änderungen der Selektivität und Aktivität zur Folge.
- Verfügbarkeit – Die für hohe Selektivität und Aktivität erforderlichen Ausgangsstoffe sind als Vorläufer oft nicht verfügbar und erfordern weitere Syntheseschritte.
- Verunreinigungen – Schon Verunreinigungen im Spurenbereich können entscheidende Auswirkungen auf das Verhalten des Katalysators haben.

Das Zusammenspiel dieser Faktoren führt dazu, dass bei der schnellen Entwicklung einer industriell-technischen Synthese die klassische organische Chemie ausgehend vom „chiral pool“ oft schneller und zunächst (kosten)günstiger zum Ziel führt. Katalysatoren kommen dann meist erst in der zweiten Runde der Prozessoptimierung zum Zug, wenn der Kostendruck höher ist. Hier ist es aber oft von Nachteil, dass einzelne Schritte solcher Syntheserouten nur schwer mit katalytischen Methoden ausgetauscht werden können. Dann müssen ganze Synthesepfade neu entwickelt werden. Da bei immer mehr Wirkstoffen nur noch der enantiomerenreine Stoff als Zielsubstanz in Frage kommt,⁸ besteht ein Bedarf an Methoden zur kostengünstigen Darstellung aus nicht enantiomerenreinen Grundstoffen.

1.2. Membranreaktor

Wenn eine Methode zur Verfügung steht, die es erlaubt, den Katalysator selektiv im Reaktor zurückzuhalten, können die Aufenthaltszeiten beziehungsweise mittleren Verweilzeiten für Substrat und Produkt unterschiedlich von denen des Katalysators sein. Ein elegantes Konzept für diese Entkopplung der Verweilzeit von Reaktanden und Katalysator ist möglich, wenn sich diese durch eine physikalische Methode voneinander trennen lassen (Abbildung 1.4 auf der nächsten Seite). Im Reaktionsgefäß ist dann eine semipermeable Barriere enthalten, die für den Katalysator unüberwindlich, aber für die anderen Reaktionsteilnehmer durchlässig ist. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, ist die Immobilisierung des Katalysators. Der Katalysator wird dazu in einer Phase festgelegt. Dadurch reduziert sich das Problem der Abtrennung des Katalysators auf eine Phasentrennung. Dieses Prinzip wird für die asymmetrische Katalyse für alle möglichen Phasenkombinationen angewendet [271]. Für die kontinuierliche Abtrennung ist dann Voraussetzung, dass die Phase des Katalysators mit allen anderen Reaktionsphasen nicht mischbar ist. Das heißt aber, dass man eine weitere Phasengrenzfläche und entsprechende Massentransportlimitierungen in Kauf nimmt.

Handelt es sich bei dem Katalysator um ein im Vergleich zu Edukt und Produkt sehr großes Molekül, so kann man diesen Größenunterschied für die selektive Zurückhaltung des dann makromolekularen Katalysators ausnutzen. Die Abtrennung von homogen gelösten Makromolekülen kann durch geeignete Membranen erfolgen (Abbildung 1.5 auf der nächsten Seite). Ist das Makromolekül in der Reaktionsphase homogen löslich, so sollte dies die Massentransportlimitierungen minimieren, die bei Mehrphasensystemen zu beobachten sind.

Für katalytische Reaktionen konnte gezeigt werden, dass die Abtrennung des Katalysators vorteilhaft mit der kontinuierlichen Reaktionsführung verbunden werden kann [67, 94, 130, 153–155, 159, 163, 164, 248, 278]. Die kontinuierliche Reaktionsführung begegnet auch einer Reihe von Problemen, die dem Einsatz von Katalysatoren in der technischen

⁸Bei über 80% der in der Entwicklung befindlichen Pharmaka handelt es sich um enantiomerenreine Stoffe [60].

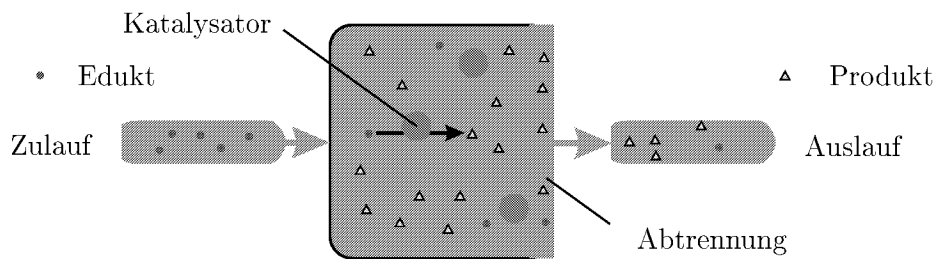


ABBILDUNG 1.4.: Prinzip der kontinuierlichen Reaktionsführung mit physikalischer Rückhaltung des Katalysators

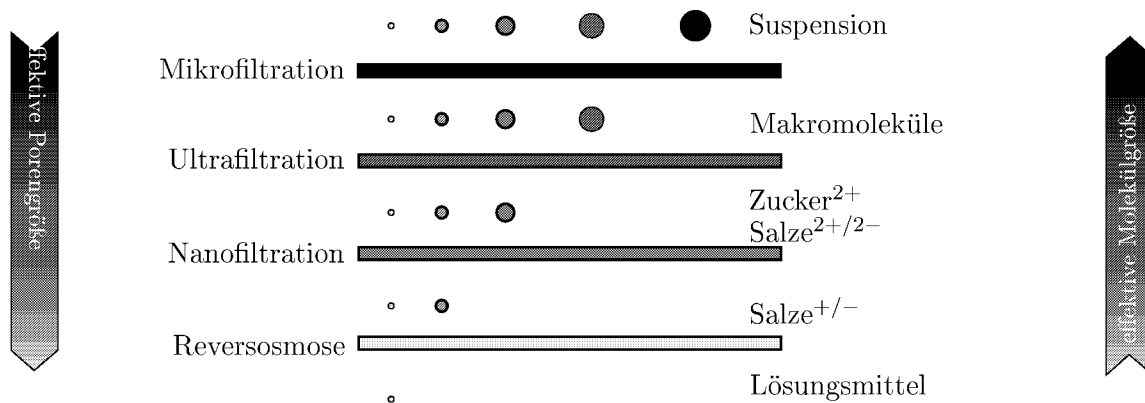


ABBILDUNG 1.5.: Einteilung von Membranverfahren nach Rückhaltevermögen

Anwendung entgegenstehen. So ist die Einhaltung von definierten Bedingungen im Reaktionsraum vereinfacht, da sich an einem stabilen Betriebspunkt die Konzentrationen zeitlich invariant verhalten. Weiterhin erlaubt die kontinuierliche Verfahrensweise die Einsparung von Rüst- und Ladezeiten bei gleichbleibender Produktqualität [166].

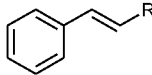
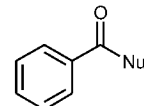
1.2.1. Enzym Membranreaktor

Enzyme sind Makromoleküle, deren katalytische Aktivität mit der makromolekularen Struktur eng verknüpft ist [252]. Die selektive Rückhaltung mit Hilfe von Membranen ist Stand der Technik und wird routinemäßig angewandt. Für den kontinuierlichen Betrieb von Enzym Membranreaktoren (EMR) gibt es zahlreiche Beispiele, die das breite Spektrum der verfügbaren Biokatalysatoren abdecken [124, 159, 170, 216, 279, 279].

1.2.2. Chemzym Membranreaktor

Chemische Katalysatoren ergänzen das Spektrum der durch Enzyme zugänglichen Reaktionen. So gibt es eine Reihe von Reaktionsklassen, die bisher nur durch metallvermittelte Katalyse zugänglich sind, die wichtigsten sind in der Tabelle 1.1 dargestellt. Insbesondere hohe Selektivitäten in Bezug auf die Synthese nur eines gewünschten Enantiomers sind bislang nur mit homogen löslichen Katalysatoren zu erzielen [128].

TABELLE 1.1.: Reaktionsklassen die bisher ausschließlich durch Metallkatalysatoren vermittelt werden können. Literaturstellen sind nur für entsprechende asymmetrische Systeme angegeben.

Reaktion	Edukte			Produkte	
Heck-Reaktion, Stille- und Suzuki-Kupplung		+			+ HX
Carbonylierung von Halogenarylen		+	CO + Nu ⁻		+ X ⁻
Hydroformylierung von Alkenen		+	CO + H ₂		
Metathese von Alkenen [119]		+			+ =
Hydrierung des aromatischen Ringes [253]		+	3 H ₂		

Solche als Homogenkatalysatoren bezeichneten Metallkomplexe und Moleküle haben im Vergleich zu Enzymen im allgemeinen ein geringes Molekulargewicht und sind effektiv zu klein, um sich quantitativ durch Membranen zurückhalten zu lassen [243].⁹ Aber Homogenkatalysatoren lassen sich durch Anbindung an ein Makromolekül durch Membranen selektiv zurückhalten [18]. Für diese Katalysatoren ist der Begriff „Chemzym“ vorgeschlagen worden [278]. Um ausreichende Retention durch Membranfiltration zu erreichen ist es nötig, das Molekulargewicht des Katalysators und damit die effektive Molekülgröße zu vergrößern. Für diese Erhöhung des Molekulargewichts stehen verschiedenste Techniken zur Verfügung; eine gute Übersicht der Methoden und verwendeten Makromoleküle findet sich bei Laue [163].

In der kontinuierlichen asymmetrischen Synthese ist der Ansatz des Chemzym Membranreaktors (CMR) mit molekulargewichtsvergrößerten Katalysatoren beziehungsweise Chemzymen mit mehr [278, 279] oder weniger [38, 280] großem Erfolg angewendet worden [154]. Die ligandenbeschleunigten Reaktionen der Boranreduktion nach Corey [82, 94, 95] und die asymmetrische Diethylzinkaddition [153] sind erfolgreiche Beispiele für den kontinuierlichen Einsatz im Membranreaktor. Jüngstes Beispiel ist der Einsatz eines Edelmetallkomplexes zur Transferhydrierung durch Laue [163], Laue u. a. [164].

⁹Eine annähernd quantitative Retention ist Voraussetzung für die effektive Entkopplung der Verweilzeiten; vergleiche Anhang D auf Seite 153.

2. Übergreifende Problemstellung und Zielsetzung

Der Einsatz eines Membranreaktors zur kontinuierlichen Reaktionsführung ist ein elegantes Konzept zur simultanen Abtrennung und Rezyklierung des Katalysators [154, 164, 279]. Allerdings ist der Einsatz von Reduktionsmitteln auf solche begrenzt gewesen, die in der flüssigen Phase mindestens in stöchiometrischen Mengen löslich sind. Will man zum Beispiel das kostengünstige und leicht zugängliche Reduktionsmittel Wasserstoff einsetzen (Abbildung 2.1 auf der nächsten Seite), ist aufgrund der geringen Löslichkeit im Reaktionsmedium die Anwesenheit der gasförmigen Komponente nicht zu vermeiden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Technik des Membranreaktors auf den Einsatz von gasförmigen Reagenzien zu erweitern. Als Modellsystem sollte die Reduktion mit Wasserstoff als Reduktionsmittel dienen. Für die Anwendung des Membranreaktors wird sowohl der Einsatz in einem chemischen als auch in einem enzymatischen System angestrebt.

Übergreifend für beide Anwendungen stehen die Entwicklung und der Aufbau eines Membranreaktors und die Weiterentwicklung von Gas- und Flüssigdosiersystemen im Vordergrund. Beide Systeme sollen durch den Einsatz geeigneter Techniken kinetisch charakterisiert werden und in der kontinuierlichen Synthese angewendet werden. Die sich hierfür beim jeweiligen System gesondert ergebenden Problemstellungen und Ziele werden für die einzelnen Teile genauer erläutert:

- Dosierung und Reaktortechnik – Abschnitt 3.1 auf Seite 13
- Homogenkatalytische Hydrierung – Kapitel 5 auf Seite 39
- Enzymkatalytische Hydrierung – Kapitel 10 auf Seite 75

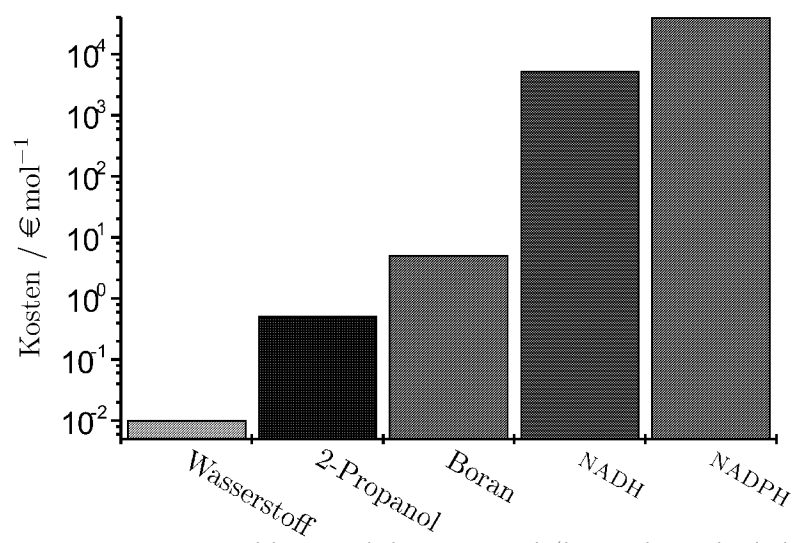


ABBILDUNG 2.1.: Kosten ausgewählter Reduktionsmittel (logarithmisch skaliert)

3. Dosierung

*Wer in technischer Chemie promovieren möchte,
muss zuerst dosieren lernen.*

K. Schügerl

3.1. Problemstellung und Zielsetzung

Die exakte Dosierung von Flüssigkeiten und Gasen ist in der chemischen Reaktionstechnik und in der technischen Chemie von zentraler Bedeutung. Über das Dosieren werden letztendlich die wichtigen Prozessparameter festgelegt, wie die Konzentration und das Verhältnis der Reaktanden, Kontaktzeiten, Verweilzeit und andere.

Für die Kontrolle der Dosierung von Flüssigkeiten im Membranreaktor (EMR beziehungsweise CMR) ergeben sich besondere Anforderungen an die Dosiertechnik, die für die durchgeführten Reaktionen entscheidend sind:

- Inertbedingungen
Die Reaktionen müssen wegen der Empfindlichkeit der verwendeten Katalysatoren unter strengstem Ausschluss von Feuchtigkeit und Sauerstoff durchgeführt werden.
- Druckfestigkeit
Die Triebkraft der Membranfiltration zur Rückhaltung der Katalysatoren ist der transmembrane Differenzdruck. Dieser treibende Druck wird von der Dosierstrecke aufgebaut.
- Regelbarkeit
Änderungen in den Betriebsparametern können zu Änderungen des Flusses führen. Dies sollte durch einen geschlossenen Regelkreis kompensiert werden.

Die bisher verwendeten Dosierpumpen haben sich zum Teil als ungeeignet erwiesen, die genannten Anforderungen zu erfüllen. Im folgenden wird ein Ansatz vorgestellt, der die Schwächen der bisher verwendeten Dosierpumpen beheben soll. Für die Erfassung der Stoffflüsse in Echtzeit wurde dabei die thermische Massenflussmessung verwendet.¹

3.2. Flüssigkeiten

Bei den bisherigen Arbeiten zum chemischen Membranreaktor hatten sich Wechselkolbenpumpen bewährt (Abbildung 3.1 auf der nächsten Seite) [94, 163, 164]. Diese sind in der Lage, gleichmäßige, pulsationsarme Flüsse zu liefern, und Drücke bis zu 40 bar aufzubauen. Allerdings stellte sich im Laufe der Arbeiten zur kontinuierlichen Wasserstoffreduktion und

¹für das Prinzip der Massenflussmessung vergleiche auch Abschnitt 16.2 auf Seite 119

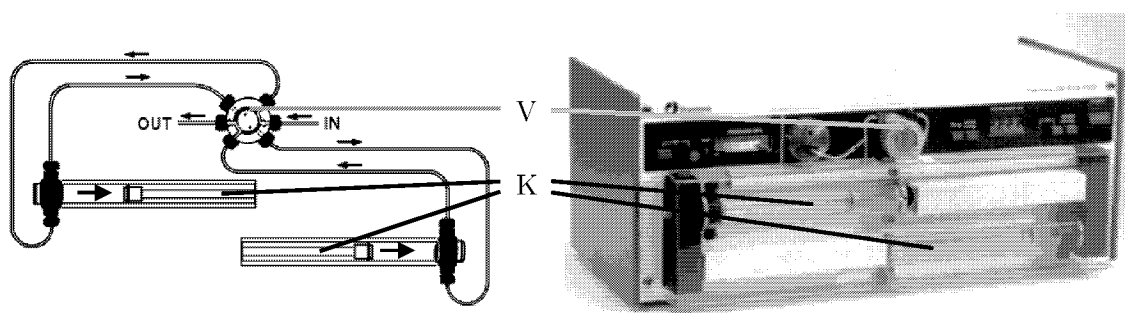


ABBILDUNG 3.1.: Prinzip der Förderung bei der Wechselkolbenpumpe und Bild der Pharmacia P-500 Pumpe [209]

(V: 2/6-Wege-Stellventil; K: Kolbenzylinder)

der Transferhydrierung [163] heraus, dass die Pumpen für die durchzuführenden Experimente nicht geeignet waren. Diese Einschränkungen sind zum Teil bauartbedingt, zum anderen aber auch auf Korrosion zurückzuführen. Kommerziell waren keine Pumpen verfügbar, die alle oben genannten Punkte erfüllten. Daher wurden die vorhandenen Pumpen umgerüstet, da sie den Anforderungen am ehesten entsprechen.

Die Pumpen zeigten verschiedene charakteristische Ausfälle. Zum einen führten minimale Leckagen im Stellventil zu Schlupf- und Kurzschlussflüssen, wodurch der effektive Fluss vom Gegendruck und der Viskosität der Flüssigkeit abhängig war. Zum anderen zeigte sich, dass die Elektronik der Pumpen unzuverlässig war, und sogar totale Ausfälle zu verzeichnen waren. Diese Schwachpunkte sollten durch geeignete Maßnahmen beseitigt werden. Einerseits die Umrüstung auf ein anderes Stellventil, und andererseits die Ansteuerung der Pumpe. Für die Steuerung sollte die interne Elektronik umgangen werden. Die Flusskontrolle kann dann durch Benutzung von Massenflussmessung in einem geschlossenen Regelkreis erfolgen.

Für die Ansteuerung gab es ein bauartbedingtes Problem um den angestrebten Flussbereich zu erreichen. Zwar waren die Pumpen nominal für minimale Flüsse von 1 mL h^{-1} ausgelegt, es stellte sich aber heraus, dass bei diesem minimalen Fluss die Taktfrequenz des Schrittmotors von 1 Hz für die Einstellung eines pulsationsarmen Flusses zu groß war. Diese Steuerfrequenz erwies sich auch für den Aufbau eines Regelkreislaufes mittels Massenflussmessung als zu niedrig. Daher wurden insgesamt drei Maßnahmen durchgeführt:

1. Einbau eines Untersetzungsgetriebes – Da der maximale Fluss von 500 mL h^{-1} ohnehin für den Einsatz mit Membranreaktoren zu groß dimensioniert war,² kann der Bereich durch ein Untersetzungsgetriebe verkleinert werden. Dadurch wird die Auflösung im unteren Flussbereich verbessert.
2. Ansteuerung mittels thermischer Massenflussmessung – Die computergestützte Steuerung und Aufzeichnung des Flusses macht diesen wichtigen Parameter für den CMR in Echtzeit verfügbar.
3. Austausch des Stellventils – Der Austausch des Stellventils sollte die Probleme beseitigen, die auf Korrosion des werkseitig verwendeten Ventils zurückgeführt wurden.

²typische Flüsse für EMR und CMR im Bereich 1 mL h^{-1} bis 30 mL h^{-1}

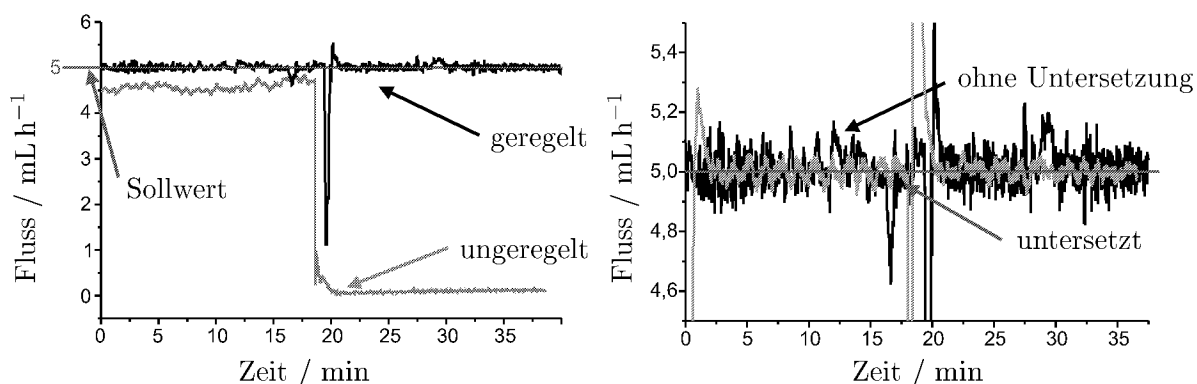


ABBILDUNG 3.2.: Die Auftragung des Flusses als Funktion der Zeit bei verschiedenen Konfigurationen der Wechsellkolbenpumpe P-500 (man beachte, dass die Ordinate nicht bei null beginnt). Rechts ist der Fluss im Vergleich zwischen einer untersetzten und einer Pumpe ohne Untersetzungsgetriebe gezeigt. (2-Propanol; 5 bar Gegendruck)

3.2.1. Ergebnis

Durch den Umbau wurde eine Dosierpumpe für den Betrieb im Membranreaktor erhalten, die den Anforderungen an die Dosierung von Flüssigkeiten gerecht wird.³

Die Abbildung 3.2 zeigt die Flüsse im Vergleich; im linken Teil der Abbildung ist ersichtlich, dass ein undichtiges Stellventil durch die Regelung kompensiert werden kann.⁴ Effektiv fördert bei der nicht geregelten Pumpe nur ein Kolben. Durch die Regelung wird die Vor-schubgeschwindigkeit der Pumpe erhöht, um den Sollfluss zu erreichen. Dazu wird ein höherer Sollwert für die Geschwindigkeit vorgegeben. Dies ist allerdings keine zufrieden stellende Lösung, denn dadurch wird am Ventil ein höherer als der für die Förderung notwendige Druck erzeugt, und man nimmt durch den Schlupf eine Rückvermischung in Kauf. Dies ist durch die Verwendung der höherwertigen Ventile ausgeschlossen. Die Umrüstung mit Untersetzungsgetriebe bewirkt, dass die Amplitude der Schwankungen in etwa halbiert wird (Abbildung 3.2). Dies vereinfacht die Ansteuerung, und die Auflösung des Flusses wird verbessert. Dies ist vor allem bei der parallelen Dosierung zweier Reaktanden unter Verwendung von zwei Pumpen wichtig, wie sich bei der kontinuierlichen Transferhydrierung gezeigt hat [164]. Dort wurde das Aktivierungsreagenz Kalium-2-propanolat über eine zweite Pumpe dosiert. Die hohe ttn des verwendeten Katalysators und vor allem die hohe Selektivität, die sich im Enantiomerenverhältnis (*er*) des Produktes niederschlägt, ließ sich effektiv erst durch die Verwendung der untersetzten und angesteuerten Pumpen realisieren. Andere Versuche mit ungeregelten Pumpen belegen dies eindrucksvoll [163].

3.3. Gase

Ist bei einer homogenen Reaktion einer der Reaktanden unter den Bedingungen der Reaktion gasförmig, so begrenzt oft die Löslichkeit des Gases in der flüssigen Reaktionsphase die Reaktionsgeschwindigkeit.

³vergleiche auch Abschnitt 3.1 auf Seite 13

⁴Ohne Gegendruck war der Fluss für beide Pumprichtungen gleich.

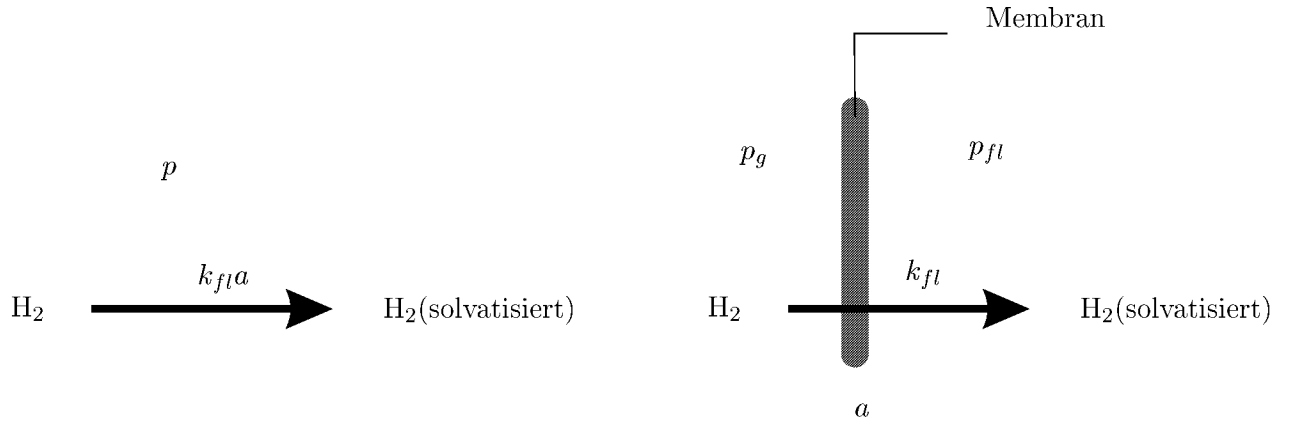
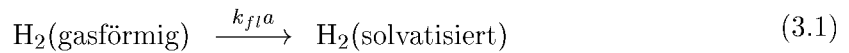


ABBILDUNG 3.3.: Durch den Einsatz von Membranen als Phasengrenzfläche können die Parameter der Solvatisierung entkoppelt werden (V : Volumen; p : Druck; a : Phasengrenzfläche; fl : Flüssigseite; g : Gasseite).

Die Solvationsreaktion von Wasserstoff



wird durch die volumenspezifische Austauschfläche $a = [\text{m}^2 \text{m}^{-3}]$ und den Übergangskoeffizienten $k_{fl} = [\text{ms}^{-1}]$ beschrieben. Das der homogenen Reaktion vorgelagerte Gleichgewicht und die Geschwindigkeit der Solvation des Gases in der Flüssigkeit können für die Reaktion geschwindigkeitsbestimmend sein.

Dabei sind im allgemeinen weder a noch k_{fl} experimentell direkt zugänglich, und werden oft nur als zusammengesetzte Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung⁵ angegeben. Dass die Solvationsgeschwindigkeit des Gases limitierend ist, findet sich in der Literatur in der Regel damit beschrieben, dass die Reaktion durch Einschalten des Rührers gestartet wird, oder dass die Reaktionsgeschwindigkeit eine Funktion der Rührerdrehzahl ist [254]. Erst durch Erhöhung der Phasengrenzfläche und durch die Verringerung der flüssigseitigen Filmdiffusionschicht kommt es zu messbaren Reaktionsgeschwindigkeiten.

Ersetzt man die Phasengrenzfläche durch eine dichte Membran, so werden k_{fl} und die Austauschfläche a voneinander entkoppelt. Zusätzlich wird der vorher gemeinsame Druck p aufgespalten, da es die Membran erlaubt, ein Druckgefälle zu etablieren. Es ergeben sich die zwei Drücke p_{fl} auf der flüssigen Phase und p_g in der Gasphase (Abbildung 3.3).

Dieses Prinzip der Versorgung mit einer gasförmigen Komponente wird erfolgreich für die Sauerstoffversorgung bei der Fermentation tierischer Zellen eingesetzt [194]. Dabei ist der Hauptgrund, die Scherkräfte an der Phasengrenzfläche zu vermeiden, durch welche die empfindlichen Zellen zerstört werden. Auch für die Dosierung von Sauerstoff bei der enzymatischen Oxidation wurde bereits ein Membranverfahren von Rissom [216] eingesetzt.

Für den Einsatz bei einer kontinuierlichen Membranfiltration ergeben sich weitere Vorteile. So kann das System auf der Flüssigseite geschlossen betrieben werden. Durch die blasenfreie Begasung und die Trennung von gasförmiger und flüssiger Phase durch eine Membran ist

⁵Die zusammengesetzte Einheit ergibt eine Frequenz: $[k_{fl}a] = [\text{m}^{-1}\text{s}^{-1} \text{m}^2 \text{m}^{-3}] = [\text{s}^{-1}]$.

die Verweilzeitkontrolle im flüssigen Volumen vereinfacht. Weiterhin wird Reaktorvolumen eingespart, da das für die gasförmige Komponente benötigte Volumen minimiert werden kann, im Gegensatz zu einem herkömmlichen Reaktionsautoklaven bei dem ein Drittel bis etwa die Hälfte des Reaktorvolumens für die gasförmige Komponente angesetzt werden muss.

3.3.1. Mathematische Behandlung des Stoffübergangs

Oft ist es von Nutzen sich zuerst mit einem analogen Wärmeleitungsproblem zu beschäftigen, bevor man sich dem tatsächlichen Diffusionsvorgang zuwendet.

Fowkes und Mahony [88, S. 4]

Der Stofftransport an einer dichten Polymermembran lässt sich analog der Wärmeleitung behandeln [86, 88, 93, 185]. Die Abbildung 3.4 auf der nächsten Seite zeigt die wichtigsten Kenndaten einer solchen Schlauchmembran wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Als effektive Austauschfläche wird die mittlere logarithmische Fläche A_m mit der Länge l und den inneren beziehungsweise äußeren Durchmessern d_i und d_a des Schlauchs angenommen:

$$A_m = \pi d_m l \quad (3.2)$$

mit der mittleren logarithmischen Dicke

$$d_m = \frac{d_a - d_i}{\ln \frac{d_a}{d_i}} \quad (3.3)$$

Dann ist der Stoffübergang $\dot{n} = [\text{mols}^{-1}]$ proportional zum Differenzdruck Δp und antiproportional zur Dicke der Membran $d_a - d_i$. Mit der stoffspezifischen Konstante κ ergibt sich für den Stoffübergang:

$$\dot{n} = \kappa \frac{A_m \Delta p}{d_a - d_i} \implies \dot{n} = \kappa \frac{\pi l \Delta p}{\ln \frac{d_a}{d_i}} \quad (3.4)$$

Je größer der Differenzdruck, je dünner die Membran und je größer die Fläche A_m , umso größer ist der Stofffluss. Je dicker die Membran ist, umso höher ist der Druck, der von der Membran gehalten wird; aber umso höhere Drücke müssen angewendet werden, um vorgegebene Flüsse zu erreichen.

3.3.2. Test verschiedener Polymere

Zunächst wurden solche Polymermembranen ausgewählt, die kommerziell verfügbar sind und eine gute Lösungsmittelstabilität aufweisen. Bei den Arbeiten von Laue [163] hatte sich gezeigt, dass es für eine ausreichende Löslichkeit des polymervergrößerten Katalysators nötig war, mit einem Lösungsvermittler zu arbeiten. Um in der Wahl des Lösungsmittels nicht eingeschränkt zu sein, wurden inerte Polymere ausgewählt, deren Quellung im organischen Lösungsmittel vernachlässigbar ist.

Zur Bestimmung der Stoffkonstante⁶ κ_{H_2} wurden verschiedene Polymere auf ihre Permeabilität für Wasserstoff getestet. Dabei stellte sich schnell heraus, dass Polytetrafluorethylen

⁶ κ ist vom Gas und vom Material abhängig; vergleiche Gleichung (3.4)

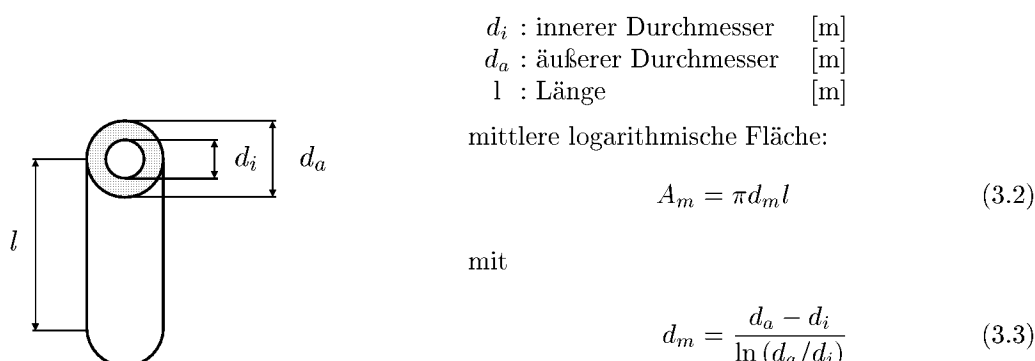


ABBILDUNG 3.4.: Kenngrößen einer Schlauchmembran mit der daraus abgeleiteten mittleren logarithmischen Fläche A_m

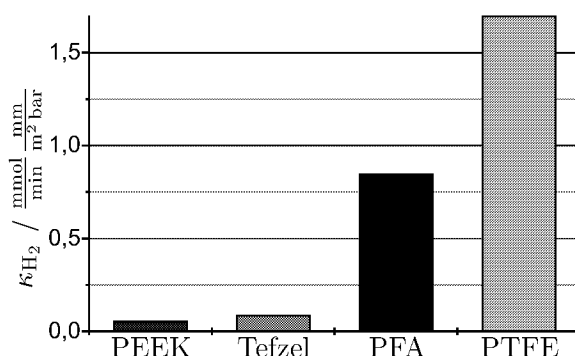


ABBILDUNG 3.5.: Experimentell bestimmter relativer Stoffübergang für ausgewählte, lösungsmittelstabile Polymere (Schlauchmembran, mit jeweils $d_i = 0,79$ mm; $d_a = 1,59$ mm; $\Delta p = 10$ bar)

(PTFE) aus mehreren Gründen das Material der Wahl war. Dieses Perfluoropolymer, das in vielen verschiedenen Formen kommerziell erhältlich ist, besitzt den größten Massendurchgangskoeffizienten κ der getesteten Polymere. Verglichen mit anderen lösungsmittelstabilen Materialien ergibt sich mindestens eine Verdopplung unter vergleichbaren Bedingungen (Abbildung 3.5).

3.3.3. Volumenbegaste Reaktion

Um das angestrebte Verfahren der membranbegasten Reaktion zu verifizieren, wurde eine literaturbekannte Modellreaktion ausgewählt. Die Hydrierung von 2-*N*-Acetyl-acetamidozimtsäuremethylester (10) kann mit einem kationischen Rhodiumkomplex des kommerziell erhältlichen Liganden BPPM **18** durchgeführt werden (Abbildung 3.6 auf der nächsten Seite) [2, 74].⁷ Der Reaktionsverlauf im drucklosen Reaktionsgefäß mit einer Schlauchmembran folgt der Geschwindigkeit des Wasserstoffeintrags, nachdem die Aktivierungsphase des Katalysator beendet ist. Bei diesem Versuch wurde eine sehr hohe Katalysatorkonzentration von 10 mol% eingesetzt, damit die Geschwindigkeit der Solvation beziehungsweise der Wasserstoffeintrag limitierend ist [74]. Die Bilanzlücke des Wasserstoffs von etwa 10% entspricht vermutlich der

⁷vergleiche auch den Abschnitt II auf Seite 29

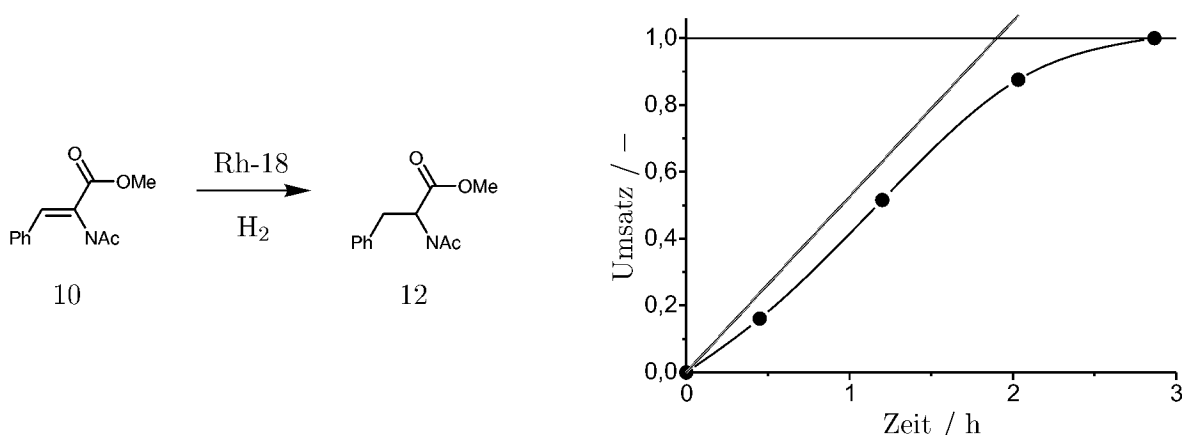


ABBILDUNG 3.6.: Verlauf der membranbegasteten Hydrierung mit Rh-BPPM Rh-18: Die durchgezogene Linie zeigt den theoretischen Umsatz nach Wasserstoffeintrag, die Punkte sind der unabhängig bestimmte Umsatz.

(2-Propanol; [10]=10 mM; [Rh-18]=1 mM; 25 °C; Membran: PTFE $A_m=180\text{ cm}^2$; $\Delta p = 8\text{ bar}$)

Menge die für die Aktivierung des Katalysators benötigt wird. Durch die Verwendung der hohen Katalysatorkonzentration kann sichergestellt werden, dass die Wasserstoffkonzentration nicht die Löslichkeitskonzentration überschreitet. Damit ist eine blasenfreie Versorgung der Reaktion mit Wasserstoff möglich.

3.4. Volumenbegaster Membranreaktor

3.4.1. Reaktoraufbau

Für den Einsatz in einem kontinuierlichen System mit Retention des Katalysators durch geeignete Filtrationsmembranen ist die modulare Kombination von Membranfiltration und membrangestützter Begasung nötig. Die Anforderungen an den Reaktor sind in Bezug auf Inertbedingungen und Druckfestigkeit die gleichen, wie sie bereits für die Dosiertechnik von Flüssigkeiten formuliert wurden.⁸ Spezifische Anforderungen ergeben sich aus der möglichst idealen Annäherung an einen kontinuierlich betriebenen Rührkessel (CSTR) und der Skalierbarkeit:

- Überströmung der Membranen – Die Filtrationsmembran und die Begasungsmembran müssen zur Vermeidung von Polarisierungseffekten und Konzentrationsgradienten mit ausreichender Überströmung angespült werden.
- Druckkontrolle – Die Drücke auf der Gasseite und der Flüssigseite sind die Parameter, die den Stoffübergang des Gases bestimmen.
- Großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis – Dies gilt vor allem für die Membranbegasung, da der Wasserstoffeintrag für die angestrebten Reaktionen limitierend ist.

Für die Dosierung von Gasen lassen sich die genannten Forderungen durch ein Doppelrohrmodul kombinieren. Dazu wird eine Schlauchmembran konzentrisch in der Mitte eines

⁸vergleiche Abschnitt 3.1 auf Seite 13

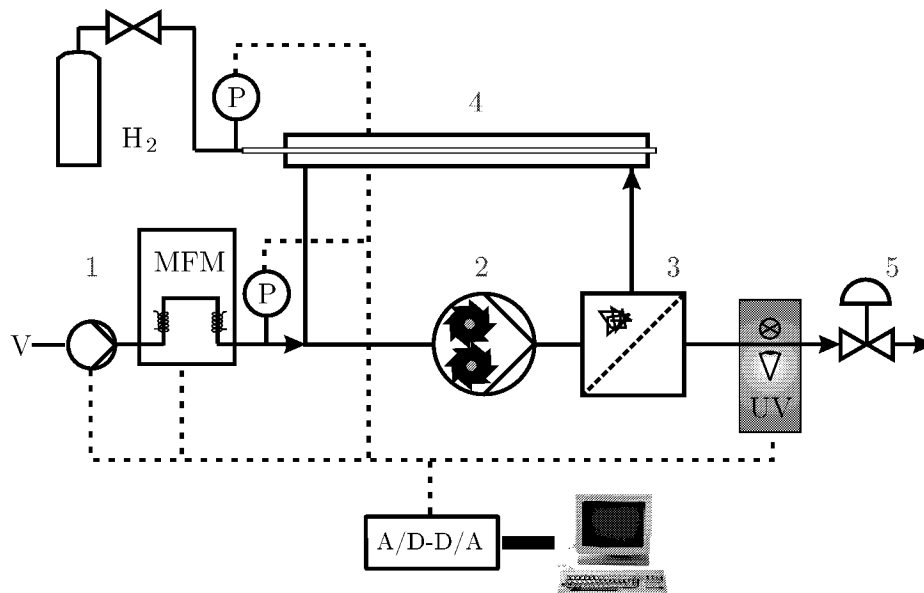


ABBILDUNG 3.7.: Fließschema des volumenbegasten Membranreaktors
(V: Vorat; 1: Dosierpumpe; MFM: Massenflussmesser; P: Druckaufnehmer; 2: Umlaufpumpe; 3: Filtrationszelle; 4: Volumenbegasung; H_2 : Wasserstoffversorgung; UV: UV-Messzelle; 5: Druckhalteventil; A/D-D/A: Signalwandlung und -verarbeitung)

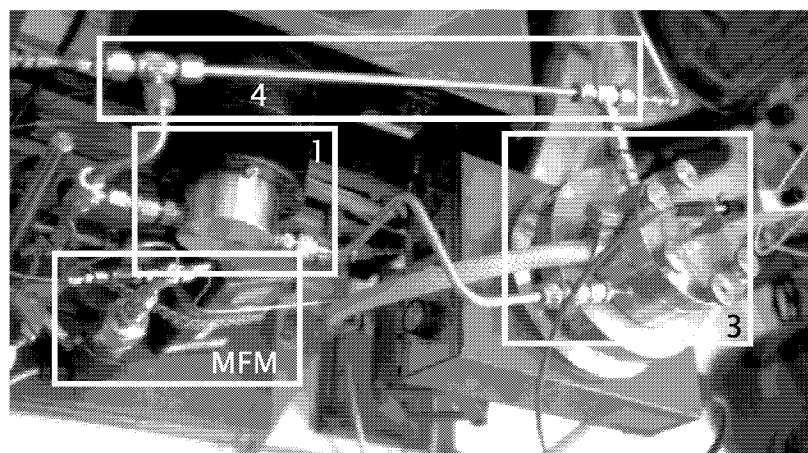


ABBILDUNG 3.8.: Foto der Versuchsanlage mit Zuordnung zu den Teilen aus dem Fließschema (vergleiche Abbildung 3.7)

zweiten Rohres angebracht. Dieser Aufbau ist dem eines Doppelrohrwärmetauschers analog, nur wird statt Wärme die gasförmige Komponente transportiert. Dieser Aufbau ist durch Rohrbündel leicht skalierbar.

Ein Reaktor, der die genannten Forderungen erfüllt, wurde im Labormaßstab aufgebaut. Das Fließschema des Reaktors ist in der Abbildung 3.7 gezeigt; ein Foto des Umlaufs mit Begasungs- und Filtrations-Modul gibt die Abbildung 3.8 auf der vorherigen Seite wieder.

Für die kontinuierliche Membranfiltration wurde ein Modul eingesetzt, das dem in vorherigen Arbeiten verwendeten Membranreaktor entspricht dem von Giffels [94], Laue [163]. Dieser wurde so modifiziert, dass er eine Durchströmung erlaubt, und so in den Umlauf integriert werden konnte. Das Filtrationsmodul wurde gleichzeitig als Wärmetauscher verwendet, und diente der Thermostatisierung des Umlaufs. Als Dosierpumpe wurde die oben vorgestellte modifizierte Wechselkolbenpumpe eingesetzt. Für den Umlauf wurde eine Zahnradpumpe verwendet, die sich für den Einsatz als Umlaufpumpe bei der Pervaporation als günstig erwiesen hatte [249, 250]. Die Kontrolle des flüssigseitigen Drucks ist durch ein nachgeschaltetes Ventil im Auslauf möglich. Zur Kontrolle der Auslaufkonzentrationen wurde zusätzlich eine druckfeste UV-Messzelle integriert.

3.4.2. Druckfestigkeit

Keep it simple: as simple as possible, but not simpler.
Albert Einstein

Für den an Wärmetauscher angelehnten Aufbau des Reaktors stellt sich die Frage, ob die Gasseite besser im Inneren der Polymermembran oder zwischen Aussenrohr und Membran geführt wird. Für die optimale Ausnutzung der Membranfläche muss dafür bei gegebenen Dimensionen die mögliche Druckdifferenz maximiert werden, da nach (3.4) der Differenzdruck Δp Triebkraft des Stoffflusses ist.

Der maximale Differenzdruck beziehungsweise der Berstdruck p_{berst} , der von der Schlauchmembran gehalten werden kann, ist eine Funktion der Durchmesser d_i und d_a [93]:

$$p_{\text{berst}} = \frac{E_A(d_a - d_i)}{d_i} \quad . \quad (3.5)$$

Je größer das Verhältnis von Membrandicke zum Innendurchmesser und je steifer das Material ist, ausgedrückt durch das Elastizitätsmodul E_A , desto größer ist der Berstdruck. Unter dem Knickdruck p_{knick} versteht man den Druck, der nötig ist, das Material über die Elastizitätsgrenze hinaus zu verformen, also in diesem Fall die Schlauchmembran zusammenzudrücken. Es gilt

$$p_{\text{knick}} = \frac{E_A(d_a - d_i)^3}{8d_a^3(1 - \xi^2)} \quad . \quad (3.6)$$

Die *Poissonsche-Querkontraktionszahl* ξ ist das Verhältnis der relativen Querkontraktion $\Delta x/x$ zur relativen Längenänderung $\Delta l/l$ bei einachsiger Zugbelastung in Längsrichtung:⁹

$$\xi = -\frac{\Delta x/x}{\Delta l/l} = [-] \quad , \quad (3.7)$$

⁹„Wieviel dünner wird das Gummiband wenn man es zieht?“

dabei gilt

$$-1 < \xi < 1 \quad (3.8)$$

für alle Stoffe [214]. Typische Größen für Polymere sind $0,4 \geq \xi \geq 0,6$ [211].

Für das Verhältnis der Drücke gilt mit (3.5) beziehungsweise (3.6)

$$\frac{p_{\text{berst}}}{p_{\text{knick}}} = 8 \frac{d_a^3}{d_i(d_i - d_a)^2} (1 - \xi)^2 \quad (3.9)$$

Mit $d_a = 1,6$ mm; $d_i = 1,0$ mm und einem Wert für das Polymer von $\xi = 0,5$ ergibt sich zum Beispiel

$$\frac{p_{\text{berst}}}{p_{\text{knick}}} \approx 11,4(1 - \xi)^2 = 8,5 \quad .$$

Wegen

$$0 < d_i < d_a \quad ,$$

ist der Ausdruck für das Verhältnis (3.9) stets größer als eins. Daher ist der Berstdruck für polymere Schlauchmembranen immer größer als der Knickdruck. Der Aufbau mit dem Gas im inneren Rohr des Begasungsmoduls den Betrieb mit höheren Differenzdrücken als es andersherum der Fall wäre.¹⁰ Weil der Fluss proportional zum Differenzdruck ist, bedeutet dies eine bessere Ausnutzung der Membranfläche zur Begasung, da durch den höheren Differenzdruck ein höherer Stofffluss pro Fläche möglich ist. Daher ist dieser Betriebsweise auch der Vorzug gegenüber der umgekehrten Anordnung der Arbeiten von Rissom [216] gegeben worden.

3.4.3. Abschätzung der Strömungsbedingungen

Im gewählten Doppelrohrmodul lassen sich Konzentrationsgradienten vermeiden, indem man im Bereich turbulenter Strömung arbeitet [166]. Die dafür erforderlichen Mindestflüsse für verschiedene Lösungsmittel lassen sich über die Definition der Reynoldszahl Re berechnen [93]:

$$Re = \frac{v d_h \rho}{\eta} \quad (3.10)$$

mit der Geschwindigkeit des Fluids v , dem hydraulischen Durchmesser d_h , der Dichte ρ und der dynamischen Viskosität η . Diese Größen sind wie folgt definiert:

$$d_h = 4 \frac{A_Q}{L} \quad (3.11)$$

$$v = \frac{F}{A_Q} \quad (3.12)$$

$$L = \pi(d'_i + d_a) \quad (3.13)$$

¹⁰Dies ist die gleiche Argumentation mit der die technisch anspruchsvolleren Hängebrücken gebaut werden. So kann eine Hängebrücke aus Stahl bei gleichem Eigengewicht mehr Nutzlast tragen, als eine gleich schwere Trägerbrücke (ξ für Stahl etwa 0,3).

TABELLE 3.1.: Mindestflüsse F_{min} für das Erreichen von turbulenter Strömung ($Re > 2320$) nach (3.16), für verschiedene Lösungsmittel. ($d'_i = 4,0$ mm; $d_a = 1,6$ mm; $\theta = 40$ °C)

Lösungsmittel	dynamische Viskosität $\eta / 10^{-4}$ Pa s	Dichte $\rho / \text{kg L}^{-1}$	$F_{min} / \text{L min}^{-1}$
Wasser	6	0,98	0,38
THF	2	0,89	0,14
Methanol	8	0,81	0,61
Ethanol	9	0,76	0,74
2-Propanol	10	0,65	0,96

mit der durchströmten Querschnittsfläche A_Q , dem benetzten Umfang L (d'_i : innerer Durchmesser des äußeren Rohres, d_a : Aussendurchmesser des inneren Rohres) und dem Fluss F . Einsetzen in (3.10) ergibt

$$Re = 4 \frac{F \rho}{L \eta} \quad . \quad (3.14)$$

Turbulente Strömung ist dann erreicht, wenn $Re > 2320$ ist [93, 214]. Für diesen Fall lassen sich für das aufgebaute Modul die Mindestflüsse F_{min} für turbulente Strömung angeben:

$$F_{min} = 580 \frac{\eta L}{\rho} \quad (3.15)$$

$$= 580 \pi (d'_i + d_a) \frac{\eta}{\rho} \quad (3.16)$$

Der minimale Fluss zum Erreichen von turbulenter Strömung ist also mit der Summe der charakteristischen Durchmesser $d'_i + d_a$ linear korreliert, und von den Stoffkonstanten des Lösungsmittels abhängig. Zum Erreichen von turbulenter Strömung mit möglichst geringem Fluss ist dementsprechend ein möglichst kleiner Durchmesser für beide Rohre zu wählen. Der realisierte Aufbau mit $d'_i = 4,0$ mm und $d_a = 1,6$ mm trägt diesem Umstand Rechnung. Die Tabelle 3.1 zeigt für ausgewählte Lösungsmittel die Mindestflüsse, die für turbulente Strömung nötig sind.

Diese Flüsse lassen sich mit der gewählten Pumpe leicht erreichen, und die Experimente wurden unter Bedingungen turbulenter Strömung durchgeführt.

3.4.4. Technische Daten

Die technischen Daten des Reaktors sind in Tabelle 3.2 auf der nächsten Seite zusammengestellt. Besonders hervorzuheben ist, dass das Gasvolumen des Reaktors sehr klein ist. Im Gegensatz zu Reaktionsautoklaven ist der Anteil des Gases gegenüber der flüssigen Phase gering. Die Unterscheidung zwischen flüssigem Reaktionsvolumen und dem Nennvolumen entfällt.¹¹ Im Falle eines Bruchs ist daher das expandierbare Gasvolumen im Reaktor sehr viel geringer als bei einem Reaktionsautoklaven.¹²

¹¹Üblicherweise werden im Reaktionsautoklaven hierfür etwa 0,3-0,5 des Nennvolumens veranschlagt.

¹²Das expandierende Volumen ergibt sich aus dem Gasvolumen multipliziert mit dem Differenzdruck. Dieses „Druckinhaltsprodukt“ ist eine wichtige Kenngröße bei der Genehmigungspflicht nach der Druckbehälterverordnung [72]. Flüssigkeiten müssen dabei wegen ihrer sehr viel geringeren Kompressibilität nicht berücksichtigt werden.

TABELLE 3.2.: Technische Daten des membranbegasteten Membranreaktors

Flüssigvolumen			
Begasungsmodul		3,7	mL
Ultrafiltrationsmodul		10	mL
Gesamtvolumen		25	mL
Gasvolumen		0,7	mL
Flüssig-/Gasvolumen		83	–
Membranflächen			
Ultrafiltration		30	cm ²
Begasungsmembran (A_m)		14	cm ²
Oberfläche/Volumen			
Begasung	nur Modul	3,8	cm ² mL ⁻¹
	gesamt	0,6	cm ² mL ⁻¹
Ultrafiltration	nur Modul	3,0	cm ² mL ⁻¹
	gesamt	1,2	cm ² mL ⁻¹

Das Begasungsmodul hat ein Oberflächen- zu Volumen-Verhältnis, das größer ist als das des Ultrafiltrationsmoduls. Das Flüssigvolumen des Reaktors wird aufgrund des Labormaßstabs der Anlage durch das Volumen von Pumpe und Ultrafiltrationsmodul dominiert, dadurch relativiert sich dieser Wert in der gesamten Apparatur. Die Volumina von Pumpen und Rohrleitungen fallen jedoch bei der Skalierung zu größeren Gesamtvolumina immer weniger ins Gewicht, so dass bei der Maßstabsvergrößerung bessere Werte zu erwarten sind.

3.5. Zusammenfassung

Es wurden Dosiertechniken sowohl für Flüssigkeiten als auch Gase für den Einsatz im Membranreaktor¹³ entwickelt. Die Ergebnisse der folgenden Abschnitte wären ohne diese Techniken zur Dosierung von Flüssigkeiten und Gasen zum großen Teil nicht möglich gewesen.

- Es konnte eine computergestützte Dosierstrecke für Flüssigkeiten aufgebaut werden, die den Anforderungen nach Druckfestigkeit, Inertbedingungen und Flusskonstanz gerecht wird.
 - Durch gezieltes Umrüsten konnten die Schwachpunkte der verwendeten Wechsellkolbenpumpen eliminiert werden.
 - Das aufgebaute System erlaubt die exakte Einhaltung von Flüssen und damit von Stöchiometrie und Verweilzeit. Der abgedeckte Bereich umfasst drei Größenordnungen (0,1 – 40 mL h⁻¹).
 - Die Regelung verwendet den in Echtzeit gemessenen Massenfluss.
 - Sauerstoff- und wasserfreie Bedingungen können eingehalten werden.
 - Eingestellte Flüsse sind bis zu 40 bar Gegendruck konstant.
- Durch den Einsatz einer Membran als Phasengrenzfläche gelingt die Dosierung von Wasserstoff.

¹³für die Retention von homogen löslichen Katalysatoren (CMR und EMR)

- Man erhält eine definierte Phasengrenze.
- Die Reaktionsparameter Flüssigdruck und Gasphasendruck beziehungsweise die Parameter des Stoffübergangs an der Phasengrenzfläche werden voneinander entkoppelt.
- Polytetrafluorethylen (PTFE) erwies sich aufgrund der hohen Permeabilität und der chemischen Beständigkeit als bestes Membranmaterial.
- Eine Reaktion mit membrangestützter, blasenfreier Begasung konnte durchgeführt werden.
- Ein modularer Umlaufreaktor mit Doppelrohrmodul und Ultrafiltration wurde für die kontinuierliche Reaktionsführung aufgebaut.¹⁴
 - Das Begasungsmodul erreicht ein Oberflächen/Volumen-Verhältnis von $3,8 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$.
 - Das Verhältnis von Gasvolumen zum Flüssigvolumen des Umlaufreaktors beträgt 0,03.

¹⁴Der Reaktor wurde für die kontinuierliche Hydrierung eingesetzt, vergleiche Kapitel 7 auf Seite 55 und Abschnitt 11.6.1 auf Seite 88.

Teil II.

Homogenkatalytische Hydrierung

4. Einleitung

4.1. Asymmetrische katalytische Hydrierung

Auch mit den Mitteln der modernen organischen Chemie ist es eine intellektuelle und praktische Herausforderung, nachhaltige Wege der Darstellung enantiomerenreiner Verbindungen aus leicht zugänglichen Ausgangsmaterialien zu entwickeln [31, 32, 85]. Der Bedarf an effektiven Methoden zur Darstellung wächst stetig, so waren im Jahr 2000 schon mehr als 80% der in Entwicklung befindlichen Pharmaka enantiomerenreine Verbindungen [60]. Dabei ist die chirale Amplifikation durch asymmetrische Katalyse einer der Wege, die großen Mengen an Abfall zu vermeiden, die durch klassische organische Synthese entstehen [235].

Die asymmetrische Reduktion ungesättigter Verbindungen war der erste homogenkatalytische Prozess, der für die industrielle Darstellung eines enantiomerenreinen Stoffes aus prochiralen Vorläufern genutzt wurde. Die enantioselektive Darstellung von L-Dopa **1** durch homogenkatalytische Hydrierung geht auf Arbeiten von Knowles und Sabacky [147] zurück (Abbildung 4.1 auf der nächsten Seite). Ein weiterer Prozess zur Darstellung von Naproxen **3** ist der Arbeitsgruppe um Noyori zu verdanken (Abbildung 4.2 auf der nächsten Seite). Diese Pionierarbeiten auf dem Gebiet der asymmetrischen Hydrierung –und damit der asymmetrischen Homogenkatalyse überhaupt– wurden 2001 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet [1, 8, 61, 80, 111, 113, 230, 257].¹

Die asymmetrische Hydrierung ist nach wie vor das für industrielle Zwecke am meisten genutzte und mächtigste Werkzeug der enantioselektiven Katalyse [28–30, 224]. Sicherlich auch deswegen, weil bei diesem Verfahren Wasserstoff als starkes und kostengünstiges Reduktionsmittel eingesetzt werden kann.

4.1.1. Wilkinson-Katalysator

Ausgangspunkt der homogenkatalytischen Reduktion von Alkenen mit molekularem Wasserstoff sind die Arbeiten von Osborn u. a. [202], Young u. a. [290]. Die Untersuchungen zeigten, dass es möglich war, unter milden Bedingungen kontrolliert Alkene zu den entsprechenden Alkanen zu reduzieren. Dies war bis dahin nur am heterogenen Katalysator möglich. Mit der Veränderung der chelatisierenden Liganden war es nun möglich, gezielt die elektronischen und sterischen Eigenschaften des „aktiven Zentrums“ zu beeinflussen.

Durch reaktionstechnische Untersuchungen konnten Wilkinson und Mitarbeiter zeigen, dass die katalytische Aktivität auf der Koordination von Wasserstoff beruht, und die Reak-

¹Der Preis wurde dabei R.Noyori und S.Knowles zu je einem Viertel, die andere Hälfte B.M.Sharpless zuerkannt. Sharpless wurde für seine Verdienste zur enantioselektiven Oxidation ausgezeichnet; vor allem für die nach ihm benannte homogenkatalytische, asymmetrische Dihydroxylierung von Doppelbindungen [33, 280].

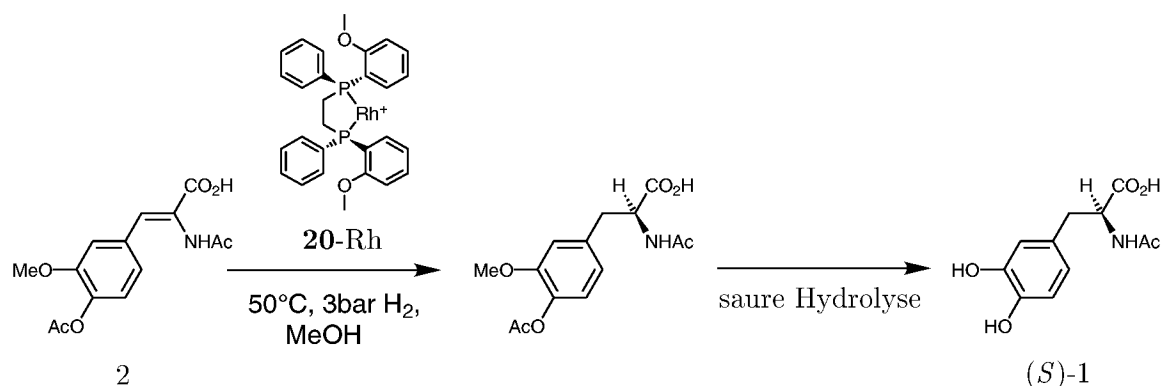


ABBILDUNG 4.1.: Das Parkinson-Medikament L-Dopa **1** wird in der wirksamen Form als *S*-Enantiomer durch asymmetrische Hydrierung aus **2** hergestellt.

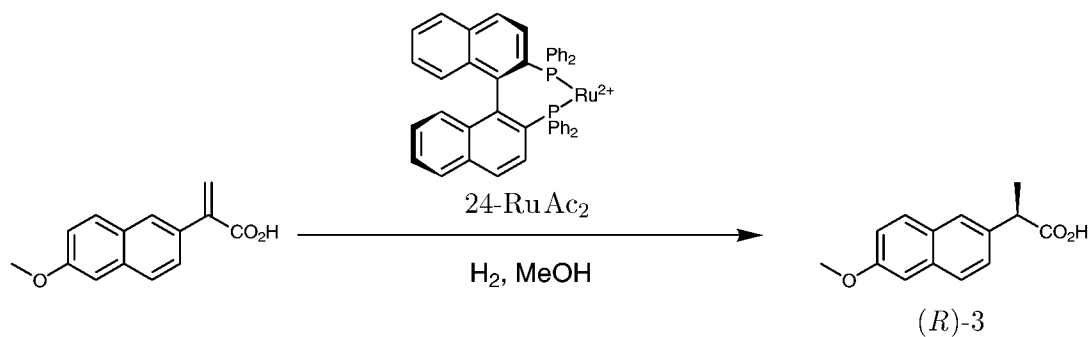


ABBILDUNG 4.2.: Die entzündungshemmende Substanz Naproxen **3** ((*R*)-2-(6-Methoxynaphthalen-2-yl)-propionsäure) wird in 92% Ausbeute und mit *er*=66 (*ee*=0,97) durch asymmetrische Hydrierung hergestellt. Dabei wird eine vergleichsweise niedrige *ttn*=200 erreicht.

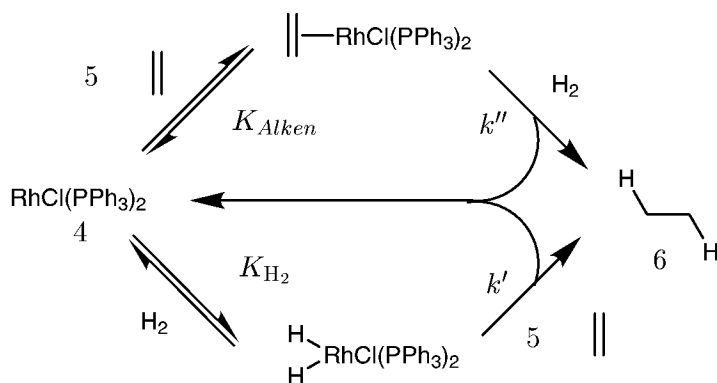


ABBILDUNG 4.3.: Mögliche Katalysiemechanismen des Wilkinson-Katalysators bei der Hydrierung von Alkenen mit der Koordination des Alkens oder von Wasserstoff als initiierenden Schritt der Katalyse

(**5** steht allgemein für Alkene, in der Abbildung ist **5**=Ethen gezeigt.)

TABELLE 4.1.: Kinetische Konstanten der Hydrierung von **5**=Cyclohexen mit dem Wilkinson-Katalysator **4** [202]

E_A	95		kJ mol^{-1}
$\Delta H^\ddagger$	93		kJ mol^{-1}
$K_{\text{Cyclohexen}}$	$\leq 0,05$		mol^{-1}L
K_{H_2}	3,4	10^3	mol^{-1}L
k'	1,1	10^{16}	$e^{-\frac{E_A}{RT}} \text{s}^{-1} \text{mol}^{-1}\text{L}$
k''	0		-

tionsgeschwindigkeit r durch ein Geschwindigkeitsgesetz der Form

$$r = k'[4] \frac{K_{\text{H}_2}[\text{H}_2][5]}{1 + K_{\text{H}_2}[\text{H}_2] + K_{\text{Alken}}[5]} \quad (4.1)$$

beschrieben wird. Die Reaktion verläuft demnach fast ausschließlich über die oxidative Addition von Wasserstoff, mit anschließender Koordination des Alkens (der untere Reaktionsweg in der Abbildung 4.3 auf der vorherigen Seite). Dies wurde zunächst aus der Kinetik der Reaktion für homologe Alkene gefolgert, da zum Beispiel das einfachste mögliche Alken **5**=Ethen eine sehr große Gleichgewichtskonstante $K_{\text{Ethen}} = 100 \text{ mol}^{-1}\text{L}$ aufweist, die einer starken Substratinhibierung gleichkommt. Erst für höhere Alkene, deren sterischer Anspruch am Rh größer wird, verläuft die Reaktion mit messbarer Geschwindigkeit. Für Cyclohexen sind die kinetischen Parameter in der Tabelle 4.1.1 aufgeführt. Weitere Untersuchungen zeigten [110], dass die Bildung des Rhodiumdihydrids der erste Schritt des katalytischen Zyklus ist und die insgesamt sehr komplexe Natur des Reaktionssystems [263].

4.1.2. Asymmetrische Hydrierung

Ausgehend von den Arbeiten von Wilkinson [202, 290] war es nun möglich, die sterischen Ansprüche des Liganden chiral zu modifizieren, so dass prochirale Edukte zu Enantiomeren reduziert werden. Dies konnte praktisch durch die Arbeiten von Knowles [147] durch die Reduktion des Zimtsäurederivats **2** gezeigt werden. Diese Arbeiten sind Ausgangspunkt für die technische Synthese von L-Dopa **1** durch asymmetrische katalytische Reduktion (Abbildung 4.1 auf der vorherigen Seite). Diese Pionierarbeit wurde im Jahre 2001 durch die Vergabe des Nobelpreises gewürdigt [8]. Die Arbeitsgruppe um Horner verfolgte unabhängig von diesen Arbeiten einen vergleichbaren Ansatz [117, 118].

Es zeigte sich bei den Untersuchungen, dass gewisse Modifikationen des Wilkinson-Katalysators nötig waren. So wurde kationisches Rhodium in der Oxidationsstufe +1 eingesetzt. Weiterhin zeigte sich, dass die Katalyse durch die Koordination des Edelmetalls an Chlorid inhibiert wird. Daher wurde der Einsatz von nicht koordinierenden Anionen nötig, deren Elektronendichte zur Bindung an Rhodium nicht ausreicht. Hier kamen vor allem Tetrafluoroborat, Trifluorsulfonat und Perchlorat als nicht-reaktive Anionen zum Einsatz [45, 101], die zusätzlich die Löslichkeit des Katalysators in organischem Lösungsmittel verbesserten, ein Umstand, der die Arbeiten von Wilkinson stark behinderte. Die Verwendung solcher Anionen gipfelt in der Verwendung von Tetrakis-3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)-borat (BARF) und strukturell verwandter Anionen [192].

Der Vorsprung der Arbeitsgruppe von Knowles (Monsanto) mündete in der technischen Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäure L-Dopa **1**. Dabei werden mit $\text{ttn} > 10^4$ hohe

Zyklenzahlen erreicht, und der katalytische Schritt zeigt eine Enantioselektivität von $er=49$ ($ee=0,96$)². Der für die industrielle Synthese verwendete Ligand DIPAMP **20** verbindet den chelatisierenden Effekt des Bisphosphans mit der Chiralität am Phosphor³, und zeichnete sich auch durch die leichte Zugänglichkeit des kristallisierbaren Liganden aus [270].

Als das Prinzip der asymmetrischen Hydrierung klar wurde, folgten weitere Verallgemeinerungen des Konzepts. Zunächst konnten Kagan und Mitarbeiter zeigen, dass die Chiralität vom Phosphor –wie bei den ursprünglichen Liganden– in das Rückgrat verlagert werden konnte, und dass es von Vorteil für die Rigidität des Zentrums ist, wenn es sich um einen Chelatkomplex handelt. Dies konnte als erstes durch die Synthese des Liganden DIOP **23** gezeigt werden [73, 135, 136], von dessen Struktur sich viele weitere Bisphosphanliganden ableiten.

Diese Erfolge der asymmetrischen Homogenkatalyse lösten eine Welle von Anstrengungen aus, neue Liganden und Katalysatorsysteme zu finden, viele davon mit exzellenten Selektivitäten und Aktivitäten, dazu sei auf die exzellenten Übersichtsartikel verwiesen [40, 41, 146] (in der Tabelle 4.2 auf Seite 35 sind ausgewählte Liganden gezeigt). Vor allem der Zugang mittels Bausteinen aus dem „chiral pool“, also aus in enantiomerenreiner Form leicht verfügbaren natürlichen Ausgangsstoffen, hat zu einer großen Zahl von Liganden geführt. Die bekanntesten Vertreter sind dabei neben dem schon erwähnten DIOP **23**, BPPM **18**, der aus der cyclischen Aminosäure Prolin (**19**) abgeleitet ist [2], und der aus Weinsäure (**22**) abgeleitete Ligand PyrPhos⁴ **21**, der von Nagel u. a. [188] erstmalig synthetisiert und später von anderen weiterentwickelt wurde [126, 186–188].

Die Zunahme der Arbeiten auf diesem Gebiet lässt sich am Anstieg des Anteils der Literaturzitate an der erfassten wissenschaftlichen Gesamtliteratur ablesen, wie dies eine Suchanfrage unter dem Stichwort „asymmetrische katalytische Hydrierung“ zeigt (Abbildung 4.4 auf der nächsten Seite) [229].

Im Laufe weiterer Untersuchungen wurde jedoch klar, dass die Hydrierung mit Bisphosphanliganden eine Reaktion mit beschränkter Anwendungsbreite ist. Den Grund dafür konnte Chan u. a. [57] durch NMR-spektroskopische Untersuchungen der beteiligten Spezies in Lösung aufklären [108, 109]. Das Enamid-Motiv der Substrate **7** unterstützt die Differenzierung der Bildung der diastereomeren Komplexe durch die gute spatiale Definition der Koordination, da es selbst einen Chelatkomplex mit dem aktiven Metallzentrum bildet (Abbildung 4.5 auf der nächsten Seite). So führt der Austausch der Esterfunktion in **10** von Methoxy- gegen *t*Butoxy- zu einer Umkehr der Stereoselektivität [49]. Andere Beispiele für die starke Wechselwirkung des Substrats sind in der Literatur beschrieben [7]. Diese Mitwirkung des Substrats an der diastereofacialen Differenzierung schränkt allerdings das Substratspektrum erheblich ein. Auf diesen Mechanismus –der einer der wahrscheinlich am besten untersuchten und verstandenen katalytischen Reaktionsmechanismen ist– wird im folgenden Abschnitt 4.1.3 auf Seite 36 näher eingegangen.

Inzwischen sind zahlreiche weitere Kombinationen von Ausgangssubstanzen und Katalysatoren bekannt, die durch enantioselektive Hydrierung Zugang zu vielen Produkten ermöglichen [40, 99, 129, 199].

In den 80er Jahren verschob sich der Focus der Untersuchungen auf Ruthenium als Zen-

²Durch Umkristallisieren des Zwischenprodukts **2** wird diese weiter erhöht.

³Der Wissensvorsprung der Arbeitsgruppe bei Monsanto in Bezug auf Chiralität am Phosphor beruht auf Pionierarbeiten von Koriun u. a. [150]; diese spielt bei bestimmten Agrochemikalien eine Rolle.

⁴Auch als DeguPhos bezeichnet, da die Firma Degussa (heute degussa.) damals an der Entwicklung beteiligt war [19]. Vergleiche auch die Fußnote 16 auf Seite 49.

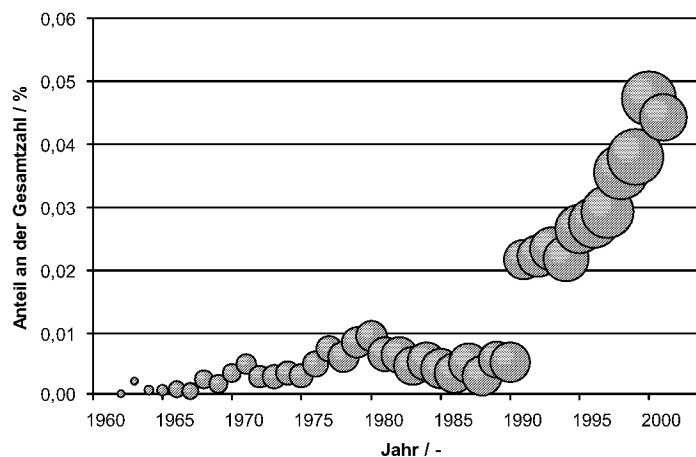


ABBILDUNG 4.4.: Entwicklung der Literaturzitate zum Thema asymmetrische katalytische Hydrierung mit Wasserstoff als Funktion des Erscheinungsjahres. Der Durchmesser des Kreises repräsentiert die absolute Anzahl an Artikeln, die Höhe des Kreismittelpunkts ist das Maß für den Anteil an relevanten Datenbanktreffern. Die sprunghafte Zunahme 1992 erklärt sich durch die Erweiterung der Suche auf die von den Autoren verfassten Kurzfassungen [229].

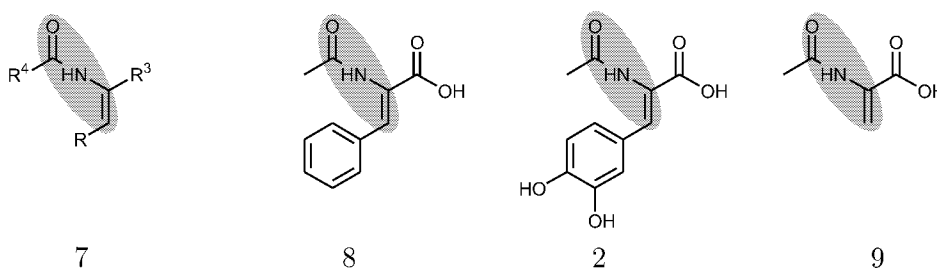


ABBILDUNG 4.5.: Das unterlegte Enamidmotiv ist für die effektive Enantioselektivität der Bisphosphan-Rhodium Katalysatoren notwendig, und beschränkt das Substratspektrum auf solche Verbindungen, die dieses oder ein ähnliches chelatisierendes Motiv enthalten.

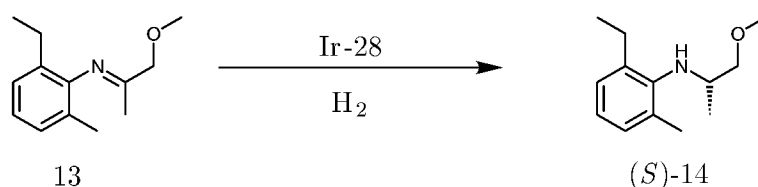


ABBILDUNG 4.6.: Die Darstellung von (*S*)-Metolachlor (**14**) gelingt mit $er = 8,5$ ($ee = 0,79$) durch asymmetrische Hydrierung des Enamins **13** Ir-xyliphos Ir-**28**. Der Katalysator erreicht $t_{\text{tn}} = 1 \cdot 10^6$ und $\text{tof} \geq 2 \cdot 10^5 \text{ h}^{-1}$.

tralatom, und der BINAP-Ligand **24** wurde erstmalig eingesetzt [125], wobei die Enantioselektivitäten des Modells substrats **8** mit Ruthenium ($er=49$; $ee=0,96$) unter denen mit Rhodium ($er=24$; $ee=0,92$) lagen. Im Folgenden gelang es Noyori u. a. [198], die Entwicklung des axial chiralen BINAP-Liganden voranzutreiben. In einem sehr kurzen Zeitraum gelangen erfolgreiche Hydrierungen mit Ru-BINAP Ru-**24** [195], der neben Alkanen prochirale Alkanone enantioselektiv zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. Diese Pionierarbeit auf dem Gebiet der Hydrierliganden der zweiten Generation, vor allem des axial symmetrischen Liganden BINAP **24**, wurde mit der Vergabe des Nobelpreises 2001 gewürdigt [8].

Für die Reduktion von Carbonylen galt lange Zeit ebenfalls, dass im Substratmolekül eine weitere Koordinationsstelle benötigt wird. Der Arbeitsgruppe um Noyori gelang jedoch durch den Einsatz von chiralen Diaminen als weiteren Komplexliganden die asymmetrische Hydrierung von nicht funktionalisierten Ketonen.⁵

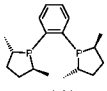
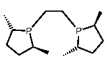
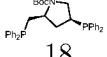
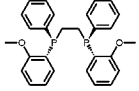
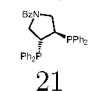
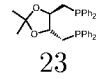
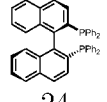
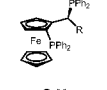
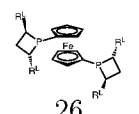
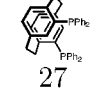
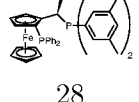
Die Erweiterung der chelatisierenden Liganden auf Stickstoff, (Amino)-Phosphonate, Alkohole etc. brachte weitere Möglichkeiten, die elektronischen und sterischen Eigenschaften des aktiven Metallzentrums zu beeinflussen. Beim verwendeten Edelmetall sind nach wie vor Ruthenium und Rhodium erfolgreich, weiterhin haben auch Iridium und Titan Anwendung in der katalytischen Hydrierung gefunden. Mit entsprechenden Liganden gelingt auch die enantioselektive Umsetzung von nicht funktionalisierten Alkenen mit hohen Enantiomerenüberschüssen [25, 78].

Die besonders erfolgreichen Liganden bzw. Katalysatoren der dritten Generation sind nach wie vor Bisphosphane, wobei besonders Alkyl- statt Aryl-Substituenten die Elektronendichte am Rhodium positiv zu beeinflussen scheinen. Besonders erfolgreiche Vertreter dieser Klasse sind zum einen der Ligand DuPhos **15**, und zum anderen Liganden wie JosiPhos **25** und PhanePhos **27**, die mehrere Chiralitätszentren besitzen, und axiale sowie zentrale Chiralität tragen [46, 193, 212].⁶ Als ein besonders aktiver und ungewöhnlicher Ligand ist xyliphos **28** hervorzuheben, der für die Produktion von Metolachlor bei Novartis verwendet wird und das meistzitierte Beispiel für den sogenannten „racemic switch“ ist; Schlüsselschritt ist die enantioselektive Enamid-Hydrierung von **13** zum enantiomer angereicherten Amin **14** (Abbildung 4.1.2) [29, 30, 163]. Auch die von Horner u. a. [117] vorgeschlagenen Monophosphanliganden erleben in jüngster Zeit eine Renaissance [148, 160].

⁵Eine Übersicht findet sich bei Noyori und Ohkuma [197] und der darin zitierten Literatur.

⁶PhanePhos **27** ist nur axial chiral.

TABELLE 4.2.: Ausgewählte Bisphosphan-Liganden, die für asymmetrische Hydrierung mit molekularem Wasserstoff angewendet werden.

Name	Formel	chiraler Vorläufer	Metall	Literatur
DuPhos	 15		Rh	[46, 47, 50, 51]
BICP			Rh	[46, 47, 50, 293, 294]
BPPM			Rh	[2, 99]
DIPAMP		-	Rh	[204]
PyrPhos			Pd, Rh	[126, 186–188]
DIOP			Rh	[136, 256]
BINAP		-	Ru	[125, 196, 198]
JosiPhos		-	Rh, Ru, Ir	[183, 260–262]
FerroTane		-	Rh, Ru, Ir	[48]
PhanePhos		-	Rh	[212]
xyliPhos		-	Ir	[30]

4.1.3. Allgemeiner Reaktionsmechanismus

Kinetics is a subject of mystery and power.

Athel Cornish-Bowden

Die asymmetrische Hydrierung ist eines der wenigen Beispiele für eine detaillierte Untersuchung und für eine kinetische Beschreibung eines homogenkatalytischen Systems. Die Aufklärung der enantioselektiven Hydrierung von **10** mit Rhodium-DIOP **23** gelang Halpern [108], Landis und Halpern [161].

Der vereinfachte Katalysezyklus ist in Abbildung 4.7 auf der nächsten Seite gezeigt. Es zeigte sich im Laufe der Untersuchungen, dass das Hauptstereoisomer (*S*)-**10** aus dem im minor-Zyklus gebildeten Diastereomer minor-**1** stammt. Dieses ist zwar während der Reaktion in kleinerer steady-state Konzentration vorhanden als der diastereomere Komplex major-**1**, aber da $k_{H_2\text{minor}} \gg k_{H_2\text{major}}$ gilt, wird es zum Hauptstereoisomer –im gezeigten Beispiel (*S*)-**12**– hydriert. Die Geschwindigkeit der oxidativen Wasserstoffaddition an den Komplex minor-**2** ist etwa eintausend Mal schneller, als die analoge Reaktion am diastereomeren major-Komplex. In der Abbildung 4.7 auf der nächsten Seite ist das Überschussenantiomer daher (*S*)-**12**; es stammt also nicht aus dem major-Reaktionsweg, sondern wird aus dem reaktiveren minor-**1** gebildet.

Bei niedrigem Wasserstoffdruck ist die oxidative Addition k_{H_2} geschwindigkeitsbestimmend. Für höhere Drücke und damit höhere Wasserstoffkonzentrationen wird die Bildungsgeschwindigkeit immer stärker durch die Bildungsgeschwindigkeiten der Vorkomplexe diktiert. Da $k_{\text{minor}} < k_{\text{major}}$ gilt, ist dieser Effekt für die niedrigere Enantioselektivität bei höheren Wasserstoffdrücken verantwortlich, da die Verlagerung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes für das minor-Produkt früher erreicht wird.

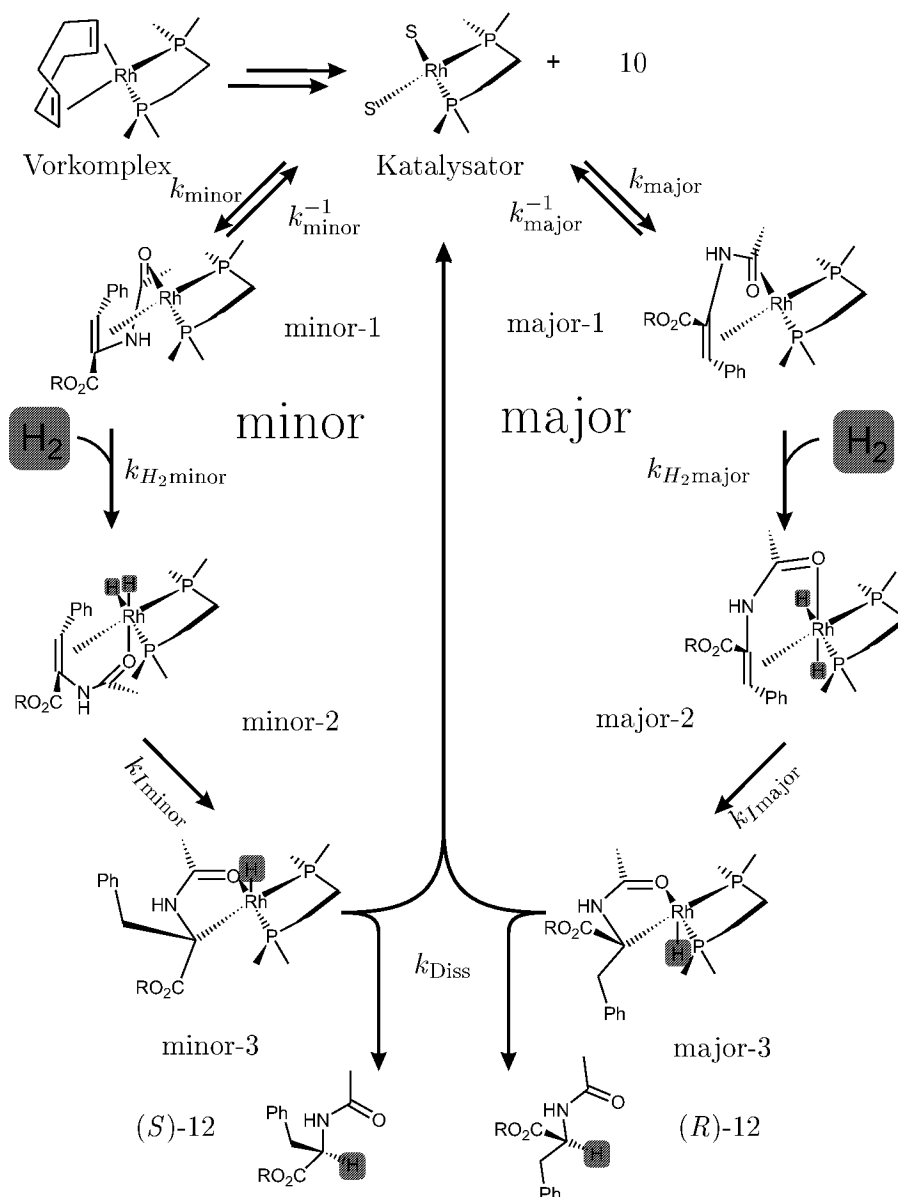


ABBILDUNG 4.7.: Vereinfachter Katalysezyklus der asymmetrischen Hydrierung nach Halpern [108], Landis und Halpern [161] ($R=Me$; S =Lösungsmittel). Die Substituenten am Phosphor sind aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.

5. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Verwendung homogen löslicher Katalysatoren, die quantitativ durch Membranen retentierbar sind, stellt ein Verfahrenskonzept zur effizienten Durchführung von enantioselektiven katalytischen Reaktionen dar [163, 164]. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, dieses für andere Reaktionen erfolgreiche Konzept auf die industriell bedeutsame Reaktion der Hydrierung aktivierter Doppelbindung mit molekularem Wasserstoff zu übertragen. Dabei standen zunächst die reaktionstechnischen Aspekte im Vordergrund, die durch die gasförmige Komponente Wasserstoff entstehen. Als Endziel wurde die kontinuierliche Durchführung der Reaktion im CMR formuliert. Die für diesen Zweck entwickelten Techniken und Geräte sind bereits beschrieben worden.¹

Folgende sekundäre Zielsetzungen liegen der vorliegenden Arbeit zugrunde:

- Auswahl eines geeigneten Reaktionssystems
- Etablierung der apparativen Möglichkeiten der kinetischen Charakterisierung der Katalysatoren
- kinetische Charakterisierung und Vergleich von polymerem und monomerem Katalysator
- Durchführung von kontinuierlichen Reaktionen im CMR.

¹vergleiche Kapitel 3 auf Seite 13

6. Reaktionssystem

Für die reaktionstechnische Bearbeitung der asymmetrischen katalytischen Hydrierung musste ein Modellsystem gefunden werden. Als Ligand wurde dafür PyrPhos **21** ausgewählt [19, 186–188]. Als zentrales Edelmetall wurde Rhodium verwendet (Abbildung 6.1). Die sich für dieses Katalysatorsystem ergebende Modellreaktion ist die enantioselektive Hydrierung von 2-*N*-Acetyl-acetamidozimtsäure (**8**) (Abbildung 6.2 auf der nächsten Seite).

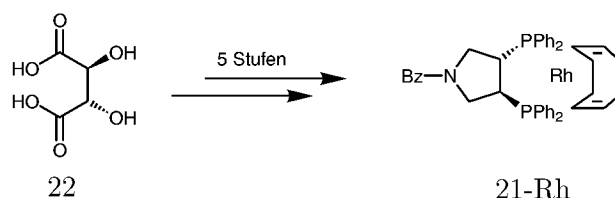


ABBILDUNG 6.1.: Der PyrPhos beziehungsweise DeguPhos-Katalysator (**21**) -Rh ist durch eine kurze Syntheseroute ausgehend von Weinsäure zugänglich [19, 188].

Der Katalysator wurde unter Beachtung verschiedener Kriterien ausgewählt:¹

1. Der Katalysator PyrPhos **21** ist in wenigen Schritten aus Weinsäure² (**22**) zugänglich [19, 144, 188]. Da der Naturstoff in beiden enantiomerenreinen Formen kostengünstig erhältlich ist, sind beide Enantiomere des Katalysators gut zugänglich (Abbildung 6.1).
2. Der Stickstoff des Pyrrolidinrings des PyrPhos-Systems **21** liegt in der C_2 -Symmetrieachse [27]. Eine Anbindung an ein Polymer über Stickstoff im Pyrrolidinring führt daher nicht zu einer Änderung der Symmetrie, die eventuell negative Auswirkungen auf die Selektivität des Katalysators haben kann [186, 187].³
3. Die elektronischen Eigenschaften des Rhodiums können leicht modifiziert werden [126, 144]. Dies erweitert das Substratspektrum auf Ketone, die vom modifizierten System dann mit hohen Selektivitäten hydriert werden.
4. Das System wurde bereits im größeren Maßstab verwendet [140, 144] und sowohl die Synthese als auch die Katalyse sind empirisch optimiert und gut reproduzierbar [19].
5. Der Katalysator ist nicht empfindlich gegenüber Wasser, im Gegensatz zu bisher im CMR untersuchten Systemen [94, 153, 163].

¹Der Katalysator wurde freundlicherweise von der degussa. AG zur Verfügung gestellt.

²beziehungsweise Tartrat

³Bei Bruch der Symmetrie verdoppelt sich die Anzahl der möglichen Diastereomere im katalytischen Zyklus. Vergleiche auch Abbildung 4.7 auf Seite 37.

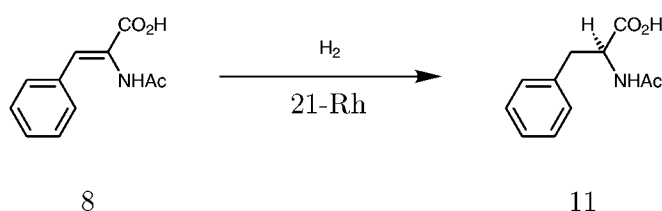


ABBILDUNG 6.2.: Der PyrPhos beziehungsweise DeguPhos-Katalysator **21** -Rh katalysiert die Hydrierung des Modellsubstrats *N*-Acetyl-acetamido-zimtsäure (**8**) zu *N*-Acetyl-phenylalanin (**11**) mit bis zu *er* = 32 (*ee* = 0,94) [19, 187].

6. Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass die Enantioselektivität von Wasserstoffdruck und Temperatur unabhängig ist [187].

Für die Wahl der Ausgangssubstanzen für die Hydrierung standen die gute Verfügbarkeit und die Vergleichbarkeit mit anderen System im Vordergrund. Als Modellsubstrate wurden aus diesen Gründen 2-*N*-Acetyl-acetamido-zimtsäure (**8**) und der homologe Methylester **10** ausgewählt. Dabei ist **8** kommerziell verfügbar, während der Ester über eine zweistufige Synthese zugänglich ist. Bei der Hydrierung entsteht *N*-Acetyl-phenylalanin (**11**) beziehungsweise dessen Methylester **12** (Abbildung 6.2). Die Reaktion verläuft mit bis zu *er* = 32 (*ee* = 0,94)⁴ bei quantitativen Umsätzen [19, 187].

6.1. Reaktionen im Satzreaktor

*Neither is perfect, but even an imperfect test can be quite useful,
as we can show from experience ...*

L.F. Shampine

Aufgrund der geringen Löslichkeit von Wasserstoff im Reaktionsmedium entspricht die Reaktionsführung einem „fed-batch“, also einer Nachdosierung der gasförmigen Komponente Wasserstoff über das gekoppelte Gleichgewicht zwischen Gasphase und flüssiger Phase. Dieses Gleichgewicht wird über das Henrysche Gesetz beschrieben, wonach die Gleichgewichtslöslichkeit von $[\text{H}_2]_g$ proportional dem Partialdruck in der Gasphase ist, also

$$p_{\text{H}_2} = H_{\text{H}_2} [\text{H}_2]_g \quad , \quad (6.1)$$

mit dem stoffspezifischen⁵ Henry-Koeffizienten $H_{\text{H}_2} = [\text{Pa mol}^{-1}]$. Ist die Reaktion, die den Wasserstoff verbraucht, langsam relativ zur Einstellung des Phasengleichgewichts, so kann man davon ausgehen, dass die Konzentration in der flüssigen Phase der Gleichgewichtslöslichkeit beziehungsweise Grenzlöslichkeit entspricht. Ist die chemische Reaktion schneller, so ist diese Näherung nicht erfüllt, und die Kinetik des Stofftransports muss in die kinetische Betrachtung einbezogen werden [166].

⁴Die absolute Konfiguration des Enantiomers im Überschuss richtet sich danach, welches Stereoisomer des Katalysators verwendet wird.

⁵Er hängt sowohl vom Gas als auch vom Lösungsmittel ab; vergleiche Anhang C.2 auf Seite 149.

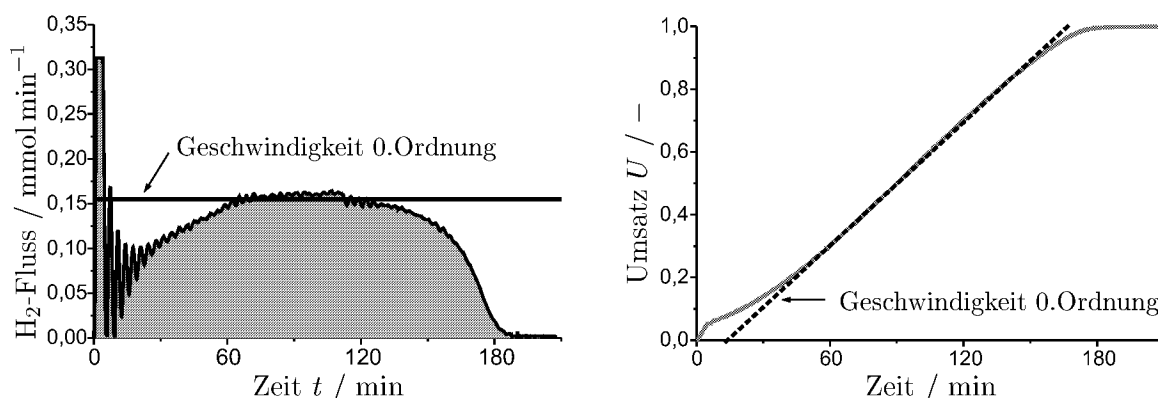


ABBILDUNG 6.3.: Typischer Reaktionsverlauf der Hydrierung mit der daraus abgeleiteten Geschwindigkeit 0.Ordnung
(10,0 bar; $V = 50$ mL; $[21-Rh]=0,5$ mM; $[8]=0,5$ M; $\theta = 25$ °C; Methanol)

6.1.1. Konstantdruckautoklav

Um den Katalysator kinetisch zu charakterisieren, wurde ein Reaktionsautoklav aufgebaut, der bei konstantem Wasserstoffdruck betrieben werden kann. Bei herkömmlichen Autoklaven wird der Reaktor nach Beaufschlagung mit dem gewünschten Druck verschlossen, und der Reaktionsverlauf über den zeitlichen Verlauf des Drucks im geschlossenen System verfolgt. Dies führt jedoch dazu, dass sich die Triebkraft des Phasenübergangs und die Wasserstoffkonzentration während der Reaktion ändern. Um dies zu vermeiden, wurde ein Reaktionsautoklav so modifiziert, dass der für konstanten Druck nötige Wasserstofffluss mittels thermischer Massenflussmessung aufgezeichnet wird. Die Regelung des Flusses erfolgte dabei über die Steuerung eines Stellventils. Die Datenaufnahme und Steuerung der Anlage wurde computergestützt durchgeführt. Das Fließbild ist in der Abbildung 6.4 auf der nächsten Seite gezeigt. Die kinetischen Untersuchungen in diesem Kapitel wurden mit diesem System aus Reaktionsautoklaven und der Echtzeitmessung des für die Aufrechterhaltung des Druckes nötigen Wasserstoffflusses ausgeführt. Ein typisches Experiment zeigt die Abbildung 6.3. Dabei erkennt man zunächst eine Aktivierung des Katalysators, und eine dadurch bedingte Oszillation des Flusses durch die Regelstrecke. Nach Abschluss der Aktivierung stellt sich ein gleichmäßiger Fluss ein, der zur Bestimmung der Geschwindigkeit genutzt wurde.

6.1.2. Charakterisierung des Katalysatorsystems

Unter der Annahme einer hyperbolischen Geschwindigkeitsgleichung der Form

$$v = \text{tof} [21 - Rh] \frac{[8]}{K_M + [8]} \quad (6.2)$$

kann bei ausreichend hohen Konzentrationen des Substrats **8**

$$[8] \gg K_M \quad , \quad (6.3)$$

die Näherung

$$v = \text{tof} [21 - Rh] \quad (6.4)$$

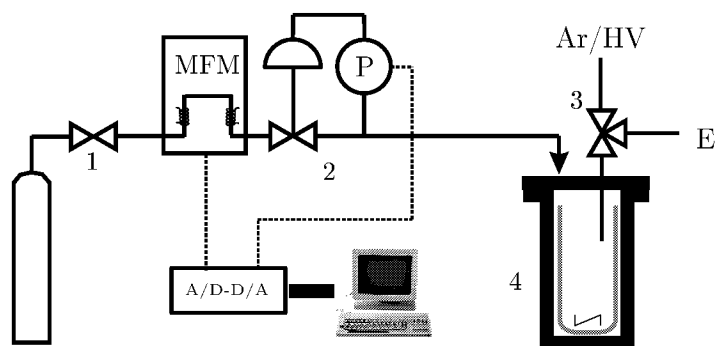


ABBILDUNG 6.4.: Schematischer Aufbau des Konstantdruckautoklaven

(P: Druckaufnehmer, MFM: Massenflussmesser, Ar/HV: Ausgang zu Inertgasversorgung oder Vakuumpumpe, E: Eduktleitung, A/D-D/A: Analog/Digital-Wandler, 1: Membranventil, 2: Druckregler, 3: Dreiwegeventil, 4: Reaktionsautoklav)

gemacht werden. Das heißt, im Sättigungsbereich des Katalysators ist die Geschwindigkeit linear zu seiner Konzentration.

Weiterhin muss sichergestellt sein, dass die Annahme nach (6.2) gilt, dass heißt, ob nicht der Stofftransport des gasförmigen Wasserstoffs geschwindigkeitsbestimmend ist. Dies ist für eine möglichst langsame katalytische Reaktion erfüllt, und ergibt sich als linearer Anteil der Geschwindigkeit als Funktion der Katalysatorkonzentration [21-Rh]. Da die Geschwindigkeit des Stofftransports im Reaktionsautoklaven in erster Linie von geometrischen Faktoren und in zweiter Linie vom Energieeintrag durch Rühren in den Reaktor abhängt [91, 166], wurde dies hier nicht bestimmt.

Eine Komplikation der kinetischen Charakterisierung ergibt sich, da der Katalysator eine Aktivierungsphase durchläuft, in der die Vorform des Katalysators **21-Rh** erst unter Reaktionsbedingungen in die katalytische aktive Spezies überführt wird.⁶ Der Einfluss der Reaktionsparameter auf die Geschwindigkeit der Hydrierung wurde bestimmt, indem der Bereich pseudo-0. Ordnung nach Beendigung der Beschleunigungsphase als Maß für die katalytische Aktivität genommen wurde, nachdem die Aktivierungsphase abgeschlossen war.

Die Untersuchungen zur Linearität zeigen, dass für niedrige Konzentrationen die Näherungen zutreffen, und dass eine Beschreibung nach (6.4) zulässig ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Katalysatorkonzentration ist in der Abbildung 6.5 auf der nächsten Seite wiedergegeben. Der Katalysator zeigt eine Zyklenfrequenz (tof) von 20 min^{-1} bei 10 bar und $\theta = 25^\circ \text{C}$.

6.1.2.1. Lösungsmittel

Es wurden zwei Lösungsmittel getestet, die für den Einsatz im CMR favorisiert wurden. Das ist zum einen Methanol, das wegen der guten Löslichkeit des Substrats⁷ **8** und von Wasserstoff verwendet wurde. Als zweites wurde Tetrahydrofuran (THF) eingesetzt, das wegen der guten Lösungseigenschaften für viele Polymere ebenfalls untersucht wurde.⁸

⁶vergleiche Abschnitt 6.1.2.3 auf Seite 46

⁷bei Raumtemperatur circa 1 M

⁸In vorangegangenen Arbeiten war es als Lösungsmittel [94, 153, 278, 279] oder Lösungsvermittler [163, 164] eingesetzt worden.

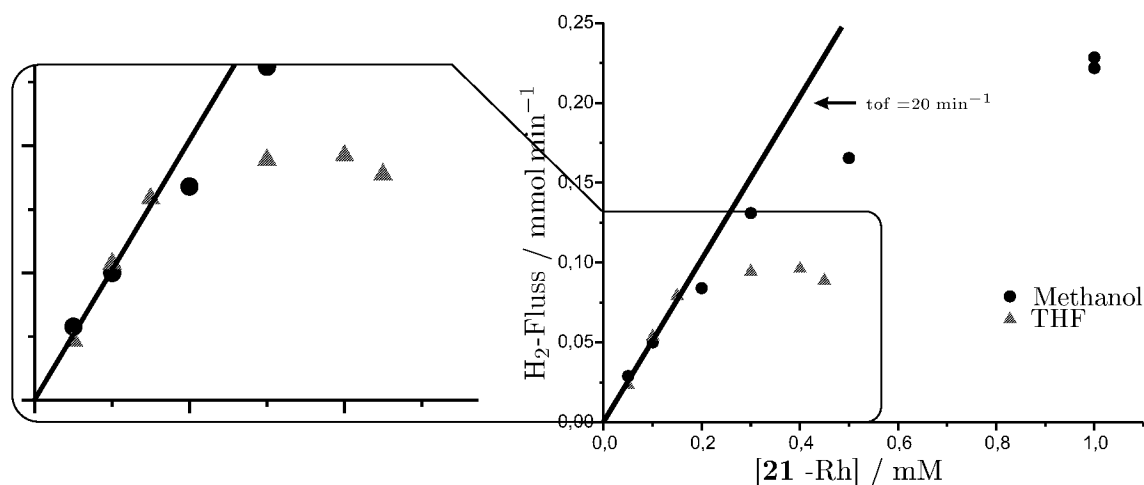


ABBILDUNG 6.5.: Wasserstofffluss als Funktion der Katalysatorkonzentration und die sich ergebende lineare Abhängigkeit bei kleinen Konzentrationen für Methanol und THF. ($p = 10,0$ bar; $V = 50$ mL; $[8] = 0,5$ M; $\theta = 25$ °C)

Die Steigung des linearen Anteils ist für beide Lösungsmittel gleich. Dass bedeutet, dass diejenigen Schritte im Katalysezyklus,⁹ an denen die Lösungsmittelmoleküle beteiligt sind, nicht geschwindigkeitsbestimmend sind. Gegenüber der Reaktion in Methanol ist der lineare Arbeitsbereich für THF deutlich kleiner. Dies ist unter anderem auf die unterschiedliche Viskosität der Lösungsmittel zurückzuführen.¹⁰

6.1.2.2. Wasserstoffdruck

Der Druck bestimmt die Löslichkeit des Wasserstoffs in der flüssigen Phase über das Henrysche Gesetz (6.1). Erhöht man den Wasserstoffdruck p_{H_2} , so erhöht sich auch die Konzentration von Wasserstoff. Wie sich der Abbildung 6.6 auf der nächsten Seite entnehmen lässt, ist die tof im betrachteten Druckbereich eine lineare Funktion des Druckes und somit der Wasserstoffkonzentration $[\text{H}_2]$ in der Lösung¹¹. Dies lässt sich im betrachteten Druckbereich als lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von p_{H_2} formulieren.

$$\text{tof}(p_{\text{H}_2}) = 2,3 \pm 0,1 \text{ min}^{-1} \text{ bar}^{-1} p_{\text{H}_2} \quad (6.5)$$

mit der Henry-Konstante $H_{\text{H}_2} = 0,27 \pm 0,1 \text{ bar mM}^{-1}$ für Methanol und mit (6.1)

$$\text{tof}([\text{H}_2]) = 2,3 \pm 0,1 \text{ min}^{-1} \text{ bar}^{-1} H_{\text{H}_2} p_{\text{H}_2} \quad (6.6)$$

$$= 0,62 \pm 0,05 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1} [\text{H}_2] \quad (6.7)$$

Da eigentlich eine hyperbolische Adsorptionskinetik für den Katalysator zu erwarten ist [254], bedeutet der lineare Zusammenhang zwischen Druck beziehungsweise Konzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit, dass die Affinität des Katalysators zu Wasserstoff relativ

⁹vergleiche Abschnitt 4.1.3 auf Seite 36

¹⁰vergleiche Tabelle 3.1 auf Seite 23

¹¹vergleiche Abschnitt C.2 auf Seite 149

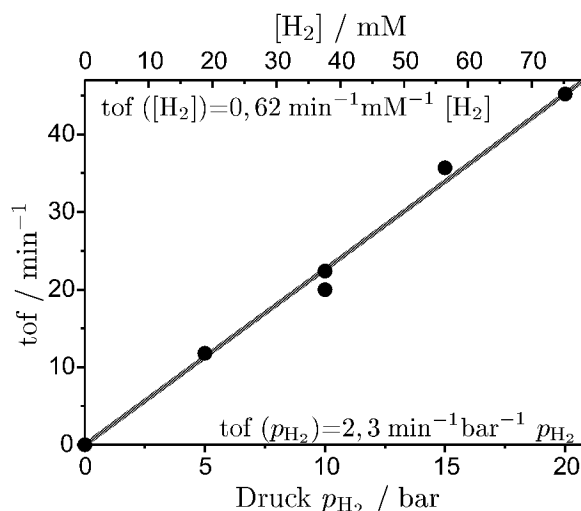


ABBILDUNG 6.6.: Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Wasserstoffdrucks beziehungsweise der Wasserstoffkonzentration und die sich ergebenden linearen Abhängigkeiten der tof für Methanol

(10,0 bar; $V = 50$ mL; $[8] = 0,5$ M; $\theta = 25$ °C)

gering ist. Die oxidative Addition von Wasserstoff an den Katalysators ist langsam, und die im untersuchten Druckbereich eingestellten Konzentrationen sind unterhalb des Sättigungsbereichs. Dies erklärt auch, warum für diesen Katalysator keine Selektivitätsänderung mit dem Druck beobachtet wird, da die Reaktion mit Wasserstoff zu langsam ist, um die Konzentrationen der diastereomeren Intermediate zu beeinflussen.¹² Eine Extrapolation auf den Sättigungsbereich ist aufgrund des sich ergebenden großen Fehlers nicht zulässig; allerdings lassen andere Untersuchungen darauf schließen, dass der lineare Bereich sich mindestens auf den doppelten Druck von $p_{H_2} = 50$ bar beziehungsweise auf die doppelte Wasserstoffkonzentration erstreckt [140, 187].

Die lineare Abhängigkeit von der Konzentration hat wichtige Konsequenzen für den praktischen Einsatz des Katalysators:

- Der Sättigungsbereich hinsichtlich der Wasserstoffkonzentration wird für die katalytische Aktivität im betrachteten Druckbereich nicht erreicht.
- Für akzeptable Aktivität muss auf der flüssigen Seite ebenfalls ein Druck p_{fl} beaufschlagt werden, um die Löslichkeit von Wasserstoff zu erhöhen.

6.1.2.3. Aktivierung

... denn das Klare und leicht Fassliche zieht uns an,
das Verwickelte schreckt uns ab.

D.Hilbert, 1900

Die Aktivierung des Katalysators erfolgt über die Freisetzung von 1,5-Cyclooctadien (COD) (29). Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist für PyrPhos **21** -Rh nicht

¹²vergleiche auch Abschnitt 4.1.3 auf Seite 36

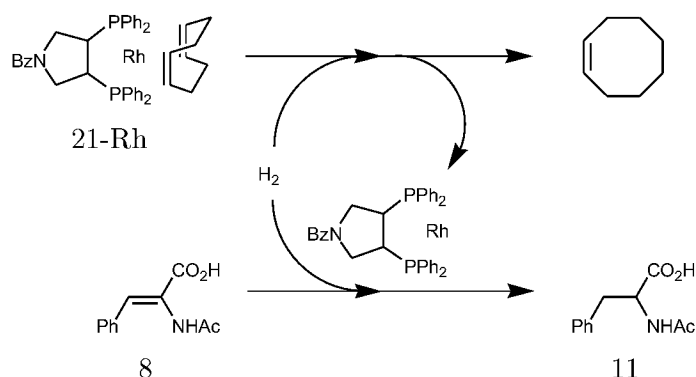


ABBILDUNG 6.7.: Die Aktivierung von **21** -Rh konkurriert mit der eigentlichen Reaktion um Wasserstoff. Je mehr Katalysator dabei aktiviert wird, umso mehr wird die langsame Aktivierungsreaktion diskriminiert.

geklärt. Für andere Katalysatoren wie zum Beispiel DIOP **23** wurde die Aktivierung genauer untersucht, und zwei alternative Reaktionswege wurden von Nindakova und Shainyan [191] vorgeschlagen:

1. Die Hydrierung des COD (**29**), die den aktiven Komplex freisetzt.
2. Die Verdrängung durch das Lösungsmittel, das dann die freien Koordinationsstellen am Rh einnimmt.

Die kinetischen Parameter der Reaktion lassen sich erst nach Beendigung der Beschleunigungsphase bestimmen. Trotzdem sind die Faktoren, die zur Aktivierung nötig sind, für den rationellen Betrieb eines kontinuierlichen Reaktors wichtig, da die möglichst vollständige Aktivierung des Katalysators für maximale ttn entscheidend ist. Ein Umstand der Aktivierung ist besonders auffällig: Verlässt man den linearen Bereich, für den die Bedingung (6.4) auf Seite 43 erfüllt ist, so erfährt die Reaktionsgeschwindigkeit über mehrere Stunden des Reaktionsverlaufs eine Beschleunigung. Ist dies der Fall, ist das Substrat umgesetzt, bevor der Katalysator vollständig aktiviert ist. In der Literatur findet man sogar die Aussage, dass im Falle von DuPhos **15** bis zu 0,5 des wertvollen Liganden verschwendet werden [39].¹³ Dass ein solch großes Reservoir von nicht aktiviertem Katalysator vorliegt, ist jedoch eine Folge falsch gewählter Reaktionsbedingungen. Die Behauptung, dass es nicht aktivierten und damit nicht genutzten Katalysator gibt, konnte auch durch weitere Untersuchungen des Katalysatorherstellers Chirotech Technology relativiert werden [66].

Ein Sachverhalt, der in der Diskussion der Aktivierung von DuPhos **15** -Rh nicht beachtet wurde, ist die Konkurrenz der Aktivierung mit der eigentlichen katalytischen Reaktion um das Substrat Wasserstoff. Wie in der Abbildung 6.7 gezeigt wird, konkurrieren die beiden Reaktionen –Aktivierung und Katalyse– um Wasserstoff. Je mehr Katalysator dabei aktiviert wird, umso schneller wird die katalytische Hydrierung von **8**, vor allem wenn dies in großem Überschuss¹⁴ vorhanden ist. Ist Wasserstoff limitiert, zum Beispiel durch den Stofftransport,

¹³„Liberation of the active catalysts by hydrogenation of COD requires much more time than complete asymmetric hydrogenation of a prochiral substrate proceeding in parallel. Due to this feature expensive DuPhos ligands are wasted by more than 50%.“ [39]

¹⁴Genauer: Wenn die Bedingung (6.3) auf Seite 43 erfüllt ist.

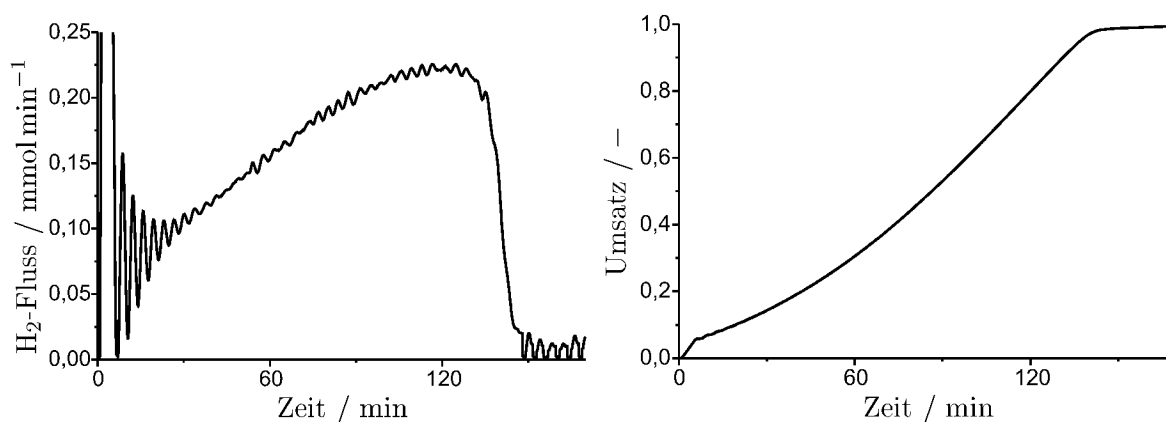


ABBILDUNG 6.8.: Die Aktivierung von **21**-Rh konkurriert mit der eigentlichen Reaktion um Wasserstoff. Bei limitierendem Stofftransport ist die Aktivierungsphase stark verlängert. (($p = 10,0$ bar; $V = 50$ mL; $[\mathbf{21}] = 1$ mM; $[\mathbf{8}] = 0,5$ M; $\theta = 25$ °C; Methanol)

so wird die Aktivierung durch die Bildung der aktiven Spezies immer stärker diskriminiert. Bevor die Aktivierung des Katalysators abgeschlossen ist, ist die Hauptreaktion abgeschlossen, weil das Edukt bereits vollständig umgesetzt wurde (Abbildung 6.8).

Die Limitierung des Stofftransports äußert sich in diesem Fall also in der verlangsamten Aktivierung. In THF sind diese Effekte nicht zu beobachten. Das heist wiederum, dass der Mechanismus der Aktivierung vom Lösungsmittel abhängt. In THF ist, wenn überhaupt, kaum eine Beschleunigung zu beobachten. Dort wird anscheinend die Aktivierung durch die Verdrängung des COD aus dem Komplex **21**-Rh durch das Lösungsmittel dominiert. Dies erklärt auch den qualitativen Befund, dass in THF der Katalysator schneller deaktiviert als in Methanol, da dort der als Schutz für das Rh wirkende COD-Ligand sehr viel schneller verdrängt wird. Analoges Verhalten wurde auch für DIOP **23** beschrieben [191].

Die anfangs aufgeworfene Frage, ob nicht aktivierter Katalysator nach Abschluss der Reaktion in nicht aktivierter Form vorliegt, wurde durch Untersuchungen für das DuPhos-System ausgeräumt [66]. Wegen der zentralen Bedeutung dieser Frage für die kinetische Charakterisierung und der unter limitierendem Stofftransport beobachteten verlängerten Aktivierung, musste dies jedoch für PyrPhos **21** näher untersucht werden.

Dazu wurde der Katalysator **21**-Rh in Methanol für unterschiedlich lange Zeiten unter Wasserstoffdruck gerührt. Dabei ist –erwartungsgemäß– kein Einfluss auf die maximale Aktivität feststellbar. Überraschenderweise trat jedoch auch nach der Vorbehandlung mit Wasserstoff immer noch eine Aktivierungsphase zu Anfang der eigentlichen Reaktion auf. Das war auch dann der Fall, wenn diese Voraktivierung länger andauerte als die üblicherweise beobachteten Beschleunigungsphasen unter Reaktionsbedingungen. Die gegenüber der eigentlichen Reaktion in der Lösung fehlende Komponente ist das Edukt. Um zu klären, ob das Edukt an der Aktivierung beteiligt ist, wurde eine Nachdosierung des Substrats durchgeführt.

Der Verlauf in Abbildung 6.9 auf der nächsten Seite zeigt, dass die Hydrierung zunächst erwartungsgemäß mit einer Beschleunigungsphase startet. Nachdem die vierfache Menge des Substrats in Methanol hinzugegeben wird, verläuft die Reaktion ohne Beschleunigungsphase bis zu quantitativem Umsatz. Dies bedeutet, dass die Aktivierung in Methanol erst in

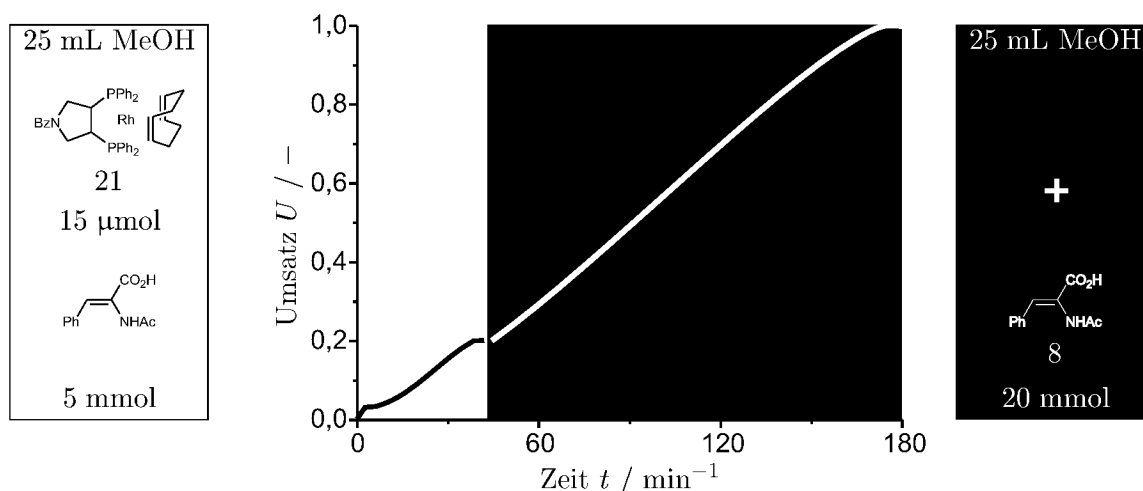


ABBILDUNG 6.9.: Durch die Nachdosierung von Substrat kann im zweiten Teil des Versuchs die Beschleunigungsphase umgangen werden.
($p = 10,0$ bar; $\theta = 25$ °C; Methanol)

Gegenwart des Substrats erfolgt. Dies wird auch durch Untersuchungen zur Desaktivierung ähnlicher Katalysatoren belegt [191], die eine schnellere Desaktivierung durch Sauerstoff in Gegenwart des Substrats beobachten. Das Substrat ist ein Ligand für den Edelmetallkomplex, das durch den großen Überschuss in Lösung in der Lage ist, COD zu verdrängen

6.2. Charakterisierung des polymervergrößerten Katalysators

Beim polymervergrößerte PyrPhos-Katalysator handelt es sich um ein *N-iso*-Propylpolymethacrylamid **33**, das in einer konvergenten Synthese zugänglich ist (Abbildung 6.10 auf der nächsten Seite).¹⁵ Die Syntheseroute ist analog zu den aus der Literatur bekannten Vorschriften [20, 21]. Auch andere polymervergrößerte PyrPhos-Systeme sind beschrieben, die zur Immobilisierung des Katalysators angewendet wurden [180, 181]. Der Vorteil des Katalysators **33** liegt in der Verwendung einer „Spacer“-Einheit, die Wechselwirkungen mit dem Polymerrückgrat minimiert, indem der Abstand zum Polymer vergrößert wird. Im Gegensatz zu anderen polymergebundenen PyrPhos-Systemen [180] bleibt die Selektivität mit **33** unverändert.

6.2.1. Katalysatorkonzentration

Analog¹⁷ zu den Untersuchungen am PyrPhos-Katalysator **21** wurden im Konstantdruckautoklaven¹⁸ Hydrierungen zur kinetischen Charakterisierung durchgeführt. Die Abbildung 6.11 auf Seite 51 zeigt den linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Re-

¹⁵ **33** wurde von Dr. Jens Wöltinger (degussa.¹⁶, Hanau) synthetisiert und freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt [277]

¹⁶ Es wurde der zu diesem Zeitpunkt verwendete Firmenname angewendet; für den aktuellen Namen sei auf die Tagespresse verwiesen.

¹⁷ vergleiche Abschnitt 6.1.2 auf Seite 43

¹⁸ vergleiche Abschnitt 6.1.1 auf Seite 43

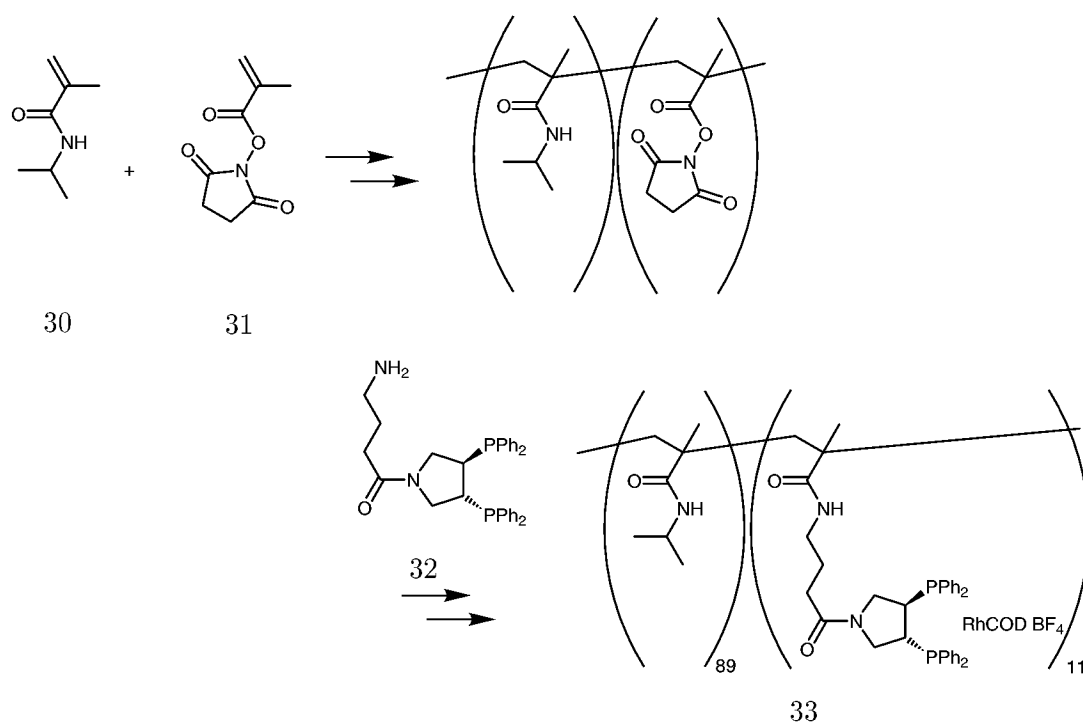


ABBILDUNG 6.10.: Synthese des polymervergrößerten PyrPhos-Katalysators **33** durch Amidkopplung an die aktivierte Esterfunktion eines Polymethylacrylamids.

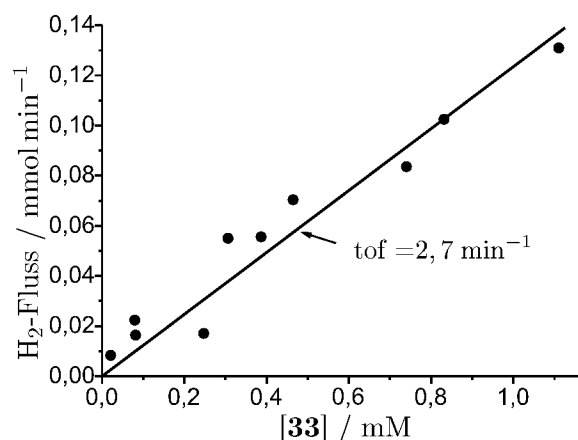


ABBILDUNG 6.11.: Geschwindigkeit der Wasserstoffaufnahme als Funktion der Katalysatorkonzentration des polymervergrößerten Katalysators **33** und die sich ergebende lineare Abhängigkeit

($p = 10,0$ bar; $V = 50$ mL; $[8] = 0,5$ M; $\theta = 25$ °C)

aktionsgeschwindigkeit. Damit ergibt sich eine $\text{tof} = 2,7 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$. Dies ist acht Mal so langsam wie der nicht polymergebundene Katalysator bezogen auf Rhodium.

6.2.2. Wasserstoffdruck

Die Überlegungen aus Abschnitt 6.1.2.2 auf Seite 45 zur Druckabhängigkeit gelten entsprechend. Die lineare Regression der Druckabhängigkeit liegt mit $0,27 \pm 0,05 \text{ min}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ so nahe bei der um den Faktor der absoluten Aktivität des polymervergrößerten Systems korrigierte Steigung von $0,31 \text{ min}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ (Abbildung 6.12 auf der nächsten Seite), dass davon ausgegangen werden kann, dass sich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion durch die Vergrößerung des Molekulargewichts nicht in Richtung der Koordination von Wasserstoff verlagert hat, was die vergleichbare Enantioselektivität der Reaktion erklärt.¹⁹

6.3. Produktaufarbeitung

Das Produkt *N*-Acetylphenylalanin (**11**) kann aus Wasser umkristallisiert werden. Durch fraktionierte Kristallisation kann man das Enantiomerenverhältnis auf $er > 400$ ($ee > 0,995$) steigern [147]. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Experimente wurden mehr als 100 g des *N*-geschützten Derivats der nicht-natürlichen (*R*)- beziehungsweise D-Aminosäure dargestellt (Abbildung 6.13 auf der nächsten Seite).

6.4. Zusammenfassung

- Es wurde ein Konstantdruckautoklav mit Wasserstoffflussmessung aufgebaut und für die kinetische Charakterisierung der Katalysatoren eingesetzt.
- Der freie Katalysator wurde kinetisch untersucht (Tabelle 6.1 auf Seite 53).

¹⁹vergleiche Abschnitt 4.1.3 auf Seite 36 zum Reaktionsmechanismus

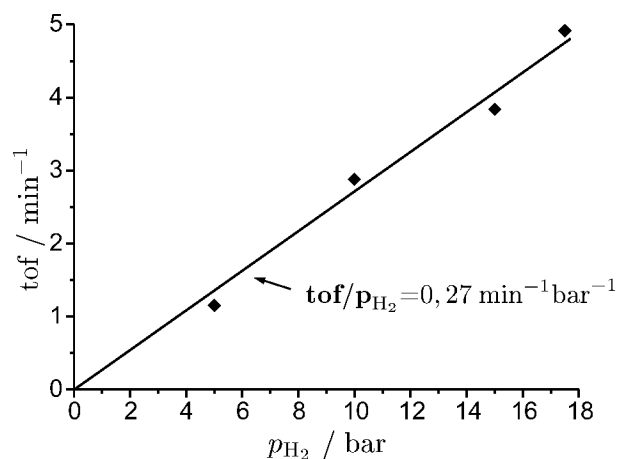


ABBILDUNG 6.12.: Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Wasserstoffdrucks und die sich ergebende lineare Abhängigkeit der tof für den polymervergrößerten Katalysator **33** ($V = 50 \text{ mL}$; $[8] = 0,5 \text{ M}$; $[33] = 1 \text{ g L}^{-1} = 0,5 \text{ mM(Rh)}$; $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

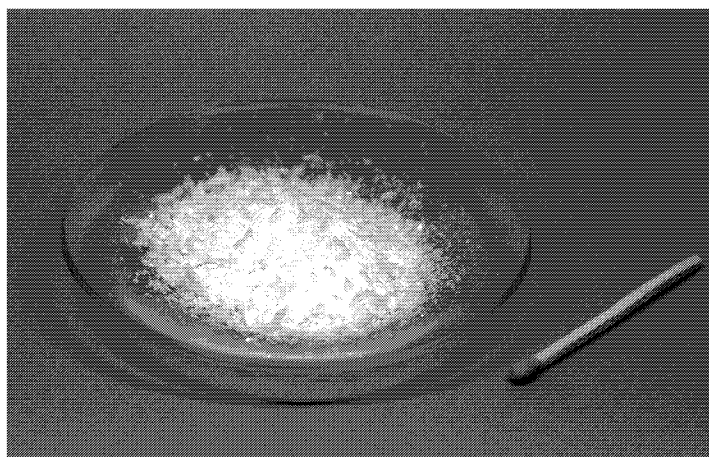


ABBILDUNG 6.13.: Probe des synthetisierten (*R*)-*N*-Acetylphenylalanin (**11**), insgesamt wurden mehr als 100 g des *N*-geschützten Derivats der nicht-natürlichen (*R*)- beziehungsweise D-Aminosäure dargestellt.

TABELLE 6.1.: Vergleich von polymervergrößertem und monomeren Katalysator

	monomer	polymervergrößert	
Molekulargewicht	827,5	$30 \cdot 10^3$	g mol^{-1}
aktive Zentren	1	16	
tof/ p_{H_2}	$2,3 \pm 0,1$	$0,27 \pm 0,05$	$\text{min}^{-1} \text{bar}^{-1}$
ttn(Satzreaktor)	10^4	10^4	
er (ee)	32 (0,94)	32 (0,94)	

- Die maximale Zyklenfrequenz (tof) ist in Methanol und THF gleich.
- Die Aktivierung ist jedoch vom Lösungsmittel abhängig, und wird in Methanol von der Gegenwart des Substrats beeinflusst.
- In Methanol konkurrieren bei Stofftransportlimitierung die Aktivierung und die eigentliche Reaktion um Wasserstoff.
- Unter katalytischen Bedingungen ohne Wasserstofflimitierung wird der Katalysator vollständig aktiviert.
- Der polymervergrößerte Katalysator wurde ebenfalls charakterisiert (Tabelle 6.1).
 - Die Selektivität des Katalysators ist unverändert.
 - Die tof ist um etwa den Faktor 8 kleiner als für den freien Katalysator.
- Die katalytische Aktivität ist im untersuchten Druckbereich (≤ 20 bar) in erster Ordnung vom Wasserstoffdruck beziehungsweise von der Wasserstoffkonzentration abhängig. Deswegen sollte zur Erhöhung der Aktivität der flüssigen Seite ein möglichst hoher Druck p_{fl} beaufschlagt werden, um die Löslichkeit von Wasserstoff zu erhöhen.

7. Kontinuierliche Synthese im Membranreaktor

*The Road goes ever on and on
Down from the door where it began.
Now far ahead the Road has gone
And I must follow, if I can.
Bilbo Baggins
in J.R.R. Tolkin, The Hobbit*

Das Ziel der Polymeranbindung des Katalysators ist die Entkopplung der Verweilzeiten von Katalysator und der anderen Bestandteile des Reaktionssystems durch selektive Retention mit einer geeigneten Membran. Dadurch ist dann die kontinuierliche Reaktionsführung unter selektiver Zurückhaltung des Katalysators durchführbar. Dieses ist jedoch nur sinnvoll möglich, wenn der Katalysator hinreichend stabil ist und eine annähernd quantitative Retention erreicht werden kann.

Da sich aufgrund der Voruntersuchungen schon abzeichnete, dass dies für den polymervergrößerten PyrPhos **33** nicht der Fall ist [277], war nicht zu erwarten, dass ein zufriedenstellender Einsatz im CMR möglich sein würde. Die Frage wie gravierend sich dies in einem kontinuierlichen Versuch auswirken würde, kann jedoch nur durch einen solchen Versuch selbst beantwortet werden.

Für die kontinuierliche Reaktionsführung wurde der in Abschnitt 3.4 auf Seite 19 beschriebene Reaktor verwendet. Es wurde eine Reihe solcher Versuche durchgeführt, von denen hier nur das in Bezug auf die Desaktivierung des polymervergrößerten Katalysators **33** aussagekräftigste gezeigt ist.

Der Umsatz als Funktion der Anzahl der Verweilzeiten ist in Abbildung 7.1 auf der nächsten Seite dargestellt. Bei der anfänglich eingestellten Verweilzeit von $\tau = 2,0$ h ist der Wasserstoffeintrag durch die dichte Polymermembran limitierend, so dass sich scheinbar ein stabiler Betriebspunkt bei niedrigem Umsatz einstellt. Bei Erhöhung der Verweilzeit auf $\tau = 5,7$ h steigt der Umsatz auf etwa den doppelten Wert. Durch Nachdosierung der gleichen Anfangsmenge des Katalysators lässt sich ein maximaler Umsatz von etwa 0,6 erreichen, der innerhalb weniger Verweilzeiten absinkt.¹ Durch nicht-lineare Regression lässt sich eine scheinbare Retention von $r = 0,78$ bestimmen. Diese ist zwar größer als die gestrichelt angegebene Ausspülkurve, die sich ohne Katalysatorrückhaltung ergeben würde, aber der Verlust von 0,22 Anteilen des Katalysators pro Verweilzeit ist für eine kontinuierliche Reaktionsführung bei weitem nicht ausreichend. Auch eine kontinuierliche Nachdosierung des Katalysators, wie sie für die kontinuierliche Transferhydrierung [163] erfolgreich war, hätte in diesem Fall bedeutet, mehr Katalysator pro Verweilzeit zuzugeben als im Satzreaktor verwendet wurde. Eine Steigerung der ttn gegenüber dem Satzreaktor wäre somit nicht möglich gewesen.

¹In der Abbildung ist dieser Ausschnitt vergrößert.

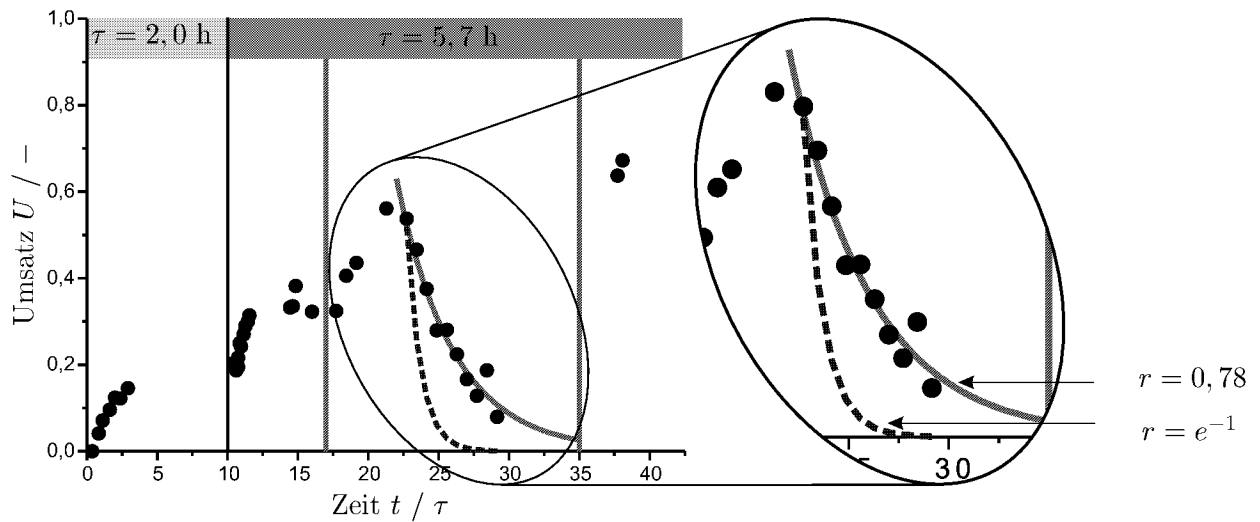


ABBILDUNG 7.1.: Kontinuierliche Hydrierung mit Poly-PyrPhos. Die senkrechten Striche zeigen den Wechsel der Verweilzeit beziehungsweise die Nachdosierung von Katalysator an. ($p_{fl} = 9$ bar; $p_{H_2} = 23$ bar; $[8]_{\text{ein}} = 0,1$ M; $\theta = 40$ °C)

Durch erneute Zugabe des Katalysators kann der Umsatz wieder auf über 0,6 gesteigert werden. Dieser Versuch wurde dann aber nach 190 h $\approx$ 8 d abgebrochen.

Der scheinbare Wert der Retention von $r = 0,78$ weicht erheblich von der unabhängig bestimmten Retention von über 0,99 ab [277]. Unter Reaktionsbedingungen weist der Katalysator beziehungsweise das Edelmetall entweder eine schlechtere Retention auf als vor der Aktivierung, oder der Katalysator desaktiviert unter Reaktionsbedingungen. Für die Desaktivierung spricht auch die Belegung der Membran mit schwarzem Niederschlag nach dem kontinuierlichen Experiment (Abbildung 7.2 auf der nächsten Seite). Dieser lässt wahrscheinlich auf metallisches Rh schließen, allerdings war kein entsprechender Nachweis möglich.

7.1. Zusammenfassung

Eine kontinuierliche Hydrierung lässt sich mit dem polymervergrößerten PyrPhos-Katalysatorsystem nicht durchführen. Die mangelnde Stabilität des Systems unter Reaktionsbedingungen lässt dies nicht zu. Diese äußert sich in einem drastischen Rückgang des Umsatzes innerhalb von wenigen Verweilzeiten.

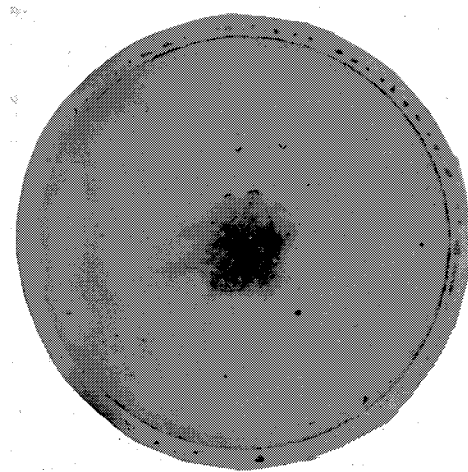


ABBILDUNG 7.2.: Ultrafiltrationsmembran (Koch MPF-50) nach dem kontinuierlichen Versuch (vergleiche Abbildung 7.1 auf der vorherigen Seite)

Teil III.

Enzymkatalytische Hydrierung

8. Einleitung

8.1. *Pyrococcus furiosus*

Its life on the surface that's unusual
Richard Taylor [276]

Die Arbeitsgruppe um Stetter entdeckte 1986 Mikroorganismen, die jenseits der Temperaturen optimal wachsen, die bis dahin als Obergrenze für Wachstum angesehen wurden [83]. Die Einteilung von *Pyrococcus furiosus* in die etwas unscharf definierte Klasse der „hyperthermophilen“ Mikroorganismen zeigt, dass der Begriff „thermophil“ bereits vergeben war [219]. Im Gegensatz zu thermophilen Mikroorganismen wachsen hyperthermophile bei Temperaturen jenseits von 70 °C optimal.

Von diesen zunächst als ungewöhnlich angesehenen Mikroorganismen, die fast ausnahmslos der phylogenetischen Domäne der Archae zugeordnet werden [69] (Abbildung 8.1 auf der nächsten Seite), sind inzwischen mehr als zwanzig Gattungen bekannt [3]. Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass selbst in als absolut lebensfeindlich angesehenen Umgebungen Habitate existieren, die von diesen Spezies dominiert werden [58]. Es wird diskutiert, ob ähnliche Lebensräume auf den Mars-Monden existieren, und ob dann extraterrestrisches Leben weniger ungewöhnlich sein könnte als bisher angenommen wird [276].

Die Lebensbedingungen dieser Mikroorganismen weichen stark von denen der bisher zugänglichen Biosphäre ab. Daher sind die Organismen unter völlig anderem evolutionären Selektionsdruck optimiert als die Lebewesen auf der Erdoberfläche. Die Strukturen und Eigenschaften der Biokatalysatoren sind daher nicht direkt mit denen aus anderen Evolutionsstammbäumen hervorgegangenen Mikroorganismen vergleichbar. Dies zeigt sich schon beim Aufbau und der komplizierten –nicht vollständig aufgeklärten– Redoxchemie der in dieser Arbeit untersuchten Hydrogenase.¹

Pyrococcus furiosus (*Pf*) wurde in einer heißen vulkanischen Schwefelquelle vor der Mittelmeerküste bei Porto di Levante, Vulcano (Italien), entdeckt [83]. Die 0,8 – 2,5 µm großen, begeißelten Zellen führen bei Berührung zu allergischen Reaktionen der Haut. Der Organismus ist sauerstoffempfindlich und ist in der Lage, verschiedene Kohlenstoffquellen durch Bildung von Kohlendioxid, organischen Säuren und Wasserstoff zu metabolisieren. Elementarer Schwefel kann mit überschüssigen Wasserstoffäquivalenten zu Schwefelwasserstoff reduziert werden; dies ist jedoch für das Wachstum von *Pf* nicht essentiell.

Die anaeroben Bedingungen und die dadurch bedingten überschüssigen Reduktionsäquivalente haben zur Ausbildung anderer Stoffwechselwege geführt als bei aeroben Organismen, die ihre Reduktionsäquivalente im allgemeinen auf Sauerstoff übertragen können. Im Gegensatz zu aeroben Organismen weist die Redoxbilanz beim Abbau von Kohlenhydraten und

¹Auf die Struktur der Hydrogenase wird im Abschnitt 8.2 auf der nächsten Seite noch näher eingegangen; vergleiche auch Kapitel 13 auf Seite 105.

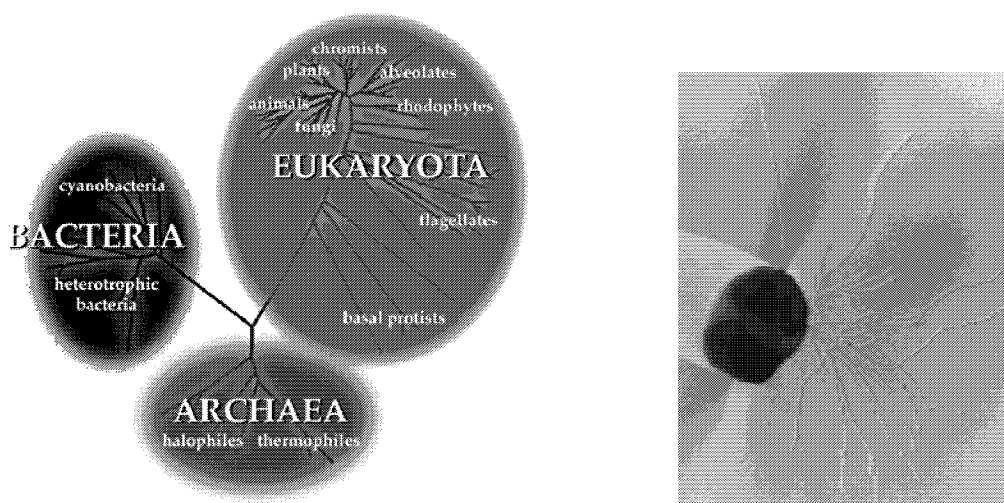


ABBILDUNG 8.1.: Künstlerische Darstellung der nach der Verwandtschaft der rRNA eingeteilten Domänen des auf Kohlenstoff basierenden Lebens (links, [69]) und elektronenmikroskopisches Bild von *Pyrococcus furiosus* (rechts, [120]).

Peptiden einen Elektronenüberschuss auf [83, 239]. So ist *Pf* in der Lage eine Reihe organischer Säuren zu Aldehyden und weiter zu Alkoholen zu reduzieren, was erfolgreich in Biotransformationen angewendet werden konnte [268].

Für die hyperthermophilen Organismen aus heißen Quellen vulkanischen Ursprungs ist es ein evolutionärer Vorteil, Wasserstoff aktivieren zu können. Dies kann für die Nutzung als Energiequelle durch Reduktion mit Wasserstoff sein [222], und die Reduktion von Protonen zu Wasserstoff stellt eine Möglichkeit für die Beseitigung von überschüssigen Elektronen aus der Reduktion organischer Verbindungen dar [5]. Der Selektionsvorteil der Nutzung von Wasserstoff als Energiequelle ist so groß, dass Hydrogenasen sogar in *Escherichia coli* induziert werden können [157, 165, 288].

8.2. Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus*

Die Hydrogenase aus *Pf* (*PfH*) ist ein redoxaktives Enzym aus dem Zytoplasma der Zelle. Sie enthält Nickel-Eisen-Cluster ([NiFe]) und verschiedene Eisen-Schwefel-Cluster ([2Fe2S], [4Fe4S]) in vier verschiedenen Untereinheiten (Abbildung 8.2 auf Seite 64). Die genaue physiologische Funktion ist ungeklärt. Gemeinsam ist den verschiedenen postulierten Stoffwechselpfaden jedoch die Einbindung in eine Redoxkette unter Beteiligung von Ferredoxin oder Nukleotidkofaktoren, analog der Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* [10]. Die physiologische Vorzugsrichtung der *in vivo* katalytischen Aktivität bezüglich Wasserstoffoxidation [239] oder Protonenreduktion [179] wird jedoch diskutiert. Für *in vitro* Biotransformationen sind beide Reaktionen, sowohl die Wasserstoffproduktion [234, 285, 286] als auch die Oxidation [178], nachgewiesen.

Die spezifische Aktivität der *PfH* zur regioselektiven 1,4-Hydridaddition an den phosphorylierten Nikotinamidkofaktor NADP^+ hat zu weiteren Untersuchungen geführt [268], die als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dienen.

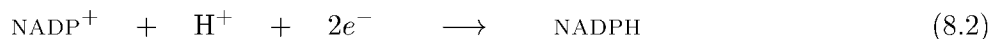
8.2.1. Zur Struktur der Hydrogenase

Die katalytische Aktivität von Enzymen ist eng mit ihrer makromolekularen Struktur verknüpft [252]. Die Komplexität der *Pyrococcus furiosus* Hydrogenase² (*PfH*) spiegelt die multiplen Funktionen im Wasserstoffstoffwechsel der Zelle wieder. Das Enzym wurde bis zur Homogenität aufgereinigt [42]. Die das Enzym kodierende Genomsequenz liegt vor [206]. Allerdings ist für den Organismus kein Expressionssystem vorhanden, das die Überproduktion des Enzyms in einem anderen Organismus erlaubt. Die Fermentation wäre aufgrund der intrinsischen Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Sauerstoff wahrscheinlich auch nur mit anaeroben Mikroorganismen möglich. Das bedeutet jedoch, dass der Ursprungsorganismus *Pf* auf absehbare Zeit das beste Expressionssystem zur Produktion der *PfH* darstellt.

Die *PfH* ist ein heterotetrameres Enzym mit einem Molekulargewicht von 153 kg mol^{-1} . Sie gehört zur Klasse der NiFe-Hydrogenasen [89, 90]. Die Redoxaktivität beruht auf verschiedenen Metallozentren, deren genaue Beteiligung an der Redoxkette ungeklärt sind [240]. Gesichert sind die Trennung von Wasserstoffoxidation bzw. Protonenreduktion an der α -Untereinheit von den anderen Redoxprozessen (Abbildung 8.2 auf der nächsten Seite). Dabei entstehen bei der heterolytischen Spaltung gemäß³



zwei Protonen und zwei Elektronen. Die Protonen werden solvatisiert und die Elektronen werden intern übertragen. Die Reduktion von NADP^+



erfolgt an der FAD-Bindungsstelle. Die Bruttogleichung der Reduktion aus (8.1) und (8.2) lautet dann:



Die räumliche Trennung von Oxidation und Reduktion kann verschiedene Gründe haben. Da eine Triebkraft der Reduktion bei physiologischen pH-Werten die Solvatationsenergie des Protons ist,⁴ wird so zunächst der Energiegewinn aus der Wasserstoffoxidation durch die Solvation von zwei Protonen maximiert. Weiterhin kann das Enzym so als Weiche im Stoffwechsel fungieren, da die Elektronen auf verschiedene Akzeptoren übertragbar sind. Da das Enzym membranständig ist, werden so unter Umständen auch transmembrane pH-Gefälle generiert oder genutzt. Die räumliche Trennung verhindert auch, dass das säurelabile Produkt NADPH durch das in der Bruttoreaktion (8.3) entstehende Proton angegriffen wird. Es werden dadurch lokale pH-Minima am Ort des reduktiv aktiven Zentrum des Enzyms verhindert, die sonst zur schnelleren Zerstörung von NADH und NADPH beitragen könnten.

²Es gibt eine zweite weniger aktive Hydrogenase aus *Pf*, die von der Arbeitsgruppe um Adams isoliert werden konnte [178]. Bei dem hier untersuchten Enzym handelt es sich daher genauer um die Hydrogenase I, die auch als Sulfhydrogenase bezeichnet wird.

³Für die ausführliche Diskussion der Redoxchemie und der elektrochemischen Notation vergleiche Anhang A auf Seite 131.

⁴vergleiche Abschnitte 11.1 auf Seite 77 und Anhang A auf Seite 131

TABELLE 8.1.: Daten zur Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* [240, 268]

Organismus	<i>Pyrococcus furiosus</i> (Pf) ^a	DSM 3638
Bezeichnung	Hydrogenase I	
	Enzyme class 1.18.99.1	[17, 114]
Struktur	heterotetramer	$\alpha\beta\gamma\delta$
Molekulargewicht	153,3 kg mol ⁻¹	
Hydrogenase	$\alpha\delta$	
Schwefelreduktase	$\beta\gamma$	
α	48,7 kg mol ⁻¹	[NiFe]
β	41,8 kg mol ⁻¹	2 [4Fe4S]
γ	33,2 kg mol ⁻¹	[2Fe2S]+FAD
δ	29,6 kg mol ⁻¹	2 [4Fe4S]

^a*Pyrococcus* nach gr. $\pi\rho\rho$ =Feuer, gr. $\kappa\omicron\kappa\kappa\upsilon\sigma$ =Beere, Traube; lat. furios=wild, stürmisch [83]. „Pyro-, als Vorsilbe bei Säuren zeigt an, dass ihre Darstellung durch Erhitzen erfolgt.“ [141]

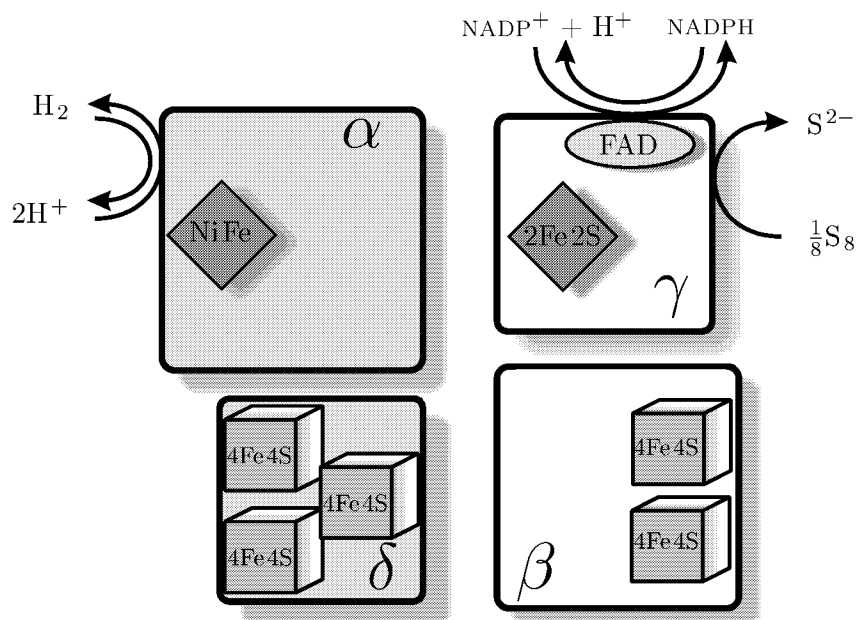


ABBILDUNG 8.2.: Die heterotetramere Struktur der Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* mit den vier Untereinheiten $\alpha\delta$ $\beta\gamma$ und den redoxaktiven metallischen Zentren und der FAD-Untereinheit [240].

8.3. Reduktive Kofaktor(re)generierung

Die erfolgreiche Anwendung von kofaktorabhängigen Enzymen ist eng verknüpft mit der kostengünstigen und effektiven Bereitstellung oder *in situ* Regenerierung des jeweiligen Kofaktors [62, 159, 169]. Vor allem sind die für die meisten redoxaktiven Enzyme benötigten Nikotinamid-Kofaktoren NADH (39) und NADPH (38) aufgrund ihrer hohen Kosten nur dann für die präparative Synthese als Reagenz einzusetzen, wenn leistungsfähige Regenerationssysteme zur Verfügung stehen, die es erlauben, sie in katalytischen Mengen als Mediator⁵ für die Hydridäquivalente einzusetzen.

Für den katalytischen Einsatz der Kofaktoren bedarf es *in situ* Regenerationsmethoden mit hohen Zyklenzahlen (ttn) für den Kofaktor. Weiterhin bietet die gezielte Kofaktorregenerierung neben der Reduzierung der Produktionskosten drei weitere Vorteile. Erstens ergibt sich die Möglichkeit, das Gleichgewicht durch die angekoppelte Reaktion zu beeinflussen; zweitens kann der Einsatz von katalytischen Mengen helfen kinetische Inhibierungen zu vermeiden; und drittens stellen die geringen Mengen des Kofaktors selbst kein Problem bei der Aufarbeitung dar.

Mit der Entdeckung von immer mehr synthetisch wertvollen enzymatischen Reduktionen zeigt sich, dass viele selektive Reaktionen nur durch Enzyme zugänglich sind, die $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ abhängig sind [121, 123, 218, 284]. Als Beispiel sei hier die direkte regio-selektive und stereoselektive Reduktion des Hexanoats **34** in 5-Position mit einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LbADH) genannt [281]. Diese ist nur durch Biotransformation ohne die sonst nötige, aufwendige Schutzgruppenchemie zugänglich (Abbildung 8.3). Allerdings zeigen die bisherigen Arbeiten, dass die reduktive Regenerierung des Kofaktors durch substratgekoppelte Kofaktorregenerierung⁶ für die Reduktion limitierend ist, und die Optimierung des Regenerationssystems ist daher Gegenstand aktueller Untersuchungen [84].

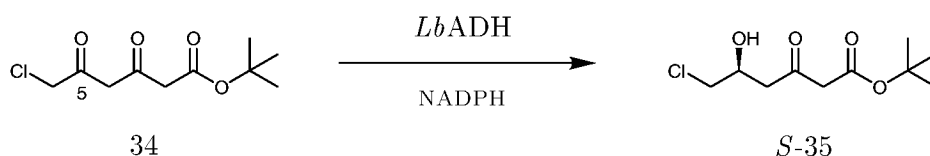


ABBILDUNG 8.3.: Die durch eine Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LbADH) katalysierte regio- und stereo-selektive Reduktion des Hexanoats **34** an der Position 5 zu **S-35** verläuft mit $er \geq 400$ ($ee \geq 99,5$) [281, 283].

Der Grund dafür, dass interessante Reaktionen und Intermediate bisher nur über den phosphorylierten Kofaktor NADPH zugänglich sind, könnte in der Trennung von Metabolstoffwechsel und synthetischem Stoffwechsel vieler Zellen liegen. Dies bedeutet für die Zellen einen Selektionsvorteil, da die Wege des Energiestoffwechsels und die der höheren Stoffwechselwege nicht um das gleiche Reduktionsmittel konkurrieren. Die Trennung erlaubt es der Zelle, die höheren Stoffwechselwege nur bei entsprechend günstiger Gesamtstoffwechselage zu betreiben.

⁵**Mediator**, Vermittler, Mittelsperson [141]. Im Gegensatz zum Katalysator wird der Mediator durch die Reaktion verändert, geht aber aus der Bruttoreaktion unverändert hervor; vergleiche Kapitel 12 auf Seite 95.

⁶vergleiche auch Abschnitt 12.1.1 auf Seite 97 und Anhang A.6 auf Seite 135

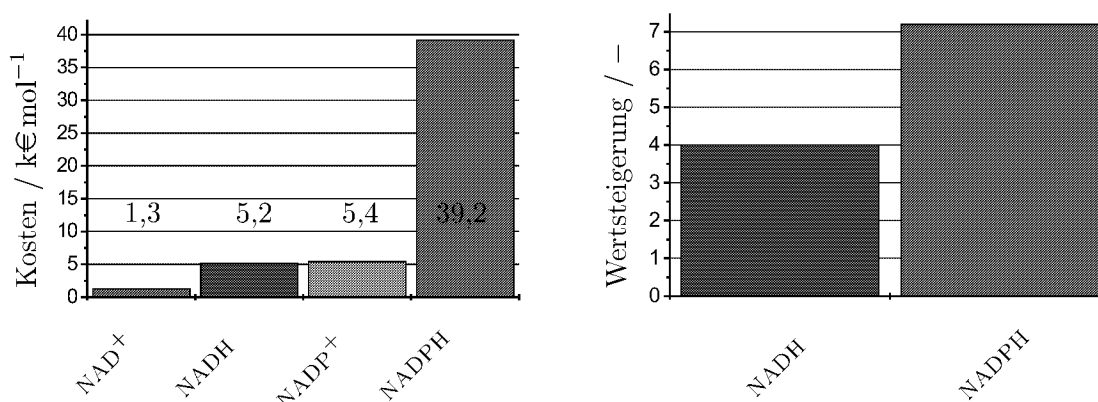


ABBILDUNG 8.4.: Kosten der Nikotinamidkofaktoren in reduzierter und oxidiert Form, und die relative Wertsteigerung durch die selektive Reduktion der oxidierten Form (Stand Januar 2002: JFC - Jülich Fine Chemicals GmbH, Jülich [292])

Das Interesse an den Enzymen der höheren Stoffwechselwege und die durch sie katalysierten Systeme bedingen einen erhöhten Bedarf an reduziertem Kofaktor NADPH und an effizienten Methoden der *in situ* Regenerierung. Auch haben die bisherigen Versuche, diese Enzyme durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz zur Akzeptanz des kostengünstigeren NAD⁺ beziehungsweise NADH zu modifizieren, stets auch nicht beabsichtigte Änderungen der katalytischen Aktivität mit sich gebracht [122].

Trotz der oben angeführten Gründe, die für die *in situ* Regeneration der Kofaktoren sprechen, gibt es eine Nachfrage für die reduzierten Kofaktoren NADH und NADPH. Diese sind in der biochemischen Analyse durch Enzymtests⁷, diagnostischen Testverfahren, als Nahrungsergänzungsmittel [26] und durch stöchiometrischen Synthesen gegeben. Diese Nachfrage spiegelt sich in den Preisen der reduzierten Kofaktoren wieder (Abbildung 8.4) [292]. Eine reduktive Darstellung ist bei beiden Nikotinamidkofaktoren mit einer großen Wertsteigerung verbunden. Daher sind die reduzierten Nukleotide NADH aber vor allem NADPH nicht nur als Mediatoren der selektiven enzymatischen Hydrierung interessant, sondern auch als Produkt.

Die reduktive Darstellung und Regenerierung von NADH und NADPH ist durch zwei Umstände erschwert. So ist die nötige regioselektive 1,4-Hydridaddition an den Nikotinamidring thermodynamisch gegenüber der 1,6-Addition benachteiligt, da bei der letzteren ein größeres konjugiertes Doppelbindungssystem erhalten bleibt (Abbildung 8.6 auf der nächsten Seite).⁸ Die chemischen Methoden der Darstellung und Regenerierung sind meist nicht sehr effektiv, da die Selektivität gegenüber der thermodynamisch bevorzugten 1,6-Addition für das Erreichen von hohen Zyklenzahlen (ttn) meist nicht ausreicht [226, 273], zum Beispiel wenn die Reduktion durch unspezifische Elektronenübertragung erfolgt.⁹ Weiterhin sind die reduzierten Formen der Kofaktoren NADPH (38) und NADH (39) in wässriger Lösung instabil,

⁷Die für die reduzierten Kofaktoren charakteristische UV-Absorption und UV-Fluoreszenz erlaubt die sensitive Verfolgung von Enzymreaktionen.

⁸Die Bezeichnung als Reduktion ist irreführend, und man bezeichnet die Reduktion besser als nukleophile 1,4-Hydridaddition an den Pyridinring der Nikotinamiduntereinheit (Abbildung 8.5 auf der nächsten Seite).

⁹Die erreichbare ttn beziehungsweise die Zyklenzahl bei der sich die Hälfte des Kofaktors in der 1,6-Form befindet, lässt sich analog der Retention bei der Filtration mit (D.4) aus Anhang D auf Seite 153 berechnen.

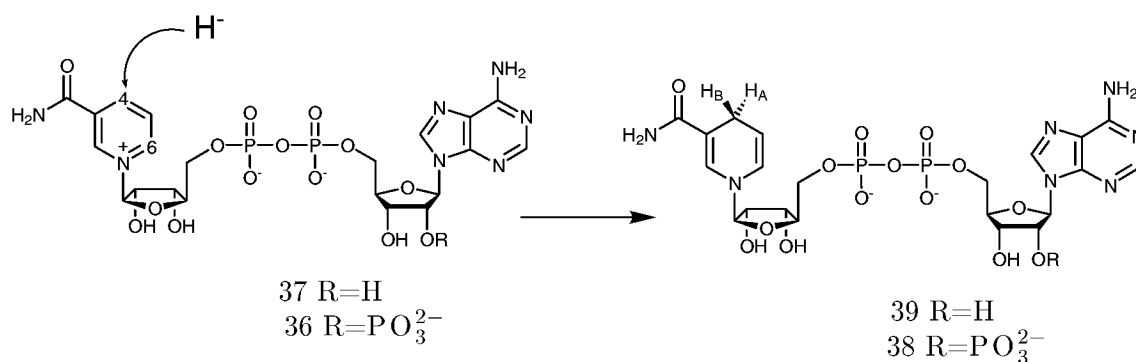


ABBILDUNG 8.5.: Bei der formalen Reduktion von NADP^+ zu NADPH findet eine 1,4-Hydridaddition statt, dabei kann das Hydrid in eine der enantiotopen Position (H_A oder H_B) übertragen werden.

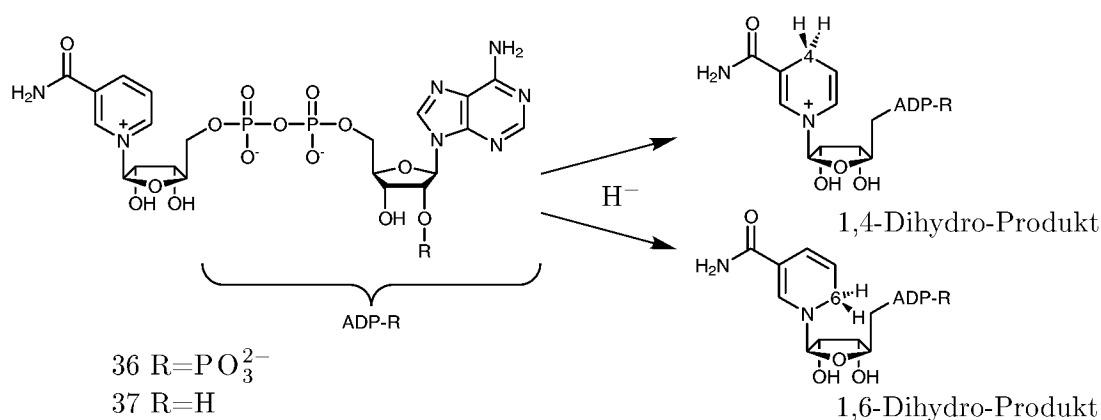


ABBILDUNG 8.6.: Energetisch ist die 1,6-Addition gegenüber der 1,4-Addition begünstigt, da die Doppelbindungen im 1,6-Dihydropyridin konjugiert sind. In enzymatischen Reduktionen ist nur das 1,4-Dihydropyridin aktiv. NADPH oder NADH bezeichnen das 1,4-Produkt.

und zerfallen irreversibel zu inaktiven Folgeprodukten.¹⁰ Dabei sind die reduzierten Formen in der Regel weniger stabil als die oxidierten, und die phosphorylierten Pyridinnukleotide zerfallen schneller als diejenigen ohne freie Phosphatfunktion am Adenosinrest (ADP-R, mit $\text{R}=\text{H}$).

Für die reduktive Kofaktorregenerierung¹¹ von NADPH sind zahlreiche Systeme vorgeschlagen und getestet worden [62, 116, 189]. Die wichtigsten seien im folgenden kurz beschrieben.

8.3.1. Substratgekoppelte Regenerierung

Bei der substratgekoppelten Kofaktorregenerierung wird ein strukturell dem gewünschten Produkt verwandtes Reduktionsmittel eingesetzt. Dies erlaubt, die Kofaktorregenerierung

¹⁰vergleiche Kapitel 9 auf Seite 71

¹¹Für die oxidative Regenerierung gibt es verschiedene Methoden, die in [189, 226] und der darin zitierten Literatur beschrieben sind.

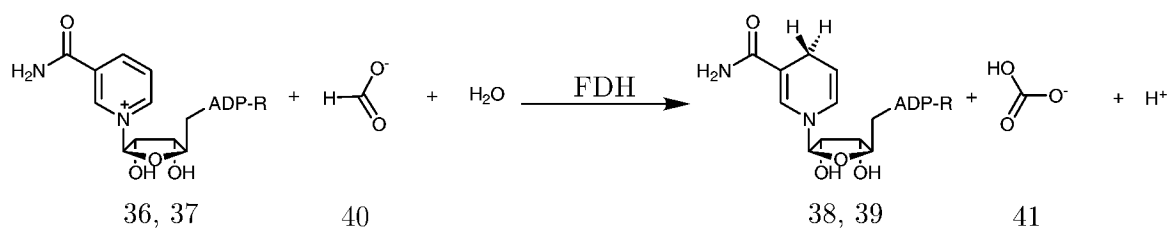


ABBILDUNG 8.7.: Die durch die Formiatdehydrogenase (FDH) katalysierte Reduktion von NAD⁺ (37) beziehungsweise NADP⁺ (36) durch Formiat (40) und die entstehenden Nebenprodukte Carbonat (41) und Protonen.

und die gewünschte Reaktion mit nur einem Enzym durchzuführen. Nachteil ist der oft benötigte hohe Überschuss an Reduktionsmittel, der durch die dicht beieinander liegenden Reduktionspotentiale von Zielmolekül und Reduktionsmittel nötig ist.¹²

8.3.2. Formiatdehydrogenasen

Vor allem die Verwendung von Formiatdehydrogenasen (FDH) ist für die reduktive Regenerierung von NADH durch Oxidation von Formiat (40) zu Carbonat beziehungsweise Kohlendioxid¹³ erfolgreich (Abbildung 8.7)[159], und wird technisch beispielsweise für die Darstellung von *tert*-Leucin mit einer Leucindehydrogenase eingesetzt [35, 170]. Eine vergleichbare Erfolgsgeschichte war der NADP⁺-abhängigen Formiatdehydrogenase bisher nicht vergönnt, wobei vor allem die bisher schlechte Verfügbarkeit im Vergleich zur NAD⁺-FDH eine Ursache ist [274]; aber auch die vergleichsweise schlechte katalytische Aktivität und Stabilität des Enzyms sind als Gründe zu nennen [216, 233].

8.3.3. Hydrogenasen

Die Verwendung von Hydrogenasen, die für die Reduktion molekularen Wasserstoff aktivieren, ist für den Einsatz zur Regenerierung der reduzierten Kofaktoren beschrieben. Dabei werden zum Teil gekoppelte Enzymsysteme vorgeschlagen, bei denen der Wasserstoff auf einen weiteren Redoxmediator übertragen wird, der seinerseits zur Reduktion von NAD⁺ und NADP⁺ mit einem weiteren Enzym genutzt wird [62, 200, 205]. Auch die Ganzzellbiotransformation unter Verwendung von Wasserstoff ist mit verschiedenen Organismen beschrieben [241, 255]. Weiterhin wurden Hydrogenasen gefunden, die direkt die NADH-Oxidation zu NAD⁺ und H₂ katalysieren [225]. So wurde das lösliche Enzym aus *Alcaligenes eutrophus* H16 erfolgreich für die elektrochemische und chemische Reduktion [56, 178] und die Kofaktorre-generierung von NADH [55] eingesetzt. Für den Einsatz von Hydrogenasen ist die geringe Stabilität nachteilig, die unter anderem auch durch die Empfindlichkeit gegen Sauerstoff gegeben ist.

¹²Die sich daraus ergebende thermodynamische Limitierung des erreichbaren Umsatzes wird im Abschnitt A.6 auf Seite 135 diskutiert.

¹³Formal entsteht Kohlendioxid, das jedoch in wässriger Lösung solvatisiert wird, und je nach pH als Carbonat oder Hydrogencarbonat vorliegt.

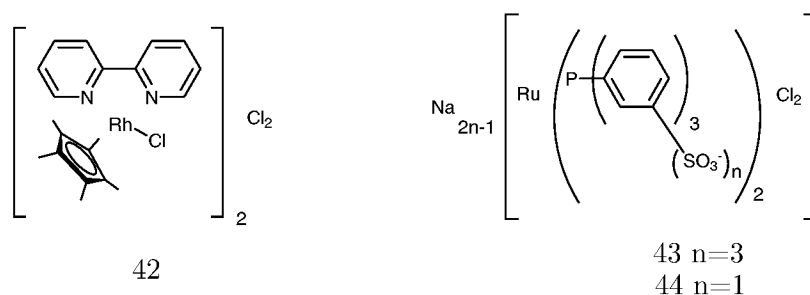


ABBILDUNG 8.8.: Homogenkatalysatoren für die selektive 1,4-Hydridaddition von NAD^+ (37) und NADP^+ (36) nach [112, 221, 248].

8.3.4. Homogenkatalysatoren

Wegen der für die enzymatische Reduktion nötigen hohen Regioselektivität gibt es wenige chemische oder elektrochemische Verfahren zur Produktion und Regenerierung der reduzierten Kofaktoren. Ausnahmen sind homogenkatalytische Edelmetallkomplexe nach Steckhan *et.al* [221] mit Bipyridin-Liganden **42** [145] und nach Hembre *et.al* [112] mit monodentaten Phosphanliganden **43** und **44** (Abbildung 8.8), die sich enzygmimetisch verhalten. Der Komplex nach Steckhan ist gut charakterisiert [246] und für zahlreiche Systeme sowohl für Produktion als auch für die Kofaktorregenerierung genutzt worden [116, 246, 248, 265]. Auch die regioselektive Reduktion von NADH -Derivaten mit **42** und Formiat wurde untersucht [173]. Ein entscheidender Nachteil der Homogenkatalysatoren ist deren mangelnde chemische Selektivität; so reduziert **42** Ketone auch direkt. In der Regel sind solche Systeme daher für die reduktive Kofaktorregenerierung nur bei räumlicher Trennung der Reaktionsräume einsetzbar [265].

9. Stabilität der Nikotinamidkofaktoren

Bei den Pyridinnukleotiden NAD^+ (37)/ NADH (39) und NADP^+ (36)/ NADPH (38) handelt es sich um aktivierte Moleküle, die *in vivo* allgemeine Träger der Reduktions- und Oxidationsäquivalente sind, und als Kofaktoren bei enzymatisch katalysierten Reaktionen beteiligt wirken. Dabei stellen sie als Hydridmediatoren die intrazelluläre Redoxwährung dar. Die Kofaktoren sind in wässriger Lösung nicht unbegrenzt stabil, und verlieren durch chemische Veränderung je nach pH, Temperatur, Puffer- und anderen Substanzen mehr oder weniger schnell die redoxaktiven Eigenschaften für enzymatische Umsetzungen [62].

Für die Anwendung *in vitro* ist es aufgrund der hohen Kosten der reduzierten Kofaktoren wichtig, hohe Ausbeuten bei der Darstellung beziehungsweise hohe Zyklenzahlen (ttn) beim Einsatz als Mediator zu erreichen. Daher werden solche Bedingungen gewählt, die zur Stabilisierung, also zur Unterdrückung von Zerfallsreaktionen, beitragen.

Eine Übersicht über einen weiten pH-Bereich gibt [62]. Verallgemeinernd lassen sich einige Tendenzen formulieren:

- die reduzierten Kofaktoren sind weniger stabil als die oxidierten Formen
- die oxidierten Formen sind im sauren pH stabiler als die reduzierten Kofaktoren
- die reduzierten Formen sind im basischen pH-Bereich stabiler
- die phosphorylierten Formen deaktivieren schneller.

Diese allgemeinen Tendenzen sind in der aus [62] entnommenen Abbildung 9.1 auf der nächsten Seite ersichtlich. Dort kann man erkennen, dass in einem Bereich von $7 < \text{pH} < 9$ die Zerfallsgeschwindigkeiten in einem Bereich liegen, der eine präparative Darstellung erlaubt.

9.1. Reduzierte Form

Die reduzierten Kofaktoren sind in wässriger Lösung nicht stabil, und zerfallen bei Raumtemperatur je nach pH und Puffer innerhalb weniger Stunden. Die Zerfallsreaktion, die zum schnelleren Abbau von NADH und NADPH gegenüber den oxidierten Formen führt, ist durch die stärkere Aktivierung des Dihydropyridinrings gegenüber dem Pyridinring begründet. Als Hauptabbauweg wurde ein mehrstufiger komplizierter Mechanismus verifiziert, der zu einem cyclischen intramolekularen Addukt führt: Cyclotetrahydropyridinnukleotid (cTHNAD(P)) **46** (Abbildung 9.2 auf der nächsten Seite) [133]. In den multiplen Wegen, die über verschiedene Reihenfolgen von Isomerisierung zum α -Anomeren und Addition an die aktivierte 5,6-Doppelbindung verlaufen, ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt die protonenkatalysierte Addition einer Hydroxyfunktion der Ribose, die zu dem stabilen tricyclischen System **46** führt. Dies führt nicht nur zum Verlust des Kofaktors für die enzymatische Reduktion, sondern für viele Enzyme konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Zerfallsprodukten um Enzyminhibitoren handelt [251].

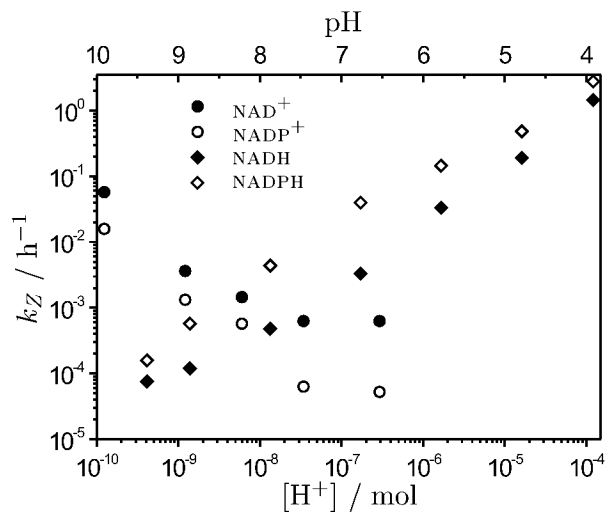


ABBILDUNG 9.1.: Geschwindigkeiten des Zerfalls k_Z für die Nikotinamidkofaktoren in Abhängigkeiten vom pH in doppelt logarithmischer Auftragung nach [62] ($[\text{Kofaktor}]_0 = 0,1 \text{ mM}$; $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; 50 mM Puffer: Acetat $3 < \text{pH} < 6$, TEA $6 < \text{pH} < 8$, Carbonat $\text{pH} > 9$)

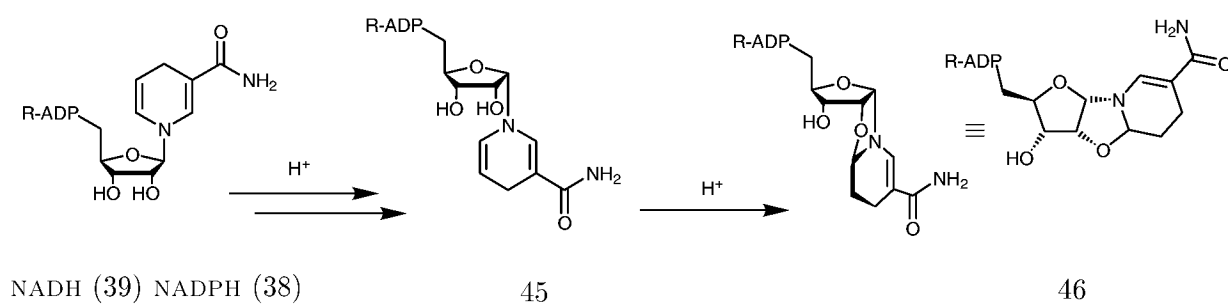


ABBILDUNG 9.2.: Die Reaktionswege der säurekatalysierten Cyclisierungsreaktion von NADPH und NADH verlaufen über die Ausbildung von α -Anomeren des Typs **45** unter Ausbildung eines *cis*-ständigen tricyclischen Systems **46**.

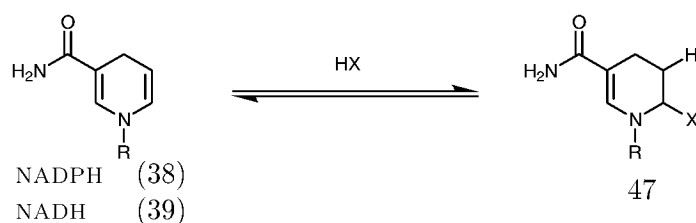


ABBILDUNG 9.3.: Nukleophile Addition an die aktivierte 5,6-Doppelbindung des Dihydropyridinrings von NADPH und NADH. Bei HX handelt es sich um mittelstarke Sauerstoffsäuren wie zum Beispiel Phosphorsäure oder Borsäure, aber auch Wasser kann so reversibel addiert werden.

Eine weitere Zerfallsreaktion ist die elektrophile Addition an die 5,6-Doppelbindung, wie in der Abbildung 9.3 gezeigt ist. Dabei wird eine Säure HX reversibel an die Doppelbindung addiert. Es wird diskutiert, ob diese Reaktion für den Fall, dass HX Wasser ist, ein möglicher Reaktionsverlauf bei der Cyclisierung ist [24, 133]. Diese Reaktion spielt auf jeden Fall bei dem beschleunigten Zerfall in Gegenwart von Puffersubstanzen wie Phosphat, Borat oder Carbonat eine Rolle [134, 287]. Diese Reaktion wird auch für den schnelleren Zerfall von NADPH gegenüber NADH verantwortlich gemacht [11], der in [62] mit der Säurekonstante pK_S der freien Phosphatgruppe von NADPH korreliert wird. Denkbar ist dabei dann der intramolekulare Ringschluss zu einer makrocyclischen Verbindung [24]. Die sekundäre Solvolyse der Phosphatester ist um Größenordnungen langsamer, und spielt daher im Gegensatz zu den oben genannten Reaktionen kaum eine Rolle [24].

Im allgemeinen und auch für die Behandlung im Rahmen dieser Arbeit nimmt man vereinfachend an, dass es sich beim Zerfall um eine irreversible Reaktion erster Ordnung handelt. Nach dem oben diskutierten Mechanismus trifft das für NADPH näherungsweise zu, auch wenn intramolekulare und intermolekulare (Gleichgewichts-)Reaktionen eine Rolle spielen [287]. Aufgrund der vermuteten zusätzlichen intramolekularen Reaktion beim Zerfall von NADPH ist für höhere Konzentrationen eine Beschleunigung zu erwarten. Weiterhin ist wegen der Katalyse durch Protonen die Geschwindigkeitskonstante der Zerfallsreaktion k_Z vom pH abhängig. Dieser Zusammenhang wurde in der Literatur umfangreich behandelt [62], wobei die Abbildung 9.1 auf der vorherigen Seite den Zusammenhang für alle Nukleotide zeigt. Hier kann man erkennen, dass die reduzierten Kofaktoren bei Abwesenheit von Protonen – bei hohen pH-Werten – stabil sind, stabiler sogar als die oxidierten Formen.¹

9.2. Oxidierte Form

Hauptzerfallsweg der oxidierten Kofaktoren sind die Hydrolyse der CN-Bindung zwischen der Riboseuntereinheit und dem Pyridinring [62]. In Gegenwart von Nukleophilen ist auch ein Angriff des elektronenarmen Pyridinrings möglich. Eine Reaktion, die bei der Kofaktorregenerierung eine Rolle spielt, ist die Addition eines enolisierten Ketons oder Aldehyds an den Pyridinring (Abbildung 9.5 auf der nächsten Seite). Diese säure- und basenkatalysierte Reaktion schränkt den Kompatibilitätsbereich bei der Kofaktorregenerierung weiter ein, da hier auch die im Überschuss eingesetzten Substrate beziehungsweise entstehenden Produkte mit

¹vergleiche Abschnitt 9.2

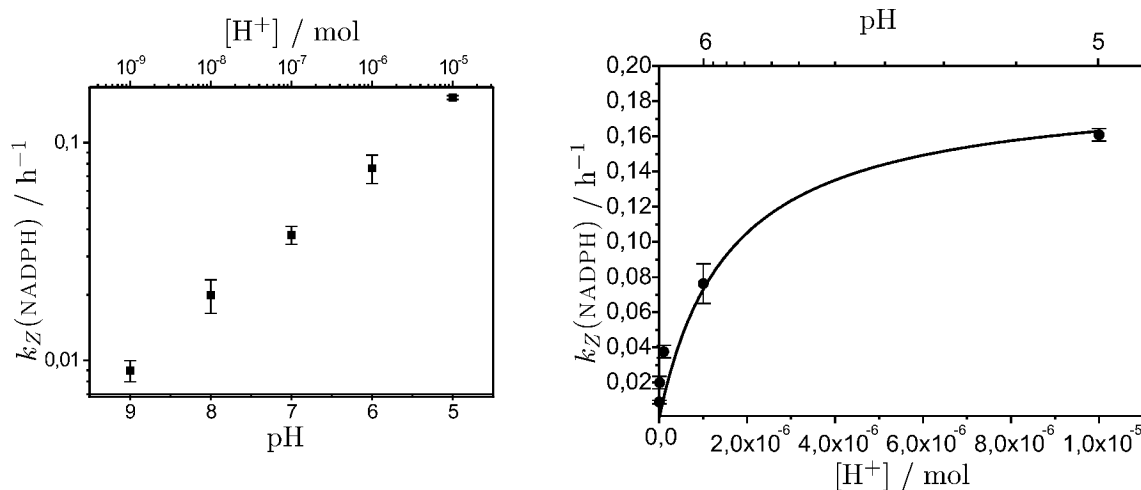


ABBILDUNG 9.4.: Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten des Zerfalls von NADPH zeigen eine starke Abhängigkeit vom pH. Die doppelt logarithmische Auftragung suggeriert einen exponentiellen Zusammenhang, der sich bei linearer Auftragung aber als hyperbolische Funktion entpuppt.

($[\text{KPi}] = 50 \text{ mM}$; $\theta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{NADPH}]_0 = 5 \text{ mM}$)

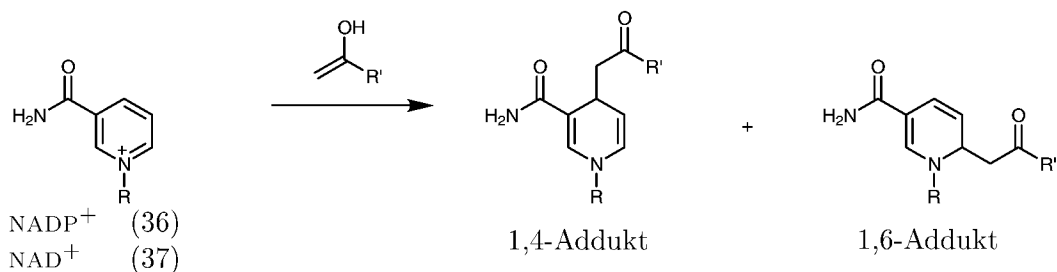


ABBILDUNG 9.5.: Reaktion von NADP⁺ und NAD⁺ mit Enolen; dabei kann es sowohl zu einer 1,4-Addition als auch zu einer 1,6-Addition des Enols an den aromatischen Ring kommen.

dem Kofaktor reagieren können. Im allgemeinen sind jedoch die Zerfallsgeschwindigkeiten der oxidierten Formen bei $\text{pH} < 9$ gegenüber denen der reduzierten Formen vernachlässigbar.

10. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Chance only hits the prepared mind
Sir Alexander Fleming

Die spezifische Aktivität der Hydrogenase aus *Pf* (*PfH*) [268] ist der Ausgangspunkt für weitere Fragestellungen. Diese stehen zum Teil in Zusammenhang mit der in dieser Arbeit untersuchten Reaktionstechnik der homogenkatalytischen Hydrierung, darüberhinaus wird die allgemeine Anwendbarkeit des Enzyms untersucht.

Zwei Möglichkeiten des Einsatzes der *PfH* sind zu unterscheiden, die die Eigenschaft des Enzyms zur Aktivierung von molekularem Wasserstoff ausnutzen:

1. Synthese von NADPH aus NADP^+ ,
2. reduktive Kofaktorregenerierung von NADPH.

Als Basis sowohl für die Synthese als auch die *in situ* Regenerierung muss die *PfH* kinetisch charakterisiert werden. Dies gilt für beide Einsatzgebiete, die sich vor allem durch den angestrebten Konzentrationsbereich unterscheiden. Dazu müssen zunächst die technischen Voraussetzungen geschaffen werden, um das Enzym unter inerten Bedingungen zu handhaben und kinetische Messungen durchzuführen. Die kommerziell verfügbaren Systeme sind zur Handhabung, Filtration und kinetischen Messung nicht geeignet.

Über die allgemeine Fragestellung der Anwendbarkeit des Enzyms zur reduktiven Generierung des reduzierten Kofaktors hinaus wird angestrebt, das Reaktionssystem als Modellsystem für die allgemeine Anwendbarkeit des Konzepts der membrangestützten Begasung mit Wasserstoff einzusetzen. Dabei steht die kontinuierliche Reaktionsführung im membranbegasteten EMR im Vordergrund.¹

Die kontinuierliche Synthese von NADPH ermöglicht dann durch die Kopplung mit anderen Enzymsystemen den allgemeinen Zugang zu anderen kofaktorabhängigen Reaktionen [248].

Die Anwendung in der Kofaktorregenerierung soll das starke und kostengünstige Reduktionsmittel Wasserstoff für die reduktive Biotransformationen mit NADPH-abhängigen Enzymen erschließen.

¹vergleiche Abschnitt 3.4 auf Seite 19

11. Reduktive Generierung

11.1. Thermodynamik

Die Reduktion von NADP^+ zu NADPH mit molekularem Wasserstoff (Abbildung 11.1 auf der nächsten Seite) ist eine Redoxreaktion, deren Gleichgewichtskonstante K_{PfH} –ausgedrückt durch die Konzentration der Reaktanden– sich wie folgt ergibt:

$$K_{PfH} = \frac{[\text{H}^+][\text{NADPH}]}{[\text{H}_2][\text{NADP}^+]} \quad (11.1)$$

Das Gleichgewicht liegt mit einer berechneten Gleichgewichtskonstante von $K_{PfH} = 1,1 \cdot 10^3$ stark auf Seiten der Produkte.¹ Weiterhin wird durch die Titration oder Pufferung des pH das entstehende Proton dem Gleichgewicht entzogen und die Konzentration auf niedrigem Niveau gehalten. Das Edukt Wasserstoff wird durch die Nachdosierung und das gekoppelte Gasphasengleichgewicht konstant gehalten, was zusätzlich das Gleichgewicht auf die Produktseite verschiebt. Bei der Reduktion von NAD^+ durch Formiat beträgt die Gleichgewichtskonstante $K_{FDH} = 0,42 \cdot 10^3$ [97].²

Der thermodynamisch mögliche Umsatz U der durch die PfH katalysierten Reduktion von NADP^+ mit NADPH ist näherungsweise quantitativ, wie man durch Einsetzen in

$$\begin{aligned} U &= \frac{1}{1 + K_{PfH}^{-1} \frac{H_{\text{H}_2}}{p_{\text{H}_2}} 10^{-\text{pH}} \text{ M}} \\ &= \frac{1}{1 + e^{\frac{\Delta G^0}{RT}} \frac{H_{\text{H}_2}}{p_{\text{H}_2}} 10^{-\text{pH}} \text{ M}} \end{aligned} \quad (11.2)$$

zeigen kann.³ Dabei können drei Faktoren als Triebkräfte der Reaktion identifiziert werden. Zum ersten ist der als konstant angenommene pH eine Triebkraft, da eins der Produkte ständig aus dem Gleichgewicht entfernt wird; zweitens ist die Wasserstoffkonzentration $[\text{H}_2] = \frac{p_{\text{H}_2}}{H_{\text{H}_2}}$ ebenfalls konstant, da bei konstantem Druck die Gasphase in einem gekoppelten Gleichgewicht dieses Edukt dem Gleichgewicht ständig nachliefert; und drittens ist die Reaktion bei „enzymverträglichen“ pH exergonisch, das heißt $\frac{\Delta G}{RT}$ ist negativ.

Haupttriebkraft der Reaktion ist dabei die pH-Pufferung, die die Konzentration des entstehenden Protons minimal werden lässt. Da diese letztendlich auf der Herstellung von Säuren und Laugen durch chemische und elektrochemische Methoden beruht, bei denen zum Teil

¹Für die ausführliche Diskussion und die durchgeführte Berechnung der Gleichgewichtskonstanten siehe Anhang A auf Seite 131.

²vergleiche Abschnitt 8.3.2 auf Seite 68 zum Einsatz der Formiatdehydrogenase (FDH) für die reduktive Kofaktorregenerierung.

³vergleiche Anhang A auf Seite 131 für die Herleitung

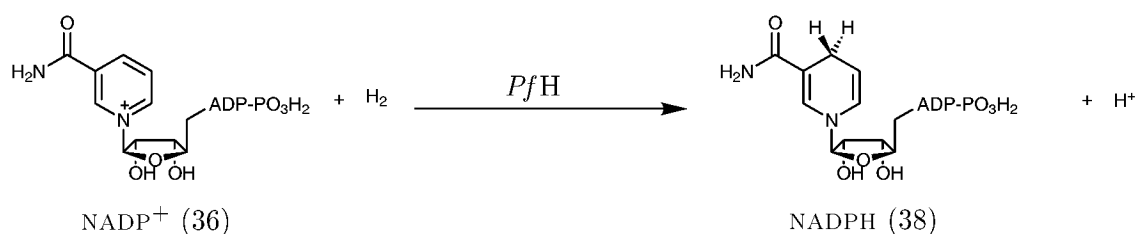


ABBILDUNG 11.1.: Reaktionsschema der von der *PfH* katalysierten Reduktion von NADP^+ zu NADPH mit molekularem Wasserstoff; es lässt sich zeigen, dass die Rückreaktion vernachlässigt werden kann.

auch Wasserstoff als Nebenprodukt anfällt, wird die Reaktion mittelbar durch die Generierung elektrischer Energie angetrieben.

Der thermodynamische Umsatz U ist unter physiologischen Bedingungen⁴ größer als 0,999999. Das heißt, für die Reduktion des Kofaktors kann die thermodynamische Gleichgewichtslage vernachlässigt werden, da diese quantitativ auf Seiten der Produkte liegt. Daher wird die Reaktion unter allen hier vorliegenden Bedingungen als irreversibel betrachtet.

11.2. Einfluss des Substrats NADP^+

*Das sind die Weisen,
die durch Irrtum zur Wahrheit reisen.
Die bei dem Irrtum verharren,
das sind die Narren.*
Friedrich Rückert, Vierzeiler

Um die Reaktion kinetisch zu charakterisieren, galt es zunächst, einen reproduzierbaren Test auf Aktivität des Enzyms zu etablieren. Dazu müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein:

- der Stofftransport von Wasserstoff aus der Gasphase darf nicht limitierend sein
- die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit soll ein Maß für die Aktivität des Enzyms darstellen
- die Reaktion sollte im Bereich 0.Ordnung –im Sättigungsbereich der Substratkonzentration $[\text{NADP}^+]$ – durchgeführt werden.

Um auszuschließen, dass der vorgelagerte Stofftransport der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wurde die lineare Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration $[\text{PfH}]$ überprüft.

Die spezifische Aktivität zeigte für einen großen Konzentrationsbereich eine Reaktion 1.Ordnung wie in der Abbildung 11.2 gezeigt ist, die auch linear zur eingesetzten Enzymkonzentration war. Es konnte also zunächst davon ausgegangen werden, dass ein Aktivitätstest möglich war, der nicht durch den vorgelagerten Phasentransfer limitiert war, sondern ein

⁴ $\theta = 25^\circ \text{C}$; $\text{pH} = 7$; $p_{\text{H}_2} = 1 \text{ bar}$

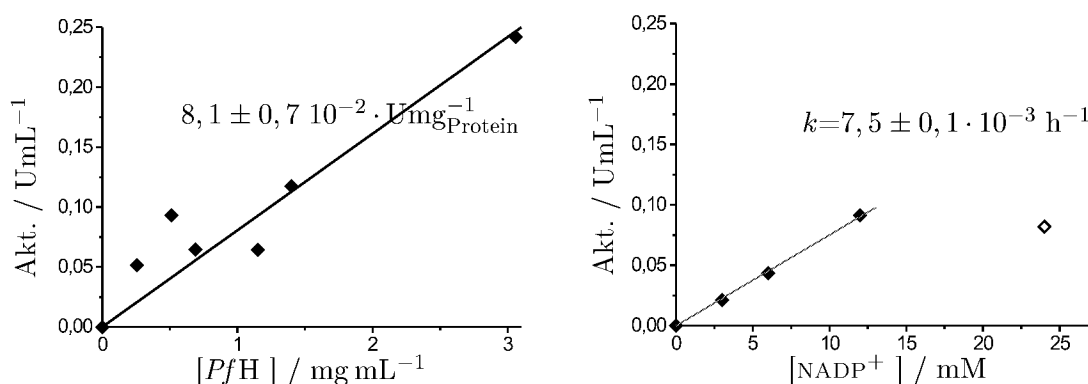


ABBILDUNG 11.2.: Die spezifische Aktivität zeigt für Konzentrationen $[\text{NADP}^+] \leq 12 \text{ mM}$ eine Reaktion erster Ordnung, die sich durch (11.3) beschreiben lässt. Der offene Punkt wurde für die lineare Regression nicht berücksichtigt. (pH=8; [EPPS]=0,20 M; $t=40^\circ\text{C}$; $p_{\text{H}_2}=1,1 \text{ bar}$)

Maß für die Enzymkonzentration darstellte. Es ergibt sich eine spezifische Aktivität von etwa $8 \cdot 10^{-2} \text{ U mg}^{-1}$. Für das Substrat NADP^+ ergibt sich für Konzentrationen bis 12 mM eine gute Korrelation unter der Annahme einer Reaktion erster Ordnung. Dieses Verhalten ist im Vergleich zu anderen Oxidoreduktasen ungewöhnlich, die Komplexbildungskonstanten dieser Enzyme für die Kofaktoren liegen im mikromolaren Bereich [252]. Dies deutet darauf hin, dass die NADP^+ -reduzierende Aktivität nicht die Funktion *in vivo* darstellt, sondern es sich um eine Nebenaktivität des Enzyms handelt.

Zunächst schien es möglich –ausgehend von diesen Experimenten– eine quantifizierbare Aussage über die katalytische Aktivität der PfH zu machen. Dass diese Ergebnisse trotz der relativ guten Korrelation keine Möglichkeit zur Bestimmung der Aktivität darstellen, zeigte sich im Verlauf der weiteren Untersuchungen, bei denen eine langsame Aktivierung des Enzyms festgestellt wurde.⁵

11.3. Temperatur

Vor dem Hintergrund der Aktivierung sind auch die von van den Ban [267] durchgeführten Experimente nur für die Bestimmung der Aktivierungsenergie anwendbar (Abbildung 11.3 auf der nächsten Seite).⁶ Der durch nichtlineare Regression ermittelte Wert von $E_A = 43 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$ liegt in der für Enzyme üblichen Größenordnung [252].

⁵vergleiche Abschnitt 11.5 auf Seite 83

⁶Es wurde auch eine andere Enzympräparation verwendet, so dass die spezifischen Aktivitäten nicht vergleichbar sind.

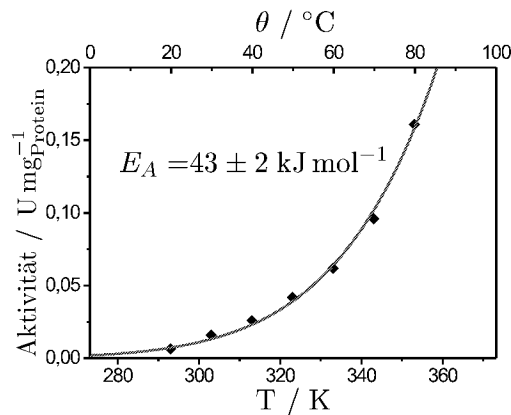


ABBILDUNG 11.3.: Temperaturabhängigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit von NADP^+ durch *PfH* durch molekularen Wasserstoff [267, 268].

11.4. Versuche im Satzreaktor⁷

Die Reduktion von NADP^+ mit molekularem Wasserstoff ist eine näherungsweise quantitativ ablaufende Reaktion, da das Gleichgewicht stark auf die Produktseite verschoben ist.⁸ Die Zersetzung von NADPH verläuft ebenfalls irreversibel.⁹ Man kann daher die Reaktionsfolge aus Reduktion von NADP^+ zu NADPH gemäß (8.3) und den anschließenden Zerfall als irreversible Folgereaktion beschreiben:



Diese Annahme ist durch die thermodynamische Gleichgewichtslage des ersten Schrittes gerechtfertigt. Die Zersetzung des gebildeten NADPH erfolgt über die oben diskutierten Mechanismen irreversibel zu den Zerfallsprodukten (Abbildung 9.2 auf Seite 72). Der typische Reaktionsverlauf des Produkts NADPH ergibt sich durch die Entstehung aus NADP^+ und dem anschließenden Zerfall zu den Folgeprodukten:

$$\frac{d[\text{NADP}^+]}{dt} = -k_R [\text{NADP}^+] = -k [\text{PfH}] [\text{NADP}^+] \quad (11.4)$$

$$\frac{d[\text{NADPH}]}{dt} = -k_Z [\text{NADPH}] + k_R [\text{NADP}^+] \quad . \quad (11.5)$$

Mit den Randbedingungen $[\text{NADPH}]_0 = 0$ und unter der Annahme, dass es sich bei beiden Reaktionen um irreversible Reaktionen erster Ordnung handelt, existieren für die

⁷Die praktischen Arbeiten wurden von Frau Dipl.-Chem. Rita Mertens im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt

⁸vergleiche Abschnitt 11.1 auf Seite 77 und Anhang A auf Seite 131

⁹vergleiche Kapitel 9 auf Seite 71

Konzentrations-Zeit-Verläufe geschlossenenene Lösungen [103, 166]:

$$(11.4) \Rightarrow \frac{[\text{NADP}^+]}{[\text{NADP}^+]_0} = e^{-k_R t} \quad (11.6)$$

$$(11.5) \Rightarrow \frac{[\text{NADPH}]}{[\text{NADP}^+]_0} = k_R \left(\frac{e^{-k_R t}}{k_Z - k_R} + \frac{e^{-k_Z t}}{k_R - k_Z} \right) , \quad (11.7)$$

wobei die Geschwindigkeitskonstanten der Bildungsreaktion k_R und der Zerfallsreaktion k_Z Zeitpunkt und maximale Ausbeute $\eta_{\max}$ festlegen. Durch Differenzieren nach der Zeit und zu Null setzen von (11.5) ergibt sich die maximale Konzentration des Produkts $[\text{NADPH}]_{\max}$ zum Zeitpunkt $t_{\max}$ des logarithmischen Mittels, ausgedrückt durch die Anfangskonzentration $[\text{NADP}^+]_0$ und die scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion k_R und des Zerfalls k_Z [166]:

$$t_{\max} = \frac{\ln \frac{k_Z}{k_R}}{k_Z - k_R} \quad (11.8)$$

$$\frac{[\text{NADPH}]_{\max}}{[\text{NADP}^+]_0} = \left(\frac{k_R}{k_Z} \right)^{\left(\frac{k_R}{k_Z - k_R} \right)} . \quad (11.9)$$

Es wurden Versuche in EPPS- und in Tris-Puffer durchgeführt. Die Verwendung von EPPS diente dazu, möglichst mit den vorherigen Untersuchungen [268] vergleichbare Bedingungen einzuhalten. Da dieser Puffer jedoch für die spätere Aufarbeitung problematisch ist, wurde alternativ das quartäre Ammoniumsalz Tris eingesetzt. Dies hat Vorteile bei einer Aufarbeitung von NADPH, denn durch das geringere Molekulargewicht ist Tris im Gegensatz zu EPPS durch Nanofiltration abtrennbar. Weiterhin kann ein Austausch des Gegenions –wie für EPPS nötig– entfallen, da NADPH als Tris-Salz kommerziell vertrieben wird [292].

Die Konzentration-Zeit-Verläufe der Versuche zeigen den typischen Verlauf einer Folgereaktion, bei der die Geschwindigkeitskonstante der Folgereaktion in der gleichen Größenordnung wie die der ersten Reaktion liegt (Abbildungen 11.4 auf der nächsten Seite und 11.5 auf der nächsten Seite).

Bei beiden Satzreaktorversuchen durchläuft die Produktkonzentration $[\text{NADPH}]$ ein Maximum und die in den Abbildungen nicht gezeigten Zerfallsprodukte nehmen im Verlauf der Reaktion zu. Die Eduktkonzentration $[\text{NADP}^+]$ zeigt eine gute Korrelation mit der Annahme der Reaktion erster Ordnung. Bei beiden Versuchen fällt jedoch auf, dass die gemessenen Konzentrationen zunächst alle größer als die simulierten Werte sind. Die Reaktion ist gegen Ende schneller als die Simulation vorhersagt. Diese langsame Beschleunigung ist ein Charakteristikum der durchgeführten Reaktionen, wie sich vor allem bei den repetitive batch Versuchen¹⁰ zeigen sollte.

Bei der Simulation der Produktkonzentration gibt es erhebliche Abweichungen. Zwar ist die Anpassung der Entstehung am Anfang gut, und korreliert dementsprechend mit der Abnahme des Edukts. Der Zeitpunkt der maximalen Produktkonzentration ist früher, und die maximale Produktkonzentration ist kleiner als erwartet. Das lässt sich durch eine schnellere Folgereaktion zu den Zerfallsprodukten erklären.

Führt man unter dieser Annahme eine nichtlineare Regression durch, bei der man nur die Geschwindigkeitskonstanten der Folgereaktion anpasst, so erhält man die Geschwindigkeitskonstanten k_Z^{fit} für die Reaktionsbedingungen. In der Tabelle 11.1 sind die Geschwindigkeitskonstanten für die jeweiligen Reaktionen aufgeführt.

¹⁰siehe Abschnitt 11.5

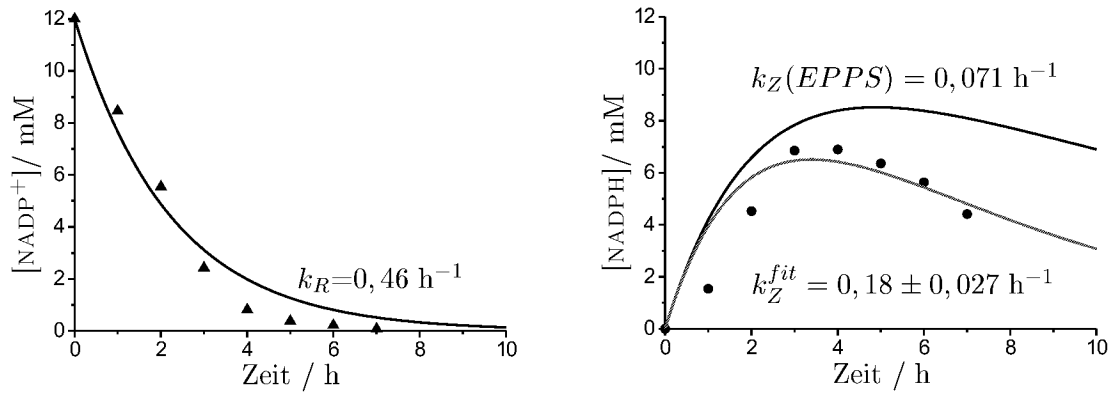


ABBILDUNG 11.4.: Konzentrations-Zeit-Verlauf für die *PfH*-katalysierte NADP⁺ Reduktion und Simulation der Experimente nach (11.6) beziehungsweise (11.7), die Anpassung von $k_Z^{fit} = 0,18 \pm 0,027 \text{ h}^{-1}$ unter der Annahme einer irreversiblen Folgereaktion nach (11.4) beziehungsweise (11.5)
(pH=8; [EPPS]=0,20 M; t=40 °C; [NADP⁺]₀=12 mM; $p_{H_2} = 1,1 \text{ bar}$)

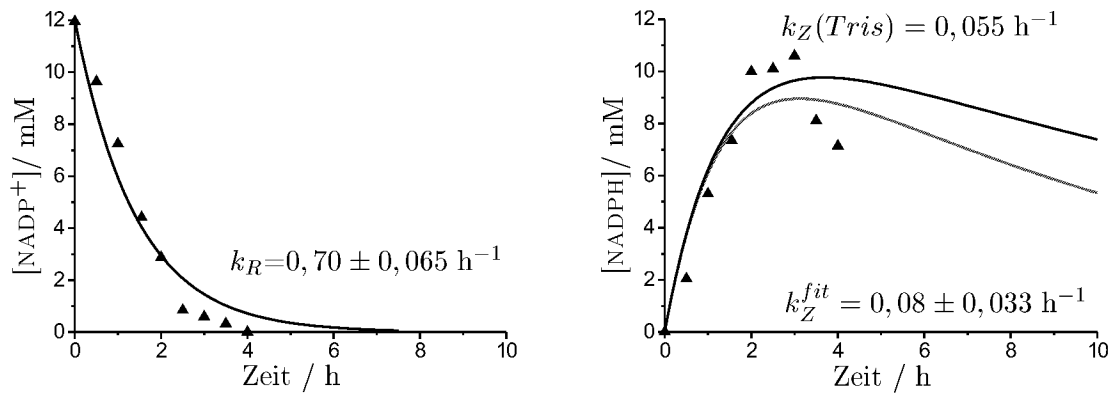


ABBILDUNG 11.5.: Konzentrations-Zeit-Verlauf für die *PfH*-katalysierte NADP⁺ Reduktion, die Anpassung von $k_Z^{fit} = 0,08 \pm 0,033 \text{ h}^{-1}$ unter der Annahme einer irreversiblen Folgereaktion gemäß (11.4)
(pH=8; [Tris]=0,20 M; θ =40 °C; [NADP⁺]₀=9,8 mM; $p_{H_2} = 1,1 \text{ bar}$)

TABELLE 11.1.: Geschwindigkeitskonstanten für die NADP^+ Reduktion

Parameter	EPPS	Tris	Einheit
k_R	0,46 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,065	h^{-1}
tof	3,3	5,1	10^3h^{-1}
k_Z	0,07 $\pm$ 0,002	0,055 $\pm$ 0,0014	h^{-1}
k_Z^{fit}	0,18 $\pm$ 0,027	0,08 $\pm$ 0,033	h^{-1}
ttn (PfH)	7,2	7,2	10^3

Die Zerfallsgeschwindigkeiten sind höher als die aus Zerfallsmessungen bestimmten Werte. Dementsprechend weicht die tatsächliche Konzentration $[\text{NADPH}]$ von der simulierten stark ab. Da die Zerfallsgeschwindigkeit im gewählten pH-Bereich sehr sensitiv ist, können auch kleine Schwankungen zu großen Änderungen bei der Zerfallsgeschwindigkeit führen.

Die Enzympräparation selbst enthält allerdings keine Anteile wie z.B. Phosphatasen. Dies wurde bei der Aufreinigung des Enzyms und durch unabhängige Stabilitätsuntersuchungen überprüft [268].

11.5. Durchführung als repetitive batch¹¹

Zum zehnten Mal wiederholt wird es gefallen.

Horaz

Enzyme sind katalytisch aktive Makromoleküle, die sich durch Ultrafiltration abtrennen lassen. Diese Eigenschaft kann man für die Rezyklierung des Enzyms nutzen, da die niedermolekularen Bestandteile der Lösung durch die Ultrafiltration nicht merklich zurückgehalten werden, und so die Lösung ausgetauscht werden kann. Die sich wiederholenden Schritte der Reaktionsführung sind dann Befüllung, Reaktion und Filtration (Abbildung 11.6 auf der nächsten Seite).

Für die Reaktion mit Wasserstoff wurde eine handelsübliche Ultrafiltrationszelle als Reaktionsgefäß für den Einsatz unter Sauerstoffausschluss umgebaut. In dieser Zelle ist die Filtration und Befüllung der Zelle unter Inertbedingungen möglich, und die Reaktion wird unter Wasserstoff-Atmosphäre durchgeführt. Die sonst angewendete Technik der Überströmung mit Gas¹² führt zu beträchtlichem Verlust an Flüssigkeit und so zu unerwünschten Effekten durch Konzentrationserhöhungen. Die Messungen wurden durch das geschlossene System besser reproduzierbar. Weiterhin konnten so höhere Drücke eingesetzt werden.

Es konnten zwei Serien von repetitive batch Läufen unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Lediglich die Drücke wurden variiert, wie in der Auftragung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Abbildung 11.8 auf Seite 85 gezeigt ist. Bei allen Läufen wurden quantitative Umsätze erzielt, wohingegen die maximalen Ausbeuten beziehungsweise maximalen Selektivitäten von Lauf zu Lauf unterschiedlich waren (Abbildung 11.7 auf der nächsten Seite). Dies hängt unter anderem damit zusammen, dass die Aktivität der Hydrogenase sich im Laufe der Reaktion veränderte. Die möglichen Ursachen dafür werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

¹¹Die praktischen Arbeiten wurden von Frau Dipl.-Chem. Rita Mertens im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt

¹²Etwas despektierlich auch als „Durchblubbern“ bezeichnet.

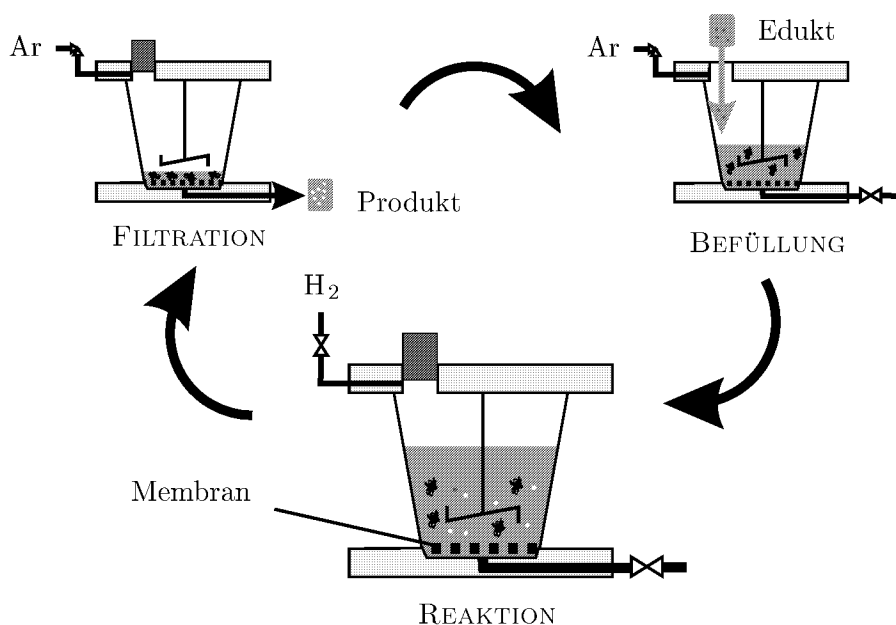


ABBILDUNG 11.6.: Prinzip der Reaktionsführung beim repetitive batch mit Rezyklisierung des Enzyms unter inerten Bedingungen

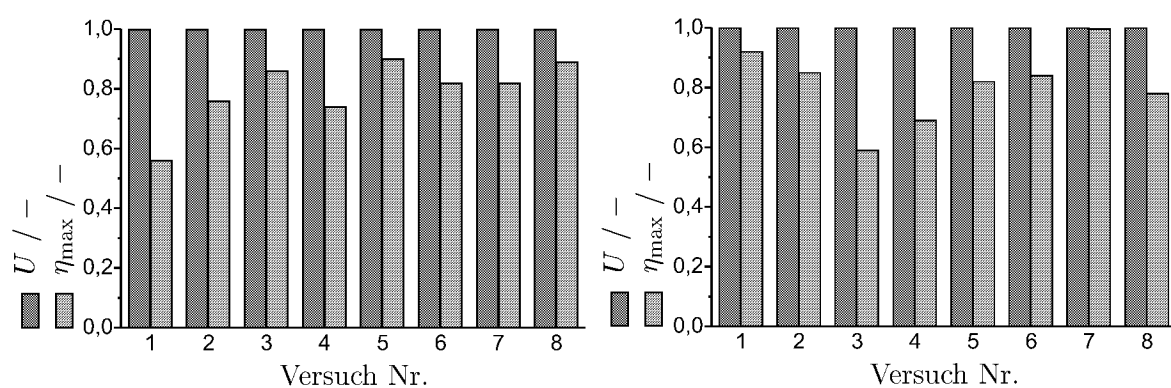


ABBILDUNG 11.7.: Erreichte Umsätze U bezogen auf NADP^+ und maximale Ausbeuten $\eta_{\max}$ für NADPH in zwei repetitiven batch-Versuchsreihen mit Rezyklisierung des Enzyms durch Membranfiltration.

($\theta = 40^\circ\text{C}$; $[\text{EPPS}] = 0,20\text{ M}$; $[\text{PfH}]_0 = 1,0\text{ mg mL}^{-1}$; $[\text{NADP}^+]_0 = 12\text{ mM}$; $\text{pH} = 8$; p_{H_2} siehe Abbildung 11.8 auf der nächsten Seite)

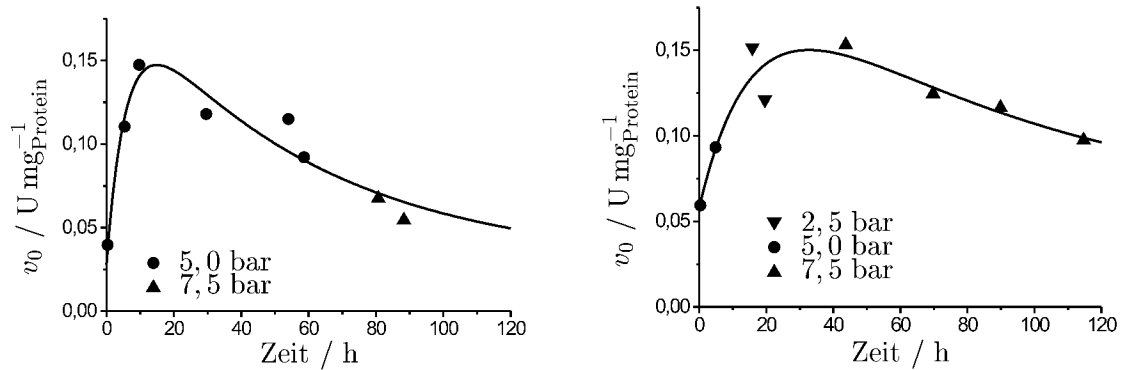


ABBILDUNG 11.8.: Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten v_0 als Funktion der Zeit für zwei repetitive batch Versuchsreihen. Die Anpassung erfolgt unter der Annahme, dass es sich um eine irreversible Folgereaktion handelt. Die Anpassung gelingt mit den Parametersätzen der Tabelle 11.2.

($\theta = 40^\circ \text{C}$; $[\text{EPPS}] = 0,20 \text{ M}$; $[\text{PfH}] = 1,02 \text{ mg mL}^{-1}$; $[\text{NADP}^+]_0 = 12 \text{ mM}$; $\text{pH} = 8$)

11.5.1. Aktivierung

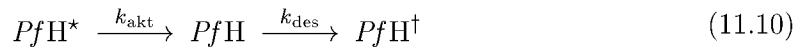
Whatever regrets may be, we have done our best.

Sir Ernest H. Shackleton,

bei der Umkehr am 9. Januar 1909 bei $88^\circ 23' \text{ Süd}$

Die Aktivität der *PfH* zeigt einen ausgeprägten Verlauf über den Zeitraum beider repetitive batch Serien. Die Auftragung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Abbildung 11.8 zeigt zwei gegenläufige Effekte. Zunächst nimmt die Aktivität zu, um dann nach Durchlaufen eines Maximums abzunehmen. Zu Beginn überwiegt eine Aktivierung, wohingegen der weitere Verlauf durch Desaktivierung des Enzyms bestimmt wird.

Um dies zu beschreiben, kann man annehmen, dass die Aktivierung einer für die NADP^+ -Reduktion inaktiven Enzymspezies PfH^* irreversibel verläuft. Die Redoxprozesse, die zu verschiedenen Zuständen des Enzyms führen und die sich durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR-Spektroskopie) unterscheiden lassen, sind in der Literatur zwar als reversibel beschrieben [240], aber es ist ungeklärt, inwiefern ein Zustand einer bestimmten Aktivität zugeordnet werden kann [42, 240]. Eine irreversible Aktivierung ist die einfachste mögliche Annahme, die sich im folgenden durch die relativ gute Beschreibung der gemessenen Daten bestätigt. Die Desaktivierung der aktiven *PfH* zu einer inaktiven Spezies $\text{PfH}^\dagger$ verläuft vermutlich ebenfalls irreversibel. Das sich daraus ergebende Reaktionsschema



mit der Aktivierungskonstante k_{akt} und der Desaktivierungskonstante k_{des} hat formale Ähnlichkeit mit der Betrachtung der irreversiblen Folgereaktion (11.3) auf Seite 80. Bei der Anpassung an die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der repetitive batch Versuchsreihen der Abbildung 11.7 auf der vorherigen Seite ist allerdings zu beachten, dass die Anfangskonzentration $[\text{PfH}]_0$ größer als null ist.¹³ Das ist der Fall, da in allen hier gezeigten Experimenten

¹³Aus Gründen der Anschaulichkeit wurde angenommen, dass zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ bereits Aktivität $[\text{PfH}]_0$

TABELLE 11.2.: Parameter des zeitabhängigen Aktivität der *PfH* bei den repetitive batch Versuchsreihen aus Abbildung 11.8 nach (11.11)

Parameter	1.Serie	2.Serie	Einheit
k_{akt}	17,1 $\pm$ 7,8	6,0 $\pm$ 4,3	10^{-2} h^{-1}
k_{des}	1,7 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,1	10^{-2} h^{-1}
$[PfH^*]_0$	15,5 $\pm$ 3,0	14,0 $\pm$ 5,6	$10^{-2} \text{ U mg}^{-1}$
$[PfH]_0$	2,8 $\pm$ 1,6	5,8 $\pm$ 1,4	$10^{-2} \text{ U mg}^{-1}$
$\sum [PfH]$	18,3 $\pm$ 4,6	19,8 $\pm$ 7,0	$10^{-2} \text{ U mg}^{-1}$
t_{max}	15,0	32,5	h
$[PfH]_{\text{max}}$	14,8	15,0	$10^{-2} \text{ U mg}^{-1}$

die *PfH* vor dem Einsatz bei 80 °C unter Wasserstoff-Atmosphäre aktiviert wurde. Die Dauer und Temperatur dieser Reduktion geht dabei auf Erfahrungen mit der Aktivität bei der Methylviologen-Reduktion zurück [272], und wurde für die hier gezeigten Arbeiten übernommen.

Für die irreversible Folgereaktion (11.10) erhält man analog der Herleitung von (11.7) den geschlossenen Ausdruck für die Konzentration beziehungsweise Aktivität der Hydrogenase:

$$[PfH] = [PfH]_0 + [PfH^*]_0 k_{\text{akt}} \left(\frac{e^{-k_{\text{akt}} t}}{k_{\text{des}} - k_{\text{akt}}} + \frac{e^{-k_{\text{des}} t}}{k_{\text{akt}} - k_{\text{des}}} \right) \quad (11.11)$$

mit dem Zeitpunkt der maximalen Aktivität

$$t_{\text{max}} = \frac{\ln \frac{k_{\text{des}}}{k_{\text{akt}}}}{k_{\text{des}} - k_{\text{akt}}} \quad (11.8)$$

und der maximalen Aktivität

$$[PfH]_{\text{max}} = [PfH]_0 + [PfH^*]_0 k_{\text{des}}^{\frac{k_{\text{des}}}{k_{\text{des}} - k_{\text{akt}}}} k_{\text{akt}}^{\frac{k_{\text{des}}}{k_{\text{akt}} - k_{\text{des}}}} \quad (11.12)$$

Passt man die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten v_0 der enzymatischen Reduktion von NADP^+ der aufeinander folgenden Experimente des repetitive batch mit nicht-linearer Regression an, so erhält man für zwei durchgeführte Versuchsreihen angepasste Parameter (Tabelle 11.2). Die Auftragung der angepassten Werte an die beiden Versuchsreihen zeigt Abbildung 11.8 auf der vorherigen Seite. Die Werte v_0 der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zeigen einen Verlauf, den man nach einer Folgereaktion erwartet. Der Vergleich der beiden Versuchsreihen macht die schlechte Reproduzierbarkeit der Einzelversuche deutlich, und zeigt, warum die Anpassung beider Serien mit nur einem Parametersatz nicht sinnvoll ist.

Die Anpassung liefert für beide Versuchsreihen eine im Rahmen des Fehlers vergleichbar große Gesamtkonzentration $\sum [PfH] = [PfH]^* + [PfH]_0$ von $18,3 \cdot 10^{-2} \text{ U mg}^{-1}$ beziehungsweise $19,8 \cdot 10^{-2} \text{ U mg}^{-1}$. Diese Summe ist die theoretische mögliche Aktivität der *PfH*, die in beiden Versuchsreihen nicht erreicht wird. Dies bedeutet, dass trotz der großen Abweichung der kinetischen Parameter für Aktivierung und Desaktivierung eine vergleichbare

vorhanden ist, die dann als Parameter für die nichtlineare Regression freigegeben wurde. Alternativ kann auch der Zeitpunkt t_0 angepasst werden, dabei geht jedoch die Anschaulichkeit der Basisaktivität $[PfH]_0$ verloren. Die Angabe eines imaginären Zeitpunktes –der ein negatives Vorzeichen aufweisen würde– kommt einer Rückdatierung gleich.

Enzymkonzentration zugrunde liegt, deren theoretische Aktivität dem Wert $\sum[PfH]$ entspricht.

Trotz der relativ großen Fehler der angepassten Parameter zeigt sich, dass die Desaktivierung k_{des} für beide Versuche etwa gleich groß ist. Die Geschwindigkeit der Aktivierung und die Anfangsaktivität $[PfH]_0$ unterscheiden sich jedoch stark. Dies ist insofern bemerkenswert, als das beide Versuchsreihen unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wurden. Es muss also mindestens einen Parameter geben, der für die beiden Versuchsreihen jeweils eine so starke Veränderung bewirkt, und der nicht kontrolliert wurde.

Diese Ergebnisse stellen die Ergebnisse zur Kinetik in Frage, die im Satzreaktor erzielt wurden.¹⁴ Wenn bei allen durchgeführten Experimenten eine derart starke und langsame Aktivierung vorliegt, dann ist dort keine Korrelation von Enzymaktivität und -konzentration möglich, und es können keine quantifizierbaren und reproduzierbaren Aussagen über den Einfluss von anderen Größen gemacht werden, solange die Ursache für die Aktivierung nicht geklärt und –wenn möglich– quantifiziert ist.

Für Hydrogenasen aus anderen Quellen sind ebenfalls Aktivierungsphänomene beschrieben worden. Allerdings sind die Geschwindigkeitskonstanten der Aktivierung um Größenordnungen schneller als das hier beobachtete Phänomen, z.B. für die Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus* Z1 mit $2,0 \text{ s}^{-1} = 7,2 \cdot 10^3 \text{ h}^{-1}$ (pH = 7,8; 25 °C) [207, 208]. Als Gründe für die langsame Aktivierung kommen verschiedene Ursachen in Frage:

- Reduktion – Eine langsame Reduktion aktiver Zentren durch Wasserstoff oder durch den reduzierten Kofaktor.
- Strukturelle Änderungen, die für regulatorische Effekte verantwortlich gemacht werden [106, 107, 171, 182, 210]:
 - Oligomerisierung – Die Ausbildung beziehungsweise Rückbildung aktiver Oligomere der Untereinheiten wird für andere Hydrogenasen diskutiert [182, 210].
 - Allosterische Veränderung durch NADP^+ , Wasserstoff oder NADPH; diese können auch durch den Pufferwechsel bedingt sein.
 - Änderung in der Quartärstruktur – Für Enzyme aus thermophilen Organismen ist die temperaturabhängige Anpassung der Quartärstruktur beschrieben [244], die unterschiedliche katalytische Aktivitäten aufweisen. Allerdings sind auch hier die beschriebenen Vorgänge sehr viel schneller.
- Adsorption auf Oberflächen – Diese wurde bei den cyclovoltammetrischen Messungen¹⁵ nach der Aktivierung mit Wasserstoff beobachtet. Diese ist trotz der Vorbelegung der Oberflächen nicht auszuschließen.
- Photochemische Aktivierung – Die Redoxaktivität der *PfH* ist photochemisch nutzbar [234], daher könnte eine photochemische Aktivierung von Metallozentren des Enzyms eine Rolle spielen.
- Ionenaustausch – Der Austausch oder Verlust von chelatisierten Ionen kann die Aktivität des membranständigen Proteins verändern [252].

¹⁴vergleiche 11.4 auf Seite 80

¹⁵Abschnitt 13.2 auf Seite 106

- Wechselwirkungen mit anderen Proteinen – Weitere Bestandteile der verwendeten Enzympräparation können regulatorische Wirkung haben, da auch andere Enzyme am Wasserstoff-Stoffwechsel von *Pf* beteiligt sind [178, 239].

Die genauen Ursachen sind unklar. Vor allem vor dem Hintergrund der kleinen Geschwindigkeitskonstanten der Aktivierung, die in der Größenordnung der Desaktivierung ist, bleibt die Frage, ob andere Möglichkeiten der Aktivitätsbestimmung gefunden werden können. Dies müssen weitere Arbeiten zeigen.

Obwohl sich die Zerfallsprodukte von NADPH ab dem zweiten Lauf vorhanden sind,¹⁶ tritt eine übermäßige Inhibierung durch die Zersetzung des thermolabilen Produkts nicht auf. Dies ist insofern bemerkenswert, weil die Filtrationszelle zwischen den Läufen nicht gespült wurde, um eine Kontamination mit Sauerstoff gering zu halten, daher waren Zerfallsprodukte ab dem zweiten Lauf immer vorhanden.

11.6. Kontinuierliche Synthese von NADPH

11.6.1. Volumenbegaster EMR

Für die kontinuierliche Reduktion von NADPH wurde ein Reaktor aufgebaut, der auch für die Reduktion des Zimtsäurederivats **8** mit einem chemischen Katalysator eingesetzt wurde¹⁷. Das Fließschema des Reaktors ist in der Abbildung 3.7 auf Seite 20 gezeigt. Zur Ultrafiltration wurde ein gegenüber vorherigen Arbeiten [94, 163] modifizierter Membranreaktor eingesetzt, dessen Aufbau in Abschnitt 3.4 auf Seite 19 beschrieben ist.

Ein Versuch zur kontinuierlichen Volumenbegasung wurde durchgeführt (Abbildung 11.9 auf der nächsten Seite). Die Abbildung zeigt zum einen die quantifizierbaren Proben, zum überwiegenden Teil war dies jedoch nicht möglich,¹⁸ für diese Proben ist die relative Konzentrationen = $[\text{NADPH}]/([\text{NADPH}] + [\text{NADP}^+])$ aufgetragen. Zum anderen ist der Verlauf der UV-Intensitätsverhältnisse im Auslauf des Reaktors gezeigt. Ausgewählt sind jeweils das Intensitätsverhältnis der Wellenlängen 340 nm/254 nm, das größer wird, je mehr NADPH in der Lösung ist, und das Verhältnis 254 nm/300 nm, das kleiner wird je höher die NADPH-Konzentration im Auslauf ist.¹⁹

Zunächst wurde eine Verweilzeit von $\tau = 2$ h eingestellt. Damit Wasserstoff im Überschuss vorhanden war wurde der Differenzdruck so gewählt, dass pro Verweilzeit 0,4 mmol dosiert wurden; dies entspricht einer Einlaufkonzentration von 16 mM.²⁰ Bei einem Flüssigdruck von 5 bar bleibt der Überschuss in der flüssigen Phase gelöst. Diese Einstellungen ergab fast quantitative Umsätze bei hoher Selektivität und Ausbeuten von mehr als 0,90. Um die Selektivität zu steigern, wurde die Verweilzeit durch Erhöhung des Flusses auf $\tau = 1,5$ h verkürzt, um die Zerfallsreaktion als Folgereaktion zu diskriminieren. Der folgende Rückgang des Umsatzes konnte durch die Erhöhung des Wasserstoffdrucks in der Schlauchmembran teilweise kom-

¹⁶Die Zelle wurde zwischen den Läufen nicht gespült, um eine Kontamination mit Sauerstoff gering zu halten

¹⁷Jedoch mit weniger großem Erfolg wie sich im Abschnitt 7 auf Seite 55 nachlesen lässt.

¹⁸Aufgrund analytischer Probleme des internen Standards war eine Quantifizierung der Proben nicht möglich.

¹⁹Es wurde auch die Intensität bei 340 nm verfolgt, allerdings ist der Verlauf durch die Intensitätsschwächung der UV-Lampe überlagert, die bei einer Versuchszeit in der Größenordnung der mittleren Lebensdauer der Lichtquelle nicht zu vermeiden ist. Aus diesen Gründen ist auch keine Quantifizierung der UV-Messung möglich.

²⁰vergleiche Abschnitt 3.3 auf Seite 15

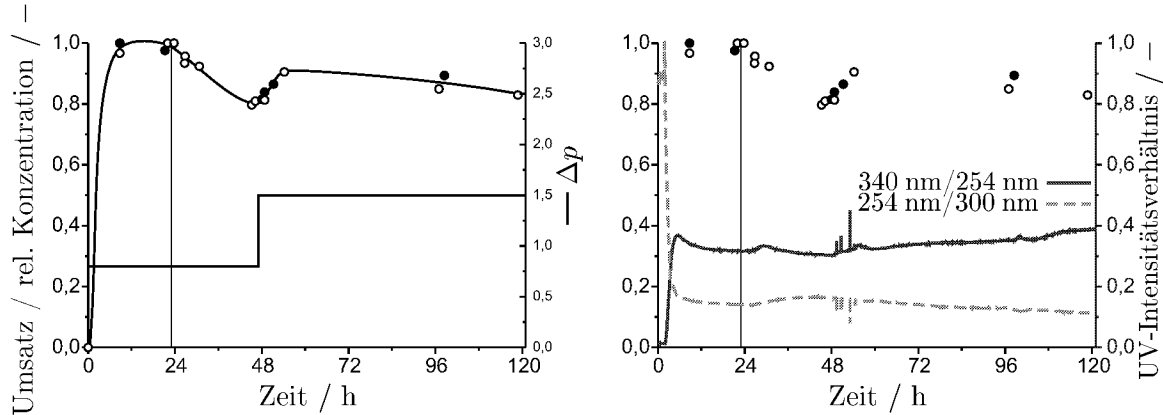


ABBILDUNG 11.9.: Verlauf der kontinuierlichen NADPH-Synthese im volumenbegasteten EMR. Geschlossene Kreise sind die quantifizierbaren Umsatzproben (siehe Text). Der senkrechte Strich bezeichnet den Zeitpunkt der Verkürzung der Verweilzeit. Links: relative Konzentration in Abhängigkeit der Zeit mit Hilfslinie; rechts: UV-Intensitätsverhältnisse im Auslauf ($[\text{NADP}^+]_{\text{Ein}} = 12 \text{ mM}$; $\theta = 40^\circ \text{C}$; $\tau = 2 \text{ h}$ ab 23 h $\tau = 1,5 \text{ h}$; $p_{\text{flüssig}} = 5 \text{ bar}$; $p_{\text{H}_2} = 5,8 \text{ bar}$ beziehungsweise $p_{\text{H}_2} = 6,5 \text{ bar}$)

pensiert werden.²¹ Die Einlaufkonzentration H_2 wird dadurch theoretisch auf 22 mM erhöht, womit eine Limitierung durch den Wasserstoffeintrag ausgeschlossen werden kann. Danach stabilisierte sich der Betriebspunkt, um langsam im Verlauf von 50 h zu sinken. Obwohl der Phosphatpuffer im Einlauf auf $\text{pH} = 8$ eingestellt war, sank der pH im Auslauf auf Werte unter $\text{pH} = 7$ ab. Niedrigere pH -Werte sind aber für die Stabilität des reduzierten Kofaktors NADPH nachteilig.²² Daher sinkt die Selektivität mit dem pH , weil die Folgereaktion des Zerfalls von reduziertem Kofaktor an Bedeutung gewinnt²³.

Das kontinuierliche Experiment wurde abgebrochen, als beim Versuch den pH des Einlaufs auf 9 zu erhöhen, der Umsatz innerhalb weniger Verweilzeiten schnell absank. Auch durch Zugabe von PfH konnte keine Stabilisierung des Betriebspunktes erreicht werden. Mögliche Ursache ist eine Destabilisierung des Enzyms bei höheren pH -Werten.

Es zeigt sich, dass der kontinuierliche Einsatz im volumenbegasteten Enzym-Membran-Reaktor über eine Zeit von mehr als 120 h mit Ausbeuten im Bereich von mehr als $0,85$ möglich ist. Die Raum-Zeit-Ausbeute (STY) beträgt $130 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei einer Ausbeute von $0,90$. Die PfH erreicht eine absolute Zyklenzahl von $\text{ttn} \geq 66 \cdot 10^3$, unter der Annahme, dass es sich bei der eingesetzten Präparation um reine Hydrogenase handelt.

²¹Die dosierte Menge von $0,3 \text{ mmol H}_2$ pro Verweilzeit beziehungsweise die Einlaufkonzentration von 12 mM sollten zwar theoretisch ausreichen, aber aufgrund der kleinen Abmessungen wirkt sich hier der Fehler der Oberflächenbestimmung der Membran aus.

²²vergleiche Abschnitt 9.1 auf Seite 71

²³beziehungsweise k_Z für (11.3), S.80 mit kleinerem pH größer wird

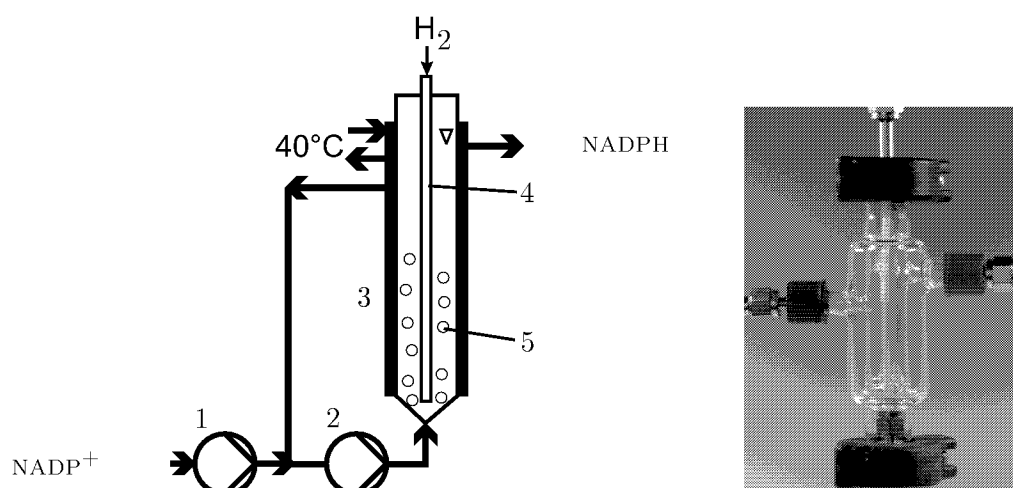


ABBILDUNG 11.10.: Fließschema des Wirbelschichtreaktors mit Immobilisierung der *PfH* auf Trägern (links) und Foto des Reaktorbetts mit PTFE-Membran.
(1:Dosierpumpe mit Massenflussmesser; 2:Umlaufpumpe; 3:Reaktorbett mit Thermostatisierung; 4:PTFE-Membran; 5:Träger)

11.6.2. Wirbelschichtreaktor

11.6.2.1. Immobilisierung der Hydrogenase auf Glasträgern

Bei den elektrochemischen Untersuchungen²⁴ wurde eine Beobachtung gemacht, die der Ausgangspunkt für die Versuche zur Immobilisierung wurden. Die Untersuchung mittels cyclischer Voltammetrie zeigten, dass die Hydrogenase eine Affinität zu Oberflächen zeigt. Um diese Eigenschaft zu nutzen und das Ausmaß der Retention zu quantifizieren, wurde ein modifizierter Umlaufreaktor analog einem Wirbelschichtreaktor aus der Zellkulturtechnik aufgebaut [172, 194]. In diesem System zur Kultivierung tierischer Zellen wurde auch erfolgreich über eine Membran, allerdings mit Sauerstoff, begast. Gegenüber den Reaktoren der Zellkultur musste ein Reaktor für die enzymatische Hydrierung anderen Anforderungen gerecht werden. Die Einhaltung von sauerstofffreien Bedingungen stand an oberster Stelle. Das eigentliche Fließbett wurde aus Glas gefertigt, und mittels Flanschverbindungen, die sich als flexible, gasdichte Verbindungen von Glas auf Metall bewährt hatten, eingesetzt (Abbildung 11.10).

Weiterhin war bekannt, dass die *PfH* durch Silikonmembranen deaktiviert wird,²⁵ wohingegen Stahl und PTFE keinen negativen Einfluss haben [266]. Vermutlich ist die Adsorption besonders bei polaren oder polarisierten Oberflächen zu beobachten. Daher wurde als Membranmaterial PTFE gewählt bei dem keine Adsorption auf der Begasungsmembran zu erwarten war. Der Auslauf des Reaktors wurde mit Argon gespült, um eine Kontamination mit Sauerstoff auszuschließen.

Der CSTR beziehungsweise der kontinuierliche Wirbelschichtreaktor wurde gewählt, weil darin die Effekte der Desaktivierung und des Ausspülen am besten sichtbar werden. Der Auslauf des CSTR gibt aufgrund der zum Reaktorvolumen identischen Konzentration ein

²⁴vergleiche Abschnitt 13.2 auf Seite 106

²⁵Vermutlich handelt es sich auch um einen Adsorptionseffekt, da bei diesen Versuchen die Aktivität im Überstand bestimmt wurde.

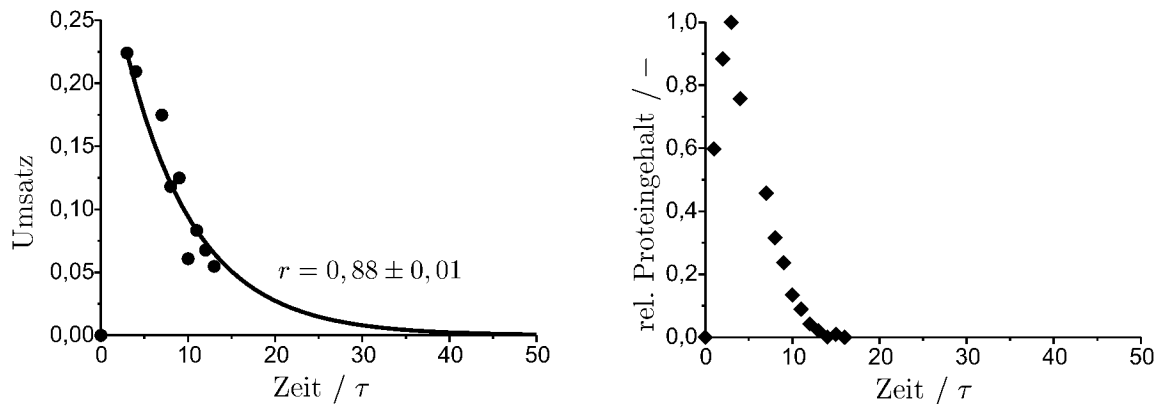


ABBILDUNG 11.11.: Verlauf der kontinuierlichen NADPH-Synthese im volumenbegasteten Umlaufreaktor mit auf Glaträgern immobilisierter *PfH*. Links der Umsatz bezogen auf NADP^+ , rechts der relative Proteingehalt im Auslauf bezogen auf die maximale Konzentration. Die durchgezogene Linie entspricht einer Retention von $r = 0,88 \pm 0,01$.

($[\text{NADP}^+]_{\text{Ein}} = 12 \text{ mM}$; $[\text{KPi}] = 100 \text{ mM}$; $\text{pH} = 8$; $\theta = 40 \text{ }^\circ\text{C}$; $\tau = 2 \text{ h}$; $p_{\text{H}_2} = 4 \text{ bar}$)

differentielles Abbild der Aktivität bei niedrigen Umsätzen. Weiterhin lassen sich Retention und die Abhängigkeit des Umsatzes beziehungsweise der Ausbeute von der Katalysatorkonzentration im CSTR leichter interpretieren und visualisieren. Durch die Durchmischung ist gewährleistet, dass im zeitlichen Mittel kein Konzentrationsgradient aufgebaut wird. In einem statischen Festbett würde dies zu Problemen führen [156, 172]. Der Aufbau mit Wirbelschichtbett umgeht daher Probleme, die durch die Einführung einer dritten Phase (Gas) zusätzlich zum heterogenen Trägermaterial und der flüssigen Phase entstehen.

Es wurde eine relativ hohe Einlaufkonzentration von $[\text{NADP}^+] = 10 \text{ mM}$ gewählt, damit der Betriebspunkt sensitiv auf Veränderungen der Aktivität reagiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von unter Wasserstoff-Atmosphäre aktivierter *PfH* über die Dosierpumpe gestartet. Der zeitliche Verlauf des NADP^+ -Umsatzes und der relativen Konzentration von Protein ist in Abbildung 11.11 dargestellt.

Der Zufluss wurde so geregelt, dass sich eine Verweilzeit von $\tau = 2 \text{ h}$ einstellte. Es zeigte sich, dass sich der Umsatz innerhalb von etwa 10 Verweilzeiten halbierte. Dies korreliert mit der Ausspülung von Protein, die bei nicht linearer Anpassung auf den relativ höchsten Umsatzwert ab der dritten Verweilzeit eine Retention von $r = 0,88 \pm 0,01$ ergibt.

Die Retention reicht für eine Immobilisierung nicht aus, da ein Verlust von 12% Aktivität pro Verweilzeit selbst beim Einsatz im repetitive batch nicht akzeptabel ist. Für eine kontinuierliche Prozessführung im CSTR ist die erreichte Retention viel zu gering. Allerdings zeigt der Versuch, dass eine Immobilisierung auf einem festem Träger prinzipiell möglich ist. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivität ausschließlich durch die in Lösung befindliche *PfH* bedingt ist, allerdings ist dies zusammen mit den Ergebnissen der cyclischen Voltammetrie unwahrscheinlich, da dort das Überschneiden des Reduktions- und Oxidations-Strom-Verlaufs für die Adsorption beziehungsweise Abscheidung einer redoxaktiven Spezies auf der Oberfläche spricht.²⁶

Die Phase bis zum Erreichen der maximalen Proteinkonzentration ist durch die Verweilzeit-

²⁶ vergleiche Abschnitt 13.2 auf Seite 106

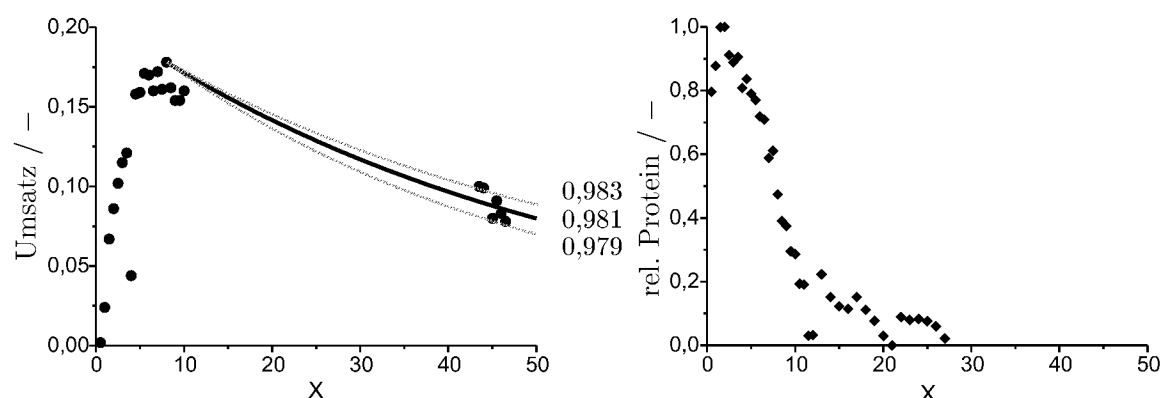


ABBILDUNG 11.12.: Zeitverlauf der kontinuierlichen NADPH-Synthese im volumenbegasteten Umlaufreaktor mit auf Graphitträgern immobilisierter *PfH*. Rechts der relative Proteingehalt im Auslauf bezogen auf die maximale Konzentration. Die durchgezogene Linie gibt die angepasste Retention von $r = 0,981 \pm 0,002$ wieder.

($[\text{NADP}^+]_{\text{Ein}} = 12 \text{ mM}$; $[\text{KPi}] = 100 \text{ mM}$; $\text{pH} = 8$; $\theta = 40^\circ \text{C}$; $\tau = 2 \text{ h}$; $p_{\text{H}_2} = 4 \text{ bar}$)

verteilung in der Dosierstrecke aus Massenflussmesser und Wechselkolbenpumpe bedingt,²⁷ zusätzlich kommt es in der Dosierstrecke sicherlich ebenfalls zu Adsorption. Die Verweilzeitverteilung in der Dosierstrecke konnte schon bei der Verwendung für den chemischen Membranreaktor festgestellt werden [163, S.86].

11.6.2.2. Immobilisierung auf Graphit

Unter den gleichen Bedingungen wie oben für die porösen Glaträger wurde versucht die *PfH* auf sphärischen Graphitträgern zu immobilisieren. Dies folgte ebenfalls aus der Beobachtung bei den cyclovoltammetrischen Experimenten. Da die Abscheidung auf der Elektrodenoberfläche aus Glaskohlenstoff erfolgte, wurde Graphit als mögliches Trägermaterial ausgewählt.²⁸ Der Umsatz-Zeitverlauf ist in der Abbildung 11.12 gezeigt.

Es zeigte sich, dass die *PfH* eine höhere Affinität zu Graphit aufweist, als zu Glas. Die Retention, die sich aus dem abfallenden Umsatz ergibt, beträgt $r = 0,98 \pm 0,002$ und ist in der Größenordnung der Desaktivierung, so dass die tatsächliche Retention größer sein sollte. Auch zeigt sich die selektive Proteinrückhaltung, denn während die Proteinkonzentration im Auslauf nach 30 Verweilzeiten bis unter die Nachweisgrenze sank, verminderte sich der Umsatz auch nach 50 Verweilzeiten noch nicht auf die Hälfte des Ausgangsniveaus.

11.7. Zusammenfassung: NADPH-Produktion

- Bei der reduktiven Darstellung von NADPH aus NADP^+ mit molekularem Wasserstoff und der Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* (*PfH*) wurde im volumenbegasteten EMR eine $\text{ttn} \geq 66 \cdot 10^3$ erreicht, eine Steigerung um Faktor 9 gegenüber der Synthese im Satzreaktor.

²⁷Das Gesamtvolumen der Dosierstrecke ist etwa um den Faktor zwei größer als das Reaktorvolumen.

²⁸Die Immobilisierung auf der chemisch nah verwandten Aktivkohle ist die erste Immobilisierung von Enzymen (Invertase) überhaupt [156, 190].

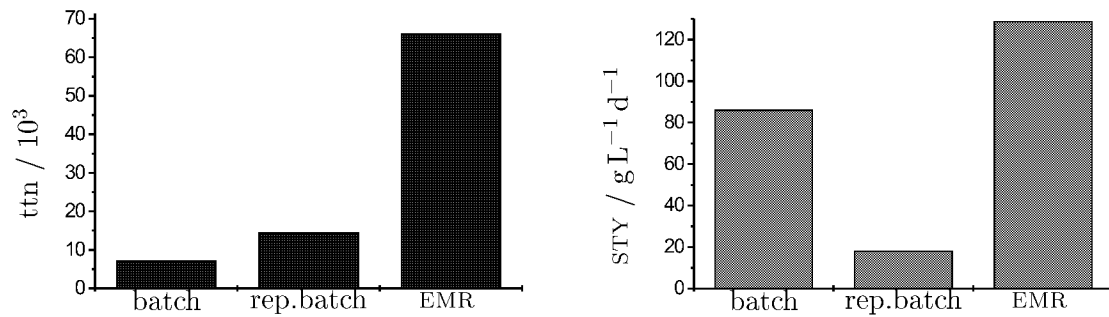


ABBILDUNG 11.13.: Vergleich der ttn und Raum-Zeit-Ausbeuten (STY) der NADPH-Synthese für die besten Versuche im Satzreaktor (batch), repetitive batch und volumenbegastem EMR.

- Die maximale Raum-Zeit-Ausbeute beträgt $130 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und wurde ebenfalls im volumenbegasteten EMR erzielt.
- Die Aktivität der *PfH* zeigt im Verlauf der repetitive batch Serie eine Zunahme um den Faktor 3. Die Ursachen dafür sind ungeklärt und die Geschwindigkeit der Zunahme unterliegt großen Schwankungen.
 - Der Verlauf der Aktivität lässt sich als irreversible Folgereaktion simulieren.
 - Die Geschwindigkeiten der Aktivierung und Desaktivierung liegen in der gleichen Größenordnung.
 - Durch die Aktivierung konnte kein Aktivitätstest etabliert werden.
- Die Volumenbegasung ist eine Methode zur Wasserstoffversorgung kleiner Volumina bei exakter Kontrolle der Verweilzeit.
 - Die *PfH* konnte immobilisiert im Wirbelschichtreaktor verwendet werden, dabei zeigte sich Graphit als geeignete Matrix.
 - Die Verwendung des Membranreaktors für gelöstes Enzym wurde demonstriert.

12. Reduktive Regenerierung

Neben der Synthese von NADPH durch Reduktion von NADP^+ ist die reduktive Kofaktorregenerierung die zweite wichtige Anwendung der *PfH*. Die Abbildung 12.1 zeigt die Regenerierung mit Wasserstoff gegenüber der substratgekoppelten Variante; dort wird angedeutet, dass die Kofaktorregenerierung mit der *PfH* und molekularem Wasserstoff für den Fall der Carbonylreduktion frei von Nebenprodukten ist. Zwar werden die Reduktionsäquivalente für die Reduktion in beiden Fällen im Überschuss eingesetzt, aber Wasserstoff lässt sich leicht entfernen, und wie im folgenden gezeigt wird, führt die Reduktion zu quantitativen Umsätzen. Das komplexe Produktgemisch der substratgekoppelten Reduktion lässt sich also vermeiden.

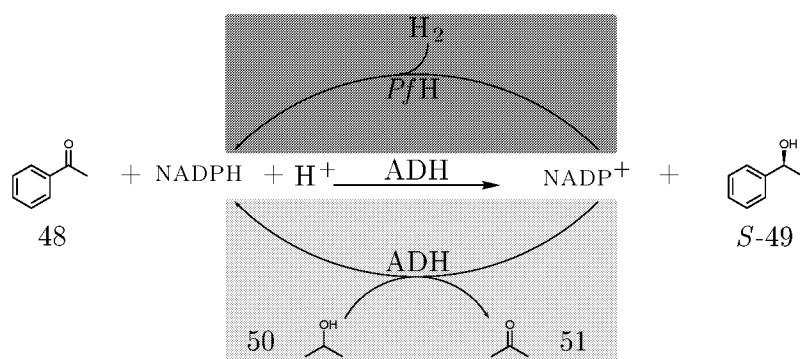


ABBILDUNG 12.1.: Kofaktorregenerierung für die Reduktion von **48** mit substratgekoppelter Regenerierung durch 2-Propanol (50) (unten) und die Regenerierung durch molekularen Wasserstoff mit der Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* (*PfH*) (oben).

12.1. Thermodynamik

*He who loves practice without theory
is like the sailor who boards ship without rudder and compass
and never knows where he may be cast.*

Leonardo da Vinci

zitiert nach M. Kline, *Math. Thought* (1972)224

Bei der Kofaktorregenerierung mit Wasserstoff ist für die Lage des Gleichgewichts das Reduktionspotential der jeweiligen Verbindung ausschlaggebend, da das Bezugspotential der Oxidation per Definition null ist.¹ Für die Hydrierung von Doppelbindungen wird formal

¹vergleiche Abschnitt A.6 auf Seite 135 für eine ausführliche Herleitung

TABELLE 12.1.: Redoxpotentiale verschiedener Carbonylverbindungen nach [96], die daraus berechnete Gleichgewichtskonstante und der theoretische Umsatz für die Reduktion mit Wasserstoff ($p_{\text{H}_2} = 1 \text{ bar}$; $T = 298 \text{ K}$)

$\text{R}^1\text{C}(=\text{O})\text{R}^2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{R}^1\text{CH}(\text{OH})\text{R}^2$					
	R ¹	R ²	E ₀ / mV	K _R ^p / 10 ³	U / -
48	4-MeO-Ph	Me	99	2,2	0,99955
	Ph	Butyl	116	8,3	0,99988
	Ph	Me	118	9,8	0,99990
	Ph	Et	118	8,8	0,99990
50	3-MeO-Ph	Me	120	11,4	0,99991
	Ph	<i>i</i> Pr	125	16,8	0,99994
	Me	Me	129	23,0	0,99996
	Ph	Ph	129	23,0	0,99996
	2-MeO-Ph	Methyl	141	58,4	0,99998

Wasserstoff auf den Akzeptor übertragen. Somit ist für die Gleichgewichtslage –anders als bei der Hydridübertragung auf NADP^+ – der pH irrelevant und die Gleichgewichtskonstante ergibt sich unmittelbar aus dem Standardpotential des Redoxpaares nach

$$K_R^p = \frac{[\text{Red.}] \text{ bar}}{[\text{Ox.}] p_{\text{H}_2}} \quad (12.1)$$

$$K_R^p = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} = e^{\frac{\nu_e F \Delta E}{RT}} = e^{\frac{2F E_0(\text{Ox.}/\text{Red.})}{RT}}, \quad (12.2)$$

wenn in der Gleichgewichtskonstante statt der Wasserstoffkonzentration der Partialdruck p_{H_2} verwendet wird. Die Umrechnung in die von der Wasserstoffkonzentration $[\text{H}_2]$ abhängige Gleichgewichtskonstante K_R folgt dem Henryschen Gesetz (6.1). Es ergibt sich

$$K_R = \frac{M[\text{Red.}]}{[\text{H}_2][\text{Ox.}]} = K_R^p H_{\text{H}_2} \frac{M}{\text{bar}}. \quad (12.3)$$

Bei maximaler Selektivität lässt sich daraus der theoretische Umsatz analog zu (11.2) bestimmen:

$$U = \frac{[\text{Red.}]}{[\text{Ox.}]_0} = \frac{1}{1 + (p_{\text{H}_2} K_R^p)^{-1} \text{ bar}} = \frac{1}{1 + ([\text{H}_2] K_R)^{-1} M}. \quad (12.4)$$

Anders als bei der Synthese von NADPH (38) aus NADP^+ (36) mit Wasserstoff² ist das Gleichgewicht also pH-unabhängig. Die Bedingung $U < 1$ ist evident. Der Umsatz ist umso größer, je größer der Term $[\text{H}_2] K_R$ beziehungsweise $p_{\text{H}_2} K_R^p$ ist. Triebkräfte der Reaktion sind hier das Redoxpotential beziehungsweise die Potentialdifferenz zur NHE –ausgedrückt durch die Gleichgewichtslage K_R – und die Wasserstoffkonzentration, die umso größer ist, je größer der Druck ist. Aus den berechneten K_R^p für einige Ketone lässt sich folgern, dass das Gleichgewicht schon bei Standardbedingungen stark auf Seiten der Produkte liegt, und somit der thermodynamisch mögliche Umsatz annähernd quantitativ ist.

²vergleiche Abschnitt 11.1 auf Seite 77 beziehungsweise Anhang A auf Seite 131

12.1.1. Exkurs: Substratgekoppelte Kofaktorregenerierung

Von substratgekoppelter Regenerierung spricht man, wenn für die Reduktion ein zweites Substrat von demselben Enzym umgesetzt wird. Für die Reduktion eines Alkanons setzt man dabei meist ein kostengünstiges Alkanol ein.³ Für die substratgekoppelte Kofaktorregenerierung lässt sich analog zeigen [163], dass sich der maximale Umsatz aus der Lage des Gleichgewichts und somit aus Differenz der Standardpotentiale berechnen lässt. Die allgemeine Reaktionsgleichung der substratgekoppelten Kofaktorregenerierung ist:



mit den oxidierten und reduzierten Formen des Regeneriersubstrats S. Die Gleichgewichtskonstante K_S ergibt sich aus der Differenz der Redoxpotentiale mit (A.17) und (A.13)⁴ zu

$$\Delta E = E_0(\text{Ox}/\text{Red}) - E_0(\text{S}_{\text{ox}}/\text{S}_{\text{red}}) \quad (12.6)$$

$$\Rightarrow K = e^{\frac{2F\Delta E}{RT}} \quad (12.7)$$

Oder mit den in der Tabelle 12.1 auf der vorherigen Seite angeführten Gleichgewichtskonstanten K_R^p gegen die Normalwasserstoffzelle:

$$K = \frac{[\text{Ox}][\text{S}_{\text{ox}}]}{[\text{Red}][\text{S}_{\text{red}}]} = \frac{K_R^p(\text{Ox}/\text{Red})}{K_R^p(\text{S}_{\text{ox}}/\text{S}_{\text{red}})} \quad (12.8)$$

Für ein gegebenes System lässt sich zeigen,⁴ dass für den Zusammenhang zwischen thermodynamischem Umsatz U , Gleichgewichtskonstante K und dem eingesetzten Überschussverhältnis r_0 von Reduktionsmittel S_{red} zum Edukt

$$r_0 = \frac{[\text{S}_{\text{red}}]_0}{[\text{Ox}]_0} \quad (12.9)$$

gilt, und dass der thermodynamische Umsatz gegeben ist durch

$$U = K \frac{(r_0 + 1) - \sqrt{(1 - r_0)^2 + 4K^{-1}r_0}}{2(K - 1)} \quad (12.10)$$

beziehungsweise

$$r_0 = U \left(1 + \frac{U}{K(1-U)} \right) \quad (12.11)$$

Für die substratgekoppelte Kofaktorregenerierung müssen sowohl Reduktionsmittel S_{red} als auch das zu reduzierende Edukt Ox vom Enzym akzeptierte Substrate sein. Die deshalb nötige nahe chemische Verwandtschaft ist ein Nachteil der substratgekoppelten Kofaktorregenerierung, weil die Potentialdifferenz dann relativ gering und unter Umständen sogar negativ⁵ ist. Somit muss zum Erreichen hoher Umsätze schon aus thermodynamischen Gründen ein

³Die Vor- und Nachteile der jeweiligen Regeneriersubstrate werden hier nicht diskutiert, dafür sei auf die Literatur verwiesen [159, 250].

⁴Vergleiche Abschnitt A.6 auf Seite 135 für die vollständige Herleitung der Zusammenhänge und die nötigen Randbedingungen.

⁵Die Gleichgewichtskonstante ist dann kleiner als eins, wie zum Beispiel bei Acetophenon und 2-Propanol.

hohes Verhältnis r_0 gewählt werden. Dieses Mindestverhältnis, das die Gleichung (12.11) für einen gewünschten Umsatz angibt, ist aber aus kinetischer Sicht meist nicht ausreichend, wenn ein Umsatzpunkt in endlicher Zeit erreicht werden soll.⁶ Auf weitere Komplikationen aus kinetischer Sicht wie Inhibierungen durch hohe Konzentrationen oder Desaktivierung des Enzyms soll hier nicht weiter eingegangen werden. Wenn ein System diesen thermodynamischen Umsatz jedoch nicht erreicht, ist dies ein Hinweis darauf, dass solche kinetischen Inhibierungen vorliegen können.

12.2. Durchführung im Satzreaktor

Theory without practice cannot survive and dies as quickly as it lives.

Leonardo da Vinci

zitiert nach M. Kline, *Math. Thought* (1972)224

Theoretisch sollte also die Hydrierung eines Ketons mit der *Pf* Hydrogenase und NADP^+ als Redoxmediator zu quantitativen Umsätzen führen, während eine substratgekoppelte Regenerierung unter sonst vergleichbaren Umständen thermodynamisch limitiert sein sollte. Um dies zu zeigen, wurden zwei Experimente zur Ketonreduktion mit einer Modellreaktion durchgeführt. Die dabei verwendete Alkoholdehydrogenase ist aus früheren Arbeiten bekannt [265] und kommerziell verfügbar. Als Modellreaktion wurde die Reduktion von Acetophenon (48) zu Phenylethanol (49) gewählt. Die substratgekoppelte Kofaktorregenerierung wurde unter Oxidation von 2-Propanol (50) durchgeführt, die trotz ihrer Limitierungen häufig angewendet wird (z.B. [227, 281]). Aus dem Anfangsverhältnis

$$r_0 = \frac{[\text{S}_{\text{red}}]_0}{[\text{Ox}]_0} \geq 1 \quad (12.9)$$

lässt sich der thermodynamisch mögliche Umsatz U mit (12.10) berechnen.⁷ Für die Regenerierung mit Wasserstoff ist eine solche Limitierung praktisch nicht vorhanden, und der mögliche Umsatz ist annähernd quantitativ.

Zum direkten Vergleich sind in der Abbildung 12.2 auf der nächsten Seite zwei Experimente unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt, wobei das Experiment mit substratgekoppelter Regenerierung annähernd den Gleichgewichtsumsatz von $U = 0,93$ erreicht, der für das eingestellte $r_0 = 30$ nach (12.10) berechnet ist. Die Regenerierung mit *PfH* zeigt sich in diesem Punkt überlegen, da sie quantitativen Umsatz erreicht. Bei der relativ geringen Substratkonzentration, die mit Acetophenon (48) erreichbar ist, fällt die Limitierung nicht so stark ins Gewicht, wie bei Systemen, die nicht durch die Löslichkeit begrenzt sind. Ein solches Beispiel ist die Reduktion des Hydroxyketons **52**, die am Ende des Kapitels beschrieben ist (Abbildung 12.7 auf Seite 102).

Für alle gezeigten Reaktionen scheint die Regenerierung geschwindigkeitsbestimmend zu sein, da die Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten NADP^+ -Konzentration abhängt. Dies lässt sich für die Regeneration mit einem zweiten Enzym durch das Verhältnis der jeweiligen Enzymaktivitäten regulieren; dies ist bei der substratgekoppelten Regenerierung nicht möglich.

⁶Die Triebkraft einer Reaktion ist die Abweichung vom thermodynamischen Gleichgewicht.

⁷Die ausführliche Herleitung findet sich im Abschnitt A.6 auf Seite 135.

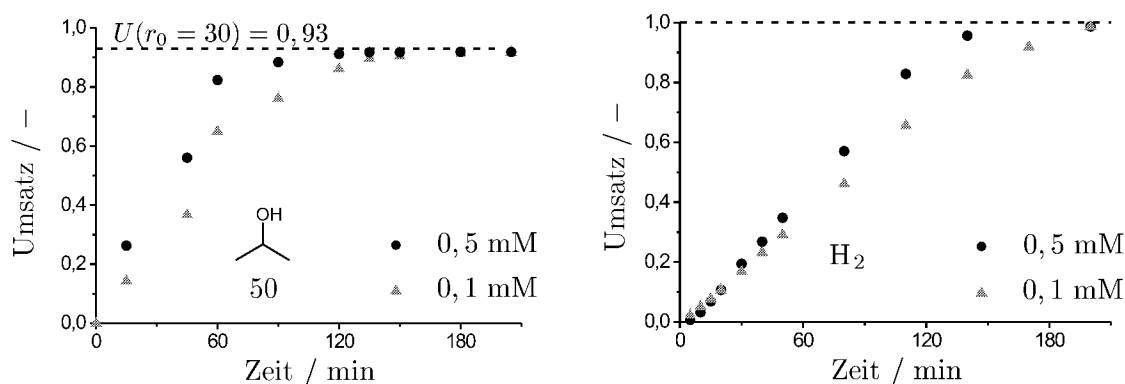


ABBILDUNG 12.2.: Reduktive NADPH Regenerierung: links mit Isopropanol (50) und rechts mit Wasserstoff und *PfH* unter gleichen Bedingungen. Der Umsatz U des Isopropanolversuchs ist der thermodynamisch mögliche Gleichgewichtsumsatz nach (12.10). Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Anfangskonzentrationen $[\text{NADP}^+]_0$. Die Umsetzungen zeigten durchgängig hohe Selektivität von $er \geq 400$ ($ee \geq 0,995$). ($[\text{KPi}] = 50 \text{ mM}$; $\text{pH}=8$; $\theta = 40^\circ\text{C}$; $[\text{ADH}]=0,3 \text{ mg mL}^{-1}$; $[(48)] = 10 \text{ mM}$; links: $[50]_0 = 300 \text{ mM}$; rechts: $[\text{PfH}] = 1 \text{ mg mL}^{-1}$; $p_{\text{H}_2} = 1,1 \text{ bar}$)

Die maximale $t_{\text{tn}} \approx 100$ –bezogen auf den Kofaktor– ist in beiden Experimenten vergleichbar. Die Enantioselektivität von $er \geq 400$ ($ee \geq 99,5$) wird unabhängig von der Regenerationsmethode erreicht, und ist durch die verwendete ADH bedingt. Es zeigt sich kein negativer Einfluss der Regenerationsmethode auf die Selektivität der Reaktion.

12.3. Durchführung als repetitive batch

Zum zehnten Mal wiederholt wird es gefallen.
Horaz

Beide Enzyme lassen sich vorteilhaft durch die Abtrennung mit einer Ultrafiltrationsmembran rezyklieren. Dies ist analog zu der Durchführung wie sie für die Synthese von NADPH in Abschnitt 11.5 auf Seite 83 beschrieben ist.

Dazu wurden zunächst die oben beschriebenen Satzreaktorversuche übertragen. Mit der Modellreaktion, der Reduktion von Acetophenon (48) zu Phenylethanol (49), wurde eine Reihe von sechs Experimenten im Satzreaktor mit anschließender Rezyklierung der Enzyme durch Membranfiltration durchgeführt (Abbildung 12.3 auf der nächsten Seite). Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass eine solche Betriebsweise analog der Darstellung von NADPH möglich ist. Bei jedem Lauf werden bezogen auf das Substrat **48** quantitative Umsätze erreicht. Im Gegensatz zum vorher gezeigten Satzreaktorversuch ist die Regenerierung zunächst nicht geschwindigkeitsbestimmend, aber die Reduktion von **48**. Dies lässt sich an der Auftragung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der relativen Bildungsgeschwindigkeit von Phenylethanol erkennen (Abbildung 12.4 auf Seite 101). Hier zeigt sich, dass die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in dem Maße abnimmt, wie man es durch die Desaktivierung der

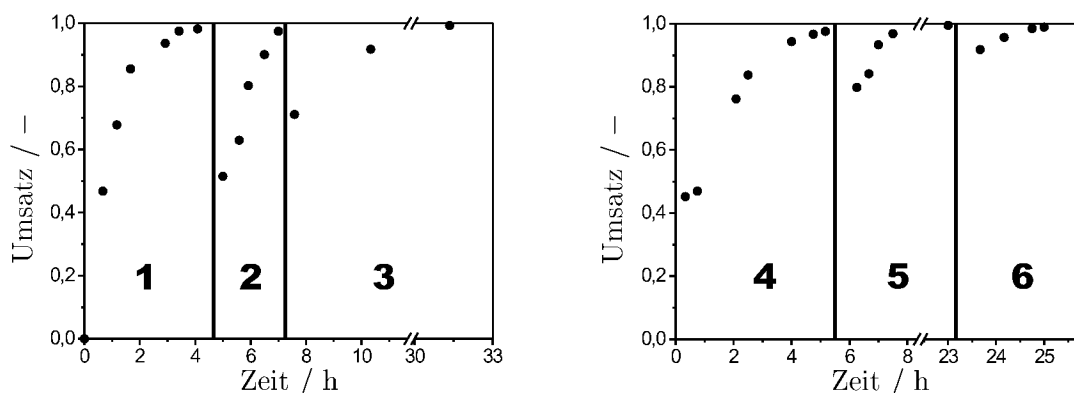


ABBILDUNG 12.3.: Reduktive NADPH Regenerierung bei der Reduktion von Acetophenon (48) zu *S*-Phenylethanol (*S*-49) durchgeführt als repetitive batch mit Rezyklisierung der Enzyme durch Ultrafiltration. Vor dem vierten Lauf (rechts) wurde die ADH nachdosiert (der absolute zeitliche Verlauf ist in der Abbildung 12.4 auf der nächsten Seite wiedergegeben). ($[\text{NADP}^+]_0 = 0,5 \text{ mM}$; $[\text{KP}_i] = 50 \text{ mM}$; $\text{pH} = 8$; $\theta = 40^\circ\text{C}$; $[\text{ADH}] = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$, Nachdosierung: $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$; $[PfH] = 1 \text{ mg mL}^{-1}$, $p_{\text{H}_2} = 1,1 \text{ bar}$)

verwendeten ADH erwarten würde. Diese Aktivität liegt relativ zu der Anfangsgeschwindigkeit des ersten Laufs in dem Bereich, der durch die Desaktivierung vorgegeben ist, die in den repetitiven batches der NADPH-Synthese bestimmt wurde.⁸ Die relativ schnelle Desaktivierung der ADH überdeckt die Aktivierung der *PfH*, wie sie bei der NADPH-Synthese beobachtet wurde.⁹ Umso wichtiger ist es für diese gekoppelten Systeme, die Kinetik der Einzelreaktionen zu bestimmen, da es für die Stabilität des Kofaktors, und damit der erreichbaren ttn entscheidend ist, das Verhältnis von oxidiertem und reduziertem Kofaktor steuern zu können [152].

Um zu höheren Zyklenzahlen des Kofaktors zu kommen, ist es üblich die $[\text{NADP}^+]$ -Konzentration zu verringern [227]. Dies bedeutete im vorliegenden Fall einen Nachteil bei der Ausnutzung der Enzyme, da die Michaelis-Menten-Konstante der verwendeten ADH mit $K_M \approx 0,5 \text{ mM}$ so hoch liegt, dass eine weitere Absenkung nur mit ebenfalls geringerer Aktivität erkaufte wird [142]. Die kinetischen Parameter der *PfH* zeigten eine Abhängigkeit erster Ordnung von NADP^+ , so dass die Absenkung der Kofaktorkonzentration für die optimale Nutzung beider Enzyme in diesem Fall nicht vorteilhaft ist. Die Zyklenzahl ist auch eine lineare Funktion der Substratkonzentration. Eine Erhöhung schied jedoch für Acetophenon (48) aufgrund der begrenzten Löslichkeit von etwa 20 mM aus. Daher wurde 2-Hydroxy-1-phenylpropanon (52) als Substrat gewählt (Abbildung 12.6 auf Seite 102), dessen Löslichkeitskonzentration größer als $0,1 \text{ M}$ ist [102].¹⁰ Die erhöhte Löslichkeit ist auf die sekundäre Hydroxyfunktion zurückzuführen. Die Reduktion der benzyliischen Ketogruppe verläuft mit der verwendeten ADH unter *R*-Stereokontrolle.¹¹ Die Stereokontrolle ist quan-

⁸in der Abbildung 12.4 auf der nächsten Seite für die gefundenen Werte als durchgezogene Linie eingezeichnet

⁹vergleiche oben, Abschnitt 16.4.1 auf Seite 124

¹⁰Das Hydroxyketon **52** wurde freundlicherweise von Dipl.-Chem. D. Kihumbu zur Verfügung gestellt.

¹¹Es handelt sich trotzdem um eine sogenannte „*S*-ADH“, jedoch folgt der Raumanpruch der Substituenten

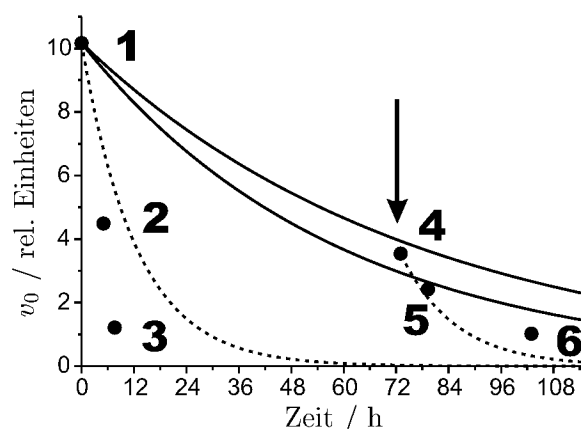


ABBILDUNG 12.4.: Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der repetitive batch Serie zur Kofaktorregenerierung mit *PfH* als Funktion der Zeit. Die gestrichelte Linie ist die relative Desaktivierung der Alkoholdehydrogenase, die vor dem vierten Versuch nachdosiert wurde; die durchgezogene Linie ist die aus der NADPH-Synthese gemittelte Desaktivierung der *PfH* $\bar{k}_{des} = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ (Tabelle 11.2 auf Seite 86).
(für die Bedingungen vergleiche Abbildung 12.3 auf der vorherigen Seite)

titativ, so dass der $er > 400$ ($ee > 0,995$) ist, und das Diastereomerenverhältnis nur von der Reinheit des eingesetzten Hydroxyketons **52** abhängt. Dies kann in der enzymatischen C-C-Knüpfung mit bis zu $er = 50$ ($ee = 0,96$) dargestellt werden [71, 124].

Die Abbildung 12.5 auf der nächsten Seite zeigt die Umsatz-Zeit-Verläufe der Reaktionen. In allen drei Läufen wurde die Kofaktorkonzentration konstant gehalten, und die Substratkonzentration von 10 mM auf 80 mM erhöht. Die maximale Zyklenzahl für NADPH beträgt damit $t_{tn} = 160$. In allen drei Versuchen wurden quantitative Umsätze erreicht. Im Vergleichsexperiment der substratgekoppelten Regenerierung durch 2-Propanol (50) zeigte sich hingegen eine thermodynamische Limitierung. Der nach Gleichung (12.10)¹² bestimmte thermodynamische Umsatz, der sich für das Anfangsverhältnis von

$$r_0 = 150/85 \approx 1,8 \quad \text{zu} \quad U(r_0 = 1,8) = 0,51$$

ergibt,¹³ ist in der Abbildung 12.7 auf der nächsten Seite als Parallele zur Ordinate eingezeichnet.

Der erreichte Umsatz wird durch den berechneten Gleichgewichtsumsatz gut beschrieben, und zeigt dass die substratgekoppelte Regenerierung für höhere Konzentrationen der Substrate ungeeignet ist. Die dann für höhere Umsätze erforderlichen sehr großen Konzentrationen des Reduktionsmittel (hier 2-Propanol) wirken sich negativ auf die Stabilität der verwendeten ADH aus [265], und sind für die Aufarbeitung des Produkts nachteilig. Im Gegensatz dazu zeigt die Reduktion unter Verwendung der *PfH* zur Regenerierung von NADPH keine thermodynamische Limitierung, sondern es werden quantitative Umsätze erzielt (Abbildung 12.5 auf der nächsten Seite, rechts). Hier zeigt sich die klare Überlegenheit eines

hier nicht der Cahn-Ingold-Prelog-Nomenklatur.

¹²siehe Abschnitte 12.1.1 auf Seite 97 beziehungsweise A.6 auf Seite 135

¹³Für das Redoxpotential von **52** wurde näherungsweise das von Acetophenon (48) angenommen. Siehe auch Tabelle 12.1 auf Seite 96.

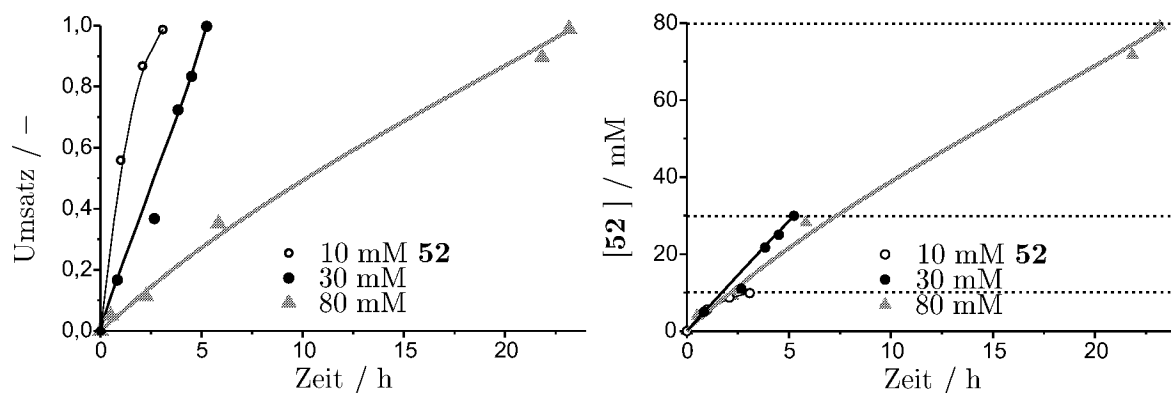


ABBILDUNG 12.5.: Repetitive batch der enzymatischen Reduktion von 2-Hydroxy-1-phenylpropanon (**52**) unter reduktiver NADPH Regenerierung mit *PfH* mit steigender Konzentration des Hydroxyketons **52**.

($[\text{NADP}^+]_0 = 0,5 \text{ mM}$; $[\text{KP}_i] = 50 \text{ mM}$; $\text{pH} = 8$; $\theta = 40 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{ADH}] = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$; $[\text{PfH}] = 1 \text{ mg mL}^{-1}$; $p_{\text{H}_2} = 1,1 \text{ bar}$)

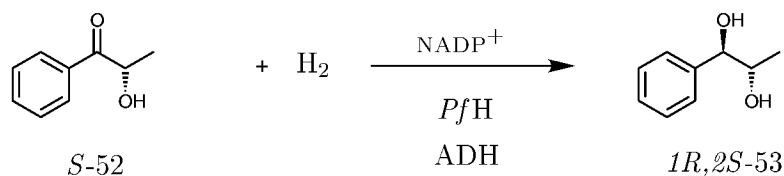


ABBILDUNG 12.6.: Enantioselektive enzymatische Reduktion von *S*-2-Hydroxy-1-phenylpropanon (**52**) zum *1R,2S*-1-Phenylpropan-1,2-diol (**53**) mit einer Alkoholdehydrogenase

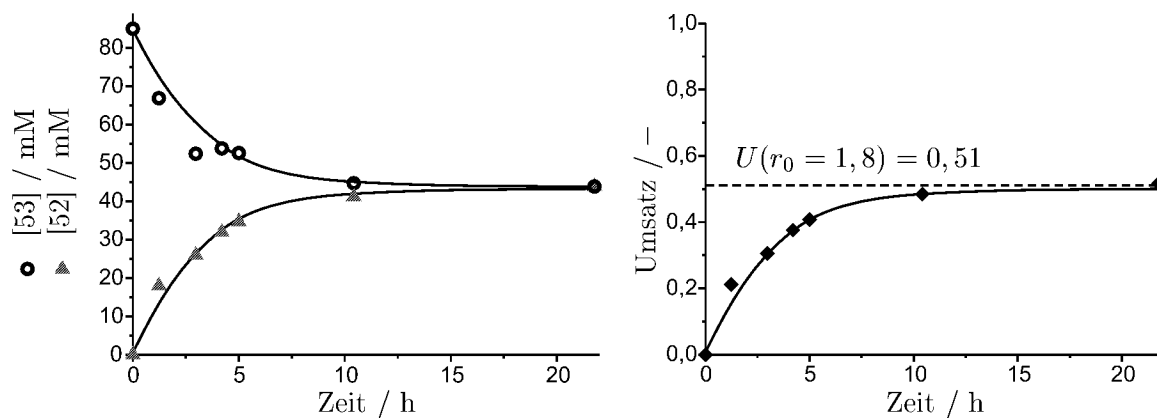


ABBILDUNG 12.7.: Konzentrations- und Umsatz-Zeitverlauf der substratgekoppelten Regenerierung von NADPH mit 2-Propanol zur Reduktion des Hydroxyketons **52** zum Diol **53**. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den thermodynamischen Umsatz nach (12.10).

($[\text{NADP}^+]_0 = 0,5 \text{ mM}$; $[\text{KP}_i] = 50 \text{ mM}$; $\text{pH} = 8$; $\theta = 40 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{ADH}] = 1 \text{ mg mL}^{-1}$; $[\text{2-Propanol}]_0 = 150 \text{ mM}$; $[\text{52}]_0 = 85 \text{ mM}$)

Regenerationssystems mit zwei Enzymen unter Verwendung eines starken Reduktionsmittels.

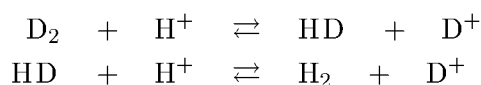
12.4. Zusammenfassung: Kofaktorregenerierung

- Es konnte gezeigt werden, dass eine reduktive Kofaktorregenerierung von NADPH mit der Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* möglich ist.
- Im Gegensatz zur substratgekoppelten Kofaktorregenerierung werden quantitative Umsätze erzielt. Für den Einsatz von Wasserstoff besteht keine thermodynamische Limitierung.
- Die für das Enzym erreichbaren Zyklenzahlen werden durch die verwendete ADH begrenzt, die Desaktivierung der PfH ist in der gleichen Größenordnung wie die bei der Synthese bestimmten Werte.
- Eine Erhöhung der maximalen Zyklenzahl von NADPH auf $t_{tn} = 160$ lässt sich vorteilhaft durch Erhöhung der Substratkonzentration erzielen.
- Die Kofaktorregenerierung konnte im Satzreaktor und unter Rezyklierung beider Enzyme durch Ultrafiltration im repetitive batch durchgeführt werden.

13. Mechanistische Untersuchungen

13.1. Reaktionen mit Deuterium

Für mechanistische Untersuchungen an Hydrogenasen wird der Austausch von Protonen mit Deuterium in wässriger Lösung entsprechend der Reaktionsfolge



untersucht [13, 54, 75, 151]. Dadurch konnte der Nachweis geführt werden, dass die heterolytische Spaltung von Wasserstoff und die Reduktion von Redoxpartnern¹ in unterschiedlichen Untereinheiten erfolgt.² Besonders für die länger bekannte Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus* [225] ist dies durch ausführliche Studien bewiesen worden [182]. Neuere Methoden verwenden den Austausch von *para*- und *ortho*-Wasserstoff und die direkte Messung von Isotopenverteilungen [54].

Für die Synthese von NADPH stellte sich die Frage, ob die Gesamtreaktion mit Deuterium statt mit Wasserstoff möglich ist, und ob es dann gelingt Deuterium statt Wasserstoff in das Zielmolekül zu übertragen. Zum einen ist die Darstellung von deuteriertem NADPH (NADPD) für andere mechanistische Untersuchungen an Oxidoreduktasen von Interesse [62], zum anderen wäre bei der Kofaktorregenerierung die Möglichkeit gegeben, gezielt deuterierte Verbindungen herzustellen.

Wie die Untersuchungen zur Struktur der *PfH* zeigen [240]³, ist Wasserstoff nicht die Hydridquelle für die Reduktion von NADP^+ . Die Reduktion findet unter Beteiligung eines Protons statt, das aus dem Lösungsmittel Wasser stammt. Es wurden dazu zwei Serien von Experimenten unternommen:

1. Die Reaktion mit D_2 sollte nicht zur Deuterierung des Kofaktors führen, auch wenn es als Substrat akzeptiert wird.
2. Reaktion in D_2O mit Wasserstoff könnte zu NADPD führen, wenn das Enzym zur Reduktion eines D^+ in der Lage ist.

13.1.1. Molekulares Deuterium

Die Reaktion wurde unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt, lediglich die Begasung erfolgt mit Deuterium anstatt mit Wasserstoff. Die Reduktion von NADP^+ gelingt mit D_2 , und es werden in vergleichbaren Zeiten quantitative Umsätze erreicht. Die Untersuchung des

¹z.B. Methylviologen, Benzylviologen oder NAD^+

²vergleiche Abschnitt 8.2 auf Seite 62

³vergleiche Abschnitt 8.2.1 auf Seite 63

Produkts mit NMR-Spektroskopie zeigte jedoch erwartungsgemäß, dass kein⁴ Deuterium auf NADP^+ übertragen wird. Dies belegt, dass der Mechanismus über einen Elektronentransport und unter räumlicher Trennung von Wasserstoff- bzw. Deuteriumspaltung und Reduktion abläuft. Das Enzym oxidiert zunächst Wasserstoff beziehungsweise Deuterium, um dann NADP^+ unter gleichzeitiger Reduktion eines Protons zu NADPH umzusetzen (vergleiche die Abbildung 8.2). Damit ergibt sich auch der angenommene ping-pong-Mechanismus für die Reduktion [182].

Zwar ist der Ersatz von Wasserstoff durch Deuterium möglich, bietet aber –wie zu erwarten war– keinen einfachen und preisgünstigen Zugang zum deuterierten Kofaktor NADPD (Abbildung 13.1 auf der nächsten Seite).

13.1.2. Reaktion in Deuteriumoxid als Lösungsmittel

Um nach dem Mechanismus der *PfH* zu deuterierten Produkten zu gelangen, müsste man bei der Reduktion von NADP^+ anstelle von Protonen D^+ zur Verfügung stellen. Für die Formiat-hydrogenase wurde für die Zersetzung von Formiat gezeigt, dass die Zusammensetzung des Gases mit dem Gehalt von Deuterium in der Lösung korreliert [79]. Durch den kompletten Austausch von Wasser gegen D_2O wurde versucht den Einbau von Deuterium zu bewirken. Dies bedeutet einen erheblich höheren Aufwand als die Verwendung von gasförmigen Deuterium, da ausschließlich wasserfreie Salze und Reagenzien für die Herstellung von Puffern verwendet werden können.

Bei der Umsetzung zeigte sich keine Reaktion (Abbildung 13.1 auf der nächsten Seite). Dies bestätigte sich auch beim Versuch der Kofaktorregenerierung. Dafür kann es verschiedene Gründe geben:

- Für die Reduktion wird nur ein Proton akzeptiert; das könnte bedeuten, dass ein Tunnelvorgang des Protons eine Rolle spielt, der mit Deuterium nicht möglich ist [63, 252].
- Die Reduktion von D_2O ist gegenüber der Reduktion von Wasser kinetisch und thermodynamisch gehemmt, da für die Reduktion Protonen benötigt werden. Die Dissoziationskonstante für D_2O ist kleiner als die von Wasser. Daher ist die D^+ Konzentration zu klein für messbare Reaktionsgeschwindigkeiten [115, Seite 265-266].

13.2. Elektrochemische Untersuchungen

Die elektrochemische Untersuchung von Metalloproteinen ist eine Methode, die zur Bestimmung von Redoxpotentialen und zur mechanistischen Aufklärung angewendet wird. Die *PfH* und andere Metalloproteine aus *Pf* wurden elektrochemisch bereits untersucht [42], zum Teil auch in Verbindung mit EPR-Messungen [240]. Andere Hydrogenasen wie die NAD^+ -abhängigen aus *Alcaligenes eutrophus* [56] und *Rhodococcus opacus* [105] wurden direkt für die elektrochemische reduktive Regenerierung eingesetzt. Der dazu postulierte Mechanismus des Hydridtransfers von der Platinoberfläche auf das Enzym [70] sollte jedoch eher kritisch gesehen werden. Wahrscheinlich wird eher das Enzym reduziert, das in dieser Form dann unter Reduktion von Protonen ein Hydrid auf NADP^+ überträgt. Diese Untersuchungen gaben zu der Vermutung Anlass, dass die Hydrogenase aus *Pf* sich ebenfalls mittels elektrochemischer Methoden untersuchen lassen sollte.

⁴Im Rahmen der Nachweisgrenze, die für NMR-Untersuchungen im allgemeinen mit 0,05 angenommen wird.

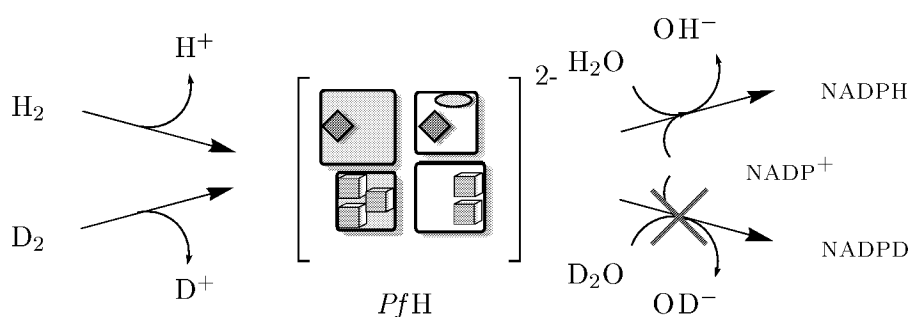


ABBILDUNG 13.1.: Die Reduktion von NADP⁺ gelingt sowohl mit Deuterium als auch mit Wasserstoff zu NADPH, jedoch kann die Umsetzung nicht in volldeutertem Wasser durchgeführt werden. Daher gibt es auf diesem Weg keinen Zugang zu deuteriertem NADPH (NADPD).

Bei den Untersuchungen mittels cyclischer Voltammetrie (CV) zeigte sich das Phänomen, dass sich bei Änderung der Polarisationsrichtung die Stromkurven überschneiden, nachdem die Stickstoff-Atmosphäre gegen Wasserstoff ausgetauscht wurde (Abbildung 13.2 auf der nächsten Seite). Die Überschneidung der Stromkurven („line crossing“) ist auf die Ablagerung elektrochemisch aktiver Substanzen auf der Elektrodenoberfläche zurückzuführen [291]. Dass dieser Effekt erst in Gegenwart von Wasserstoff auftritt, kann verschiedene Ursachen haben. Eine der wahrscheinlichsten ist, dass bei der Aktivierung des Enzyms eine konformative Änderung auftritt, die zur Exposition einer adhesiven Oberfläche führt. Die Ausbildung von Pentärstrukturen mehrerer Einzelenzyme –auch verschiedener– und der *in vitro* Zerfall in Untereinheiten und Rückbildung aktiver Spezies ist auch für andere Hydrogenasen beschrieben (z.B. aus *Rhodococcus opacus*) [182, 210]. Aus den Messungen leitet sich jedoch ab, dass die Anlagerung zumindest teilweise elektrochemisch als „electrodeposition“ erfolgt [100, 138]. Da sich der Effekt der Adsorption jedoch auch auf der Fritte der Referenzelektrode als bräunlich-roter Niederschlag bemerkbar machte, scheinen sowohl elektrochemische als auch physikochemische Beiträge eine Rolle zu spielen.

Weiterhin ist die Adsorption nicht nach einem Zyklus abgeschlossen. Da nach einigen Zyklen die Oberfläche der Elektrode vollständig belegt sein sollte,⁵ muss die weitere Abscheidung auf bestehenden Lagen der bereits abgeschiedenen Hydrogenase erfolgen.

Es überlagern sich drei Effekte, die durch die Zugabe von Wasserstoff ausgelöst werden:

1. Aktivierung der PfH durch Wasserstoff
2. elektrochemisch induzierte Ablagerung
3. physikochemische Ablagerung auf geeigneten Oberflächen.

Die Überlagerung lässt keine quantitativen Aussagen über die Geschwindigkeiten der Einzelreaktionen zu. Das hier beobachtete Verhalten der aktivierten PfH auf geeigneten Oberflächen zu adsorbieren ist eine mögliche Erklärung für die langsame und schlecht reproduzierbare Aktivierung, die bei den repetitive batch Versuchen⁶ beobachtet wurde. Für die

⁵Die Oberfläche der Glaskohlenstoff-Elektrode beträgt 0,07 cm².

⁶in Abschnitt 11.5 auf Seite 83

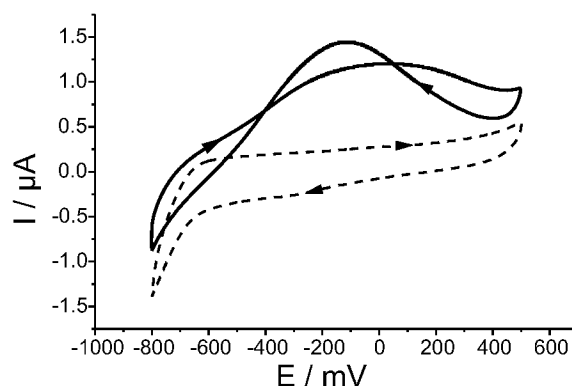


ABBILDUNG 13.2.: Exemplarische Cyclovoltammogramme der Hydrogenase aus *Pf* bei 80°C. Die gestrichelte Strom-Spannungs-Kurve ist ohne Wasserstoffatmosphäre aufgenommen, die durchgezogene Linie zeigt den Verlauf in Gegenwart von Wasserstoff. ($\theta = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$; 25 mV s^{-1} ; $[PfH]_0 = 4\text{ mg mL}^{-1}$)

Immobilisierung lässt sie sich jedoch vorteilhaft anwenden, was durch den Einsatz im kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktor⁷ gezeigt werden konnte.

13.3. Zusammenfassung

- Die Ergebnisse der qualitativen Isotopen-Untersuchungen sind in der Abbildung 13.1 auf der vorherigen Seite zusammengefasst. Diese zeigt die möglichen und die blockierten Reaktionswege, die sich durch den Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium ergeben.
- Die Hydrogenase ist in der Lage, Deuterium zu aktivieren und heterolytisch zu spalten, analog zu der Aktivierung von Wasserstoff. Eine Reduktion von NADP^+ gelingt in volldeuteriertem Wasser jedoch nicht. Das heißt, dass eine Übertragung der Elektronen auf Deuterium nicht möglich ist. Dies ist entweder energetisch oder kinetisch aufgrund eines Isotopeneffekts nicht möglich.
- Die *PfH* ist elektrochemisch aktiv und zeigt in Gegenwart von Wasserstoff ein „line crossing“-Phänomen, das für die elektrochemisch induzierte Adsorption („electrodeposition“) auf geeigneten Oberflächen charakteristisch ist.

⁷vergleiche Abschnitt 11.6.2.1 auf Seite 90

Teil IV.

Zusammenfassung und Ausblick

14. Zusammenfassung und Vergleich

14.1. Dosiertechnik

Es konnte eine computergestützte Dosierstrecke für Flüssigkeiten aufgebaut werden, die den Anforderungen der homogenen Katalyse gerecht wird. Durch den Einsatz einer dichten Membran als Phasengrenzfläche gelingt die Dosierung von Gasen unter Entkopplung der Drücke. Ein modularer Umlaufreaktor mit Doppelrohrmodul zur membrangestützten Begasung und mit Ultrafiltrationsmodul wurde für die kontinuierliche Reaktionsführung aufgebaut. Das Begasungsmodul erreicht ein Oberflächen/Volumen-Verhältnis von $3,8 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$. Der Anteil des Gasvolumens am Gesamtvolumen des Umlaufreaktors ist 0,03.

14.2. Hydrogenase

14.2.1. Reduktive Generierung von NADPH

Bei der reduktiven Darstellung von NADPH aus NADP^+ mit molekularem Wasserstoff und der Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* (PfH) wurde im volumenbegasteten EMR eine $\text{ttn} = 66 \cdot 10^3$ erreicht, eine Steigerung um Faktor 9 gegenüber der Synthese im Satzreaktor. Die maximale Raum-Zeit-Ausbeute beträgt $130 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und wurde ebenfalls im volumenbegasteten EMR erzielt. Die Aktivität der PfH zeigt im Verlauf der repetitive batch Serie eine Zunahme um das Dreifache. Der Verlauf der Aktivität lässt sich als irreversible Folgereaktion simulieren, aber die Ursachen der Steigerung sind ungeklärt.

Die PfH konnte immobilisiert im Wirbelschichtreaktor verwendet werden, dabei zeigte sich Graphit als geeignete Matrix mit einer Retention von mehr als 98%.

14.2.2. Reduktive Regenerierung

Es konnte gezeigt werden, dass eine reduktive Kofaktorregenerierung von NADPH mit der Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* möglich ist. Dabei wurden für den Kofaktor NADPH Zyklenzahlen von $\text{ttn} = 160$ erreicht. Im Gegensatz zur substratgekoppelten Kofaktorregenerierung werden quantitative Umsätze erzielt, da für den Einsatz von Wasserstoff keine thermodynamische Limitierung des Umsatzes auftritt. Die Kofaktorregenerierung konnte im Satzreaktor und unter Rezyklierung beider Enzyme durch Ultrafiltration im repetitive batch durchgeführt werden.

14.3. Homogene Katalyse

Das Chemzym erwies sich im kontinuierlichen Einsatz als nicht stabil, so dass keine kontinuierliche Synthese analog zum enzymatischen System möglich war.

TABELLE 14.1.: Vergleich der makromolekularen Katalysatoren Chemzym (PyrPhos **33**) und Enzym (*Pf*H)

	Poly-PyrPhos (33)	<i>Pf</i> Hydrogenase	
Molekulargewicht	30	153	kg mol ⁻¹
Retention ^a	(0,998)	Quantitativ	
Desaktivierung	4	1	10 ⁻² h ⁻¹
Aktive Zentren	11	1	
ttn _{max}	10	66	10 ³
tof (Satzreaktor)	0,27 bar ⁻¹	84	min ⁻¹
Raum-Zeit-Ausbeute ^a	(52)	130	g L ⁻¹ d ⁻¹

^avergleiche Kapitel 7 auf Seite 55.

14.4. Gemeinsamkeiten und Unterschiede

In der Tabelle 14.1 sind die Eigenschaften der Katalysatoren zusammenfassend gegenübergestellt. Das Enzym ist aufgrund seiner höheren Stabilität und Aktivität dem Chemzym in allen Belangen überlegen. Die Werte für das chemische System beziehen sich zum Teil auf instabile Betriebspunkte und stellen in den meisten Fällen die Obergrenzen dar. Bei den angegebenen Werten für das enzymatische System verhält es sich eher umgekehrt, da es sich bei der verwendeten Enzympräparation nicht um reine Hydrogenase handelt. Daher sind die Werte für die ttn und die tof die Untergrenzen der Aktivität der *Pf* Hydrogenase.

15. Diskussion und Ausblick

*Now fills thy sleep with perturbations.
Ghost of Anne
in Shakespeare, Richard III*

Die Ergebnisse der einzelnen Kapitel wurden dort bereits diskutiert, diese sollen hier die Grundlage für Perspektiven zukünftiger Arbeiten dienen [238].

15.1. Chemischer Membranreaktor

15.1.1. Zugang zu geeigneten Katalysatoren

Bei allen bisherigen Arbeiten mit molekulargewichtsvergrößerten beziehungsweise polymer-vergrößerten Katalysatoren ergaben sich Schwierigkeiten bezüglich des Katalysators. Dies waren vor allem die schlechte Verfügbarkeit eines retentierbaren Makromoleküls und dessen Stabilität unter Reaktionsbedingungen, die besonders in dieser Arbeit den kontinuierlichen Einsatz einschränkte beziehungsweise verhinderte.

Um die Zugänglichkeit zu polymergebundenen Katalysatoren zu verbessern, ist es sinnvoll, eine allgemeinere Synthesestrategie für solche Systeme zu entwickeln. Die allgemeine Anwendbarkeit des Prinzips des CMR wurde eindrucksvoll demonstriert, auch wenn in dieser Arbeit eher die durch die Katalysatoren gesteckten Grenzen sichtbar wurden. Es erscheint logisch, die Synthese von polymervergrößerten Katalysatoren auf eine allgemeinere Basis zu stellen.

Für die Anbindung an feste Phasen existiert ein reicher Fundus von Kopplungsreaktionen, für die auch schon gezeigt werden konnte, dass sie auf homogene Polymere übertragbar sind [37].

Eine mögliche, verallgemeinernde Strategie ist in der Abbildung 15.1 auf der nächsten Seite gezeigt. Ein Polymer und ein Katalysator mit geeigneten aktivierten Gruppen kann gekoppelt werden. Dies erlaubt die konvergente Synthese von aktiviertem Polymer und Katalysator.

Andere funktionelle Gruppen erlauben die nachträgliche Modifikation hinsichtlich gewünschter Eigenschaften wie zum Beispiel Löslichkeit oder Retention durch Einführung von weiteren Modifikatoren. Teilweise ist dieser Ansatz in den Arbeiten von Laue *et.al* [163, 164] verwirklicht, allerdings ist die verwendete Kopplungsreaktion des Katalysators an das Polymer zu spezifisch für das gewählte Polymer, um einen verallgemeinerten Zugang zu polymergebundenen Katalysatoren zu erlauben.¹

Ein allgemeiner vereinfachter Zugang zu polymergebundenen Katalysatoren würde den schnelleren Test von geeigneten Katalysatoren ermöglichen, ohne dass die Gefahr besteht, dass die in die Synthese eines speziellen Katalysators investierte Arbeit durch mangelnde

¹Es handelt sich um eine Hydrosilylierung.

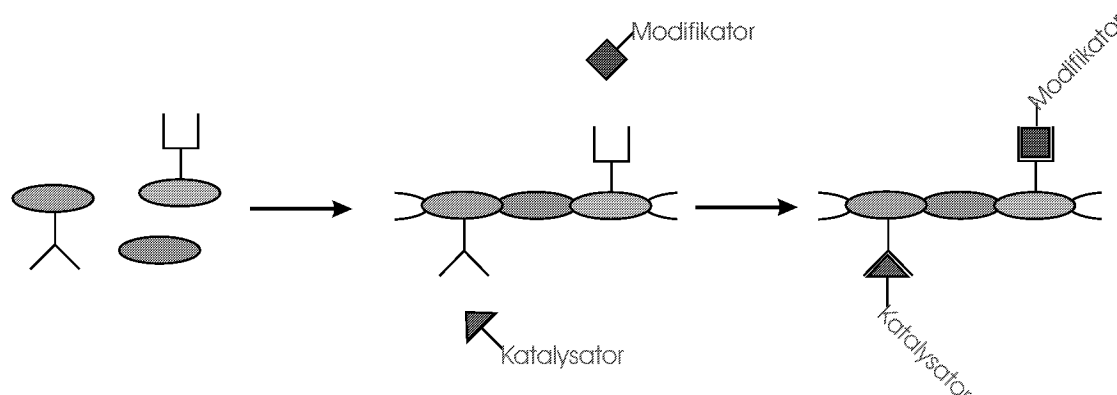


ABBILDUNG 15.1.: Synthesestrategie für molekulargewichtsvergrößerte Katalysatoren

Stabilität zunichte gemacht wird. Bis ein solcher Zugang besteht, ist es jedoch sinnvoll, das Katalysatorsystem vor der Polymeranbindung möglichst genau hinsichtlich Stabilität und Aktivität zu charakterisieren, um vermeintliche Überraschungen [38, 280] zu vermeiden, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit den kontinuierlichen Einsatz verhinderten.

Ein universeller und routinemäßiger Zugang würde auch die Möglichkeit ergeben alternative Polymere [34] zu verwenden. Die frühe Festlegung auf bestimmte Polymere in der Synthese des Chemzyms ist nachteilig, da die Eigenschaften des polymervergrößerten Katalysators sich hinsichtlich Löslichkeit und Retention nicht vorhersagen lassen. Die Anwendung der Katalysatoren in schwer zu handhabenden Lösungsmitteln schränkt deren technische Anwendung unnötig ein, hier kommt der Auswahl eines geeigneten Polymerrückgrats eine besondere Bedeutung zu.

Auf Seiten der Reaktionstechnik hat diese Arbeit gezeigt, dass die direkte Messung von Reaktionsgeschwindigkeiten, Flüssen und Konzentrationen nicht nur einen besseren Einblick in das System erlaubt, sondern darüberhinaus die direkte Regelung von Reaktionsparametern ermöglicht. Dies ist der „off-line“ Messung soweit wie möglich vorzuziehen. So wird die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Flussregelung von Gasen und Flüssigkeiten bereits in anderen laufenden Arbeiten erfolgreich verwendet.

Für die Zukunft des Membranreaktors ist es nötig, die Reaktorkonzepte stärker an die Kinetik und Selektivität des Katalysators anzupassen. Bisher kam immer ein kontinuierlich betriebener Rührkessel (CSTR) zum Einsatz. Alternativen für bestimmte Systeme wurden bereits vorgeschlagen [94, 163]. Diese Lösungen sind jeweils spezifisch für das jeweilige Reaktionssystem. Vor der Realisierung solcher Konzepte ist es aber auch notwendig, die sich ergebenden technischen Probleme –zum Beispiel Sauerstoff- oder Feuchtigkeitsausschluss – zu lösen, oder solche Katalysatorsysteme zu bearbeiten, die nicht so empfindlich sind wie die bisher betrachteten.²

Die Wahl geeigneter Katalysatorsysteme ist aufgrund der langfristigen Bindung von Arbeitskraft bei der Synthese makromolekularer Katalysatoren besonders kritisch. Für die Umsetzung im Membranreaktor kann auf andere Reaktionen zurückgegriffen werden. Hier sind vor allem solche interessant, die eine hohe Katalysatorkonzentration benötigen, da

²Die Probleme mit den Inertbedingungen sind sicherlich auch ein Hinderungsgrund für die Umsetzung im technischen Maßstab.

der CMR die Einstellung von hohen Konzentrationen und dennoch hohen ttn möglich macht [94, 154, 163]. Um nur einige mögliche Reaktionen zu nennen, seien hier die asymmetrische Metathese von Alkenen, die Heck-Kopplung, die Pauson-Khand-Reaktion, die asymmetrische Aldolkopplung, die Baeyer-Villiger-Oxidation und die Kharrash-Addition angeführt [119, 128, 289].³

Vor dem Hintergrund der aufwendigen Synthese eines makromolekularen Katalysators sollten zunächst solche Systeme im Vordergrund stehen, die eine gewisse Anwendungsbreite aufweisen, um für eine technische Anwendung attraktiv zu sein. Die kinetischen Untersuchungen am Monomer müssen im Hinblick auf die Durchführbarkeit im Membranreaktor erfolgen. Dabei müssen die Stabilität unter Reaktionsbedingungen möglichst im Vorfeld der aufwendigen Synthese durch geeignete Methoden der Modellbeschreibung erfasst werden.

15.2. Hydrogenase

Der hyperthermophile Organismus *Pyrococcus furiosus* (Pf) wird auf Stärke und Hefeextrakt unter Zusatz von Spurenelementen in artifiziellem Meerwasser fermentiert [269]. Die dabei erreichten Zelldichten und somit auch die maximale Ausbeute an aktiver Hydrogenase sind gering. Es werden selten mehr als 1,5 g L⁻¹ Biofeuchtmasse erreicht [268], allerdings steht die Fermentationstechnik dieser Zellen erst am Anfang der Entwicklung, und es konnten schon beachtliche Steigerungen erzielt werden [213, 269]. Auch die kürzlich gelungene Aufklärung der Genomsequenz lässt weitere Entwicklungen erwarten [217]. Auf längere Sicht sind damit höhere Zelldichten und auch höhere Ausbeuten aktiven Enzyms realisierbar. Diese sind für eine reaktionstechnische Bearbeitung, und erst recht für eine technische Umsetzung, unbedingte Voraussetzung, nicht zuletzt weil das Enzym sonst einen erheblichen Kostenfaktor darstellt.

Andere Hydrogenasen aus anderen Mikroorganismen sind noch nicht auf ihren Einsatz als Katalysatoren überprüft worden, sondern nur aufgrund ihrer ungewöhnlichen Redoxchemie untersucht worden [23, 89, 143, 157, 210]. Hier sind gerade für das thermisch nicht stabile Produkt NADPH solche Enzyme interessant, die eine niedrigere Aktivierungsenergie haben als die für hohe Temperaturen optimierte Hydrogenase aus dem hyperthermophilen *Pyrococcus furiosus*. Eine höhere Aktivität bei niedrigeren Temperaturen ist hinsichtlich der Stabilität der reduzierten Kofaktoren vorteilhaft und minimiert das Problem des thermolabilen Produkts beziehungsweise Mediators.

Die vordringliche Aufgabe auf dem Gebiet der Hydrogenase I aus *Pyrococcus furiosus* (PfH) ist die Aufklärung der Kinetik und der Ursachen der Aktivierung. Die Aktivierung selbst ist ein eher positiv besetzter Effekt. Bei der NADPH-Synthese ist eine höhere Aktivität vorteilhaft, da sie schneller zu hohen Produktkonzentrationen führt und das Maximum der Produktkonzentration –gegeben durch Gleichung (11.9)⁴– früher und größer auftritt. Dadurch können bei gleicher Enzymmenge Ausbeute und Selektivität gesteigert werden.

Für die Kofaktorregenerierung ist das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Kofaktor für das Erreichen maximaler ttn des Redoxmediators entscheidend [62, 152]. Dies lässt sich nur bei bekannter Aktivität des Gesamtsystems befriedigend vorhersagen. Da dies aber eine nicht vorhersagbare Funktion der Zeit ist,⁵ müssen hier weitere Untersuchungen folgen.

³vergleiche auch die Tabelle 1.1 auf Seite 9

⁴siehe Seite 81

⁵vergleiche Kapitel 11.5.1 auf Seite 85

Ohne eine reproduzierbare Messung sind andere Einflüsse wie pH, Temperatur und die Konzentrationen der Reaktionspartner –um nur die wichtigsten zu nennen– gar nicht quantifizierbar. Dies ist für eine Bearbeitung des Themas unter reaktionstechnischen Gesichtspunkten jedoch von Bedeutung. Sollte die Identifikation der Ursachen nicht gelingen, versagen selbst solche Optimierungsverfahren, die zumindest eine reproduzierbare Messung der Aktivität voraussetzen.

Die Eigenschaft der *PfH* auf geeigneten Oberflächen zu adsorbieren, erübrigt aufwendigere Techniken zur Immobilisierung. Dabei könnte die Immobilisation direkt auf einer dichten Polymermembran zur Wasserstoffversorgung (zum Beispiel Silikon) als Alternative zu anderen Techniken in Betracht gezogen werden.

Auch die direkte elektrochemische (Re)Generierung mit der *PfH* könnte analog zu den Untersuchungen an anderen Systemen erfolgen [55, 105]. Dabei ist die Tendenz zur Selbstimmobilisierung vorteilhaft, die sonst durch aufwendige Techniken erreicht werden muss. Der Einsatz als Katalysator in einer Brennstoffzelle könnte aufgrund der spontanen Adsorption auf stromleitendem Graphit ebenfalls ohne aufwendige Immobilisierungstechniken möglich sein.

15.2.1. NADPH-Synthese

Die Kinetik der Reduktion von NADP^+ und des anschließenden Zerfalls von NADPH lässt sich als irreversible Folgereaktion beschreiben.⁶ Für eine Folgereaktion, bei der man das Zwischenprodukt erhalten möchte, ist der kontinuierlich betriebene Rührkessel (CSTR) immer der schlechteste Reaktor, da dort unter Auslaufbedingungen die Folgereaktion durch die hohe Konzentration des Zwischenprodukts forciert wird. Zwar lässt sich die Geschwindigkeit der ersten Reaktion durch Erhöhung der *PfH*-Konzentration beschleunigen, dennoch ist NADPH ein labiles Zwischenprodukt, so dass sich eine an der Charakteristik des idealen Strömungsrohrs beziehungsweise des idealen Satzreaktors orientiertes Reaktorkonzept als besser herausstellen muss [166]. Dies ließe sich vermeiden, wenn NADPH selektiv abtrennbar wäre, wie es bei anderen Prozessen erfolgreich zur Überwindung von unerwünschten Nebenreaktionen [84], Produktinhibierungen [226] und schlechten Löslichkeiten eingesetzt wurde [158, 167]. Dies ist für die chemisch sehr ähnlichen Moleküle NADP^+ und NADPH ohne chromatographischen Schritt nach bisherigem Kenntnisstand nicht möglich.⁷

Für die Synthese der labilen Nikotinamidkofaktoren wäre ein Fluss möglichst nahe am idealen Strömungsrohr beziehungsweise des Satzreaktors vorteilhaft, eine solche Anordnung ist bei einer irreversiblen Folgereaktion immer der Reaktor mit der besten Ausbeute des Zwischenprodukts [166]. In Bezug auf Wasserstoff handelt es sich dann wegen der geringen Löslichkeit immer um einen Kreuzstrombetrieb beziehungsweise „fed-batch“.⁸

Daher sprechen verschiedene Gründe für die Durchführung in einer Rührkesselkaskade:

- Retention
 - Die Retention des homogen gelösten Enzyms durch Membranen ist durchführbar und lässt sich auf eine Kaskade übertragen.

⁶vergleiche Abschnitt 11.4 auf Seite 80

⁷Eine selektive Fällung gelingt nur mit geringen Ausbeuten.

⁸Wegen der im kontinuierlichen Betrieb höheren Raum-Zeit-Ausbeuten ist die kontinuierliche Betriebsweise im allgemeinen vorzuziehen.

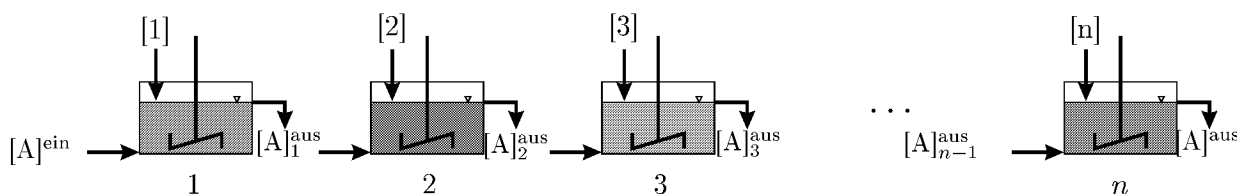


ABBILDUNG 15.2.: Bei einer Rührkesselskaskade lassen sich die Reaktorkonzepte Strömungsrohr beziehungsweise Kreuzstromreaktor realisieren. Auch pH- und Temperaturgradienten lassen sich verwirklichen, da jeder Reaktor getrennt behandelt werden kann. Die Kopplung verschiedener Reaktionen in einzelnen Reaktionsräumen ergibt weitere Möglichkeiten.

- Eine unvollständige Retention bei der Immobilisierung kann durch eine Kaskade mit kontinuierlicher Nachdosierung deutlich verbessert werden.
- Gradienten
 - Jeder Rührkessel ist mit einem eigenen Parametersatz von Temperatur, pH, Druck, Verweilzeit und Katalysatorkonzentration ausgestattet. Dadurch können optimale Gradienten in Bezug auf Aktivität und Stabilität eingestellt werden.
 - Auch die Kopplung unterschiedlicher Reaktionen im EMR ist durch die Serienschaltung möglich [130].
- Kreuzstrom bezüglich Wasserstoff
 - Wasserstofflimitierung – Aufgrund der relativ geringen Wasserstofflöslichkeit in Wasser muss das System in Bezug auf dieses Edukt im Kreuzstrom betrieben werden. Dies lässt sich in einer Rührkesselskaskade am ehesten verwirklichen.
 - pH-Stat – Für die Aufarbeitung sollte mit möglichst wenig Salzfracht aus der Pufferung gearbeitet werden [215]. In einem einzelnen CSTR lässt sich der pH besser kontrollieren und konstant regeln. Dies ist in einem Strömungsrohr technisch kaum möglich, ohne Gradienten und lokale Maxima in Kauf zu nehmen.

Bei der Kofaktorregenerierung verhindern die schlechten Löslichkeiten der Substrate und Produkte hohe ttn des Kofaktors, dafür bietet sich der Einsatz von echten oder membran-gestützten Mehrphasensystemen an [12, 84, 158]. Die Trennung der Reaktionsräume und die damit verbundene Entkopplung der Reaktionsbedingungen für Regenerierung und Reduktion des Edukts kann in diesem Zusammenhang auch in Betracht gezogen werden.⁹

Da die *PfH* auch andere Substrate neben NADP^+ akzeptiert, ist eine reduktive Regenerierung von anderen Kofaktoren oder Mediatoren wie zum Beispiel Methylviologen eine Möglichkeit, ein thermisch stabileren Mediator zu erhalten.¹⁰ Damit wäre der Temperaturbereich der Regenerierung nicht mehr durch den Kofaktor beschränkt. Andere Hydrogenasen könnten hier das Spektrum der Kofaktoren zusätzlich erweitern [23, 89, 143, 258]. Besonderes Augenmerk wäre zum Beispiel auf die reduktive Regenerierung von FADH_2 oder PQQ zu

⁹Dies wird in Anbetracht der Wahrung möglicher Patentansprüche hier jedoch unterlassen.

¹⁰Methylviologen ist elektrochemisch zugänglich, trotzdem ist die Anwendung von Wasserstoff attraktiv, da keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz der Enzyme vor eventuellen Elektrodenprozessen getroffen werden müssen.

richten, deren Regenerierung mit Wasserstoff nicht beschrieben ist und für die nur wenige effektive Systeme zur reduktiven Regenerierung beschrieben sind.

16. Material und Methoden

16.1. Apparate und Bauteile

Massenflussmesser	Bronkhorst B.V (Niederlande)
Autoklav	Werkstätten des Forschungszentrums Jülich
Membranpumpen	vacubrand
	Büchi, Constanz, Schweiz
Magnetrührer	IKA Laboratoriumstechnik
YM10 Ultrafiltrationsmembran	Amicon, Düsseldorf
MPF-50 Filtrationsmembran	Koch Membrane Systems, Wilmington, USA
Druckhalteventil	JASCO, Düsseldorf
Zahnradpumpen	Verder, Düsseldorf
BAS 100 B/W Version 2.3	Bioanalytical Systems, West Lafayette, Indiana, USA
Spritzen	Hamilton (Chromatographie Service, Langerwehe)
Glaskapillaren	Supelco (Sigma, Steinheim)
Glasgeräte	Werkstätten des Forschungszentrums
Kapillarelektrophorese:	
PACE/MDQ	Beckman Coulter
Gaschromatographie:	
Agilent 6890 Gaschromatograph	Agilent Technologies, Heilbronn
Chirasil Val-Kapillarsäule	Varian Deutschland GmbH
Chirasil Dex-Kapillarsäule	Varian Deutschland GmbH
P-500 Wechselkolbenpumpe	Amersham Pharmacia Biotech
Klemmringverschraubungen und Ventile	Swagelock (B.E.S.T., Köln)
	Upchurch Scientific (GAT, Hamburg)
	AGA Gas GmbH, Krefeld
Getriebe	RS-Elektronik (Mörfelden-Walldorf)
Glasgefäße	CS Chromatographieservice, Langerwehe
	Werkstätten des Forschungszentrums
	CS Chromatographieservice, Langerwehe
Polymerschläuche	

16.2. Thermische Massenflussmessung

Das Prinzip der thermischen Massenflussmessung beruht darauf, dass sich die Temperaturdifferenz ΔT eines Fluids bei Zuführung einer Wärmemenge Q proportional zur Masse m und der Wärmekapazität c_p verhält:

$$\Delta T = c_p m Q \quad (16.1)$$

Zur Messung werden drei aufeinander folgende Widerstände verwendet. Zwischen dem letzten und dem ersten wird die Temperaturdifferenz bestimmt, während der mittlere eine Wärmemenge Q an das strömende Fluid abgibt. Alternativ kann auch die Temperaturdifferenz konstant gehalten werden, indem die Wärmemenge variiert wird. Durch Serienschaltung vieler Messungen kann mit geringer Wärmemenge und mit Temperaturdifferenzen von insgesamt etwa 1 K eine hohe Genauigkeit und zeitliche Auflösung erzielt werden.

Der Zusammenhang nach (16.1) ist nur unter bestimmten Voraussetzungen erfüllt. Es wird idealer Wärmeübergang angenommen. Damit zumindest ein linearer Zusammenhang gegeben ist, wird ein laminarer Fluss durch Strömungslaminatoren erzwungen. Dies schränkt den effektiven Messbereich ein, da für höhere Flüsse ein Strömungsteiler eingesetzt werden muss, und nur ein definierter Anteil des Fluids durch das Messrohr gelangt. Weiterhin ist die Wärmekapazität c_p eine Funktion von Druck, Temperatur und der Konzentration gelöster Stoffe. In der Praxis geht man daher so vor, dass man eine Kalibrierung mit dem geförderten Fluid durchführt.

Die Geräte sind kommerziell von verschiedenen Anbietern erhältlich, für diese Arbeiten wurden die Geräte der Firma Bronkhorst verwendet.

16.2.1. Wasserstoffflussmessung

Für die Messung der Wasserstoffaufnahme wurde eine Kombination von volumetrischer und massenflussbasierter Messung gemäß Abbildung 16.1 entworfen und aufgebaut.

Die gesamte Anlage kann über das Ventil 1 mit dem gewünschten Gas befüllt werden. Das Volumen des Vorratsbehälters V_1 wird separat ermittelt. Dieses bekannte Volumen dient zur Bestimmung aller anderen Volumina über die Gasgleichung. Dazu wird das Ventil 2 nach Befüllung mit ausreichendem Druck geschlossen und die gesamte Anlage mit Hilfe der Vakuumpumpe (HV) evakuiert. Danach wird 3 wieder geschlossen und der Druck, der sich nach Öffnen von 2 einstellt, dient zur Ermittlung des Gesamtvolumens $V_1 + V_2$. Die Änderung des Drucks und das bekannten Volumens kann dann zur Verbrauchsmessung oder zur Bestimmung anderer Volumina genutzt werden. Das Ventil 4 dient zur Druckregelung im Reaktor. Es ist von der Firma Bronkhorst als Sonderanfertigung nach Vorgabe von Fluss- und Differenzdruckbereich gefertigt.

Alle Verschraubungen wurden in 6 mm Edelstahl ausgeführt. Für die Verbindung zum Reaktor hat sich die Verwendung von flexiblen $\frac{1}{16}$ Zoll Stahl-Kapillaren bewährt.

Der Aufbau erlaubt die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit über die Verfolgung des Wasserstoffflusses. Die mögliche Datenaufnahmefrequenz lag dabei bei 10 Hz, aus praktischen Gründen wurde in der Regel mit 0,2 – 0,1 Hz gearbeitet.

16.2.2. Modifikation an der Wechselkolbenpumpe P-500

Zur Dosierung von Flüssigkeiten wurde eine Ansteuerung von Pumpen des Typs P-500 (Pharmacia) etabliert. Dafür wurde eine Regelstrecke aufgebaut, und für die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Versuche und die kontinuierlichen Versuche im CMR von S.Laue [163] eingesetzt. Es wurden Wechselkolbenpumpen des Typs P-500 mit Untersetzungsgetrieben der Firma RS Components umgebaut, so dass die Geschwindigkeit der Pumpe um den Faktor 12,5 vermindert wurde. Dazu waren zusätzliche Modifikationen nötig, da sich der Drehsinn der Welle änderte. Diese wurden in Zusammenarbeit mit den elektronischen Werkstätten des IBT durchgeführt. Als sich im Laufe der Arbeiten immer mehr herausstellte, dass das

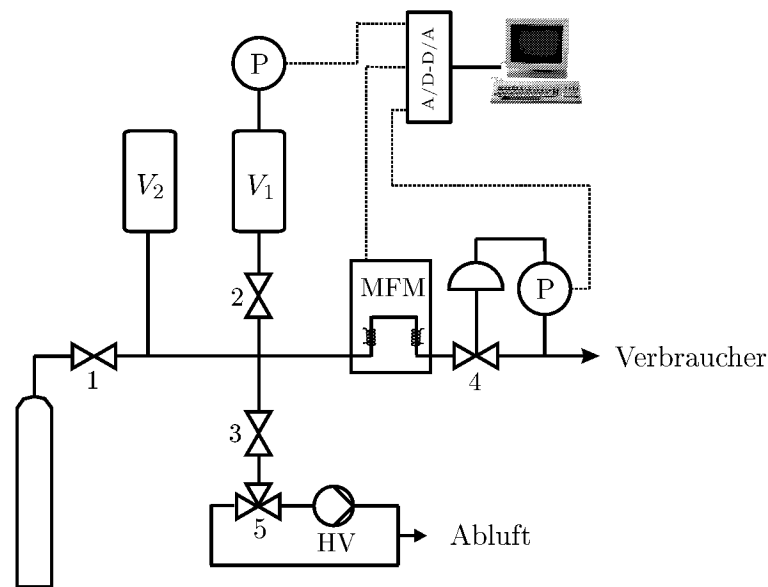


ABBILDUNG 16.1.: Schematischer Aufbau der Gasverbrauchsmessung
(V: Vorratsbehälter, P: Druckaufnehmer, MFM: Massenflussmesser, HV: Vakuumpumpe, A/D-D/A: Analog/Digital-Wandler, 1–3: Membranventile, 4: Tellerventil (Bronkhorst), 5: Dreiwegeventil)

zentrale Stellventil der Schwachpunkt der verwendeten Pumpen war, wurde dies durch ein 2/2-Wege-Kugelventil der Firma Swagelock ersetzt, das den Anforderungen besser entsprechen sollte.

Untersetzungsgetriebe Es wurde ein 2:25-Zahnradgetriebe aus dem Modellbaubereich (Abbildung 16.2) verwendet. Dies wurde zwischen dem Schrittmotor und dem Schneckengetriebe des Kolbenantriebs angebracht. Dadurch wurde die Auflösung im typischen Flussbereich deutlich verbessert, und der maximale Bereich von 500 mL h^{-1} auf 40 mL h^{-1} verkleinert.

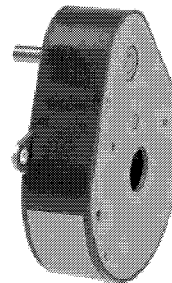
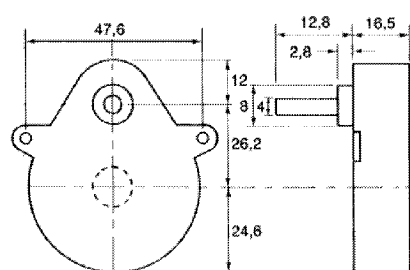


ABBILDUNG 16.2.: Schemazeichnung des verwendeten Untersetzungsgetriebes (Maße in mm) und Foto wie es für die Umrüstung verwendet wurde (RS-Elektronik, Best-Nr. 336-450)

Ansteuerung Für die Ansteuerung wurde ein Frequenzgenerator gebaut (Elektronikwerkstatt des IBT, Forschungszentrum Jülich),¹ der die Vorschubfrequenz des Schrittmotors der Pumpe direkt vorgibt. Die Steuerung der Pumpe wurde computergestützt –unter Umgehung der internen Elektronik– realisiert. Dazu wird das Ausgangssignal des Massenflussmessers mit dem Sollwert verglichen und die Eingangsspannung des Frequenzgenerators entsprechend der Regelparameter variiert. Die Regelparameter wurden unter Benutzung einer Proportional-Integral-Differential-Regelung (PID-Regelung) in dem Programm LabView® realisiert. Dabei wurden die Regelparameter empirisch optimiert. Als kritisch für die Regelung stellte sich der Umschaltzeitpunkt des Ventils heraus, da dort durch die Schaltzeit des Ventils für kurze Zeit keine Förderung durch die Pumpe erfolgt. Das wurde durch die oben beschriebenen Undichtigkeiten des Ventils verstärkt. Bei einem minimalen Fluss in die entgegengesetzte Richtung wird von den Massenflussmessern ein sehr hohes Ausgangssignal erzeugt. Dies führt wiederum dazu, dass die Pumpe heruntergeregelt wird. Um dies zu vermeiden, musste ein sehr hoher dämpfender Differentialanteil in der Regelung gesetzt werden, damit dies nicht zum zeitweiligen Stoppen der Pumpe führt.²

Austausch des Stellventils Von den getesteten Ventilen hatten sich 2/2-Kugelventile der Firma Swagelock aus dem Hydraulikbereich bewährt. Diese waren am besten geeignet, die sauerstoff- und wasserfreien Bedingungen aufrecht zu erhalten. Da das Medium dabei nur mit Edelstahl in Berührung kommt, waren auch keine Korrosionsschäden zu befürchten. Für den Umbau wurde ein Adapter gefertigt. Der Antrieb erfolgt über den in der Pumpe vorhandenen Servomotor, dessen Schaltweg verlängert wurde, da sich der Schaltwinkel gegenüber dem herkömmlichen Ventil vergrößert.

16.3. Arbeitsvorschriften

16.3.1. Allgemeines

Wenn nicht anders angegeben:

- Alle Lösemittel wurden mit Helium/Argon entgast, und ohne weitere Trocknung oder Reinigung direkt eingesetzt.
- Empfindliche Substanzen wurden mittels Schlenk-Technik unter Stickstoff- oder Argon-Atmosphäre gehandhabt.

16.3.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren mindestens von analytischer Qualität (p.a.) und wurden soweit nicht anders angegeben von der Sigma Chemikalien GmbH, Steinheim bezogen. Für den Einsatz unter Ausschluss von Sauerstoff wurden die Lösungsmittel mit Helium und Argon entgast. Für präparative und analytische Umsetzungen wurde mit Schlenk-Techniken und unter Verwendung von gasdichten Spritzen gearbeitet, soweit dies nötig erschien.

¹Ein durch Strom oder Spannung extern ansteuerbarer Frequenzgenerator mit einer geforderten Ausgangsfrequenz von 0 – 153 Hz war kommerziell nicht verfügbar.

²Die verwendete Ansteuerung lässt sich auch für nicht mit einem Untersetzungsgetriebe modifizierten Pumpen verwenden, erwartungsgemäß muss dafür nur der Proportional-Anteil des verwendeten Regelparameters um den Faktor der Untersetzung korrigiert werden.

NADP ⁺	Jülich Fine Chemicals, Jülich
NADPH	Jülich Fine Chemicals, Jülich
NAD ⁺	Jülich Fine Chemicals, Jülich
NADH	Jülich Fine Chemicals, Jülich
ADH-M	Jülich Fine Chemicals, Jülich
Gase	Messer-Griesheim (mindestens 5.0 Qualität)
Deuterium	Messer-Griesheim (3.0)
Graphitträger	Sigradur

16.3.3. Hydrierungen im Konstantdruckautoklaven

Die Umsetzungen wurden in einem Autoklaven (Nennvolumen= 100mL, Flüssigvolumen= 50mL) mit Glaseinsatz und einem teflonierten Magnetrührstab durchgeführt. Dabei wurde folgender Ablauf eingehalten, soweit nicht anders angegeben:

1. Im Glaseinsatz wird die Substratmenge eingewogen und mit dem Rührstab in den Autoklaven gebracht.
2. Mit Hilfe einer Ölschieberdrehpumpe wurde das gesamte Volumen evakuiert.
3. Der Katalysator und eventuelle Zusätze werden in einem Schlenkrohr im entgasten Lösemittel gelöst und in den evakuierten Autoklaven gespült.
4. Der Rührer wird zum Lösen des Edukts für 2 – 3 min eingeschaltet.
5. Der gewünschte Wasserstoffdruck wird beaufschlagt, und die Reaktion durch Einschalten des Rührers gestartet. Durch Rühren wird die Diffusionshemmung der Reaktion aufgehoben.

Einen typischen Reaktionsverlauf zeigt die Abbildung 6.3 auf Seite 43.

16.3.4. Hydrierung mit limitierendem Wasserstoffeintrag

In einem 500 mL-Glasgefäß mit tefloniertem Magnetrührstab werden 660mg 2-Acetylamino-3-phenyl-acrylsäure, 210mg 4-Diphenylphosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-pyrrolidin-1-carboxysäure-butylester (BPPM) (18) und Rhodium-biscyclooctadien-tetrafluorosulfonat in 250 mL 2-Propanol gelöst, und durch Durchströmen mit Helium unter Argon-Atmosphäre entgast. In die Lösung wird ein mit Wasserstoff gespülter Teflonschlauch eingebracht. Dieser wird auf einen Innendruck von 0,8 MPa gehalten, und der dazu nötige Wasserstofffluss aufgezeichnet. Der Umsatz wird gaschromatographisch durch Probennahme aus dem drucklosen flüssigen Volumen verfolgt.

16.3.5. Hydrierungen im volumenbegasten Umlaufreaktor

Vor dem Start der Reaktion wird das Reaktionssystem, bestehend aus der Pharmacia-P-500 Pumpe mit Massenflussmessern und dem Reaktor aus Abschnitt 3.4 auf Seite 19, mit entgastem Lösungsmittel gespült. Die Gasseite wird mit Wasserstoff gespült. Der Reaktor wird auf 40 °C thermostatisiert. Für das chemische System wird die Membran zunächst in der passenden Größe ausgestanzt, für die Ultrafiltration des Enzyms wird eine handelsübliche

Membran passender Größe verwendet. Die Membran wird vor dem Versuch mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wird sie unter Vermeidung von Gasblasen in den Membranreaktor gelegt und mit entgastem Lösemittel gespült. Es wird anschließend mit mindestens 5 Reaktorvolumina Substratlösung gespült. Der Katalysator wird in entgaster Lösung gelöst in den Reaktor gespült. Der Reaktorauslauf wird fraktioniert gesammelt und analysiert. Der gewünschte Druck wird über Membranventile (AGA) eingestellt: für die flüssigen Seite befindet es sich im Auslauf; für die Gasseite regelt es die Nachdosierung aus der angeschlossenen Wasserstoffbombe.

16.3.6. Bestimmung der Wasserstofflöslichkeiten

Der Reaktionsautoklav wurde mehrfach evakuiert und mit Argon gespült. Das entgaste Lösungsmittel wurde in den evakuierten Autoklaven gesaugt. Nach Beaufschlagung mit Wasserstoff wurde der Rührer gestartet und der Wasserstofffluss aufgezeichnet. Die Messung wurde gestoppt, wenn der Fluss wieder auf den Nullpunkt abgesunken war. Die Wasserstoffmenge wurde durch numerische Integration des Flusses über die Zeit bestimmt. Ein typisches Experiment findet sich in Abbildung C.1 auf Seite 150.

16.4. Satzreaktorversuche zur NADPH-Synthese und zur Kofaktorregenerierung

In Reaktionsgefäßen aus Glas, mit einem Magnetrührstab die mit einem teflonierten Gummiseptum verschlossen werden ($V = 2$ mL; CS Chromatographieservice), wird die Reaktionslösung eingefüllt (typisches Gesamtvolumen $V_{fl} = 1$ mL). Durch Spülen mit Helium und anschließend Wasserstoff wird entgast, und die Atmosphäre gegen Wasserstoff ausgetauscht. Die Reaktion wird durch Zugabe von Enzym gestartet. Mit einer gasdichten Spritze werden Proben (ca. 20 μ L) entnommen und analysiert.

16.4.1. Repetitive Batch mit PfH

Eine Ultrafiltrationszelle (Nennvolumen 6 mL, Flüssigvolumen 3 mL, Amicon) mit hängend angeordnetem magnetischem Rührer wurde so modifiziert, dass unter Ausschluss von Sauerstoff gearbeitet werden konnte. Dazu wurde das Überdruckventil durch einen Stopfen ersetzt und in der Zuleitung ein Dreiwegeventil eingebaut (vergleiche Abbildung 11.6 auf Seite 84). Damit ein konstanter Druck beaufschlagt werden kann, wurde ein Absperrventil in den Auslass integriert (Upchurch, GAT). Die Zelle mit eingelegter Ultrafiltrationsmembran (YM10, Amicon) wurde zweimal mit entgastem Puffer gespült und das Volumen soweit wie möglich entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Membran nicht austrocknet. Die Reaktionslösung wurde im Argon-Gegenstrom eingefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym gestartet. Während der Reaktion wurde das Ventil periodisch geöffnet, um Proben des Reaktorinhalts zu analysieren.³ Die Zelle wurde nach Abschluss der Reaktion bis auf ein Restvolumen (ca. 0,2 mL) entleert, und die Reaktion durch Zugabe von 3 mL frischer Substratlösung wieder gestartet. Durch das verbliebene Restvolumen sind die Startkonzentrationen des Produkts in den folgenden Läufen nicht null. Weiterhin konnte das im Reaktor

³Ein empirisch ermittelter Vorlauf von etwa 30 – 50 μ L wurde jeweils verworfen.

verbleibende Restvolumen nicht genau bestimmt werden, so dass die Umsätze für die Kofaktorregenerierung nur relativ bestimmt wurden.

16.4.2. Kontinuierlicher Wirbelschichtreaktor mit *PfH*

Das Fließbild ist in der Abbildung 11.10 auf Seite 90 gezeigt. Die Träger wurden eingefüllt und der Reaktor wurde verschlossen. Anschließend wurde der Reaktor zum Erreichen von Sauerstoffausschluss mit 10 Volumina (250 mL) entgastem demineralisierten Wasser gewaschen und abschließend zum Einstellen der Einlaufkonzentration mit 5 Volumina des 100 mM Kaliumphosphatpuffers (pH=8) mit NADP^+ gespült. Die Schlauchmembran wurde zunächst mit Wasserstoff gespült und anschließend auf einen Innendruck von 4 bar eingestellt. Der Auslauf des Reaktors wurde ständig mit Argonüberdruck von 1,1 bar gespült. Als Umlaufpumpe wurde eine magnetgekoppelte Zahnradpumpe (Verder) eingesetzt. Die Verweilzeit wurde über die massenflussgesteuerte Wechselkolbenpumpe (Pharmacia) gesteuert. Die Umlaufgeschwindigkeit wurde so geregelt, dass das Wirbelbett gut durchmischt war, aber keine Träger ausgespült wurden ($1 - 2 \text{ L min}^{-1}$). Für Graphit wurde zusätzlich ein Stahlnetz vor die Ansaugöffnung gelegt. Die Handhabung sauerstoff- oder feuchtigkeitsempfindlicher Feststoffe ist im allgemeinen schwieriger als die Handhabung von Flüssigkeiten, für die Schlenk-Techniken angewandt werden können. Daher war es nicht möglich, die Glasträger mit *PfH* vorzubelegen, und anschließend unter Inertbedingungen in den Umlaufreaktor zu überführen. Es wurden Glasträger nach [172] und Graphitträger (Sigradur; 0,3 mm) verwendet.

16.4.3. Analytik

16.4.3.1. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde durch Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue G250 bestimmt [232]. Die Kalibrierung wird mit Standards von Albumin aus Rinderserum (BSA) aufgenommen. Die Absorption wird bei $\lambda=620 \text{ nm}$ gemessen.

16.4.3.2. Analytik der Pyridinnukleotide

Das UV-Spektrum der oxidierten und reduzierten Formen ist unterschiedlich genug, um UV-Spektrometrie zur Verfolgung von Oxidations- und Reduktions-Reaktionen zu ermöglichen. Hierfür wird die für die reduzierte Form spezifische Absorption mit dem Maximum der Absorption bei 340 nm genutzt, jedoch ist dies für eine Analyse der Selektivität und des Umsatzes nicht ausreichend. Vor allem bei höheren Konzentrationen ist die Absorption so stark, dass sie ohne Verdünnung nicht mehr direkt zu bestimmen ist.⁴ Es stand für die Analytik verschiedener Nukleotide eine durch genetischen Algorithmus optimierte Methode zur Verfügung [43]. Diese hatte zusätzlich den Vorteil der geringen Probenmenge von $\leq 20 \mu\text{L}$, so dass diese als Referenzanalytik ausgewählt wurde. Die Stabilität der reduzierten Formen ist auch ein analytisches Problem, da die Proben nur sehr begrenzt lagerfähig sind, und sie durch Einfrieren ebenfalls teilweise zerstört werden. Da für die Zerfallsprodukte keine Standards zur Verfügung stehen, ist die Verwendung interner Standards aufgrund der nicht geschlossenen Massenbilanz unumgänglich.

⁴In einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke ist die Konzentrationsgrenze schon bei 0,2 mM erreicht.

Kapillarelektrophorese: Nukleotide Die Methodenentwicklung ist ausführlich beschrieben [43, 44].

- Kapillare (CElectFS50, SUPELCO):
 - Länge bis zum Fenster 43 cm
 - Gesamtlänge 50 cm
 - Innendurchmesser 50 μm
 - Aussendurchmesser 350 μm
- Puffer:
 - $[\text{KP}_i]=40 \text{ mM}$
 - $[\text{Borat}]=10 \text{ mM}$
 - $\text{pH}=8,5$
- Konditionierung der Kapillare erfolgt durch Spülen mit der jeweiligen Lösung, die Mengenangaben sind mit einem großen Fehler behaftet. Im allgemeinen wird so lange und oft gespült, dass die Kapillare sich im Gleichgewicht mit der Lösung befindet (Volumen der Kapillare ca. 1 μL , Fluss $\approx 45 \mu\text{L min}^{-1}$).
 1. Wasser (90 μL)
 2. 0,1N Natronlauge (90 μL)
 3. Wasser (90 μL)
 4. Puffer (360 μL)
- Probe
 - Die Probe wird ggf. mit Puffer verdünnt und mit 1 mM Uridin als internem Standard versetzt
 - Druckinjektion, typisch 34 mbar für 5 s
- Trennung bei 30 kV und 40 °C

Ein exemplarisches Elektropherogramm bei 254 nm zeigt die Abbildung 16.3. Die Methode ist nicht für sehr hohe Pufferkonzentrationen in der Probe geeignet, so führen 0,1 M Fremdsalzkonzentrationen zu Verschiebungen in den Migrationszeiten. Die Probenstabilität als Funktion der Anfangskonzentration ist in der Abbildung 16.4 gezeigt. Man erkennt die Abweichung für NADPH bei höheren Konzentrationen.

Hydrierung Die Analyse von **8** und die Enantiomerentrennung von **11** erfolgt mit Dimethyl- β -Cyclodextrin als chiralem Selektor [43, 44].

- Kapillare (CElectFS25, SUPELCO; uncoated silica ID25, OD350, Polymicro Technologies):
 - Länge bis zum Fenster 50 cm
 - Gesamtlänge 57 cm

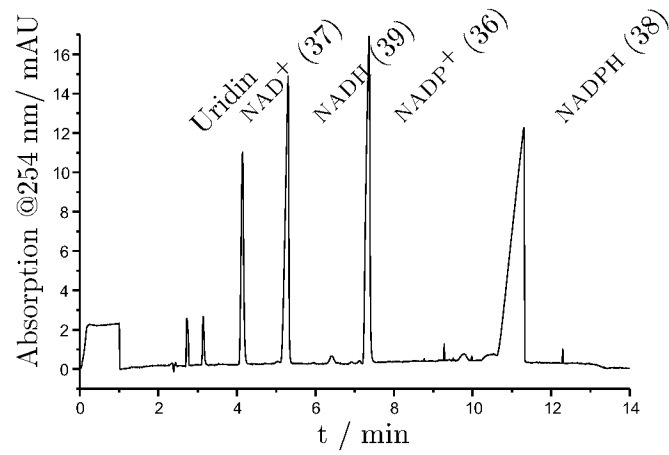


ABBILDUNG 16.3.: Elektropherogramm der Nukleotidtrennung

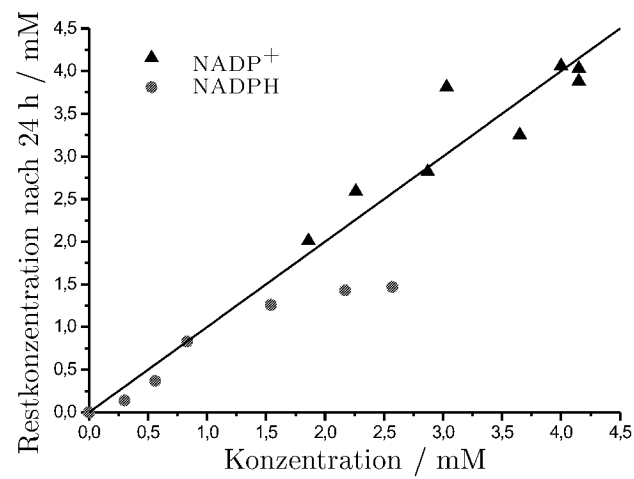


ABBILDUNG 16.4.: Probenstabilität von NADP^+ und NADPH bei 4 °C und pH=8 als Funktion der Anfangskonzentration

- Innendurchmesser 25 μm
- Aussendurchmesser 350 μm
- Puffer:
 - $[\text{KP}_i]=125 \text{ mM}$
 - $[\text{Dimethyl-}\beta\text{-Cyclodextrin}]=25 \text{ mM}$
 - $\text{pH}=10,2$
- Konditionierung der Kapillare erfolgt durch Spülen mit der jeweiligen Lösung, die Mengenangaben sind mit einem großen Fehler behaftet. Im allgemeinen wird so lange und oft gespült, dass die Kapillare sich im Gleichgewicht mit der Lösung befindet (Volumen der Kapillare ca. 0,25 μL , Fluss $\approx 45 \mu\text{L min}^{-1}$).
 1. Wasser (90 μL)
 2. 0,1N Natronlauge (90 μL)
 3. Wasser (90 μL)
 4. Puffer (360 μL)
- Probe
 - Die Probe wird ggf. mit Wasser verdünnt
 - Druckinjektion, typisch 34 mbar für 5 s
- Trennung bei 30 kV und 40 $^{\circ}\text{C}$

Ein typisches Elektropherogramm findet sich in [43, 44].

16.4.4. Cyclovoltammetrie

Die Experimente wurden in einer luftdichten Zelle mit Dreielektrodenanordnung durchgeführt. Die Arbeitselektrode war eine Scheibenelektrode aus Glaskohlenstoff (3 mm). Die Gegenelektrode war ein Platindraht. Alle Potentiale wurden gegen eine $\text{Ag} | \text{AgCl} | 3 \text{ M KCl}$ Elektrode gemessen. Die Experimente wurden unter sauerstofffreien Bedingungen durchgeführt, indem die Lösungen entgast wurde und die elektrochemische Zelle mit Stickstoff gespült wurde. Die Experimente wurden mit einer Lösung von 340 $\mu\text{g PfH}$ in Kaliumphosphatpuffer ($\text{pH} = 8$) durchgeführt. Zunächst wurden die Experimente unter Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt, wobei die Temperatur in 10 $^{\circ}\text{C}$ Schritten von 40 $^{\circ}\text{C}$ auf 80 $^{\circ}\text{C}$ erhöht wurde. Die Experimente wurden nach Austausch der Gasphase gegen Wasserstoff bei 80 $^{\circ}\text{C}$ begonnen und die Temperatur schrittweise auf 40 $^{\circ}\text{C}$ gesenkt. Während des Experiments wurde die Temperatur konstant gehalten und mit Vorschubgeschwindigkeiten variiert. Zwischen den Zyklen wurde die Lösung gerührt.

Teil V.

Anhang

A. Herleitung der Gleichgewichtskonstanten¹

Finally, a word of encouragement to those who are frightened by mathematics. The mathematics involved in actually applying, as opposed to deriving, [...] is quite trivial. It involves little more than adding and multiplying. It is in fact possible to make the applications, by filling in the necessary formulae in a routine way, without even understanding where the formulae have come from. I do not, however, advocate this practice.

David M. Bishop [27]

Die Reduktion von NADP^+ zu NADPH mit molekularem Wasserstoff (Abbildung 11.1 auf Seite 78) lässt sich als Redoxreaktion auffassen, deren Gleichgewichtskonstante K wie folgt aufgestellt werden kann:

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{NADPH}]}{[\text{H}_2][\text{NADP}^+]} \quad , \quad (11.1)$$

beziehungsweise mit dem Henryschen Gesetz (6.1) (siehe Seite 42) ergibt sich

$$K_p = K H_{\text{H}_2} = \frac{[\text{H}^+][\text{NADPH}]}{p_{\text{H}_2}[\text{NADP}^+]} \quad . \quad (\text{A.1})$$

Hierbei ist zu beachten, dass im folgenden die Aktivitätskoeffizienten gleich eins gesetzt sind, und die Konzentration gleich der Aktivität angenommen wird.²

Im Anschluss soll die Gleichgewichtskonstante und der thermodynamisch erreichbare Umsatz abgeschätzt werden. Dazu sind einige grundsätzliche Betrachtungen zum Redoxpotential der Halbzellen in wässriger Lösung und den daraus ableitbaren Größen nötig.

A.1. Betrachtung zum pH

Der pH-Wert einer wässrigen Lösung ist definiert als

$$\text{pH} = -\lg \frac{[\text{H}^+]}{\text{M}} \quad . \quad (\text{A.2})$$

Für die folgenden Betrachtungen wird die Protonenkonzentration als Funktion der üblichen Messgröße pH benötigt, die sich unter Anwendung der Potenzgesetze wie folgt schreiben lässt:

¹Die Nomenklatur in diesem Kapitel folgt möglichst den Vorschlägen der IUPAC [127]

²Dies gilt streng genommen nur für unendlich verdünnte Lösungen, bei denen die Moleküle untereinander keine Wechselwirkungen zeigen [14].

$$[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}} \text{ M} \quad (\text{A.3})$$

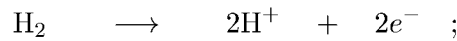
$$e^{[\text{H}^+]} = e^{10^{-\text{pH}}} \text{ M}$$

$$[\text{H}^+] = e^{-\text{pH}(\lg e)^{-1}} \text{ M} \quad (\text{A.4})$$

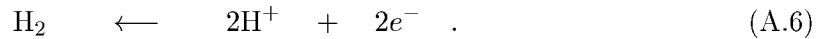
$$[\text{H}^+]^2 = e^{-2\text{pH}(\lg e)^{-1}} \text{ M}^2 \quad (\text{A.5})$$

A.2. Das Redoxpotential der Wasserstoffhalbzelle

Bei der Oxidation von Wasserstoff in wässriger Lösung werden zwei Protonen gebildet:



beziehungsweise aufgrund der Vorzeichenkonventionen in der elektrochemischen Notation in Reduktionsrichtung notiert:



Das Redoxpotential der Halbzelle H^+/H_2 ist daher vom pH der Lösung abhängig. Die Normalwasserstoffhalbzelle (NHE) ist bei einer Konzentration von $[\text{H}^+]=1 \text{ M}$ als Bezugselektrode³ und einem Wasserstoffdruck von $p_{\text{H}_2} = 1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$ der elektrochemischen Spannungsreihe definiert:⁴

$$E = E_0 - \frac{RT}{\nu_e F} \ln \frac{p_{\text{H}_2} \text{ bar}^{-1}}{[\text{H}^+]^2 \text{ M}^{-2}} , \quad (\text{A.7})$$

mit R : allgemeine Gaskonstante, T : absolute Temperatur, ν_e : Anzahl der Elektronen und F : Faraday-Konstante. Für diese Referenzelektrode wird $E_0 \equiv 0$ definiert, so dass sich (A.7) zu

$$E = -\frac{RT}{\nu_e F} \ln \frac{p_{\text{H}_2} \text{ bar}^{-1}}{[\text{H}^+]^2 \text{ M}^{-2}} \quad (\text{A.8})$$

vereinfacht. Einsetzen von (A.5) unter Beachtung $\nu_e = 2$ und der Potenzgesetze ergibt schließlich die Abhängigkeit des Potentials von p_{H_2} und vom pH:

$$E = -\frac{RT}{2F} \ln (p_{\text{H}_2} \text{ bar}^{-1}) - \frac{RT}{F} \text{pH} (\lg e)^{-1} . \quad (\text{A.9})$$

Für die Standardbedingungen $p_{\text{H}_2} = 1 \text{ bar}$ und $\text{pH} = 0$ werden die Terme in (A.9) gleich null, dies gilt unabhängig von der Temperatur, da die temperaturabhängigen Terme wegfallen. Die Steigung der Kurve $-RTF^{-1}(\lg e)^{-1} = -59 \text{ mV}$ für $T = 298,15 \text{ K}$ zeigt, dass sich das Redoxpotential pro pH -Einheit um 59 mV erniedrigt. Da sich in einer gepufferten Lösung der pH nicht stark ändert, ist bei gegebenem pH das Potential nur noch vom Wasserstoffdruck und somit logarithmisch von der gelösten Wasserstoffkonzentration abhängig. Beispielsweise ergibt sich

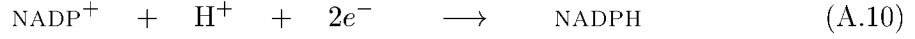
$$E'(\text{pH} = 7; p_{\text{H}_2} = 1 \text{ bar}; T = 298 \text{ K}) = -413 \text{ mV} .$$

³ $\text{pH} = -\lg \frac{1 \text{ M}}{\text{M}} = 0$

⁴ Da die NHE selbst experimentell sehr aufwendig ist, werden praktisch andere Referenzzellen wie zum Beispiel Ag/AgCl eingesetzt. [14, 226, 237]

A.3. Das Redoxpotential der $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -Halbzelle

Für die Reduktion von NADP^+ zu NADPH wird nach



ein Proton benötigt. Mit Hilfe der tabellierten Werte nach Loach [175] lässt sich für die Normalzelle das Potential zu $E_0(\text{NADP}^+/\text{NADPH}) = -117 \text{ mV}$ bestimmen. Dieses Potential bei $\text{pH} = 0$ hat theoretischen Charakter, da sowohl oxidierte als auch reduzierte Form des Kofaktors unter diesen Bedingungen Halbwertszeiten im Sekundenbereich haben.⁵ Mit dem Normalpotential $E_0(\text{NADP}^+/\text{NADPH})$ lässt sich dann das Potential E in der Nernstschen Gleichung für andere Bedingungen und Konzentrationen berechnen.

$$\begin{aligned} E(\text{NADP}^+/\text{NADPH}) &= E_0(\text{NADP}^+/\text{NADPH}) - \frac{RT}{2F} \ln \frac{[\text{NADPH}]}{[\text{NADP}^+][\text{H}^+]} \\ E(\text{NADP}^+/\text{NADPH}) &= -117 \text{ mV} - \frac{RT}{2F} \left(\text{pH}(\lg e)^{-1} + \ln \frac{[\text{NADPH}]}{[\text{NADP}^+]} \right) \end{aligned} \quad (\text{A.11})$$

Gleichung (A.11) zeigt die Abhängigkeit vom pH mit -30 mV pro Änderung um eine Einheit bei konstantem $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -Verhältnis. Damit ergibt sich

$$E'(\text{pH} = 7; T = 298 \text{ K}; [\text{NADPH}] = [\text{NADP}^+]) = -323 \text{ mV} \quad .$$

A.4. Freie Reaktionsenergie und Gleichgewichtskonstante

Die Reduktion von NADP^+ mit Wasserstoff zu NADPH ergibt sich aus der Summe der Halbzellreaktionen (A.6) und (A.10) zu



Die freie Reaktionsenergie ΔG der Reaktion (A.12) ergibt sich aus der Differenz ΔE der Redoxpotentiale der Halbzellreaktionen:

$$\Delta G^0 = -\nu_e F \Delta E \quad (\text{A.13})$$

$$\Delta E = \Delta E(\text{NADP}^+/\text{NADPH}) - \Delta E(\text{H}^+/\text{H}_2) \quad (\text{A.14})$$

Einsetzen der Halbzellreaktionen (A.9) und (A.11) in (A.14) ergibt die Potentialdifferenz in Abhängigkeit der Konzentrationen bzw. des Drucks und des pH:

$$\Delta E = -117 \text{ mV} + \frac{RT}{2F} \left(\text{pH}(\lg e)^{-1} + \ln \frac{p_{\text{H}_2}}{\text{bar}} \frac{[\text{NADP}^+]}{[\text{NADPH}]} \right) \quad (\text{A.15})$$

Analog lässt sich dann mit (A.13) für ΔG , unter Beachtung von $\nu_e = 2$, die folgende Form gewinnen:

$$\Delta G^0 = 234 \text{ mV} F - RT \left(\text{pH}(\lg e)^{-1} + \ln \frac{p_{\text{H}_2}}{\text{bar}} \frac{[\text{NADP}^+]}{[\text{NADPH}]} \right) \quad (\text{A.16})$$

⁵vergleiche auch Abschnitt 9 auf Seite 71

Für äquimolare Konzentrationen, $\text{pH}=7$ und $p_{\text{H}_2} = 1 \text{ bar}$ ergibt sich $\Delta E' = 90 \text{ mV}$ und $\Delta G' = -17 \text{ kJmol}^{-1}$. Damit lässt sich die Gleichgewichtskonstante K berechnen:

$$K = e^{-\frac{\Delta G'}{RT}} \quad (\text{A.17})$$

$$K \approx 1,1 \cdot 10^3 \quad .$$

Diese ist zwar mit einem relativ großen Fehler behaftet, zum einen da die Standardpotentiale aufgrund von Überspannungseffekten nicht direkt und genau zugänglich sind, zum anderen weil es sich bei der Reduktion von NADP^+ nach (A.10) um einen Hydridtransfer und nicht um eine direkte Reduktion handelt⁶. Trotzdem ist die Größenordnung richtig und reicht für weitergehende Betrachtungen aus.

A.5. Maximaler Umsatz

Mit der im vorherigen Abschnitt A.4 hergeleiteten Gleichgewichtskonstante lässt sich der maximal erreichbare Umsatz der durch die Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* (*PfH*) vermittelten Reduktion in Abhängigkeit von pH , Wasserstoffdruck p_{H_2} und absoluter Temperatur T berechnen. Bei maximaler Selektivität $\sigma = 1$ kann man mit der Anfangskonzentration $[\text{NADP}^+]_0$ und

$$U = \eta = \frac{[\text{NADPH}]}{[\text{NADP}^+]_0} \quad (\text{A.18})$$

$$= \frac{[\text{NADPH}]}{[\text{NADP}^+] + [\text{NADPH}]} \quad (\text{A.19})$$

den Gleichgewichtsumsatz aus (11.1) erhalten. Die Gleichgewichtskonzentration $[\text{NADPH}]$ ergibt sich mit (11.1) zu

$$[\text{NADPH}] = \frac{K [\text{H}_2] [\text{NADP}^+]}{[\text{H}^+]} \quad (\text{A.20})$$

Ersetzt man (A.20) in (A.19), erhält man

$$U = \frac{[\text{NADP}^+] \frac{K [\text{H}_2]}{[\text{H}^+]}}{[\text{NADP}^+] + [\text{NADP}^+] \frac{K [\text{H}_2]}{[\text{H}^+]}} \quad (\text{A.21})$$

$$= \frac{1}{1 + K^{-1} [\text{H}_2]^{-1} [\text{H}^+]} \quad (\text{A.22})$$

Ersetzt man dann noch die Konzentrationen durch (A.3) respektive das Henrysche Gesetz (6.1), so erhält man

$$U = \eta = \frac{1}{1 + K^{-1} \frac{H_{\text{H}_2}}{p_{\text{H}_2}} 10^{-\text{pH}} \text{ M}} \quad (\text{A.23})$$

$$= \frac{1}{1 + e^{\frac{\Delta G^0}{RT}} \frac{H_{\text{H}_2}}{p_{\text{H}_2}} 10^{-\text{pH}} \text{ M}} \quad (11.2)$$

⁶Zur selektiven 1,4-Hydridaddition beziehungsweise Reduktion von NADP^+ benötigt man einen Hydridüberträger wie in [245, 246, 248, 273] beschrieben; vergleiche auch Kapitel 8 auf Seite 61.

Evident ist, dass die Bedingung

$$(11.2) < 1$$

erfüllt ist, da der zweite Summand $e^{\frac{\Delta G^0}{RT}} \frac{H_{H_2}}{p_{H_2}} 10^{-pH}$ mol im Nenner von (11.2) stets größer als null ist. Es ergibt sich für $pH=7$ und $p_{H_2} = 1$ bar ein thermodynamischer Umsatz von

$$U' = 1 - 9 \cdot 10^{-8} = 0,99999991 .$$

Dabei können drei Faktoren als Triebkräfte der Reaktion identifiziert werden. Zum ersten ist der als konstant angenommene pH eine Triebkraft, da eins der Produkte ständig aus dem Gleichgewicht entfernt wird; zweitens ist die Wasserstoffkonzentration $[H_2] = \frac{p_{H_2}}{H_{H_2}}$ ebenfalls konstant, da bei konstantem Druck die Gasphase in einem gekoppelten Gleichgewicht dieses Edukt dem Gleichgewicht ständig nachliefert; und drittens ist die Reaktion bei „enzymverträglichen“ pH exergonisch, das heißt $\frac{\Delta G}{RT}$ ist negativ.

Haupttriebkraft der Reaktion ist dabei die pH -Pufferung, die die Konzentration des entstehenden Protons minimal werden lässt.

A.6. Substratgekoppelte Kofaktorregenerierung

Man spricht von substratgekoppelter reduktiver Kofaktorregenerierung, wenn ein zweites Substrat S_{Red} von demselben Enzym unter Reduktion des oxidierten Kofaktors oxidiert wird. Dies ist schematisch in der Abbildung A.1 gezeigt.

Bei der homogenen Katalyse spricht man von der Transferhydrierung, da ein Wasserstoffäquivalent von einem Donor auf einen Akzeptor übertragen wird. Gebräuchlich sind dabei als Donoren S_{red} vor allem kurzkettige Alkohole wie zum Beispiel 2-Propanol [163].

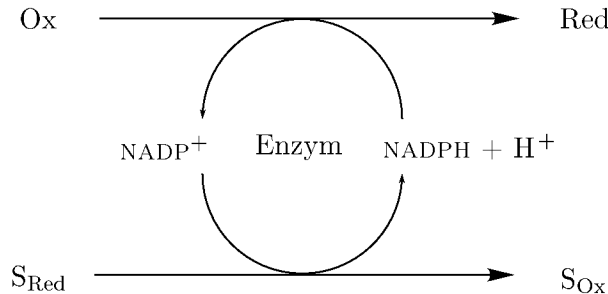
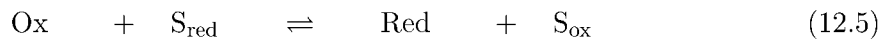


ABBILDUNG A.1.: Bei der substratgekoppelten Kofaktorregenerierung wird ein Kosubstrat S_{Red} unter Reduktion des Kofaktors (hier als $NADP^+$ angenommen) oxidiert. Dies geschieht durch das gleiche Enzym wie die eigentliche Reduktion.

Für die Betrachtung der Gleichgewichtslage ist die Art des –zum Beispiel hydridübertragenden– Mediators unerheblich, da er in der Bruttoreaktion zur Aufstellung des Massenwirkungsgesetzes nicht mehr vorkommt:



Daraus ergibt sich die Massenwirkungsgleichung zu

$$K = \frac{[Red][S_{ox}]}{[Ox][S_{red}]} . \quad (A.27)$$

Es gilt ohne Beschränkung der Allgemeinheit $[\text{S}_{\text{red}}]_0 \geq [\text{Ox}]_0 > 0$.⁷ Definiert man dann das Verhältnis r_0 als das Anfangsverhältnis des Donors zum Edukt der Reduktion:

$$r_0 = \frac{[\text{S}_{\text{red}}]_0}{[\text{Ox}]_0} \geq 1 \quad (12.9)$$

und ersetzt dann die aktuellen Konzentrationen mit den Anfangskonzentrationen und dem Umsatz U unter der Annahme, dass die Produktkonzentrationen zum Zeitpunkt $t = 0$ null sind: $[\text{Red}]_0 = [\text{S}_{\text{ox}}]_0 = 0$, so kann man die Konzentrationen als Funktion von Umsatz, r_0 und den Startkonzentrationen ausdrücken:

$$[\text{Red}] = [\text{S}_{\text{ox}}] = [\text{Ox}]_0 U \quad (A.24)$$

$$[\text{Ox}] = [\text{Ox}]_0 (1 - U) \quad (A.25)$$

$$[\text{S}_{\text{red}}] = [\text{Ox}]_0 (r_0 - U) \quad (A.26)$$

Eingesetzt in den Massenwirkungsterm (A.27) erhält man eine quadratische Gleichung. Diese hängt ist nur noch vom Anfangsverhältnis r_0 und der Gleichgewichtskonstante ab, da sich die Konzentration $[\text{Ox}]_0$ kürzen lässt:

$$K = \frac{U^2}{(1 - U)(r_0 - U)} \quad (A.27)$$

Dies vereinfacht die Notation gegenüber der Herleitung von Laue [163]. Man erhält als Normalform

$$(K - 1)U^2 - K(1 + r_0)U + Kr_0 = 0 \quad (A.28)$$

Für den Fall $K = 1$, der bedeutet, dass es keine Potentialdifferenz der elektrochemischen Halbzellen gibt, vereinfacht sich (A.28) zu

$$U(K = 1) = \frac{r_0}{1 + r_0} \quad (A.29)$$

Im weiteren ist $K \neq 1$, da für $K = 1$ die Lösung von (A.28) eine Definitionslücke aufweist, deren stetige Ergänzung (A.29) ist.

Die Lösungen von U erhält man durch die Lösungsformel für quadratische Gleichungen⁸

$$U_{1,2} = \frac{K(r_0 + 1)}{2(K - 1)} \pm \sqrt{\frac{K^2}{2(K - 1)^2} (r_0 + 1)^2 - \frac{Kr_0}{K - 1}} \quad ,$$

oder mit quadratischer Ergänzung

$$U_{1,2} = \frac{K(r_0 + 1) \pm \sqrt{K^2(r_0 + 1)^2 - 4Kr_0(K - 1)}}{2(K - 1)} \quad ,$$

⁷Das Reduktionsmittel wird sinnvollerweise mindestens äquimolar eingesetzt, daher ist eine solche Nebenbedingung keine praktische Einschränkung.

⁸„pq-Formel“

und mit $K \neq 0$ folgt schließlich

$$U_{1,2} = K \frac{r_0 + 1 \pm \sqrt{(1 - r_0)^2 + 4K^{-1}r_0}}{2(K - 1)} . \quad (12.10)$$

Für den Fall äquimolarer Startkonzentrationen $[\text{Ox}]_0 = [\text{S}_{\text{red}}]_0$ bzw. $r_0 = 1$ vereinfacht sich (12.10) zu

$$U(r_0 = 1) = \frac{\sqrt{K}}{\sqrt{K} + 1} , \quad (\text{A.30})$$

als physikalisch sinnvolle Lösung ($0 < U < 1$). Die Gleichgewichtskonstante kann anhand tabellierter Werte zum Beispiel aus der Tabelle 12.1 auf Seite 96 entnommen werden [96]. Dafür gilt dann

$$K = \frac{[\text{Ox}][\text{S}_{\text{ox}}]}{[\text{Red}][\text{S}_{\text{red}}]} = \frac{K_R^p(\text{Ox}/\text{Red})}{K_R^p(\text{S}_{\text{ox}}/\text{S}_{\text{red}})} . \quad (12.8)^9$$

Für den Fall $r_0 > 1$ ist die zulässige Lösung in nicht trivialer Weise von r_0 und K abhängig. Man wählt diejenige Lösung aus dem physikalisch sinnvollen Intervall $0 < U < 1$.¹⁰

Löst man (A.27) nach r_0 , so erhält man

$$r_0 = U \left(1 + \frac{U}{K(1 - U)} \right) \quad (12.11)$$

als Ausdruck dafür, welches Anfangsverhältnis man einstellen müsste, um bei gegebenen K einen Umsatz zu erreichen. Oder mit (12.7) ergibt sich

$$r_0 = U \left(1 + \frac{U}{(1 - U)} e^{-\frac{2F\Delta E}{RT}} \right) \quad (\text{A.31})$$

als Abhängigkeit des Verhältnisses r_0 für gegebene Potentialdifferenz und Umsatz. Die Gleichung (A.31) liefert dann das Anfangsverhältnis r_0 , dass mindestens eingestellt werden muss, damit bei gegebener Potentialdifferenz ein Umsatz U erreicht werden kann. Dieser Zusammenhang ist in der Abbildung A.2 auf der nächsten Seite für verschiedene gegebene Umsätze in Abhängigkeit von der Potentialdifferenz ΔE gezeigt. Betrachtet man zum Beispiel $\Delta E = -11$ mV für das Modellsystem Acetophenon (48) und 2-Propanol (50), so kann man ablesen, dass allein für das Erreichen des thermodynamischen Umsatz von $U = 0,97$ ein $r_0 \approx 80$ eingestellt werden muss.

Diese ermittelten Parameter stellen die Mindestanforderungen dar, die eingehalten werden müssen, damit das System thermodynamisch in der Lage ist, gewünschte Umsätze zu erreichen. Damit das System dies allerdings in endlichen Zeiten tut beziehungsweise ausreichende Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht, sind meistens höhere Verhältnisse als die nach (A.31) berechneten notwendig.

⁹siehe Seite 97

¹⁰Aus der numerischen Lösung lässt sich ablesen, dass für $K < 1$ nur der Term mit Subtraktion der Wurzel sinnvolle Werte liefert, und für $K > 1$ die Addition gewählt werden muss.

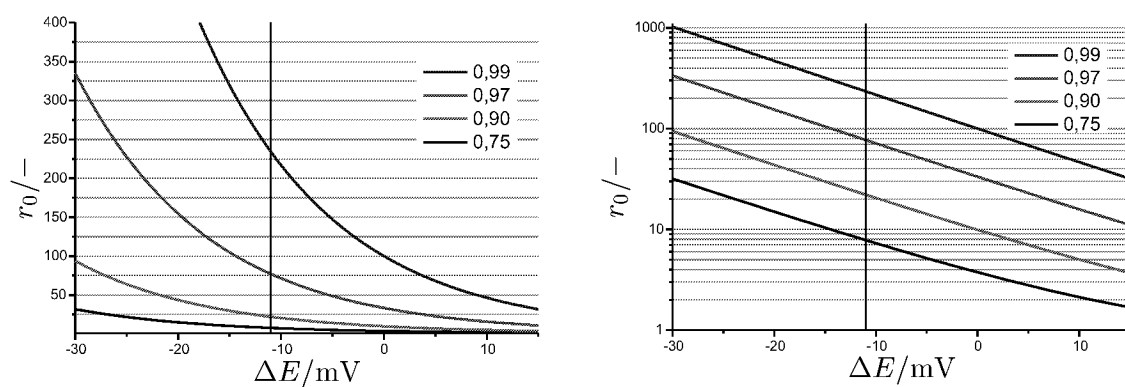


ABBILDUNG A.2.: Anfangsverhältnis beziehungsweise Überschuss des Reduktionsmittels r_0 aufgetragen als Funktion der Potentialdifferenz für verschiedene Umsätze nach (A.31) ($T=298$ K). Der senkrechte Strich bezeichnet die Potentialdifferenz für das Reaktionssystem Acetophenon (48) und 2-Propanol (50) ($\Delta E = -11$ mV).

B. Zur Abgrenzung von Enantiomerenüberschuss und Enantiomerenverhältnis

Für Chemiker und die chemieverwandten Arbeitsgebiete wird der Enantiomerenüberschuss ee als Zielgröße der Synthese immer wichtiger. Ist der ee wirklich das Maß aller Dinge? Dieses Kapitel zeigt die wichtigen Schwachpunkte der historischen Definition des ee und ihre Umgehung durch den Gebrauch des Enantiomerenverhältnisses er .

Für die Qualität einer enantioselektiven Reaktion findet man in der Literatur im allgemeinen die Angabe des Enantiomerenüberschusses ee :¹

$$ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \quad , \quad (\text{B.1})$$

wobei $[R]$ und $[S]$ die Konzentration der beiden Enantiomere bedeuten.²

Die Form nach (B.1) wird allgemein angenommen, wenn R das im Überschuss vorhandene Enantiomer ist. Für den umgekehrten Fall, wenn S im Überschuss erhalten wurde, werden die Werte für ee negativ, behalten aber den richtigen Betrag. Die Angabe von negativen Werten ist unüblich, so dass man die Formel je nach Überschussenantiomer umstellt. Für (B.1) erhält man dann:

$$ee(R) = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \quad , \quad (\text{B.1-R})$$

und mit S als Überschussenantiomer analog:

$$ee(S) = \frac{[S] - [R]}{[R] + [S]} \quad . \quad (\text{B.1-S})$$

Ein negativer Wert für $ee(S)$ oder $ee(R)$ bedeutet, dass das andere Enantiomer die Überschusskomponente ist. Die Umrechnung gelingt mit der Beziehung

$$ee(R) = -ee(S) \quad . \quad (\text{B.2})$$

Was bedeutet der Wert, den man erhält? Er bedeutet, wie es im Namen schon enthalten ist, den Überschuss der einen Komponente. Also der Wert „80% ee “ bedeutet, das 10 Teile

¹ *engl.* enantiomeric excess

² Dies ist die Form die am häufigsten verwendet wird. Alternativ kann man jede mit der Konzentration linear korrelierte Größe verwenden (zum Beispiel absolute Stoffmengen oder Integrationsflächen in der Chromatographie). Im allgemeinen wird die Angabe in Prozent gemacht, was mit der eigentlichen Skala, Bruchteile von 1, identisch ist.

des einen Enantiomers 90 Teilen des anderen Enantiomers gegenüberstehen:

$$80\% = \frac{90 - 10}{90 + 10} = \frac{80}{100} = 0,8 \quad .$$

Das ist also der Überschuss der einen Komponente in bezug auf den racemischen Anteil der Mischung. Diese Definition bezieht sich ursprünglich auf den Drehwert für linear polarisiertes Licht. Der Drehwert wird nur durch ein Enantiomer erhöht, und der racemische Anteil trägt nicht dazu bei. Für die Definition nach Drehwert ist die Berechnung des Enantiomerenüberschusses auch deutlich einfacher:

$$ee = \frac{\alpha}{\alpha_0} \quad , \quad (\text{B.3})$$

wobei α_0 den Drehwert für das reine Enantiomer und α den gemessenen Wert bezeichnet. Unter der Verwendung von (B.3) kann man durch Vergleich mit der enantiomerenreinen Substanz direkt auf den ee umrechnen.³

B.1. Enantiomerenverhältnis

Die Angabe des Enantiomerenüberschusses ee ist für die Abschätzung der Enantioselektivität der Reaktion allerdings recht ungeeignet. Definiert man das Enantiomerenverhältnis er als Verhältnis der beiden Enantiomere

$$er(R) = \frac{[R]}{[S]} \quad \text{bzw.} \quad er(S) = \frac{[S]}{[R]} \quad , \quad (\text{B.4})$$

so ergeben sich Werte, die mit der Enantioselektivität der Reaktion linear zusammenhängen. Für das obige Beispiel ergibt sich ein $er(R) = 9$. In der weiteren Betrachtung wird auf die ausdrückliche Erwähnung der jeweiligen Überschusskomponente verzichtet. Im allgemeinen werden Werte $er < 1$ vermieden, indem man auf die Überschusskomponente umrechnet. Die Umrechnung für er ergibt sich zu

$$er(R) = er(S)^{-1} \quad (\text{B.5})$$

Der er kann im Gegensatz zum ee direkt mit den Reaktionsgeschwindigkeiten der Einzelreaktionen korreliert werden. Wir nehmen an, dass sich die Enantiomere in zwei unabhängigen, irreversiblen Reaktionen mit den Geschwindigkeitskonstanten k_R und k_S aus dem gleichen Edukt E bilden, wie in der Abbildung B.1 auf der nächsten Seite gezeigt wird.

³Der Drehwert α_0 ist allerdings eine etwas launische Messgröße, die aufgrund ihrer zum Teil nicht linearen Abhängigkeit von Konzentration, Lösungsmittel, Temperatur und Wellenlänge etwas aus der Mode gekommen ist. Die Wellenlängenabhängigkeit des Drehwerts wird bei der Messung des Circular dichroismus (CD) genutzt, und kann unter anderem bei strukturell verwandten Verbindungen zum Ableiten der absoluten Konfiguration benutzt werden [14, 64, 65].

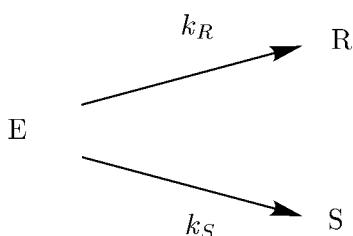


ABBILDUNG B.1.: Allgemeines Reaktionsschema für die parallele Bildung zweier Enantiomere R und S aus dem gemeinsamen Edukt E

Wenn die Reaktion erster Ordnung in $[E]$ ist, ergeben sich für er und ee jeweils

$$er = \frac{k_R[E]}{k_S[E]}$$

$$\Rightarrow er = \frac{k_R}{k_S} \quad (\text{B.6})$$

$$ee = \frac{k_R[E] - k_S[E]}{k_R[E] + k_S[E]}$$

$$\Rightarrow ee = \frac{k_R - k_S}{k_R + k_S} \quad (\text{B.7})$$

wenn sich die Selektivität der Reaktion nicht ändert.⁴

Das heißt also, dass man bei der Angabe eines Wertes für er direkt auf das Verhältnis der Geschwindigkeiten der Einzelreaktionen schließen kann. Dies ist für den ee bei weitem nicht so schnell abzuleiten, da hier der Zusammenhang zwischen den relativen Anteilen nicht linear ist. Um dies zu veranschaulichen, kann man den ee in Abhängigkeit des er darstellen:

$$ee = \frac{er - 1}{er + 1} \quad (\text{B.8})$$

$$\Leftrightarrow er = \frac{ee + 1}{1 - ee} \quad (\text{B.9})$$

Trägt man jetzt den ee als Funktion von er auf (Abbildung B.2 auf der nächsten Seite), zeigt sich der hyperbolische Zusammenhang zwischen ee und er .

Hier zeigt sich, dass die Selektivität in zwei Bereichen stark unterschiedlich korreliert. Zum einen im Bereich $er \leq 10$ beziehungsweise $ee \leq 0,8$. Hier führt eine nur geringe Änderung der Selektivität, also im obigen Beispiel der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten k_R/k_S , zu einem starken Anstieg des Enantiomerenüberschusses. Beispielsweise bringt die Verdopplung des er von 3 auf 6 eine Steigerung des ee von 0,50 auf 0,71.

Die asymptotische Näherung an 1 im weiteren Verlauf relativiert die Selektivitäten jedoch wieder. Eine Verdopplung des er von 100 auf 200 hat beim ee „nur“ die Steigerung von 0,98 auf 0,99 zur Folge.

⁴Dies ist im allgemeinen nicht erfüllt und gerade für katalytische Reaktionen ändert sich die Selektivität mit der Konzentration. Diese Vereinfachung stellt eine wesentliche Schwäche der Definition des E-Wertes bei der kinetischen Racematspaltung dar.

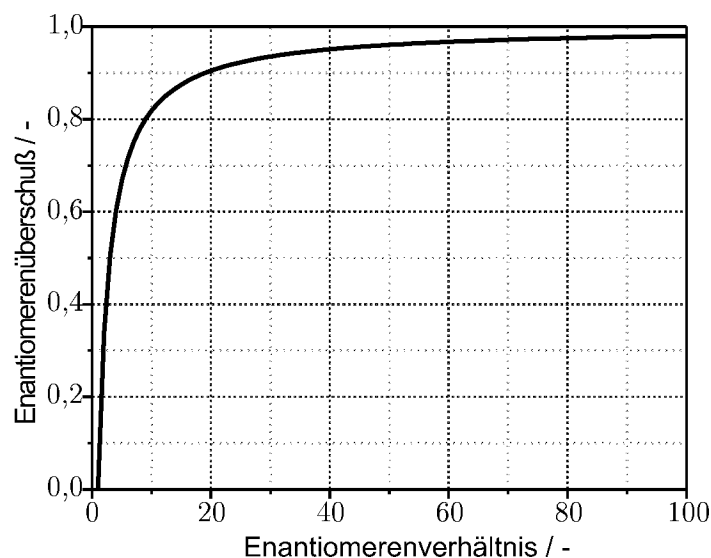


ABBILDUNG B.2.: Enantiomerenüberschuss ee als Funktion des Enantiomerenverhältnisses er nach Gleichung (B.8)

In der Formel (B.8) lässt sich dies daran ablesen, dass die ∓ 1 für große er immer mehr an Gewicht verliert. Die asymptotische Annäherung an 1 hat auch zur Folge, dass ein ee von 1 nur für ein unendlich großes er erreicht werden würde. Der Angabe von „100%“ ee kann man im Rahmen der Meßgenauigkeit⁵ also durchaus ein tiefes Misstrauen entgegenbringen.⁶ Die Gleichung (B.9) ist für den Fall der „absoluten Enantioselektivität“ auch nicht definiert.

Dasselbe gilt auch für die Messung von kleinen ee -Werten, da hier der Wert sehr sensitiv auf kleinste Messfehler reagiert. Denn gemäß (B.9) bringt eine ee -Steigerung von 20% auf 30% nur eine Änderung der Selektivität von 1,50 auf 1,86 mit sich. Das heißt, hier können kleine Änderungen auch eine enorme Steigerung vortäuschen.⁷ Ungeachtet dieser Tatsachen werden solche Begriffe sogar in renommierten Lehrbüchern der organischen Chemie und der Biochemie verwandt, oft als Synonym für sehr hohe Selektivität [64]. Auch wird oft versäumt den er als Alternative einzuführen [64, 168], der unter reaktionstechnischen Gesichtspunkten den Sachverhalt besser und anschaulicher beschreibt [201].

B.2. ΔG und der Enantiomerenüberschuss

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der irreversiblen Reaktion erster Ordnung (Abbildung B.1 auf der vorherigen Seite) hängen von der jeweils dafür benötigten Aktivierungsenergie ΔG ab. Da

$$k = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}, \quad (\text{B.10})$$

⁵Vergleiche auch Heisenbergsche Unschärferelation.

⁶Dies relativiert auch die Drehwertmessungen nach (B.3).

⁷Der geneigte Leser möge versuchen, aus den enantiomer angereicherten Stoffen das Racemat zu mischen. Hierbei ist der Wägefehler meist schon groß genug, um eine absolute racemische Mischung zu erschweren.

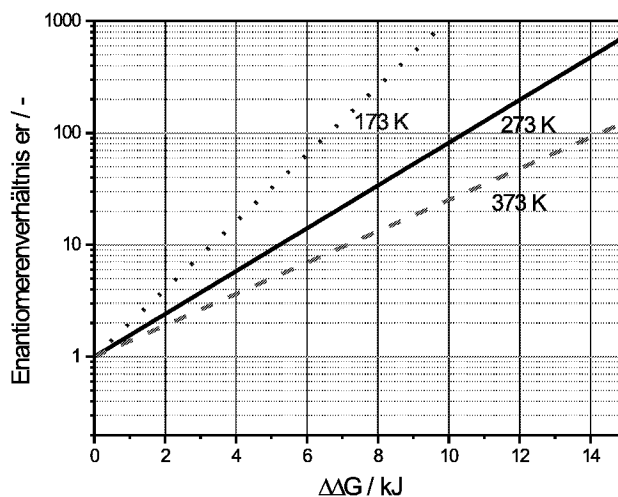


ABBILDUNG B.3.: Enantiomerenverhältnis er als Funktion der Differenz freien Aktivierungsenergie $\Delta\Delta G$ und verschiedener Temperaturen, unter der Annahme einer irreversiblen Parallelreaktion zu den Enantiomeren.

(mit R : allgemeine Gaskonstante, und T : absolute Temperatur) gilt, kann man mit Gleichung (B.6) er als Funktion der Aktivierungsenergien ausdrücken:

$$er = \frac{e^{-\frac{\Delta G_R}{RT}}}{e^{-\frac{\Delta G_S}{RT}}} = e^{\frac{\Delta G_S - \Delta G_R}{RT}}. \quad (\text{B.11})$$

Für die Differenz der Aktivierungsenergien ΔG schreibt man im allgemeinen $\Delta\Delta G$, somit ergibt sich

$$er = e^{\frac{\Delta\Delta G}{RT}} \quad (\text{B.12})$$

$$\Rightarrow \Delta\Delta G = RT \ln(er). \quad (\text{B.13})$$

Dies ist der Hintergrund für die empirische Regel, dass die Enantioselektivität einer Reaktion mit steigender Temperatur abnimmt.⁸ Dies ist in der Abbildung B.3 zu erkennen, in der drei Isothermen die Abhängigkeit des er von der Differenz der Aktivierungsenergien zeigen.

Voraussetzung ist dabei allerdings, dass der Reaktionsschritt der die Enantioselektivität bestimmt, gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmend ist. Andere als die in der Abbildung B.3 gezeigten Temperatureffekte deuten meist auf eine Verschiebung der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte hin.⁹

Für den Enantiomerenüberschuss ee erhält man durch Einsetzen von (B.9) folgende Ab-

⁸Dies ist nicht allgemein gültig, und bei Folgereaktionen kann auch der umgekehrte Fall eintreffen, unter anderem wenn sich die Konzentrationen von diastereomeren Zwischenstufen ändern [53].

⁹Dies ist zum Beispiel bei der homogenen katalytischen Hydrierung der Fall [53, 161].

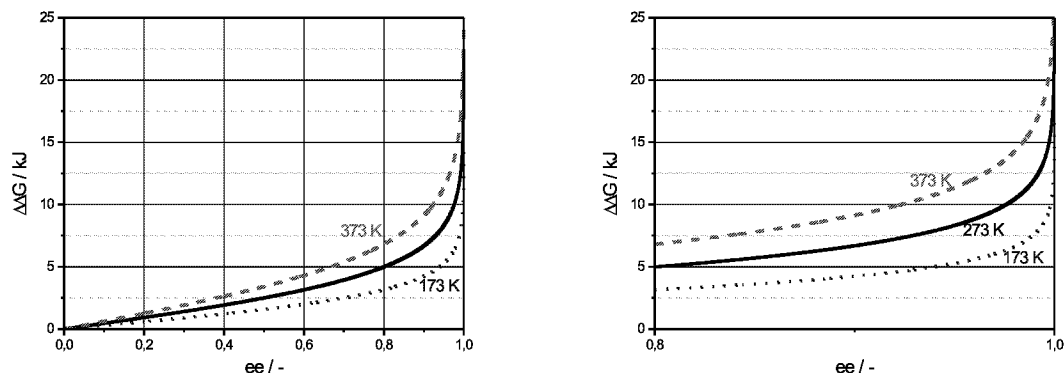


ABBILDUNG B.4.: $\Delta\Delta G$ in Abhängigkeit vom Enantiomerenüberschuss ee bei verschiedenen Temperaturen

hängigkeit von $\Delta\Delta G$:

$$ee = \frac{e^{\frac{\Delta\Delta G}{RT}} - 1}{e^{\frac{\Delta\Delta G}{RT}} + 1} \quad (\text{B.14})$$

$$\Leftrightarrow \Delta\Delta G = RT \ln\left(\frac{-(ee + 1)}{ee - 1}\right) \quad (\text{B.15})$$

Diese Gleichung (B.15) soll hier noch näher betrachtet werden, da sie die direkte Berechnung von $\Delta\Delta G$ aus dem ee erlaubt. Trägt man $\Delta\Delta G$ in Abhängigkeit vom ee auf, so erhält man die Abbildung B.4.

Hierbei zeigt sich wiederum, dass die Diskriminierung der unerwünschten Reaktion ausgedrückt durch $\Delta\Delta G$ für hohe ee überproportional ansteigen muss. Die Werte für höhere ee sind in der Größenordnung der Aktivierungsenergien der gesamten Reaktionen. Vor diesem Hintergrund ist das enge Substratspektrum von optimierten Katalysatoren –wie zum Beispiel Enzymen– nicht verwunderlich. Denn nur die optimale Anpassung an ein Substrat beinhaltet die gewünschte stereochemische Selektivität in ausreichender Weise.

B.3. Weiterführende Betrachtungen

Die hyperbolische Abhängigkeit des ee mit Änderung des er zunächst überproportional stark zu wachsen, und dann in eine asymptotische Näherung zum ultimativen Ziel der „100 prozentigen“ Enantioselektivität überzugehen, wird auch durch die Ableitung von ee nach er illustriert. Differenziert man (B.8), so erhält man:

$$\frac{\delta ee}{\delta er} = \frac{2}{(er + 1)^2} \quad (\text{B.16})$$

Je kleiner der Ausdruck (B.16) ist desto weniger ändert sich der Wert des ee , wenn sich er ändert (Abbildung B.5 auf der nächsten Seite). Hier zeigt sich, dass die Steigerung des ee umso schwieriger wird, je höher dessen Anfangswert ist. Dies illustriert für den Chemiker die Schwierigkeit seiner Anstrengungen. Zu Anfang erzielt man mit kleinen Änderungen

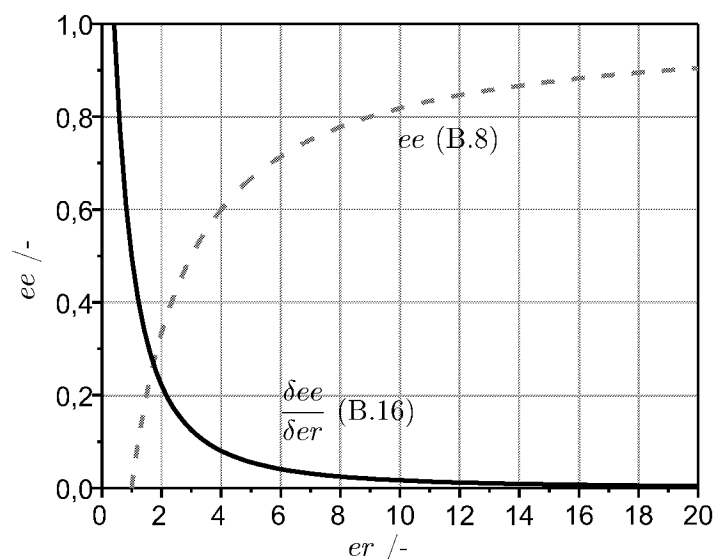


ABBILDUNG B.5.: Ableitung des ee nach er nach Gleichung (B.16) und die Ausgangsgleichung (B.8) zur Illustration des Zusammenhangs von ee und er

große Wirkungen beim ee . Später wird die Erfolgskurve flacher, und man muss weiter laufen um vergleichbare Steigerungen zu erzielen. Dies lässt sich anhand von (B.16) als Rutsche verstehen (Abbildung B.5). Am Anfang rutscht man von selbst, später muss man kräftig nachhelfen, ohne große Erfolge zu sehen. Oder um es anders zu formulieren: Der ee ist von jemandem erfunden worden, der Gutachter beeindrucken musste. Am Anfang können dabei scheinbar große Fortschritte mit geringem Aufwand erzielt werden. Später, wenn das Projekt dann läuft, ist eine Steigerung nicht mehr primäres Ziel. Die hyperbolische Funktion (B.8) konvergiert aus dem Positiven gegen null.

B.4. Zusammenfassung

- Der Enantiomerenüberschuss ee ist kein geeignetes Maß für die Selektivität einer Reaktion.
- Das Enantiomerenverhältnis er korreliert mit den wichtigen kinetischen und thermodynamischen Größen der enantioselektiven Reaktion:
 - den Geschwindigkeitskonstanten k_R und k_S ,
 - der Differenz der Aktivierungsenergien $\Delta\Delta G$,
- ee und er lassen sich leicht ineinander umrechnen, korrelieren jedoch nicht linear.
- Für katalysierte Reaktionen ist das Erreichen von „100% ee “ aus thermodynamischen Gründen nicht möglich.¹⁰
- Die IUPAC fordert die Bezeichnung nach Enantiomerenverhältnis er anstatt des veralteten ee .

¹⁰Absolute Enantioselektivität ist daher eher ein Konzept, wie zum Beispiel Vakuum, Sterilität o.ä..

C. Phasenübergang und Löslichkeit von Gasen

Homogene katalytische Reaktionen, die sich in einer Phase abspielen, können vom reaktionstechnischen Standpunkt wie andere homogene Reaktionen behandelt werden. Die Reaktorauslegung kann bei bekannter Kinetik erfolgen und Umsatz und Selektivität beziehungsweise Ausbeute können auf Basis dieser Daten ermittelt werden. Dies ist in den Lehrbüchern ausführlich behandelt [36, 166]. Die Schwierigkeit liegt hier darin die Kinetik selbst genau zu bestimmen. Dies ist bisher nur für ausgewählte homogenkatalytische Reaktionen durchgeführt worden. Die Zahl der asymmetrischen Katalysen ist dementsprechend noch geringer. Dabei zeigte sich, dass diese oft sehr kompliziert sind, und sich nur sehr selten oder mit sehr großem Aufwand auf die Elementarreaktionen zurückführen lassen [59, 264]. Für die ligandenbeschleunigte Katalyse wurden Studien der nichtlinearen Effekte der Chiralitätsverstärkung betrieben [137]. Auch in Hinblick auf die kontinuierliche Umsetzung im CMR [74, 94, 153, 163, 164] sind kinetische Studien der Katalysatoren durchgeführt worden. Die katalytische Reaktion ist stets komplex, da sie mehrere Elementarreaktionen durchläuft, deren Geschwindigkeiten in vergleichbaren Größenordnungen liegen. Auch die Aktivierung des Katalysators und die tatsächliche Katalysatorkonzentration sind oft variabel und können nur indirekt bestimmt werden. Viele der bekannten Systeme sind sehr sensitiv auf die Änderung bestimmter Parameter, so zum Beispiel Verunreinigungen der Edukte, Sauerstoff- oder Wasserkonzentration [31]. Diese sind oft nur schwer zu quantifizieren und erschweren die genaue Bestimmung der kinetischen Konstanten zusätzlich.

Andere Reaktionen wurden mechanistisch untersucht, um Rückschlüsse für den weiteren Entwurf von Liganden für die asymmetrische Synthese zu ziehen. Die dabei verwendeten Bedingungen weichen jedoch teilweise stark von den katalytischen Bedingungen realer Synthesen ab, so dass dort keine für eine Reaktorauslegung relevante Kinetik gewonnen werden kann. Oft wird dabei auch gar nicht versucht, makroskopische kinetische Konstanten zu gewinnen [45, 59, 81, 104]. Auch sind die Systeme für die theoretische Berechnung zu komplex und die bisherigen Studien zeigen große Abweichungen von der Realität, auch wenn es gerade diese Differenzen sein können, die neue Einsichten in das System vermitteln [162, 264]. Jüngstes Beispiele für die ausführliche Bestimmung einer Reaktionskinetik für den Einsatz im kontinuierlichen System findet sich in Laue [163].

Die Hydrierung mit elementarem Wasserstoff, die Hydroformylierung oder andere Reaktionen mit einer zweiten gasförmigen Phase werfen jedoch weitere reaktionstechnische Fragestellungen auf. Damit die Reaktion in der flüssigen Phase stattfinden kann, muss der gasförmige Reaktand oder die Reaktanden in die flüssige Phase gelangen. Zur Beschreibung bedient man sich meist der Zweifilm-Theorie.¹ Hier wird nur der reine Stofftransport in

¹„Other theories can and have been used; however, they give essentially the same result, but with more impressive mathematics.“ Levenspiel [166] Die Herleitung komplexerer Modelle findet sich zum Beispiel in Ottino [203], Schlüter und Schulzke [223] und darin zitierter Literatur.

Gas-/Flüssigsystemen betrachtet; für weitergehende Betrachtungen sei auf die Literatur verwiesen (z.B. Levenspiel [166]). Anschließend wird als Beispiel die Löslichkeit von Wasserstoff in verschiedenen Lösungsmitteln diskutiert.

C.1. Löslichkeit und reiner Stofftransport

Für die Konzentration in der Flüssigkeit direkt an der Phasengrenzfläche gilt in Abhängigkeit vom Partialdruck p_{Ai} das Henrysche Gesetz

$$p_{Ai} = H_A [A]_i \quad (6.1)$$

$$H_A = \frac{\text{Fugazität von A in der Gasphase}}{\text{Aktivität von A in der Lösung}}$$

unter der vereinfachenden Voraussetzung, dass der Henry-Koeffizient H_A konstant ist.² Für den Transport an die Grenzfläche ergibt sich für die Gasseite die Geschwindigkeit r_{Ag} zu

$$-r_{Ag} = k_{Ag} a (p_A - p_{Ai}) \quad (C.1)$$

mit der Austauschfläche pro Volumen $a = \left[\frac{\text{m}^2}{\text{m}^3} \right]$ und der Geschwindigkeitskonstante des Gastransports $k_{Ag} = \left[\frac{\text{mol m}}{\text{Pa s}} \right]$.

Für den flüssigseitigen Stofftransport lautet der Zusammenhang mit der entsprechenden Geschwindigkeitskonstante k_{Afl}

$$-r_{Afl} = k_{Afl} a ([A]_i - [A]) \quad (C.2)$$

Die Kombination der Gleichungen (C.1) und (C.2) mit dem Henryschen Gesetz (6.1) ergibt

$$-r_A = \frac{1}{\frac{1}{k_{Ag} a} + \frac{H_A}{k_{Afl} a}} (p_A + H_A [A]) \quad (C.3)$$

wobei die Serie von Transportwiderständen im Nenner des ersten Terms erkennbar ist. Für den Fall, dass es sich auf der Gasseite um ein reines Gas handelt, gilt $p_A = p_{Ai}$, da keine gasseitige Verarmung der Komponente A eintreten kann. Der gasseitige Transportwiderstand fällt somit weg und (C.3) vereinfacht unter der Bedingung $H_A > 0$ sich zu

$$\begin{aligned} -r_A &= \frac{k_{Afl} a}{H_A} (p_A + H_A [A]) \\ \Rightarrow -r_A &= k_{Afl} a \left(\frac{p_A}{H_A} + [A] \right) \end{aligned} \quad (C.4)$$

die man auch durch Einsetzen von (6.1) in (C.2) erhält.

In der vorliegenden Arbeit spielt nur die Betrachtung für reine Gase eine Rolle, für diesen Fall ist $p_A = p_{Ai}$ und der Transportwiderstand in der Gasphase ist null. Für die weiterführenden Betrachtungen sei auf die Literatur verwiesen [16, 166].

²Für verdünnte Lösungen gilt, dass die Ostwald-Löslichkeit $L = \frac{[A]}{p_A} = H^{-1}$ ist.

C.2. Löslichkeit von Wasserstoff

Es sind einige Anstrengungen gemacht worden, das Löslichkeitsverhalten anhand von chemischen Struktureigenschaften von Gas und Flüssigkeit vorherzusagen [139]. Dies ist auch für den Entwurf und den Einsatz neuer Reaktionsmedien wie z.B. ionischer Flüssigkeiten [22], perfluorierter Lösungsmittel [132] und anderer Zweiphasensysteme [68] von Interesse. Allerdings vereinfachen diese Ansätze nicht die Bestimmung der Löslichkeiten, da meist andere experimentell schlechter zugängliche Konstanten benötigt werden, oder ein großer theoretischer Aufwand für experimentell relativ leicht zugängliche Stoffkonstanten nötig ist [139]. Auch gibt es noch keinen Ansatz, der den Einfluss weiterer gelöster Substanzen berücksichtigt oder Lösungsmittelgemische beschreiben kann.

Für die Löslichkeiten vieler Gase gibt es Tabellenwerke wie Fogg und Gerrard [87]. Diese enthalten aber meist die Grenzlöslichkeit als Molenbruch $x_g = \left[\frac{\text{mol}}{\text{mol}}\right]$. Wenn der Hauptaugenmerk auf einer möglichst hohen volumenbezogenen Löslichkeit liegt, ist die Angabe von x_g aber irreführend. Die volumenbezogene Grenzlöslichkeit $c_g = [\text{M}]$ ist von der Dichte ρ abhängig, da in der Umrechnung das Molvolumen³ der Flüssigkeit V_M eingeht:

$$V_M = \frac{M}{\rho} = [\text{m}^3 \text{mol}^{-1}] \quad (\text{C.5})$$

mit ρ : Dichte und M : Molgewicht der Flüssigkeit. Die volumenbezogene Grenzlöslichkeit c_g ergibt sich dann zu:

$$c_g = \frac{x_g}{V_M} = x_g \frac{\rho}{M} \quad (\text{C.6})$$

Trägt man die Grenzlöslichkeit als volumenbezogene Löslichkeit und als Molenbruchlöslichkeit auf, so ergeben sich genau umgekehrte Tendenzen für homologe Reihen verschiedener Lösungsmittel, wie man den Abbildungen C.2 bis C.4 auf Seiten 150–151 entnehmen kann. Für die Löslichkeit in Alkoholen gilt zum Beispiel, dass für höhere Kettenlängen die volumenbezogene Löslichkeit abnimmt, der Molenbruch der Grenzlöslichkeit jedoch ansteigt. Dies lässt sich auf den Effekt zurückführen, dass die Dichte –und damit das Molvolumen– abnimmt, je weniger die Hydroxyfunktion Wasserstoffbrückenbindungen eingehen kann.

Die Löslichkeit von Wasserstoff in Wasser ist relativ gering und liegt bei Normaldruck und Normaltemperatur unter 1 mM. Die Löslichkeit ist im allgemeinen so gering, dass sie eine Nachdosierung erforderlich macht.

Für Methanol wurde der lineare Zusammenhang der Löslichkeit verifiziert. Dazu wurde die Wasserstoffaufnahme im Konstantdruckautoklaven als Funktion des Differenzdrucks bestimmt. Der Henry-Koeffizient für Methanol ergibt sich demnach zu

$$H_{\text{H}_2} = 0,27 \pm 0,1 \text{ bar mM}^{-1} \quad .$$

Die Löslichkeit steigt linear mit dem Druck um $H_{\text{H}_2}^{-1} = 3,7 \text{ mM bar}^{-1}$.

Die möglichst hohe Löslichkeit von Wasserstoff ist jedoch nicht das einzige Kriterium für die Wahl des Lösungsmittels. Auch die Substrat- und Katalysatorlöslichkeit spielen eine wichtige Rolle. Auch kommen Lösungsmittel, die selbst reduzierbare Doppelbindungen enthalten, wie zum Beispiel die Ketone und Styren in der Abbildung C.4 auf Seite 151, nicht in Frage. Die Konkurrenzreaktion mit dem Lösungsmittel würde die eigentliche Reaktion aufgrund des großen Überschusses stark diskriminieren.

³Das Volumen das von einem Mol der Flüssigkeit eingenommen wird.

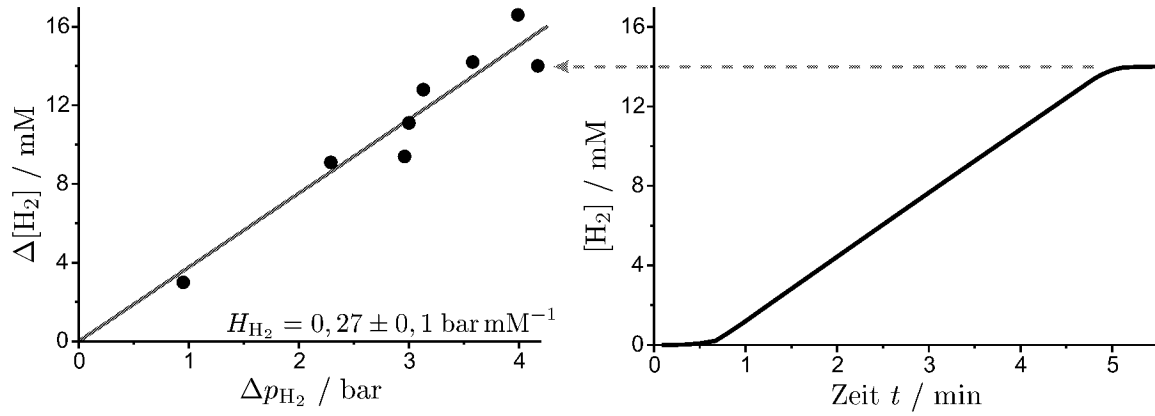


ABBILDUNG C.1.: Wasserstofflöslichkeiten in Methanol in Abhängigkeit vom Differenzdruck Δp_{H_2} und typischer Zeitverlauf eines Experiments (beide: $\theta = 25^\circ \text{C}$; Methanol; rechts: $\Delta p_{\text{H}_2} = 4,2 \text{ bar} = 12,4 \text{ bar} - 8,2 \text{ bar}$)

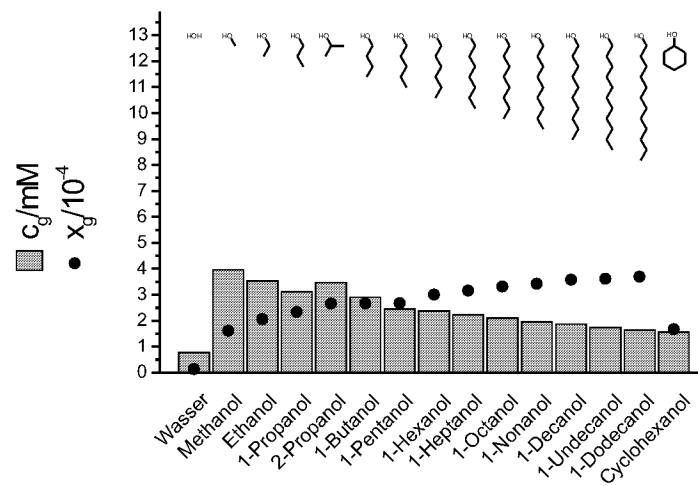


ABBILDUNG C.2.: Wasserstofflöslichkeiten in Akanolen, dargestellt als Molenbruchlöslichkeit x_g und als volumenbezogene Grenzlöslichkeit c_g bei Normaldruck und -temperatur

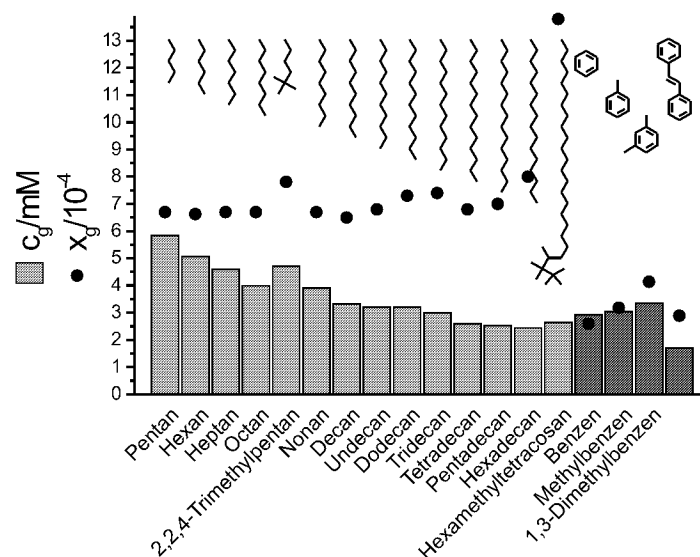


ABBILDUNG C.3.: Wasserstofflöslichkeiten in aliphatischen Kohlenwasserstoffen und ausgewählten Aromaten, dargestellt als Molenbruchlöslichkeit x_g und als volumenbezogene Grenzlöslichkeit c_g bei Normaldruck und -temperatur

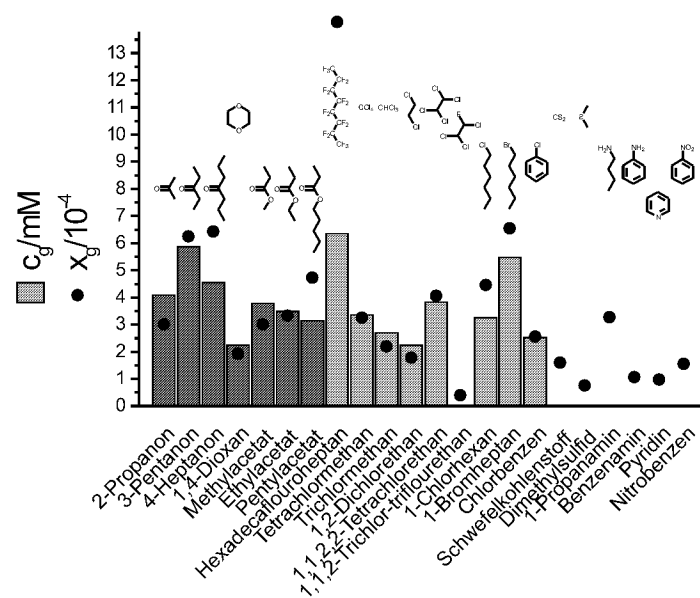


ABBILDUNG C.4.: Wasserstofflöslichkeiten in Ketonen, Estern, halogenierten und stickstoffhaltigen Kohlenwasserstoffen, dargestellt als Molenbruchlöslichkeit x_g und als volumenbezogene Grenzlöslichkeit c_g bei Normaldruck und -temperatur

D. Retention

In einem idealen CSTR wird eine Komponente proportional zu ihrer Konzentration ausgespült. Nach einer Verweilzeit τ ist die Anfangskonzentration $[A]_0$ auf

$$[A]_1 = [A]_0 r$$

abgesunken. Den Proportionalitätsfaktor r nennt man Retention, da er bezeichnet, wie stark die Komponente A durch physikochemische Vorgänge zurückgehalten wird [131]. Für den Zeitpunkt t ist der Restanteil im Reaktor gegeben durch:

$$\frac{[A]_t}{[A]_0} = r^{\left(\frac{t}{\tau}\right)} \quad (\text{D.1})$$

$$\text{Restanteil} = \text{Retention}^{(\text{Anzahl der Verweilzeiten})} \quad .$$

Für $r > 0$ kann man diesen Ausdruck zur Basis e umformen:

$$\frac{[A]_t}{[A]_0} = e^{\left(\frac{t}{\tau}\right) \ln r} \quad (\text{D.1}^*)$$

Bei der Restanteilnotation kann für die Konzentration jede proportionale Größe verwendet werden.¹ Der Exponent $\left(\frac{t}{\tau}\right)$ ist die auf die Verweilzeit τ normierte Zeit, und kann als Anzahl der ausgetauschten Volumina in der Zeit t im CSTR beziehungsweise als Anzahl der Verweilzeiten verstanden werden, und stellt eine dimensionslose Zeit dar.

Die Retention r kann Werte aus dem Bereich $1 \geq r \geq 0$ annehmen, und zwar für vollständige Zurückhaltung bis zu dem Fall, dass keine Wechselwirkungen vorliegen. Das Verhalten für verschiedene Werte von r ist in der Abbildung D.1 auf der nächsten Seite wiedergegeben.

Die Geschwindigkeit der Ausspülung $\frac{\delta[A]}{\delta t}$ ergibt sich durch Differenzierung der Definitionsgleichung D.1 nach der Zeit zu

$$\frac{\delta[A]}{\delta t} = r^{\left(\frac{t}{\tau}\right)} \ln r. \quad (\text{D.2})$$

Als Kenngröße der Retention wird oft auch die Halbwertszeit $t_{1/2}$ (D.3) benutzt, und zwar als die Zeit, nach der nur noch die Hälfte der ursprünglichen Menge vorhanden ist:

$$\frac{[A]_{t_{1/2}}}{[A]_0} = \frac{1}{2} \quad (\text{D.3})$$

¹z.B. die Masse, oder aber auch die Extinktion

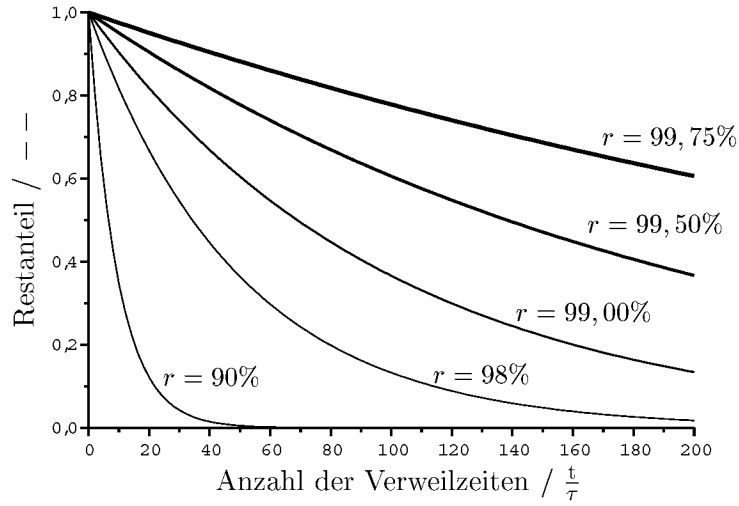


ABBILDUNG D.1.: Restanteil als Funktion der Anzahl der Verweilzeiten für verschiedene Werte der Retention r nach Gleichung (D.1).

Mit (D.1) folgt

$$\frac{t_{1/2}}{\tau} = -\frac{\ln 2}{\ln r} \quad (\text{D.4})$$

$$r = 2^{-\frac{\tau}{t_{1/2}}} \quad (\text{D.5})$$

$$\frac{\delta \left(\frac{t_{1/2}}{\tau} \right)}{\delta r} = \frac{\ln 2}{2r \ln r} \quad (\text{D.6})$$

Die Ableitung von (D.4) ergibt (D.6), wobei hier nur angemerkt werden soll, dass die Ableitung bei 1 eine positive Polstelle aufweist. Je mehr man sich in Richtung vollständiger Retention bewegt, umso stärker fällt die Änderung ins Gewicht. Dieses nichtlineare Verhalten macht die Griffigkeit der Definition nach (D.1) schwierig. Die Abbildung D.2 zeigt die Halbwertszeit $t_{1/2}$ in Einheiten von τ als Funktion der Retention r .

Man erkennt, dass sich für den Übergang $r \rightarrow 1$

$$\lim_{r \rightarrow 1} t_{1/2} = \infty \quad (\text{D.7})$$

ergibt, dass heißt, für eine quantitative Retention ist die Definition einer Halbwertszeit nicht mehr sinnvoll.

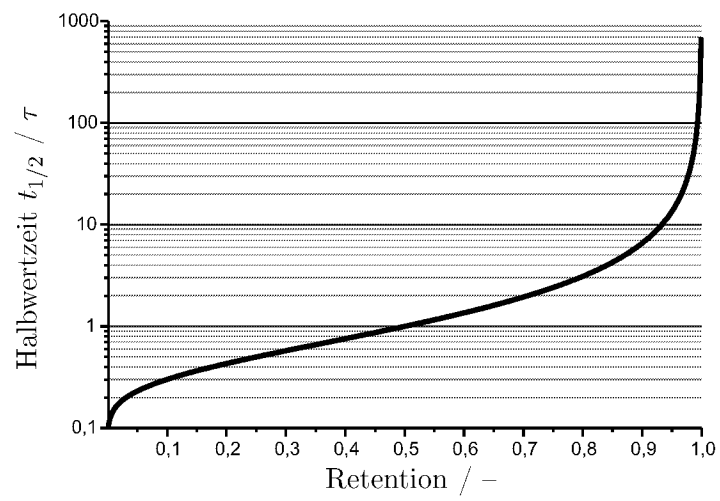
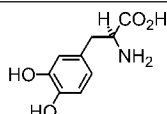
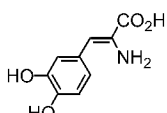
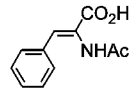
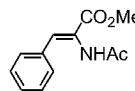
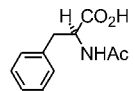
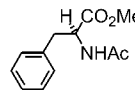
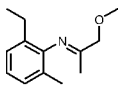
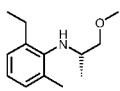
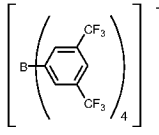
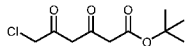
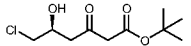


ABBILDUNG D.2.: Halbwertszeit $t_{1/2}$ als Funktion der Retention r für einen CSTR in halb-logarithmischer Auftragung

E. Formelverzeichnis: Nummerierung und Nomenklatur

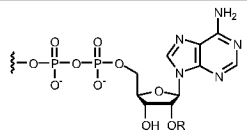
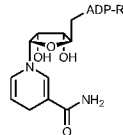
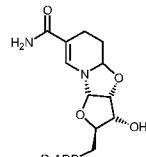
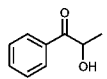
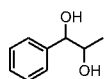
Nr.	Abk.	Bezeichnung	
1	DOPA	2-Acetylamino-3-(3,4-dihydroxy-phenyl)-propionsäure	
2	proDOPA	2-Acetylamino-3-(3,4-dihydroxy-phenyl)-acrylsäure	
3	Naproxen	2-(6-Methoxy-naphthalen-2-yl)-propionsäure	s.Abb.4.2, S.30
4		Rhodium-bis-(triphenylphosphan)-chlorid bzw. Wilkinson-Katalysator	
5		Alkene (allgemeine Formel)	-
6		Alkane (allgemeine Formel)	-
7		Enamid (allgemeine Formel)	siehe Abb.4.5 S.33
8	AAZ	2-Acetylamino-3-phenyl-acrylsäure bzw. α -Acetamido-zimtsäure	
9		2-Acetylamino-acrylsäure	siehe Abb.4.5 S.33
10	AAZMe	2-Acetylamino-3-phenyl-acrylsäure-methylester bzw. α -Acetamido-zimtsäuremethylester	
11	NAcPhe	2-Acetylamino-3-phenyl-propionsäure bzw. <i>N</i> -Acetylphenylalanin	
12	NAcPheMe	2-Acetylamino-3-phenyl-propionsäuremethylester bzw. <i>N</i> -Acetylphenylalanin-methylester	
13	MEA	(2-Ethyl-6-methyl-phenyl)-(-methoxy-1-methyl-ethylidene)-amin	
14		(2-Ethyl-6-methyl-phenyl)-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-amin	

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von der vorherigen Seite			
Nr.	Abk.	Bezeichnung	
15	DuPhos	1,2-Bis(2,5-dimethylphospholanyl)-benzen	siehe Tab.4.2 S.35
16		α,δ - bzw. 1,4-Diole	
17	BICP	2,2'-Bis-diphenylphosphanyl-bicyclopentyl-ethan	siehe Tab.4.2 S.35
18	BPPM	4-Diphenylphosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-pyrrolidin-1-carboxysäure-butylester	siehe Tab.4.2 S.35
19	Prolin	Pyrrolidin-2-carbonsäure	
20	DIPAMP	1,2-Bis(methoxyphenyl-phenyl-phosphanyl)-ethan	siehe Tab.4.2 S.35
21	PyrPhos	1-Phenyl-3,4-bis-(diphenylphosphanyl)-pyrrolidin	siehe Tab.4.2 S.35
22		Weinsäure, 2,3-Dihydroxy-bernsteinsäure bzw. 2,3-Dihydroxy-butandisäure	-
23	DIOP	2-Dimethyl-4,5-bis-(diphenylphosphanyl)-[1,3]dioxolane	siehe Tab.4.2 S.35
24	BINAP	2,2'-Bis-phosphanyl-[1,1']binaphthalenyl	siehe Tab.4.2 S.35
25	JosiPhos	1-(Diphenylphosphanyl)-2-(1-diphenylphosphanyl-alkyl)-ferrocen	siehe Tab.4.2 S.35
26	FerroTane	Bis-1,1'-(2,4-Dialkyl-phosphetanyl)-ferrocen	siehe Tab.4.2 S.35
27	PhanePhos	5,11-Bis-phosphanyl-paracyclophan bzw. 5,11-Bis-phosphanyl-tricyclo[8.2.2 ^{24,7}]hexadeca-1(13),4(16),5,7(15),10(14),11-hexaen	siehe Tab.4.2 S.35
28	xyliPhos	1-[Methyl-(bis(3,5-dimethylphenyl)-phosphanyl)-methylen]--diphenylphosphan-ferrocen	siehe Tab.4.2 S.35
-	BARF	(Tetrakis-3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)-borat	
29	COD	1,5-Cyclooctadien	
30		<i>N</i> -isoPropyl-2-methyl-acrylamid	Abb. 6.10 auf Seite 50
31		Aktivester von 30	Abb. 6.10 auf Seite 50
32		PyrPhos 21 mit Spacer	Abb. 6.10 auf Seite 50
33		molekulargewichtsvergrößerter PyrPhos-Katalysator	Abb. 6.10 auf Seite 50
34	CDHE	6-Chlor-3,5-dioxo-hexanoat- <i>tert</i> -butylat	
35	CHOH	6-Chlor-5-hydroxy-3-oxo-hexanoat- <i>tert</i> -butylat	

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von der vorherigen Seite

Nr.	Abk.	Bezeichnung	
-	ADP-R	Adenosin-dinucleotid-(phosphat)-rest R=H oder (PO ₃ H ₂)	
36	NADP ⁺	β-Nikotinamid-dinucleotid-phosphat (R=PO ₃ H ₂)	Abb. 11.1 auf Seite 78
37	NAD ⁺	β-Nikotinamid-dinucleotid (R=H)	Abb. 11.1 auf Seite 78
38	NADPH	β-1,4-Dihydro-nikotinamid-dinucleotid- phosphat (R=PO ₃ H ₂)	Abb. 11.1 auf Seite 78
39	NADH	β-1,4-Dihydro-nikotinamid-dinucleotid- (R=H)	Abb. 11.1 auf Seite 78
40	Formiat	Methansäure, Ameisensäure bzw. Formiat (als Anion)	-
41	Carbonat	CO ₃ ²⁻ , Carbonat bzw. HCO ₃ ⁻ Hydrogencarbonat	-
42	RhBiPyCp*	Pentamethylcyclopentadienyl-(2,2'-bipyridyl)- Rhodium	Abb. 8.8 auf Seite 69
43	TPPTS	Pentanatrium-bis-(tri-(3-sulfonato-phenyl)- phosphan)-dichloro-rhodium	Abb. 8.8 auf Seite 69
44	TPPMS	Trinatrium-bis-(Diphenyl-(3-sulfonato- phenyl)-phosphan)-dichloro-rhodium	Abb. 8.8 auf Seite 69
45	α-NADPH	α-1,4-Dihydro-nikotinamid-dinucleotid- (phosphat)	
46		cyclisches α-1,4,5,6-Tetrahydro-nikotinamid- dinucleotid-(phosphat)	
47	NADPHx	5,6-Addukt von NADPH	Abb. 47 auf Seite 159
48	AP	1-Phenylethanon bzw. Acetophenon	
49	PE	1-Phenylethanol	-
50	iPrOH	2-Propanol, iso-Propanol	-
51	AC	2-Propanon, Aceton	-
52	HPP	2-Hydroxy-1-phenylpropanon	
53	Diol	1-Phenylpropan-1,2-diol	

Literaturverzeichnis

Die Formatierung der Einträge im Literaturverzeichnis folgt den Vorschlägen der DIN 1505 Teil 2 und wurde mit Hilfe von Lorenzen [177] umgesetzt.

- [1] : *Nobelpreis für die Grundlagen von Herz- und Parkinsonmitteln*. Aachener Zeitung. 11. Oktober 2001
- [2] ACHIWA, K.: Asymmetric hydrogenation with new chiral functionalized bisphosphine-rhodium complexes. In: *Journal of the American Chemical Society* 98 (1976), Nr. 25, S. 8265–8266
- [3] ADAMS, Michael W. W.: Thermophilic archaea: An overview. In: ROBB, Frank T. (Hrsg.) ; PLACE, A. R. (Hrsg.) ; SOWERS, K. R. (Hrsg.) ; SCHREIER, H. J. (Hrsg.) ; DASSARMA, S. (Hrsg.) ; FLEISCHMANN, E. M. (Hrsg.): *Archaea: A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995, S. 3–7
- [4] ADAMS, Michael W. W. (Hrsg.) ; KELLY, Robert M. (Hrsg.): *Methods in Enzymology*. Bd. 330: *Hyperthermophilic Enzymes – Part A*. Academic Press, 2001
- [5] ADAMS, Michael W. W. ; MORTENSON, Leonard E. ; CHEN, Jiann-Shin: Hydrogenase. In: *Biochemistry* 594 (1981), S. 105–176
- [6] AGER, D.J. (Hrsg.): *Handbook of Chiral Chemicals*. New York : Marcel Dekker, 1999
- [7] AGUADO, Gemma P. ; ALVAREZ-LARENA, Angel ; ILLA, Ona ; MOGLIONI, Albertina G. ; ORTUÑO, Rosa M.: On the stereoselective hydrogenation of chiral cyclobutyl dehydro-amino acid derivatives: influence of the catalyst in the π -facial diastereoselection. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 12 (2001), S. 25–28
- [8] AHLBERG, Per: *Advanced Information on the Nobel Prize in Chemistry 2001*. 2001. – <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2001/index.html>
- [9] AKHAVAN, Jaqueline: *The Chemistry of Explosives*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 1998. – ISBN 0854645635 (FZJ-ZB C LE15)
- [10] ALBRACHT, Simon P. J.: Nickel hydrogenases: in search of the active site. In: *Biochemistry* 1188 (1994), S. 167–204
- [11] ALIVISATOS, Spyridon G. A. ; UNGAR, Frieda ; ABRAHAM, George: Non-enzymatic interactions of reduced coenzyme I with inorganic phosphate and certain other anions. In: *Nature* (1964), S. 973–975
- [12] ANDERSON, Mats ; HOLMBERG, Hans ; ADLERCREUTZ, Patrick: Evaluation of *Alcaligenes eutrophus* cells as an NADH regenerating catalyst in organic-aqueous two-phase system. In: *Biotechnology and Bioengineering* 57 (1998), Nr. 1, S. 79–86
- [13] ARP, D. J. ; BURRIS, R. H.: Kinetic mechanism of the hydrogen-oxidizing hydrogenase from soybean nodule bacteroids. In: *Biochemistry* 20 (1981), S. 2234–2240
- [14] ATKINS, P. W.: *Physical Chemistry*. Oxford University Press, 1994. – ISBN 0198557302
- [15] AVALOS, Martín ; BABIANO, Reyes ; CINTAS, Pedro ; JIMÉNEZ, José L. ; PALACIOS, Juan C. ; BARRON, Laurence D.: Absolute asymmetric synthesis under physical fields: facts and fictions. In: *Chemical Reviews* 98 (1998), S. 2391–2404
- [16] BAERNS, Manfred ; CLAUS, Peter: Chemical reaction engineering aspects of homogeneous-

- ly catalyzed processes. In: CORNILS, B. (Hrsg.) ; HERMANN (Hrsg.): *Applied Homogeneous Catalysis*. Wiley-VCH, 1996
- [17] BAIROCH, A.: The ENZYME data bank in 1999. In: *Nucleic Acid Research* 27 (1999), S. 310–311. – <http://www.expasy.ch/enzyme/>
- [18] BAYER, E. ; SCHURIG, V.: Lösliche Metallkomplexe von Polymeren zur Katalyse. In: *Angewandte Chemie* 87 (1975), S. 484
- [19] BECK, Wolfgang ; NAGEL, Ulrich: *Optisch aktive 3,4-Bis(diphenylphosphino)-pyrrolidone, diese als chirale Liganden enthaltende Rhodiumkomplexe und deren Verwendung*. EP 0151282. 07.09.1988 1988
- [20] BERGBREITER, David E. ; CASE, Brenda L. ; LIU, Un-Shan ; CARAWAY, John W.: Poly(N-isopropylacrylamide) soluble polymer supports in catalysis and synthesis. In: *Macromolecules* 31 (1998), S. 6053–6062
- [21] BERGBREITER, D.E.: Organic polymers as a catalyst recovery vehicle. In: [271], S. 111–148. – (FZJ-ZB: C ET 31)
- [22] BERGER, Alessandro ; SOUZA, Roberto F. de ; DELGADO, Marcelo R. ; DUPONT, Jairton: Ionic liquid-phase asymmetric catalytic hydrogenation: hydrogen concentration effects on enantioselectivity. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 12 (2001)
- [23] BERKESSEL, Albrecht ; THAUER, Rudolf K.: Zum Katalysemechanismus einer metallfreien Hydrogenase aus methanogenen Archae: enzymatische Umsetzungen von H₂ ohne Metall und ihre Analogie zur Chemie der Alkane in supersaurer Lösung. In: *Angewandte Chemie* 107 (1996), Nr. 20, S. 2418–2421
- [24] BERNOFSKY, Carl: Nature and biochemical significance of compounds derived from pyridine nucleotides. In: DOLPHIN, David (Hrsg.) ; POULSON, Rozanne (Hrsg.) ; AVRAMOVIĆ, Olga (Hrsg.): *Coenzymes and Cofactors: Pyridine Nucleotide Coenzymes, Part B* Bd. II. New York : John Wiley & Sons, 1987, S. 105–172
- [25] BESSEL, Carol A. ; AGGARWAL, Pooja ; MARSCHLOK, Amy C. ; TAKEUCHI, Kenneth J.: Transition-metal complexes containing *trans*-spanning diphosphine ligands. In: *Chemical Reviews* 101 (2001), S. 1031–1066
- [26] BIRKMAYER, Georg: *NADH The Energizing Coenzyme*. Keats Publishing, 2002. – <http://www.enada.com>. – ISBN 0879838620
- [27] BISHOP, David M.: *Group theory and Chemistry*. Oxford : Clarendon Press, 1973. – ISBN 0198551401
- [28] BLASER, H.-U. ; PUGIN, B. ; SPINDLER, F.: Enantioselective synthesis. In: CORNILS, B. (Hrsg.) ; HERRMANN, W.A. (Hrsg.): *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds* Bd. 2. Weinheim : VCH, 1996, S. 992–1000
- [29] BLASER, Hans-Ulrich: The chiral switch of (*S*)-Metolachlor: a personal account of an industrial odyssey in asymmetric catalysis. In: *Advanced Synthesis and Catalysis* 344 (2002), Nr. 1, S. 17–31
- [30] BLASER, Hans-Ulrich ; SPINDLER, Felix: The chiral switch of Metolachlor. 1999
- [31] BLASER, Hans-Ulrich ; STUDER, Martin: Critical issues for using enantioselective catalysis for fine chemicals production. In: *Chirality* 11 (1999), S. 459–464
- [32] BLASER, Hans-Ulrich ; STUDER, Martin: The role of catalysis for the clean production of fine chemicals. In: *Applied Catalysis A: General* 189 (1999), S. 191–204
- [33] BOLM, Carsten: Asymmetrische Dihydroxylierung mit polyethylenglycol-gebundenen Liganden. In: *Angewandte Chemie* 109 (1997), S. 773
- [34] BOLM, Carsten ; DINTER, C.D. ; SEGER, A. ; HÖCKER, H. ; BRONZIO, J.: Synthesis of catalytically active polymers by means of ROMP: an effective approach towards polymeric homogeneously soluble catalysts. In: *Journal of Organic Chemistry* 64 (1999), S. 5730

- [35] BOMMARIUS, Andreas S. ; DRAUZ, Karlheinz ; EILS, Stefan ; KIRCHHOFF, Jochen ; SCHWARM, Michael: Reduction technologies in the industrial synthesis of fine chemicals. In: *CHIMICA OGGI* (2000), Nr. Oktober, S. 12–17
- [36] BRERETON, Richard: Studying Reactions by Kinetics. In: *www.chemweb.com* (2002), Nr. 5.April. – <http://www.chemweb.com/alchem/articles/1015947525148.html>
- [37] BRINKMANN, Nils: *Polymergestützte Oligosacharidsynthese*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Dissertation, 2002
- [38] BRINKMANN, Nils ; GIEBEL, D. ; LOHMER, G. ; REETZ, Manfred T. ; KRAGL, Udo: Allylic substitution with dendritic palladium catalysts in a continuously operating membrane reactor. In: *Journal of Catalysis* 183 (1999), S. 163–168
- [39] BÖRNER, Armin ; HELLER, Detlef: The economic use of precious chiral diphosphine ligands —DuPHOS and its rhodium(I) COD and NBD complexes. In: *Tetrahedron Letters* 42 (2001), S. 223–225
- [40] BROWN, John M.: Hydrogenation of functionalized carbon-carbon double bonds. In: JACOBSON, Eric N. (Hrsg.) ; PFALTZ, Andreas (Hrsg.) ; YAMAMOTO, Hisashi (Hrsg.): *Comprehensive asymmetric catalysis* Bd. 1. Berlin, Heidelberg, New York : Springer Verlag, 1999, S. 121–182
- [41] BRUNNER, H.: Hydrogenation. In: [67], S. 201
- [42] BRYANT, Frank O. ; ADAMS, Michael W. W.: Characterization of hydrogenase from hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. In: *Journal of Biological Chemistry* 264 (1989), S. 5070–5079
- [43] BUCHHOLZ, A. ; GREINER, L. ; HOH, C. ; LIESE, A.: Genetic algorithms as tool for capillary electrophoresis method development. In: *Journal of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology* 7 (2002), Nr. 3/4, S. 51–60
- [44] BUCHHOLZ, Arne ; GREINER, Lasse ; HOH, Christoph ; WANDREY, Christian: *Verfahren zur Optimierung der Parameter eines Trennungsverfahrens für Stoffgemische*. DE10021597.1. 2001
- [45] BURIAC, Jilian M. ; KLEIN, Jason C. ; HERRINGTON, Deborah G. ; OSBORN, John A.: Probing the mechanisms of enantioselective hydrogenation of simple olefins with chiral rhodium catalysts in the presence of anions. In: *Chemistry- A European Journal* 6 (2000), Nr. 1, S. 139–150
- [46] BURK, Mark J.: C₂-symmetric bis(phospholanes) and their use in highly enantioselective hydrogenation reactions. In: *Journal of the American Chemical Society* 113 (1991), S. 8518–8519
- [47] BURK, Mark J.: Asymmetric catalysis: development and applications of the DuPhos ligands. In: AGER, David J. (Hrsg.): *Handbook of Chiral Chemicals*. New York : Marcel Dekker, 1999, S. 339–359
- [48] BURK, Mark J.: Modular phospholane ligands in asymmetric catalysis. In: *Accounts of Chemical Research* 33 (2000), S. 363–372
- [49] BURK, M(ark) J. ; CASY, G. ; JOHNSON, N. B.: A three-step procedure for asymmetric catalytic reductive amidation of ketones. In: *Journal of Organic Chemistry* 63 (1998), S. 6084–6085
- [50] BURK, Mark J. ; FEASTER, John E. ; NUGENT, William A. ; HARLOW, Richard. L.: Preparation and use of C₂-symmetric bis(phospholanes): production of α -amino acid derivatives via highly enantioselective hydrogenation reactions. In: *Journal of the American Chemical Society* 115 (1993), S. 10125–10138
- [51] BURK, Mark J. ; GROSS, Michael F. ; HARPER, T. Gregory P. ; KALBERG, Christopher S. ; LEE, Jeffrey R. ; MARTINEZ, Jose P.: Asymmetric catalytic routes to chiral building blocks of medicinal interest. In: *Pure and Applied Chemistry* 68 (1996), Nr. 1, S. 37–44
- [52] BUSCHMANN, H. ; SCHARF, H.-D. ; HOFFMANN, N. ; ESSER, P.: In: *Angewandte Chemie, International Edition in English* 30 (1991), 414–452 S. – siehe [53]
- [53] BUSCHMANN, H. ; SCHARF, H.-D. ; HOFFMANN, N. ; ESSER, P.: Das Isoinversionsprinzip- ein allgemeines Selektionsmodell in der Chemie. In: *Angewandte Chemie* 103 (1991), S. 480–518.

- siehe [52]
- [54] CAMMACK, Richard ; FERNANDEZ, Victor M. ; HATCHIKIAN, Claude E.: Nickel-Iron Hydrogenase. In: *Methods in Enzymology* Bd. 243. Academic Press, 1994, S. 42–68
- [55] CANTET, J. ; BERGEL, A. ; COMTAT, M.: Coupling of the electroenzymatic reduction of NAD^+ with a synthesis reaction. In: *Enzyme and Microbial Technology* 18 (1996), S. 72–79
- [56] CANTET, Jean ; BERGEL, Alain ; COMTAT, Maurice: Kinetics of the catalysis by the *Alcaligenes eutrophus* H16 hydrogenase of the electrochemical reduction of NAD^+ . In: *Journal of Molecular Catalysis* 73 (1992), S. 371–380
- [57] CHAN, A. S. C. ; PLUTH, J. J. ; HALPERN, Jack: Identification of the enantioselective step in the asymmetric catalytic hydrogenation of a prochiral olefin. In: *Journal of the American Chemical Society* 102 (1980), S. 5952–5954
- [58] CHAPELLE, F.H.: A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. In: *Nature* 415 (2002), S. 312–315
- [59] CHAUDHARI, R. V. ; SEAYAD, A. ; JAYASREE, S.: Kinetic modelling of homogeneous catalytic processes. In: *Catalysis Today* 66 (2001), S. 371–380
- [60] Chiral market spirals upwards. In: *Chemistry in Britain* (2001), Nr. April, S. 17
- [61] : *Chemie Nobelpreis für chirale Synthesen*. Chemische Rundschau. 12. Oktober 2001
- [62] CHENAULT, H. K. ; WHITESIDES, George M.: Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 14 (1987), S. 147–197
- [63] CHIN, J.K. ; KLINMAN, J.P.: Probes of a role for remote binding interactions on hydrogen tunneling in the horse liver alcohol dehydrogenase reaction. In: *Biochemistry* 39 (2000), Nr. 6, S. 1278–84
- [64] CHRISTEN, Hans R. ; VÖGTLE, Fritz: *Organische Chemie - Von den Grundlagen zur Forschung*. Bd. I. Otto Salle Verlag, Verlag Sauerländer, 1992. – ISBN 3793553973
- [65] CHRISTEN, Hans R. ; VÖGTLE, Fritz: *Organische Chemie - Von den Grundlagen zur Forschung*. Bd. II. 1990. – ISBN 3793553981
- [66] COBLEY, Christopher J. ; LENNON, Ian C. ; MCCAGUE, Raymond ; RAMSDEN, James A. ; ZANOTTI-GEROSA, Antonio: On the economic application of DuPHOS rhodium(I) catalysts: a comparison of COD versus NBD precatalysts. In: *Tetrahedron Letters* 42 (2001), S. 7481–7483
- [67] CORNILS, Boy (Hrsg.) ; HERRMANN, W.A. (Hrsg.): *Applied homogeneous catalysis with organometallic compounds*. Weinheim : VCH, 2000
- [68] CURRAN, Dennis P.: Trennungsstrategien in der organischen Synthese: Von der Planung zur Praxis. In: *Angewandte Chemie* 110 (1998), S. 1230–1255
- [69] DELONG, Edward F.: A phylogenetic perspective on hyperthermophilic microorganisms. In: [4], S. 121–128
- [70] DÉLÉCOULS, K. ; SAINT-AGUET, P. ; ZABOROSCH, C. ; BERGEL, Alain: Mechanism of the catalysis by the *Alcaligenes eutrophus* H16 hydrogenase of direct electrochemical reduction of NAD^+ . In: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 468 (1999), S. 139–149
- [71] DÜNNWALD, Thomas ; GREINER, Lasse ; IDING, Hans ; LIESE, Andreas ; MÜLLER, Michael ; POHL, Martina: *Stereoselektive Synthese von 2-Hydroxyketonen*. DE19918935.8. 2000
- [72] : *Druckbehälterverordnung*. 1980
- [73] DUMONT, W. ; POULIN, J.-C. ; DANG, T.-P. ; KAGAN, H.B.: Asymmetric Catalytic Reduction with Transition Metal Complexes. II. Asymmetric Catalysis by a Supported Chiral Rhodium Complex. In: *Journal of the American Chemical Society* (1973), S. 8295–8299
- [74] DWARS, Torsten ; HABERLAND, Jürgen ; GRASSET, Ingrid ; OEHME, Günther ; KRAGL, Udo: Asymmetric hydrogenation in a membrane reactor: recycling of the chiral catalyst by using a retainable micellar system. In: *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 168 (2001), S. 81–86

- [75] EGERER, Peter ; GÜNTHER, Helmut ; SIMON, Helmut: On the hydrogen-deuterium exchange reaction catalyzed by the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16 in the free and immobilized state. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 703 (1982), S. 149–157
- [76] ELIEL, E. L. ; WILEN, S. H. ; MANNER, L. N.: *Stereochemistry of Organic Compounds*. Wiley, 1994
- [77] ENDERS, Dieter ; HOFFMANN, Reinhard W.: Asymmetrische Synthese. In: *Chemie in unserer Zeit* 19 (1985), Nr. 6, S. 177–187
- [78] FACHE, F. ; GAMEZ, P. ; DUNJIC, B. ; LEMAIRE, M.: *Chemistry Review Prints*. Bd. 2: *From homogeneous to heterogeneous catalysis-recent advances in asymmetric catalysis with nitrogen containing ligands*. 1999
- [79] FARKAS, A. ; FARKAS, L. ; YUDKIN, J.: The decomposition of sodium formate by *Bacterium coli* in the presence of heavy water. In: *Proceedings of the Royal Society of London /B* 115 (1934), S. 373–379
- [80] : *Moleküle nach Art unserer Hände*. Frankfurter allgemeine Zeitung. 11. Oktober 2001
- [81] FEICHTINGER, Derek ; PLATTNER, Dietmar A.: Probing the reactivity of oxomanganese-salen complexes: An electrospray tandem mass spectrometric study of highly reactive intermediates. In: *Chemistry- A European Journal* 7 (2001), Nr. 3, S. 591–599
- [82] FELDER, Marcel ; GIFFELS, Guido ; WANDREY, Christian: A polymer-enlarged homogeneously soluble oxazaborolidine catalyst for the asymmetric reduction of ketones by borane. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 8 (1997), S. 1975
- [83] FIALA, Gerhard ; STETTER, Karl O.: *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. In: *Archives of Microbiology* 145 (1986), S. 56–61
- [84] FILHO, Murillo V.: *persönliche Mitteilung*. 2002
- [85] FISCHER, Konrad ; KRAGL, Udo ; ONDRUSCHKA, Bernd: Technische Chemie 2000. In: *Nachrichten aus der Chemie* 49 (2001), Nr. März, S. 382–386
- [86] FITCH, M. W. ; KOROS, W.J. ; NOLEN, R.L. ; CARNES, J. R.: Permeation of several gases through elastomers with emphasis on the Deuterium/Hydrogen pair. In: *Journal of Applied Polymer Science* 47 (1993), S. 1033–1046
- [87] FOGG, P. C. ; GERRARD, W.: *Solubility of gases in liquids: A critical evaluation of gas/liquid systems in theory and practice*. Chichester, UK : Wiley, 1991. – ISBN 0471929255
- [88] FOWKES, N. D. ; MAHONY, J.J.: *Einführung in die mathematische Modellierung*. Spektrum Akademischer Verlag, 1996. – ISBN 3860253875
- [89] FREY, Michel: Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes. In: *ChemBioChem* 3 (2002), S. 153–160
- [90] FREY, Michel ; FONTECILLA-CAMPS, Juan C. ; VOLBEDA, Anne: Nickel-iron hydrogenases. In: [4]
- [91] GADDIS, E. S.: The impinging-stream reactor. In: *Chemical Engineering Science* 47 (1992), S. 2877–2882
- [92] GASSER, Thomas: Medikamentöse Behandlung des Morbus Parkinson. In: *Arzneiverordnung in der Praxis* (1999), Nr. 3, S. 2–4
- [93] GIECK, K. ; GIECK, R.: *Technische Formelsammlung*. 30.Auflage. Germering : Gieck Verlag, 1995. – ISBN 9920379217
- [94] GIFFELS, Guido: *Enantioselektive Homogenkatalyse mit polymergebundenen Katalysatoren im Membranreaktor*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Dissertation, 1998
- [95] GIFFELS, Guido ; BELICZEY, Juliane ; FELDER, Marcel ; KRAGL, Udo: Polymer enlarged oxazaborolidines in a membrane reactor: Enhancing effectivity by retention of the homogeneous catalyst. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 9 (1998), S. 691

- [96] GLADIALI, S. ; MESTRONI, G.: Transferhydrogenations. In: BELLER, Matthias (Hrsg.) ; BOLM, Carsten (Hrsg.): *Transition Metals for Organic Synthesis* Bd. 1. New-York : Wiley- VCH, 1998, S. 97
- [97] GOLDBERG, Robert N. ; TEWARI, Yadu B. ; BELL, Donna ; FAZIO, Karl ; ANDERSON, Ellen: Thermodynamics of enzyme-catalyzed Reactions: Part 1. Oxidoreductases. In: *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 22 (1993), Nr. 2, S. 515–582
- [98] GOOSSENS, Michel ; MITTELBACH, Frank ; SAMARIN, Alexander: *Der L^AT_EX-Begleiter (The L^AT_EX Companion)*. Addison Wesley Verlag, 2000. – ISBN 3827316898
- [99] GRASSET, Ingrid ; SCHMIDT, Ute ; ZIEGLER, Silke ; FISCHER, Christine ; OEHME, Günther: Use of rhodium complexes with amphiphilic and nonamphiphilic ligands for the preparation of chiral α -aminophosphonic acid esters by hydrogenation in micellar media. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 9 (1998), S. 4193–4202
- [100] GREEF, R. ; PEAT, R. ; PETER, L. M. ; PLETCHER, D. ; ROBINSON, J.: *Instrumental methods in electrochemistry*. Chichester, England : Ellis Horwood Limited, 1990 (Ellis Horwood Series in Physical Chemistry). – ISBN 0134720938
- [101] GREEN, M. ; KUC, T. A. ; TAYLOR, Susan H.: Cationic Transition-metal complexes. Part I. Synthesis and Reactions of Bis(diene)-rhodium and -iridium tetrafluoroborates. In: *Journal of the Chemical Society (A)* (1971), S. 2334–2337
- [102] GREINER, Lasse: *Reaktionstechnik der Benzoylformiatdecarboxylase*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Diplomarbeit, 1999
- [103] GREINER, Mareen: *Integration mit Integrationsfaktor-persönliche Mitteilung*. 2002
- [104] GRIDNEV, Ilya D. ; HIGASHI, Natsuka ; ASAKURA, Katsuo ; IMAMOTO, Tsuneo: Mechanism of asymmetric hydrogenation catalyzed by rhodium complex of (*S,S*)-1,2-Bis(*tert*-butylmethylphosphino)ethane. Dihydride mechanism of asymmetric hydrogenation. In: *Journal of the American Chemical Society* 122 (2000)
- [105] GROS, Pierre ; ZABOROSCH, Christiane ; SCHLEGEL, Hans G. ; BERGEL, Alain: Direct electrochemistry of *Rhodococcus opacus* hydrogenase for the catalysis of NAD⁺ reduction. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 405 (1996), S. 189–195
- [106] GRZESZIK, C. ; ROSS, K. ; SCHNEIDER, K. ; REH, M. ; SCHLEGEL, Hans G.: Location, catalytic activity, and subunit composition of NAD-reducing hydrogenases of some *Alcaligenes* strains and *Rhodococcus opacus* MR22. In: *Archives of Microbiology* 167 (1997), S. 172–176
- [107] HALLAHAN, D. L. ; FERNANDEZ, V. M. ; HALL, D. O.: Reversible activation of hydrogenase from *Escherichia coli*. In: *European Journal of Biochemistry* 165 (1987), S. 621–5
- [108] HALPERN, J.: Mechanism and stereoselectivity of asymmetric hydrogenation. In: *Science* 217 (1982), Nr. 4558, S. 401–407
- [109] HALPERN, Jack: Mechanistic aspects of homogeneous catalytic hydrogenation and related processes. In: *Inorganica Chimica Acta* 50 (1981), S. 11–19
- [110] HALPERN, Jack ; WONG, C. S.: In: *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (1973), 629–630 S
- [111] : *Chemie-Nobelpreis für bessere Arzneimittel*. Handelsblatt. 11. Oktober 2001
- [112] HEMBRE, Robert T. ; WAGENKNECHT, Paul S. ; PENNEY, Jonathan M.: *Enzymatic Reductions with dihydrogen via metal catalyzed cofactor regeneration*. WO 00/53731. 2000-09-14 2000
- [113] : *Nobel Prize in Chemistry shared by three researchers*. Herald Tribune. 11. Oktober 2001
- [114] HOH, Christoph ; VILLELA FILHO, Murillo: Enzyme Classification. In: [170], S. 31–56. – ISBN 3527300945
- [115] HOLLEMAN, Arnold F.: *Lehrbuch der anorganischen Chemie/Holleman-Wiberg*. 101. Auflage. Berlin, New York : Walter de Gruyter, 1995. – Fortgeführt von Egon Wiberg, Nils Wiberg. – ISBN 3110126419

- [116] HOLLMANN, Frank ; SCHMID, Andreas ; STECKHAHN, Eberhard: Erste synthetische Anwendung einer Monooxygenase unter indirekter elektrochemischer NADH-Regenerierung. In: *Angewandte Chemie* 113 (2001), Nr. 1, S. 190–193
- [117] HORNER, L. ; BÜTHE, H. ; SIEGEL, H.: Hydrierung und Isomerisierung von Olefinen mit homogen gelösten Phosphin-Rhodium-Komplexen. In: *Tetrahedron Letters* 37 (1968), S. 4023–4026
- [118] HORNER, L. ; SIEGEL, H. ; BÜTHE, H.: Asymmetrische katalytische Hydrierung mit einem homogen gelösten optisch aktiven Phosphin-Rhodium-Komplex. In: *Angewandte Chemie* 80 (1968), Nr. 24, S. 1034–1035
- [119] HOVEYDA, Amir H. ; SCHROCK, Richard R.: Catalytic asymmetric olefin metathesis. In: *Chemistry- A European Journal* 7 (2001), Nr. 5, S. 945–951
- [120] HUBER, Robert ; STETTER, Karl O.: Discovery of hyperthermophilic microorganisms. In: [4]
- [121] HUMMEL, Werner: Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. In: *TibTech* 17 (1999), S. 487–492
- [122] HUMMEL, Werner: *persönliche Mitteilung*. 2001
- [123] HUMMEL, Werner ; KULA, Maria-Regina: Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. In: *European Journal of Biochemistry* 184 (1989), S. 1–13
- [124] IDING, Hans ; SIEGERT, Petra ; DÜNNWALD, Thomas ; MÜLLER, Michael ; GREINER, Lasse ; LIESE, Andreas ; GRÖTZINGER, J. ; DEMIR, A. ; POHL, Martina: Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. In: *Chemistry- A European Journal* 6 (2000), Nr. 8, S. 1483–1495
- [125] IKARIYA, Takao ; ISHII, Y. ; KAWANO, H. ; ARAI, T. ; SABURI, M. ; YOSHIKAWA, S. ; AKUTAGAWA, S.: Synthesis of novel chiral ruthenium complexes of 2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl and their use as asymmetric catalysts. In: *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (1985), S. 922
- [126] INOGUCHI, Kiyoshi ; ACHIWA, Kazuo: Efficient asymmetric hydrogenation of (*Z*)-2-acetamidocinnamic acid catalyzed by the rhodium complex of modified *N*-benzyl-(3*R*,4*R*)-3,4-bis(diphenylphosphino)pyrrolidine (DEGPHOS). In: *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990), Nr. 3, S. 818–820
- [127] IUPAC : Recommendations for nomenclature and tables in biochemical thermodynamics. In: *Pure and Applied Chemistry* 66 (1994), Nr. 8, S. 1641–1666
- [128] JACOBSON, Eric. N. (Hrsg.) ; PFALTZ, Andreas (Hrsg.) ; YAMAMOTO, Hisashi (Hrsg.): *Comprehensive asymmetric catalysis*. Berlin, Heidelberg, New York : Springer Verlag, 1999. – ISBN 3540643362
- [129] JAMES, Brian R.: Synthesis of chiral amines catalyzed homogeneously by metal complexes. In: *Catalysis Today* 37 (1997), S. 209–221
- [130] JANDEL, Almuth-Sigrun ; HUSTEDT, Helmut ; WANDREY, Christian: Continuous production of *L*-alanine from fumarate in a two stage membrane reactor. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 15 (1982), S. 59–63
- [131] JANDEL, L. ; SCHULTE, B. ; BÜCKMANN, A.F. ; WANDREY, Christian: Quantitative Description of the rejection of polymeric catalysts by ultrafiltration membranes. In: *Journal of Membrane Science* 7 (1980), S. 185
- [132] JESSOP, Philip G. ; IKARIYA, Takao ; NOYORI, Ryoji: Homogeneous catalysis in supercritical fluids. In: *Chemical Reviews* 99 (1999), S. 475–493
- [133] JOHNSON, S. L. ; TUAZON, Polygena: Acid-catalyzed hydration of reduced nicotinamide adenine dinucleotide and its analogues. In: *Biochemistry* 16 (1977), S. 1175–1181
- [134] JR., Laércio R. ; FERNANDES, Julio C. B. ; OLIVEIRA NETO, Graciliano d. ; KUBOTA, Lauro ; KATEKAWA, Edson ; SERRANO, Sílvia H. P.: Study of NADH stability using Ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design. In: *Annals of Biochemistry* 260 (1998),

- S. 50–55
- [135] KAGAN, H. B.: Asymmetric Synthesis using Organometallic Catalysts. In: WILKINSON, G. (Hrsg.) ; STONE, F. G. A. (Hrsg.) ; ABEL, E. W. (Hrsg.): *Comprehensive Organometallic Chemistry* Bd. 8. London : Pergamon, 1982, S. 463–498
 - [136] KAGAN, H.B. ; DANG, T.-P.: Asymmetric Catalytic Reduction with Transition Metal Complexes. I. A Catalytic System of Rhodium(I) with (-)-2,3-O-Isopropylidene-2,3-dihydroxy-1,4-bis(diphenylphosphino)butane, a New Chiral Diphosphine. In: *Journal of the American Chemical Society* 94 (1972), S. 6429–6433
 - [137] KAGAN, Henri B. ; LUUKAS, T. O.: Non-linear effects and autocatalysis. In: [128]. – ISBN 3540643362
 - [138] KASMI, A. E. ; LEOPOLD, M. C. ; GALLIGAN, R. ; ROBERTSON, R. T. ; SAAVEDRA, S. S. ; KACEMI, K. E. ; BOWDEN, E. F.: Adsorptive immobilization of cytochrom c on indium/tin oxide (ITO): electrochemical evidence for electron transfer-induced conformational changes. In: *Electrochemistry Communications* 4 (2002), S. 177–181
 - [139] KATRITZKY, Alan R. ; TATHAM, Douglas B.: Correlation of the solubilities of gases and vapors in methanol and ethanol with their molecular structures. In: *Journal of Chemical Informatics and Computational Science* 41 (2001), S. 358–363
 - [140] KÖHLER, M.: *persönliche Mitteilung*. 2000
 - [141] KIENLE, Richard von: *Fremdwörterlexikon*. Gütersloh : Praesentverlag Heinz Peter, 1965
 - [142] KIHUMBU, David: *N.N.*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Dissertation, 2003
 - [143] KLEIN, Andreas R. ; FERNÁNDEZ, Victor M. ; THAUER, Rudolf K.: H₂-forming N⁵,N¹⁰-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase: mechanism of H₂ formation analyzed using hydrogen isotopes. In: *FEBS Letters* 368 (1996), S. 203–206
 - [144] KLEMENT, I.: *DeguPhos und seine Anwendung - Eine kurze Übersicht*. 04.Januar 1999
 - [145] KÖLLE, Ulrich ; GRÄTZEL, Michael: Metallorganische Rhodium(III)-Komplexe als Homogenkatalysatoren für die Photoreduktion von Protonen zu Wasserstoff an kolloidalem TiO₂. In: *Angewandte Chemie* 99 (1987), Nr. 6, S. 572–574
 - [146] KNOWLES, W.S.: Asymmetric Hydrogenation. In: *Accounts of Chemical Research* 16 (1983), S. 106–112
 - [147] KNOWLES, W.S. ; SABACKY, M.J.: Catalytic Asymmetric Hydrogenation employing a Soluble, Optically Active, Rhodium Complex. In: *Chemical Communications* (1968), S. 1445–1446
 - [148] KOMAROV, Igor V. ; BÖRNER, Armin: Hochenantioselektiv oder nicht? - Chirale einzählige Monophosphorliganden in der asymmetrischen Hydrierung. In: *Angewandte Chemie* 113 (2001), Nr. 7, S. 1237–1240
 - [149] KOPKA, Helmut: *L^AT_EX Einführung Band 1*. Addison Wesley Verlag, 2000. – ISBN 3827315573
 - [150] KORPIUN, O. ; LEWIS, R. A. ; CHICKOS, J. ; MISLOW, K: Synthesis and absolute configuration of optically active phosphine oxides and phosphinates. In: *Journal of the American Chemical Society* 90 (1968), S. 4842
 - [151] KOW, Y. W. ; BURRIS, R. H.: Purification and properties of membrane-bound hydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. In: *Journal of Bacteriology* 159 (1984), S. 564–569
 - [152] KRAGL, Udo: *Habilitation*. Bonn, 1998
 - [153] KRAGL, Udo ; DREISBACH, Carsten: Kontinuierliche asymmetrische Synthese in einem Membranreaktor. In: *Angewandte Chemie* 108 (1996), S. 684–685
 - [154] KRAGL, Udo ; DREISBACH, Carsten ; WANDREY, Christian: Membrane Reactors in Homogeneous Catalysis. Cornils:2000
 - [155] KRAGL, Udo ; DWARS, Torsten: The development of new methods for the recycling of chiral catalysts. In: *Trends in Biotechnology* 19 (2001), S. 442–449
 - [156] KRAGL, Udo ; GREINER, Lasse ; WANDREY, Christian: Enzymes, immobilized, reactors. In:

- FLICKINGER, M. C. (Hrsg.) ; DREW, S. W. (Hrsg.): *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. John Wiley & Sons, 1999
- [157] KRASNA, A. I.: Mutants of *Escherichia coli* with altered hydrogenase activity. In: *Journal of Gen Microbiology* 130 (1984), S. 779–787
- [158] KRUSE, Wolfgang: *Enantioselektive enzymkatalysierte Reduktion von Ketonen im Enzym-Membran-Reaktor mit membrangestützter extraktiver Produktabtrennung – Verfahren zur Produktion chiraler hydrophober Alkohole*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Dissertation, 1995
- [159] KULA, Maria-Regina ; WANDREY, Christian: Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme-Membrane Reactor with Simultaneous NADH Regeneration. In: *Methods in Enzymology* 136 (1987), S. 9
- [160] LAGASSE, F. ; KAGAN, H. B.: In: *Chem. Pharm. Bull.* 48 (2000), 315–324 S
- [161] LANDIS, Clark R. ; HALPERN, Jack: Asymmetric hydrogenation of methyl-(Z)- α -acetamidocinnamate catalyzed by {1,2-Bis((phenyl-*o*-anisoyl)phosphino)ethane}rhodium(I): kinetics, mechanism, and origin of enantioselection. In: *Journal of the American Chemical Society* 109 (1987), S. 1746–1754
- [162] LANDIS, Clark R. ; HILFENHAUS, Peter ; FELDGLUS, Steven: Structures and reaction pathways in rhodium(I)-catalyzed hydrogenation of enamides: a model DFT study. In: *Journal of the American Chemical Society* 121 (1999), S. 8741–8754
- [163] LAUE, Stephan: *Transferhydrierung im Membranreaktor*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Dissertation, 2002
- [164] LAUE, Stephan ; GREINER, Lasse ; WÖLTINGER, Jens ; LIESE, Andreas: Continuous application of chemzymes in a membrane reactor: asymmetric transfer hydrogenation of acetophenone. In: *Advanced Synthesis and Catalysis* 343 (2001), Nr. 6-7, S. 711–720
- [165] LAURINAVICHENE, Tatyana V. ; TSYGANKOV, Anatoly A.: H₂ consumption by *Escherichia coli* coupled via hydrogenase 1 or hydrogenase 2 to different terminal electron acceptors. In: *FEMS Microbiology Letters* 202 (2001), S. 121–124
- [166] LEVENSPIEL, Octave: *Chemical reaction engineering*. third edition. John Wiley&Sons, Inc., 1999. – ISBN 047125424X
- [167] LIESE, Andreas: *Reaktorkonzepte für Biotransformationen in Zweiphasensystemen*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Dissertation, 1998
- [168] LIESE, Andreas ; SEELBACH, Karsten: Basics of Bioreaction Engineering. In: [170], S. 51–50. – ISBN 3527300945
- [169] LIESE, Andreas ; SEELBACH, Karsten ; BUCHHOLZ, Arne ; HABERLAND, Jürgen: Processes. In: [170]. – ISBN 3527300945
- [170] LIESE, Andreas (Hrsg.) ; SEELBACH, Karsten (Hrsg.) ; WANDREY, Christian (Hrsg.): *Industrial Biotransformations*. Wiley-VCH, 2000. – ISBN 3527300945
- [171] LLAMA, M. J. ; SERRA, J. L. ; RAO, K. K. ; HALL, D. O.: Isolation of two hydrogenase activities in *Chromatium*. In: *European Journal of Biochemistry* 114 (1981), S. 89–96
- [172] LÜLLAU, E. ; DREISBACH, C. ; GROGG, A. ; BISELLI, Manfred ; WANDREY, C.: Immobilization of animal cells on chemically modified SIRAN carrier. In: SPIER, R. E. (Hrsg.) ; GRIFFITHS, J. B. (Hrsg.) ; MACDONALD, C. (Hrsg.): *Animal Cell Technology; Developments, Processes & Products*. Butterworth-Heinemann, 1992, S. 469–475
- [173] LO, H. C. ; BURIEZ, Olivier ; KERR, John B. ; FISH, Richard H.: In: *Angewandte Chemie, International Edition in English* 38 (1999), 1429–1432 S. – siehe auch [174]
- [174] LO, H. C. ; BURIEZ, Olivier ; KERR, John B. ; FISH, Richard H.: Regioselektive Reduktion von NAD⁺-Modellverbindungen mit [Cp*Rh(bipy)H⁺]: Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und mechanistische Aspekte der Bildung von 1,4-NADH-Derivaten. In: *Angewandte Chemie* 111 (1999), Nr. 10, S. 1524–1527. – siehe auch [173]

- [175] LOACH, Paul A.: Oxidation-reduction potentials, absorbance bands and molar absorbance of compounds used in biochemical studies. In: *CRC Handbook of Biochemistry*. second. CRC, 1996, S. J–33
- [176] LOCKE, Wyn: Modern Drug Discovery. In: *The Alchemist* (2001), Nr. <http://www.chemweb.com/alchem/articles/985883680391.html>
- [177] LORENZEN, Klaus F.: Das Literaturverzeichnis in wissenschaftlichen Arbeiten / Fachhochschule Hamburg. 1997. – Forschungsbericht. <http://www.fh-hamburg.de/pers/Lorenzen/tum/litverz.ps>
- [178] MA, Kesen ; WEISS, Robert ; ADAMS, Michael W. W.: Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assesment of its role in sulfur reduction. In: *Journal of Bacteriology* 182 (2000), Nr. 7, S. 1864–1871
- [179] MA, Kesen ; ZHOU, Zhi H. ; ADAMS, Michael W. W.: Hydrogen production from pyruvate by enzymes purified from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: a key role for NADPH. In: *FEMS Microbiology Letters* 122 (1994), S. 245–250
- [180] MALMSTRÖM, T. ; ANDERSSON, C.: Enantioselective hydrogenation in water catalysed by rhodium phosphine complexes bound to polyacrylic acid. In: *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 139 (1999), Nr. 2-3, S. 259–270
- [181] MALMSTRÖM, Torsten ; ANDERSSON, Carlaxel: Rhodium catalysed enantioselective hydrogenation in water using pyrphos bound to poly-acrylic acid as ligand. In: *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 157 (2000), S. 79–82
- [182] MASSANZ, C. ; SCHMIDT, S. ; FRIEDRICH, B.: Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. In: *Journal of Bacteriology* 180 (1998), S. 1023–1029
- [183] MCGARRITY, J. ; SPINDLER, F. ; FUCHS, R. ; EYER, M.: *Bispholanes for asymmetric synthesis*. EP0624587. 1994
- [184] MESSERSCHMIDT, Albrecht (Hrsg.) ; HUBER, Robert (Hrsg.) ; POULOS, Thomas (Hrsg.) ; WIEGHARDT, Karl (Hrsg.): *Handbook of Metalloproteins*. Bd. 2. Chichester : John Wiley & Sons, 2001
- [185] N, V. C. ; LÓPEZ, M. L. ; ANDRIO, A. ; LÓPEZ-ALEMANY, A. ; REFOJO, M. F.: Determination of the oxygen transmissibility and permeability of hydrogel contact lenses. In: *Journal of Applied Polymer Science* 72 (1999), Nr. 3, S. 321–327
- [186] NAGEL, Ulrich: Asymmetrische Hydrierung von α -(Acetylamino)-zimtsäure mit einem neuen Rhodiumkomplex: die Konzeption eines optimalen Liganden. In: *Angewandte Chemie* 96 (1984), Nr. 6, S. 425–426
- [187] NAGEL, Ulrich ; KINZEL, Elke: Enantioselektive katalytische Hydrierung von α -(Acetylamino)-zimtsäure mit einem Rhodium-Phosphankomplex in wässriger Lösung. In: *Chemische Berichte* 119 (1986), Nr. 5, S. 1731–1733
- [188] NAGEL, Ulrich ; KINZEL, Elke ; ANDRADE, Juan ; PRESCHER, Günter: Synthese N-substituierter (R,R)-3,4-Bis(diphenylphosphino)-pyrrolidine und Anwendung ihrer Rhodiumkomplexe zur asymmetrischen Hydrierung von α -(Acylamino)-acrylsäure-derivaten. In: *Chemische Berichte* 119 (1986), S. 3326–3343
- [189] NAKAMURA, Kozo ; AIZAWA, Masuo ; MIYAWAKI, Osato: *Electro-enzymology, coenzyme regeneration*. Berlin : Springer, 1988 (Biotechnology monographs). – ISBN 3540185194
- [190] NELSON, J. M. ; GRIFFIN, Edward G.: Adsorption of invertase. In: *Journal of the American Chemical Society* 38 (1916), S. 1109–1115
- [191] NINDAKOVA, L. O. ; SHAINYAN, B. A.: Transformations of the chiral diphosphine rhodium catalyst $[(1,5\text{-COD})\text{Rh}(-)R,R\text{-DIOP}]^+\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ under conditions of hydrogenation. In: *Russian Chemical Bulletin, International Edition* 50 (2001), Nr. 10, S. 1855–1859
- [192] NISHIDA, H. ; TAKADA, N. ; YOSHIMURA, M. ; SONODA, T. ; KOBAYASHI, H.: Tetrakis[3,5-

- bis(trifluoromethyl)phenyl]borate. Highly lipophilic stable anionic agent for solvent extraction of cations. In: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 57 (1984), S. 2600–2604
- [193] NIZ, Kilian M. ; BOLM, Carsten: Configurational control in stereochemically pure ligands and metal complexes for asymmetric catalysis. In: *Chemistry- A European Journal* 6 (2000), Nr. 13, S. 2309–2316
- [194] NOLL, T. ; BISELLI, M. ; WANDREY, C.: Wirbelschichtreaktor und Biomasse-Monitor – ein leistungsfähiges Fermentationssystem für Säugerzellen. In: *Biospektrum* 2 (1996), S. 65–67
- [195] NOYORI, Ryoji: Chiral metal complexes as discriminating molecular catalysts. In: *Science* 24 (1990), Nr. Juni, S. 1194–1199
- [196] NOYORI, Ryoji: *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*. Tokyo : John Wiley&Sons, 1994. – ISBN 0471572675
- [197] NOYORI, Ryoji ; OHKUMA, Takeshi: Asymmetrische Katalyse mit hinsichtlich Struktur und Funktion gezielt entworfenen Molekülen: die chemo- und stereoselektive Hydrierung von Ketonen. In: *Angewandte Chemie* 113 (2001), S. 40–75
- [198] NOYORI, Ryoji ; OHTA, M. ; HSIAO, Y. ; KITAMURA, M. ; OHTA, T. ; TAKAYA, H.: Asymmetric synthesis of isoquinoline alkaloids by homogeneous catalysis. In: *Journal of the American Chemical Society* 108 (1986), S. 7117
- [199] NUGENT, W.A. ; RAJANBABU, T.V. ; BURK, M(ark) J.: Beyond nature's chiral pool: enantioselective catalysis in industry. In: *Science* 259 (1993), S. 479–483
- [200] OKURA, I. ; KURABAYASHI, K. ; AONO, S.: Regeneration of NADPH and hydrogenation of ketones to alcohols with the combination of hydrogenase, ferredoxin-NADP reductase, and alcohol dehydrogenase. In: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 60 (1987), S. 3663–3666
- [201] OMMON, C. ; ENSE, S.: Obvious fakes are easily recognized by recognition of uncommon patterns. In: *Brain Research* 851 (1999), S. 21–13
- [202] OSBORN, J(ohn) A. ; JARDIN, F.H. ; YOUNG, J.F. ; WILKINSON, G.: The preparation and properties of tris(triphenylphosphine)halogenorhodium(I) and some reaction thereof including catalytic homogeneous hydrogenation of olefins and acetylenes and their derivatives. In: *Journal of the Chemical Society* (1966), S. 1711–1732
- [203] OTTINO, J. M.: The art of mixing with an admixture of art: viewing creativity through P. V. Danckwerts's early work. In: *Chemical Engineering Science* 55 (2000), S. 2749–2765
- [204] PARSHALL, G. ; NUGENT, W.: Making pharmaceuticals via homogeneous catalysis. In: *Chem-Tech* (1988), Nr. März, S. 184–190
- [205] PAYEN, B. ; SEGUI, M. ; MONSAN, P. ; SCHNEIDER, K. ; FRIEDRICH, C. G. ; SCHLEGEL, H. G.: Use of cytoplasmic hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* for NADH regeneration. In: *Biotechnology Letters* 5 (1983), S. 463–467
- [206] PEDRONI, Paola ; MURA, G. M. ; GALLI, G. ; SERBOLISCA, L. ; GRANDI, G.: The hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: from basic research to possible future applications. In: *International Journal of Hydrogen Energy* 21 (1996), Nr. 10, S. 853–858
- [207] PETROV, R. R. ; UTKIN, I. B. ; POPOV, V. O.: Effect of redox potential on the activation of the NAD-dependent hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* Z1. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 268 (1989), S. 287–297
- [208] PETROV, R. R. ; UTKIN, I. B. ; POPOV, V. O.: Redox-dependent inactivation of the NAD-dependent hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* Z1. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 268 (1989), S. 298–305
- [209] PHARMACIA BIOTECH AB: *High precision pump P-500 –User manual*. 1995
- [210] PORTHUN, A. ; BERNHARD, M. ; FRIEDRICH, B.: Expression of a functional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase from the gram-positive *Rhodococcus opacus* in the gram-negative *Ralstonia eutropha*. In: *Archives of Microbiology* 177 (2002), S. 159–166

- [211] POWERS, J. M. ; CADDELL, R. M.: The macroscopic volume changes of selected polymers subjected to uniform tensile deformation. In: *Polymer Engineering and Science* 12 (1972), Nr. 6, S. 432–436
- [212] PYE, Philip J. ; ROSSEN, Kai ; REAMER, Robert A. ; TSOU, Nancy N. ; VOLANTE, R. P. ; REIDER, Paul J.: A new planar chiral bisphosphine ligand for asymmetric catalysis: Highly Enantioselective hydrogenations under mild conditions. In: *Journal of the American Chemical Society* 119 (1997), S. 6207–6208
- [213] PYSZ, Marybeth A. ; RINKER, Kristina D. ; SHOCKLEY, Keith R. ; KELLY, Robert M.: Continuous Cultivation of Hyperthermophiles. In: [4]
- [214] RENNERT, Peter (Hrsg.) ; SCHMIEDEL, Herbert (Hrsg.) ; WEISSMANTEL, Christian (Hrsg.): *Kleine Enzyklopädie Physik*. Leipzig : Bibliographisches Institut, 1988
- [215] RENTMEISTER, Andrea: *Kinetische Untersuchungen der Guanosin-5'-diphospho- β -L-fucose Synthetase*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Diplomarbeit, 2002
- [216] RISSOM, Sebastian: *Membranverfahren für Redoxenzyme – Gasversorgung, Reaktion, Produktextraktion*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Dissertation, 1999
- [217] ROBB, Frank T. ; MAEDER, Dennis L. ; BROWN, James R. ; DIRUGGIERO, Jocelyne ; STUMP, Mark D. ; YEH, Raimond K. ; WEISS, Robert ; DUNN, Dianne M.: Genomic Sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: Implications for Physiology and Enzymology. In: [4]
- [218] ROBERTS, Stanley M.: Preparative biotransformations. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* (2001), S. 1475–1499
- [219] ROTHSCHILD, Lynn J. ; MANCINELLI, Rocco L.: Life in extreme environments. In: *Nature* 409 (2001), S. 1092–1101
- [220] RUBIRES, Raimon ; FARRERA, Joan-Anton ; RIBÓ, Josep M.: Stirring Effects on the Spontaneous Formation of Chirality in the Homoassociation of Diprotonated *meso*-Tetraphenylsulfonato Porphyrins. In: *Chemistry- A European Journal* 7 (2001), Nr. 2, S. 436–446
- [221] RUPPERT, R. ; HERRMANN, S. ; STECKHAN, E.: Very efficient reduction of NAD(P)⁺ with formate catalysed by cationic rhodium complexes. In: *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (1988), S. 1150–1151
- [222] SCHINK, B. ; SCHLEGEL, H(ans) G.: Mutants of *Alcaligenes eutrophus* defective in autotrophic metabolism. In: *Archives of Microbiology* 117 (1978), S. 123–129
- [223] SCHLÜTER, Stefan ; SCHULZKE, Tim: Modeling mass transfer accompanied by fast chemical reactions in gas/liquid reactors. In: *Chemical Engineering and Technology* 22 (1999), Nr. 9, S. 742–746
- [224] SCHMID, Rudolf ; SCALONE, Michelangelo: Process R&D of pharmaceuticals, vitamins, and fine chemicals. 1999, S. 1439–1449
- [225] SCHNEIDER, Klaus ; SCHLEGEL, Hans G.: Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 452 (1976), S. 66–80
- [226] SCHRÖDER, Iris: *N.N.*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Dissertation, 2002
- [227] SCHUBERT, Thomas ; HUMMEL, Werner ; MÜLLER, Michael: Highly enantioselective preparation of multifunctionalized propargylic building blocks. In: *Angewandte Chemie* 114 (2002), Nr. 4, S. 656–659. – siehe auch [228]
- [228] SCHUBERT, Thomas ; HUMMEL, Werner ; MÜLLER, Michael: Highly enantioselective preparation of multifunctionalized propargylic building blocks. In: *Angewandte Chemie, International Edition in English* 51 (2002), Nr. 4, S. 634–637. – siehe auch [227]
- [229] 2001. – Aus der Online-Datenbank SCI, Stichtag: 2001-11-02, Stichwort: (*asym* or assym* or chiral**) and *hydrogena** and (*hydrogen or dihydrogen*); begrenzt auf das jeweilige Jahr
- [230] : *Chemie der Spiegelbilder*. Süddeutsche Zeitung. 11. Oktober 2001

- [231] SEDGEWICK, Robert: *Algorithmen in C++*. Addison Wesley Verlag, 1992. – ISBN 3-893194622
- [232] SEDMARK, James J. ; GROSSBERG, Sidney E.: A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. In: *Analytical Biochemistry* 79 (1977), S. 544–552
- [233] SEELBACH, Karsten ; RIEBEL, Bettina ; HUMMEL, Werner ; KULA, Maria-Regina ; TISHKOV, Vladimir I. ; EGOROV, Alexey M. ; WANDREY, Christian ; KRAGL, Udo: A novel, efficient regeneration method of NADPH using a new formate dehydrogenase. In: *Tetrahedron Letters* 37 (1996), Nr. 9, S. 1377–1380
- [234] SELVAGGI, A. ; TOSI, C. ; BARBERINI, U. ; FRANCHI, E. ; RODRIGUEZ, F. ; PEDRONI, Paola: *In vitro* hydrogen photoproduction using *Pyrococcus furiosus* sulfhydrogenase and TiO₂. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 125 (1999), Nr. 1-3, S. 107–112
- [235] SHELDON, Roger: Organic synthesis- past, present and future. In: *Chemistry and industry (London)* (1992)
- [236] SHELDON, Roger: *Chirotechnology: Industrial synthesis of optically active compounds*. New York : Marcel Dekker, 1993
- [237] SHRIVER, D. F. ; ATKINS, P. W. ; LANGFORD, C. H.: *Inorganic Chemistry*. Oxford University Press, 1994. – ISBN 019855396X
- [238] SIETMANN, Richard: Erfinden nach Plan. In: *c't* (2001), Nr. 23, S. 96–105
- [239] SILVA, Pedro J. ; BAN, Eyke C. D. van den ; WASSINK, Hans ; HAAKER, Huub ; CASTRO, Baltazar de ; ROBB, Frank T. ; HAGEN, Wilfred R.: Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. In: *European Journal of Biochemistry* 267 (2000), S. 6541–6551
- [240] SILVA, Pedro J. ; CASTRO, Baltazar de ; HAGEN, Wilfred R.: On the prosthetic groups of the Ni-Fe sulfhydrogenase from *Pyrococcus furiosus*: topology, structure, and temperature-dependent redox-chemistry. In: *Journal of Bioinorganic Chemistry* 4 (1999), S. 284–291
- [241] SIMON, Helmut ; BADER, Johann ; GÜNTHER, Helmut ; NEUMANN, Stefan ; THANOS, Jordanes: Chiral compounds synthesized by biocatalytic reductions. In: *Angewandte Chemie, International Edition in English* 24 (1985), Nr. 539, S. 539–552. – siehe auch [242]
- [242] SIMON, Helmut ; BADER, Johann ; GÜNTHER, Helmut ; NEUMANN, Stefan ; THANOS, Jordanes: Chiral Verbindungen synthetisiert durch biokatalytische Reduktionen. In: *Angewandte Chemie* 97 (1985), S. 541. – siehe auch [241]
- [243] SMET, Koen D. ; AERTS, Sven ; CEULEMANS, Erik ; VANKELECOM, Ivo F. J. ; JACOBS, Pierre A.: Nanofiltration-coupled catalysis to combine the advantages of homogeneous and heterogeneous catalysis. In: *Chemical Communications* (2001), S. 597–598
- [244] SODE, Koji ; TSUGAWA, Wakako ; YAMAZAKI, Tomohiko ; WATANABE, Masato ; OGASAWARA, Nobuhiro ; TANAKA, Mitsuharu: A novel thermostable glucose dehydrogenase varying temperature properties by altering its quaternary structure. In: *Enzyme and Microbial Technology* 19 (1996), S. 82–85
- [245] STECKHAN, E.: Electroenzymatic synthesis. In: *Topics in Current Chemistry* 170 (1994), S. 83–111
- [246] STECKHAN, E. ; FREDE, M. ; HERRMANN, S. ; RUPPERT, R. ; SPIKA, E. ; DIETZ, E.: Enzymatische Synthesen durch indirekte elektrochemische Prozesse. In: *Dechema-Monographien* 125 (1992), S. 723–752
- [247] STECKHAN, E. ; THÖMMES, J. ; WANDREY, C.: In: *Angewandte Chemie, International Edition in English* 24 (1990), Nr. 4, 388–390 S. – siehe [248]
- [248] STECKHAN, E. ; THÖMMES, J. ; WANDREY, C.: Kontinuierliche Erzeugung von NADH aus NAD⁺ und Formiat mit einem molekulargewichtsvergrößerten Homogenkatalysator in einem Membranreaktor. In: *Angewandte Chemie* 4 (1990), S. 445–447. – siehe [247]
- [249] STILLGER, T. ; BÖNITZ, M. ; FILHO, M. V. ; LIESE, A.: Überwindung von thermodynamischen Limitierungen in substratgekoppelten Cofaktorregenerierungsverfahren. In: *Chemie Ingenieur Technik* 74 (2002), Nr. 7, S. 1035–1037

- [250] STILLGER, Thomas: *Pervaporation in einem Hybridverfahren zur substratgekoppelten Cofaktorregenerierung*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Diplomarbeit, 2000
- [251] STRANDJORD, Paul E. ; CLAYSON, Kathleen J.: The control of inhibitory impurities in reduced nicotinamid adenine dinucleotide in lactate dehydrogenase assays. In: *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 67 (1966), S. 144–153
- [252] STRYER, Lubert: *Biochemistry*. 4.Auflage. W. H. Freeman and Company, 1995. – ISBN 0716720094
- [253] STUDER, Martin ; BURKHARDT, Stefan ; BLASER, Hans-Ulrich: Catalytic hydrogenation of chiral α -Amino and α -hydroxy esters at room temperature with Nishimura catalyst without racemization. In: *Advanced Synthesis and Catalysis* 343 (2001), Nr. 8, S. 802–808
- [254] SUN, Yongkui ; WANG, Jian ; LEBLOND, Carl ; LANDAU, Ralph N. ; LAQUIDARA, Joseph ; JR., John R. ; BLACKMOND, Donna G.: Kinetic Influences on enantioselectivity in asymmetric catalytic hydrogenation. In: *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 115 (1997), S. 495–502
- [255] TADASHI, Matsunaga: *Reduction of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*. Japan-JP61056090A. 1986
- [256] TAKAISHI, Naokate ; IMAI, Horosuke ; BERTELO, Christopher ; STILLE, R.R.: Transition metal catalyzed asymmetric organic syntheses via polymer bound chiral ligands. Synthesis of *R* amino acids and hydratropic acid by hydrogenation. In: *Journal of the American Chemical Society* 98 (1976), Nr. 17, S. 5400–5402
- [257] : *Das richtige Spiegelbild*. tageszeitung. 12. Oktober 2001
- [258] THAUER, Rudolf K. ; KLEIN, Andreas R. ; HARTMANN, Gudrun C.: Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: evidence for a purely organic hydrogenation catalyst. In: *Chemical Reviews* 96 (1996), S. 3031–3042
- [259] T'HOFF, Jacobus H. van: A suggestion looking to the extension into space of the structural formulas at present used in chemistry and a note upon the relation between the optical activity and the chemical constitution of organic compounds. In: *Archives neerlandaises des sciences exactes et naturelles* 9 (1874), S. 445–454. – <http://dbhs.wvusd.k12.ca.us/Chem-History/Van't-Hoff-1874.html>
- [260] TOGNI, A. ; BREUTEL, C. ; SCHNYDER, A. ; SPINDLER, F.: A novel easily accessible chiral ferrocenyldiphosphine for highly enantioselective hydrogenation, allylic alkylation, and hydroboration reactions. In: *Journal of the American Chemical Society* 116 (1994), S. 4062
- [261] TOGNI, A. ; DORTA, R. ; KOLLNER, C. ; PIDDA, G.: Some new aspects of asymmetric catalysis with chiral ferrocenyl ligands. In: *Pure and Applied Chemistry* 70 (1998), Nr. 8, S. 1477–1485
- [262] TOGNI, A. ; SPINDLER, F. ; ZANETTI, N. ; TIJANI, A.: *N.N.* EP0564406. 1993
- [263] TOLMAN, C. A. ; MEAKIN, P. Z. ; LINDNER, D. L. ; JESSON, J. P.: Triarylphosphine, hydride and ethylene complexes of Rhodium(I) chloride. In: *Journal of the American Chemical Society* 96 (1974), S. 2762–2774
- [264] TORRENT, Maricel ; SOLÀ, Miquel ; FRENKING, Gernot: Theoretical studies of some transition-metal-mediated reactions of industrial and synthetic importance. In: *Chemical Reviews* 100 (2000), S. 439–493
- [265] UHLENBROCK, Katharina: *Methoden zur reaktionstechnischen Optimierung enzymatischer Synthese - dargestellt am Beispiel der enantioselektiven Reduktion von p-Chloracetophenon im organisch wäßrigen Zwei-Phasen-System*, Rheinische-Friedrichs-Wilhelm-Universität, Dissertation, 1994
- [266] VAN DEN BAN, Eyke C. D.: *Stabilitätsuntersuchungen zur PfH- persönliche Mitteilung*. 2000
- [267] VAN DEN BAN, Eyke C. D.: *Temperaturabhängigkeit der PfH Reduktionsaktivität-persönliche Mitteilung*. 2000
- [268] VAN DEN BAN, Eyke C. D.: *Exploring the reductive capacity of Pyrococcus furiosus*, Wageningen Universiteit, PhD, 2001

- [269] VERHAGEN, Marc F. J. M. ; MENON, Angeli L. ; SCHUT, Gerrit J. ; ADAMS, Michael W. W.: *Pyrococcus furiosus*: Large-scale cultivation and enzyme purification. In: [4], S. 25–30
- [270] VINEYARD, B.D. ; KNOWLES, W.S. ; SABACKY, M.J. ; BACHMAN, G.L. ; WEINKAUFF, D.J.: Asymmetric hydrogenation. Rhodium chiral bisphosphine catalyst. In: *Journal of the American Chemical Society* 99 (1977), Nr. 18, S. 5946–5952
- [271] VOS, Dirk E. D. (Hrsg.) ; VANKELECOM, Ivo F. (Hrsg.) ; JACOBS, Pierre A. (Hrsg.): *Chiral Catalyst Immobilization and Recycling*. Weinheim : Wiley-VCH, 2000. – (FZJ-ZB: C ET 31)
- [272] WASSINK, Hans: *Aktivierung der PfH durch Wasserstoff bei erhöhter Temperatur beseitigt die Beschleunigungsphase bei der Reduktion von Methylviologen - persönliche Mitteilung*. 2001
- [273] WESTERHAUSEN, D. ; HERRMANN, S. ; HUMMEL, Werner ; STECKHAHN, E.: Formiatgetriebene, nicht enzymatische NAD(P)H-Regeneration bei der durch Alkoholdehydrogenasen katalysierten stereoselektiven Reduktion von 4-Phenyl-2-butanon. In: *Angewandte Chemie* 104 (1992), S. 1496–1498
- [274] WEUSTER-BOTZ, Dirk ; PASCHOLD, H. ; STRIEGEL, B. ; GIEREN, H. ; KULA, Maria-Regina ; WANDREY, Christian: Continuous computer controlled production of formate dehydrogenase and isolation on a pilot scale. In: *Chemical Engineering and Technology* 17 (1994), S. 131–137
- [275] WHITE, Snow: Nanism in food processing: a case studie in seven examples. In: *Journal of Applied Biotechnology* 7 (2001), Nr. 7, S. 4+3
- [276] WHITFIELD, John: Life, as it was in the beginning? In: *nature science update* (2002). – im Internet unter <http://www.nature.com/nsu/020114/020114-7.html>
- [277] WÖLTINGER, Jens: *Begleitbrief zur Übersendung des polymervergrößerten Katalysators*. 07.Januar 2001
- [278] WÖLTINGER, Jens ; BOMMARIUS, Andreas S. ; DRAUZ, Karlheinz ; WANDREY, Christian: The chemzyme membrane reactor in the fine chemicals industry. In: *Organic Process Research & Development* 5 (2001), S. 241–248
- [279] WÖLTINGER, Jens ; DRAUZ, Karlheinz ; BOMMARIUS, Andreas S.: The membrane reactor in the fine chemicals industry. In: *Applied Catalysis A: General* 221 (2001), S. 171–185
- [280] WÖLTINGER, Jens ; HENNIGES, Hans ; KRIMMER, Hans-Peter ; BOMMARIUS, Andreas S. ; DRAUZ, Karlheinz: Application of the continuous Sharpless dihydroxylation. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 12 (2001), S. 2098–2098
- [281] WOLBERG, M. ; HUMMEL, W. ; WANDREY, C. ; MÜLLER, M.: Highly regio-and enantioselective reduction of 3,5-dioxocarboxylates. In: *Angewandte Chemie* 112 (2000), Nr. 23, S. 4476–4478. – [282]
- [282] WOLBERG, M. ; HUMMEL, W. ; WANDREY, C. ; MÜLLER, M.: Highly regio-and enantioselective reduction of 3,5-dioxocarboxylates. In: *Angewandte Chemie, International Edition in English* 39 (2000), Nr. 23, S. 4306–4308. – [281]
- [283] WOLBERG, Michael ; MÜLLER, Michael ; HUMMEL, Werner: *Verfahren zur enantioselectiven Reduktion von 3,5-Dioxocarbonsäuren sowie deren Ester*. DE19857323.2. 1998
- [284] WONG, Chi-Huey ; WHITESIDES, George M.: *Tetrahedron organic chemistry series*. Bd. 12: *Enzymes in synthetic organic chemistry*. Oxford : Elsevier Science Ltd, 1994
- [285] WOODWARD, Jonathan ; CORDRAY, Kimberley A. ; EDMONSTON, Robert J. ; BLANCO-RIVERA, Maria ; MATTINGLY, Susan M. ; EVANS, Barbara R.: Enzymatic hydrogen production: conversion of renewable resources for energy production. In: *Energy & Fuels* 14 (2000), Nr. 1, S. 197–201
- [286] WOODWARD, Jonathan ; ORR, Mark ; CORDRAY, Kimberley A. ; GREENBAUM, Elias: Enzymatic production of biohydrogen. In: *Nature* 405 (2000), S. 1014–1015
- [287] WU, James T. ; WU, Lily H. ; KNIGHT, Joseph A.: Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. In: *Clinical Chemistry* 32 (1986), Nr. 2, S. 314–319

- [288] YAMAMOTO, I ; ISHIMOTO, M.: Hydrogen-dependent growth of *Escherichia coli* in anaerobic respiration and the presence of hydrogenases with different functions. In: *Journal of Biochemistry* 84 (1978), S. 673–679
- [289] YAO, Qingwei: Ein löslicher polymergebundener Rutheniumcarbenkomplex: ein robuster und wiederverwendbarer Katalysator für Ringschluss-Olefinmethathesen. In: *Angewandte Chemie* 112 (2000), Nr. 21, S. 4060–4062
- [290] YOUNG, J.F. ; OSBORN, J.A. ; JARDIN, F.H. ; WILKINSON, G.: Hydride intermediates in homogeneous hydrogenation reactions of olefins and acetylenes using rhodium catalysts. In: *Chemical Communications* (1965), S. 131–132
- [291] ZARE, H. R. ; GOLABI, S. M.: Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at a chlorogenic acid modified glassy carbon electrode. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 464 (1999), S. 14–23
- [292] ZEIDLER, Georg ; DAUSSMANN, Thomas: *persönliche Mitteilung* – <http://www.juelich-chemicals.de>. 2002
- [293] ZHU, Guoxin ; ZHANG, Xumu: Asymmetric Rh-catalyzed hydrogenation of enamides with a chiral 1,4-bisphosphino bearing diphenylphosphinogroups. In: *Journal of Organic Chemistry* 63 (1998), S. 9590–9593
- [294] ZHU, G.X. ; CASALNUOVO, A.L. ; ZHANG, X.M.: Practical syntheses of beta-amino alcohols via asymmetric catalytic hydrogenation. In: *Journal of Organic Chemistry* 63 (1998), Nr. 23, S. 8100–8101

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4055
April 2003
ISSN 0944-2952