



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Hochschule Neubrandenburg

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Lebensmitteltechnologie

WS 2010/2011

Zur Lipase-katalysierten 1,3-selektiven Veresterung von Glycerinformal

BACHELOR-ARBEIT

Verfasser: Paul Rakowski

Betreuer: Prof. Dr. Mark Rüschen gen. Klaas
Prof. Dr. Karl Steffens

Neubrandenburg, 17.02.2011

ABSTRACT

In the present work the regioselective lipase-catalysed transesterification of glycerol formal with lauric acid methyl ester was investigated. Based on the essay “Selective esterification of glycerol formal” of Rüschen, Klaas et al. (2007) who examined the applicability of a homogeneous biocatalyst for that purpose, this work is intended to determine the applicability of a heterogeneous 1,3-selective lipase. “Lipozyme RM IM” (Novozymes) was used. It is the lipase of *Rhizomucor miehei* immobilized on the macroporous anion exchange resin “Duolite A568” (Amberlite). Attempts to adjust the reaction conditions in order to reach roughly the high conversion and selectivity of Rüschen, Klaas et al. failed. It is suspected that the carrier material is not suitable for that purpose, especially because it consists of phenol-formaldehyde polycondensate.

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

5R	1,3-Dioxolan-4-yl-methanol
5RE	5-Ring-Ester
6R	1,3-Dioxan-5-ol
6RE	6-Ring-Ester
DAG	Diacylglycerid
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatograph(ie)
GF	Glycerinformal
GLC	Gas-Flüssigkeits-Chromatographie
LM	Lösungsmittel
LSME	Laurinsäuremethylester
LSMEnr	nicht reagierter (nach der Reaktion im Reaktionsgemisch verbliebe- ner) Laurinsäuremethylester
LSVE	Laurinsäurevinylester
MAG	Monoacylglycerid
n.r.	nicht reagiert
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
RML	<i>Rhizomucor miehei</i> Lipase
SSG	Substandardglycerin
TAG	Triacylglycerid

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	5
1.1. DERIVATISIERUNG VON GLYCERIN.....	5
1.2. GLYCERINFORMAL	5
1.3. REGIOSELEKTIVE VERESTERUNG MITTELS LIPASEN	7
1.4. IMMOBILISATION VON ENZYMEN.....	9
2. MATERIAL & METHODEN.....	10
2.1. MATERIALIEN.....	10
2.1.1. CHEMIKALIEN.....	10
2.1.2. BIOKATALYSATOREN	10
2.1.3. GERÄTE	10
2.1.4. SONSTIGE MATERIALIEN	11
2.2. METHODEN.....	11
2.2.1. REAKTIONSFÜHRUNG & -BEDINGUNGEN	11
2.2.2. GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE	12
2.2.3. AUSWERTUNG DER CHROMATOGRAMME.....	13
2.2.4. INAKTIVIERUNG DER HETEROGENEN LIPASE.....	17
3. ERGEBNISSE & DISKUSSION	18
3.1. VORVERSUCHE MIT HOMOGENER LIPASE	18
3.2. WIEDERFINDUNG VON UMSATZ & SELEKTIVITÄT MIT HOMOGENER LIPASE.....	19
3.3. SUCHE GEEIGNETER REAKTIONSBEDINGUNGEN MIT HETEROGENER LIPASE.....	21
3.3.1. NUTZUNG DER HETEROGENEN LIPASE UNTER UNVERÄNDERTEN BEDINGUNGEN.....	21
3.3.2. VERDOPPLUNG DER ENZYMMENGE	22
3.3.3. pH-PUFFERUNG MIT SALZEN	24
3.3.4. ERMITTLUNG DES EINFLUSSES DES TRÄGERMATERIALS.....	26
4. ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK.....	28
5. LITERATURVERZEICHNIS	30
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	32
7. TABELLENVERZEICHNIS.....	32
8. FORMELVERZEICHNIS	33
9. ANLAGENVERZEICHNIS	34
ERKLÄRUNG ÜBER DIE SELBSTSTÄNDIGE ANFERTIGUNG DER ARBEIT.....	49

1. EINLEITUNG

1.1. DERIVATISIERUNG VON GLYCERIN

Die Nachfrage nach Biodiesel als erneuerbare Alternative zu Dieselkraftstoff steigt aus ökonomischen und ökologischen Gründen stetig. Bei Biodiesel handelt es sich um Fettsäuremethyl- bzw. ethylester, die durch Umesterung von TAG mittels Methanol bzw. Ethanol erzeugt werden [7]. Bei der Herstellung von 10 kg Biodiesel fällt als Nebenprodukt ca. 1 kg Glycerin an [11]. Die Nutzung des Glycerins stellt große Probleme dar. Zur Herstellung hochwertiger Produkte wird reines Glycerin benötigt. Die Aufreinigung des s.g. SSG ist jedoch aufwändig und teuer und wird durch sinkende Preise von reinem Glycerin immer weniger lukrativ. Die Verbrennung von Glycerin zur Energiegewinnung wäre eine Alternative, zumal die Energie wieder in der Biodieselproduktion genutzt werden könnte. Die hohe Viskosität und Selbstzündungstemperatur des Glycerins macht eine saubere Verbrennung allerdings schwierig und erhöht das Risiko toxischer Emissionen [16]. Der Überschuss an Glycerin könnte sich nachteilig auf die Wettbewerbsfähigkeit von Biodiesel auswirken [7]. Es müssen Alternativen zur Nutzung des überschüssigen Glycerins gefunden werden, die trotz Aufreinigung des SSG rentabel sind. Da Glycerin mit seinen drei OH-Gruppen ein sehr reaktives Molekül ist, kann es zu unzähligen Derivaten, wie Estern, Polyethern und Alkydharzen synthetisiert werden. Eine große Anzahl von Patenten und wissenschaftlichen Publikationen zur Derivatisierung von Glycerin wurde bereits veröffentlicht [2][11]. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der enzymatisch katalysierten 1,3-selektiven Veresterung von GF.

1.2. GLYCERINFORMAL

GF wird gebildet durch Acetalisierung des Glycerins mit Formaldehyd (Anlage 1) und ist das einfachste zyklische Acetal des Glycerins. Vorteilhafterweise sind Reaktionsführungen bekannt, die die Nutzung des SSG ohne Aufreinigung erlauben [6]. Formaldehyd wird durch Methanol gewonnen, welches wiederum durch die Oxidation von Erdgas (Methan) hergestellt wird [7]. Da sich die drei OH-Gruppen des Glycerins kaum in ihrer Reaktivität unterscheiden kommen grundsätzlich zwei Konstitutionsisomere der Glycerinacetale bzw. -ketale vor (Abb. 1). Gewöhnlich werden daher Dioxan (6-Ring) und Dioxolan (5-Ring) gleichermaßen gebildet. Reaktionsparameter wie die Temperatur, das Verhältnis von Glycerin zu Aldehyd bzw. Keton und die Art des LM bestimmen das Verhältnis beider Konstitutionsisomere. Die Reak-

tion von Glycerin mit Aceton in Dichlormethan bei 40 °C führt fast ausschließlich zum Dioxolan. Bei Verwendung von Formaldehyd unter sonst gleichen Bedingungen liegt das Verhältnis von 5- zu 6-gliedrigem Ring bei 22:78 [2]. In der Reinform liegt das Isomerenverhältnis des GF bei 60 % 6R und 40 % 5R [20].

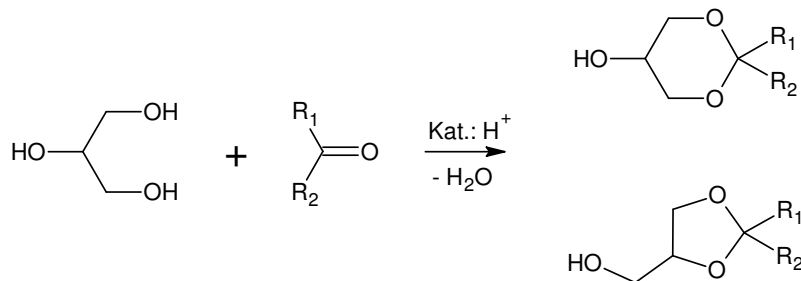


Abb. 1: Acetalisierung des Glycerins (R = H, Alkylgruppe)

Da GF nicht toxisch für den Menschen ist, besteht ein breites Anwendungsgebiet für diesen Stoff. Nennenswerte Anwendungsmöglichkeiten sind Pharmazeutika, Pestizide und Medikamente [24]. Einige wissenschaftliche Publikationen berichten über verbesserte Eigenschaften von Biodiesel mit GF als Additiv [8][7][12]. Aber vor allem die Anwendung als LM auf biogener Basis scheint Erfolg versprechend zu sein. Eine Vielzahl der bislang vorwiegend aus Erdöl und Erdgas gewonnenen LM weist ein für Mensch und Umwelt unverträgliches und schädliches Potential auf. Die hervorragende Human- und Umweltverträglichkeit, geringe Flüchtigkeit, geringe Viskosität und gute Lösungskraft für eine Vielzahl an verschiedenen Chemikalien macht GF zu einer vortrefflichen Alternative für bisher eingesetzte LM. Dabei scheint der 5R als primärer Alkohol am besten geeignet zu sein [3]. Außerdem können die Löslichkeit oder andere physikalische Eigenschaften sehr leicht durch weitere Reaktionen an der verbliebenen OH-Gruppe verändert werden. Dadurch können sehr unpolare als auch sehr polare Derivate von dem 5R produziert werden [2]. Eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit von dem 5R resultiert aus dem stereogenen Zentrum. Diese Eigenschaft macht es zu einem kostengünstigen Ausgangsstoff in der Herstellung chiraler Dotierstoffe in Flüssigkristalldisplays [1]. Darüber hinaus sind auch Anwendungen bekannt, in denen Formaldehyd als Schutzgruppe eingefügt wird. So können MAG bei direkter Veresterung mit Fettsäuren hergestellt werden, ohne DAG und TAG als Nebenprodukte zu erhalten [17]. Eine Acylmigration kann somit ausgeschlossen werden [5].

Die Bildung von dem 5R ist aufgrund der geringeren Ringspannung kinetisch begünstigt. Durch Ringtransformation (Abb. 2) bildet sich aber rasch das thermodynamische Gleichgewicht zwischen 5R und 6R heraus. Eine Isomerentrennung im industriellen Maßstab ist daher

nur möglich, wenn eines der Isomere in ein Derivat mit ausreichend unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften überführt [9] und gleichzeitig die Ringtransformation ausgeschlossen werden kann. Das ist möglich sofern die verbliebene OH-Gruppe verestert wird.

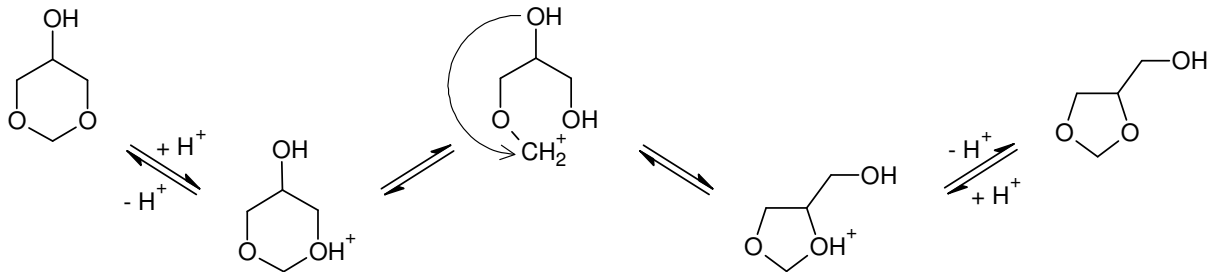


Abb. 2: Ringtransformation

1.3. REGIOSELEKTIVE VERESTERUNG MITTELS LIPASEN

Eine interessante Möglichkeit zur Isomerentrennung stellt die regioselektive Veresterung mittels 1,3-selektiver Lipasen (Triacylglycerolhydrolasen) (EC 3.1.1.3) dar [25]. Viele Lipasen sind 1,3-selektiv. Sie reagieren bevorzugt mit den primären OH-Gruppen [18]. Da Derivate von dem 5R erzeugt werden sollen, sollte die Wahl auf möglichst 1,3-selektive Lipasen fallen. Die natürliche Aufgabe der Lipasen in wässrigen Lösungen ist die Hydrolyse von TAG zu Glycerin und Fettsäuren. Dennoch ist es möglich mit ihnen eine große Bandbreite unterschiedlichster natürlicher als auch unnatürlicher Substrate umzusetzen [5]. Wie alle Hydrolasen benötigen Lipasen keine Cofaktoren. Im Unterschied zu anderen Hydrolasen setzen sie bevorzugt komplex aufgebaute Alkohole mit langkettigen lipophilen Säuren um [13]. Da ihre Substrate i.d.R. wasserunlöslich sind, besitzen Lipasen die herausragende Eigenschaft aktiv in organischen LM zu sein [5]. Ihre Aktivität ist in unpolaren Medien häufig sogar höher, weil die Löslichkeit lipophiler Substrate zunimmt und Nebenreaktionen der Substrate mit dem polaren LM Wasser vermieden werden können [13]. Das chemische Gleichgewicht verschiebt sich in organischen LM aufgrund der geringen Konzentration von Wasser zugunsten der Kondensationsreaktion. Das ermöglicht Veresterungen des GF mit Fettsäuren bzw. Umesterungen mit Fettsäureestern [25]. Dennoch ist eine molekulare Wasserschicht für die Aktivität von Lipasen zwingend erforderlich. Das Wasser bildet eine Hydrathülle um das Enzym und schützt damit die für die katalytische Aktivität wichtige Konformation des aktiven Zentrums [13]. Andere polare LM außer Wasser sind ebenso wenig geeignet, da die Hydrathülle in das umgebende Medium diffundieren würde [19]. Eine eigentümliche Eigenschaft, der fast alle Lipasen gehorchen ist die Grenzflächenaktivierung. Bei geringen Konzentrationen liegt das

Substrat gelöst vor. Ab einer bestimmten Konzentration bildet das Substrat Mizellen aus und ab dieser s.g. kritischen Mizellen-Konzentration steigt die Lipase-Aktivität sprunghaft [23]. Verantwortlich dafür ist eine Ausstülpung des Enzyms, die den Zutritt zum aktiven Zentrum versperrt. Diese, treffend als Deckel formulierte Ausstülpung ist außen hydrophil aber auf der Innenseite hydrophob. An einer hydrophil/hydrophoben Grenzfläche löst der Deckel auf einer Seite ab und das aktive Zentrum liegt frei. Die Wahl eines geeigneten LM und optimaler Substratkonzentrationen für eine bestimmte Reaktion müssen experimentell bestimmt werden [13]. Liefert das Screening der Reaktionsbedingungen noch nicht das gewünschte Ergebnis weil zu wenige Erträge erzielt werden, so können Variationen des Acylrests Abhilfe schaffen. Der Acylrest bestimmt über die Art der Abgangsgruppe (Abb. 3). Da die Abgangsgruppe mit dem Alkohol um das Acyl-Enzym konkurriert sind solche Acylreste zu bevorzugen, bei denen schwächere nucleophile Abgangsgruppen als der zu acylierende Alkohol entstehen oder aber die Abgangsgruppe zu Verbindungen isomerisiert, welche aus dem Reaktionsgeschehen ausscheiden. Das bei Veresterungen entstehende Wasser muss aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden um Rückreaktionen zu unterbinden. Daher sind Umesterungen der Veresterung vorzuziehen. Eine elegante Methode ist die Acylierung mit Vinylacrylaten, da der Vinylalkohol als Abgangsgruppe instabil ist und zu Acetaldehyd isomerisiert. Die Abgangsgruppe wird dadurch dem Reaktionsgleichgewicht irreversibel entzogen. Eine Rückreaktion ist nicht möglich [13][25].

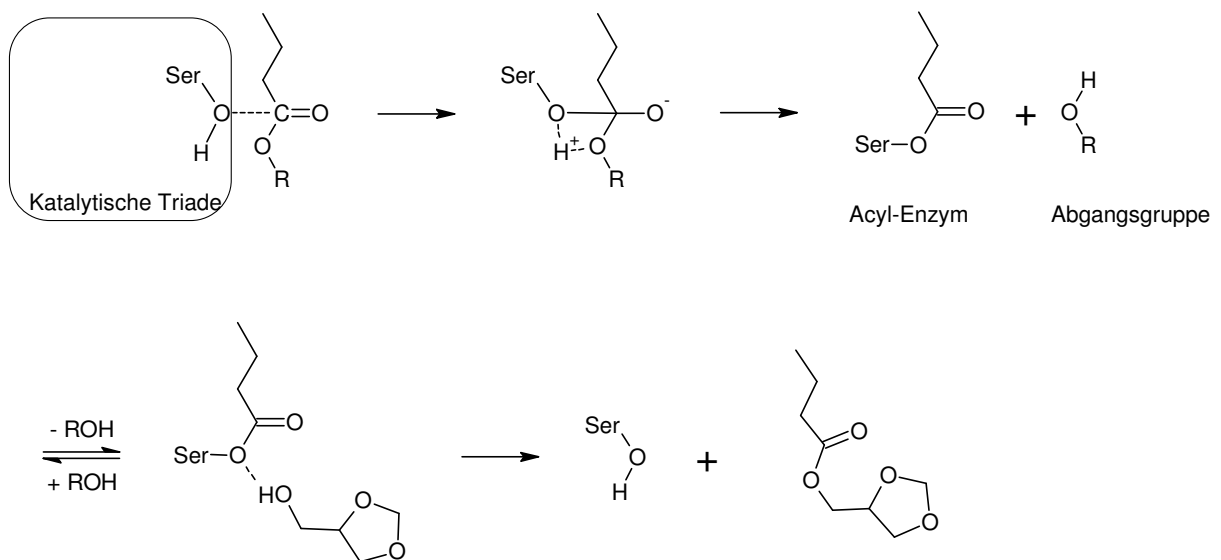


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der enzymatischen Katalyse von Fettsäure(estern) mit 5R

1.4. IMMOBILISATION VON ENZYMEN

Um biokatalytische Reaktionen für industrielle Anwendungen interessant werden zu lassen, muss neben hohen Erträgen und Selektivitäten auch eine möglichst hohe Wiederverwendbarkeit der Enzyme erreicht werden. Denn die Beschaffung von Enzymen stellt einen großen finanziellen Aufwand dar. Durch chemisch-physikalische Methoden lassen sich Enzyme auf Trägermaterialien fixieren, welche leicht aus dem Reaktionsmedium separiert werden können und somit für Mehrfachverwendungen bereit stehen. Die Wahl der Immobilisierungsmethode hängt neben dem verwendeten Enzym von dem zu katalysierenden Prozess ab. Daraus erklärt sich die enorme Vielfalt an verschiedenen Immobilisationsverfahren. Grundsätzlich muss neben der Wahl des Trägers über die Art der Bindung zwischen Enzym und Trägermaterial entschieden werden. Je stärker die Bindung zwischen Enzym und Trägermaterial, desto weniger wahrscheinlich ist die Ablösung des Enzyms vom Träger und dadurch bedingt bleibt die katalytische Aktivität über einen langen Nutzungszeitraum erhalten. Nachteiligerweise verringert sich mit Anzahl und Stärke der Bindungen die katalytische Aktivität da eine Bindung an Trägermaterialien mit Konformationsänderungen am Enzym einhergeht. Daher sollte bei den Immobilisationsverfahren besonders darauf geachtet werden, dass die Bindungsstellen weit ab vom katalytischen Zentrum liegen. Ein weiterer Vorteil starker Bindungen zwischen Enzym und Trägermaterial sind höhere Resistenzen gegenüber denaturierenden Einflüssen und damit stabilere katalytische Aktivitäten bei Milieuänderungen. Es ist sogar möglich, dass sich das Temperaturoptimum nach oben verschiebt. Höhere Herstellungskosten und eine erschwerte Wiederaufbereitung (Regeneration) des Trägers mit neuem Enzym nach Abfall der katalytischen Aktivität bei stark gebundenen Enzymen machen schwach gebundene Enzyme i.d.R. ökonomischer. Da Enzyme in unpolaren Medien nicht löslich sind, ist eine starke Bindung zwischen Enzym und Trägermaterial nicht erforderlich. Enzyme bleiben in diesen Medien selbst ohne Wechselwirkung am wasserfeuchten Träger haften. Bei schwach gebundenen Enzymen bietet sich vor allem die Einschluss-Methodik an. Die Enzyme liegen relativ frei in den Zwischenräumen des Trägermaterials vor. Diese Methode verbindet die Vorteile katalytischer Aktivität und Wiederverwendbarkeit in geeigneter Weise miteinander. Jedoch besitzt diese Methode den Nachteil, dass die Substrate die Enzyme schlechter erreichen können (Diffusionslimitierung), was sich wiederum in einer Abnahme der katalytischen Aktivität widerspiegelt [22]. Ruttloff (1994) [22] und Liese et. al (2000) [14] geben einen guten Überblick über Möglichkeiten zur Immobilisation von Enzymen.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. MATERIALEN

2.1.1. CHEMIKALIEN

Chemikalie	Anbieter
1-Octanol (pur.)	Merck
2-Methyl-2-Butanol (98 %)	Alfa Aeser
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck
Glycerinformal (pur.)	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat (wasserfrei)	Merck
Laurinsäuremethylester (pur.)	Fluka
Methanol (p.a.)	Merck

2.1.2. BIOKATALYSATOREN

Homogene Lipase	Anbieter
Lipase von <i>Rhizomucor miehei</i> (≥ 20.000 U/g)	Sigma

Heterogene Lipase	Anbieter
Lipozyme RM IM (200 U/g [15]) (Lipase von <i>Rhizomucor miehei</i> adsorbiert auf dem makroporösen basischen Anionenaustauscherharz Duolite A568 [Granulat aus quervernetzten Phenol- Formaldehyd-Polykondensaten] [26])	Novozymes

2.1.3. GERÄTE

Gaschromatograph	Agilent 6890 Series GC
Kapillarsäule	HP – INNOWax 19091N-213
Detektor	FID

2.1.4. SONSTIGE MATERIALIEN

Analysenwaage

Filterpapier

Laborboy

magnetischer Heizrührer (temperierbar mittels angeschlossenem Kontaktthermometer)

Mikroliterspritze

Ölbad

Pasteur-, Kolbenhub- und Vollpipetten

Rückflusskühler

Rührfische

Rundkolben & Deckel (50 ml; mit Schliff)

Trichter

Vakuumtrockenschrank

verschießbare Reagenzgläser

Vibrationsspatel

Zweihalskolben (200 ml)

2.2. METHODEN

2.2.1. REAKTIONSFÜHRUNG & -BEDINGUNGEN

In einem 50 ml-Rundkolben wird folgender Reaktionsansatz mit 20 ml LM erstellt:

LM	2-M-2-B
Konzentration des GF	0,25 mol/l
Stoffmengenverhältnis GF : LSME	5:2
Enzymbeladung	0,01 mol LSME / 1 g Enzym
Reaktionstemperatur	40 °C
Reaktionszeit	72 h

Bei dem LM 2-M-2-B handelt es sich um einen tertiären Alkohol. Aufgrund sterischer Hindernisse katalysieren Lipasen Reaktionen mit tertiären Alkoholen nur sehr langsam [5]. Es dürfte daher keinen Einfluss auf den Reaktionsverlauf haben.

Der Anlage 2 können die genauen Massen zu den Chemikalien und Enzymen entnommen werden. Zusätzlich wird ein Rührfisch in die Reaktionslösung gegeben. Durch einen geeigneten muldenförmigen Aufsatz wird der Rundkolben auf den magnetischen Heizrührer gestellt, fixiert und mittels angeschlossenen Kontaktthermometers bei der Reaktionstemperatur von 40 °C gehalten. Die Magnetrotationsgeschwindigkeit wird sehr gering gewählt um die Abrasion des immobilisierten Enzyms zu minimieren. Ein leichtes Durchmischen genügt. Nach 72 Stunden Reaktionszeit erfolgt die Analyse der Produktzusammensetzung mittels GLC.

2.2.2. GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE

Als innerer Standard dient 1-Octanol. Das 1-Octanol kann nicht mit Start der Reaktion zugegeben werden. Da es sich bei 1-Octanol ebenfalls um einen primären Alkohol handelt, würde dieser möglicherweise von der Lipase als Substrat genutzt werden. Das 1-Octanol sollte daher bei Nutzung der homogenen Lipase erst kurz vor der GC-Analyse dazugegeben werden. Dabei wird das 1-Octanol direkt in das Reaktionsgefäß überführt, mit dem Reaktionsgemisch vermischt und anschließend wird mit einer Mikroliterspritze 1 µl der Suspension aufgezogen und per Luftpropftechnik in den Injektor des GC injiziert. Wird hingegen die heterogene Lipase verwendet, erfolgt zunächst eine Filtration. Nach der Filtration wird unter Berücksichtigung des Filtrationsverlustes das 1-Octanol dazugegeben. Die GC-Analyse erfolgt analog. Auch bei Nutzung der heterogenen Lipase sollte der innere Standard erst kurz vor der GC-Analyse erfolgen. Denn trotz Filtration könnten Spuren der Lipase in das Filtrat übergegangen sein. Der Grund dafür liegt in der teilweisen Abrasion der Lipase vom Trägermaterial während der Reaktionsführung.

GC-Einstellungen

Ofen

Anfangstemperatur	80 °C
Haltezeit	8,00 min
Heizrate	12,00 °C/min
Endtemperatur	240 °C
Haltezeit	15,00 min
Gesamtzeit	36,33 min

Injektor

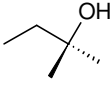
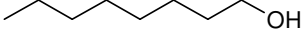
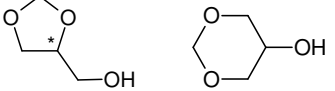
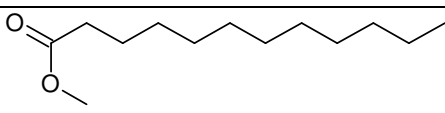
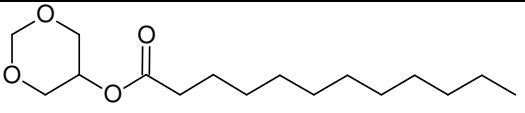
Verfahren	Split-Betrieb
Splitverhältnis	50:1
Temperatur	250 °C
Druck	39,0 kPa
Splitfluss	49,8 ml/min
Gesamtfluss	52,4 ml/min
Gas	Stickstoff

Kapillarsäule

Modell	HP 19091N-213
stationäre Phase	Polyethylen-Glycol
Polarität	hoch
Temperaturbeständigkeit	max. 260 °C
Länge	30 m
Innendurchmesser	320 µm
Filmdicke	50 µm

2.2.3. AUSWERTUNG DER CHROMATOGRAMME

Die Chromatogramme werden quantitativ mit der Methode des inneren Standards ausgewertet. Massenspektrometrische Untersuchungen von Rüschen, Klaas et al. [21] identifizierten folgende Probenkomponenten (Chromatogramm: Abb. 4).

1	LM	2-M-2-B	
2	Innerer Standard	1-Octanol	
3	Substrat 1 (Alkohol)	GF	
4	Substrat 2 (Acylspender)	LSME	
5	Produkt 1	6RE	

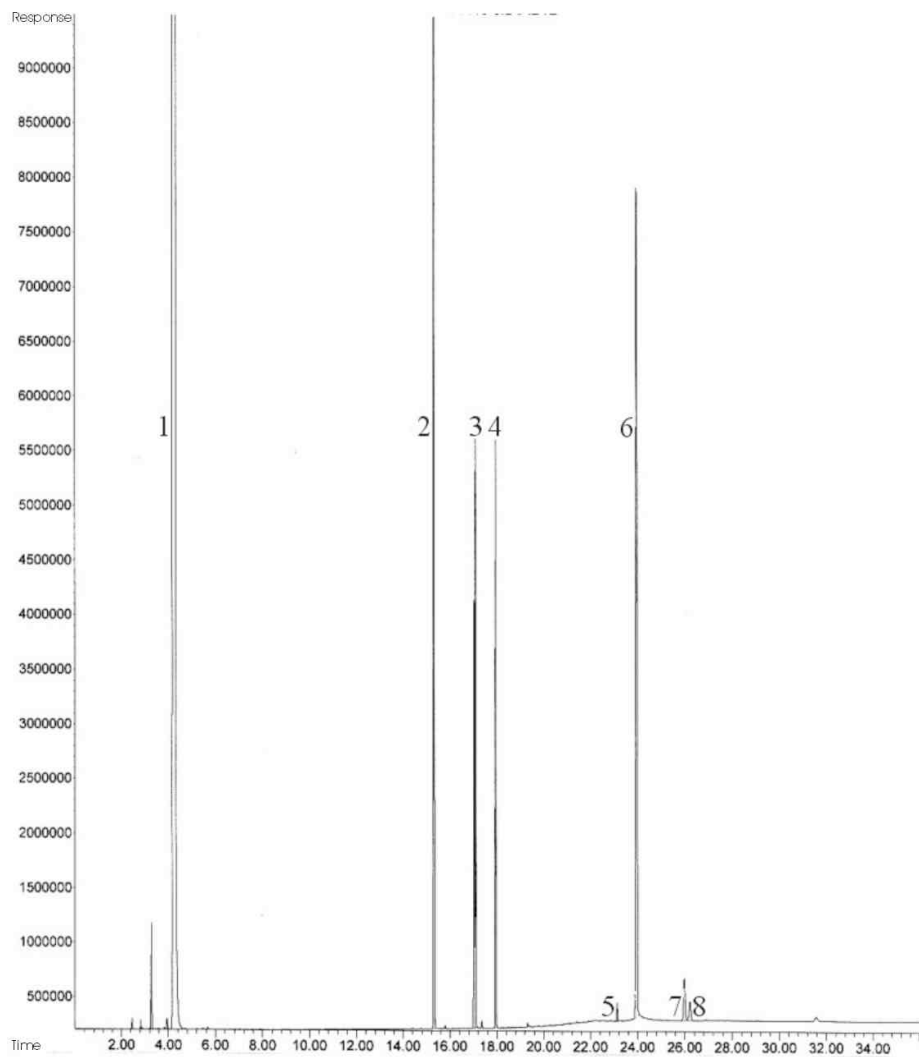
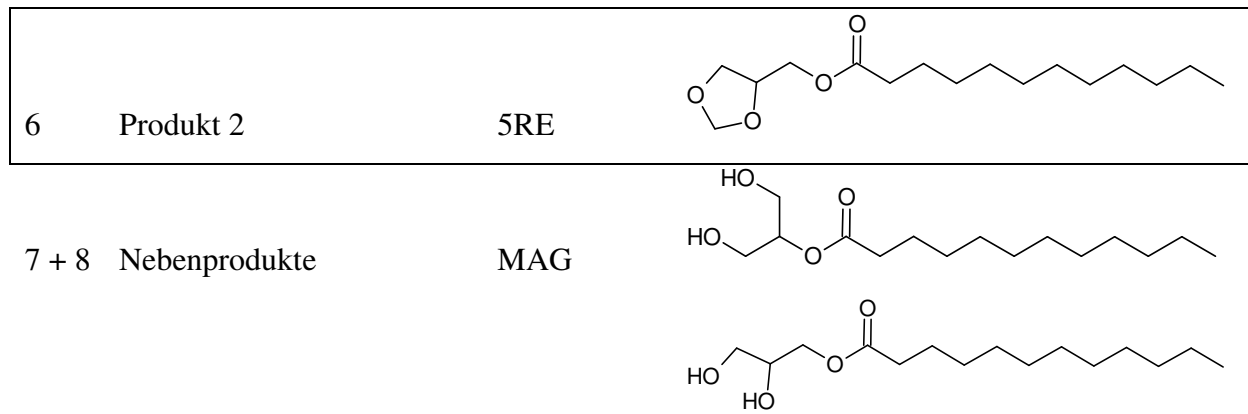


Abb. 4: Komponentenidentifizierung (Chromatogramm)

Der GF-Peak ist ein nicht bis zur Basislinie getrennter Doppelpeak (nicht erkennbar in Abb. 4). Dabei gehört der kleinere erste Peak vermutlich zu dem zu 40 % vorhandenen 5RE. Die Nebenprodukte resultieren aus einer, durch Protonierung hervorgerufenen Entacetalisierung. Infolgedessen wird Formaldehyd abgespalten und es entstehen MAG.

Berechnungsmethoden

1. Quantifizierung des nicht reagierten Substrats

Als innerer Standard dient 1-Octanol. Der Korrekturfaktor von 1-Octanol zu LSME beträgt 1,079 [21]. Bei identischen Massen von 1-Octanol und LSME wäre die Fläche des Peaks von 1-Octanol 1,079 mal größer als die Fläche des Peaks von LSME.

Formel 1: Quantifizierung des n.r. LSME

$$m_{LSME_{nr}} = KF \cdot \frac{A_{LSME_{nr}} \cdot m_{iS}}{A_{iS}}$$

A_{iS} ... Fläche oder Flächenprozent des inneren Standards im Chromatogramm

$A_{LSME_{nr}}$... Fläche oder Flächenprozent des n.r. LSME im Chromatogramm

KF ... Korrekturfaktor (KF = 1,079)

m_{iS} ... Masse des inneren Standards

$m_{LSME_{nr}}$... Masse des n.r. LSME

2. Umsatz

Der Umsatz ist das Verhältnis von umgesetztem LSME zu dem zu Reaktionsbeginn zugesetzten LSME.

Formel 2: Berechnung des Umsatzes

$$U = 1 - \frac{m_{LSME_{nr}}}{m_{LSME}}$$

U ... Umsatz [%]

m_{LSME} ... Masse des gesamten (vor der Reaktion) hinzugesetzten LSME

3. Selektivität

Die Selektivität ist das Verhältnis von den synthetisierten Produktmolekülen zu den umgesetzten Molekülen. Da das Substrat nur zu Isomeren (gleiche Molekülmassen) umgesetzt wird, kann die Selektivität vereinfacht durch das Masseverhältnis des erwünschten zu dem unerwünschten Isomer berechnet werden. Es wird davon ausgegangen, dass der Detektor auf

beide Isomere in gleicher Weise anspricht und dass daher das Masseverhältnis dem Flächenverhältnis im Chromatogramm entspricht.

Formel 3: Berechnung der 1,3-Selektivität

$$S = \frac{A_{5RE}}{A_{6RE}}$$

S ... Selektivität

A_{5RE} ... Fläche oder Flächenprozent des 5RE im Chromatogramm

A_{6RE} ... Fläche oder Flächenprozent des 6RE im Chromatogramm

Liegt keine Selektivität vor, so ist $S = 0,6$, da GF ein Isomerengemisch von 60 % 6RE und 40 % 5RE ist. Je höher die 1,3-Selektivität der Lipase, desto größer wird S.

Formel 4: Berechnung der prozentualen 1,3-Selektivität

$$S_{\%} = \frac{A_{5RE}}{A_{5RE} + A_{6RE}}$$

$S_{\%}$... prozentuale Selektivität [%]

Liegt keine Selektivität vor, ist $S_{\%} = 40\%$ aus den genannten Gründen. Je höher die 1,3-Selektivität der Lipase, desto größer wird $S_{\%}$.

Diese beiden Selektivitätsangaben ergänzen sich gegenseitig und sollten daher zusammen betrachtet werden. Während an $S_{\%}$ leicht der Anteil des 5RE am Umsatz erkannt werden kann, wird es immer schwieriger selbst große Unterschiede zu registrieren, je näher $S_{\%}$ an 100 % heranreicht. Beispielsweise bedeutet ein Anstieg von $S_{\%}$ von 90 % auf 99 % eine Verzehnfachung von S.

Zu bedenken ist, dass die Nebenprodukte in diesen Berechnungsmethoden zur Selektivität nicht berücksichtigt werden und auch nicht berücksichtigt werden können, solange unklar ist, welches Nebenprodukt welches Isomer ist. Wären die Identitäten der Nebenprodukte bekannt, könnten sie in die Berechnungen unter Berücksichtigung ihrer Molekülmassen und mit den entsprechenden Korrekturfaktoren einfließen. Es müsste dann nur geklärt werden, ob die Nebenprodukte das Resultat der Reaktionsbedingungen sind oder möglicherweise durch das Enzym selbst hervorgerufen werden.

Wiederfindung (Kap. 3.2.)

Formel 5: Berechnung der Wiederfindung

$$W = \frac{\bar{x}}{x_R}$$

W ... Wiederfindung [%]

\bar{x} ... Mittelwert der Messergebnisse

x_R ... richtiger Wert (in diesem Fall die Werte der Vorversuche unter 3.1.)

2.2.4. INAKTIVIERUNG DER HETEROGENEN LIPASE

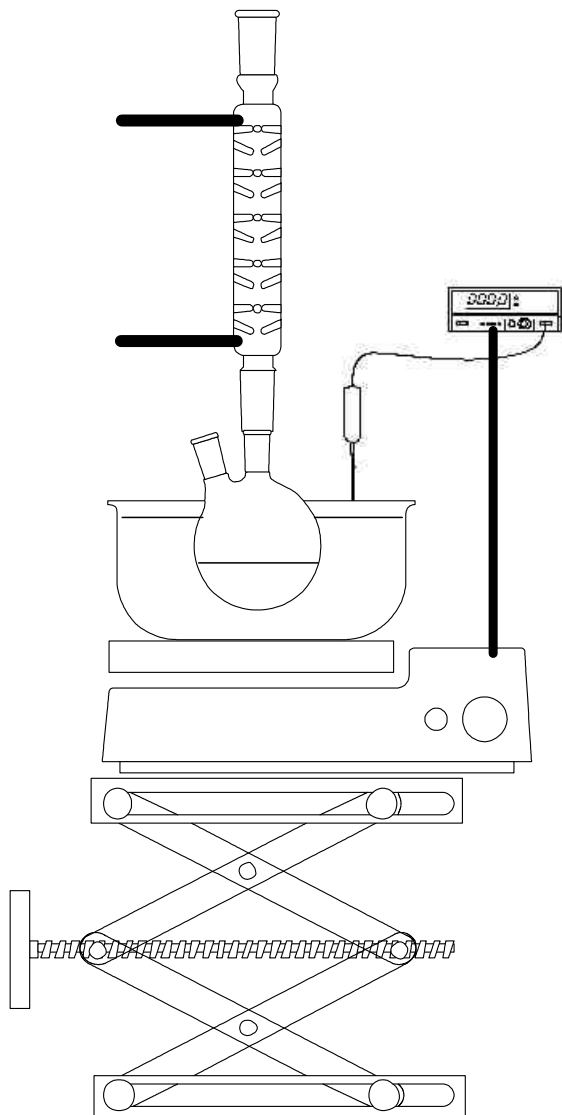


Abb. 5: Apparatur zur Hitzedenaturierung von Enzymen

Die in Versuch 3.3.4. genutzte Inaktivierung der heterogenen Lipase geschieht mittels Kochung in Methanol (Abb. 5). Dazu wird in einen 200 ml-Zweihalskolben eine ausreichende Menge der heterogenen Lipase überführt und mit genügend Methanol versetzt. Um eine Blasenbildung zu verhindern wird zusätzlich ein Rührfisch dazu gegeben. Es werden sehr geringe Magnetrotationsgeschwindigkeiten gewählt. Die Wärmeübertragung vom magnetischen Heizrührer erfolgt über ein Ölbad. Die Temperatur wird mit dem Kontaktthermometer so geregelt, dass bei dem Methanol eine leichte Blasenbildung sichtbar ist (Siedetemperatur Methanol: 65 °C). Das siedende Methanol wird unter Rückflusskühlung zurück gewonnen. Die Kochung wird nach einer Stunde in siedendem Methanol beendet. Anschließend wird das immobilisierte Enzym abfiltriert und über Nacht im Vakuumtrockenschrank getrocknet.

3. ERGEBNISSE & DISKUSSION

3.1. VORVERSUCHE MIT HOMOGENER LIPASE

Diese Arbeit baut auf den Versuchen von Rüschen, Klaas et al. (2007) auf [21]. Diese testeten verschiedene homogene 1,3-selektive Lipasen auf Umsatz und Selektivität bezüglich der Umesterung des GF mittels LSME und LSVE. Nachdem eine geeignete Lipase gefunden wurde, wurden Umsatz und Selektivität durch Variationen des LM, der GF-Konzentration und der Enzymmenge optimiert. Die Wahl fiel auf die unter Kap. 2.2.1. geschilderten Reaktionsbedingungen. Als homogenes Enzym wurde Patalase 20,000L von Novozymes genutzt. Dabei handelt es sich um die Lipase RML von *Aspergillus fungus* mit einer Molekülmasse von 33 kDa. Kommerziell erhältliche Präparate dieser Lipase enthalten ca. 25-57 Masseprozent Protein. RML ist gegenüber Wasseraktivitäten von 0,32-0,55 am aktivsten. Dieses Enzym ist chemoselektiv gegenüber einfach ungesättigten Fettsäuren (20:1 n-9, 22:1 n-9) aber zeigt kaum Reaktivität gegenüber mehrfach ungesättigten Fettsäuren. [5]. Das Temperaturoptimum für RML beträgt 35-40 °C [19]. Es sind zwar Lipasen mit höherer 1,3-Selektivität bekannt – ein Beispiel dafür wäre die Lipase von *Rhizopus delemar* [4] – dennoch zeigt RML deutlich höhere Umsätze.

Umsatz und Selektivität unter den geschilderten Bedingungen:

Umsatz	60 %
Selektivität	> 31 \triangleq 97 %

Mit den Vinylestern lagen die Umsätze wie vermutet bei 100 %. Dennoch wurden Methylester genutzt, da mit ihnen unter diesen Reaktionsbedingungen deutlich höhere Selektivitäten erreicht wurden. Der Einsatz von Molekularsieben zur Entfernung des Methanols aus dem Reaktionsmedium bei Gebrauch der Methylester führte zu keiner Erhöhung der Umsätze. Die Verwendung gesättigter Fettsäuremethylester kürzerer oder längerer Alkylkettenlängen lieferten geringere Umsätze und Selektivitäten. LSME scheint unter diesen Reaktionsbedingungen am besten geeignet zu sein.

Aufgrund ihrer größeren Molekülmasse besitzen die Ester höhere Siedepunkte als das GF und somit können beide Komponenten mittels Kurzwegdestillation getrennt werden. Da mittels 1,3-selektiver Lipase vorwiegend der 5RE entsteht, stellt sich im abdestillierten GF durch Ringtransformation von dem 6R zu dem 5R wieder das Gleichgewicht beider Isomere ein. Wird die Umesterung mittels 1,3-selektiver Lipasen und anschließender destillativer Trennung häufig genug wiederholt, so müsste es theoretisch möglich sein, eine Ausbeute von annähernd 100 % des 5RE zu erhalten.

Nachteilig an der Reaktionsführung mit homogener Lipase ist, dass diese nur mit erheblichem Aufwand aus dem Reaktionsmedium entfernt werden kann und deswegen für erneute Umesterungen nicht zur Verfügung steht. Abhilfe könnte die Nutzung heterogener Lipasen schaffen. Voraussetzung dafür ist, dass die heterogene Lipase ähnliche Umsätze und Selektivitäten aufweist wie die homogene Lipase. Falls diese Bedingungen erfüllt sein sollten, müsste abschließend die Wiederverwendbarkeit der heterogenen Lipase geprüft werden, indem bei mehrfacher Verwendung der heterogenen Lipase im Batch-Prozess die Abnahmen von Umsatz und möglicherweise Selektivität ermittelt werden.

3.2. WIEDERFINDUNG VON UMSATZ & SELEKTIVITÄT MIT HOMOGENER LIPASE

Mit diesem Versuch soll getestet werden, ob die Versuchsergebnisse bezüglich Umsatz und Selektivität in hinreichender Weise erhalten werden. Zur Sicherheit wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Anlage 3 können die Chromatogramme und Peakwerte der drei Proben entnommen werden.

Tab. 1: 3.2.: Umsatz & Selektivität der Dreifachbestimmung

		Probe 1	Probe 2	Probe 3
LM	2-M-2-B [g]	16,31	16,33	16,31
Substrat 1	GF [g]	0,54	0,53	0,53
Substrat 2	LSME [g]	0,44	0,45	0,43
Lipase	homogen [g]	0,20	0,20	0,20
Int. Stand.	1-Octanol [g]	0,1992	0,1995	0,2048
Flächen%	1-Octanol [%]	23,534	22,809	25,420
	LSMEnr [%]	18,131	17,446	15,137
	6RE [%]	1,033	0,282	0,680
	5RE [%]	29,646	32,691	31,579
Rechnungen	m_{LSMEnr} [g]	0,1656	0,1646	0,1316
	U [%]	62,37	63,41	69,40
	S	28,70	115,93	46,44
	S% [%]	96,63	99,14	97,89

Tab. 2: 3.2.: Wiederfindung der Ergebnisse

		Mittelwert	StAbw
Versuch	U [%]	65,06	3,79
	S	63,69	46,10
	S% [%]	97,89	1,26
Vorversuche	U [%]	60	
	S	31	
	S% [%]	97	
Wiederf. [%]	U [%]	108,43	
	S [%]	205,45	
	S% [%]	100,92	

Die Selektivitäten S weichen stark voneinander ab (Tab. 1). Rein statistisch gesehen, dürfte kein Mittelwert von S gebildet werden. Dennoch ist die Ursache dieser Abweichungen verständlich. Der Peak des 6RE ist im Verhältnis zu dem Peak des 5RE sehr klein. Geringe Schwankungen der Peakfläche des 6RE haben daher großen Einfluss auf deren Verhältnis. Des Weiteren kann an den Wiederfindungen von S und S% deutlich erkannt werden, dass - wie erläutert - große Schwankungen von S geringe Auswirkungen auf S% haben.

Umsatz und Selektivität stimmen in ausreichendem Maß mit den Versuchsergebnissen von Rüschen, Klaas et al. [21] überein (Tab. 2). Folglich können die Versuche mit der heterogenen Lipase aufgenommen werden.

3.3. SUCHE GEEIGNETER REAKTIONSBEDINGUNGEN MIT HETEROGENER LIPASE

3.3.1. NUTZUNG DER HETEROGENEN LIPASE UNTER UNVERÄNDERTEN BEDINGUNGEN

Es wird Lipozyme RM IM von Novozymes genutzt. RML ist in dieser Form auf dem makroporösen basischen Anionenaustauscherharz Duolite A568 adsorbiert. Dabei handelt es sich um ein Granulat aus quervernetzten Phenol-Formaldehyd-Polykondensaten [26]. 90 % der Partikel des Granulats weisen eine Porengröße von 100-1000 μm auf [10].

Vorerst werden die Versuchsbedingungen des vorigen Versuchs übernommen. Es findet wieder eine Dreifachbestimmung statt. Der Anlage 4 können die Chromatogramme und Werte der einzelnen Proben entnommen werden.

Tab. 3: 3.3.1.: Umsatz & Selektivität der Dreifachbestimmung

		Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	StAbw
LM	2-M-2-B [g]	16,3000	16,3000	16,3000		
Substrat 1	GF [g]	0,5325	0,5281	0,5174		
Substrat 2	LSME [g]	0,4241	0,4235	0,4273		
Lipase	heterogen [g]	0,2043	0,2015	0,2019		
Int. Stand.	1-Octanol [g]	0,1720	0,1786	0,1702		
Flächen%	1-Octanol [%]	25,113	23,179	24,267		
	LSMEnr [%]	30,696	31,277	32,147		
	6RE [%]	n.a.	n.a.	n.a.		
	5RE [%]	13,165	13,177	10,232		
Rechnungen	m_{LSMEnr} [g]	0,2268	0,2600	0,2433		
	U [%]	46,51	38,6	43,07	42,73	3,97
	S	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	S _% [%]	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00

In fast allen Quellen die sich mit der Immobilisation beschäftigen wird über geringere Aktivitäten und höhere Selektivitäten von heterogenen Enzymen berichtet. Diese Beziehung wird in diesem Fall nicht beobachtet. Zunächst erscheint ein Umsatz von ca. 40 % akzeptabel (Tab. 3). Bezogen auf die homogene Lipase wäre das mit einem Abfall der katalytischen Aktivität von nur ca. 30 % gleichzusetzen. Noch besser erscheint die Selektivität zu sein. Eine Selektivität von 100 % kann nicht weiter verbessert werden. Diese Ergebnisse müssen jedoch kritisch betrachtet werden. Wie in den Chromatogrammen deutlich zu erkennen ist, entstehen vermehrt die Nebenprodukte. Da diese Nebenprodukte aus den unter 2.2.3. genannten Gründen nicht in die Berechnung der Selektivität mit einbezogen werden können, liegen die berechneten Selektivitäten weitaus höher als die wahre Selektivität der Lipase. Tab. 4 zeigt unter Berücksichtigung der Molekülmassen aber ohne Korrekturfaktor die untere Grenze der Selektivität.

tivität. Es wird davon ausgegangen, dass alle Nebenprodukte das Resultat der enzymatischen Katalyse sind. Die Selektivität wird vermutlich etwas größer sein als $0,8 \triangleq 44 \%$ (Tab. 4).

Tab. 4: 3.3.1.: alternative Berechnung der Selektivität

M(5RE)	[g/mol]	286,407
M(MAG)	[g/mol]	274,396
Stöchiometrischer Faktor		1,044

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	StAbw
MAG 1 [%]	11,117	10,641	12,513		
MAG 2 [%]	3,486	3,725	3,217		
5RE [%]	13,165	13,177	10,232		
S_{alternativ}	0,86	0,88	0,62	0,79	0,14
S_{%alternativ} [%]	46,34	46,77	38,39	43,84	4,72

Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird dieser Berechnungsansatz auf die Versuche unter 3.2. angewandt. Aus diesem Berechnungsansatz resultiert eine Selektivität von $6,4 \triangleq 88 \%$ (Tab. 5).

Tab. 5: 3.2.: alternative Berechnung der Selektivität

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mittelwert	StAbw
MAG 1 [%]	3,127	3,516	2,288		
MAG 2 [%]	0,865	1,383	1,174		
6RE [%]	1,033	0,282	0,680		
5RE [%]	29,646	32,691	31,579		
S_{alternativ}	5,70	6,06	7,35	6,37	0,87
S_{%alternativ} [%]	87,67	86,47	89,73	87,96	1,65

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Selektivität der homogenen Lipase unter diesen Versuchsbedingungen ca. 8-mal höher ist als die Selektivität der heterogenen Lipase. Folglich wird durch Variation der Versuchsbedingungen versucht Umsatz und vor allem Selektivität zu erhöhen.

3.3.2. VERDOPPLUNG DER ENZYMENGE

Der geringe Umsatz lässt sich mit einer geringeren katalytischen Aktivität immobilisierter Enzyme begründen. Zum einen sind bei Einsatz gleicher Masse weniger Enzyme bei Nutzung eines immobilisierten Enzyms vorhanden, da das Trägermaterial den Großteil der Masse bil-

det. Zum anderen können im Trägermaterial eingeschlossene Enzyme schwerer mit dem Substrat in Kontakt treten. Die Enzymaktivität der homogenen Lipase liegt bei 20.000 U/g, wohingegen für die heterogene Lipase nur eine Enzymaktivität von 200 U/g gefunden wurde [15]. Ob die katalytische Aktivität der homogenen Lipase allerdings 100-mal höher liegt als die katalytische Aktivität der heterogenen Lipase darf bezweifelt werden. Als Unit (Internationale Enzymeinheit) wird diejenige Enzymmenge bezeichnet, „die unter definierten Bedingungen innerhalb einer festgelegten Versuchsdauer eine bestimmte Menge des Substrats zum Umsatz bringt“ [22]. Dabei scheint jedoch keine Einigung zu bestehen über die zugrunde gelegten Messparameter. Möglicherweise wurde die Enzymaktivität der homogenen Lipase in Reinsubstanz gemessen. Sie liegt jedoch als Lösung vor. Da es nicht möglich ist in einem 20 ml-Ansatz mit 20 g Enzym (= 100-fache Masse) zu arbeiten, wird in diesem Versuch mit doppelter Enzymmenge gearbeitet.

Tab. 6: 3.3.2.: Umsatz & Selektivität

		Probe
LM	2-M-2-B [g]	16,3000
Substrat 1	GF [g]	0,5195
Substrat 2	LSME [g]	0,4215
Lipase	heterogen [g]	0,4004
Int. Stand.	1-Octanol [g]	0,1689
Flächen%	1-Octanol [%]	18,154
	LSMEnr [%]	31,969
	6RE [%]	n.a.
	5RE [%]	15,258
Rechnungen	m_{LSMEnr} [g]	0,3209
	U [%]	23,86
	S	n.a.
	S% [%]	100,00

Tab. 7: 3.3.2.: alternative Berechnung der Selektivität

	Probe
MAG 1 [%]	11,436
MAG 2 [%]	4,893
6RE [%]	0,000
5RE [%]	15,258
S_{alternativ}	0,90
S%_{alternativ} [%]	47,23

Die Verdopplung der Enzymmenge hat keine Erhöhung des Umsatzes bewirkt. Der Umsatz ist sogar stark abgefallen (Tab. 6). Eine mögliche Ursache ist, dass mit Verdopplung der Enzymmenge die Enzymbeladung halbiert wird und dadurch die relative katalytische Aktivität sinkt. Dennoch sollte die absolute katalytische Aktivität steigen. Das ist jedoch nicht der Fall.

Es ist schwierig weitere Aussagen zu treffen, da allein die spezifische katalytische Aktivität ausgedrückt in U/g keine ausreichende Charakterisierung des Enzyms liefert. Die Messmethoden der katalytischen Aktivität müssen genauer erläutert werden. Laut Bornscheuer et al. (1999) [5] legt Novo die Aktivität von RML fest, indem die Menge von Laurinsäure gemessen wird, welche in die 1,3-Positionen von TAG in Sonnenblumenöl mit einem hohen Anteil an Ölsäure eingearbeitet wird. An anderer Stelle wird erwähnt, dass es sich bei der Enzymeinheit Unit um 1 μmol hydrolysierter bzw. veresterter Fettsäure pro min unter den jeweiligen optimalen Testbedingungen handelt [5]. Dennoch handelt es sich bei diesen Angaben immer um Anfangsgeschwindigkeiten. Mit zunehmender Zeit nimmt die Konzentration an Substrat ab und die Konzentration an Produkt zu. Deswegen nehmen auch die Umsatzgeschwindigkeiten ab. Eine Berechnung der benötigten Reaktionszeit ist daher nur mit Kenntnis der Substrat- und Enzymmenge und katalytischen Aktivität nicht möglich.

3.3.3. PH-PUFFERUNG MIT SALZEN

Da vor allem die Nebenprodukte entstehen, der 6RE nicht erkennbar ist und der 5RE in zu geringen Mengen gebildet wird, wird davon ausgegangen, dass durch Protonierung eine Entcatalisierung stattfindet. Diese könnte aus einem sauer reagierenden Trägermaterial resultieren. Laut Wiemann (2010) handelt es sich bei dem Trägermaterial um einen basischen Anionenaustauscherharz [26]. Daher scheint zunächst die Vermutung eines sauer reagierenden Trägers abwegig. Der negativ geladene Träger zieht jedoch Protonen an. Infolgedessen kommt es in der Umgebung des Enzyms zu einer Erhöhung der Protonenkonzentration, während sich der pH-Wert durch diesen Protonenentzug in der umgebenden Lösung in den alkalischen Bereich verschiebt [22]. Liegt Formaldehyd frei vor, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass freie Stellen in orto- und para-Position des Phenol-Formaldehyd-Trägers mit dem freien Formaldehyd reagieren. Der pH-Wert der homogenen Lipase liegt in Lösung zwischen 5 und 6. Die heterogene Lipase wird mit Salzen bzw. Salzhydraten auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt. Dazu werden Kaliumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat im Masseverhältnis 14,61:1 in genannter Reihenfolge eingesetzt. Der Anlage 5 können die Chromatogramme und dazugehörigen Werte entnommen werden.

Tab. 8: 3.3.3.: Umsatz & Selektivität der Doppelbestimmung

		Probe 1	Probe 2	Mittelwert	StAbw
LM	2-M-2-B [g]	16,3000	16,3000		
Substrat 1	GF [g]	0,5306	0,5281		
Substrat 2	LSME [g]	0,4226	0,4235		
Lipase	heterogen [g]	0,2002	0,2015		
pH-Puffer	KH ₂ PO ₄ [g]	0,0899	0,0855		
	Na ₂ HPO ₄ +2H ₂ O [g]	0,0061	0,0059		
Int. Stand.	1-Octanol [g]	0,1673	0,1695		
Flächen%	1-Octanol [%]	15,425	16,648		
	LSMEnr [%]	35,447	36,380		
	6RE [%]	n.a.	n.a.		
	5RE [%]	12,950	11,711		
Rechnungen	m _{LSMEnr} [g]	0,4148	0,3997		
	U [%]	1,84	5,63	3,73	2,68
	S	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	S _% [%]	100,00	100,00	100,00	0,00

Tab. 9: 3.3.3.: alternative Berechnung der Selektivität

	Probe 1	Probe 2	Mittelwert	StAbw
MAG 1 [%]	15,940	15,006		
MAG 2 [%]	4,075	3,787		
6RE [%]	0,000	0,000		
5RE [%]	12,950	11,711		
S _{alternativ}	0,62	0,60	0,61	0,02
S _{%alternativ} [%]	38,26	37,38	37,82	0,62

Die Pufferung des pH-Wertes hat keinen Einfluss auf die Selektivität. Der Abfall der Selektivität von 0,8 auf 0,6 (Tab. 9) ist bei zwei bis drei Proben kein Indiz für eine signifikante Abnahme der Selektivität. Erstaunlich sind die berechneten geringeren Umsätze. Dass diese allerdings durch die Pufferung des Systems hervorgerufen werden ist unwahrscheinlich. Es ist möglich, dass die Zugabe von Salzhydraten eine homogenere Verteilung des Wassers im LM bewirkt [13] und damit möglicherweise eine Dehydratisierung des Enzyms verursacht, wodurch die katalytische Aktivität abnehmen könnte. Die Anfälligkeit der Berechnungsmethode ist jedoch eine wahrscheinlichere Ursache. Je größer m_{iS} und je kleiner A_{iS} desto größer wird nach Formel 1 m_{LSMEnr} und dadurch nach Formel 2 der Umsatz kleiner. Es besteht verglichen mit den anderen Versuchen ein Missverhältnis zwischen m_{iS} und A_{iS} . Die Berechnungsmethoden stützen sich darauf, dass es zu keiner Inhomogenität der Probe kommt. Mögliche Ursachen für Inhomogenitäten könnten Entmischungen oder Verflüchtigungen einzelner Probenbestandteile sein. Möglicherweise hatte sich das 1-Octanol während der Probennahme für die GC-Injektion noch nicht vollständig vermischt. Eine sicherere Berechnungsmethode des Umsatzes könnte erfolgen, sofern alle entstehenden Produkte (5RE, 6RE, MAG 1, MAG 2 und sonstige Nebenprodukte [Formaldehyd]) sowie ihr Flächen/Masse-Verhältnis (auch zu den

Substraten) bekannt wären. Unter Berücksichtigung ihrer Molekülmassen könnte der Umsatz ohne jeglichen inneren Standard berechnet werden. Mögliche Fehlerquellen werden dadurch minimiert.

3.3.4. ERMITTLUNG DES EINFLUSSES DES TRÄGERMATERIALS

Da alle bisherigen Versuche keine sonderlichen Rückschlüsse über die Anwendbarkeit der heterogenen Lipase lieferten, soll in diesem Versuch getestet werden, ob das Trägermaterial das Reaktionsgeschehen beeinflusst oder ob die Ursache in der Immobilisation des Enzyms selbst liegt. Dazu wird die heterogene Lipase unter der in 2.2.4. beschriebenen Methode inaktiviert. Sowohl die heterogene Lipase in inaktiver Form als auch die homogene Lipase in aktiver Form werden den unter 2.2.1. geschilderten Reaktionsbedingungen hinzugesetzt. Bleibt die katalytische Aktivität der homogenen Lipase von dem Trägermaterial unbeeinflusst, so müssten die Versuchsergebnisse dem Versuchsergebnis unter 3.2. entsprechen. Mit einem zusätzlichen Kontrollversuch, in dem nur die inaktivierte heterogene Lipase genutzt wird, soll sichergestellt werden, dass diese vollständig ihre katalytische Aktivität eingestellt hat und die Versuchsergebnisse nicht verfälscht.

Tab. 10: 3.3.4.: Umsatz & Selektivität

		Probe 1	Probe 2	Mittelwert	StAbw	Kontrollv.
LM	2-M-2-B [g]	16,3000	16,3000			16,3000
Substrat 1	GF [g]	0,5275	0,5268			0,5246
Substrat 2	LSME [g]	0,4398	0,4291			0,4309
Lipase	heterogen [g]	0,2022	0,2027			0,2026
	homogen [g]	0,1989	0,2096			0,0000
Int. Stand.	1-Octanol [g]	0,1474	0,1431			0,1326
Flächen%	1-Octanol [%]	23,333	22,416			19,078
	LSMEnr [%]	15,388	13,571			46,729
	6RE [%]	0,000	0,000			0,000
	5RE [%]	33,923	36,285			0,000
Rechnungen	m_{LSMEnr} [g]	0,1049	0,0935			0,3504
	U [%]	76,15	78,22	77,18	1,46	18,67
	S	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	S _% [%]	100,00	100,00	100,00	0,00	n.a.

Tab. 11: 3.3.4.: alternative Berechnung der Selektivität

	Probe 1	Probe 2	Mittelwert	StAbw
MAG 1 [%]	2,009	1,778		
MAG 2 [%]	1,116	1,022		
6RE [%]	0,000	0,000		
5RE [%]	33,923	36,285		
S _{alternativ}	10,40	12,41	11,41	1,42
S _{%alternativ} [%]	91,23	92,54	91,89	0,93

Das Chromatogramm des Kontrollversuchs (Anlage 7) zeigt, dass die Hitzeinaktivierung der Lipase erfolgreich verlief. Es sind nur die Substrat-Peaks und der Peak des inneren Standards erkennbar. Dennoch lassen sich, aus den in 3.3.3. genannten Gründen, Umsätze für den Kontrollversuch berechnen (Tab. 10). Die optische Überprüfung mithilfe der Chromatogramme scheint daher in jedem Fall erforderlich zu sein. Sehr auffällig ist das Fehlen des Peaks bei 3,2 min. Da dieser zeitlich vor dem LM-Peak erscheint, ist es möglich, dass es sich dabei um das Formaldehyd handelt. Des Weiteren ist der Peak bei Nutzung der homogenen Lipase größer als bei Nutzung der heterogenen Lipase. Trotz dessen entstehen bei Nutzung der heterogenen Lipase mehr MAG als Nebenprodukt. Diese Beobachtung scheint nur mit der unter 3.3.3. geäußerten Vermutung vereinbar, dass freies Formaldehyd mit dem Trägermaterial reagieren könnte und die Konzentration an freiem Formaldehyd in Lösung deswegen geringer ist. Werden beide Enzyme genutzt (Probe 1 & 2) ist der Peak vorhanden. Möglicherweise sorgt in diesem Fall die räumliche Trennung von Enzym und Trägermaterial dafür, dass freies Formaldehyd nicht mit dem Trägermaterial in Kontakt tritt. Sehr auffällig ist neben den offensichtlich hohen Umsätzen die ebenso hohe Selektivität (Tab. 11). Verglichen mit Versuch 3.2. in dem nur die homogene Lipase eingesetzt wurde, werden in diesem Versuch 18 % mehr Umsatz und 80 % höhere Selektivitäten (MAG eingeschlossen) erreicht (Tab. 12). Diese Berechnungen scheinen unter Berücksichtigung der Chromatogramme durchaus vertrauenswürdig zu sein. Ein vergleichsweise großer Peak des 5RE, kleine MAG-Peaks und das Fernbleiben des 6RE-Peaks verstärken diesen Eindruck. Eine erkennbare Erhöhung der Selektivität scheint einem negativen Einfluss des Trägermaterials sogar zu widersprechen. Da bei immobilisierten Enzymen häufig eine Selektivitätszunahme zu verzeichnen ist [2], wird sich die homogene Lipase vermutlich äußerlich an den Träger angelagert haben. Da es aber nur oberflächlich auf dem Träger adsorbiert ist, tritt das Produkt nach Freigabe aus dem aktiven Zentrum nicht mit dem Trägermaterial in Kontakt. Dadurch wird möglicherweise eine Reaktion des im GF gebundenen Formaldehyds mit dem Phenol-Formaldehyd-Träger vermieden.

Tab. 12: Vergleich von 3.2. & 3.3.4.

		Mittelwert	StAbw
3.2.	U [%]	65,06	3,79
	S _{alternativ}	6,37	0,87
	S _{%alternativ} [%]	87,96	1,65
3.3.4.	U [%]	77,18	1,46
	S _{alternativ}	11,41	1,42
	S _{%alternativ} [%]	91,89	0,93
Wiederf. [%]	U [%]	118,63	
	S _{alternativ} [%]	179,12	
	S _{%alternativ} [%]	104,47	

4. ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK

Ausgehend von den Ergebnissen von Rüschen, Klaas et al. (2007) [21] zur selektiven Veresterung von Glycerinaldehyd mittels dem homogenen Enzym „Patalase 20,000L“ (Novozymes) wurde in dieser Arbeit die Anwendbarkeit der heterogenen Lipase „Lipozyme RM IM“ (Novozymes) zur regioselektiven (1,3-selektiven) Umesterung von Glycerinaldehyd mit Laurinsäuremethylester überprüft. Zunächst sollten geeignete Reaktionsbedingungen für die heterogene Lipase gefunden werden, in denen ähnliche Umsätze und Selektivitäten, verglichen mit der Nutzung der homogenen Lipase erzielt werden. Anschließend hätte die Wiederverwendbarkeit der heterogenen Lipase im Batch-Prozess durch Abfall der Umsätze überprüft werden können. Es konnten jedoch keine geeigneten Reaktionsbedingungen für die heterogene Lipase gefunden werden. Zwei Ursachen wurden dafür in Betracht gezogen. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass das Trägermaterial der heterogenen Lipase die Reaktionsbedingungen beeinflusst und zum anderen, dass das Enzym durch das Immobilisierungsverfahren aus sterischen Gründen an der Reaktion gehindert wird. Um den Einfluss des Trägermaterials auf das Reaktionsgeschehen zu klären wurde das heterogene Enzym inaktiviert und sowohl das inaktivierte heterogene Enzym als auch das aktive homogene Enzym in der Reaktion eingesetzt. Ein Abfall der katalytischen Aktivität des homogenen Enzyms konnte jedoch nicht festgestellt werden. Da sich jedoch das homogene Enzym frei in Lösung, das heterogene Enzym hingegen eingeschlossen in den Poren des Trägers befindet wird ein negativer Einfluss des Trägermaterials, zumal es sich dabei um Phenol-Formaldehyd-Kondensate handelt, nicht ausgeschlossen.

Eine Überprüfung dieser These wäre möglich, sofern durch massenspektrometrische Analysen eindeutig der undefinierte Peak vor dem Lösungsmittel-Peak definiert wird. Handelt es sich dabei um Formaldehyd, könnte durch ein einfaches Verfahren der Einfluss des Trägermaterials getestet werden. Dazu wird in ein Reaktionsgefäß das Lösungsmittel 2-Methyl-2-Butanol überführt und die inaktivierte heterogene Lipase als auch Formaldehyd dazu gegeben. Auf eine gute Durchmischung während der Reaktion muss geachtet werden, damit Formaldehyd in geeigneter Weise mit dem Träger in Kontakt treten kann. Durch gaschromatographische Analysen wird die Konzentration des Formaldehyds vor der Reaktion und nach 72 Stunden gemessen. Ist ein Abfall der Formaldehyd-Konzentration festzustellen, so ist diese Annahme bestätigt worden. In diesem Fall müsste auf ein anderes Trägermaterial zurückgegriffen werden. Polypropylen [5] oder Polystyrol [10] könnten für diese Zwecke dann besser geeignet sein als Phenol-Formaldehyd.

Trifft diese Annahme nicht zu, müsste der Einfluss der Immobilisation auf das Enzym überprüft werden. Möglicherweise kommt es zu Konformationsänderungen. Eine Möglichkeit wäre, die Unlöslichkeit der homogenen Lipase in aprotisch-unpolaren Lösungsmitteln auszunutzen. In diesen Medien würde die Lipase selbst ohne spezielle Wechselwirkungen zwischen Enzym und Trägermaterial an wasserfeuchten Trägern haften bleiben [22]. Die Nachteile protischer oder polarer Lösungsmittel wie beispielsweise Konformationsänderungen des Enzyms, Diffusion der enzymatischen Hydrathülle in das umliegende Medium aber auch mögliche Acylmigrationen oder Entacetalisierungen können vermieden bzw. gemindert werden. Allerdings dürften diese Medien die Diffusion des Substrats Glycerinformatol sehr erschweren. Die Hinzugabe von Cosolventien würde höchstwahrscheinlich erforderlich werden [13]. Ein umfassendes Lösungsmittel-Screening wäre in diesem Fall unerlässlich. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist jedoch, die leichte Ablösbarkeit des Enzyms vom Träger. Einer erforderlichen mechanischen Beanspruchung im industriellen Maßstab hält dieses Immobilisationsverfahren sicher nicht stand.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Bauer, M.; Kuschel, F.; Sawade, H.; Boeffel C.: Polymerisierbare oder vernetzbare Dozierstoffe, diese enthaltende flüssigkristalline Zusammensetzung und deren Verwendung. DE 10 2004 038 131 B4, **2008**.
- [2] Behr, A.; Eitling, J.; Irawadi, K.; Leschinski, J.; Lindner, F.: Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. RSC Publishing, Green Chemistry, 10 (**2008**), 13-30.
- [3] Bergemann, D.: Synthese Lösungsmittel auf biogener Basis. Laborpraxis, 34 (**2010**) 6, 46-49.
- [4] Berger, M.; Schneider, P.: Regioselectivity of lipases in organic solvents. Biotechnology Letters, 13 (**1991**) 5, 333-338.
- [5] Bornscheuer, U.T.; Kazlauskas, R.J.: Hydrolases in organic synthesis: Regio- and stereoselective biotransformations, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, **1999**.
- [6] Coleman, T.; Blankenship, A.: Process for the preparation of glycerol formal. US 2010/0094027 A1, **2010**.
- [7] Company, C.E.; Ferrer, N.B.; Boliart, J.C.: Preparation of fatty acid esters of glycerol formal and its use as biofuel. US 2010/0005708 A1, **2010**.
- [8] Delgado Puche, J.: Procedure to obtain biodiesel fuel with improved properties at low temperature. US 7,637,969 B2, **2009**.
- [9] Deutsch, J.; Martin, A.; Lieske, H.: Investigations on heterogeneously catalysed condensations of glycerol to cyclic acetals. Journal of Catalysis, 245 (**2007**) 428-435.
- [10] Eigtved, P.: Immobilized mucor miehei lipase for transesterification. US 4,798,793, **1989**.
- [11] Guerrero-Pérez, M.O.; Rosas, J.M.; Bedia, J.; Rodríguez-Mirasol, J.; Cordero, T.: Recent inventions in glycerol transformations and processing. Bentham Science Publishers, Recent Patents on Chemical Engineering, 2 (**2009**) 1, 11-21.
- [12] Jaecker-Voirol, A.; Durand, I.; Hillion, G.; Delfort, B.; Montagne, X.: Glycerin for new biodiesel formulation. Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP, 63 (**2008**) 4, 395-404.
- [13] Jeromin, G.E.; Bertau, M.: Bioorganikum. 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, **2005**.
- [14] Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C.: Industrial biotransformations. Weinheim : Wiley-VCH, **2000**.

- [15] Marty, A.; Chulalaksananukul, W.; Condoret, J.S.; Willemot, R.M.; Durand, G.: Comparison of lipase-catalysed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane. *Biotechnology Letters*, 12 (1990) 1, 11-16.
- [16] Metzger, B.: Glycerol combustion. Master's thesis, North Carolina State University, Raleigh, 2007.
- [17] Norris, F.A.: Monoglycerides. US 2,619,493, 1952.
- [18] Otera, J.: Esterification. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.
- [19] Perraud, R.; Laboret, F.: Optimization of methyl propionate production catalysed by *mucor miehei* lipase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44 (1995) 321-326.
- [20] Pivnichny, J.V.: Separation and determination of the two components of glycerol formal by high-performance liquid chromatography. Pergamon Press, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2 (1984) 3/4, 491-500.
- [21] Rüschen Klaas, M.; Zawerucha, J.; Schneider, J.: Selective esterification of glycerol formal. Presentation, 98th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo, Quebec, 2007.
- [22] Ruttloff, H. (Hrsg.): *Industrielle Enzyme*. 2. Aufl. Hamburg: Behr's Verlag, 1994.
- [23] Schmidt, M.: Untersuchung zum Einsatz von Esterasen und Lipasen in der organischen Chemie. Inauguraldissertation, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2005.
- [24] Showler, A.J.; Darley, P.A.: Condensation products of glycerol with aldehydes and ketones. 2-substituted m-dioxan-5-ols and 1,3-dioxolane-4-methanols. Faculty of Medical Science, University of Medical Sciences, Bangkok, Thailand, and Department of Science, Medway College of Technology, Chatham, Kent, England, 1966.
- [25] Theil, F.: *Enzyme in der Organischen Synthese*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl., 1997.
- [26] Wiemann, L.O.: Entwicklung stabiler Enzympräparate zur Verwendung als industrielle Biokatalysatoren. Inauguraldissertation, Technische Universität Berlin, 2010.

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Acetalisierung des Glycerins (R = H, Alkylgruppe).....	6
Abb. 2: Ringtransformation.....	7
Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der enzymatischen Katalyse von Fettsäure(estern) mit 5R..	8
Abb. 4: Komponentenidentifizierung (Chromatogramm).....	14
Abb. 5: Apparatur zur Hitzedenaturierung von Enzymen.....	17
Abb. 6: Acetalisierung des Glycerins mit Formaldehyd	34
Abb. 7: 3.2.: Probe 1 (Chromatogramm)	37
Abb. 8: 3.2.: Probe 2 (Chromatogramm)	38
Abb. 9: 3.2.: Probe 3 (Chromatogramm)	39
Abb. 10: 3.3.1. Probe 1 (Chromatogramm).....	40
Abb. 11: 3.3.1.: Probe 2 (Chromatogramm)	41
Abb. 12: 3.3.1.: Probe 3 (Chromatogramm)	42
Abb. 13: 3.3.2.: Einfachbestimmung (Chromatogramm).....	43
Abb. 14: 3.3.3.: Probe 1 (Chromatogramm)	44
Abb. 15: 3.3.3.: Probe 2 (Chromatogramm)	45
Abb. 16: 3.3.4.: Kontrollversuch (Chromatogramm).....	46
Abb. 17: 3.3.4.: Probe 1 (Chromatogramm)	47
Abb. 18: 3.3.4.: Probe 2 (Chromatogramm)	48

7. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: 3.2.: Umsatz & Selektivität der Dreifachbestimmung.....	20
Tab. 2: 3.2.: Wiederfindung der Ergebnisse.....	20
Tab. 3: 3.3.1.: Umsatz & Selektivität der Dreifachbestimmung	21
Tab. 4: 3.3.1.: alternative Berechnung der Selektivität	22
Tab. 5: 3.2.: alternative Berechnung der Selektivität	22
Tab. 6: 3.3.2.: Umsatz & Selektivität	23
Tab. 7: 3.3.2.: alternative Berechnung der Selektivität	23

Tab. 8: 3.3.3.: Umsatz & Selektivität der Doppelbestimmung	25
Tab. 9: 3.3.3.: alternative Berechnung der Selektivität	25
Tab. 10: 3.3.4.: Umsatz & Selektivität	26
Tab. 11: 3.3.4.: alternative Berechnung der Selektivität	26
Tab. 12: Vergleich von 3.2. & 3.3.4.	27
Tab. 13: Massen der Chemikalien für einen 20ml-Ansatz	36
Tab. 14: 3.2.: Probe 1 (Werte)	37
Tab. 15: 3.2.: Probe 2 (Werte)	38
Tab. 16: 3.2.: Probe 3 (Werte)	39
Tab. 17: 3.3.1.: Probe 1 (Werte)	40
Tab. 18: 3.3.1.: Probe 2 (Werte)	41
Tab. 19: 3.3.1.: Probe 3 (Werte)	42
Tab. 20: 3.3.2. Einfachbestimmung (Werte)	43
Tab. 21: 3.3.3.: Probe 1 (Werte)	44
Tab. 22: 3.3.3.: Probe 2 (Werte)	45
Tab. 23: 3.3.4.: Kontrollversuch (Werte)	46
Tab. 24: 3.3.4.: Probe 1 (Werte)	47
Tab. 25: 3.3.4.: Probe 2 (Werte)	48

8. FORMELVERZEICHNIS

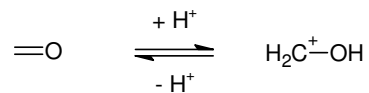
Formel 1: Quantifizierung des n.r. LSME	15
Formel 2: Berechnung des Umsatzes	15
Formel 3: Berechnung der 1,3-Selektivität	16
Formel 4: Berechnung der prozentualen 1,3-Selektivität	16
Formel 5: Berechnung der Wiederfindung	17

9. ANLAGENVERZEICHNIS

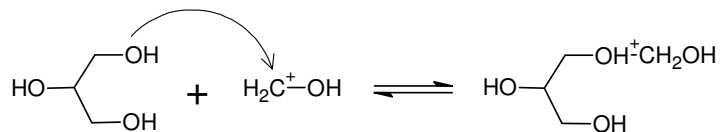
Anlage 1: Acetalisierung des Glycerins mit Formaldehyd

1. Halbacetalbildung

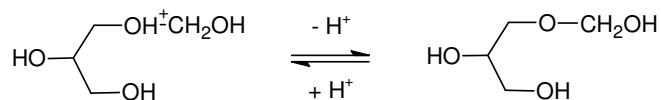
1.1. Protonierung der Carboxylgruppe des Formaldehyds



1.2. Nucleophiler Angriff einer OH-Gruppe des Glycerins

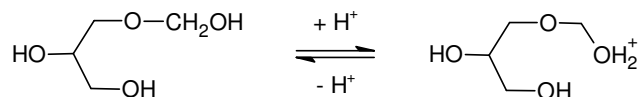


1.3. Abgabe des Protons

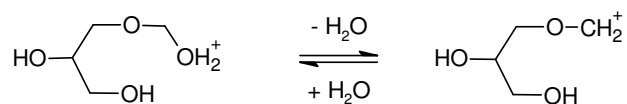


2. Vollacetalbildung

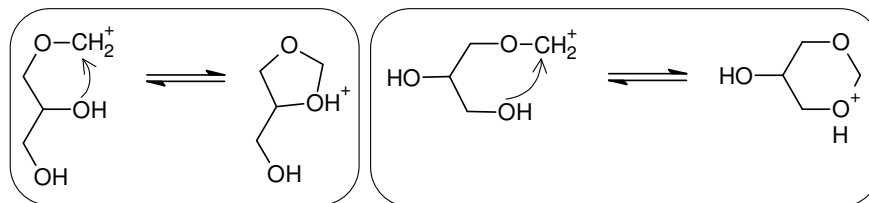
2.1. Protonierung der OH-Gruppe des Halbacetals



2.2. Eliminierung von Wasser



2.3. Nucleophiler Angriff einer anderen OH-Gruppe



2.4. Abgabe des Protons

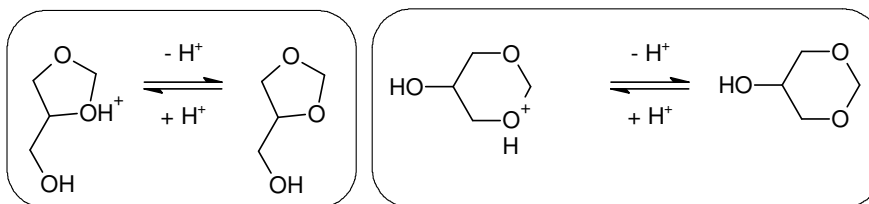


Abb. 6: Acetalisierung des Glycerins mit Formaldehyd

Anlage 2: Berechnungen der Massen der Chemikalien und Enzyme

Volumen 2-M-2-B:

$$20\text{ml} = 20 \cdot 10^{-3}\text{l}$$

angestrebte Konzentration GF:

$$0,25 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

für 20 ml benötigte Stoffmenge GF:

$$0,25 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 20 \cdot 10^{-3}\text{l} = 0,005\text{mol}$$

Molmasse GF:

$$104,11 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Masse der 0,005 mol GF:

$$104,11 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,005\text{mol} = 0,52\text{g}$$

Dichte GF:

$$1,20 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

Volumen der 0,52 g GF:

$$\frac{0,52\text{g}}{1,20 \frac{\text{g}}{\text{ml}}} = 0,43\text{ml}$$

Stoffmenge LSME:

$$2/5 \cdot \text{Stoffmenge GF} = 0,40 \cdot 0,005\text{mol} = 0,002\text{mol}$$

Erklärung: Bei 100 % 1,3-Selektivität würde nur diese Menge umgeestert werden können, da der primäre Alkohol nur 40 % (=2/5) der Stoffmenge des GF bildet. Wird zuviel LSME zugegeben, würde das entstehende Methanol mit dem Alkohol um das Acyl-Enzym konkurrieren. Dadurch würde der Umsatz gemindert werden. Laut Theil (1997) [25] lässt sich durch Zugabe des Alkohols (GF) im Überschuss ein quasi-irreversibler Reaktionsverlauf erreichen.

Molmasse LSME:

$$214,34 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Masse der 0,002 mol LSME:

$$214,34 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,002\text{mol} = 0,43\text{g}$$

Dichte LSME:

$$0,87 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

Volumen der 0,43 g LSME:

$$\frac{0,43g}{0,87 \frac{g}{ml}} = 0,49ml$$

Masse 1-Octanol:

$$0,40 \cdot 0,43g = 0,17g$$

$$\frac{0,17g}{1,079} = 0,16g$$

Erklärung: Bei einem vermuteten Umsatz von 60 % bleiben 40 % der Masse des LSME nach der Umesterung erhalten. Falls annähernd identische Peakflächen angestrebt werden, so müssen bei masseselektiven Detektoren unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors (1,079) annähernd identische Massen aufgegeben werden.

Molmasse 1-Octanol:

$$130,23 \frac{g}{mol}$$

Stoffmenge der 0,17 g 1-Octanol:

$$\frac{0,17g}{130,23 \frac{g}{mol}} = 0,001mol$$

Dichte 1-Octanol:

$$0,82 \frac{g}{ml}$$

Volumen der 0,16 g 1-Octanol:

$$\frac{0,16g}{0,82 \frac{g}{ml}} = 0,21ml$$

Enzymmenge:

$$0,01 \text{ mol LSME} / 1 \text{ g Enzym} =$$

$$0,002 \text{ mol LSME} / 0,2 \text{ g Enzym}$$

Tab. 13: Massen der Chemikalien für einen 20ml-Ansatz

	LM 2-M-2-B	Substrat 1 GF	Substrat 2 LSME	Int. Stand. 1-Octanol	Enzym Lipase	
Molmasse	g/mol	88,15	104,11	214,34	130,23	n.a.
Dichte	g/ml	0,815	1,203	0,869	0,824	n.a.
Volumen	ml	20,0000	0,4327	0,4933	0,1929	n.a.
Masse	g	16,3000	0,5206	0,4287	0,1589	0,2000
Stoffmenge	mol	0,1849	0,0050	0,0020	0,0012	n.a.

Es wurde mit mehr signifikanten Stellen bei Molmasse und Dichte gerechnet, als vorhanden, da einige Stoffmengen sonst nicht darstellbar gewesen wären und demzufolge auch Volumina und Massen nicht berechnet hätten werden können.

Anlage 3: 3.2. Wiederfindung von Umsatz & Selektivität mit homogener Lipase

Dreifachbestimmung

Probe 1:

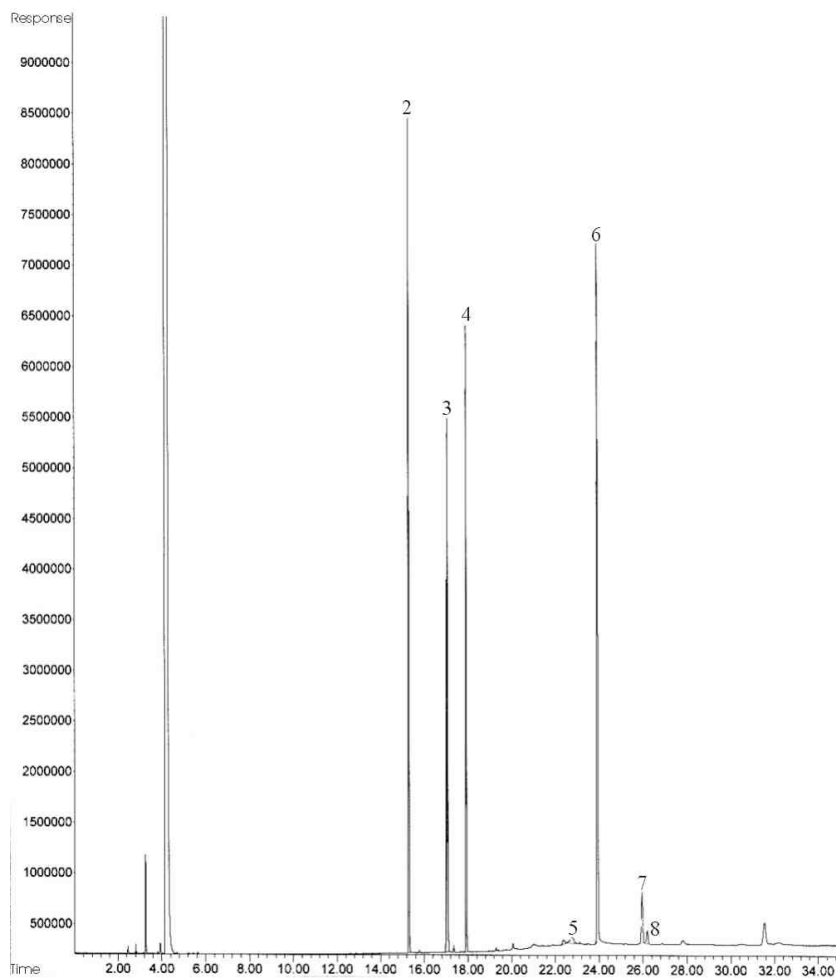


Abb. 7: 3.2.: Probe 1 (Chromatogramm)

Tab. 14: 3.2.: Probe 1 (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,304	171989340	23,534
3	17,052	172955600	23,666
4	17,934	132502999	18,131
5	22,767	7548903	1,033
6	23,937	216659196	29,646
7	25,956	22849903	3,127
8	26,196	6320169	0,865

Probe 2:

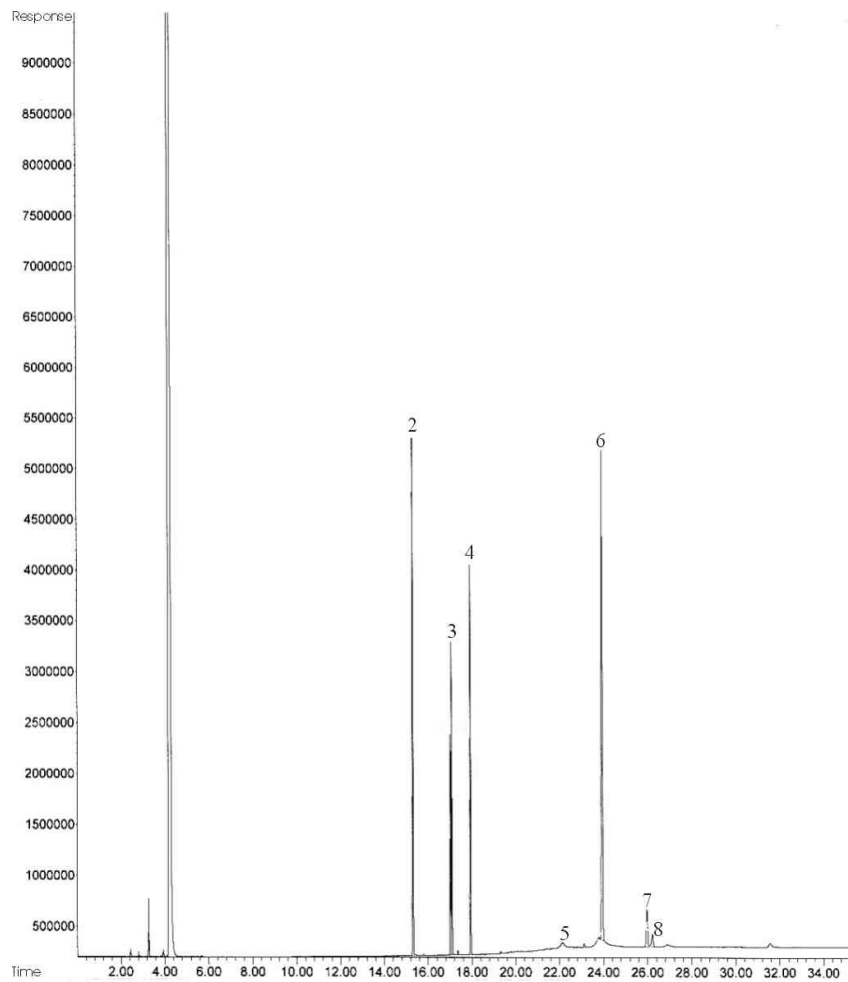


Abb. 8: 3.2.: Probe 2 (Chromatogramm)

Tab. 15: 3.2.: Probe 2 (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,310	105077132	22,809
3	17,058	100763137	21,872
4	17,934	80374082	17,446
5	23,115	1300947	0,282
6	23,940	150604261	32,691
7	25,966	16197899	3,516
8	26,209	6372659	1,383

Probe 3:

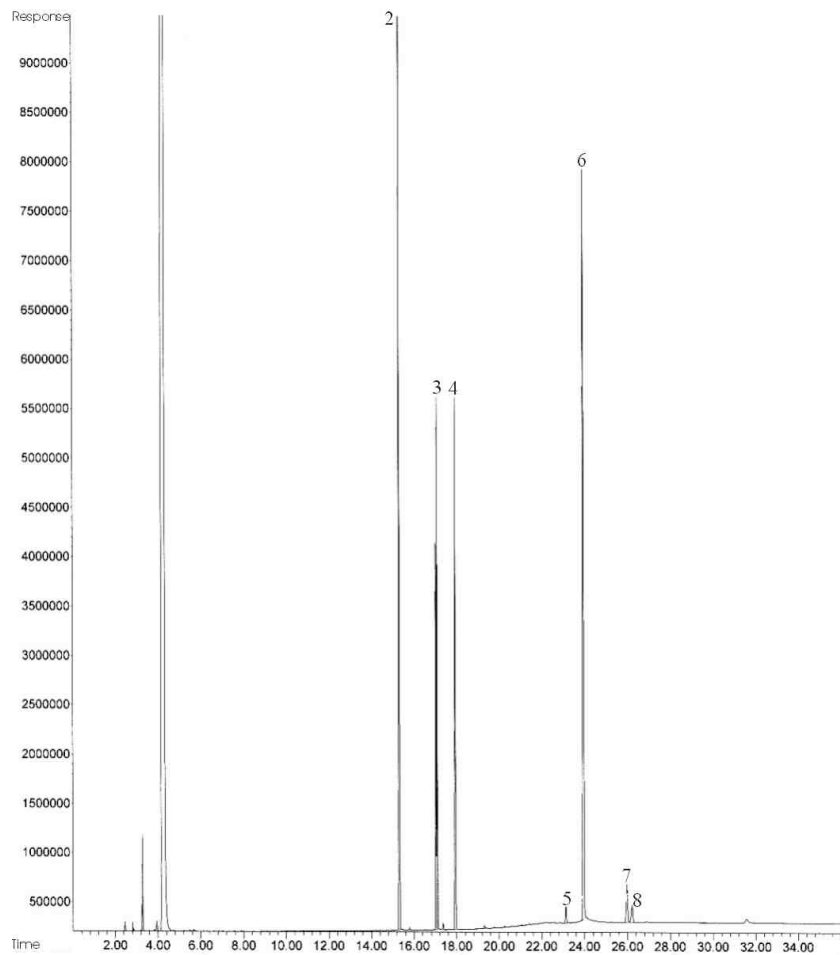


Abb. 9: 3.2.: Probe 3 (Chromatogramm)

Tab. 16: 3.2.: Probe 3 (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,319	196206147	25,420
3	17,059	183096499	23,721
4	17,942	116836238	15,137
5	23,122	5248959	0,680
6	23,953	243748933	31,579
7	25,975	17662172	2,288
8	26,213	9059919	1,174

Anlage 4: 3.3.1. Nutzung der heterogenen Lipase unter unveränderten Bedingungen

Dreifachbestimmung:

Probe 1:

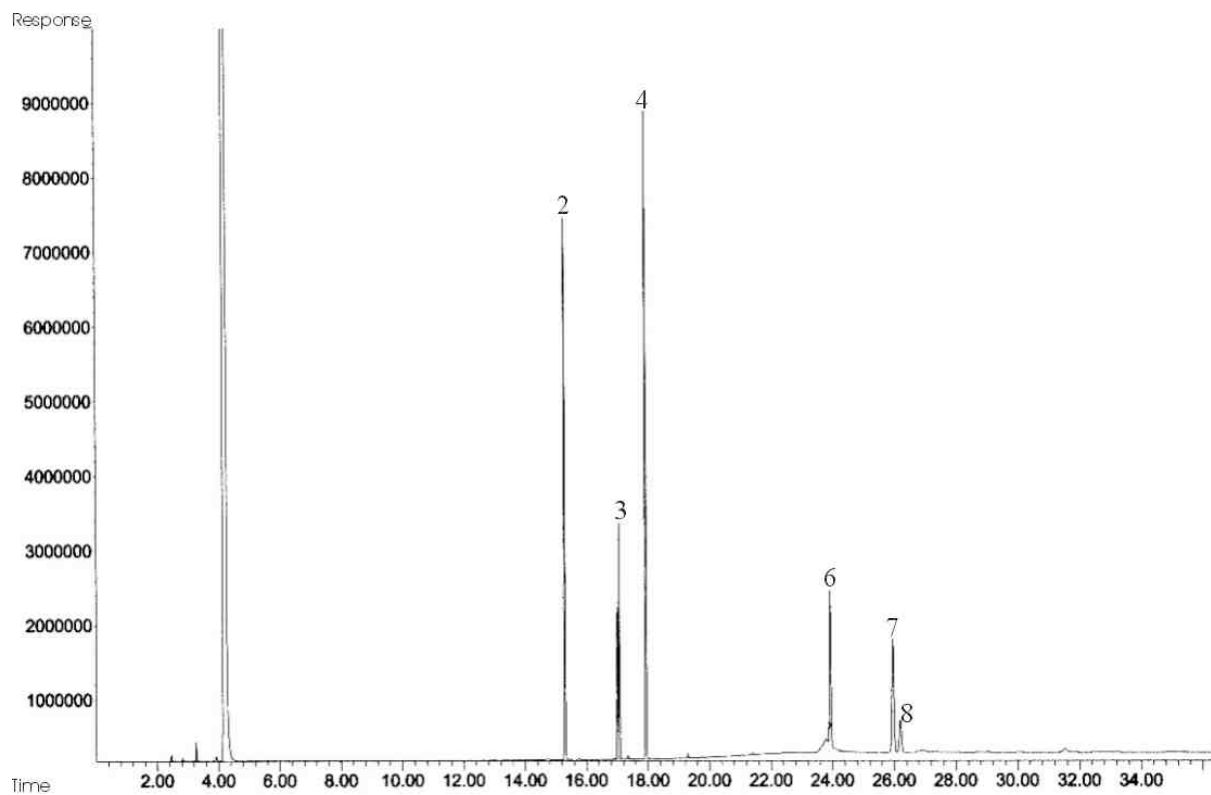


Abb. 10: 3.3.1. Probe 1 (Chromatogramm)

Tab. 17: 3.3.1.: Probe 1 (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,300	154629144	25,113
3	17,043	101127561	16,424
4	17,937	189005326	30,696
6	23,926	81063943	13,165
7	25,965	68450467	11,117
8	26,201	21462239	3,486

Probe 2:

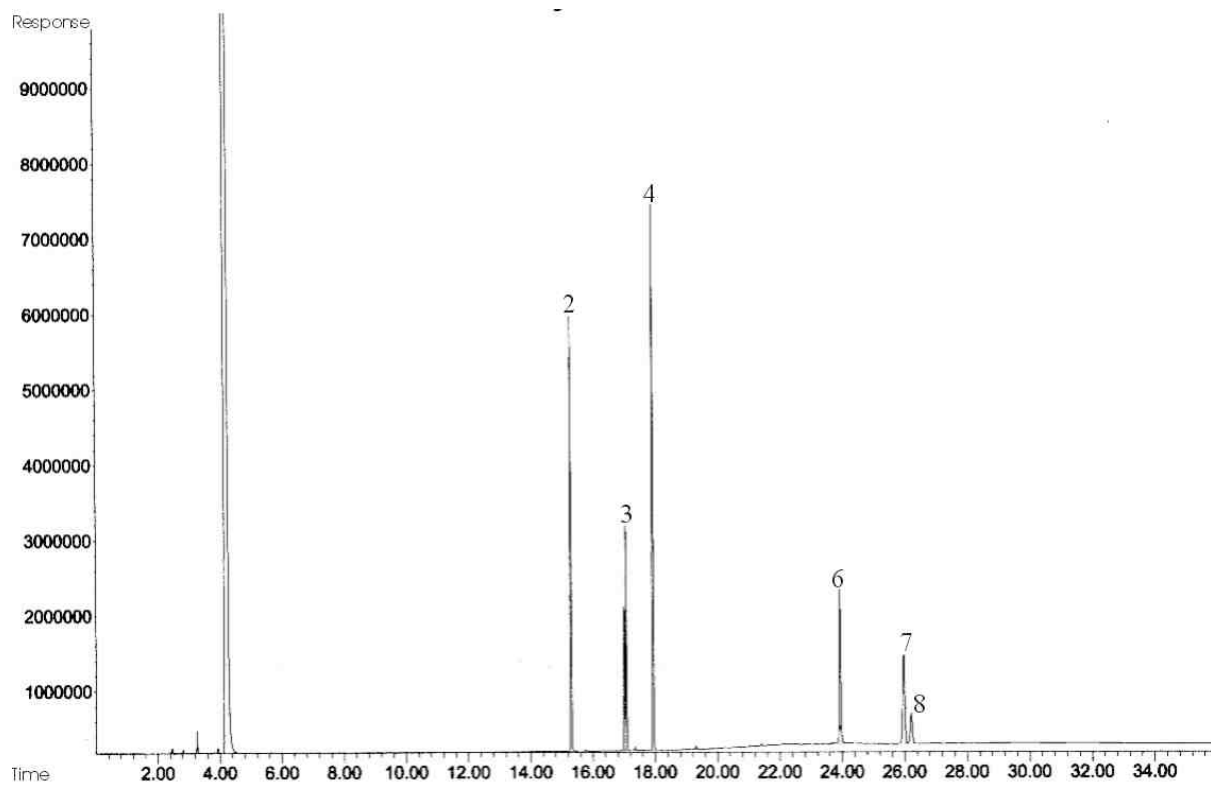


Abb. 11: 3.3.1.: Probe 2 (Chromatogramm)

Tab. 18: 3.3.1.: Probe 2 (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,226	119808950	23,179
3	17,047	93042990	18,001
4	17,942	161663083	31,277
6	23,933	68106926	13,177
7	25,976	55001181	10,641
8	26,211	19256032	3,725

Probe 3:

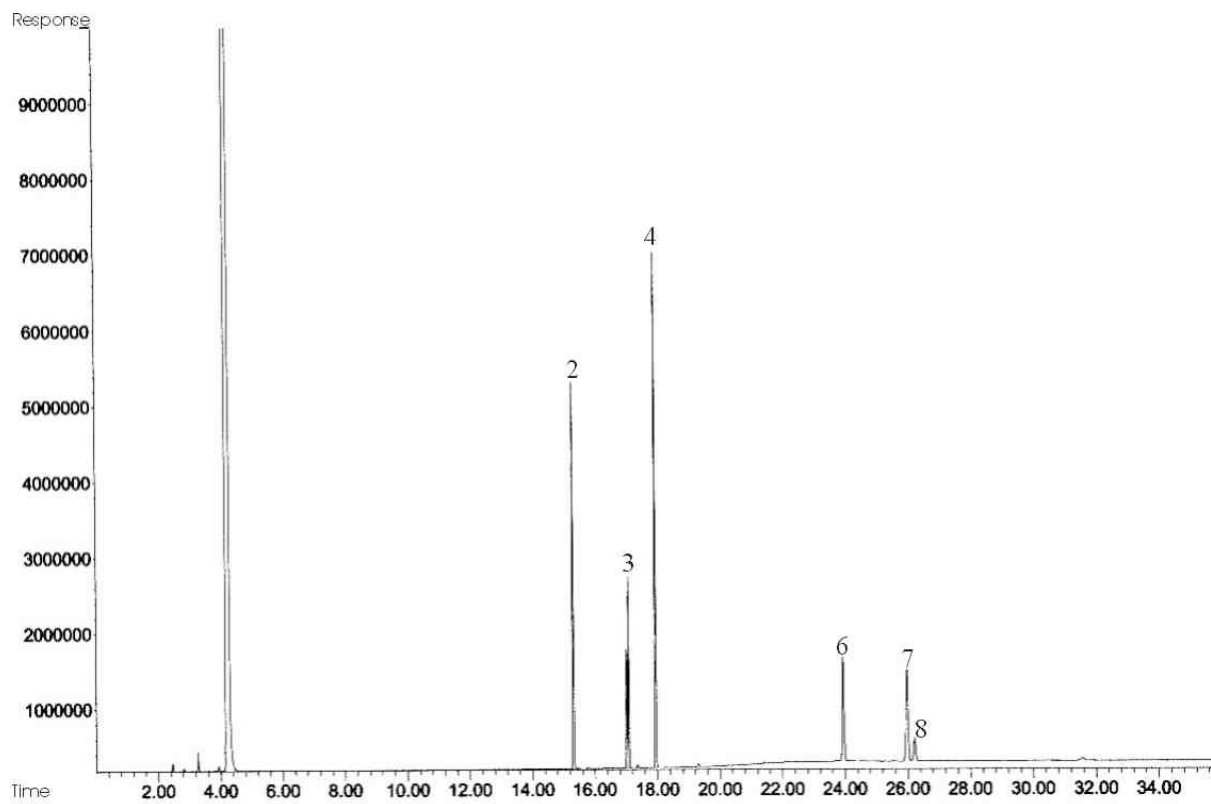


Abb. 12: 3.3.1.: Probe 3 (Chromatogramm)

Tab. 19: 3.3.1.: Probe 3 (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,312	108474195	24,267
3	17,052	78781623	17,624
4	17,945	143699557	32,147
6	23,937	45738058	10,232
7	25,980	55935355	12,513
8	26,219	14379641	3,217

Anlage 5: 3.3.2. Verdopplung der Enzymmenge

Einfachbestimmung:

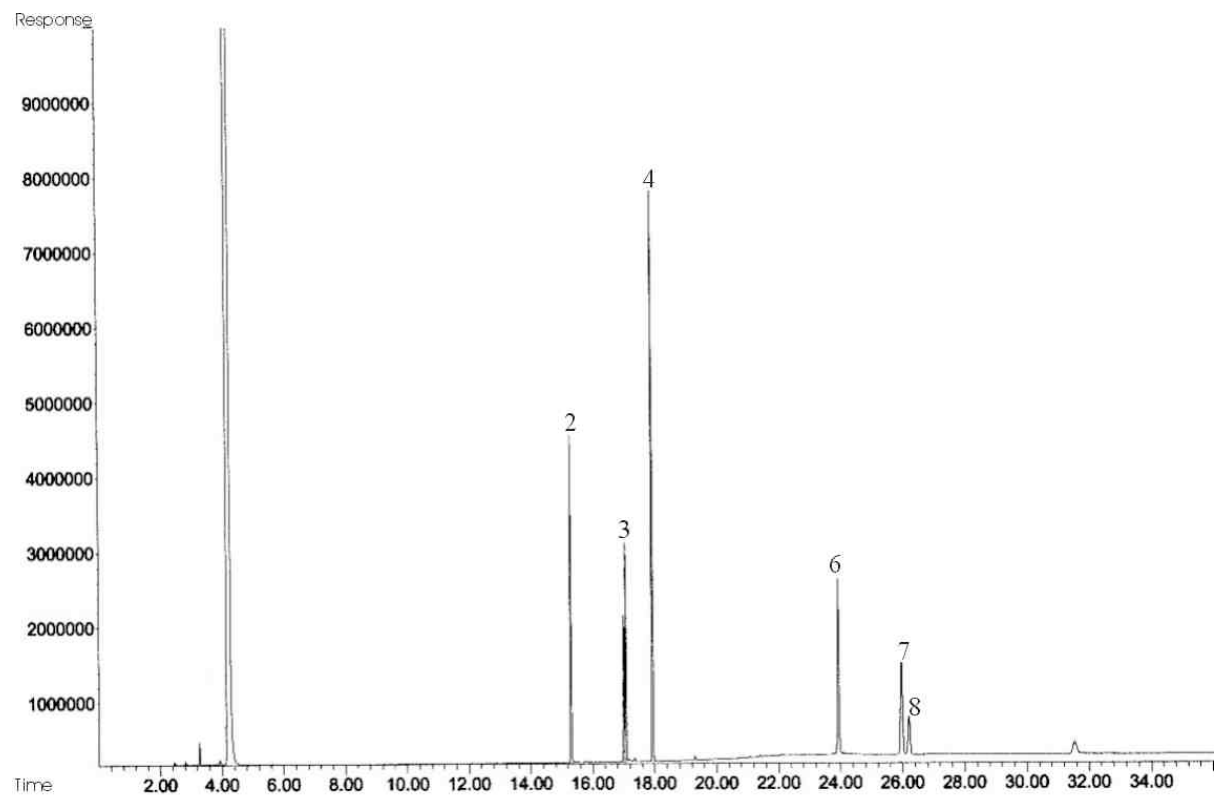


Abb. 13: 3.3.2.: Einfachbestimmung (Chromatogramm)

Tab. 20: 3.3.2. Einfachbestimmung (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,301	92733419	18,154
3	17,044	93430073	18,290
4	17,938	163307708	31,969
6	23,932	77939146	15,258
7	25,972	58418490	11,436
8	26,209	24994817	4,893

Anlage 6: 3.3.3. pH-Pufferung mit Salzen

Doppelbestimmung:

Probe 1:

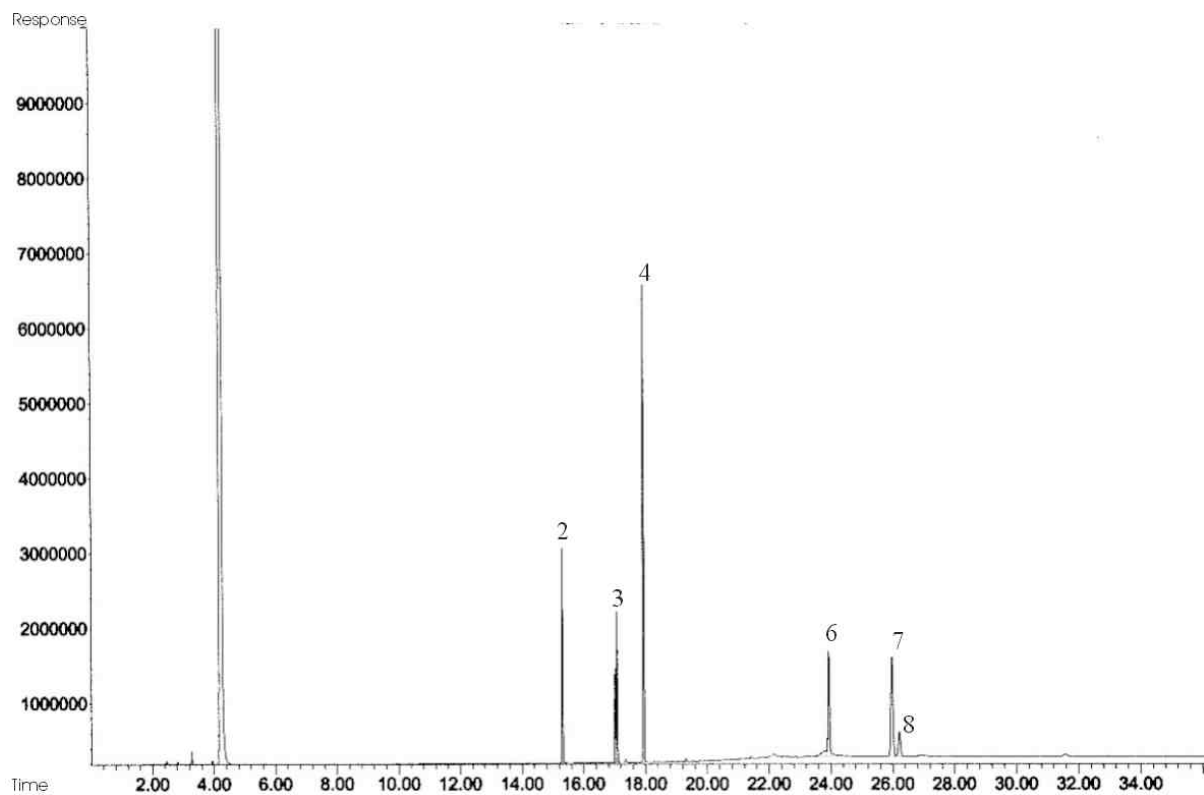


Abb. 14: 3.3.3.: Probe 1 (Chromatogramm)

Tab. 21: 3.3.3.: Probe 1 (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,308	59724047	15,425
3	17,050	62582165	16,164
4	17,944	137242367	35,447
6	23,936	50138638	12,950
7	25,980	61718519	15,940
8	26,215	15775896	4,075

Probe 2:

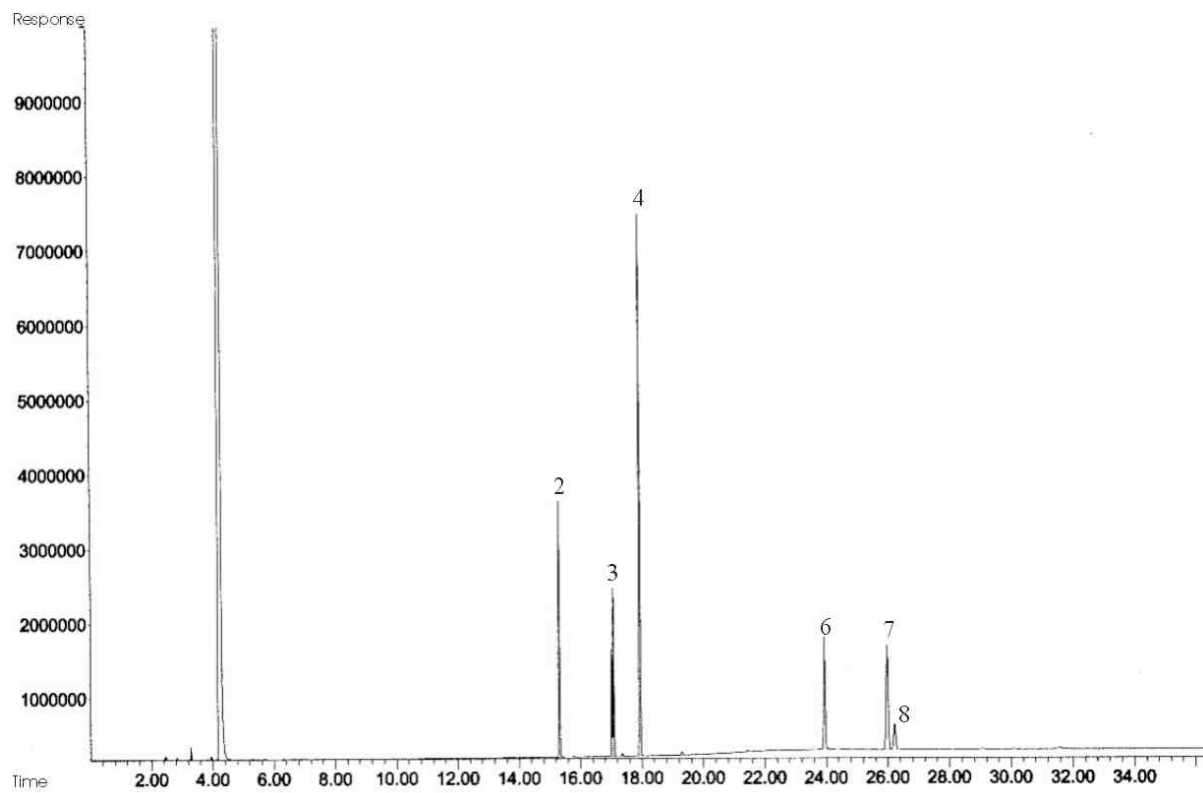


Abb. 15: 3.3.3.: Probe 2 (Chromatogramm)

Tab. 22: 3.3.3.: Probe 2 (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,313	71337589	16,648
3	17,053	70566447	16,468
4	17,947	155894509	36,380
6	23,940	50185074	11,711
7	25,983	64303407	15,006
8	26,219	16227752	3,787

Anlage 7: 3.3.4. Ermittlung des Einflusses des Trägermaterials

Kontrollversuch:

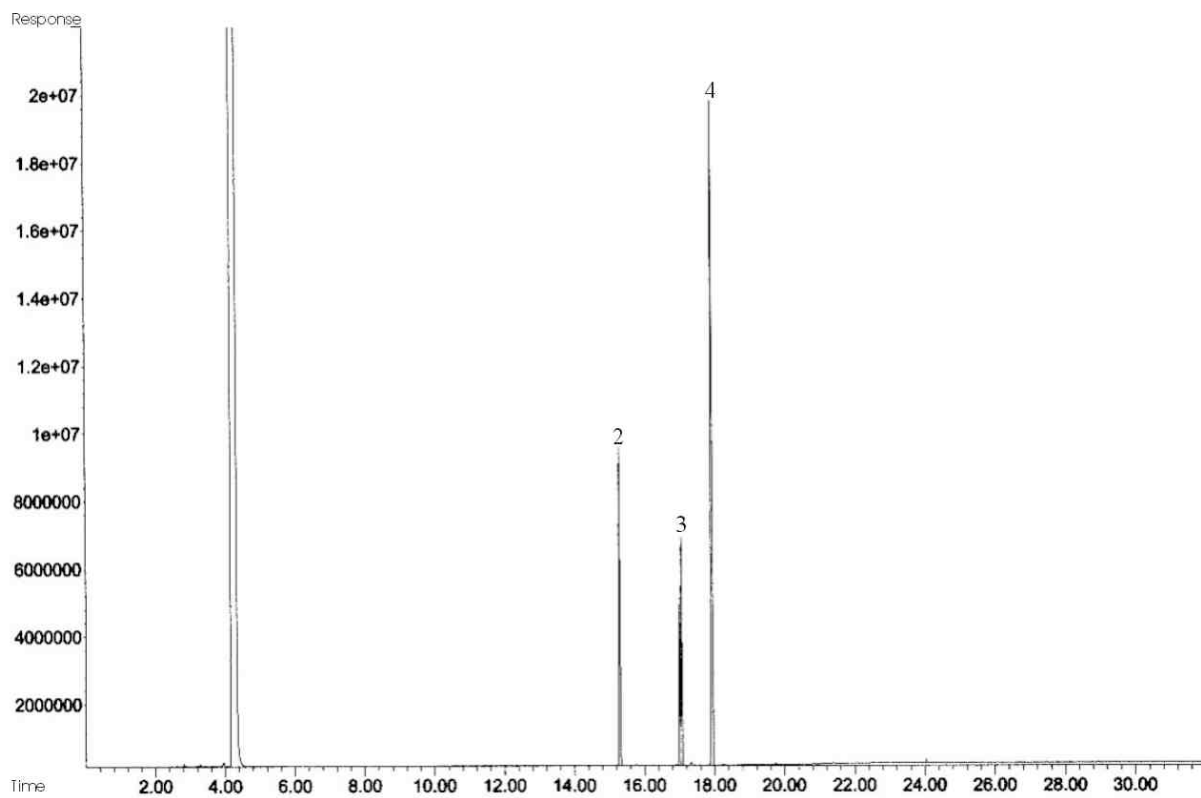


Abb. 16: 3.3.4.: Kontrollversuch (Chromatogramm)

Tab. 23: 3.3.4.: Kontrollversuch (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,300	199495781	19,078
3	17,042	226824474	21,692
4	17,945	488634898	46,729

Doppelbestimmung:

Probe 1:

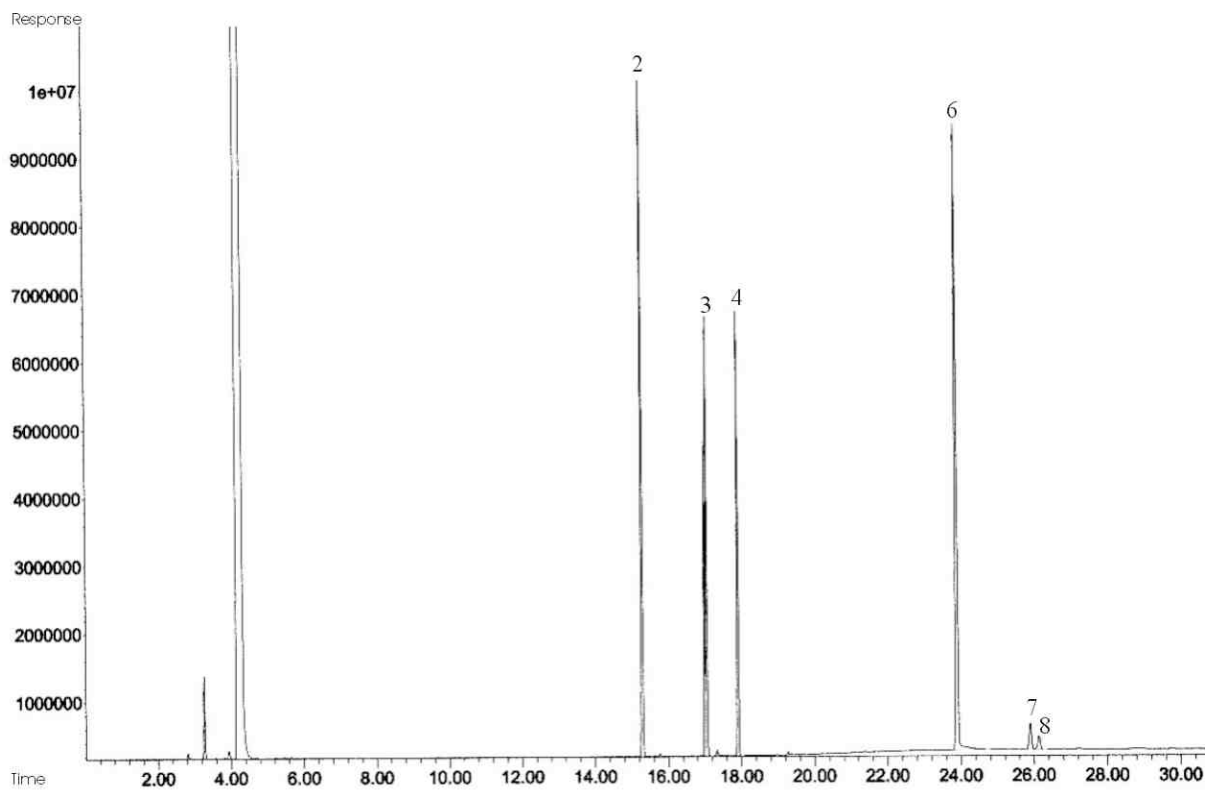


Abb. 17: 3.3.4.: Probe 1 (Chromatogramm)

Tab. 24: 3.3.4.: Probe 1 (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,296	211361013	23,333
3	17,037	219485892	24,230
4	17,915	139391955	15,388
6	23,902	307294038	33,923
7	25,894	18202899	2,009
8	26,129	10110339	1,116

Probe 2:

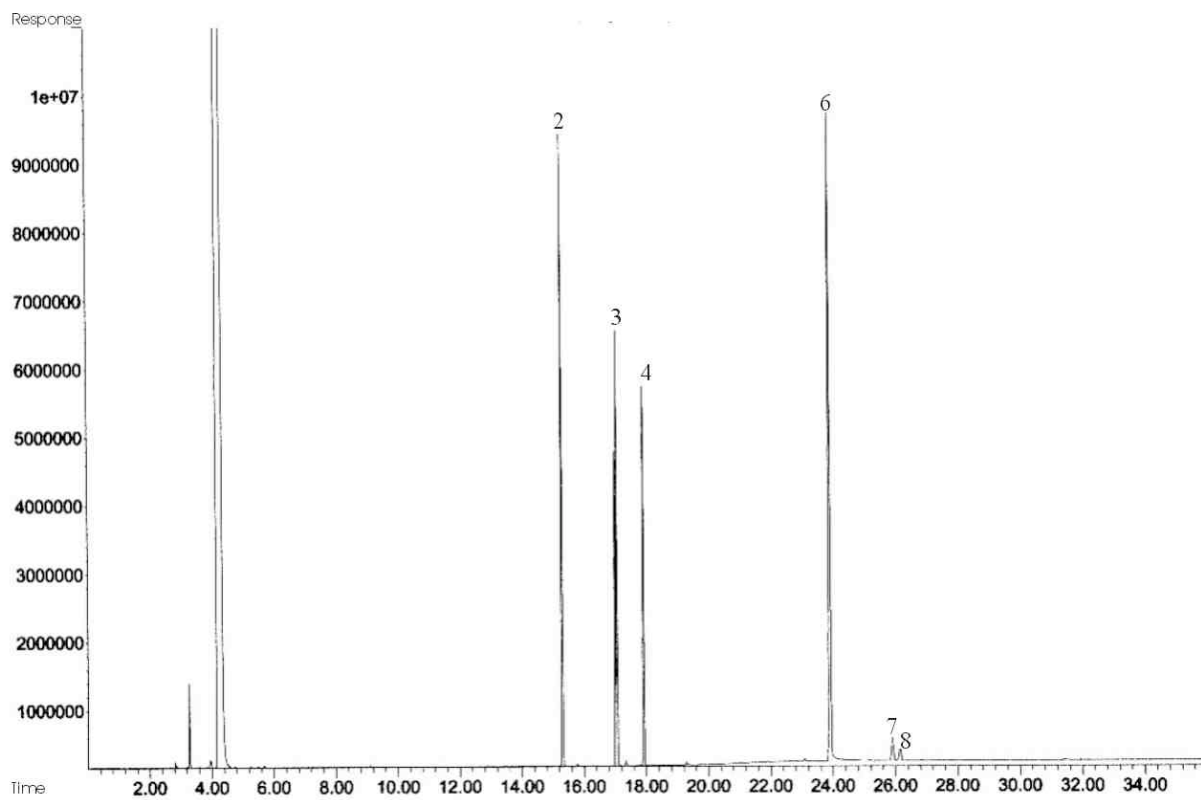


Abb. 18: 3.3.4.: Probe 2 (Chromatogramm)

Tab. 25: 3.3.4.: Probe 2 (Werte)

Peak Nr.	Ret.zeit min	Peakfläche	Flächen% %
2	15,308	192074548	22,416
3	17,042	213597499	24,928
4	17,924	116287261	13,571
6	23,914	310908849	36,285
7	25,907	15236169	1,778
8	26,149	8755746	1,022

ERKLÄRUNG ÜBER DIE SELBSTSTÄNDIGE ANFERTIGUNG DER ARBEIT

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift