

# Reaktionskinetische Experimente zur Lipase-katalysierten Hydrolyse von Rapsöl in Wasser-in-Öl-Emulsionen

Von der Fakultät für Umweltwissenschaften und Verfahrenstechnik der  
Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus zur Erlangung des  
akademischen Grades eines Doktor-Ingenieurs genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Ingenieurin

Katja Saulich

geboren in Witzhausen

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Schnitzlein

Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Peter Stahmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2008



---

# Danksagung

---

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Chemische Reaktionstechnik der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Schnitzlein für seine menschliche und fachliche Unterstützung während der gesamten Arbeit. Seine stete Bereitschaft zur Diskussion und seine Geduld haben zum Fortgang der Arbeit entscheidend beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Stahmann möchte ich mich herzlichst für die Übernahme des Co-Referats und die interessanten Diskussionen bedanken.

Einen großen Dank möchte ich an Dr. Oliver Reich (Institut für Chemie, Physikalische Chemie, Universität Potsdam) für den angenehmen Aufenthalt am Institut und die zahlreichen Diskussionen richten. Die gemeinsamen Messungen von Tropfengröße und Reaktionsfortschritt lieferten nicht nur interessante Ergebnisse, sondern machten außerdem großen Spaß.

Bei Herrn Dr. Thomas Skrivanek (Krüss, Hamburg) bedanke ich mich für eine vorbildliche Kundenbetreuung.

Ein großer Dank gilt den Studenten, die mit ihrem Engagement im Rahmen von Studien- und Diplomarbeiten einen wertvollen Beitrag geleistet haben: Volker Krüger, Ina von Buchholz, Marlene Smieszek, Christian Vogel, Daniel Gurka und Viviane Dujardin.

Für die angenehme Atmosphäre am Lehrstuhl sorgten alle Mitarbeiter. Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Norbert Heinzelmann, für die hervorragende (EDV)-technische Unterstützung; bei Mahesh Huddar, für die Durchführung einer Untersuchungsreihe zur Bestimmung der Enzymaktivität im Einphasen- und Zweiphasensystem; bei Stephan Machefer, für ideenreiche und konstruktive Diskussionen; bei Lilo Buchal und Judith Krautwald, für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei Florian möchte ich mich für die zahlreichen Tipps und Tricks bei den aufgetretenen Linux- und Latex-Problemen und die kulinarische Versorgung sehr bedanken. Und Ina danke ich aufs herzlichste fürs Anfeuern und Diskutieren. Danke!

Und nicht zuletzt gilt mein Dank von ganzem Herzen meiner Familie und meinen Freunden für die immerwährende Unterstützung.

---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Symbole</b>	<b>vii</b>
<b>1 Motivation</b>	<b>1</b>
<b>2 Einführung</b>	<b>7</b>
2.1 Charakterisierung von Enzymen . . . . .	7
2.1.1 Biokatalyse . . . . .	7
2.1.2 Lipasen . . . . .	10
2.1.2.1 Struktur . . . . .	11
2.1.2.2 Lipase-katalysierte Hydrolyse . . . . .	11
2.1.2.3 Aktivität . . . . .	15
2.1.2.4 Kommerzielle Lipase aus <i>Candida rugosa</i> . . . . .	16
2.2 Eigenschaften von Emulsionen . . . . .	18
2.3 Zielstellung und Vorgehen . . . . .	21
<b>3 Experimentelle Untersuchung</b>	<b>23</b>
3.1 Charakterisierung des Stoffsystems . . . . .	23
3.1.1 Chemikalien . . . . .	23
3.1.2 Lipase . . . . .	23
3.1.2.1 Lipase und Puffer . . . . .	23
3.1.2.2 Bestimmung der Aktivität . . . . .	25
3.1.2.3 Einfluss verschiedener Reaktionsparameter . . . . .	27

## Inhaltsverzeichnis

3.2	Untersuchungen am Einzeltropfen . . . . .	27
3.2.1	Reaktionsfortschritt – GC . . . . .	28
3.2.2	Grenzflächenspannung – Pendant-Drop . . . . .	30
3.3	Untersuchungen an der Emulsion . . . . .	35
3.3.1	Offline-Messung des Reaktionsfortschrittes – Titration . . . . .	35
3.3.2	Online-Messung des Reaktionsfortschrittes – FTIR/ATR . . . . .	37
3.3.3	Bestimmung der Tropfengröße – PDWS . . . . .	49
3.3.4	Versuchsanlage zur Untersuchung der Reaktionskinetik . . . . .	61
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1	Charakterisierung der Lipase . . . . .	63
4.1.1	Molare Masse und Konzentration . . . . .	63
4.1.2	Temperatur und <i>pH</i> -Wert . . . . .	64
4.1.3	Rührergeschwindigkeit . . . . .	67
4.1.4	Substratverhältnis . . . . .	69
4.1.5	Lipaseaktivität . . . . .	71
4.1.5.1	Lipaseaktivität in gerührter Lösung . . . . .	71
4.1.5.2	Lipaseaktivität während der Lipolyse (Emulsion) . . . . .	72
4.1.5.3	Gelöste und an o/w-Grenzfläche adsorbierte Lipase . . . . .	76
4.2	Kinetische Untersuchungen . . . . .	77
4.2.1	Einzeltropfen . . . . .	77
4.2.1.1	Einzelkomponenten-Sorption . . . . .	77
4.2.1.2	Mehrkomponenten-Sorption . . . . .	87
4.2.2	Emulsionssystem . . . . .	91
4.2.2.1	Reaktionsfortschritt . . . . .	91
4.2.2.2	Tropfengröße und volumenspezifische Phasengrenzfläche . . . . .	92
4.2.2.3	Phänomenologische Beschreibung der Reaktionskinetik . . . . .	96
4.3	Wirtschaftliche Lipasekonzentration . . . . .	103
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>105</b>
	<b>Literatur</b>	<b>109</b>
<b>A</b>	<b>Verwendete Chemikalien</b>	<b>119</b>
<b>B</b>	<b>Reaktionsparameter</b>	<b>121</b>
B.1	Lipaseaktivität in gerührter Lösung . . . . .	121

B.2	Lipaseaktivität während der Lipolyse . . . . .	122
B.3	Referenzsystem (I) und (II) . . . . .	122
<b>C</b>	<b>GC-Analyse – Chromatogramm der Reaktionsprodukte</b>	<b>125</b>
<b>D</b>	<b>Korrektur der originären FTIR-Messergebnisse</b>	<b>127</b>
<b>E</b>	<b>Tropfengrößenbestimmung mittels Mikroskopie</b>	<b>129</b>



---

# Symbole

---

## Lateinische Symbole

Symbol	Einheit	Bedeutung
$A$	—	Strahlungsabsorption
$A$	$\text{m}^2$	Fläche
$a$	—	Korrekturfaktor
$a$	—	Kapillarkonstante
$a$	—	Parameter aus einer Anpassungsgleichung
$a$	$\text{U}/\text{mg}_{\text{Protein}}$	spezifische Enzymaktivität
$a/a_0$	—	relative Enzymaktivität
$B$	—	Formparameter
$b$	—	Parameter aus einer Anpassungsgleichung
$b$	$\text{m}$	Krümmungsradius der Tropfenoberfläche am Tropfenapex (Nullpunkt der Bezugsfläche)
$C$	—	Konstante
$c$	—	Parameter aus einer Anpassungsgleichung
$c$	$\text{m}/\text{s}$	Lichtgeschwindigkeit
$c$	$\text{mol}/\text{l}$	Konzentration bezogen auf das Reaktionsvolumen
$c_{e0}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	Massekonzentration der Lipase im Phosphatpuffer
$\tilde{c}_{\text{Öl},0}$	$\text{mol}/\text{l}$	Rapsölmenge pro Wasservolumen zu Reaktionsbeginn

## Symbole

Symbol	Einheit	Bedeutung
$d$	$\mu\text{m}, \text{m}$	Durchmesser
$\bar{d}$	$\mu\text{m}, \text{m}$	mittlerer Durchmesser
$\hat{d}$	$\mu\text{m}$	Durchmesser aus der Intervallmitte (diskrete Verteilung)
$\Delta d$	$\mu\text{m}$	Intervallbreite (diskrete Verteilung)
$d_{32}$	$\mu\text{m}$	Sauterdurchmesser
$d_P$	$\mu\text{m}$	Eindringtiefe der IR-Strahlung in die Probe
$f$	Hz	Frequenz
$f(N_{Vi})$	—	Funktion Viskositätsgruppe
$g$	$\text{m}/\text{s}^2$	Erdbeschleunigung
$I_{AC}$	$1/\text{m}^3$	Intensität der Amplitude
$\hat{k}_1$	$\text{mmol}/\text{m}^2/\text{min}$	Anpassungsparameter (1) für $\hat{r}_0 = f(c_{e0})$
$\hat{k}_2$	—	Anpassungsparameter (2) für $\hat{r}_0 = f(c_{e0})$
$k_1$	$\text{mmol}/(\text{l min g}_{\text{Protein}})$	Konstante der Umsetzungsgeschwindigkeit des Rapsöls an einem aktiven Zentrum
$k_2$	$1/\text{g}_{\text{Protein}}$	Konstante der globalen Adsorptions-/Desorptionskinetik an der Phasengrenzfläche
$k_I$	$1/\text{m}$	Intensitätskoeffizient
$k_{\Phi}$	$1/\text{m}$	Phasenkoeffizient
$l$	$\text{m}$	Länge
$M$	$\text{g}/\text{mol}$	molare Masse
$M_{2,0}$	$\text{m}^3$	Flächenmoment
$M_{3,0}$	$\text{m}^4$	Volumenmoment
$m$	$\text{mg}$	Masse
$N$	—	Anzahl
$N_{We}$	—	Weber-Gruppe
$(N_{We})_{krit}$	—	kritischer Wert der Weber-Gruppe $N_{We}$ beim Tropfenaufbruch
$n$	$\text{mmol}$	Stoffmenge
$\bar{n}$	$\text{mmol}$	Stoffmenge der stöchiometrisch limitierenden Spezies
$n_{21}$	—	das Verhältnis vom Brechungsindex des weniger dichten Mediums (Probe) zu dem des dichteren Mediums (Kristall)

Symbol	Einheit	Bedeutung
$n_R$	1/min	Rührergeschwindigkeit
$P_{FFS}$	mmol/min	produzierte Fettsäuremenge pro Zeit (Produktionsrate)
$\Delta p$	Pa	Differenz des hydrostatischen Druckes zwischen Tropfeninneren und -äußeren
$q_0(\bar{d})$	1/ $\mu\text{m}$	Anzahlverteilung des mittleren Tropfendurchmessers
$r$	m	Abstand
$r$	nmol/h	Reaktionsgeschwindigkeit
$\tilde{r}$	mmol/(l min)	volumenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit (Volumen Reaktionsgemisch oder Wasserphase)
$\hat{r}$	mmol/(m <sup>2</sup> min)	grenzflächenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit
$r_1, r_2$	m	Krümmungsradien der Tropfenoberfläche am Punkt $P(x, z)$ (zueinander orthogonal)
$S$	m <sup>2</sup>	Phasengrenzfläche
$S_V$	m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup>	volumenspezifische (Wasserphase) Phasengrenzfläche
$s$	m	Bogenlänge
$T$	°C, $K$	Temperatur
$T$	—	Transmission
$t$	min, h	Zeit
$t_{1/2}$	min	Halbwertszeit (bezogen auf die Lipaseaktivität)
$V$	ml	Volumen
$\dot{V}$	ml/min	Volumenstrom
$\tilde{V}_{X_{\text{öl}}=0}$	ml	Volumen der wässrigen Phase bei Umsatz $X = 0\%$
$\tilde{V}_{X_{\text{öl}}=1}$	ml	Volumen der wässrigen Phase bei Umsatz $X = 100\%$
$X$	—	Umsatz
$\bar{X}$	—	Umsatz der stöchiometrisch limitierenden Spezies
$x$	m	Tropfenbreite am Punkt $P(x, z)$
$z$	m	Tropfenhöhe am Punkt $P(x, z)$

## Griechische Symbole

Symbol	Einheit	Bedeutung
$\alpha$	—	Absorptionsparameter
$\epsilon$	W/m <sup>3</sup>	Leistungseintrag pro Volumen
$\varepsilon$	—	relative Volumenänderung
$\eta$	mPa s	dynamische Viskosität
$\gamma_{w/o}$	ml/ml	Volumenverhältnis Phosphatpuffer-/Ölphase
$\lambda$	$\mu\text{m}$ , nm	Wellenlänge
$\mu_a$	1/m	Absorptionskoeffizient
$\mu'_s$	1/m	effektiver Streukoeffizient
$\nu$	—	stöchiometrischer Faktor
$\bar{\nu}_i$	—	stöchiometrischer Faktor der stöchiometrisch limitierenden Spezies $i$
$\omega$	1/s	Kreisfrequenz
$\Phi$	—	Phase
$\Phi_0$	—	frequenzabhängige Phasenverschiebung
$\Pi$	mN/m	Oberflächendruck
$\phi$	°	Winkel zwischen der Tangente am Punkt $P(x, z)$ und der Bezugsebene
$\phi$	—	Volumenanteil
$\rho_{AC}$	1/m <sup>3</sup>	zeitabhängiger Teil der Photonendichte
$\varrho$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte
$\Delta\varrho$	kg/m <sup>3</sup>	Dichteunterschied zwischen Fluid I und Fluid II
$\sigma$	mN/m	Grenzflächenspannung
$\sigma_e$	mN/m	durch die Lipaseadsorption beeinflusste Grenzflächenspannung
$\sigma^*$	mN/m	Grenzflächenspannung im Gleichgewicht
$\sigma^{**}$	mN/m	Grenzflächenspannung im Fall maximaler Belegung bei Konkurrenzadsorption
$\theta$	°	Einfallswinkel des IR-Strahls auf die Kristalloberfläche
$\theta$	—	experimentell bestimmter Belegungsgrad
$\Upsilon$	—	theoretischer Belegungsgrad

Symbol	Einheit	Bedeutung
$\nu$	$\text{cm}^{-1}$	Wellenzahl

## Indizes

Index	Bedeutung
0	Bezugspunkt oder -ebene, Reaktionsbeginn bzw. am Ende der Induktionsphase
4, 8, 12, 16 bzw. 20	4, 8, 12, 16 bzw. 20 $\mu\text{g}$ Lipase pro ml 0,1 M Phosphatpuffer
<i>A</i>	Außen
<i>ads</i>	adsorbiert
<i>b</i>	Bulk
<i>d</i>	disperse Phase
<i>e</i>	Lipase
<i>end</i>	Versuchsende bzw. Endumsatz
<i>F</i>	Film
<i>FFS</i>	freie Fettsäuren
<i>FTIR</i>	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
<i>GC</i>	Gaschromatographie
<i>GG</i>	Gleichgewicht
<i>grenz</i>	Grenzwert
<i>i</i>	Spezies <i>i</i> bzw. Index <i>i</i> bzw. Intervall <i>i</i> bzw. Innen
<i>k</i>	kontinuierliche Phase
<i>korr</i>	korrigiert
<i>KOH</i>	KOH-Titration
<i>M</i>	Mikroskopie
<i>max</i>	Maximum
<i>o</i>	ölige Phase
<i>opt</i>	Optimum
<i>P</i>	Probe
<i>PDWS</i>	Photonendichtewellen-Spektroskopie
<i>p</i>	Puffer
<i>RK</i>	Reaktion bzw. Reaktionsmedium

## *Symbole*

Index	Bedeutung
<i>t</i>	Zeit
<i>tr</i>	Tropfen
<i>tot</i>	gesamt
<i>w</i>	wässrige Phase

## Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A.I.F.	Anwendung industrielle Forschung
APD	Avalanche Photodiode
ention.	entionisiert
FFS	freie Fettsäuren
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot
GC	Gaschromatographie
LWL	Lichtwellenleiter
Ma.-%	prozentualer Massenanteil
Mol-%	prozentualer Molanteil
o/w	Öl-in-Wasser-Emulsion
PDW	Photonendichtewellen
PDWS	Photonendichtewellen-Spektroskopie
R	Rest
Vol.-%	prozentualer Volumenanteil
w/o	Wasser-in-Öl-Emulsion

# Kapitel 1

---

## Motivation

---

Mit zunehmender Knappheit an Energieressourcen und den daraus resultierenden hohen Energiekosten entwickelt sich ein Bedarf, energieintensive Verfahren der produzierenden Industrie durch Verfahren geringeren Energiebedarfs und höherer Produktselektivität zu ersetzen. In der stoffumwandelnden Industrie kommen als Substitutionsverfahren biokatalytische Prozesse in Frage. Diese zeichnen sich neben deutlich geringerem Energiebedarf durch verbesserte Substrat- und Produktspezifitäten und daraus resultierend geringerem Aufwand in der Produktaufbereitung aus [6]. Bei der Bewertung biokatalytischer Verfahren im Hinblick auf ihre industrielle Anwendbarkeit nimmt der Biokatalysator, in der Regel ein Enzym, eine zentrale Rolle ein. Dabei gilt es, die Durchführbarkeit sowie die Notwendigkeit der Etablierung eines neuen Verfahrens im Verhältnis zu seiner Wirtschaftlichkeit abzuwägen. Die Rentabilität wird durch die zusätzlichen Kosten der Einführung eines enzymatischen Prozesses sowie dem ökonomischen Wert des erzielten Produktes bestimmt. Kosteneinsparungen ergeben sich dann, wenn das gewünschte Produkt durch das neue Verfahren insgesamt billiger produziert werden kann bzw. höhere Umsätze im vorgegebenen Zeitraum erzielbar sind. Auf die Praxis bezogen ergibt sich die Wirtschaftlichkeit eines biokatalytischen Prozesses aus der benötigten Enzymkonzentration und den damit verbundenen Enzymkosten, den (physikalischen) Betriebsbedingungen und dem erzielbaren Umsatzgrad [30]. Als

## 1 Motivation

Voraussetzung für eine kommerzielle Anwendung von Enzymprozessen ist ein quantitatives und qualitatives Verständnis der grundlegenden physikalischen und chemischen Phänomene, die diesen Prozessen obliegen, notwendig.

Die Hydrolyse von Ölen und Fetten (Triglyceride) ist ein Beispiel, bei dem die Produkte neben dem technisch etablierten Verfahren alternativ biokatalytisch herstellbar sind. Die aus der Fetthydrolyse (Lipolyse) hervorgehenden Spaltprodukte Partialglyceride, Fettsäuren und Glycerin sind wichtige Grundstoffe chemischer Prozesse und finden besonders in der pharmazeutischen sowie der Lebens- und Waschmittelindustrie zahlreiche Verwendung [83]. Das zur Zeit am häufigsten eingesetzte Verfahren zur Fetthydrolyse ist der Colgate-Emery-Prozess. Hierbei werden die Triglyceride bei hohen Drücken (60 bar) und hohen Temperaturen (250 °C) im Gegenstromverfahren umgesetzt. Die hierbei erzielten Umsätze liegen bei 97%. Nachteil dieses Verfahrens ist der große Energiebedarf. Die hohe Prozesstemperatur führt bei den temperaturempfindlichen Fettsäuren zu unerwünschten Nebenprodukten. Die biokatalytische Fettspaltung mit Enzymen hingegen ermöglicht ein produktschonendes Verfahren bei moderaten Reaktionsbedingungen, nahezu neutralem  $pH$ -Wert, Temperaturen zwischen 30 und 50 °C und Umgebungsdruck [56]. Aufgrund der Regiospezifität von Enzymen sind zudem höhere Produktselektivitäten realisierbar. Derartige Reaktionen werden durch sogenannte Lipasen katalysiert.

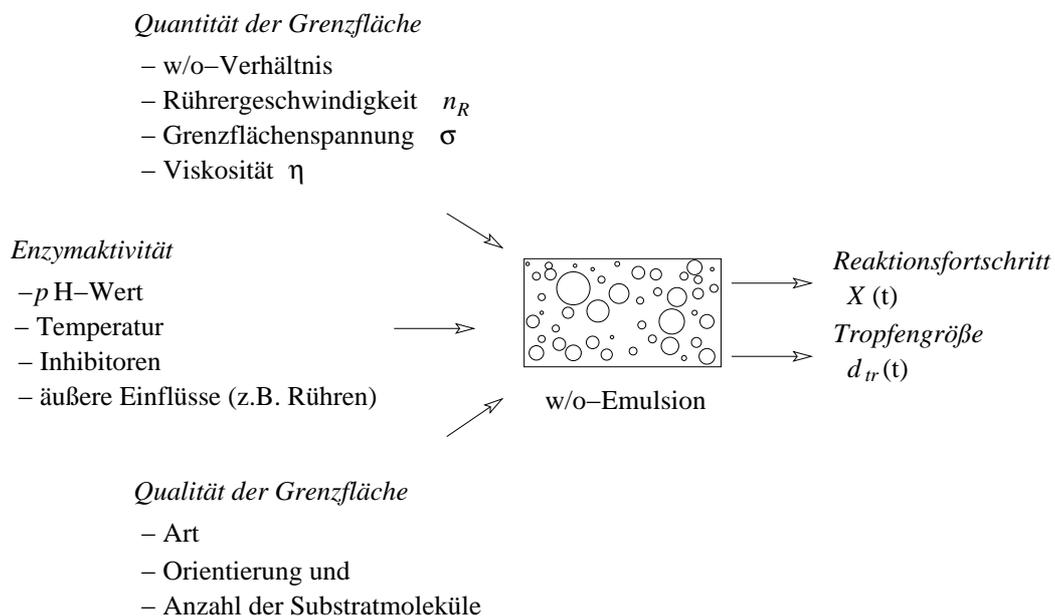
Die Lipase-katalysierte Hydrolyse findet an Öl/Wasser-Grenzflächen statt. Dort erfolgt die Umsetzung des Triglycerids zusammen mit Wasser zu den entsprechenden Lipolyseprodukten. Die Aktivierung der Lipase erfolgt erst durch Kontakt mit der Phasengrenzfläche [17, 74]. Benzonana und Desnuelle [8] ermittelten eine Abhängigkeit zwischen Umsetzungsgeschwindigkeit und Größe der Phasengrenzfläche, dem eigentlichen Reaktionsort der Lipolyse.

Zur Reaktorauslegung sowie für eine optimale Prozessführung ist die Kenntnis der Reaktionskinetik notwendig. Die Kinetik dieser heterogenen Reaktion wird maßgeblich durch Qualität und Quantität der Phasengrenzfläche [16, 94] sowie dem Enzymverhalten (Aktivität, Stabilität) während der Reaktion bestimmt. Die Enzymkinetik beeinflussende Faktoren sind wiederum von verschiedenen Einflussgrößen abhängig (Abb. 1.1), die sich in der Regel mit dem Reaktionsfortschritt ändern. Neben den Betriebsgrößen wie Rührergeschwindigkeit und Substratverhältnis<sup>1</sup> wird die Grenzflächengröße unter anderem von der stoffspezifischen Grenzflächenspannung  $\sigma$  beein-

---

<sup>1</sup>Mit der Bezeichnung „Substratverhältnis“ ist das volumenspezifische Verhältnis der beiden Reaktanden Triglycerid und Wasser gemeint.

flusst. Diese wird durch die Zusammensetzung bzw. der Belegung der Phasengrenzfläche bestimmt. Da Enzym und eines der Endprodukte (Fettsäure) in bestimmtem  $pH$ -Wertbereich grenzflächenaktiv sind und sich deshalb vorzugsweise an der Grenzfläche anlagern, ist die Grenzflächenspannung eine von der Reaktion abhängige Größe [29, 51, 63]. Neben der Größe des Reaktionsortes spielt der Aufbau der Grenzfläche (Organisation und Dynamik der Grenzflächenmoleküle) eine entscheidende Rolle bei der Enzymkinetik [10]. Das Enzymverhalten (Aktivität) während der Reaktion, beeinflusst durch Temperatur- und  $pH$ -Wert-Stabilität, eine inhibierende Wirkung der Fettsäure [35] sowie äußere Einflüsse wie z. B. Rühren oder Pumpen, ist ein entscheidender Faktor für die Wirtschaftlichkeit eines enzymatisch katalysierten Prozesses. Um eine bestimmte Produktmenge innerhalb eines gegebenen Zeitraumes zu produzieren sind Enzymaktivität und -stabilität bei gegebenen Reaktionsbedingungen maßgeblich mitbestimmend für die einzusetzende Enzymmenge und somit für die Wirtschaftlichkeit. Dies zeigt die Notwendigkeit, die Lipolysereaktion, die sich aufgrund ihres dynamisch-heterogenen Charakters nicht mittels konventioneller Enzymkinetik beschreiben lässt [18, 94], im Detail zu beleuchten.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung verschiedener Einflussgrößen der Reaktionsgeschwindigkeit der Lipase-katalysierten Lipolyse

Die Charakterisierung der Lipolysereaktion und ihre technische Umsetzung im Labormaßstab erfolgte in einer Vielzahl von Forschungsarbeiten. Lipasen wurden dabei in freier Form in Micellen sowie in Emulsionen mit organischem Lösungsmittel [50, 40, 45, 47, 62, 64, 40, 84], in Emulsionen ohne organisches Lösungsmittel

## 1 Motivation

[1, 18, 28, 32, 43, 48, 76, 88] und in adsorbierter Form auf Membranen oder Feststoffpartikeln [34, 37, 56, 59, 66, 67, 72, 73, 99] verwendet. Die Untersuchungsziele dieser Arbeiten sind in erster Linie die Beschreibung und Modellierung der Reaktionskinetik zu Reaktionsbeginn sowie die Bestimmung des Einflusses von Reaktionsparametern wie z. B. pH-Wert, Temperatur, Rührergeschwindigkeit (gelöste Lipase) und adsorbierte Enzymmenge auf festem Träger (adsorbierte Lipase).

Die Lipolyse in Emulsionen hat den Vorteil einer einfachen Realisierbarkeit bei geringen Betriebskosten<sup>2</sup> sowie in der Regel höheren Phasengrenzflächen gegenüber der auf Feststoffen adsorbierten Lipase. Als nachteilig erweist sich die komplizierte Messung der Grenzflächengröße in Zweiphasensystemen, besonders bei großer spezifischer Phasengrenze. Die Rückgewinnung von aktiver Lipase und eine zusätzliche Trennung von Öl- und Wasserphase im Anschluss an die Reaktion (zur Gewinnung der Produkte Fettsäure und Glycerin) gestalten sich zudem schwierig. Wasser-in-Öl-Emulsionen (w/o) sind gegenüber Öl-in-Wasser-Emulsionen (o/w) leichter trennbar [88]. Im Hinblick auf eine technische Umsetzung ist der erstgenannte Emulsionstyp vorzuziehen. Die überwiegende Mehrheit der Untersuchungen im Emulsionssystem erfolgte allerdings mit o/w-Emulsionen.

Im Rahmen eines dieser Arbeit vorangegangenen Forschungsprojektes (A.I.F.<sup>3</sup>-Projekt) wurde ein Laborreaktor (Schlaufenreaktor) für die Lipolyse im w/o-Emulsionssystem entwickelt [76]. Dabei erfolgten Reaktion und Phasentrennung im selben Reaktionsraum. Der w/o-Emulsion wurden weder Lösungsmittel noch Emulgator zugesetzt. Allerdings führt dies zu einer Verstärkung des dynamischen Emulsionsverhaltens. Neben der Reaktorentwicklung wurden diverse Substrate und Lipasen verschiedenen Ursprungs hinsichtlich ihrer Eignung für den Prozess untersucht. Unter Verwendung von Lein-, Raps- sowie Sonnenblumenöl und einer Lipase aus dem Hefepilz *Candida rugosa* wurden für Konzentrationen der dispersen Phase > 20 Vol.-% die höchsten Umsetzungsgeschwindigkeiten bestimmt.

Für eine industrielle Anwendung ist eine optimale Prozessführung ein wichtiges Kriterium. Dafür ist die Erfassung und Beschreibung der Reaktionskinetik notwendig. Erfolgt die Kinetikbeschreibung über die gesamte Reaktionszeit, so wird das Enzymverhalten während der Reaktion berücksichtigt. Wie bereits erwähnt, ist die biokatalytische Hydrolyse im dynamischen Zweiphasensystem nicht mit den üblichen Enzymkinetikmodellen beschreibbar. Eine Besonderheit ist die Größenänderung der Phasengrenz-

---

<sup>2</sup>ohne Enzymkosten

<sup>3</sup>A.I.F. – Anwendung industrielle Forschung

fläche (Reaktionsort) während des Reaktionsverlaufes aufgrund der grenzflächenaktiven Eigenschaften von Biokatalysator und Produkt. Dabei ist die Detektion der Tropfengröße einer wässrig dispersen Phase bei technisch relevanten Volumenkonzentrationen  $> 20$  Vol.-%, nicht trivial.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktionskinetik phänomenologisch auf der Basis von kinetischen Untersuchungen für die biokatalytische Hydrolyse von Rapsöl in einer w/o-Emulsion (Anteil wässrige Phase 25 Vol.-%)<sup>4</sup> zu beschreiben. Dabei galt es, den Reaktionsfortschritt und die Phasengrenzfläche in hoher zeitlicher Auflösung zu messen sowie Einflüsse wie Temperatur, *pH*-Wert, Substratverhältnis und Rührergeschwindigkeit auf das Enzymverhalten zu bestimmen. Mit dem Ziel, eine wirtschaftliche optimale Lipasekonzentration abschätzen zu können, sollten zudem Kenntnisse bezüglich des Lipase- und Fettsäureverhaltens an der Grenzfläche während der Reaktion gewonnen werden.

---

<sup>4</sup>Das verwendete System entspricht einem im A.I.F.-Projekt [76] eingesetztem Reaktionssystem.



# Kapitel 2

---

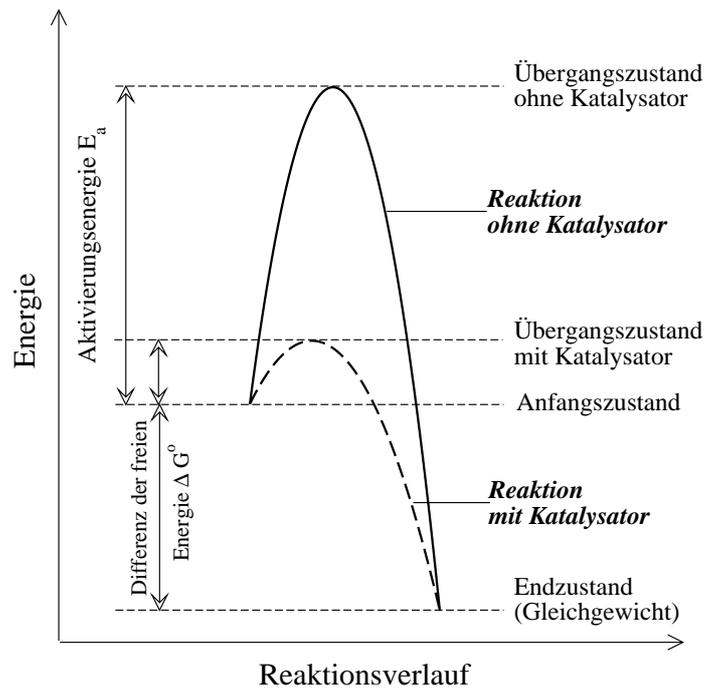
## Einführung

---

### 2.1 Charakterisierung von Enzymen

#### 2.1.1 Biokatalyse

Funktion und Effektivität von Stoffwechselreaktionen in nahezu allen Organismen hängen in erster Linie von biologischen Katalysatoren (Enzymen) ab. Damit eine Reaktion ablaufen kann, muss zunächst eine spezifische Menge an Energie aufgebracht werden, welche als Aktivierungsenergie bezeichnet wird. Ist die zur Verfügung stehende Energiemenge ausreichend groß, damit die nötige Aktivierungsenergie überwunden werden kann, befinden sich die Substratmoleküle in einem Übergangszustand. Bei ausreichender Anzahl reagieren diese dann zu den energetisch niedrigeren Produkten weiter. Enzyme senken die erforderliche Aktivierungsenergie ab, so dass sich bei gleicher Temperatur mehr Moleküle im Übergangszustand befinden als ohne Katalysator [82]. Biologische Katalysatoren beschleunigen Reaktionen um das  $10^8$ - bis  $10^{10}$ -fache [44] (Abb. 2.1). Enzyme bewirken eine stärkere Herabsetzung der Aktivierungsenergie als anorganische Katalysatoren, weshalb enzymkatalysierte Reaktionen im Allgemeinen schon bei milden Reaktionsbedingungen ablaufen [41], dies ist zum Beispiel am menschlichen Stoff-



**Abbildung 2.1:** Energiediagramm einer enzymkatalysierten ( - - - ) im Vergleich zu einer unkatalysierten ( — ) Reaktion [44]

wechselprozess ersichtlich. Sie verschieben dabei jedoch weder das thermodynamische Reaktionsgleichgewicht, noch gehen sie in das Produkt ein.

**Biochemischer Aufbau von Enzymen** Chemisch gehören die meisten Enzyme zur Klasse der Proteine. Sie bestehen aus einer oder mehreren Peptidketten, welche aus durch Peptidbindungen verknüpften Aminosäuren bestehen. Es existieren 20 verschiedene proteinogene Aminosäuren, die sich durch polare, hydrophobe, basische und saure Seitenketten unterscheiden. Damit eine katalytische Aktivität erreicht werden kann, müssen mindestens 50 Aminosäuren miteinander verkettet sein. Meistens setzen sich Enzyme jedoch aus deutlich mehr Aminosäureeinheiten zusammen. Molare Massen zwischen  $10^4$  und  $10^5$  g/mol sind die Regel [44]. Die Reihenfolge, in der die Aminosäuren miteinander verknüpft sind, wird als Primärstruktur bezeichnet. Durch die Primärstruktur ist die räumliche Anordnung der Aminosäuren entweder als  $\alpha$ -Helix oder als  $\beta$ -Faltblatt festgelegt. Diese wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Disulfidverbindungen, Wasserstoffbrücken, elektrostatische Bindungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten bestimmen die räumliche Orientierung der Helix- und der Faltblattstruktur, die sogenannte Tertiärstruktur. Die in Tertiärstrukturen organisierten Peptidketten werden als Untereinheiten bezeichnet.

Manche Enzyme bestehen aus mehreren, miteinander verknüpften Untereinheiten. Die Verbindung mehrerer Untereinheiten wird Quartärstruktur genannt.

Nur wenige Aminosäuren (2 – 4) des Proteins sind für die Substratbindung und die katalytische Funktion verantwortlich [82]. Sie haben innerhalb der Molekülstruktur eine spezifische räumliche und sequenzielle Anordnung und bilden das sogenannte katalytische (aktive) Zentrum. Hier werden die Substrate aufgenommen, gebunden und in Produkte umgesetzt.

**Wirkungsweise** Das katalytische Zentrum besitzt eine spezifische Konformation und befindet sich entweder auf der Oberfläche oder im Inneren des Proteins. Das Substrat muss entsprechende sterische Merkmale aufweisen, um mit dem katalytischen Zentrum interagieren zu können. Neben dieser sogenannten Substratspezifität weisen Enzyme auch eine Wirkungsspezifität auf, d. h., sie katalysieren nur einen bestimmten Reaktionstypus. Existieren in einem Substratmolekül mehrere Bindungen des gleichen Typs, dann verhalten sich Enzyme regiospezifisch oder stereoselektiv, d. h., sie spalten Bindungen an oder in bestimmten Positionen auf.

Der gesamte Reaktionsmechanismus am Enzym kann grob in folgende Schritte gegliedert werden:

1. Substratbindung
2. Katalytische Reaktion
3. Produktfreisetzung

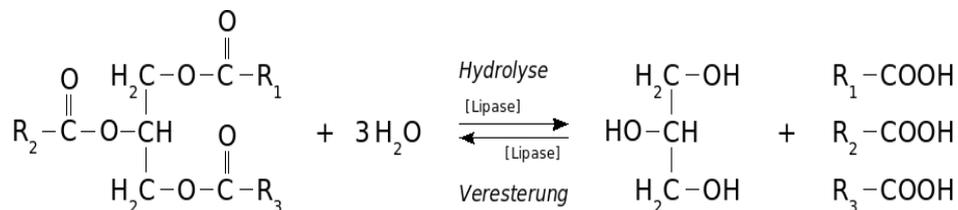
Bei dem Vorgang der Substratbindung kommt es zu reversiblen Konformationsänderungen des Enzyms. Dadurch wird das Enzym so ausgerichtet, dass sich zum einen Wasserstoffbrücken, ionische Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat zur Substratbindung ausbilden. Zum anderen können die für die katalytische Funktion verantwortlichen Aminosäuren lokal umpositioniert werden. Dies geschieht durch eine strukturinterne Ladungsverschiebung. Um die Konformationsänderung des katalytischen Zentrums zu realisieren, muss in anderen Enzymbereichen ebenfalls eine räumliche Strukturänderung erfolgen, ohne dabei jedoch die globale Enzymstruktur zu zerstören. Dies erklärt den komplexen und aus vielen Aminosäuren bestehenden Aufbau des Gesamtzyms. Hervorgerufen durch die substratbindenden Kräfte erfolgt neben der enzymseitigen Konformationsänderung ebenfalls eine strukturelle Substratänderung. Durch Wechselwirkungen zwischen Substrat und katalytischem

## 2 Einführung

Zentrum kommt es zu Ladungsverschiebungen im Substrat. Dies führt zu einem aktivierten Übergangszustand des Substrats [44]. Die Folge ist eine Verminderung der Aktivierungsenergie. Im Anschluss an die Reaktion erfolgt die Freisetzung des entstandenen Produktes an die Umgebung. Das Enzym besitzt jetzt wieder seine ursprüngliche Konformation.

### 2.1.2 Lipasen

Lipasen (EC 3.1.1.3)<sup>1</sup>, auch Triacylglycerinester-Hydrolasen, gehören zur Familie der Serin-Hydrolasen und entsprechen einer weitverbreiteten Gruppe von Enzymen in der Natur. Sie kommen sowohl im Menschen, in Tieren und Pflanzen als auch in Mikroorganismen vor. Ihre natürliche Funktion besteht in dem hydrolytischen Abbau von wasserunlöslichen Triglyceriden zu freien Fettsäuren und Glycerin (Abb. 2.2). Bei dieser biokatalytischen Gleichgewichtsreaktion entstehen wie beim konventionellen thermischen Verfahren Partialglyceride als Zwischenprodukt der Gesamtreaktion. Die Lage des Reaktionsgleichgewichtes wird durch den Wassergehalt des Gesamtsystems bestimmt [39]. Je nach Wassergehalt ist ebenso die Rückreaktion (Veresterung) möglich [18, 54].



**Abbildung 2.2:** Reaktionsschema der Lipase-katalysierten Reaktion: Hydrolyse und Synthese von Triglyceriden ( $R_1 - R_3$  entsprechen den Fettsäureresten)

Unter Regiospezifität versteht man das Vermögen der Lipasen die Esterbindungen an bestimmten Positionen zu hydrolysieren und den Vorzug, längere oder kürzere bzw. gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren abzuspalten [16].

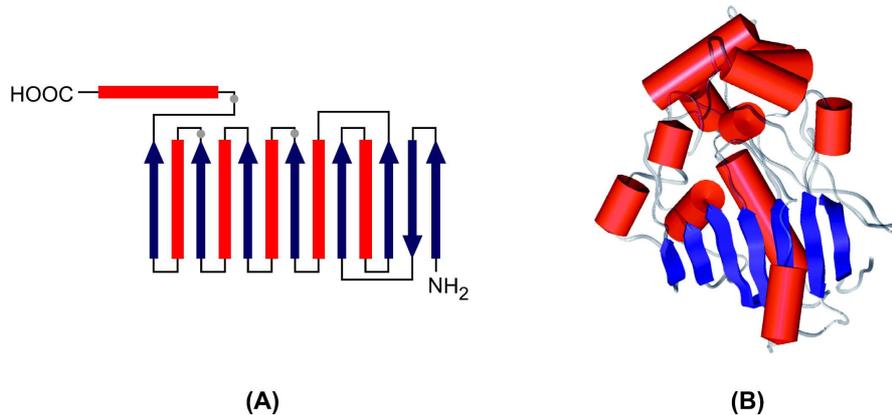
Die am besten untersuchte Lipase ist tierischen Ursprungs und wird aus Schweinepankreas gewonnen. Sie hat eine hohe Aktivität und lässt sich leicht isolieren [13]. Mikrobielle Lipasen aus Bakterien oder Pilzen liegen entweder intra- oder extrazellulär vor. Bedeutende Produzenten sind das Bakterium *Pseudomonas fluorescens* und der Hefepilz *Candida rugosa*. Aber auch aus verschiedenen Species der Pilz-Gattungen *Aspergillus* und *Mucor* und der Bakterien-Gattungen *Staphylococcus* und *Streptococcus*

<sup>1</sup>Die EC-Nummern bilden ein Klassifikationssystem für Enzyme. Als Kriterium für die Kategorisierung wird die vom Enzym katalysierte Reaktion verwendet.

wurden Lipasen isoliert. Pflanzliche Lipasen stammen vor allem aus Samen, wie z. B. Weizenkeimen und Rizinussamen [16].

### 2.1.2.1 Struktur

Obwohl die Lipasen unterschiedlichen Ursprungs oftmals keine signifikante Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz aufweisen, konnte bei nahezu allen strukturaufgeklärten Lipasen ein ähnlicher dreidimensionaler Aufbau ermittelt werden [12]. Das charakteristische Faltungsmuster wird als  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung bezeichnet [77]. Dabei sind im Zentrum der Lipase acht nahezu parallel angeordnete  $\beta$ -Faltblätter platziert, die beidseitig von  $\alpha$ -Helices eingeschlossen sind, mit Ausnahme des zweiten  $\beta$ -Faltblattes, welches zudem invers in die Struktur eingeordnet ist (Abb. 2.3). Die Aminosäuren, welche für die katalytische Umsetzung verantwortlich sind, befinden sich für die bisher untersuchten Lipasen bis auf wenige Ausnahmen in denselben Positionen auf der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsstruktur [12].



**Abbildung 2.3:** (A) Schematische Darstellung der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung (Rechtecke kennzeichnen  $\alpha$ -Helices, Pfeile entsprechen  $\beta$ -Faltblätter und kleine graue Kreise markieren die Position der katalytisch aktiven Aminosäuren); (B)  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung ( $\alpha$ -Helices als Zylinder,  $\beta$ -Faltblätter als Pfeile) am Beispiel einer Lipase aus *Candida rugosa* (aus [81])

### 2.1.2.2 Lipase-katalysierte Hydrolyse

Die Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Triglycerids ist eine heterogene Reaktion. Da das Enzym wasserlöslich und das Substrat hydrophob ist, erfolgt die Reaktion und die damit verbundene Interaktion zwischen Enzym und Substrat an der Grenzfläche zwischen Wasser- und Ölphase [16]. Demzufolge geht den charakteristischen Teilschritten

## 2 Einführung

des biokatalytischen Wirkmechanismus (Abschn. 2.1.1) die Grenzflächenaktivierung des Enzyms voraus.

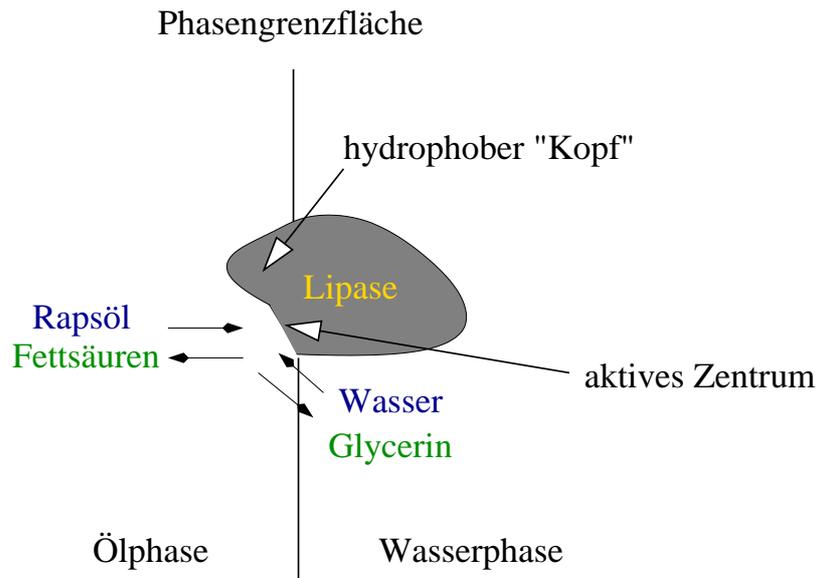
**Lipase und Grenzflächen – Grenzflächenaktivierung** Die o/w-Phasengrenzfläche besteht aus zwei sich gegenüberliegenden Schichten, in denen die Moleküle der jeweiligen Phase organisiert sind. Grenzflächenaktive Substanzen, wie z. B. dissoziierte Fettsäuren<sup>2</sup> und Lipasen, haben ausgeprägte hydrophile und lipophile Bereiche. Bei der öllöslichen Fettsäure ragt der hydrophile Molekülbereich in die wässrige Phase hinein. Bei der wasserlöslichen Lipase dringt der lipophile Bereich in die Ölphase ein. Dieser Prozess der Anlagerung wird als Adsorption bezeichnet.

Sobald die Substrate der Lipasen monomere Schichten, Micellen oder Emulsionen ausbilden, steigt die Aktivität einer Lipase rapide an. Sarda und Desnuelle [74] zeigten, dass Lipasen bei wasserlöslichen Substraten nahezu keine Aktivität aufweisen. Erst nach der Substratsättigung und dem Vorhandensein von Substrattröpfchen wurde ein deutlicher Anstieg der Aktivität festgestellt. Man kann daher von einer „Aktivierung der Lipase“ durch die Grenzfläche sprechen. Diese notwendige Grenzfläche muss nicht zwingend eine flüssig/flüssig Grenzfläche sein. Brockmann *et al.* [17] wiesen nach, dass es bei einem wasserlöslichen Substrat nach Zugabe von hydrophoben Partikeln zu einem tausendfachen Anstieg der Aktivität kommt. Ursache hierfür ist die Bildung einer Monolayerschicht aus Substrat auf der Partikeloberfläche, die mit der Grenzflächencharakteristik einer Emulsion vergleichbar ist.

Voraussetzung für die Aktivitätssteigerung der Lipase durch Grenzflächenadsorption ist ihre korrekte Orientierung an der Grenzfläche zwischen wässriger Phase und wasserunlöslichem Substrat. Brockerhoff [15] entwickelte eine Modellvorstellung für das Grenzflächenverhalten von Lipasen am Beispiel einer Pankreaslipase (Abb. 2.4). Dabei wurde angenommen, dass die Lipaseoberfläche einen hydrophoben Bereich aufweist, der für die Substratbindung und Orientierung der Lipase verantwortlich ist. Dieser Oberflächenbereich wurde als „hydrophober Kopf“ bezeichnet. Das aktive Zentrum befindet sich in der Nähe des „hydrophoben Kopfes“, ist aber nicht dessen Bestandteil. Durch diese Konstellation sind aktives Zentrum und wasserunlösliches Substrat eng verknüpft, jedoch nicht miteinander verbunden, so dass Wassermoleküle stets Zugang zum Lipasemolekül haben. Die korrekte Orientierung der Lipase an der Grenzfläche wird durch geladene Aminosäureketten an der Enzymoberfläche hervorgerufen [16]. Das Substrat

---

<sup>2</sup>Mit den im Weiteren erwähnten Fettsäuren mit grenzflächenaktiven Eigenschaften sind Fettsäuren im dissoziierten Zustand gemeint.



**Abbildung 2.4:** Hypothetisches Modell zur Orientierung einer Pankreaslipase an der Öl/Wasser-Grenzfläche (modifiziert nach Brockerhoff [15])

und die Lipase sind relativ zueinander unbeweglich, so dass das aktive Zentrum sich in der Ebene zum Substrat befindet. Eine bessere Orientierung und hohe Konzentrationen an Substratmolekülen im Nahbereich der Lipase bilden die Voraussetzung für eine im Vergleich zu nicht adsorbierten Enzymen höheren Reaktionsgeschwindigkeit [16].

Die Modellvorstellung wurde 20 Jahre später durch experimentelle Untersuchungen (Strukturaufklärung der Lipase) konkretisiert. Die Grenzflächenaktivierung von Lipasen wird zum einen durch eine Konformationsänderung der dreidimensionalen Lipasestruktur erklärt [23]. Das katalytische Zentrum ist im Inneren des Proteins eingebettet und durch eine spezielle, für Lipasen typische Struktureinheit verschlossen, die als „Deckel“ bezeichnet wird [24]. Dieser „Deckel“ besteht je nach Organismus aus 10 – 20 helikal angeordneten Aminosäuren. In der Lipase aus *Candida rugosa* beispielsweise entspricht der „Deckel“ einer einzelnen aus elf Aminosäuren bestehenden  $\alpha$ -Helix [36]. Ausgelöst durch Adsorption der Lipase an die Phasengrenzfläche verschiebt sich diese Struktureinheit um  $12 \text{ \AA}$ , wobei eine hydrophobe Fläche, die etwa 8% ( $\approx 800 \text{ \AA}^2$ ) der Gesamtoberfläche des Enzyms einnimmt, freigelegt wird [12]. Dadurch erfahren einige Proteinbereiche eine Konformationsänderung, so dass die für die Substratbindung verantwortlichen Aminosäuren in Position gebracht werden, um für die Spaltreaktion notwendigen Bindungen ausbilden zu können. Zum anderen wird die Aktivitätssteigerung durch eine Änderung von Konzentration und Organisation der Substratmoleküle in der Grenzflächenschicht als Folge der Lipaseadsorption beschrieben. Muderwha und Brockman [61] ermittelten in ihrer Arbeit folgenden Zusammenhang zwischen

## 2 Einführung

der Grenzflächenkonzentration von Substrat und der adsorbierten Lipasemenge: Mit zunehmender Substratmenge an der Grenzfläche steigt die Anzahl adsorbierter Lipasen, wobei das Molekülverhältnis Lipase/Substrat gegen einen Grenzwert strebt.

Grenzflächenaktive Substanzen konkurrieren mit dem Substrat um Oberflächenplätze an der Phasengrenze. Erfolgt eine Adsorption, wird die Grenzflächenkonzentration des Substrats herabgesetzt. Dies entspricht einer Substratverdünnung und führt zur Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit [16]. Des Weiteren kann die dreidimensionale Struktur durch die Adsorption an der Grenzfläche verändert werden, wodurch die Lipasen unter Umständen deaktiviert werden können [13].

**Substratbindung** Ist die Lipase an einer hydrophoben Grenzfläche adsorbiert, klappt der „Deckel“ auf und ein hydrophober Spalt zwischen Enzymoberfläche und „Deckel“ wird freigelegt. Das hydrophobe Triglycerid diffundiert durch den Spalt in das Enzym zur Substratbindestelle. Hier existieren vier spezifische Bindetaschen: die Alkohol- bzw. Oxyanion-Bindetasche und drei Taschen zur Bindung der drei Fettsäureketten [12]. Damit die Bindung zwischen Lipase und Substrat anhand von Wasserstoffbrücken, ionischen Bindungen und hydrophoben Wechselwirkungen entstehen kann, darf der Abstand zwischen Substrat und Enzym ein Mindestmaß nicht überschreiten.

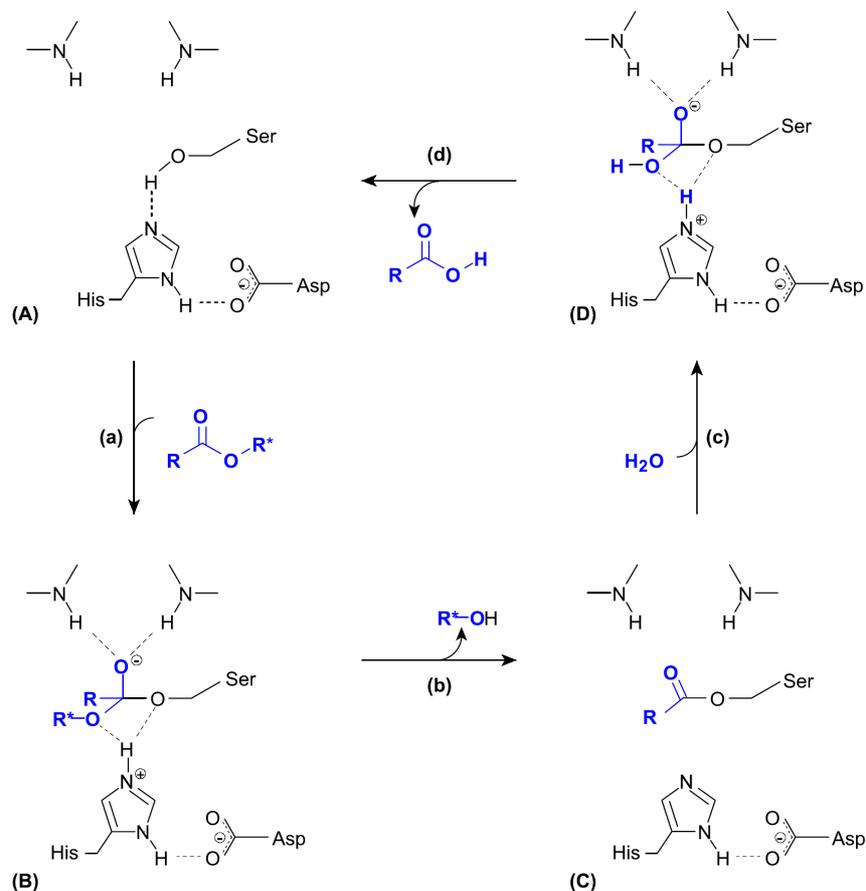
Die Fettsäurebindestellen zwischen unterschiedlichen Lipasen variieren stark. Die Alkohol-Bindetaschen in verschiedenen Lipasen sind allerdings vergleichbar. Die Konfiguration des Spaltes und der Fettsäurebindestaschen ist verantwortlich für die Substratspezifität der Lipasen. So besitzt die Lipase aus *Candida rugosa* beispielsweise einen hydrophoben Tunnel, der ins Innere der Lipase reicht und lang genug für C18-Fettsäureketten ist [12]. Die dreidimensionale Form der Fettsäure- bzw. Triglyceridmoleküle wird durch die Acylkettenlänge, den Sättigungsgrad und den Ort der Doppelbindungen in der Acylkette festgelegt.

**Katalytischer Mechanismus und Produktfreisetzung**<sup>3</sup> Der Mechanismus der Lipase-katalysierten Hydrolyse eines Esters ist in Abb. 2.5 dargestellt. Drei Aminosäurereste sind für den katalytischen Prozess verantwortlich. Im Fall der Lipase aus *Candida rugosa* sind es Serin (224), Glutaminsäure (356) und Histidin (464), sie werden als katalytische Triade bezeichnet. Das in den Substratbindestellen gebundene Triglycerid wird an einem der drei Carbonyl-Kohlenstoffatome nucleophil durch das Seitenketten-Sauerstoffatom des Serins angegriffen (a). Das entstehende Oxyanion der ersten te-

---

<sup>3</sup>Folgender Abschnitt lehnt sich an den Ausführungen von [81] an.

trahedralen Zwischenstufe (B) wird durch Rückgrat-Atome der beiden Aminosäuren stabilisiert, welche die Oxyanion-Tasche bilden. Der Zusammenbruch dieses Intermediates führt zur Abspaltung des Alkohols aus der Bindungstasche (b), und das Acylenzym (C) verbleibt an dieser Stelle. Im Hydrolyseschritt (c) greift nun Wasser das Acylenzym unter Ausbildung des zweiten tetrahedralen Intermediates (D) an. Dessen Zusammenbruch (d) führt zur Abspaltung der Säure. Die freie Carbonsäure verlässt das Enzym und regeneriert hierdurch die Lipase. Der geschwindigkeitbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist der Zerfall des ersten tetrahedralen Intermediates unter Freisetzung des Alkohols (b) [26].



**Abbildung 2.5:** Mechanismus der Lipase-katalysierten Hydrolyse eines Esters; (a) – (d) entsprechen den Reaktionsschritten und (A) – (D) kennzeichnen die Zwischenprodukte (aus [81])

### 2.1.2.3 Aktivität

Eine Aktivitätseinheit (Unit) ist als diejenige Enzymmenge definiert, die  $1 \mu\text{mol}$  Substrat in einer Minute bei definierten Reaktionsbedingungen umsetzt. Dabei wird die Enzymaktivität von der Stabilität der Proteinstruktur bestimmt. Diese ist sensibel ge-

## 2 Einführung

genüber äußeren Einflüssen, wie z. B. Wärme,  $pH$ -Wert, Ionenstärke und Scherkräften. Durch Wärme, mechanische Kräfte und Ladungsveränderungen in unmittelbarer Nähe des Enzyms kann es zu Bindungsänderungen im Enzym kommen. Das hat eine Strukturänderung zur Folge und kann zu einer veränderten Fähigkeit, die Substratmoleküle umzusetzen, führen. Für jedes Enzym gibt es eine Struktur, bei der es eine maximale Menge an Substrat in Produkt umsetzt. Unter diesen optimalen Bedingungen ist das Enzym maximal aktiv. Häufig befindet sich dieses Optimum in einem engen Prozessparameterbereich [30].

Die Enzymstabilität beschreibt den Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit der Zeit bei gegebenen Reaktionsbedingungen. Für industrielle Anwendungen ist es wichtig, das zeitabhängige Aktivitätsverhalten des eingesetzten Enzyms unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen zu kennen, um den Aktivitätsverlauf während der Reaktion abzuschätzen.

**Aktivitätstest** Die Enzymaktivität wird experimentell in Aktivitätstests ermittelt. Dabei liegen die Reaktanden in kleinen Volumina vor und der zeitabhängige Substratverbrauch wird mit einer geeigneten Analysenmethode gemessen. Um Enzymaktivitäten vergleichen zu können, müssen die Testbedingungen (Temperatur,  $pH$ -Wert, Rührergeschwindigkeit, Substratverhältnis etc.) gleich bleiben. Bei der Aktivitätsmessung sollten die Substratmoleküle im Vergleich zu den Lipasemolekülen im Überschuss vorliegen [30, 53]. Wird der Aktivitätstest im Zusammenhang mit einer bestimmten Anwendung durchgeführt, sollten im Test die gleichen Substrate und Reaktionsbedingungen Verwendung finden, um eine direkte Beziehung zwischen Anwendung und Aktivitätstest bzw. Lipaseaktivität herstellen zu können [30].

Aufgrund der Charakteristika von Lipasen finden ihre Aktivitätstests in Emulsionen statt. Dies führt zu technischen Schwierigkeiten in der Testdurchführung. Das zweiphasige System ist in der Regel nicht stabil und die Tropfen liegen in einer Größenverteilung vor. Dies führt insgesamt zu einer schlechten Reproduzierbarkeit der Testergebnisse [60].

### 2.1.2.4 Kommerzielle Lipase aus *Candida rugosa*

Der Hefepilz *Candida rugosa* verfügt über mindestens fünf Gene, die jeweils einen Lipasetypen (EC 3.1.1.3) kodieren. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Lipasen

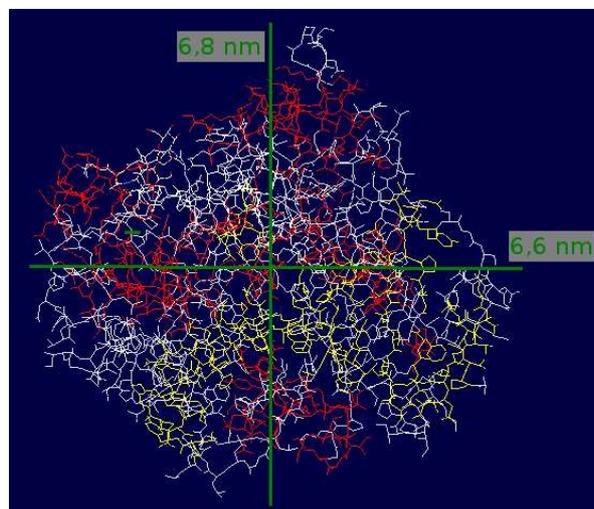
(Lip1 bis Lip5)<sup>4</sup> strukturbedingt nur geringfügig. Sie bestehen aus 548 bzw. 549 Aminosäuren und weisen molare Massen zwischen 58420 und 58865 Da<sup>5</sup> auf.

Benzonana und Esposito [9] untersuchten die Regiospezifität der zu spaltenden Esterbindungen einer Lipase aus dem Hefepilz *Candida rugosa*. Für Olivenöl als Substrat stellten sie fest, dass alle drei Esterbindungen des Triglycerids mit der gleichen Wahrscheinlichkeit und Geschwindigkeit gespalten werden. Neben Di- und Monoglyceriden entsteht Glycerin kurze Zeit nach Reaktionsbeginn.

Wie in Abschn. 2.1.2.2 erläutert, ist der „hydrophobe Kopf“ der Lipasestruktur für die Substratbindung verantwortlich. Eine Information über dessen Größe ist aus der Literatur nicht bekannt. Um die benötigte Adsorptionsfläche an der Phasengrenzfläche abzuschätzen, wird aus der in Abb. 2.6 dargestellten Lipasestruktur ein Pseudodurchmesser  $d_e$  definiert, welcher der maximalen linearen Ausdehnung einer dreidimensionalen Lipasestruktur in der Ebene entspricht. Daraus wird die Adsorptionsfläche geschätzt zu:

$$A_e = \frac{\pi}{4} d_e^2 \quad (2.1)$$

Für  $d_e \approx 6,8$  nm ergibt sich ein Flächenbedarf von  $A_e \approx 3,6 \cdot 10^{-17}$  m<sup>2</sup>.



**Abbildung 2.6:** Struktur einer Lipase aus *Candida rugosa* [36] (aus <http://www.rcsb.org>; Protein Data Bank Identifier: 1crl; letzter Zugriff: 10.10.07)

<sup>4</sup>Die Ausdrücke Lip1, Lip2 usw. bezeichnen jeweils das Gen, das die Aminosäuresequenz der entsprechenden Lipase 1 bzw. Lipase 2 usw. kodiert.

<sup>5</sup>aus <http://au.expasy.org>; letzter Zugriff: 10.10.07

## 2.2 Eigenschaften von Emulsionen

Emulsionen sind disperse Mehrphasensysteme, die im einfachsten Fall aus zwei ineinander unlöslichen Flüssigkeiten (Wasser und Öl) bestehen. Dabei liegt die eine Flüssigkeit feinverteilt (disperse Phase) in der anderen (kontinuierliche Phase) vor. Es wird prinzipiell zwischen zwei Emulsionssystemen unterschieden. Bei einer Öl-in-Wasser-Emulsion (o/w) ist die disperse Phase lipophil. Im umgekehrten Fall spricht man von einer Wasser-in-Öl-Emulsion (w/o). Die Tropfendurchmesser für Emulsionen liegen typischerweise zwischen 0,1 und 500  $\mu\text{m}$  [80].

Emulsionen sind thermodynamisch instabil. Die lokalen Zusammensetzungen und Tropfengrößenverteilungen ändern sich in Abhängigkeit von der Zeit. Die physikalischen Instabilitäten werden durch Sedimentation und Tropfenkollision verursacht. Diese führen je nach Art und Größe der Wechselwirkungskräfte zu Aggregation und Koaleszenz [80]. Die Wechselwirkungskräfte zwischen den Tropfen einer Emulsion werden durch anziehende Van-der-Waals- und abstoßende elektrostatische Kräfte gebildet. Die elektrostatischen Kräfte bei o/w-Emulsionen entstehen aufgrund einer elektrischen Doppelschicht rund um die negativ geladenen Öltröpfen. Bei w/o-Emulsionen fehlt diese elektrische Doppelschicht, so dass abstoßende Kräfte hauptsächlich durch sterische Barrieren an der Grenzfläche erzeugt werden [79].

Emulsionen werden stabilisiert, indem Hilfsstoffe wie Stabilisatoren und/oder grenzflächenaktive Substanzen (Emulgatoren) zugesetzt werden. Stabilisatoren bestehen aus hochmolekularen Substanzen und erhöhen die Viskosität der kontinuierlichen Phase. Hierdurch nimmt die Beweglichkeit der Tropfen und damit die Koaleszenzwahrscheinlichkeit ab. Gleichzeitig wird aufgrund der höheren Viskosität die Sedimentationsgeschwindigkeit kleiner. Emulgatoren adsorbieren wegen ihres amphiphilen<sup>6</sup> Charakters an der Grenzfläche zwischen disperser und kontinuierlicher Phase [80]. Dies wird durch ihren hydrophilen und lipophilen Molekülteil ermöglicht. Dadurch sind sie in der Lage, sich an der Phasengrenzfläche von Emulsionen anzulagern. Die Grenzflächenspannung zwischen kontinuierlicher und disperser Phase wird infolgedessen abgesenkt und die mechanische Zerkleinerung der dispersen Phase entsprechend erleichtert. Die an der Phasengrenzfläche adsorbierten Moleküle bauen zudem einen Film an der Grenzfläche auf. Neben der sterischen Barriere von grenzflächenaktiven Substanzen können ionische Emulgatormoleküle Ladungen an die Grenzfläche bringen, dies führt zur Erhöhung der elektrostatischen Barriere in o/w-Emulsionen.

---

<sup>6</sup>Moleküle, die sowohl hydrophile als auch lipophile Bereiche aufweisen

Wichtig für die Charakteristik von Emulsionen ist die Grenzflächenbesetzungskinetik des verwendeten Emulgators. Diese beschreibt, wie schnell die durch den Emulgiervorgang neu gebildete Grenzfläche mit Emulgatormolekülen besetzt wird. Die Bestimmung der Grenzflächenbesetzungskinetik erfolgt durch eine kontinuierliche Messung des zeitlichen Verlaufes der Grenzflächenspannung. Solange die Grenzflächen nicht ausreichend mit Emulgator besetzt sind, reichen die abstoßenden Wechselwirkungskräfte nicht aus, um Koaleszenzvorgänge zu verhindern. Emulsionen, die mit Emulgatoren einer sehr langsamen Grenzflächenbesetzungskinetik hergestellt werden, besitzen daher nach dem Emulgieren mit gleichem Energieeintrag größere Tropfen und breitere Tropfengrößenverteilungen als Emulsionen, die mit Emulgatoren einer schnellen Grenzflächenbesetzungskinetik hergestellt werden [79].

Neben ihren hauptsächlichen Wirkungen ändern Emulgatoren und Stabilisatoren zudem die rheologischen Eigenschaften der Emulsion [79]. Die Tropfengrößenverteilung der dispersen Phase beeinflusst Feinheit, Homogenität, Stabilität und Fließeigenschaften der Emulsion. Das Emulgieren der dispersen Phase in der kontinuierlichen Phase erfolgt meistens über mechanischen Energieeintrag. Der Emulgierprozess besteht in der Regel aus drei Schritten [79]:

1. Vormischen der einzelnen Komponenten zu einer grobdispersen Rohemulsion,
2. Feinemulgieren durch Tropfenaufbruch bei Überschreitung kritischer Tropfendeformation und
3. Stabilisieren der neu entstandenen Phasengrenzfläche.

Werden die neugebildeten Tropfen mit Emulgatormolekülen schnell belegt, können sie wegen der Herabsetzung der Grenzflächenspannung im Gegensatz zu langsamerer Belegung einfacher zerkleinert werden [78].

Die Tropfengrößenverteilung der Emulsion hängt von Art und Größe des mechanischen Energieeintrages, der Grenzflächenbesetzungskinetik grenzflächenaktiver Substanzen sowie der Ionenstärke und dem pH-Wert ab [78].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weder Emulgatoren noch Stabilisatoren verwendet. Allerdings wirken sowohl Enzyme als auch das Reaktionsprodukt Fettsäure<sup>7</sup> als grenzflächenaktive Substanzen stabilisierend auf die Emulsion. Die Emulsionsherstellung erfolgte mit einem Rührwerk. Bei der Verwendung von Rührwerken werden die

---

<sup>7</sup>Die Fettsäure weist allerdings nur dann grenzflächenaktive Eigenschaften auf, wenn sie deprotoniert vorliegt. Dies ist der Fall, wenn  $pK_{SFFS} < pH_{Lösung}$ . Bei 25 °C entspricht der  $pK_S$ -Wert für Ölsäure 5,02. Für die gesamten Untersuchungen wurde der pH-Wert zu Reaktionsbeginn auf 6,5 eingestellt.

## 2 Einführung

Emulsionstropfen hauptsächlich durch Scherung (in turbulenter Strömung) zerkleinert [98]. Die Intensität und Homogenität der Scherbeanspruchung hängt von der Geometrie des Rührers und des Rührbehälters ab. Tropfendeformation erfolgt durch normale und tangentielle Spannungen, die an der Grenzfläche zwischen kontinuierlicher und disperser Phase angreifen. Wenn die deformierenden Kräfte die formerhaltenden Grenzflächenkräfte örtlich genügend lange überschreiten, kommt es zum Tropfenaufbruch [78].

**Tropfenzerkleinerung in turbulenten Strömungen** Befindet sich ein Tropfen mit dem Durchmesser  $d_{tr}$  in einer turbulent strömenden Flüssigkeit, wird er unterschiedlichen Strömungswirbeln ausgesetzt. Ein Tropfen, der kleiner als der Wirbel ist, folgt der Strömung. Ist der Tropfendurchmesser jedoch größer als der Wirbel, kommt es zur Ausbildung einer Druckdifferenz über die Tropfenoberfläche. Passiert ein Tropfen mehrere Wirbel hintereinander, so beginnt er zu oszillieren. Die Folge ist die lokale Deformation des Tropfens. Es entstehen Ausbuchtungen und Ausstülpungen. Entweder werden die Ausstülpungen vom Tropfenkörper abgetrennt [42] oder der oszillierende Tropfen wird als Ganzes zerkleinert [97].

Die Tropfendeformation bzw. der Tropfenaufbruch in turbulenter Strömung kann durch eine Funktion der Kenngrößen Weber-Gruppe  $N_{We}$  und der Viskositätsgruppe  $N_{Vi}$  beschrieben werden [78]:

$$(N_{We})_{krit} = C [1 + f(N_{Vi})] \quad (2.2)$$

Dabei entspricht  $(N_{We})_{krit}$  dem Wert der Weber-Gruppe beim Tropfenaufbruch,  $C$  ist eine Konstante.  $N_{We}$  und  $N_{Vi}$  sind wie folgt definiert [42, 5]:

$$N_{We} = \frac{\rho_k d_{tr}^{5/3} \epsilon^{2/3} C^2}{\sigma} \quad \text{Weber-Gruppe} \quad (2.3)$$

$$N_{Vi} = \frac{\eta_d \epsilon^{1/3} d_{tr}^{1/3}}{\sigma} \quad \text{Viskositätsgruppe} \quad (2.4)$$

mit  $d_{tr}$  – Tropfendurchmesser,  $\rho_k$  – Dichte der kontinuierlichen Phase,  $\sigma$  – Grenzflächenspannung zwischen disperser und kontinuierlicher Phase,  $\epsilon$  – Leistungsdichte,  $\eta_d$  – dynamische Viskosität der dispersen Phase,  $C$  – Konstante. Die Weber-Gruppe bildet das Verhältnis zwischen den auf die Tropfenoberfläche wirkenden äußeren Kräften und den gegen die Deformation wirkenden Grenzflächenkräften. Die Viskositätsgruppe beschreibt zusätzlich den Viskositätseffekt der Flüssigkeit im Tropfen [78].

Der genaue Funktionsverlauf der Viskositätsgruppe ( $f(N_{Vi})$ ) ist nicht bekannt. Eine Grenzwertbetrachtung ergibt für den in einer turbulenten Strömung erzeugten maximalen mittleren Tropfendurchmesser  $d_{tr,max}$  folgenden Zusammenhang [5, 42]:

○  $N_{Vi} \rightarrow 0$

$$d_{tr,max} \sim \varrho_k^{-1/5} \sigma^{3/5} \epsilon^{-2/5} \quad (2.5)$$

○  $N_{Vi} \rightarrow \infty$

$$d_{tr,max} \sim \epsilon^{-1/4} \eta_d^{3/4} \varrho_k^{-1/2} \quad (2.6)$$

Gln. 2.3 und 2.4 zeigen, dass bei gegebenen Stoffwerten die Tropfengröße von der eingetragenen Leistungsdichte abhängig ist. Je höher die Leistungsdichte pro Volumen ist, desto feinere Tropfen erhält man. Zudem ist der Emulgierprozess temperaturabhängig. Mit steigender Emulgiertemperatur verringern sich Dichte, Grenzflächen- spannung und Viskosität bei gleichbleibendem Energieeintrag. Dies führt zu Tropfen mit geringeren mittlerem Durchmesser.

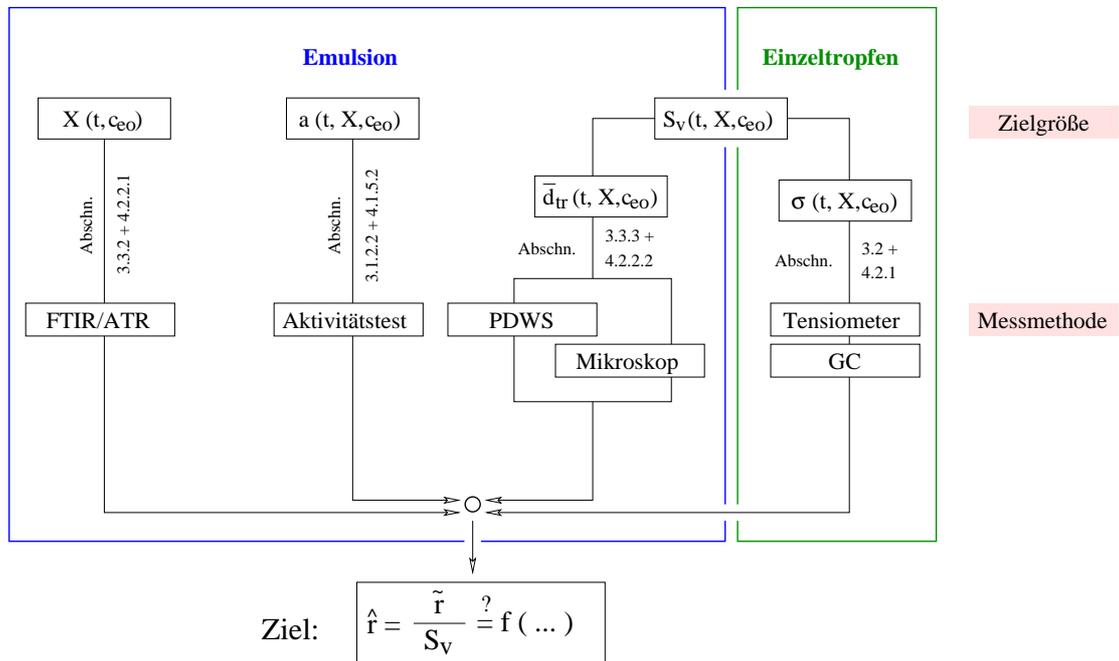
## 2.3 Zielstellung und Vorgehen

Um die komplexen Zusammenhänge bei der biokatalytischen Hydrolyse von Rapsöl in einer dynamischen w/o-Emulsion zu untersuchen, wurden verschiedene Teilaspekte betrachtet (Abb. 2.7). Mit dem Ziel, eine grenzflächenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}$  zu bestimmen, wurden für die reaktionskinetischen Untersuchungen Reaktionsfortschritt  $X$  und volumenspezifische Phasengrenzfläche  $S_V$  parallel im selben Reaktionsvolumen in Abhängigkeit der Reaktionszeit gemessen. Dabei wurde für die Bestimmung des Rapsölsatzes mit hohen Zeitraten eine FTIR-Analysemethode entwickelt. Für die Messung der mittleren Tropfengröße  $d_{tr}$  zur Berechnung der spezifischen Phasengrenzfläche wurde eine nicht-konventionelle Tropfengrößen-Bestimmungsmethode für disperse Systeme hoher Konzentrationen angewandt, die Photonendichtewellen-Spektroskopie.

Die reaktionskinetische Untersuchung im heterogenen Reaktionssystem wurde unter Variation der Lipasekonzentration  $c_{e0}$  durchgeführt. Alle anderen Reaktionsparameter wurden während der Untersuchung konstant gehalten. Dementsprechend wies die w/o-Emulsion zu Untersuchungsbeginn immer dieselben physikalischen Eigenschaften auf. Zudem wurde die spezifische Lipaseaktivität  $a$  während der Reaktion bestimmt. Der Einfluss von Temperatur, pH-Wert, Rührergeschwindigkeit und Substratverhältnis auf

## 2 Einführung

die Lipaseaktivität bzw. Umsetzungsgeschwindigkeit im Zweiphasensystem wurde separat bestimmt.



**Abbildung 2.7:** Untersuchungsziel und Methoden; Legende:  $a$  – spezifische Lipaseaktivität,  $c_{e0}$  – Lipasekonzentration,  $\bar{d}_{tr}$  – mittlerer Tropfendurchmesser,  $\tilde{r}$  – volumenspezifische (Wasserphase) Reaktionsgeschwindigkeit,  $\hat{r}$  – grenzflächenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit,  $S_V$  – volumenspezifische (Wasserphase) Phasengrenzfläche,  $t$  – Reaktionszeit,  $X$  – Umsatz,  $\sigma$  – Grenzflächenspannung zwischen öli- ger und wässriger Phase

Um detaillierte Kenntnisse über die Vorgänge an der Phasengrenzfläche (wie Lipase- und Fettsäureadsorption) zu gewinnen, wurde die Grenzflächenspannung  $\sigma$  zwischen öli- ger und wässriger Phase (mit Pendant-Drop-Tensiometer) sowie parallel die Fettsäu- remenge (mit GC) in der öli- gen Phase gemessen.

# Kapitel 3

---

## Experimentelle Untersuchung

---

### 3.1 Charakterisierung des Stoffsystems

#### 3.1.1 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tab. A.1 (S. 119) zusammengestellt. Die Chemikalien wurden in Analysequalität vom jeweiligen Hersteller bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Tab. 3.1 enthält die Fettsäurezusammensetzung des eingesetzten raffinierten Rapsöls ( $\rho_{\text{Öl}} = 0,913 \text{ g/cm}^3$ ) sowie des bei Kalibrierungen verwendeten Spaltfettsäuregemisches aus Rapsöl ( $\rho_{\text{FFS}} = 0,905 \text{ g/cm}^3$ ). Der natürliche Anteil freier Fettsäure im Rapsöl beträgt 0,07 Ma.-%<sup>1</sup>.

#### 3.1.2 Lipase

##### 3.1.2.1 Lipase und Puffer

Die eingesetzte Lipase wurde mit *Candida rugosa* produziert und wurde unter der Bezeichnung Typ VII bei Sigma-Aldrich (München, D) erworben. Das leicht bräunliche Lipasepulver enthält laut Hersteller neben den Lipasemolekülen zusätzlich Laktose als

---

<sup>1</sup>Herstellerangabe

### 3 Experimentelle Untersuchung

**Tabelle 3.1:** Zusammensetzung des verwendeten Rapsöls (Kunella Feinkost – Artikelnummer 20336) und deren Spaltfettsäure (Prignitzer Chemie – Muster)

Kettenlänge	Rapsöl <sup>a</sup> in Ma.-%	Spaltfettsäure <sup>a</sup> in Ma.-%
C14:0	— <sup>b</sup>	0,1
C16:0	4,6	4,8
C16:1	— <sup>b</sup>	0,2
C18:0	1,7	1,8
C18:1	61,7	61,8
C18:2	19,6	19,9
C18:3	9,1	7,9
C20:0	— <sup>b</sup>	0,6
C20:1	— <sup>b</sup>	1,7
C22:0	— <sup>b</sup>	0,3
C22:1	0,9	0,9

<sup>a</sup> Analyse wurde vom Hersteller durchgeführt

<sup>b</sup> Wert liegt unterhalb der Nachweisgrenze

Füllstoff. Nach Herstellerangabe ist das Lipasepulver frei von  $\alpha$ -Amylasen sowie Proteasen. Die Lagertemperatur beträgt 4 °C. Die kommerziell erworbene Lipase wurde in der gelieferten Qualität eingesetzt.

Die experimentelle Bestimmung der molaren Masse  $M_e$  der verwendeten Lipase sowie deren Konzentration im Lipasepulver erfolgte anhand einer SDS-Gelelektrophorese. Die Analyse wurde vom Labor von Klaus-Peter Stahmann (Fachhochschule Lausitz, Senftenberg, D) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zur Verfügung gestellt.

Zur Pufferung wurde ein K-Na-Phosphatpuffer verwendet. Dieser Puffer besitzt eine maximale Pufferkapazität bei  $pH$  7,2 (25 °C). Zur Herstellung der Lipaselösung wurde Lipasepulver in 0,1 M K-Na-Phosphatpuffer gelöst. Für die Untersuchungen wurden Lipaselösungen verschiedener Konzentrationen verwendet. Die Konzentrationsangabe der Lipaselösung  $c_{e0}$  bezieht sich auf die in der Lipasepräparation befindliche Lipasemenge (Abschn. 4.1.1, S. 63) pro ml 0,1 M K-Na-Phosphatpuffer.

Für die Herstellung des 0,1 M K-Na-Phosphatpuffers wurde eine 0,1 M Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung vorgelegt. Der gewünschte  $pH$ -Wert wurde mit einer 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung eingestellt. Für die Bereitstellung der 0,1 M di-Natriumhydrogenphosphat- bzw. 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung wurden 14,2 g  $Na_2HPO_4$  bzw. 13,6 g  $KH_2PO_4$  in einem Liter entionisiertem Wasser gelöst.

### 3.1.2.2 Bestimmung der Aktivität

**Methode** Die Bestimmung der Lipaseaktivität erfolgte im Batchversuch mittels Standardemulsion. Dazu wurden 0,9 ml Rapsöl und 0,15 ml einer Lipase-Phosphatpufferlösung ( $pH$  6,5) bei konstanter Temperatur ( $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mit einem Magnetrührer (RET control-visc, Ika Labortechnik, Staufen, D) bei  $500\text{ min}^{-1}$  in einem geschlossenen Reaktionsgefäß emulgiert. Nach 15 Minuten Rührzeit wurde die gesamte Emulsion in einer Biofuge (Biofuge pico, Heraeus, Hanau, D) bei  $11000\text{ min}^{-1}$  innerhalb von vier Minuten getrennt. In 0,45 ml der öligen Phase (Überstand) wurde die produzierte Fettsäuremenge  $n_{FFS}$  durch Titration, wie im Folgenden beschrieben (Abschn. 3.3.1, S. 35), bestimmt.

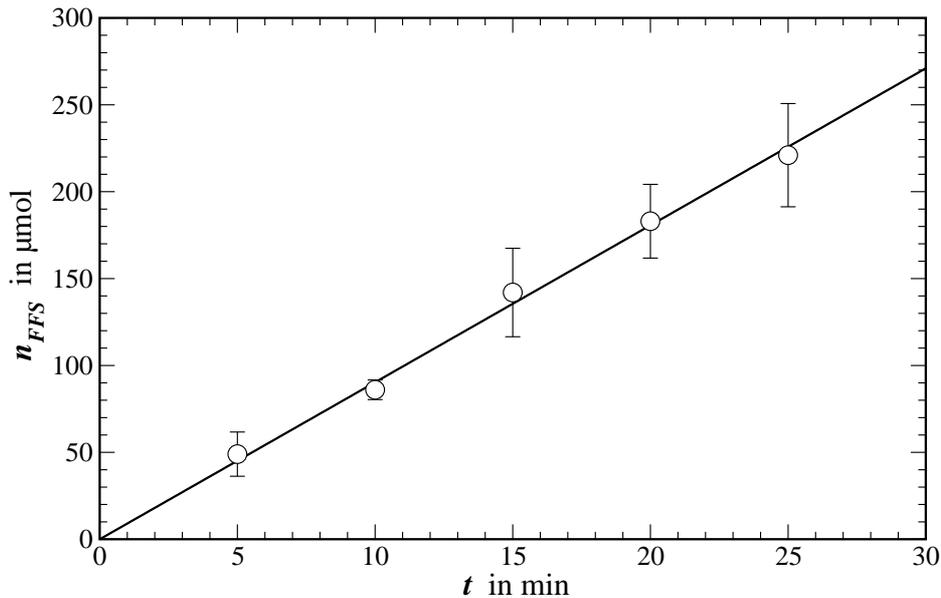
Die Aktivität hat die Einheit U und ist in dieser Arbeit definiert als die Menge an aktiver löslicher Lipase, die  $1\text{ }\mu\text{mol}$  Substrat in der Minute umsetzt. Um sowohl den natürlichen Fettsäuregehalt im Rapsöl als auch mögliche Einflüsse, basierend auf der Durchführung des Tests, zu berücksichtigen, wurde der Blindwert des Aktivitätstests ermittelt. Dazu wurde der Aktivitätstest ohne Zugabe der Lipase durchgeführt. Die Messwerte wurden mit dem Blindwert korrigiert. In der Regel handelt es sich bei den angegebenen Aktivitätswerten um einen Mittelwert aus drei Einzelmessungen. Wird die Aktivität auf die verwendete Lipasemasse normiert, erhält man die spezifische Aktivität  $a$ .

$$a = \frac{n_{\text{Öl}}}{t m_{\text{Protein}}} \quad (3.1)$$

Der Vergleich von Aktivitäten ist nur zulässig, wenn diese bei gleichen Testbedingungen ermittelt wurden. Es wurde daher darauf geachtet, dass sowohl die Reaktionsparameter (Temperatur,  $pH$ -Wert, Substratverhältnis, Substrat- und Enzymqualität) als auch die Parameter für das Messsystem (Rührergeschwindigkeit, Testzeit, Rührerart, Zentrifugationszeit, Reaktionsgefäß) für alle Aktivitätsuntersuchungen unverändert blieben.

**Messqualität** Für die qualitative Beurteilung des verwendeten Aktivitätstests wurde die Testzeit variiert und der Test jeweils mehrfach wiederholt. Voraussetzung für einen gültigen Aktivitätstest ist ein Reaktionsgeschwindigkeitsansatz nullter Ordnung, bezogen auf das Substrat Rapsöl und eine für die Analyse ausreichend hohe Menge an produzierten Fettsäuren. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätstest ist dies bei 15 Minuten Testzeit der Fall (Abb. 3.1).

### 3 Experimentelle Untersuchung



**Abbildung 3.1:** Produzierte Fettsäuremenge in Abhängigkeit von der Testzeit für  $c_{e0} = 4 \mu\text{g/ml}$

Aus drei Wiederholungsmessungen für jede Testzeit wurde ein mittlerer Fehler, bezogen auf alle Testzeiten, von 15% ermittelt. Dieser hohe Messfehler ist typisch für Aktivitätstests mit wasserunlöslichem Substrat. Die Tropfenverteilung der dispergierten wässrigen Phase ist trotz identischer Versuchsbedingungen nicht ideal reproduzierbar. Dieses Verhalten ist typisch für Emulsionen und wird durch die kleinen Flüssigkeitsvolumina zusätzlich verstärkt. Eine weitere Fehlerquelle stellt die Emulsionstrennung dar. Nach 15 Minuten Reaktionszeit wird das gesamte zweiphasige Reaktionsgemisch direkt in der Zentrifuge getrennt. Eine Weiterreaktion während der Phasentrennung ist nicht auszuschließen.

**Lipaseaktivität in gerührter Lösung** Zur Bestimmung des Rührereinflusses wurden 900 ml Lipaselösung bei verschiedenen Rührergeschwindigkeiten  $n_R$  mit einem vierflügeligen Viskoproprüher zeitabhängig gerührt. Die Versuchsparameter sind in Tab. B.1 (S. 121) aufgeführt. Zu definierten Zeiten wurde dem Reaktor eine  $150 \mu\text{l}$  Probe entnommen und die Aktivität bestimmt.

**Lipaseaktivität während der Lipolyse (Emulsion)** Für die zeitabhängige Verfolgung der Lipaseaktivität während der Lipolysereaktion im Emulsionssystem wurde dasselbe Versuchssystem wie bei den Untersuchungen zur Charakterisierung der Reaktionskinetik verwendet. Die Versuchsparameter sind in Tab. B.2 (S. 122) aufgeführt. Zur Beobachtung der Lipaseaktivität zu verschiedenen Reaktionszeiten wurde

aus 1 ml Emulsionsprobe 150  $\mu\text{l}$  Lipase-Phosphatpufferlösung durch Zentrifugieren bei 11000  $\text{min}^{-1}$  innerhalb von vier Minuten getrennt. Mit der getrennten Lösung wurde der Aktivitätstest durchgeführt. Um eine mögliche Beanspruchung der Lipase durch den Trennungsschritt festzustellen, wurde die Aktivität einer neu angesetzten Lipaselösung mit und ohne vorheriges Zentrifugieren ermittelt. Das Zentrifugieren bei den gegebenen Bedingungen bewirkt demnach eine siebenprozentige<sup>2</sup> Absenkung der Lipaseaktivität.

#### 3.1.2.3 Einfluss Temperatur, pH-Wert, Rührergeschwindigkeit und Substratverhältnis

Die Bestimmung des Einflusses verschiedener Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und Rührergeschwindigkeit auf das Umsatzverhalten erfolgte im Referenzsystem (I) (Tab. B.3, S. 122). Die Untersuchung vom Einfluss des Substratverhältnisses auf das w/o-Emulsionsverhalten erfolgte im Referenzsystem (II) (Tab. B.4, S. 123). Bei allen Untersuchungen waren die Versuchsparameter, falls nicht anders angegeben und ausgenommen der gezielt variierten Parameter entsprechend dem betrachteten Referenzsystem, identisch. Für die Untersuchung der verschiedenen Einflussfaktoren wurden je nach Zielstellung verschiedene Methoden der Fettsäureanalyse verwendet (Tab. B.5, S. 123).

## 3.2 Untersuchungen am Einzeltropfen

Die Lipase und die entstehenden Produkte (Fettsäure, Partialglyceride) sind grenzflächenaktive Substanzen. Durch ihre Anlagerung an der Grenzfläche während der Hydrolysereaktion wird die Grenzflächenspannung  $\sigma$  des Zweiphasensystems verändert [51, 29, 63]. Durch die parallele Beobachtung des zeitlichen Verlaufs von Grenzflächenspannung und produzierter Fettsäuremenge sollen qualitative Aussagen zu Detailvorgängen während der Reaktion ermöglicht werden. Die Messung des dynamischen Verhaltens der Grenzflächenspannung erfolgte mit der Pendant-Drop-Methode. Dabei wird ein Phosphatpuffertropfen bekannter Lipasekonzentration in der Ölphase aufgehängt und dessen zeitabhängige Grenzflächenspannung bestimmt. Parallel dazu wird die während der Reaktion in die Ölphase diffundierte Fettsäuremenge mittels Gaschromatographie gemessen. Der Versuchsaufbau (Abb. 3.5, S. 33) zur Einzeltropfenuntersuchung (Reaktionsfortschritt und Grenzflächenspannung) wird in Abschn. 3.2.2 erläutert.

---

<sup>2</sup>Mittelwert aus drei Messungen

### 3.2.1 Reaktionsfortschritt – Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) ist mittlerweile eine etablierte Methode zur Analyse von Fettsäuregemischen. Die Methode ist insbesondere für geringe Fettsäuremengen im *nmol*-Bereich, wie sie bei der Einzeltropfen-Analyse (Pendant-Drop) auftreten, geeignet. Neben der aufwendigen Standardanalyse, die eine Veresterung der Fettsäuren zu den entsprechenden Fettsäuremethylestern vor jedem GC-Analyseschritt voraussetzt [4], können seit dem Aufkommen temperaturstabiler Säulen Fettsäuregemische auch ohne vorherige Aufbereitungsschritte analysiert werden [35, 91].

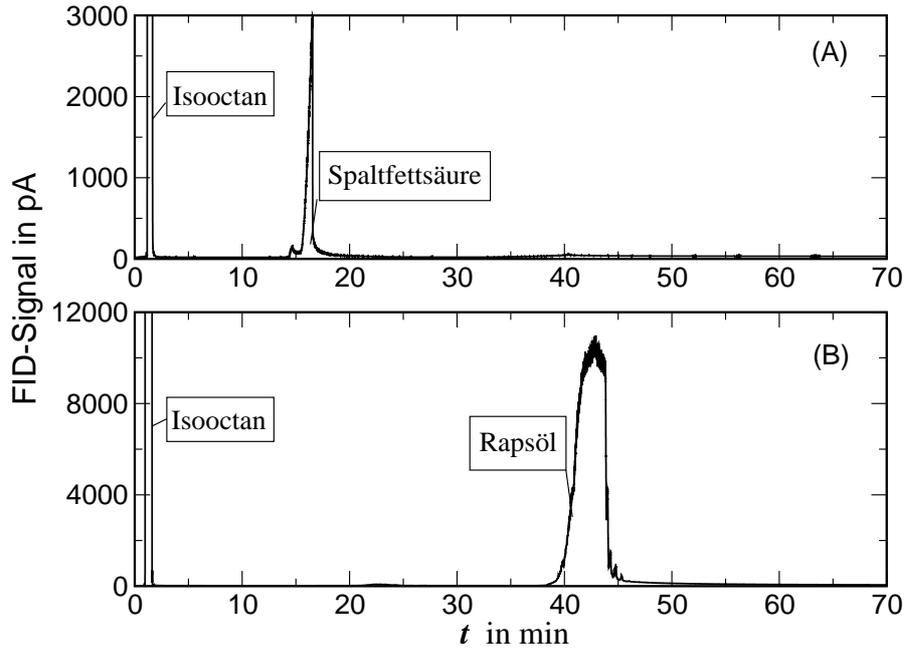
**Durchführung** Die quantitative Bestimmung der Fettsäurekonzentration in der Ölphase erfolgte mit einem Gaschromatograph (GC) von Hewlett-Packard (6890 Series) mit integriertem Flammenionisationsdetektor (FID). Die gaschromatographische Trennung der öligen Probe erfolgte in einer unpolaren Fused-Silica Kapillartrennsäule (*OPTIMA – 1 – TG – 0.1  $\mu\text{m}^3$* ) von Machery-Nagel (Düren, D). Dieser Säulentyp ist für hohe Temperaturen (bis 370 °C) und ölhaltige Substanzen besonders geeignet. Für die Probenherstellung wurden 150  $\mu\text{l}$  der zu analysierenden Ölphase mit Isooctan versetzt (Öl:Isooctan = 1:9). 1  $\mu\text{l}$  dieses Gemisches wurden zur Analyse nach dem „cool on-column“-Verfahren in den GC injiziert. Um Fettsäuren (Siedepunkte zwischen 210 und 260 °C) und Rapsöl (Siedepunkt bei ca. 320 °C) voneinander zu trennen, wurde folgendes Temperaturprogramm gewählt: 50 °C, isotherm (2 min), 10 °C/min auf 270 °C, isotherm (15 min), 40 °C/min auf 370 °C, isotherm (30 min). Als Trägergas wurden 2 ml/min Helium verwendet.

**Signal und Kalibrierung** Für die qualitative und quantitative Auswertung wurden Rapsöl und dessen Spaltfettsäure vermessen. Das erhaltene FID-Signal ist in Abb. 3.2 dargestellt. Die Retentionszeiten für die Spaltfettsäuren bzw. für das Rapsöl liegen in Abhängigkeit von der Konzentration zwischen 14 – 20 bzw. 38 – 50 Minuten. Die beiden Substanzklassen sind eindeutig identifizierbar.

Um von dem FID-Signal auf die Fettsäurekonzentration in der öligen Probe schließen zu können, wurde eine Kalibrierung mit drei Öl/Fettsäure-Gemischen im relevanten Konzentrationsbereich durchgeführt. Für das Analyseziel „Reaktionsmonitoring am Einzeltropfen“ ist die Kenntnis der Gesamtmenge an produzierter Fettsäure erforderlich. Demzufolge wurde nur der Fettsäurepeak (Abb. 3.2 (A)) für die Kalibrierung

---

<sup>3</sup>Säulenlänge  $l = 15$  m und Innendurchmesser  $d_i = 0,32$  mm



**Abbildung 3.2:** FID-Signal für die Reinsubstanzen: (A) kommerziell erworbene Spaltfettsäure und (B) Rapsöl (experimentelle Daten gemäß [25])

herangezogen und dessen Fläche  $A_{FID}$  als Funktion der Fettsäuremenge  $n_{FFS,GC}$  ausgewertet. In Abb. 3.3 ist für den relevanten Konzentrationsbereich der lineare Zusammenhang zwischen der Produktmenge und der korrespondierenden Peakfläche dargestellt. Aus der linearen Korrelation lässt sich die Fettsäuremenge der Probe aus der gemessenen Signalfläche wie folgt berechnen:

$$n_{FFS,GC} = \frac{A_{FID}}{260,35} \quad (3.2)$$

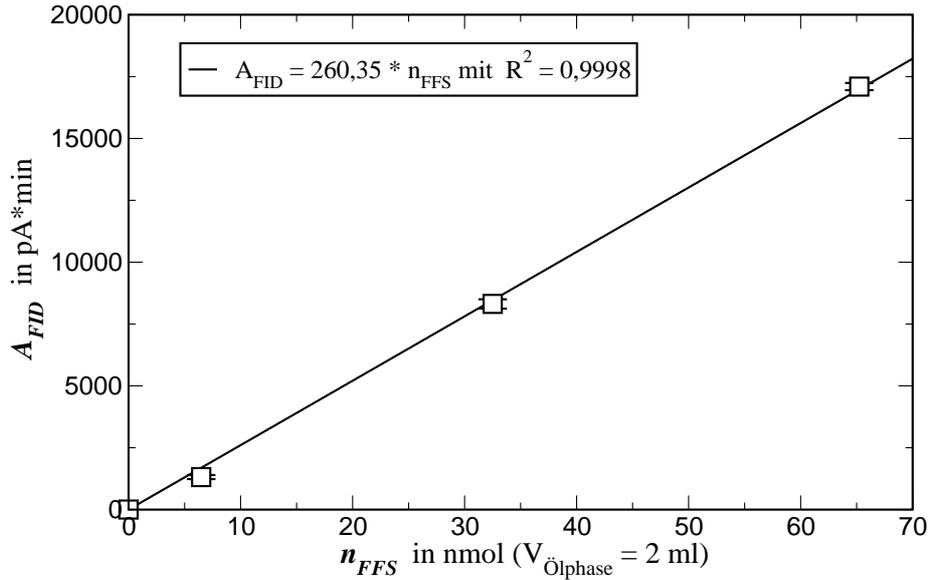
Die umgesetzte Rapsölmenge berechnet sich nach:

$$X = \frac{n_{\ddot{O}l,0} - \left(n_{\ddot{O}l,0} - \frac{n_{FFS,GC}}{3}\right)}{n_{\ddot{O}l,0}} \quad (3.3)$$

wobei  $n_{\ddot{O}l,0}$  gleich der Rapsölmenge zu Reaktionsbeginn ist. Reproduzierbare Kalibriermessungen (drei Wiederholungen pro Rapsöl-/Fettsäuregemisch) sowie ein linearer Zusammenhang im untersuchten Konzentrationsbereich legen nahe, dass weder Rapsöl noch Fettsäure in der Säule akkumulieren.

Wie aus der Literatur bekannt ist, spaltet die Lipase aus *Candida rugosa* alle drei Esterbindungen langkettiger Triglyceride mit der gleichen Wahrscheinlichkeit [9]. Dementsprechend entstehen neben den Fettsäurespaltprodukten auch Mono- und Di-

### 3 Experimentelle Untersuchung



**Abbildung 3.3:** Kalibrierung des Gaschromatographen im untersuchungsrelevanten Konzentrationsbereich der Fettsäure (experimentelle Daten gemäß [25])

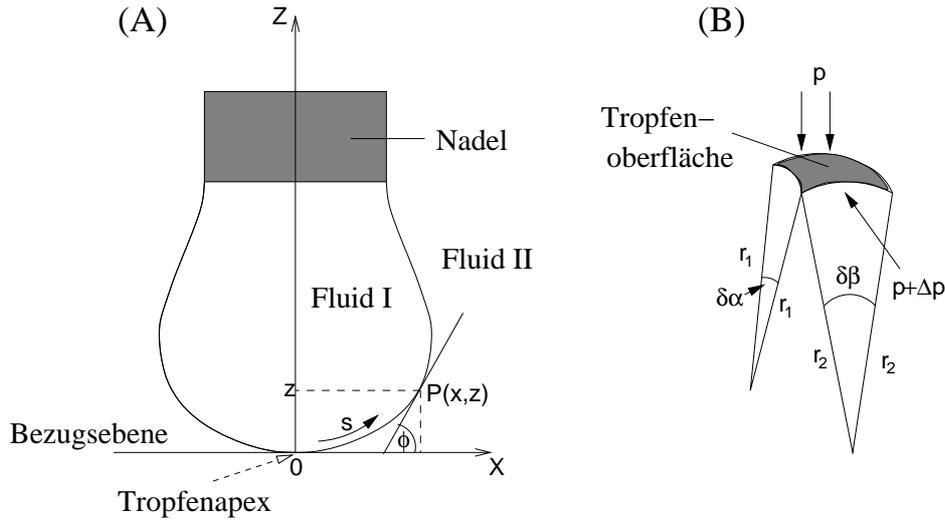
glyceride als Zwischenprodukte. In Abb. C.1 (S. 125) ist exemplarisch ein Chromatogramm für einen Umsatz von 0,2% dargestellt. Unter den angewandten Trennbedingungen werden die Monoglyceride (Retentionszeit 20 – 25 Minuten) aus der Probe abgetrennt, wohingegen für die Diglyceride keine Abtrennung vom Rapsöl erfolgt. Die qualitative und quantitative Bestimmung aller an der Hydrolysereaktion beteiligten organischen Spezies ist unter den genannten Trennbedingungen nicht möglich. Das Untersuchungsziel, die Identifizierung und quantitative Auswertung des Fettsäurepeaks zur Detektion der produzierten Fettsäuremenge am Einzeltropfen, ist hingegen mit der angewandten Methode realisierbar.

#### 3.2.2 Grenzflächenspannung – Pendant-Drop-Methode

**Prinzip** Mit der Pendant-Drop-Methode ist die Messung der Grenzflächenspannung  $\sigma$  zwischen zwei fluiden Phasen möglich. Die theoretische Grundlage hierfür liefert die von deLaplace und Young entwickelte Gleichung zur Beschreibung der Druckdifferenz zwischen zwei statischen fluiden Phasen [22, 100] (Abb. 3.4 (A) und (B)).

$$\Delta p = \sigma \left[ \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right] \quad (3.4)$$

Dabei ist  $\sigma$  – die Grenzflächenspannung,  $r_1$  und  $r_2$  – Krümmungsradien (orthogonal),  $\Delta p$  – die Differenz des hydrostatischen Druckes zwischen Tropfeninnerem und -äuße-



**Abbildung 3.4:** Grenzflächenspannung am Tropfen: (A) Tropfenprofil (Fluid I – wässrige Phase, Fluid II – ölige Phase) und (B) Kräftegleichgewicht an der Tropfenoberfläche

rem. Im Gleichgewicht ist die Druckdifferenz zwischen innerer und äußerer Seite der Grenzfläche abhängig von der Grenzflächenspannung und der Geometrie der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen. Herrscht einzig die Gewichtskraft vor, so ist die Druckdifferenz linear abhängig von der Tropfenhöhe,

$$\Delta p = \Delta p_0 + \Delta \rho g z \quad (3.5)$$

dabei ist  $\Delta p_0$  – die Druckdifferenz an der Bezugsebene (Tropfenapex),  $\Delta \rho$  – der Dichteunterschied zwischen Fluid I und II,  $g$  – die Erdbeschleunigung,  $z$  – die Tropfenhöhe am Punkt  $P(x, z)$ , gemessen von der Bezugsebene. An einem hängenden bzw. stehenden Tropfen, je nach Dichtedifferenz der beiden Phasen, herrscht ein hydrodynamischer und mechanischer Gleichgewichtszustand. Die Tropfenform ergibt sich aus einem Kräftegleichgewicht zwischen Gewicht-, Auftriebs-, Kapillar- und Grenzflächenkraft und kann mit der Bashforth-Adams Gleichung [7] beschrieben werden,

$$\sigma \left( \frac{\sin \phi}{x} + \frac{1}{r_1} \right) = \frac{2\sigma}{b} + \Delta \rho g z \quad (3.6)$$

dabei ist  $\phi$  – der Winkel zwischen der Tangente am Punkt  $P(x, z)$  und der Bezugsebene,  $x$  – die Tropfenbreite am Punkt  $P(x, z)$ ,  $r_1$  – der Krümmungsradius am Punkt  $P(x, z)$ ,  $b$  – der Krümmungsradius der Tropfenoberfläche am Tropfenapex. Andreas *et al.* [3], Rotenberg *et al.* [71] und Stauffer [87] leiteten unter anderen aus der theoretischen

### 3 Experimentelle Untersuchung

Beschreibung der Tropfenform eine mathematische Routine ab, die es erlaubt, aus der Tropfenform die Grenzflächenspannung zu berechnen.

Ein Tropfen von Fluid I, an einer Nadel hängend, wird in die kontinuierliche Phase von Fluid II eingetaucht. In Abb. 3.4 (A) ist eine Tropfenkontur beispielhaft dargestellt. Die Punkte  $P_i(x_i, z_i)$  liegen auf dem Tropfen und beschreiben das Tropfenprofil. Befindet sich der Tropfen im Gleichgewicht, so ist die Tropfenkontur mit folgenden Differentialgleichungen beschreibbar:

$$\frac{d\phi}{dS} = \frac{2}{B} - Z - \frac{\sin \phi}{X} \quad (3.7)$$

$$\frac{dX}{dS} = \cos \phi \quad (3.8)$$

$$\frac{dZ}{dS} = \sin \phi \quad (3.9)$$

mit der dimensionslosen Bogenlänge  $S$  und der Kapillarkonstante  $a$

$$a = \sqrt{\frac{\sigma}{\Delta \rho g}} \quad (3.10)$$

dem Formparameter  $B$  des Tropfens

$$B = \frac{1}{a b} \quad (3.11)$$

und  $X, Z, S$  als dimensionslose Koordinaten

$$x = X a, \quad z = Z a, \quad s = S a \quad (3.12)$$

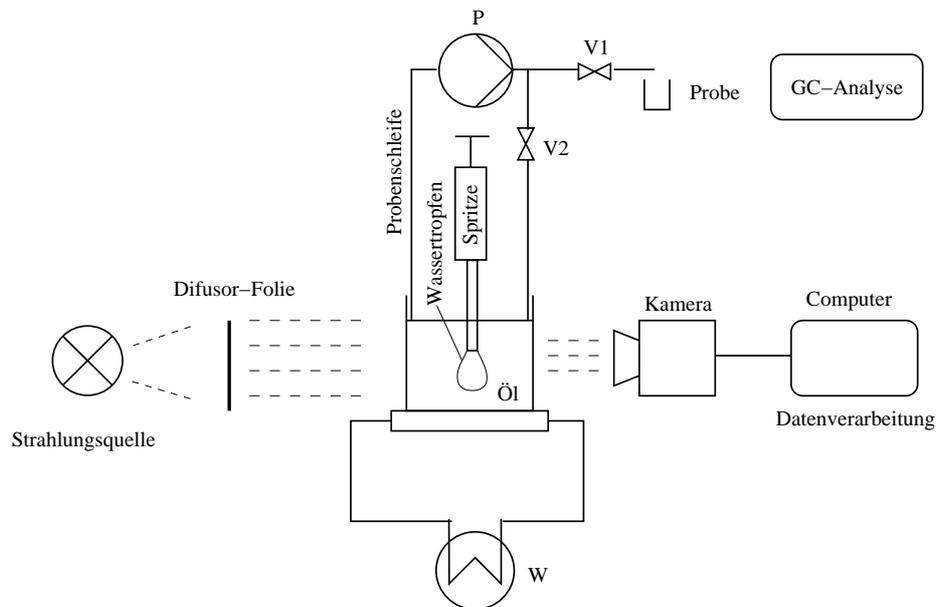
Der Formparameter  $B$  kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Für einen kugelförmigen Tropfen beträgt  $B < 0,5$ , für einen langgezogenen Tropfen ist  $B > 0,7$ . Aufgrund der Abhängigkeit von  $a$  ist der Formparameter spezifisch für das Stoffsystem.

Zur Ermittlung der Grenzflächenspannung muss zunächst die reale Tropfenkontur durch eine mathematische Funktion beschrieben werden. Dabei wird der obere Bereich des Tropfenhalses (Aufhängungspunkt) ausgespart. Das theoretische Tropfenprofil wird durch Lösung der Differentialgleichungen 3.7, 3.8 und 3.9 unter Berücksichtigung der Nebenbedingungen im Tropfenapex,

$$X = Z = S = \phi = 0 \quad (3.13)$$

$$\frac{\sin \phi}{X} = \frac{1}{B} \quad (3.14)$$

erhalten und durch Variation von  $B$  mittels numerischer Iteration an den mathematischen Fit der Tropfenkontur angepasst. Der Fehler des Lösungsverfahrens ist für den Wertebereich des Formparameters  $B = 0,48 \dots 0,62$  am geringsten. Bei Unterschreiten eines Grenzwertes für die Grenzflächenkraft, resultierend aus stofflichen oder thermodynamischen Änderungen einer oder beider fluider Phasen, reißt der Tropfen ab.



**Abbildung 3.5:** Versuchsaufbau „Untersuchungen am Einzeltropfen“: Pendant-Drop-Methode und Gaschromatographie (P – Pumpe, V1 und V2 – Ventil 1 und 2, W – Wärmetauscher)

**Versuchsaufbau und Durchführung** Der prinzipielle Versuchsaufbau (Abb. 3.5) zur Messung der Grenzflächenspannung eines Lipase-Phosphatpuffertropfens ( $pH$  6,5) in Rapsöl wurde von Dujardin [25] konzipiert sowie umgesetzt und orientiert sich an der von Beverung *et al.* [11] beschriebenen Methode. Auf einer optischen Bank (vibrationsgeschützt) sind Halogenlampe, Diffusor-Folie, Quarzküvette und Digitalkamera fixiert. Um isotherme Versuchsbedingungen zu gewährleisten, sind die in der Küvette befindlichen 2 ml Ölphase sowie der in dieser aufgehängte  $12 \mu\text{l}$  Tropfen auf  $35^\circ\text{C}$  thermostatisiert. Zu Versuchsbeginn wird eine geringe Induktionszeit benötigt, damit beide Phasen die Zieltemperatur erreichen. Der Tropfen hängt ( $\rho_w > \rho_o$ ) an einer 2 mm ( $\varnothing_A$ ) Kapillare (GLT Löttechnik, Pforzheim, D), die mit einer Spritze verbunden ist. Die Einstellung des Tropfenvolumens erfolgt mittels einer Stellschraube. Das Dosiersystem erlaubt die Dosierung des Tropfenvolumens mit einer Genauigkeit von  $\pm 5\%$ . Zur Realisierung der Probennahme für die anschließende GC-Analyse und zur

### 3 Experimentelle Untersuchung

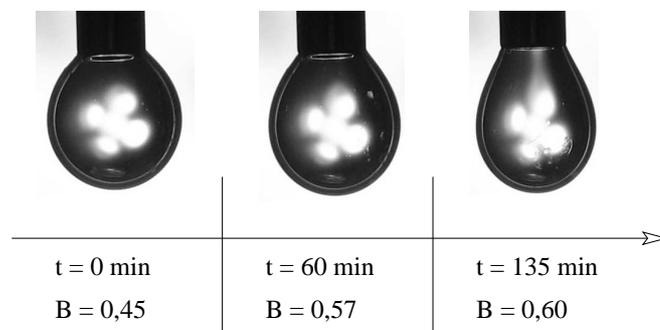
Erhöhung des Stoff- bzw. Wärmeaustausches wird die Ölphase im Kreislauf gepumpt. Die Strömungsgeschwindigkeit ist dabei gering zu halten, um die Bewegung des Tropfens zu minimieren.

In diskreten Zeitintervallen (1 – 5 Minuten) wurden Bilder der Tropfen aufgenommen. Für die Fettsäureanalyse im Gaschromatographen wurden  $150\ \mu\text{l}$  Probe aus der in der Küvette befindlichen kontinuierlichen öligen Phase entnommen. Die Anzahl der Probennahmen war aufgrund des geringen Gesamtvolumens der Ölphase begrenzt. Die Pendant-Drop-Methode ist sehr sensitiv gegenüber Verunreinigungen. Dies kann zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen. Dem wurde bei der Durchführung und Probennahme durch sorgfältige Versuchsvorbereitung und -durchführung Rechnung getragen.

Aus den digitalen Bilddaten der Kamera wurde unter Verwendung der Software DSA 10 (Krüss, Hamburg, D) die mathematische Beschreibung des Tropfenprofils ermittelt, und anschließend die Grenzflächenspannung sowie Oberfläche und Volumen des Tropfen berechnet.

Die Wahl des Tropfenvolumens ergibt sich aus der Optimierung beobachtbarer Reaktionszeit und des  $B$ -Parameterwertes im auswertbaren Bereich. Voruntersuchungen ergaben ein optimales Tropfenvolumen von  $12\ \mu\text{l}$  am Versuchsanfang. Bei diesem Volumen bildet sich ein kugelförmiges Profil für  $B < 0,5$  aus. Diese Form ändert sich jedoch sehr schnell, so dass sich nach einer Minute der Tropfen im optimalen  $B$ -Parameterbereich befindet, der bis zum Tropfenabriss beibehalten wird. Ein Tropfenvolumen von  $12\ \mu\text{l}$  wird zu Beginn eines jeden Experimentes eingestellt.

Abb. 3.6 zeigt exemplarisch die Änderung der Tropfenkontur während der Reaktion. Durch die Adsorption grenzflächenaktiver Substanzen an der Phasengrenzfläche wird die Grenzflächenspannung mit fortschreitender Reaktionszeit abgesenkt. Dies führt zur Änderung der Tropfenkontur bzw. des  $B$ -Parameters.



**Abbildung 3.6:** Zeitliche Änderung der Tropfenkontur während der Reaktion ( $c_{e0} = 4\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )

### 3.3 Untersuchungen an der Emulsion

Um die heterogene Lipolysereaktion kinetisch charakterisieren zu können, ist die Kenntnis des Reaktionsfortschrittes sowie der Phasengrenzfläche in hoher zeitlicher Auflösung notwendig. Der Reaktionsfortschritt wird bei der betrachteten Reaktion in der Regel anhand der entstehenden Fettsäuren detektiert. Die Standardmethode hierzu, die Titration, erfolgt offline und benötigt mehrere Minuten Analysedauer. Um die Fettsäuren in hoher zeitlicher Auflösung zu ermitteln, wurde unter Verwendung der Infrarot(IR)-Spektroskopie eine neuartige kontinuierliche (online<sup>4</sup>) Methode zur Fettsäureanalyse entwickelt [75]. Die Titration kam zur Fettsäurebestimmung im Zusammenhang mit einem Aktivitätstest, bei Untersuchungen verschiedener Einflussgrößen (*pH*-Wert, Temperatur und Rührergeschwindigkeit) und zur Validierung der IR-Analytik zur Anwendung. Für die inline<sup>5</sup> Messung der Tropfengröße wurde ein von Reich [68] entwickeltes, neuartiges Verfahren herangezogen, die Photonendichtewellen(PDW)-Spektroskopie, mit der disperse Systeme hoher Konzentrationen und optischer Dichte charakterisiert werden können.

#### 3.3.1 Offline-Messung des Reaktionsfortschrittes – Titration

Die Bestimmung der Fettsäure durch Titration mit einer ethanolschen Kalilauge entspricht einer Neutralisationsreaktion:



Es wird davon ausgegangen, dass die Base und die Säure im stöchiometrischen Verhältnis reagiert. Für die Bestimmung des Fettsäuregehaltes in der Emulsion wurde zunächst die Ölphase von der Wasserphase in einer 1,5 ml Emulsionsprobe mittels einer Biofuge (pico, Heraeus, Hanau, D) abgetrennt. Von der getrennten Ölphase wurden 0,45 ml abpipettiert und in einer Küvette mit 0,1 ml einer Phenolphthalein-Lösung<sup>6</sup> und 3 ml einer Ethanol/Aceton-Mischung (Volumenverhältnis 1:1) mit einem Magnetrührer (RET control-visc, Ika Labortechnik, Staufen, D) vermischt. Unter weiterem Rühren wurde mit einer 1 ml Bürette 0,5 M Kalilauge bis zum Äquivalenzpunkt (Farbumschlag von farblos zu Magenta) zugegeben. Die Verwendung eines Ethanol/Aceton-Gemisches

---

<sup>4</sup>Eine geringe Probenmenge wird kontinuierlich aus dem Reaktionsgemisch entnommen, entsprechendem Analysengerät zugeführt, vermessen und wieder in den Reaktor zurückgeführt.

<sup>5</sup>Die Messung erfolgt direkt im Reaktor ohne zusätzliche Probennahme.

<sup>6</sup>1 g Phenolphthalein wurde in 100 ml Ethanol gelöst.

### 3 Experimentelle Untersuchung

diente einer verbesserten Löslichkeit der öligen Probe in der Kalilauge. Die Fettsäuremenge in der Ölprobe  $n_{FFS,KOH,P}$  wurde wie folgt berechnet,

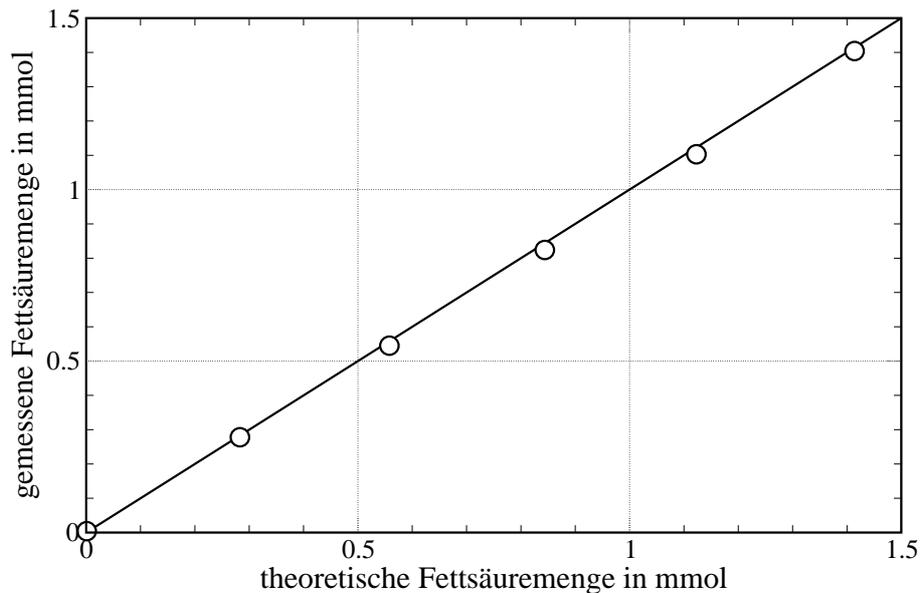
$$n_{FFS,KOH,P} = V_{KOH} c_{KOH} - n_{FFS,0} \quad (3.15)$$

wobei  $V_{KOH}$  dem verbrauchten Volumen der Kalilauge und  $c_{KOH}$  der Konzentration an  $\text{OH}^-$  in der ethanolischen Lösung entsprechen. Der Wert von  $n_{FFS,0}$  gibt die natürliche Menge freier Fettsäuren im frischem Öl an. Deren ebenfalls durch Titration ermittelte Wert stimmte mit dem vom Hersteller angegebenen Wert überein. Die produzierte Fettsäuremenge für das gesamte Reaktionsvolumen  $n_{FFS,KOH,RK}$  ist abhängig vom Verhältnis des Reaktionsvolumens  $V_{RK}$  zum Probenvolumen  $V_P$  und der Fettsäuremenge in der Ölprobe  $n_{FFS,KOH,P}$ .

$$n_{FFS,KOH,RK} = \frac{V_{RK}}{V_P} n_{FFS,KOH,P} \quad (3.16)$$

Der Umsatz ergibt sich aus der zu Reaktionsbeginn eingesetzten Rapsölmenge  $n_{\text{Öl},0}$  und der ermittelten Fettsäuremenge  $n_{FFS,KOH,RK}$  wie folgt:

$$X = \frac{n_{\text{Öl},0} - \left( n_{\text{Öl},0} - \frac{n_{FFS,KOH,RK}}{3} \right)}{n_{\text{Öl},0}} \quad (3.17)$$



**Abbildung 3.7:** Qualität der KOH-Titration: Vergleich von gemessener und eingewogener (theoretischer) Fettsäuremenge in 0,45 ml öligem Probenvolumen für unterschiedliche Fettsäuremengen

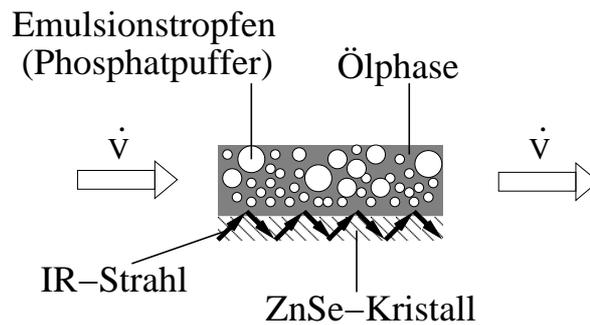
Um die Qualität der Titration in einem öligen Medium zu überprüfen, wurden Fettsäure/Öl-Gemische unterschiedlicher Konzentration hergestellt und die Menge der Fettsäure bestimmt. Die eingewogene Fettsäuremenge (theoretischer Wert) und die mittels Titration bestimmte Menge wurden miteinander verglichen. Abb. 3.7 zeigt die gute Übereinstimmung von theoretischem und gemessenem Wert.

#### 3.3.2 Online-Messung des Reaktionsfortschrittes

**Fourier-Transformations(FT)-Infrarot(IR)-Absorptionsspektroskopie mit einer ATR-Messzelle** In der Infrarot-Absorptionsspektroskopie wird die zu untersuchende Probe mit elektromagnetischen Wellen aus dem Infrarotbereich durchstrahlt. Einzelne Molekülgruppen absorbieren Strahlung und werden dadurch in Schwingung versetzt. Dabei sind zwei Schwingungsarten zu unterscheiden: Deformationsschwingungen (Pendeln, Scheren, Wippen bzw. Verdrillen) und Streckerschwingungen (symmetrisch und asymmetrisch) [85]. Der primäre Anwendungsbereich der Infrarotspektroskopie ist die Identifizierung organischer Verbindungen. Komplexe organische Verbindungen weisen im Mittelinfrarotbereich ein eindeutig zuzuweisendes Spektrum auf (Fingerprintbereich). Die hohe Spezifität der Methode ermöglicht eine quantitative Bestimmung einzelner Komponenten in einem Gemisch bekannter qualitativer Zusammensetzung [85].

Die IR-Spektroskopie wurde zur Bestimmung der Fettsäuremenge bei der enzymatischen Fettsäurepaltung im Emulsionssystem (w/o) angewandt. Emulsionen haben einen hohen dispersiven Anteil. Das hat zur Folge, dass aufgrund der starken optischen Streuung nur ein geringer Teil der eingestrahnten Energie nach Durchgang durch die Emulsion detektiert wird. Diese ist für eine quantitative Analyse im Allgemeinen zu gering. Die Verwendung von IR-Transmissionsmesszellen ist daher nicht empfehlenswert. Als geeigneter erweist sich ein Messzellentyp (ATR-Messzelle), der auf dem Prinzip der Totalreflexion beruht. Der Aufbau und das Funktionsprinzip sind in Abb. 3.8 dargestellt.

Fällt elektromagnetische Strahlung durch ein Medium mit vergleichsweise hohem Brechungsindex (internes Reflexionselement) unter einem höheren als dem kritischen Einfallswinkel auf die Grenzfläche zu einem Medium mit kleinerem Brechungsindex (Probe), so wird die Strahlung in das optisch dichtere Material zurückreflektiert. Dabei dringt die Strahlung geringfügig vom optisch dichteren in das optisch dünnere Medium als gedämpfte Oberflächenwelle ein. Das Licht wird an der Übergangsstelle zwischen Kristall und Probe total reflektiert, üblicherweise vier- bis achtmal (inner-



**Abbildung 3.8:** Prinzipskizze der Vorgänge in der ATR-Messzelle (Ausschnitt); die Emulsion strömt mit einem Volumenstrom  $\dot{V}$  von 12 ml/min durch die Messzelle.

halb der Messzelle) zur Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses, während die Probe mit der an Intensität abnehmenden Welle interagiert. Daraus folgt eine Absorption an jeder Reflexionsstelle. Da demnach nicht die gesamte Strahlung vollständig reflektiert wird, spricht man von einer abgeschwächten Totalreflexion (Attenuated Total Reflection).

Zur Untersuchung wurde als internes Reflexionselement ein Zinkseleinit-Kristall (ZnSe) verwendet. Der IR-Strahl trifft mit einem Einfallswinkel  $\theta$  von  $45^\circ$  auf die Grenzfläche zwischen Kristall und Probe. Über die Kristalllänge von 14,5 mm ergeben sich sechs Reflexionsstellen. Bei einem Probenvolumen von  $45 \text{ mm}^3$  besteht eine Probenschichtdicke von 1 mm.

Als Eindringtiefe  $d_P$  ist der Weg definiert, nach dem die Energie gegen Null strebt. Er ist proportional zur Wellenlänge  $\lambda$  des eingestrahlten Lichtes und umgekehrt proportional zum Quotient der Brechungsindizes vom optisch dichteren zum dünneren Material ( $n_{21} = n_2/n_1$ ).

$$d_P = \frac{\lambda}{2 \pi n_1 (\sin^2 \theta - n_{21}^2)^{1/2}} \quad (3.18)$$

Da der Brechungsindex eine temperaturabhängige Größe ist, wurde eine temperierte Messzelle verwendet.

Aufgrund der geringen Eindringtiefe der Strahlung ist die abgeschwächte Totalreflexion im Allgemeinen unabhängig von der Probendicke und erlaubt es somit, stark absorbierende oder dispersive Proben zu analysieren. Bei der quantitativen Auswertung von ATR-Spektren ist darauf zu achten, dass die Eindringtiefe von der Wellenlänge abhängt. Strahlung mit größerer Wellenlänge dringt tiefer in die Probe ein, so dass in einem ATR-Spektrum Banden mit größerer Wellenlängen intensiver sind im Vergleich zu jenen kleinerer Wellenlängen.

Bei der Verwendung von ATR-Messzellen sind ferner folgende Aspekte zu berücksichtigen:

1. Das Maß des physikalischen Kontakts zwischen Probe und internem Reflexions-element bestimmt die Empfindlichkeit der Messung bzw. beeinflusst die Konzentrationslinearität. Für feste Proben ist dies zu berücksichtigen, bei flüssigen Proben jedoch vernachlässigbar.
2. Bei apparativen Veränderungen (z. B. Ausrichtung der Spiegel) kann sich der Einfallswinkel ändern, die Folge ist eine Variation der Eindringtiefe (Gl. 3.18). Daraus resultiert eine Änderung der absoluten Absorption der bestimmten Spezies. Apparative Änderungen erfordern demnach eine Rekalibrierung der Methode.
3. Eine ungleichmäßige Verteilung der Reaktanden in direkter Nähe des Kristalls führt zu nicht reproduzierbaren und verfälschten Ergebnissen. Dies wird z. B. durch Adhäsion oder durch eine inhomogene Verteilung der Reaktanden im Film auf der Kristalloberfläche hervorgerufen.
4. Durch chemisch aggressive Medien wird die Kristalloberfläche angegriffen und verändert. Dies führt zu diffuser Reflexion an der Oberfläche und Ablagerungen der verwendeten Reaktanden und entstehenden Produkte in der porösen Schicht. Beides führt zu einer Abnahme der Strahlungsintensität.

Das Ergebnis der IR-Absorptionsspektroskopie ist die Transmission  $T$ . Sie ist das Verhältnis der Strahlungsintensität  $I$  nach den Absorptionsvorgängen in der Probe zur Anfangsintensität  $I_0$  (vor der Messzelle).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.19)$$

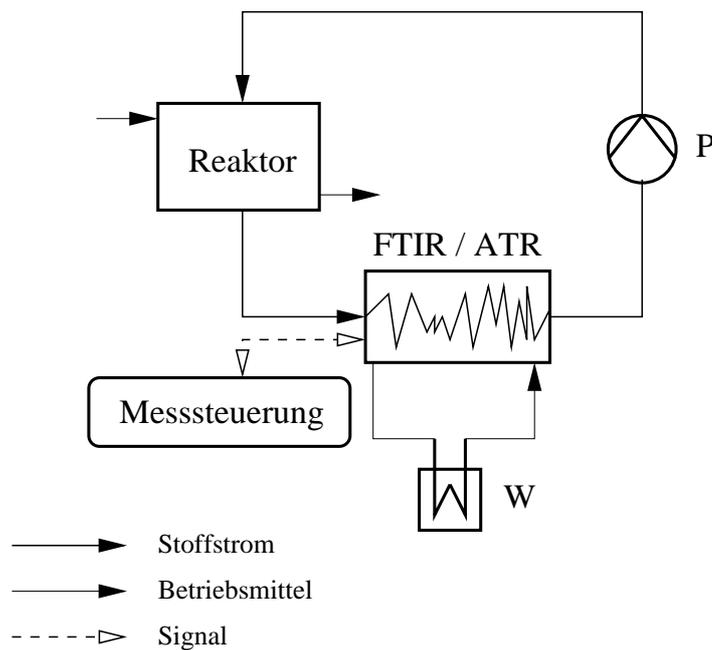
Für die quantitative Bestimmung wird entweder die Peakhöhe oder die Peakfläche des Absorptionsspektrums verwendet [95]. Die Absorption  $A$  ergibt sich aus dem negativen dekadischen Logarithmus der Transmission.

$$A = -\log T \quad (3.20)$$

**Experimenteller Aufbau** Der schematische Aufbau der Versuchsanlage für die kontinuierliche Ermittlung des Reaktionsfortschrittes mittels IR-Spektroskopie wird in Abb. 3.9 gezeigt. Die im Reaktor hergestellte Emulsion (Abschn. 3.3.4, S. 61) wurde

### 3 Experimentelle Untersuchung

kontinuierlich im Kreislauf mit konstantem Volumenstrom durch die ATR-Messzelle gepumpt. Konstante Emulsionseigenschaften sind ein wichtiges Kriterium für reproduzierbare Messungen. Durch Anordnung der Pumpe nach der ATR-Messzelle und einer konstanten Rührergeschwindigkeit stellt sich nach drei Minuten ein stationärer Gleichgewichtszustand bezüglich der Emulsionseigenschaften und der Strömungsverhältnisse in der Messzelle ein<sup>7</sup>. Ist dieser Zustand erreicht, wird die Reaktion durch Zugabe der Lipaselösung gestartet. Die Temperierung von Reaktor und ATR-Messzelle erfolgt mittels zweier, voneinander unabhängiger Thermostaten.



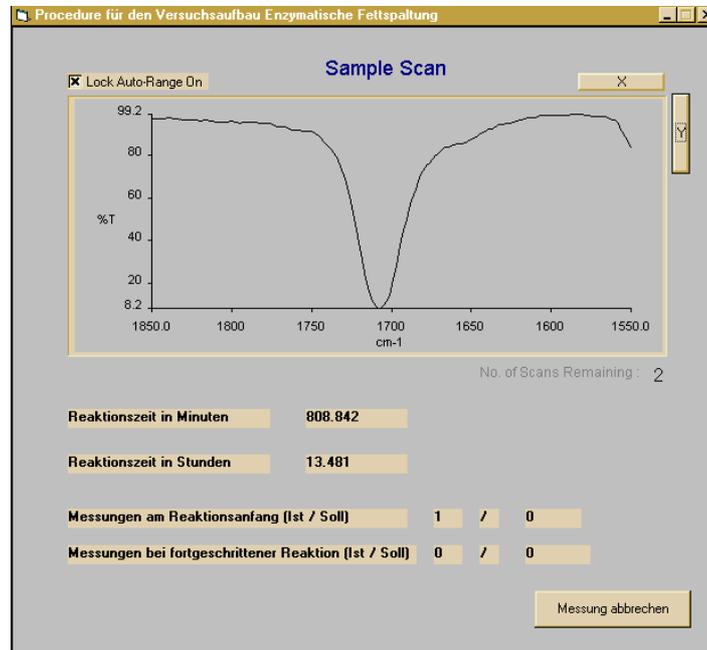
**Abbildung 3.9:** Experimenteller Aufbau zur Bestimmung des Reaktionsfortschrittes mittels FTIR/ATR-Spektroskopie (P – Pumpe, W – Wärmetauscher)

Für die Untersuchungen zum Reaktionsfortschritt wurde ein Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrometer (Spektrum 1000 von Perkin Elmer, Rodgau, D) verwendet, da es gegenüber dispersiven IR-Spektrometern ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis und eine stark erhöhte Detektionsgeschwindigkeit des gesamten IR-Spektrums aufweist.

Die Steuerung von Messwerterfassung und -auswertung erfolgte online mit Hilfe eines eigens zu diesem Zweck entwickelten Messprogramms auf Basis der herstellerspezifischen Makrosprache „Spektrum Procedures“ (Perkin Elmer, Rodgau, D). Die Betriebsparameter des Spektrometers sowie Messintervalldichte, Reaktionsbeginn und -ende werden vom Benutzer vorgegeben. Der Maximalwert des charakteristischen Fettsäurepeaks (Wellenzahl  $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$ ) wird automatisch bestimmt und mit Hilfe der Kali-

<sup>7</sup>Dies wurde mit Tracer-Versuchen überprüft.

briergleichung in die Fettsäuremenge bzw. den Umsatz der stöchiometrisch limitierenden Spezies umgerechnet. Abb. 3.10 zeigt beispielhaft den Bildschirmausdruck während einer Messung (Reaktionsende).



**Abbildung 3.10:** Selbstentwickeltes Programm zur Messdatenerfassung und Steuerung der FTIR-Analyse am Beispiel der Spektrenaufnahme

Um die Analysendauer zu verkürzen, wurde nur der Teil des Spektrums gescannt, in dem der charakteristische Fettsäurepeak zu suchen ist. Das Signal/Rausch-Verhältnis wird erhöht, indem der ausgewählte Wellenzahlbereich wiederholt gemessen und aus den erhaltenen Absorptionswerten der Mittelwert gebildet wird. Für den Wellenzahlbereich von  $1640 - 1800 \text{ cm}^{-1}$  ergab sich eine Messdauer von 50 Sekunden, wobei die Ausgabewerte (Mittelwerte) auf jeweils acht Einzelscans basieren. Die sich aus den Betriebsparametern ergebende Messdauer ist angesichts der geringen Zeitkonstante der Reaktion für die geforderte zeitliche Auflösung als ausreichend anzusehen.

**Charakteristische Peaks** In Abb. 3.11 sind die Absorptionsspektren der Reaktanden und Produkte (Rapsöl, Phosphatpuffer, freie Fettsäure und Glycerin<sup>8</sup>) dargestellt. Zur Ermittlung der Spektren wurde jede Spezies einzeln in der ATR-Messzelle untersucht. Die Komponenten der Ölphase weisen charakteristische Peaks außerhalb des sogenannten Fingerprintbereiches auf. Der signifikante Peak des Rapsöls hat sein Maximum bei der Wellenzahl  $1740 \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda = 5,75 \mu\text{m}$ ), dieser wird durch eine Streck-

<sup>8</sup>Partialglyceride wurden nicht betrachtet.

### 3 Experimentelle Untersuchung

schwingung der C=O-Bindung der Estergruppe hervorgerufen. Bei einer Wellenzahl von  $1710\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda = 5,85\ \mu\text{m}$ ) absorbiert die C=O-Bindung der Carboxylgruppe der Fettsäure elektromagnetische Strahlung und wird dadurch ebenfalls in Streckschwingungen versetzt. Die signifikanten Peaks der Fettsäure und des Rapsöls liegen für eine quantitative Analyse in einem genügend großen Abstand voneinander entfernt, so dass Interferenzen ausgeschlossen werden können. Der charakteristische Peak der Fettsäure weist eine höhere Signalstärke im Vergleich zu jenem des Rapsöls auf. Er besitzt dementsprechend ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis, das zu einem geringeren Analysefehler führt. Aus diesem Grund ist der Fettsäurepeak für das Monitoring des Reaktionsfortschrittes dem Rapsölpeak vorzuziehen und wird somit zur quantitativen Auswertung verwendet. Interferenzen durch Wasser bei der Wellenzahl  $1710\text{ cm}^{-1}$  treten nur im geringen Maße auf und werden durch die Art und Weise der Kalibrierung berücksichtigt. Die Lipase absorbiert ebenfalls Strahlung im Infrarotbereich, jedoch ist die hier verwendete Wassermenge im Vergleich zur verwendeten Lipasemenge so groß, dass die signifikanten Lipasepeaks vom Wasserspektrum überblendet werden.<sup>9</sup> Ferner wird bei der angewendeten Analyseprozedur in erster Linie die ölige Phase vermessen.

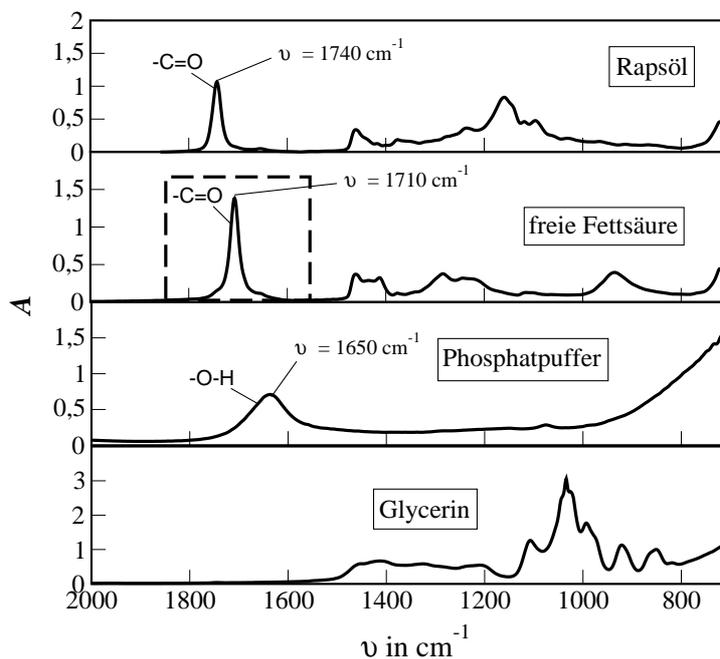


Abbildung 3.11: IR-Absorptionsspektren der Reaktanden und Produkte

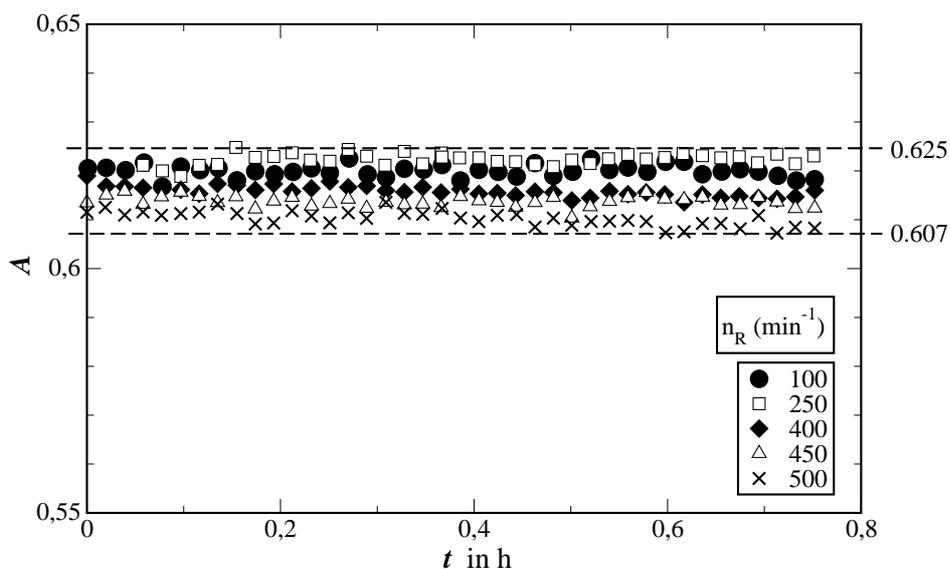
**Einfluss der Tropfengröße** Das Monitoring des Reaktionsfortschrittes erfolgt anhand der w/o-Emulsion, ohne diese zuvor zu trennen. Das zweiphasige Reaktionsge-

<sup>9</sup>experimentelle Daten nicht dargestellt

misch fließt mit einem Volumenstrom von 12 ml/min kontinuierlich über den Kristall (Abb. 3.8). In allen Untersuchungen stellt Öl die kontinuierliche Phase dar. Die bessere Benetzbarkeit des ZnSe-Kristalls mit der Ölphase, im Vergleich zur wässrigen Phase, rechtfertigt die Annahme, dass sich ein zusammenhängender Ölfilm auf der Kristalloberfläche ausbildet.

Um festzustellen, ob Wassertropfen das Messsignal beeinflussen, wurden w/o-Emulsionen mit konstanten Volumenverhältnissen bei verschiedenen Rührergeschwindigkeiten  $n_R$  untersucht. Emulsionsherstellung sowie Durchführung der IR-Messung erfolgte nach der in Abschn. 3.3.4 (S. 61) beschriebenen Vorgehensweise. Der Phosphatpuffer enthielt dabei keine Lipase und die ölige Phase bestand aus einem Fettsäure/Rapsöl-Gemisch entsprechend einem Umsatz von 50%. Eine definierte Emulsionsmenge wurde kontinuierlich über den ATR-Kristall geleitet und die Höhe des Fettsäurepeaks bei  $1710\text{ cm}^{-1}$  bestimmt.

Es ist festzustellen, dass mit zunehmender Rührergeschwindigkeit, gleichbedeutend mit einem in der Regel abnehmenden mittleren Tropfendurchmesser, die Höhe des betrachteten Fettsäurepeaks abnimmt (Abb. 3.12). Im untersuchten Bereich beträgt die Änderung 3%. Da die Variation des mittleren Tropfendurchmessers eine Signaländerung verursacht, wird vermutet, dass sich Wassertropfen im für die Spektroskopie relevanten Messvolumen befinden und den eindringenden IR-Strahl beeinflussen. Je kleiner die Tropfen werden, desto mehr Strahlung wird gestreut und nicht mehr reflektiert. Dies führt insgesamt zu einem schwächeren Signal.

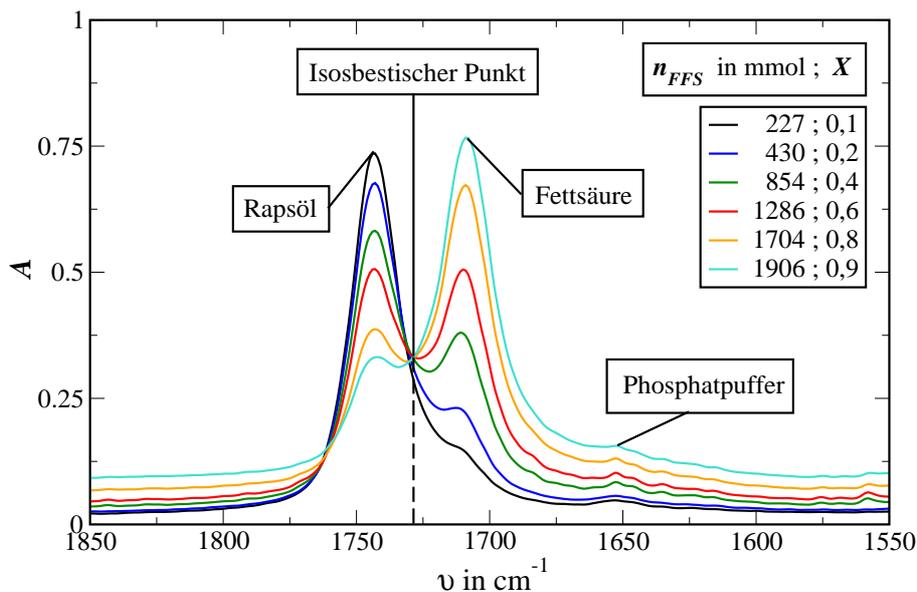


**Abbildung 3.12:** Das zeitliche Verhalten des Fettsäurepeaks im IR-Absorptionsspektrum bei  $\nu = 1710\text{ cm}^{-1}$  für verschiedene Rührergeschwindigkeiten  $n_R$

### 3 Experimentelle Untersuchung

Die Signalstärke ist für jede Rührergeschwindigkeit zeitlich konstant. Dies weist auf einen gleichbleibenden Einfluss des Wassers und konstante Strömungsverhältnisse hin. Sowohl die Kalibrierung als auch die Reaktionsuntersuchungen wurden bei der gleichen Rührergeschwindigkeit durchgeführt.

**Beobachtung des Reaktionsfortschrittes** Der im vorangegangenen Paragraph „Einfluss der Tropfengröße“ beschriebene Versuch wurde mit einer Rührergeschwindigkeit von  $250 \text{ min}^{-1}$  für unterschiedliche Rapsöl/Fettsäure-Zusammensetzungen der öligen Phase wiederholt, um das IR-Spektrum des Zweiphasensystems für verschiedene Umsätze zu betrachten. Die charakteristischen Peaks für Rapsöl ( $\nu = 1740 \text{ cm}^{-1}$ ) und Fettsäure ( $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$ ) sind in Abb. 3.13 für verschiedene Umsätze dargestellt. Bei  $\nu = 1729 \text{ cm}^{-1}$  existiert ein sogenannter isobestischer Punkt zwischen Rapsöl- und Fettsäurepeak. Der isobestische Punkt entspricht der Wellenlänge, bei der sich die Strahlungsabsorption in Abhängigkeit des Öl/Fettsäure-Verhältnisses nicht ändert. Bei  $\nu = 1729 \text{ cm}^{-1}$  sind die Absorptionskoeffizienten von Rapsöl bzw. Fettsäure derart miteinander stöchiometrisch verknüpft, dass die Absorptionszunahme durch die entstehenden Fettsäuren mittels der Absorptionsabnahme aufgrund der verbrauchten Ölmoleküle kompensiert wird. Der Absorptionswert bei dieser Wellenlänge ist somit zeitlich konstant und nicht vom Reaktionsfortschritt abhängig. Reaktionssysteme, die einen isobestischen Punkt aufweisen, eignen sich besonders gut für quantitative Analysen [96].



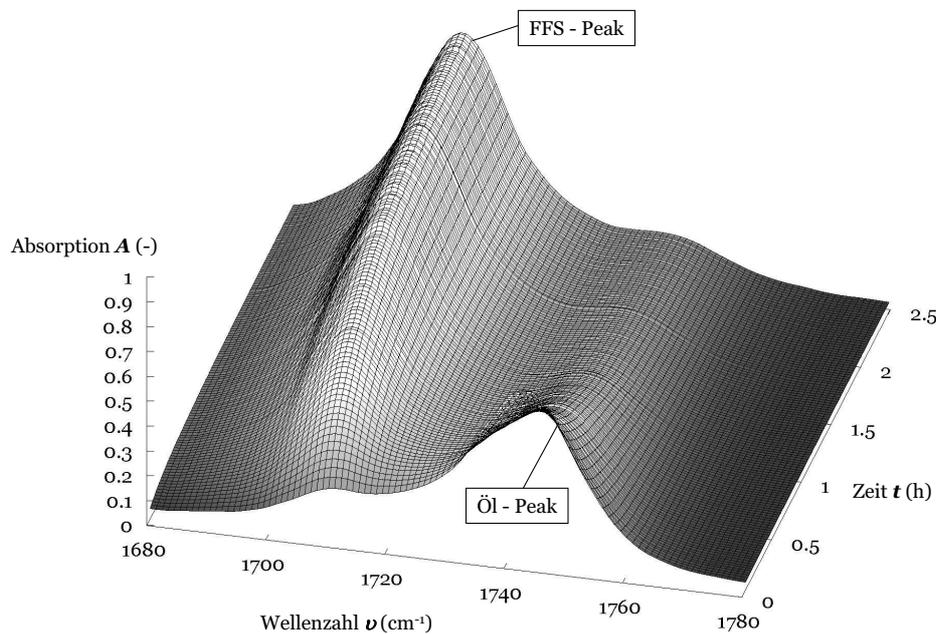
**Abbildung 3.13:** Veränderung der charakteristischen Öl- bzw. Fettsäurepeaks bei verschiedener Zusammensetzung der öligen Phase; ein sogenannter isobestischer Punkt existiert bei  $\nu = 1729 \text{ cm}^{-1}$ .

Der Phosphatpuffer weist bei einer Wellenzahl von  $1650\text{ cm}^{-1}$  einen signifikanten Peak auf (Abb. 3.11). Im Zweiphasensystem ist für den Phosphatpuffer bei dieser Wellenzahl eine geringe Absorption zu beobachten (Abb. 3.13). Demzufolge absorbieren nur marginale Mengen der wässrigen Phase IR-Strahlung, dies lässt auf Spuren von Phosphatpuffer im Detektionsbereich schließen. Die relative Höhe dieses Signals (Auswertung mit Basislinie) bleibt mit zunehmenden Umsatz konstant. Der Effekt wird durch die Kalibrierung mit berücksichtigt.

Die Eindringtiefe des IR-Strahls in die Probe berechnet sich nach Gl. 3.18 für die relevante Wellenlänge von  $1710\text{ cm}^{-1}$  bei einem Umsatz von 50% zu  $0,6\text{ }\mu\text{m}$ .

In Abb. 3.13 kann eine Erhöhung der Basislinie mit steigendem Umsatz beobachtet werden. Die Ermittlung der Peakhöhe erfolgt daher unter Berücksichtigung der Basislinienverschiebung.

In Abb. 3.14 ist die Entwicklung der signifikanten Rapsöl- bzw. Fettsäurepeaks während eines Reaktionsexperimentes dargestellt. Die Abnahme der Rapsölmenge bei gleichzeitiger Zunahme der Fettsäuremenge während der Reaktion ist deutlich zu erkennen.



**Abbildung 3.14:** Zeitlicher Verlauf des Rapsöl- bzw. Fettsäurepeaks während eines Reaktionsexperimentes ( $c_{e0} = 4\text{ }\mu\text{g/ml}$ )

**Kalibrierung** Für die Bilanzierung der betrachteten Reaktion ist die Konzentrationsmessung einer Spezies (Schlüsselkomponente) ausreichend. Aus dem Reaktionsfortschritt, repräsentiert durch den Umsatz der stöchiometrisch limitierenden Spezies  $\bar{X}_i$ ,

### 3 Experimentelle Untersuchung

lassen sich die Konzentrationen aller an der Reaktion beteiligten Spezies rechnerisch ermitteln. Wie bereits erläutert, wurde als Schlüsselkomponente die freie Fettsäure ausgewählt. Um von der Peakhöhe auf die Fettsäurekonzentration schließen zu können, wurde eine Kalibrierung des Reaktionssystems durchgeführt. Hierfür wurden Kalibriergemische bekannter Zusammensetzung von Rapsöl, Phosphatpuffer (ohne Lipase), Fettsäure und Glycerin hergestellt. Aus vorgegebenen Umsätzen und Anfangsmassen der beiden Edukte Rapsöl und Phosphatpuffer wurden nach Gln. 3.21 und 3.22 die Gemische für die jeweiligen Umsatzstufen (Tab. 3.2) berechnet. Dabei ist Rapsöl die stöchiometrisch limitierende Komponente  $\bar{X}_{\text{Ö1}}$ . Die vorgegebenen Anfangsmassen sind identisch mit denen zur reaktionskinetischen Untersuchung verwendeten. Die neben Fettsäure und Glycerin entstehenden Partialglyceride fanden bei der Kalibrierung keine Berücksichtigung, da die Bilanzierung der Reaktion auf Basis der gespaltenen Esterbindungen erfolgt.

$$n_i = n_{i,0} - \frac{\nu_i}{\bar{\nu}_{\text{Ö1}}} \bar{n}_{\text{Ö1},0} \bar{X}_{\text{Ö1}} \quad (3.21)$$

$$m_i = n_i M_i \quad (3.22)$$

**Tabelle 3.2:** Zusammensetzung der Vorlagen zur Kalibrierung der IR-Spektroskopie

Umsatz	Rapsöl	Phosphatpuffer	Fettsäure	Glycerin
%	g	g	g	g
0	617,5	228,4	0	0
20	493,0	220,1	117,9	12,9
50	308,1	208,9	295,2	32,2
80	126,6	197,5	471,9	51,5
100	0	189,8	589,5	64,2

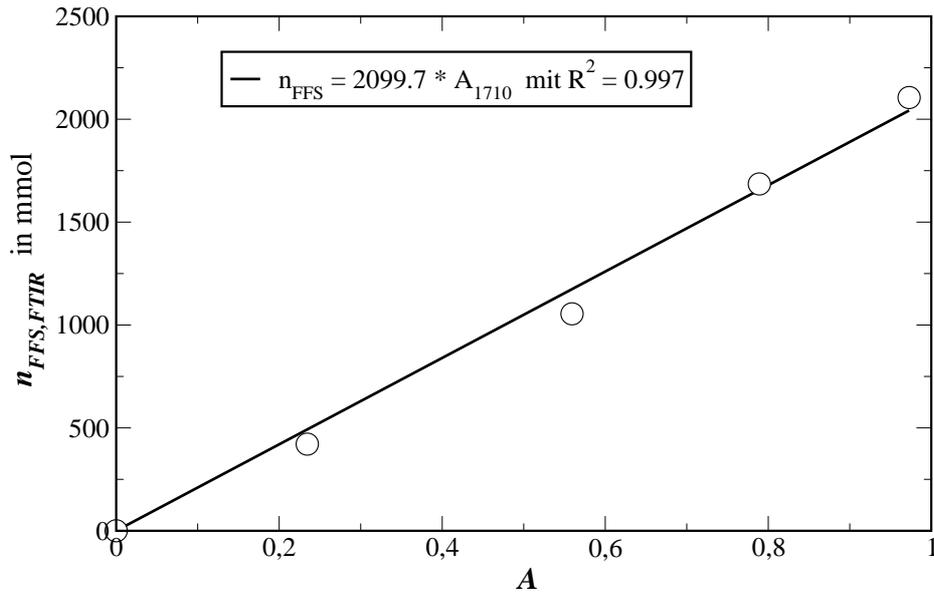
Die Reaktionsparameter der Kalibrierung entsprechen denen der reaktionskinetischen Experimente (Tab. 3.3, S. 62). Die Emulsion des jeweiligen Kalibriergemisches wurde im Rührkesselreaktor hergestellt und kontinuierlich durch die ATR-Messzelle im Kreislauf gepumpt. Nachdem sich ein stationärer Emulsionszustand eingestellt hatte, wurde das IR-Spektrum des jeweiligen Kalibriergemisches vermessen und die Peakhöhe bei  $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$  unter Berücksichtigung der Basislinie bestimmt.

Da die Kalibrierung für verschiedene Rapsöl/Fettsäure-Zusammensetzungen erfolgte, wurde die Abhängigkeit des Brechungsindex vom Umsatz und die daraus resultierende Änderung der Eindringtiefe des IR-Strahls automatisch berücksichtigt.

In Abb. 3.15 ist der funktionelle Zusammenhang der Absorptionsintensität des zur Auswertung verwendeten Fettsäurepeaks ( $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$ ) und der Fettsäuremenge dargestellt. Die Fettsäuremenge kann aus dem linearen Zusammenhang

$$n_{FFS,FTIR} = 2099,7 \cdot A_{1710} \quad (3.23)$$

bestimmt werden. Das untere Detektionslimit liegt ungefähr bei 12 mmol.

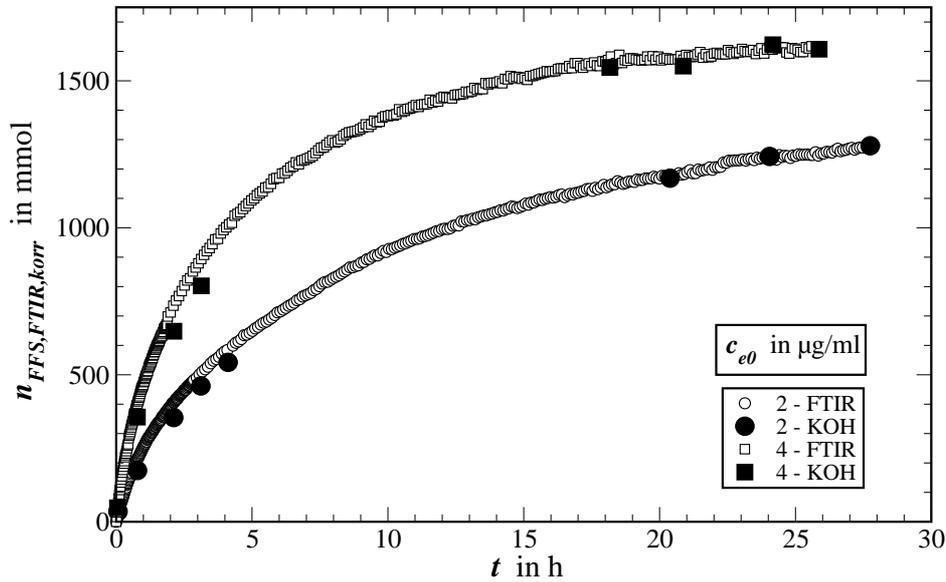


**Abbildung 3.15:** Kalibriergerade der IR-Absorptionsspektroskopie für den zur Auswertung verwendeten Fettsäurepeak ( $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$ )

Die Kalibrierung erfolgte zu Beginn der Untersuchungsreihe. Die Kristalloberfläche veränderte sich aufgrund der aggressiven Wirkung der Fettsäuren im Verlauf der Untersuchungen. Die angegriffene ZnSe-Oberfläche führt zu einer Signalabschwächung. Dementsprechend wurden die originären Messergebnisse der FTIR-Analyse mit dem Korrekturfaktor  $a_{FTIR}$  verrechnet (Anhang D, S. 127). Als Ergebnis wird eine korrigierte Fettsäuremenge  $n_{FFS,FTIR,korr}$  erhalten. In Abb. 3.16 ist dieser korrigierte Fettsäuremengen-Zeit-Verlauf beispielhaft für die Enzymkonzentrationen 2 und 4  $\mu\text{g/ml}$  dargestellt. Um die Qualität der Korrektur zu bestimmen, wurde die reale Fettsäuremenge  $n_{FFS,KOH,Rk}$  offline mittels ethanolischer KOH-Titration (Abschn. 3.3.1, S. 35) parallel zur kontinuierlichen Messung ermittelt und mit den Korrektur-Werten verglichen (Abb. 3.16). Innerhalb der ersten 5 Stunden verringert sich der relative Fehler von gemittelten 20% auf unter 10%. Nach 20 Stunden sind Korrektur-Wert und realer Wert nahezu identisch. Es wird angenommen, dass die zeitabhängige Abweichung zwischen realer und korrigierter Fettsäuremenge für alle untersuchten Enzymmengen

### 3 Experimentelle Untersuchung

übereinstimmt. Der Fehler zu Reaktionsbeginn ist nicht unerheblich, allerdings ist er bekannt und kann entsprechend berücksichtigt werden.



**Abbildung 3.16:** Reaktionsexperimente zwei verschiedener Lipasekonzentrationen: Vergleich der IR-Analyse mit der KOH-Titration, beispielhaft für  $c_{e0} = 2$  und  $4 \mu\text{g/ml}$ ; in dieser Untersuchung wurde der Reaktionsendpunkt für beide Experimente nicht erreicht.

**Umsatzberechnung** Der zeitabhängige Umsatz  $X$  der stöchiometrisch limitierten Komponente berechnet sich aus der mittels FTIR-Analyse bestimmten Fettsäuremenge  $n_{FFS,FTIR,korr}$  (Gl. D.2, S. 127) gemäß

$$X(t) = X_{\text{Öl}}(t) = \frac{n_{\text{Öl},0} - n_{\text{Öl}}(t)}{n_{\text{Öl},0}} \quad (3.24)$$

mit

$$n_{\text{Öl}}(t) = \left( n_{\text{Öl},0} - \frac{n_{FFS,FTIR,korr}(t)}{3} \right) \quad (3.25)$$

Dabei entsprechen  $n_{\text{Öl},0}$  und  $n_{\text{Öl}}$  den Rapsölmengen zu Reaktionsbeginn ( $t = 0 \text{ min}$ ) bzw. zur Reaktionszeit  $t$ .

**Reproduzierbarkeit der FTIR-Messung** Um die Reproduzierbarkeit der FTIR-Analyse zu prüfen, wurden für drei verschiedene Enzymkonzentrationen jeweils ein Experiment und eine Wiederholung durchgeführt. Wie in Abb. 3.17 zu erkennen ist, sind die durchgeführten Messungen mit nur geringfügigem Fehler sehr gut reproduzierbar.

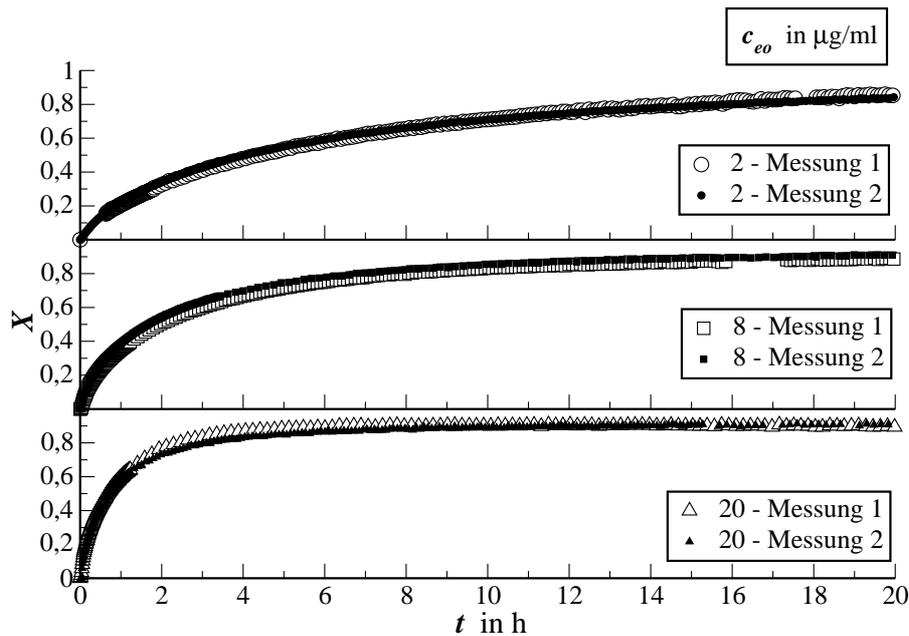


Abbildung 3.17: Reproduzierbarkeit der FTIR-Analyse für verschiedene Lipasekonzentrationen

### 3.3.3 Bestimmung der Tropfengröße – Photonendichtewellen-Spektroskopie

Im Hinblick auf die kinetische Charakterisierung ist die Kenntnis der volumenspezifischen Grenzflächengröße des betrachteten zweiphasigen (fl/fl) Reaktionssystems von großer Bedeutung. Das Messverfahren sollte den für Emulsionen typischen Tropfengrößenbereich von 0,1 bis 500  $\mu\text{m}$  erfassen können und für die in dieser Arbeit eingesetzte Tropfenkonzentration von 25 Vol.-% verwendbar sein. Die Messung sollte online und ohne Probenverdünnung erfolgen. Dadurch wird eine unerwünschte Änderung der Tropfengrößenverteilung durch Probennahme und Emulsionsverdünnung vermieden. Eine zeitliche Auflösung in mindestens derselben Größenordnung wie bei dem für die Ermittlung des Reaktionsfortschrittes verwendeten Verfahren (50 Sekunden) ist von Vorteil, um Zusammenhänge zwischen Reaktionsfortschritt und Tropfengröße feststellen zu können.

Für die Bestimmung der Tropfengröße in Tropfenkollektiven hoher Konzentration kommen nur wenige Messverfahren in Frage. Die Mikroskopie ist als abbildendes und diskontinuierliches Verfahren zur Bestimmung der Tropfengröße und ihrer Verteilung in Emulsionen prinzipiell geeignet [62]. Der experimentelle Aufwand ist jedoch verhältnismäßig hoch und die zeitliche Auflösung begrenzt. Typische Streulichtmessverfahren, wie z. B. Laserbeugungsspektrometrie, können in optisch dichten Medien

### 3 Experimentelle Untersuchung

ohne Verdünnung nicht angewendet werden, da Mehrfachbeugung bzw. -streuung das Messresultat verfälschen. Die Ultraschallextinktionsanalyse erfüllt die oben geforderten Kriterien. Dabei handelt es sich um ein Verfahren zur kontinuierlichen Ermittlung von Tropfengrößenverteilungen. Tropfengrößen zwischen 10 nm – 3  $\mu\text{m}$  bei Konzentrationen bis zu 70 Vol.-% können online detektiert werden. Allerdings stand dieses Verfahren für die Untersuchungen nicht zur Verfügung. Die Photonendichtewellen-Spektroskopie ist ein weiteres Verfahren, welches die oben genannten Kriterien erfüllt. Allerdings kann mit dieser Methode lediglich eine mittlere Tropfengröße und keine Tropfengrößenverteilung ermittelt werden.

Mit der Photonendichtewellen(PDW)-Spektroskopie ist die getrennte Ermittlung von Absorptions- und Streueigenschaften stark streuender Medien möglich. Im Gegensatz zu den klassischen Lichtstremethoden (statische und dynamische Lichtstreuung) beruht die PDW-Spektroskopie auf dem Prinzip der Mehrfachstreuung von Licht. Bisher wurde das Interesse an der PDW-Spektroskopie durch biomedizinische Fragestellungen geprägt [90]. Eine technische Anwendung der PDW-Spektroskopie wurde von Reich [68] mit der Motivation entwickelt, optische Eigenschaften technisch interessanter, stark streuender Realsysteme zu charakterisieren. Im Folgenden wird die Anwendung der PDW-Spektroskopie auf das in dieser Arbeit verwendete w/o-Emulsionssystem demonstriert. Zunächst soll aber kurz auf den theoretischen Hintergrund der PDW-Spektroskopie eingegangen werden. Die Ausführungen lehnen sich an die Forschungsarbeit von Reich an [69, 68].<sup>10</sup>

**Prinzip** Die zeit- und ortsabhängige Ausbreitung von intensitätsmoduliertem Licht in einem stark streuenden Medium wird als Photonendichtewelle (PDW) beschrieben, die durch die Anzahl der Photonen pro Volumen charakterisiert ist. Beim Durchtreten der PDW durch das Medium ändern sich Amplitude und Phase der Welle, verursacht durch Absorption und Streuung der sich in der Probe befindlichen Teilchen.

Bei der PDW-Spektroskopie wird sinusförmig intensitätsmoduliertes Laserlicht über einen Lichtwellenleiter (LWL) in die zu untersuchende Probe eingestrahlt. Die entstehende Photonendichtewelle wird über einen zweiten Lichtwellenleiter bezüglich ihrer Amplitude und Phasenverschiebung analysiert. Aus diesen Größen, Amplitude  $I_{AC}$  und Phase  $\Phi$ , kann die getrennte Absolutbestimmung von Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$  und effektivem Streukoeffizienten  $\mu'_s$  erfolgen. Während mit dem effektiven Streuko-

---

<sup>10</sup>Die Untersuchungen zur Tropfengrößenbestimmung mittels PDW-Spektroskopie wurden an der Universität Potsdam am Institut für Chemie (Lehrstuhl für Physikalische Chemie) durchgeführt. Dabei wurden Messungen und Auswertung in Zusammenarbeit mit Oliver Reich vorgenommen.

effizienten die mittlere Teilchengröße bzw. der Volumenanteil der streuenden Spezies bestimmbar ist, gibt der Absorptionskoeffizient Auskunft über absorbierende Substanzen in der Probe.

Die PDW-Spektroskopie ist insbesondere zur Untersuchung stark streuender Medien mit relativ geringer Absorption geeignet. Einerseits gestattet die hohe Streuung eine Beschreibung der Lichtausbreitung in Form eines zufälligen Teilchentransports. Andererseits verringert sich die Photonendichte bei starker Absorption derartig, dass eine Detektion erschwert wird. Der theoretischen Beschreibung der PDW-Spektroskopie liegt die Annahme zugrunde, dass sich die Strahlung in einem unendlich großen System ausbreitet und dadurch keine Strahlung aus der Probe austritt bzw. auf ihre Begrenzungen trifft.

Mittels einer Strahlungstransportgleichung wird die räumliche und zeitliche Ausbreitung von Licht beschrieben. Unter Vernachlässigung von Interferenz- und Polarisierungseffekten wird eine Transportgleichung der Photonen analog dem Stofftransport entwickelt. Dabei wird ein Diffusionsansatz zur Beschreibung der zeitlichen Änderung der Photonendichte verwendet. Der hierbei angewandte Diffusionskoeffizient charakterisiert Streu- und Absorptionseigenschaften des Mediums. Unter der Annahme, dass die Photonen häufig gestreut werden und die Streuzentren zufällig verteilt sind, wird die Ausbreitung der Photonendichtewelle mittels P1-Näherung der Strahlungstransportgleichung beschrieben.

$$\rho_{AC}(r, t) = \frac{C}{r} \exp(-k_I r + i(k_\Phi r - \omega t - \Phi_0)) \quad (3.26)$$

Dabei ist  $\rho_{AC}$  – zeitabhängiger Teil der Photonendichte bei großen Abständen zur Strahlungsquelle und Systemgrenze,  $r$  – Abstand zwischen Emissions- und Detektions-LWL,  $\omega$  – Kreisfrequenz,  $\Phi_0$  – frequenzabhängige Phasenverschiebung,  $k_I$  – Intensitätskoeffizient,  $k_\Phi$  – Phasenkoeffizient. Der Parameter  $C$  hängt von der Intensität und der Modulationstiefe der Quelle sowie von den optischen Parametern des Mediums ab.  $k_I$  und  $k_\Phi$  sind jeweils vom Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$ , vom effektiven Streukoeffizienten  $\mu'_s$  und von der Frequenz  $f$  abhängig.

$$k_I = \sqrt{\frac{3}{2} \left( \sqrt{\left[ \alpha \mu_a + \mu'_s \right]^2 + \frac{\omega^2}{c^2}} \left[ \mu_a^2 + \frac{\omega^2}{c^2} \right] + \mu_a \left[ \alpha \mu_a + \mu'_s \right] - \frac{\omega^2}{c^2} \right)} \quad (3.27)$$

$$k_\Phi = \sqrt{\frac{3}{2} \left( \sqrt{\left[ \alpha \mu_a + \mu'_s \right]^2 + \frac{\omega^2}{c^2}} \left[ \mu_a^2 + \frac{\omega^2}{c^2} \right] - \mu_a \left[ \alpha \mu_a + \mu'_s \right] + \frac{\omega^2}{c^2} \right)} \quad (3.28)$$

### 3 Experimentelle Untersuchung

Dabei ist  $c$  die Lichtgeschwindigkeit und  $\alpha$  entspricht einem Parameter, der den Einfluss der Absorption auf den optischen Diffusionskoeffizienten beschreibt (in dieser Arbeit:  $\alpha = 1/3$ ).  $\rho_{AC}$  kann experimentell anhand der Amplitude  $I_{AC}$ , im Folgenden auch als Intensität bezeichnet, und der Phase  $\Phi$  charakterisiert werden.

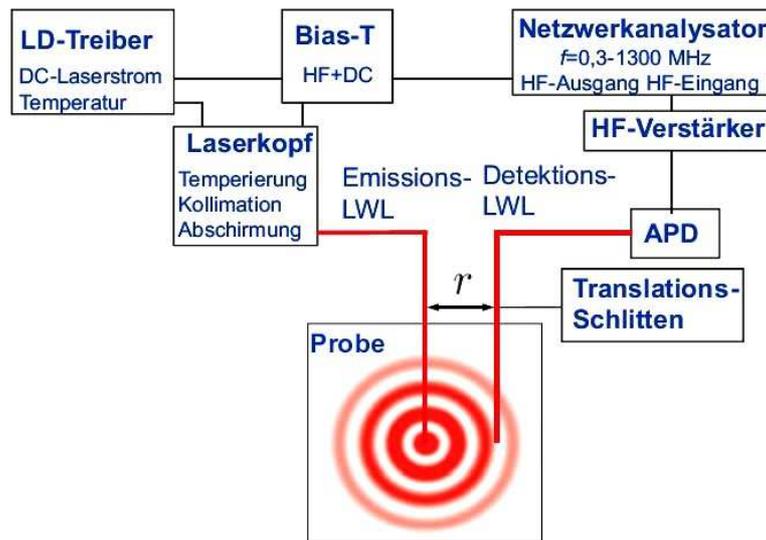
$$\rho_{AC}(r, t, f) = I_{AC}(r, f) \cos(\Phi(r, f) - \omega t) \quad (3.29)$$

$$I_{AC}(r, f) = \frac{C(f)}{r} \exp(-k_I(f) r) \quad (3.30)$$

$$\Phi(r, f) = k_\Phi(f) r - \Phi_0(f) \quad (3.31)$$

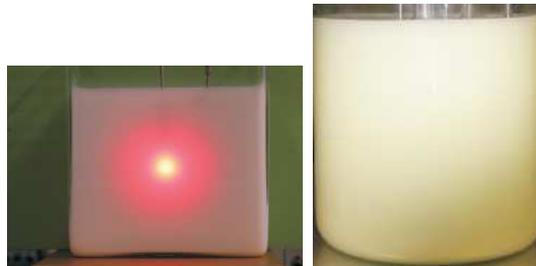
Durch eine nichtlineare Regression der Messgrößen Intensität  $I_{AC}$  und Phase  $\Phi$ , als Funktion von  $r$  und  $f$ , werden  $\mu_a$  und  $\mu'_s$  bestimmt.

**Anwendung und Bewertung** Der Versuchsaufbau zur Erzeugung und Detektion von Photonendichtewellen mit dem Ziel, die mittlere Tropfengröße zu bestimmen, ist in Abb. 3.18 schematisch dargestellt. Für die Untersuchungen wird monochromatisches Licht der Wellenlänge 638 nm verwendet. Dessen Erzeugung erfolgte mit einem intensitätsmodulierten Diodenlaser. Dieser ist im Vergleich zu traditionellen Lasern kostengünstiger, robuster, wartungsfrei und erlaubt eine elektronische Hochfrequenz-Modulation. Die Laserdiode ist auf einen Laserkopf installiert. Mittels eines Lasertreibers werden Strom und Temperatur konstant gehalten. Das vom Diodenlaser ausgesandte Licht wird mit einer Linse in den Emissions-LWL (optische Glasfaser) eingekoppelt. Mit einem zweiten LWL, dem Detektions-LWL, wird das Licht nach der Probe auf den Detektor, eine Avalanche Photodiode (APD), geleitet. Emissions- und Detektions-LWL sind in das zu untersuchende Medium (900 ml w/o-Emulsion mit 25 Vol.-% Wasserphase) senkrecht eingetaucht und enden auf gleicher Höhe (Hälfte der Reaktorhöhe). Sie sind parallel zueinander angeordnet. Ihr Abstand  $r$  variiert während der Messung zwischen 20 und 40 mm. Zur Einstellung unterschiedlicher Abstände zwischen den LWL's wird ein computergesteuerter Translationsschlitten verwendet, der den Detektions-LWL schrittweise bewegt. Nach der Detektion des ankommenden Lichtes wird die Intensität  $I_{AC}$  und die Phase  $\Phi$  des erhaltenen Signals mit einem Netzwerkanalysator in Abhängigkeit von der Modulationsfrequenz und dem Abstand zwischen den LWL's bestimmt. Es werden 51 verschiedene Modulationsfrequenzen in einem Bereich von 0,3 und 1300 MHz realisiert. Die hohen Frequenzen ermöglichen eine genaue Bestimmung der Absorptions- und Streueigenschaften.



**Abbildung 3.18:** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Durchführung der PDW-Spektroskopie [68]

Das vom Emissions-LWL als punktförmige Lichtquelle in die stark streuende Probe eingekoppelte Laserlicht breitet sich in Form einer Kugelwelle konzentrisch in alle Raumrichtungen aus (Abb. 3.19, linkes Bild). Das in dieser Arbeit untersuchte Medium ist in Abb. 3.19, rechtes Bild, abgebildet.



**Abbildung 3.19:** Linkes Bild: Ausbreitung der Photonendichtewelle als Kugelwelle im dispersen System [68]; rechtes Bild: untersuchtes Emulsionssystem.

Für die Auswertung wurden folgende Annahmen getroffen:

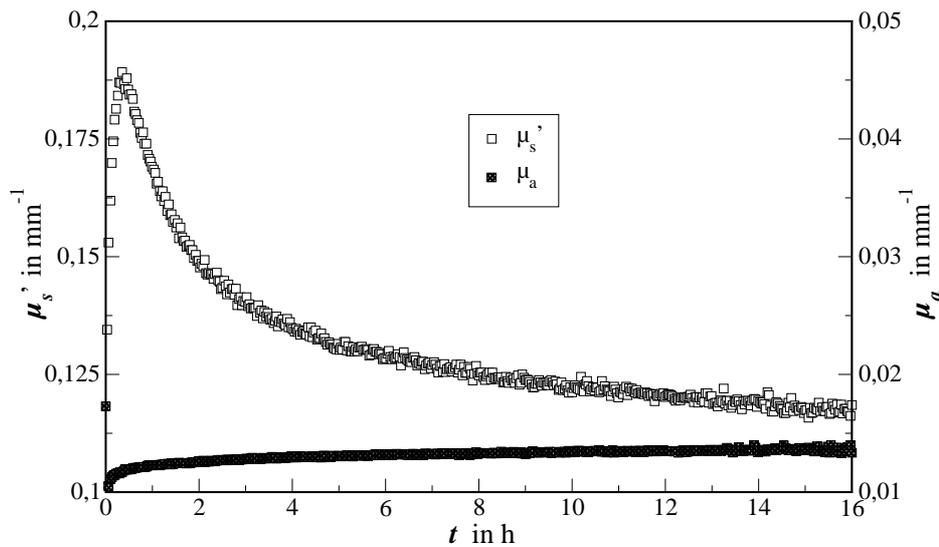
1. Der Abstand zwischen Lichtwellenleiter und Gefäßwand bzw. Rührer ist genügend groß, so dass keine Laserstrahlung die Systemgrenzen erreicht. Zur Erhöhung des Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$  des betrachteten Systems um einen bestimmten Betrag wurde der wässrigen Phase der Farbstoff Isosulfanblau (Merck, Darmstadt, D) zugegeben. Damit sollte die Wahrscheinlichkeit verringert werden, dass Strah-

### 3 Experimentelle Untersuchung

lung die Systemgrenzen erreicht. Der Farbstoff hat keinen Einfluss auf Emulsion und Reaktion.<sup>11</sup>

- Die Probe ist makroskopisch homogen, d. h., überall in der Probe liegen die gleichen optischen Eigenschaften vor.

Aus dem Messsignal, Intensität  $I_{AC}$  und Phase  $\Phi$ , einer PDW-Untersuchung werden Absorptionskoeffizient  $\mu_a$  und Streukoeffizient  $\mu'_s$ , wie bereits erläutert, berechnet. In Abb. 3.20 sind die zeitlichen Verläufe beider optischer Koeffizienten am Beispiel einer Lipasekonzentration dargestellt. Der Absorptionskoeffizient zeigt während des Untersuchungszeitraumes keine signifikante Änderung. Die geringe Absorption bei  $\lambda = 638$  nm wird durch den Phosphatpuffer und die Komponenten der öligen Phase hervorgerufen. Im Gegensatz dazu ist der effektive Streukoeffizient zeitabhängig und nimmt mit dem Reaktionsfortschritt ab.



**Abbildung 3.20:** Zeitlicher Verlauf des effektiven Streukoeffizienten  $\mu'_s$  und Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$  am Beispiel einer biokatalytischen Hydrolyse bei der Enzymkonzentration von  $c_{e0} = 8 \mu\text{g/ml}$

Der effektive Streukoeffizient  $\mu'_s$  charakterisiert die streuenden Komponenten in einer Probe und ist dementsprechend abhängig von der Größe der streuenden Tropfen.

$$\mu'_s = f(d_{tr}) \quad (3.32)$$

<sup>11</sup>Ein Wiederholungsversuch für  $c_{e0} = 8 \mu\text{g/ml}$  wurde mit dem Farbstoff Isosulfanblau durchgeführt. Die Reaktionsgeschwindigkeit war zu jedem Versuchszeitpunkt dieselbe, verglichen mit dem Experiment ohne Farbstoff.

Es wurden verschiedene Theorien bezüglich der Beziehung zwischen Streukoeffizient und Teilchengröße entwickelt. Sie unterscheiden sich im Größenbereich des Teilchendurchmessers. Für die in der hier untersuchten Emulsion relevanten Teilchengrößen<sup>12</sup> und den damit verbundenen Streueigenschaften ist die Mie-Theorie zu verwenden [46]. Es sind dabei folgende Annahmen zu treffen:

1. Alle Tropfen sind kugelförmig und gleich groß.
2. Eine Streuung durch das Enzym und ein gegebenenfalls komplexer Aufbau des Zweiphasensystems (multiple Emulsion) liegt nicht vor.

Die Streuung wird durch eine örtliche Variation des Brechungsindex hervorgerufen. Um vom effektiven Streukoeffizienten auf die Teilchengröße schließen zu können, muss der Brechungsindex der Spezies bei der verwendeten Wellenlänge  $\lambda$  bekannt sein. Aufgrund der Reaktion ändern sich die Brechungsindices der beiden Phasen im Verlauf der Reaktion. Demzufolge wurde der Brechungsindex für beide Phasen zu Beginn sowie am Ende der Reaktion<sup>13</sup> mit einem Refraktometer bei  $\lambda = 638 \text{ nm}$  ermittelt. Unter der Annahme, dass der Brechungsindex in der jeweiligen Phase linear von der Produktbildung abhängt, wurden die fehlenden Werte zu den entsprechenden Versuchszeiten durch lineare Interpolation ermittelt. Die Änderung des Volumenanteils der dispersen Phase wurde zudem in Abhängigkeit vom Umsatz berechnet<sup>14</sup>.

In den durchgeführten Experimenten nimmt der effektive Streukoeffizient  $\mu'_s$  im Laufe der Reaktion Werte zwischen  $0,10$  und  $0,27 \text{ mm}^{-1}$  an. Der mittlere Tropfendurchmesser  $\bar{d}_{tr}$  wurde unter Verwendung der Mie-Theorie im relevanten Wertebereich von  $\mu'_s$  unter Berücksichtigung des umsatzabhängigen Volumenanteils der Tropfenphase sowie den umsatzabhängigen Brechungsindices beider Phasen berechnet. In Abb. 3.21 ist der funktionale Zusammenhang von  $\mu'_s$  und  $\bar{d}_{tr}$  exemplarisch für  $t = 0 \text{ min}$  dargestellt. Für jede weitere Messzeit wurde die Abhängigkeit zwischen effektivem Streukoeffizienten und Tropfengröße ermittelt. Der Zusammenhang zwischen  $\mu'_s$  und  $\bar{d}_{tr}$  ist mit folgender Funktion beschreibbar:

$$\mu'_s = \frac{A}{B + \bar{d}_{tr}} \phi_w \quad (3.33)$$

---

<sup>12</sup>Mikroskopische Untersuchungen für identische Reaktionssysteme mit ähnlichen Reaktionsbedingungen (verschiedene Rührerarten) wurden im Vorfeld durchgeführt [27].

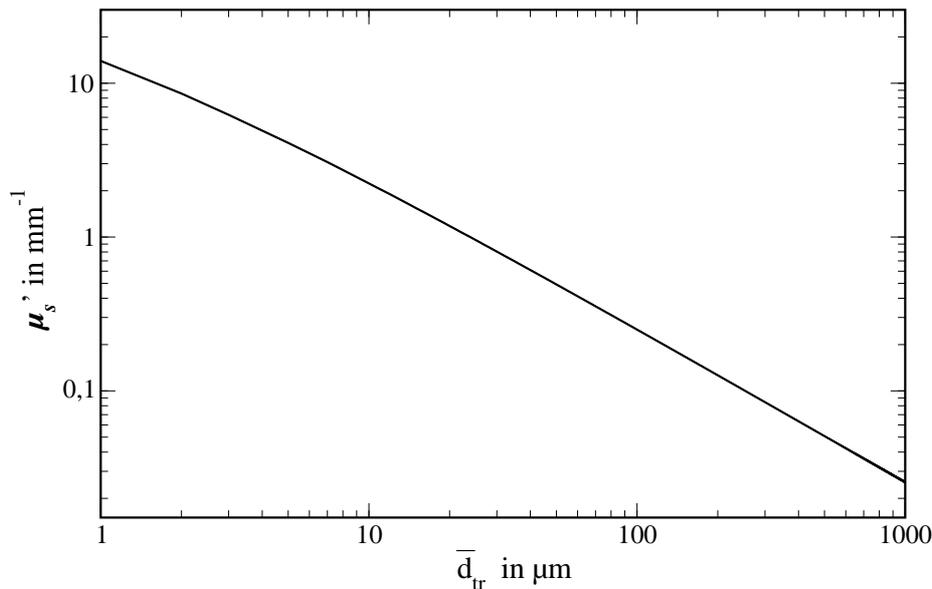
<sup>13</sup>*Reaktionsbeginn*: ölige (kontinuierliche) Phase = Rapsöl, wässrige (disperse) Phase = Phosphatpuffer und Lipase; *Reaktionsende*: ölige Phase = Rapsöl und Fettsäuren, wässrige Phase = Phosphatpuffer, Glycerin und Lipase

<sup>14</sup>Es wurde ein ideales Verhalten bezüglich der Volumenänderung angenommen.

### 3 Experimentelle Untersuchung

Durch Umformung von Gl. 3.33 ist der mittlere Tropfendurchmesser  $\bar{d}_{tr}$  zu jedem Messzeitpunkt aus dem experimentell ermittelten effektiven Streukoeffizienten  $\mu'_s$  wie folgt abschätzbar:

$$\bar{d}_{tr} = \frac{A \phi_w - \mu'_s B}{\mu'_s} \quad (3.34)$$



**Abbildung 3.21:** Mittels Mie-Theorie berechneter effektiver Streukoeffizient  $\mu'_s$  für Phosphatpuffertropfen in Rapsöl bei  $\phi_p = 25$  Vol.-% und den Brechungsindices beider Phasen bei  $t = 0$  min.

Die getroffenen Annahmen sind im Kontext zum verwendeten Reaktionssystem wie folgt zu bewerten:

- **Homogene Probeneigenschaften**

Nach visueller Beurteilung wird die gesamte Phosphatpuffermenge (disperse Phase) mit dem verwendeten Viskoproprüher im gesamten Reaktionsvolumen gleichmäßig verteilt. An der Behälterwand sind keine Totzonen erkennbar. Wurde der Rührer nach Versuchsende ausgeschaltet, so konnte keine, sich sofort bildende, Wasserschicht auf dem Reaktorboden beobachtet werden, was auf eine inhomogene Mischung hingewiesen hätte.

- **Gleich große Tropfen**

Im Vorfeld durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen zur Tropfengrößenverteilung für ein identisches Reaktionssystem bei ähnlichen Reaktionsbedingungen<sup>15</sup> ergaben eine monomodale Tropfenverteilung [27]. Die Annahme gleich

---

<sup>15</sup>Anstelle eines Viskoproprühers wurde ein Propellerrührer eingesetzt.

großer Tropfendurchmesser trifft nicht zu. In dem in dieser Arbeit betrachteten Anwendungsbereich der PDW-Spektroskopie ist der detektierte Durchmesser von Tropfenoberfläche und -volumen abhängig [68] und somit mit dem Sauterdurchmesser  $d_{tr,32}$  vergleichbar.

- **Streuung des Proteins**

Untersuchungen zu möglichen Streueigenschaften der verwendeten Lipase aus *Candida rugosa* liegen nicht vor.

- **Multiple Emulsion**

Bei mikroskopischen Untersuchungen wurden keine multiplen Emulsionstropfen beobachtet.

Um die Anwendbarkeit der PDW-Spektroskopie auf die in dieser Arbeit untersuchte w/o-Emulsion zu überprüfen, wurde ein Experiment bei identischen Reaktionsbedingungen wiederholt, der Sauterdurchmesser  $d_{tr,32,M}$  mikroskopisch bei verschiedenen Reaktionszeiten bestimmt und mit  $\bar{d}_{tr,PDWS}$  aus den PDW-Spektroskopie-Messungen verglichen.

**Validierung der PDW-Spektroskopie mittels Mikroskopie** Der Vergleich zwischen PDW-Spektroskopie und Mikroskopie wurde für eine Lipasekonzentration von  $2 \mu\text{g/ml}$  vorgenommen. Die mikroskopische Bestimmung der Tropfengrößenverteilung ist ein diskontinuierliches Verfahren. Die Messung erfolgt offline und ist ein zeitintensiver Prozess. Die Untersuchung wurde mit einem Olympus BX 50 Mikroskop inklusive Kamera (Olympus, Hamburg, D) bei einer zehnfachen Vergrößerung durchgeführt. Zu vier verschiedenen Versuchszeiten wurde jeweils eine Probe an immer derselben Stelle aus dem Reaktor mittels einer speziell präparierten Pipette<sup>16</sup> entnommen. Für jede Versuchszeit wurde ein Emulsionstropfen auf den Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Spätestens 40 Sekunden nach der Probenentnahme wurden Bilder der sich im Fokus befindlichen Tropfen aufgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass die Schärfenebene bei allen untersuchten Proben identisch war.

Die erhaltenen Bilder wurden jeweils in  $7 \times 9$  Rechtecke unterteilt. Nach einem statistischen Grundmuster wurden Rechtecke ausgewählt (jedes zweite Rechteck waagrecht sowie jedes dritte Rechteck senkrecht) und deren Tropfen mit dem Graphikprogramm *Gimp 2.2* manuell markiert. Die Ermittlung der Anzahlverteilung  $q_0(\hat{d}_{tr,i})$  der

---

<sup>16</sup>Es wurde eine extra große Öffnung an der Pipettenspitze generiert, um eine mögliche Tropfenkoaleszenz durch die Probenentnahme zu minimieren.

### 3 Experimentelle Untersuchung

markierten Tropfen erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Image Tool 3.0*. Für eine maßstabsgetreue Bestimmung des Durchmessers wurde das Längenmaß kalibriert. *Image Tool 3.0* ermittelt automatisch Größe und Häufigkeit der Tropfendurchmesser der geladenen Bilder.

Die Anzahlverteilung  $q_0(\hat{d}_{tr,i})$  zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt berechnet sich nach Gl. 3.35. Die in dieser Arbeit verwendete Intervallgröße  $\Delta d_{tr,i}$  entspricht  $1 \mu\text{m}$ .

$$q_0(\hat{d}_{tr,i}) = \frac{\text{Tropfenzahl im Intervall } i \text{ von } d_{tr,i} \text{ bis } (d_{tr,i} + \Delta d_{tr,i})}{\text{gesamte Tropfenzahl } \Delta d_{tr,i}} \quad (3.35)$$

mit

$$\hat{d}_{tr,i} = d_{tr,i} + \frac{\Delta d_{tr,i}}{2} \quad (3.36)$$

Aus der  $q_0(\hat{d}_{tr,i})$ -Verteilung wird der Sauterdurchmesser  $d_{tr,32,M}$  nach Gln. 3.37 und 3.38 berechnet. Die volumenspezifische Oberfläche  $S_V$  entspricht dem Quotienten aus der Oberfläche aller Tropfen und dem Tropfenvolumen der dispersen Phase. Wenn das gesamte Volumen der dispersen Phase in gleich große Tropfen eingeteilt und anschließend das Volumen aller Tropfen durch die entsprechende Tropfenoberfläche geteilt wird, dann entspräche dieser Tropfendurchmesser dem Sauterdurchmesser  $d_{tr,32,M}$ . Ein Tropfen mit dem Durchmesser  $d_{tr,32,M}$  besitzt die gleiche volumenspezifische Oberfläche wie die Gesamtheit aller Tropfen in der Emulsion. Dieser Äquivalenzdurchmesser verhält sich reziprok zur volumenspezifischen Oberfläche  $S_V$ .

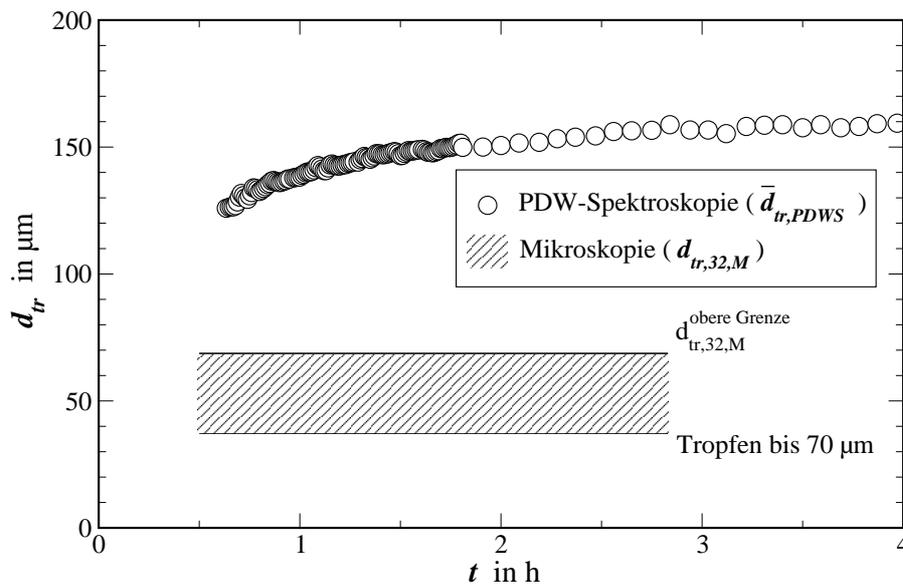
$$S_V = \frac{\sum_{i=1}^N \pi \hat{d}_{tr,i}^2 q_0(\hat{d}_{tr,i}) \Delta d_{tr,i}}{\sum_{i=1}^N \frac{\pi}{6} \hat{d}_{tr,i}^3 q_0(\hat{d}_{tr,i}) \Delta d_{tr,i}} = 6 \frac{M_{2,0}}{M_{3,0}} \quad (3.37)$$

Der Sauterdurchmesser  $d_{tr,32,M}$  berechnet sich wie folgt,

$$d_{tr,32,M} = \frac{6}{S_V} \quad (3.38)$$

In Abb. 3.22 sind mittlerer Tropfendurchmesser der PDW-Spektroskopie  $\bar{d}_{tr,PDWS}$  (entspricht näherungsweise  $d_{tr,32}$ ) sowie der Sauterdurchmesser aus der mikroskopischen Untersuchung  $d_{tr,32,M}$  für  $c_{e0} = 2 \mu\text{g/ml}$  aufgetragen. Für die mikroskopische Untersuchung wurde anstelle eines konkreten Wertes ein Wertebereich angegeben, da

die betrachtete Tropfenzahl (zwischen 750 und 1500 pro Probennahme)<sup>17</sup> für einen statistisch stabilen Wert zu gering war. Steigt die betrachtete Tropfenzahl an, so sinkt der Anteil großer Teilchen und der ermittelte Sauterdurchmesser verringert sich. Werden alle Tropfen der jeweiligen Stichprobe ausgewertet und ein über alle vier Versuchszeiten gemittelter Sauterdurchmesser  $d_{tr,32,M}$  berechnet, markiert der ermittelte Wert eine obere Grenze ( $69 \mu\text{m}$ ). Werden alle großen Tropfen über  $70 \mu\text{m}$  von der Auswertung ausgeschlossen (3% der betrachteten Tropfen) ergibt sich für  $d_{tr,32,M}$  ein über alle vier Zeiten gemittelter Wert von  $37 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.22:** Vergleich der mittleren Tropfengröße während der biokatalytischen Hydrolyse von Rapsöl, jeweils gemessen mit der PDW-Spektroskopie und Mikroskopie, exemplarisch für eine Lipasekonzentration von  $c_{e0} = 2 \mu\text{g/ml}$ .

Die Werte für  $d_{tr,32,M}$  sind in Tab. E.1 (S. 129) in Abhängigkeit vom Probennahmezeitpunkt für beide Auswertevarianten aufgeführt. Der zeitabhängige Verlauf von  $d_{tr,32,M}$  hängt von der Größe der Stichprobe ab. Die in dieser Arbeit betrachtete Tropfenzahl ist zu gering, um eine reaktionsspezifische Abhängigkeit des Sauterdurchmessers feststellen zu können.

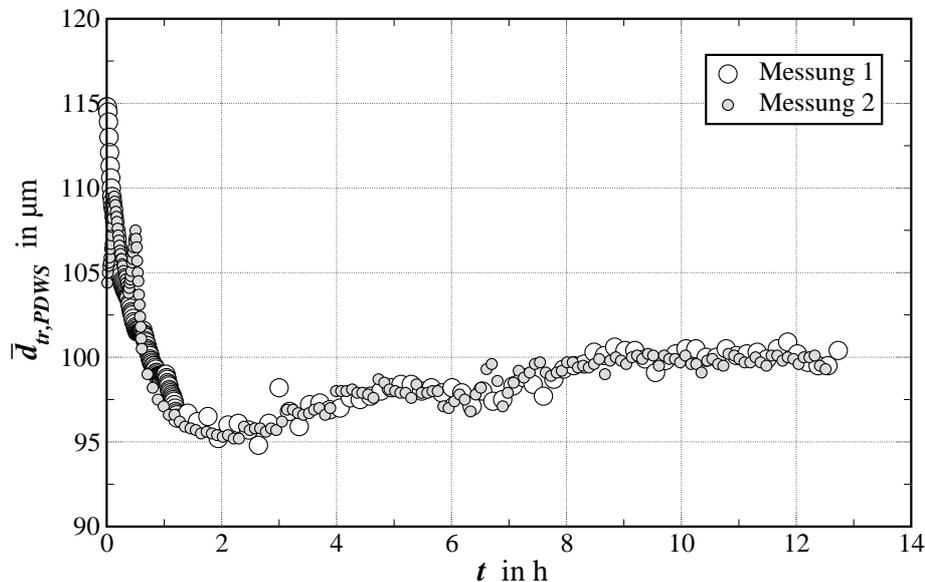
Des Weiteren ist darauf hinzuweisen, dass mit dem Mikroskop unter der eingestellten Vergrößerung die detektierbare Tropfengröße auf einen maximalen Wert beschränkt ist. Dieser Wert wird durch die Apertur des Mikroskops bestimmt. Liegen Teilchen in der Probe vor, deren Größe sich oberhalb des Maximalwertes befindet, werden sie bei der Messung nicht berücksichtigt.

<sup>17</sup>Die betrachtete Tropfenzahl variiert zu den vier Probennahmezeitpunkten. Aufgrund einer zeitlichen Limitierung war die Realisierung einer statistisch gesicherten Stichprobe von 10000 Tropfen nicht möglich.

### 3 Experimentelle Untersuchung

Bei der untersuchten Lipasekonzentration von  $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$  ist der mittels PDW-Spektroskopie ermittelte Durchmesser um den Faktor  $2-3,5$  größer als der durch Mikroskopie bestimmte Tropfendurchmesser. Die PDW-Spektroskopie-Untersuchungen wurden zum ersten Mal auf ein flüssig/flüssig-System mit hoher Teilchenkonzentration angewandt. Es steht zu vermuten, dass aufgrund des hohen Volumenanteils der wässrigen Phase der Effekt einer „abhängigen Streuung“ auftritt. Dies ist der Fall, wenn die Abstände zwischen den Tropfen zu gering sind und die Streuung eines Tropfens von Größe und Anzahl der Nachbartropfen beeinflusst wird. Das hätte eine Verringerung des effektiven Streukoeffizienten  $\mu'_s$  zur Folge, die zu scheinbar größeren mittleren Tropfendurchmessern  $\bar{d}_{tr,PDWS}$  führt. Experimentelle Fehler für derart hohe Abweichungen sind unwahrscheinlich.

Quantitative Aussagen bezüglich der Tropfengrößenverteilung auf Basis der PDW-Spektroskopie bleiben aufgrund des Diskutiertem fraglich. Dennoch können qualitative Aussagen über die Entwicklung der mittleren Tropfengröße im Verlauf einer Reaktion getroffen werden.



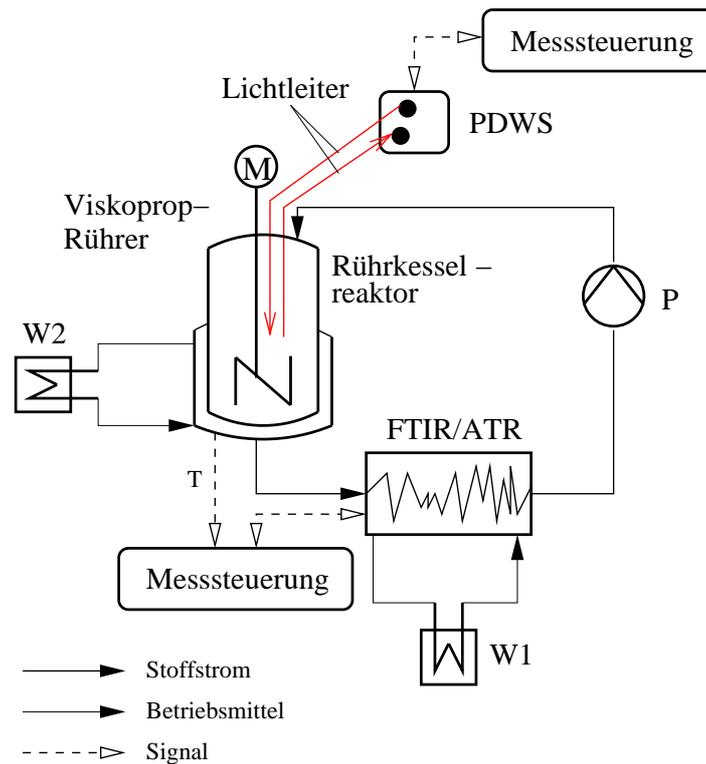
**Abbildung 3.23:** Reproduzierbarkeit der PDW-Spektroskopie für die in dieser Arbeit betrachtete zweiphasige Lipolysereaktion ( $c_{e0} = 20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )

**Reproduzierbarkeit der PDW-Spektroskopie-Messung** Um die Reproduzierbarkeit der PDW-Spektroskopie zu überprüfen, wurde ein Experiment einmal wiederholt. Wie in Abb. 3.23 zu erkennen ist, liefert die verwendete Methode sehr gut reproduzierbare Ergebnisse mit geringem Messfehler. Die zu Versuchsbeginn auftretenden

Schwankungen bei Messung 2 sind durch Inhomogenitäten im Zweiphasensystem zu erklären.

### 3.3.4 Versuchsanlage zur Untersuchung der Reaktionskinetik

Der Aufbau der Versuchsanlage zur reaktionskinetischen Charakterisierung der heterogenen Lipolysereaktion ist schematisch in Abb. 3.24 dargestellt. Dabei werden Reaktionsfortschritt und Größe der Emulsionstropfen simultan gemessen.



**Abbildung 3.24:** Schematische Darstellung der Versuchsanlage zur Untersuchung der Reaktionskinetik (P – Pumpe, W1 und W2 – Wärmetauscher 1 und 2)

Die Reaktion findet in einem temperierbaren Rührkesselreaktor aus Glas ( $V_{RK} = 1,5\text{ l}$ ) statt. Zu Reaktionsbeginn werden die gesamte Rapsölmenge sowie 60% der Phosphatpuffermenge im Reaktor vorgelegt. Mit einem Viskopropührer (vierflügelig) wird eine Emulsion bei  $250\text{ min}^{-1}$  hergestellt. Die Schlauchpumpe P1 fördert die entstehende w/o-Emulsion kontinuierlich im Kreislauf durch die ATR-Messzelle des FTIR-Spektrometers. Sie ermöglicht eine schonende Förderung der Emulsion. Die Probenahme erfolgt dabei aus der Reaktormitte. Es wird angenommen, dass nach fünf Minuten die Emulsionsbildung abgeschlossen ist und die Emulsion ein stationäres Verhalten aufweist. Nun werden die beiden Lichtwellenleiter des PDW-Spektrometers positioniert. Der Abstand beider Lichtwellenleiter zur Reaktorwand und der Rührerwelle darf dabei

### 3 Experimentelle Untersuchung

vorgegebene Werte nicht unterschreiten. Die Lichtwellenleiter bleiben während des gesamten Versuches in der Emulsion. Die Temperierung von Reaktor und ATR-Messzelle übernehmen zwei unabhängige Thermostate (Haake, Karlsruhe, D). Die Temperatur im Reaktor wurde mit einem Widerstandsthermometer erfasst.

Für alle Experimente wurden die in Tab. 3.3 aufgeführten Reaktandenvolumina und Reaktionsparameter verwendet. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe der Lipaselösung, die durch Lösen einer entsprechenden Menge an Lipasepulver im restlichen Phosphatpuffervolumen (40%) hergestellt wurde. PDW- und FTIR-Spektroskopie wurden zeitgleich gestartet. Die Messdatenerfassung erfolgte für beide Analysemethoden in äquivalenten Intervallen.

**Tabelle 3.3:** Reaktionsparameter für die kinetischen Untersuchungen

Lipasepräparat	Sigma Lipase VII aus <i>Candida rugosa</i>
Lipasekonzentration $c_{e0}$	2 – 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Rapsölvolumen $V_{\text{Öl}}$	675 ml
Volumen 0,1 M Phosphatpuffer $V_p$	225 ml
Temperatur $T$	35 °C
pH-Wert (0,1 M Phosphatpuffer)	6,5
Rührergeschwindigkeit $n_R$	250 $\text{min}^{-1}$
Rührerart	Viskopropührer (vierflügelig)
Volumenstrom $\dot{V}$ (FTIR/ATR)	12 ml/min

# Kapitel 4

---

## Ergebnisse und Diskussion

---

### 4.1 Charakterisierung der Lipase

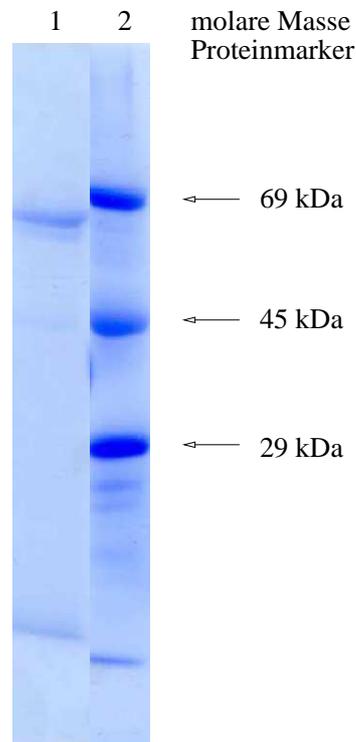
#### 4.1.1 Molare Masse und Konzentration

Um das kommerziell erworbene Lipasepulver hinsichtlich der tatsächlich im Pulver enthaltenen Menge an Biokatalysator sowie dessen molare Masse zu charakterisieren, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Abb. 4.1 zeigt das Ergebnis. In der linken Spur (Lipasepulver) ist eine einzige Bande sichtbar, die darauf hindeutet, dass lediglich eine homogene Proteinfraction, die Lipase, im Pulver enthalten ist. Durch einen Vergleich der Lipase-Bande mit denen des Proteinmarkers (rechts) kann die molare Masse zu  $60 \pm 5$  kDa abgeschätzt werden. Der Wert stimmt mit der in der Literatur angegebenen molaren Masse überein [36].

Die Konzentration der im Pulver enthaltenen Lipase kann durch einen Intensitätsvergleich der charakteristischen Lipase-Bande mit der Bande des Markerproteins (20  $\mu$ g und 69 kDa) abgeschätzt werden. In 2 mg Lipasepulver befinden sich demnach ca. 8  $\mu$ g Protein. Somit enthält die verwendete Lipasepräparation  $4 \mu\text{g}_{\text{Lipase}}/\text{mg}_{\text{Pulver}}$ . Neben den 0,4% Lipaseanteil besteht das Lipasepulver aus dem Füllstoff Laktose. Dieser soll eine

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Agglomeration der Lipasemoleküle beim Lösen des Lipasepulvers im Puffer verhindern (Herstellerangabe).



**Abbildung 4.1:** Ergebnis der SDS-Gelelektrophorese: 2 mg Lipasepulver *Candida rugosa* (Spur 1); Proteinmarker mit 20  $\mu\text{g}$  Protein pro Bande (Spur 2)

### 4.1.2 Temperatur und $p\text{H}$ -Wert

Temperatur und  $p\text{H}$ -Wert besitzen einen entscheidenden Einfluss auf das Enzymverhalten und die Reaktionskinetik einer biokatalytischen Reaktion [31]. Als Voraussetzung für hohe Umsatzgeschwindigkeiten muss zunächst jeweils der Temperatur- und  $p\text{H}$ -Wertbereich gefunden werden, für den die Lipase aus *Candida rugosa* eine maximale Aktivität aufweist. Da die Untersuchungen im Hinblick auf eine technische Verwendung betrachtet wurden, sollte die Leistungsfähigkeit des Enzyms in Abhängigkeit von der Reaktions- bzw. Belastungszeit unter den gegebenen Reaktionseinflüssen ermittelt werden. Hierfür wurde die Lipolysereaktion in einem definierten Reaktionssystem (Referenzsystem (I)) bei konstanten Reaktionsbedingungen unter Variation der Temperatur (20 – 50 °C) und des  $p\text{H}$ -Wertes (5,5 – 7) durchgeführt (Abschn. 3.1.2.3, S. 27). Als Kriterium für die Bewertung der Lipaseaktivität wurde die Produktionsrate an Fettsäure  $P_{FFS}(t)$  zu bestimmten Versuchszeiten  $t$  verwendet.

$$P_{FFS}(t) = \frac{\Delta n_{FFS}(t)}{t} \quad (4.1)$$

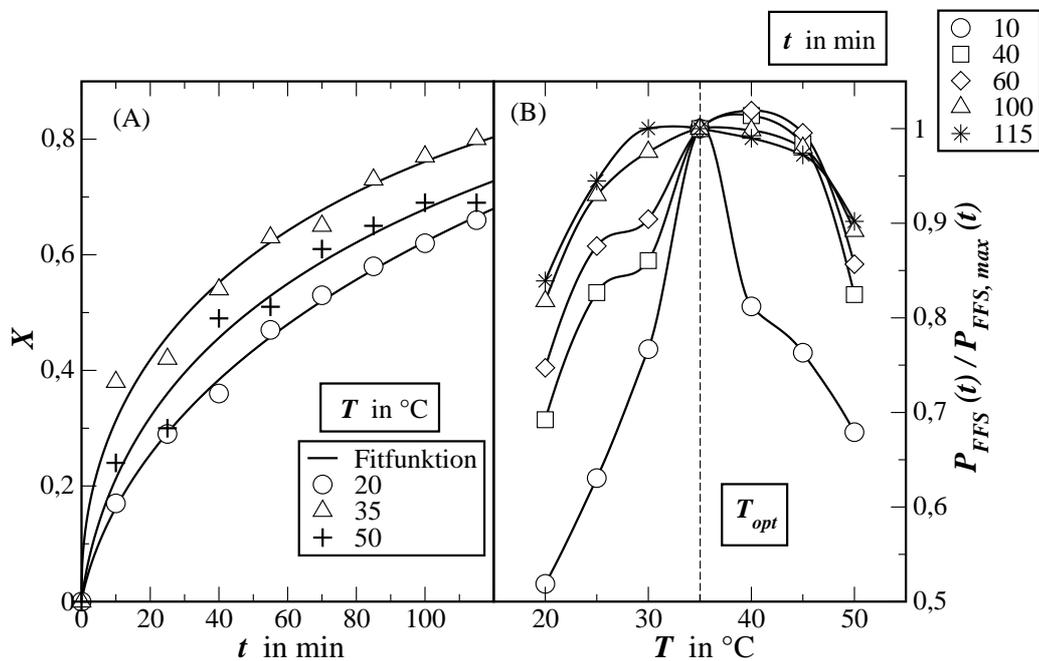
#### 4.1 Charakterisierung der Lipase

Zur Darstellung des temperaturabhängigen Verhaltens der Enzymaktivität bietet es sich an, die Produktionsrate  $P_{FFS}(t)$  auf die maximale Produktionsrate  $P_{FFS,max}(t)$  zu normieren.

$$\text{relative Produktionsrate} = \frac{P_{FFS}(t)}{P_{FFS,max}(t)} = \frac{\Delta n_{FFS}}{\Delta n_{FFS,max}} \quad (4.2)$$

Dabei entspricht  $P_{FFS,max}(t)$  der maximal aufgetretenen Produktionsrate innerhalb des untersuchten Temperatur- bzw. pH-Wertbereiches zur Versuchszeit  $t$ .

In Abb. 4.2 (A) und (B) ist der Temperatureinfluss auf die relativen Produktionsraten anhand einzelner Beispiele dargestellt. Sowohl zum Zeitpunkt  $t = 10$  min als auch nach  $t = 115$  min steigt die relative Produktionsrate mit zunehmender Temperatur an. Das Umsatzmaximum liegt über den gesamten Zeitraum bei  $35^\circ\text{C}$  vor. Bei weiterer Temperaturzunahme sinkt die relative Produktionsrate wieder ab. Abbildung (B) zeigt, dass insbesondere die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperatur von  $35^\circ\text{C}$  am höchsten ist, wohingegen sich die Produktionsraten im Verlauf der Reaktion annähern. Das Ergebnis, dass bei  $35^\circ\text{C}$  für gegebene Reaktionszeiten die höchsten Umsätze erzielt werden, ist demnach auf die Startphase der Reaktion zurückzuführen.



**Abbildung 4.2:** (A) Temperatureinfluss auf das Umsatz-Zeit-Verhalten sowie (B) die relativen Fettsäure-Produktionsraten zu verschiedenen Zeitpunkten (bei pH 6,5)

Die mit der Temperatur steigenden relativen Produktionsraten könnten zum einen auf einen verbesserten Stofftransport der Reaktanden sowie eine höhere Adsorptions-

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

wahrscheinlichkeit der Lipase zurückgeführt werden. Ferner nimmt mit zunehmender Temperatur die volumenspezifische Oberfläche  $S_V$  zu. Grund hierfür ist die Verringerung der Tropfengröße durch eine Viskositätsabnahme der Ölphase und die Absenkung der Grenzflächenspannung zwischen Öl- und Wasserphase [19]. Allerdings führen zu hohe Temperaturen zu einer irreversiblen Denaturierung der Enzyme, die durch die thermische Instabilität ihrer Proteinstruktur zu erklären ist [1, 53, 99]. Der damit verbundene Verlust der Enzymaktivität kann bereits zu Beginn der Reaktion zu geringeren Produktionsraten führen.

Die Stabilität der Enzymlösung ist im untersuchten Parameterbereich unabhängig von der Temperatur. In allen Fällen nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zeit bzw. dem Umsatz ab und erreicht für alle Temperaturen einen ähnlichen Wert. Weder eine besonders hohe noch eine besonders niedrige Temperatur führt zu einer stärkeren Absenkung der Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf ein definiertes Versuchsende (Umsatz oder Zeit). Vielmehr ist die größte Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei 35 °C, d. h. bei der höchsten Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, zu verzeichnen. Dies legt den Schluss nahe, dass die Stabilität der Lösung von der Anzahl der Spaltprozesse pro Enzym abhängig ist.

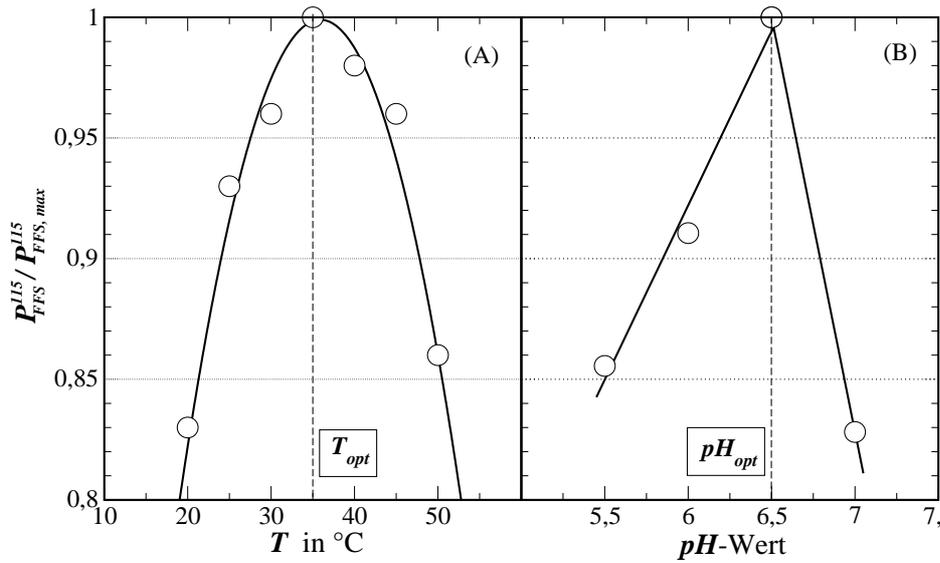
Für die folgenden Untersuchungen wurde als Standardtemperatur 35 °C gewählt, da in diesem Fall aufgrund der hohen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit die höchsten Umsätze in der kürzesten Zeit realisiert werden können.

Das Aktivitätsverhalten der Lipase ist ebenfalls vom  $pH$ -Wert<sup>1</sup> abhängig. Das  $pH$ -Optimum wurde für die verwendete Lipase im Temperaturoptimum (nach einer Reaktionszeit von 115 min) zu  $pH$  6,5 bestimmt (Abb. 4.3 (B)). Eine Verringerung dieses Wertes um eins bewirkt eine Reduktion der Aktivität um etwa 25%. Eine Erhöhung des  $pH$ -Wertes auf sieben bewirkt eine Aktivitätsabnahme um etwa 27%.

Der  $pH$ -Wert der wässrigen Lösung bestimmt die Nettoladung des Enzyms. Diese bestimmt wiederum dessen morphologische Gestalt in der Art, dass der Ladungszustand ionisierbarer Aminosäureketten die Anbindung des Substratmoleküls an das dreidimensionale aktive Zentrum des Enzyms beeinflusst. Eine andere Erklärung der  $pH$ -Wert-Abhängigkeit der Aktivität könnte sein, dass das Substrat zwar gebunden wird, jedoch die chemische Umwandlung entweder behindert oder im Extremfall ganz unterbunden wird, da die ionischen Gruppen Teil des katalytischen Reaktionsmecha-

---

<sup>1</sup>Die Untersuchung des  $pH$ -Wertes erfolgte im Rahmen einer vorangegangenen Forschungsarbeit [76]. Reaktionssystem und -bedingungen (Lipaseorganismus und -menge, Pufferart, Substratverhältnis, Rührerart und -geschwindigkeit) sind mit dem in dieser Arbeit verwendeten Referenzsystem (I) identisch (Abschn. 3.1.2.3, S. 27).



**Abbildung 4.3:** (A) Einfluss von Temperatur (bei pH 6,5) und (B) pH-Wert (bei  $T = 35$  °C; experimentelle Werte gemäß [76]) auf die relative Produktionsrate ( $t = 115$  min) an Fettsäure bei Reaktionsfortschritten von über 60%

nismuses sind [55]. In der Regel ist ein mehr oder minder breites und für jedes Enzym spezifisches pH-Aktivitätsoptimum zu finden. Dieses ist nach Dawson [21] neben der strukturbildenden Funktion der Nettoladungen auf der Enzymoberfläche auch für die Ausrichtung einer Lipase an der Substratoberfläche verantwortlich.

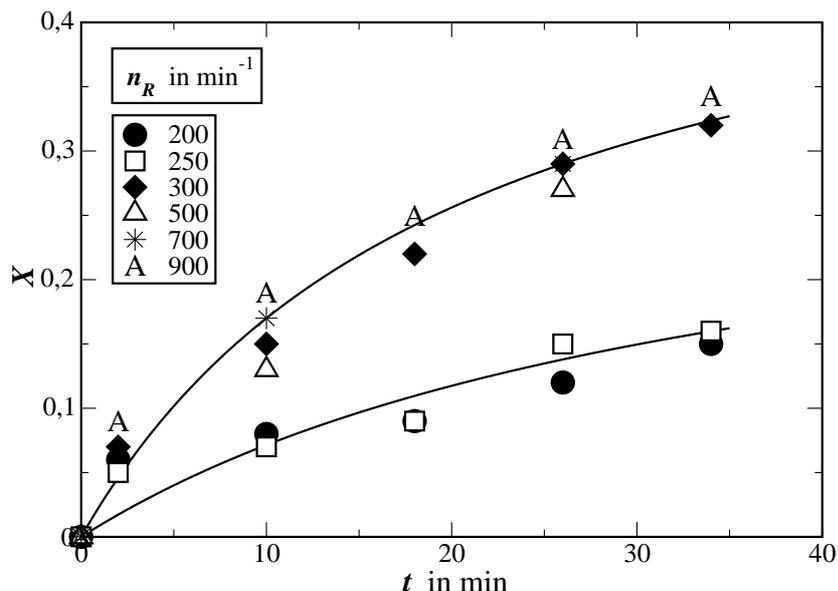
Der gemessene pH-Wert entspricht dem in der Bulkphase vorherrschenden Wert. Allerdings unterscheidet sich dieser Wert bei Grenzflächenreaktionen in der Regel von dem unmittelbar an der Phasengrenzfläche vorhandenem Wert [16].

In Abb. 4.3 (A) und (B) sind die optimalen Bedingungen der Lipase aus *Candida rugosa* in der w/o-Emulsion für Temperatur und pH-Wert zusammengefasst. In einem Übersichtsartikel von Malcata *et al.* [56] wurden die pH-Werte und Temperaturen verschiedener Forschungsarbeiten für die gelöste, nicht an Trägerstoffen adsorbierte Lipase aus *Candida rugosa* zu 6 – 8 bzw. 30 – 40 °C angegeben. Die Werte stimmen gut mit den Ergebnissen für das hier betrachtete System überein.

### 4.1.3 Rührergeschwindigkeit

Der Einfluss der Rührergeschwindigkeit auf das Umsatz-Zeit-Verhalten wurde im Referenzsystem (I) (Abschn. 3.1.2.3, S. 27) untersucht.<sup>2</sup> Es konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender Rührergeschwindigkeit die Umsatzraten ansteigen (Abb. 4.4). Die

<sup>2</sup>Zum Untersuchungszeitpunkt stand jedoch keine kontinuierliche Methode zur Bestimmung von Tropfengrößen in w/o-Emulsionen mit Tropfenkonzentrationen größer 15% zur Verfügung.



**Abbildung 4.4:** Zeitabhängiges Umsatzverhalten in Abhängigkeit von der Rührergeschwindigkeit (Volumenverhältnis  $\gamma_{w/o} = 1$ ,  $c_{e0} = 24 \mu\text{g/ml}$ )

Tropfengröße der Emulsion wird neben den chemisch-physikalischen Eigenschaften der Reaktanden und Produkte hauptsächlich durch die Rührergeschwindigkeit bestimmt (vgl. Abschn. 2.2, S. 18). Al-Zuhair *et al.* [1] ermittelten bei der Lipase-katalysierten Hydrolyse in einer o/w-Emulsion (ohne Lösungsmittel) eine stetige Zunahme der spezifischen Phasengrenzfläche mit steigender Rührergeschwindigkeit. Der Effekt ist dabei auf eine maximale Rührergeschwindigkeit begrenzt, ab der ein weiterer Energieeintrag nicht mehr zu einer weiteren Erhöhung der Phasengrenzfläche führt. Die Tropfen ließen sich offenbar unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht weiter zerkleinern. Wie bereits diskutiert, bestimmt die Größe der Phasengrenzfläche die Anzahl adsorbierter Lipasemoleküle. Vergrößert sich die Phasengrenzfläche, können bei ausreichender Anzahl an Enzymmolekülen im Tropfenbulk mehr Moleküle durch Kontakt mit der o/w-Grenzfläche aktiviert und so mehr Ölmoleküle umgesetzt werden. Die Umsetzungsgeschwindigkeit erhöht sich erwartungsgemäß mit zunehmender Größe der Grenzfläche [1, 2, 89]. Der von Al-Zuhair *et al.* [1] beschriebene Einfluss der Rührergeschwindigkeit bestätigt sich auch für das in dieser Arbeit verwendete Reaktionssystem. Es kann allerdings keine lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Rührergeschwindigkeit festgestellt werden. Vielmehr sind zwei unterschiedliche Zustände zu beobachten. So wurden bei  $300\text{--}900 \text{ min}^{-1}$  wesentlich höhere Umsätze als bei  $200\text{--}250 \text{ min}^{-1}$  erfasst. Zwischen  $250\text{--}300 \text{ min}^{-1}$  kommt es demnach zu einer sprunghaften Zunahme der Grenzfläche, die auf einen Wechsel im hydrodynamischen Regime hindeutet. Der für dieses Referenzsystem ermittelte Umschlagspunkt kann je-

doch nicht ohne Weiteres auf andere Versuchsaufbauten übertragen werden, da die Hydrodynamik des Systems stark von weiteren Parametern, wie z. B. Gefäßabmessungen und Rührwerksgestalt, abhängig ist.

#### 4.1.4 Substratverhältnis

Zu Beginn der Reaktion wird die Phasengrenzfläche durch Ölmoleküle und Moleküle aus der wässrigen Phase gebildet. Eine Beeinflussung durch Partialglyceride oder Fettsäuren entfällt. Für die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit  $\tilde{r}_0$  kommt es daher auf die zur Verfügung stehende Grenzfläche und deren Belegung mit Lipase an.

Der Einfluss von drei unterschiedlichen Substratverhältnissen auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wurde im Referenzsystem (II) (Abschn. 3.1.2.3, S. 27) unter Variation der Lipasekonzentration untersucht. Das Reaktionsvolumen und die Rührergeschwindigkeit blieben für die Untersuchungen konstant. In allen Fällen handelte es sich um eine w/o-Emulsion, die während der Reaktion als solche bestehen blieb. Die Bewertung erfolgte anhand der volumenbezogenen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit  $\tilde{r}_0$ . Der Reaktionsfortschritt wurde durch die IR-Spektroskopie alle 50 Sekunden erfasst und der Umsatz nach Gl. 3.24 ermittelt. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit  $\tilde{r}_0$  berechnet sich aus Umsatz  $X$ , Zeit  $t$  und volumenspezifischer Rapsölkonzentration  $c_{\text{Öl},0}$ .

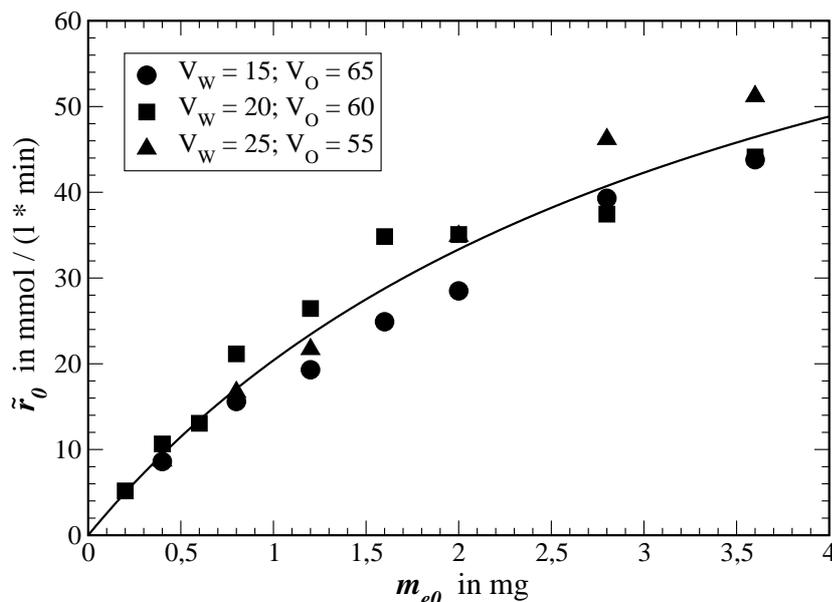
$$\tilde{r}_0 = \frac{X(t_1) - X(t_0)}{t_1 - t_0} c_{\text{Öl},0} \quad (4.3)$$

Direkt nach dem Start der Reaktion nimmt die Produktionsgeschwindigkeit an Fettsäuren zunächst zu, erreicht einen Maximalwert und nimmt im weiteren Verlauf der Reaktion wieder stetig ab. Die Phase vom Versuchsbeginn bis zum Erreichen der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit, die lediglich wenige Minuten beträgt, wird als Induktionsphase bezeichnet. Innerhalb dieser Phase werden die Enzyme an der Grenzfläche adsorbiert und besitzen ihre maximale Aktivität. Eine detailliertere zeitliche Auflösung der Vorgänge innerhalb dieser Phase war mit den gegebenen Mitteln nicht möglich. Als Anfangsreaktionsgeschwindigkeit  $\tilde{r}_0$  wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit am Ende der Induktionsphase definiert.

Alle drei verwendeten Substratverhältnisse zeigen ein nahezu identisches Verhalten (Abb. 4.5). Bei höheren Lipasemengen nimmt die Streuung etwas zu, wobei allerdings keine systematische Abhängigkeit der Messergebnisse vom Versuchsparameter zu erkennen ist. Es wird daher angenommen, dass die  $\tilde{r}_0$ -Werte aller drei Substratverhältnisse für die jeweilige Lipasemenge um denselben Mittelwert streuen. Es bestand zunächst die

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Vermutung, dass sich die Phasengrenzfläche durch Zunahme des w/o-Volumenverhältnisses  $\gamma_{w/o}$  vergrößert. Dies ist hier aber offensichtlich nicht der Fall. Durch die eingestellten Reaktionsparameter scheinen die vorherrschenden physikalischen Eigenschaften des Reaktionssystems eine weitere Vergrößerung der Phasengrenzfläche zu unterdrücken. Das Reaktionssystem ist demnach stabil gegenüber Schwankungen in den Volumenverhältnissen der beiden Phasen.



**Abbildung 4.5:** Volumenbezogene Anfangsreaktionsgeschwindigkeit  $\tilde{r}_0$  in Abhängigkeit von der Enzymmasse  $m_{e0}$  für verschiedene Volumenverhältnisse von wässriger und öliker Phase  $\gamma_{w/o}$ : Kreis  $\hat{=}$  0,23; Quadrat  $\hat{=}$  0,33; Dreieck  $\hat{=}$  0,45 (Kreis und Dreieck: experimentelle Daten gemäß [49]; Anpassungskurve: Gl. 4.4)

Zwischen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit  $\tilde{r}_0$  und verwendeter Enzymmasse  $m_{e0}$  besteht bis  $m_{e0} = 0,5$  mg eine lineare Abhängigkeit. Mit steigender Lipasemenge weichen die  $\tilde{r}_0$ -Werte von dieser linearen Beziehung nach unten ab. Der funktionale Zusammenhang zwischen  $\tilde{r}_0$  und  $m_{e0}$  kann durch folgende Sättigungsfunktion hinreichend beschrieben werden ( $R^2 = 0,973$ ),

$$\tilde{r}_0 = \frac{k_1 k_2 m_{e0}}{1 + k_2 m_{e0}} \quad (4.4)$$

mit den Parametern  $k_1 = 91,174 \text{ mmol (l min)}^{-1}$  und  $k_2 = 0,288 \text{ (g}_{\text{Lipase}})^{-1}$ . Für hohe Lipasemassen strebt der Kurvenverlauf gegen den Grenzwert  $91,2 \text{ mmol (l min)}^{-1}$ .

Es wird vermutet, dass die Grenzfläche mit steigender Biokatalysatormenge in der Pufferphase zunehmend mit Lipase bedeckt ist. Da mit steigendem Belegungsgrad der angebotene Platz auf der Grenzfläche abnimmt, wird es für Lipasemoleküle aus dem Tropfenbulk immer schwieriger an der Grenzfläche zu adsorbieren. Infolge der zuneh-

menden Konkurrenz wird die Adsorption erschwert. Die Grenzfläche gilt als mit Lipase gesättigt, wenn der Grenzwert erreicht ist und sich die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit trotz steigender Lipasemenge nicht weiter erhöht. Für diesen Fall entspricht  $k_1$  der Konstante der Umsetzungsgeschwindigkeit des Rapsöls an einem aktiven Zentrum, vorausgesetzt alle aktiven Zentren weisen die gleiche Aktivität auf.  $k_2$  entspricht der Konstante der globalen Adsorptions-/Desorptionskinetik an der Phasengrenzfläche und stellt somit ein Maß für die Sättigung bzw. für die mögliche Behinderung der Lipasemoleküle an der Grenzfläche dar.

### 4.1.5 Lipaseaktivität

#### 4.1.5.1 Lipaseaktivität in gerührter Lösung

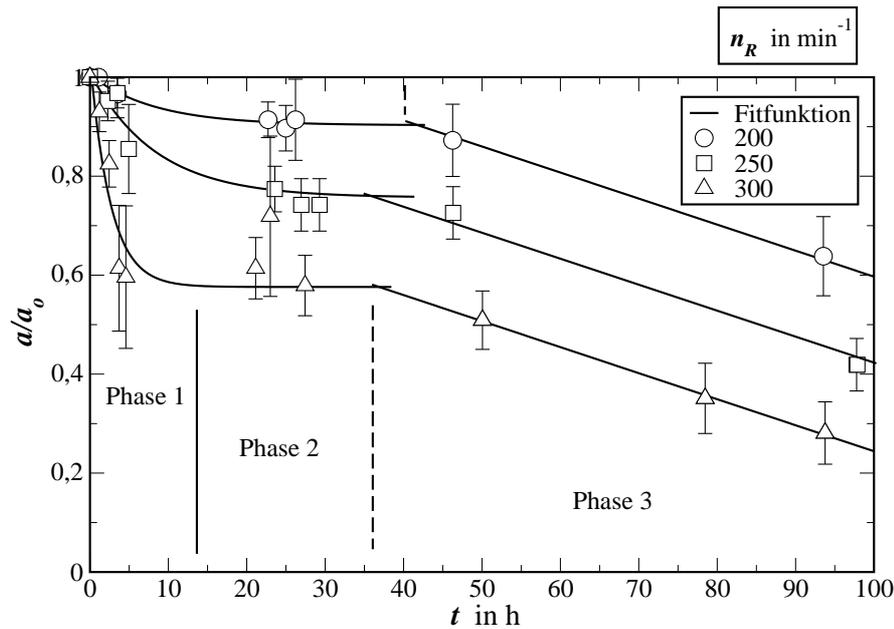
Zur Erzeugung einer Emulsion wurden Rapsöl und Phosphatpuffer unter Verwendung eines bestimmten Rührertyps zur Herstellung einer möglichst großen Phasengrenzfläche miteinander vermischt. Dabei wird vermutet, dass die beim Rührprozess auftretenden Scherkräfte die Lipaseaktivität beeinflussen. Um die Wirkung von Scherkräften auf die Enzymaktivität zu untersuchen, wurden mehrere Lipaselösungen zu 900 ml mit einem vierflügeligen Viskoproprüher unter Variation der Rührergeschwindigkeit hergestellt (Abschn. 3.1.2.2, S. 26). Die Lipasekonzentration blieb für alle Lösungen konstant ( $c_{e0} = 2 \mu\text{g/ml}$ ). Während des Experimentes wurden dem temperierten Reaktor ( $T = 35^\circ\text{C}$ ) zu definierten Zeiten Proben entnommen und die Aktivität des darin befindlichen Enzyms ermittelt. Zur Bewertung des zeitabhängigen Aktivitätsverhaltens wurde die relative Aktivität  $a/a_0$  verwendet, wobei  $a_0$  dem spezifischen Aktivitätswert der gelösten Lipase zu Beginn des Experimentes entspricht.

Wie in Abb. 4.6 zu sehen ist, sinkt die relative Aktivität in Abhängigkeit der Zeit und der Scherrate<sup>3</sup>. Dabei sind drei Phasen erkennbar. In Phase 1 nimmt die relative Aktivität bis zum Erreichen eines konstanten Wertes nichtlinear ab. In Phase 2 bleibt  $a/a_0$  konstant, um anschließend in Phase 3 weiter linear abzusinken. Vermutlich wird die Lipase durch die Wirkung von Scherkräften denaturiert, d. h. die Tertiärstruktur wird zerstört und führt zur Aufhebung der Aktivität des Enzyms.

Eine zeitabhängige Beeinträchtigung der Proteinstruktur kann neben der Wirkung von Scherkräften auch durch Faktoren wie Temperatur und Lipase-Agglomeration er-

---

<sup>3</sup>Die Scherrate (in unmittelbarer Nähe des Rührers) ist linear von der Rührergeschwindigkeit abhängig [20].



**Abbildung 4.6:** Relative Aktivität gelöster Lipase bei verschiedenen Rührergeschwindigkeiten

folgen. Dabei ist im Fall der Agglomeration die Kollisionswahrscheinlichkeit der Lipasemoleküle sicherlich eine Funktion der Rührergeschwindigkeit.

Lee und Choo [52] beobachteten ebenfalls eine Abhängigkeit der Denaturierungsgeschwindigkeit der Lipase aus *Candida rugosa* von der Scherrate (Phase 1) sowie eine zeitlich konstante Aktivität bei fortgeschrittener Belastungsdauer (Phase 2). Lee und Choo erklärten den Abfall der Lipaseaktivität u. a. durch den Lipasekontakt mit der hydrophoben Grenzfläche von „eingezogenen“ Luftblasen. Wurde der Kontakt zwischen Lipaselösung und Luftschicht durch das Auffüllen bis zum Füllstandslimit verhindert, so sank die Aktivität nur um 3% ab.

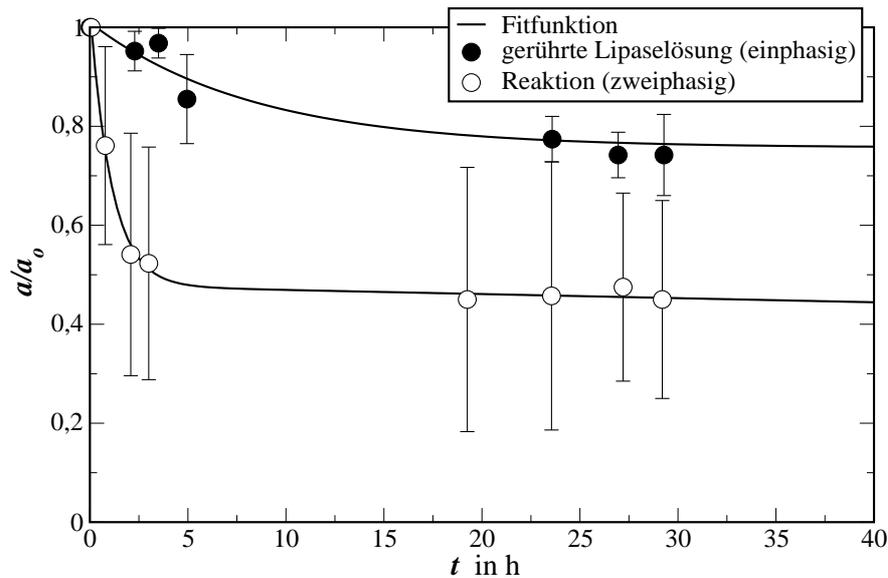
Der lineare Abfall nach über 40 h Beobachtungszeit (Phase 3) könnte durch einen Lipaseabbau aufgrund von Mikroorganismen erklärt werden, welche mikroskopisch beobachtet wurden [38].

#### 4.1.5.2 Lipaseaktivität während der Lipolyse (Emulsion)

Zur Bestimmung der Lipaseaktivität in einer w/o-Emulsion ( $V = 900$  ml,  $\gamma_{w/o} = 0,33$ ) wurden zu bestimmten Versuchszeitpunkten Emulsionsproben aus dem Reaktor entnommen, die Phasen getrennt und die spezifische Aktivität der Lipaselösung bestimmt (Abschn. 3.1.2.2, S. 26).

Der Verlauf der relativen Enzymaktivität<sup>4</sup> in einer gerührten Lipaselösung und in einem gerührten Zweiphasensystem ist in Abb. 4.7 für  $c_{e0} = 2 \mu\text{g}/\text{ml}$  dargestellt. Dabei sind Rührertyp (Viskopropührer) und -geschwindigkeit ( $n_R = 250 \text{ min}^{-1}$ ) identisch.

Die Kurvenform der Aktivitätsverläufe ist für beide Systeme ähnlich. Die Lipaseaktivität im Emulsionssystem fällt um nahezu 50% und in der Lipaselösung um ca. 20% ab. Werden in der Lipaselösung mehr als 20 Stunden benötigt, stellt sich in der Emulsion dagegen der Gleichgewichtszustand bereits nach vier Stunden ein.



**Abbildung 4.7:** Zeitlicher Verlauf der relativen Aktivität für die gelöste Lipase (einphasig, keine Reaktion) und für Lipase, die aus dem Zweiphasensystem zurückgewonnen wurde ( $c_{e0}$  jeweils  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ )

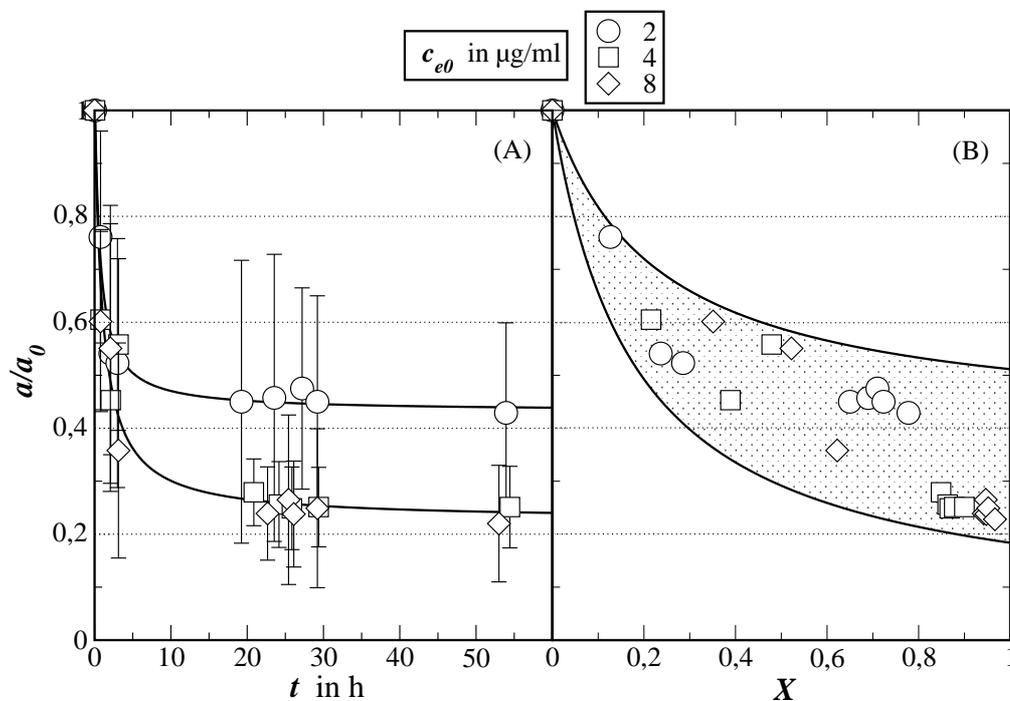
Die möglichen Ursachen für die höhere Denaturierungsgeschwindigkeit im Zweiphasensystem könnte zum einen die Lipasedenaturierung durch die Reaktionsprodukte sein, Goto *et al.* [35] ermittelten eine inhibierende Wirkung durch das Reaktionsprodukt Fettsäure. Zum anderen könnte der Lipasekontakt mit der hydrophoben Phasengrenzfläche zu veränderten Katalyseeigenschaften führen. Der Kontakt von Proteinen mit Öl/Wasser-Grenzflächen bewirkt eine Änderung ihrer Proteinstruktur, dies wird unter anderem auf die Wirkung der Grenzflächenspannung zurückgeführt [57]. Brockerhoff [14] ermittelte eine erhebliche Deaktivierung einer Pankreaslipase durch ihre Anlagerung an einer stark hydrophoben Grenzfläche. Stahmann *et al.* [86] beobachteten zudem

<sup>4</sup>Mit der spezifischen Anfangsaktivität  $a_0$  zu Reaktionsbeginn wird bei diesen Experimenten die spezifische Aktivität jener Lipase verstanden, die bereits Kontakt mit der Phasengrenzfläche hatte. Nach Zugabe der Lipaselösung zum Öl wird, nach Beendigung der Induktionsphase, eine Emulsionsprobe genommen und die spezifische Aktivität  $a_0$  gemessen.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

eine maßgebliche Deaktivierung der Lipase aus *Ashbya gossypii* nach dem Kontakt mit hydrophoben Grenzflächen wie Öl- bzw. Fettsäuretropfen und Gasblasen.

Emulsion und Lipaselösung unterscheiden sich in ihrer Viskosität. Lee und Choo [52] fanden heraus, dass trotz Änderung der Viskosität der Lipaselösung (Lipase aus *Candida rugosa*) die Denaturierungsrate konstant blieb. Würde dies in dem hier betrachteten Fall (Vergleich von Lipaselösung und Emulsion) ebenfalls zutreffen, und somit die Wirkung der Scherkräfte in der Emulsion, trotz veränderter Viskosität, den gleichen Effekt auf die Denaturierungsrate wie in der Lipaselösung hat, so wäre den Effekten der Fettsäureinhibierung und der möglichen Deaktivierung durch hydrophobe Grenzflächen eine wesentlich größere Bedeutung zuzuweisen als der Wirkung von Scherkräften.



**Abbildung 4.8:** Lipaseaktivität während der Lipolysereaktion im Emulsionsreaktor für verschiedene Enzymkonzentrationen in Abhängigkeit von der (A) Zeit und vom (B) Umsatz

In Abb. 4.8 (A) ist der zeitliche Verlauf der relativen Aktivität für drei Lipasekonzentrationen dargestellt. Der Kurvenverlauf ist mit den zuvor diskutierten Fällen vergleichbar. Die Denaturierungsraten sind für alle drei Konzentrationen ähnlich, wobei sie für  $c_{e0} = 4$  und  $8 \mu\text{g/ml}$  praktisch identisch sind. Für  $c_{e0} = 2 \mu\text{g/ml}$  sinkt die relative Aktivität auf 43% ab. Für die beiden höheren Enzymkonzentrationen sinkt die relative Aktivität im Untersuchungszeitraum um den gleichen Wert auf ca. 20% ab. Der zunehmende Abfall der Aktivität mit steigender Lipasemenge könnte durch

eine erhöhte Lipasekonzentration an der Grenzfläche und der daraus resultierenden gegenseitigen Beeinflussung der Lipasemoleküle untereinander erklärt werden. Zudem könnte es auch schon im Tropfenbulk vor Adsorption an der Grenzfläche zur Bildung von Proteinaggregaten kommen. Die Halbwertszeiten<sup>5</sup>  $t_{1/2}$  der untersuchten Lipasekonzentrationen sind in Tab. 4.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1:** Halbwertszeiten der Lipaseaktivität

$c_{e0}$	$t_{1/2}$
$\mu\text{g/ml}$	h
2	5,4
4	2,0
8	2,0

Der auffällig hohe Analysenfehler ist vermutlich dem zusätzlich benötigten Zentrifugenschritt zur Trennung von Phosphatpuffer- und Ölphase vor dem Aktivitätstest geschuldet. Eventuell bleibt die Lipase während des Trennschrittes an der o/w-Grenzfläche haften. Ist die Menge der an der Grenzfläche verweilenden Lipasemoleküle von Analyse zu Analyse unterschiedlich, so finden sich auch verschiedene Lipasekonzentrationen in der abgetrennten Lipaselösung wieder.

In Abb. 4.8 (B) ist das Verhalten der relativen Aktivität in Abhängigkeit des Umsatzes abgebildet. Wegen des hohen Analysenfehlers ist die Tendenz der Werte der jeweiligen Lipasekonzentration nicht signifikant, weshalb lediglich ein Bereich markiert wurde. Mit steigendem Umsatz nimmt die relative Aktivität aller Lipasekonzentrationen nichtlinear ab. Tendenziell ist das Absinken von  $a/a_0$  für  $c_{e0} = 2 \mu\text{g/ml}$  geringer als bei höheren Konzentrationen.

Die Lipase-deaktivierenden Effekte lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

$$a(t, c_{e0}, X) = \begin{cases} f(t) \rightarrow \text{Scherkräfte, Lipaseadsorption an der o/w-Grenzfläche} \\ f(t, c_{e0}) \rightarrow \text{Aggregatbildung der Lipase} \\ f(X) \rightarrow \text{Lipaseinhibierung} \end{cases}$$

Die zeitliche Reduzierung der Lipaseaktivität wird demnach durch die Einflussgrößen Lipasekonzentration und Umsatz bestimmt:

$$-\frac{da}{dt} = f(c_{e0}, X) \quad (4.5)$$

<sup>5</sup>Die Zeit, bei der die Lipaseaktivität unter den gegebenen Einsatzbedingungen um die Hälfte absinkt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Von einer separaten Untersuchung des Effektes der Fettsäureinhibierung, z. B. durch Messung und Analyse von Fettsäure- und Rapsölgemischen, wurde abgesehen, da die verschiedenen, in dieser Arbeit dargestellten, Deaktivierungseffekte nicht voneinander zu trennen sind und die Ergebnisse daher fraglich wären.

### 4.1.5.3 Gelöste und an o/w-Grenzfläche adsorbierte Lipase

In Tab. 4.2 sind die spezifischen Anfangsaktivitäten  $a_0$  der Lipase dargestellt, die jeweils im Phosphatpuffer gelöst bzw. an der Ölgrenzfläche adsorbiert (Emulsion) vorliegt. Auffällig sind dabei die höheren Fehler bei der Bewertung der spezifischen Aktivität

**Tabelle 4.2:** Vergleich der spezifischen Aktivität von in Phosphatpuffer gelöster und an der o/w-Grenzfläche adsorbierter Lipase aus *Candida rugosa*

$c_{e0}$ $\mu\text{g/ml}$	Lipase (Lösung)	Lipase (Emulsion)	
	spez. Aktivität $a_0$ $\text{U/mg}_{\text{Lipase}}$	spez. Aktivität $a_0$ $\text{U/mg}_{\text{Lipase}}$	Aktivitätsverlust %
2	$2511^a \pm 0,4\%$	$370^a \pm 22\%$	85
4	$2148^a \pm 6\%$	$637^a \pm 31\%$	70
8	$2029^b \pm 6\%$	$418^b \pm 35\%$	79

<sup>a</sup> Mittelwert aus zwei Messungen

<sup>b</sup> Mittelwert aus drei Messungen

von in Emulsion adsorbierter Lipase, die auf den zusätzlichen Analyseschritt „Zentrifugentrennung“, wie im vorangegangenen Abschnitt erläutert, zurückgeführt werden. Die Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten  $a_0$  beider Untersuchungssysteme sind mit über 70% erheblich. Dafür sind folgende Ursachen möglich:

- Beiden Lipasefraktionen ist gemein, dass sie während der Präparationszeit, also der Herstellung der Lipaselösung (für beide Systeme), in der Lösung durch Aggregation an spezifischer Aktivität verlieren.
- Bei der Lipase im Emulsionssystem kommt eine zusätzliche Beanspruchung durch den Zentrifugenschritt hinzu. Experimentell wurde eine Aktivitätsabnahme von 7% durch die Zentrifuge festgestellt (Abschn. 3.1.2.2, S. 26).
- Zudem hatte die Lipase in der Emulsion Kontakt mit der hydrophoben Grenzfläche. Dies scheint ein wesentlicher Grund für die Deaktivierung zu sein, wie bereits erläutert.

## 4.2 Kinetische Untersuchungen

In Folgenden werden die Ergebnisse von kinetischen Untersuchungen der Lipase-katalysierten Hydrolyse in zwei verschiedenen Reaktionssystemen vorgestellt:

1. Phosphatpuffer-Einzeltropfen hängend in öliger Phase
2. w/o-Emulsion mit einem Volumenverhältnis von  $\gamma_{w/o} = 0,33$

### 4.2.1 Einzeltropfen

Die Lipase sowie die Hydrolyseprodukte (Fettsäure und Partialglyceride) sind amphiphile Moleküle, die an der Grenzfläche hydrophiler und lipophiler Phase adsorbieren und dadurch einen elastischen Film an der Grenzfläche aufbauen [80]. Die Veränderung der stofflichen Zusammensetzung an der Grenzfläche bewirkt eine Änderung der Grenzflächenspannung  $\sigma$  zwischen wässriger und öliger Phase. Ziel der Untersuchung ist die Charakterisierung der Vorgänge an der Phasengrenzfläche während der Lipase-katalysierten Hydrolyse von Rapsöl durch eine Messung der Grenzflächenspannung. Bislang wurden die bei der Lipolyse auftretenden Phänomene an der Grenzfläche hauptsächlich anhand eines stehenden Öltropfens in wässriger Phase untersucht [29, 51, 63]. In dieser Arbeit wird der inverse Fall, ein Phosphatpuffertropfen in einer öligen Phase, betrachtet.

Der qualitative und quantitative Einfluss einzelner grenzflächenaktiver Spezies ist im Abschnitt „Einzelkomponenten-Sorption“ (4.2.1.1) erläutert, der kombinierte Einfluss an der Grenzfläche adsorbierender Spezies wird im Abschnitt „Mehrkomponenten-Sorption“ (4.2.1.2) dargelegt.<sup>6</sup> Die Versuchsdurchführung ist in Abschn. 3.2.2 (S. 33) beschrieben. Die unternommenen Experimente wurden bei 35 °C durchgeführt.

#### 4.2.1.1 Einzelkomponenten-Sorption

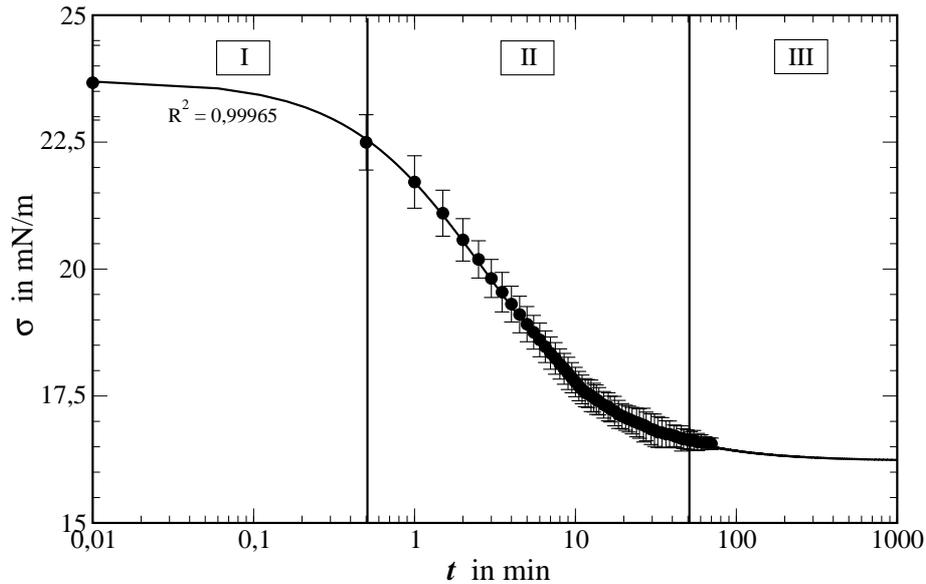
**Dynamische Ausbildung des Tropfenprofils** Nach dem Einhängen des Tropfens in die kontinuierliche Phase ist das Verhalten der Grenzflächenspannung  $\sigma$  in drei Phasen unterteilbar [11]. Abb. 4.9 zeigt dies beispielhaft für einen Wassertropfen in Öl.

1. In Phase I nimmt innerhalb der ersten Minute die Anfangsgrenzflächenspannung  $\sigma_0$  nur in geringem Maße ab. Öl- bzw. Wassermoleküle, die sich in unmittelbarer

---

<sup>6</sup>Die Einzelkomponenten-Sorption erfolgte mit dem Tensiometer DSA 10 (Krüss, Hamburg, D). Die Mehrkomponenten-Sorption wurde mit einem eigens am Lehrstuhl aufgebauten Versuchsstand durchgeführt [25].

#### 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.9:** Zeitlicher Verlauf der Grenzflächenspannung am Beispiel eines  $12 \mu\text{l}$  Tropfens aus entionisiertem Wasser, aufgehangen in 2 ml Rapsöl (Anpassungskurve: Gl. 4.6)

Nähe der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen befinden, ordnen sich spontan in zwei gegenüberliegenden Grenzschichten an.  $\sigma_0$  ist abhängig von der statistischen Verteilung sowie der Konzentration der Substratmoleküle in den beiden Phasen.

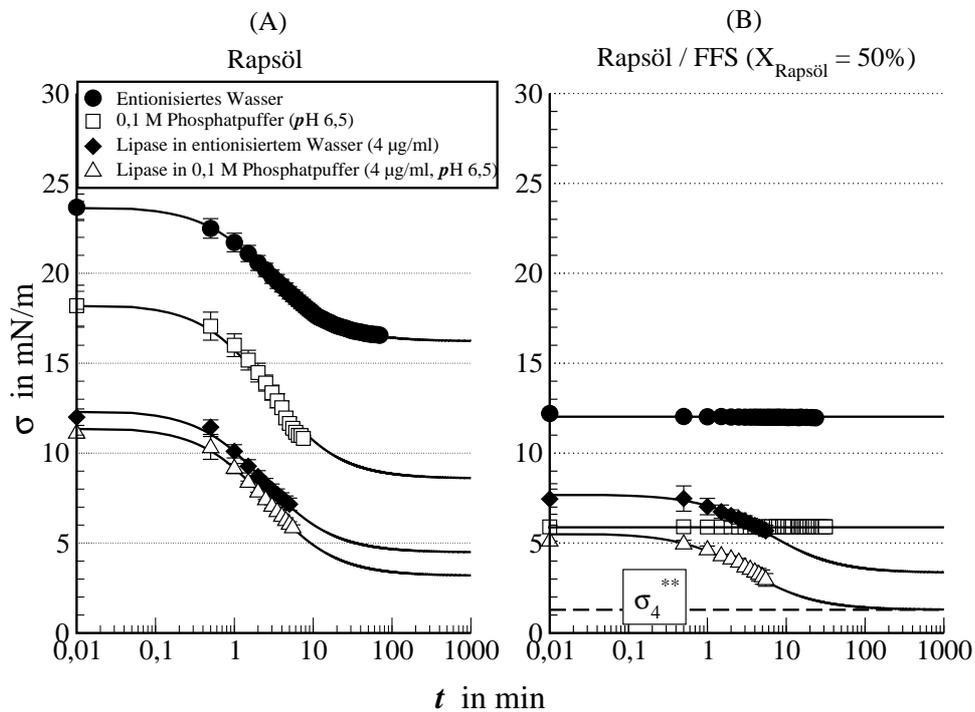
2. Nach Abschluss der Phasengrenzflächenbildung durch eine erste Molekülschicht erfolgt in Phase II eine stetige Absenkung der Grenzflächenspannung  $\sigma$ . Dies wird zum einen durch den weiteren Aufbau der Grenzschicht durch Moleküle erklärt, die sich in unmittelbarer Nähe der Phasengrenzfläche befinden. Zum anderen kommt es dadurch zu einer Erhöhung der Schichtdicke und Reorganisation der bestehenden Grenzschichten.
3. Mit Phase III erreicht die Grenzflächenspannung den zeitlich konstanten Wert  $\sigma^*$  (Gleichgewicht). Die Bildung der Phasengrenzfläche inklusive dem Aufbau der beiden Grenzschichten ist mit Phase III abgeschlossen.

Der zeitliche Verlauf der Gleichgewichtseinstellung lässt sich mittels folgender empirischer Modellgleichung in guter Näherung wiedergeben,

$$\sigma = \frac{1 + a t}{b + c t} \quad (4.6)$$

wobei  $a$ ,  $b$  und  $c$  Modellparameter sind und dabei  $b$  dem reziproken Wert von  $\sigma_0$  entspricht. Für  $t \rightarrow \infty$  berechnet sich aus dem Quotienten  $a/c$  der Gleichgewichtswert  $\sigma^*$ .

Der zeitliche Verlauf zur Einstellung einer stabilen Grenzflächenspannung ist stoffspezifisch. Bei der Hydrolysereaktion sind mehrere grenzflächenaktive Spezies beteiligt. Dabei liegt die Lipase bereits zu Reaktionsbeginn vor, während die grenzflächenaktiven Hydrolyseprodukte erst im Verlauf der Reaktion entstehen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die Grenzflächenspannung der an der Reaktion beteiligten Spezies getrennt zu untersuchen, um so die Einflüsse der einzelnen Substanzen qualitativ unterscheiden und beurteilen zu können.



**Abbildung 4.10:** Ein Tropfen bestehend aus entionisiertem Wasser (Kreis), 0,1 M Phosphatpuffer (Quadrat), 4  $\mu\text{g/ml}$  Lipase in entionisiertem Wasser (Raute) oder 4  $\mu\text{g/ml}$  Lipase in 0,1 M Phosphatpuffer (Dreieck) wird entweder in (A) Rapsöl oder in (B) einem Gemisch aus Rapsöl und Spaltfettsäure ( $X = 50\%$ ) aufgehangen (Anpassungskurven: Gl. 4.6, außer gefüllte Kreise und ungefüllte Rechtecke in (B)).

**Untersuchung des Einflusses einzelner Reaktanden** In Abb. 4.10 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zweier kontinuierlicher Phasen gegenübergestellt: (A) Rapsöl und (B) Rapsöl/Fettsäure-Gemisch ( $X = 50\%$ ). Wird Rapsöl als kontinuierliche Phase verwendet, so zeigen alle Experimente das typische zeitlich dreiphasige Verhalten zur Einstellung des Gleichgewichtes. Verglichen mit entionisiertem Wasser hat der Phosphatpuffer einen höheren Einfluss auf das Sinken der Grenzflächenspannung in Phase II. Die Anwesenheit von Lipase in der wässrigen Phase führt zu einer

## 4 Ergebnisse und Diskussion

weiteren Absenkung der Grenzflächenspannung. Werden beide wässrigen Phasen (mit bzw. ohne Lipase) miteinander verglichen, so sind die Unterschiede in  $\sigma_0$  und  $\sigma^*$  der Wirkung der Puffersalze zuzuschreiben. Der Effekt der Puffersalze ist nicht additiv.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der Einfluss der Lipase gegenüber dem Puffer deutlich überwiegt. Die Beobachtung der Gleichgewichtseinstellung war nicht für alle Untersuchungen experimentell zugänglich, da es in vielen Fällen zu einem vorzeitigen Abriss des Tropfens kam (vgl. Abschn. 3.2.2, S. 30). Mit Gl. 4.6 konnte der Verlauf der Grenzflächenspannung bis zum Erreichen des Gleichgewichtes nachvollzogen werden (Abb. 4.9). Nach Tropfenabriss wurde daher der tendenzielle Verlauf bis zur Gleichgewichtseinstellung mittels Gl. 4.6 hypothetisch nachvollzogen.

Die Affinität der Lipase zur Grenzflächenadsorption ist durch ihren strukturellen Aufbau zu erklären. Die Lipaseoberfläche weist einen hydrophoben und einen deutlich größeren hydrophilen Bereich auf [36]. Der amphiphile Charakter der Lipase erlaubt die Anlagerung zwischen beiden Grenzschichten. Nach der Adsorption der Lipase an der Phasengrenzfläche kommt es durch Änderung der Proteinstruktur zur Aktivierung der Lipase [23], die Voraussetzung für die biokatalytische Funktion ist.

**Absenkung der Grenzflächenspannung durch Fettsäuren** Beim Vergleich der beiden kontinuierlichen Phasen ist festzustellen, dass die Grenzflächenspannung bei allen untersuchten Substanzen in Anwesenheit von Fettsäure deutlich niedriger ist (Abb. 4.10 (B)). Bei entionisiertem Wasser und Phosphatpuffer stellt sich das thermodynamische Gleichgewicht sofort nach dem Einhängen des jeweiligen Tropfens ein. Die Bildung und die Organisation der o/w-Phasengrenzschicht scheint sich demnach sofort nach der Tropfeninduktion einzustellen. Grund dafür ist, dass die verwendete Fettsäuremenge in der öligen Phase im dreifachen Überschuss gegenüber dem Rapsöl vorliegt, was zu einem schnellen Abschluss der Grenzschichtbildung führt. Wird eine durchschnittliche Adsorptionsfläche der Fettsäure von  $30 \text{ \AA}^2$  angenommen [58], so entspräche der Platzbedarf aller vorhandenen Fettsäuren  $A_{FFS}$  (50% Umsatz bei  $V_{\text{Rapsöl},0} = 2 \text{ ml}$ ) dem  $25 \cdot 10^6$ -fachen der tatsächlich vorhandenen Tropfenoberfläche. Es wird vermutet, dass aufgrund der sofortigen Gleichgewichtseinstellung die Grenzfläche mit Fettsäure abgesättigt ist. Die insgesamt niedrigeren  $\sigma$ -Werte können mit dem amphiphilen Charakter der Fettsäure erklärt werden. Der hydrophile Molekülbereich dringt in die wässrige Phase ein, während die lipophile Acylkette in die ölige Phase hineinragt [33]. Beide Grenzschichten werden dadurch miteinander verbunden. Dies führt zu einer

erhöhten Tropfenstabilität trotz der insgesamt niedrigeren  $\sigma^*$ -Werte, verglichen mit dem Rapsölsystem.

**Prozesse an der Phasengrenze** Das typische zeitlich dreiphasige Verhalten des Grenzflächenspannungsverlaufes tritt nicht in Anwesenheit von freien Fettsäuren auf. Im Gegensatz zu den Fettsäuren liegt die Lipase in geringerer Konzentration vor. Daraus folgt, dass die Anlagerung der Lipase an die Grenzfläche mehr Zeit benötigt.

**Tabelle 4.3:** Grenzflächenspannung der Reinsubstanzen in öliger Phase beim Erreichen des Gleichgewichtszustandes

	in Öl	in Öl/FFS ( $X = 50\%$ )
wässrige Phase	$\sigma^*$	$\sigma^*$
	mN/m	mN/m
Entionisiertes Wasser	16,22	12,00
0,1 M Phosphatpuffer ( $pH\ 6,5$ )	8,59	5,90
Lipase in entionisiertem Wasser ( $4\ \mu\text{g/ml}$ )	4,48	3,35
Lipase in 0,1 M Phosphatpuffer ( $4\ \mu\text{g/ml}$ , $pH\ 6,5$ )	3,18	1,29

In Tab. 4.3 sind die  $\sigma^*$ -Werte für die Experimente aus Abb. 4.10 gegenübergestellt. Der Lipaseeffekt, der bei der Verwendung von entionisiertem Wasser in den kontinuierlichen Phasen Rapsöl bzw. Rapsöl/Fettsäure ( $X = 50\%$ ) auftritt, kann durch die Bildung folgender  $\sigma^*$ -Verhältnisse bewertet werden:

$$\frac{\sigma_{\text{ention. Wasser ohne Lipase}}^*}{\sigma_{\text{ention. Wasser mit Lipase}}^*} (\text{Öl}) \approx 3,62 \quad \frac{\sigma_{\text{ention. Wasser ohne Lipase}}^*}{\sigma_{\text{ention. Wasser mit Lipase}}^*} (\text{Öl/FFS}) \approx 3,58$$

Die Veränderung der Gleichgewichtsgrenzflächenspannung  $\sigma^*$  durch Adsorption der Lipase an der Grenzfläche ist in beiden Systemen nahezu identisch. Wenn die Vermutung stimmt, dass bei dem System „Rapsöl-Fettsäure“ die Phasengrenze mit Fettsäure gesättigt ist, dann wäre dies ein Indiz dafür, dass die Fettsäure durch die Lipase im entionisierten Wasser verdrängt wird. Bei Betrachtung des Lipaseeinflusses im Phosphatpuffertropfen stellt sich der Effekt wie folgt dar:

$$\frac{\sigma_{\text{Puffer ohne Lipase}}^*}{\sigma_{\text{Puffer mit Lipase}}^*} (\text{Öl}) \approx 2,70 \quad \frac{\sigma_{\text{Puffer ohne Lipase}}^*}{\sigma_{\text{Puffer mit Lipase}}^*} (\text{Öl/FFS}) \approx 4,54$$

Im System „Rapsöl-Fettsäure“ scheint im Vergleich zum Rapsöl der Lipase-induzierte Effekt deutlich größer zu sein. Wie in Abb. 4.10 (A) ersichtlich ist, bewirken die Salze des Phosphatpuffers eine Änderung der Grenzflächenspannung. Der im System

## 4 Ergebnisse und Diskussion

„Rapsöl-Fettsäure“ und „Rapsöl“ beobachtete Effekt setzt sich also aus der Wirkung von Lipase, Fettsäure und Puffersalzen zusammen. Nach diesen Überlegungen und aufgrund dem Ergebnis, dass eine signifikante Vergrößerung der Phasengrenzfläche nicht beobachtet werden konnte, steht zu vermuten, dass die Fettsäuren durch die deutlich größeren Lipasemoleküle aus der Doppelgrenzschicht verdrängt werden. Konkurrieren Lipase- und Fettsäuremoleküle um Grenzflächenplätze, so wird die Grenzflächenspannung minimal auf den Wert  $\sigma_4^{**}$  abgesenkt (Abb. 4.10 (B)). Wenn die Grenzfläche bei der Grenzflächenspannung  $\sigma_4^{**}$  mit grenzflächenaktiver Substanz gesättigt ist, liegt bei diesem Wert eine maximale Belegung der Grenzfläche vor.

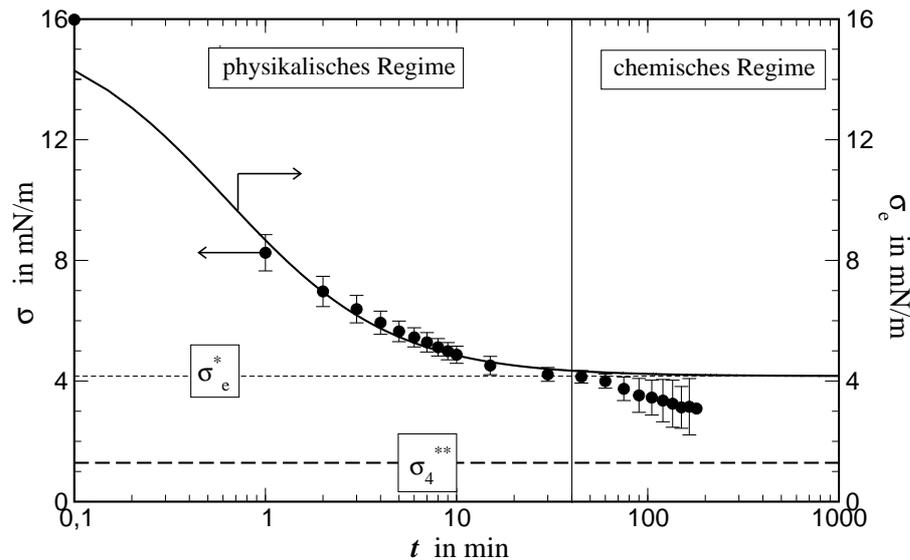
Zusammenfassend ist festzustellen, dass Fettsäuren und Lipasen die Grenzflächenspannung deutlich absenken. Beide Moleküle zeichnen sich durch ihren amphiphilen Charakter aus. Nach den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen besitzt die Lipase die größere Affinität zur Sorption an der Grenzfläche. Flipsen *et al.* [29] untersuchten die Lipase-katalysierte Hydrolyse an einem stehenden Öltropfen in wässriger Phase und zogen vergleichbare Schlussfolgerungen aus ihren Experimenten. Die gegenüber den Fettsäuren höhere Grenzflächenaffinität zeigt sich auch in dem Ergebnis, dass im Emulsionssystem Umsätze von deutlich mehr als 50% in adäquater Zeit erreicht werden konnten. Würden die Fettsäuren in der Lage sein, die Lipasemoleküle aus der Tropfenoberfläche zu verdrängen, wäre ein deutlich geringerer Umsatz bei vergleichbarer Reaktionszeit zu erwarten. Die hohe Grenzflächenaffinität der Lipase könnte durch die größeren hydrophilen und hydrophoben Oberflächenbereiche im Vergleich zur Fettsäure erklärt werden ( $A_{FFS} = 0,3 \text{ nm}^2$  [58] und  $A_e = 36 \text{ nm}^2$ , vgl. Abschn. 2.1.2.4, S. 16). Der amphiphile Charakter der Lipase führt wie die Fettsäure zu einer Tropfenstabilisierung.

**Verlauf der Grenzflächenspannung bei Reaktionsbedingungen** Aus der Literatur ist bekannt, dass die Lipase-katalysierte Hydrolyse von langkettigen Triglyceriden in mehrere Schritte unterteilt werden kann. Zunächst diffundiert die Lipase zur Phasengrenzfläche, wo sie anschließend adsorbiert [74, 93]. Bei der Lipaseadsorption handelt es sich um einen Gleichgewichtsprozess, bestehend aus Adsorption und Desorption. Bei der darauf folgenden Reaktion akkumulieren die produzierten Fettsäuren an der Phasengrenzfläche bzw. diffundieren in die ölige Phase. Die Fettsäurelöslichkeit in der wässrigen Phase ist mit 0,1% vernachlässigbar [29, 51].<sup>7</sup>

---

<sup>7</sup>Ein möglicher grenzflächenaktiver Einfluss des Glycerins ist aus der Literatur nicht bekannt und wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Im Folgenden wird der Effekt von Lipase und Fettsäure auf die Grenzflächenspannung untersucht. Zur Bewertung der Lipaseadsorption würde idealerweise eine inaktive Lipase mit identischen Oberflächeneigenschaften benötigt, um den Effekt der produzierten Fettsäuren auf die Lipaseadsorption und die dadurch erzeugten Mischeffekte zu differenzieren. Eine solche Lipase stand für die Arbeit jedoch nicht zur Verfügung.



**Abbildung 4.11:**  $\sigma$ -Verlauf während der Reaktion: Einfluss von Lipaseadsorption und Fettsäureakkumulation an der Phasengrenzfläche während der Hydrolysereaktion für  $c_{e0} = 4 \mu\text{g/ml}$  (die Anpassungskurve (Gl. 4.7) berücksichtigt das physikalische Regime; experimentelle Daten gemäß [25])

In Abb. 4.11 ist die zeitliche Änderung der Grenzflächenspannung während eines Reaktionsexperimentes exemplarisch für eine Lipasekonzentration von  $4 \mu\text{g/ml}$  dargestellt. Das Experiment lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: physikalisches und chemisches Regime. Innerhalb der ersten 30 Minuten sind Phase II und III zur Erlangung der Gleichgewichtsgrenzflächenspannung deutlich zu erkennen. Der Abfall der Grenzflächenspannung  $\sigma$  im ersten Abschnitt ist hauptsächlich der Lipaseadsorption zuzuschreiben (physikalisches Regime). Sobald Lipase adsorbiert vorliegt, werden Fettsäuren produziert (vgl. Abb. 4.14, S. 88). Darüber, ob und wieviel Fettsäuren sich innerhalb des physikalischen Regimes an der Phasengrenze anlagern und um wieviel sie die Grenzflächenspannung herabsetzen, lässt sich keine Aussage treffen. Der Verlauf von  $\sigma$  während der Enzymadsorption lässt sich mit dem gleichen Modellansatz beschreiben, der für den Grenzflächenspannungsverlauf der Reinsubstanzen verwendet wurde:

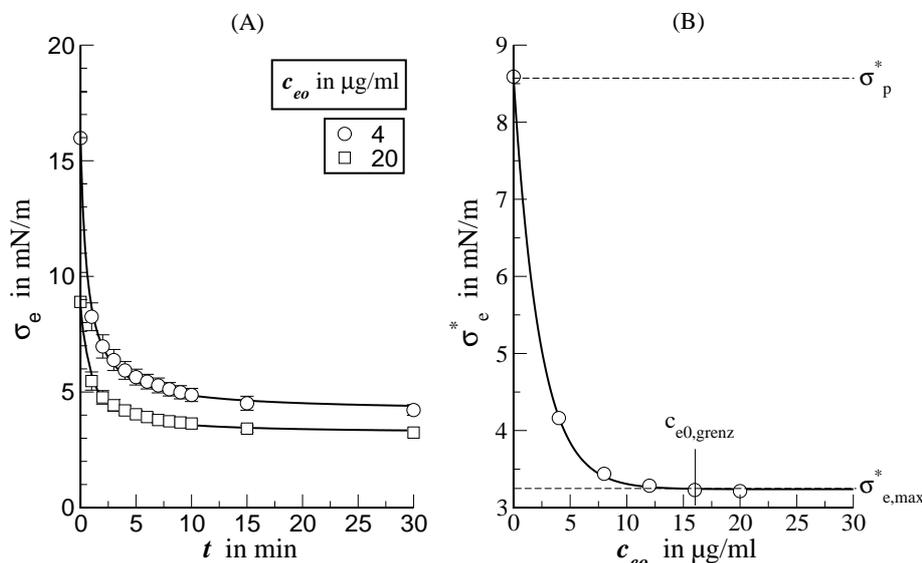
$$\sigma_e = \frac{1 + a_e t}{b_e + c_e t} \quad (4.7)$$

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Wenn sich Lipaseadsorption und -desorption an der Grenzfläche im Gleichgewicht befinden, so entspricht  $\sigma_e$  dem Gleichgewichtswert  $\sigma_e^*$  ( $t \rightarrow \infty$ ). Nach 30 Minuten wird eine konstante Grenzflächenspannung beobachtet, die auf das Erreichen des Gleichgewichtszustands der Lipaseadsorption hinweist,  $\sigma_e$  entspricht demnach ungefähr  $\sigma_e^*$ .

Im zweiten Abschnitt erfolgt ein weiterer Abfall der Grenzflächenspannung. Dieser wird der Einlagerung von Reaktionsprodukten in die Grenzfläche zugeschrieben (chemisches Regime).

Im physikalischen Regime erfolgt eine zunehmende Anlagerung von Lipase an der Phasengrenze, im chemischen Regime hingegen ist der Anlagerungsprozess der Lipase abgeschlossen, so wird vermutet.



**Abbildung 4.12:** (A) Physikalisches Regime: Zeitlicher Verlauf der Grenzflächenspannung  $\sigma_e$  beispielhaft für zwei Lipasekonzentrationen  $c_{e0} = 4$  und  $20 \mu\text{g/ml}$  (Anpassungskurven: Gl. 4.7); (B) Abhängigkeit zwischen der Grenzflächenspannung im Sorptionsgleichgewicht  $\sigma_e^*$  und der Lipasekonzentration  $c_{e0}$  im Phosphatpuffer (Anpassungskurve: Gl. 4.8)

**Lipaseadsorption an der Öl/Wasser-Grenzfläche** In Abb. 4.12 (A) ist das physikalische Regime für zwei unterschiedliche Enzymkonzentrationen ( $c_{e0} = 4 \mu\text{g/ml}$  und  $20 \mu\text{g/ml}$ ) dargestellt. Dabei ist eine deutliche Abhängigkeit der Grenzflächenspannung von der anfänglichen Lipasemenge im Phosphatpuffer zu beobachten. Offensichtlich sind zum Untersuchungsbeginn bei höheren Lipasekonzentrationen spontan mehr Lipasemoleküle adsorbiert ( $\frac{\sigma_0}{\sigma_e^*}(4 \mu\text{g/ml}) > \frac{\sigma_0}{\sigma_e^*}(20 \mu\text{g/ml})$ ). Laut der im vorangegangenen Abschnitt erläuterten Modellvorstellung, entspricht  $\sigma_e^*$  der Gleichgewichtskonzentration der an der Grenzfläche adsorbierten Lipase. Erwartungsgemäß ist bei einer Zunahme der Lipasekonzentration in der wässrigen Phase eine Abnahme von  $\sigma_e^*$  zu beobachten.

In Abb. 4.12 (B) ist der Zusammenhang von  $\sigma_e^*$  und  $c_{e0}$  dargestellt. Mit zunehmender Lipasekonzentration  $c_{e0}$  strebt  $\sigma_e^*$  dem Grenzwert  $\sigma_{e,max}^*$  entgegen. Es ist anzunehmen, dass beim Erreichen von  $\sigma_{e,max}^*$  die Phasengrenze mit Lipase vollständig gesättigt vorliegt. Der Zusammenhang zwischen der Gleichgewichtsgrenzflächenspannung und der Lipasekonzentration ist mit der empirischen Modellgleichung 4.8 in guter Näherung beschreibbar. Daraus konnte die Grenz-Gleichgewichtsgrenzflächenspannung für das untersuchte Reaktionssystem und  $c_{e0} \rightarrow \infty$  zu  $\sigma_{e,max}^* = 3,2 \text{ mN/m}$  bestimmt werden.

$$\sigma_e^* = a \exp(-b c_{e0}) + c \quad (4.8)$$

Im Weiteren erfolgt eine Abschätzung einer möglichen, an der Grenzfläche adsorbierten, Lipasemenge. Mit der Annahme, dass die Menge der adsorbierten Lipasemoleküle  $n_{e,ads}$  direkt proportional zu den experimentell ermittelten  $\sigma_e^*$ -Werten ist, kann bei konstanter Phasengrenzfläche von  $\sigma_e^*$  auf den Belegungsgrad  $\theta_e$  geschlossen werden. Dabei ist  $n_{e,ads}$  proportional zur Differenz der Gleichgewichtsgrenzflächenspannung des Phosphatpuffers ( $\sigma_p^*$ ) und der Lipase im physikalischen Regime.

$$n_{e,ads} \sim (\sigma_p^* - \sigma_e^*) \quad (4.9)$$

Die maximal mögliche Belegung der zur Verfügung stehenden Grenzfläche mit Lipase  $n_{e,ads,max}$  entspricht der Grenzflächenspannungsdifferenz bei maximal adsorbierter Lipasemenge und reinem Puffer.

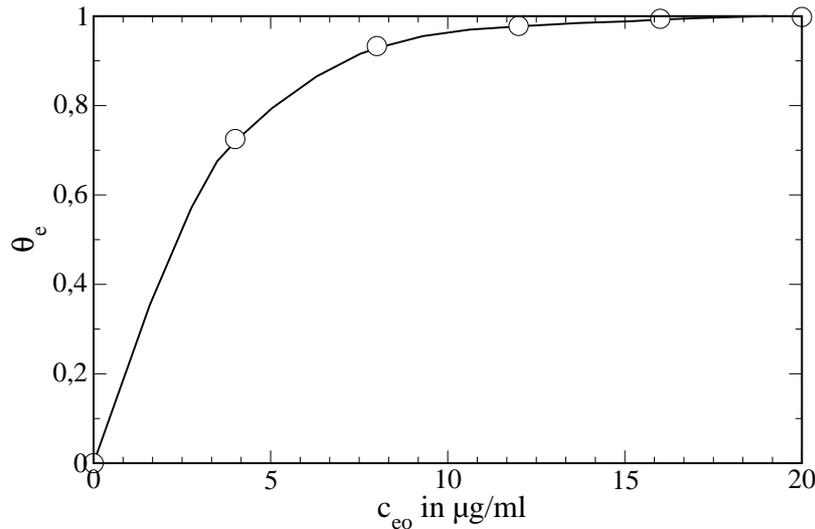
$$n_{e,ads,max} \sim (\sigma_p^* - \sigma_{e,max}^*) \quad (4.10)$$

Der Belegungsgrad für die adsorbierte Lipase an der Tropfenoberfläche ergibt sich aus dem Verhältnis der Stoffmengen der adsorbierten Lipase  $n_{e,ads}$  zur maximal möglichen Menge an Lipase  $n_{e,ads,max}$ .

$$\theta_e \approx \frac{n_{e,ads}}{n_{e,ads,max}} = \frac{\sigma_p^* - \sigma_e^*}{\sigma_p^* - \sigma_{e,max}^*} \quad (4.11)$$

Basierend auf dieser Annahme wurde  $\theta_e$  für verschiedene Lipasekonzentrationen mittels vorgestelltem Modell berechnet und in Abb. 4.13 dargestellt. Die untersuchte Tropfengrenzfläche von  $A_{tr} = 2,3 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2$  ist ab einer Lipasekonzentration von  $c_{e0,grenz} = 16 \mu\text{g/ml}$  zu 99% gesättigt.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.13:** Belegungsgrad der Lipase an einer Öl-/Wasserphasengrenzfläche; die experimentelle Bestimmung erfolgte an einem  $12 \mu\text{l}$ , in Rapsöl hängenden Phosphatpuffertropfen.

Um eine mögliche Überschussmenge an Lipase in der wässrigen Phase, die nach dem Erreichen des Adsorptiongleichgewichtes vorliegt, abschätzen zu können, wird der theoretische Belegungsgrad  $\Upsilon$  eingeführt. Diese Größe beschreibt das Verhältnis des Platzbedarfs der verwendeten Lipasemoleküle an der Grenzfläche bei vollständiger Adsorption und der tatsächlich vorhandenen Phasengrenzfläche (Tropfenoberfläche).

$$\Upsilon = \frac{\text{Platzbedarf der Lipasemoleküle (m}^2\text{)}}{\text{Tropfengröße (m}^2\text{)}} = \frac{A_{e,tot}}{A_{tr}} \quad (4.12)$$

Dabei wird angenommen, dass alle Lipasemoleküle, sowohl aktive als auch inaktive, an der Phasengrenzfläche adsorbierbar sind. Die Fläche, die jedes Lipasemolekül an der Grenzfläche einnimmt, wird zu  $A_e = 3,6 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2$  abgeschätzt (Abschn. 2.1.2.4, S. 16). Bei  $\Upsilon < 1$  ist die zur Verfügung stehende Grenzfläche ausreichend groß, so dass alle vorhandenen Lipasemoleküle an der Phasengrenze adsorbieren könnten. Bei  $\Upsilon > 1$  hingegen würden nicht alle Moleküle an der Grenzfläche Platz finden, und im Tropfenbulk würde ein Überschuss an Lipase verbleiben.

Bei einer Lipasekonzentration von  $4 \mu\text{g/ml}$  sind 73% von möglichen 78% der Phasengrenzfläche bedeckt (Tab. 4.4). Für  $c_{e0} = 16 \mu\text{g/ml}$  sind 99% der Lipase auf der Grenzfläche adsorbiert, allerdings liegt im Tropfenbulk ein dreifacher Lipaseüberschuss vor. Aus den Ergebnissen resultiert die Vermutung, dass bei  $c_{e0} < 4 \mu\text{g/ml}$  alle in der wässrigen Phase vorhandenen Lipasemoleküle an der Tropfengrenzfläche adsorbieren ( $\theta_e \approx \Upsilon$ ). Und ab  $c_{e0} > 4 \mu\text{g/ml}$  ist ein maßgeblicher Lipaseüberschuss im Tropfenbulk vorhanden.

**Tabelle 4.4:** Experimentell bestimmter und theoretischer Belegungsgrad der Lipase aus *Candida rugosa* an der Oberfläche eines in Rapsöl hängenden Phosphatpuffertropfens

$c_{e0}$ $\mu\text{g/ml}$	$\theta_e$	$\Upsilon$
4	0,725	0,783
8	0,933	1,566
12	0,978	2,350
16	0,994	3,133
20	0,998	3,916

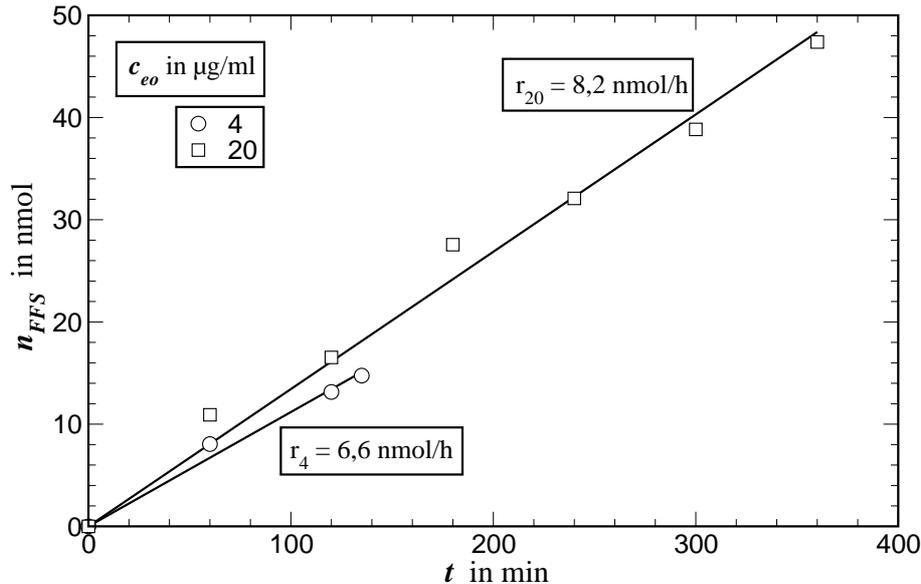
#### 4.2.1.2 Mehrkomponenten-Sorption

**Quantifizierung der produzierten Fettsäuren** Um den quantitativen Effekt der in die Ölphase diffundierten Fettsäuren mit der Grenzflächenspannung zu korrelieren, wurde die entstehende Fettsäuremenge analysiert (Abschn. 3.2.1, S. 28). Die Untersuchung wurde für die Versuche mit  $c_{e0} = 4$  und  $20 \mu\text{g/ml}$  durchgeführt. In definierten Zeitabständen wurde eine Probe der öligen Phase entnommen und analysiert. Die maximale Probenanzahl ist aufgrund des geringen Volumens der Phase auf drei bzw. sechs Proben begrenzt. Mit der verwendeten GC-Methode konnten lediglich die entstandenen Fettsäuren quantifiziert werden. Es liegen keine Informationen zu eventuell entstandenen Mono- bzw. Diglyceriden vor.

Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen wurde ein linearer Verlauf der produzierten Fettsäuren innerhalb des beobachteten Zeitraumes festgestellt (Abb. 4.14). Demnach ist kein Einfluss der in die ölige Phase diffundierten Fettsäuren auf die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit  $r$  messbar. Für den Hydrolyseanfang wurde ebenfalls ein linearer Verlauf angenommen.

$$r = \frac{1}{\nu_{FFS}} \frac{dn_{FFS}}{dt} = k = f(c_{e0}) \quad (4.13)$$

Eine Steigerung der adsorbierten Lipasemenge um 26% führt zu einer 20% höheren Reaktionsgeschwindigkeit ( $\theta_{e,20} = 0,99 > \theta_{e,4} = 0,73$ ). Die Abweichung liegt im Rahmen des Messfehlers von 5% (bei zwei Wiederholungen eines Pendant-Drop-Experimentes) [25]. Dementsprechend wird ein linearer Zusammenhang zwischen adsorbierter Lipasemenge und der Reaktionsgeschwindigkeit angenommen.

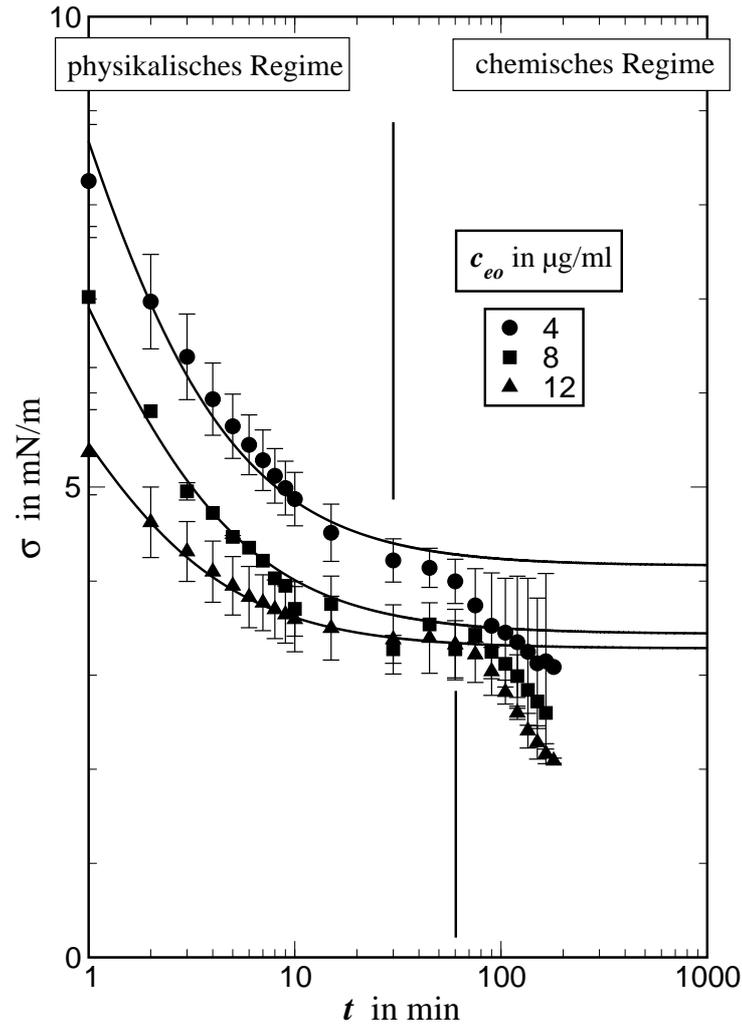


**Abbildung 4.14:** Zeitlicher Verlauf der produzierten Fettsäuremenge in der öligen Phase unter Verwendung eines  $12 \mu\text{l}$  Tropfens mit 4 bzw.  $20 \mu\text{g}$  Lipase pro ml  $0,1 \text{ M}$  Phosphatpuffer (experimentelle Daten gemäß [25])

**Qualitative Beschreibung der Vorgänge an der o/w-Grenzfläche** In Abb. 4.15 ist der Grenzflächenspannungsverlauf für die Lipase-katalysierte Hydrolyse exemplarisch für drei verschiedene Lipasekonzentrationen ( $4, 8, 12 \mu\text{g/ml}$ ) dargestellt. Für alle Experimente wurde das bereits in Abschn. 4.2.1.1 (S. 82) beschriebene Verhalten des Grenzflächenspannungsverlaufes beobachtet. Bei allen betrachteten Lipasekonzentrationen kommt es während der Induktionsphase (nicht dargestellt) zu größeren Änderungen der Grenzflächenspannung, die im Mittel  $\Delta\sigma = 5 \text{ mN/m}$  betragen. Daraus folgt eine größere adsorbierte Lipasemenge innerhalb der ersten Minute.

Im chemischen Regime wird für alle Lipasekonzentrationen eine weitere, stetige Abnahme von  $\sigma$  beobachtet, die durch eine zunehmende Anlagerung der entstehenden Reaktionsprodukte an der Grenzfläche erklärt werden kann. Bezüglich eines betrachteten Zeitpunktes ist die Grenzflächenspannung um so niedriger, je höher die adsorbierte Lipasekonzentration ist. Ist mehr Lipase adsorbiert, können mehr Fettsäuren pro Zeiteinheit entstehen und sich ebenfalls an der Phasengrenzfläche anlagern. Wie mit dem im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten Modell zum Lipaseadsorptionsverhalten gezeigt wurde, ist ab  $c_{e0} = 8 \mu\text{g/ml}$  die Grenzfläche über 90% mit Lipase belegt. Daher wird vermutet, dass die produzierte Fettsäure sich in den Räumen zwischen den voluminösen Proteinen anlagert. Eine Verdrängung des Proteins durch die Fettsäure wird auf Basis der Ausführungen in Abschn. 4.2.1.1 (Abb. 4.10, S. 79) ausgeschlossen.

Das Untersuchungsende wird durch den Tropfenabriss bestimmt.



**Abbildung 4.15:** Zeitabhängige Effekte von Lipase und entstehender Hydrolyseprodukte (die Anpassungskurve (Gl. 4.7) berücksichtigt das physikalische Regime; experimentelle Daten gemäß [25])

### Einfluss der Fettsäuren auf die Absenkung der Grenzflächenspannung

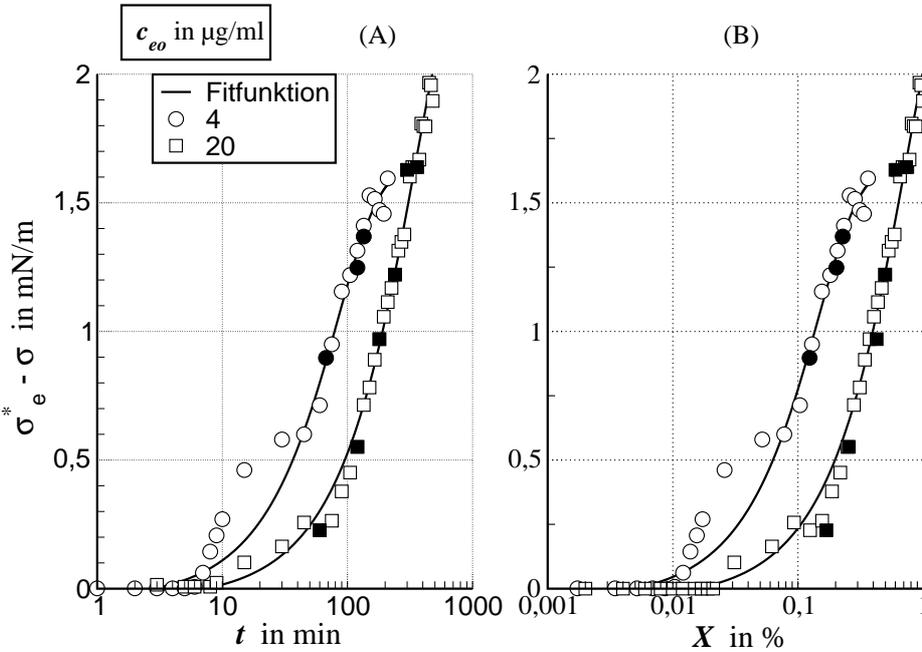
Wie bereits erläutert wurde, ist die Anzahl an Bestimmungen der Fettsäuremengen über die Versuchszeit stark begrenzt, im Gegensatz zu den Messungen der Grenzflächenspannung  $\sigma$ . Die fehlenden Fettsäuremengen wurden durch lineare Interpolation den gemessenen  $\sigma$ -Werten zugeordnet. Um den Effekt der Fettsäureanlagerung an die Grenzfläche zu beschreiben, wurde der sogenannte Oberflächendruck  $\Pi$  nach Flipsen *et al.* [29] berechnet.

$$\Pi(t) = \sigma_e^*(t) - \sigma(t) \quad (4.14)$$

Dabei wird die Gleichgewichtsgrenzflächenspannung  $\sigma_e^*$  aus der empirischen Modellgleichung zur Beschreibung der Lipaseadsorption (Gl. 4.7) für  $t \rightarrow \infty$  berechnet,  $\sigma$  entspricht dem Messwert.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 4.16 (A) und (B) sind zeitlicher- und umsatzabhängiger Verlauf von  $\Pi$  wiedergegeben, wobei das physikalische Regime, inklusive dem ersten Bereich des chemischen Regimes, durch Interpolationswerte dargestellt ist und nicht durch Messwerte validiert wurde. Zeit- und umsatzabhängiger Verlauf von  $\Pi$  sind entsprechend dem



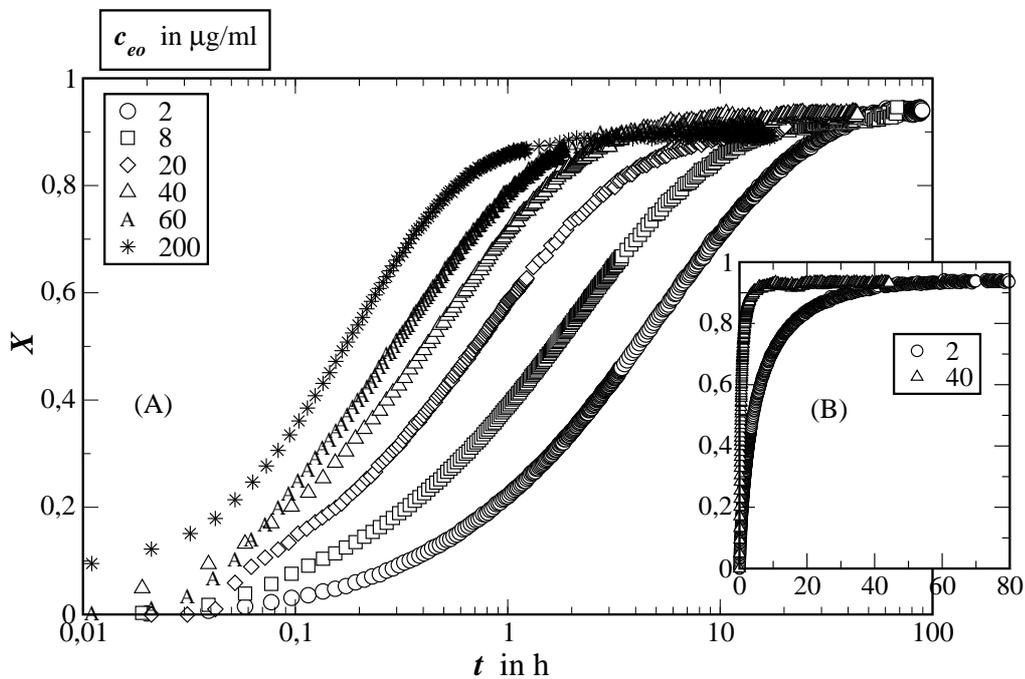
**Abbildung 4.16:** (A) Oberflächendruck  $\Pi$  in Abhängigkeit der Zeit sowie vom (B) Umsatz (gemessen in der Ölphase) für die Lipasekonzentrationen 4 und  $20 \mu\text{g/ml}$  (Messwerte = gefüllte Symbole, Interpolationswerte = ungefüllte Symbole)

linearen Zusammenhang zwischen Umsatz und Zeit qualitativ gleichwertig. In den ersten sieben Minuten wird nur Lipase adsorbiert. Die darauf folgende zeitliche Zunahme von  $\Pi$  ist auf die Einlagerung der Hydrolyseprodukte in die Phasengrenzfläche zurückzuführen. Für beide Lipasemengen wird ein ähnlicher Kurvenverlauf beobachtet. Ausgehend von der Annahme, dass für beide Lipasekonzentrationen alle Parameter (Tropfengröße, Pufferkonzentration, Öl- und Lipasequalität) übereinstimmen, ist die Zunahme der grenzflächenaktiven Spezies an der Phasengrenzfläche durch Adsorption bei  $c_{e0} = 4 \mu\text{g/ml}$  für die gesamte Beobachtungsszeit größer, verglichen mit  $c_{e0} = 20 \mu\text{g/ml}$ . Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass bei  $c_{e0} = 4 \mu\text{g/ml}$  weniger Lipasemoleküle an der Grenzfläche adsorbieren ( $\theta_e = 0,73$ ) als es bei  $c_{e0} = 20 \mu\text{g/ml}$  ( $\theta_e = 0,99$ ) der Fall ist, demnach ist mehr Platz auf der Grenzfläche. Bei  $20 \mu\text{g/ml}$  kann aufgrund der größeren Tropfenstabilität die Fettsäureanlagerung über einen längeren Zeitraum beobachtet werden.

## 4.2.2 Emulsionssystem

### 4.2.2.1 Reaktionsfortschritt

Die online-Messung des Reaktionsfortschrittes der Lipolyse im w/o-Emulsionssystem erfolgte unter Variation der Lipasekonzentration  $c_{e0}$  durch die FTIR-Spektroskopie, die eine hohe zeitliche Auflösung garantiert. Die prinzipielle Funktion und Durchführung der FTIR-Spektroskopie wurden in Abschn. 3.3.2 (S. 37) diskutiert, Aufbau und Durchführung der Versuchsanlage sind in Abschn. 3.3.4 (S. 61) beschrieben. Die unternommenen Experimente wurden bei  $T = 35\text{ °C}$  durchgeführt.



**Abbildung 4.17:** Reaktionsfortschritt bei der Hydrolyse für verschiedene Lipasekonzentrationen

Abb. 4.17 (A) zeigt das Umsatz-Zeit-Verhalten für alle untersuchten Lipasekonzentrationen. Bereits nach sechs Minuten Reaktionszeit waren Umsätze zwischen 1% und 30% (je nach Lipasekonzentration) messbar. Je höher die Lipasemenge in der Phosphatpufferphase ist, desto weniger Zeit wird benötigt, um den Endumsatz zu erreichen. Das ist durch eine Erhöhung der an der Grenzfläche adsorbierten Lipasemenge mit zunehmender Lipasekonzentration zu erklären. Der Endumsatz markiert den Zeitpunkt, ab dem kein Substrat mehr umgesetzt wird. Er ist unabhängig von  $c_{e0}$  (Abb. 4.17 (B)). Für alle untersuchten Enzymkonzentrationen ergaben sich Endumsätze zwischen 90 und 93%. Wie in Abb. 4.8 (B) (S. 74) gezeigt wurde, sind bei Umsätzen über 85% für

## 4 Ergebnisse und Diskussion

$c_{e0} = 8 \mu\text{g/ml}$  noch 20% Restaktivität zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, dass die Endumsätze den Gleichgewichtsumsätzen entsprechen.

Auch biokatalytische Reaktionen sind Gleichgewichtsreaktionen [30]. Es wurde herausgefunden, dass der Gleichgewichtsumsatz einer Lipolysereaktion (in w/o-Emulsionssystem) von der Glycerinkonzentration abhängt [18]. So wurde mit steigendem w/o-Volumenverhältnis ein höherer Gleichgewichtsumsatz beobachtet, der in der geringeren Glycerinkonzentration der wässrigen Phase begründet ist.

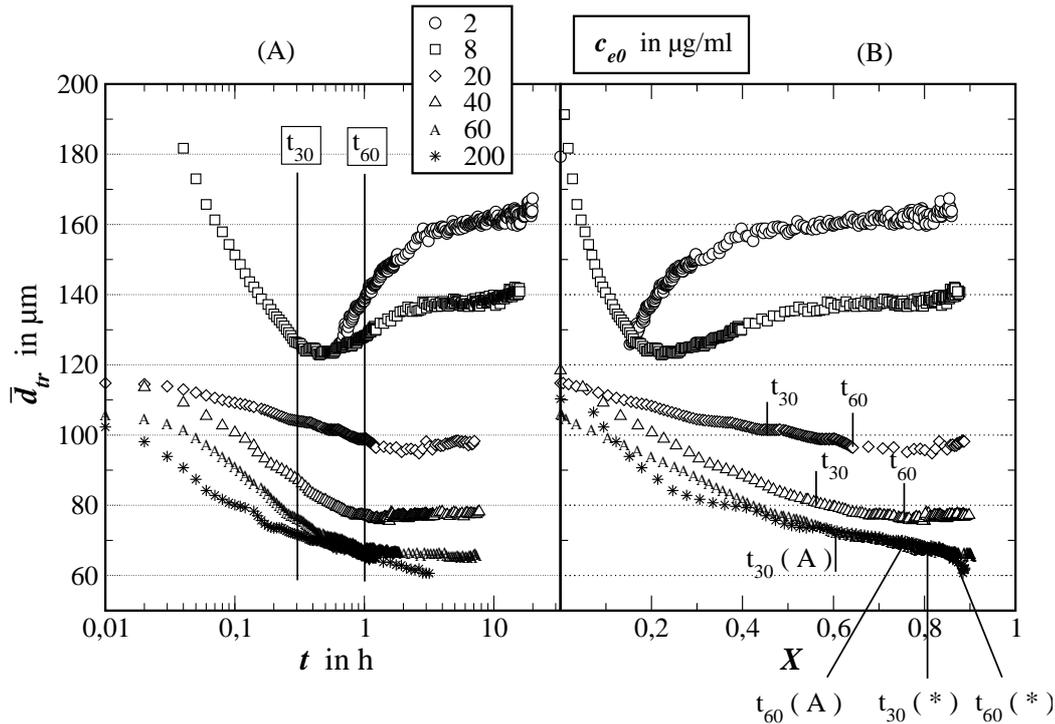
Bei festgelegter Lipasekonzentration wird das Umsatz-Zeit-Verhalten durch alle an der Reaktion beteiligten Effekte bestimmt:

- Eine Abnahme der Umsetzungsgeschwindigkeit mit fortschreitender Reaktionszeit, auch bei maximaler Enzymaktivität, entspricht dem üblichen Verhalten einer Gleichgewichtsreaktion. Substrat wird verbraucht, wodurch die Gegenreaktion mit zunehmender Zeit bzw. Annäherung an das Gleichgewicht immer größer wird.
- Mit steigender Reaktionsdauer wurde eine Abnahme der Lipaseaktivität, hervorgerufen durch diverse Effekte, beobachtet (Abb. 4.8, S. 74). Eine Reduzierung der Aktivität verringert die Umsetzungsgeschwindigkeit.
- Weiterhin besitzt die Größe der Phasengrenzfläche eine entscheidende Funktion bei der Lipolyse in Zweiphasensystemen. Sie bestimmt unter anderem die Anzahl der adsorbierten Lipasemoleküle und beeinflusst damit maßgeblich die Hydrolysegeschwindigkeit [8]. Es steht zu vermuten, dass, aufgrund der grenzflächenaktiven Eigenschaften von Lipase und Fettsäure und der dadurch hervorgerufenen Absenkung der Grenzflächenspannung (Abb. 4.15, S. 89), eine Variation der Tropfengröße und dadurch eine Veränderung der Grenzflächengröße mit der Reaktionszeit erfolgt. Deshalb ist die Kenntnis von der Größe der Wassertropfen im Reaktionsverlauf notwendig.

### 4.2.2.2 Tropfengröße und volumenspezifische Phasengrenzfläche

Parallel zum Reaktionsfortschritt wurde die mittlere Tropfengröße  $\bar{d}_{tr}$  bei  $T = 35^\circ\text{C}$  mittels PDW-Spektroskopie im Reaktionsvolumen detektiert. Methodenbeschreibung und Bewertung sowie Durchführung und Versuchsaufbau sind in Abschn. 3.3.3 (S. 49) und Abschn. 3.3.4 (S. 61) dokumentiert.

Abb. 4.18 (A) und (B) zeigen das zeit- und umsatzabhängige Verhalten der mittleren Tropfengröße  $\bar{d}_{tr}$  für Lipasekonzentrationen zwischen 2 und 200  $\mu\text{g/ml}$ . Bei  $c_{e0} = 2 \mu\text{g/ml}$  wurde erst nach 0,6 Stunden mit dem Monitoring der Tropfengröße begonnen.



**Abbildung 4.18:** Verhalten der mittleren Tropfengröße während der Hydrolysereaktion in Abhängigkeit von (A) der Reaktionszeit und (B) dem Reaktionsfortschritt für verschiedene Lipasekonzentrationen

Für  $c_{e0} = 2$  und  $8 \mu\text{g/ml}$  sinkt die mittlere Tropfengröße zunächst ab und steigt anschließend bis zum Erreichen eines konzentrationsabhängigen Endwertes. Für Lipasekonzentrationen zwischen  $20 - 200 \mu\text{g/ml}$  sind die Tropfen bei Reaktionsbeginn näherungsweise gleich groß ( $\bar{d}_{tr} = 100 - 120 \mu\text{m}$ ). Mit fortlaufender Reaktion werden diese Tropfen kleiner und erreichen einen konstanten Wert ohne ein Minimum zu durchlaufen.

Die Ursache für die Änderung der Tropfengröße ist bei sonst gleichbleibenden Versuchsparametern eine Folge der Variation der physikalischen Eigenschaften der Emulsion. Zum einen verändert sich durch das Entstehen der Reaktionsprodukte wie Glycerin (wässrige Phase) und Fettsäure (ölige Phase) die Viskosität der Emulsion. Eine abschätzende Messung im Höppler-Viskosimeter für  $c_{e0} = 2 \mu\text{g/ml}$  ergab eine Veränderung der Viskosität von  $45 (t_0)$  auf  $20 (t_{end})$  mPa s während der Reaktion. Die sinkende Viskosität begünstigt die Verringerung der Tropfengröße. Zum anderen könnte die Reduzierung der Grenzflächenspannung ebenfalls eine Abnahme der Tropfengröße bewirken (Abschn. 4.2.1.2, S. 88).

Die mittlere Tropfengröße zu Reaktionsbeginn  $\bar{d}_{tr,0}$  sinkt für den betrachteten Lipasekonzentrationsbereich  $c_{e0} = 20 - 200 \mu\text{g/ml}$  von  $117$  auf  $100,5 \mu\text{m}$  mit steigender Konzentration. Es ist zu vermuten, dass die Grenzflächenbelegung zum Zeitpunkt

## 4 Ergebnisse und Diskussion

$t = 0$  min von der Enzymmenge im Tropfenbulk abhängt. Ist mehr Lipase verfügbar, führt die erhöhte Adsorption zu einer weiteren Verringerung der Grenzflächenspannung und damit zu kleineren Tropfengrößen. Für alle untersuchten Lipasekonzentrationen erreicht die Tropfengröße  $\bar{d}_{tr}$  ab einem Umsatz von näherungsweise 70% einen zeitlich konstanten Wert, der mit steigender Lipasemenge von  $160 \mu\text{m}$  ( $c_{e0} = 2 \mu\text{g/ml}$ ) auf  $60 \mu\text{m}$  ( $c_{e0} = 200 \mu\text{g/ml}$ ) abnimmt.

Wie in Abschn. 4.2.1.1 (S. 84) und Abschn. 4.2.1.2 (S. 88) vermutet, erfolgt die Änderung der Grenzflächenspannung innerhalb der ersten 30 Minuten hauptsächlich durch die Lipaseanlagerung an die Grenzfläche. Abb. 4.18 (A) zeigt, dass bereits nach einer halben Stunde der für die jeweilige Lipasekonzentration spezifische Tropfengrößenbereich eingestellt ist. Unter der Annahme der Anwendbarkeit der Pendant-Drop-Ergebnisse auf das Emulsionssystem wird vermutet, dass die Tropfengröße am Reaktionsende durch die innerhalb der ersten 30 Minuten an der Grenzfläche adsorbierte Lipasemenge bestimmt wird. Die nach 60 Minuten für  $c_{e0} = 8$  und  $12 \mu\text{g/ml}$  beobachtete weitere Abnahme der Grenzflächenspannung, begründet durch die Anlagerung der grenzflächenaktiven Reaktionsprodukte an freie Bereiche der Phasengrenze, scheint keinen Einfluss auf die Tropfengröße zu haben, denn ab diesem Zeitpunkt ist der Tropfendurchmesser für eine Lipasekonzentration  $\geq 20 \mu\text{g/ml}$  nahezu konstant (Abb. 4.18 (B)). Demzufolge kann von einem nichtlinearen Zusammenhang zwischen Grenzflächenspannung und Tropfengröße ausgegangen werden.

Die umsatzabhängige Entwicklung der mittleren Tropfengröße bei  $c_{e0} = 60$  und  $200 \mu\text{g/ml}$  ist näherungsweise identisch. Dies könnte dadurch begründet sein, dass ab  $c_{e0} = 60 \mu\text{g/ml}$  eine maximale Belegung der Grenzfläche mit grenzflächenaktiver Substanz während der gesamten Reaktionszeit erreicht ist.

Das sehr markante Verhalten bei  $c_{e0} = 2$  und  $8 \mu\text{g/ml}$  ( $\bar{d}_{tr}$  nimmt zuerst ab und dann wieder zu) könnte dadurch erklärt werden, dass an der Phasengrenze die Menge adsorbierter grenzflächenstabilisierender Substanz nicht ausreichend ist, um die Grenzflächenspannung genügend abzusenken und eine Tropfenkoaleszenz zu verhindern.

**Volumenspezifische Phasengrenzfläche** Die auf die Wasserphase bezogene mittlere spezifische Phasengrenzfläche  $S_V$  wird aus dem mittleren Tropfendurchmesser  $\bar{d}_{tr}$ , der Tropfenanzahl  $N_{tr}$  und dem Volumen der Wasserphase  $V_w$  berechnet.

$$S_V(t) = \frac{\pi \bar{d}_{tr}^2(t) N_{tr}(t)}{V_w(t)} \quad (4.15)$$

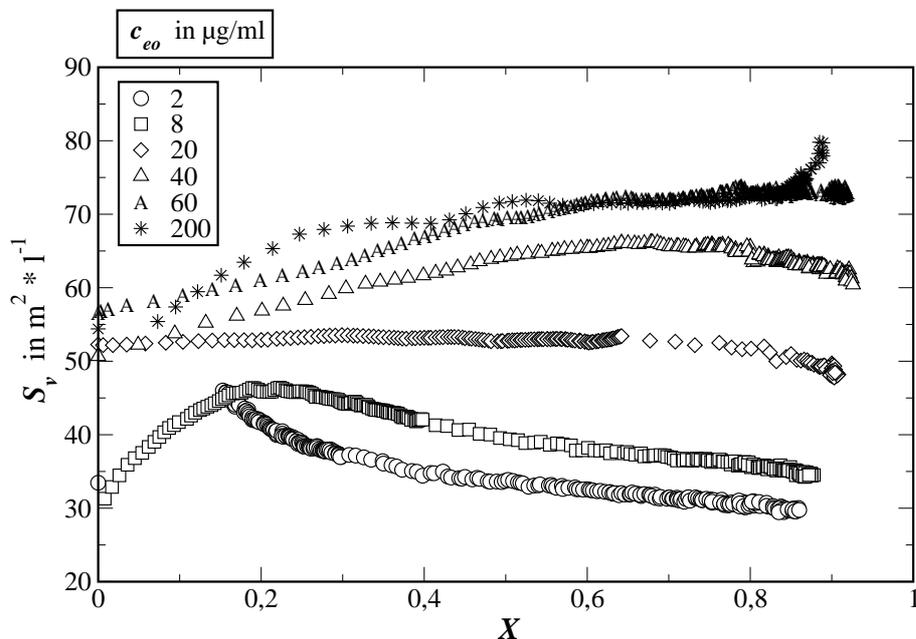
$V_w$  wird in Abhängigkeit des während der Reaktion verbrauchten Wassers und entstehenden Glycerins berechnet.<sup>8</sup> Die Tropfenanzahl  $N_{tr}$  ergibt sich aus dem Wasservolumen  $V_w$  und dem Tropfenvolumen  $V_{tr}$ .

$$N_{tr}(t) = \frac{V_w(t)}{V_{tr}(t)} \quad (4.16)$$

mit

$$V_{tr}(t) = \frac{4}{3} \pi \left( \frac{\bar{d}_{tr}(t)}{2} \right)^3 \quad (4.17)$$

In Abb. 4.19 ist die Entwicklung der volumenspezifischen, auf die Wasserphase bezogenen Phasengrenzfläche  $S_V$  mit zunehmendem Reaktionsfortschritt abgebildet. Für  $c_{e0} = 2$  und  $8 \mu\text{g/ml}$  nimmt die spezifische Phasengrenzfläche mit zunehmendem Umsatz zu, um dann wieder auf den Anfangswert abzusinken. Für  $c_{e0} = 20 \mu\text{g/ml}$  bleibt die volumenspezifische Grenzfläche konstant und bei  $c_{e0} = 40 - 200 \mu\text{g/ml}$  steigt sie umsatzabhängig an. Trotz der mehr als dreifachen Lipasekonzentration bei  $c_{e0} = 200 \mu\text{g/ml}$  ist im Vergleich zu  $c_{e0} = 60 \mu\text{g/ml}$  kein signifikanter Unterschied im umsatzabhängigen Verhalten der spezifischen Phasengrenzfläche zu beobachten. Dies ist ein weiteres Indiz für die Sättigung der Phasengrenze mit grenzflächenaktiver Substanz ab  $c_{e0} = 60 \mu\text{g/ml}$ .



**Abbildung 4.19:** Entwicklung der spezifischen Phasengrenzfläche mit zunehmendem Umsatz im Laufe der Hydrolysereaktion unter Variation der Enzymkonzentration

<sup>8</sup>Es wird ideales Verhalten angenommen. Demnach befinden sich neben den Phosphatpuffersalzen nur Glycerin- und Wassermoleküle in der wässrigen Phase. Die Puffersalze beeinflussen nicht die Linearität der Volumenänderung von Glycerin-/Wassergemischen.

### 4.2.2.3 Phänomenologische Beschreibung der Reaktionskinetik

**Grenzflächenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}$**  Bei der Lipolyse in einer w/o-Emulsion ändert sich die spezifische Phasengrenzfläche mit der Reaktionszeit, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurde. Um den Einfluss der Grenzflächen-größe zu eliminieren wird die Reaktionsgeschwindigkeit auf die Größe der Phasengrenzfläche bezogen. Die grenzflächenbezogene Geschwindigkeit  $\hat{r}$  berechnet sich aus der volumenbezogenen (Wasserphase) Reaktionsgeschwindigkeit  $\tilde{r}$  und der spezifischen Grenzfläche  $S_V$ ,

$$\hat{r} = \frac{\tilde{r}}{S_V} \quad (4.18)$$

wobei  $\tilde{r}$  unter Berücksichtigung der reaktionsbedingten Volumenänderung der Wasserphase<sup>9</sup> ermittelt wird ( $\varepsilon_w$  – relative Volumenänderung).

$$\tilde{r} = \frac{\tilde{c}_{\ddot{O}1,0}}{1 + \varepsilon_w X_{\ddot{O}1}} \cdot \frac{dX_{\ddot{O}1}}{dt} \quad (4.19)$$

$$\varepsilon_w = \frac{\tilde{V}_{X_{\ddot{O}1=1}} - \tilde{V}_{X_{\ddot{O}1=0}}}{\tilde{V}_{X_{\ddot{O}1=0}}} \quad (4.20)$$

$\tilde{c}_{\ddot{O}1,0}$  entspricht der Rapsölkonzentration zu Reaktionsbeginn bezogen auf das Volumen der wässrigen Phase. Aus den gemessenen Umsatzwerten berechnet sich die flächenbezogene Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}$ .

$$\begin{aligned} \hat{r} &= \frac{\tilde{c}_{\ddot{O}1,0}}{1 + \varepsilon_w(t_{i+\frac{1}{2}}) X_{\ddot{O}1}(t_{i+\frac{1}{2}})} \cdot \frac{\Delta \left( \frac{X_{\ddot{O}1}}{S_V} \right)}{\Delta t} \\ &= \frac{\tilde{c}_{\ddot{O}1,0}}{1 + \varepsilon_w(t_{i+\frac{1}{2}}) X_{\ddot{O}1}(t_{i+\frac{1}{2}})} \cdot \frac{\frac{X_{\ddot{O}1}}{S_V}(t_{i+1}) - \frac{X_{\ddot{O}1}}{S_V}(t_i)}{t_{i+1} - t_i} \end{aligned} \quad (4.21)$$

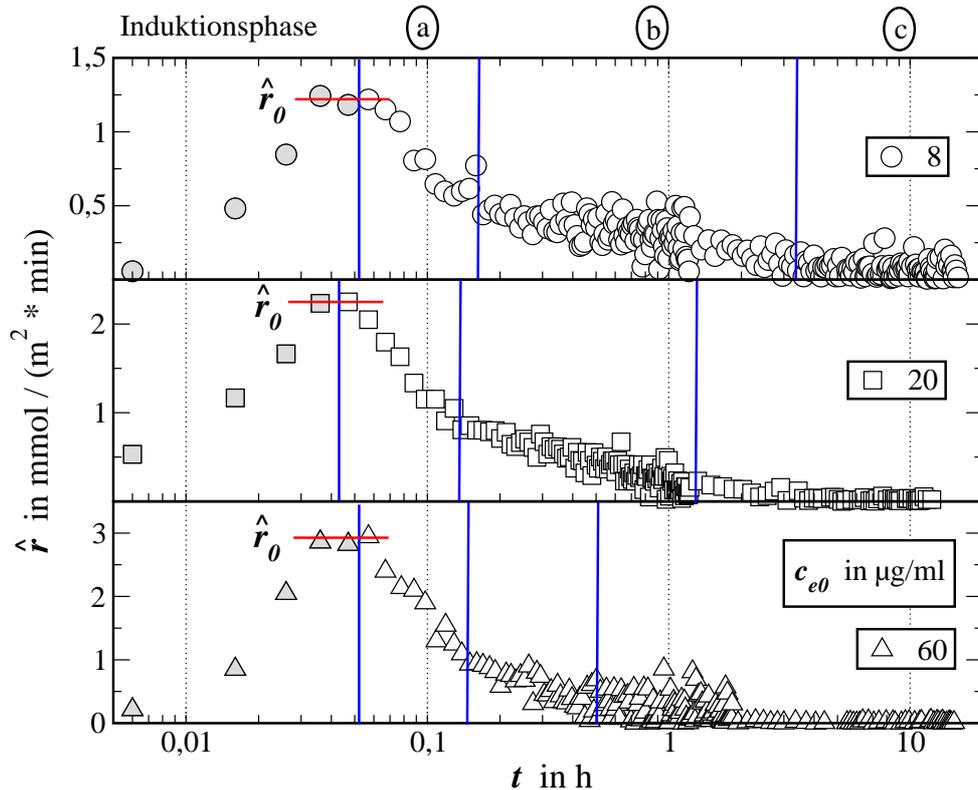
Die Richtigkeit der gemessenen mittleren Tropfengrößen  $\bar{d}_{tr}$  (vgl. Diskussion in Abschn. 3.3.3, S. 57) wurde als fraglich eingestuft. Dementsprechend sind die berechneten Absolutwerte der volumenspezifische Phasengrenzfläche  $S_V$  und somit der grenzflächenbezogenen Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}$  möglicherweise fehlerhaft. Allerdings wird von der qualitativen Richtigkeit des Verlaufs der Reaktionsgeschwindigkeit ausgegangen.

Zur Demonstration der kinetischen Abhängigkeiten wird die aus den gemessenen Umsätzen berechnete Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}$  in Abhängigkeit von der Reaktionszeit exemplarisch für drei verschiedene Lipasekonzentrationen ( $c_{e0} = 8, 20$  und

---

<sup>9</sup>siehe Fußnote 8

60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) aufgetragen (Abb. 4.20). Für alle drei Konzentrationen verhält sich der zeitabhängige Kurvenverlauf von  $\hat{r}$  in gleicher Weise und ist durch vier Phasen charakterisierbar: Induktionsphase, Regime a, Regime b und Regime c. Die Übergänge zwischen den Regimen Induktionsphase–a sowie a–b sind durch einen abrupten Wechsel der Kurvensteigung gekennzeichnet.



**Abbildung 4.20:** Zeitlicher Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}$  für  $c_{e0} = 8, 20$  und  $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; Darstellung der verschiedenen Regime

Als Induktionsphase wird, wie in Abschn. 4.1.4 (S. 69) bereits angedeutet, der Zeitbereich zwischen Zugabe der Lipaselösung und dem Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}_0$  bezeichnet. Es wird vermutet, dass diese Verzögerungszeit bis zur Erlangung des  $\hat{r}_0$ -Wertes, neben der Ausbildung der Phasengrenzfläche, hauptsächlich durch den Vorgang der Lipaseanlagerung an die Phasengrenze und der damit verbundenen Lipaseaktivierung beeinflusst wird. In der Literatur wurde ebenfalls eine solche Induktionsphase bei der Lipase-katalysierten Hydrolyse in Emulsionen, Monolayern sowie Micellen nach der Zugabe von Lipaselösung und Substrat beobachtet [65, 92]. Dabei wurde gezeigt, dass diese Verzögerungszeit nicht durch die Diffusion der Lipase zur Grenzfläche erfolgt, sondern aufgrund der relativ langsamen Anlagerung des Enzyms an die Substratoberfläche hervorgerufen wird. Die Geschwindigkeit des Anlagerungsprozesses wird durch die Packungsdichte der Substratmoleküle an der Phasengrenze

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

bestimmt. Basierend auf experimentellen Untersuchungen an Monolayern wird vermutet, dass die Lipaseanlagerung dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Lipase-katalysierten Hydrolyse im heterogenen System entspricht [65, 70]. Die Lipaseanlagerung an der Substratoberfläche bestimmt die Menge des Biokatalysators an der Phasengrenze [10]. Die Induktionsphase endet für die untersuchten Lipasekonzentrationen näherungsweise zum selben Zeitpunkt (Tab. 4.5). Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Vorgänge während der Induktionsphase lediglich zeitabhängig sind.

**Tabelle 4.5:** Zeiten und Umsätze der Regimeübergänge

$c_{e0}$ $\mu\text{g/ml}$	$t_{\text{Induktionsphase}}$ h	$X_{\text{Induktionsphase}}$	$t_{a-b}$ h	$X_{a-b}$	$t_{b-c}$ h	$X_{b-c}$
8	0,05	0,03	0,16	0,11	3,43	0,63
20	0,04	0,05	0,13	0,20	1,24	0,64
40	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	0,16	0,29	0,71	0,63
60	0,05	0,10	0,14	0,33	0,50	0,64
200	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	0,22	0,58	0,44	0,75

<sup>a</sup> Aufgrund von versuchstechnischen Gründen war keine Induktionsphase zuverlässig identifizierbar.

In Regime a sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}$  innerhalb von sechs Minuten für die betrachteten Lipasekonzentrationen über 50% ab. Mittels Differentialmethode wurden für die untersuchten Lipasekonzentrationen substratbezogene Reaktionsordnungen zwischen fünf und acht ermittelt. Eine substratbedingte Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit solch einer hohen Reaktionsordnung ist allerdings nicht sinnvoll. Die Beobachtung, dass für die untersuchten Konzentrationen Regime a näherungsweise zum selben Zeitpunkt beginnt und endet (Tab. 4.5), lässt auch hier auf einen zeitabhängigen Effekt schließen. Bei der Untersuchung des Aktivitätsverhaltens im Zweiphasensystem wurde innerhalb der ersten halben Stunde ein Abfall der Lipaseaktivität um 20 – 25 % beobachtet (Abb. 4.8 (A), S. 74). Daher wird vermutet, dass die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit durch den Aktivitätsverlust der Lipase im betrachteten Zeitraum herbeigeführt wurde. Ein Aktivitätsverlust wurde hauptsächlich durch die Lipaseadsorption an der o/w-Grenzfläche begründet (Abschn. 4.1.5.2, S. 72). Der Reaktionsgeschwindigkeitsverlauf in Regime a wird demnach durch das zeitabhängige Aktivitätsverhalten der Lipase bestimmt.

$$\hat{r}_{\text{Regime a}} = f_1(a) \quad (4.22)$$

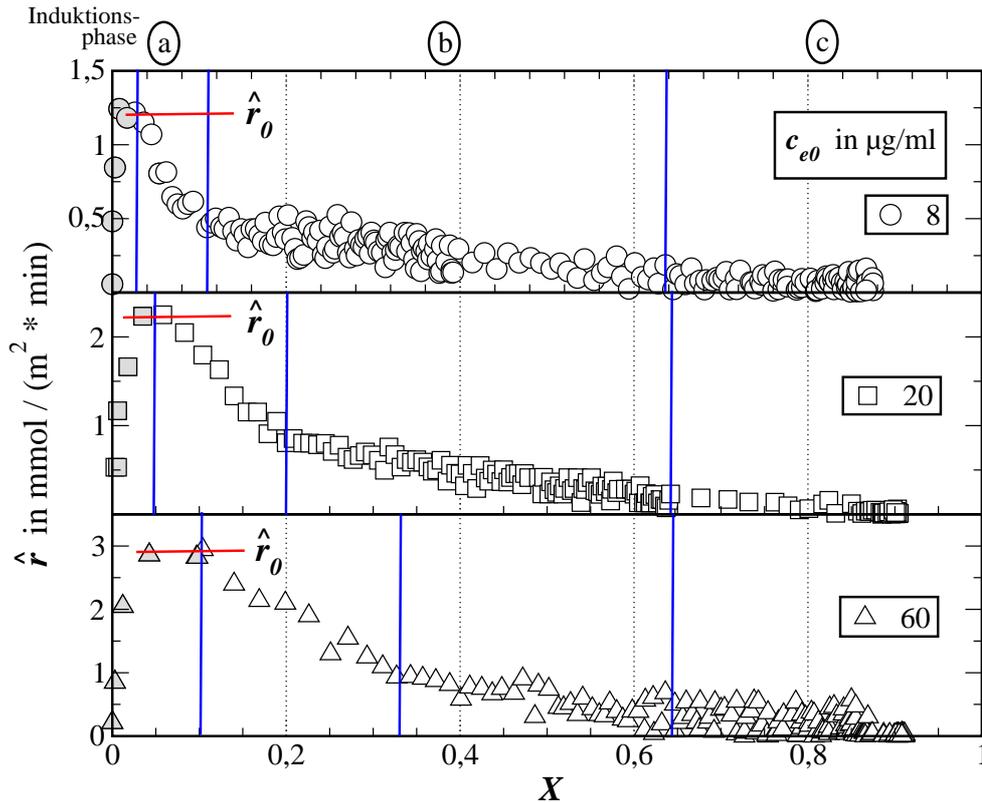
In Regime b fällt die Reaktionsgeschwindigkeit für alle untersuchten Lipasekonzentrationen weniger stark ab als in Regime a. Die substratbezogenen Reaktionsordnungen belaufen sich auf Werte zwischen 0,2 und 0,5. Diese niedrigen Reaktionsordnungen lassen einen überwiegenden Substrateinfluss auf den Reaktionsgeschwindigkeitsverlauf vermuten. Mit fortschreitender Reaktion sinkt die Substratkonzentration in der öligen Phase in dem Maße ab, wie der Umsatz ansteigt. Zum einen wird mit zunehmendem Umsatz die Diffusion der Ölmoleküle hin zur Phasengrenzfläche erschwert, da die Anzahl der Fettsäuremoleküle in der öligen Phase zunimmt. Zum anderen müssen die Ölmoleküle vermutlich einen längeren Weg zur Phasengrenze zurücklegen, dadurch wird mehr Zeit beansprucht. Das zweite Substrat Wasser liegt die gesamte Reaktionszeit über in einem Überschuss von mindestens 17 Mol-% vor und wirkt somit nicht limitierend auf die Reaktion. Des Weiteren lagern sich mit fortschreitender Reaktion grenzflächenaktive Reaktionsprodukte an der Phasengrenze an (Abb. 4.15, S. 89), die zu einer Herabsetzung der Substratmenge an der Grenzfläche führen. Zudem könnte die inhibierende Wirkung der Fettsäuren (Blockade des aktiven Zentrums) die Lipaseaktivität weiter herabsetzen. Vermutlich wird in Regime b der Reaktionsgeschwindigkeitsverlauf hauptsächlich durch die Reaktion bestimmt:

$$\hat{r}_{Regime\ b} = f_2(X_{Öl}) \quad (4.23)$$

Das Regime b endet für alle untersuchten Lipasekonzentrationen zu verschiedenen Reaktionszeiten, aber bei gleichen Umsätzen (Tab. 4.5), mit Ausnahme von  $c_{e0} = 200\ \mu\text{g/ml}$ .

Zu Beginn von Regime c ist die Reaktionsgeschwindigkeit der betrachteten Lipasekonzentrationen auf ungefähr 10% des Maximalwertes ( $\hat{r}_0$ ) abgefallen und sinkt im weiteren Verlauf bis auf Null ab. Für Regime c wird angenommen, dass weder der aktivitäts- noch der umsatzbedingte Effekt überwiegt.

In Abb. 4.21 ist der Reaktionsgeschwindigkeitsverlauf in Abhängigkeit vom Umsatz für drei Lipasekonzentrationen dargestellt. Da Induktionsphase und Regime a, wie vermutet, durch einen zeitbedingten Aktivitätseffekt bestimmt werden und die Reaktion bei verschiedenen Lipasekonzentrationen unterschiedlich schnell verläuft (Abb. 4.17), finden die Regimewechsel bei verschiedenen Umsätzen statt (Tab. 4.5). Die Beobachtung, dass der Übergang von Regime b zu c aller untersuchter Lipasemengen bei demselben Umsatz (64%) erfolgt (abgesehen von  $c_{e0} = 200\ \mu\text{g/ml}$ ), bestätigt die Annahme umsatzabhängiger Effekte in Regime b.



**Abbildung 4.21:** Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}$  in Abhängigkeit vom Umsatz für  $c_{e0} = 8, 20$  und  $60 \mu\text{g/ml}$ ; Darstellung der verschiedenen Regime

Der Kurvenverlauf der Abb. 4.20 und 4.21 innerhalb der ersten beiden Phasen (Induktionsphase und Regime a) wird mit den gewonnen Erkenntnissen wie folgt gedeutet: Durch die Lipaseadsorption im Grenzflächenfilm (Zunahme der grenzflächenspezifischen Enzymaktivität) steigt die Reaktionsgeschwindigkeit an. Gleichzeitig erfolgt eine Deaktivierung der adsorbierten Lipase. Mit der Zunahme adsorbierter Lipasemenge verringert sich zum einen die Adsorptiongeschwindigkeit. Zum anderen nimmt die Deaktivierung adsorbierter Lipase zu. Beide Prozesse (Lipaseadsorption und -deaktivierung) erreichen nach zwei Minuten einen Gleichgewichtszustand, der lediglich nur eine Minute andauert. Die Reaktionsgeschwindigkeit bleibt innerhalb dieser Zeit konstant. Danach überwiegt die Deaktivierung, die ein Absinken der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge hat. Rietsch *et al.* [70] beobachteten bei der Lipase-katalysierten Hydrolyse an einem o/w-Monolayer ebenfalls eine Induktionsphase und einen kurzen Zeitbereich, in dem die Reaktionsgeschwindigkeit konstant war. Sie erklärten dieses Verhalten ebenfalls mit dem gleichzeitigen Auftreten von Adsorption und Deaktivierung der Lipase.

**Fazit** Der Verlauf der grenzflächenspezifischen Reaktionsgeschwindigkeit ( $\hat{r}_0 \rightarrow \hat{r}(t)$ ) wird durch aktivitäts- und umsatzbedingte Phänomene bestimmt. Dabei kann

die Reaktionsgeschwindigkeit durch zwei funktionale Ausdrücke  $f_1$  und  $f_2$  beschrieben werden, wobei in  $f_1$  die Aktivität und in  $f_2$  der Umsatz eingehen.

$$\hat{r} \propto f_1(a) f_2(X_{\text{Ö1}}) \quad (4.24)$$

Regime a wird überwiegend durch die Funktion  $f_1$  beschrieben, Regime b hingegen wird hauptsächlich durch den Zusammenhang  $f_2$  beeinflusst.

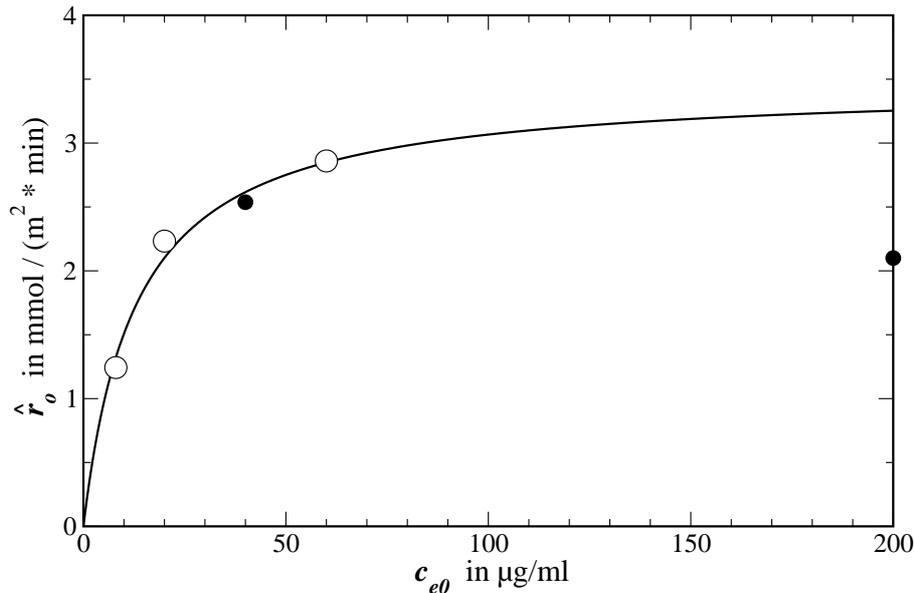
Allgemeiner betrachtet, unter Berücksichtigung der Variation der Lipasemenge sowie der pH- und Temperaturabhängigkeit, ergibt sich für die grenzflächenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit folgender Zusammenhang:

$$\hat{r} = k(T, pH) f(c_{e0}, a, X_{\text{Ö1}}) \quad (4.25)$$

Aufgrund der Beobachtung, dass sich die Emulsionseigenschaften bei Variation von nur einem Reaktionsparameter (z. B. der Rührergeschwindigkeit oder dem Volumenverhältnis der Phasen) in hohem Maße ändern und schlecht reproduzierbar sind, wurde von der Erstellung eines Modells, welches sowohl die reaktionsspezifischen als auch die physikalischen Phänomene befriedigend beschreibt, abgesehen. Zudem fehlte für eine Modellvalidierung eine zuverlässig quantitative Erfassung der wichtigen Einflussgrößen Aktivität und Phasengrenzfläche, da beide Größen unter den gegebenen Umständen nur qualitativ zuverlässig beschreibbar waren.

**Maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}_0$**  Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $\hat{r}_0$  entspricht bei der betrachteten Reaktion der Reaktionsgeschwindigkeit am Ende der Induktionsphase. In Abb. 4.22 sind die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der untersuchten Lipasekonzentrationen dargestellt. Nicht für alle Lipasekonzentrationen konnte ein zuverlässiger Wert für  $\hat{r}_0$  bestimmt werden (gefüllte Kreise). Für die Lipasekonzentrationen 10 und 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  wurde aus versuchstechnischen Gründen keine Induktionsphase identifiziert. Für beide Fälle wurde für  $\hat{r}_0$  der maximale Wert der Messreihe verwendet. Bei der Lipasekonzentration von 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  liegt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit deutlich niedriger als erwartet. Aufgrund der hochkonzentrierten Lipaselösung besteht die Möglichkeit, dass die Lipasemoleküle bereits bei der Präparation der Lösung (aufgrund von Agglomeration) und/oder während des Adsorptionsprozess in hohem Maße deaktiviert wurden.

Die adsorbierte Lipasemenge, die grenzflächenspezifische Häufigkeit der Ölmoleküle sowie die Lipaseaktivität werden als wesentliche Einflussgrößen für die maximale Re-



**Abbildung 4.22:** Abhängigkeit zwischen maximaler Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration (gefüllte Kreise: siehe Erläuterungen im Text; Anpassungskurve gemäß Gl. 4.27)

aktionsgeschwindigkeit erachtet. Dabei steht die adsorbierte Lipasemenge in direktem Zusammenhang mit der Lipasekonzentration der wässrigen Lösung  $c_{e0}$  (Abb. 4.12 (B), S. 84). Die grenzflächenspezifische Konzentration der Ölmoleküle, d. h. wie dicht die Ölmoleküle im Grenzflächenfilm gepackt sind, wird in erster Linie durch die Moleküleigenschaften der in beiden Grenzflächenfilmen befindlichen Substanzen sowie durch die Tropfengröße bestimmt. Das verwendete Phosphatpuffer/Öl-Verhältnis  $\gamma_{w/o}$  beeinflusst diese Eigenschaften maßgeblich. Die Lipaseaktivität  $a_0$  am Ende der Induktionsphase wird vermutlich überwiegend durch die Agglomeration der Lipasemoleküle, den Adsorptionsschritt an der Öl/Wasser-Grenzfläche und Scherkräfte bestimmt. Zusammengefasst ergibt sich für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit die folgende Abhängigkeit:

$$\hat{r}_0 = f(c_{e0}, a_0) \quad (4.26)$$

Der in Abb. 4.22 dargestellte Zusammenhang zwischen maximaler Reaktionsgeschwindigkeit und Lipasekonzentration entspricht einem Sättigungsverlauf und wird mit folgender Anpassungsgleichung gut beschrieben ( $R^2 = 0,993$ ),

$$\hat{r}_0 = \frac{\hat{k}_1 \hat{k}_2 c_{e0}}{1 + \hat{k}_2 c_{e0}} \quad (4.27)$$

dabei entsprechen  $\hat{k}_1 = 3,464 \text{ mmol (m}^2 \text{ min)}^{-1}$  und  $\hat{k}_2 = 0,077 \text{ ml } (\mu\text{g}_{\text{Lipase}})^{-1}$  den Anpassungsparametern. Mit zunehmender Lipasemenge in der wässrigen Phase ver-

ringert sich der freie Platz an der Phasengrenze. Eine Anlagerung nicht adsorbierter Lipase wird mit steigender bereits adsorbierter Lipasemenge zunehmend schwieriger. Ab einer Lipasekonzentration von  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  verringert sich die Zunahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Lipasekonzentration in der wässrigen Phase erheblich und  $\hat{r}$  strebt dem Grenzwert 3,5 entgegen. Es wird vermutet, dass die Phasengrenzfläche beim Erreichen des Grenzwertes mit Lipase gesättigt vorliegt.

### 4.3 Wirtschaftliche Lipasekonzentration

Die Halbwertszeiten<sup>10</sup>  $t_{1/2}$  von Lipasen in einer Emulsion (in dieser Arbeit 2 bis 5,4 Stunden, vgl. Tab. 4.1, S. 75) liegen deutlich unter den Halbwertszeiten jener Lipasen, die auf festen Materialien adsorbiert sind (z. B. 6 [37] und 43 [67] Tage)<sup>11</sup>. Bei hohen Lipasepreisen ( $251 \text{ €}/100 \text{ g}$ )<sup>12</sup> ist deshalb die Verwendung einer wirtschaftlichen Lipasekonzentration wichtig. Damit ist diejenige Konzentration gemeint, bei welcher in kurzen Zeiträumen hohe Umsätze erzielt werden, bei gleichzeitig geringem Lipaseüberschuss in der wässrigen Phase.

Bei den reaktionskinetischen Untersuchungen im Emulsionssystem war es nicht möglich, die Grenzflächenspannung zwischen Tropfen- und kontinuierlicher Phase zu messen. Dementsprechend konnte kein Belegungsgrad  $\theta_e$  nach einer in dieser Arbeit vorgestellten Methode ermittelt werden (Abschn. 4.2.1.1, S. 84). Für eine Abschätzung einer möglichen Grenzflächenbelegung wurde der theoretische Belegungsgrad  $\Upsilon$  herangezogen (Gl. 4.12, S. 86). Dieser berechnet sich im Falle einer Emulsion wie folgt:

$$\Upsilon = \frac{\text{Platzbedarf der Lipasemoleküle (m}^2\text{)}}{\text{Grenzflächengröße (alle Tropfen) (m}^2\text{)}} = \frac{A_{e,tot}}{A_{tr,tot}} \quad (4.28)$$

Tab. 4.6 zeigt die theoretischen Belegungsgrade  $\Upsilon$  für die untersuchten Lipasekonzentrationen zusammen mit den Reaktionszeiten  $t_{GG}$  beim Erreichen der Gleichgewichtsumsätze  $X_{GG}$  sowie den erzielten Umsätzen nach drei Stunden Reaktion. Die geringen Werte der theoretischen Belegungsgrade zwischen 2% und 40% für  $c_{e0} = 2 - 60 \mu\text{g}/\text{ml}$  deuten auf eine große Grenzfläche hin, die nicht mit Lipase gesättigt vorliegt, im Gegensatz zu  $c_{e0} = 200 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $\Upsilon = 1,36$ ).

---

<sup>10</sup>bezogen auf die Lipaseaktivität

<sup>11</sup>In beiden Fällen wurde Lipase aus *Candida rugosa* auf Zellulose-Membranen adsorbiert.

<sup>12</sup>Preis für die Lipase aus *Candida rugosa* Typ VII von Sigma Aldrich (2007)

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4.6:** Theoretische Belegungsgrade  $\Upsilon$ , Reaktionszeiten zum Erreichen des Endumsatzes  $X_{GG}$  und Umsätze nach drei Stunden Reaktionszeit bei der biokatalytischen Hydrolyse von Rapsöl im Emulsionssystem bei den verwendeten Reaktionsbedingungen

$c_{e0}$ $\mu\text{g/ml}$	$\Upsilon$	$t_{GG}(X_{GG})$ h	$X(t = 3 \text{ h})$
2	0,02	44,20	0,41
8	0,11	32,60	0,60
20	0,14	9,80	0,83
40	0,29	5,80	0,88
60	0,40	2,70	0,90
200	1,36	1,20	0,93

Allerdings tritt ein Widerspruch bezüglich der  $\Upsilon$ -Werten der Lipasekonzentrationen zwischen 60 und 200  $\mu\text{g/ml}$  und den in Abschn. 4.2.2.2 (S. 94) gewonnen Erkenntnissen auf. Aufgrund des nahezu gleichen Verlaufs der volumenspezifischen Phasengrenzfläche bei  $c_{e0} = 60$  und 200  $\mu\text{g/ml}$  wurde auf eine Sättigung der Grenzfläche geschlossen. Eine mögliche fehlerhafte Bestimmung der Tropfengröße (Abschn. 3.3.3, S. 57) bzw. Phasengrenzfläche wird als Ursache für diesen Widerspruch ausgeschlossen, da dies zu noch kleineren theoretischen Belegungsgraden geführt hätte.

Die Ermittlung einer optimalen Lipasekonzentration ist mit den vorliegenden Daten nicht möglich. Als wirtschaftlich sinnvolle Lipasekonzentration für das in dieser Arbeit betrachtete Reaktionssystem werden Werte aus dem Konzentrationsbereich zwischen 20 und 40  $\mu\text{g/ml}$  erachtet. Mit Lipasekonzentrationen dieser Größenordnung wird die Zielstellung, in kurzer Zeit mit einer geringstmöglichen Lipasekonzentration hohe Umsätze zu erzielen, erreicht.

# Kapitel 5

---

## Zusammenfassung und Ausblick

---

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hydrolyse von Rapsöl mit einer Lipase aus *Candida rugosa* in einem Emulsionssystem (w/o) hinsichtlich der Lipaseaktivität und grenzflächenbezogenen Reaktionsgeschwindigkeit unter Variation von untersuchungsrelevanten Parametern studiert. Dabei ist es gelungen, den Reaktionsfortschritt und die Grenzflächengröße des Zweiphasensystems parallel mit innovativen Methoden zu bestimmen.

Die kontinuierliche Bestimmung der Fettsäuremenge im dynamischen Zweiphasensystem in hoher zeitlicher Auflösung mittels einer entwickelten infrarotspektroskopischen Methode ist nachweislich in guter Qualität gelungen. Zur Detektion der mittleren Tropfengröße wurde die Photonendichtewellen-Spektroskopie in einem dynamischen Emulsionssystem (25 Vol.-% disperse Phase) angewandt. Eine abschätzende Untersuchung mittels Mikroskopie ergab, dass mit dieser Methode die zeitabhängige Entwicklung der Tropfengröße qualitativ gut beschreibbar ist.

Die Untersuchung des Reaktionseinflusses bei Variation der Reaktionsparameter *pH*-Wert, Temperatur, Verhältnis der Substratvolumina und Rührergeschwindigkeit ergab folgende Ergebnisse:

- Bei Verwendung eines *pH*-Wertes von 6,5 und einer Temperatur von 35 °C wurde eine maximale Spaltfähigkeit der Lipase bei verschiedenen Reaktionszeiten erzielt.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

- Eine Volumenvariation der dispersen Phase zwischen 18% und 30% führte zu keiner signifikanten Änderung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit. Dieser Befund ergab sich für alle untersuchten Lipasekonzentrationen.
- Eine Erhöhung der Rührergeschwindigkeit führte zu einem Anstieg der Umsetzungsgeschwindigkeit. Dies wird mit einer Verringerung der Tropfengröße begründet. Mit zunehmender Rührergeschwindigkeit erreicht die Umsetzungsgeschwindigkeit einen Grenzwert.

Ein Aktivitätsverlust der Lipase wurde sowohl in gerührter Enzymlösung als auch im Emulsionssystem (während der Reaktion) festgestellt. Im Fall von gerührter Enzymlösung wird dieser hauptsächlich der Wirkung von Scherkräften zugeschrieben. Hingegen der Aktivitätsverlust im Emulsionssystem, während der Lipolyse, überwiegend durch die Lipaseadsorption an der o/w-Grenzfläche begründet wird. Bei Verwendung höherer Lipasemengen wurde in beiden Systemen eine stärkere Aktivitätsabnahme beobachtet.

Bei Betrachtung der grenzflächenspezifischen Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Reaktionszeit sowie vom Umsatz, wurden drei reaktionsbestimmende Bereiche identifiziert: Induktionsphase, Regime a und Regime b. In der Induktionsphase adsorbiert Lipase an der Grenzfläche unter gleichzeitigem Auftreten von Lipasedeaktivierung, so die Vermutung. In Regime a wird die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit durch einen überwiegenden zeitabhängigen Effekt der Aktivitätsabnahme begründet. In Regime b wird eine weitere Verringerung der Umsetzungsgeschwindigkeit durch die Reaktion bedingten Phänomene, wie eine geringer werdende Substratkonzentration und Fettsäureinhibierung der Lipase vermutet.

Untersuchungen zu Vorgängen an der Phasengrenzfläche wurden anhand von Pendant-Drop-Messungen unternommen. Die Abnahme der Grenzflächenspannung aufgrund der grenzflächenaktiven Reaktionsteilnehmer wurde durch zwei Bereiche charakterisiert. Im physikalischen Regime wird die Abnahme der Grenzflächenspannung hauptsächlich durch die Lipaseanlagerung an die Grenzfläche, die am Ende des physikalischen Regimes einen Gleichgewichtszustand erreicht hat, vermutet. Durch Fettsäureadsorption an freie Bereiche der Grenzfläche wird im chemischen Regime die Grenzflächenspannung weiter abgesenkt. Es wird angenommen, dass Lipase Fettsäuren an der Grenzfläche verdrängt.

Eine Methode wurde hergeleitet, mit welcher aus Grenzflächenspannungsdaten der Belegungsgrad der Lipase an einer Oberfläche bekannter Größe abschätzbar ist. Dabei

wurde ermittelt, dass bei Lipasekonzentrationen  $< 4 \mu\text{g}/\text{ml}$  die gesamte Lipasemenge im Tropfenbulk an der Grenzfläche ( $23 \text{ mm}^2$ ) adsorbiert sein könnte.

Die Änderung physikalischer Parameter, wie z. B. Grenzflächenspannung und Viskosität, mit zunehmenden Reaktionsfortschritt ist vermutlich die Ursache für die gemessene Variation des mittleren Tropfendurchmessers bzw. der volumenspezifischen Grenzflächengröße. Die Änderung der mittleren Tropfengröße bis zum Erreichen eines Gleichgewichtswertes erfolgte innerhalb einer Stunde. Trifft die Vermutung zu, dass die Herabsetzung der Grenzflächenspannung im physikalischen Regime (ca. eine Stunde) hauptsächlich durch die Lipase erfolgt, dann wurde die Änderung der Tropfengröße überwiegend durch die Lipaseadsorption verursacht.

Die Lipase-katalysierte Hydrolyse im Emulsionssystem ist aufgrund der geringen Halbwertszeiten bezüglich der Aktivität und des hohen Enzympreises nicht wirtschaftlich. Gelingt es zukünftig nicht, die Lipase bei wesentlich geringeren Kosten zu gewinnen, so ist für einen industriellen Einsatz die auf Feststoffen adsorbierte Lipase gegenüber gelöster, in Emulsionen verwendeter, Lipase vorzuziehen.

**Ausblick** Aus denen in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und angestellten Betrachtungen ergeben sich folgende interessante Fragestellungen für weitere Untersuchungen:

- **Physikalisches und chemisches Regime**

Eine Verwendung von inaktiver Lipase mit identischen Oberflächeneigenschaften würde es ermöglichen, physikalisches und chemisches Regime weitergehend zu charakterisieren. Dann wäre eine Aussage darüber möglich, welchen Anteil die Lipase und die Fettsäuren jeweils an der Herabsetzung der Grenzflächenspannung im physikalischen bzw. chemischen Regime haben.

- **Lipasemenge im Tropfenbulk**

Bei den Untersuchungen am Einzeltropfen wurde angenommen, dass bei Lipasekonzentrationen  $< 4 \mu\text{g}/\text{ml}$  unter den gegebenen Reaktionsbedingungen alle in der wässrigen Phase vorhandenen Lipasemoleküle an der Tropfengrenzfläche adsorbieren ( $\theta_e \approx \Upsilon$ ). Bei Zutreffen dieser Annahme dürfte nach der Einstellung des Adsorptiongleichgewichtes keine Lipase mehr im Tropfen zu finden sein. Dies könnte durch eine Bestimmung der Lipasekonzentration im Tropfen nach dem Erreichen des Adsorptiongleichgewichtes geklärt werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

### ○ **Fettsäureinhibierung**

Mit Lipasen gleicher Anfangsaktivität aber unterschiedlicher Fettsäurehemmung wäre im Rahmen weiterer reaktionskinetischer Experimente der Effekt der Fettsäureinhibierung in Regime a und b genauer studierbar und damit von den anderen Effekten differenzierbar.

### ○ **Dynamik der Lipaseadsorption**

Mit Untersuchungen zur Dynamik der Lipaseadsorption, mit beispielsweise der Ellipsometrie, wären Aussagen dazu möglich, ob adsorbierte Lipase während der gesamten Reaktion an der Grenzfläche verweilt oder zurück in die wässrige Phase desorbiert, um erneut an der Grenzfläche zu adsorbieren.

---

## Literaturverzeichnis

---

- [1] AL-ZUHAIR, S., M. HASAN und K. B. RAMACHANDRAN: *Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase*. Process Biochem., 38:1155–1163, 2003.
- [2] ALBASI, C., N. BERTRAND und J. P. RIBA: *Enzymatic hydrolysis of sunflower oil in a standardised agitated tank reactor*. Bioprocess Eng., 20:77–81, 1999.
- [3] ANDREAS, J. M., E. A. HAUSER und W. B. TUCKER: *Boundary tension by pendant drops*. J. Phys. Chem., 42:1001–1019, 1938.
- [4] A.O.C.S.: *Official Method Ce 1-62. Fatty acid composition by gas chromatography. Sampling and analysis of commercial fats and oils*, 1990. 1-4.
- [5] ARAI, K., M. KONNO, Y. MATUNAGA und S. SAITO: *Effect of dispersed phase viscosity on the maximum stable drop size for break-up in turbulent flow*. J. Chem. Eng. Jpn., 10:325–330, 1977.
- [6] BAILEY, J. E. und D. F. OLLIS: *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw-Hill, New York, 2 Aufl., 1986.
- [7] BASHFORTH, F. und J. C. ADAMS: *An attempt to test the theory of capillary action*. Cambridge University Press, London, 1883.
- [8] BENZONANA, G. und P. DESNUELLE: *Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie au milieu hétérogène*. Biochim. Biophys. Acta, 105:121–136, 1965.

## Literaturverzeichnis

- [9] BENZONANA, G. und S. ESPOSITO: *On the positional and chain specificities of candida rugosa*. Biochim. Biophys. Acta, 231:15–22, 1971.
- [10] BERG, O. G., B. Z. YU, J. ROGERS und M. K. JAIN: *Interfacial catalysis by phospholipase A2: determination of the interfacial kinetic rate constants*. Biochemistry, 30:7283–7297, 1991.
- [11] BEVERUNG, C., C. RADKE und H. BLANCH: *Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements*. Biophys. Chem., 81:59–80, 1999.
- [12] BOMMARIUS, A. S. und B. R. RIEBEL: *Biocatalysis*. Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [13] BORGSTRÖM, B. und H. BROCKMAN: *Lipases*. Elsevier, New York, 1984.
- [14] BROCKERHOFF, H.: *On the function of bile salts and proteins as cofactors of lipases*. J. Biol. Chem., 246:5828–5831, 1971.
- [15] BROCKERHOFF, H.: *A model of pancreatic lipase and the orientation of enzymes at interfaces*. Chem. Phys. Lipids, 10:215–222, 1973.
- [16] BROCKERHOFF, H. und R. G. JENSEN: *Lipolytic enzymes*. Academic Press, New York, 1974.
- [17] BROCKMAN, H. L., J. H. LAW und F. J. KEZDY: *Catalysis of adsorbed enzymes*. J. Biol. Chem., 248:4965–4970, 1973.
- [18] BÜHLER, M. und C. WANDREY: *Enzymatische Fettspaltung*. Fett Wiss. Technol., 89:156–164, 1987.
- [19] CALDERBANK, P. H.: *Physical rate processes in industrial fermentation, part I: the interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation*. Chem. Eng. Res. Des., 36a:443–463, 1958.
- [20] CALDERBANK, P. H. und M. B. MOO-YOUNG: *The prediction of power consumption in the agitation of non-newtonian fluids*. Chem. Eng. Res. Des., 37a:26–33, 1959.
- [21] DAWSON, R. M. C. *Metab. Physiol. Significance Lipids*, Proc. Advan. Study Course, 1963, p. 179, 1963.

- [22] DE LAPLACE, P. S.: *Mechanique Celeste. Supplement to Book 10.* 1806.
- [23] DEREWENDA, U., A. M. BROZOWSKI, D. M. LAWSON und Z. S. DEREWENDA: *Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase.* *Biochemistry*, 31:1532–1541, 1992.
- [24] DEREWENDA, Z. S. und A. M. SHARP: *News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases.* *Trends Biochem. Sci.*, 18:20–25, 1993.
- [25] DUJARDIN, V.: *Biokatalytische Spaltung von Rapsöl: Untersuchung von reaktionsspezifischen Grenzflächenphänomenen mit Hilfe der Pendant-Drop-Methode.* Diplomarbeit, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, 2005.
- [26] EMA, T., J. KOBAYASHI, S. MAENO, T. SAKAI und M. UTAKA: *Origin of the enantioselectivity of lipases explained by a stereo-sensing mechanism operative at the transition state.* *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 71:443–453, 1998.
- [27] EMBERGER, B.: *Verfahren zur makroskopischen Erfassung von Tropfengrößenverteilungen in einer Wasser-in-Öl-Emulsion.* Studienarbeit, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, 2000.
- [28] FADILUĞLU, S. und Z. SÖYLEMEZ: *Kinetics of lipase-catalysed hydrolysis of olive oil.* *Food Res. Int.*, 30:171–175, 1997.
- [29] FLIPSEN, J. A. C., H. T. W. M. VAN DER HIJDEN, M. R. EGMOND und H. M. VERHEIJ: *Action of cutinase at the triolein-water interface. Characterisation of interfacial effects during lipid hydrolysis using the oil-drop tensiometer as a tool to study lipase kinetics.* *Chem. Phys. Lipids*, 84:105–115, 1996.
- [30] FULLBROOK, P. D.: *Practical applied Kinetics.* In: *Industrial enzymology: the application of enzymes in industry*, S. 8–40. Nature Press, New York, 1983.
- [31] FULLBROOK, P. D.: *Practical limits and prospects.* In: *Industrial enzymology: the application of enzymes in industry*, S. 41–110. Nature Press, New York, 1983.
- [32] GAN, Q., F. BAYKARA, H. RAHMAT und L. R. WEATHERLEY: *Analysis of a direct contact membrane reactor for lipase catalysed oil hydrolysis in a dynamic emulsion system.* *Catal. Today*, 56:179–190, 2000.
- [33] GAONKAR, A.: *Interfacial tensions of vegetable oil/water systems: effect of oil purification.* *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66:1090–1092, 1989.

## Literaturverzeichnis

- [34] GIORNO, L., R. MOLINARI, E. DRIOLI, D. BIANCHI und P. CESTI: *Performance of a biphasic organic/aqueous hollow fibre reactor using immobilized lipase*. J. Chem. Technol. Biotechnol., 64:345–352, 1995.
- [35] GOTO, M., M. GOTO, F. NAKASHIO, K. YOSHIZUKA und K. INOUE: *Hydrolysis of triolein by lipase in a hollow fiber membrane reactor*. J. Membr. Sci., 74:207–214, 1992.
- [36] GROUCHULSKI, P., Y. LI, J. D. SCHRAG, F. BOUTHILLIER, P. SMITH, D. HARRISON, B. RUBIN und M. CYGLER: *Insights into interfacial activation from an open structure of Candida rugosa lipase*. J. Biol. Chem., 268:12843–12847, 1993.
- [37] GUIT, R. P. M., M. KLOOSTERMAN, G. W. MEINDERSMA, M. MAYER und E. M. MEIJER: *Lipase kinetics: hydrolysis of tracetin by lipase from candida cylindracea in a hollow-fiber membrane reactor*. Biotechnol. Bioeng., 38:727–732, 1991.
- [38] GURKA, D.: *Entwicklung eines Zweiphasenreaktors zur enzymatischen Hydrolyse von Pflanzenölen*. Diplomarbeit, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, 2005.
- [39] HAN, D., H. RHEE und S. LEE: *Lipase reaction in aot-isoctane reversed micelles: effect of water on equilibria*. Biotechnol. Bioeng., 30:381–388, 1987.
- [40] HAN, D. und J. RHEE: *Characteristics of lipase-catalysed hydrolysis of olive oil in AOT-isoctane reversed micelles*. Biotechnol. Bioeng., 28:1250–1255, 1986.
- [41] HARTMEIER, W.: *Immobilisierte Biokatalysatoren*. Springer Verlag, Berlin, 1986.
- [42] HINZE, J. O.: *Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting in dispersion processes*. AIChE J., 1:289–295, 1955.
- [43] JURADO, E., F. CAMACHO, G. LUZON, M. FERNANDEZ-SERRANO und M. GARCIA-ROMAN: *Kinetic model for the enzymatic hydrolysis of tributyrin in o/w emulsions*. Chem. Eng. Sci., 61:5010–5020, 2006.
- [44] KARLSON, P., D. DOENECKE und J. KOOLMAN: *Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 14. Aufl., 1994.

- [45] KAWANO, Y., S. KIYOYAMA, K. SHIOMORI, Y. BABA und T. HANO: *Hydrolysis of olive oil with lipase in a vibromixer*. J. Ferment. Bioeng., 78:293–297, 1994.
- [46] KERKER, M.: *The scattering of light and other electromagnetic radiation*. Academic Press, New York, 1969.
- [47] KERY, V., J. TRANCIKOVA und S. SCHMIDT: *Hydrolysis of olive oil by pancreatic lipase in biphasic organic-aqueous system*. Collect. Czech. Chem. Commun., 54:2809–2813, 1989.
- [48] KIERKELS, H. G. T., L. F. W. VLEUGELS, J. H. A. KERN, E. M. MEIJER und M. KLOOSTERMAN: *Lipase kinetics: on-line measurement of the interfacial area of emulsions*. Enzyme Microb. Technol., 12:760–763, 1990.
- [49] KRÜGER, V.: *Untersuchungen zur Reaktionskinetik der enzymatischen Fettspaltung von Rapsöl*. Studienarbeit, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, 2001.
- [50] KWON, D. Y., K. H. KIM und J. S. RHEE: *Characteristics of lipases in two phase system*. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 15:43–48, 1987.
- [51] LABOURDENNE, S., N. GAUDRY-ROLLAND, S. LETELLIER, M. LIN, A. CAGNA, G. ESPOSITO, R. VERGER und C. RIVIERE: *The oil-drop tensiometer: potential applications for studying the kinetics of (phospho)lipase action*. Chem. Phys. Lipids, 71:163–173, 1994.
- [52] LEE, Y.-K. und C.-L. CHOO: *The kinetics and mechanism of shear inactivation of lipase from candida cylindracea*. Biotechnol. Bioeng., 33:183–190, 1989.
- [53] LOTTSPREICH, F. und H. ZORBAS: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998.
- [54] MACRAE, A. R. und R. C. HAMMOND: *Present and future applications of lipases*. Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 3:193–217, 1985.
- [55] MALCATA, F. X., C. G. HILL und C. H. AMUNDSON: *Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow fiber reactor. V: Effects of pH*. Biocatalysis, 33:177–219, 1993.

## Literaturverzeichnis

- [56] MALCATA, F. X., H. R. REYES, H. S. GARCIA, C. G. HILL, JR. und C. H. AMUNDSON: *Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases*. Enzyme Microb. Technol., 14:426–446, 1992.
- [57] MCLAREN, A. D. und L. PACKER: *Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous systems*. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 33:245–308, 1970.
- [58] MOMSEN, W. E., M. M. MOMSEN und H. L. BROCKMAN: *Lipid structural reorganization induced by the pancreatic lipase cofactor, procolipase*. Biochemistry, 34:7271–7281, 1995.
- [59] MONTERO, S., A. BLANCO, M. D. VIRTO, L. C. LANDETA, I. AGUD, R. SOLOZABAL, J. LASCARAY, M. DE RENOBALLES, M. J. LLAMA und J. I. SERRA: *Immobilization of candida rugosa lipase and some properties of the immobilized enzyme*. Enzyme Microb. Technol., 15:239–247, 1993.
- [60] MOORE, T. S.: *Lipid metabolism in plants*. LRC Press, New York, 1993.
- [61] MUDERHWA, J. M. und H. L. BROCKMAN: *Lateral lipid distribution is a major regulator of lipase activity. Implications for lipid-mediated signal transduction*. J. Biol. Chem., 267:24184–24192, 1992.
- [62] MUKATAKA, S., T. KOBAYASHI und J. TAKAHASHI: *Kinetics of enzymatic hydrolysis of lipids in biphasic organic-aqueous systems*. J. Ferment. Technol., 63:461–466, 1985.
- [63] NURY, S., G. PIÉRONI, C. RIVIÈRE, Y. GARGOURI, A. BOIS und R. VERGER: *Lipase kinetics at the triacylglycerol-water interface using surface tension measurements*. Chem. Phys. Lipids, 45:27–37, 1987.
- [64] PADMINI, P., S. RAKSHIT und A. BARADARAJAN: *Kinetics of enzymatic hydrolysis of rice bran oil in organic system*. Enzyme Microb. Technol., 16:432–435, 1994.
- [65] PATTUS, F., A. J. SLOTBOOM und G. H. DE HAAS: *Regulation of phospholipase A2 activity by the lipid-water interface: a monolayer approach*. Biochemistry, 18:2691–2697, 1979.
- [66] PENCREAC'H, G., M. LEULLIER und J. BARATTI: *Properties of free and immobilized lipase from pseudomonas cepacia*. Biotechnol. Bioeng., 56:181–189, 1997.

- [67] PRONK, W., P. KERKHOF, C. VAN HELDEN und K. VAN'T RIET: *The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in a hydrophilic membrane reactor*. Biotechnol. Bioeng., 32:512–518, 1988.
- [68] REICH, O.: *Photonendichtewellenspektroskopie mit intensitätsmodulierten Diodenlasern*. Dissertation, Universität Potsdam, 2005.
- [69] REICH, O., H.-G. LÖHMANNSRÖBEN und F. SCHAEEL: *Optical sensing with photon density waves: investigation of model media*. Phys. Chem. Chem. Phys., 5:5182–5187, 2003.
- [70] RIETSCH, J., F. PATTUS, P. DESNUELLE und R. VERGER: *Further studies of mode of action of lipolytic enzymes*. J. Biol. Chem., 252:4313–4318, 1977.
- [71] ROTENBERG, Y., L. BORUVKA und A. W. NEUMANN: *Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces*. J. Colloid Interface Sci., 93:169–183, 1983.
- [72] RUCKA, M. und B. TURKIEWICZ: *Hydrolysis of sunflower oil by means of hydrophobic membrane with lipolytic activity*. Biotechnol. Lett., 11:167–172, 1989.
- [73] RUCKA, M. und B. TURKIEWICZ: *Ultrafiltration membranes as carriers for lipase immobilization*. Enzyme Microb. Technol., 12:52–55, 1990.
- [74] SARDA, L. und P. DESNUELLE: *Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion*. Biochim. Biophys. Acta, 30:513–521, 1958.
- [75] SAULICH, K. und K. SCHNITZLEIN: *Online-Monitoring der lipase-katalysierten Hydrolyse von Rapsöl*. Chemie Ingenieur Technik, 76:337–340, 2004.
- [76] SCHNITZLEIN, K.: *Enzymatische Fettspaltung zur industriellen Aufarbeitung nachwachsender Rohstoffe*. Forschungsbericht, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, 2000.
- [77] SCHRAG, J. D. und M. CYGLER: *Lipases and  $\alpha/\beta$  hydrolase fold*. Methods Enzymol., 284:85–107, 1997.
- [78] SCHUBERT, H. und H. KARBSTEIN: *Herstellung und Stabilität von Emulsionen am Beispiel von Lebensmitteln*. In: *Technik der mehrphasigen Strömung nicht-mischbarer fluider Phasen, Schäume und Emulsionen*, S. 1–25. GVC - VDI, 1992.

## Literaturverzeichnis

- [79] SCHUCHMANN, H. P. und T. DANNER: *Emulgieren: mehr als nur Zerkleinern*. Chem. Ing. Tech., 76:364–375, 2004.
- [80] SCHUCHMANN, H. P. und H. SCHUCHMANN: *Lebensmittelverfahrenstechnik - Rohstoffe, Prozesse, Produkte*. Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [81] SCHULZ, T.: *Molekulare Grundlagen der Stereoselektivität Lipase-katalysierter Umsetzungen*. Dissertation, Universität Stuttgart, 2001.
- [82] SEGEL, I. H.: *Enzyme kinetics - behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. John Wiley & Sons, New York, 1975.
- [83] SHARMA, R., Y. CHISTI und U. C. BANERJEE: *Production, purification, characterization and applications of lipases*. Biotechnol. Adv., 19:627–662, 2001.
- [84] SHIOMORI, K., T. HAYASHI, Y. BABA, Y. KAWANO und T. HANO: *Hydrolysis rates of olive oil by lipase in a monodispersed o/w emulsion system using membrane emulsification*. J. Ferment. Bioeng., 80:552–558, 1995.
- [85] SKOOG, D. A. und J. J. LEARY: *Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen*. Springer Verlag, Berlin, 1996.
- [86] STAHMANN, K.-P., T. BÖDDECKER und H. SAHM: *Regulation and properties of a fungal lipase showing interfacial inactivation by gas bubbles, droplets of lipids or fatty acid*. Eur. J. Biochem., 244:220–225, 1997.
- [87] STAUFFER, C.: *The measurement of surface tension by the pendant drop technique*. J. Phys. Chem., 69:1933–1938, 1965.
- [88] TANIGAKI, M., M. SAKATA, H. TAKAYA und K. MIMURA: *Hydrolysis of palm stearin oil by a thermostable lipase in a draft tube-type reactor*. J. Ferment. Bioeng., 80:340–345, 1995.
- [89] TSAI, S. W., G. H. WU und C. L. CHIANG: *Kinetics of enzymatic hydrolysis of olive oil in biphasic organic-aqueous systems*. Biotechnol. Bioeng., 38:762–768, 1991.
- [90] TUCHIN, V. V.: *Handbook of optical biomedical diagnostics*. SPIE Press, Bellingham, 2002.

- [91] VAN DER PADT, A., M. J. EDEMA, J. J. W. SEWALT und K. VAN'T RIET: *Enzymatic acylglycerol synthesis in a membrane bioreactor*. J. Am. Oil Chem. Soc., 67:347–352, 1990.
- [92] VERGER, R.: *Enzyme kinetics of lipolysis*. Methods Enzymol., 64:340–392, 1980.
- [93] VERGER, R. und G. H. DE HAAS: *Enzyme Reactions in a membrane model: a new technique to study enzyme reactions in monolayers*. Chem. Phys. Lipids, 10:127–136, 1973.
- [94] VERGER, R. und G. H. DE HAAS: *Interfacial enzyme kinetics of lipolysis*. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 5:77–117, 1976.
- [95] WACHTER, G.: *Quantitative IR-Spektrometrie*. Perkin Elmer, Heft 29, 1993.
- [96] WALDE, P. und P. L. LUISI: *A continuous assay for lipase in reverse micelles based on fourier transform infrared spectroscopy*. Biochemistry, 28:3353–3360, 1989.
- [97] WALSTRA, P.: *Encyclopedia of emulsion technology Vol. 1*, Kap. Formation of emulsions. Marcel Dekker, New York, 1983.
- [98] WALSTRA, P.: *Principles of emulsion formation*. Chem. Eng. Sci., 48:333–349, 1993.
- [99] WARMUTH, W.: *Hydrolyse von Triglyzeriden mit immobilisierter Lipase*. Dissertation, Technische Universität München, 1995.
- [100] YOUNG, T.: *Miscellaneous Works*, Bd. I. John Murray, London, 1855.



# Anhang A

---

## Verwendete Chemikalien

---

**Tabelle A.1:** Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Isooctan	Merck, Darmstadt, D
Isosulfanblau	Merck, Darmstadt, D
Kalilauge in Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Lipase aus <i>Candida rugosa</i> Typ VII	Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Phenolphthalein	Merck, Darmstadt, D
Rapsöl (raffiniert)	Kunella Feinkost, Cottbus, D
Spaltfettsäure von Rapsöl	Prignitzer Chemie, Wittenberge, D



# Anhang B

---

## Reaktionsparameter

---

### B.1 Lipaseaktivität in gerührter Lösung

**Tabelle B.1:** Versuchsparameter – Messung der Aktivität in einer Lipaselösung

Lipasepräparat	Sigma Lipase VII aus <i>Candida rugosa</i>
Lipasekonzentration $c_{e0}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Volumen 0,1 M Phosphatpuffer $V_p$	900 ml
Temperatur $T$	35 °C
pH-Wert (0,1 M Phosphatpuffer)	6,5
Rührergeschwindigkeit $n_R$	200, 250, 300 $\text{min}^{-1}$
Rührerart	Viskopropührer (vierflügelig)

## B.2 Lipaseaktivität während der Lipolyse

**Tabelle B.2:** Versuchsparameter – Messung der Aktivität während der Reaktion im Emulsionssystem

Lipasepräparat	Sigma Lipase VII aus <i>Candida rugosa</i>
Lipasekonzentration $c_{e0}$	2, 4, 8 $\mu\text{g/ml}$
Rapsölvolumen $V_{\text{Öl}}$	675 ml
Volumen 0,1 M Phosphatpuffer $V_p$	225 ml
Temperatur $T$	35 °C
pH-Wert (0,1 M Phosphatpuffer)	6,5
Rührergeschwindigkeit $n_R$	250 $\text{min}^{-1}$
Rührerart	Viskopropührer (vierflügelig)

## B.3 Einfluss verschiedener Reaktionsparameter im Emulsionssystem – Referenzsystem (I) und (II)

**Tabelle B.3:** Reaktionsbedingungen von Referenzsystem (I) – Temperatur, pH-Wert und Rührergeschwindigkeit

Lipasepräparat	Sigma Lipase VII aus <i>Candida rugosa</i>
Lipasekonzentration $c_{e0}$	13 und 24 $\mu\text{g/ml}$
Reaktionsvolumen $V_{RK}$	100 ml
Volumenverhältnis $\gamma_{w/o}$	1
Temperatur $T$	40 °C
pH-Wert (0,1 M Phosphatpuffer)	6,5
Rührergeschwindigkeit $n_R$	700 $\text{min}^{-1}$
Rührerart	Magnetührkern (Stäbchen: 3,5 $\times$ 1 cm)

**Tabelle B.4:** Reaktionsbedingungen von Referenzsystem (II) – Substratverhältnis

Lipasepräparat	Sigma Lipase VII aus <i>Candida rugosa</i>
Lipasemasse $m_{e0}$	0,2 – 3,6 mg
Reaktionsvolumen $V_{RK}$	80 ml
Volumenverhältnis $\gamma_{w/o}$	0,23 0,33 0,45
Temperatur $T$	35 °C
pH-Wert (0,1 M Phosphatpuffer)	6,5
Rührergeschwindigkeit $n_R$	300 min <sup>-1</sup>
Rührerart	Propellerrührer (dreiflügelig)

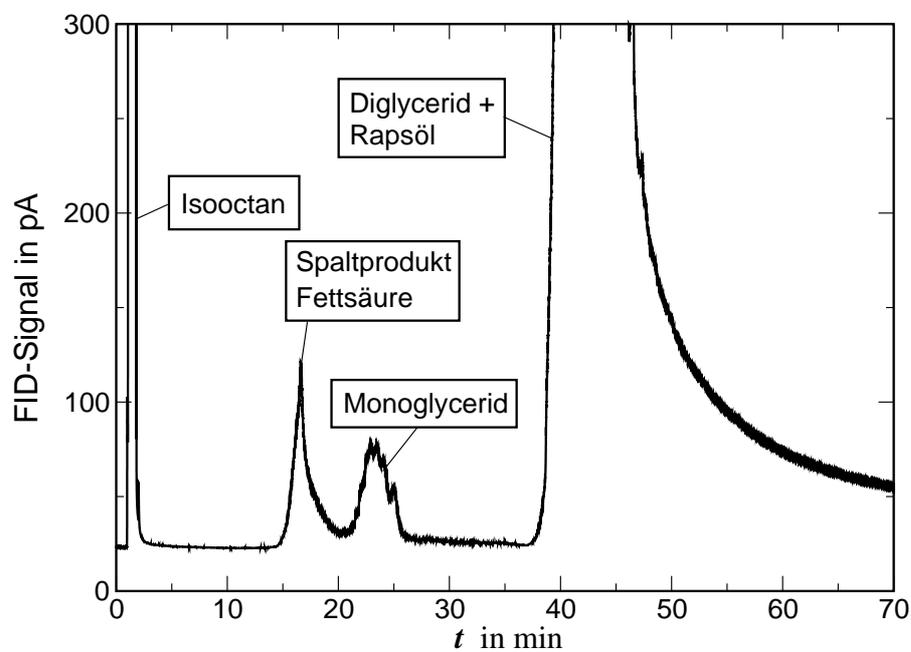
**Tabelle B.5:** Methoden der Fettsäureanalyse bei der Untersuchung verschiedener Reaktionsparameter

Reaktionsparameter	Analysemethode
pH und Temperatur	Titration
Rührergeschwindigkeit	Titration
Substratverhältnis	FTIR



# Anhang C

## GC-Analyse – Chromatogramm der Reaktionsprodukte



**Abbildung C.1:** Chromatogramm der Reaktionsprodukte bei 0,2% Umsatz (experimentelle Daten gemäß [25])



# Anhang D

---

## Korrektur der originären FTIR-Messergebnisse

---

Die mit der Kalibriergleichung Gl. 3.23 (S. 47) berechnete Fettsäuremenge  $n_{FFS,FTIR}$  ist aufgrund des angeätzten ATR-Kristalls verfälscht. Der Korrekturfaktor  $a_{FTIR}$  ergibt sich nach Gl. D.1 aus dem Verhältnis von realer zur verfälschten Fettsäuremenge zum Zeitpunkt  $t_{end}$  am Ende des Experimentes. Die dafür benötigte reale Fettsäuremenge  $n_{FFS,KOH,Rk}$  wurde offline durch Titration bestimmt (Abschn. 3.3.1, S. 35).

$$a_{FTIR} = \frac{n_{FFS,KOH,Rk}(t_{end})}{n_{FFS,FTIR}(t_{end})} \quad (D.1)$$

Die originären Fettsäuremengen  $n_{FFS,FTIR}$  eines Experimentes multipliziert mit dem Korrekturfaktor  $a_{FTIR}$  ergeben die korrigierten Fettsäuremengen  $n_{FFS,FTIR,korr}$ .

$$n_{FFS,FTIR,korr}(t) = a_{FTIR} \cdot n_{FFS,FTIR}(t) \quad (D.2)$$

Dabei wird angenommen, dass der Korrekturfaktor zu jedem Zeitpunkt des Experimentes konstant ist.



# Anhang E

---

## Tropfengrößenbestimmung mittels Mikroskopie

---

**Tabelle E.1:** Mikroskopische Bestimmung des Sauter-  
durchmessers zur Validierung der PDW-Spektroskopie zu  
verschiedenen Zeitpunkten einer Hydrolyse

Zeit h	alle gemessenen Tropfen	
	$d_{tr,32,M}$ $\mu\text{m}$	betrachtete Tropfenzahl -
0,58	80,12	757
0,98	78,83	558
1,77	59,38	1279
2,83	56,50	1541
Mittel	$\approx 69$	

*E Tropfengrößenbestimmung mittels Mikroskopie*

Zeit h	Tropfen bis $70 \mu\text{m}$	
	$d_{tr,32,M}$ $\mu\text{m}$	betrachtete Tropfenzahl -
0,58	37,06	732
0,98	41,18	534
1,77	36,52	1262
2,83	34,14	1523
Mittel	$\approx 37$	