

# **Mehrphasige enzymatische Veresterung von Mono- und Polysacchariden mit Fettsäuren in unkonventionellen Lösungsmitteln**

Vom Promotionsausschuss der  
Technischen Universität Hamburg-Harburg  
zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)**

genehmigte Dissertation

von

**Bastian Kannengiesser**

aus

Hamburg

2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2009 bis Mai 2014 am Institut für Technische Biokatalyse der Technischen Universität Hamburg-Harburg angefertigt.

|                                       |                                |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| Erstgutachter:                        | Prof. Dr. rer. nat. A. Liese   |
| Zweitgutachter:                       | Prof. Dr.-Ing. M. Schlüter     |
| Vorsitzender des Prüfungsausschusses: | Prof. Dr. rer. nat. A.-P. Zeng |
| Datum der mündlichen Prüfung:         | 27. September 2016             |

*»Wie's eben kommt. Gestaltung, Umgestaltung,  
Des ewigen Sinnes ewige Unterhaltung.«*

(Mephistopheles zu Faust)



# Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Andreas Liese für die Möglichkeit, im Institut für Technische Biokatalyse eine spannende Aufgabenstellung zu bearbeiten, mich dabei fachlich wie persönlich weiterzuentwickeln und erfolgreich zu promovieren. Seine langjährige Betreuung und Unterstützung in zahlreichen Gesprächen sowie während der Anfertigung meiner Dissertation werde ich ebenso stets zu schätzen wissen wie das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ich danke Herrn Prof. Michael Schlüter dafür, dass er sich als Zweitgutachter und Zweitprüfer meiner Arbeit angenommen hat, sowie Herrn Prof. An-Ping Zeng für den Vorsitz des Prüfungsausschusses während meiner Prüfung.

Für die interessante und anwendungsbezogene Zusammenarbeit mit dem industriellen Kooperationspartner Evonik Industries AG bedanke ich mich bei Dr. Marrit Eckstein und Dr. Oliver Thum.

Bei Dr. Martin Pöhnlein bedanke ich mich für den spannenden Austausch innerhalb unseres Themengebietes sowie die erfolgreiche Zusammenarbeit an einer gemeinsamen Veröffentlichung, bei Prof. Rudolf Müller und Dr. Lutz Hilterhaus für das umfangreiche fachliche Feedback, bei Ulrike Zimmermann und Miranda Liephout für die organisatorische Unterstützung von Seiten des Sekretariats, bei Maren Breuer, Uta Naefken, Thi Lien Tieu-Schröder und Gerhard Schietke für alle technischen Hilfestellungen im Labor und bei Gesine Liese für einen spannenden Job bei den Kinderforschern an der TUHH.

Ich danke Thomas Gerlach für den interessanten Austausch über Wechselwirkungen in Lösungsmitteln, Eva Nittinger für die aufschlussreiche molekulardynamische Simulation verschiedener Enzym-Substrat-Komplexe, Rainer Behn für die Durchführung von Röntgenbeugungsmessungen, Dr. Luis Prado für die Durchführung von thermogravimetrischen Analysen, Frans Jan de Jong und Dr. Marko Hoffmann für die Durchführung von kalorimetrischen Messungen und die Möglichkeit das Rotationsrheometer zu nutzen, sowie Frank Sokolinski für die unkomplizierte Reparatur elektrischer Geräte.

Für die Beiträge an meiner Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Getachew Shibabaw Molla, Sabrina Förster, Nick Tietgens, Maik Baydar, Christine Oertel, Marco Kornmann,

Leif Kolbow, Dennis Braniewicz, Tom Gaida, Dr. Alexander Himmelspach, Christian Scherkus, Steffen Hackbusch, Steffen Kühn sowie allen, die mir sehr hilfreiches Feedback für meinen Vortrag gegeben, mir bei jeglicher Vor- und Nachbereitung geholfen und mich nach der Prüfung herzlich empfangen haben, und mir während meiner Zeit im Institut für Technische Biokatalyse zur Seite gestanden haben.

# Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Abkürzungen</b>   | <b>v</b>    |
| <b>Symbole, Einheiten und Indizes</b>                            | <b>ix</b>   |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>                                     | <b>xiii</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>                                       | <b>xvii</b> |
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1 Nachwachsende Rohstoffe und Bioraffinerie-Konzepte . . . . . | 1           |
| 1.2 Tenside . . . . .  | 4           |
| 1.3 Enzyme als Biokatalysatoren . . . . .                        | 5           |
| 1.4 Neuartige Lösungsmittel . . . . .                            | 7           |
| <b>2 Aufgabenstellung/Zielsetzung</b>                            | <b>11</b>   |
| <b>3 Grundlagen</b>  | <b>13</b>   |
| 3.1 Ester und Acylierungen . . . . .                             | 13          |
| 3.2 Grenzflächenaktive Fettsäurezuckerester . . . . .            | 14          |
| 3.3 Aufbau und Funktion katalytisch aktiver Proteine . . . . .   | 17          |
| 3.3.1 Klassifizierung von Enzymen . . . . .                      | 17          |
| 3.3.2 Struktur und Funktion der Enzyme . . . . .                 | 18          |
| 3.3.3 Enzym-Kinetik . . . . .                                    | 19          |
| 3.3.4 Industrielle Anwendung von Enzymen . . . . .               | 20          |
| 3.3.5 Lipasen und Veresterungsreaktionen . . . . .               | 22          |
| 3.3.6 CALB/Novozym435 . . . . .                                  | 23          |
| 3.4 Polarität von Molekülen . . . . .                            | 25          |
| 3.5 Neotere Lösungsmittel . . . . .                              | 26          |
| 3.5.1 Ionische Flüssigkeiten . . . . .                           | 27          |
| 3.5.2 Stark eutektische Lösungsmittel . . . . .                  | 30          |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.6      | Mischen und Rühren . . . . .  | 34        |
| 3.6.1    | Viskosität von Fluiden . . . . .  | 34        |
| 3.6.2    | Energieeintrag in Mischsystemen . . . . .   | 37        |
| 3.6.3    | Disperse Systeme . . . . .  | 42        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>47</b> |
| 4.1      | Substrate und Substratsynthese . . . . .  | 48        |
| 4.1.1    | Monomere Saccharide und Fettsäuren als Substrate . . . . .                                | 48        |
| 4.1.2    | Charakterisierung der Synthese von Alkylglucosiden . . . . .                              | 51        |
| 4.1.3    | Polymere Saccharide als Substrate . . . . .   | 56        |
| 4.1.4    | Chemische Aktivierung des Polysaccharids . . . . .  | 59        |
| 4.1.5    | Zusammenfassung . . . . .   | 65        |
| 4.2      | Enzyme und Enzympräparate . . . . .   | 66        |
| 4.2.1    | Katalysator für Monosaccharid-Veresterungen . . . . .                                     | 66        |
| 4.2.2    | Enzym-Charakterisierung für Lösungsmittel-freie Monosaccharid-<br>Veresterungen . . . . . | 68        |
| 4.2.3    | Katalysator für Polysaccharid-Veresterungen . . . . .                                     | 72        |
| 4.2.4    | Zusammenfassung . . . . .   | 75        |
| 4.3      | Reaktionsmedien . . . . .   | 75        |
| 4.3.1    | Lösungsmittel für Monosaccharide . . . . .  | 76        |
| 4.3.2    | Lösungsmittel zur Vorbehandlung von Cellulose . . . . .                                   | 80        |
| 4.3.3    | Zusammenfassung . . . . .   | 83        |
| 4.4      | Kombination zu Reaktionssystem . . . . .  | 84        |
| 4.4.1    | Energieeintrag zur Reaktionsbeschleunigung . . . . .                                      | 85        |
| 4.4.2    | Wasserakkumulation während der Reaktion . . . . .   | 88        |
| 4.4.3    | Einfluss des stark eutektischen Lösungsmittels . . . . .                                  | 91        |
| 4.4.4    | Zusammenfassung . . . . .   | 93        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>95</b> |
| 5.1      | Aktive Substrate für die Synthese von Fettsäure-Zuckerestern . . . . .                    | 95        |
| 5.2      | Biokatalysatoren für die Veresterung von Sacchariden . . . . .                            | 99        |
| 5.3      | Lösungsmittel und Reaktionsmedien für Saccharide und Fettsäuren . . .                     | 101       |
| 5.4      | Einfluss des Energieeintrags . . . . .  | 102       |
| 5.5      | Akkumulation von Wasser im Reaktionssystem . . . . .                                      | 103       |
| 5.6      | Substratkonzentration . . . . .   | 104       |

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>6 Zusammenfassung</b>                                 | <b>105</b> |
| <b>7 Ausblick</b>  | <b>109</b> |
| <b>A Verwendete Materialien</b>                          | <b>111</b> |
| A.1 Chemikalien, Lösungsmittel und Hilfsstoffe . . . . . | 111        |
| A.2 Geräte und Gefäße . . . . .                          | 112        |
| A.3 Software . . . . .                                   | 115        |
| <b>B Angewandte Methoden</b>                             | <b>117</b> |
| B.1 Analytik . . . . .                                   | 117        |
| B.1.1 Berechnungen und Abschätzungen . . . . .           | 126        |
| B.2 Präparationen und Synthesen . . . . .                | 139        |
| <b>Literaturverzeichnis</b>                              | <b>147</b> |



# Abkürzungen

|                           |   |
|---------------------------|---|
| 1-DecOH                   | 1-Decanol   |
| AU                        | willkürliche Einheit (engl. <i>arbitrary unit</i> )   |
| AGL                       | Alkylglucosidlaurat   |
| AGU                       | Monomer der Cellubiose und somit der Cellulose<br>(Anhydro- $\beta$ -D-glucose-Einheit, engl. <i>anhydrous glucose unit</i> ) |
| ATR                       | abgeschwächte Totalreflexion (engl. <i>attenuated total reflection</i> )  |
| BC                        | Blasensäule (engl. <i>bubble column</i> )   |
| BG                        | Butylglucopyranosid (»Butylglucosid«)   |
| BMBF                      | Bundesministerium für Bildung und Forschung   |
| [BMIm][PF <sub>6</sub> ]  | 1-Butyl-3-methylimidazoliumhexafluorophosphat (IL)  |
| [BMIm][TfO]               | 1-Butyl-3-methylimidazoliumtrifluormethansulfonat (IL)  |
| [BMIm][Tf <sub>2</sub> N] | 1-Butyl-3-methylimidazolium-<br><i>bis</i> (trifluoromethylsulfonyl)imid (IL)   |
| CALA                      | Lipase A aus <i>Candida antarctica</i>  |
| CALB                      | Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>  |
| CBOA                      | Cellobiose-Octaacetat   |
| Cell                      | Cellulose   |
| ChCl                      | Cholinchlorid   |
| CS                        | Caprylsäure, Octansäure (C8:0)  |
| DAG                       | Diacylglycerid  |
| DES                       | stark eutektisches Lösungsmittel (engl. <i>deep eutectic solvent</i> )  |
| DMSO                      | Dimethylsulfoxid  |
| EG                        | Ethylglucopyranosid (»Ethylglucosid«)   |
| [EMIm][OAc]               | 1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat (IL)  |
| [EMIm][DCA]               | 1-Ethyl-3-methylimidazoliumdicyanamid (IL)  |

---

|             |   |
|-------------|---|
| [EMIm][SCN] | 1-Ethyl-3-methylimidazoliumthiocyanat (IL)  |
| EtGly       | Ethylenglycol   |
| EtOAc       | Ethylacetat   |
| FS          | Fettsäure   |
| FTIR        | Fourier-Transform-Infrarot(-Spektroskopie)  |
| GC          | Gaschromatographie  |
| Gluc        | Glucose   |
| Gly         | Glycerin  |
| HBA         | Wasserstoffbrücken-Akzeptor (engl. <i>hydrogen bond acceptor</i> )  |
| HBD         | Wasserstoffbrücken-Donor (engl. <i>hydrogen bond donor</i> )  |
| HEC         | Hydroxyethylcellulose   |
| HES         | Hydroxyethylstärke  |
| HLB         | Hydrophil-Lipophil-Gleichgewicht (engl. <i>hydrophile-lipophile balance</i> )   |
| HPC         | Hydroxypropylcellulose  |
| HPLC        | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )   |
| HR          | hochaufgelöst (engl. <i>high resolution</i> )   |
| HYDE        | Bewertungsfunktion basierend auf Energien von Wasserstoffbrücken-Bindungen und Dehydratation in Protein-Ligand-Komplexen (engl. <i>HYdrogen bond and DEhydration energies</i> ) |
| IL          | ionische Flüssigkeit (engl. <i>ionic liquid</i> )   |
| KF          | Titrationverfahren nach Karl Fischer zur quantitativen Wasserbestimmung   |
| LöMi        | Lösungsmittel   |
| LS          | Laurinsäure, Dodecansäure (C12:0)   |
| lyophil.    | lyophilisiert, gefriergetrocknet  |
| MAG         | Monoacylglycerid  |
| MAS         | Rotation im magischen Winkel (engl. <i>magic angle spinning</i> )   |
| MCT         | Quecksilber-Cadmium-Tellurid (engl. <i>mercury cadmium telluride</i> )  |
| MEK         | Methylethylketon (Butanon)  |

---

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| MG                                  | Methylglucopyranosid (»Methylglucosid«)  |
| MGL                                 | Methylglucopyranosidlaurat (»Methylglucosidlaurat«)  |
| ML                                  | Methylaurat  |
| [Me-(OEt) <sub>3</sub> -Et-Im][OAc] | 1-Methylethylenglycol-3-ethylimidazolacetat (IL)   |
| MTBE                                | Methyl- <i>tert</i> -butylether  |
| NADES                               | natürliches stark eutektisches Lösungsmittel (engl. <i>natural deep eutectic solvent</i> )                 |
| NMR                                 | Kernspinresonanz(-Spektroskopie) (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )                                |
| NP                                  | Normalphase (hydrophile stationäre Phase)  |
| NZ435                               | Novozym435 (kommerzielles Enzympräparat der Firma Novozymes A/S)   |
| O/W                                 | Öl-in-Wasser-Emulsion  |
| ÖS                                  | Ölsäure, ( <i>Z</i> )-9-Octadecensäure (C18:1)   |
| PEG                                 | Polyethylenglycol  |
| PG                                  | Propylglucopyranosid (»Propylglucosid«)  |
| PLS                                 | Methode zur Erstellung von Vorhersagemodellen (engl. <i>Partial Least Squares</i> )                        |
| PLU                                 | Propyllaurate-Units (Maß für katalytische Aktivität bei der Veresterung von Propanol mit Laurinsäure in U) |
| PRESS                               | Fehlerquadratsumme der Vorhersage (engl. <i>predicted residual error sum of squares</i> )                  |
| Prop                                | (Reaktor mit) Propellerrührer  |
| PVDF                                | Polyvinylidenfluorid   |
| rcf                                 | Vielfaches der Erdbeschleunigung (engl. <i>relative centrifugal force</i> )                                |
| rpm                                 | Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rotations per minute</i> )  |
| RI                                  | Brechungsindex (engl. <i>refractive index</i> )  |
| RMSE                                | mittlerer quadrierter Fehler der Vorhersage (engl. <i>Root Mean Square Error</i> )                         |
| RMSEC                               | mittlerer quadrierter Fehler der Kalibrierung (engl. <i>Root Mean Square Error of Calibration</i> )        |
| RMSECV                              | mittlerer quadrierter Fehler der Kreuzvalidierung (engl. <i>Root</i>                                       |

---

|       |   |
|-------|---|
|       | <i>Mean Square Error of Cross Validation</i> )  |
| RP    | Umkehrphase (hydrophobe stationäre Phase, engl. <i>reversed phase</i> )                         |
| RTIL  | bei Raumtemperatur flüssige ionische Flüssigkeit (engl. <i>room temperature ionic liquid</i> )  |
| STR   | Rührkessel (engl. <i>stirred tank reactor</i> )   |
| tBuOH | <i>tert</i> -Butanol  |
| U     | Unit (katalytische Einheit); $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol}_{\text{Substrat}} \text{ min}^{-1}$ |
| VOC   | flüchtige organische Verbindung (engl. <i>volatile organic compound</i> )                       |
| Wend  | (Reaktor mit) Wendelrührer  |
| W/O   | Wasser-in-Öl-Emulsion   |

# Symbole, Einheiten und Indizes

## Lateinische Symbole

|           |  |  |
|-----------|--|--|
| $a$       | massenspezifische katalytische Aktivität | $[\text{U g}^{-1} = \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}]$ |
| $A$       | Querschnittsfläche                       | $[\text{cm}^2]$  |
| $A$       | Präexponentieller Faktor                 |  |
| $\vec{b}$ | Parametervektor                          | $[\text{mmol l}^{-1} \text{AU}^{-1}]$                      |
| $c$       | Konzentration                            | $[\text{mmol l}^{-1}]$ oder $[\text{mmol g}^{-1}]$         |
| $\vec{c}$ | Residuenvektor                           | $[\text{mmol l}^{-1}]$                                     |
| $d$       | Rührerdurchmesser                        | $[\text{cm}]$  |
| $g$       | Erdbeschleunigung                        | $(g = 9,81 \text{ N kg}^{-1})$                             |
| $h$       | (Füll-)Höhe                              | $[\text{cm}]$  |
| $I$       | Bandenintensität im IR-Spektrum          | $[\text{AU}]$  |
| $k$       | Reaktionsgeschwindigkeitskonstante       |  |
| $k$       | Konsistenzindex                          | $[\text{mPa s}^n]$   |
| $K$       | Verteilungskoeffizient                   | $[-]$  |
| $m$       | Masse                                    | $[\text{g}]$   |
| $M$       | Molare Masse                             | $[\text{g mol}^{-1}]$                                      |
| $n$       | Anzahl Stichproben                       | $[-]$  |
| $n$       | Fließindex                               | $[-]$  |
| $n$       | Rührerdrehfrequenz                       | $[\text{s}^{-1}]$  |
| $n$       | Stoffmenge                               | $[\text{mol}]$   |
| $Ne$      | Newton-Zahl                              | $[-]$  |
| $p$       | Druck                                    | $[\text{mbar}]$  |
| $P$       | (Rührer-)Leistung                        | $[\text{W} = \text{J s}^{-1}]$                             |
| $r$       | Reaktionsgeschwindigkeit                 | $[\text{mmol l}^{-1} \text{s}^{-1}]$                       |
| $R_0$     | Anfangssteigung exponentieller Verläufe  | $[\text{s}^{-1}]$  |
| $Re$      | Reynolds-Zahl                            | $[-]$  |
| $t$       | Zeit                                     | $[\text{s}]$   |

|           |                           |   |
|-----------|---------------------------|---|
| $T$       | absolute Temperatur       | [K]                                     |
| $u$       | (Umfangs-)Geschwindigkeit | [cm s <sup>-1</sup> ]                   |
| $U$       | Umfang                    | [cm]                                    |
| $v$       | Reaktionsgeschwindigkeit  | [mmol l <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] |
| $v$       | Schergeschwindigkeit      | [cm s <sup>-1</sup> ]                   |
| $V$       | Volumen                   | [ml]                                    |
| $\dot{V}$ | Volumenstrom              | [L min <sup>-1</sup> ]                  |
| $w$       | Massenanteil              | [%-wt]                                  |
| $x$       | Molanteil                 | [%-mol]                                 |
| $X$       | Spektralmatrix            | [AU]                                    |
| $X$       | Umsatz                    | [-]                                     |
| $y$       | Beobachteter Wert         |   |
| $\hat{y}$ | Vorhergesagter Wert       |   |
| $Y$       | Konzentrationsmatrix      | [mmol l <sup>-1</sup> ]                 |

### **griechische Symbole**

|                |                               |                                   |
|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| $\delta$       | Breite des Wendelrührers      | [cm]                              |
| $\Delta$       | Differenz                     |                                   |
| $\eta$         | dynamische Viskosität         | [mPa s]                           |
| $\dot{\gamma}$ | Schergefälle                  | [s <sup>-1</sup> ]                |
| $\nu$          | kinematische Viskosität       | [m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ] |
| $\phi$         | volumenbezogener Phasenanteil | [-]                               |
| $\rho$         | Dichte                        | [g ml <sup>-1</sup> ]             |
| $\tau$         | Schubspannung                 | [mPa]                             |
| $\vartheta$    | Temperatur                    | [°C]                              |

**Indizes**

|    |                                     |
|----|-------------------------------------|
| d  | disperse Phase                      |
| d  | Dispersionskräfte                   |
| E  | Emulsion (quasihomogene Mischung)   |
| h  | hydrophil                           |
| h  | Wasserstoffbrücken-Kräfte           |
| k  | kontinuierliche Phase               |
| l  | lipophil                            |
| M  | quasihomogene Mischung              |
| N  | normiert                            |
| OW | Octanol-Wasser                      |
| p  | polare Kräfte                       |
| S  | Suspension (quasihomogene Mischung) |
| T  | Übergang (engl. <i>transition</i> ) |



# Abbildungsverzeichnis

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.1  | Konzept der Bioraffinerie2021 . . . . .                                      | 3  |
| 1.2  | Anteiliger Tensid-Verbrauch in USA und Kanada . . . . .                      | 4  |
| 1.3  | Spektrum potentieller Vorteile der Biokatalyse . . . . .                     | 6  |
| 1.4  | Anteil der Veröffentlichungen über IL . . . . .                              | 8  |
| 1.5  | Anteil der Veröffentlichungen über DES . . . . .                             | 10 |
| 3.1  | Lipasekatalysierte Bildung eines Fettsäure-Zuckeresters . . . . .            | 13 |
| 3.2  | Tensid-Strukturen und Orientierungsverhalten . . . . .                       | 14 |
| 3.3  | HLB-Werte von Tensiden für Anwendungen und von Verbindungen . . . . .        | 16 |
| 3.4  | Produkte von Biotransformationen und deren Anwendung . . . . .               | 20 |
| 3.5  | Arten eingesetzter Biokatalysatoren in Biotransformationen . . . . .         | 21 |
| 3.6  | Charakteristiken von Lösungen in industriellen Biotransformationen . . . . . | 22 |
| 3.7  | Hydrolyse eines Triacylglycerids durch eine Lipase . . . . .                 | 22 |
| 3.8  | Reaktionsmechanismus der CALB in der katalytischen Triade . . . . .          | 24 |
| 3.9  | Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten . . . . .                            | 27 |
| 3.10 | Auswahl häufig verwendeter Kationen in IL . . . . .                          | 28 |
| 3.11 | Auswahl häufig verwendeter Anionen in IL . . . . .                           | 28 |
| 3.12 | Eutektikum am Beispiel von Cholinchlorid und Urea . . . . .                  | 30 |
| 3.13 | Systematischer Aufbau von DES . . . . .                                      | 31 |
| 3.14 | Auswahl möglicher Bestandteile von DES des Typs III . . . . .                | 32 |
| 3.15 | Laminare Scherung von Fluidschichten aufgrund einer Schubkraft . . . . .     | 34 |
| 3.16 | Fließkurven verschiedener Fluide . . . . .                                   | 36 |
| 3.17 | Leistungscharakteristik üblicher Rührer . . . . .                            | 39 |
| 3.18 | Einbaubedingungen und Geometrien üblicher Rührorgane . . . . .               | 39 |
| 3.19 | Arten disperser Systeme . . . . .  | 43 |
| 3.20 | In Dispersionen auftretende Rührzustände . . . . .                           | 45 |
| 4.1  | Untersuchte Komponenten des Reaktionssystems . . . . .                       | 48 |
| 4.2  | Veresterung von Glucose bzw. MG mit Laurinsäure in 1,5 ml-Vials . . . . .    | 49 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 4.3  | Veresterung verschiedener Fettsäuren mit MG in 1,5 ml-Vials . . . . .  | 50 |
| 4.4  | Dampfdruckkurven einiger in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen .  | 51 |
| 4.5  | Säurekatalysierte Alkylierung von Glucose . . . . .  | 52 |
| 4.6  | Spezifische Aktivität von Amberlyst 15 bei der Alkylierung von Glucose<br>mit niederen primären unverzweigten Alkoholen . . . . .                          | 53 |
| 4.7  | Alkylierung von Glucose mit niederen primären unverzweigten Alkoholen  | 53 |
| 4.8  | Alkylierung von Glucose mit Ethanol . . . . .  | 54 |
| 4.9  | Enzymatische Veresterung von Laurinsäure mit Methyl- bzw. Ethylglucosid  | 55 |
| 4.10 | Veresterung von Glucose bzw. Cellulose mit Laurinsäure in 1,5 ml-Vials .   | 56 |
| 4.11 | Veresterung verschiedener Saccharide mit Ölsäure in tertiärem Butanol .  | 58 |
| 4.12 | Chemische Acylierung von Cellulose und enzymatische Veresterung . . .  | 59 |
| 4.13 | IR-Spektren zur Strukturanalyse nach der Aktivierung von PEG600-Disäure<br>durch Chlorierung . . . . .   | 60 |
| 4.14 | NMR-Spektren zur Strukturanalyse nach der Aktivierung von PEG600-<br>Disäure durch Chlorierung . . . . .   | 61 |
| 4.15 | IR-Spektren zur Strukturanalyse nach der chemischen Veresterung von<br>Cellulose mit PEG600-Diacylchlorid . . . . .  | 62 |
| 4.16 | NMR-Spektren zur Strukturanalyse nach der chemischen Veresterung von<br>Cellulose mit PEG600-Diacylchlorid . . . . .                                       | 63 |
| 4.17 | IR-Spektren der Proben aus der enzymatischen Veresterung von Cellulose-<br>PEG600-Säure mit 1-Decanol . . . . .  | 64 |
| 4.18 | NMR-Spektren zur Strukturanalyse nach der enzymatischen Veresterung<br>von Cellulose-PEG600-Säure mit 1-Decanol . . . . .                                  | 65 |
| 4.19 | Spezifische Aktivitäten verschiedener Lipase-Präparate für die Vereste-<br>rung von Laurinsäure mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid . . . . .           | 67 |
| 4.20 | Vergleich der katalytischen Aktivitäten von Novozym435, durch Leaching<br>von Enzym befreitem Novozym435 und Amberlyst 15 . . . . .                        | 69 |
| 4.21 | Spezifische Aktivität von Novozym435 im untersuchten Temperaturbereich   | 70 |
| 4.22 | Reaktionsgeschwindigkeit der Veresterung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid<br>mit Laurinsäure als Funktion des Umsatzes für verschiedene Temperaturen | 71 |
| 4.23 | Endumsätze und dafür benötigte Reaktionszeiten bei der Veresterung von<br>Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Laurinsäure . . . . .                     | 72 |
| 4.24 | Spezifische Aktivitäten für die Veresterung von 1-Decanol mit PEG600-<br>Disäure durch verschiedene Lipasen . . . . .                                      | 74 |
| 4.25 | Veresterung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Ölsäure durch Novozym435  | 77 |

---

|      |   |     |
|------|---|-----|
| 4.26 | Veresterung von LS mit MG durch Novozym435 in DES . . . . .   | 79  |
| 4.27 | Löslichkeiten der betrachteten Substrate in [BMIm][TfO] und ChCl:U . . .  | 80  |
| 4.28 | Untersuchung des Lösungsvorgangs von Cellulose in verschiedenen Lö-<br>sungsmitteln . . . . .   | 82  |
| 4.29 | Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Energieeintrag in verschiedenen Rühr-<br>systemen . . . . .  | 87  |
| 4.30 | Veresterung von Laurinsäure mit Methyl- $\alpha$ -D-glucoopyranosid durch Novo-<br>zym435 im Rührkessel mit Propellerrührer . . . . . | 89  |
| 4.31 | Mittlerer Wassergehalt während der ersten 24 h der Veresterung von LS<br>mit MG als Funktion des DES-Anteils . . . . .                | 89  |
| 4.32 | Wassergehalt bei der Veresterung von LS mit MG als 24 h-Mittel in Ab-<br>hängigkeit der spezifischen Aktivität . . . . .              | 90  |
| 4.33 | Wassergehalt im Fließgleichgewicht als Funktion des Wasserzustroms . . .  | 91  |
| 4.34 | Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Veresterung von LS mit MG als<br>Funktion des LS-Anteils . . . . .                                | 92  |
| 5.1  | Aktives Zentrum von CALB mit gebundenem Methyl- $\alpha$ -D-glucoopyranosid<br>und Caprinsäure (C10:0) . . . . .                      | 100 |
| 6.1  | Grundfließbild der Fettsäure-Zuckerester-Synthese aus Alkohol, Glucose<br>und Laurinsäure . . . . .                                   | 107 |
| B.1  | (An-)Lösungsversuche mit Cellulose . . . . .  | 124 |
| B.2  | Fließkurve des Reaktionsgemisches aus 80 %-mol DES und jeweils 10 %-<br>mol LS und MG . . . . .                                       | 125 |
| B.3  | Ermittlung des spezifischen Energieeintrages . . . . .  | 132 |
| B.4  | NMR-Spektrum der in dieser Arbeit synthetisierten IL . . . . .  | 144 |
| B.5  | Ermittlung der Gleichgewichtskonzentration von Wasser in DES . . . . .  | 146 |



# Tabellenverzeichnis

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 3.1 | Klassifizierung von Enzymen nach <i>Enzyme Commission</i> . . . . .                              | 17  |
| 3.2 | Vor- und Nachteile durch Immobilisieren von Biokatalysatoren . . . . .                           | 21  |
| 3.3 | Geometrische Parameter üblicher Rührorgane . . . . .   | 40  |
| 4.1 | Zusammensetzung der untersuchten DES mit ChCl als HBA . . . . .                                  | 78  |
| 4.2 | In dieser Arbeit untersuchte ionische Flüssigkeiten . . . . .                                    | 81  |
| 4.3 | Geometrische Parameter verwendeter Rührorgane . . . . .  | 85  |
| 4.4 | Ausgewählte Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Reinstoffe<br>und Gemische . . . . . | 86  |
| B.1 | Auflistung der korrigierten Determinationskoeffizienten . . . . .                                | 137 |



# 1 Einleitung

## 1.1 Nachwachsende Rohstoffe und Bioraffinerie-Konzepte

Erdöl ist die wichtigste Energieressource für moderne Wirtschaftssysteme (Greene u. a. (2006)). Der weltweite Energieverbrauch aber auch die Versorgung der Weltbevölkerung mit Energie sind Hauptursachen für den Ausstoß von Treibhausgasen. Insbesondere durch die Industrialisierung von Schwellenländern wird der Ausstoß weiter wachsen (Metz (2007)). Aufgrund steigender Preise und der Umweltbelastung bei ihrer Gewinnung wird eine Abnahme der Förderung fossiler Ressourcen erwartet (Cherubini u. a. (2009); Bentley u. a. (2007)). Dieses als »Oil-Peak« bezeichnete globale Ölfördermaximum wird für 2023 vorausgesagt (Greene u. a. (2006)). Aus den gleichen Gründen und wegen notwendiger Alternativen zu Raffinerien, die auf Erdöl basieren, werden weltweit Bioraffinerien gebaut (Demirbas (2010)). In allen Wirtschafts-Sektoren (Elektrizität, Wärme, Transport, chemische Industrie) muss der Anteil erneuerbarer Energien erhöht werden, während gleichzeitig die Nachhaltigkeit und erschwingliche Produktion von Nahrung und Futtermitteln für eine wachsende Weltbevölkerung sichergestellt werden muss (Cherubini u. a. (2009)). Bioenergie und Biokraftstoffe<sup>1</sup> gehören zu den wichtigsten Komponenten zur Reduktion von Treibhausgas-Emissionen und zum Ersatz fossiler Brennstoffe, weswegen ihr Bedarf in Zukunft steigen wird (Goldemberg (2000); Dincer (2008)).

Mit Prozessen in heutigen Bioraffinerien vergleichbare Verfahren sind schon lange bekannt. Vor tausenden von Jahren wurde in China bereits fermentativ gewonnenes Ethanol durch Destillation aufkonzentriert (Demirbas (2010)). Im 19. und am Anfang des 20. Jahrhunderts wurden nachwachsende Rohstoffe im industriellen Maßstab in der Papier- und Holzverarbeitung, der Holzverzuckerung, der Cellulose-Nitrierung (Schießbaumwolle, Zelluloid) sowie der Herstellung löslicher Cellulose-Fasern, der Fettverarbei-

---

<sup>1</sup>Bioalkohol, Pflanzenöle/Biodiesel, Pyrolyseöle

tung und der Produktion von Furfural für die Nylon-Synthese verwendet (Kamm u. a. (2012)). Lignin und andere wertvolle Nebenprodukte bedingten das Streben, integrierte Verfahren zur Wertsteigerung zu entwickeln. Wachsende Nachfrage und Neuerungen in Genetik, Biotechnologie, Chemie und Ingenieurwesen führten zur (Wieder-)Entdeckung von (althergebrachten) Verfahren mit erneuerbaren Rohstoffen und somit zum Konzept der Bioraffinerie (Svensson (2010)). Während Wärme und Elektrizität durch verschiedene erneuerbare Quellen (Wind, Sonne, Wasserkraft, Biomasse) erzeugt werden können, ist die einzige erneuerbare Kohlenstoffquelle Biomasse. Der Ersatz fossilen Kohlenstoffs durch erneuerbaren Kohlenstoff aus Biomasse trug zur Entwicklung von Bioraffinerien zur Produktion von Biokraftstoffen, Bioenergie, Biochemikalien, Biomaterialien, Nahrung und Futtermitteln bei (Cherubini u. a. (2009)).

Der Begriff der Bioraffinerie wird in der Literatur unterschiedlich definiert. Grundsätzlich enthalten Bioraffinerien Konzepte von System-Integration, Produktvielfalt und Nachhaltigkeit (Wellisch u. a. (2010)). Konkret handelt es sich um Anlagen mit integrierten Prozessen für die Umwandlung verschiedener Arten von Biomasse zur Erzeugung von Kraftstoffen, Energie und wertgesteigerten Chemikalien aus Biomasse analog zur Erdöl-basierten Raffinerie (National Renewable Energy Laboratory (2009); Demirbas (2010)). Es haben sich mehrere Herangehensweisen bei der Klassifizierung von Bioraffinerien etabliert. Vor allem der eingesetzte Rohstoff ist bezeichnend für ein Konzept<sup>2</sup>, aber auch die Technologie-Generation<sup>3</sup> oder die Art der Umwandlung<sup>4</sup> werden unterschieden (Demirbas (2010)). Durch eine Vielzahl möglicher Kombinationen dieser verschiedenen Klassifizierungsansätze ist die Bezeichnung im Einzelfall oft unspezifisch, und gibt wenig Aufschluss über spezifische Charakteristika. Daher wurde eine neue Klassifizierung vorgeschlagen, die auf einer Hierarchie der Aspekte Plattform<sup>5</sup>, Produkte<sup>6</sup>, Rohstoffe<sup>7</sup> und (Haupt-)Prozesse<sup>8</sup> basiert (Cherubini u. a. (2009)).

Das erklärte Ziel des durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Forschungsvorhabens »Bioraffinerie2021« ist die Entwicklung von Technologien, Verfahren und wissenschaftlichen Konzepten zur Weiterentwicklung vorhandener

<sup>2</sup>»Grüne Bioraffinerie«, »Lignocellulose-Bioraffinerie«, »Getreide-/Ganzpflanzen-Bioraffinerie«, »Ölsamen-Bioraffinerie«, »Wald-Bioraffinerie«

<sup>3</sup>1. Generation (Biokraftstoffe aus Sacchariden oder Fetten; »konventionelle Technologien«), 2. Generation (Pflanzen, Stroh, Holz; »fortgeschrittene Technologien«), 3. Generation (Ethanol, Chemikalien, Plastik aus Agrar- und Wald-Biomasse), 4. Generation (Biokraftstoffe aus Pflanzenöl)

<sup>4</sup>Biosyngas, Pyrolyse, Fermentation, Ölpflanzen, hydrothermale Veredelung

<sup>5</sup>Verknüpfung von Rohstoff und Produkt

<sup>6</sup>energetisch oder materiell

<sup>7</sup>primäre (erntefrisch), sekundäre (Prozessrückstände), tertiäre (Endverbraucherabfall) Rohstoffe

<sup>8</sup>Fraktionierung oder Depolymerisation, chemische, thermochemische, biochemische Umsetzung

Bioethanolanlagen zu integrierten Bioraffinerien. Dies kann durch die Nutzung lignocellulosehaltiger Biomasse und Erzeugung weiterer Wertprodukte wie z. B. Plattformchemikalien erreicht werden. Der Vorteil dieses »Bottom Up«-Ansatzes liegt darin, dass bereits bestehende Strukturen verwendet werden können. Das Projekt ist in vier Handlungsfelder unterteilt: die verfahrenstechnische Optimierung der Ethanolproduktion, die Erweiterung des Rohstoffspektrums auf Lignocellulose, die Erzeugung weiterer Wertprodukte und die Entwicklung und Bewertung neuer Konzepte integrierter Bioraffinerien. Die Erzeugung weiterer Wertprodukte neben Ethanol stellt einen Beitrag zur additiven Wertschöpfung des Prozesses dar. Als Rohstoffbasis sollen Cellulose und Lignin dienen, wobei die stoffliche Nutzung zur Synthese materieller Produkte im Vordergrund steht (Abbildung 1.1). Ursprünglich wurde das aus dem Lignocellulose-Aufschluss stammende

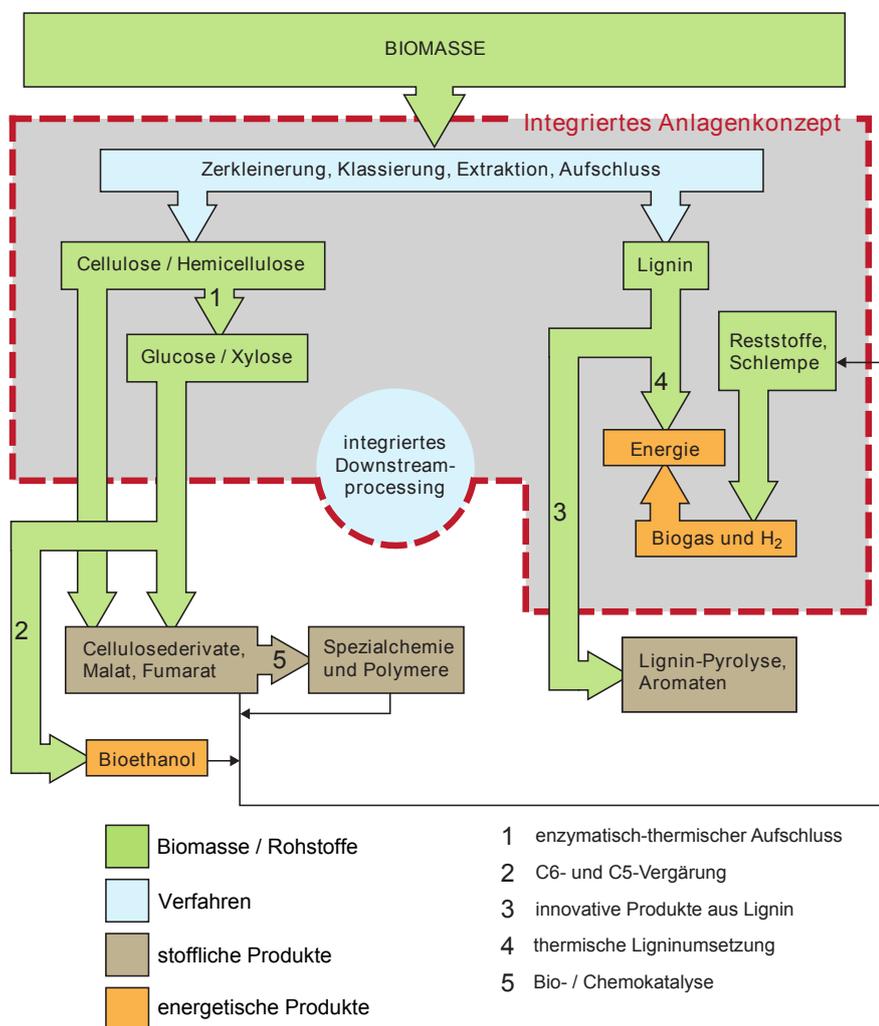


Abbildung 1.1: Konzept der Bioraffinerie2021 (TuTech Innovation GmbH (2009))

de Lignin allein zur Erzeugung von Prozessenergie verbrannt. Durch Entwicklung von Verfahren, Prozessen und Konzepten sollen C2- bis C6-Chemikalien sowie deren Derivate bereitgestellt werden können. Die Produktpalette soll als Plattformchemikalien zum einen durch Pyrolyse gewonnene Phenole und zum anderen durch Biotransformation erzeugte Phenol- und Cellulosederivate insbesondere Celluloseester umfassen. Sie können als neuartige Emulgatoren oder Konsistenzgeber in pharmazeutischen oder kosmetischen Produkten eingesetzt werden. Zur Zeit der Antragstellung betrug das Marktvolumen für vergleichbare kosmetische Emulgatoren und Tenside bei 1,4 Mrd. €, wobei nachhaltige Produkte aus natürlichen Rohstoffen einen erwarteten Marktpreis von 3–10 €/kg erzielen sollten.

Als industrieller Projektpartner ist *Evonik Industries AG* an dem Vorhaben beteiligt. Das Unternehmen ist einer der größten Anbieter kosmetischer Rohstoffe, Additive und Wirkstoffe für maßgeschneiderte Lösungen, deren Synthese in biokatalytischen und fermentativen Prozessen erfolgt. Nicht zuletzt ist im Unternehmen Erfahrung auf dem Gebiet der ionischen Flüssigkeiten (IL) vorhanden, so dass eine große Produktpalette verschiedener IL maßgeschneidert werden kann. (TuTech Innovation GmbH (2009))

## 1.2 Tenside

Tenside bzw. Surfactants (engl. *surface active agents*) gehören zu den vielseitigsten Produkten der chemischen Industrie; sie finden Verwendung in Alltagsprodukten wie Motorenöl, Pharmazeutika und Wasch- oder Reinigungsmitteln (Rosen (2004)). In 2014 betrug der weltweite Umsatz mit Tensiden über 33 Mrd. US\$, wovon 56 % auf Haushaltsdetergenzien entfallen. (Ceresana (2015)). Anionische Tenside stellen den am häufigsten verwendeten Typus dar (Abbildung 1.2). In den zurückliegenden 50 Jahren hat

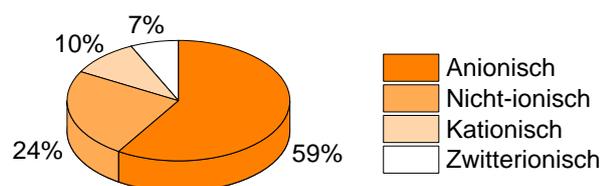


Abbildung 1.2: Anteiliger Tensid-Verbrauch in USA und Kanada im Jahr 2000 (Rosen (2004))

das Umweltbewusstsein für Haushaltsprodukte stetig zugenommen. Infolgedessen hat sich die Reinigungs- und Waschmittel-Industrie in den vergangenen Jahrzehnten natürlichen Rohstoffen zugewandt, um petrochemische Produkte zu ersetzen (Svensson

(2010)). Daher basieren neuere Tenside auf nachwachsenden und biologisch-abbaubaren Ressourcen, vor allem Naturfetten für hydrophobe Tensid-Bausteine und Saccharide oder Aminosäuren für hydrophile Tensid-Bausteine (Rosen (2004)). Ester im Allgemeinen und Fettsäurezuckerester im Speziellen werden aufgrund ihrer Tensid-Eigenschaften vielfältig in Nahrungsmitteln, Kosmetika und Medikamenten eingesetzt (Flores u. a. (2002)). Fettsäurezuckerester sind nichtionische Tenside, und werden allgemein als Emulgatoren eingesetzt. Durch Austausch von Fettsäure oder Zucker können ihre Eigenschaften wie die kritische Micellbildungskonzentration (CMC) oder das hydrophil-lipophile Gleichgewicht (HLB) über weite Bereiche eingestellt werden (Kobayashi (2011)). Außerdem sind sie geschmacks- und geruchsneutral, biologisch abbaubar, ungiftig und nicht reizend. Dadurch und durch ihre antimikrobielle Aktivität sind sie attraktiv für Anwendungen in den genannten Bereichen (Gumel u. a. (2011)).

Die Synthese von Tensiden aus Fetten oder Ölen und Sacchariden wird in industriellem Maßstab noch nicht so lang durchgeführt wie die Herstellung durch einfache Derivatisierung von Fetten (Hill (2010)). Die Verknüpfung dieser Komponenten mit ihren entgegengesetzten Polaritäten stellt eine Herausforderung dar. Die wichtigsten Saccharid-basierten Tenside sind heute Alkylpolyglycoside, Sorbitanester und Sucroseester. Alkylpolyglycoside sind anderen Tensiden in Bezug auf ökologische, toxikologische und dermatologische Eigenschaften überlegen, und können nach den »12 Prinzipien der Grünen Chemie« nach Anastas u. Warner (1998) produziert werden. Sie sind effiziente Komponenten in Reinigungsdetergenzien, Geschirrspülmitteln und Reinigern. Mit der Kombination von Fettalkoholen aus Speiseölen und Glucose aus Stärke als Rohstoffe wurden zum ersten Mal komplett auf erneuerbaren Rohstoffen basierende nicht-ionische Tenside erzeugt (Hill (2010)).

## 1.3 Enzyme als Biokatalysatoren

Alle für den Stoffwechsel in lebenden Zellen wichtigen chemischen Reaktionen werden durch Enzyme<sup>9</sup> katalysiert (Garrett u. Grisham (2010)). Auch außerhalb von Zellen können Enzyme *in vitro* Katalysen bewirken (Buchholz u. a. (2012)). Die erste systematische Untersuchung von Stoffen mit katalytischer Wirkung unternahm Jöns Jakob Berzelius 1836 anhand von »Diastase«<sup>10</sup>. Durch die Zunahme an Wissen über Enzyme innerhalb der vergangenen 50 Jahre konnten diese als Biokatalysatoren in vielen Prozessen

---

<sup>9</sup>griech. en = in, zyme = Hefe

<sup>10</sup> $\alpha$ -Amylase-haltiger Malzextrakt

eingesetzt werden, wobei ohnehin mehr als 80 % der industriellen chemischen Prozesse durch Katalysatoren gesteuert werden (Braun u. a. (2006)). Dank Disziplinen wie Biochemie, Bioinformatik oder Molekularbiologie und Methoden wie »Protein-Engineering« oder »Site-Directed-Evolution« können Enzyme modifiziert, optimiert und somit »maßgeschneidert« werden, um eine auf den Prozess ausgerichtete Leistungssteigerung zu erreichen (Buchholz u. a. (2012)) oder neue Aktivitäten und/oder neue Prozesse zu ermöglichen (Zhu u. a. (2011)).

Produkte werden vom Verbraucher als »natürlich« akzeptiert, wenn die verwendeten Rohstoffe natürlichen Ursprungs sind, und sie durch enzymatische Synthesen generiert werden. Lipase-katalysierte Synthesen können unter milden Bedingungen durchgeführt werden und benötigen eine geringere Anzahl an Trenn- und Aufarbeitungsschritten als chemische Synthesen (Kobayashi (2011)). Die Vorteile biotechnologischer Verfahren gegenüber traditionellen industriellen Verfahren können also funktionell (z. B. neue Reaktionswege), ökonomisch (Kostensparnis) oder ökologisch sein (z. B. geringerer Ressourcenbedarf) (Abbildung 1.3).

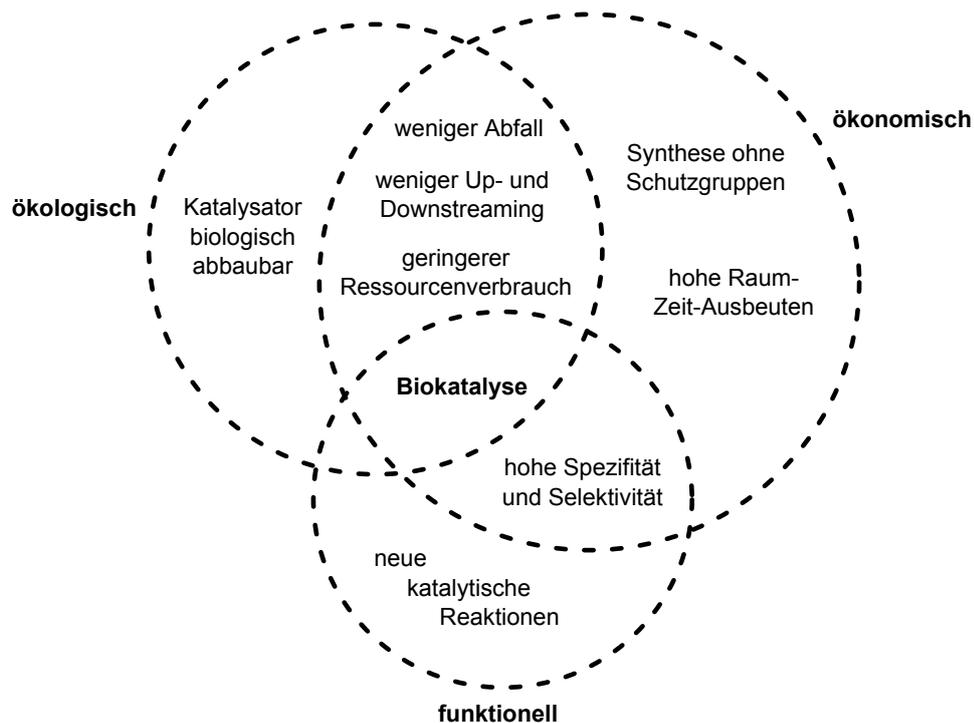


Abbildung 1.3: Spektrum potentieller Vorteile der Biokatalyse (nach Braun u. a. (2006))

## 1.4 Neuartige Lösungsmittel

Obwohl die »Grüne Chemie« seit den 1990er Jahren zunehmend ins Interesse von Industrie und Forschung gerückt ist, fehlen bis heute umweltfreundliche, kostengünstige und leicht zu handhabende Lösungsmittel für chemische oder enzymatische Katalysen, für die Elektrochemie oder die Verwertung von Biomasse. Bislang wurden vor allem die auch als »neotere Lösungsmittel«<sup>11</sup> bezeichneten IL untersucht, um diese Kriterien zu erfüllen. Aufgrund hoher Kosten, anspruchsvoller Synthesen und der für reproduzierbare Eigenschaften notwendigen hohen Reinheit gibt es nur wenige industrielle Anwendungen für IL, z. B. den BASIL-Prozess oder den Diphazol-Prozess (Durand u. a. (2013), Maa-se u. Massonne (2005), Olivier-Bourbigou u. Hugues (2003)). Inzwischen werden Deep Eutectic Solvents als vielversprechende Alternative zu IL gesehen, da sie die meisten Vorteile von IL vorweisen, jedoch weniger Nachteile mit sich bringen (Francisco u. a. (2013)).

### Ionische Flüssigkeiten

Bei den neuartigen IL handelt es sich laut Definition um organische Salze mit einem relativ niedrigen Schmelzpunkt von unter 100 °C (oder sogar im Bereich der Raumtemperatur<sup>12</sup>). Es handelt sich also um keine molekularen Fluide; IL bestehen vollständig aus Ionen (Meindersma u. a. (2012), Yang u. Pan (2005)). Zu ihren wichtigsten Eigenschaften gehören die Folgenden (Murugesan u. Linhardt (2005)):

- breiteres Spektrum chemischer und physikalischer Eigenschaften als bei organischen Lösungsmitteln durch Anpassung der Seitenketten des Kations und/oder passende Auswahl des Anions
- kaum/keine Verluste durch Verdampfen aufgrund eines sehr niedrigen bzw. praktisch nicht vorhandenen Dampfdrucks
- niedriger Schmelzpunkt aufgrund asymmetrischer Ionen ohne Möglichkeit einer dichten Packung
- großer Liquidus-Bereich sowie thermische Stabilität<sup>13</sup>
- Mischbarkeit mit Wasser maßgeblich durch Wahl des Anions beeinflussbar

---

<sup>11</sup>Murugesan u. Linhardt (2005)

<sup>12</sup>Room Temperature Ionic Liquids (RTIL)

<sup>13</sup>Falls thermische Zersetzung eintritt, können jedoch giftige oder reaktive Zerfallsprodukte entstehen.

- Recyclierbarkeit durch Extraktion der Reaktionsprodukte mittels überkritischem Kohlendioxid, Wasser oder organischem Lösungsmittel

Aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften werden IL oft als »Designer-Solvents« oder »Green Solvents« bezeichnet (Murugesan u. Linhardt (2005), Leitner u. a. (2010)). Die erste Veröffentlichung über ein IL (Ethylammoniumnitrat, Schmelztemperatur  $< 14^\circ\text{C}$ ) stammt aus dem Jahr 1914 (Walden (1914)). Das Interesse an IL ist jedoch erst seit 1999 gewachsen (Abbildung 1.4), daher finden Entwicklungen vor allem in der Forschung statt, während es noch wenige industrielle Anwendungen gibt (Ullmann (2012)). Die treibende

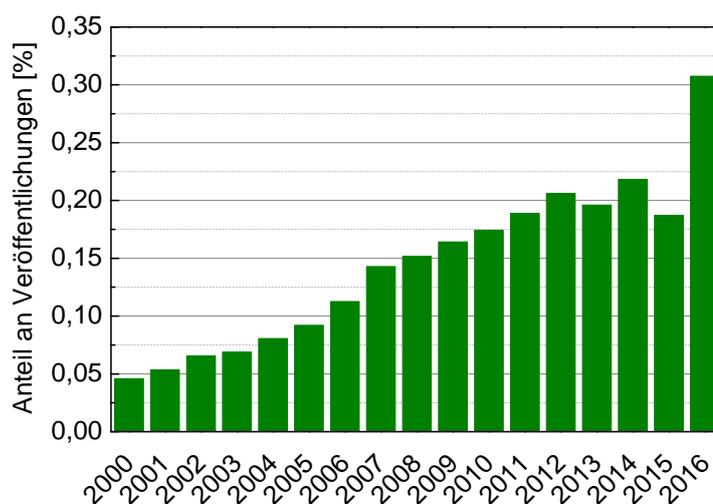


Abbildung 1.4: Anteil der Veröffentlichungen über IL (Abfrage am 29.2.2016 über *ISI Web of Knowledge* mit *ionic\* liquid\** als Argument im Feld *Topic* und der jeweiligen Jahreszahl im Feld *Year Published*)

Kraft für die Erforschung von IL ist die Erwartung, dass sie eine vorteilhafte Alternative zu konventionellen flüchtigen organischen Lösungsmitteln (VOCs) sind, welche die Hauptquelle für Umweltverschmutzung darstellen (Bodo u. Migliorati (2011)). IL können nicht nur als Lösungs- oder Extraktionsmittel, sondern auch als homogener Katalysator, als Schmiermittel, für Analytik oder in der Elektrochemie eingesetzt werden (Ullmann (2012)). Sie besitzen ein großes Potential als Reaktionsmedium insbesondere für polare Substrate in der Biochemie (z. B. Kohlenhydrate, Aminosäuren), denn Aktivität, Selektivität und Stabilität von Enzymen können in ILs höher sein als in üblichen organischen Lösungsmitteln wie etwa MTBE oder EtOAc. Etwa  $10^3$  verschiedene IL waren bereits vor einem Jahrzehnt erhältlich, während die Synthese von  $10^6$  theoretisch möglich ist (Ullmann (2012)). Daraus lassen sich  $10^{12}$  binäre Mischungen mit speziellen, angepassten Eigenschaften herstellen.

Jedoch wurden nicht alle Erwartungen an IL als neue Klasse von Lösungsmitteln erfüllt oder sind zumindest nicht für alle gültig. Bestehende Herausforderungen sind Toxizität, geringe biologische Abbaubarkeit, erhöhte Viskosität und hohe Kosten. Dennoch werden IL intensiv erforscht, um die Kommerzialisierung voranzutreiben, und sie auch in der Praxis als Lösungsmittel, Katalysatoren und auch materiell zu erschließen (De u. a. (2014)).

### **Stark eutektische Lösungsmittel**

Die Eigenschaften von stark eutektischen Lösungsmitteln (DES) sind denen von IL sehr ähnlich; auch sie besitzen einen niedrigen Schmelzpunkt, sodass sie bei Raumtemperatur flüssig sind, ihr Dampfdruck ist bei hoher thermischer Stabilität niedrig (Durand u. a. (2013)). Sie zeichnen sich jedoch gegenüber den IL durch eine Reihe von Vorteilen aus: Die Rohstoffe zu ihrer Herstellung sind kostengünstig, DES sind biologisch abbaubar und belasten daher die Umwelt weniger, ihre Herstellung ist einfach und schnell, da ihre Bestandteile ohne vorherige oder anschließende Aufreinigung nur gemischt werden müssen (Zhang u. a. (2012)).

Die meisten DES bestehen zum einen aus Cholinchlorid als Wasserstoffbrücken-Akzeptor, einem sehr niedrigpreisigen, biologisch abbaubaren und ungiftigen Molekül, welches im Stoffwechsel vieler Lebewesen vorkommt und als Tierfutterzusatz im Megatonnen-Maßstab mit wenig Abfall hergestellt wird (Smith u. a. (2014)), und zum anderen aus einem Alkohol, Amid, Amin, Saccharid oder einer Carbonsäure als Wasserstoffbrücken-Donor. Somit sind sie nachhaltig und biokompatibel (Durand u. a. (2013)).

Da die Eigenschaften von DES ebenso wie die der IL anwendungsspezifisch maßgeschneidert werden können, wächst das Interesse von Industrie und Forschung an ihnen heute exponentiell (Abbildung 1.5 auf der nächsten Seite). Bisher gibt es allerdings vergleichsweise wenige Veröffentlichungen über DES, insbesondere über deren Anwendung in der Biokatalyse. Dies kann an der möglichen Denaturierung von Proteinen durch starke Wasserstoffbrückenbindungen liegen (Zhang u. a. (2012)). Andererseits wird auch von der Aktivierung und Stabilisierung von Lipasen durch Anwesenheit von DES berichtet (Huang u. a. (2014)). Erstmals wurde in Gill u. Vulfson (1994) berichtet, dass zwei feste Substrate beim Mischen eine Flüssigkeit bilden, und so eine Phase für die Biokatalyse bereitstellen - ein ähnlicher Ansatz wird in Pöhnlein u. a. (2015) verfolgt. Darüber hinaus besteht ein Interesse an DES zur Anwendung in der Elektrochemie, als Extraktions- bzw. Absorptionsmittel für z. B. Kohlenstoffdioxid oder in biomedizinischen Anwendungen (Smith u. a. (2014), Paiva u. a. (2014)).

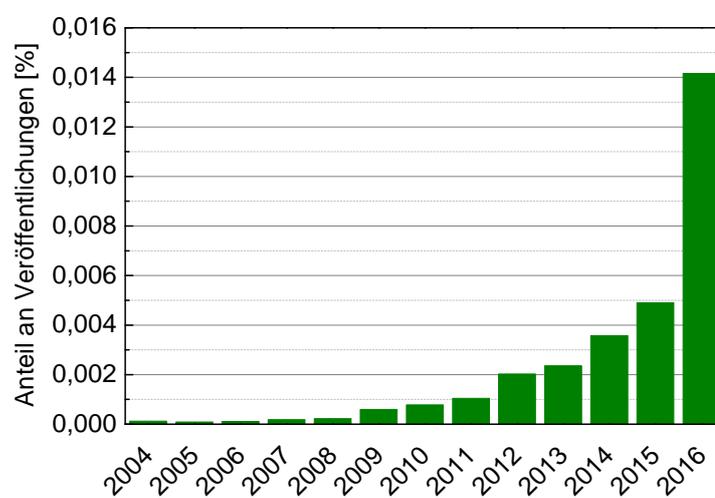


Abbildung 1.5: Anteil der Veröffentlichungen über DES (Abfrage am 13.8.2015 über *ISI Web of Knowledge* mit *deep\* eutectic\* solvent\** als Argument im Feld *Topic* und der jeweiligen Jahreszahl im Feld *Year Published*)

## 2 Aufgabenstellung/Zielsetzung

Ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen soll zur stofflichen Nutzung der Biomasse in einer Bioraffinerie die Hydrophobisierung hydrophiler Moleküle (Monosaccharide, Oligosaccharide, Polysaccharide) durch Verknüpfung mit hydrophoben Molekülen (Fettsäuren, Fettalkohole) untersucht werden. Als Rohstoffe für die somit gebildeten Tenside bieten sich Cellulose bzw. deren Fragmente oder Oligo-/Monomere sowie freie Fettsäuren an. Als ganzheitlicher Ansatz industrieller Biotechnologie sollen Enzyme als Biokatalysatoren zum Einsatz kommen, und möglichst native bzw. nur biotechnologisch derivatisierte Substrate eingesetzt werden. Die diametrale Polarität der einzusetzenden Substrate stellt hierbei eine große Herausforderung dar. Gegebenenfalls soll durch Einsatz eines neuartigen Lösungsmittels, welches in der Lage ist, die ineinander unlöslichen Substrate dem Enzym zugänglich zu machen, eine Prozessintensivierung erreicht werden.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Saccharid-Komponente als Acylakzeptor, da diese aufgrund ihres Aggregatzustandes und ihrer Löslichkeit eine größere Herausforderung bei der Prozessierung darstellt als die niedrigschmelzende Fettsäure. Alle Untersuchungen sollen mit einem Monosaccharid als Modellsubstrat und einem Polysaccharid als Zielsubstrat durchgeführt werden. Zur Vereinfachung soll möglichst nur eine Fettsäure eingesetzt/untersucht werden, da angenommen wird, dass die Reaktivität aufgrund von Polarität und Löslichkeit maßgeblich von der Qualität bzw. Art des Saccharids abhängt, und sich die physikochemischen Eigenschaften der aliphatischen Fettsäuren nur quantitativ mit der Länge des Alkylrests ändern, nicht jedoch qualitativ (Homologie).

In Voruntersuchungen sollen die Komponenten des Reaktionssystems zunächst separat untersucht werden:

- **Identifikation bzw. Bereitstellung aktiver Substrate**, insbesondere (Poly)Saccharide durch Prüfung vorhandener Substrate und ggf. Modifikation vor der eigentlichen Umsetzung in der Fettsäure-Zuckerester-Synthese.
- **Identifikation eines geeigneten Biokatalysators**, welcher die Substrate von Interesse umsetzen kann, und Ermittlung seiner Einsatzgrenzen. Hierbei sind be-

sonders Lipasen von Interesse, da sie bekannt für Umsatz von Fettsäuren mit Sacchariden sind.

- **Identifikation und bei Bedarf Synthese potentieller Lösungsmittel**, welche die Substrate in eine gemeinsame flüssige Reaktionsphase überführen können (oder zumindest die (Poly)Saccharide in eine zweite flüssige Phase). Dazu zählen insbesondere IL und DES.

Schließlich sollen die gefundenen Komponenten Biokatalysator, Substrate und Lösungsmittel kombiniert und in einem geeignetem Reaktortyp mit Charakterisierung unter Berücksichtigung spezifischer Systemeigenschaften (Phasenverhalten und spezifischer Energieeintrag, Gleichgewichtsverschiebung durch Wasserentzug, hohe Substratkonzentrationen) charakterisiert werden.

# 3 Grundlagen

## 3.1 Ester und Acylierungen

Aus der Reaktion einer Säure mit einem Alkohol geht ein Ester hervor (Veresterung, Acylierung). Diese Reaktion kann durch eine Säure katalysiert werden. Dabei wird der Carbonylsauerstoff durch die Säure protoniert und der nucleophile Angriff durch das Sauerstoff-Atom der Hydroxygruppe erleichtert (Mortimer u. a. (2014)). Das Verringern der Aktivierungsenergie ist bei Veresterungen von Fettsäuren auch durch den Einsatz einer Lipase möglich.

Es kann sich bei der Säure um eine anorganische wie auch organische Säure handeln, der Alkohol kann mehrwertig sein. Ester aus Carbonsäuren und (mehrwertigen) Alkoholen sind industriell sehr interessant. Fette sind Ester von Speisefettsäuren mit Glycerol; als Monoester wirken sie emulgierend, durch alkalische Hydrolyse lassen sich ionische Tenside aus ihnen herstellen. Ester von niederen Alkoholen und niederen Carbonsäuren kommen als Aromen in einer Vielzahl von Früchten vor. Methyl ester von Fettsäuren können als Kraftstoff (»Biodiesel«) verwendet werden. (Mortimer u. a. (2014), Rowe (2004))

In Abbildung 3.1 ist die Acylierung eines Alkylglucosids mit einer Carbon-/Fettsäure gezeigt, wie sie in dieser Arbeit untersucht wird. Durch entfernen des Nebenprodukts

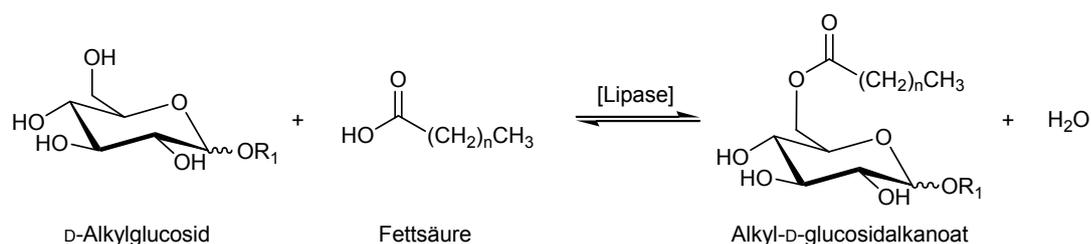


Abbildung 3.1: Lipasekatalysierte Bildung eines Fettsäure-Zuckeresters

Wasser (»Kondensationsreaktion«) kann die Lage des Reaktionsgleichgewichts auf die Seite des Esters verschoben werden. Dies kann adsorptiv mittels Molekularsieben, de-

stillativ durch reduzierten Druck unterhalb des Dampfdrucks von Wasser oder durch Strippen mit einem trockenen Gas geschehen.

### 3.2 Grenzflächenaktive Fettsäurezuckerester

Die Eigenschaften eines Stoffes sind in der Nähe von bzw. an Grenzflächen sehr unterschiedlich zu den Eigenschaften im Kern der Phase. Üblicherweise ist jedoch der Anteil der Moleküle, die an der Grenzfläche beteiligt sind, vernachlässigbar gering. Der Unterschied wird nur dann makroskopisch von Bedeutung, wenn die Grenzfläche sehr groß ist (z. B. Emulsionen, Schäume, Suspensionen) oder der Unterschied zum Rest des Systems so groß ist, dass Grenzflächeneffekte das Verhalten des gesamten Systems dominieren (heterogene Katalyse, Korrosion, Reinigung usw.). (Rosen (2004))

Tenside lagern sich aufgrund ihrer Struktur an Grenzflächen an und ändern (meist reduzieren) dort die freie Energie der Oberfläche, also die zum Erzeugen oder Vergrößern der Grenzfläche notwendige Arbeit. Dies wird nur durch die amphiphile Struktur der Tenside möglich: Sie besitzen eine lyophile Gruppe (Kopf) mit starker Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel (bei Wasser: hydrophil), und eine lyophobe Gruppe (Schwanz) mit geringer Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel (bei Wasser: hydrophob) (Abbildung 3.2).

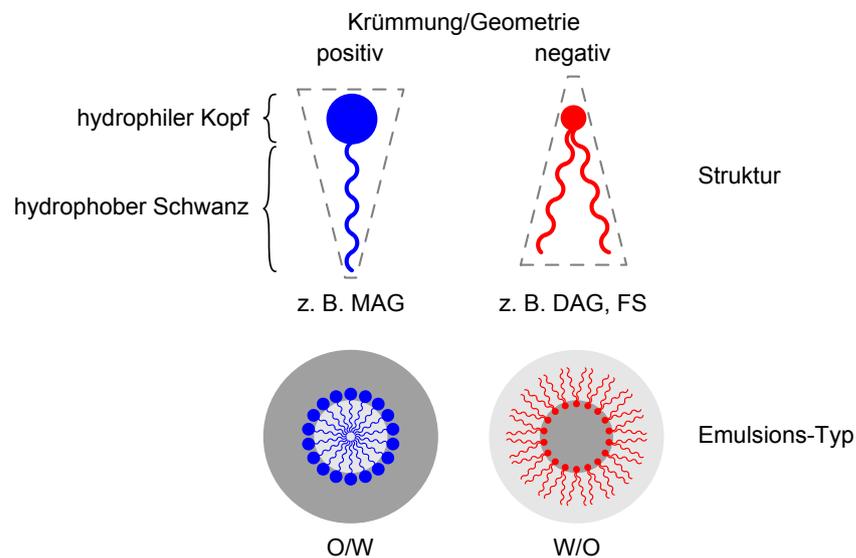


Abbildung 3.2: Tensid-Strukturen und Orientierungsverhalten mit resultierendem Emulsions-Typ nach Rosen (2004) und Thiam u. a. (2013) (MAG: Monoacylglycerid, DAG: Diacylglycerid, FS: Fettsäure, O/W: Öl-in-Wasser-Emulsion, W/O: Wasser-in-Öl-Emulsion)

Hydrophile Gruppen sind sehr polar oder sogar ionisch (Rosen (2004)):

- **Anionisch:** negative Ladung (z. B. Alkalisalze von Carbonsäuren/Seifen)
- **Kationisch:** positive Ladung (z. B. Salze langkettiger Amine)
- **Zwitterionisch/amphoter:** beide Ladungen (z. B. langkettige Aminosäuren)
- **Nicht-ionisch:** keine Ladung (z. B. Monoglyceride von Fettsäuren)

Für hydrophobe Gruppen kommen vor allem langkettige verzweigte oder unverzweigte Kohlenwasserstoffe, aber auch deren Derivate in Betracht (Rosen (2004)). Die Eigenschaften eines Tensids hängen von der Art bzw. Ladung des hydrophilen Kopfes und der Art des hydrophoben Schwanzes (Länge, Verzweigung, aromatischer Kern, u.a.) ab (Rosen (2004)). In einer Emulsion hat ein Tensid bzw. Emulgator die Aufgaben, die Bildung der Emulsion zu fördern, möglichst kleine Tropfen zu erzeugen und die Emulsion zu stabilisieren. Außerdem bestimmt der Emulgator die Art der Emulsion (W/O oder O/W), solange nicht eine der beiden Phasen deutlich überwiegt. Dieses Verhalten des Emulgators kann mit der *Oriented-Wedge-Theory* nach Harkins u. Keith (1924) erklärt werden, derzufolge eine konvexe Grenzfläche derjenigen Phase bevorzugt wird, in der die weniger raumfüllende Gruppe besser löslich ist. Somit können die Tensidmoleküle dichter beieinander liegen, und die Grenzflächenenergie stärker herabsetzen (Abbildung 3.2 auf der vorherigen Seite).

Eine Vorhersage dieses Verhaltens ermöglicht das HLB<sup>1</sup>-Konzept nach Griffin (1949), welches die Größe und Stärke der polaren (hydrophilen) und der unpolaren (hydrophob  $\hat{=}$  lipophil) Gruppe ins Verhältnis setzt (Gleichung 3.1). Der HLB-Wert ist somit ein Maß für die relative simultane Wechselwirkung des Tensids mit der unpolaren und polaren Phase einer Emulsion, und ermöglicht die Zuordnung von Tensiden zu bestimmten Anwendungen (Abbildung 3.3 auf der nächsten Seite) (Griffin (1949)).

$$\text{HLB} = 20 \cdot \frac{M_h}{M_l + M_h} \quad (3.1)$$

HLB: Hydrophil-Lipophil-Gleichgewicht [–]

$M$ : molare Masse [g mol<sup>-1</sup>]

h: hydrophiler Anteil des Tensidmoleküls

l: lipophiler Anteil des Tensidmoleküls

---

<sup>1</sup>Hydrophil-Lipophil-Gleichgewicht (engl. *hydrophile-lipophile balance*, Griffin (1949))

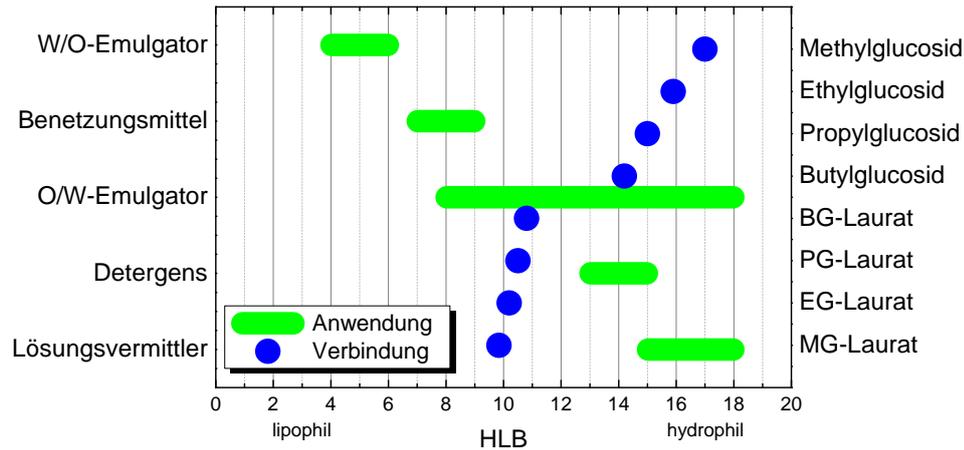


Abbildung 3.3: HLB-Werte von Tensiden für bestimmte Anwendungen nach Griffin (1949) und der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen

Die berechneten HLB-Werte der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen suggerieren die Anwendung von Alkylglucosiden als eher hydrophile Lösungsvermittler, Detergentien oder O/W-Emulgatoren, während Alkylglucosid-Lauraten sich als amphiphile Stabilisatoren für O/W-Emulsionen eignen (Abbildung 3.3). Für die Synthese von Fettsäurezuckerestern wurden in jüngerer Zeit neben Sucrose, Glucose und Sorbitol auch Lactose, Xylose und Rückstände aus der Verarbeitung von Stroh und Hemicellulose verwendet. Aufgrund ihrer höheren Löslichkeit sind Alkylglucoside bzw. Alkylpolyglycoside interessante Alternativen zu nativen Sacchariden in Acylierungen (Flores u. a. (2002)). Die Synthese dieser Derivate gelang Emil Fischer 1893 als saure Katalyse der Veretherung von Zucker mit Alkohol. Bislang sind jedoch nur wenige Produkte aus Alkyl(poly)glycosiden auf dem Markt erhältlich: Methylglucosidester und einige anionische Derivate von Alkylpolyglycosiden. Methylglucosid kann z. B. basekatalysiert ( $K_2CO_3$ ) mit Methylestern umgeestert werden. Solche Methylglucosidester sind relativ lipophil, und daher wenig löslich in Wasser. Jedoch erweisen sie sich als exzellente Emulgatoren (Hill (2010)). Wird die Synthese von Fettsäurezuckerestern durch eine Lipase katalysiert, können diese im Gegensatz zu chemisch synthetisierten Fettsäurezuckerestern für Lebensmittel verwendet werden, weil in der Biokatalyse keine Acylchloride oder schädliche Lösungsmittel wie *N,N*-Dimethylformamid oder Pyridin zum Einsatz kommen. Außerdem sind Lipasen sehr regio- und stereospezifisch bezüglich bestimmter Substrate, sodass eine Verknüpfung an einer bestimmten Position des Zuckers als Polyol möglich ist. Daher sind Lipase-katalysierte Synthesen vielversprechend, wenn definierte Strukturen angestrebt werden (Kobayashi (2011)).

## 3.3 Aufbau und Funktion katalytisch aktiver Proteine

### 3.3.1 Klassifizierung von Enzymen

Um Ordnung in die nahezu unüberschaubare Vielfalt bekannter Enzyme zu bringen, werden Enzyme anhand der Reaktionen klassifiziert, die sie katalysieren. Die Unterscheidungskriterien beruhen auf den Empfehlungen der *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* von 1992 (Webb (1992)), und werden heute als EC-Nummern der *Enzyme Commission* verwendet. Jede Bezeichnung setzt sich aus dem Präfix *EC* und vier voneinander durch Punkte getrennte Zahlen zusammen. Die vier Zahlen bezeichnen als Klassen und Unterklassen sukzessiv spezifizierend die katalysierte Reaktion. Die erste Zahl gibt an, welchen Reaktionstyp das Enzym katalysiert bzw. welcher der sechs definierten Hauptklassen das Enzym angehört (Tabelle 3.1). Die darauf folgenden Zahlen geben die Unterklassen an, und bezeichnen an zweiter Stelle die chemische Struktur, die verändert wird, an dritter Stelle die Eigenschaften des involvierten Enzyms oder weitere Charakteristika der katalysierten Reaktion, und an vierter Stelle eine fortlaufende Nummer (Buchholz u. a. (2012)). Zusätzlich zu der EC-Nummer werden Enzymen ein empfohlener Name (häufig der bislang benutzte Trivialname) sowie ein systematischer Name (der auf Substrat und Reaktionsart hinweist) zugeordnet (Voet u. a. (1992)).

Tabelle 3.1: Klassifizierung von Enzymen nach *Enzyme Commission* (Garrett u. Grisham (2010))

| Hauptklasse        | Katalysierte Reaktion                             |
|--------------------|---|
| 1. Oxidoreduktasen | Reduktions- und Oxidationsreaktionen              |
| 2. Transferasen    | Übertragung funktioneller Gruppen                 |
| 3. Hydrolasen      | Hydrolysereaktionen                               |
| 4. Lyasen          | Addition an Doppelbindungen                       |
| 5. Isomerasen      | Isomerisierung und Racemisierung                  |
| 6. Ligasen         | Aufbau von Bindungen unter Energieverbrauch (ATP) |

Da die Klassifizierung nach *Enzyme Commission* nicht die Enzyme selbst, sondern deren katalysierte Reaktion(en) zuordnet, können verschiedene, nicht miteinander verwandte Enzyme identisch klassifiziert werden (wenn sie die gleiche Reaktion katalysieren).

### 3.3.2 Struktur und Funktion der Enzyme

Enzyme sind Proteine, und diese wiederum makromolekulare Polymere von Aminosäuren, die durch Peptid-Bindungen verknüpft sind. Durch verschiedene Wechselwirkungen ist ihr Aufbau sehr komplex. Er wird verständlicher durch eine hierarchische Betrachtungsweise (Garrett u. Grisham (2010)):

1. Die **Primärstruktur** bezeichnet die Sequenz der kovalent verknüpften Aminosäuren in der Polypeptidkette.
2. Wiederholt auftretende, regelmäßige Strukturen bzw. Faltungen aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen, die sich durch ihre Position und Länge auszeichnen, werden als Teil der **Sekundärstruktur** aufgefasst. Man unterscheidet  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen.
3. Durch unregelmäßige Faltungen, welche man als **Tertiärstruktur** erfasst, erhält das Protein eine kompakte dreidimensionale Form, und seine äußere Oberfläche wird im Verhältnis zum Volumen minimiert.
4. Nicht selten verbinden sich einzelne, teilweise verschiedene Polypeptidketten als Untereinheiten nicht-kovalent zu einer charakteristischen oligomeren **Quartärstruktur**.

Als globuläre Proteine sind Enzyme meist gut wasserlöslich, da sie kompakt gefaltet sind, und ihre hydrophoben Aminosäure-Reste nach innen weisen, wodurch sie ihre spherische Form erhalten (Garrett u. Grisham (2010)). Die hydrophilen Reste hingegen weisen dann nach außen zum umgebenden Lösungsmittel, meist Wasser.

Enzyme wirken wie chemische Katalysatoren. Ebenso wie diese verändern sie lediglich die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion (Ostwald (1894)), indem sie die Aktivierungsenergie der Reaktanden herabsetzen, ohne bei diesem Vorgang verbraucht oder dauerhaft verändert zu werden. Sie können die Lage des chemischen Gleichgewichts nicht beeinflussen, denn diese ist eine thermodynamische Konstante (Dose (1991)). Enzyme können gegenüber chemischen Katalysatoren deutliche Vorteile aufweisen. Sie besitzen eine hohe Aktivität bei vergleichsweise milden Reaktionsbedingungen (z. B. Temperaturen unter 100 °C, atmosphärischer Druck, fast neutrale pH-Werte). Vor allem zeichnen sie sich jedoch durch ihre Spezifität aus, die sich sowohl auf die Edukte, die in der Enzymologie traditionell Substrate genannt werden, als auch auf die Produkte und der zu ihrer Bildung führenden Reaktionen bezieht (Voet u. a. (1992)). Diese Spezifität wird zum

einen durch eine geometrische Komplementarität der räumlichen Strukturen chemischer Gruppen im Substratmolekül mit der Form der Substrattasche und des aktiven Zentrums bewirkt, zum anderen durch eine Komplementarität der nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Substrat und Substrattasche, also elektrostatischer Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, und Van-der-Waals-Kräften und hydrophober Wechselwirkungen. Die Komplementarität beruht also auf der Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins. Die Substratbindungsstellen sind zumeist »vorgeformt«; durch Wechselwirkungen mit den Aminosäuren-Seitengruppen bei der Anbindung des Substrats und Umorientierung von Aminosäuren-Seitenketten im aktiven Zentrum während der Umsetzung kommt es jedoch zusätzlich zu Konformationsänderungen des Enzyms und Polarisierung bestimmter Bindungen und somit zur Aktivierung des Substrats (Dose (1991)). Hierdurch wird die Stabilisierung des Übergangszustandes als wichtigster enzymatischer Katalysemechanismus bewirkt. Dieser als »Induced-Fit« bezeichnete Mechanismus stellt die Weiterentwicklung des ursprünglichen »Schlüssel-Schloss-Prinzips« dar.

Die genannten Vorteile von Enzymen als Biokatalysatoren werden jedoch nicht selten durch Nachteile wie hohe Preise, Abhängigkeit von Cofaktoren oder Cosubstraten, verschiedene Formen reversibler Inhibierung und Denaturierung relativiert, wodurch biokatalytisch synthetisierte Moleküle teurer sind als chemisch hergestellte Analoga.

### 3.3.3 Enzym-Kinetik

Die chemische Kinetik, die auf der Arbeit von Ludwig Ferdinand Wilhelmy aus 1850 beruht (Wilhelmy (1850)), besagt, dass die Geschwindigkeit spontaner irreversibler monomolekularer Reaktionen proportional zur Konzentration des Edukts ist (Kinetik 1. Ordnung). Im Gegensatz dazu zeigt ein Enzym mit zunehmender Substratkonzentration jedoch ein Sättigungsverhalten. Das heißt, für eine niedrige Substratkonzentration folgt die Umsetzung einer Kinetik 1. Ordnung, während bei einer hohen Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit zunehmend unabhängig von dieser ist, also einer Kinetik 0. Ordnung folgt (Garrett u. Grisham (2010)).

Unter Annahme eines reversibel gebildeten Enzym-Substrat-Komplexes, der irreversibel zu Produkt und Enzym zerfällt formulierten Leonor Michaelis und Maud Leonora Menten die heute nach ihnen benannte Michaelis-Menten-Kinetik (Michaelis u. Menten (1913)). George Edward Briggs und John Burdon Sanderson Haldane trugen die Annahme des Fließgleichgewichtes (»Steady-State«) zu der Kinetik bei (Briggs u. Haldane, John Burdon Sanderson (1925)), d.h. die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes bleibt konstant. Durch Zusammenfassen der einzelnen Reaktionsgeschwin-

digkeitskonstanten zur Michaelis-Konstante erhält man aus dem System an Differentialgleichungen die als Michaelis-Menten-Kinetik bekannte heutige Grundgleichung der Enzymkinetik (Garrett u. Grisham (2010)) in Gleichung 3.2. Darin stellt  $V_{\max}$  die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit Substrat dar. Die Michaelis-Konstante  $K_m$  kann als reziprokes Maß für die Affinität des Substrates zum Enzym verstanden werden. Sie entspricht derjenigen Substratkonzentration, bei der die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit genau halbmaximal wird ( $[S] = K_m \Leftrightarrow v = \frac{1}{2} V_{\max}$ ). Sowohl  $V_{\max}$  als auch  $K_m$  hängen vom pH-Wert ab.

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (3.2)$$

$v$ : Reaktionsgeschwindigkeit [ $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ]

$V_{\max}$ : maximale Reaktionsgeschwindigkeit [ $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ]

$[S]$ : Substratkonzentration [ $\text{mol m}^{-3}$ ]

$K_m$ : Michaelis-Konstante [ $\text{mol m}^{-3}$ ]

Für sehr hohe Substratkonzentrationen wird die Reaktionsgeschwindigkeit konstant und maximal ( $[S] \gg K_m \Leftrightarrow v = V_{\max}$ ). Alle Bindungsstellen sind nun mit Substrat gesättigt. Durch Erweiterungen können verschiedene Typen von Inhibierung in der Michaelis-Menten-Kinetik berücksichtigt werden.

### 3.3.4 Industrielle Anwendung von Enzymen

Die Anzahl der Prozesse mit Biotransformationen auf industriellem Maßstab verdoppelt sich alle zehn Jahre (Straathof (2006)). Unter ihnen ist die Produktion von Feinchemikalien insbesondere für Pharmazeutika die häufigste Anwendung (Abbildung 3.4). Dies

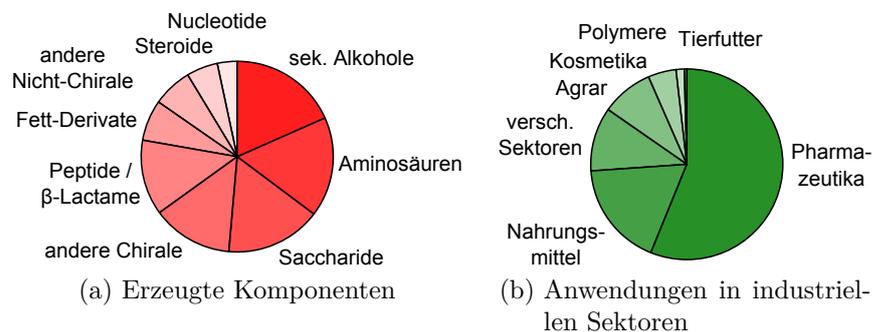


Abbildung 3.4: Produkte von Biotransformationen und deren Anwendung (nach Straathof (2006))

liegt vor allem an der Kosten-Optimierung durch die hohe Selektivität der Enzyme, denn die Prozessintensivierung ist das Schlüsselkonzept zur Kosten-Kontrolle, und biokatalytische Prozesse sind kostengünstiger und effizienter als chemische (Ghisalba u. a. (2009)), sofern der Biokatalysator eine Selektivität aufweist (Straathof (2006)). Am häufigsten werden Hydrolasen eingesetzt (Abbildung 3.5), darunter meist Lipasen (Oleochemie), und in vergleichbarer Häufigkeit Proteasen (Peptide), Amidasen (Amide) und Glycosidasen (Saccharide). Die Waschmittelindustrie ist der größte industrielle Anwendungs-

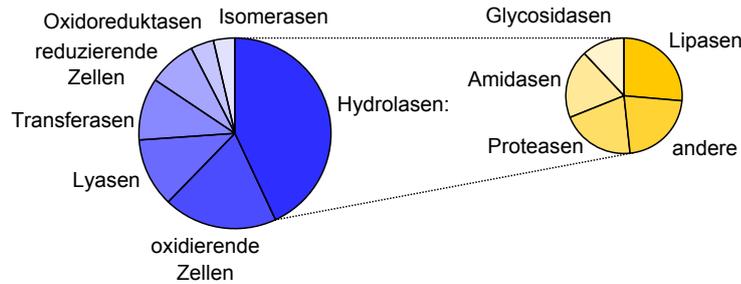


Abbildung 3.5: Arten eingesetzter Biokatalysatoren in Biotransformationen (nach Straathof (2006))

bereich für Lipasen (Houde u. a. (2004)) neben Lebensmittel-, Textil-, Kosmetik- und Papierindustrie, Öl-/Fett-, Tee- und Lederverarbeitung sowie Umwelttechnik, Pharmazie, Medizin und Diagnostik (Hasan u. a. (2006); Verma u. a. (2012)).

Um enzymatische Katalysen heterogen durchführen zu können, werden Enzyme durch Adsorption, ionische Bindung, kovalente Bindung, Quervernetzung oder Umhüllung immobilisiert. Die damit verbundenen Nachteile können durch die hinzugewonnene verlängerte Lebensdauer kompensiert werden (Braun u. a. (2006); Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Mögliche Vor- und Nachteile durch Immobilisieren von Biokatalysatoren nach Braun u. a. (2006)

| Vorteile   | Nachteile                                    |
|--|--|
| ➤ Erhöhung der Katalysatorstabilität             | ➤ Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit |
| ➤ Erhöhung der Halbwertszeit                     | ➤ Aktivitätsverlust durch die Fixierung      |
| ➤ Mehrfachverwendung der Katalysatoren           |  |
| ➤ Kontinuierliche Reaktionsführung im Bioreaktor |  |
| ➤ einfachere Produktreinigung                    |  |
| ➤ Verbesserung der Produktqualität               |  |



Die Richtung der Reaktion in Abbildung 3.7 auf der vorherigen Seite hängt dabei nur von den Verhältnissen der Konzentrationen im Massenwirkungsgesetz ab; in einer wasserfreien Umgebung zeigen Lipasen daher eine synthetische Aktivität. Um diese technisch auszunutzen und den Umsatz zu maximieren, muss das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Carbonsäure-Esters verschoben werden, indem z. B. eine Ausgangskomponente (meist der billige Alkohol) im Überschuss eingesetzt wird, oder indem das Nebenprodukt Wasser aus dem Reaktionsgemisch entfernt wird. Dies kann u. a. adsorptiv mithilfe von Molekularsieben oder destillativ geschehen.

Veresterungen (Acylierungen) können auch chemisch katalysiert werden. Im einfachsten Fall wird eine starke anorganische Säure eingesetzt, welche auch das Reaktionswasser binden kann (Becker u. Beckert (2004)). Auch aktivierte Substrate sind für die Darstellung von Carbonsäureestern denkbar, so etwa Anhydride oder Halogenide (meist Chloride) von Säuren. Letztere werden in der (eigentlich analytischen) Methode nach Carl Schotten und Eugen Baumann in alkalischer Umgebung eingesetzt. Soll Wasser aufgrund einer möglichen Hydrolyse des gebildeten Esters vermieden werden, wird Pyridin (oder anderes tertiäres Amin bzw. Stickstoffbase) als Lösungsmittel eingesetzt, dessen Stickstoff protoniert werden kann (Variante nach Alfred Einhorn, Einhorn u. a. (1898)). Somit wird zunächst das reaktive Zwischenprodukt Acylpyridiniumsalz gebildet, wodurch der nucleophile Angriff einer Hydroxalgruppe erleichtert wird. Zudem wirkt Pyridin als »Säurefänger«, und entfernt die freigesetzte Salzsäure, welche den Reaktionsablauf stören würde (Uhl u. Kyriatsoulis (1984)).

### 3.3.6 CALB/Novozym435

Eine der am häufigsten in der Industrie eingesetzten Lipasen ist die *Lipase B* aus dem anamorphen Basidiomycet *Candida antarctica*. CALB besteht aus 317 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 33 kDa (Magnusson (2005)). Als echte Lipase mit der Klassifizierung *EC 3.1.1.3* kann sie Hydrolysen sowie Ver- bzw. Umesterungen katalysieren, ist jedoch auch für ihre Fähigkeit bekannt, Saccharide als Alkoholkomponente umzusetzen (Adelhorst u. a. (1990); Yan (2001); Müller (2012)).

Strukturanalysen von CALB haben gezeigt, dass der Deckel über ihrem aktiven Zentrum nur aus einer kurzen Schlaufe (Helix  $\alpha 5$ ) besteht (Uppenberg u. a. (1994), Zisis u. a. (2015)). Als Folge weist CALB eine deutlich geringer ausgeprägte Grenzflächenaktivierung auf als andere Lipasen wie etwa CALA (Martinelle u. a. (1995)). Das aktive Zentrum besteht aus der für alle  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen typischen katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Asparaginsäure (Abbildung 3.8 auf der nächsten Seite) (Uppenberg

u. a. (1994), Gotor-Fernández u. a. (2006)).

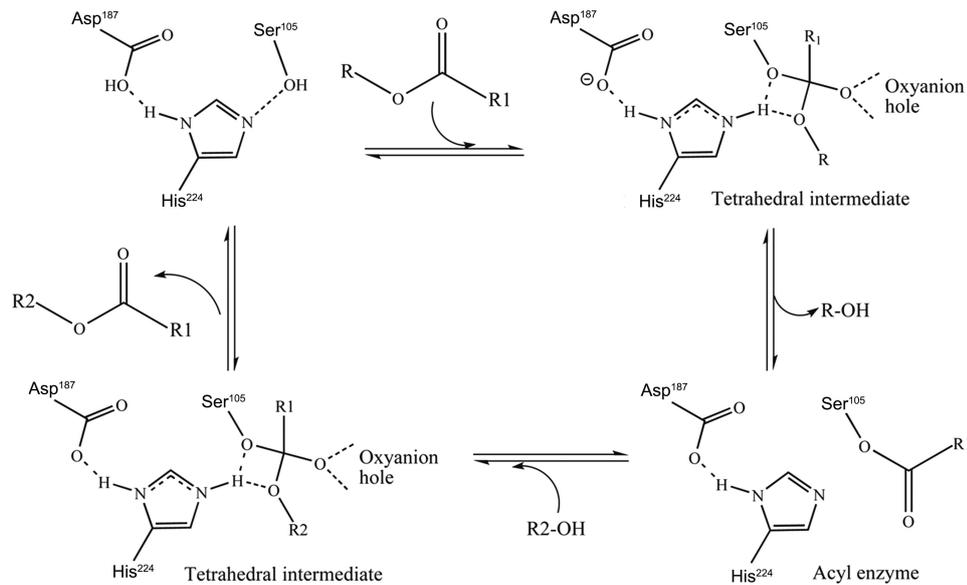


Abbildung 3.8: Ping-Pong-Bi-Bi-Reaktionsmechanismus der CALB in der katalytischen Triade mit Ser105, Asp187 und His224 (Li u. a. (2010))

Für industrielle Anwendungen wird CALB z. B. rekombinant in *Aspergillus niger* exprimiert (Sigma Aldrich 2015) und oft in immobilisierter Form z. B. von »Novozymes« als Novozym435<sup>2</sup> oder von *c-Lecta* eingesetzt, beispielsweise zur Synthese von Isopropylmyristat (Houde u. a. (2004)) oder zur Veresterung von hochviskosem Polyglycerol-3 mit Laurinsäure bei Temperaturen bis zu 75 °C (Hilterhaus u. a. (2008)).

Während chemisch-katalysierte Acylierungen von Sacchariden nicht selektiv ablaufen (Gumel u. a. (2011)), setzt Novozym435 regiospezifisch die 6-O-Hydroxygruppe um (Lee u. a. (2008b), Ferrer u. a. (2005)). Diese Fähigkeit ist erwünscht, denn die selektive Veresterung des Polyols an definierten Positionen ist aufgrund der Multifunktionalität herausfordernd und chemisch nicht möglich. Sie ist jedoch im Allgemeinen essentiell zum gezielten Einstellen erwünschter Produkteigenschaften. Obwohl *Candida antarctica* als psychrotoleranter Mikroorganismus bei Temperaturen von 5 °C bis 32 °C wachsen kann (Goto u. a. (1969)), ist die CALB sehr thermostabil und zeigt ihre höchste Aktivität bei Temperaturen zwischen 60 °C und 80 °C (Arroyo u. Sinisterra (1994)) und einem pH-Wert von etwa 7,0 (Kirk u. Christensen (2002)).

<sup>2</sup>mittels hydrophober Wechselwirkungen adsorbiert auf hydrophobem Acryl-Copolymer, quervernetzt mit Divinylbenzen, Lewatit VP OC 1600, Petry u. a. (2006)

## 3.4 Polarität von Molekülen

Durch Solvatation eines Moleküls werden seine Energie sowie die seiner Übergangszustände (im Vergleich zu der im Gaszustand) verringert. Somit hängen die Geschwindigkeit und die Ordnung sowie die Lage des Gleichgewichts einer chemischen Reaktion vom umgebenden Lösungsmittel ab (Becker u. Beckert (2004), Reichardt u. Welton (2010)).

Der Grundsatz »Ähnliches wird in Ähnlichem gelöst« (lat. »similia similibus solvuntur«) ist seit der Zeit der Alchemisten bekannt. Entsprechend können Lösungsmittel kurzerhand nach ihrer Polarität in unpolare/schwach polare Lösungsmittel<sup>3</sup>, polare protische Lösungsmittel<sup>4</sup> und polare aprotische Lösungsmittel<sup>5</sup> gruppiert werden<sup>6</sup>. Heute stellt man präziser fest, dass das Vorhandensein ähnlicher funktioneller Gruppen oft ausreicht, um eine Verbindung in Lösung zu bringen (Reichardt u. Welton (2010)).

Die Löslichkeit eines Moleküls in einem Lösungsmittel wird durch intermolekulare Kräfte bestimmt. Um eine Solvatation zu ermöglichen müssen die Wechselwirkungen zwischen Solvens und Solut stärker sein als die zwischen den Molekülen des Solvens' und als die zwischen den Molekülen des Solut (Reichardt u. Welton (2010)). Solvatation beruht auf Coulomb-, Dispersions-, Pol/Dipol-Kräften und spezifischen chemischen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken-Bindungen und Wechselwirkungen zwischen Elektronenpaardonatoren und -akzeptoren (Becker u. Beckert (2004)). Oft wird als Maß für solche Wechselwirkungen die Polarität von Lösungsmitteln in Form von Dipolmomenten oder der relativen Permittivität (bzw. Dielektrizitätskonstante) angegeben. Diese Parameter sind jedoch makroskopische Größen, die ein unstrukturiertes isotropes Kontinuum beschreiben. Molekularmikroskopisch betrachtet ist ein Lösungsmittel jedoch ein Diskontinuum aus individuellen, wechselwirkenden Molekülen mit spezifischen Eigenschaften (u. a. Dipolmoment, elektrische Polarisierbarkeit, Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, Vorhandensein von Elektronenpaardonatoren und -akzeptoren), daher reicht ein einzelner Parameter als Maß für die Polarität nicht aus (Reichardt u. Welton (2010)).

---

<sup>3</sup>z. B. Alkane, Ether

<sup>4</sup>dissoziierbare Wasserstoffatome bzw. Fähigkeit Wasserstoffbrücken-Bindungen auszubilden, z. B. Alkohole, Carbonsäuren, Wasser

<sup>5</sup>keine dissoziierbaren Wasserstoffatome oder potenzielle Wasserstoffbrücken-Bindungen, z. B. Ketone, Sulfoxide, Nitrile

<sup>6</sup>Je nach Kontext schlägt Reichardt u. Welton (2010) unterschiedliche Klassifizierungen vor: Nach chemischer Struktur (atomar, molekular, ionisch), nach physikalischen Eigenschaften (Siedetemperatur, Dampfdruck, ...), nach Säure-Base-Charakter (Brönsted, Lewis, ...), nach spezifischen Wechselwirkungen (unpolar, polar protisch, polar aprotisch) oder anhand multivariater statistischer Methoden (Chemometrie)

Der Begriff der Polarität ist wiederum nicht präzise definiert. Er wird verschieden interpretiert als permanentes Dipolmoment einer Verbindung, als relative Permittivität oder als Summe aller derjenigen Moleküleigenschaften, die für alle Wechselwirkungen zwischen den Molekülen von Solvens und Solut verantwortlich sind. Die Polarität soll die allgemeine Solvatisierungsfähigkeit eines Lösungsmittels ausdrücken, welche wiederum von der Summe aller spezifischen wie unspezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel und der gelösten Verbindung abhängt (Reichardt u. Welton (2010)). Aus Mangel an einfachen theoretischen Modellen für Lösungsmittelleffekte, und weil Polarität nicht adäquat mit einer einzelnen physikalischen Konstante definiert werden kann, wurden empirische Polaritätsskalen eingeführt. Man findet Gleichgewicht-basierte empirische Parameter (z. B. den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient  $\log K_{OW}$  nach Leo u. a. (1971) als experimentell leicht zugängliches Maß für lipophile/hydrophile Wechselwirkungen), Kinetik-basierte Parameter (z. B. das Ionisierungspotential  $Y$  nach Grunwald u. Winstein (1948)), Spektroskopie-basierte Parameter (z. B. normierte Übergangsenergien  $E_T^N$  nach Dimroth u. a. (1963)<sup>7</sup>) sowie weitere Parameter (z. B. Löslichkeitsparameter  $\delta$  nach Hildebrand u. a. (1970) oder  $\delta_d$ ,  $\delta_p$  und  $\delta_h$  nach Hansen (1967)) (Reichardt u. Welton (2010)).

In Abbildung 3.9 auf der nächsten Seite sind die Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der in dieser Arbeit untersuchten Moleküle dargestellt. Grenzflächenaktive Moleküle wie Alkylglucosidlaurate entziehen sich der Definition des Verteilungskoeffizienten, da sie sich ja gerade an der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen akkumulieren. Dennoch konnten für die Alkylglucoside Verteilungskoeffizienten experimentell ermittelt werden, die zumindest für die länger-kettigen Homologen (C3 und C4) gut mit den vorhergesagten Werten übereinstimmen. Die Trends der Verteilungskoeffizienten sind konsistent mit der Homologie innerhalb der Molekülgruppen (Alkylglucoside, Alkohole, Alkylglucosid-Laurate) sowie der Gruppen über das hier gezeigte Spektrum von Glucose als polarste Verbindung zu Laurinsäure als unpolarste Verbindung.

### 3.5 Neotere Lösungsmittel

Die Wahl eines geeigneten Mediums stellt eine der größten Herausforderungen bei der Synthese von Fettsäure-Zuckerestern dar. Das verwendete Lösungsmittel soll Substrate (und Produkte) mit sehr unterschiedlichen Polaritäten lösen können, ohne das Enzym in seiner Aktivität, Stabilität oder Selektivität zu beeinträchtigen (Yang u. Huang (2012)).

---

<sup>7</sup>heute als Reichardt-Polaritäts-Skala bekannt

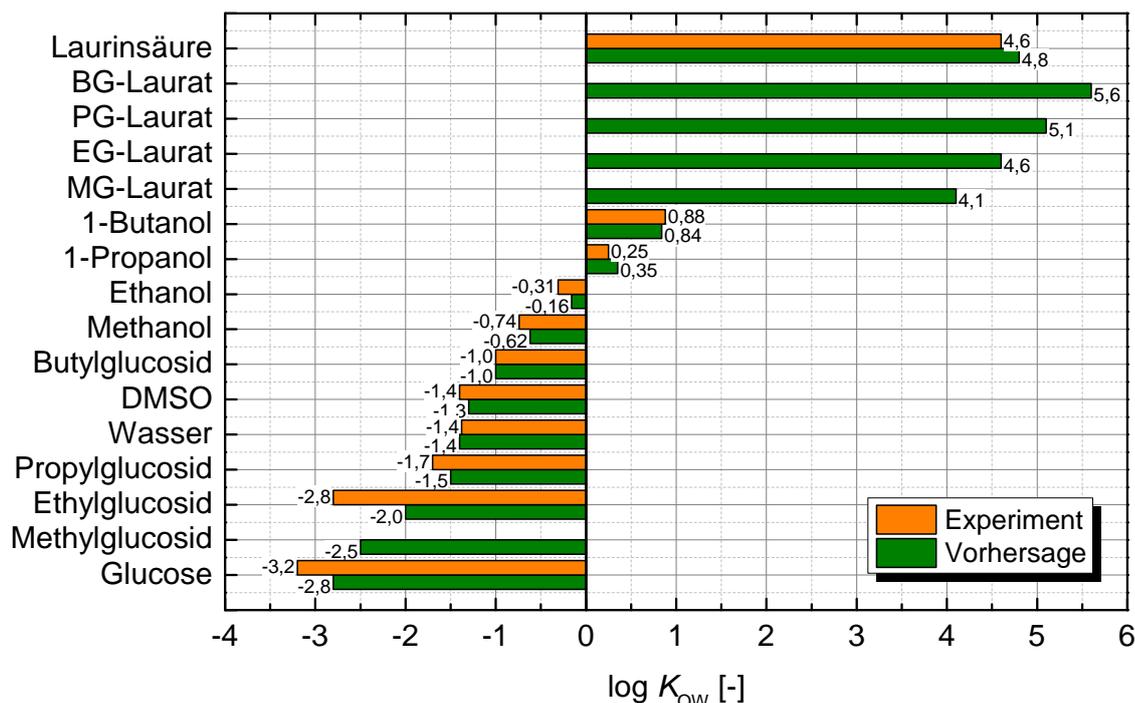


Abbildung 3.9: Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen als gemittelte Vorhersagen durch ACD/Labs, EPISuite und ChemAxon (ChemSpider) bzw. experimentell ermittelter Literaturwert (Sangster (1989))

Polare organische Lösungsmittel wie Pyridin oder *N,N*-Dimethylformamid inaktivieren Lipasen und sind in der Lebensmittelindustrie oder der Pharmazie nicht zugelassen. Lösungsmittel mit geringerem Gefahrenpotential (z. B. Acetonitril, Aceton, Hexan, 2-Methyl-2-butanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Cosolvent) lösen nur geringe Konzentrationen von Sacchariden, so dass zum Einen die Löslichkeit selbst, aber auch die Lösungskinetik als Limitierung angesehen wird. Tertiäre Alkohole können wegen sterischer Faktoren und begrenzter Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum von den meisten Lipasen nicht umgesetzt werden, und sind daher potentielle Reaktionsmedien für die Synthese von Fettsäure-Zuckerestern. (Flores u. a. (2002))

### 3.5.1 Ionische Flüssigkeiten

Die essentielle Eigenschaft des niedrigen Schmelzpunktes von IL liegt in der Raumfüllung ihrer großen, sperrigen asymmetrischen organischen Kationen begründet (Murugesan u. Linhardt (2005), Meindersma u. a. (2012)). So nimmt etwa die Schmelztemperatur von IL mit Dialkylimidazolokation mit steigender Größe des Anions ab (De u. a. (2014)). Es

handelt sich daher nicht um ein geschmolzenes Salz, sondern ein Fluid aus schwach koordinierenden Ionen. Aufgrund des ionischen Charakters liegen starke elektrostatische Wechselwirkungen vor, weswegen IL grundsätzlich einen niedrigen Dampfdruck aufweisen (Bodo u. Migliorati (2011)). In der Regel handelt es sich um die in den Abbildungen 3.10 und 3.11 gezeigten Kationen und Anionen. Durch Austausch der Seitengruppen

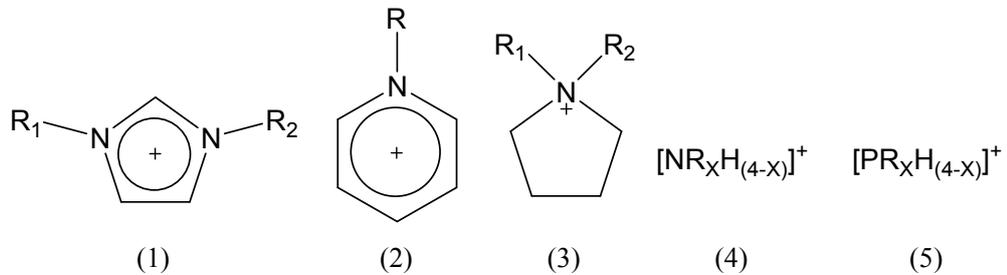


Abbildung 3.10: Auswahl häufig verwendeter Kationen in IL: (1) Imidazolium, (2) Pyridinium, (3) Pyrrolidinium, (4) Ammonium, (5) Phosphonium (nach Murugesan u. Linhardt (2005))

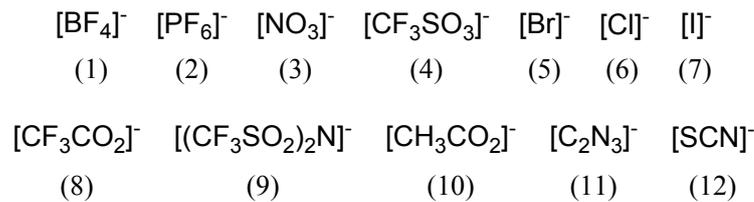


Abbildung 3.11: Auswahl häufig verwendeter Anionen in IL (mit alternativen Schreibweisen): (1) Tetrafluorborat, (2) Hexafluorphosphat, (3) Nitrat, (4) Trifluormethansulfonat ( $[\text{TfO}]^-$ , »Triflat«), (5) Bromid, (6) Chlorid, (7) Iodid, (8) Trifluoracetat, (9) *Bis*(Trifluormethylsulfonyl)imid ( $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ ), (10) Acetat ( $[\text{OAc}]^-$ ), (11) Dicyanamid ( $[\text{DCA}]^-$ ), (12) Thiocyanat (nach Murugesan u. Linhardt (2005), ergänzt um die in dieser Arbeit verwendeten Anionen)

des Kations und passende Auswahl des Anions können die chemischen und physikalischen Eigenschaften der IL anwendungsspezifisch eingestellt werden (»Designer-Solvents«). Die physikalischen Eigenschaften wie Schmelzpunkt, Viskosität und Dichte hängen vor allem vom Kation bzw. dessen Seitenketten ab, während das Anion das chemische Verhalten und die Stabilität festlegt. Typischerweise besitzen IL folgende Eigenschaften (Auswahl aus Meindersma u. a. (2012), Yang u. Pan (2005)):

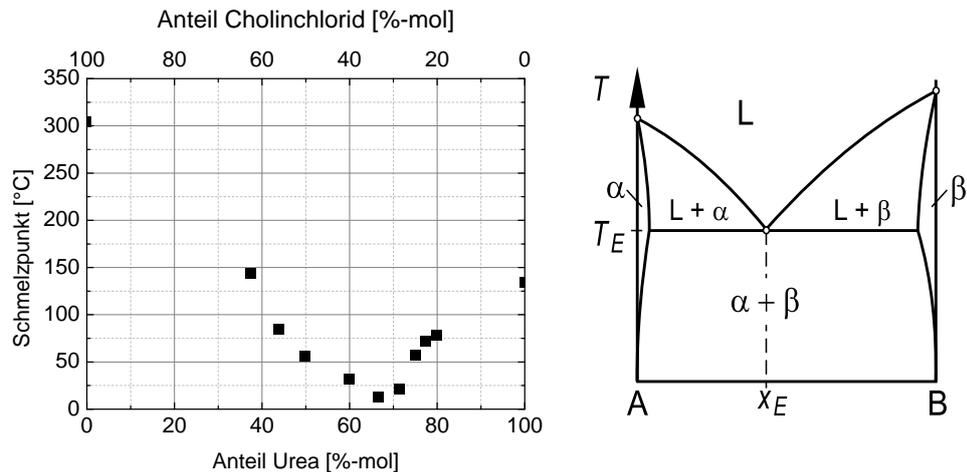
- Großer Liquidus-Bereich von 300 K ( $-96^{\circ}\text{C}$  bis  $+200^{\circ}\text{C}$ )
- Exzellente Lösungsmittel für polare sowie unpolare organische, anorganische oder polymere Materialien
- Thermisch stabil bis zu Temperaturen von  $500^{\circ}\text{C}$
- Kein messbarer Dampfdruck
- Nicht entflammbar
- hohe Polarität (ähnlich niederen Alkoholen oder Formamid)
- Dichte zwischen  $1,1\text{ g ml}^{-1}$  und  $1,6\text{ g ml}^{-1}$
- Viskosität zwischen  $40\text{ mPa s}$  und  $800\text{ mPa s}$

Die Aktivität von Enzymen kann in IL vergleichbar mit der oder höher als die in organischen Lösungsmitteln sein (Yang u. Pan (2005)). Oftmals kommt es jedoch zu einer starken Inaktivierung und Denaturierung, welche möglicherweise auf Verunreinigungen aus der Synthese (z. B. Halogenide, Silberionen) zurückzuführen ist (Zhao u. a. (2008), Yang u. Pan (2005), Lee u. a. (2006)). Die Fähigkeit kleiner Ionen zur Ausbildung starker Wasserstoff-Brückenbindungen kann die Lösung polarer Moleküle wie auch die Denaturierung von Proteinen gleichermaßen bewirken. Wirkt die IL selbst denaturierend, oder liegt eine Substrat- und/oder Produkt-Inhibierung vor, bietet sich in biotechnologischen Prozessen der Einsatz einer mit Wasser nicht mischbaren IL als Reservoir für Substrat(e) und Produkt(e) in einer zweiten Phase an, während eine wässrige Phase als Reaktionsphase mit dem Biokatalysator (Enzym oder ganze Zellen) dienen kann (Murugesan u. Linhardt (2005)).

Eine Inaktivierung von Enzymen kann durch gezieltes Design der IL verhindert werden. Eine niedrige Anionen-Konzentration scheint ausschlaggebend für den Erhalt der Enzymaktivität zu sein. Daher sollten kleine Anionen (wie Halogenid-Ionen) vermieden werden. Gleichzeitig kann die Löslichkeit von z. B. Sacchariden erhöht werden, indem Wasserstoffbrücken-bildende Anionen sowie Sauerstoff-enthaltende (als Wasserstoffbrücken-Akzeptor) kompakte Kationen eingesetzt werden (Zhao u. a. (2008)). Je stärker die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken in den Ionen der IL ausgeprägt ist, desto höher ist die Löslichkeit von Sacchariden darin. Gleichzeitig steigt jedoch auch das Maß der Inaktivierung von Enzymen, sodass für die enzymatische Prozessierung von Sacchariden ein Kompromiss zwischen der Löslichkeit des Saccharids und der Stabilität des Enzyms gefunden werden muss. Im Gegensatz zu üblichen polaren organischen Lösungsmitteln (z. B. Methanol, *N*-Methylformamid) werden Enzyme in IL mit vergleichbaren Polaritäten nicht inaktiviert, während Saccharide in weniger polaren organischen Lösungsmitteln nur geringe Löslichkeit besitzen (Murugesan u. Linhardt (2005)).

### 3.5.2 Stark eutektische Lösungsmittel

In 2003 wurde beobachtet, dass eine Mischung aus Cholinchlorid und Urea in einem bestimmten Verhältnis ein Eutektikum mit einer Schmelztemperatur von  $12^\circ\text{C}$  bildet (Abbott u. a. (2003)). Im Vergleich zu den beiden Reinstoffen mit Schmelztemperaturen von  $133^\circ\text{C}$  für Urea und sogar  $302^\circ\text{C}$  für Cholinchlorid ist die Schmelztemperatur also um mehr als 120 K erniedrigt (Abbildung 3.12a).



(a) Schmelzpunkt des binären Gemisches aus Cholinchlorid und Urea in Abhängigkeit von der molaren Zusammensetzung (nach Abbott u. a. (2003))

(b) Zustandsdiagramm für eutektische Systeme (Czichos u. a. (2014))

Abbildung 3.12: Eutektikum am Beispiel von Cholinchlorid und Urea

Dieser neue Typ von Lösungsmitteln wurde vom Autor als »Deep-Eutectic Solvent« bezeichnet. Heute ist die Mischung aus Cholinchlorid und Urea im molaren Verhältnis von 1:2 das bekannteste DES mit den häufigsten Veröffentlichungen (Durand u. a. (2013)). Eutektische<sup>8</sup> Gemische zeichnen sich durch eine vollständige Mischbarkeit im flüssigen Zustand bei begrenzter Mischbarkeit im festen Zustand aus (Abbildung 3.12b). Die Komponenten beeinflussen sich gegenseitig derart, dass sie die Schmelztemperatur der Mischung im Vergleich zu den Reinstoffen herabsetzen (Hornbogen u. a. (2008)). Die beiden Liquidus-Linien im Phasendiagramm treffen sich im eutektischen Punkt ( $T_E; x_E$ ). Dort sind drei Phasen (Schmelze und Mischphasen  $\alpha$  und  $\beta$ ) im Gleichgewicht, und die Schmelztemperatur ist minimal. Im Gegensatz zu IL bestehen DES nicht vollständig aus Ionen und sind daher keine wirklichen IL (Zhang u. a. (2012)). Nach Smith u. a. (2014) besitzen DES eine allgemeine Struktur, die in vier Typen

<sup>8</sup>griech. eútēktos = leicht zu schmelzen, aus: eū = gut, wohl und tēktós = schmelzbar (Duden (2015))

unterteilt werden kann (Abbildung 3.13). Demzufolge liegt in DES stets ein Kom-

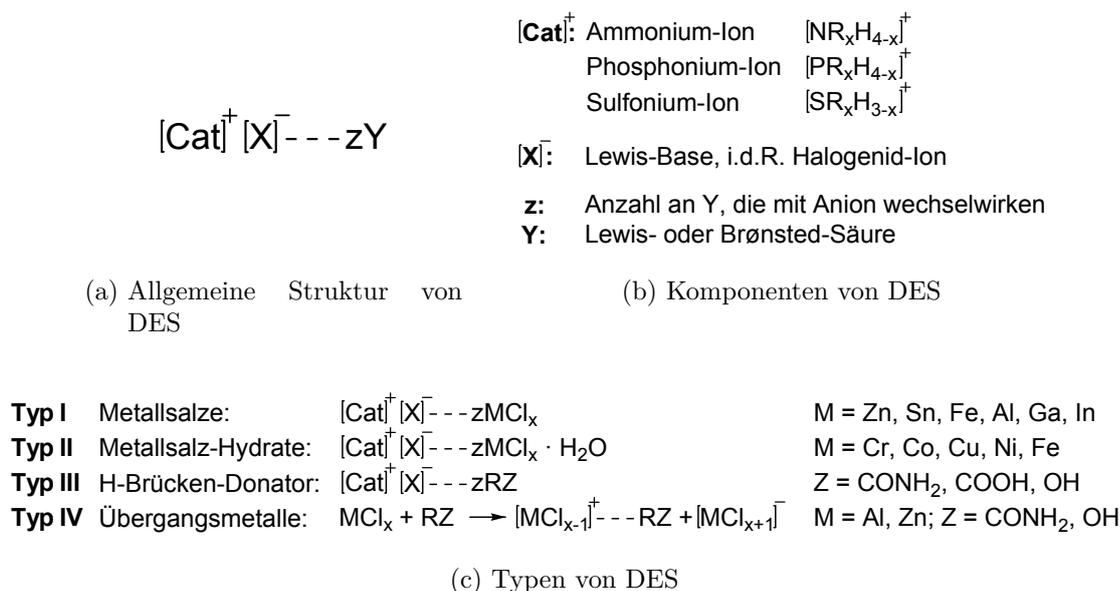


Abbildung 3.13: Systematischer Aufbau von DES nach Smith u. a. (2014)

plex aus dem Anion ( $[\text{X}]^-$ ) eines Ammonium-, Phosphonium- oder Sulfonium-Salzes ( $[\text{Cat}]^+ [\text{X}]^-$ ) und einem Metallsalz oder Wasserstoffbrücken-Donor (Y) vor. Das molare Verhältnis, in dem die Bestandteile gemischt werden müssen, hängt von der Stöchiometrie des gebildeten Komplexes ab (Francisco u. a. (2013)). Durch die Abschirmung der Ladung z. B. in der Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen dem Halogenid-Anion und einem Wasserstoffbrücken-Donor wird diese Ladung delokalisiert, und die Schmelztemperatur der Mischung gegenüber den Reinstoffen herabgesetzt (Smith u. a. (2014)). Auch *van der Waals*-Kräfte können an der verminderten Kristallisation beteiligt sein (Francisco u. a. (2013)).

Mit dem Wissen, dass die Gefrierpunktserniedrigung maßgeblich durch die Wechselwirkung zwischen einem Wasserstoffbrücken-Donor und einem -Akzeptor bewirkt wird, werden DES zu »Designer-Solvents« (Francisco u. a. (2013)). Abbildung 3.14 auf der nächsten Seite zeigt eine Auswahl möglicher Bestandteile von DES des Typs III. Da die ungewöhnlichen Solvatisierungseigenschaften auf der Fähigkeit beruhen, Wasserstoffbrücken zu bilden, sind DES mit protischen Lösungsmitteln wie Wasser oder Alkoholen mischbar, jedoch nicht mit aprotischen Lösungsmitteln wie Alkanen oder Ethern (Durand u. a. (2013)).<sup>9</sup>

<sup>9</sup>Somit können DES grundsätzlich keine zweiphasigen Reaktionssysteme mit Wasser bilden (Francisco u. a. (2013)).

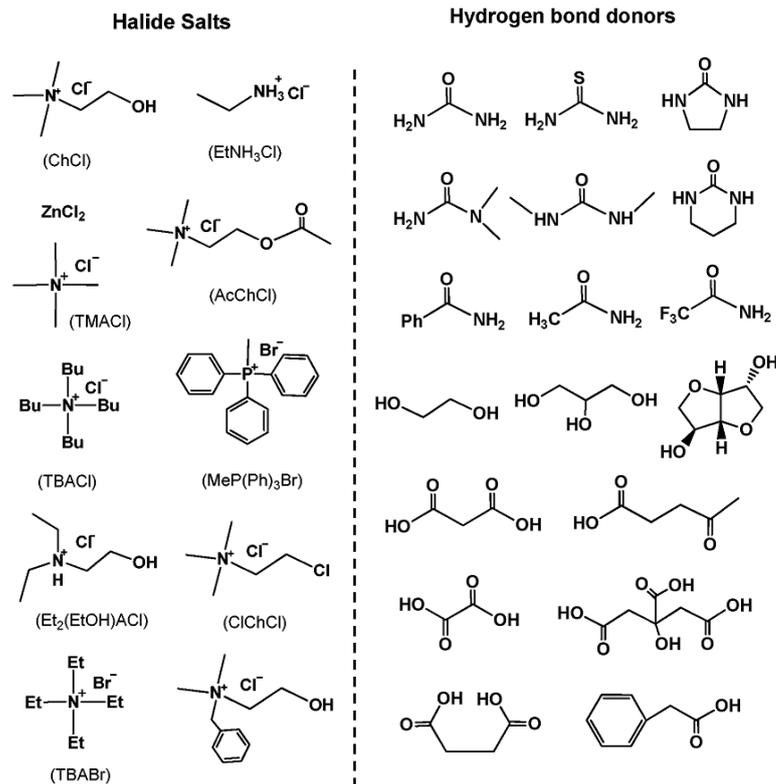


Abbildung 3.14: Auswahl möglicher Bestandteile von DES des Typs III (Zhang u. a. (2012))

Das Hauptcharakteristikum von DES ist die Fähigkeit, Protonen zu donieren oder zu akzeptieren, wodurch sie eine höhere Polarität als polare organische Lösungsmittel und somit das Potenzial besitzen Salze, Proteine, Aminosäuren, Surfactants, Zucker oder Polysaccharide zu lösen (Durand u. a. (2013)). Typische Vorteile von DES sind laut Francisco u. a. (2013):

- Weiter Liquidus-Bereich
- Niedriger Dampfdruck
- Nicht entflammbar
- Biokompatibilität
- Biologische Abbaubarkeit
- Einfache Herstellung durch Mischen ohne Aufreinigung
- Oft kostengünstige, leicht verfügbare und toxikologisch charakterisierte Komponenten

Die physiko-chemischen Eigenschaften (Viskosität, Dichte, Brechungsindex, Leitfähigkeit, Oberflächenspannung, chemische Inertheit) von DES sind denen von ILs grund-

sätzlich ähnlich, jedoch sind DES kostengünstiger in der Herstellung und gleichzeitig umweltfreundlicher (Zhang u. a. (2012)). Durch entsprechende Kombination einer Vielzahl verschiedener Wasserstoffbrücken-Donatoren und -Akzeptoren können die Eigenschaften von DESs gezielt beeinflusst werden (Francisco u. a. (2013)).

Die Viskositäten von DES sind generell höher als die von üblichen organischen Lösungsmitteln (z. B. n-Hexan (25 °C): 0,32 mPa s; Chloroform (25 °C): 0,56 mPa s), und liegen im Bereich von 19 mPa s (ChCl:EtGly 1:3, 20 °C) bis 34 400 mPa s (ChCl:Glu 1:1, 50 °C) bzw. 85 000 mPa s (ChCl:ZnCl<sub>2</sub> 1:2, 25 °C)<sup>10</sup> (Zhang u. a. (2012)). Dies wird durch die elektrostatischen Wechselwirkungen, *van der Waals*-Kräfte und das extensive Netzwerk aus Wasserstoffbrücken-Bindungen mit der daraus resultierenden verminderten Mobilität freier Spezies, durch die Größe der Ionen und ein geringes freies Volumen innerhalb der DES hervorgerufen (Zhang u. a. (2012)). Durch Auswahl kleiner Ionen kann also eine geringere Viskosität erzielt werden (Durand u. a. (2013)).

Im Gegensatz zu den Viskositäten erstrecken sich die Dichten von DES nicht über mehrere Größenordnungen (1,041 g cm<sup>-3</sup> für EtNH<sub>3</sub>Cl:Acetamide 1:1,5 bei 25 °C; 1,63 g cm<sup>-3</sup> für ZnCl<sub>2</sub>:U 1:3,5 bei 25 °C)<sup>11</sup> (Zhang u. a. (2012)). Sie sind also grundsätzlich etwas höher als die von Wasser (0,998 g cm<sup>-3</sup> bei 20 °C).

Am Beispiel der DES aus Cholinchlorid und Urea konnte gezeigt werden, dass durch die Selbstassoziation über Wasserstoffbrücken-Bindungen die chemische Aktivität gegenüber z. B. Proteinen bzw. Enzymen reduziert ist und die Komponenten in der Kombination weniger denaturierend wirken als einzeln (Zhang u. a. (2012)). Desweiteren ist bekannt, dass Umesterungsreaktionen mit Lipasen in DES möglich sind, und dass die Aktivität von u. a. immobilisierter Lipase B aus *Candida antarctica* in verschiedenen DES mit der in Toluol vergleichbar oder sogar höher sein kann (Gorke u. a. (2008)). Andererseits wird auch berichtet, dass Aktivität und Stabilität des erwähnten Enzyms in den gleichen DES niedriger sein können als in Toluol (Durand u. a. (2012)).

Einige Komponenten von DES des Typs III liegen im Substratspektrum von Lipasen (Carbonsäuren, Amide, Alkohole), weswegen mit Nebenreaktion gerechnet werden muss, wenn enzymatische Acylierungen in DES durchgeführt werden. Dadurch wird einerseits die Ausbeute verringert, andererseits jedoch auch die Zusammensetzung der DES verändert, so dass sich ihre essentiellen Eigenschaften wie Schmelzpunkt oder Viskosität ausschlaggebend ändern können (Durand u. a. (2013)). Jedoch gibt es Reaktionssysteme, in denen die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten der DES stärker sind, als mit

---

<sup>10</sup>ChCl:U 1:2, 25 °C: 750 mPa s

<sup>11</sup>ChCl:U 1:2, 25 °C: 1,25 g cm<sup>-3</sup>

den Substraten der enzymatischen Reaktion, sodass etwa bei einer Lipase-katalysierten Umesterung von Ethylvalerat mit Butanol in ChCl:Gly weniger als 0,5 % Glycylester gebildet wurden, während ein Umsatz des Substratesters von mehr als 90 % erreicht wurde (Gorke u. a. (2008)). In Pöhnlein u. a. (2015) wird gezeigt, dass es möglich ist, das in organischen Lösungsmitteln wenig lösliche Substrat Glucose nicht nur in einer DES aus Cholinchlorid und Urea zu lösen, sondern sogar in Form eines eutektischen binären Gemisches bereitzustellen, in dem auch das zweite Substrat Vinylhexanoat löslich ist. Bis dahin waren nur die lipophilen Acylmoleküle dafür bekannt, in Acylierungen als Substrat und Lösungsmedium gleichermaßen zu fungieren (Pöhnlein u. a. (2015)). Allgemein werden DES aufgrund ihrer biokompatiblen Eigenschaften (s. Aufzählung auf Seite 32) als enzymtolerant angesehen (Francisco u. a. (2013)).

## 3.6 Mischen und Rühren

### 3.6.1 Viskosität von Fluiden

Die Viskosität ist eine elementare Eigenschaft eines jeden Fluids. Sie ist ein Maß für die innere Reibung, welche aufgrund der Kohäsionskräfte zwischen Molekülen bei Fließvorgängen auftritt (Viswanath (2007), Zlokarnik (1999)). Daher ist sie eine wichtige Kenngröße zur Auslegung von Grundoperationen und Prozessschritten wie Mischen und Pumpen bzw. Fördern. Die Werte von Viskositäten können mehrere Größenordnungen überspannen.

Die dynamische Viskosität<sup>12</sup>  $\eta$  ist die Proportionalitätskonstante zwischen einer auf ein Fluid wirkenden Schubspannung  $\tau = F/A$  und dem sich einstellenden Schergefälle  $\dot{\gamma} = dv/dy$  (Newtonsches Reibungsgesetz) (Abbildung 3.15 und Gleichung 3.3 auf der nächsten Seite).

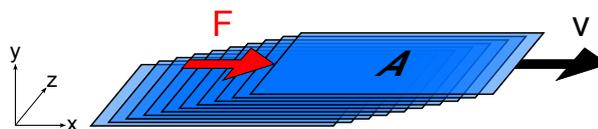


Abbildung 3.15: Laminare Scherung von Fluidschichten aufgrund einer Schubkraft

<sup>12</sup>auch absolute Viskosität genannt

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad \Rightarrow \quad \eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (3.3)$$

$\tau$ : Schubspannung [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ]  
 $\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]  
 $\dot{\gamma}$ : Schergefälle [ $\text{s}^{-1}$ ]

Auch die kinematische Viskosität  $\nu$  ist gebräuchlich. Sie ist die auf die Dichte  $\rho$  bezogene dynamische Viskosität:

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (3.4)$$

$\nu$ : kinematische Viskosität [ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ]  
 $\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]  
 $\rho$ : Dichte [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

Die Viskosität ist nicht konstant, sondern zumindest von der Temperatur<sup>13</sup> und bei hohen Drücken auch vom Druck abhängig (Zlokarnik (1999), Viswanath (2007)). Gibt es keine weiteren Abhängigkeiten, spricht man von einem Newtonschen Fluid. Die Viskositäten einiger Fluide hängen zudem vom Maß der Scherung ab, der sie ausgesetzt werden (Abbildung 3.16 auf der nächsten Seite). Nimmt die Viskosität mit steigender Scherrate ab, wird das Fluid als strukturviskos bzw. pseudoplastisch bezeichnet. Fluide mit einer Viskosität, die mit steigender Scherrate zunimmt, bezeichnet man als dilatant. Ist zum Fließen das Überwinden einer Fließgrenze  $\tau_0$  notwendig, die Viskosität im Übrigen jedoch konstant, spricht man von einem Bingham-Plastik. Ferner ist die Viskosität einiger Fluide von der Dauer der Scherbeanspruchung abhängig; zeitabhängig-strukturviskose Fluide werden als thixotrop bezeichnet, zeitabhängig-dilatante als rheopex. Und schließlich verhalten sich manche Fluide teilweise wie ein Feststoff. Sie werden als viskoelastisch bezeichnet.

Zur mathematischen Beschreibung verschiedener Fluide kann der universelle Potenzansatz nach Herschel und Bulkley als eines der gebräuchlichsten Modelle, welches eine

<sup>13</sup>Die Temperaturabhängigkeit der Viskosität lässt sich mit einem Ansatz nach Arrhenius beschreiben.

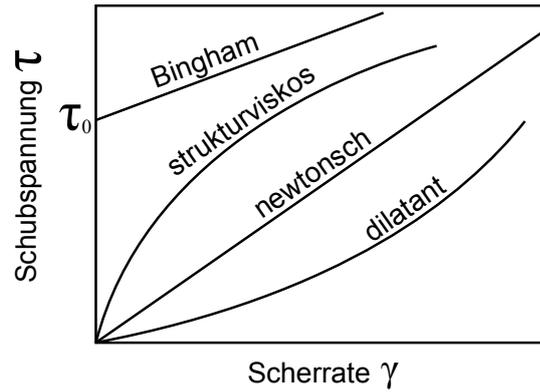


Abbildung 3.16: Fließkurven verschiedener Fluide (nach Kraume (2012))

Fließgrenze berücksichtigt (Mezger (2010)), herangezogen werden (Gleichung 3.5).

$$\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma}^n \quad (3.5)$$

$\tau$ : Schubspannung [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ]

$\tau_0$ : Fließgrenze [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ]

$k$ : Konsistenzindex [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{n-2}$ ]

$\dot{\gamma}$ : Schergefälle [ $\text{s}^{-1}$ ]

$n$ : Fließindex [–]

Wie zuvor erhält man die Viskosität, nun als effektive Viskosität bezeichnet, als Quotient aus Schubspannung und Schergefälle (Gleichung 3.6).

$$\eta_{\text{eff}} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} + k \dot{\gamma}^{n-1} \quad (3.6)$$

$\eta_{\text{eff}}$ : effektive Viskosität [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]

$\tau$ : Schubspannung [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ]

$\dot{\gamma}$ : Schergefälle [ $\text{s}^{-1}$ ]

$\tau_0$ : Fließgrenze [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ]

$k$ : Konsistenzindex [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{n-2}$ ]

$n$ : Fließindex [–]

Je nach Rheologie des Fluids nehmen die Konstanten des Modells nach Herschel und Bulkley typische Werte an. Der Fließindex ist 1 für Newtonsche und Bingham-plastische Fluide, kleiner als 1 für strukturviskose und größer als 1 für dilatante Fluide. Für Newtonsche, strukturviskose und dilatante Fluide ist  $\tau_0 = 0$ . Für Newtonsche Fluide wird der Konsistenzindex zur effektiven Viskosität.

### 3.6.2 Energieeintrag in Mischsystemen

Aufgrund der inneren Reibung von Flüssigkeiten kostet das Mischen Energie, die in gerührten Systemen als Wellenleistung und in Blasensäulen als Druckverlust der Gasphase dem System zugeführt werden muss.

#### Leistungseintrag als Rührerleistung

Der Zusammenhang zwischen der Rührerdrehzahl und der übertragenen Leistung ist von der Geometrie von Rührorgan und Behälter (bzw. vom Maßstab) abhängig, und muss für jedes System empirisch abgebildet werden (Abbildung 3.17 auf Seite 39). Ein Vergleich verschiedener Systeme ist nach der Modelltheorie dann möglich, wenn die zu vergleichenden Vorgänge ähnlich sind, d. h. wenn sie sich in geometrisch ähnlichen Räumen abspielen und alle beschreibenden Kennzahlen gleiche Werte haben (Zlokarnik (1999)). Zur Formulierung dimensionsloser Kennzahlen bedient man sich der Dimensionsanalyse, welche vor allem in der Maßstabsübertragung von Grundoperationen Anwendung findet. Grundsätzlich muss eine mathematische Beziehung zur Beschreibung physikalisch-chemisch-technischer Zusammenhänge dimensionshomogen formuliert werden, um allgemeingültig zu sein. Zunächst wird eine Relevanzliste erstellt, welche die Zielgröße (einzige abhängige Größe) und die zugehörigen Einflussgrößen (untereinander primär unabhängig) enthält. Anschließend wird der Zusammenhang zwischen diesen Größen dimensionslos formuliert, so dass dieser per Definition dimensionshomogen ist. Somit erhält man eine vollständige Beschreibung der Problemstellung bei reduzierter Anzahl beschreibender Größen<sup>14</sup>. Für die Beschreibung des Leistungseintrags wird die Rührerleistung  $P$  als Zielgröße festgelegt, die von den Einflussgrößen Rührerdurchmesser  $d$ , Dichte  $\rho$ , kinematische Viskosität  $\nu$  sowie der Rührerdrehzahl  $n$  abhängt. Als Kennzahlen erhält man die Reynolds-Zahl  $Re$ , welche als Verhältnis von Trägheits- und Zähigkeitskräften die vorherrschende Strömungsform beschreibt, und die Newton-Zahl  $Ne$ , die dem Verhältnis von Widerstandskraft und Fließkraft entspricht, und ein Maß

---

<sup>14</sup>Das II-Theorem besagt, dass eine Beziehung zwischen  $n$  physikalischen Größen zu einer Beziehung zwischen  $n - r$  voneinander unabhängigen II-Größen reduziert werden kann, wobei  $r$  der Rang der Dimensionsmatrix (meist gleich der Anzahl auftretender Grunddimensionen) ist.

für die eingebrachte Rührleistung darstellt (Gleichungen 3.7 und 3.8).

$$Re = \frac{\rho n d^2}{\eta} = \frac{n d^2}{\nu} \quad (3.7)$$

*Re*: Reynolds-Zahl [–]

$\rho$ : Dichte des Fluids [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

$n$ : Rührerdrehfrequenz [ $\text{s}^{-1}$ ]

$d$ : Rührerdurchmesser [m]

$\eta$ : dynamische Viskosität des Fluids [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]

$\nu$ : kinematische Viskosität des Fluids [ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ]

$$Ne = \frac{P}{\rho n^3 d^5} \quad (3.8)$$

*Ne*: Newton-Zahl [–]

$P$ : Rührerleistung [ $\text{m}^2 \text{kg s}^{-3}$ ]

$\rho$ : Dichte des Fluids [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

$n$ : Rührerdrehfrequenz [ $\text{s}^{-1}$ ]

$d$ : Rührerdurchmesser [m]

Die Anzahl der Einflussgrößen wurde von vier auf zwei reduziert. Der Zusammenhang zwischen  $Ne$  und  $Re$  ( $Ne = f(Re)$ ) wurde bereits in Zlokarnik (1967) für verschiedene Rührorgane empirisch untersucht und in einer zweidimensionalen Auftragung grafisch dargestellt; eine neuere, heute gebräuchliche Darstellung ist in Abbildung 3.17 auf der nächsten Seite gezeigt. Grundsätzlich muss die Leistungscharakteristik jeder Rührergeometrie experimentell ermittelt werden, bevor sie auf ähnliche Rühraufgaben übertragen werden kann (VDI (2006)). Zweckmäßigerweise werden genormte Geometrien eingesetzt, welche sich an Empfehlungen bzw. Erfahrungswerten für optimale Betriebsbedingungen orientieren (Abbildung 3.18 auf der nächsten Seite und Tabelle 3.3 auf Seite 40).

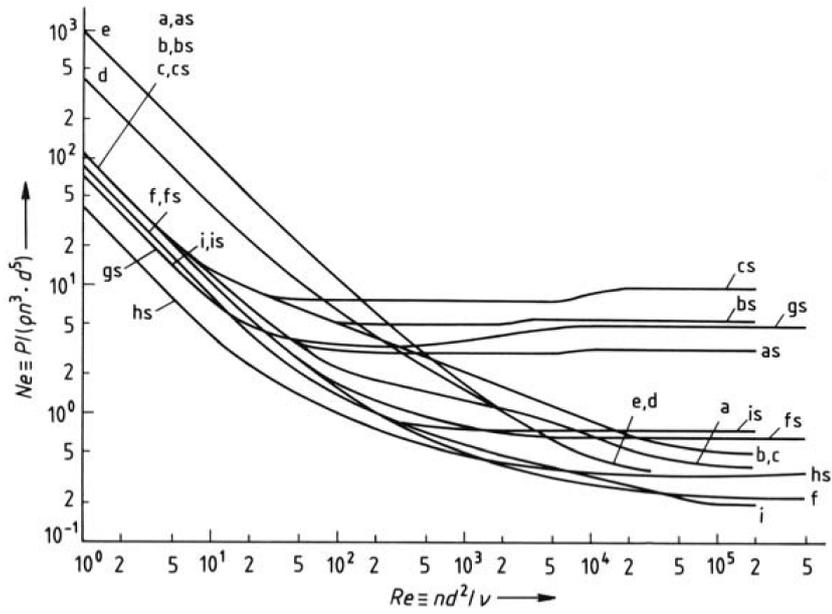


Abbildung 3.17: Leistungscharakteristik der Rührer in Abb. 3.18 (nach Zlokarnik (2012))

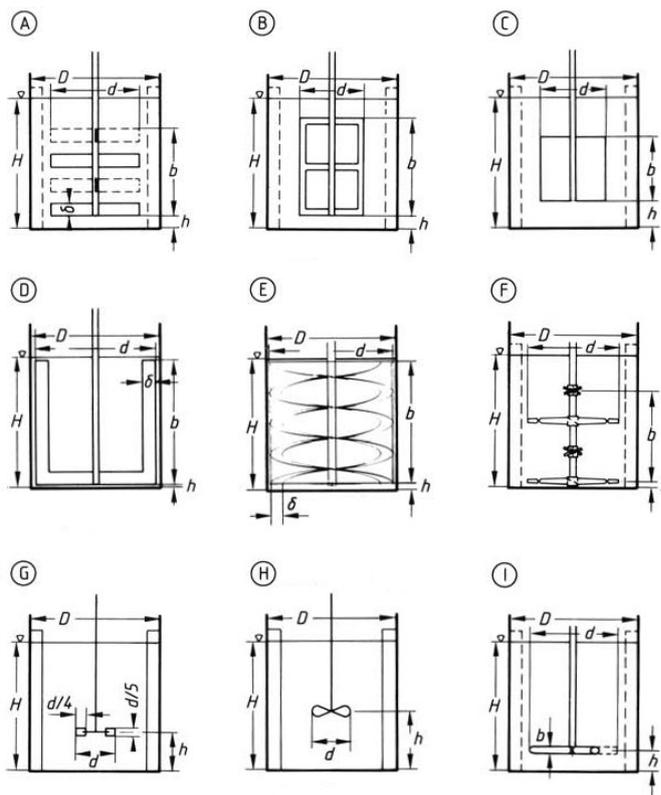


Abbildung 3.18: Einbaubedingungen und Geometrien üblicher Rührorgane;  $H/D=1$ ; optionale Bewehrung gestrichelt; geometrische Parameter in Tab. 3.3; (nach Zlokarnik (2012))

Tabelle 3.3: Geometrische Parameter üblicher Rührorgane zu Abb. 3.18 (nach Zlokarnik (2012);  $\eta$ ,  $U$  nach Grassmuck u. a. (1994))

| Rührertyp     | D/d  | h/d  | b/d  | $\delta/d$ | $\eta$<br>Pa s | u<br>$\text{m s}^{-1}$ | Anmerkung                     |
|---------------|------|------|------|------------|----------------|------------------------|-------------------------------|
| A Kreuzbalken | 1,5  | 0,15 | 1    | 0,15       | $\leq 50$      | 2 – 6                  |                               |
| B Gitter      | 2    | 0,2  | 1,5  | 0,1        | $\leq 30$      | 2 – 5                  |                               |
| C Blatt       | 2    | 0,4  | 1    |            |                |                        |                               |
| D Anker       | 1,02 | 0,01 | 1    | 0,1        | $\leq 30$      | 2 – 6                  |                               |
| E Wendel      | 1,02 | 0,01 | 1    | 0,1        | $> 50$         | 0,3 – 3                | doppelgängig, s = 0,5         |
| F MIG         | 1,43 | 0,15 | 1    |            | $\leq 50$      | 1,5 – 11               | 4 Balken                      |
| G Scheibe     | 3,33 | 1    |      |            | $\leq 10$      | 2 – 6                  | 6 Schaufeln                   |
| H Propeller   | 3,33 | 1,5  |      |            | $\leq 8$       | 2 – 15                 | 3 Flügel, $\alpha = 25^\circ$ |
| I Impeller    | 1,5  | 0,25 | 0,15 |            | $\leq 10$      | 3 – 8                  |                               |

Zur Anwendung gemessener dimensionsloser Leistungscharakteristiken auf Mischungen müssen die gemittelten Eigenschaften der Mischung eingesetzt werden. Unter der Annahme, dass die Emulsion quasihomogen ist, können Dichte  $\rho$  und Viskosität  $\eta$  einer Mischung gemittelt werden.

### Leistungseintrag in Blasensäulen

Im Gegensatz zu den gerührten System erfolgt die Durchmischung in einer Blasensäule pneumatisch, d. h. aufgrund der freien Konvektion der Blasen des zugeführten Gases. Daher lässt sich der Leistungseintrag aus dem Druckverlust berechnen, den die zugeführte Gasphase beim Aufstieg durch das Fluid erfährt.

Der Druckverlust des Gases am Ausgang des Gasverteilers am Boden der Blasensäule ergibt sich aus dem hydrostatischen Druck, der durch das darüberstehende Fluid verursacht wird:

$$P = \Delta p \dot{V}_G \quad (3.9)$$

$P$ : über Begasung eingebrachte Leistung [ $\text{m}^2 \text{kg s}^{-3}$ ]  
 $\Delta p$ : Druckverlust [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ]  
 $\dot{V}$ : Volumenstrom [ $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ ]  
 G: Gasphase

$$\Delta p = \rho_{M,G} g h_{M,G} \quad (3.10)$$

$\Delta p$ : Druckverlust [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ]

$\rho$ : Dichte [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

$g$ : Erdbeschleunigung =  $9,81 \text{ m s}^{-2}$

$h$ : Füllhöhe des Fluids/der hydrostatischen Säule [m]

M: quasihomogene Mischung (der kondensierten Phasen)

G: Gasphase

Da es sich in dieser Arbeit um Gemische aus zwei kondensierten Phasen (Suspension Saccharid in Fettsäure oder Emulsion Fettsäure in DES) und einem Gas handelt, geht der Phasenanteil des Gases in die Berechnung der Dichte ein; sie wird proportional zum Anteil der Gasphase verringert (Dichte der Gasphase vernachlässigbar):

$$\rho_{M,G} = \phi_G \rho_G + \phi_M \rho_M \approx \phi_M \rho_M \quad (3.11)$$

$\rho$ : Dichte [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

$\phi$ : volumetrischer Phasenanteil [–]

G: Gasphase

M: quasihomogene Mischung (der kondensierten Phasen)

Der Anteil der Gemisch-Phase  $\phi_M$  kann aus der Zunahme des Reaktorvolumens durch die Begasung berechnet werden, welche sich wiederum in einem Anstieg des Flüssigkeitsspiegels äußert:

$$\phi_M = \frac{V_M}{V_M + V_G} = \frac{h_M}{h_{M,G}} \quad (3.12)$$

$\phi$ : volumetrischer Phasenanteil [–]

V: Volumen [ $\text{m}^3$ ]

h: Höhe des Fluids/der hydrostatischen Säule [m]

G: Gasphase

M: quasihomogene Mischung (der kondensierten Phasen)

Somit ergibt sich die durch die Begasung in die Blasensäule eingebrachte Leistung zu:

$$P = \frac{h_M}{h_{M,G}} \rho_M g h_{M,G} \dot{V}_G = h_M \rho_M g \dot{V} \quad (3.13)$$

$P$ : über Begasung eingebrachte Leistung [ $\text{m}^2 \text{kg s}^{-3}$ ]

$h$ : Höhe des Fluids/der hydrostatischen Säule [m]

$\rho$ : Dichte [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

$g$ : Erdbeschleunigung =  $9,81 \text{ m s}^{-2}$

$\dot{V}$ : Volumenstrom [ $\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$ ]

G: Gasphase

M: quasihomogene Mischung (der kondensierten Phasen)

Daraus folgt, dass die eingebrachte Leistung für eine gegebene Menge und Zusammensetzung ausschließlich vom Volumenstrom des Gases abhängt und proportional zu diesem ist.

### 3.6.3 Disperse Systeme

Bei Überwiegen flüssiger Komponenten wird eine Mischoperation als Rühren und das Mischorgan als Rührer bezeichnet (Zlokarnik (1999)). Das Rühren hat in Prozessen folgende Aufgaben:

- Ausgleich von Konzentrationsunterschieden in Lösungen, Kolloiden und dispersen flüssigen Systemen (Suspensionen, Emulsionen, Schäume)
- Reduzieren von Temperaturgradienten und Intensivieren des Wärmeaustauschs

Sind die zu vereinigenden Stoffe ineinander nicht löslich, erhält man ein disperses Gemisch mit einer kontinuierlichen Phase (Dispersionsmedium) und einer (oder mehreren) diskontinuierlichen Phasen (disperse Phasen). Diese werden je nach Aggregatzustand der einzelnen Phasen unterschiedlich bezeichnet (Abbildung 3.19 auf der nächsten Seite). In dieser Arbeit wurde neben Lösungen vor allem mit mehrphasigen Gemischen gearbeitet. Es handelt sich dabei um Suspensionen bzw. Emulsionen mit bis zu zwei flüssigen und bis zu zwei festen Phasen sowie einer Gasphase (z. B. Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, Novozym435, Laurinsäure und Luft in der Blasensäule oder Novozym435, Laurinsäure, Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid in DES gelöst und Wasserdampf im Rührkessel unter Vakuum).

Um Korrelationen, die für Reinstoffe entwickelt/ermittelt wurden, auf Mischungen anwenden zu können, müssen die gemittelten Eigenschaften der Mischung verwendet

|                   |           | disperse Phase       |                           |                        |
|-------------------|-----------|----------------------|---------------------------|------------------------|
|                   |           | gasförmig            | flüssig                   | fest                   |
| Dispersionsmedium | gasförmig | (keine Phasengrenze) | flüssiges Aerosol (Nebel) | festes Aerosol (Rauch) |
|                   | flüssig   | Schaum               | Emulsion                  | Suspension             |
|                   | fest      | fester Schaum        | feste Emulsion            | feste Suspension       |

Abbildung 3.19: Arten disperser Systeme (nach Schramm (2005))

werden. Es wird angenommen, dass das Gemisch quasihomogen ist, und dass die Durchmesser der vorhandenen Partikel unterhalb einer kritischen Größe liegen und somit als undeformierbare Kugeln betrachtet werden können (Liepe (1988)). Die Eigenschaften der Mischungen können dann über die Volumenanteile der Phasen gemittelt werden. Dafür stehen Definitionen und theoretische Modelle (Gleichungen 3.14 bis 3.16 auf der nächsten Seite) sowie empirische Korrelationen (Gleichung 3.17) zur Verfügung (VDI (2006)).

Der volumetrische Phasenanteil ist über die Volumina der einzelnen Phasen definiert:

$$\phi_d = \frac{V_d}{V_d + V_k} \quad V_i = \frac{m_i}{\rho_i} \quad m_i = M_i n_i \quad (3.14)$$

$$\Rightarrow \phi_d = \frac{M_d n_d}{\rho_d \left( \frac{M_d n_d}{\rho_d} + \frac{M_k n_k}{\rho_k} \right)}$$

$\phi$ : volumetrischer Phasenanteil [–]

V: Volumen [m<sup>3</sup>]

m: Masse [kg]

$\rho$ : Dichte [kg m<sup>-3</sup>]

M: molare Masse [kg mol<sup>-1</sup>]

n: Stoffmenge [mol]

d: disperse Phase

k: kontinuierliche Phase

Die Dichte eines Gemisches wird proportional zu den Phasenanteilen gemittelt:

$$\rho_M = \phi_d \rho_d + (1 - \phi_d) \rho_k \quad (3.15)$$

$\rho$ : Dichte [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

$\phi$ : volumetrischer Phasenanteil [–]

M: quasihomogene Mischung

d: disperse Phase

k: kontinuierliche Phase

Zur Mittelung der Viskosität einer quasihomogenen Mischung muss zwischen Emulsionen und Suspensionen unterschieden werden. In jedem Fall bewirkt die disperse Phase eine Erhöhung der mittleren Viskosität (Liepe (1988)). Die Viskosität einer Emulsion wird anhand der Phasenanteile gemittelt (Gleichung 3.16, Olney u. Carlson (1947)).

$$\eta_E = \eta_d^{\phi_d} \eta_k^{1-\phi_d} \quad (3.16)$$

$\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]

$\phi$ : volumetrischer Phasenanteil [–]

E: Emulsion (quasihomogene Mischung)

d: disperse Phase

k: kontinuierliche Phase

Für Suspensionen kugelförmiger Partikel gleicher Größe kann die empirische Korrelation nach Eilers (1941) verwendet werden (Gleichung 3.17 auf der nächsten Seite). Dies stellt bezüglich des Gemisches aus Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid und Laurinsäure eine Vereinfachung dar, da zum einen die Partikelgrößenverteilung nicht monodispers ist, und zum anderen ein unbestimmter Teil des Saccharids von der Fettsäure gelöst wird.

$$\eta_S = \eta_k \left[ 1 + \frac{2,5 \phi_d}{2 \left( 1 - \frac{\phi_d}{\phi_{\max}} \right)} \right]^2 \quad (3.17)$$

$\eta$ : dynamische Viskosität [ $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]

$\phi$ : volumetrischer Phasenanteil [–]

$\phi_{\max}$ : maximaler Phasenanteil der dispersen Phase<sup>15</sup>

S: Suspension (quasihomogene Mischung)

k: kontinuierliche Phase

d: disperse Phase

Im Allgemeinen ist es jedoch empfehlenswert, die rheologischen Eigenschaften der Emulsion experimentell zu ermitteln, wenn die Möglichkeit besteht (Viswanath (2007)).

Um die disperse Phase vollständig zu suspendieren bzw. emulgieren und schließlich eine homogene Suspension bzw. Emulsion zu erhalten (Abbildung 3.20), müssen Platzwechselvorgänge erzwungen werden (Pahl (2002)). Aufgrund innerer Reibung (Viskosität) kostet dies Energie, welche über das Rührorgan als Wellenleistung zugeführt werden muss.

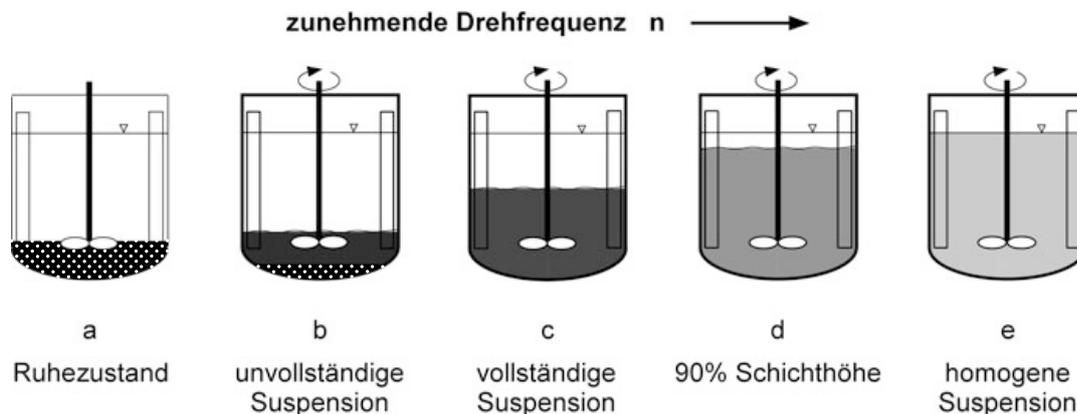


Abbildung 3.20: In Dispersionen auftretende Rührzustände (nach Kraume (2012))

<sup>15</sup>Dieser beträgt theoretisch 0,74 für starre Kugeln identischer Größe. Aufgrund einer real nicht vermeidbaren Polydispersität der diskontinuierlichen Phase wurde experimentell ein maximaler Dispersphasenanteil von 0,78 für Dispersionen praktisch nicht verformbarer kugelförmiger Partikel ermittelt (Eilers (1941)).



## 4 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit betrachteten Reaktionssysteme werden aus den Komponenten Substrat(e), Katalysator und gegebenenfalls Reaktionsmedium zusammengesetzt. Zwischen diesen Elementen bestehen paarweise Abhängigkeiten:

- **Substrat**  $\leftrightarrow$  **Enzym**: Die Substrate müssen vom Enzym akzeptiert und umgesetzt werden. Außerdem soll das Enzym nicht durch hohe Konzentrationen in Lösungsmittel-freien Reaktionssystemen inhibiert werden.
- **Substrat**  $\leftrightarrow$  **Lösungsmittel**: Die Substrate müssen im Lösungsmittel löslich sein, um für die Reaktion zur Verfügung zu stehen. Idealerweise werden sowohl das polare Saccharid wie auch die unpolare Fettsäure gelöst. Andernfalls (also bei Abwesenheit eines Lösungsmittels) liegt ein mehrphasiges System mit entsprechender Makrokinetik vor.
- **Enzym**  $\leftrightarrow$  **Lösungsmittel**: Das Enzym darf durch das Lösungsmittel nicht inaktiviert oder seine Aktivität durch Konformationsänderungen verringert werden. Das Lösungsmittel darf nicht selbst vom Enzym umgesetzt werden.

Darüber hinaus gelten thermodynamische Grundsätze. Der Gleichgewichtsumsatz ist über das Massenwirkungsgesetz und die Gleichgewichtskonstante limitiert, wenn sich gebildetes Produkt akkumuliert. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist temperaturabhängig, ebenso die Löslichkeit der Reaktanden (im Lösungsmittel oder ineinander).

In dieser Arbeit werden zunächst die obigen Paarungen alleinstehend untersucht, bevor eine Kombination zu einem vollständigen Reaktionssystem führt. In einem geeigneten Reaktor können limitierende Systemeigenschaften (Viskosität, Hygroskopizität, ...) näher untersucht werden. Ein grafischer Überblick der zu untersuchenden Komponenten ist in Abbildung 4.1 auf der nächsten Seite dargestellt.

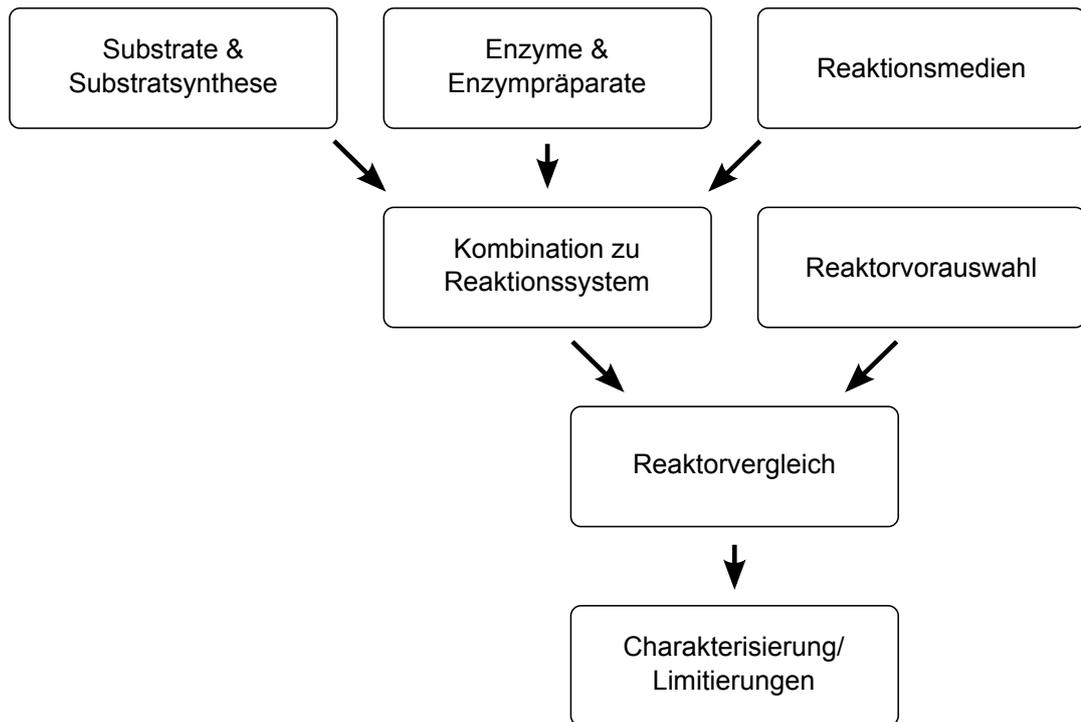


Abbildung 4.1: In dieser Arbeit untersuchte Komponenten des Reaktionssystems mit anschließender Zusammenführung und näherer Untersuchung

## 4.1 Substrate und Substratsynthese

Grundsätzlich ist das verfügbare Substratspektrum durch die Art der zu erweiternden Bioraffinerie vorgegeben. In allen Pflanzen-basierten Bioraffinerie-Klassen verbleibt Cellulose-haltige Biomasse als Rückstand (insofern diese nicht zu Biogas umgesetzt wird). Diese kann als Substrat für Veresterungen bzw. als Quelle für (Mono/Oligo)-Saccharide verwendet werden. Fette bzw. Fettsäuren werden in Ölpflanzen-basierten Bioraffinerien generiert und teilweise zu z. B. Kraftstoffen prozessiert.

### 4.1.1 Monomere Saccharide und Fettsäuren als Substrate

Als einfachstes Monosaccharid mit Ähnlichkeit zu Cellulose wurde Glucose als deren Monomer untersucht. Aus Vorversuchen war bereits bekannt, dass Novozym435 in der Lage ist, Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid umzusetzen (Björkling u. a. (1989); Müller (2012)). Daher bietet sich ein direkter Vergleich dieser beiden Substrate an. Die Versuche wurden mit Laurinsäure in 3-fachem molarem Überschuss in HPLC-Vials durchgeführt. Der Überschuss an Laurinsäure ist notwendig, um das Gemisch trotz der niedrigen Temperatur von 60°C und des hohen Feststoffgehalts durch die zugegebenen Molekularsiebe

fließfähig zu halten.

Als relatives Konzentrationsmaß wurden die Intensitäten der ATR-FTIR-Spektroskopie erfassten Infrarot-Banden von Säure- und Ester-Funktion verwendet. Die Verläufe der IR-Bandenintensitäten von Substrat und Produkt und die daraus ermittelten Anfangssteigerungen sind in Abbildung 4.2 aufgetragen. Die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit

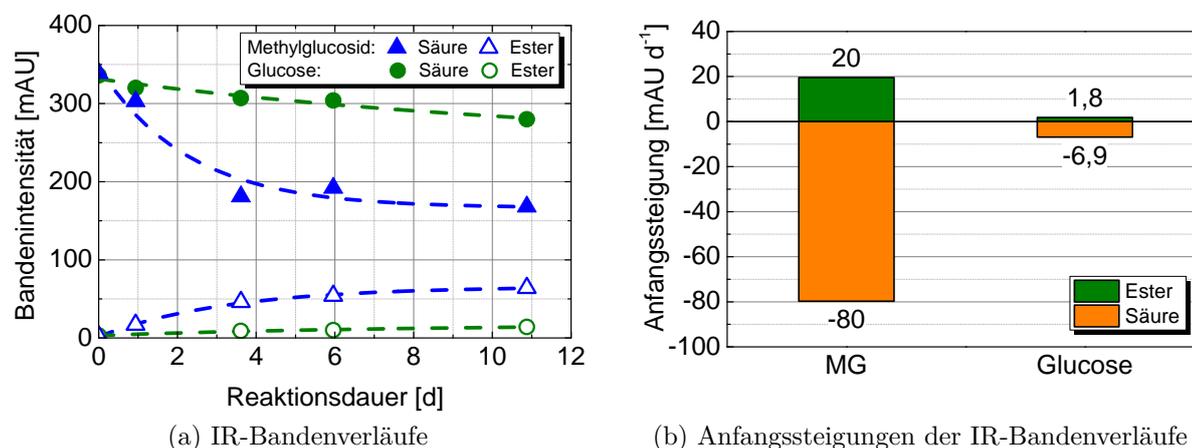


Abbildung 4.2: Veresterung von Glucose (Gluc) bzw. Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (MG) mit Laurinsäure (LS) in 1,5 ml-Vials (2,0 mmol LS, 0,7 mmol Saccharid, 5 %wt<sub>Substrate</sub> Novozym435, 100 mg Molsiebe, Schüttler mit 1500 rpm, 60 °C, Bestimmung mittels Offline-ATR-FTIR)

von Laurinsäure ist mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mehr als eine Größenordnung höher als mit Glucose. Bei dem Ansatz mit Glucose bleibt die IR-Intensität der Esterbande über eine Woche nahezu konstant, während sie im Ansatz mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid deutlich zunimmt. Eine Reaktion läuft umso schneller ab, je höher die Konzentration gelöster Substratmoleküle in der Reaktionsphase ist. Aufgrund ihrer gegensätzlichen Polaritäten (Abbildung 3.9 auf Seite 27) sind die hier betrachteten Substrate grundsätzlich kaum ineinander löslich. Aufgrund seines unpolaren 1-*O*-Alkylrests und somit höheren Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten wird angenommen, dass Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid eine höhere Löslichkeit in der unpolaren Fettsäure und somit eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit besitzt als (native) Glucose. Da die Länge des Alkylrests in einem Saccharid-Derivat entscheidend für die Polarität des Moleküls ist, kann ein Alkylrest länger als -CH<sub>3</sub> (Methyl-) die Polarität des Alkylglucosids weiter herabsetzen und somit seine Löslichkeit in einer unpolaren Fettsäure wie Laurinsäure erhöhen. Um den Einfluss der Länge des Alkylrestes untersuchen zu können, wurden Alkylglucoside mit niederen primären unverzweigten Alkoholen synthetisiert und als Substrat in Veresterungen mit

Laurinsäure eingesetzt.

Um den Einfluss der verwendeten Fettsäure zu untersuchen, wurden verschiedene Fettsäuren mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid verestert (Abbildung 4.3). Die höchste Anfangs-

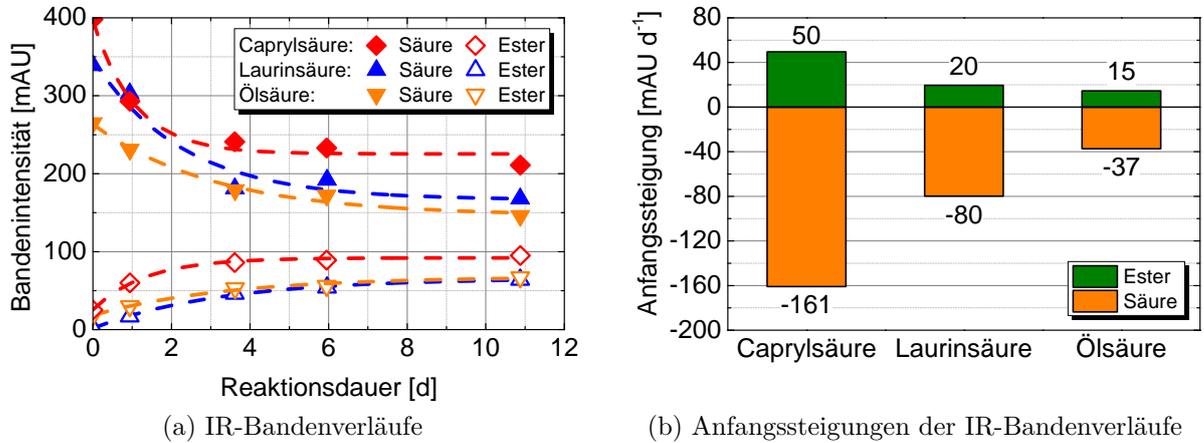


Abbildung 4.3: Veresterung verschiedener Fettsäuren (FS) mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (MG) in 1,5 ml-Vials (2,0 mmol FS, 0,7 mmol MG, 5% wt<sub>Substrate</sub> Novozym435, 100 mg Molsiebe, Schüttler mit 1500 rpm, 60 °C, Bestimmung mittels Offline-ATR-FTIR)

reaktionsgeschwindigkeit wurde für Caprylsäure (C8:0) beobachtet. Die für Laurinsäure (C12:0) ist nur halb so hoch, und die von Ölsäure (C18:1) wiederum um die Hälfte niedriger. Der Einfluss der Fettsäure ist nicht so gravierend wie der des Saccharids (Abbildung 4.2 auf der vorherigen Seite). Alle hier untersuchten Fettsäuren besitzen einen hinreichend niedrigen Dampfdruck, der das destillative Entfernen von Wasser aus dem Reaktor ermöglicht (Abbildung 4.4 auf der nächsten Seite). Laurinsäure wurde als Modellverbindung für die Acylkomponente festgelegt, um alle Versuche untereinander vergleichbar zu machen.

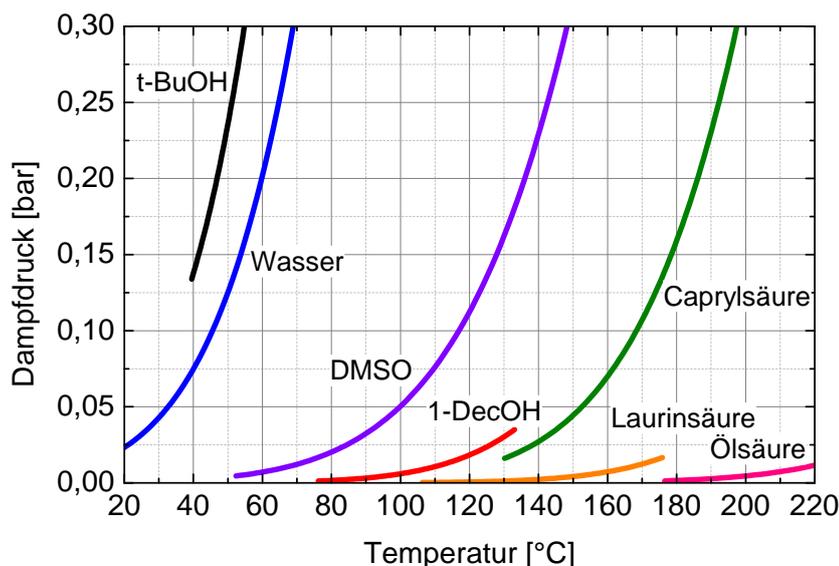


Abbildung 4.4: Dampfdruckkurven einiger in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen (anhand von Antoine-Parametern im jeweiligen Gültigkeitsbereich dargestellt, NIST (2011))

### 4.1.2 Charakterisierung der Synthese von Alkylglucosiden<sup>1</sup>

Da native Glucose unter den für das Enzym akzeptablen Reaktionsbedingungen eine deutlich geringere Reaktivität als Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid besitzt, wurde die Derivatisierung von Monosacchariden zur Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit gewählt. Die Literatur belegt, dass die Reaktivität von Alkylglucosiden in einer enzymatischen Veresterung vom Alkylrest abhängt (Björkling u. a. (1989)). Durch einen Methyl-Rest kann der Umsatz nach 24 Stunden gegenüber Glucose von weniger als 5 % auf über 50 % gesteigert werden. Wird der Alkylrest um eine weitere Methylengruppe verlängert, steigt der Umsatz in 24 Stunden auf über 90 %. Durch längere Alkylreste kann dieser Umsatz nicht weiter gesteigert werden, was bedeutet, dass die größte Abhängigkeit der Reaktivität von der Länge des Alkylrests im Bereich von C1 bis C3 liegt (Björkling u. a. (1989)). Alkylglucoside außer Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid sind kommerziell nicht erhältlich, daher sollten zu Versuchszwecken einige einfache Alkylglucoside synthetisiert werden.

Um homologe Alkylglucoside zu erzeugen, bietet sich eine Alkylierung von Glucose an (Glucosylierung, Abbildung 4.5 auf der nächsten Seite). Es wurden die primären unverzweigten Alkohole von C1 bis C4 (Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 1-Butanol) ausgewählt, um Methylglucosid (MG), Ethylglucosid (EG), Propylglucosid (PG) und

<sup>1</sup>Die Charakterisierung der Synthese von Alkylglucosiden wurde von Nick Tietgens im Rahmen einer Bachelor-Arbeit untersucht (Tietgens (2012)).

Butylglucosid (BG) zu synthetisieren. Es handelt sich bei der Glucosylierung um eine

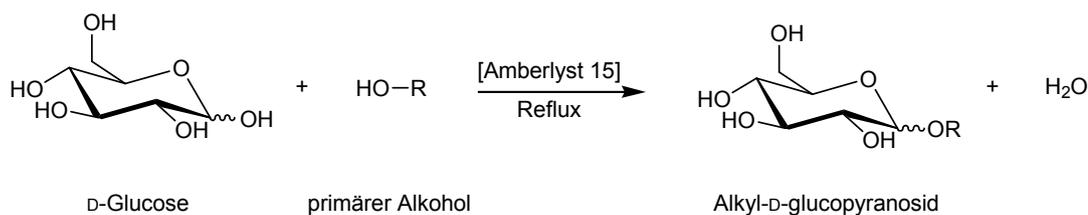


Abbildung 4.5: Säurekatalysierte Alkylierung von Glucose mit primären Alkoholen nach Fischer (1893) (In dieser Arbeit wurden Methyl- ( $-\text{CH}_3$ ), Ethyl- ( $-\text{C}_2\text{H}_5$ ), Propyl- ( $-\text{C}_3\text{H}_7$ ) und Butylalkohol ( $-\text{C}_4\text{H}_9$ ) eingesetzt.)

Kondensationsreaktion zwischen Alkoholen (Veretherung), sie kann durch eine Säure katalysiert werden. Salzsäure als Katalysator ist für diese Reaktion schon seit dem Ende des 19. Jahrhunderts bekannt (Fischer (1893), Fischer (1895)). In den 1950er Jahren wurden Ionentauscher für Glucosylierungen eingesetzt (Cadotte u. a. (1952)). Ein großer Vorteil liegt dabei in der Möglichkeit, den Katalysator durch Filtration oder Sedimentation vom Produkt zu trennen. Auch eine enzymatische Glucosylierung mithilfe von Mandel- $\beta$ -Glucosidase ist möglich, jedoch sind die Ausbeuten mit primären Alkoholen gering (unter 20% nach 72 Stunden) oder es ist hoher Zeitaufwand nötig (70% Umsatz nach 14 Tagen) (Vic u. a. (1995), Adelhorst u. a. (1990)). Aus diesem Grund wurde der saure Ionentauscher Amberlyst 15 als Katalysator für die hier durchgeführten Synthesen ausgewählt und wie in Adelhorst u. a. (1990) beschrieben eingesetzt.

Die Reaktivität der verwendeten Alkohole nimmt mit zunehmender Kettenlänge ab, was sich als abnehmende spezifische Katalysatoraktivität bei konstanter Temperatur ( $60^\circ\text{C}$ ) äußert (Abbildung 4.6 auf der nächsten Seite). Zur Zeitersparnis wurden bei dieser Temperatur nur die Anfangssteigungen bestimmt, um Aussagen über die relativen Reaktivitäten zu erhalten, nicht jedoch die Endpunkte (Gleichgewichtsumsatz, Selektivität, Ausbeute).

Durch Steigerung der Reaktionstemperatur sollte die Reaktionsgeschwindigkeit angehoben werden. Da ohne Überdruck gearbeitet werden sollte, stellte sich in der Durchführung als Reflux die jeweilige Siedetemperatur des Alkohols unter Umgebungsdruck als obere Temperaturgrenze dar. Da die Siedetemperatur mit zunehmender Kettenlänge ansteigt, steigt auch Reaktivität unter Reflux-Bedingung mit zunehmender Kettenlänge an. Für die Bildung von Ethylglucosid wurde die Reaktivität um fast eine Größenordnung gegenüber Methylglucosid gesteigert. Der erreichte Gleichgewichtsumsatz nimmt dagegen mit zunehmender Kettenlänge des Alkohols ab (Abbildung 4.7 auf der nächsten Seite). Es wurde eine starke Zunahme der Konzentration gelösten Saccharids am

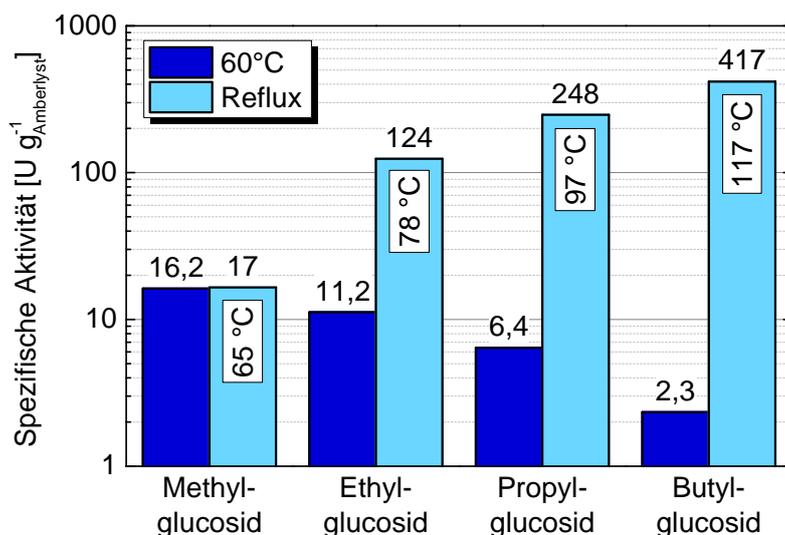


Abbildung 4.6: Spezifische Aktivität von Amberlyst 15 (berechnet aus Produktbildungsrate) bei der Alkylierung von Glucose mit niederen primären unverzweigten Alkoholen (75 ml Alkohol, 25 g Glucose, 5 g Amberlyst 15, 60 °C bzw. unter Reflux bei jeweils angegebener Siedetemperatur), Bestimmung mittels NP-HPLC

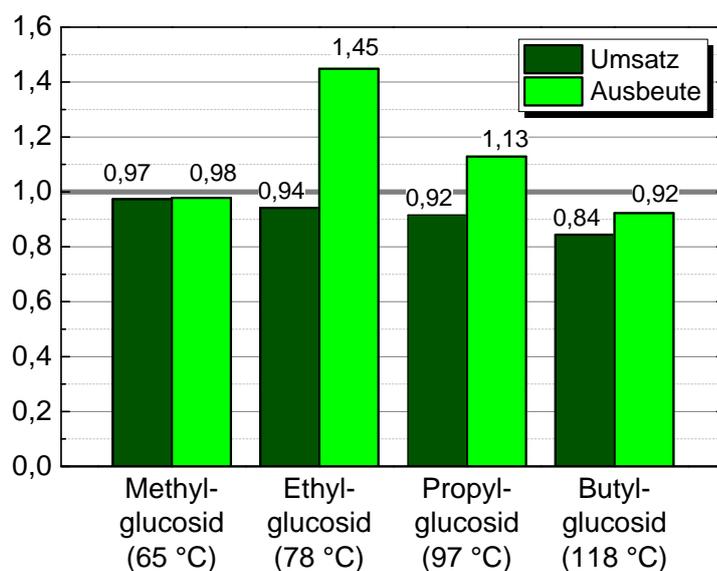


Abbildung 4.7: Alkylierung von Glucose mit niederen primären unverzweigten Alkoholen durch Amberlyst 15 unter Reflux (75 ml Alkohol, 25 g Glucose, 5 g Katalysator, Siedetemperatur jeweils angegeben, Bestimmung mittels NP-HPLC)

Anfang der Reaktion beobachtet, welche am Beispiel der Synthese von Ethylglucosid veranschaulicht werden soll (Abbildung 4.8). Die Löslichkeit der Glucose in Ethanol von

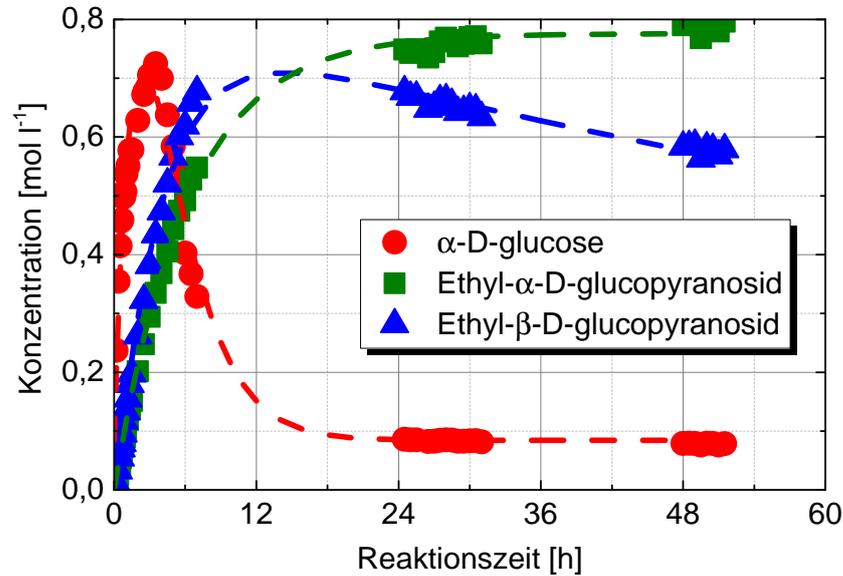


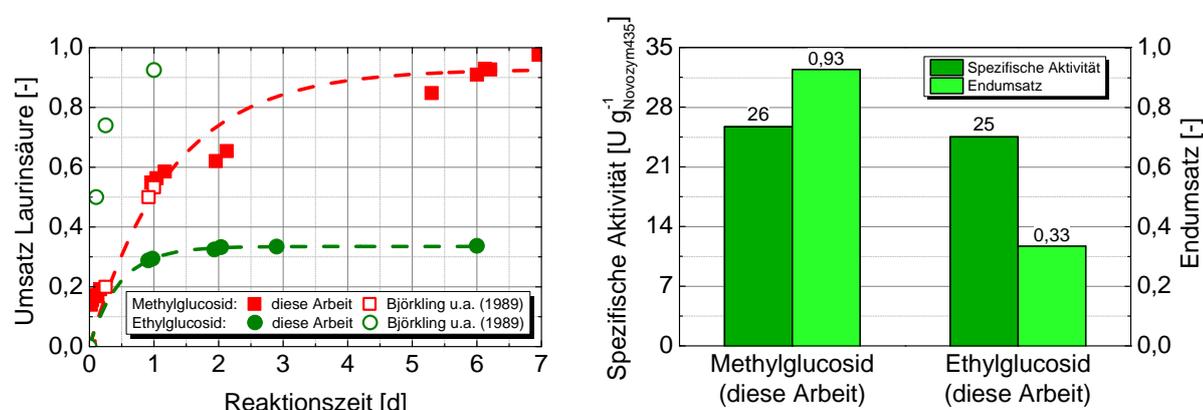
Abbildung 4.8: Alkylierung von Glucose mit Ethanol durch Amberlyst 15 bei 78 °C (75 ml Ethanol, 25 g Glucose, 5 g Amberlyst 15, Bestimmung mittels NP-HPLC)<sup>2</sup>

27 mmol l<sup>-1</sup> (0 h; Anfangswert) ist zunächst gering, bevor Alkylglucosid mit emulgierender Eigenschaft gebildet wird (HLB-Werte in Abbildung 3.3 auf Seite 16). Erst nachdem das Saccharid vollständig gelöst ist, nimmt seine Konzentration durch die Reaktion ab. Die Konzentrationsverläufe entsprechen einer Sequenz von Reaktionen. Zunächst ist die Bildung des  $\beta$ -Glucosids kinetisch begünstigt. Nach etwa 12 h anomerisiert es zunehmend zur  $\alpha$ -Form, welche im Gleichgewicht bevorzugt wird. Die Stoffmengenbilanz ist nicht geschlossen; aus den eingesetzten 1,85 mol l<sup>-1</sup> werden in Summe maximal 1,6 mol l<sup>-1</sup> (5,5 h) und schließlich 1,5 mol l<sup>-1</sup> (48 h) erhalten. Erwartet wurde stattdessen, dass Alkohol verdampft und somit die Gesamtkonzentration ansteigt. Die präparative Aufreinigung für eine anschließende Verwendung in enzymatischen Veresterungen sollte durch Abfiltrieren des Ionenauschers und Kristallisation durch langsame Abkühlung aus einer konzentrierten Lösung geschehen. Nur das synthetisierte Methylglucosid konnte erfolgreich kristallisiert werden; es wurden weiße Kristalle mit einer Reinheit von 90 mol-% erhalten. Synthetisiertes Ethyl-, Propyl- und Butylglucosid bildete trotz Eindampfen,

<sup>2</sup>Sowohl Glucose als auch  $\beta$ -EG wurden als Intermediat und  $\alpha$ -EG als Produkt in sequentieller Reaktion 1. Ordnung gefittet. Dadurch wird der Lösungsvorgang der Glucose während der Reaktion berücksichtigt.

langsamen Abkühlens auf bis zu  $-20^{\circ}\text{C}$  und Ankratzen der Gefäßwand mit einem Spatel auch nach mehreren Tagen keine sichtbaren Kristalle. Mit Ethylglucosid wurde ein Versuch zur Umkristallisierung unternommen: Das vom Ethanol befreite hochviskose, bräunlich-transparente Produkt wurde bei  $60^{\circ}\text{C}$  in Ethylacetat gelöst. Trotz wiederholter Zugabe von Hexan und Eindampfen des Gemisches wurden keine Kristalle gebildet. Trotz wahrscheinlicher Verunreinigungen sollte das synthetisierte Ethylglucosid in einer enzymatischen Veresterung mit Laurinsäure eingesetzt werden, da eine deutlich höhere Reaktivität durch den gegenüber Methylglucosid längeren Alkylrest erwartet wurde (Björkling u. a. (1989)), und Ethylglucosid nicht kommerziell erhältlich ist.

Der Umsatzverlauf der Laurinsäure mit kommerziellem Methylglucosid ähnelt dem in der Literatur veröffentlichten unter ähnlichen Bedingungen (Abbildung 4.9, Björkling u. a. (1989)). Nach 7 Tagen wird nahezu vollständiger Umsatz erreicht. Im Gegensatz da-



(a) Umsatzverläufe (dazu Umsatzpunkte des Saccharids aus Björkling u. a. (1989): 1,5 Equivalente LS,  $70^{\circ}\text{C}$ , 10 mbar, 6 %-wt immob. Lipase aus *Candida antarctica*)

(b) Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und Endumsätze

Abbildung 4.9: Enzymatische Veresterung von Laurinsäure (LS) mit Methyl- (MG) bzw. in dieser Arbeit synthetisiertem Ethylglucosid (EG) (12,5 mmol LS, 12,5 mmol MG bzw. 26 g EG (12,5 mmol), 5 %-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435,  $80^{\circ}\text{C}$ , 50 mbar, 8 ml-Glasreaktor, Fish-Clip-Hängerührer mit 700 rpm, Bestimmung mittels Säuretitation)

zu wurde die Laurinsäure mit dem in dieser Arbeit synthetisierten Ethylglucosid nur zu 33 % umgesetzt, während in der Literatur in kürzerer Zeit ein fast dreimal höherer Umsatz erreicht wird. Dies kann auf große Mengen Verunreinigungen im Ethylglucosid hindeuten. Aufgrund fehlerhaft bestimmter Konzentrationen ist seine Reinheit unbekannt, und ein Ausdruck der Anfangssteigung als Aktivität nicht möglich. Unter der Annahme, dass keine dieser Verunreinigungen die Aktivität des verwendeten Novozym435 beein-

flusst, kann die Reinheit auf maximal etwa 34 % geschätzt werden. Sie kann noch geringer sein, wenn man in Betracht zieht, dass reaktive Nebenprodukte oder Rückstände (mit veresterbaren Hydroxyfunktionen, z. B. Ethanol) aus der Alkylierung vorhanden sein können, und dass jedes Saccharid-Molekül mehrfach verestert werden kann<sup>3</sup>. Die Anfangssteigung ist nicht wie erwartet mehrfach höher als die von Methylglucosid, sondern fast identisch.

### 4.1.3 Polymere Saccharide als Substrate

Als polymeres Substrat ist vor allem Cellulose interessant. Es sollte daher untersucht werden, wie hoch die Reaktivität dieses  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-Polyglycosids im Vergleich zu seinem Monomer Glucose ist<sup>4</sup>. Die Umsetzung von Laurinsäure mit Cellulose verläuft (anfangs) um eine Größenordnung langsamer als die mit Glucose (Abbildung 4.10), die Bildung des Esters noch langsamer.

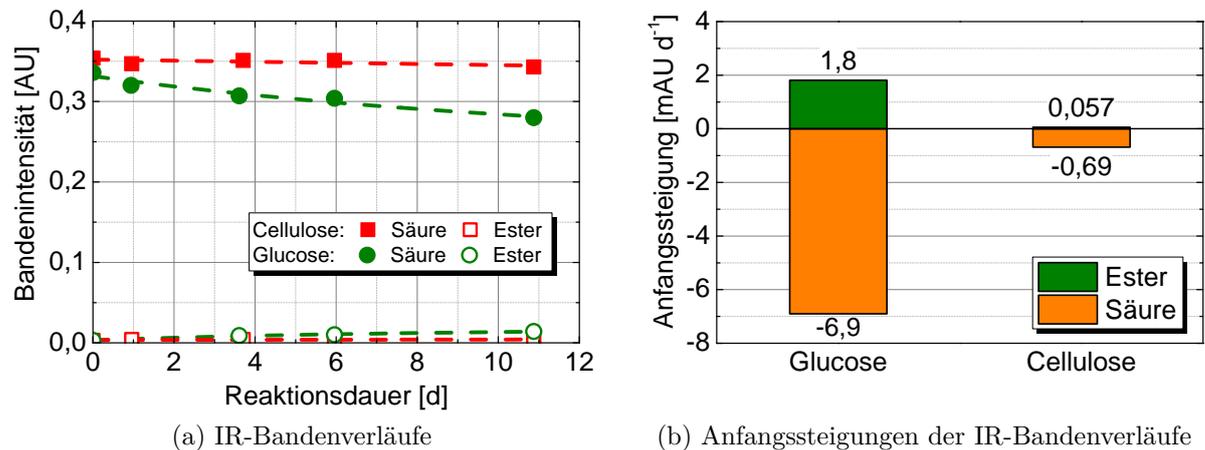


Abbildung 4.10: Veresterung von Glucose bzw. Cellulose mit Laurinsäure in 1,5 ml-Vials (2,0 mmol Laurinsäure, 0,7 mmol Saccharid (Cellulose als AGU), 100 mg Molekularsieve, 5 %-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435, Schüttler mit 1500 rpm, 60 °C, Bestimmung mittels Offline-ATR-FTIR)

Dies kann an dem hohen Grad intra- und intermolekularer Wechselwirkungen des Polysaccharids durch Wasserstoffbrücken liegen. Aufgrund des unpolaren Charakters der Fettsäure kann diese nicht die Wasserstoffbrücken der Cellulose aufbrechen und als Lösungsmittel fungieren. Zudem suggerieren Simulationen<sup>5</sup> eine Substrattasche in CALB,

<sup>3</sup>In Björkling u. a. (1989) wurden bei der Veresterung von Ethylglucosid mit Laurinsäure etwa 5 % Diester nachgewiesen.

<sup>4</sup>Monomer der Cellulose ist das Disaccharid Cellubiose, welche wiederum ein Glucose-Dimer ist.

<sup>5</sup>Eva Nittinger, Zentrum für Bioinformatik, Universität Hamburg

die durch ein Monosaccharid bereits nahezu vollständig gefüllt ist, sodass der Zugang eines makromolekularen Polyols erschwert oder gar unmöglich sein kann. Um den Einfluss der Löslichkeit des Polysaccharids in Fettsäure aber auch des Polymerisierungsgrades zu untersuchen, sollten verschiedene Saccharid-Derivate in Veresterungen mit einer Fettsäure untersucht werden. Dabei wurden die folgenden Aspekte von Löslichkeit und Reaktivität erwogen:

- Saccharide mit Alkylresten am primären C1-Atom oder den sekundären C-Atomen (C2-C4) sind weniger polar und daher besser löslich in unpolaren Fettsäuren (z. B. Methylglucosid).
- Am primären C6-Atom darf kein Alkylrest vorhanden sein, da Etherbindungen nicht enzymatisch umgesetzt werden können<sup>6</sup>, dort aber die regioselektive Veresterung stattfinden soll. Dies trifft z. B. auf die Carboxymethylcellulose zu (die Carboxylfunktionen als funktionelle Gruppen trägt); in der Literatur konnte diese nicht verestert werden (Sereti u. a. (2001)).
- Hydroxyalkylreste erhöhen ebenfalls die Löslichkeit in Fettsäuren. Als Abstandhalter können die Alkylreste möglicherweise intra- und intermolekulare Wechselwirkungen in Cellulose stören sowie den Zugang der funktionellen Gruppe zum aktiven Zentrum des Biokatalysators erleichtern. Sie können an allen Positionen (C1-C6) verestert werden (z. B. Hydroxyethylcellulose).
- Carboxylreste an C1-C6 können die Löslichkeit erhöhen und in Umesterungen umgesetzt werden (z. B. Cellobiose-Octaacetat).

Entsprechend dieser Überlegungen wurden die Saccharide Methylglucosid, Cellubioseoctaacetat, Hydroxypropylcellulose, Hydroxyethylcellulose und Hydroxyethylstärke als Substrat untersucht. Da Laurinsäure einen Schmelzpunkt von 43 °C besitzt, würden Proben bei der Analyse mittels Offline-ATR-FTIR erstarren. Deswegen wurde Ölsäure als Acyldonor eingesetzt, welche bei Raumtemperatur flüssig ist. Es wurde zwar ein Einfluss der Fettsäure bei Veresterungsreaktionen festgestellt (Abschnitt 4.1.1 auf Seite 48), jedoch ist dieser geringer als der des Saccharids. Innerhalb dieser Versuchsreihe sind die Ergebnisse vergleichbar, und Erkenntnisse auf Laurinsäure übertragbar. Die hier gezeigten Versuche wurden in tertiärem Butanol durchgeführt, da sie einer Versuchsreihe entnommen wurden, in der u. a. der Einfluss eines Lösungsmittels untersucht wurde (Abschnitt 4.3.1 auf Seite 76). Hydroxypropyl-Cellulose wies eine so hohe Löslichkeit

<sup>6</sup>Einzig die enzymatische Umetherung von Alkoxysilanen konnte gezeigt werden (Abbate u. a. (2013))

in tertiärem Butanol auf, dass es vollständig gelöst wurde und somit die Viskosität des Gemischs bis zur Erstarrung erhöhte. Daher wurden geringere Mengen Saccharid und Novozym435 in ein größeres Volumen tertiären Butanols gegeben. Wiederum reichte die Anfangssteigung der Verläufe der IR-Banden-Intensitäten als relatives Maß für die Reaktionsgeschwindigkeiten aus. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten dieser Veresterungsversuche sind in in Abbildung 4.11 dargestellt. Die höchste Anfangsreaktionsgeschwin-

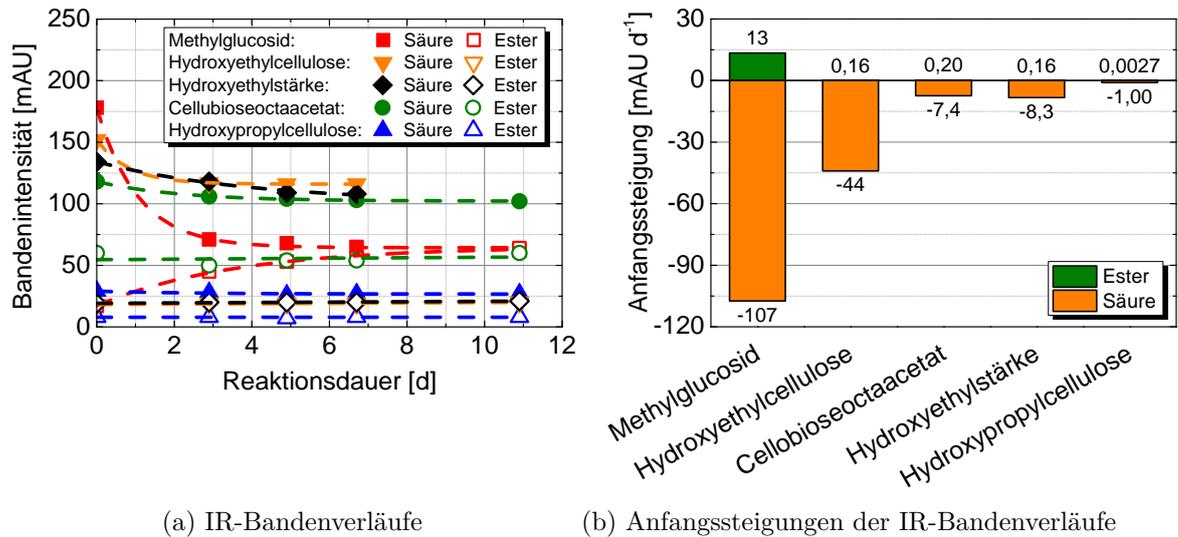


Abbildung 4.11: Veresterung verschiedener Saccharide mit Ölsäure in 5 ml-Vials in tertiärem Butanol (1,5 g Ölsäure, 0,5 g Saccharid (0,1 g Hydroxypropylcellulose), 0,6 g Molsiebe, 1 ml tertiäres Butanol (2 ml bei Hydroxypropylcellulose), 0,1 g Novozym435 (0,02 g bei Hydroxypropylcellulose), 6 rpm in Überkopfmischer, 60 °C, Bestimmung mittels Offline-ATR-FTIR)

digkeit wurde bei Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid beobachtet. Die anfängliche Abnahme der Intensität der Säurebande beim Ansatz mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid ist mindestens 50 % höher als bei den übrigen Substraten. Der Verlauf der Säurebande kann durch Verluste der Säure infolge undichter Gefäßdeckel verfälscht worden sein (verursacht durch anhaftende Saccharid-Partikel an der Dichtung). Der Verlauf der Esterbande gibt verlässlichere Ergebnisse und zeigt noch gravierendere Unterschiede. Außer für Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid konnte kaum die Bildung eines Esters nachgewiesen werden. Aufgrund seines Dampfdrucks, der im betrachteten Temperaturbereich von 45 °C bis 80 °C höher als der von Wasser ist (Abbildung 4.4 auf Seite 51), wurde tertiäres Butanol nur für diese Versuchsreihe als Lösungsmittel eingesetzt, und für keine weiteren Untersuchungen.

#### 4.1.4 Chemische Aktivierung des Polysaccharids

Entgegen der Vorüberlegungen wurde unter den untersuchten Cellulosederivaten keine Reaktivität in der Größenordnung derjenigen von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid gefunden. Daher sollte die Möglichkeit untersucht werden ein vom Enzym akzeptiertes Substrat als Abstandhalter zwischen Polysaccharid und einem hydrophoben Substrat einzubringen. Dafür eignet sich die nach Carl Schotten und Eugen Baumann benannte Alkoholylse eines Säurechlorids in Anwesenheit von Pyridin als Lösungsmittel und Säurefänger (Variante nach Alfred Einhorn), wie sie in Wang u. Hsieh (2004) beschrieben ist. Hierbei soll Cellulose als Alkohol und eine PEG-Disäure als Acyldonor dienen, welche zuvor durch chemische Chlorierung aktiviert werden soll. Das freibleibende Ende der PEG-Disäure kann wiederum enzymatisch mit z. B. einem Fettalkohol (mit niedrigem Dampfdruck) verestert werden (Abbildung 4.12).

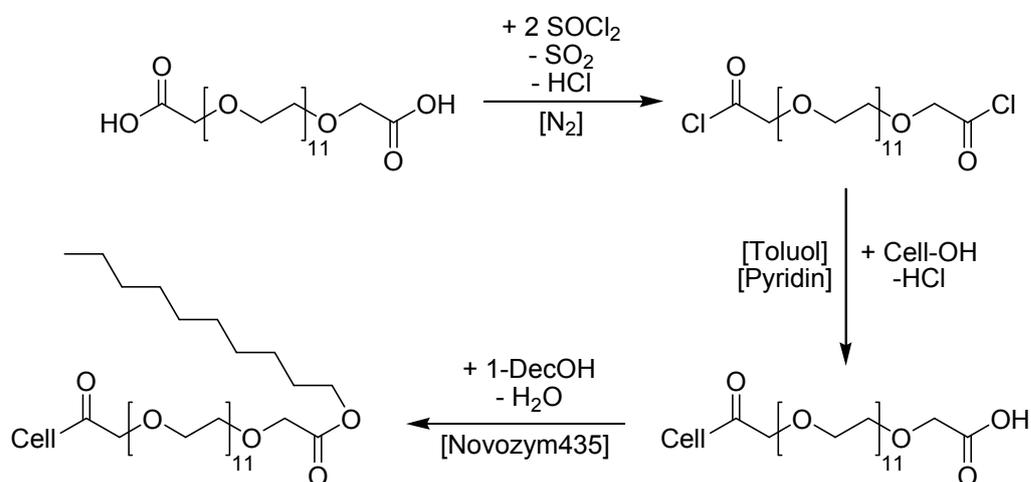


Abbildung 4.12: Chemische Acylierung von Cellulose mit chlorierter PEG600-Disäure und anschließende enzymatische Veresterung der Säurefunktion mit 1-Decanol

Die chemische Chlorierung von PEG600-Disäure erfolgte mittels Thionylchlorid im Überschuss. Das klare, flüssige Produkt war schwach bräunlich/orange gefärbt, und wurde qualitativ mittels ATR-FTIR- sowie NMR-Spektroskopie<sup>7</sup> untersucht (Abbildungen 4.13 auf der nächsten Seite und 4.14 auf Seite 61). Das Infrarot-Spektrum des Substrats PEG600-Disäure weist eine Bande bei  $1750\text{ cm}^{-1}$  mit Schulter (bzw. sich überlappende Mehrfachbande) auf. Die Wellenzahl entspricht nicht der für Carbonsäuren typischen Bande im Bereich  $1725\text{ cm}^{-1} - 1700\text{ cm}^{-1}$  (asymmetrische Valenz- bzw. Streck-

<sup>7</sup>Dr. Young Joo Lee, NMR-Abteilung, Fachbereich Chemie, Universität Hamburg

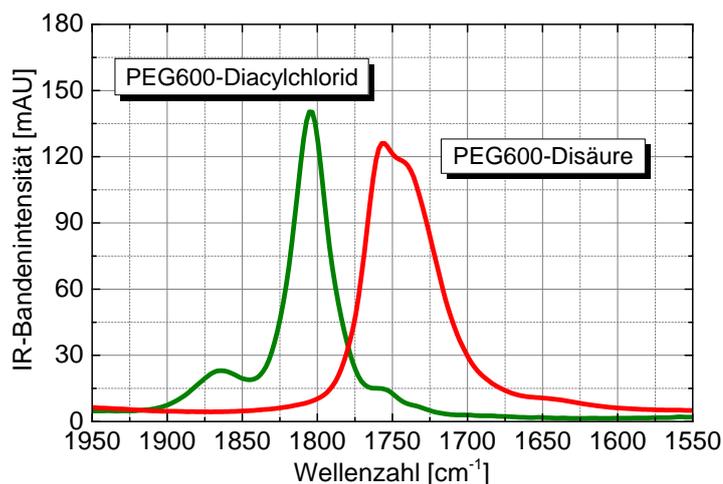
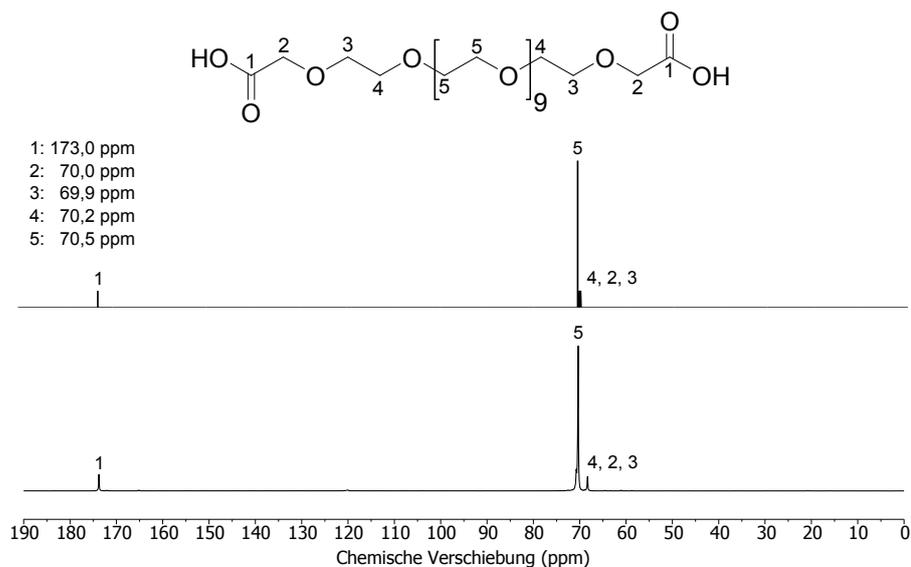


Abbildung 4.13: IR-Spektren zur Strukturanalyse nach der Aktivierung von PEG600-Disäure durch Chlorierung (100 mmol PEG600-Disäure (200 mmol COOH), 400 mmol  $\text{SOCl}_2$  tropfenweise, Stickstoffbegasung, Magnet-rührer mit 250 rpm, Raumtemperatur)

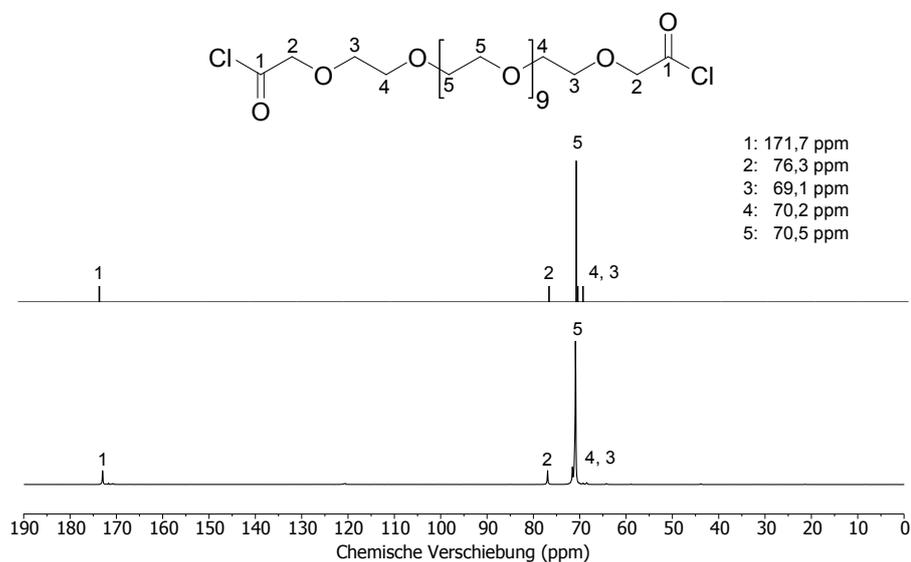
schwingung der C=O-Bindung in Wasserstoffbrücken-assoziierten Dimeren von Carbonsäuren, Hesse u. a. (2005)), stimmt jedoch mit der Dokumentation des Chemikalienhändlers überein. Die Dokumentation zeigt bei dieser Wellenzahl jedoch nur eine Bande, und nicht wie in Abbildung 4.13 eine Überlagerung mehrerer Banden. Möglicherweise wurden neben Dimeren auch Monomere erfasst. Im Infrarot-Spektrum des halogenierten Acyls ist eine für Säurechloride typische Bande im Bereich  $1815\text{ cm}^{-1} - 1790\text{ cm}^{-1}$  (Valenzschwingung der C=O-Bindung in Carbonsäurechloriden) vorhanden. Im Bereich der ursprünglichen Carbonsäure-Bande ist nur eine geringe Absorption messbar. Das bedeutet, dass nahezu alle Carboxylfunktionen chloriert worden sind.

Die gemessenen NMR-Spektren von PEG600-Disäure und -Diacylchlorid stimmen qualitativ mit mittels der Software *ChemDraw Ultra* vorhergesagten Spektren überein. Insbesondere die chemische Verschiebung des zweiten C-Atoms ab der Carbonylgruppe verändert sich von 70,0 ppm nach 76,3 ppm und beweist die erfolgreiche Überführung der Carboxylfunktion in ein aktives Acylchlorid (Signal 2 in Abbildung 4.14a und 4.14b auf der nächsten Seite).

Das aktivierte PEG600-Diacylchlorid wurde mit Cellulose verestert, um den Abstandshalter mit endständiger Säurefunktion in das Polysaccharid einzubringen. Das daraus erhaltene Produkt wies eine orange-bräunliche Färbung bei gummiartiger Konsistenz auf. Es wurde qualitativ mittels ATR-FTIR- sowie NMR-Spektroskopie untersucht (Abbildungen 4.15 auf Seite 62 und 4.16 auf Seite 63). Im Infrarotspektrum des Produkts ist



(a) PEG600-Disäure (oben: Simulation; unten: Messung)



(b) PEG600-Diacylchlorid (oben: Simulation; unten: Messung)

Abbildung 4.14:  $^{13}\text{C}$ -HR-MAS-NMR-Spektren zur Strukturanalyse nach der Aktivierung von PEG600-Disäure durch Chlorierung (100 mmol PEG600-Disäure (200 mmol  $\text{COOH}$ ), 400 mmol  $\text{SOCl}_2$  tropfenweise, Stickstoffbegasung, Magnetprüher mit 250 rpm, Raumtemperatur)

die aus der PEG600-Disäure stammende Bande bei  $1750\text{ cm}^{-1}$  vorhanden, was darauf hindeutet, dass die Acylhalogenid-Funktionen des PEG-Derivats im Laufe der Veresterung mit Cellulose und der anschließenden Aufreinigung wieder in Carboxylfunktionen überführt wurden (Abbildung 4.15 auf der nächsten Seite). Es kann nicht eindeutig überprüft werden, ob eine Veresterung stattgefunden hat, da im Bereich der für Carbonsäure-Ester

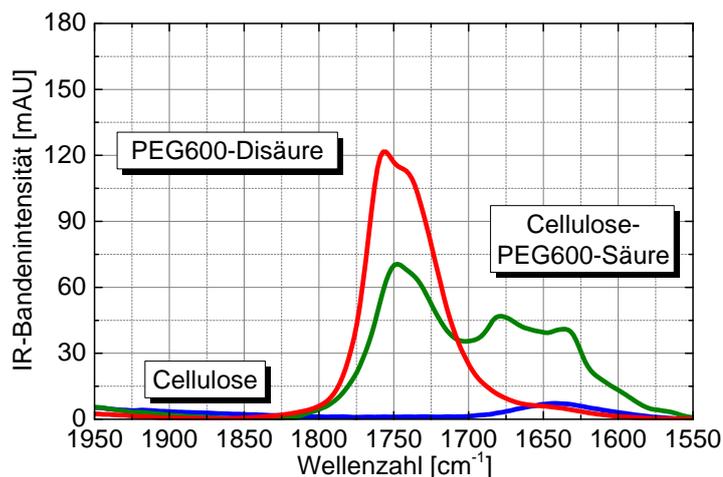


Abbildung 4.15: IR-Spektren zur Strukturanalyse nach der chemischen Veresterung von Cellulose mit PEG600-Diacetylchlorid (20 mmol PEG600-Diacetylchlorid (40 mmol  $\text{COCl}_2$ ), 200 mg Cellulose Avicel PH-101 (3,7 mmol OH), 100 ml Toluol, 74,3 mmol Pyridin tropfenweise, Stickstoffbegasung, Magnetrührer mit 250 rpm)

typischen Banden ( $1750\text{ cm}^{-1}$  –  $1735\text{ cm}^{-1}$ ) auch im Substrat PEG600-Disäure eine hohe Absorption vorhanden ist. Im Bereich  $1700\text{ cm}^{-1}$  –  $1600\text{ cm}^{-1}$  fand eine Zunahme mehrerer Banden statt. Diese könnten durch (protonierte oder deprotonierte) Carbonsäuren hervorgerufen werden, nicht jedoch durch einen Carbonsäure-Ester. Die Abnahme der Bande der OH-Valenzschwingung bei  $3000\text{ cm}^{-1}$  –  $3600\text{ cm}^{-1}$  bedeutet eine Verringerung der Anzahl an Wasserstoffbrücken-Bindungen, was auf eine erfolgreiche Veresterung der Hydroxyfunktion des Polyols Cellulose hindeutet.

Das gemessene NMR-Spektrum zeigt einzig ein durch die C-Atome in der wiederholten Ethylenglycol-Einheit der PEG600-Säure verursachtes Signal (Signal 1 in Abbildung 4.16b auf der nächsten Seite). Es sind keine Signale vorhanden, die auf eine Cellulosestruktur (Abbildung 4.16a auf der nächsten Seite) oder auf eine Carboxyl-Funktion hinweisen (Signal 1 in Abbildung 4.14a auf der vorherigen Seite). Bei der Probenaufbereitung wurde jedoch nur klarer Überstand entfernt. Das bedeutet, dass die NMR-Messungen den Cellulose-Anteil der Probe aufgrund geringer Löslichkeit nicht erfasst hat.

Dennoch wurde der Versuch unternommen, die synthetisierte Cellulose-PEG600-Säure enzymatisch mit 1-Decanol zu verestern. Aufgrund seines im betrachteten Temperaturbereich unter dem Dampfdruck von Wasser liegenden Dampfdrucks (Abbildung 4.4 auf Seite 51) ist 1-Decanol für Veresterungen bei reduzierten Druck geeignet. Die Abbildun-

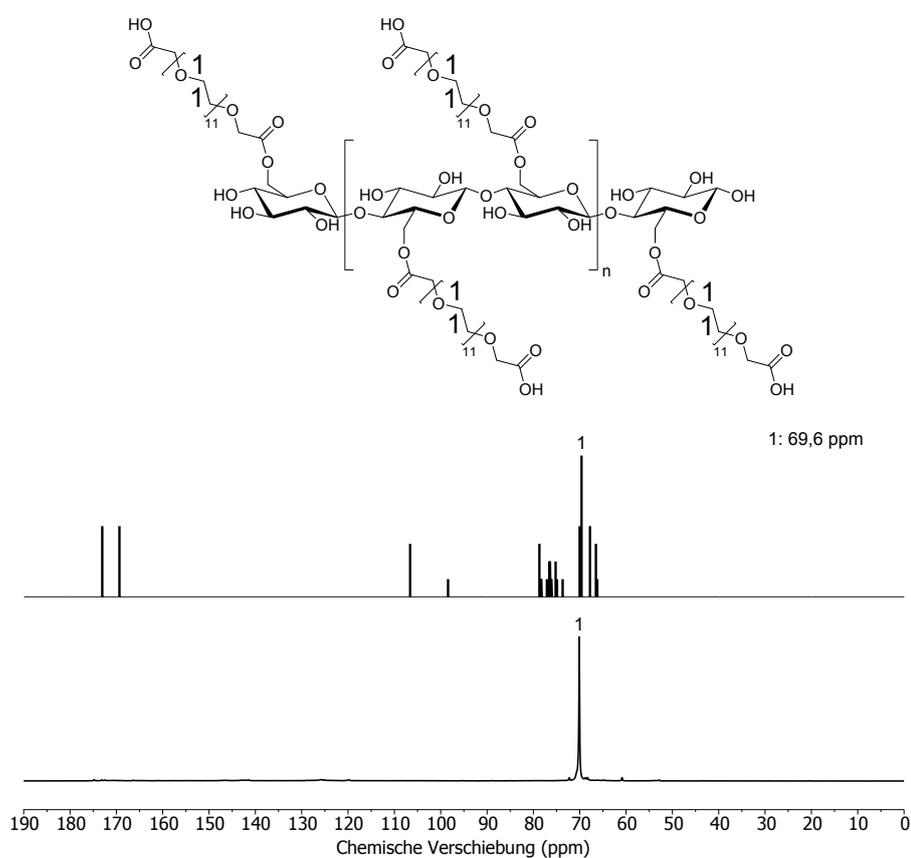
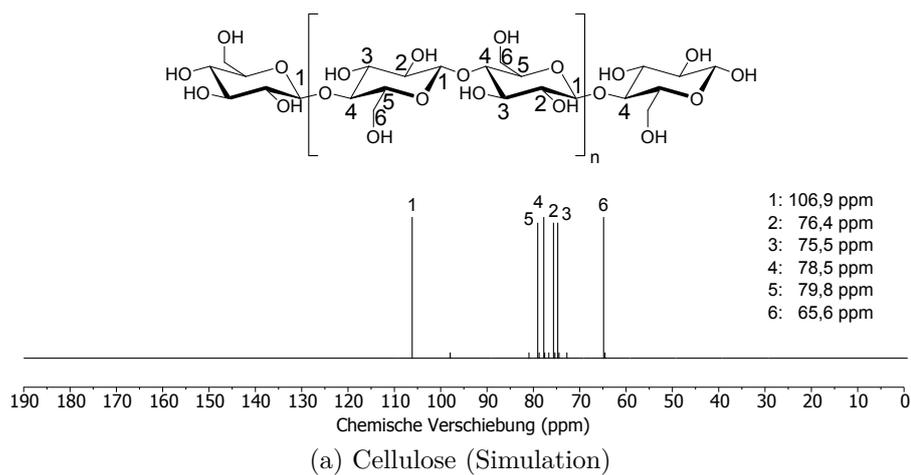


Abbildung 4.16:  $^{13}\text{C}$ -HR-MAS-NMR-Spektren zur Strukturanalyse nach der chemischen Veresterung von Cellulose mit PEG600-Diacetylchlorid (20 mmol PEG600-Diacetylchlorid (40 mmol  $\text{COCl}_2$ ), 200 mg Cellulose Avicel PH-101 (3,7 mmol OH), 100 ml Toluol, 74,3 mmol Pyridin tropfenweise, Stickstoffbegasung, Magnetruher mit 250 rpm)

gen 4.17 und 4.18 auf der nächsten Seite zeigen die Ergebnisse ATR-FTIR- sowie NMR-spektroskopischen Messungen. Über eine Reaktionsdauer von fast 4 Tagen ist im IR-

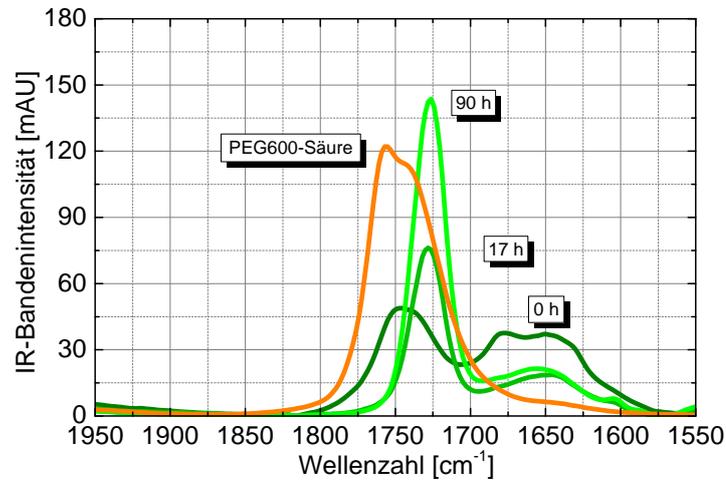


Abbildung 4.17: IR-Spektren der Proben aus der enzymatischen Veresterung von Cellulose-PEG600-Säure mit 1-Decanol (800 mg Cellulose-PEG600-Säure, 42 mmol 1-Decanol, 5,4 %<sub>wt</sub> Substrate Novozym435, 80 °C, 200 mbar, 700 rpm)

Spektrum eine Zunahme der Bande bei  $1725\text{ cm}^{-1}$  (Valenzschwingung der C=O-Bindung in Carbonsäuren) zu beobachten (Abbildung 4.17). Dies deutet nicht auf die Bildung eines Esters hin, sondern auf die Zunahme der Carbonsäure-Konzentration. Allerdings stimmt die Lage dieser Bande nicht mit der Lage der Bande der C=O-Valenzschwingung der PEG600-Disäure überein ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ), und das Reaktionsmedium kann aufgrund der Reaktionsbedingungen keine nennenswerten Mengen Wasser enthalten, sodass hier nicht von einer Hydrolyse des Esters aus Cellulose und PEG600-Disäure ausgegangen werden kann. Es kommt zu keiner weiteren Zunahme der Carbonyl-Bande bei  $1750\text{ cm}^{-1}$  –  $1735\text{ cm}^{-1}$ , was die Bildung weiterer Esterbindungen belegen würde, sondern zu deren Abnahme.

Im NMR-Spektrum sind vor allem Signale der C-Atome in der Ethylenglycol-Einheit (Signal 1 in Abbildung 4.18 auf der nächsten Seite) sowie des kovalent verknüpften Decyl-Restes (Signale 2 und 3 in Abbildung 4.18 auf der nächsten Seite) sichtbar, welche sich von den Signalen reinen 1-Decanols unterscheiden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass das aufgereinigte Produkt Restmengen von Decanol enthält. Wie bei dem Ester aus Cellulose und PEG600-Disäure gibt es keinen Hinweis auf C-Atome aus der Cellulose-Struktur.

Es wurde eine deutlich höhere Produktmasse erhalten, als bei vollständigem Umsatz

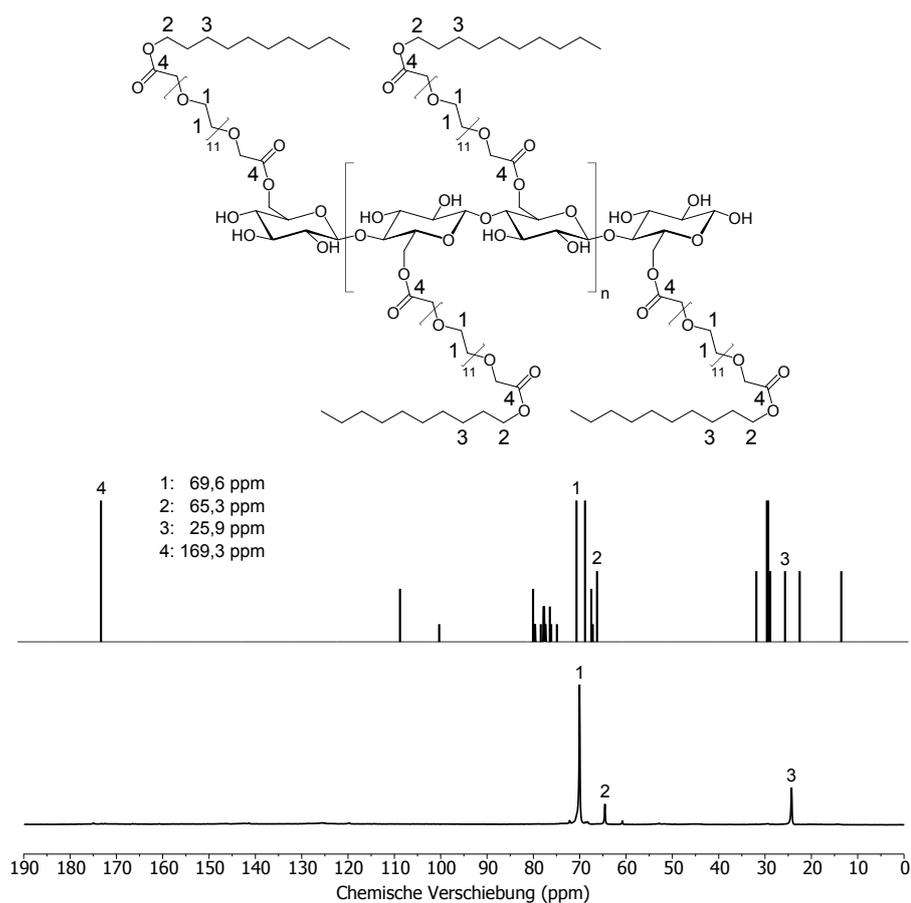


Abbildung 4.18:  $^{13}\text{C}$ -HR-MAS-NMR-Spektren zur Strukturanalyse nach der enzymatischen Veresterung von Cellulose-PEG600-Säure mit 1-Decanol (oben: Simulation; unten: Messung) (800 mg Cellulose-PEG600-Säure, 42 mmol 1-Decanol, 5,4 %-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435, 80 °C, 200 mbar, 700 rpm)

der Hydroxygruppen der Cellulose mit jeweils nur einem PEG600-Disäuremolekül und einem Decanolmolekül zu erwarten war. Insbesondere in Hinblick auf die mögliche inter- und intramolekulare Veresterung der Cellulose durch PEG600-Disäure deutet dies auf große Mengen an Verunreinigungen (z. B. Einschlüsse von Decanol) hin.

#### 4.1.5 Zusammenfassung

- ⇒ Durch Alkylierung derivatisierte Monosaccharide zeigen eine deutlich höhere Aktivität in Veresterungen mit Laurinsäure als native Glucose.
- ⇒ In der Synthese von Alkylglucosiden konnte kein Glucosid mit einem Alkylrest der Länge C2 oder größer durch Kristallisation aufgereinigt werden.

- ⇒ Ethylglucosid mit niedriger Reinheit konnte enzymatisch verestert werden, jedoch wurde im Vergleich mit Methylglucosid weder eine größere Aktivität noch ein ähnlich hoher Endumsatz (insbesondere kein vollständiger Endumsatz) erreicht.
- ⇒ Weder native Cellulose oder einfache Derivate (HEC, HPC) und Analoga (HES) noch das Disaccharid Cellobiosid-Octaacetat konnten enzymatisch verestert werden.
- ⇒ Das Einbringen eines Abstandshalters zwischen Cellulose und einem hydrophoben Substrat ist mit vorheriger chemischer Chlorierung (Säurechlorid) möglich. Während der anschließenden enzymatischen Veresterung wurden Veränderungen im IR- und NMR-Spektrum gefunden, die jedoch nicht eindeutig die Bildung des gewünschten Esters belegen.

## 4.2 Enzyme und Enzympräparate

Zur Reaktionsbeschleunigung wird ein Biokatalysator benötigt. Er muss in der Lage sein, die Zielsubstrate umzusetzen, und muss unter den gewählten Bedingungen (Temperatur, Druck, Substratkonzentration, Lösungsmittelkonzentration) aktiv und stabil sein. Da Fettsäuren und Saccharide als Substrate dienen, muss es sich bei dem Biokatalysator um eine Lipase handeln. Als immobilisiertes Präparat besteht die Möglichkeit sie im Downstreaming abzutrennen und wiederholt einzusetzen.

### 4.2.1 Katalysator für Monosaccharid-Veresterungen

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die immobilisierte Lipase Novozym435 Saccharide mit Fettsäuren umsetzen kann (Ljunger u. a. (1994), Degn u. a. (1999), Yan u. a. (1999)). Jedoch wird Glucose etwa eine Größenordnung langsamer umgesetzt als Alkylglucoside wie etwa Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, was durch eine höhere Löslichkeit des Derivats aufgrund geringerer Polarität des Moleküls begründet sein kann (Björkling u. a. (1989); Müller (2012)). Aus diesem Grund wurde Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid als Modellsubstrat festgelegt.

Es wurden unterschiedliche Präparationen verschiedener Hersteller von immobilisierter CALB auf ihre Fähigkeit getestet, Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Laurinsäure zu verestern. Hierbei wurde die Fettsäure im Überschuss zugegeben, um eine fließfähige und mischbare Konsistenz des Reaktionsgemisches bei der Reaktionstemperatur zu

erhalten. Abbildung 4.19 zeigt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Veresterungen. Novozym435 (Charge LC200230) weist die höchste spezifische Aktivität bei der

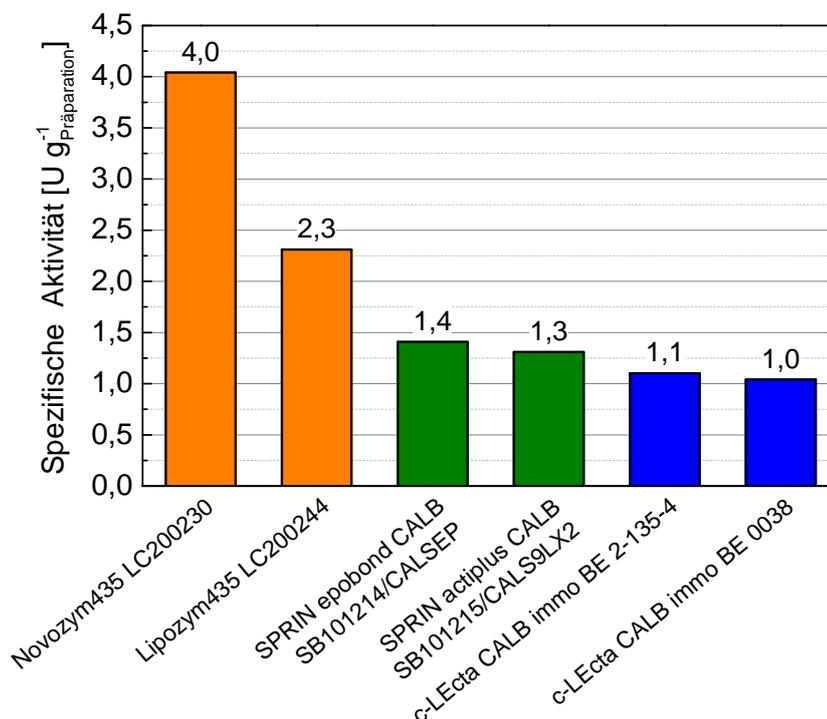


Abbildung 4.19: Spezifische Aktivitäten verschiedener Lipase-Präparate für die Veresterung von Laurinsäure mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (30 mmol LS, 15 mmol MG, 5 %-wt Lipase-Präparat, 60 °C, 10 mbar, 8 ml-Glasreaktor, Magnetrührer mit 500 rpm, Bestimmung mittels Säuretitration)

Umsetzung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Laurinsäure auf. Auch in Gumel u. a. (2011) stellte sich Novozym435 als effektivstes Lipase-Präparat heraus. Im Vergleich zur Veresterung von Laurinsäure mit 1-Propanol ist die Veresterung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mehr als 1000 x langsamer<sup>8</sup>.

<sup>8</sup>Im Spezifikations-Datenblatt des Chemikalien-Händlers *Sigma Aldrich* wird eine spezifische Aktivität von *mindestens* 5000 PLU g<sup>-1</sup> angegeben (ohne Angabe der Assay-Bedingungen), insofern können Chargen-bedingte Schwankungen der Aktivität nicht ausgeschlossen werden. Ein eigener PLU-Assay ergab (für Novozym435 Mat.-Nr. 07000987/Charge 16123880) eine spezifische Aktivität von etwa 17400 PLU g<sup>-1</sup> (Abschnitt B.2 auf Seite 141).

## 4.2.2 Enzym-Charakterisierung für Lösungsmittel-freie Monosaccharid-Veresterungen<sup>9</sup>

Um die Einsatzbedingungen von Novozym435 in Veresterungen von Monosacchariden einzugrenzen, wurden Versuche mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid und Laurinsäure durchgeführt. Die verwendeten Substrate sind nur begrenzt ineinander löslich, was auf ihre gegensätzliche Polarität zurückzuführen ist (Abbildung 3.9 auf Seite 27), und der Schmelzpunkt von Laurinsäure liegt mit 44 °C oberhalb der Raumtemperatur. Dies stellt eine Herausforderung für die Analytik bei der Probenahme aufgrund eventueller Entmischung im mehrphasigen System und teilweiser Erstarrung der Probe in der Pipette dar. Daher soll Online-Infrarot-Spektroskopie als Alternative zur Säure-Titration zur Bestimmung von Konzentrations- bzw. Umsatzverläufen zum Einsatz kommen, um im Anfangsbereich der Umsatzkurven mit wenig Aufwand mehr Datenpunkte mit möglichst geringer Streuung zu erhalten.

Da in Vorversuchen mit einer bestimmten Charge (interne Kennzeichnung »ISO1«) mit weißen Partikeln kein Umsatz von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid festgestellt wurde, jedoch eine Charge mit bräunlichen Partikeln Aktivität aufwies, wurde in Betracht gezogen, dass nicht nur das auf der Oberfläche immobilisierte Enzym, sondern auch der Träger selbst oder Produktionsrückstände in ihm eine katalytische Wirkung besitzen.

Um den Beitrag des Enzymträgers zur katalytischen Aktivität beurteilen zu können, wurde eine Protein-Desorptions-Prozedur<sup>10</sup> angewendet. Die verbleibende Aktivität sollte mit der des nativen Präparats sowie mit der des verbreiteten sauren Ionenauschers *Amberlyst 15* verglichen werden. Er gilt als einer der aktivsten sauren heterogenen Katalysatoren (Fernandes u. a. (2012)) und ist für seine Fähigkeit bekannt, Ver- und Umesterungen von Fettsäure(ester)n mit n-Alkoholen zu katalysieren (Pappu, Venkata K S u. a. (2011)) Zudem weist er eine hohe Stabilität bzw. Standzeit auf und kann wiederholt eingesetzt werden (Götz (2013); Fernandes u. a. (2012)). Abbildung 4.20 auf der nächsten Seite zeigt die anhand der jeweiligen Anfangssteigung ermittelten spezifischen Aktivitäten. Das mit der Protein-Desorptions-Prozedur behandelte Novozym435 besitzt keine nachweisbare Aktivität mehr. Diese Beobachtung stimmt mit Hollmann u. a. (2009) überein. Die alleinige Denaturierung des Proteins kann ausgeschlossen werden, da bekannt ist, dass CALB in reinem Acetonitril aktiv bleibt (Martinelle u. Hult (1995)).

---

<sup>9</sup>Die Charakterisierung von Novozym435 als Katalysator für die Veresterung von Alkylglucosiden mit Laurinsäure wurde von Sabrina Förster im Rahmen einer Bachelor-Arbeit untersucht (Förster (2012)).

<sup>10</sup>Inkubation in 50 %-vol wässriger Acetonitrillösung bei 70 °C (Abschnitt B.2 auf Seite 142)

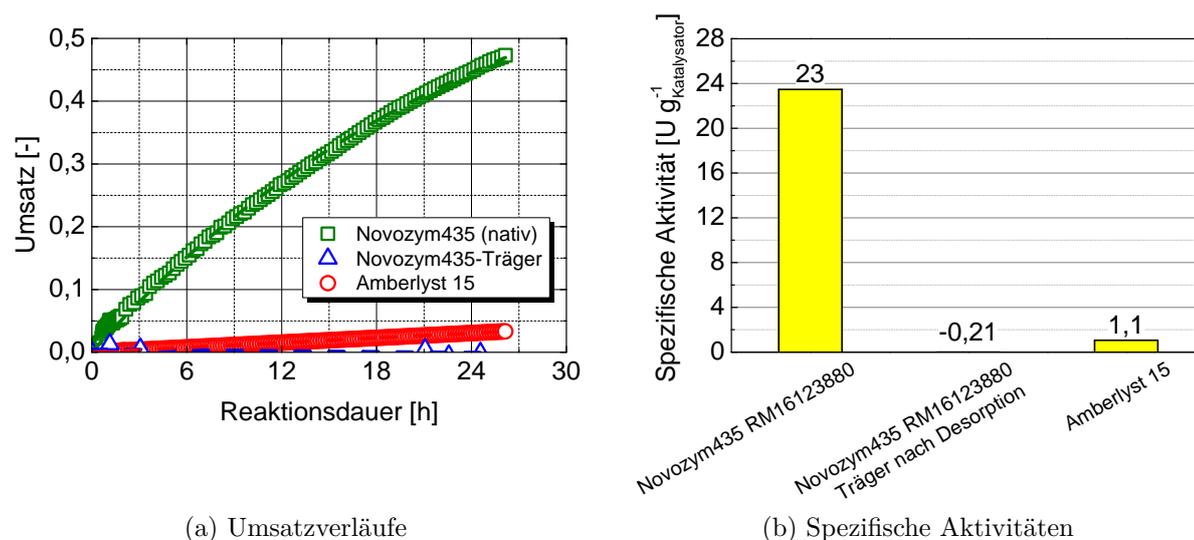


Abbildung 4.20: Vergleich der katalytischen Aktivitäten von Novozym435, durch Leaching von Enzym befreitem Novozym435 und Amberlyst 15 (equimolare Ansätze aus Laurinsäure und Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, 5% $_{\text{wt}_{\text{Substrate}}}$  Katalysator, 80 °C, 50 mbar, 50 ml-Glasreaktor, Fish-Clip-Hängerührer mit 500 rpm, Bestimmung mittels Online-ATR-FTIR mit Chemometrie)

Bemerkenswert ist, dass gar keine Restaktivität vorhanden ist, denn binäre Mischungen aus Wasser und Acetonitril (oder Wasser und Methanol) sind dafür bekannt, Proteine nur unvollständig vom Träger waschen zu können (Petry u. a. (2006)). Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten von Novozym435 und Amberlyst 15 von 30 liegt in der gleichen Größenordnung wie das bei der Synthese von Biodiesel aus Palmöl und Methanol gefundene (50-fach in Talukder u. a. (2009)).

Als minimale Temperatur, bei der ein äquimolarer Ansatz von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid und Laurinsäure mit 5 % Novozym435 noch fließfähig und vollständig durchmischbar ist, wurde in Vorversuchen 80 °C ermittelt. Grundsätzlich sollte daher bei höheren Temperaturen gearbeitet werden, als etwa für einen typischen Propyllaurat-Assay (60 °C) oder bisherigen Veresterung von Fettsäuren mit Alkylglucosiden (70 °C, Björkling u. a. (1989); Müller (2012)) angewandt wurden, um auf Lösungsmittel oder Überschuss der Fettsäure mit Zudosierung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid während der Reaktion verzichten zu können. Es ist bekannt, dass Novozym435 über einen großen Temperaturbereich eine hohe Stabilität aufweist und bei Temperaturen zwischen 60 °C und 80 °C sehr aktiv ist (Arroyo u. Sinisterra (1994)).

Zur Eingrenzung des Temperaturfensters wurden Versuche zur Synthese von Alkylglu-

cosidalkanoaten unter Variation der Temperatur durchgeführt. Um den Umsatzverlauf insbesondere am Anfang der Reaktion mit vielen Datenpunkten verfolgen zu können, wurde Infrarot-Spektroskopie in Kombination mit einem dafür erstellten chemometrischen Modell eingesetzt. Aus den Anfangssteigungen der Umsatzplots wurde die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur ermittelt (Abbildung 4.21). Im untersuchten Bereich ist eine Aktivierung mit steigender Temperatur zu erkennen.

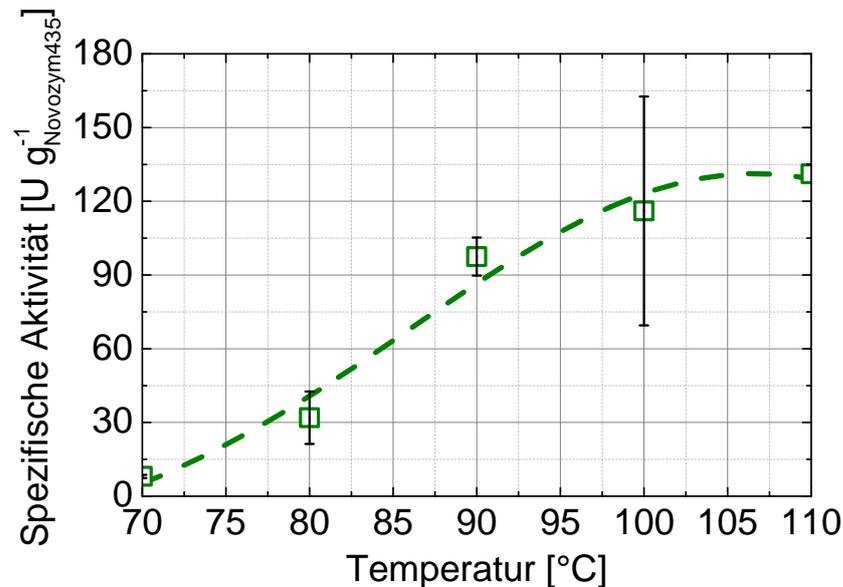


Abbildung 4.21: Spezifische Aktivität von Novozym435 im untersuchten Temperaturbereich (äquimolare Ansätze aus Laurinsäure und Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, 5 %-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435, 50 ml-Glasreaktor, Fish-Clip-Hängerührer mit 500 rpm, 50 mbar, Bestimmung mittels Online-ATR-FTIR mit Chemometrie; Fit mit Gauss-Funktion als visuelle Hilfe)

Die für eine Temperatur von 70 °C bestimmte Aktivität entspricht den Ergebnissen von Müller (2012). Die Aktivität folgt bei Temperaturen bis 90 °C der RTG-Regel<sup>11</sup> (Verdreifachung je 10 K Temperaturerhöhung), auf der der Ansatz von Arrhenius beruht (Arrhenius (1889)). Oberhalb von 90 °C nimmt die Aktivierung aufgrund einer dominierenden überlagerten Denaturierung des Proteins (Deaktivierung des Enzyms) ab.

Eine genauere Untersuchung der gegensätzlichen Effekte von Aktivierung und Denaturierung erlaubt eine Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Umsatzes (Abbildung 4.22 auf der nächsten Seite). Im Temperaturbereich von 70 °C bis 100 °C ist eine Aktivierung mit zunehmender Temperatur zu erkennen, welche sich durch eine zu-

<sup>11</sup>Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel: etwa Verdoppelung bis Vervierfachung der Reaktionsgeschwindigkeit je 10 K Temperaturerhöhung (nach Jacobus Henricus van't Hoff, Arrhenius (1889))

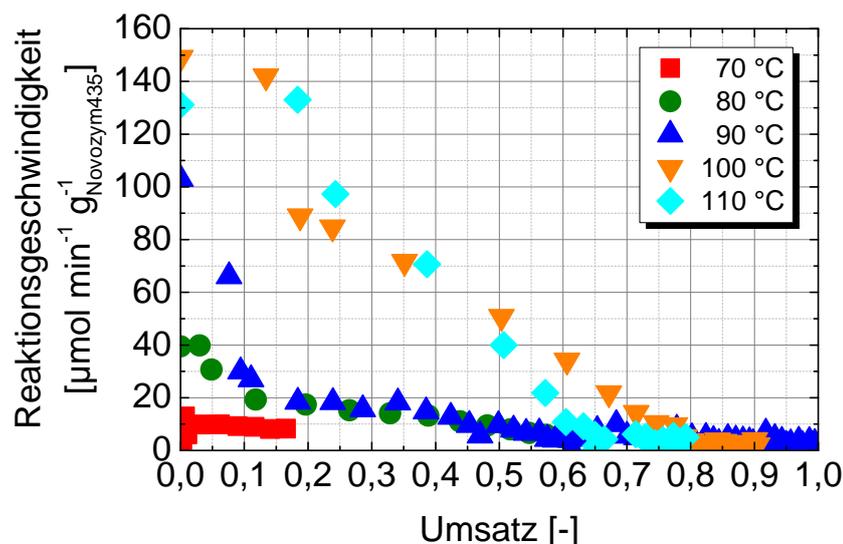


Abbildung 4.22: Reaktionsgeschwindigkeit der Veresterung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Laurinsäure als Funktion des Umsatzes für verschiedene Temperaturen (äquimolare Ansätze, 5%-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435, 50 ml-Glasreaktor, 50 mbar, Fish-Clip-Hängerührer mit 500 rpm, Bestimmung mittels Online-ATR-FTIR mit Chemometrie)

nehmende Anfangsreaktionsgeschwindigkeit äußert. Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit bei 110 °C weicht von diesem Trend ab. Die Denaturierung des Biokatalysators zeigt sich durch steilen Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmendem Umsatz und Überschneiden der Verläufe, zumindest bei 100 °C und 110 °C. Insbesondere an den Endpunkten der Messreihen für die Temperaturen von 90 °C bis 110 °C wird deutlich, dass mit der hier eingesetzten Enzymmenge oberhalb von 90 °C kein vollständiger Umsatz mehr erreicht werden kann. Doch die Reaktion schreitet bei diesen Temperaturen in der Nähe des Endumsatzes mit einer sehr geringen scheinbar konstanten Geschwindigkeit fort. In Abbildung 4.23 auf der nächsten Seite sind die erreichten Endumsätze zusammen mit der dafür benötigten Reaktionsdauer dargestellt. Für Temperaturen von maximal 90 °C wird der gleiche, nahezu vollständige Endumsatz erreicht, daher wird auch für Temperaturen niedriger als die hier untersuchten angenommen, dass keine Denaturierung stattfindet und vollständiger Endumsatz erreicht wird. Aus diesem Grund wurde zur Zeitersparnis darauf verzichtet, die Veresterungen bei 70 °C bis zum Endumsatz durchzuführen, denn selbst bei 80 °C dauert dies etwa eine Woche. Durch die temperaturbedingte Aktivierung des Katalysators nimmt die für das Erreichen des Endumsatzes nötige Zeit mit steigender Temperatur ab. Um auszuschließen, dass in folgenden Versuchen fehlerhafte Messungen durch vernachlässigte Denaturierung durchgeführt werden, wurde 80 °C als

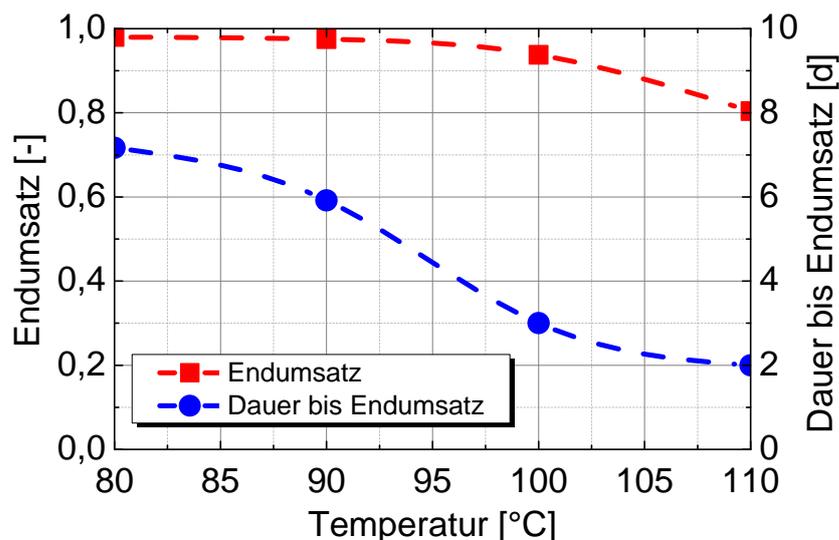


Abbildung 4.23: Endumsätze und dafür benötigte Reaktionszeiten bei der Veresterung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Laurinsäure im untersuchten Temperaturbereich (äquimolare Ansätze, 5 %-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435, 50 mbar, 50 ml-Glasreaktor, Fish-Clip-Hängerührer mit 500 rpm, Bestimmung mittels Säuretitation; Bezier-Kurve als visuelle Hilfe)

Reaktionstemperatur festgelegt. Dies ist gleichzeitig die minimale bei Voruntersuchungen gefundene Temperatur, bei der äquimolare Ansätze von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid und Laurinsäure mit 5 % Novozym435 noch fließfähig und quasihomogen durchmischbar sind.

### 4.2.3 Katalysator für Polysaccharid-Veresterungen

In der Fachliteratur wird vor allem von chemischen Veresterungen von Cellulose berichtet (Cheng u. Gu (2012)), häufig unter Verwendung von Säurechloriden als aktivierte Substrate (Kwatra u. a. (1992); Malm u. a. (1951)). Zu den wichtigsten Ansätzen zur regioselektiven Acylierung von Cellulose werden die direkte Veresterung mit aktivierten Acylgruppen (Chloride, Anhydride), die Aktivierung des Saccharides in Form von Cellulose-Trifluoracetat und noch einige weitere gezählt (Fox u. a. (2011)), nicht jedoch enzymatische Veresterungen. Es sind Beispiele für Enzym-katalysierte Acylierungen von Cellulose bekannt, jedoch unter Verwendung aktiver Acylkomponenten, allen voran Vinylderivate von Fettsäuren (Xie u. Hsieh (2001); Cheng u. Gu (2012)). Selbst molekularbiologisch veränderte Cutinase<sup>12</sup> konnte in 72 h bei 30 °C nur gut 3 % der Hydroxyfunktionen

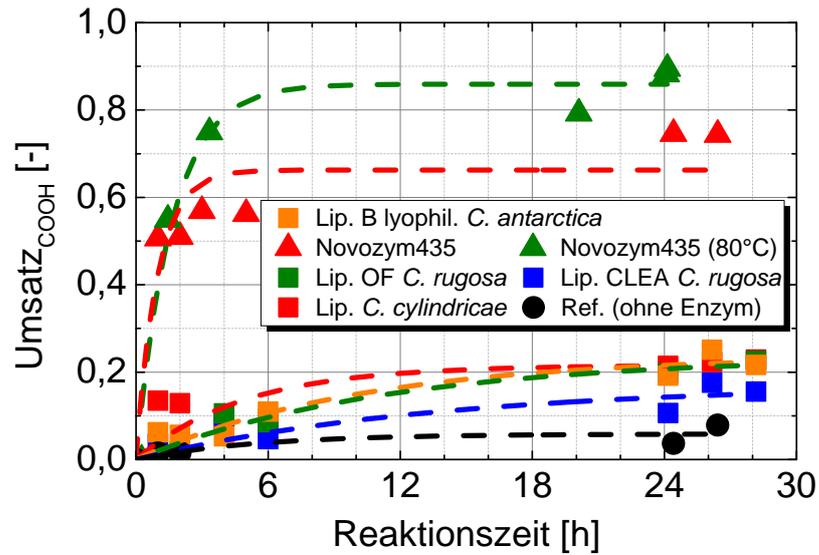
<sup>12</sup>Cutinase (EC 3.1.1.74) ist eine Hydrolase, die Cutin als komplexes Polyester-Biopolymer aus Epoxy- und Hydroxyfettsäuren in den strukturgebenden Komponenten von Pflanzen hydrolysieren kann.

in nativer Cellulose mit Fettsäuren verestern (Matamá u. a. (2013)). Werden aktivierte Fettsäuren in Form von Vinylestern in pH-gepufferten wässrigen Medien verwendet, können durch Lipasen bis zu 16 %-wt Acetyl in Cellulose eingebracht werden. Bei vollständiger Veresterung (Substitutionsgrad DS = 3,0 bezogen auf ein Glucosemonomer) wäre der Massenanteil über 44 Gew.-%. Dieses Ergebnis konnte durch Vorbehandlung der Cellulose geringfügig und durch Einsatz einer Mischung aus den organischen Lösungsmitteln Dimethylsulfoxid und Paraformaldehyd entscheidend verbessert werden (Yang u. Wang (2003)).

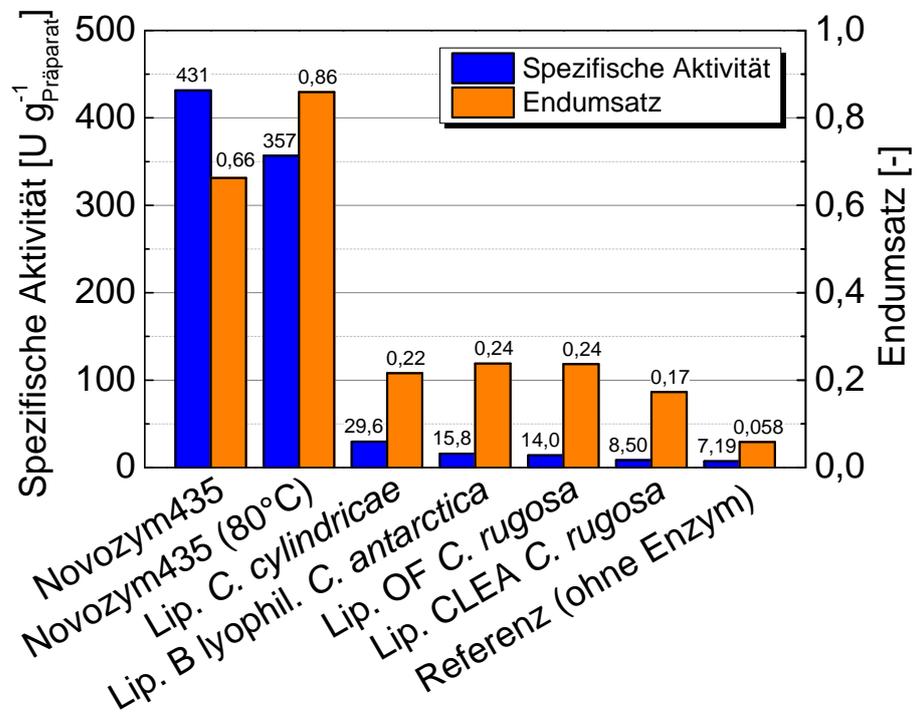
In dieser Untersuchung wird vom Einsatz aktivierter Ester als Substrate abgesehen. Da festgestellt wurde, dass eine Derivatisierung von Cellulose zur Steigerung der Löslichkeit nicht zielführend ist (Abschnitt 4.1.3 auf Seite 56), sollte als neuer Ansatz eine chemisch eingebrachte PEG-Disäure als Abstandshalter wie in Wang u. Hsieh (2004) zwischen dem Cellulose-Makromolekül und einer Acylkomponente ermöglichen, dass die zu veresternden funktionellen Gruppen in das aktive Zentrum des verwendeten Enzyms gelangen und dort umgesetzt werden. Es handelt sich hierbei um eine typische Lipasekatalysierte Reaktion, sodass sich Lipasen als Biokatalysator für die Modifizierung von Cellulose anbieten. Es wurde bereits gezeigt, dass die chemische Derivatisierung von Cellulose mittels PEG600-Diacylchlorid als Abstandshalter möglich ist (Abschnitt 4.1.4 auf Seite 59).

1-Decanol zeichnet sich durch einen hydrophoben Charakter (Verteilungskoeffizient  $\log K_{OW}$  von 4,57 (Sangster (1989))) und einen niedrigen Dampfdruck (1,6 mbar bei 80 °C (NIST (2011))) aus, und ist somit für Veresterungen unter Vakuum geeignet. Daher wurde es als Modellsubstrat für die Veresterung der freien Säure-Funktion von PEG600-Disäure festgelegt. Um ein Enzym zu identifizieren, das in der Lage ist diese Veresterung zu katalysieren, wurden die beiden Substrate (ohne vorangegangene Veresterung mit Cellulose) mit verschiedenen Lipase-Präparaten umgesetzt. Die Umsatzverläufe und Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten sind in Abbildung 4.24 auf der nächsten Seite gezeigt.

Novozym435 kann diese Reaktion deutlich schneller katalysieren und erreicht vielfach höhere Endumsätze, als die übrigen hier untersuchten Präparate. Bei 80 °C liegt der Dampfdruck von Wasser bei 475 mbar (NIST (2011)) und somit über dem Druck im Reaktor. Es wird effektiv aus dem Reaktionssystem entfernt, der Endumsatz wird gesteigert.



(a) Umsatzverläufe



(b) Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und Endumsätze

Abbildung 4.24: Spezifische Aktivitäten für die Veresterung von 1-Decanol mit PEG600-Disäure durch verschiedene Lipasen (2,92 g 1-Decanol (15 mmol), 4,5 g PEG600-Disäure (7,5 mmol; entspricht 15 mmol COOH), 370 mg Lipase-Präparat, 45 °C, 200 mbar, 8 ml-Glasreaktor, Magnetrührer mit 500 rpm, Bestimmung mittels Säuretitration)

#### 4.2.4 Zusammenfassung

- ⇒ Novozym435 (Charge LC200230) besitzt gegenüber den weiteren untersuchten Präparaten sowie dem sauren Ionentauscher Amberlyst 15 die höchste Aktivität bei der Veresterung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Laurinsäure.
- ⇒ Der Träger des Präparates Novozym435 trägt nicht zur katalytischen Aktivität in der Veresterung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Laurinsäure bei.
- ⇒ IR-Spektroskopie konnte erfolgreich eingesetzt werden, um Umsatzverläufe für Auswertungen mit vielen Datenpunkten abzubilden.
- ⇒ Als Reaktionstemperatur für die Veresterung von Laurinsäure mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid wurde 80°C festgelegt.
- ⇒ Da native Cellulose eine sehr niedrige Reaktivität aufweist, sollte PEG600-Disäure als Abstandhalter zwischen der Cellulose und 1-Decanol als Acylakzeptor eingesetzt werden.
- ⇒ Novozym435 kann die Veresterung von 1-Decanol mit PEG600-Disäure katalysieren, und erweist sich als vielfach aktiver als die übrigen untersuchten Lipase-Präparate.

### 4.3 Reaktionsmedien

Ohne Lösungsmittel liegt das Saccharid aufgrund des über der Reaktionstemperatur liegenden Schmelzpunktes sowie der niedrigen Löslichkeit in der unpolaren Fettsäure als Feststoff vor. Daraus resultiert eine entsprechende Makrokinetik mit niedriger Reaktionsgeschwindigkeit, wenn der Stoffübergang aufgrund eines niedrigen Übergangskoeffizienten oder einer geringen spezifischen Oberfläche geringer ist als die Reaktionsgeschwindigkeit. Durch den Einsatz eines mäßig polaren organischen Lösungsmittels soll das Saccharid als Substrat in der flüssigen Phase bereitgestellt werden. Dadurch ist eine bessere Mischbarkeit und homogene Verteilung der beiden Phasen und folglich eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Zu beachten ist dabei jedoch, dass polare Lösungsmittel Wasser aus der näheren Umgebung des Enzyms entfernen können, und somit die Aktivität des Enzyms negativ beeinflusst werden kann, während eine zu hohe Wasserkonzentration eine Hydrolyse begünstigen würde (Park u. a. (2001)). Laut Taluk-

der u. a. (2009) ist die Veresterungsaktivität von Novozym435 bis zu einem Wassergehalt von 3,4 %-wt nahezu konstant.

Beispielsweise kann durch die Zugabe von 2-Butanon (MEK) die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit fast verdoppelt werden, wenngleich die im lösungsmittelfreien Ansatz unter reduziertem Druck erreichte Aktivität nicht erzielt wird (Müller (2012)). In diesem Kapitel sollen weitere potentielle Lösungsmittel insbesondere für Glucose untersucht werden. Dabei ist ein niedriger Dampfdruck des Lösungsmittels von Vorteil, wenn eine Veresterung unter reduziertem Druck durchgeführt werden soll, um das entstehende Wasser instantan destillativ aus dem Reaktionssystem zu entfernen. Der Einsatz von Molekularsieben würde den Feststoffanteil erhöhen und sich somit nachteilig auf den Mischvorgang (z. B. bei freier Konvektion durch Inversion des Reaktionsgefäßes) auswirken bzw. nach Abrieb durch den mechanischen Energieeintrag eines Rührorgans die Probenaufbereitung erschweren. Es wird daher reduzierter Druck zur Wasserentfernung mit geringerem Handhabungsaufwand und einer einfachen reproduzierbaren Steuerung bevorzugt. Insbesondere ionische Flüssigkeiten und stark eutektische Lösungsmittel bieten sich aufgrund ihres niedrigen Dampfdruckes für diese Anwendung an, wie in Abschnitt 3.5 auf Seite 26 dargelegt wurde.

### 4.3.1 Lösungsmittel für Monosaccharide

Das IL [EMIm][OAc] zeichnet sich durch ein hohes Lösungsvermögen für Saccharide (insbesondere Glucose) und geringe Enzyminaktivierung aus (Zhao u. a. (2008)). In Vorversuchen wurde jedoch festgestellt, dass [EMIm][OAc] eine Reaktion mit Glucose eingeht, und sich eine Reaktionslösung bei 60 °C innerhalb eines Tages schwarz färbt. Daher wurde [EMIm][OAc] nicht weiter als Lösungsmittel für Monosaccharide untersucht. Auch in DMSO sind die Löslichkeiten polarer sowie unpolarer Moleküle hoch (Gaylord Chemical Company (2007)), während sein Dampfdruck deutlich niedriger als der von Wasser ist (Abbildung 4.4 auf Seite 51), was eine destillative Wasserabtrennung erlauben würde. In einem Ansatz mit Laurinsäure und Glucose wurde jedoch eine unerwartete titrimetrisch bestimmte Zunahme des Säuregehalts gemessen, während eine Abnahme durch die Reaktion erwartet wurde. Daher wurde dieser Ansatz als ungeeignet eingestuft. Mäßig polare Alkohole mit einem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von etwa null können effektive Lösungsmittel für Saccharide wie auch Fettsäuren sein (Abbildung 3.9 auf Seite 27), ohne Enzyme zu denaturieren (Yoo u. a. (2007)). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob durch Anwesenheit von tertiärem Butanol, welches aufgrund sterischer Hinderung nicht als Substrat akzeptiert wird, die Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich

zum lösungsmittelfreien Ansatz gesteigert werden kann. Zusätzlich wurde [BMIm][TfO] untersucht, da es Laurinsäure gut und Glucose durch ein Übersättigungsverfahren in mäßig hoher Konzentration lösen kann, und weil Novozym435 unter diesen Bedingungen in ihm aktiv ist (Lee u. a. (2008a)).

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von Ölsäure bei der Veresterung in tertiärem Butanol ist dreimal so groß wie die im lösungsmittelfreien Ansatz und mindestens fünfmal so groß wie im Ansatz mit [BMIm][TfO] (Abbildung 4.25). Die Esterbildung ist in terti-

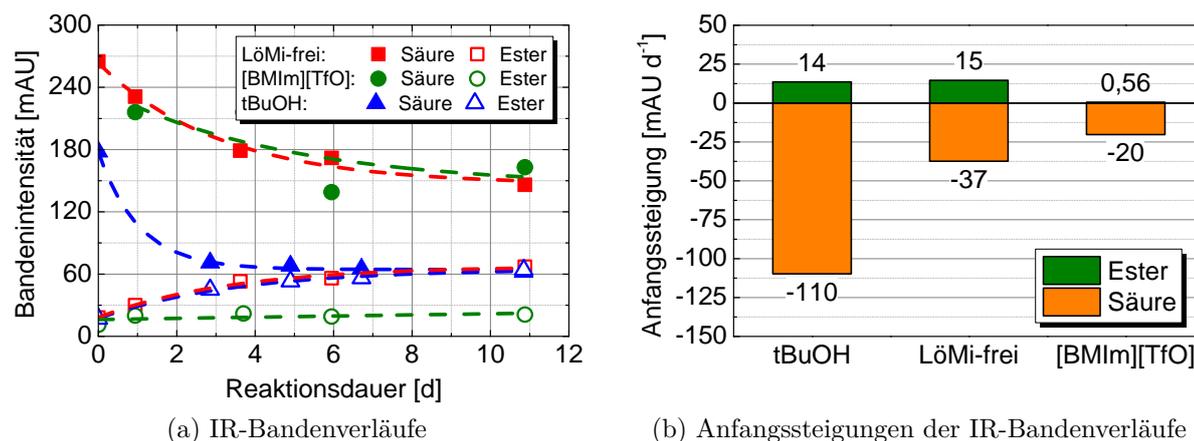


Abbildung 4.25: Veresterung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Ölsäure durch Novozym435 (1,5 ml-Vials: 2 mmol ÖS, 0,7 mmol MG, 100 mg Molekularsiebe mit 15 % Kapazität, 0,49 ml oder 0 ml [BMIm][TfO], 5 %-wt Novozym435, 60 °C, 1000 rpm in Orbitalschüttler; 5 ml-Vials: 5,3 mmol ÖS, 2,5 mmol MG, 600 mg Molsiebe, 1 ml tBuOH, 0,1 g Novozym435, 60 °C, 6 rpm in Überkopfmischer, Offline-ATR-FTIR)

ärem Butanol vergleichbar der im Lösungsmittel-freien Ansatz, während in [BMIm][TfO] kaum ein Anzeichen dafür vorhanden ist. Da der Dampfdruck von tertiärem Butanol im betrachteten Temperaturbereich (45 °C bis 80 °C) stets höher als der von Wasser ist, und die Entfernung des bei Veresterungsreaktionen gebildeten Wassers destillativ erfolgen soll, wurde tertiäres Butanol nicht länger als Reaktionsmedium in Betracht gezogen.

Als Alternative zu IL wurden DES aus der Literatur (Durand u. a. (2012), Hayyan u. a. (2013)) untersucht (Tabelle 4.1 auf der nächsten Seite). Sie besitzen ein ähnliches Potential wie IL, da auch sie je nach Komposition sehr niedrige Dampfdrücke und unterschiedliche Lösungsvermögen besitzen. Ein zeitlich begrenztes Aufschäumen der klaren Flüssigkeit wurde auf das Expandieren gelöster Gase oder Wasser zurückgeführt. Das aus Cholinchlorid und Oxalsäure gebildete DES zeigte bei 80 °C im Vakuum eine

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der untersuchten DES mit ChCl als HBA<sup>13</sup>

| HBD <sup>14</sup> | Stoffmengenverhältnis<br>ChCl:HBD | Lösungsgeschwindigkeit   |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Urea              | 1:2                               | hoch                     |
| Oxalsäure         | 1:1                               | moderat                  |
| Glucose           | 1:1                               | kein einphasiges Produkt |
| MG*               | 1:1                               | kein einphasiges Produkt |

\*: eutektischer Punkt bei äquimolarer Zusammensetzung angenommen

anhaltende Gasentwicklung, weshalb von ihrem Einsatz abgesehen wurde. Aus Cholinchlorid und Glucose konnte trotz Erhitzen auf 80 °C und Rühren über mehrere Tage keine einphasige Flüssigkeit bzw. DES erzeugt werden<sup>15</sup>. Ein DES aus Cholinchlorid und Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid würde analog zur DES aus Cholinchlorid und Glucose das Saccharid-Substrat in einer flüssigen Reaktionsphase bereitstellen (Pöhnlein u. a. (2015)). Jedoch konnte hieraus ebenfalls keine einphasige Flüssigkeit erzeugt werden. Im Folgenden wurde einzig die laut Tang u. Row (2013) in der Literatur am häufigsten erwähnte DES aus Cholinchlorid und Urea näher untersucht, welche sich schnell und mit wenig Mischaufwand herstellen ließ (Abbildung 4.26 auf der nächsten Seite). Entgegen der Angaben aus der Literatur hatte die DES aus ChCl:U keinen Schmelzpunkt von 12 °C, sondern kristallisierte nach einigen Tagen bei Raumtemperatur. Dies könnte darauf hinweisen, dass die vorhandene DES eine andere Zusammensetzung als 1 mol Cholinchlorid je 2 mol Urea (ChCl:U = 1:2) hatte, und darauf zurückzuführen sein, dass bei einer dauerhaften Lagerung bei 80 °C im Vakuum der Harnstoff langsam zerfällt. Daher wurden alle DES für jeden Versuch neu angesetzt. Bei 60 °C ist ein Gemisch von Laurinsäure und Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid im molaren Verhältnis LA:MG von 2:1 mit einem DES-Anteil von 50 %-wt nicht fließfähig und nicht mischbar. Daher wurde die Reaktionstemperatur bei dem Ansatz mit DES auf 80 °C erhöht. Die Reaktion verläuft in dem Ansatz ohne DES schneller, obwohl das Saccharid nur teilweise gelöst ist und die Versuchstemperatur niedriger<sup>16</sup>. Der sigmoidale Verlauf des Umsatzes kann auf eine Aktivierung der Lipase durch Bereitstellen einer großen hydrophob-hydrophilen Grenzfläche

<sup>13</sup>Wasserstoffbrücken-Akzeptor (engl. *hydrogen bond acceptor*)

<sup>14</sup>Wasserstoffbrücken-Donor (engl. *hydrogen bond donor*)

<sup>15</sup>In Pöhnlein u. a. (2015) gelang dies bei einer Temperatur von 100 °C, und in Hayyan u. a. (2013) bei 80 °C.

<sup>16</sup>Aufgrund des sigmoidalen Verlaufs war ein Fit mit einer Kinetik 1. Ordnung nicht möglich, daher wurde die Steigung aus einem linearem Fit ermittelt.

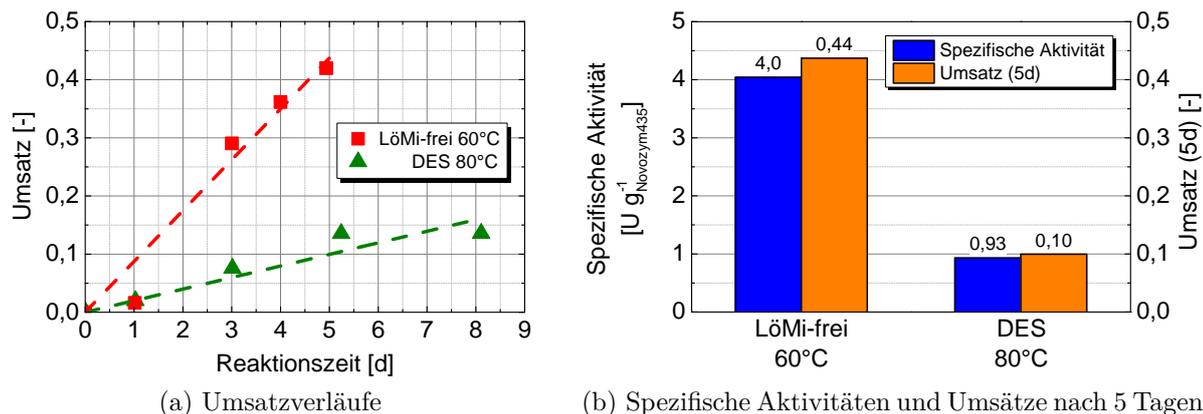


Abbildung 4.26: Veresterung von LS mit MG durch Novozym435 in DES (LA:MG = 2:1, 0 %-wt<sub>Substrate</sub> oder 100 %-wt<sub>Substrate</sub> DES, 5 %-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435, 8 ml-Glasreaktor, Magnetrührer bei 500 rpm, 50 mbar, Bestimmung mittels Säuretitration)

(stabilisiert durch die Bildung grenzflächenaktiver Moleküle) hindeuten. Allerdings wird CALB nicht durch eine Grenzfläche aktiviert (Martinelle u. a. (1995)). Wahrscheinlicher bewirkt das amphiphile Reaktionsprodukt eine Erhöhung der Löslichkeit des Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid in der Laurinsäure bzw. eine Begünstigung und Stabilisierung der Emulsion der Laurinsäure in der DES-Phase. Eine Inaktivierung aufgrund des höheren Temperaturniveaus ist unwahrscheinlich; die Stabilität von Novozym435 ist in Abbildung 4.23 auf Seite 72 in Form eines konstanten Endumsatzes bis zu Temperaturen von 90 °C gezeigt. Es ist möglich, dass der Stofftransport im DES-haltigen System aufgrund der Viskosität der polaren Phase (Saccharid in DES) oder aufgrund begrenzter Löslichkeit niedriger ist. Daher wurden die Löslichkeiten der interessanten Substrate in einem einfachen Versuch eingegrenzt bzw. der Literatur entnommen, und zum Vergleich denjenigen in [BMIm][TfO] gegenübergestellt (Abbildung 4.27 auf der nächsten Seite). Die Löslichkeiten unterstreichen den unpolaren Charakter von [BMIm][TfO] und den polaren Charakter von ChCl:U. Ein Reaktionssystem in [BMIm][TfO] ist folglich durch die geringe Löslichkeit des Saccharids beschränkt, während die Fettsäure gelöst wird. In ChCl:U ist das Reaktionssystem durch eine niedrige Löslichkeit von Laurinsäure begrenzt. Jedoch liegt diese bei Reaktionstemperaturen oberhalb von 43 °C flüssig vor, sodass in dieser Emulsion möglicherweise dennoch ein höherer Stoffaustausch und höhere Reaktionsgeschwindigkeit in der Makrokinetik erreicht werden kann, als bei einer Suspension.

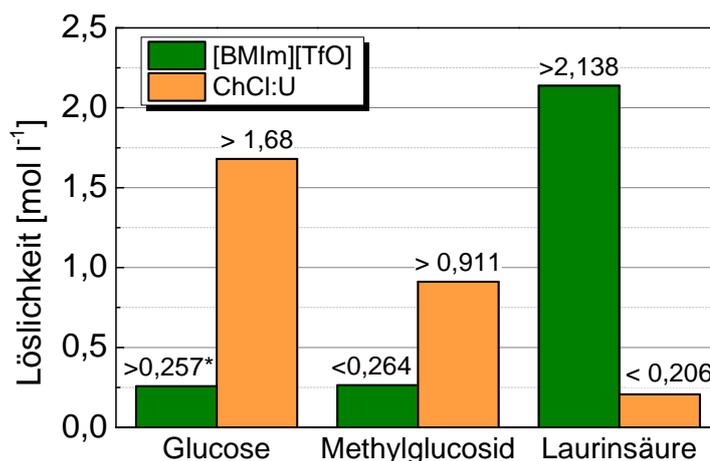


Abbildung 4.27: Löslichkeiten der betrachteten Substrate in [BMIm][TfO] und ChCl:U (1:2) bei 60°C, Bestimmung mittels visueller Prüfung (\*: Lee u. a. (2008a), 25 °C)

### 4.3.2 Lösungsmittel zur Vorbehandlung von Cellulose

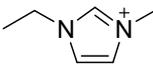
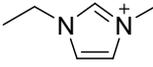
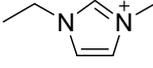
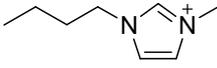
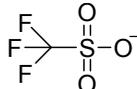
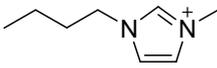
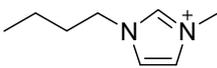
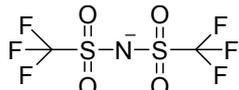
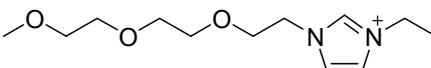
Aufgrund der Inaktivierung von Novozym435 durch IL und potentieller Nebenreaktionen bei erhöhten Temperaturen (Abschnitt 4.3.1 auf Seite 76) soll für die Biokatalyse selbst kein IL eingesetzt werden. In der DES aus Cholinchlorid und Urea (1:2) sind jedoch bei einer Temperatur von 75 °C weniger als 4 mg ml<sup>-1</sup> Cellulose löslich. Dies entspricht einer Löslichkeit von weniger als 25 mM bezogen auf die Glucose-Einheiten als Monomer der Cellulose (AGU<sup>17</sup>). Daher soll in diesem Kapitel die Möglichkeit untersucht werden, inter- und intramolekulare Wechselwirkungen der Cellulose zu stören, und kristalline Bereiche der Cellulose aufzubrechen bzw. deren Kristallinitätsgrad zu reduzieren. Dies soll die spezifische Oberfläche und somit die Reaktionsgeschwindigkeit von Cellulose als Feststoff-Phase erhöhen.

Zur Vorbehandlung durch Lösen bzw. Anlösen und Regenerieren nach Gremos u. a. (2011) wurden einige durch Evonik zur Verfügung gestellte ILs und zusätzlich ein nach Zhao u. a. (2008) im Labor synthetisiertes IL untersucht (Tabelle 4.2 auf der nächsten Seite).

Außerdem wurde untersucht, ob mit wässrigen Lösungen von Natronlauge mit oder ohne zusätzliches Wasserstoffperoxid eine (Teil-)Hydrolyse wie in Banerjee u. a. (2011) hervorgerufen werden kann. Der Versuch wurde um saure Wasserstoffperoxid-Lösungen mit Phosphorsäure ergänzt, da Holzverzuckerungen unter sauren Bedingungen bekannt sind (Sathitsuksanoh u. a. (2010)). Ein Ansatz mit reinem Wasser als Medium diene als

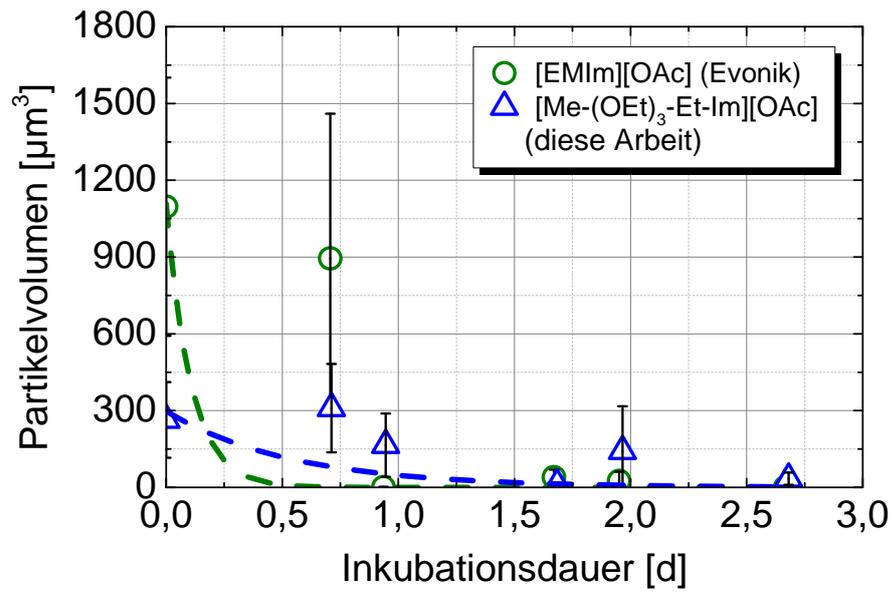
<sup>17</sup>Anhydro-β-D-Glucose-Einheit, engl. *anhydrous glucose unit*

Tabelle 4.2: In dieser Arbeit untersuchte ionische Flüssigkeiten

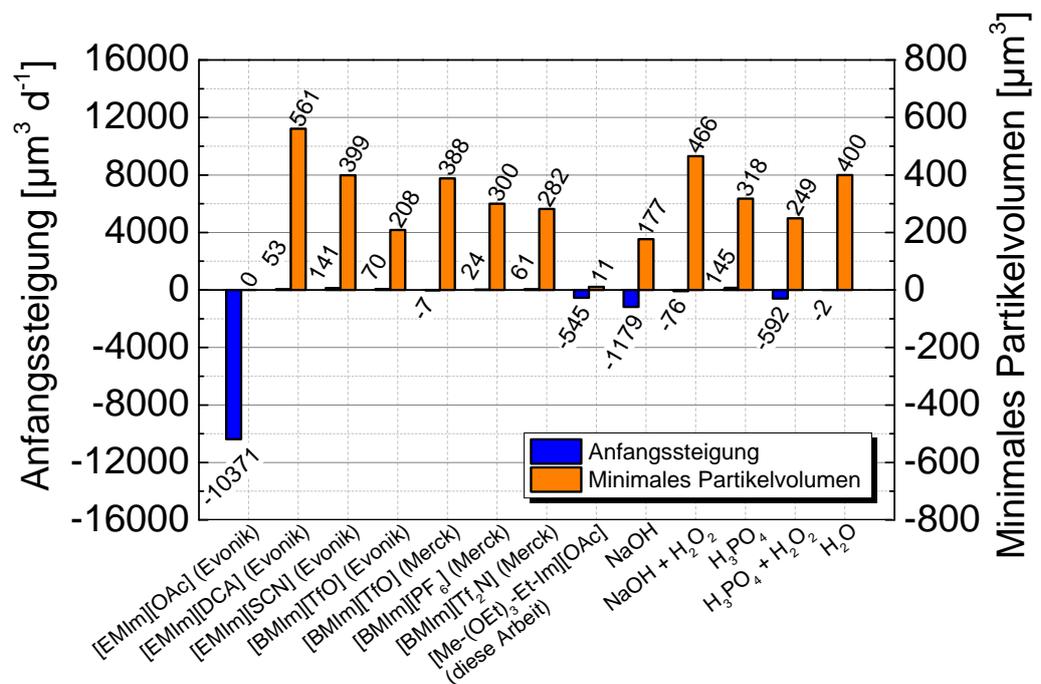
| Ionische Flüssigkeit   | Kation   | Anion   |
|--|--|---|
| [EMIm][OAc]<br>1-Ethyl-<br>3-methylimidazoliumacetat   |     |    |
| [EMIm][DCA]<br>1-Ethyl-<br>3-methylimidazoliumacetat   |     | CN-N <sup>-</sup> -CN   |
| [EMIm][SCN]<br>1-Ethyl-<br>3-methylimidazoliumthiocyanat                                       |     | <sup>-</sup> S-C≡N  |
| [BMIm][TfO]<br>1-Butyl-3-methylimidazolium-<br>trifluormethansulfonat                          |     |    |
| [BMIm][PF <sub>6</sub> ]<br>1-Butyl-3-methylimidazolium-<br>hexafluorophosphat                 |     |    |
| [BMIm][Tf <sub>2</sub> N]<br>1-Butyl-3-methylimidazolium -<br>bis(trifluoromethylsulfonyl)imid |    |   |
| [Me-(OEt) <sub>3</sub> -Et-Im][OAc]<br>1-Methylethylenglycol-<br>3-ethylimidazolacetat         |  |  |

Kontrolle.

Mithilfe von an Cuissinat u. a. (2008) angelehnte Hellfeldmikroskopie konnte einzig für die ILs [Me-(OEt)<sub>3</sub>-Et-Im][OAc] und [EMIm][OAc] eine offensichtliche Abnahme der Partikelgröße festgestellt werden (Abbildung 4.28 auf der nächsten Seite). Die Partikelvolumina wurden anhand der abgebildeten zweidimensionalen Geometrie (Länge und Breite) unter der Annahme einer zylindrischen Form berechnet. Das jeweils geringste während der Inkubation beobachtete Partikelvolumen betrug 11 μm<sup>3</sup> (nach 1,7 Tagen) für [Me-(OEt)<sub>3</sub>-Et-Im][OAc] und 0 μm<sup>3</sup> für [EMIm][OAc] (vollständige Lösung nach 2,7 Tagen). In den übrigen Lösungsmitteln wurden deutlich höhere minimale Partikelvolumina von 177 μm<sup>3</sup> bis 561 μm<sup>3</sup> ermittelt. Die höchste mittels exponentiellem Fit ermittelte anfängliche Abnahme des Partikelvolumens wurde in [EMIm][OAc] festgestellt. Sie ist mit etwa 10 000 μm<sup>3</sup> d<sup>-1</sup> fast 10-mal höher als die zweithöchste von wässriger Natronlauge. In Wasser betrug die Abnahme nur 2,45 μm<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>, was im Rahmen der großen Streuung



(a) Verlauf der Partikelvolumina (Auswahl)



(b) Anfangssteigungen und Minimalwerte der Partikelvolumina

Abbildung 4.28: Untersuchung des Lösungsvorgangs von Cellulose (Avicel PH-101) in verschiedenen Lösungsmitteln, 5 mg Cellulose, 1000 µl Lösungsmittel, 30 °C (Partikelabmessungen mittels Hellfeld-Mikroskopie)

vernachlässigt werden kann bzw. auf den Zerfall von Agglomeraten zurückzuführen sein könnte.

Die anfänglich ermittelten Partikelvolumina streuen stark, sie liegen zwischen  $221 \mu\text{m}^3$  und  $1430 \mu\text{m}^3$  (hier nicht gezeigt). Folglich sind auch die ermittelten Anfangssteigungen fehlerbehaftet, was an teilweise positiven ermittelten Werten bis  $+145 \mu\text{m}^3 \text{d}^{-1}$  deutlich wird. Der Grund hierfür kann die zufällige Anordnung/Ausrichtung oder ein Aufquellen der Fasern («Ballooning», Cuissinat u. a. (2008)) sein.

Da für [EMIm][OAc] die vollständige Lösung von Cellulose-Fasern innerhalb von weniger als 24 h festgestellt werden konnte, wurde diese IL für (An-)Lösungsversuche von Cellulose ausgewählt und sollte nach der Vorschrift in Gremos u. a. (2012) eingesetzt werden. Nach einer Vorbehandlung von Cellulose durch Lösen in [EMIm][OAc] und Ausfällen in Ethanol konnte das [EMIm][OAc] nicht vollständig entfernt werden. Trotz mehrmaliger Wäsche in Ethanol<sup>18</sup> verblieb ein IL-Anteil von 26,8 %-wt in der schließlich getrockneten Cellulose (nachgewiesen mittels Offline-ATR-FTIR-Spektroskopie mit Kalibrierung mit einer für das IL typischen Bande). Daher wurde dieser Ansatz zur Cellulose-Vorbehandlung nicht weiter verfolgt.

### 4.3.3 Zusammenfassung

- ⇒ Novozym435 wird in reinem DMSO und in [BMIm][TfO] inaktiviert. [EMIm][OAc] kann Saccharide in hoher Konzentration lösen, jedoch tritt mit Glucose bei erhöhten Temperaturen eine Nebenreaktion auf.
- ⇒ In tBuOH ist Novozym435 aktiv, jedoch ist der Dampfdruck höher als der von Wasser, weswegen es bei destillativer *in situ*-Abtrennung des Wassers verloren gehen würde.
- ⇒ In DES ChCl:U (1:2) können Mono-Saccharide in einer flüssigen Phase bereitgestellt und verestert werden.
- ⇒ [EMIm][OAc] kann Cellulose lösen, die Entfernung des IL nach der Vorbehandlung ist jedoch unvollständig.
- ⇒ Die DES ChCl:U (1:2) kann Cellulose nicht lösen.

---

<sup>18</sup>[EMIm][OAc] ist vollständig mit Ethanol mischbar.

## 4.4 Kombination zu Reaktionssystem

Die unternommenen Versuche zur Acylierung von Polysacchariden zeigen vor allem, dass die Handhabung unlöslicher polymerer Substrate und Produkte eine große Herausforderung darstellt (Substrat nur in geringen Konzentrationen in Lösung, Sedimentation beim Probenhandling, keine chromatographische Analyse des Produkts möglich, Einschlüsse von Substrat oder Lösungsmittel möglich). Es hat sich gezeigt, dass Synthese und Aufreinigung von Derivaten nicht ausgereift sind. Sie können auch nicht für Analysen in Lösung gebracht werden. Die Analyse im festen Aggregatzustand mittels  $^{13}\text{C}$ -HR-MAS-NMR ist aufwendig, dauert mehrere Tage, und hat in diesen Untersuchungen keine eindeutigen Aussagen erbracht.

Aus den vorangegangenen Untersuchungen lässt sich ableiten, dass das Novozym435 im Vergleich zu anderen Lipase-Präparaten eine hohe Aktivität nicht nur für aliphatische Alkohole sondern auch Monosaccharide besitzt sowie außerordentlich stabil gegen moderat erhöhte Temperaturen ist.

Als einziges kommerzielles Saccharid wurde Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid von Novozym435 umgesetzt. Es wurde gezeigt, dass die Synthese von Ethylglucosid möglich jedoch nicht ausgereift ist. Laurinsäure wird (wie auch die anderen hier untersuchten Fettsäuren) umgesetzt. Ihr Dampfdruck ist niedrig, so dass eine Biokatalyse unter Vakuum zur Gleichgewichtsverschiebung durch Wasserentzug möglich ist.

Die DES aus Cholinchlorid und Urea kann die untersuchten Monosaccharide lösen, ohne das eingesetzte Enzym zu inaktivieren. Sie hat einen für die Anwendung unter Vakuum geeigneten niedrigen Dampfdruck. Ihre Herstellung ist einfach und kostengünstig, und sie ist biologisch abbaubar.

Unter reduziertem Druck kann das bei der Veresterungsreaktion gebildete Wasser aus dem System entfernt, und somit das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Esterbildung verschoben werden. Im Gegensatz zum Einsatz von Molekularsieben, wodurch der Feststoffanteil im Reaktor erhöht wird, wird die Mischbarkeit hierbei nicht nachteilig beeinflusst. Die Absenkung des Drucks im Reaktor ist (im Labormaßstab) einfach, erfordert nur geringe Vorbereitung und verliert (im Gegensatz zu Molekularsieben) nicht an Kapazität, während die Reaktion fortschreitet.

Zur genaueren Untersuchung der enzymatischen Acylierung von Monosacchariden sollen Versuche im Reaktionssystem bestehend Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid und Laurinsäure in  $\text{ChCl}:\text{U}$  (1:2) mit Novozym435 bei 50 mbar und 80 °C durchgeführt werden.

### 4.4.1 Energieeintrag zur Reaktionsbeschleunigung

In einem Gemisch aus den Substraten Laurinsäure und Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, dem DES ChCl:U (1:2) als Lösungsmittel und dem Katalysator Novozym435 liegt das Saccharid vollständig gelöst in einer zweiten flüssigen Phase vor. Diese DES-Phase besitzt im Gegensatz zur Laurinsäure-Phase augenscheinlich eine deutlich höhere Viskosität und Dichte. Zur Erwirkung von Platzwechselfvorgängen ist also ein erhöhter Energieaufwand nötig. Der Stofftransport findet hier nicht anfänglich von einer festen Phase (suspendiertes Saccharid) in eine flüssige Phase (geschmolzene Laurinsäure) statt, sondern zwischen zwei flüssigen Phasen (gelöstes Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid in DES und geschmolzene Laurinsäure). Wenn in der vorherrschenden Makrokinetik der Stofftransport der Substrat- und Produktmoleküle geschwindigkeitsbestimmend ist, hängt die beobachtete (makroskopische) Reaktionsgeschwindigkeit über die Größe der Phasengrenzfläche(n) und der Ausdehnung der Grenzschicht von der Intensität der Durchmischung, also dem spezifischen Energieeintrag, ab. Dieser kann für verschiedene Reaktortypen und Rührorgane sehr unterschiedlich sein.

Die Auswahl eines geeigneten Rührorgans hängt vor allem von der Art der Rühraufgabe, der Viskosität sowie der Förderrichtung ab, und kann anhand von Empfehlungen und Übersichten wie in Kipke (1979), Ekato (2012) oder Krebs (2002) erfolgen. Da keinerlei Erfahrungswerte zur Auswahl eines Rührorgans vorlagen, wurde neben dem Propeller als verbreiteter wandferner Rührer mit axialer Förderung im turbulenten Zustand für niedrigviskose Medien ein Wendelrührer mit axialer wandnaher Förderung im laminaren Zustand für hochviskose Medien ausgewählt; ihre tatsächlichen Geometrien sind in Tabelle 4.3 aufgelistet. Weiterhin wurde das Blasensäulenkonzept (pneumatisches Mischen) als qualitativ andersartiger Reaktor ausgewählt, der sich für viskose Reaktionssysteme bewährt hat (Hilterhaus (2008), Müller (2012)).

Tabelle 4.3: Geometrische Parameter der verwendeten Rührorgane zu Abbildung 3.18 (nach Zlokarnik (2012);  $\eta$ , U nach Grassmuck u. a. (1994))

| Rührertyp   | D/d  | h/d  | b/d | $\delta/d$ | u<br>m s <sup>-1</sup> | Anmerkung                     |
|-------------|------|------|-----|------------|------------------------|-------------------------------|
| E Wendel    | 1,11 | 0,11 | 1   | 0,22       | 0,72                   | doppelgängig, s = 1           |
| H Propeller | 1,76 | 0,88 |     |            | 1,09                   | 3 Flügel, $\alpha = 45^\circ$ |

Zur Ermittlung des Leistungseintrags in Rührsystemen ist die Kenntnis der beschreibenden dimensionslosen Kennzahlen (Reynolds-Zahl  $Re$  und Newton-Zahl  $Ne$ ) notwen-

dig, welche wiederum von den Eigenschaften Dichte  $\rho$  und Viskosität  $\eta$  der Fluide abhängen. Die Eigenschaften der Reinstoffe Laurinsäure und Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid sowie der DES und Mischungen dieser drei Bestandteile sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Tabelle 4.4: Ausgewählte Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Reinstoffe und Gemische bei 80 °C (für Reinstoffe Werte aus der Literatur, für Mischungen Mittelwerte berechnet)

| LS  | MG<br>%-mol | DES | $\phi_d^a$          | $\rho_M^b$<br>g cm <sup>-3</sup> | $\eta_M$<br>mPa s              |
|-----|-------------|-----|---------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 100 | 0           | 0   | –                   | 0,848 <sup>c</sup>               | 3,49 <sup>e</sup>              |
| 0   | 100         | 0   | –                   | 1,46 <sup>f</sup>                | –                              |
| 0   | 0           | 100 | –                   | 1,16 <sup>g</sup>                | 28,1 <sup>g</sup>              |
| 50  | 50          | 0   | 0,360 <sub>MG</sub> | 1,07                             | 11,8 <sub>S</sub> <sup>h</sup> |
| 30  | 30          | 40  | 0,504 <sub>LS</sub> | 1,09                             | 9,82 <sub>E</sub> <sup>i</sup> |
| 10  | 10          | 80  | 0,244 <sub>LS</sub> | 1,13                             | 16,9 <sub>E</sub> <sup>i</sup> |

M: (quasihomogene) Mischung; S: Suspension; E: Emulsion; d: disperse Phase;  
a: Gleichung 3.14; b: Gleichung 3.15; c: Fisher (1995); e: Valeri u. Meirelles (1997);  
f: Merck (2013); g: Yadav u. Pandey (2014); h: Gleichung 3.17; i: Gleichung 3.16<sup>19</sup>

Für das Reaktionsgemisch aus DES:MG:LS (8:1:1) wurden in den drei Reaktoren Rührkessel mit Propellerrührer, Rührkessel mit Wendelrührer und Blasensäule für die Reaktionstemperatur von 80 °C nach Zugabe von 5 %-wt Novozym435 die Anfangssteigungen bezogen auf die Enzymmenge und die zugehörigen Leistungseinträge (nach Abbildung 3.17 auf Seite 39) bezogen auf die Reaktormasse ermittelt. In Abbildung 4.29 auf der nächsten Seite sind diese paarweise aufgetragen. Entgegen der Erwartung, dass das Reaktionssystem aufgrund der Viskosität und Heterogenität einer stofftransportlimitierten Makrokinetik gehorcht, korreliert die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit nicht proportional mit dem Leistungseintrag, sondern zumindest für die Systeme mit 80 %-mol DES umgekehrt proportional. Wie in Müller (2012) wurde auch in dieser Untersuchung ohne Lösungsmittel im Rührkessel unter reduziertem Druck eine höhere Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gefunden als in der Blasensäule<sup>20</sup>. Die höchste spezifische Aktivität für das Gemisch DES:MG:LS (8:1:1) wurde in der Blasensäule beobachtet, welche gleich-

<sup>19</sup>Messung bzw. Berechnung mittels Gleichung B.9 auf Seite 125 ergab 74,9 mPa s für den Rührkessel mit Propellerrührer und 81,2 mPa s für den Rührkessel mit Wendelrührer

<sup>20</sup>dort 70 °C; 40 % des MG vorgelegt, dann nachdosiert; Rührkessel bei 20 mbar mit Halbmondrührer bei 200 min<sup>-1</sup> (Energieeintrag unbekannt, ca. 11 U g<sub>NZ435</sub><sup>-1</sup>); Blasensäule mit 2 cm Durchmesser bei 0,45 l min<sup>-1</sup> (Energieeintrag 0,234 mW g<sup>-1</sup>; ca. 6 U g<sub>NZ435</sub><sup>-1</sup>)

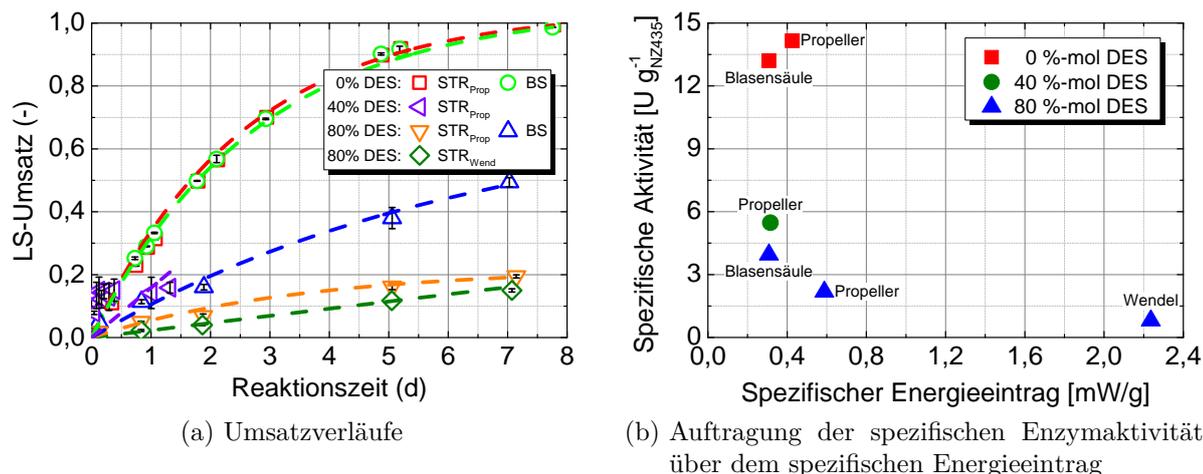


Abbildung 4.29: Spezifische Enzymaktivität in Abhängigkeit vom spezifischen Energieeintrag in verschiedenen Rührsystemen (äquimolare Ansätze, 5 %<sub>Substrate</sub> Novozym435, 80 °C, 50 ml-Glasreaktor mit Propellerrührer, 290 ml-Glasreaktor mit Wendelrührer, 190 ml-Blasensäule, Bestimmung mittels Säuretitation bzw. RP-HPLC, Energieeintrag über Korrelationen ermittelt)

zeitig den niedrigsten spezifischen Leistungseintrag aufwies. Es zeigt sich ein drastischer Einfluss des DES: In den lösemittelfreien Systemen ist die spezifische Aktivität mindesten dreimal so hoch wie in den Systemen mit 80 %-mol DES. Untersuchungen mit DES:MG:LS (4:3:3) wurden nicht mit dem Wendelrührer durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen wurde, dass Propellerrührer und Wendelrührer identische Reaktionsverläufe erzielen.

Die Verläufe der Umsätze in 40 %-mol DES in der Blasensäule (nicht gezeigt) und im Rührkessel wiesen hohe Streuungen auf, was vermutlich auf Entmischungsphänomenen beruht. Sie wurden daher linear gefittet, um die Anfangssteigung zu ermitteln. Die spezifische Enzymaktivität in der Blasensäule von  $43 \text{ U g}_{\text{NZ435}}^{-1}$  wird als falsch angenommen, und ist deswegen nicht teil dieser Auswertung. Die Aktivität nimmt grundsätzlich mit zunehmendem DES-Gehalt ab. Mit Propellerrührer und Blasensäule können die niedrigsten spezifischen Energieeinträge und gleichzeitig die höchsten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erzielt werden.

Möglicherweise liegt die Stofftransportlimitierung nicht in einer ungenügenden Durchmischung begründet, sondern in einem ungenügenden Stoffübergangskoeffizient für das Nebenprodukt Wasser. Im System mit DES deutet sich dies durch die Überlegenheit der Blasensäule an, bei der das treibende Gefälle für den Wasseraustrag die Differenz

zwischen der Gleichgewichtskonzentration von Wasser in der Gasphase und der maximalen Beladung des Gasstromes ist. Im Rührkessel unter Vakuum gibt es keine Gleichgewichtskonzentration in der Gasphase, da diese vollständig aus Wasserdampf besteht; die Gasphase formt sich instantan bei der Bildung der Wassermoleküle, und wird durch freie Konvektion aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Im lösemittelfreien System sind die spezifischen Aktivitäten signifikant höher als im System mit DES, was auf eine Hygroskopie der DES hinweisen könnte. Dies ist in Anbetracht der Hygroskopie der DES-Komponente Cholinchlorid eine naheliegende Erklärung, und wurde genauer untersucht.

#### 4.4.2 Wasserakkumulation während der Reaktion

Um der Frage nachzugehen, ob durch die Anwesenheit der wahrscheinlich hygroskopischen DES (ChCl:U=1:2) das Nebenprodukt Wasser während der Reaktion im Reaktor akkumuliert wird, und die makroskopische Reaktionsgeschwindigkeit der Veresterung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Laurinsäure aufgrund der Beschleunigung der Rückreaktion abnimmt, wurde mithilfe der Karl-Fischer-Titration der Wassergehalt des Reaktionsgemisches für verschiedene DES-Anteile am Anfang der Reaktion bestimmt. Da insbesondere im lösungsmittelfreien System hohe Streuungen aufeinanderfolgender Messungen auftraten, wurde für jeden Versuch der mittlere Wassergehalt der ersten 24 h ermittelt. Dieser Zeitraum wurde *a priori* willkürlich festgelegt; für das System DES:MG:LS (4:3:3) im Rührkessel mit Propellerrührer konnte gezeigt werden, dass in dieser Zeit der maximale Wassergehalt erreicht wird, und dieser sich nach 24 h kaum noch ändert (Abbildung 4.30 auf der nächsten Seite). Die Wasserkonzentrationen der einzelnen Proben wurden unter Berücksichtigung des Abstandes der Probenahmen mithilfe von Origin Lab gemittelt<sup>21</sup> (Abbildung 4.31 auf der nächsten Seite). Vor Beginn der Reaktion ist der Wassergehalt im System DES:MG:LS (8:1:1) höher als im lösemittelfreien System, was auf eine Hygroskopie der DES hindeutet. Beide Anfangswerte sind niedriger als die zugehörigen (bis zu 17-mal so hohen) Mittelwerte der folgenden 24 h. Für die 24 h-Mittelwerte ist anhand der vorliegenden Daten kein funktionaler Zusammenhang (z. B. Proportionalität) zum DES-Gehalt erkennbar. Der mittlere Wassergehalt der ersten 24 h nach Reaktionsbeginn ist nicht wie vermutet beim größten DES-Anteil am höchsten, sondern im lösungsmittelfreien System. Somit kann die in DES-haltigen Systemen niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit nicht durch die Akkumulation von Wasser als Nebenprodukt der Veresterung erklärt werden. Vielmehr ist der erhöhte Was-

<sup>21</sup>Integration mit linearer Interpolation zwischen den Messwerten und Division durch die Gesamtdauer (24 h).

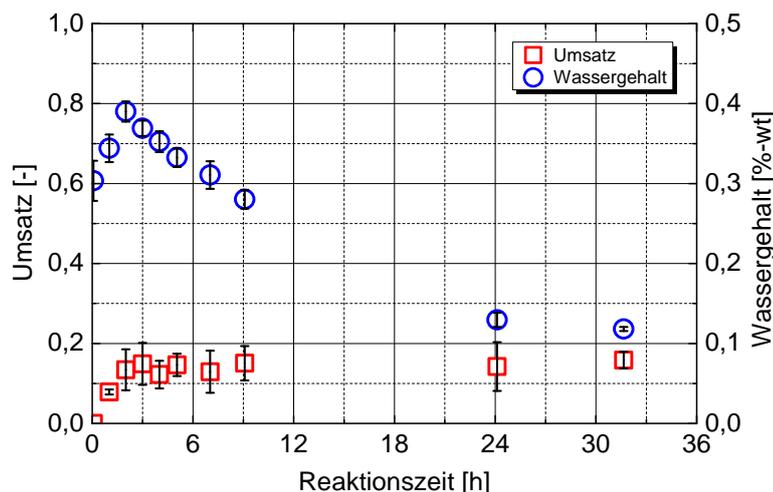


Abbildung 4.30: Veresterung von Laurinsäure mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid im Rührkessel mit Propellerrührer (äquimolare Ansätze, 5%<sub>Substrate</sub> Novozym435, 40 %-mol DES, 80 °C, 50 mbar, Bestimmung mittels RP-HPLC bzw. KF-Titration)

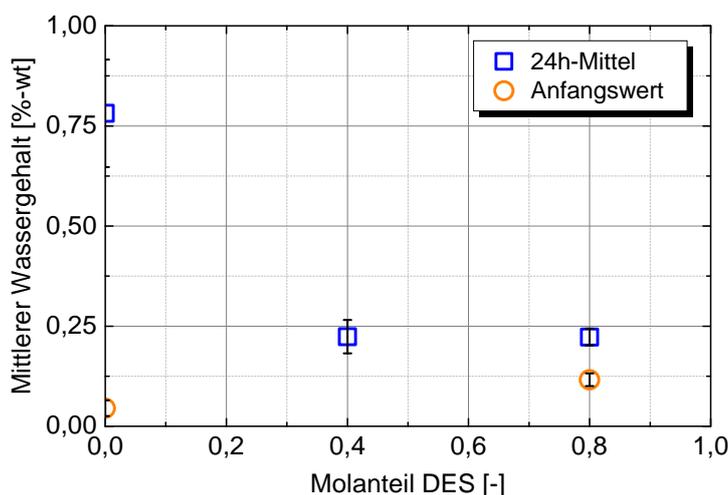


Abbildung 4.31: Mittlerer Wassergehalt der Veresterung von LS mit MG in BC bzw. STR<sub>Prop</sub> während der ersten 24 h als Funktion des DES-Anteils (äquimolare Ansätze, 5%<sub>Substrate</sub> Novozym435, Mittelung erfolgte jeweils aus Messwerten für BC und STR, Bestimmung mittels Säuretitation oder RP-HPLC bzw. KF-Titration)

sergehalt eine Folge der im lösemittelfreien System erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit, was durch eine Auftragung des Wassergehalts über die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit belegt werden kann (Abb. 4.32 auf der nächsten Seite). Die Reaktionsgeschwindigkeit wird nicht durch Akkumulation von Wasser verringert, sondern der beobachtete mittlere

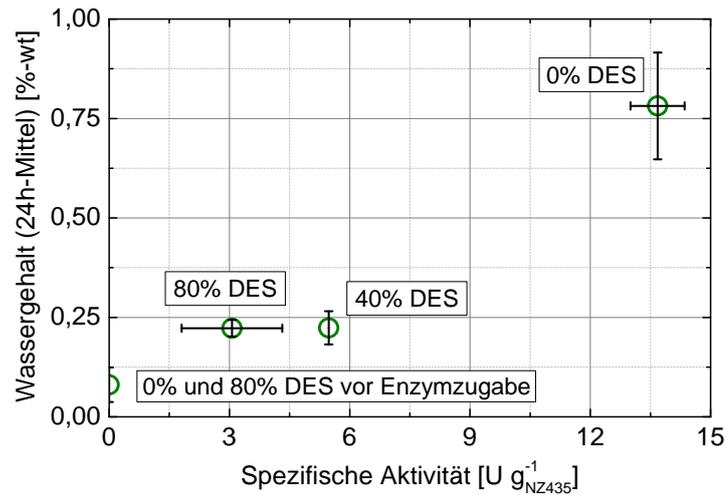


Abbildung 4.32: Wassergehalt bei der Veresterung von LS mit MG in BC bzw. STR<sub>Prop</sub> als 24 h-Mittel in Abhängigkeit der spezifischen Aktivität (äquimolare Ansätze, 5 %<sub>Substrate</sub> Novozym435, Mittelung erfolgte jeweils aus Messwerten für BC und STR, Bestimmung mittels RP-HPLC bzw. KF-Titration)

Wassergehalt während der ersten 24 h ist umso höher je höher die spezifische Aktivität ist. Möglicherweise liegt eine Proportionalität zwischen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit und dem mittleren Wassergehalt der ersten 24 h vor. Das bedeutet, dass Wasser (zwischenzeitlich) in geringem Maße akkumuliert wird (Austrag langsamer als Bildung), dieses sich jedoch nicht auf die Reaktionsgeschwindigkeit auswirkt. Möglicherweise sind die gefundenen Wasserkonzentrationen (alle unter 1 %-wt) zu gering, um einen Einfluss auf die Rückreaktion (Hydrolyse) haben zu können. Laut Anderson u. a. (1998) ist die Aktivität von CALB in den meisten Fällen unabhängig von der Wasseraktivität des Mediums. In einigen Fällen ist die katalytische Aktivität jedoch umso höher, je mehr Wasser vorhanden ist. Die Hygroskopie der DES könnte über den gesamten Reaktionsverlauf einen höheren Wassergehalt in Systemen mit DES bewirken. Um dies genauer zu prüfen, wurden Konzentrationen von Wasser im Fließgleichgewicht (Steady-State-Bedingungen) in reaktionsidentischen Zusammensetzungen bestimmt (Abbildung 4.33 auf der nächsten Seite). In Reaktionsgemischen mit 80 % DES herrscht im betrachteten Bereich in der Blasensäule eine niedrigere Wasser-Konzentration vor. Somit ist der Wasseraustrag in der Blasensäule größer als im Rührkessel. Dies entspricht der höheren Reaktionsgeschwindigkeit in der Blasensäule in Systemen mit 80 %-mol DES (Abbildung 4.29b auf Seite 87). Für Systeme ohne DES wurden sehr geringe Wasserkonzentrationen (Blasensäule: unter 0,10 %, Rührkessel: unter 0,14 %) oder sogar negative Konzentrationen

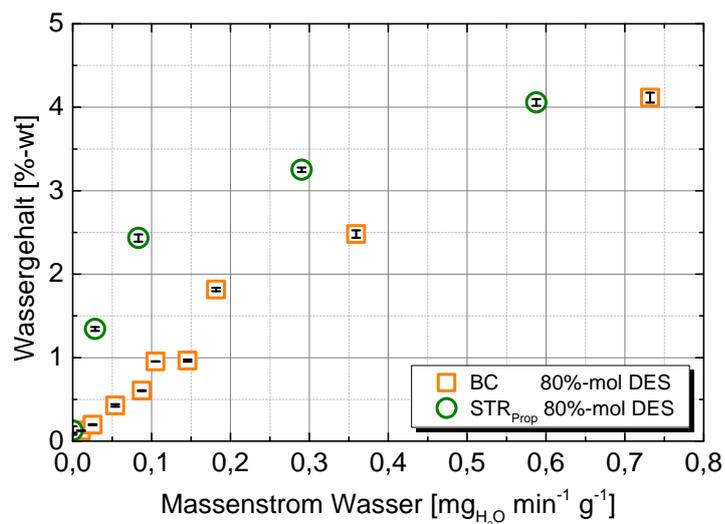


Abbildung 4.33: Wassergehalt im Fließgleichgewicht als Funktion des Wasserzustroms (equimolare Ansätze ohne Enzym, 80 %-mol DES, 80 °C, 50 ml-Glasreaktor mit Propellerrührer mit 500 rpm bei 50 mbar, 190 ml-Blasensäule mit 1 L min<sup>-1</sup>, Spritzenpumpe, Bestimmung KF-Titration)

bestimmt, vermutlich weil das Wasser mit dem Saccharid agglomerierte (sedimentierte Agglomerate wurden einige Minuten vor jeder Messung aufgelockert) und die geringen Konzentrationen durch Methodenfehler der Bestimmungen (z. B. aufgrund des Wassergehalts des zur Probenaufnahme verwendeten Formamids) kaschiert wurden. Dies belegt, dass die verwendete DES hygroskopische Eigenschaften besitzt. Die maximalen als Einzelwert ermittelten Wasserkonzentrationen innerhalb von 24 h nach Reaktionsbeginn betragen 1,10 %-wt (Rührkessel, lösungsmittelfrei) und 1,58 %-wt (Blasensäule, lösungsmittelfrei); aufgrund der Streuungen und der Zunahme nach Reaktionsstart sind die gemittelten Werte niedriger. Solch niedrige Konzentrationen wirken sich scheinbar nicht auf die Kinetik aus. Da die höchsten 24 h-Mittelwerte des Wassergehalts bei Reaktionen ohne DES gefunden wurden, und in genau diesen Systemen die niedrigsten Gleichgewichtskonzentrationen von Wasser in Steady-State-Messungen gefunden wurden, ist es wahrscheinlich, dass der Wassergehalt durch die Reaktionsgeschwindigkeit gegeben ist, und diese wiederum durch die Substratkonzentration (siehe Kapitel 4.4.3).

#### 4.4.3 Einfluss des stark eutektischen Lösungsmittels

Es ist möglich, dass die reduzierte Reaktionsgeschwindigkeit durch die geringere Konzentration der Substrate in lösungsmittelhaltigen Systemen hervorgerufen wird. Bei Auftragung der spezifischen Aktivität über dem Molanteil der Substrate ist ein proportionaler

Zusammenhang über den gesamten Bereich des Substrat-Molanteils erkennbar (Abbildung 4.34). Dies entspricht einer Formalkinetik 1. Ordnung, obwohl für geringe DES-

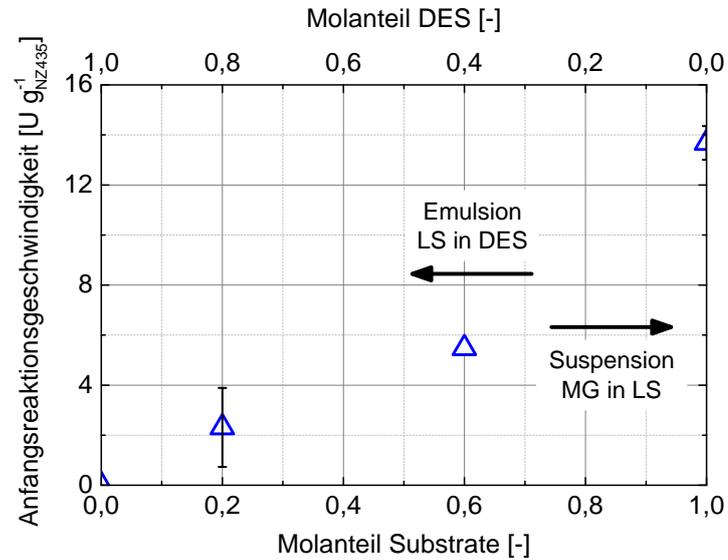


Abbildung 4.34: Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Veresterung von LS mit MG als Funktion des LS-Anteils (equimolare Ansätze, 5%<sub>Substrate</sub> Novozym435, 80°C, 50 mbar, Bestimmung mittels Säuretitation bzw. RP-HPLC)

Konzentrationen (also hohen Substratkonzentrationen) das Gemisch von einer Emulsion in eine Suspension übergeht, und sich somit die Makrokinetik qualitativ ändert. Laut Sandoval u. a. (2002) kann die Michaelis-Menten-Kinetik angepasst werden, um lösungsmittelunabhängig zu sein und auch für lösungsmittelfreie Systeme Vorhersagen liefern zu können. Demzufolge sollten für sogenannte TABEK<sup>22</sup>-Modelle thermodynamische Aktivitäten anstelle der Konzentrationen verwendet werden, welche berechnet werden können. Außerdem wird  $V_{\max}$  als systemspezifisch erkannt (und muss für jedes System ermittelt werden). Wird das Substratverhältnis oder das Verhältnis Substrat-Lösungsmittel variiert, wird  $V_{\max}$  linear mit dem Verteilungskoeffizienten  $\log P$  (als Maß für die Polarität des Mediums) korreliert. In Abbildung 4.34 ist eine mögliche lineare Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration erkennbar. Die Erkenntnisse aus Sandoval u. a. (2002) sind jedoch nur bedingt auf das Reaktionssystem DES:MG:LS übertragbar. Es handelt sich hier nicht um hochkonzentrierte Lösungen, sondern um Systeme mit mehreren Substrat-Phasen (Emulsion oder Suspension), während zusätzlich der Biokatalysator heterogen vorliegt, und noch eine Gasphase vorhanden ist (Druckluft in der Blasensäule oder Wasserdampf im Rührkes-

<sup>22</sup>Thermodynamic Activity-Based Enzyme Kinetics

sel). Solche komplexen System können nur mit makrokinetischen Modellen beschrieben werden, in denen die Transportwiderstände von Reaktion und Stofftransport aufaddiert werden (Levenspiel (1999)).

Bei mittleren und hohen DES-Anteilen stellt die unpolare Fettsäure-Phase der Emulsion ein Substratreservoir (bzgl. des Acyl-Donors Laurinsäure) mit konstanter Konzentration (Reinstoff) dar, während die Löslichkeit der Fettsäure in der polaren DES gering ist. Somit stünde eine nur geringe effektive Konzentration der Fettsäure für die Reaktion in der kontinuierlichen DES-Phase zur Verfügung.

Nur für lösungsmittelfreie Systeme bzw. geringe DES-Anteile liegt eine Suspension (des Acyl-Akzeptors Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid) vor, wobei das Saccharid jedoch eine moderate Löslichkeit in der Fettsäure aufweist. Es liegt in höherer Konzentration gelöst in der (kontinuierlichen) Reaktionsphase (der Fettsäure) vor, so dass beide Substrate in gelöster oder flüssiger Form für die Reaktion zur Verfügung stehen. Es ist bekannt, dass in lösungsmittelfreien Systemen höhere Aktivitäten gefunden werden als in verdünnten Lösungen, jedoch steigt die Aktivität nicht proportional zur Konzentration an (Sandoval u. a. (2002)).

#### 4.4.4 Zusammenfassung

- ⇒ Das betrachtete Reaktionssystem ist nicht durch eine Makrokinetik beschränkt, die durch die Variation des Energie-/Leistungseintrags beeinflusst werden kann. In der pneumatisch mischenden Blasensäule wurde bei niedrigstem Leistungseintrag die höchste spezifische Enzymaktivität ermittelt.
- ⇒ Die verringerte Reaktionsgeschwindigkeit wird nicht durch akkumuliertes Wasser verursacht. In Systemen ohne DES ist der mittlere anfängliche Wassergehalt am höchsten, weil ohne DES die höchste Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Der Wasseraustrag ist in der Blasensäule stets höher als im Rührkessel; trotzdem werden identische Reaktionsgeschwindigkeiten in Blasensäule und Rührkessel erreicht. Die DES ChCl:U (1:2) wirkt als hygroskopisches Wasserreservoir, jedoch sind die erreichten maximalen Wasserkonzentrationen gering.
- ⇒ Die stärkste beobachtete Abhängigkeit der Aktivität besteht zum DES-Gehalt, der sich negativ auf die Aktivität auswirkt. Obwohl das Saccharid in flüssiger bzw. gelöster Form bereit gestellt wird, ist die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bzw. Aktivität in DES mindestens 50 % niedriger. Möglicherweise besteht eine Proportionalität zur Gesamtkonzentration der Substrate.



# 5 Diskussion

Die Aussagekraft der Ergebnisse der Untersuchungen zu den Komponenten Substrat, Biokatalysator und Reaktionsmedium sowie zu den Einflussgrößen im gewählten Reaktionssystem wird durch eine Makrokinetik und kaschierende Effekte wie limitierte Löslichkeit und Mehrphasigkeit mit den daraus resultierenden Herausforderungen bei der Versuchsdurchführung und Probenaufbereitung (Entmischung) und Abweichungen bei Konzentrationsbestimmungen vermindert/relativiert. Dies wirkt sich auf abgeleitete Größen wie Aktivität und weitere Sekundärdaten aus.

## 5.1 Aktive Substrate für die Synthese von Fettsäure-Zuckerestern

Diese Untersuchungen wurden auf die Saccharide Glucose und Cellulose fokussiert, da sie im Konzept einer integrierten Bioraffinerie als Stoffströme aus pflanzlicher Biomasse abgetrennt oder generiert werden können, und als Substrate für biokatalytisch erzeugte Produkte dienen sollen. Der Rohstoff Fettsäure taucht im Konzept der Ethanol-Bioraffinerie nur als Zwischenprodukt beim fermentativen Abbau von Schlempe zur Biogas-Gewinnung auf. In Konzepten wie der Ölpflanzen-Bioraffinerie treten entsprechend große Stoffströme mit Fetten oder Ölen bzw. Fettsäuren auf. Durch Kombination dieser Stoffströme ist eine vollständige Integration mit dem Ziel der Fettsäure-Zuckerester-Synthese möglich. Aus diesem Grunde sollte grundsätzlich auf den Einsatz von aktivierten Substraten mit aktiver Abgangsgruppe wie Vinylester oder Säurechloride verzichtet werden.

Wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist der Umsatz nativer Fettsäuren möglich; sogar Saccharide können ohne Derivatisierung umgesetzt werden, wenn geeignete Lösungsmittel verwendet werden. So konnte z. B. in Degn u. Zimmermann (2001) Glucose in einem Gemisch aus tertiärem Butanol und Pyridin enzymatisch mit Myristylsäure verestert werden (85 % Umsatz der 150 mM Glucose in 24 h mit 4 %-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435 bei 45 °C und 4-fachem Überschuss der Fettsäure). Dem gegenüber hätte der

Einsatz derivatisierter Fettsäuren für Umesterungen mit Sacchariden den Vorteil, dass die Nebenprodukte durch Verdampfung leicht aus dem Reaktionssystem entfernt werden könnten. Bei Veresterungen mit Vinylestern von Fettsäuren entsteht Ethenol. Dieses tautomerisiert spontan zu Acetaldehyd, welches aufgrund seines niedrigen Siedepunktes von 21 °C (NIST (2011)) sofort verdampft, und somit das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Fettsäure-Zuckeresters verschiebt. In Lee u. a. (2008a) wurde ein Umsatz von 110 mM Glucose von 90 % mit equimolarer Laurinsäure trotz 100 %-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435 bei 50 °C in [BMIm][TfO] erst nach 100 h erreicht. Mithilfe von Vinylaurat in 2-fachem Überschuss konnte bei 40 °C der gleiche Umsatz von Glucose innerhalb von weniger als 10 h erreicht werden. Doch in Anwesenheit von Wasser wird der Vinylester teilweise hydrolysiert, auch wenn Molsiebe zum Trocknen des Reaktionsgemisches hinzugegeben wurden (Lin u. a. (2016)). Deswegen wird der Vinylester stets im Überschuss zugegeben (Ganske u. Bornscheuer (2005), Lin u. a. (2015)). Auch Methanol als Nebenprodukt einer Umesterung mit dem Methylester einer Fettsäure lässt sich aufgrund seines hohen Dampfdrucks destillativ vermeintlich leichter abtrennen als Wasser. In Cao u. a. (1999) wurden die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten bei der enzymatischen Veresterung von Glucose in tertiärem Butanol bei 60 °C mit Vinylpalmitat (80 % Umsatz in 48 h) und Palmitinsäure (76 % Umsatz in 48 h) gefunden. Das Anhydrid (16 % Umsatz in 48 h) und der Methylester (4 % Umsatz in 48 h) reagierten deutlich langsamer. Bei Acylierungen mit Carbonsäureanhydriden entsteht zudem ein mol Carbonsäure je mol gebildeten Esters.

Das Derivat Methylglucosid erwies sich als deutlich reaktiver als native Glucose. Da das aktive Zentrum von CALB vergleichsweise klein ist, und deswegen kleinere Substrate bevorzugt werden müssten, kann diese höhere Reaktivität nicht durch stärkere Wechselwirkungen erklärt werden. Molekulardynamische Simulationen ergaben, dass durch die hydrophobe Wechselwirkung des Methylrests in Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit der aliphatischen Kohlenstoffkette der Laurinsäure nur eine geringfügig höhere Affinität zum Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid gegenüber Glucose besteht. Das legt die Vermutung nahe, dass der eigentliche Effekt zur Aktivitätssteigerung in der gesteigerten Löslichkeit des Derivats in der unpolaren Fettsäure liegt (Adelhorst u. a. (1990)). Nichtsdestotrotz ist es in Pöhnlein u. a. (2015) gelungen, Glucose mittels Novozym435 zu acylieren. Dabei wurde die Glucose in DES gelöst, Vinylester als Acyldonor verwendet, und 15 %-wt Novozym435 eingesetzt, und dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich gesteigert.

In dieser Untersuchung hat sich ein vergleichsweise geringer Einfluss der verwendeten Fettsäure (im Gegensatz zum Saccharid) auf den Reaktionsverlauf gezeigt, obwohl eine

Substratspezifität für die Acylkomponente zu erwarten ist. Möglicherweise ist der Kanal, durch den das Acylsubstrat zum aktiven Zentrum der CALB diffundieren muss, deutlich kürzer als die hier untersuchten Fettsäuremoleküle, so dass Länge (und Struktur) der Kohlenstoffkette von untergeordneter Bedeutung sind.

Die Abnahme der Reaktivität der Alkohole mit zunehmender Kettenlänge bei der chemischen Veretherung mit Glucose kann mit der abnehmenden Löslichkeit (und somit Konzentration gelöster Moleküle) des Saccharids am Anfang der Reaktion erklärt werden kann. Der unter Reflux mit zunehmender Kettenlänge leicht abnehmende Gleichgewichtsumsatz könnte in der spezifischen Gleichgewichtslage des jeweiligen Reaktionssystems begründet sein, welche jedoch nicht im einzelnen untersucht wurde. Wahrscheinlich trägt ein abnehmender molarer Überschuss des Alkohols von Methanol zu Butanol<sup>1</sup> dazu bei, dass das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Substrate verschoben wird. Für Reaktionstemperaturen bis 97 °C kann die Zersetzung des Ionentauschers ausgeschlossen werden, da die empfohlene maximale Betriebstemperatur 120 °C beträgt (Rohm and Haas (2006)). Die Reaktionstemperatur bei der Alkylierung mit 1-Butanol liegt nahe der oberen Grenze für die empfohlene Betriebstemperatur des Ionentauschers Amberlyst 15; hier wurden möglicherweise Bestandteile des Ionentauscher-Harzes<sup>2</sup> herausgelöst (»Ausbluten«) oder Nebenprodukte gebildet, welche anschließend die Bildung von Kristallen störten. Da nach der Butylglucosid-Synthese die Synthesen von Propylglucosid und Ethylglucosid durchgeführt wurden, und die verwendete HPLC-Analytik wahrscheinlich durch die gebildeten Nebenprodukten irreversibel beeinflusst wurde<sup>3</sup>, sind die Konzentrationsbestimmungen von EG, PG und BG fehlerbehaftet. Ebenso stellt die Annahme, dass die Reinheit der zur Kalibrierung verwendeten Produkte proportional zum Anteil der Peakflächen eines Chromatogramms ist, eine Fehlerquelle bei der Konzentrationsbestimmung dar. Die mangelnde Kristallisationsfähigkeit von EG und PG ist nicht nachvollziehbar, wenn nicht auch schon bei niedrigen Temperaturen oberhalb von 65 °C Nebenprodukte gebildet wurden. Die nicht erfolgte Kristallisation bedingt hohe Restmengen an Ethanol in EG. Dies kann jedoch nicht dafür verantwortlich sein, dass die equimolar eingesetzte Laurinsäure nicht vollständig umgesetzt wurde, denn das Molekulargewicht von Ethanol ist geringer als das von EG, sodass im Fall von verbliebenem Ethanol ein Überschuss an Hydroxygruppen vorläge, und Laurinsäure vollständig umgesetzt werden kann. Mögli-

<sup>1</sup>Konstant gehalten wurde das Verhältnis Masse Glucose zu Volumen Alkohol, nicht jedoch das Stoffmengenverhältnis oder die Stoffmengenkonzentration. In dieser Untersuchung stand die Präparation dieser Substrate im Vordergrund, nicht die Analyse.

<sup>2</sup>Makroporöses Polymerharz auf Basis eines quervernetzten Styren-Divinylbenzen-Copolymers (Rohm and Haas (2006))

<sup>3</sup>Telefonat mit Kundendienst des Säulenherstellers

cherweise konnte jedoch beim Eindampfen (nach vergeblichem Kristallisationsversuch) im Rotationsverdampfer unter Vollvakuum Ethanol nicht vollständig entfernt werden, weil die Temperatur nicht hoch genug war. Beim Einsatz im Reaktor bei 80 °C besitzt Ethanol einen entsprechend höheren Dampfdruck, und wird aus dem evakuierten Reaktor abgezogen.

Der Vergleich von Glucose mit Cellulose als Substrat in Veresterungen hat gezeigt, dass das Polysaccharid deutlich reaktionsträger ist als das Monomer Glucose (welches wiederum viel weniger reaktiv ist als Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid). Daran sind vermutlich mehrere Effekte beteiligt. Einerseits bewirkt die große Anzahl an Wasserstoff-Brückenbindungen innerhalb aber auch zwischen den Cellulosemolekülen, dass große Abschnitte von Cellulosefasern kristallin sind mit entsprechend geringer spezifischer Oberfläche. Dadurch besitzt Cellulose praktisch keine Löslichkeit in unpolaren Umgebungen. Andererseits ist das aktive Zentrum von CALB vergleichsweise klein, so dass selbst für vereinzelte Cellulosemoleküle die Wahrscheinlichkeit gering ist, durch die Substratkanäle bis in die Substrattasche zu diffundieren. Grundsätzlich ist der Einsatz eines Enzyms zu empfehlen, welches Cellulose als Substrat akzeptiert (Cellulasen, Cutinasen, ...). Da jedoch bekannt war, dass das industriell verbreitete, sehr aktive und stabile Lipase-Präparat Novozym435 das Saccharid Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid umsetzen kann, wurden diese Untersuchungen neben anderen Lipasepräparaten mit Novozym435 durchgeführt.

Der Einfluss der Löslichkeit wurde mithilfe von geeigneten Cellulosederivaten untersucht, welche aufgrund eingebrachter funktioneller Gruppen schwächere Wechselwirkungen zwischen den Cellulosemolekülen und stärkere Wechselwirkungen mit dem umgebenden unpolaren Medium (Fettsäure) aufweisen, und gleichzeitig reaktive Gruppen für Veresterungen tragen. Dass keines der eingesetzten Derivate (weder Di- noch Polysaccharidderivate) eine ähnliche Reaktivität wie die von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid besitzt, bestärkt die Vermutung, dass bei der Umsetzung von Cellulose mit Novozym435 vor allem eine Substratspezifität hinderlich ist. Insofern wäre eine alternative Derivatisierung zum Einbringen anderer funktioneller Gruppen nicht zielführend. Die einzige Möglichkeit die Reaktivität zu erhöhen liegt darin, einen Abstand zwischen dem Celluloserückgrat und dem Ort der Acylierung einzubringen. Dies ist in dieser Arbeit pragmatischerweise und erfolgreich durch chemische Aktivierung eines PEG-Disäure-Moleküls geschehen, denn Novozym435 konnte in keiner Reaktion Cellulose umsetzen. Die anschließende enzymatische Veresterung der freien Säurefunktionen des Abstandhalters konnte nicht eindeutig belegt werden, da Widersprüche in den Analyse-Ergebnissen vom Fehlen eines für das Celluloserückgrat typischen Signals im NMR-Spektrum bis zu Ausbeuten des

Endprodukts Cellulose-PEG-Decylester von über 100 % reichen.

## 5.2 Biokatalysatoren für die Veresterung von Sacchariden

Es hat sich gezeigt, dass Novozym435 das aktivste Präparat für die hier untersuchten Veresterungen ist. Dies gilt sowohl für die Veresterung des Monosaccharids Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Laurinsäure als auch für die Veresterung des Cellulosederivats mit PEG-Disäure als Abstandshalter und 1-Decanol. CALB wird in der Literatur als sehr aktiv für die Synthese verschiedene Ester beschrieben. Der Zugang zum aktiven Zentrum ist für die Acyl-Komponente ein enger Kanal, sodass eine hohe Selektivität für Acyl-Substrate vorliegt. Der Kanal für die Alkohol-Komponente ist dagegen breiter, sodass die Selektivität für den Alkohol niedriger ist. Das aktive Zentrum in CALB besitzt im Vergleich zu anderen Lipasen eine geringe räumliche Ausdehnung und bedingt so die Substratspezifität (Anderson u. a. (1998)). Unter diesem Gesichtspunkt ist jedoch nicht erklärbar, warum Novozym435 Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid deutlich schneller umsetzt als Glucose, wenn letztere doch leichter ins aktive Zentrum diffundieren sollte. Molekulardynamische Simulationen haben gezeigt, dass der Methylrest im Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid im aktiven Zentrum eine hydrophobe Wechselwirkung mit der unpolaren aliphatischen Kette der Fettsäure eingehen kann, während die hydrophile Hydroxyfunktion der Glucose an dieser Stelle eine abstoßende Wechselwirkung mit der unpolaren Kohlenstoffkette der Fettsäure hervorruft (Abbildung 5.1 auf der nächsten Seite). Daraus ergibt sich eine (wenn auch nur geringfügig) höhere Bindungsaffinität von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid gegenüber nativer Glucose. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen in Anderson u. a. (1998). Es war jedoch nicht möglich, die Simulation mit der langen C12-Fettsäure Laurinsäure durchzuführen, da diese zu lang und zu flexibel ist. Die Bindungsstrategien wurden stattdessen mit der C10-Fettsäure Caprinsäure evaluiert.

CALB wird grundsätzlich eine vergleichsweise hohe Stabilität zugeschrieben, welche durch Immobilisierung noch erhöht wird (Anderson u. a. (1998)). Dadurch ist Novozym435 auch bei moderat erhöhten Temperaturen nahe 100 °C über mehrere Tage stabil, sodass Untersuchungen bei 80 °C durchgeführt werden können. Dies wirkt sich vorteilhaft auf die Mischbarkeit der äquimolaren Reaktionsansätze aus. Bei 70 °C müsste die Fettsäure im Überschuss vorgelegt und das Saccharid nachdosiert werden, weil aufgrund von Adhäsion der flüssigen Fettsäure zwischen den Saccharidpartikeln und rheologischen Effekten das Reaktionsgemisch ins Stocken gerät. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal

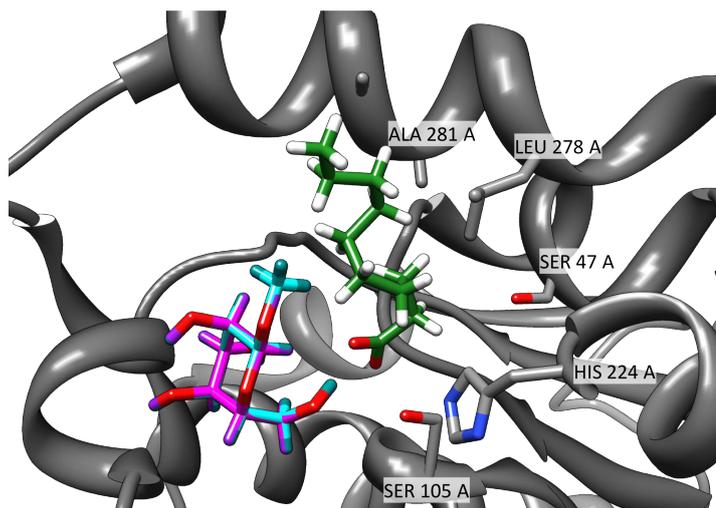


Abbildung 5.1: Aktives Zentrum von CALB mit gebundenem Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid und Caprinsäure (C10:0) als Modellmolekül <sup>4</sup>(Caprinsäure grün/weiß/rot, Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid pink/rot/türkis/violett mit Methylrest in türkis)

Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid und Laurinsäure durch Novozym435 konsequent bei 80°C verestert, um die Möglichkeit nutzen zu können, die beiden Substrate bereits zu Anfang der Reaktion equimolar vorzulegen, so dass die Fettsäure nicht Überschuss bzw. das Saccharid nicht portionsweise zudosiert werden muss.

Durch die Desorption des mittels hydrophober Wechselwirkungen adsorptiv auf dem Träger immobilisierten Proteins CALB sollte gezeigt werden, dass weder der Träger selbst noch in ihm befindliche Produktionsrückstände katalytisch zur Veresterungsreaktion beitragen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass durch die Inkubation in dem Acetonitril-Wasser-Gemisch auch genau jene unter Verdacht stehende Moleküle extrahiert wurden. Insofern ist nur belegt, dass der Träger keine katalytische Aktivität besitzt. Der Überstand der Desorptions-Prozedur müsste vom gelösten Protein befreit und auf katalytisch Rückstände untersucht werden, welche vermutlich in sehr geringen Konzentration vorlägen.

Die Anwendung der ATR-FTIR-Spektroskopie zur Analyse von Veresterungsreaktionen bringt den Vorteil einer online-Reaktionsverfolgung mit hoher zeitlicher Datendichte bei geringem Handhabungsaufwand mit sich. Dennoch wurden Schwankungen bzw. Abweichungen von den erwarteten Verläufen der Reaktionsgeschwindigkeiten über den

<sup>4</sup>Docking der Moleküle mittels LeadIT-Software (Version 2.1.4, integrierte FlexX-Dockingstrategie, Biosolvent GmbH), energetische Bewertung mittels HYDE-Funktion (Schneider u. a. (2013)), Eva Nittinger, Zentrum für Bioinformatik, Universität Hamburg, Juli 2014

Umsatz für niedrige Umsätze bis 10 % gefunden. Dies liegt wahrscheinlich an einer nicht vollständigen Verteilung des Katalysators innerhalb der ersten Minuten der Reaktion aufgrund der erhöhten Viskosität der Reaktionsgemische.

## 5.3 Lösungsmittel und Reaktionsmedien für Saccharide und Fettsäuren

Obwohl [EMIm][OAc] in der Literatur als Lösungsmittel für Saccharide empfohlen wird (Zhao u. a. (2008)), kommt es für Acylierungen von Glucose nicht infrage, weil bei 60 °C eine nicht näher untersuchte Nebenreaktion mit Verfärbung zwischen der Glucose und der IL stattfindet. Eine ähnliche Reaktion ist die sogenannte Maillard-Reaktion, bei der reduzierende Zucker (z. B. Glucose) mit primären oder sekundären Aminen (z. B. Proteinen/Aminosäuren) reagieren (Ledl u. Schleicher (1990)). Als Heteroaromat ist das 1,3-Dialkylimidazolium-Ion jedoch grundsätzlich reaktionsträge und enthält nur eine tertiäre Aminogruppe und eine quartäre Ammoniumgruppe, aber kein sekundäres Amin. Es ist nicht bekannt, dass die Maillard-Reaktion auch mit tertiären Aminen oder quartären Ammoniumverbindungen abläuft.

Es ist bekannt, dass reines DMSO Novozym435 inaktiviert (Talukder u. a. (2009)), und somit nicht als Lösungsmittel in einer Biokatalyse in Frage kommt. Die Deaktivierung von Novozym435 kann auf die bevorzugte Bindung dieses Moleküls an hydrophobe oder aromatische Seitenketten von Aminosäuren bei erhöhten DMSO-Konzentrationen erklärt werden (Arakawa u. a. (2007)). Dadurch kommt es zu Strukturänderungen und Entfaltungen mit erhöhter Selbstassoziation und Ausfällung des Proteins. Nur bei geringen DMSO-Konzentrationen sind Proteine in DMSO-Wasser-Gemischen hydratisiert, denn DMSO wird eine Wechselwirkung mit polaren Oberflächen zugesprochen. Mit einem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von -1,35 (Sangster (1989)) gilt es als (aprotisches) polares Molekül.

Dass es im Veresterungsversuch mit Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid und Laurinsäure in [BMIm][TfO] zwar zur Abnahme der Säurebande, jedoch nicht zur Zunahme der Esterbande kommt, kann nicht erklärt werden. Laut Lee u. a. (2008a) ist Novozym435 in ihm aktiv, und auch die Löslichkeit ist für beide Substrate Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid und Laurinsäure vergleichsweise hoch. Die Proben wurden allerdings nicht aufbereitet, so dass das Produkt mit Offline-ATR-FTIR-Spektroskopie nicht nachweisbar ist, wenn es sich in der Fettsäurephase mit der geringeren Dichte akkumuliert, während der horizontal ausgerichtete ATR-Kristall ausschließlich mit der IL-Phase mit der höheren Dichte

benetzt wird.

Die anhaltende Gasentwicklung bei der Herstellung der aus Cholinchlorid und Oxalsäure gebildeten DES bei 80 °C im Vakuum legt den thermischen Zerfall oder eine Sublimation der Oxalsäure nahe, wie es in Merck (2013) erwähnt wird. Dass das Gemisch aus Cholinchlorid und Glucose nicht wie in Pöhnlein u. a. (2015) verflüssigt werden konnte, kann in der hohen Viskosität des Gemisches begründet sein, sowie in einer zu niedrigen Temperatur während der Präparation. Eine Temperatur von 100 °C würde die Viskosität deutlich senken, und die Bildung eines Eutektikums beschleunigen.

Der höhere Endumsatz und die höhere Anfangsreaktionsgeschwindigkeit im lösungsmittelfreien System zum Vergleich mit DES-haltigen Systemen deutet auf eine Inaktivierung des Biokatalysators durch die DES hin. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden DES-haltigen Reaktoren sind durch eine insuffiziente Durchmischung im kleineren Ansatz bedingt, der mithilfe eines Magnetrührers gemischt wurde.

Der Einsatz eines DES als Reaktionsmedium ist möglich (Pöhnlein u. a. (2015)). Jedoch konnte durch den Einsatz eines Lösungsmittels (organisch, IL, DES) als Reaktionsmedium (oder zur Vorbehandlung) keine Steigerung der Prozessintensität in Form einer erhöhten Anfangsreaktionsgeschwindigkeit oder Produktivität (Raum-Zeit-Ausbeute) erzielt werden. Daher wird weiterhin die lösungsmittelfreie Synthese favorisiert. Dadurch werden zudem hohe Produktivitäten erreicht und unerwünschte Verunreinigungen bzw. eine aufwendige Produktabtrennung vermieden.

## 5.4 Einfluss des Energieeintrags

Die Auswahl der zu untersuchenden Rührorgane erfolgte pragmatisch, es wurden verfügbare Rührsysteme untersucht, alle waren für die auftretenden Viskositäten von maximal 75 mPas geeignet. Der Vergleich dieser verschiedenen Rührsysteme mit DES hinsichtlich ihres spezifischen Energieeintrags und Effizienz (Anfangsreaktionsgeschwindigkeit) erfolgte in dieser Arbeit zum ersten Mal. Es wurden im Gegensatz dazu nur Studien zur Anwendung von DES mit Ultraschall durchgeführt (Kim u. a. (2011)), und teilweise der Energieeintrag anhand des Stromverbrauchs ermittelt (Singh u. a. (2013)). In dieser Arbeit wurden die spezifischen Energieeinträge grafisch anhand von Korrelationen ermittelt, die wiederum für genau spezifizierte Geometrien vermessen wurden. Die Geometrien der verwendeten Rührreaktoren wurden soweit möglich identisch oder zumindest ähnlich gewählt, im Fall des Propellerrührers wurde jedoch ein Rundkolben anstelle eines zylindrischen Reaktors verwendet. Daher ist mit einer systematischen Abweichung

der ermittelten Leistungseinträge zu rechnen. Ebenfalls fehlerbehaftet sind die gemittelten physikalischen Systemeigenschaften. Zumindest für die gemessene Viskosität des Systems bestehend aus 20 %-mol Substraten und 80 %-mol DES ist bekannt, dass die daraus berechneten Viskositäten von 74,9 mPa s und 81,2 mPa s mehr als viermal höher sind als die mittels empirischer Korrelationen ermittelten.

Es gibt keinerlei Erklärung für das Phänomen der zum Leistungseintrag umgekehrt proportionalen Aktivität bei den Veresterungsstudien in DES. Falls eine Diffusionslimitierung aufgrund der Viskosität des Reaktionsgemisches und der Porosität des Biokatalysators vorläge, müsste die ermittelte Aktivität mit zunehmender Rührleistung ansteigen, weil die Ausdehnung der Grenzschicht in der Nähe der Katalysatoroberfläche verringert wird. Hier werden sehr unterschiedliche Rührsysteme miteinander verglichen, doch die Aktivität hängt auch nicht vom Strömungszustand ab. Die Reynolds-Zahl des Propellerrührers beträgt für das System mit 80 %-mol DES 136, die des Wendelrührers 147. Somit befinden sich beide Rührsysteme in einem laminaren Strömungszustand. Da die gemittelten Dichten der Mischungen nahezu unabhängig vom DES-Gehalt sind, und unter der Annahme, dass sich die Gemische für alle Zusammensetzungen newtonsch verhalten und wie bei den berechneten Werten ähnliche Viskositäten besitzen, werden für alle gerührten Systeme Reynolds-Zahlen im laminaren Strömungszustand erhalten. Dies bedeutet, dass die Reaktionsgeschwindigkeit im untersuchten Bereich nicht über die Intensität der Durchmischung beeinflusst werden kann. Im DES-freien Reaktionssystem hat sich praktisch kein Unterschied zwischen dem Rührkessel mit Propellerrührer und der Blasensäule gezeigt.

## 5.5 Akkumulation von Wasser im Reaktionssystem

Es konnte gezeigt werden, dass die verwendete DES ChCl:U (1:2) zwar hygroskopisch ist, jedoch unter den hier untersuchten Reaktionsbedingungen nur sehr niedrige Wasserkonzentrationen von unter 2 %-wt auftreten. Diese haben keinen Einfluss auf die Kinetik, denn gerade bei den höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten sind die gefundenen Wasserkonzentrationen innerhalb der ersten 24 h am höchsten. In dieser Zeit ist die Austragsgeschwindigkeit geringer als die Wasserbildungsrate durch die Veresterungsreaktion.

## 5.6 Substratkonzentration

Es scheint über den gesamten Bereich von niedrigen Konzentrationen (20 %-mol Substrate) bis zu hohen Konzentrationen in lösungsmittelfreien Systemen (100 %-mol Substrate) ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Substratkonzentration und der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zu bestehen. Die Proportionalität entspricht einer Formalkinetik erster Ordnung. In Sandoval u. a. (2002) wurde eine auf der Michaelis-Menten-Kinetik aufbauende Kinetik vorgeschlagen, die thermodynamische Aktivitäten anstelle von Konzentrationen verwendet, und deren maximale Reaktionsgeschwindigkeit linear von der Polarität des Reaktionsmediums abhängt. Diese kann wiederum mit dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten bemessen werden, welcher linear zwischen den beiden Bestandteilen einer binären Mischung (hier vereinfachend DES als eine Komponente und beide Substrate als zweite Komponente) interpoliert werden kann (Sandoval u. a. (2001)).

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Möglichkeiten zur enzymatischen Veresterung von Sacchariden mit Fettsäuren zur Synthese von Fettsäure-Zuckerestern mit emulgierenden Eigenschaften untersucht. Dabei wurden potentielle Substrate, Biokatalysatoren und Lösungsmittel innerhalb einer erfolgsversprechenden Vorauswahl identifiziert, genauer untersucht und schließlich zu einem Prozess kombiniert (Abbildung 6.1 auf Seite 107). Alkylglucoside können durch chemische Alkylierung des Monosaccharids Glucose (oder durch Alkoholyse von Cellulose<sup>1</sup>; Heath u. Jeffries (1968), Valley (1955)) produziert werden. Unter Reflux ist die Reaktion innerhalb von 24 Stunden (BG) bis 48 Stunden (MG) abgeschlossen. Bei 60 °C dauert die Reaktion für MG 48 Stunden, während sie für BG über 6 Tage dauert. Dabei konnte MG mit einem Umsatz der Glucose von 0,97 und einer Ausbeute von 0,98 gewonnen werden.

In dieser Arbeit konnte nicht gezeigt werden, dass Ethyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid eine höhere Reaktivität besitzt als Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, obwohl in Björkling u. a. (1989) für das Erstgenannte eine 10x höhere Anfangssteigung beobachtet wurde. Cellulose konnte erst nach Einbringen eines Abstandhalters in Form einer Dicarbonsäure zwischen dem Rückgrat des Polysaccharids und den zu veresternden funktionellen Gruppen biokatalytisch umgesetzt werden, der Erfolg konnte jedoch nicht eindeutig belegt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass der Einfluss der Fettsäure geringer als der des Saccharids ist: Von Caprylsäure über Laurinsäure bis Ölsäure nimmt die Anfangssteigung von Säure und Ester jeweils etwa um den Faktor zwei ab, während dieser Trend von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid über Glucose bis Cellulose bei einem Faktor von jeweils etwa 10 liegt.

Als leistungsfähiger Biokatalysator hat sich das Lipase-Präparat Novozym435 von anderen Präparaten abgesetzt. Es weist bei Temperaturen zwischen 70 °C und 110 °C hohe Aktivitäten von 8 U g<sup>-1</sup> bis 130 U g<sup>-1</sup> auf und bleibt auch bei 90 °C über eine Reaktionsdauer von 6 Tagen aktiv. Novozym435 ist 20x aktiver als der Ionentauscher Amberlyst 15.

Mit dem DES ChCl:U (1:2) wurde ein wasserfreies Reaktionsmedium gefunden, das

---

<sup>1</sup>Ergebnisse hier nicht gezeigt

den Biokatalysator nicht inaktiviert, und aufgrund seiner Polarität Saccharide lösen kann (etwa 1 M und mehr an Glucose oder MG). Das DES weist einen niedrigen Dampfdruck<sup>2</sup> auf, sodass Nebenprodukte der Kondensationsreaktion (Wasser bei Veresterung bzw. Alkohol oder Vinylalkohol bzw. Acetaldehyd) destillativ abgetrennt werden können. Es wird aus biologisch abbaubaren ungiftigen Verbindungen durch einfaches Mischen hergestellt, und kann somit als nachhaltig und ungefährlich eingestuft werden. Trotz seiner Polarität konnte dieses DES Cellulose kaum lösen. Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid konnte in allen hier untersuchten durchweg vergleichsweise hohen Konzentrationen in diesem DES gelöst werden. Die Löslichkeit der Fettsäure ist niedrig, jedoch stehen durch den Einsatz von DES beide Substrate in flüssiger bzw. gelöster Form zur Verfügung.

Die Veresterung von Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit Laurinsäure durch Novozym435 ist weder im lösungsmittelfreien System noch in DES (mit einer relativ hohen Viskosität insbesondere bei niedrigem DES-Anteil) stofftransportlimitiert. Die gefundenen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten lassen sich nicht durch höheren Energieeintrag steigern. Ebenso wird die Umsatzgeschwindigkeit weder durch zwischenzeitlich akkumuliertes Wasser von unter 1 %-wt verringert, noch hängt sie vom hier untersuchten Reaktortyp ab. Für Blasensäule und Rührkessel mit Propeller-Rührer werden ohne DES identische Ergebnisse erzielt, während die Reaktion in Gegenwart von DES in der Blasensäule stets schneller abläuft als im Rührkessel. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit mit nahezu vollständigem Umsatz innerhalb von 8 Tagen wurde im lösungsmittelfreien System gefunden. Dies entspricht einer spezifischen Produktleistung von  $342 \text{ g}_{\text{MGL}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Der Einsatz von DES oder anderer Lösungsmittel ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht vorteilhaft.

---

<sup>2</sup>Der Dampfdruck dieses DES ist nicht publiziert. Urea besitzt bei 80 °C einen Dampfdruck von  $7 \cdot 10^{-3} \text{ mbar}$  (Ferro u. a. (1987)). Da Cholinchlorid einen höheren Schmelzpunkt als Urea aufweist, wird angenommen, dass es einen noch niedrigeren Dampfdruck besitzt, und der Dampfdruck der Mischung in derselben Größenordnung liegt, und somit vernachlässigbar gering ist. Dies entspricht der allgemeinen Darstellung dieser DES in der Literatur (Francisco u. a. (2013)).

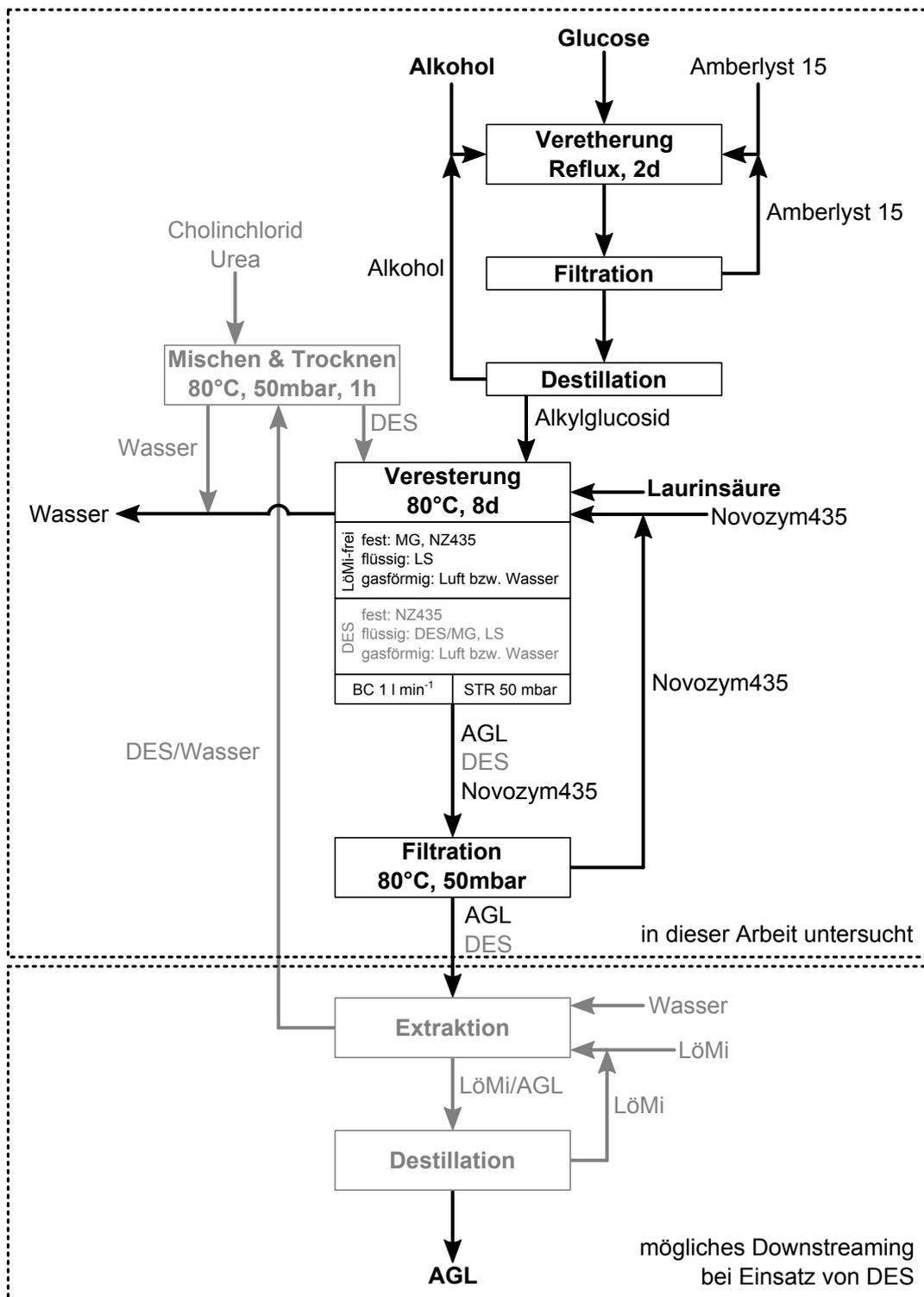


Abbildung 6.1: Grundfließbild der Fettsäure-Zuckerester-Synthese ausgehend von den Rohstoffen Alkohol, Glucose und Laurinsäure bis zum Produkt Alkylglucosidlaurat (schwarz: favorisierter Weg ohne Lösungsmittel; grau: alternativer Weg mit DES)



## 7 Ausblick

Die Generierung von aktiven Sacchariden scheint das wichtigste Stellrad bei der Entwicklung eines wirtschaftlichen Prozesses zur Synthese von Fettsäure-Zuckerestern zu sein. Durch Alkylierung von Oligosacchariden oder Alkoholyse von Cellulose können aktive Saccharid-Substrate mit erwünschten Eigenschaften für die Veresterung mit unpolaren Fettsäuren hergestellt werden. Dabei spielt vor allem die Polarität bzw. Löslichkeit in der Acylkomponente eine Rolle. Die Aufreinigung dieser Saccharid-Derivate (z. B. durch Kristallisation) muss dann ebenfalls genauer untersucht werden, um hohe Reinheit zu gewährleisten. Auch durch aktive Acylsubstrate wie Methyl oder Vinylester kann die Reaktionsgeschwindigkeit möglicherweise weiter gesteigert werden. Die Synthese von Ethylestern könnte in die Prozesse einer Ethanol-Bioraffinerie integriert werden.

Um auch Polysaccharide umsetzen zu können, müssen weitere Hydrolasen insbesondere Cellulasen untersucht werden, welche gleichzeitig Acylkomponenten akzeptieren. Gelingt es nicht Hydrolasen zu finden, die mindestens so aktiv und stabil sind wie das bislang eingesetzte Novozym435, können mit molekularbiologischen Methoden wie Bioinformatik/Simulation und Protein-Engineering Biokatalysatoren mit neuen Eigenschaften generiert werden.

Die überlagerten Stofftransportphänomene und chemische Reaktionen in mehrphasigen Reaktionssystemen können nur als Makrokinetik in ihrer Gänze erfasst und modelliert werden, z. B. als »Shrinking Particle Model« (Bechtloff (2002)). Daher müssen die einzelnen Anteile separat in geeigneten Versuchen ermittelt werden, wenn optimale Betriebsparameter gefunden oder ein tieferes Verständnis aller Teilvorgänge erlangt werden soll. Dabei sollte auch der Zusammenhang zwischen dem spezifischen Energieeintrag und der beobachteten Reaktionsgeschwindigkeit näher untersucht werden, der in dieser Arbeit nicht schlüssig dargestellt werden konnte.

Zumindest Cellulose weist eine so geringe Löslichkeit in Fettsäuren auf, dass auf ein Lösungsmittel, welches die polare Cellulose und unpolare Fettsäuren gleichermaßen lösen kann ohne das Enzym zu deaktivieren, nicht verzichtet werden kann. Hierfür besitzen neotere Lösungsmittel wie DES und IL das größte Potenzial, da sie die gewünschten

Eigenschaften wie einstellbare Polarität und Lösungsvermögen für ein breites Molekülspektrum bei niedrigem Dampfdruck in sich vereinen. Beim Einsatz von IL muss jedoch großes Augenmerk auf Verunreinigungen gelegt werden. Dies betrifft zum einen die Identifikation beeinflussender Verunreinigungen (allen voran Halogenide) mit der notwendigen Analyse zur Quantifizierung, und zum anderen die Entfernung selbiger mit geeigneten Methoden wie etwa präparative Ionenaustausch-Chromatographie. In jedem Fall müssen IL ausgewählt und gegebenenfalls synthetisiert werden, welche die eingesetzten Enzyme nicht inaktivieren. Es können auch Mischungen verschiedener IL, DES oder organischer Lösungsmittel zum Einsatz kommen. Möglicherweise weisen Mischungen dieser drei Klassen neue interessante Eigenschaften wie eine geringere Viskosität bei ausreichender Polarität auf.

Der Einsatz von Lösungsmitteln jeglicher Art macht jedoch ein Downstreaming unvermeidlich. Die in der Fettsäure-Zuckerester-Synthese eingesetzten Verbindungen weisen grundsätzlich einen vergleichsweise niedrigen Dampfdruck auf, sodass destillatives Downstreaming nicht wirtschaftlich ist. Alternativ müsste also eine extraktive Produktabtrennung untersucht werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das gebildete Produkt grenzflächenaktiv ist, und sich zunächst an der Grenzfläche akkumuliert und emulsionsstabilisierend wirkt. Bei höheren Konzentrationen können Mycellen gebildet werden, welche sich wiederum auf polare und unpolare Phase verteilen. Feststoffe können durch Sedimentation und Dekantieren abgetrennt werden, wenn eine nicht zu hohe Viskosität der flüssigen Phase vorliegt. Bei hohen Viskositäten muss mithilfe einer Druckdifferenz filtriert werden. Die Viskosität kann wiederum durch Einsatz eines Lösungsmittel verringert werden.

Eines der Hauptinteressen bei der Herstellung von Fettsäure-Zuckerestern liegt in deren Anwendungspotential. Dieses müsste durch gezielte Untersuchungen der Eigenschaften wie minimaler Grenzflächenspannung oder kritischer Mycellbildungskonzentration ermittelt werden. Nicht zuletzt entscheiden auch dermatologische oder ökotrophologische Eigenschaften über mögliche Einsatzgebiete in z. B. Kosmetika oder Nahrungsmitteln. Dafür müssen entsprechende Studien zur Charakterisierung durchgeführt werden.

# A Verwendete Materialien

## A.1 Chemikalien, Lösungsmittel und Hilfsstoffe

|                        |  |
|------------------------|--|
| Ameisensäure           | Reinheit $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich   |
| Amberlyst 15           | Amberlyst 15 hydrogen form wet, Partikelgröße $< 300\ \mu\text{m}$ , Feuchtigkeit $\leq 1,6\%$ , Kapazität $4,7\ \text{meq g}_{\text{trocken}}^{-1}$ , Sigma-Aldrich |
| Cholinchlorid          | Reinheit $\geq 98\%$ , Sigma   |
| Cellulose              | Avicel PH-101, mikrokristalline Cellulose, Partikelgröße $\approx 50\ \mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich   |
| Cellobiose-Octaacetat  | $\alpha$ -D-Cellobioseoctaacetat, Reinheit $98\%$ , Aldrich  |
| Glucose                | $\alpha$ -D-Glucose, wasserfrei, Reinheit $96\%$ , Aldrich   |
| Hydroxyethylcellulose  | 2-Hydroxyethylcellulose, $M_{\text{W}} \approx 90\ 000$ , Aldrich  |
| Hydroxyethylstärke     | 2-Hydroxyethylstärke, Aldrich  |
| Hydroxypropylcellulose | 2-Hydroxypropylcellulose, $M_{\text{W}} \approx 100\ 000$ , $\geq 95\%$ , Aldrich  |
| KF-Reagens             | Hydranal-Composite 2, Ein-Komponenten-Reagens für volumetrische Karl-Fischer-Titration (Methanol-frei), Fluka  |
| KF-Lösungsmittel       | Hydranal-Formamid trocken, Wassergehalt $\leq 0,02\%$ , Fluka  |
| Laurinsäure (LS)       | Dodecansäure, Reinheit $\geq 98\%$ , Aldrich   |
| Methylglucosid (MG)    | Methyl-D-glucopyranosid ( $\alpha$ - und $\beta$ -Anomer), Reinheit $\geq 99\%$ , Sigma  |
| Molsiebe               | Porendurchmesser $3\ \text{\AA}$ , Perlen, Durchmesser $\approx 2\ \text{mm}$ , Wasserkapazität $\geq 15\%$ , bei $120\ \text{°C}/50\ \text{mbar}$ aktiviert, Fluka  |
| Oxalsäure              | Reinheit $\geq 98\%$ , Aldrich   |
| PEG600-Disäure         | Poly(ethylene glycol)-bis(carboxymethyl)-ether, $M_{\text{n}} \approx 600$ , Aldrich   |

Die Präparate Novozym435 (LC200230, FG LC200232) und Lipozym435 (LC200244) wurden von Novozymes A/S (Dänemark) bezogen. Das Präparat Novozym435 (Mat.-Nr. 07000987 Charge RM91089418) wurde von Evonik Industries AG (Essen) zur Verfü-

gung gestellt. Die Präparate SPRIN epobond CALB (SB101214/CALSEP) und SPRIN actiplus CALB (SB101215/CALS9LX2) stammen von Sprin S.p.A. (Italien). c-LEcta CALB immo (BE 2-135-4, BE 0038) wurden von c-LEcta (Leipzig) bezogen. Alle Enzym-Präparate wurde trocken bei 4°C gelagert und ohne Vorbehandlung eingesetzt.

Die ionischen Lösungsmittel [EMIm][OAc], [EMIm][Cl], [BMIm][TfO], [EMIm][SCN] und [EMIm][DCA] wurden von Evonik Industries (Essen) zur Verfügung gestellt.

[BMIm][TfO], [BMIm][PF<sub>6</sub>] und [BMIm][Tf<sub>2</sub>N] wurden von Merck KGaA (Darmstadt) bezogen. [Me-(OEt)<sub>3</sub>-Et-Im][OAc] wurde im Institut für Technische Biokatalyse nach der Vorschrift in Zhao u. a. (2008) synthetisiert. Alle ionischen Lösungsmittel wurden trocken bei 18°C gelagert und ohne Vorbehandlung eingesetzt<sup>1</sup>.

Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden in der Qualität »zur Synthese«, »zur Analyse« bzw. in einer Reinheit von mindestens 99% über die Chemikalienhändler Sigma-Aldrich (München), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) oder Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen) bezogen.

## A.2 Geräte und Gefäße

|                   |   |
|-------------------|---|
| Blasensäule       | Maßanfertigung, 190 ml, Innendurchmesser 26 mm, Länge 360 mm (davon 260 mm temperiert mittels Doppelmantel), Gasdistribution mittels Lochplatte mit 7 Bohrungen (Dreiecksteilung), Bohrungsdurchmesser 0,5 mm, Begasung 1 L min <sup>-1</sup>             |
| Feinwaage         | CPA224S-0CE, Ablesbarkeit 0,1 mg, Eichwert 0,001 g, Sartorius AG (Göttingen)  |
| FTIR-Spektrometer | Vertex 70 (gespült mit trockenem Stickstoff) mit Pike MIRacle Diamant-ATR-Einheit und MCT-Detektor (gekühlt mittels tiefkalt-verflüssigten Stickstoffs), Steuer- und Auswertungs-Software Bruker OPUS, Bruker Corporation (Billerica, Massachusetts, USA) |

<sup>1</sup>Durch versuchte Trocknung (50°C, 100 mbar, über Nacht, anschließende Lagerung in Exsiccator) stieg der Wassergehalt von z. B. [EMIm][OAc] von etwa 0,3% auf über 2% an, daher wurden alle IL im geschlossenen Originalgebinde gelagert und ohne vorherige Trocknung verwendet.

---

|                        |   |
|------------------------|---|
| FTIR-Spektrometer      | ReactIR 45m (gespült mit trockenem Stickstoff), AgX-DiComp-ATR-Fasersonde (Durchmesser 9,5 mm) mit Diamant-ATR-Kristall, MCT-Detektor (gekühlt mittels tiefkalt-verflüssigten Stickstoffs), Steuer- und Auswertungs-Software iC IR, Mettler-Toledo, LLC (Columbus, Ohio, USA)   |
| Glasreaktor            | Dreihals-Rundkolben mit Normschliff (temperiert mittels Doppelmantel, gerührt mittels Magnetstäbchen oder Propellerrührer), 8 ml–100 ml, Maßanfertigung, Glasbläserei Brunswieg (Hamburg) oder Dreihals-Rundkolben mit Normschliff (temperiert mittels Ölbad, gerührt mittels Magnetstäbchen oder Propellerrührer), 50 ml |
| Glasreaktor            | zylindrischer Reaktor (temperiert mittels Doppelmantel, gerührt mittels Wendelrührer), Innendurchmesser 50 mm, Länge 150 mm, 290 ml, evakuierbar, Maßanfertigung, Glasbläserei Brunswieg (Hamburg), mit GLS-80-Reaktionsgefäßdeckel mit Führungshülse für Rührer sowie Anschlusshälten, BOLA (Grünsfeld)                  |
| Hängerrührer Fish-Clip | Aufhängung aus PVDF, Länge 250 mm, Durchmesser 10 mm, Antrieb über externen Magnetrührer, übliche Magnetstäbchen (Durchmesser 6 mm oder 8 mm) können eingerastet werden (verwendeter Magnetrührer muss ausreichend starken Magneten aufweisen um auch bei erhöhten Viskositäten rühren zu können), Bürkle GmbH (Lörrach)  |
| Durchlichtmikroskop    | Laborlux S, Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrast, in Kombination mit EC3 Mikroskopkamera (3,1 MPixel) mit USB-Verbindung zum PC und Acquire-Software (V2.0), Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)  |
| HPLC                   | Entgaser, Pumpe, Probengeber, Säulenofen, RI-Detektor aus der Serie 1100 und 1200, Steuer- und Auswertungs-Software Agilent ChemStation Rev. A.10.01, Agilent Technologies (Santa Clara, Californien, USA)  |
| Überkopfmischer        | Hybridisierungs-Ofen Unitherm 6/12, UniEquip Laobrgerätebau und -vertriebs GmbH (Martinsried)   |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Karl-Fischer-Titrator       | 870 Titrino plus 10 ml mit 803 Ti Stand, Deutsche METROHM GmbH & Co. KG (Filderstadt)  |
| NMR-Spektrometer<br>(UniHH) | AVANCE 400 MHz-Spektrometer, 5 mm BBI Probenkopf mit ATM und z-Gradient, 10 mm $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -Probenkopf, B-ACS 60 Probenwechsler, Bruker Corporation (Billerica, Massachusetts, USA) |
| NP-HPLC-Säule               | Eurokat H, Partikeldurchmesser 10 $\mu\text{m}$ , Länge 300 mm, Innendurchmesser 8 mm, Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH (Berlin)   |
| Pipetten                    | 0,5–10 $\mu\text{l}$ , 10–100 $\mu\text{l}$ , 100–1000 $\mu\text{l}$ , 500–5000 $\mu\text{l}$ aus der Serie Research variable, Eppendorf AG (Hamburg)  |
| Rheometer                   | Kinexus KNX2100, Steuer- und Auswertungs-Software rSpace, Malvern Instruments Ltd (Malvern, UK)  |
| RP-HPLC-Säule               | Nucleodur C18 Pyramid, Partikelgröße 5 $\mu\text{m}$ , Länge 250 mm, Innendurchmesser 4,6 mm, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren)   |
| Rührwerk                    | IKA RW20 digital, IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen)  |
| Schüttler                   | Certomat R, für Reagenzgläser, B. Braun Biotech International GmbH (Melsungen)   |
| Schüttler                   | HeizThermoMixer MHR 11, für HPLC-Probengefäße, HLC Biotech (Bovenden)  |
| Standzentrifuge             | Megafuge 1.0R, 15-ml- und 50 ml-Probengefäße, Heraeus/Kendro, Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)  |
| Spritzen-Pumpe              | AL-1000, programmierbar, World Precision Instruments, Inc. (Sarasota, Florida, USA)  |
| Tischzentrifuge             | Centrifuge 5415 D, 1,5 ml-Probengefäße, Eppendorf AG (Hamburg)   |
| Titrette                    | Titrette class A precision, 25 ml, Brand GMBH + CO KG (Wertheim)   |
| Vakuum-Ofen                 | VTR-5022, Haereus (Hanau), mit Wasserstrahlpumpe   |
| Vakuum-Pumpe                | PC 3001 Vario, VACUUBRAND GMBH + CO KG (Wertheim)  |

Bei allen anderen Geräten und Gefäßen handelt es sich um übliche, austauschbare Laborgeräte bzw. (Proben-)Gefäße, die keinen speziellen Anforderungen außer ihrem Ver-

wendungszweck genügen müssen.

## A.3 Software

Neben den gerätespezifischen Programmen wurden Excel 2010 (Version 14.0.7166.5000, Microsoft Corporation) zur Auswertung von Messwerten, Origin (Version 8.5.1G SR1, OriginLab Corporation) zur Auswertung und Darstellung von Messwerten, Inkscape (Version 0.48.5 r10040, GNU general public license, [www.inkscape.org](http://www.inkscape.org)) zur Erstellung von Vektor-Grafiken, Citavi (Version 4.4.0.28, Swiss Academic Software GmbH) zur Literatur-Verwaltung und MiKTeX (Version 2.9.4533, open source, [www.miktex.org](http://www.miktex.org)) mit TeXnicCenter (Version 2.02, open source, [www.texniccenter.org](http://www.texniccenter.org)) zum Setzen und Speichern im PDF-Format verwendet.



# B Angewandte Methoden

## B.1 Analytik

Es wurden stets mit nicht gerundeten Werten gerechnet (soweit vorhanden, z. B. bei Werten aus der Literatur). Zur einfacheren Darstellung wurden nur drei signifikante Stellen angegeben. Für Fits wurden die korrigierten Bestimmtheitsmaße in Abschnitt B.1.1 auf Seite 136 aufgelistet. Das korrigierte Bestimmtheitsmaß wird nicht durch die Anzahl unabhängiger Variablen verfälscht. Aus Mehrfachbestimmungen wurden Standardabweichungen (ausgehend von einer Stichprobe) berechnet und als Fehlerbalken in die entsprechenden Plots mitaufgenommen. NMR-Messungen wurden in Auftrag gegeben und sind daher nicht in diesem Abschnitt beschrieben.

### Säuretitration

Die Proben von etwa 300 mg wurden mit 10 ml Ethanol und 20 µl einer 1 %-igen ethanolschen Phenolphthaleinlösung versetzt, und bei Bedarf leicht erwärmt um den Lösungsvorgang zu beschleunigen. Unter ständigem Rühren mittels Magnetrührer bzw. Schwenken des Kolbens wurde 0,1 M Kaliumhydroxidlösung aus einer Titrette hinzugegeben. Sobald eine schwache Rosa-Färbung für mindestens eine Minute erhalten blieb, wurde das verbrauchte Volumen an Kalilauge abgelesen und daraus sowie aus der Probenmasse die in der Probe erhaltene Stoffmenge an Säure berechnet:

$$c_{\text{Säure}} = \frac{n_{\text{Säure}}}{m_{\text{Probe}}} = \frac{n_{\text{Lauge}}}{m_{\text{Probe}}} = \frac{c_{\text{Lauge}} \cdot V_{\text{Lauge}}}{m_{\text{Probe}}} \quad (\text{B.1})$$

$c$ : Konzentration [mol L<sup>-1</sup>]

$n$ : Stoffmeng [mol]

$m$ : Masse [g]

$V$ : Volumen [ml]

### Bestimmung von Wasser-Konzentrationen mittels Karl-Fischer-Titration

Die Proben von etwa 300 mg wurden mit 1,7 ml getrocknetem Formamid (über Mol-sieb gelagert, Wassergehalt regelmäßig bestimmt) versetzt, und leicht erwärmt um den Lösungsvorgang zu beschleunigen. Die Lösung wurde mit einer Spritze mit Kanüle aufgenommen, ein geringer Teil davon für die RP-HPLC-Analyse verwendet, und die restliche Lösung in die konditionierte Messzelle des KF-Titrators mit vorgelegtem trockenem Methanol gegeben. Aus den Wasserkonzentrationen von Probenlösung und Formamid sowie den Massen von Probe und Formamid kann der Wassergehalt der ursprünglichen Probe berechnet werden:

$$\begin{aligned}
 c_{\text{Probe}} &= \frac{c_{\text{Lösung}} \cdot m_{\text{Lösung}} - c_{\text{Formamid}} \cdot m_{\text{Formamid}}}{m_{\text{Probe}}} \\
 &= \frac{c_{\text{Lösung}} \cdot (m_{\text{Probe}} + m_{\text{Formamid}}) - c_{\text{Formamid}} \cdot m_{\text{Formamid}}}{m_{\text{Probe}}} \quad (\text{B.2})
 \end{aligned}$$

$c$ : Konzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

$n$ : Stoffmeng [ $\text{mol}$ ]

$m$ : Masse [ $\text{g}$ ]

$V$ : Volumen [ $\text{ml}$ ]

### Offline-ATR-FTIR-Spektroskopie

Das FTIR-Spektrometer Vertex 70 (Bruker) wurde vor Messbeginn mehrere Stunden mit trockenem, gasförmigem Stickstoff mit etwa  $3 \text{ L min}^{-1}$  gespült, um Absorption durch  $\text{CO}_2$  und Wasserdampf gering und konstant zu halten. Dabei konnte der Gleichgewichtszustand anhand des Intensitätsverlaufs der Banden von  $\text{CO}_2$  (Doppelpack bei  $2200 \text{ cm}^{-1}$  bis  $2400 \text{ cm}^{-1}$ ) festgestellt werden. Für Offline-ATR-Messungen mit Pike-ATR-Einheit war aufgrund der hohen IR-Intensität ein Detektor ohne Flüssig-Stickstoff-Kühlung ausreichend. Es wurde mindestens täglich ein neues Hintergrundspektrum aufgezeichnet.

Die Proben wurden auf den Kristall der in das Spektrometer eingebauten ATR-Einheit von Pike gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Gasblasen im Proben tropfen enthalten sind. Bei Raumtemperatur ( $18^\circ\text{C}$ ) erstarrende Proben wurden mithilfe einer Anpress-Schraube auf den Kristall gedrückt, um die Signalintensität zu erhöhen. Durch dreifaches Durchrutschen der Schlupfkupplung der Anpress-Schraube wurde der Anpressdruck und somit die Signalintensität reproduzierbar. Es wurden für jedes Ergebnisspektrum 256 Einzelspektren mit einer Auflösung von  $4 \text{ cm}^{-1}$  aufgenommen.

Von Proben aus Veresterungsreaktionen wurden die Spektren auf den Bereich von

1880  $\text{cm}^{-1}$  bis 1525  $\text{cm}^{-1}$  zurechtgeschnitten, bevor eine Basislinienkorrektur (concave rubberband, 1 iteration, 200 baseline points) vorgenommen wurde. Es wurden die Signalintensitäten bei 1697  $\text{cm}^{-1}$  – 1710  $\text{cm}^{-1}$  für die Carbonsäurefunktion und bei 1738  $\text{cm}^{-1}$  – 1743  $\text{cm}^{-1}$  für die Carbonsäureesterfunktion ausgewertet.

Von Proben mit regenerierter Cellulose wurden die Spektren Basislinien-korrigiert (concave rubber band, 10 iterations, 200 points, exclude  $\text{CO}_2$ ). Es wurden die Signalintensitäten der Bande bei 1566  $\text{cm}^{-1}$ , die spezifisch für die IL ist, und der Bande bei 1103  $\text{cm}^{-1}$ , die die Streckschwingung der C-O-Etherbindung repräsentiert, analog zur Berechnung des Massenanteils ins Verhältnis gesetzt:

$$\frac{m_{\text{IL}}}{m_{\text{IL}} + m_{\text{Cellulose}}} \propto \frac{IR_{1566}}{IR_{1566} + IR_{1103}}$$

$$\Rightarrow w_{\text{IL}} = k \cdot \frac{IR_{1566}}{IR_{1566} + IR_{1103}} \quad (\text{B.3})$$

$m$ : Masse [g]

$IR$ : Intensität des Infrarotsignals [AU]

$w$ : Massenanteil [%-wt]

$k$ : Proportionalitätskonstante [%-wt]

IL: ionische Flüssigkeit

1566: bei 1566  $\text{cm}^{-1}$

1103: bei 1103  $\text{cm}^{-1}$

Diese Korrelation konnte mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,960$  kalibriert werden.

### Online-ATR-FTIR-Spektroskopie mit Chemometrie

Das FTIR-Spektrometer ReactIR 45m (Mettler Toledo) wurde vor Messbeginn mehrere Stunden mit trockenem, gasförmigem Stickstoff mit etwa 3  $\text{L min}^{-1}$  gespült, um Absorption durch  $\text{CO}_2$  und Wasserdampf gering und konstant zu halten. Der verwendete MCT-Detektor wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt, und wurde für Langzeitmessungen alle 24 h aufgefüllt (maximale Laufzeit von etwa 30 h mit einer Füllung). Ausrichtung und Sauberkeit der ATR-Fasersonde konnten mithilfe der iC-IR-Software überprüft werden. In Ergänzung zur Stickstoff-Spülung wurden Einflüsse durch Wasserdampf im System durch den »Water Vapor Algorithm« der iC-IR-Software korrigiert. Es wurde vor jedem Versuch ein neues Hintergrundspektrum aufgezeichnet. Die ATR-Sonde wurde derart im Reaktor fixiert, dass sie ausreichend angeströmt wurde und sich keine Gasblasen auf den

leicht vertieft eingesetzten ATR-Kristall setzen konnten.

Es wurden für jedes Ergebnisspektrum 256 Einzelspektren mit einer Auflösung von  $4\text{ cm}^{-1}$  im Bereich von  $3000\text{ cm}^{-1}$  bis  $650\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen. Die Intervalle der automatisch durchgeführten Messungen wurden für die ersten zwei Stunden auf 2 min. und für die restliche Reaktionszeit auf 10 min gesetzt. Die Spektren wurden in keiner Weise vom Experimentator nachbearbeitet (insbesondere kein Zuschneiden und keine Basislinienkorrektur).

Für die Erstellung der chemometrischen Modelle (für jede der untersuchten Temperaturen eines) wurden diejenigen ATR-FTIR-Spektren als Prädiktoren (X-Matrix) ausgewählt, für die Titrationsergebnisse vorlagen. Mithilfe einer multivariaten PLS-Regression wurden Spektralmatrix X und Konzentrationsmatrix Y unabhängig voneinander in ihre Hauptkomponenten (Faktoren/Eigenvektoren) zerlegt bzw. reduziert, und diese miteinander korreliert (Gleichung B.4).

$$X \cdot \vec{b} + \vec{c} = Y \quad (\text{B.4})$$

X: Spektralmatrix

$\vec{b}$ : Parametervektor

$\vec{c}$ : Residuenvektor (Fehlervektor)

Y: Konzentrationsmatrix

Die optimale Anzahl zu berücksichtigender Hauptkomponenten wurde zunächst anhand des PRESS-Wertes ermittelt (Gleichung B.5). Die Qualität der erhaltenen Modelle wurde anhand des gemittelten quadrierten Vorhersagefehlers RMSE (Gleichung B.6 auf der nächsten Seite) für die Kalibrierung (RMSEC) und die Kreuzvalidierung (RMSECV) sowie anhand des Bestimmtheitsmaßes für die lineare Korrelation zwischen Vorhersage (FTIR + Modell) und Messwert (Titration) bestimmt.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (\text{B.5})$$

PRESS: Fehlerquadratsumme

n: Anzahl der (Stich-)Proben

$y_i$ : beobachteter Wert

$\hat{y}_i$ : vorhergesagter Wert

$$RMSE = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (\text{B.6})$$

*RMSE*: Wurzel aus mittlerem quadratischen Fehler

*PRESS*: Fehlerquadratsumme

*n*: Anzahl der (Stich-)Proben

*y<sub>i</sub>*: beobachteter Wert

*ŷ<sub>i</sub>*: vorhergesagter Wert

So wurden beispielsweise für 90 °C ein minimaler PRESS-Wert bei 4 Hauptkomponenten ermittelt. Das erstellte Modell zeichnete sich durch einen RMSEC-Wert von 0,961 %-wt<sub>LS</sub> und einen RMSECV-Wert von 1,55 %-wt<sub>LS</sub> aus. Die lineare Korrelation zwischen den titrimetrisch bestimmten und den chemometrisch vorhergesagten LS-Konzentrationen wies ein Bestimmtheitsmaß von 0,996 auf.

### **Bestimmung der Konzentration von Glucose und Alkylglucosiden mittels NP-HPLC (Alkylierungen)**

Nach Ausschalten des Magnetrührers und Sedimentation der festen Bestandteile (Glucose, Amberlyst 15) wurden mithilfe einer Glasspritze mit ausreichend langer Kanüle durch einen Verschlussstopfen aus Silikon Proben mit einem Volumen von 100 µl entnommen und der Kalibrierung der HPLC (bis 100 mM) entsprechend mit Eluent verdünnt. Die chromatografische Analyse erfolgte in einer Agilent-1200-HPLC-Anlage. Die NP-Säule<sup>1</sup> Eurokat H (Knauer) wurde bei 75 °C betrieben. Als Eluent diente eine 5 mM wässrige Lösung von Schwefelsäure. Die Flussrate betrug 0,5 ml min.<sup>-1</sup>. Die Analyten wurden mittels RI-Detektor quantifiziert. Es wurden stets 10 µl verdünnter Probe injiziert. Folgende Elutionszeiten (und Bestimmtheitsmaße) wurden erzielt: MeOH: 24,1 min. (1,000); α-Glucose: 12,1 min. (1,000); α-MG: 13,4 min. (1,000); β-MG: 12,8 min. (0,998); α-EG: 13,9 min.; β-EG: 13,0 min.; α-PG: 15,2 min.; β-PG: 14,1 min.; α-BG: 17,3 min.; β-BG: 15,7 min. Da außer MG kein anderes Alkylierungsprodukt kommerziell erhältlich war und auch nicht kristallisiert werden konnte, wurde angenommen, dass α- und β-Anomere jeweils identische Kalibrationsgeraden aufweisen. Dies wurde in Tietgens (2012) für MG gezeigt. Die Reinheit der jeweils eingedampften Alkylierungsprodukte wurde als proportional zum Anteil des Peaks im Chromatogramm an der Gesamtfläche angenommen. Anfangssteigungen wurden durch lineares Fitten der Konzentrationsverläufe im linearen Bereich bis vier Stunden ermittelt.

<sup>1</sup>Normalphase, hydrophile stationäre Phase

### **Bestimmung der Konzentration von LS und MGL mittels RP-HPLC-Analyse**

Für eine Analyse wurde eine Probe von etwa 300 µl in ein Probengefäß überführt und in der 10-fachen Menge an Eluent aufgenommen. Die Probe wurde vorsichtig im Wasserbad erwärmt, um den Lösungsvorgang zu beschleunigen. Der intakte Enzymträger von Novozym435 sedimentierte innerhalb weniger Sekunden, bevor der Überstand entnommen und bei Bedarf (Trübung durch Abrieb von Enzymträgern oder Molsieben) mittels Filtration durch einen 0,2 µm-Spritzenfilter aus Nylon von einer Trübung durch verbliebene feine Partikel (Abrieb von Enzymträger oder Molsieben) befreit wurde. Wenn auch Wasserbestimmungen mittels KF-Titration durchgeführt wurden, wurde von der dafür vorbereiteten Probenlösung ein geringer Teil für die RP-HPLC-Analyse verwendet. Die chromatografische Analyse erfolgte in einer Agilent-1200-HPLC-Anlage. Die RP-Säule Nucleodur C18 Pyrimid (Machery Nagel) wurde bei 40 °C betrieben. Als Eluent diente eine Mischung aus 90 %-vol Methanol und 10 %-vol Wasser, die durch Zugabe von 2 ml l<sup>-1</sup> Ameisensäure auf einen pH-Wert von etwa 3 eingestellt wurde. Dadurch wurden die in der Probe enthaltenen Fettsäuren vollständig protoniert, sodass sie als unpolare Moleküle stärker mit der unpolaren stationären Phase wechselwirken konnten. Die Flussrate betrug 0,5 ml min.<sup>-1</sup>. Die Analyten wurden mittels RI-Detektor quantifiziert. Es wurden stets 10 µl verdünnter Probe injiziert. Folgende Elutionszeiten (und Bestimmtheitsmaße) wurden erzielt: Laurinsäure: 10,8 min. (0,999); MGL: 9,1 min.; MG: 6,1 min. (1,000); sowie Urea: 6,2 min. (1,000), Cholinchlorid: 5,1 min. (1,000).

### **Bestimmung der Größe von Cellulosepartikeln mittels Hellfeldmikroskopie**

Die Proben wurden auf einen Mikroskop-Objekträger gegeben und möglichst ohne Luft einschüsse mit einem Deckgläschen abgedeckt. Es wurden an drei verschiedenen Stellen der Probe beliebige Partikel ausgewählt und bei 400-facher Vergrößerung und einer Helligkeit von 4,5 im Hellfeld digitale Aufnahmen gemacht (Belichtungszeit 43,3 ms, Gamma 1,40, Scale 10 µm, Gain 1x, Saturation 0,00) Durch Kalibrierung vor jeder Messung mithilfe der Markierungen einer Neubauer-Zählkammer konnte ein Maßstab in jedes Bild eingeblendet werden, und so die Abmessungen jedes Partikels ermittelt werden. Unter der vereinfachenden Annahme, dass die Partikel zylindrisch sind, konnte aus Durchmesser (geringere Abmessung) und Länge (größere Abmessung) das Volumen jedes Partikels berechnet werden. Durch Dreifach-Bestimmung wurden die Volumina gemittelt und konnten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken gegen die Inkubationsdauer aufgetragen werden. Die Anfangssteigung als relatives Maß für die Lösungsgeschwindigkeit

wurde einem exponentiellen Fit entnommen:

$$V(t) = V_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (\text{B.7})$$

$V$ : Volumen [ $\mu\text{m}^3$ ]

$V_0$ : Anfangsvolumen [ $\mu\text{m}^3$ ]

$k$ : Anfangssteigung von  $V(t)/V_0$  [ $\text{s}^{-1}$ ]

$$\Rightarrow \frac{dV}{dt} = -k \cdot V_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

$$\Rightarrow \frac{dV(t=0)}{dt} = -k \cdot V_0 \quad (\text{B.8})$$

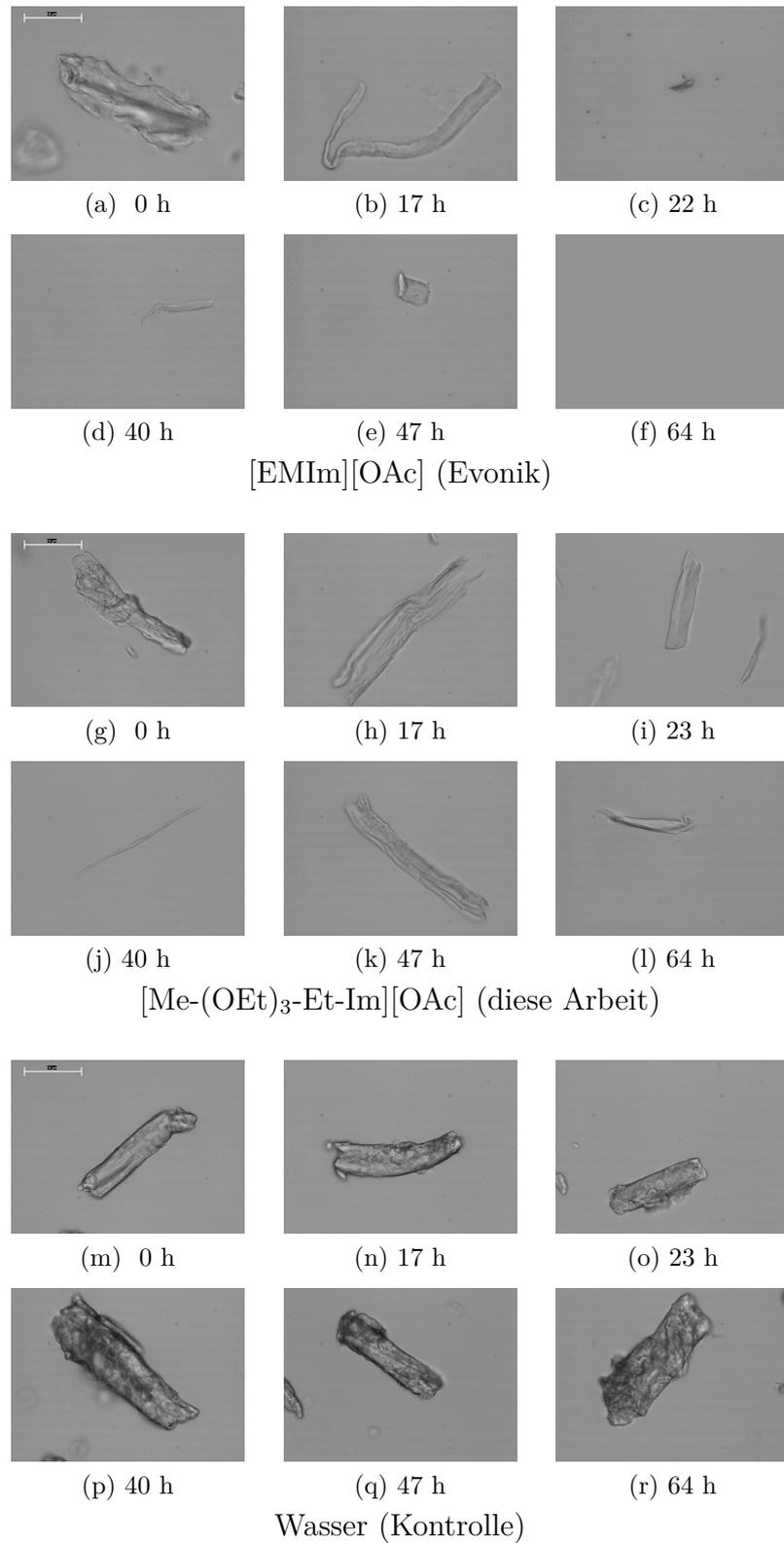


Abbildung B.1: (An-)Lösungsversuche mit Cellulose

## Rheometrie

Eine dem Reaktionsgemisch zu Anfang der Reaktion (Umsatz  $X = 0$ ) entsprechende Emulsion eines equimolaren Ansatzes von LS und MG mit 80 %-mol DES wurde rheologisch untersucht, um die besonderen Eigenschaften dieses zweiphasigen Systems zu berücksichtigen. Dazu wurde der Ansatz für eine Veresterung im Glasreaktor vorbereitet, jedoch ohne die Zugabe von Enzym. Die Messungen wurden mit einem Platte-Platte-Aufbau mit einem Spalt von 5 mm bei 80 °C durchgeführt. Es wurden Proben von 0,9 ml<sup>2</sup> auf die Platte gegeben, um sicherzustellen, dass der Messraum vollständig mit Probe gefüllt ist. Logarithmisch-equidistante Scherraten von 2 s<sup>-1</sup> bis 2000 s<sup>-1</sup> wurden eingestellt, die jeweils sich aufbauende Schubspannung gemessen, und beides gegeneinander aufgetragen mit mithilfe eines Herschel-Bulkley-Ansatzes gefittet (Gleichung B.9, Abbildung B.2).

$$\frac{\eta_{\text{eff}}}{\text{Pa}\cdot\text{s}} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \frac{0,0549}{\frac{\dot{\gamma}}{\text{s}^{-1}}} + 0,0488 \left( \frac{\dot{\gamma}}{\text{s}^{-1}} \right)^{0,0895} \quad (\text{B.9})$$

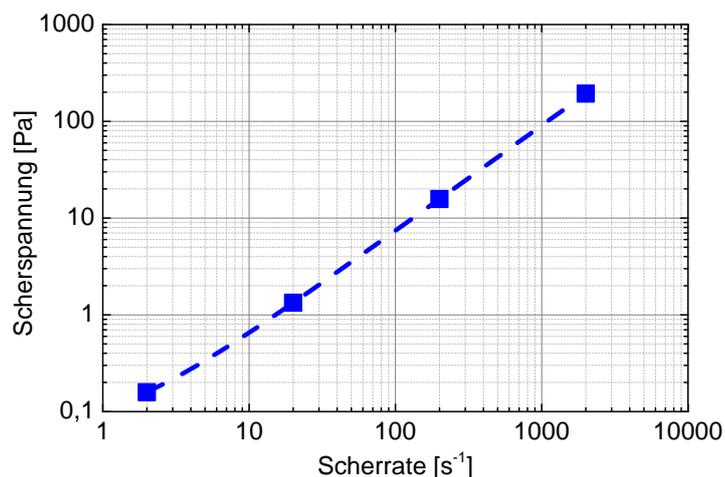


Abbildung B.2: Fließkurve des Reaktionsgemisches aus 80 %-mol DES und jeweils 10 %-mol LS und MG (Bestimmtheitsmaß  $R_{\text{kor}}^2$  des Fits beträgt 1,000)

<sup>2</sup>Rechnerisch beträgt das Volumen zwischen den beiden Platten etwa 0,6 ml, während die Software 0,7 ml empfiehlt.

## B.1.1 Berechnungen und Abschätzungen

### Physikalische Eigenschaften disperser Systeme

Zur Ermittlung des spezifischen Leistungseintrags wurden die Phasenanteile, Dichten und Viskositäten von Emulsionen und Suspensionen nach den Gleichungen 3.15, 3.16 oder 3.17 auf Seite 45 gemittelt. Dabei wurde angenommen, dass alle Mischungen sich wie Newtonsche Fluide verhalten. Insbesondere für das Gemisch DES:MG:LS (8:1:1) wurden nur geringe Abweichungen von Newtonscher Viskosität gezeigt (Abbildung B.2 und Gleichung B.9 auf der vorherigen Seite).

**Lösungsmittelfrei (0 %-mol DES), Substrate äquimolar** Es wird vereinfachend angenommen, dass sich das MG nicht in der LS löst.

$$\begin{aligned}\phi_{\text{MG}} &= \frac{V_{\text{MG}}}{V_{\text{MG}} + V_{\text{LS}}} & V_i &= \frac{m_i}{\rho_i} & m_i &= M_i n_i \\ \Rightarrow \phi_{\text{MG}} &= \frac{M_{\text{MG}}}{\rho_{\text{MG}} \left( \frac{M_{\text{MG}}}{\rho_{\text{MG}}} + \frac{M_{\text{LS}}}{\rho_{\text{LS}}} \right)} = \frac{194,18}{1,46 \left( \frac{194,18}{1,46} + \frac{200,32}{0,848} \right)} \\ &= 0,360\end{aligned}$$

Somit stellt LS die kontinuierliche Phase dar, und MG liegt suspendiert vor.

$$\begin{aligned}\rho_{\text{M}} &= \phi_{\text{d}} \rho_{\text{d}} + (1 - \phi_{\text{d}}) \rho_{\text{k}} \\ &= 0,360 \cdot 1,46 \text{ g cm}^{-3} + (1 - 0,360) \cdot 0,848 \text{ g cm}^{-3} \\ &= 1,07 \text{ g cm}^{-3}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\eta_{\text{S}} &= \eta_{\text{k}} \left[ 1 + \frac{2,5 \phi_{\text{d}}}{2 \left( 1 - \frac{\phi_{\text{d}}}{\phi_{\text{max}}} \right)} \right]^2 \\ &= 3,49 \text{ mPa s} \left[ 1 + \frac{2,5 \cdot 0,36}{2 \left( 1 - \frac{0,36}{0,78} \right)} \right]^2 \\ &= 3,49 \text{ mPa s} \cdot 3,37 \\ &= 11,8 \text{ mPa s}\end{aligned}$$

**40 %-mol DES, Substrate äquimolar** Es wird vereinfachend angenommen, dass MG vollständig in dem DES ChCl:U (1:2) gelöst ist, und dass MG in DES kein Exzessvolumen besitzt, d. h. ihre Volumina tragen vollständig zum Gesamtvolumen bei.

$$\phi_{\text{LS}} = \frac{V_{\text{LS}}}{V_{\text{LS}} + V_{\text{DES/MG}}} \quad V_i = \frac{m_i}{\rho_i} \quad m_i = M_i n_i$$

$$V_{\text{LS}} = \frac{M_{\text{LS}} n_{\text{LS}}}{\rho_{\text{LS}}} = \frac{M_{\text{LS}} \cdot 0,3 \cdot n_{\text{gesamt}}}{\rho_{\text{LS}}}$$

$$V_{\text{DES/MG}} = V_{\text{DES}} + V_{\text{MG}}$$

$$V_{\text{DES}} = \frac{M_{\text{ChCl}} \cdot 1/3 \cdot 0,4 \cdot n_{\text{gesamt}} + M_{\text{U}} \cdot 2/3 \cdot 0,4 \cdot n_{\text{gesamt}}}{\rho_{\text{DES}}}$$

$$V_{\text{MG}} = \frac{M_{\text{MG}} \cdot 0,3 \cdot n_{\text{gesamt}}}{\rho_{\text{MG}}}$$

$$\begin{aligned} \Rightarrow \phi_{\text{LS}} &= \frac{\frac{M_{\text{LS}} \cdot 0,3}{\rho_{\text{LS}}}}{\frac{M_{\text{LS}} \cdot 0,3}{\rho_{\text{LS}}} + \frac{M_{\text{ChCl}} \cdot 1/3 \cdot 0,4 + M_{\text{U}} \cdot 2/3 \cdot 0,4}{\rho_{\text{DES}}} + \frac{M_{\text{MG}} \cdot 0,3}{\rho_{\text{MG}}}} \\ &= \frac{\frac{200,32 \cdot 0,3}{0,848}}{\frac{200,32 \cdot 0,3}{0,848} + \frac{139,62 \cdot 1/3 \cdot 0,4 + 60,06 \cdot 2/3 \cdot 0,4}{1,16} + \frac{194,18 \cdot 0,3}{1,46}} \\ &= 0,504 \end{aligned}$$

Aufgrund der höheren Dichte und Viskosität der DES wird davon ausgegangen, dass bei einem Phasenanteil von etwa 0,5 die Fettsäure die dispergierte Phase darstellt.

$$\begin{aligned} \rho_M &= \phi_d \rho_d + (1 - \phi_d) \rho_k \quad \rho_k = \rho_{\text{DES/MG}} = \frac{m_{\text{DES}} + m_{\text{MG}}}{V_{\text{DES}} + V_{\text{MG}}} \\ m_{\text{DES}} &= M_{\text{ChCl}} \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,4 \cdot n_{\text{gesamt}} + M_{\text{U}} \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,4 \cdot n_{\text{gesamt}} \\ m_{\text{MG}} &= M_{\text{MG}} \cdot 0,3 \cdot n_{\text{gesamt}} \\ V_{\text{DES}} &= \frac{M_{\text{ChCl}} \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,4 \cdot n_{\text{gesamt}} + M_{\text{U}} \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,4 \cdot n_{\text{gesamt}}}{\rho_{\text{DES}}} \\ V_{\text{MG}} &= \frac{M_{\text{MG}} \cdot 0,3 \cdot n_{\text{gesamt}}}{\rho_{\text{MG}}} \\ \Rightarrow \rho_M &= \phi_d \rho_d + (1 - \phi_d) \cdot \frac{M_{\text{ChCl}} \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,4 + M_{\text{U}} \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,4 + M_{\text{MG}} \cdot 0,3}{\frac{M_{\text{ChCl}} \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,4 + M_{\text{U}} \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,4}{\rho_{\text{DES}}} + \frac{M_{\text{MG}} \cdot 0,3}{\rho_{\text{MG}}}} \\ &= 0,504 \cdot 0,848 \text{ g cm}^{-3} + \\ &\quad + (1 - 0,504) \cdot \frac{139,62 \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,4 + 60,06 \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,4 + 194,18 \cdot 0,3}{\frac{139,62 \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,4 + 60,06 \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,4}{1,16} + \frac{194,18 \cdot 0,3}{1,46}} \text{ g cm}^{-3} \\ &= 1,09 \text{ g cm}^{-3} \end{aligned}$$

Schließlich wird angenommen, dass die in dem DES gelösten Saccharidmoleküle die Viskosität der Lösung nicht beeinflussen.

$$\begin{aligned} \eta_E &= \eta_d^{\phi_d} \eta_k^{1-\phi_d} \\ &= (3,49 \text{ mPa s})^{0,504} \cdot (28,1 \text{ mPa s})^{1-0,504} \\ &= 9,82 \text{ mPa s} \end{aligned}$$

**80 %-mol DES, Substrate äquimolar** Es wird vereinfachend angenommen, dass MG vollständig in dem DES ChCl:U (1:2) gelöst ist, und dass MG in DES kein Exzessvolumen besitzt, d. h. ihre Volumina tragen vollständig zum Gesamtvolumen bei.

$$\phi_{\text{LS}} = \frac{V_{\text{LS}}}{V_{\text{LS}} + V_{\text{DES/MG}}} \quad V_i = \frac{m_i}{\rho_i} \quad m_i = M_i n_i$$

$$V_{\text{LS}} = \frac{M_{\text{LS}} n_{\text{LS}}}{\rho_{\text{LS}}} = \frac{M_{\text{LS}} \cdot 0,1 \cdot n_{\text{gesamt}}}{\rho_{\text{LS}}}$$

$$V_{\text{DES/MG}} = V_{\text{DES}} + V_{\text{MG}}$$

$$V_{\text{DES}} = \frac{M_{\text{ChCl}} \cdot 1/3 \cdot 0,8 \cdot n_{\text{gesamt}} + M_{\text{U}} \cdot 2/3 \cdot 0,8 \cdot n_{\text{gesamt}}}{\rho_{\text{DES}}}$$

$$V_{\text{MG}} = \frac{M_{\text{MG}} \cdot 0,1 \cdot n_{\text{gesamt}}}{\rho_{\text{MG}}}$$

$$\begin{aligned} \Rightarrow \phi_{\text{LS}} &= \frac{\frac{M_{\text{LS}} \cdot 0,1}{\rho_{\text{LS}}}}{\frac{M_{\text{LS}} \cdot 0,1}{\rho_{\text{LS}}} + \frac{M_{\text{ChCl}} \cdot 1/3 \cdot 0,8 + M_{\text{U}} \cdot 2/3 \cdot 0,8}{\rho_{\text{DES}}} + \frac{M_{\text{MG}} \cdot 0,1}{\rho_{\text{MG}}}} \\ &= \frac{\frac{200,32 \cdot 0,1}{0,848}}{\frac{200,32 \cdot 0,1}{0,848} + \frac{139,62 \cdot 1/3 \cdot 0,8 + 60,06 \cdot 2/3 \cdot 0,8}{1,16} + \frac{194,18 \cdot 0,1}{1,46}} \\ &= 0,244 \end{aligned}$$

Somit stellt LS die diskontinuierliche Phase dar, welche durch die DES-Phase emulgiert wird.

$$\begin{aligned} \rho_M &= \phi_d \rho_d + (1 - \phi_d) \rho_k \quad \rho_k = \rho_{\text{DES/MG}} = \frac{m_{\text{DES}} + m_{\text{MG}}}{V_{\text{DES}} + V_{\text{MG}}} \\ m_{\text{DES}} &= M_{\text{ChCl}} \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,8 \cdot n_{\text{gesamt}} + M_U \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,8 \cdot n_{\text{gesamt}} \\ m_{\text{MG}} &= M_{\text{MG}} \cdot 0,1 \cdot n_{\text{gesamt}} \\ V_{\text{DES}} &= \frac{M_{\text{ChCl}} \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,8 \cdot n_{\text{gesamt}} + M_U \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,8 \cdot n_{\text{gesamt}}}{\rho_{\text{DES}}} \\ V_{\text{MG}} &= \frac{M_{\text{MG}} \cdot 0,1 \cdot n_{\text{gesamt}}}{\rho_{\text{MG}}} \\ \Rightarrow \rho_M &= \phi_d \rho_d + (1 - \phi_d) \cdot \frac{M_{\text{ChCl}} \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,8 + M_U \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,8 + M_{\text{MG}} \cdot 0,1}{\frac{M_{\text{ChCl}} \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,8 + M_U \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,8}{\rho_{\text{DES}}} + \frac{M_{\text{MG}} \cdot 0,1}{\rho_{\text{MG}}}} \\ &= 0,244 \cdot 0,848 \text{ g cm}^{-3} + \\ &\quad + (1 - 0,244) \cdot \frac{139,62 \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,8 + 60,06 \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,8 + 194,18 \cdot 0,1}{\frac{139,62 \cdot \frac{1}{3} \cdot 0,8 + 60,06 \cdot \frac{2}{3} \cdot 0,8}{1,16} + \frac{194,18 \cdot 0,1}{1,46}} \text{ g cm}^{-3} \\ &= 1,13 \text{ g cm}^{-3} \end{aligned}$$

Schließlich wird angenommen, dass die in dem DES gelösten Saccharidmoleküle die Viskosität der Lösung nicht beeinflussen.

$$\begin{aligned} \eta_E &= \eta_d^{\phi_d} \eta_k^{1-\phi_d} \\ &= (3,49 \text{ mPa s})^{0,244} \cdot (28,1 \text{ mPa s})^{1-0,244} \\ &= 16,9 \text{ mPa s} \end{aligned}$$

### Bestimmung des Leistungseintrags für verschiedene Systeme

**Propeller-Rührer** Alle Untersuchungen zum Leistungseintrag im Reaktor mit Propeller-rührer wurden in einem 50 ml-Rundkolben mit 49,7 g Reaktionsgemisch (DES:MG:LS = 8:1:1) oder 37,7 g Reaktionsgemisch (DES:MG:LS = 0:1:1) bei 80 °C und 50 mbar mit einer Drehfrequenz von 800 rpm durchgeführt. An dieser Stelle wird beispielhaft der spezifische Leistungseintrag für den Rührkessel mit Propellerrührer und einem Reaktionsgemisch von DES:MG:LS (8:1:1) bestimmt. Alle weiteren Ermittlungen der spezifischen

Rührer-Leistung erfolgen analog.

Zur Ermittlung der Leistungskennzahl muss zunächst aus dem Schergefälle die Viskosität ermittelt werden:

Der Durchmesser einer Kugel mit 50 ml Volumen beträgt

$$D = \left( \frac{6V}{\pi} \right)^{\frac{1}{3}} = \left( \frac{6 \cdot 50 \text{ ml}}{\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \\ = 4,57 \text{ cm}$$

Mit einem Rührerdurchmesser von 2,6 cm ergibt sich ein Abstand zur Behälterwand von

$$\Delta = \frac{D - d}{2} = \frac{4,57 \text{ cm} - 2,6 \text{ cm}}{2} \\ = 0,985 \text{ cm}$$

Der Rührer hat bei einer Drehfrequenz von  $13,3 \text{ s}^{-1}$  eine Umfangsgeschwindigkeit von

$$u = U n = \pi d n = \pi \cdot 2,6 \text{ cm} \cdot 13,3 \text{ s}^{-1} \\ = 109 \text{ cm s}^{-1}$$

Somit kann das Schergefälle abgeschätzt werden zu

$$\dot{\gamma} = \frac{u}{\Delta} = \frac{109 \text{ cm s}^{-1}}{0,985 \text{ cm}} \\ = 111 \text{ s}^{-1}$$

Und die Viskosität ergibt sich mit Gleichung B.9 zu:

$$\eta_{\text{eff}} = \frac{0,0549 \text{ Pa}}{111 \text{ s}^{-1}} + 0,0488 \cdot (111 \text{ s}^{-1})^{0,0895} \\ = 74,9 \text{ mPa s}$$

Mithilfe der Stoffwerte der Emulsion kann nun mit Gleichung 3.7 auf Seite 38 die

Reynolds-Zahl berechnet werden:

$$Re = \frac{\rho n d^2}{\eta} = \frac{1,13 \text{ g cm}^{-3} \cdot 13,3 \text{ s}^{-1} \cdot (2,6 \text{ cm})^2}{74,9 \text{ mPa s}}$$

$$= 136$$

Anhand der Leistungscharakteristik in Abbildung B.3 lässt sich nun die Newton-Zahl grafisch ermitteln:

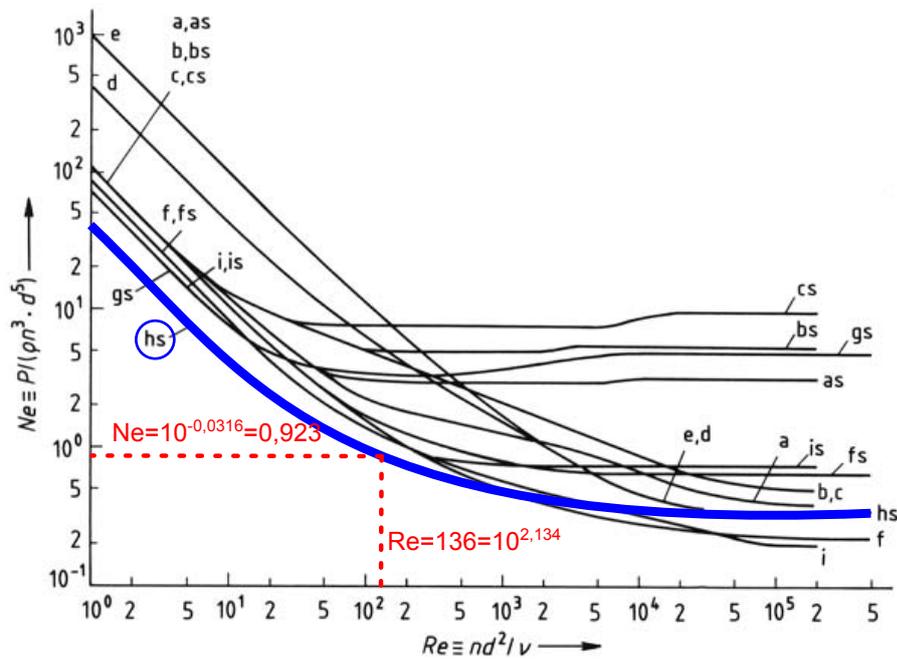


Abbildung B.3: Ermittlung des spezifischen Energieeintrages mit Propellerrührer nach Zlokarnik (2012)

Mit Gleichung 3.8 auf Seite 38 kann daraus der Leistungseintrag berechnet werden:

$$Ne = \frac{P}{\rho n^3 d^5}$$

$$\Rightarrow P = Ne \rho n^3 d^5$$

$$= 0,923 \cdot 1,13 \text{ g cm}^{-3} \cdot (13,3 \text{ s}^{-1})^3 \cdot (2,6 \text{ cm})^5$$

$$= 29,2 \text{ mW}$$

Somit beträgt der spezifische Leistungseintrag

$$\begin{aligned}\frac{P}{m} &= \frac{29,2 \text{ mW}}{49,7 \text{ g}} \\ &= 0,588 \frac{\text{mW}}{\text{g}}\end{aligned}$$

Für das Gemisch DES:MG:LS (0:1:1) erhält man:

$$\frac{P}{m} = 0,426 \frac{\text{mW}}{\text{g}}$$

**Wendel-Rührer** Alle Untersuchungen zum Leistungseintrag im Reaktor mit Wendel-Rührer wurden in einem zylindrischen Reaktor mit einem Innendurchmesser von 5,1 cm bei 80 °C und 50 mbar und mit einem Rührer mit 4,6 cm Durchmesser bei einer Drehfrequenz von 300 rpm durchgeführt. Der Reaktor war bis zu einer Höhe von 4,78 cm (ohne Rührer) mit Reaktionsgemisch (DES:MG:LS = 8:1:1; 110 g) gefüllt. Der spezifische Leistungseintrag wurde analog zur Vorgehensweise ab Seite 130 ermittelt.

**Blasensäule** Alle Untersuchungen zum Leistungseintrag in der Blasensäule wurden in einem Rohr mit einem Innendurchmesser von 2,6 cm bei 80 °C und einem Druckluft-Volumenstrom von 1,0 L min<sup>-1</sup> durchgeführt<sup>3</sup>. Die Blasensäule war (bei ausgeschalteter Begasung) bis zu einer Höhe von 5,52 cm mit Reaktionsgemisch (DES:MG:LS = 8:1:1; 33,1 g) oder bis zu einer Höhe von 17,8 cm mit Reaktionsgemisch (DES:MG:LS = 0:1:1; 101 g) gefüllt. An dieser Stelle wird beispielhaft der spezifische Leistungseintrag für die Blasensäule mit einem Reaktionsgemisch von DES:MG:LS (8:1:1) bestimmt. Alle weiteren Ermittlungen der spezifischen Begasungs-Leistung erfolgen analog.

Mit Gleichung 3.10 auf Seite 41 erhält man als Leistungseintrag:

$$\begin{aligned}P &= h_M \rho_M g \dot{V} \\ &= 5,52 \text{ cm} \cdot 1,13 \text{ g cm}^{-3} \cdot 9,81 \text{ N kg}^{-1} \cdot 1,0 \text{ L min}^{-1} \\ &= 10,20 \text{ mW}\end{aligned}$$

<sup>3</sup>Unter diesen Bedingungen herrscht in wässrigen Medien ein Strömungsregime im Übergangsbereich zwischen homogener Blasenströmung und Kolbenblasenströmung vor (Kraume (2012), Shah u. a. (1982)). Aufgrund höherer Viskosität wurde im Labor jedoch überwiegend die Kolbenblasenströmung beobachtet.

Der spezifische Leistungseintrag ist somit:

$$\begin{aligned}\frac{P}{m} &= \frac{10,20 \text{ mW}}{33,1 \text{ g}} \\ &= 0,311 \frac{\text{mW}}{\text{g}}\end{aligned}$$

Für das Gemisch DES:MG:LS (0:1:1) erhält man die identische spezifische Leistung, weil diese unabhängig von den Eigenschaften des Fluids und (bei unverändertem Durchmesser) einzig zum Volumenstrom der Begasung proportional ist:

$$\begin{aligned}\frac{h_M \rho_M}{m} &= \frac{h_M \rho_M}{h_M \rho_M A} = \frac{1}{A} = \text{konstant} \\ \Rightarrow \frac{P}{m} &= \frac{g \dot{V}}{A} \propto \dot{V}\end{aligned}\quad (\text{B.10})$$

### Fitting für visuelle Hilfe und Anfangssteigung

Bei den hier untersuchten Reaktionsgemischen handelt es sich um mehrphasige Systeme mit entsprechender Makrokinetik, dessen Berücksichtigung nicht im Fokus dieser Arbeit liegt. Es sollen Ergebnisse identischer Versuchsbedingungen untereinander verglichen werden können (z. B. Screening). Die Fits dienen dem Ausgleich von Messwertstreuungen zur Ermittlung von relativen Aktivitäten und als visuelle Hilfslinien im Plot. Zur Vereinfachung wurde eine Formalkinetik 1. Ordnung angenommen, und alle Konzentrations- bzw. IR- sowie Umsatzverläufe entsprechend mit Origin gefittet.

Substratkonzentration:

$$r = \frac{dc}{dt} = -k \cdot c \quad (\text{B.11})$$

$$c(t) = c_0 \cdot e^{-kt} \quad (\text{B.12})$$

Umsatz:

$$X = 1 - \frac{c(t)}{c_0} = 1 - e^{-kt} \quad (\text{B.13})$$

Für Reaktionen, die nicht bis zum vollständigen Umsatz laufen (z. B. Gleichgewichtskontrollierte Reaktionen) wird der Umsatz im Fit wie in Mahmud u. a. (2010) begrenzt:

$$X = (1 - e^{-kt}) \cdot X_{\max} \quad (\text{B.14})$$

Die Anfangssteigung lässt sich aus der Ableitung berechnen:

$$\frac{dX}{dt} = k \cdot e^{-kt} \cdot X_{\max} \quad (\text{B.15})$$

$$\frac{dX(t=0)}{dt} = k \cdot X_{\max} \quad (\text{B.16})$$

In analoger Herangehensweise wurde eine Gleichung zur Beschreibung des IR-Intensitätsverlauf formuliert, welche dem Konzentrationsverlauf des Substrats (Gleichung B.12 auf der vorherigen Seite) folgt. Es wurde dabei vereinfachend angenommen, dass die Signalintensität proportional zur Konzentration ist. Es wurde ein konstanter additiver Term eingeführt, um berücksichtigen zu können, dass die Signalintensität aufgrund von Peak-Überlappung nicht notwendigerweise zu null wird, wenn kein Analyt vorhanden ist (Basislinie). Im Fit kann nicht zwischen Basislinie und Signalintensität bei Endumsatz unterschieden werden, daher stellt der konstante additive Term die Summe aus IR-Signal bei Endumsatz und Basislinie dar. Für die Säure erhält man:

$$IR_{\text{Substrat}}(t) = (IR_0 - IR_{\text{end}}) \cdot e^{-kt} + IR_{\text{end}} \quad (\text{B.17})$$

Für den IR-Intensitätsverlauf des gebildeten Esters erhält man:

$$IR_{\text{Produkt}}(t) = (IR_{\text{end}} - IR_0) \cdot (1 - e^{-kt}) + IR_0 \quad (\text{B.18})$$

Die Anfangssteigung als relatives Maß für die Aktivität erhält man aus der Ableitung am Anfang der Reaktion. Für die Säure ergibt sich:

$$\frac{dIR_{\text{Substrat}}}{dt} = -k \cdot (IR_0 - IR_{\text{end}}) \cdot e^{-kt} \quad (\text{B.19})$$

$$\frac{dIR_{\text{Substrat}}(t=0)}{dt} = -k \cdot (IR_0 - IR_{\text{end}}) \quad (\text{B.20})$$

Und für den Ester erhält man:

$$\frac{dIR_{\text{Produkt}}}{dt} = k \cdot (IR_{\text{end}} - IR_0) \cdot e^{-kt} \quad (\text{B.21})$$

$$\frac{dIR_{\text{Produkt}}(t=0)}{dt} = k \cdot (IR_{\text{end}} - IR_0) \quad (\text{B.22})$$

Bei niedriger Reaktionsgeschwindigkeit bzw. niedrigem Umsatz kann ein Fit nach Kinetik 1. Ordnung stark fehlerbehaftet sein. Gab ein Fit deswegen den gemessenen

Verlauf nicht hinreichend wieder, wurde ein linearer Fit angewendet, und dessen Steigung als Anfangssteigung angenommen. Für sequentielle Reaktionen wurden ebenfalls eine Formalkinetik 1. Ordnung angenommen:



$$c_a(t) = c_{a,0} \cdot e^{-k_1 t} \quad (\text{B.24})$$

$$c_b(t) = \frac{k_1 \cdot c_{a,0}}{k_2 - k_1} \left( e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} \right) \quad (\text{B.25})$$

$$c_c(t) = c_{a,0} \cdot \left( 1 - \frac{k_2 \cdot e^{-k_1 t} - k_1 \cdot e^{-k_2 t}}{k_2 - k_1} \right) \quad (\text{B.26})$$

**Korrigierte Determinationskoeffizienten  $R^2_{\text{korr}}$  der ermittelten Fits** Als Qualitätsmaß für die in dieser Arbeit erstellten Fits wurde der korrigierte Determinationskoeffizient (Bestimmtheitsmaß) angegeben (Gleichung B.27, Tabelle B.1). Im Gegensatz zum nicht korrigierten Determinationskoeffizienten, der umso größer ist je mehr Variablen das Modell beinhaltet (auch wenn diese nicht zum Zusammenhang beitragen), wird er um die Anzahl der Freiheitsgrade bereinigt (Kohn (2005)). Daher kann er bei einem geringen Zusammenhang auch negative Werte annehmen. Er ist Teil des Ergebnisberichts, den Origin ausgibt. Die korrigierten Determinationskoeffizienten der in dieser Arbeit erstellten und dargestellten Fits sind in der Auflistung B.1 auf der nächsten Seite gezeigt.

$$\overline{R}^2 = 1 - \frac{\frac{1}{n-p-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{B.27})$$

$\overline{R}^2$ : korr. Determinationskoeffizient

$n$ : Anzahl der (Stich-)Proben

$p$ : Anzahl der unabhängigen Variablen

$y_i$ : beobachteter Wert

$\hat{y}_i$ : geschätzter Regressionswert

$\bar{y}$ : Mittelwert aller Messwerte

Tabelle B.1: Auflistung der korrigierten Determinationskoeffizienten  $R_{\text{korr}}^2$ 

| Abb. 4.2a | $R_{\text{korr, Säure}}^2$ | $R_{\text{korr, Ester}}^2$ | Abb. 4.3a | $R_{\text{korr, Säure}}^2$ | $R_{\text{korr, Ester}}^2$ |
|-----------|----------------------------|----------------------------|-----------|----------------------------|----------------------------|
| MG        | 0,91857                    | 0,99638                    | CS        | 0,96753                    | 0,98961                    |
| Glucose   | 0,90118                    | 0,95467                    | LS        | 0,91857                    | 0,99638                    |
|           |                            |                            | ÖS        | 0,97716                    | 0,97906                    |

| Abb. 4.6 | $R_{\text{korr, 60}^\circ\text{C}}^2$ | $R_{\text{korr, Reflux}}^2$ | Abb. 4.8     | $R_{\text{korr}}^2$ |
|----------|---------------------------------------|-----------------------------|--------------|---------------------|
| MG       | 0,99581                               | 0,99943                     | Glucose      | 0,97860             |
| EG       | 0,99753                               | 0,98899                     | $\alpha$ -EG | 0,99757             |
| PG       | 0,99545                               | 0,98662                     | $\beta$ -EG  | 0,99394             |
| BG       | 0,97263                               | 0,99561                     |              |                     |

| Abb. 4.9a | $R_{\text{korr}}^2$ | Abb. 4.10a | $R_{\text{korr, Säure}}^2$ | $R_{\text{korr, Ester}}^2$ |
|-----------|---------------------|------------|----------------------------|----------------------------|
| MG        | 0,95120             | Glucose    | 0,90118                    | 0,95467                    |
| EG        | 0,99958             | Cellulose  | 0,32175                    | 0,07222                    |

| Abb. 4.11a | $R_{\text{korr, Säure}}^2$ | $R_{\text{korr, Ester}}^2$ |
|------------|----------------------------|----------------------------|
| MG         | 0,99746                    | 0,99111                    |
| HEC        | 0,99999                    | 0,84731                    |
| HES        | 0,96858                    | 0,84731                    |
| CBOA       | 0,99765                    | -0,28756                   |
| HPC        | 0,43481                    | -0,33253                   |

| Abb. 4.19                             | $R_{\text{korr}}^2$ |
|---------------------------------------|---------------------|
| Novozym435 LC200230                   | 0,95901             |
| Lipozym435 LC200244                   | 0,99579             |
| SPRIN epobond CALB SB101214/CALSEP    | 0,90941             |
| SPRIN actiplus CALB SB101215/CALS9LX2 | 0,95272             |
| c-LEcta CALB immo BE 2-135-4          | 0,95092             |
| c-LEcta CALB immo BE 0038             | 0,75608             |

| Abb. 4.20a         | $R_{\text{korr}}^2$ | Abb. 4.24a                             | $R_{\text{korr}}^2$ |
|--------------------|---------------------|--|---------------------|
| Novozym435 (nativ) | 0,99794             | Novozym435                             | 0,87900             |
| Novozym435-Träger  | 0,04261             | Novozym435 (80 °C)                     | 0,95002             |
| Amberlyst 15       | 1,00000             | Lipase <i>C. cylindrica</i>            | 0,56057             |
|                    |                     | Lipase B lyophil. <i>C. antarctica</i> | 0,91906             |
|                    |                     | Lipase OF <i>C. rugosa</i>             | 0,92988             |
|                    |                     | Lipase CLEA <i>C. rugosa</i>           | 0,75941             |
|                    |                     | Referenz (ohne Enzym)                  | 0,67796             |

| Abb. 4.25a  | $R_{\text{korr, Säure}}^2$ | $R_{\text{korr, Ester}}^2$ |
|-------------|----------------------------|----------------------------|
| LöMi-frei   | 0,97716                    | 0,97906                    |
| [BMIm][TfO] | -0,30527                   | 0,07413                    |
| tBuOH       | 0,99737                    | 0,98982                    |

| Abb. 4.26a       | $R_{\text{korr}}^2$ |
|------------------|---------------------|
| LöMi-frei, 60 °C | 0,95555             |
| DES, 80 °C       | 0,89334             |

| Abb. 4.28a   | $R_{\text{korr}}^2$ |
|--|---------------------|
| [EMIm][OAc] (Evonik)   | 0,35650             |
| [EMIm][DCA] (Evonik)   | 0,29501             |
| [EMIm][SCN] (Evonik)   | 0,75075             |
| [BMIm][TfO] (Evonik)   | 0,16906             |
| [BMIm][TfO] (Merck)  | -0,24673            |
| [BMIm][PF <sub>6</sub> ] (Merck)                               | -0,21915            |
| [BMIm][Tf <sub>2</sub> N] (Merck)                              | -0,19088            |
| [Me-(OEt) <sub>3</sub> -Et-Im][OAc] (diese Arbeit)             | 0,26682             |
| NaOH   | 0,51087             |
| NaOH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                           | -0,23838            |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                                 | 0,08566             |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 0,59384             |
| H <sub>2</sub> O   | -0,24997            |

| Abb. 4.29a        | $R_{\text{korr}}^2$ |
|-------------------|---------------------|
| 0 %-mol DES Prop  | 0,99659             |
| 0 %-mol DES BC    | 0,99969             |
| 40 %-mol DES Prop | -5,66821            |
| 80 %-mol DES Wend | 0,99409             |
| 80 %-mol DES Prop | 0,98825             |
| 80 %-mol DES BC   | 0,95350             |

## B.2 Präparationen und Synthesen

### Veresterungen in 1,5 ml-Vials (Substratscreening)

2 mmol Fettsäure (LS, ÖS, CS), 0,7 mmol Saccharid (Glucose, MG, Cellulose als AGU), 100 mg Molsiebe (3 Å Porengröße, 15 % Wasseradsorptionskapazität) und 100 %-wt<sub>Substrate</sub> bzw. 0 %-wt<sub>Substrate</sub> [BMIm][TfO] wurden in ein HPLC-Probengefäß (1,5 ml, Schraubverschluss, PTFE-beschichtete Dichtung) gegeben. Die Substrate wurden bei 60 °C und 1500 rpm vorgemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 %-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435 gestartet.

Es wurden Proben von 50 µl nach Separation der Phasen (Molsiebe, Novozym435, Saccharid, FS, IL) aus der oberen Phase (FS hat geringste Dichte) entnommen und mittels Offline-ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht. Die erhaltenen Signalverläufe von FS und Ester wurden mit einer Formalkinetik 1. Ordnung gefittet, die Anfangssteigungen aus den ermittelten Parametern berechnet.

### Veresterungen in 5 ml-Vials in tBuOH (Substratscreening)

1,5 g ÖS, 0,5 g Saccharid (MG, HEC, HES, CBOA, HPC), 0,6 g Molsiebe (3 Å Porengröße, 15 % Wasseradsorptionskapazität) wurden in einem 5 ml-Vial mit Schraubverschluss eingewogen, mit 1 ml tBuOH versetzt und bei 60 °C und 6 rpm im Überkopfmischer vorge-mischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mg Novozym435 gestartet.

Es wurden Proben von 50 µl nach Separation der Feststoffe (Molsiebe, Novozym435, Saccharid) aus der flüssigen Phase entnommen und mittels Offline-ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht. Aufgrund erheblicher Bandenüberlappung mussten die Banden anhand der Minima in der zweiten Ableitung der Spektren lokalisiert werden. Die erhalte-

nen Signalverläufe von FS und Ester wurden mit einer Formalkinetik 1. Ordnung gefittet, die Anfangssteigungen aus den ermittelten Parametern berechnet.

### **Synthese von Alkylglucosiden**

Der saure Ionentauscher Amberlyst 15 wurde vor der Benutzung mit Wasser und Methanol gewaschen, in 2 % methanolischer Schwefelsäure aktiviert, und schließlich dreimal in Methanol gewaschen.

25 g  $\alpha$ -Glucose wurden im Mörser zerrieben und mit dem Ionentauscher in einen 250 ml-Glasreaktor gegeben. 75 ml des jeweiligen Alkohols wurden genutzt, um den Ionentauscher aus dem Wägegefäß und Glucose aus dem Mörser in den Reaktor zu spülen bzw. der Rest direkt in den Reaktor gegeben. Um die mechanische Belastung auf den Ionentauscher (Zermahlen) gering zu halten, wurde ein Fish-Clip-Hängerührer mit Magnetstäbchen eingesetzt. Die Drehzahl wurde so eingestellt, dass eine vollständige Suspension etabliert wurde. Ein Reflux-Kondensator erlaubte den drucklosen Betrieb auch bei Sieden des Alkohols (Reflux). Die Reaktion wurde durch Öffnen des Temperierkreislaufts gestartet. Nach Ausschalten des Magnetrührers und Sedimentation der festen Bestandteile (Glucose, Amberlyst 15) wurden Proben mit einem Volumen von 100  $\mu$ l mithilfe einer Glasspritze mit ausreichend langer Kanüle durch einen Verschlussstopfen aus Silikon entnommen und in Eluent für die NP-HPLC-Analyse verdünnt. Zur Aufreinigung der Produkte wurde zunächst der Ionentauscher in einem temperierten Büchnertrichter mit Filterpapier abfiltriert. Das Filtrat wurde in einem Rundkolben auf 4 °C abgekühlt. Durch Umwickeln des Kolbens mit Aluminiumfolie wurde die Abkühlung verlangsamt. Wenn nötig, wurde versucht die Kristallisation durch Ankratzen der Innenwand in der Flüssigkeit mit einem Spatel zu initiieren. Wenn dennoch keine Kristallisation eintrat, wurde versucht, das Produkt durch vollständiges Abziehen des Alkohols unter Vakuum zu kristallisieren oder durch Zugabe von Hexan aus Ethylacetat umzukristallisieren.

### **Veresterungen in Glasreaktoren**

Die Substrate wurden in den Reaktor gegeben, unter Vakuum bei Reaktionstemperatur geschmolzen und mit einem Fish-Clip-Hängemagnetrührer mit 500 rpm oder einem Propellerrührer mit 800 rpm gemischt. Zur Durchführung der Reaktion in Anwesenheit von DES wurden zunächst Cholinchlorid und Urea außerhalb des Reaktors vorgemischt, im Reaktor unter Vakuum bei Reaktionstemperatur geschmolzen und gemischt, und schließlich wurde das Saccharid hinzugegeben. Sobald eine einphasige, klare Lösung vorlag, wurde die Fettsäure hinzugegeben, geschmolzen und emulgiert. Durch Zugabe von

5 %-wt<sub>Substrate</sub> wurde die Reaktion gestartet. Unter Normaldruck und bei eingeschaltetem Rührer wurden Proben von etwa 300 µl mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und daraus die Laurinsäurekonzentration titrimetrisch oder mittels RP-HPLC bestimmt sowie die Wasserkonzentration mittels KF-Titration. Dabei musste zügig vorgegangen werden, damit die Probe nicht vollständig in der Pipettenspitze erstarrt. Für genauere Untersuchungen wurde daraus und aus zugehörigen also zeitgleich aufgezeichneten ATR-FTIR-Spektren ein chemometrisches Modell erstellt, mit dessen Hilfe die zeitaufgelöste Bestimmung der Laurinsäurekonzentration und somit des Umsatzverlauf durch Online-ATR-FTIR-Spektroskopie möglich war. Dazu wurde die Sonde des FTIR-Spektrometers (Mettler Toledo) derart im Reaktor fixiert, dass ihr ATR-Kristall ausreichend angeströmt wurde.

### **Veresterungen in Blasensäulen**

Die Substrate wurden in die Blasensäule gegeben, unter Begasung mit 1,0 L min<sup>-1</sup> bei Reaktionstemperatur geschmolzen und gemischt. Zur Durchführung der Reaktion in Anwesenheit von DES wurden zunächst Cholinchlorid und Urea außerhalb der Blasensäule vorgemischt, in der Blasensäule unter Begasung mit 1,0 L min<sup>-1</sup> bei Reaktionstemperatur geschmolzen und gemischt, und schließlich wurde das Saccharid hinzugegeben. Sobald eine einphasige, klare Lösung vorlag, wurde die Fettsäure hinzugegeben, geschmolzen und emulgiert. Durch Zugabe von 5 %-wt<sub>Substrate</sub> wurde die Reaktion gestartet. Innerhalb von drei Tagen konnte gravimetrisch kein Austrag von Reaktionsgemisch (Leiten des Abgases durch Gaswaschflasche mit Watte) nachgewiesen werden. Auch die Identität der Reaktionsverläufe in Blasensäule und Rührkessel ohne Einsatz von DES spricht gegen einen relevanten Verlust an Reaktionsgemisch bzw. Fettsäure durch die Begasung. Bei eingeschalteter Begasung wurden mit einer 5 ml-Einwegpipette Proben von 100 µl bis 900 µl entnommen und daraus die Laurinsäurekonzentration titrimetrisch oder mittels RP-HPLC bestimmt sowie die Wasserkonzentration mittels KF-Titration. Dabei musste zügig vorgegangen werden, damit die Probe nicht vollständig in der Pipettenspitze erstarrt.

### **Propyllaurat-Assay**

Je 80 mmol Laurinsäure und 1-Propanol sowie 36 mmol Wasser wurden bei 60 °C in einem 50 ml-Glasreaktor mit einem Propellerrührer bei 500 rpm homogenisiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 %-wt<sub>Substrate</sub> Novozym435 gestartet. Proben von 300 µl wurden titrimetrisch auf ihren Gehalt an Laurinsäure untersucht. Die Anfangssteigung

wurde mittels Fit einer Kinetik 1. Ordnung bestimmt. 1 PLU<sup>4</sup> entspricht der Umsetzung von 1  $\mu\text{mol}$  Substrat innerhalb von 1 min.

### **Desorption von Lipase vom Träger**

In einen 500 ml-Zweihals-Rundkolben wurden 250 ml einer wässrigen 50 %-vol Acetonitrillösung auf 70 °C erwärmt. 2,5 g eines Enzympräparats wurden hinzugegeben und für 15 min. mit einem Hängemagnetstäbchen (*Fish-Clip*) suspendiert. Nach Sedimentation wurde der Überstand mithilfe einer Pipette entfernt, und die verbliebenen Partikel dreimal mit jeweils 250 ml destilliertem Wasser gewaschen, d. h. suspendiert, sedimentiert, und der Überstand mithilfe einer Pipette entfernt. Anschließend wurden die Partikel über Nacht bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Diese Methode ist angelehnt an Scholz (2009).

### **Chlorierung von PEG-Disäure mittels Thionylchlorid**

100 mmol (60 g) PEG600-Disäure (entspricht 200 mmol Carboxylfunktionen) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von  $600 \text{ g mol}^{-1}$  wurden in einem 250 ml-Rundkolben vorgelegt und bei Raumtemperatur (18 °C) und 6 mbar entgast, bis die Schaumbildung endete. Der Kolben wurde mithilfe einer Kanüle für 20 min. mit etwa  $1,0 \text{ L min}^{-1}$  mit trockenem Stickstoff gespült, bevor durch einen Tropftrichter 400 mmol (29 ml) Thionylchlorid mit etwa einem Tropfen pro Sekunde unter Rühren mittels Magnetrührer bei 250 rpm hinzugegeben wurden. Der Rundkolben war drucklos mit einem Rückflusskondensator und zwei Gaswaschflaschen mit 1 M Natronlauge in Reihe verbunden, in denen gasförmige Reaktionsprodukte ( $\text{HCl}$ ,  $\text{SO}_2$ ) absorbiert und neutralisiert wurden. Der Ansatz wurde über Nacht weiter gerührt. Nach Abschluss der Reaktion (keine weitere Gasbildung) wurde das überschüssige Thionylchlorid bei 30 °C und reduziertem Druck bis zu 5 mbar abdestilliert und in einem Eis-gekühlten Kolben aufgefangen, bis die Gasbildung endete. Das Produkt verblieb bis zur Verwendung in demselben Rundkolben unter Vakuum verschlossen. Bei vollständiger Chlorierung beider Carboxyl-Gruppen aller PEG-Moleküle besitzt das Produkt eine molare Masse von  $636,9 \text{ g mol}^{-1}$ .

### **Chemische Veresterung von Cellulose mit PEG-Acylchlorid**

20 mmol (12,7 g) PEG600-Diacylchlorid (entspricht 40 mmol chlorierte Carboxylfunktionen) wurden in einem Eis-gekühlten 250 ml-Rundkolben vorgelegt und mithilfe einer

---

<sup>4</sup>Propyl laurate unit

Kanüle mit trockenem Stickstoff bei niedriger Flussrate durchspült. 200 mg Cellulose Avicel PH-101 (1,23 mmol AGU  $\cong$  3,7 mmol Hydroxyfunktionen) wurden zusammen mit 100 ml Toluol hinzugegeben. Der Rundkolben war drucklos mit einem Rückflusskondensator verbunden, um Lösungsmittel zurückzuhalten. Über einen Tropftrichter wurden 6 ml (74,3 mmol) Pyridin gelöst in 40 ml Toluol mit etwa einem Tropfen pro Sekunde unter Rühren mittels Magnetrührer bei 250 rpm hinzugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht weiter gerührt und mit Stickstoff bei geringer Flussrate überspült. Nach Abschluss der Reaktion wurden die erhaltenen Feststoffe (bräunlicher Cellulose-PEG600-Disäureester, weißes Pyridiniumhydrochlorid) durch Zentrifugation (4 °C, 6000 rpm, 5 min.) vom klar-gelben Überstand befreit und wiederholt bei Raumtemperatur (18 °C) mit Methanol gewaschen, bis der Überstand keine Gelb-Färbung mehr aufwies. Das aufgereinigte Produkt wurde bei 50 °C und reduziertem Druck über Nacht getrocknet.

### **Enzymatische Veresterung freier Carbonsäuregruppen von Cellulose-PEG600-Disäure-Ester mit Decanol**

800 mg des synthetisierten Cellulose-PEG600-Disäure-Esters wurden mit 8 ml 1-Decanol in einen 8 ml-Glasreaktor gegeben und bei 80 °C und 200 mbar mittels Fish-Clip-Hängemischer mit 700 rpm gemischt. Durch Zugabe von 400 mg Novozym435 wurde die Reaktion gestartet. Es wurden Proben von 500  $\mu$ l entnommen. Diese konnten nicht titrimetrisch analysiert werden, da die Braunfärbung des Gemisches das Erkennen des Farbumschlags des Phenolphthaleins kaschierte. Daher wurden die Proben auf Raumtemperatur (18 °C) abgekühlt, mit Aceton versetzt, und bei 40 °C und 1400 rpm für 5 min. geschüttelt. Der trübe Überstand konnte dann nach kurzer Sedimentation der Enzymträger abgezogen und bei 4 °C mit 21 000 rcf<sup>5</sup> für 5 min erneut zentrifugiert werden. Die Feststoffe des Überstands wurden soe wiederholt mit Aceton gewaschen, um restliches Decanol zu entfernen. Schließlich wurden die Proben in offenen Probengefäßen bei 30 °C im Thermoschüttler im Abzug getrocknet und mittels Offline-ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht.

### **Synthese des ionischen Lösungsmittels [Me-(OEt)<sub>3</sub>-Et-Im][OAc]**

Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift in Zhao u. a. (2008). Nach Synthese, Ionenaustausch, Entfärbung mittels Aktivkohle und Trocknung im Rotationsverdampfer (40 °C, < 60 mbar) und im Vakuumofen (100 °C, < 600 mbar) über eine Woche wurden etwa 35 g blass-bräunliches flüssiges Produkt erhalten, und bis zur Verwendung im Exsikkator

<sup>5</sup>Vielfaches der Erdbeschleunigung (engl. *relative centrifugal force*)

tor gelagert. Anhand einer NMR-Spektroskopischen Untersuchung<sup>6</sup> (s. Abb. B.4) konnte die erzielte Struktur und somit erfolgreiche Synthese verifiziert. Es sind wenige kleine Signale vorhanden, die nicht zugeordnet werden können und somit auf Verunreinigungen hindeuten.

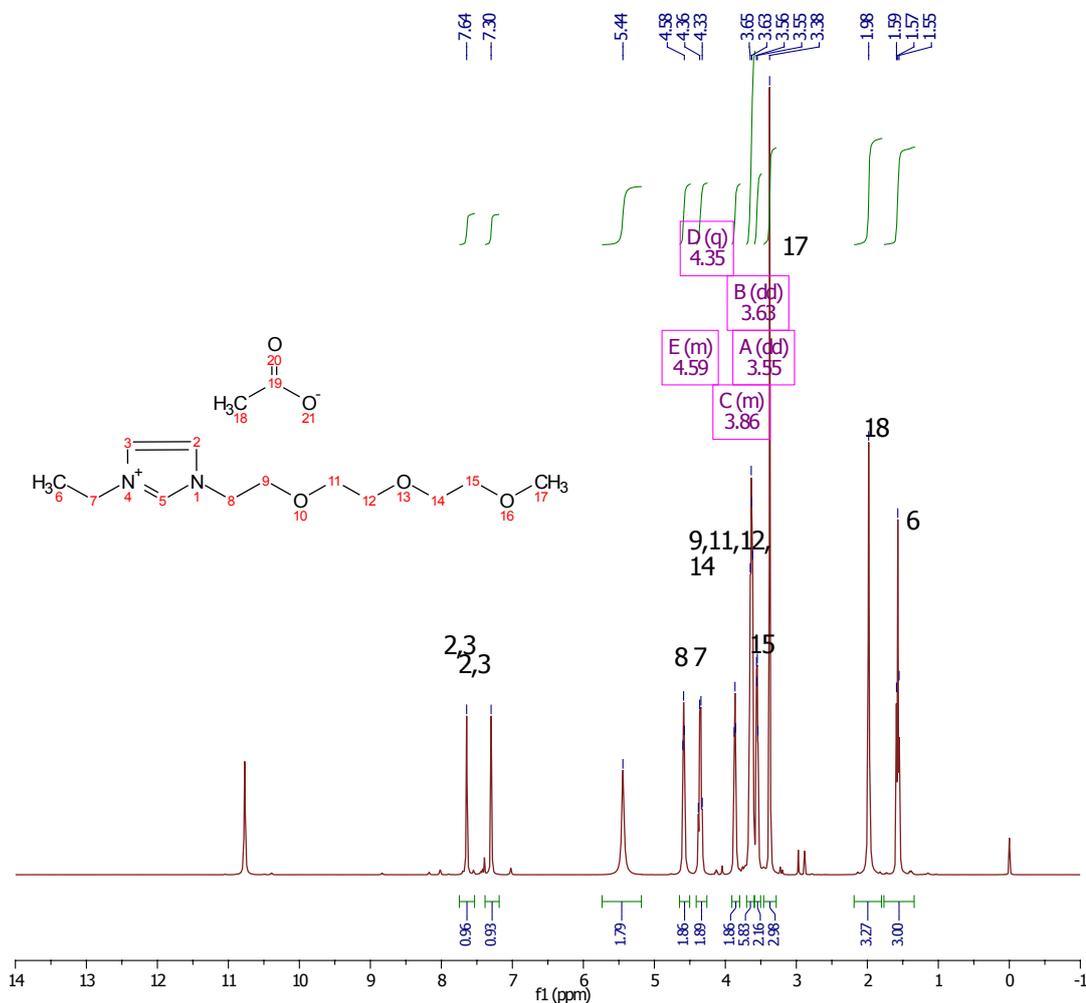


Abbildung B.4: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der in dieser Arbeit synthetisierten IL [Me-(OEt)<sub>3</sub>-Et-Im][OAc]

### Herstellung Tief-eutektischer Lösungsmittel

Die Komponenten der DES wurden im jeweiligen Mol-Verhältnis in einem Glasgefäß oder im Reaktor eingewogen und bei 80 °C im Vakuum mittels Magnetstäbchen gerührt bzw. unter Begasung mit Druckluft in der Blasensäule gemischt, geschmolzen bzw. gelöst

<sup>6</sup>Dr. Felix Scheliga, Dr. Rober Meyer, Institut für Technische und Makromolekulare Chemie, Universität Hamburg

und getrocknet.

### **Abschätzung von Löslichkeiten (Gluc, MG oder LS in BMImTfO oder ChCl:U)**

Es wurde 1 ml der DES ChCl:U (1:2) bzw. der IL [BMIm][TfO] in einem 1,5 ml-Vial (HPLC-Probengefäß) vorgelegt und bei 60 °C und 1000 rpm temperiert. Die zu untersuchenden Verbindungen (LS, MG, Glucose) wurden in Portionen zu etwa 50 mg mit einem Spatel hinzugegen, und das Vial wurde weiter inkubiert, bis das Gemisch wieder klar wurde, und somit die vollständige Lösung der zugegebenen Verbindung festgestellt wurde. Zugabe und Inkubation wurden so oft wiederholt, bis innerhalb von 1 h keine vollständige Lösung erfolgte bzw. bis eine Löslichkeit von etwa 1 mol l<sup>-1</sup> oder sogar darüber festgestellt wurde.

### **Lösungsversuche mit Cellulose in speziellen Medien**

In Reagenzgläsern (Durchmesser 16 mm, Länge 100 mm) wurden 25 mg Cellulose (Avicel PH-101) eingewogen, nach Zugabe von 5 ml des jeweiligen Mediums mit einer Kappe verschlossen und auf einem Vortexer suspendiert. Die Suspensionen wurden bei 30 °C mit 150 rpm in Bewegung gehalten. Proben von 25 µl wurden mittels Hellfeldmikroskopie untersucht. Es wurden folgende Medien untersucht:

[EMIm][OAc], [EMIm][DCA], [EMIm][SCN], [BMIm][TfO], [BMIm][PF<sub>6</sub>], [BMIm][Tf<sub>2</sub>N], [Me-(OEt)<sub>3</sub>-Et-Im][OAc], 3,16 mM NaOH (pH 11,52), 3,16 mM NaOH + 27 %-wt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pH 6,17), 3,16 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2,68), 3,16 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 27 %-wt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pH 1,94), H<sub>2</sub>O (Kontrolle).

### **Regeneration von Cellulose aus Lösung in ionischem Lösungsmittel**

In einen 50 ml-Glasreaktor wurden 20 ml [EMIm][OAc] und 2 g Cellulose (Avicel PH-101) gegeben und unter Rühren mit 500 rpm bei 50 mbar auf 50 °C aufgeheizt. Innerhalb einer Stunde war die gesamte Cellulose gelöst. Die Lösung wurde langsam in einen Küchenmixer mit 100 ml Ethanol bei 50 °C gegossen, und dieser für 10 min. auf höchster Stufe betrieben. Die erhaltenen feinen weißen Partikel wurden mithilfe eines Cellulose-Filters und Vakuum abfiltriert, erneut mit 100 ml Ethanol bei Raumtemperatur (18 °C) versetzt, manuell geschüttelt und abschließend abfiltriert. Der Rückstand wurde bei 50 mbar und 60 °C über Nacht getrocknet.

### Bestimmung der Gleichgewichtskonzentrationen von Wasser in Reaktionsgemischen unter Steady-State-Bedingungen

Für die Bestimmung des Wasseraustrags im Fließgleichgewicht wurden die Ansätze wie für Veresterungen im Glasreaktor und in der Blasensäule vorbereitet, jedoch ohne Enzymzugabe. Die Glasreaktoren wurden bei 80 °C und 50 mbar mit einem Propellerrührer bei 500 rpm betrieben. Die Blasensäule wurde bei 80 °C mit 1,0 L min<sup>-1</sup> begast. Mithilfe einer Spritzenpumpe wurde über eine Kanüle Wasser in definierten Flussraten in das Gemisch dosiert. Es wurden mithilfe einer Pipette Proben von etwa 500 µl entnommen, und der Wassergehalt mittels KF-Titration bestimmt. Der Endwert des Sättigungsverlaufs wurde anhand einer mindestens 1 h dauernden Stagnation der gemessenen Wasserkonzentration ermittelt. Aus dem Anfangswert vor Einschalten der Spritzenpumpe wurde der Gleichgewichtswert ohne Zusodierung ermittelt, wenn zuvor 18 h – 21 h gewartet wurde (Trocknungsvorgang). In den Systemen ohne DES bildete Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid mit ansteigender Wasserkonzentration zunehmend Agglomerate. Diese wurden einige Minuten vor der jeweiligen Probenahme aufgelockert, damit das Saccharid sich über das gesamte Gemisch verteilen konnte. Durch Anlegen eines Fits mit exponentiellem Verlauf konnten die Gleichgewichtskonzentrationen ermittelt werden (Abbildung B.5).

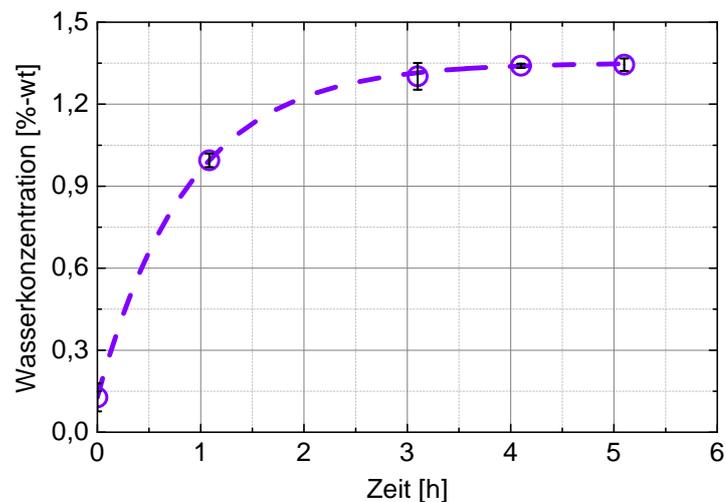


Abbildung B.5: Ermittlung der Gleichgewichtskonzentration von Wasser in ChCl:U (1:2) unter Steady-State-Bedingungen (equimolarer Ansatz, 80%-mol DES, Glasreaktor, 80 °C, 50 mbar, 500 rpm, Wasser-Flussrate 1 µl min<sup>-1</sup>, Bestimmtheitsmaß des Fit beträgt 1,000

# Literaturverzeichnis

- [Abbate u. a. 2013] ABBATE, Vincenzo ; BRANDSTADT, Kurt ; TAYLOR, Peter ; BAS-SINDALE, Alan: Enzyme-Catalyzed Transesterification of Alkoxysilanes. In: *Catalysts* 3 (2013), Nr. 1, S. 27–35. <http://dx.doi.org/10.3390/catal3010027>. – DOI 10.3390/catal3010027. – ISSN 2073–4344
- [Abbott u. a. 2003] ABBOTT, Andrew P. ; CAPPER, Glen ; DAVIES, David L. ; RASHEED, Raymond K. ; TAMBYRAJAH, Vasuki: Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. In: *Chemical Communications* (2003), Nr. 1, S. 70–71. <http://dx.doi.org/10.1039/b210714g>. – DOI 10.1039/b210714g. – ISSN 1359–7345
- [Adelhorst u. a. 1990] ADELHORST, Kim ; BJÖRKLING, Fredrik ; GODTFREDSSEN, Sven E. ; KIRK, Ole: Enzyme Catalysed Preparation of 6-O-Acylglucopyranosides. In: *Synthesis* 1990 (1990), Nr. 02, S. 112–115. <http://dx.doi.org/10.1055/s-1990-26802>. – DOI 10.1055/s-1990-26802. – ISSN 0039–7881
- [Anastas u. Warner 1998] ANASTAS, Paul T. ; WARNER, John C.: *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford [England] and New York : Oxford University Press, 1998. – ISBN 9780198506980
- [Anderson u. a. 1998] ANDERSON, Emily M. ; LARSSON, Karin M. ; KIRK, Ole: One Biocatalyst–Many Applications: The Use of *Candida Antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 16 (1998), Nr. 3, S. 181–204. <http://dx.doi.org/10.3109/10242429809003198>. – DOI 10.3109/10242429809003198. – ISSN 1024–2422
- [Arakawa u. a. 2007] ARAKAWA, Tsutomu ; KITA, Yoshiko ; TIMASHEFF, Serge N.: Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. In: *Biophysical chemistry* 131 (2007), Nr. 1-3, S. 62–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2007.09.004>. – DOI 10.1016/j.bpc.2007.09.004. – ISSN 0301–4622

- [Arrhenius 1889] ARRHENIUS, Svante: Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie, Stöchiometrie und Verwandtschaftslehre* 4 (1889), S. 226–248
- [Arroyo u. Sinisterra 1994] ARROYO, Miguel ; SINISTERRA, Jose V.: High Enantioselective Esterification of 2-Arylpropionic Acids Catalyzed by Immobilized Lipase from *Candida antarctica*: A Mechanistic Approach. In: *The Journal of Organic Chemistry* 59 (1994), Nr. 16, S. 4410–4417. <http://dx.doi.org/10.1021/jo00095a014>. – DOI 10.1021/jo00095a014. – ISSN 0022–3263
- [Banerjee u. a. 2011] BANERJEE, Goutami ; CAR, Suzana ; SCOTT-CRAIG, John S. ; HODGE, David B. ; WALTON, Jonathan D.: Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. In: *Biotechnology for Biofuels* 4 (2011), Nr. 1, S. 16. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-4-16>. – DOI 10.1186/1754-6834-4-16. – ISSN 1754–6834
- [Bechtloff 2002] BECHTLOFF, Bernd: *Gezielte Beeinflussung der Kinetik von Fest-Flüssig-Reaktionskristallisationen*. Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität, Diss., 2002
- [Becker u. Beckert 2004] BECKER, Heinz Georg O. ; BECKERT, Rainer: *Organikum: Organisch-chemisches Grundpraktikum*. 22., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Weinheim : Wiley-VCH, 2004. – ISBN 3–527–31148–3
- [Bentley u. a. 2007] BENTLEY, R. W. ; MANNAN, S. A. ; WHEELER, S. J.: Assessing the date of the global oil peak: The need to use 2P reserves. In: *Energy Policy* 35 (2007), Nr. 12, S. 6364–6382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2007.08.001>. – DOI 10.1016/j.enpol.2007.08.001. – ISSN 03014215
- [Björkling u. a. 1989] BJÖRKLING, Fredrik ; GODTFREDSSEN, Sven E. ; KIRK, Ole: A highly selective enzyme-catalysed esterification of simple glucosides. In: *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (1989), Nr. 14, S. 934. <http://dx.doi.org/10.1039/c39890000934>. – DOI 10.1039/c39890000934
- [Bodo u. Migliorati 2011] BODO, Enrico ; MIGLIORATI, Valentina: Theoretical Description of Ionic Liquids. Version: 2011. <http://dx.doi.org/10.5772/20754>. In: HANDY, Scott (Hrsg.): *Ionic Liquids - Classes and Properties*. InTech, 2011. – DOI 10.5772/20754. – ISBN 978–953–307–634–8, S. 107–126

- [Braun u. a. 2006] BRAUN, Matthias ; TEICHERT, Olaf ; ZWECK, Axel ; ZUKÜNFTIGE TECHNOLOGIEN CONSULTING (Hrsg.): *Biokatalyse in der industriellen Produktion: Fakten und Potenziale zur weißen Biotechnologie: Übersichtsstudie*. Düsseldorf, 2006 (Zukünftige Technologien)
- [BRENDA 2015] BRENDA ; PROF. DR. D. SCHOMBURG (Hrsg.): *3.1.1.1: carboxylesterase*. [http://www.brenda-enzymes.org/all\\_enzymes.php?ecno=3.1.1.1](http://www.brenda-enzymes.org/all_enzymes.php?ecno=3.1.1.1). Version: 2015
- [Briggs u. Haldane, John Burdon Sanderson 1925] BRIGGS, George E. ; HALDANE, JOHN BURDON SANDERSON: A Note on the Kinetics of Enzyme Action. In: *Biochemical Journal* 19 (1925), Nr. 2, 338–339. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1259181/>. – ISSN 1470–8728
- [Buchholz u. a. 2012] BUCHHOLZ, Klaus ; KASCHE, Volker ; BORNSCHEUER, U. T.: *Biocatalysts and enzyme technology*. 2nd ed., completely rev., and enlarged ed. Weinheim : Wiley-Blackwell, ©2012. – ISBN 3527329897
- [Cadotte u. a. 1952] CADOTTE, J. E. ; SMITH, F. ; SPRIESTERSBACH, D.: A New Synthesis of Glycoside. In: *Journal of the American Chemical Society* 74 (1952), Nr. 6, S. 1501–1504. <http://dx.doi.org/10.1021/ja01126a044>. – DOI 10.1021/ja01126a044. – ISSN 0002–7863
- [Cao u. a. 1999] CAO, Linqiu ; BORNSCHEUER, Uwe T. ; SCHMID, Rolf D.: Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6 (1999), Nr. 3, S. 279–285. [http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177\(98\)00083-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(98)00083-6). – DOI 10.1016/S1381-1177(98)00083-6. – ISSN 13811177
- [Ceresana 2015] CERESANA ; CERESANA (Hrsg.): *Marktstudie Tenside*. 2. Konstanz, 2015
- [ChemSpider ] CHEMSPIDER ; ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (Hrsg.): *Search and share chemistry: free chemical structure database*. <http://www.chemspider.com>
- [Cheng u. Gu 2012] CHENG, H. N. ; GU, Qu-Ming: Enzyme-Catalyzed Modifications of Polysaccharides and Poly(ethylene glycol). In: *Polymers* 4 (2012), Nr. 4, S. 1311–1330. <http://dx.doi.org/10.3390/polym4021311>. – DOI 10.3390/polym4021311. – ISSN 2073–4360

- [Cherubini u. a. 2009] CHERUBINI, Francesco ; JUNGMEIER, Gerfried ; WELLISCH, Maria ; WILLKE, Thomas ; SKIADAS, Ioannis ; VAN REE, René ; JONG, Ed d.: Toward a common classification approach for biorefinery systems. In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 3 (2009), Nr. 5, S. 534–546. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.172>. – DOI 10.1002/bbb.172. – ISSN 1932104X
- [Cuissinat u. a. 2008] CUISSINAT, Celine ; NAVARD, Patrick ; HEINZE, Thomas: Swelling and dissolution of cellulose, Part V: cellulose derivatives fibres in aqueous systems and ionic liquids. In: *Cellulose* 15 (2008), Nr. 1, S. 75–80. – ISSN 0969–0239
- [Czichos u. a. 2014] CZICHOS, Horst ; SKROTZKI, Birgit ; SIMON, Franz-Georg: *Das Ingenieurwissen: Werkstoffe*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41126-7>. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41126-7>. – ISBN 978–3–642–41125–0
- [De u. a. 2014] DE, Arnab ; DEWAN, Manika ; MOZUMDAR, Subho: Ionic Liquids. Version: 2014. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118774038.ch10>. In: TIWARI, Ashutosh (Hrsg.) ; DEMIR, Mustafa M. (Hrsg.): *Advanced Sensor and Detection Materials*. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc, 2014. – DOI 10.1002/9781118774038.ch10. – ISBN 9781118774038, S. 309–368
- [Degn u. a. 1999] DEGN, Peter ; PEDERSEN, LarsH. ; DUUS, JensO. ; ZIMMERMANN, Wolfgang: Lipase-catalysed synthesis of glucose fatty acid esters in tert-butanol. In: *Biotechnology letters* 21 (1999), Nr. 4, 275–280. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005439801354>. – DOI 10.1023/A:1005439801354
- [Degn u. Zimmermann 2001] DEGN, Peter ; ZIMMERMANN, Wolfgang: Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 74 (2001), Nr. 6, S. 483–491. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.1139>. – DOI 10.1002/bit.1139. – ISSN 0006–3592
- [Demirbas 2010] DEMIRBAS, Ayhan: *Biorefineries: For Biomass Upgrading Facilities*. Dordrecht : Springer, 2010. – ISBN 1848827202
- [Dimroth u. a. 1963] DIMROTH, Karl ; REICHARDT, Christian ; SIEPMANN, Theodor ; BOHLMANN, Ferdinand: Über Pyridinium-N-phenol-betaine und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln. In: *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 661 (1963), Nr. 1, S. 1–37. <http://dx.doi.org/10.1002/jlac.19636610102>. – DOI 10.1002/jlac.19636610102. – ISSN 00754617

- [Dincer 2008] DINCER, K.: Lower Emissions from Biodiesel Combustion. In: *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 30 (2008), Nr. 10, S. 963–968. <http://dx.doi.org/10.1080/15567030601082753>. – DOI 10.1080/15567030601082753. – ISSN 1556–7036
- [Dose 1991] DOSE, Klaus: *Biochemie: Eine Einführung ; mit 22 Tabellen*. 2., überarb. u. erw. Aufl. Berlin [u.a.] : Springer, 1991 (Springer-Lehrbuch). – ISBN 9780387555669
- [Duden 2015] DUDEN: *Online Wörterbuch*. [www.duden.de](http://www.duden.de). Version: 2015
- [Durand u. a. 2012] DURAND, E. ; LECOMTE, J. ; BARÉA, B. ; PIOMBO, G. ; DUBREUCQ, E. ; VILLENEUVE, P.: Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. In: *Process Biochemistry* 47 (2012), Nr. 12, S. 2081–2089. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.027>. – DOI 10.1016/j.procbio.2012.07.027. – ISSN 1359–5113
- [Durand u. a. 2013] DURAND, E. ; LECOMTE, J. ; VILLENEUVE, P.: Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. In: *European Journal of Lipid Science and Technology* 115 (2013), Nr. 4, S. 379–385. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201200416>. – DOI 10.1002/ejlt.201200416. – ISSN 14387697
- [Eilers 1941] EILERS, H.: Die Viskosität von Emulsionen hochviskoser Stoffe als Funktion der Konzentration. In: *Kolloid-Zeitschrift* 97 (1941), Nr. 3, S. 313–321. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01503023>. – DOI 10.1007/BF01503023. – ISSN 0303–402X
- [Einhorn u. a. 1898] EINHORN, Alfred ; HOLLANDT, Friedrich ; VON ALFRED EINHORN, MITGETHEILT: Ueber die Acylierung der Alkohole und Phenole in Pyridinlösung. In: *Justus Liebig's Annalen der Chemie* 301 (1898), Nr. 1, S. 95–115. <http://dx.doi.org/10.1002/jlac.18983010111>. – DOI 10.1002/jlac.18983010111. – ISSN 00754617
- [Ekato 2012] EKATO: *Ekato. The book*. 3. Aufl. Freiburg, Br. : EKATO Holding, 2012. – ISBN 3000375104
- [Fernandes u. a. 2012] FERNANDES, D. R. ; ROCHA, A. S. ; MAI, E. F. ; MOTA, Claudio J. ; TEIXEIRA DA SILVA, V.: Levulinic acid esterification with ethanol to ethyl levulinate production over solid acid catalysts. In: *Applied Catalysis A: General* 425–426 (2012), S. 199–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2012.03.020>. – DOI 10.1016/j.apcata.2012.03.020. – ISSN 0926–860X

- [Ferrer u. a. 2005] FERRER, Manuel ; SOLIVERI, Juan ; PLOU, Francisco J. ; LÓPEZ-CORTÉS, Nieves ; REYES-DUARTE, Dolores ; CHRISTENSEN, Morten ; COPA-PATIÑO, José L. ; BALLESTEROS, Antonio: Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. In: *Enzyme and Microbial Technology* 36 (2005), Nr. 4, S. 391–398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.02.009>. – DOI 10.1016/j.enzmictec.2004.02.009. – ISSN 0141–0229
- [Ferro u. a. 1987] FERRO, D. ; BARONE, G. ; DELLA GATTA, G. ; PIACENTE, V.: Vapour pressures and sublimation enthalpies of urea and some of its derivatives. In: *The Journal of Chemical Thermodynamics* 19 (1987), Nr. 9, S. 915–923. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9614\(87\)90038-3](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9614(87)90038-3). – DOI 10.1016/0021-9614(87)90038-3. – ISSN 00219614
- [Fischer 1893] FISCHER, Emil: Über die Glucoside der Alkohole. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 26 (1893), Nr. 3, S. 2400–2412. <http://dx.doi.org/10.1002/cber.18930260327>. – DOI 10.1002/cber.18930260327
- [Fischer 1895] FISCHER, Emil: Über die Verbindungen der Zucker mit den Alkoholen und Ketonen. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 28 (1895), Nr. 1, S. 1145–1167. <http://dx.doi.org/10.1002/cber.189502801248>. – DOI 10.1002/cber.189502801248
- [Fisher 1995] FISHER, CharlesH: n-fatty acids: Comparison of published densities and molar volumes. In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72 (1995), Nr. 6, 681–685. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02635655>. – DOI 10.1007/BF02635655. – ISSN 0003–021X
- [Flores u. a. 2002] FLORES, Maria V. ; NARAGHI, Kaynoush ; ENGASSER, Jean-Marc ; HALLING, Peter J.: Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipase catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl 2-butanol. In: *Biotechnology and Bioengineering* 78 (2002), Nr. 7, S. 815–821. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10263>. – DOI 10.1002/bit.10263. – ISSN 0006–3592
- [Förster 2012] FÖRSTER, Sabrina: *FTIR-gestützte Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Acylierung von Alkylglucosiden*. Hamburg, Technische Universität Hamburg-Harburg, Diss., 2012

- [Fox u. a. 2011] FOX, S. C. ; LI, Bin ; XU, Daiqiang ; EDGAR, Kevin J.: Regioselective Esterification and Etherification of Cellulose: A Review. In: *Biomacromolecules* 12 (2011), Nr. 6, S. 1956–1972. <http://dx.doi.org/10.1021/bm200260d>. – DOI 10.1021/bm200260d. – ISSN 1525–7797
- [Francisco u. a. 2013] FRANCISCO, Maria ; VAN DEN BRUINHORST, Adriaan ; KROON, Maaïke C.: Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): A New Generation of Designer Solvents. In: *Angewandte Chemie International Edition* 52 (2013), Nr. 11, S. 3074–3085. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201207548>. – DOI 10.1002/anie.201207548. – ISSN 14337851
- [Ganske u. Bornscheuer 2005] GANSKE, Franka ; BORNSCHEUER, Uwe T.: Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 36 (2005), Nr. 1-6, S. 40–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.08.004>. – DOI 10.1016/j.molcatb.2005.08.004. – ISSN 13811177
- [Garrett u. Grisham 2010] GARRETT, R. ; GRISHAM, Charles M.: *Biochemistry*. 4th ed., International ed. Australia and United Kingdom : Brooks/Cole and Cengage Learning, 2010. – ISBN 978–0–495–11464–2
- [Gaylord Chemical Company 2007] GAYLORD CHEMICAL COMPANY: *Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Solubility Data*. P.O. Box 1209, Slidell, LA 70459-1209 USA, 2007
- [Ghisalba u. a. 2009] GHISALBA, Oreste ; MEYER, Hans-Peter ; WOHLGEMUTH, Roland: Industrial Biotransformation. Version: 2009. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470054581.eib174>. In: FLICKINGER, Michael C. (Hrsg.): *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc, 2009. – DOI 10.1002/9780470054581.eib174. – ISBN 9780471799306, S. 1–18
- [Gill u. Vulfson 1994] GILL, Iqbal ; VULFSON, Evgeny: Enzymic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates. In: *Trends in biotechnology* 12 (1994), Nr. 4, S. 118–122. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90088-4](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799(94)90088-4). – DOI 10.1016/0167–7799(94)90088–4
- [Goldemberg 2000] GOLDEMBERG, José: *World energy assessment: Energy and the challenge of sustainability*. 2000. – ISBN 92–1–126126–0

- [Gorke u. a. 2008] GORKE, Johnathan T. ; SRIENC, Friedrich ; KAZLAUSKAS, Romas J.: Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. In: *Chemical Communications* (2008), Nr. 10, S. 1235. <http://dx.doi.org/10.1039/b716317g>. – DOI 10.1039/b716317g. – ISSN 1359–7345
- [Goto u. a. 1969] GOTO, Shoji ; SUGIYAMA, Junta ; IIZUKA, Hiroshi: A Taxonomic Study of Antarctic Yeasts. In: *Mycologia* 61 (1969), Nr. 4, S. 748. <http://dx.doi.org/10.2307/3757466>. – DOI 10.2307/3757466. – ISSN 00275514
- [Gotor-Fernández u. a. 2006] GOTOR-FERNÁNDEZ, Vicente ; BUSTO, Eduardo ; GOTOR, Vicente: Candida antarctica Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 348 (2006), Nr. 7-8, S. 797–812. <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.200606057>. – DOI 10.1002/adsc.200606057. – ISSN 1615–4150
- [Götz 2013] GÖTZ, Katharina I.: *Chemo-enzymatische Synthese von (S)-[gamma]-Valerolacton auf Basis von Lävulinsäure*. Hamburg-Harburg, Technische Universität Hamburg-Harburg, Diss., 2013
- [Grassmuck u. a. 1994] GRASSMUCK, Jochem ; HOUBEN, Karl-Werner ; ZOLLINGER, Rudolf M.: *DIN-Normen in der Verfahrenstechnik: Ein Leitfaden der technischen Regeln und Vorschriften ; mit 180 Tabellen*. 2., neubearb. Aufl. Stuttgart and Leipzig and Berlin and Wien and Zürich : Teubner and Beuth, 1994. – ISBN 3–410–13188–4
- [Greene u. a. 2006] GREENE, David L. ; HOPSON, Janet L. ; LI, Jia: Have we run out of oil yet? Oil peaking analysis from an optimist's perspective. In: *Energy Policy* 34 (2006), Nr. 5, S. 515–531. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2005.11.025>. – DOI 10.1016/j.enpol.2005.11.025. – ISSN 03014215
- [Gremos u. a. 2012] GREMOS, Stavros ; KEKOS, Dimitris ; KOLISIS, Fragiskos: Super-critical carbon dioxide biocatalysis as a novel and green methodology for the enzymatic acylation of fibrous cellulose in one step. In: *Bioresource Technology* 115 (2012), S. 96–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.056>. – DOI 10.1016/j.biortech.2011.09.056
- [Gremos u. a. 2011] GREMOS, Stavros ; ZARAFETA, Dimitra ; KEKOS, Dimitris ; KOLISIS, Fragiskos: Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid. In: *Bioresource Technology* 102 (2011), Nr. 2, 1378–1382. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888759>

- [Griffin 1949] GRIFFIN, William C.: CLASSIFICATION OF SURFACE-ACTIVE AGENTS BY "HLB". In: *Journal Of The Society Of Cosmetic Chemists* 1 (1949), Nr. 5, S. 311–326
- [Grunwald u. Winstein 1948] GRUNWALD, Ernest ; WINSTEIN, S.: The Correlation of Solvolysis Rates. In: *Journal of the American Chemical Society* 70 (1948), Nr. 2, S. 846–854. <http://dx.doi.org/10.1021/ja01182a117>. – DOI 10.1021/ja01182a117. – ISSN 0002–7863
- [Gumel u. a. 2011] GUMEL, A. M. ; ANNUAR, M.S.M. ; HEIDELBERG, T. ; CHISTI, Y.: Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. In: *Process Biochemistry* 46 (2011), Nr. 11, S. 2079–2090. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.021>. – DOI 10.1016/j.procbio.2011.07.021. – ISSN 1359–5113
- [Hansen 1967] HANSEN, Charles M.: *The Three Dimensional Solubility Parameter and Solvent Diffusion Coefficient: Their Importance in Surface Coating Formulation*. Lyngby, Danmarks tekniske Hojskole, Diss., 1967
- [Harkins u. Keith 1924] HARKINS, W. D. ; KEITH, E. B.: THE ORIENTED WEDGE THEORY OF EMULSIONS AND THE INVERSION OF EMULSIONS. In: *Science (New York, N.Y.)* 59 (1924), Nr. 1534, S. 463–467. <http://dx.doi.org/10.1126/science.59.1534.463>. – DOI 10.1126/science.59.1534.463. – ISSN 0036–8075
- [Hasan u. a. 2006] HASAN, Fariha ; SHAH, Aamer A. ; HAMEED, Abdul: Industrial applications of microbial lipases. In: *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006), Nr. 2, S. 235–251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>. – DOI 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016. – ISSN 0141–0229
- [Hayyan u. a. 2013] HAYYAN, Adeeb ; MJALLI, Farouq S. ; ALNASHEF, Inas M. ; AL-WAHAIBI, Yahya M. ; AL-WAHAIBI, Talal ; HASHIM, Mohd A.: Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties. In: *Journal of Molecular Liquids* 178 (2013), S. 137–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2012.11.025>. – DOI 10.1016/j.molliq.2012.11.025. – ISSN 01677322
- [Heath u. Jeffries 1968] HEATH, J. E. ; JEFFRIES, R.: The alcoholysis of cellulose. In: *Journal of Applied Polymer Science* 12 (1968), Nr. 3, S. 455–465. <http://dx.doi.org/10.1002/app.1968.070120306>. – DOI 10.1002/app.1968.070120306. – ISSN 00218995

- [Hesse u. a. 2005] HESSE, Manfred ; MEIER, Herbert ; ZEEH, Bernd: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7. Stuttgart : Thieme, 2005. – ISBN 313576107X
- [Hildebrand u. a. 1970] HILDEBRAND, Joel H. ; PRAUSNITZ, John M. ; SCOTT, Robert L.: *Regular and related solutions: The solubility of gases, liquids, and solids / Joel H. Hildebrand, John M. Prausnitz, Robert L. Scott*. New York and London : Van Nostrand Reinhold, 1970. – ISBN 0442156650
- [Hill 2010] HILL, Karlheinz: Surfactants Based on Carbohydrates and Proteins for Consumer Products and Technical Applications. Version: 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470686607.ch4>. In: KJELLIN, Mikael (Hrsg.) ; JOHANSSON, Ingegrd (Hrsg.): *Surfactants from Renewable Resources*. Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd, 2010. – DOI 10.1002/9780470686607.ch4. – ISBN 9780470686607, S. 63–84
- [Hilterhaus 2008] HILTERHAUS, Lutz: *Entwicklung eines Reaktorkonzepts zur enzymatischen Herstellung neuartiger Esteröle*. Hamburg, Technische Universität Hamburg-Harburg, Diss., 2008
- [Hilterhaus u. a. 2008] HILTERHAUS, Lutz ; THUM, Oliver ; LIESE, Andreas: Reactor Concept for Lipase-Catalyzed Solvent-Free Conversion of Highly Viscous Reactants Forming Two-Phase Systems. In: *Organic Process Research & Development* 12 (2008), Nr. 4, S. 618–625. <http://dx.doi.org/10.1021/op800070q>. – DOI 10.1021/op800070q. – ISSN 1083–6160
- [Hollmann u. a. 2009] HOLLMANN, F. ; GRZEBYK, P. ; HEINRICHS, V. ; DODERER, K. ; THUM, O.: On the inactivity of *Candida antarctica* lipase B towards strong acids. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57 (2009), Nr. 1–4, 257–261. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.09.012>. – DOI 10.1016/j.molcatb.2008.09.012. – ISSN 13811177
- [Hornbogen u. a. 2008] HORNBOGEN, Erhard ; EGGELER, Gunther ; WERNER, Ewald: *Werkstoffe: Aufbau und Eigenschaften von Keramik-, Metall-, Polymer- und Verbundwerkstoffen*. 9., vollst. neu bearb. Aufl. Berlin [u.a.] : Springer, 2008 (Springer-Lehrbuch). – ISBN 3540718583
- [Houde u. a. 2004] HOUDE, Alain ; KADEMI, Ali ; LEBLANC, Danielle: Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118 (2004), Nr. 1–3, S. 155–170. <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>. – DOI 10.1385/ABAB:118:1-3:155. – ISSN 0273–2289

- [Huang u. a. 2014] HUANG, Ze-Lin ; WU, Ben-Pei ; WEN, Qing ; YANG, Tao-Xiang ; YANG, Zhen: Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 89 (2014), Nr. 12, S. 1975–1981. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.4285>. – DOI 10.1002/jctb.4285. – ISSN 0268–2575
- [Kamm u. a. 2012] KAMM, Birgit ; GRUBER, Patrick R. ; KAMM, Michael: Biorefineries - Industrial Processes and Products. Version: 2012. [http://dx.doi.org/10.1002/14356007.104\\_101](http://dx.doi.org/10.1002/14356007.104_101). In: ULLMANN (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* Bd. 5. Weinheim and Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. – DOI 10.1002/14356007.104\_101. – ISBN 3527306730, S. 659–688
- [Kim u. a. 2011] KIM, Sun-Hee ; YANG, Seung-Tae ; KIM, Jun ; AHN, Wha-Seung: Sonochemical Synthesis of Cu<sub>3</sub>(BTC)<sub>2</sub> in a Deep Eutectic Mixture of Choline Chloride/dimethylurea. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society* 32 (2011), Nr. 8, S. 2783–2786. <http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.8.2783>. – DOI 10.5012/bkcs.2011.32.8.2783. – ISSN 0253–2964
- [Kipke 1979] KIPKE, Klaus: Rühren von dünnflüssigen und mittelviskosen Medien. In: *Chemie Ingenieur Technik* 51 (1979), Nr. 5, S. 430–436. <http://dx.doi.org/10.1002/cite.330510512>. – DOI 10.1002/cite.330510512. – ISSN 0009–286X
- [Kirk u. Christensen 2002] KIRK, Ole ; CHRISTENSEN, Morten W.: Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. In: *Organic Process Research & Development* 6 (2002), Nr. 4, S. 446–451. <http://dx.doi.org/10.1021/op0200165>. – DOI 10.1021/op0200165. – ISSN 1083–6160
- [Kobayashi 2011] KOBAYASHI, Takashi: Lipase-catalyzed syntheses of sugar esters in non-aqueous media. In: *Biotechnology letters* 33 (2011), Nr. 10, S. 1911–1919. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-011-0663-z>. – DOI 10.1007/s10529-011-0663-z
- [Kohn 2005] KOHN, Wolfgang: *Statistik: Datenanalyse und Wahrscheinlichkeitsrechnung*. Berlin [u.a.] : Springer, 2005 (Statistik und ihre Anwendungen). – ISBN 3-540-21677-4
- [Kraume 2012] KRAUME, Matthias: *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2012. – ISBN 978-3-642-25148-1

- [Krebs 2002] KREBS, R.: Bauelemente rührtechnischer Apparate - Auslegungskriterien, Wirtschaftlichkeit, anwendungsorientierte Lösungen. Version: 2002. <http://dx.doi.org/10.1002/3527603360.ch7>. In: KRAUME, Matthias (Hrsg.): *Mischen und Rühren*. Weinheim and FRG : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002. – DOI 10.1002/3527603360.ch7. – ISBN 9783527603367, S. 147–174
- [Kwatra u. a. 1992] KWATRA, Harpreet S. ; CARUTHERS, James M. ; TAO, Bernard Y.: Synthesis of long chain fatty acids esterified onto cellulose via the vacuum-acid chloride process. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 31 (1992), Nr. 12, S. 2647–2651. <http://dx.doi.org/10.1021/ie00012a004>. – DOI 10.1021/ie00012a004
- [Ledl u. Schleicher 1990] LEDL, Franz ; SCHLEICHER, Erwin: Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. In: *Angewandte Chemie* 102 (1990), Nr. 6, S. 597–626. <http://dx.doi.org/10.1002/ange.19901020604>. – DOI 10.1002/ange.19901020604. – ISSN 0044–8249
- [Lee u. a. 2008a] LEE, S. ; DANG, D. ; HA, S. ; CHANG, W. ; KOO, Y.: Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid sugar ester using extremely supersaturated sugar solution in ionic liquids. In: *Biotechnology and bioengineering* 99 (2008), Nr. 1, S. 1–8
- [Lee u. a. 2006] LEE, S. ; HA, S. ; KOO, Y.: Adverse effect of chloride impurities on lipase-catalyzed transesterifications in ionic liquids. In: *Biotechnology letters* 28 (2006), Nr. 17, S. 1335–1339
- [Lee u. a. 2008b] LEE, Sang H. ; HA, Sung H. ; HIEP, Nguyen M. ; CHANG, Woo-Jin ; KOO, Yoon-Mo: Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid ester using ionic liquids mixtures. In: *Journal of biotechnology* 133 (2008), Nr. 4, S. 486–489
- [Leitner u. a. 2010] LEITNER, Walter ; JESSOP, Philip G. ; LI, Chao-Jun ; WASSERSCHEID, Peter ; STARK, Annegret: *Handbook of green chemistry*. Bd. v. 4, 5, 6: *Green solvents*. Weinheim : Wiley-VCH, 2010. – ISBN 978–3–527–32592–4
- [Leo u. a. 1971] LEO, Albert ; HANSCH, Corwin ; ELKINS, David: Partition coefficients and their uses. In: *Chemical Reviews* 71 (1971), Nr. 6, S. 525–616. <http://dx.doi.org/10.1021/cr60274a001>. – DOI 10.1021/cr60274a001. – ISSN 0009–2665
- [Levenspiel 1999] LEVENSPIEL, Octave: *Chemical reaction engineering*. 3rd ed. New York : Wiley, 1999. – ISBN 9780471254249

- [Li u. a. 2010] LI, Cong ; TAN, Tianwei ; ZHANG, Haiyang ; FENG, Wei: Analysis of the conformational stability and activity of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents: insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (2010), Nr. 37, S. 28434–28441. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.136200>. – DOI 10.1074/jbc.M110.136200. – ISSN 1083–351X
- [Liepe 1988] LIEPE, Friedrich (Hrsg.): *Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden*. Bd. 4: *Teil 4: Stoffvereinigen in fluiden Phasen: Ausrüstungen und ihre Berechnung*. 1. Aufl. Weinheim [u.a.] : VCH, 1988. – ISBN 3–527–26205–9
- [Lin u. a. 2015] LIN, Xiao-Sheng ; WEN, Qing ; HUANG, Ze-Lin ; CAI, Yu-Zheng ; HALLING, Peter J. ; YANG, Zhen: Impacts of ionic liquids on enzymatic synthesis of glucose laurate and optimization with superior productivity by response surface methodology. In: *Process Biochemistry* 50 (2015), Nr. 11, S. 1852–1858. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.019>. – DOI 10.1016/j.procbio.2015.07.019. – ISSN 1359–5113
- [Lin u. a. 2016] LIN, Xiao-Sheng ; ZHAO, Kai-Hua ; ZHOU, Qiu-Ling ; XIE, Kai-Qi ; HALLING, Peter J. ; YANG, Zhen: *Aspergillus oryzae* lipase-catalyzed synthesis of glucose laurate with excellent productivity. In: *Bioresources and Bioprocessing* 3 (2016), Nr. 1, S. 965. <http://dx.doi.org/10.1186/s40643-015-0080-6>. – DOI 10.1186/s40643-015-0080-6. – ISSN 2197–4365
- [Ljunger u. a. 1994] LJUNGER, Gudrun ; ADLERCREUTZ, Patrick ; MATTIASSON, Bo: Lipase catalyzed acylation of glucose. In: *Biotechnology Letters* 16 (1994), Nr. 11, S. 1167–1172. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01020845>. – DOI 10.1007/BF01020845. – ISSN 0141–5492
- [Maase u. Massonne 2005] MAASE, Matthias ; MASSONNE, Klemens: Biphasic Acid Scavenging Utilizing Ionic Liquids: The First Commercial Process with Ionic Liquids. Version: 2005. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2005-0902.ch010>. In: ROGERS, Robin D. (Hrsg.) ; SEDDON, Kenneth R. (Hrsg.): *Ionic Liquids IIIB: Fundamentals, Progress, Challenges, and Opportunities* Bd. 902. Washington, DC : American Chemical Society, 2005. – DOI 10.1021/bk-2005-0902.ch010. – ISBN 0–8412–3894–4, S. 126–132

- [Magnusson 2005] MAGNUSSON, Anders: *Rational redesign of Candida antarctica lipase B*. Stockholm, Royal Institute of Technology, Diss., 2005
- [Mahmud u. a. 2010] MAHMUD, Mohd S. ; SAFINSKI, Tomasz ; NELSON, Mark I. ; SIDHU, Harvinder S. ; ADESINA, Adesoji A.: Kinetic Analysis of Oleic Acid Esterification Using Lipase as Catalyst in a Microaqueous Environment. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49 (2010), Nr. 3, S. 1071–1078. <http://dx.doi.org/10.1021/ie900704n>. – DOI 10.1021/ie900704n. – ISSN 0888–5885
- [Malm u. a. 1951] MALM, C. J. ; MENCH, J. W. ; KENDALL, D. L. ; HIATT, G. D.: Aliphatic Acid Esters of Cellulose: Preparation by Acid-Chloride-Pyridine Procedure. In: *Industrial & Engineering Chemistry* 43 (1951), Nr. 3, S. 684–688. <http://dx.doi.org/10.1021/ie50495a033>. – DOI 10.1021/ie50495a033. – ISSN 0019–7866
- [Martinelle u. a. 1995] MARTINELLE, Mats ; HOLMQUIST, Mats ; HULT, Karl: On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1258 (1995), Nr. 3, S. 272–276. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00131-U](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(95)00131-U). – DOI 10.1016/0005-2760(95)00131-U. – ISSN 00052760
- [Martinelle u. Hult 1995] MARTINELLE, Mats ; HULT, Karl: Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by *Candida antarctica* lipase B. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1251 (1995), Nr. 2, S. 191–197. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00096-D](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(95)00096-D). – DOI 10.1016/0167-4838(95)00096-D. – ISSN 01674838
- [Matamá u. a. 2013] MATAMÁ, Teresa ; CASAL, Margarida ; CAVACO-PAULO, Artur: Direct enzymatic esterification of cotton and Avicel with wild-type and engineered cutinases. In: *Cellulose* 20 (2013), Nr. 1, S. 409–416. <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-012-9827-9>. – DOI 10.1007/s10570-012-9827-9. – ISSN 0969–0239
- [Meindersma u. a. 2012] MEINDERSMA, G. W. ; MAASE, Matthias ; HAAN, André B. de: Ionic Liquids. Version:2012. [http://dx.doi.org/10.1002/14356007.114\\_101](http://dx.doi.org/10.1002/14356007.114_101). In: ULLMANN (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim and Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. – DOI 10.1002/14356007.114\_101. – ISBN 3527306730, S. 547–575
- [Merck 2013] MERCK: *The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 15th ed. Cambridge, UK : Royal Society of Chemistry, 2013. – ISBN 1849736707

- [Metz 2007] METZ, Bert: *Climate change 2007: mitigation of climate change: Mitigation of climate change : contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge : Cambridge University Press, 2007. – ISBN 0521705983
- [Mezger 2010] MEZGER, Thomas: *Das Rheologie-Handbuch: Für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern*. 3., überarb. Aufl. Hannover : Vincentz Network, 2010 (Farbe- und Lack-Edition). – ISBN 3866308639
- [Michaelis u. Menten 1913] MICHAELIS, Leonor ; MENTEN, Maud L.: Die Kinetik der Invertinwirkung. In: *Biochemische Zeitschrift* 49 (1913), S. 335–369. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.015>. – DOI 10.1016/j.febslet.2013.07.015
- [Mortimer u. a. 2014] MORTIMER, Charles E. ; BECK, Johannes ; MÜLLER, Ulrich: *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*. 11., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.] : Thieme, 2014. – ISBN 978-3-13-484311-8
- [Müller 2012] MÜLLER, Jakob J.: *Enzymatische Veresterungen in Blasensäulenreaktoren - Kinetik, Stofftransport und Online Analytik*. Hamburg, Technische Universität Hamburg-Harburg, Diss., 2012
- [Murugesan u. Linhardt 2005] MURUGESAN, S. ; LINHARDT, R.: Ionic liquids in carbohydrate chemistry - Current trends and future directions. In: *Current organic synthesis* 2 (2005), Nr. 4, S. 437–451
- [National Renewable Energy Laboratory 2009] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY: *What Is a Biorefinery? Biomass Research: NREL is a national laboratory of the U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, operated by the Alliance for Sustainable Energy, LLC*. <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html?print>. Version: 2009
- [NIST 2011] NIST: *NIST Chemistry WebBook*. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Version: 2011
- [Olivier-Bourbigou u. Hugues 2003] OLIVIER-BOURBIGOU, H. ; HUGUES, F.: Applications of Ionic Liquids to Biphasic Catalysis. In: ROGERS, Robin D. (Hrsg.) ; SEDDON, Kenneth R. (Hrsg.) ; VOLKOV, Sergei (Hrsg.): *Green industrial applications of ionic liquids* Bd. 92. Dordrecht : Springer Science+Business Media, 2003. – ISBN 978-94-010-0127-4, S. 67–84

- [Olney u. Carlson 1947] OLNEY, R. B. ; CARLSON, G. J.: Power and Absorption in Mixers; Correlation with Equipment Dimensions and Fluid Properties. In: *Chemical Engineering Progress* 43 (1947), S. 473–480
- [Ostwald 1894] OSTWALD, Wilhelm: Referat zur Arbeit F. Strohmans: Über den Wärmehalt der Bestandteile der Nahrungsmittel. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie, Stöchiometrie und Verwandtschaftslehre* 15 (1894), Nr. 4, S. 705–706
- [Pahl 2002] PAHL, h. c. M.: Mischtechnik, Aufgaben und Bedeutung. Version: 2002. <http://dx.doi.org/10.1002/3527603360.ch1>. In: KRAUME, Matthias (Hrsg.): *Mischen und Rühren*. Weinheim and FRG : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002. – DOI 10.1002/3527603360.ch1. – ISBN 9783527603367, S. 1–19
- [Paiva u. a. 2014] PAIVA, Alexandre ; CRAVEIRO, Rita ; AROSO, Ivo ; MARTINS, Marta ; REIS, Rui L. ; DUARTE, ANA RITA C.: Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. In: *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2 (2014), Nr. 5, S. 1063–1071. <http://dx.doi.org/10.1021/sc500096j>. – DOI 10.1021/sc500096j. – ISSN 2168–0485
- [Pappu, Venkata K S u. a. 2011] PAPPU, VENKATA K S ; YANEZ, Abraham J. ; PEE-REBOOM, Lars ; MULLER, Evan ; LIRA, Carl T. ; MILLER, Dennis J.: A kinetic model of the Amberlyst-15 catalyzed transesterification of methyl stearate with n-butanol. In: *Bioresource Technology* 102 (2011), Nr. 5, S. 4270–4272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.006>. – DOI 10.1016/j.biortech.2010.12.006
- [Park u. a. 2001] PARK, D. W. ; KIM, J. S. ; HAAM, S. ; KIM, H. S. ; KIM, W. S.: Lipase-catalyzed synthesis of beta-methylglucoside esters containing an alpha-hydroxy acid. In: *Biotechnology letters* 23 (2001), Nr. 23, S. 1947–1952
- [Petry u. a. 2006] PETRY, Inga ; GANESAN, Ashok ; PITT, Andrew ; MOORE, Barry D. ; HALLING, Peter J.: Proteomic methods applied to the analysis of immobilized biocatalysts. In: *Biotechnology and bioengineering* 95 (2006), Nr. 5, S. 984–991. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.21074>. – DOI 10.1002/bit.21074
- [Pöhnlein u. a. 2015] PÖHNLEIN, Martin ; ULRICH, Jonas ; KIRSCHHÖFER, Frank ; NUSSER, Michael ; MUHLE-GOLL, Claudia ; KANNENGIESSER, Bastian ; BRENNER-WEISS, Gerald ; LUY, Burkhard ; LIESE, Andreas ; SYLDATK, Christoph ; HAUSMANN, Rudolf: Lipase-catalyzed synthesis of glucose-6- O -hexanoate in deep eutectic solvents.

- In: *European Journal of Lipid Science and Technology* 117 (2015), Nr. 2, S. 161–166. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201400459>. – DOI 10.1002/ejlt.201400459. – ISSN 14387697
- [Reichardt u. Welton 2010] REICHARDT, Christian ; WELTON, Thomas: *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/9783527632220>. <http://dx.doi.org/10.1002/9783527632220>. – ISBN 9783527632220
- [Rohm and Haas 2006] ROHM AND HAAS: *Amberlyst 15 wet: Industrial Grade Strongly Acidic Catalyst For Catalysis and Separation Technologies: Technical Data Sheet*. 2006
- [Rosen 2004] ROSEN, Milton J.: *Surfactants and Interfacial Phenomena*. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc, 2004. <http://dx.doi.org/10.1002/0471670561>. <http://dx.doi.org/10.1002/0471670561>. – ISBN 0471478180
- [Rowe 2004] ROWE, David J.: *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. Oxford : Blackwell Pub., 2004. – ISBN 084932372X
- [Sandoval u. a. 2002] SANDOVAL, G. ; CONDORET, J. S. ; MONSAN, P. ; MARTY, A.: Esterification by immobilized lipase in solvent-free media: kinetic and thermodynamic arguments. In: *Biotechnology and bioengineering* 78 (2002), Nr. 3, S. 313–320
- [Sandoval u. a. 2001] SANDOVAL, Georgina C. ; MARTY, Alain ; CONDORET, Jean-Stéphane: Thermodynamic activity-based enzyme kinetics: Efficient tool for non-aqueous enzymology. In: *AIChE Journal* 47 (2001), Nr. 3, S. 718–726. <http://dx.doi.org/10.1002/aic.690470318>. – DOI 10.1002/aic.690470318. – ISSN 00011541
- [Sangster 1989] SANGSTER, James: Octanol–Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. In: *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 18 (1989), Nr. 3, S. 1111–1229. <http://dx.doi.org/10.1063/1.555833>. – DOI 10.1063/1.555833. – ISSN 0047–2689
- [Sathitsuksanoh u. a. 2010] SATHITSUKSANOH, Noppadon ; ZHU, Zhiguang ; HO, Tsung-Jen ; BAI, Ming-Der ; ZHANG, Yi-Heng P.: Bamboo saccharification through cellulose solvent-based biomass pretreatment followed by enzymatic hydrolysis at ultra-low cellulase loadings. In: *Bioresource Technology* 101 (2010), Nr.

- 13, S. 4926–4929. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.081>. – DOI 10.1016/j.biortech.2009.09.081
- [Schneider u. a. 2013] SCHNEIDER, Nadine ; LANGE, Gudrun ; HINDLE, Sally ; KLEIN, Robert ; RAREY, Matthias: A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function. In: *Journal of computer-aided molecular design* 27 (2013), Nr. 1, S. 15–29. <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-012-9626-2>. – DOI 10.1007/s10822-012-9626-2. – ISSN 1573–4951
- [Scholz 2009] SCHOLZ, Alexander: *Untersuchung stabiler Enzympräparate für den Einsatz im Blasensäulenreaktor*. Hamburg-Harburg, Technische Universität Hamburg-Harburg, Diss., 2009
- [Schramm 2005] SCHRAMM, Laurier L.: *Emulsions, foams, and suspensions: Fundamentals and applications*. Weinheim and [Great Britain] : Wiley-VCH, 2005. – ISBN 9783527307432
- [Sereti u. a. 2001] SERETI, V. ; STAMATIS, H. ; PAPPAS, C. ; POLISSIOU, M. ; KOLISIS, F. N.: Enzymatic acylation of hydroxypropyl cellulose in organic media and determination of ester formation by diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopy. In: *Biotechnology and bioengineering* 72 (2001), Nr. 4, S. 495–500
- [Shah u. a. 1982] SHAH, Y. T. ; KELKAR, B. G. ; GODBOLE, S. P. ; DECKWER, W.-D.: Design parameters estimations for bubble column reactors. In: *AIChE Journal* 28 (1982), Nr. 3, S. 353–379. <http://dx.doi.org/10.1002/aic.690280302>. – DOI 10.1002/aic.690280302. – ISSN 00011541
- [Sigma Aldrich 2015 ] SIGMA ALDRICH 2015: *Novozym435: Lipase acrylic resin from Candida antarctica*. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/14777?lang=de&region=DE>
- [Singh u. a. 2013] SINGH, Balvant S. ; LOBO, Hyacintha R. ; PINJARI, Dipak V. ; JARAG, Krishna J. ; PANDIT, Aniruddha B. ; SHANKARLING, Ganapati S.: Ultrasound and deep eutectic solvent (DES): a novel blend of techniques for rapid and energy efficient synthesis of oxazoles. In: *Ultrasonics sonochemistry* 20 (2013), Nr. 1, S. 287–293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.06.003>. – DOI 10.1016/j.ultsonch.2012.06.003. – ISSN 1873–2828

- [Smith u. a. 2014] SMITH, Emma L. ; ABBOTT, Andrew P. ; RYDER, Karl S.: Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. In: *Chemical reviews* 114 (2014), Nr. 21, S. 11060–11082. <http://dx.doi.org/10.1021/cr300162p>. – DOI 10.1021/cr300162p. – ISSN 1520–6890
- [Straathof 2006] STRAATHOF, Adrie J. J.: Quantitative Analysis of Industrial Biotransformation. Version: 2006. <http://dx.doi.org/10.1002/9783527608188.ch7>. In: LIESE, Andreas (Hrsg.) ; SEELBACH, Karsten (Hrsg.) ; WANDREY, Christian (Hrsg.): *Industrial Biotransformations*. Weinheim, FRG : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. – DOI 10.1002/9783527608188.ch7. – ISBN 9783527608188, S. 515–520
- [Svensson 2010] SVENSSON, Martin: Surfactants Based on Natural Fatty Acids. Version: 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470686607.ch1>. In: KJELLIN, Mikael (Hrsg.) ; JOHANSSON, Ingegrd (Hrsg.): *Surfactants from Renewable Resources*. Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd, 2010. – DOI 10.1002/9780470686607.ch1. – ISBN 9780470686607, S. 1–19
- [Talukder u. a. 2009] TALUKDER, M. M. R. ; WU, J. C. ; LAU, S. K. ; CUI, L. C. ; SHIMIN, G. ; LIM, A.: Comparison of Novozym 435 and Amberlyst 15 as Heterogeneous Catalyst for Production of Biodiesel from Palm Fatty Acid Distillate. In: *Energy & Fuels* 23 (2009), Nr. 1, S. 1–4. <http://dx.doi.org/10.1021/ef8006245>. – DOI 10.1021/ef8006245. – ISSN 0887–0624
- [Tang u. Row 2013] TANG, Baokun ; ROW, Kyung H.: Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. In: *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* 144 (2013), Nr. 10, S. 1427–1454. <http://dx.doi.org/10.1007/s00706-013-1050-3>. – DOI 10.1007/s00706-013-1050-3. – ISSN 0026–9247
- [Thiam u. a. 2013] THIAM, Abdou R. ; FARESE, Robert V. ; WALTHER, Tobias C.: The biophysics and cell biology of lipid droplets. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (2013), Nr. 12, S. 775–786. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3699>. – DOI 10.1038/nrm3699. – ISSN 1471–0080
- [Tietgens 2012] TIETGENS, Nick: *Charakterisierung und Optimierung der Synthese von Alkylglucosiden mit primären niederen Alkoholen*. Hamburg, Technische Universität Hamburg-Harburg, Diss., 2012
- [TuTech Innovation GmbH 2009] TUTECH INNOVATION GMBH ; TUTECH INNOVATION GMBH (Hrsg.): *Bioraffinerie2021: Energie aus Biomasse - Neue Wege zur inte-*

*grierten Bioraffinerie: Antrag für ein BMBF-Forschungsvorhaben im Förderprogramm "BioEnergie2021 - Forschung für die Nutzung von Biomasse".* 2009

- [Uhl u. Kyriatsoulis 1984] UHL, Wolfgang ; KYRIATSOULIS, Apostolos: Acylierung. Version: 1984. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-663-02002-8\\_106](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-663-02002-8_106). In: UHL, Wolfgang (Hrsg.) ; KYRIATSOULIS, Apostolos (Hrsg.): *Namen- und Schlagwortreaktionen in der Organischen Chemie*. Wiesbaden : Vieweg+Teubner Verlag, 1984. – DOI 10.1007/978-3-663-02002-8\_106. – ISBN 978-3-663-02003-5, S. 184–186
- [Ullmann 2012] ULLMANN (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim and Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. <http://dx.doi.org/10.1002/14356007>. <http://dx.doi.org/10.1002/14356007>. – ISBN 3527306730
- [Uppenberg u. a. 1994] UPPENBERG, J. ; HANSEN, M. T. ; PATKAR, S. ; JONES, T. A.: The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. In: *Structure (London, England : 1993)* 2 (1994), Nr. 4, S. 293–308. – ISSN 0969–2126
- [Valeri u. Meirelles 1997] VALERI, Daniella ; MEIRELLES, Antonio J. A.: Viscosities of fatty acids, triglycerides, and their binary mixtures. In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (1997), Nr. 10, S. 1221–1226. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-997-0048-6>. – DOI 10.1007/s11746-997-0048-6. – ISSN 0003–021X
- [Valley 1955] VALLEY, R. B.: A Study of the Alcoholysis of Cellulose. In: *Textile Research Journal* 25 (1955), Nr. 11, S. 930–939. <http://dx.doi.org/10.1177/004051755502501104>. – DOI 10.1177/004051755502501104. – ISSN 0040–5175
- [VDI 2006] VDI (Hrsg.): *VDI-Wärmeatlas: VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen: CD-ROM 3.0 [Elektronische Ressource]*. 10., bearb. und erw. Aufl. Berlin and Heidelberg : Springer, 2006. – ISBN 3–540–29646–8
- [Verma u. a. 2012] VERMA, N. ; THAKUR, S. ; BHATT, A. K.: Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). In: *International Research Journal of Biological Sciences* 1 (2012), Nr. 8, S. 88–92
- [Vic u. a. 1995] VIC, G. ; BITON, J. ; LE BELLER, D. ; MICHEL, J. M. ; THOMAS, D.: Enzymatic glucosylation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse

- hydrolysis reaction using almond-beta-D-glucosidase. In: *Biotechnology and bioengineering* 46 (1995), Nr. 2, S. 109–116. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260460204>. – DOI 10.1002/bit.260460204
- [Viswanath 2007] VISWANATH, D. S.: *Viscosity of liquids: Theory, estimation, experiment, and data*. Dordrecht : Springer, 2007. – ISBN 1–4020–5482–3
- [Voet u. a. 1992] VOET, Daniel ; VOET, Judith G. ; MAELICKE, Alfred: *Biochemie*. Weinheim [u.a.] : VCH, 1992. – ISBN 9783527282425
- [Walden 1914] WALDEN, Paul: Ueber die Molekulargroesse und elektrische Leitfaehigkeit einiger geschmolzenen Salze. In: *Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St.-Pétersbourg* 8 (1914), Nr. 6, 405–422. <http://www.mathnet.ru/eng/agreement>
- [Wang u. Hsieh 2004] WANG, Yuhong ; HSIEH, You-Lo: Enzyme immobilization to ultra-fine cellulose fibers via amphiphilic polyethylene glycol spacers. In: *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 42 (2004), Nr. 17, S. 4289–4299. <http://dx.doi.org/10.1002/pola.20271>. – DOI 10.1002/pola.20271. – ISSN 0887–624X
- [Webb 1992] WEBB, Edwin C.: *Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. San Diego : Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press, ©1992. – ISBN 0–12–227164–5
- [Wellisch u. a. 2010] WELLISCH, Maria ; JUNGMEIER, Gerfried ; KARBOWSKI, Adrian ; PATEL, Martin K. ; ROGULSKA, Magdalena: Biorefinery systems - potential contributors to sustainable innovation. In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 4 (2010), Nr. 3, S. 275–286. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.217>. – DOI 10.1002/bbb.217. – ISSN 1932104X
- [Wilhelmy 1850] WILHELMY, Ludwig F.: Über das Gesetz, nach welchem die Einwirkung der Säuren auf den Rohrzucker stattfindet. In: *Poggendorff's Annalen* LXXXI (1850), S. 413–433, 499–526
- [Xie u. Hsieh 2001] XIE, Jiangbing ; HSIEH, You-Lo: Enzyme-catalyzed transesterification of vinyl esters on cellulose solids. In: *Journal of Polymer Science Part A:*

- Polymer Chemistry* 39 (2001), Nr. 11, S. 1931–1939. <http://dx.doi.org/10.1002/pola.1170>. – DOI 10.1002/pola.1170. – ISSN 0887–624X
- [Yadav u. Pandey 2014] YADAV, Anita ; PANDEY, Siddharth: Densities and Viscosities of (Choline Chloride + Urea) Deep Eutectic Solvent and Its Aqueous Mixtures in the Temperature Range 293.15 K to 363.15 K. In: *Journal of Chemical & Engineering Data* 59 (2014), Nr. 7, S. 2221–2229. <http://dx.doi.org/10.1021/je5001796>. – DOI 10.1021/je5001796. – ISSN 0021–9568
- [Yan u. a. 1999] YAN, Y. C. ; BORNSCHEUER, U. T. ; CAO, L. Q. ; SCHMID, R. D.: Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters - Removal of byproducts by azeotropic distillation. In: *Enzyme and Microbial Technology* 25 (1999), Nr. 8-9, S. 725–728. – ISSN 0141–0229
- [Yan 2001] YAN, Youchun: *ENZYMATIC PRODUCTION OF SUGAR FATTY ACID ESTERS*. Stuttgart, Universität Stuttgart, Diss., 2001
- [Yang u. Wang 2003] YANG, K. ; WANG, Y.-J: Lipase-Catalyzed Cellulose Acetylation in Aqueous and Organic Media. In: *Biotechnology Progress* 19 (2003), Nr. 6, S. 1664–1671. <http://dx.doi.org/10.1021/bp0341388>. – DOI 10.1021/bp0341388. – ISSN 8756–7938
- [Yang u. Huang 2012] YANG, Zhen ; HUANG, Ze-Lin: Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids. In: *Catalysis Science & Technology* 2 (2012), Nr. 9, S. 1767. <http://dx.doi.org/10.1039/c2cy20109g>. – DOI 10.1039/c2cy20109g. – ISSN 2044–4753
- [Yang u. Pan 2005] YANG, Zhen ; PAN, Wubin: Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. In: *Enzyme and Microbial Technology* 37 (2005), Nr. 1, S. 19–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.014>. – DOI 10.1016/j.enzmictec.2005.02.014. – ISSN 01410229
- [Yoo u. a. 2007] YOO, Sang i. ; PARK, Sang J. ; YOON, Hyon H.: Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters. In: *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 13 (2007), Nr. 1, S. 1–6. – ISSN 1226–086X
- [Zhang u. a. 2012] ZHANG, Qinghua ; DE OLIVEIRA VIGIER, KARINE ; ROYER, Sébastien ; JÉRÔME, François: Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. In: *Chemical Society reviews* 41 (2012), Nr. 21, S. 7108–7146. <http://dx.doi.org/10.1039/c2cs35178a>. – DOI 10.1039/c2cs35178a. – ISSN 1460–4744

- [Zhao u. a. 2008] ZHAO, Hua ; BAKER, Gary A. ; SONG, Zhiyan ; OLUBAJO, Olarongbe ; CRITTLE, Tanisha ; PETERS, Darkeysha: Designing enzyme-compatible ionic liquids that can dissolve carbohydrates. In: *Green Chem* 10 (2008), Nr. 6, 696–705. <http://dx.doi.org/10.1039/B801489B>. – DOI 10.1039/B801489B
- [Zhu u. a. 2011] ZHU, D. ; WU, Q. ; WANG, N.: Industrial Enzymes. Version: 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00182-3>. In: *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, 2011. – DOI 10.1016/B978-0-08-088504-9.00182-3. – ISBN 9780080885049, S. 3–13
- [Zisis u. a. 2015] ZISIS, Themistoklis ; FREDDOLINO, Peter L. ; TURUNEN, Petri ; VAN TEESELING, MURIEL C F ; ROWAN, Alan E. ; BLANK, Kerstin G.: Interfacial Activation of *Candida antarctica* Lipase B: Combined Evidence from Experiment and Simulation. In: *Biochemistry* 54 (2015), Nr. 38, S. 5969–5979. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00586>. – DOI 10.1021/acs.biochem.5b00586
- [Zlokarnik 1967] ZLOKARNIK, Marko: Eignung von Rührern zum Homogenisieren von Flüssigkeitsgemischen. In: *Chemie Ingenieur Technik - CIT* 39 (1967), Nr. 9-10, S. 539–548. <http://dx.doi.org/10.1002/cite.330390909>. – DOI 10.1002/cite.330390909. – ISSN 0009–286X
- [Zlokarnik 1999] ZLOKARNIK, Marko: *Rührtechnik: Theorie und Praxis*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1999 (Chemische Technik/Verfahrenstechnik). – ISBN 364258635X
- [Zlokarnik 2012] ZLOKARNIK, Marko: Stirring. Version: 2012. [http://dx.doi.org/10.1002/14356007.b02\\_25](http://dx.doi.org/10.1002/14356007.b02_25). In: ULLMANN (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim and Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. – DOI 10.1002/14356007.b02\_25. – ISBN 3527306730, S. 433–471



# Lebenslauf

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>Name</b>              | Kannengiesser   |
| <b>Vorname</b>           | Bastian   |
| <b>Geburtsdatum</b>      | 04.08.1982  |
| <b>Geburtsort</b>        | Hamburg, Deutschland  |
| <b>08 1989 – 07 1993</b> | Grundschule Altrahlstedt, Hamburg   |
| <b>08 1993 – 07 1999</b> | Gymnasium Rahlstedt, Hamburg  |
| <b>08 1999 – 06 2002</b> | Technisches Gymnasium an der Gewerbeschule 16 in Farmsen, Hamburg                               |
| <b>07 2002 – 04 2003</b> | Zivildienst in der Hamburger Werkstatt GmbH, Hamburg  |
| <b>05 2003 – 06 2003</b> | Grundpraktikum bei ThyssenKrupp Fahrtreppen GmbH, Hamburg                                       |
| <b>06 2003 – 09 2003</b> | Aushilfstätigkeit in der Hamburger Werkstatt GmbH, Hamburg                                      |
| <b>10 2003 – 05 2009</b> | Studium der Verfahrenstechnik an der Technischen Universität Hamburg-Harburg                    |
| <b>07 2009 – 09 2016</b> | Promotion im Institut für Technische Biokatalyse an der Technischen Universität Hamburg-Harburg |
| <b>07 2016 – 09 2016</b> | Aushilfskraft bei Kinderforscher an der TUHH, Hamburg   |
| <b>10 2016 – heute</b>   | Projektingenieur bei GEA TDS GmbH, Büchen   |