

**Nutzung von hydrophilen „Green
Solvents“ zur biokatalytischen
Estersynthese in zweiphasigen
Reaktionssystemen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Beatrice Kleiner

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Oktober 2015

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Prof. Dr. Michael Feldbrügge

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2015

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Promotion und dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, Ideen frei zu entwickeln und meiner Arbeit selbständig nachzugehen.

Für die freundliche Übernahme des Korreferates möchte ich Herrn Prof. Dr. Feldbrügge herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Schörken möchte ich mich herzlichst für die Überlassung des interessanten Themas und seiner engagierten Unterstützung in wissenschaftlichen Fragestellungen bedanken. Vielen Dank für die investierte Zeit und ich hoffe dass noch viele Doktoranden die Möglichkeit erhalten, von ihm betreut zu werden.

Der gesamten Fakultät 11 der Technischen Hochschule Köln möchte ich dafür danken, dass sie mich in ihre kleine Gemeinschaft aufgenommen haben und ich hoffe, dass die F11 sich weiter so gut entwickelt. Ein besonders herzlicher Dank geht hierbei an die Mitglieder des 5. OG, die mir in jeder Situation mit Rat, Tat und Spaß zur Seite gestanden haben. Darüber hinaus möchte ich mich bei den Studenten bedanken, die im Rahmen von Bachelorarbeiten oder Praxisprojekten einen Teil zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Mitgliedern des Forschungsinstituts STEPS der TH Köln zum einen für finanzielle Hilfen und zum anderen für die Möglichkeit interessante Einblicke in andere Forschungsbereiche zu erhalten und meine Forschung kritisch zu diskutieren.

Ein besonderer Dank geht ebenfalls an Mitglieder des IMET, namentlich an Dr. Filip Kovacic, Peter Dollinger und Dr. Nadine Katzke für die Bereitstellung der Zellextrakte für das Enzymscreening und auch an alle anderen Mitarbeiter, die mich aktiv oder passiv bei der Arbeit unterstützt haben. Ein großer Dank geht nach Spanien, an Herrn Dr. Manuel Ferrer, für die Überlassung der Vektoren aus Metagenombibliotheken.

Meinen Eltern schulde ich tiefen Dank für die fortwährende Unterstützung in allen Belangen nicht nur in meiner naturwissenschaftlichen Ausbildung. Meinem Freund Benny kann ich gar nicht genug danken, für sein Verständnis, seine Geduld und seinen Glauben an mich insbesondere zum Ende der Arbeit.

Veröffentlichungen

Kleiner, B., Schörken, U.; Native lipase dissolved in hydrophilic green solvents: a versatile 2-phase reaction system for high yield ester synthesis; European Journal of Lipid Science and Technology (2015), 117, S. 167

Kleiner, B., Schörken, U.; Solubilisierte Lipase als Katalysator für die Synthese technischer Ester in hydrophilen Lösungsmitteln; Chemie Ingenieur Technik (2014), 86, S.1410

Kleiner, B., Fleischer, P., Schörken, U.; Biocatalytic synthesis of biodiesel utilizing deep eutectic solvents: A two-step-one-pot approach with free lipases suitable for acidic and used oil processing; Process Biochemistry (2015); doi:10.1016/j.procbio.2015.10.016.

Präsentationen bei internationalen Konferenzen

Kleiner, B., Schörken, U (2014) Poster-Präsentation: Solubilized lipases as catalysts for the synthesis of technical esters in the presence of hydrophilic solvents; ProcessNet-Jahrestagung und 31. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, Deutschland

Kleiner, B., Schörken, U (2014) Poster-Präsentation: Synthesis of technical esters in DES with lipases; 12th Euro Fed Lipid Congress, Montpellier, Frankreich

Kleiner, B., Schörken, U (2014) Poster-Präsentation: Lipase catalyzed synthesis of emollient esters in deep eutectic solvents; 7th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry, Karlsruhe, Deutschland

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
I. Einleitung	1
I.1 Struktur und Funktion von Lipasen	1
I.1.1 Porträts ausgewählter Lipasen	5
I.2 Lipasen in der Biokatalyse	8
I.3 Lipase Katalyse in hydrophilen Lösungsmitteln	17
I.4 Zielsetzung.....	21
II. Material und Methoden	22
II.1 Materialien	22
II.1.1 Zellextrakte	22
II.2 Geräte	24
II.3 Analytische Methoden	24
II.3.1 GC Analytik.....	24
II.3.2 Berechnung der Ausbeuten und der Reaktionsgeschwindigkeiten.....	26
II.3.3 Stickstoffmessung (TN _b).....	26
II.3.4 Wasserbestimmung der Lipidphase	27
II.3.5 Viskositätsmessung.....	27
II.3.6 Fettchemische Kennzahlen	27
II.4 Herstellung DES	29
II.4.1 Berechnung logP-Werte der verwendeten Lösungsmittel	30
II.5 Immobilisation von Lipozym CalB.....	30
II.6 Biokatalytische Reaktionen	30
II.6.1 Probenahme	30
II.6.2 Synthese von Emollientestern	30
II.6.3 Zweistufiges Biodieselfverfahren.....	31
II.6.4 Synthese von Emulgatoren	33
II.6.5 Synthese von 2-Ethylhexylestern.....	34
II.6.6 Biodiesel und Kokosöl Entsäuerung.....	34
II.6.1 Screening verschiedener Reaktionen mit miniaturisierten Methoden	34
II.7 Aufreinigung der Produkte	35
II.7.1 Raffination	35
II.7.2 Aufreinigung mittels Kurzwegdestillation	35
II.8 Stabilität und Recycling der Lipasen.....	36
II.8.1 Stabilisierung von Lipozym CalB in ChCl:U mit Ectoinen	36
II.8.2 Langzeitstabilität.....	36
II.8.3 Recycling von Lösungsmitteln und Lipase	37
II.9 Mikrotiterplatten Enzymassay.....	37

II.10	Biochemische Methoden.....	38
II.10.1	Gewinnung Zellextrakte für Aktivitätstests in Lösungsmitteln.....	38
II.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	38
II.10.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Biuret.....	38
II.10.4	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	39
III.	Ergebnisse	40
III.1	Herstellung und Charakterisierung von DES	40
III.2	Synthese von Emollients.....	45
III.2.1	Vergleich von DES mit anderen Lösungsmitteln.....	45
III.2.2	Optimierung der Reaktionsparameter	49
III.2.3	Reaktion zwischen Laurin- bzw. Ölsäure und verschiedenen Alkoholen	53
III.2.4	Scale-Up der Emollient-Synthese und Produktaufbereitung.....	56
III.3	Herstellung von Biodiesel mittels Enzymkaskade zweier Lipasen	59
III.3.1	Optimierung der Reaktionsparameter der 1. Stufe	60
III.3.2	Optimierung der Reaktionsparameter der 2. Stufe.....	64
III.3.3	Biodiesel Herstellung aus Altfetten	69
III.3.4	Scale-Up und Aufreinigung	70
III.3.5	Recycling des Enzyms.....	73
III.4	Weitere technische Synthesen in DES.....	75
III.4.1	Synthese von Emulgatoren	75
III.4.2	Synthese von Schmierstoffen	76
III.4.3	Entsäuerung von Biodiesel und Kokosöl.....	77
III.5	Enzymscreening in DES.....	81
III.5.1	Screening mit Nitrophenol-Assay	81
III.5.2	Aktivität und Stabilität in Lösungsmitteln.....	83
III.5.3	Screening verschiedener Reaktionen mit miniaturisierten Methoden	86
III.5.4	Vergleichende Untersuchungen mit LipA und CalA.....	90
IV.	Diskussion.....	93
IV.1	Einsatz von nativen Lipasen in hydrophilen Lösungsmitteln	93
IV.2	Synthese von Emollients.....	96
IV.3	Herstellung von Biodiesel mittels Enzymkaskade zweier Lipasen	99
IV.4	Weitere technische Synthesen in DES.....	104
IV.5	Enzymscreening in DES.....	106
V.	Zusammenfassung	111
VI.	Summary	112
VII.	Literaturverzeichnis.....	114
VIII.	Anhang	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielhafte Auflistung Lipase katalysierter Reaktionen [8-10]	2
Abbildung 2: α/β -Struktur der Lipasen bestehend aus acht β -Faltblättern (1-8) und sechs α -Helices (A-F), grün markiert sind die Aminosäuren der katalytischen Triade im aktiven Zentrum [15-17]	3
Abbildung 3: Reaktionsmechanismus einer Lipase katalysierten Reaktion [22-24]	4
Abbildung 4: 3D Struktur der Lipase B (links) und Lipase A (rechts) aus <i>Pseudozyma antarctica</i> (3D-Struktur aus der Protein Data Bank (PDB) (1tca; 2veo))	6
Abbildung 5: <i>Thermomyces lanuginosa</i> Lipase in der geschlossenen Form (links) und der offenen Form (rechts) mit im aktiven Zentrum gebundener Ölsäure (3D-Struktur aus der Protein Data Bank (PDB) (1dt3; 1gt6))	7
Abbildung 6: Lipase LipA aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kokristallisiert mit 1,2-dioctylcarbamoyleglycero-3-O-p-nitrophenyl octylphosphonat (links) und 2D-Struktur [61] (rechts) (3D-Struktur aus der Protein Data Bank (PDB) (1ex9))	8
Abbildung 7: Vergleich eines chemischen und eines enzymatischen Prozesses zur Herstellung eines Emollientesters [98, 124]	13
Abbildung 8: Kapazität und Produktion von Biodiesel in EU Staaten (A) sowie weltweite Produktion als Jahresverlauf (B) (1: Deutschland; 2: Frankreich; 3: Italien; 4: Österreich; 5: Großbritannien; 6: Belgien; 7: Niederlande; 8: Griechenland; 9: Polen; 10: Portugal; 11: Bulgarien; 12: Schweden; 13: Slowakei) [153]	15
Abbildung 9: Zylindergeometrie	27
Abbildung 10: Strukturformel Hydroxyectoin und Ectoin	42
Abbildung 11: Cholinchlorid und Harnstoff als Reinsubstanzen und nach dem Mischen als DES	42
Abbildung 12: Temperaturabhängigkeit der Viskosität der drei Lösungsmittel ChCl:U, ChCl:G und Glycerin mit 10 % Wassergehalt zwischen 25-60°C	43
Abbildung 13: Temperaturabhängigkeit der Viskosität als Arrhenius-Andrade Plot der drei Lösungsmittel ChCl:U, ChCl:G und Glycerin mit 10 % Wassergehalt zwischen 25-60°C	44
Abbildung 14: Reaktionsgleichung für die Synthese von Decyloleat aus Decanol und Ölsäure	45
Abbildung 15: GC Overlay der Decyllaurat Synthese: Laurinsäure und Decanol in 2-Methyl-2-butanol (schwarz), in Glycerin (grau, Mitte) und ChCl:G (grau, unten)	48
Abbildung 16: GC Overlay der Decyllaurat Synthese: Standard Reaktion in 2-Methyl-2-butanol (schwarz) und in Ethylenglykol (pink)	48
Abbildung 17: Ausbeute in Abhängigkeit des eingesetzten Lösungsmittels bei Wassergehalten zwischen 2,5 und 40 % bezogen auf die Lipidphase	50

Abbildung 18: Reaktionsgeschwindigkeit in $\mu\text{mol}/\text{min}$ für verschiedene Reaktionen in Abhängigkeit des eingesetzten Lösungsmittels bei Wassergehalten von 0,25, 1 und 4 g Wasser	51
Abbildung 19: Reaktionsgeschwindigkeit der Synthesen zu Decyloleat in Abhängigkeit der Temperatur zwischen 35 und 75°C (links) und des Enzymgehalts zwischen 0,125 und 2 wt% (rechts)	51
Abbildung 20: Reaktionsgeschwindigkeit für die Synthesen zu Decyloleat und Decyllaurat in Abhängigkeit der eingesetzten ChCl:U Menge (2,5-40 g DES bezogen auf 10 g Lipidphase)	52
Abbildung 21: Ausbeuten an Estern in Abhängigkeit des Eduktverhältnisses von Ölsäure bzw. Laurinsäure zu Decanol in ChCl:U oder Glycerin	53
Abbildung 22: Ester und Nebenproduktkonzentration der Veresterung mit Lipozym CalB von Öl- bzw. Laurinsäure mit verschiedenen Alkoholen in Glycerin, ChCl:G und ChCl:U (A=Ethanol; B= Isopropanol; C=Butanol; D=2-Ethylhexanol; E=Decanol; F= Dodecanol; G=Hexadecanol)	54
Abbildung 23: Ausbeuten der Recyclingversuche von Glycerin und Lipozym CalB für die Synthese von Decyloleat.....	56
Abbildung 24: Vergleichende Auftragung der Konzentration von Decyloleat für eine Versuch in einem Batch- Reaktor, im Schüttelkolben (links) und in dem Coflore- Reaktor (Rührkesselkaskade) (rechts)	57
Abbildung 25: Reaktionsgleichung für die Umesterung von Biodiesel ausgehend von Triglycerid (Rapsöl) und Ethanol	59
Abbildung 26: Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten des Abbaus von Tri-, Di-, und Monoglyceriden des Rapsöls durch Lipozym CalB und Lipozym TL (Reaktionsraten von Lipozym TL wurden aus Standard Umesterungen ermittelt; Reaktionsraten von Lipozym CalB wurden ausgehend von Rapsöl (TG) und Mischungen (37% Biodiesel, 25% Monoglyceride, 32% Diglyceride) für Diglycerid- Abbauraten und (70% Biodiesel, 20% Monoglyceride, 4% Diglyceride) für Monoglycerid- Abbauraten vermessen; Werte stellen keine Reaktionsraten von Reinsubstanzen dar, jedoch näherungsweise Raten einer Standard Umesterung von Rapsöl).....	60
Abbildung 27: Reaktionsgeschwindigkeiten der Variation der Enzymmenge von 0,125-2 wt% (links) bei 30°C und der Temperatur von 20-50°C (rechts) mit einer Enzymmenge von 1wt%.....	62
Abbildung 28: Säurezahlen der Versuche mit unterschiedlichen Ethanolgehalten (0 bis 14 mol/mol) als Funktion des Wassergehalts (0,5 bis 3,0 mol/mol).....	63
Abbildung 29: Ausbeute an Biodiesel (links) und Reaktionsgeschwindigkeit (rechts) der 1. Stufe mit Lipozym TL mit verschiedenen Ethanolgehalten in Abhängigkeit des Wassergehalts.....	63
Abbildung 30: Verteilung der Glyceride nach 48 h Reaktion bei einem Wassergehalt von 1 mol/mol bei verschiedenen Ethanolgehalten (Detaillierte Werte der Verteilung der Glyceride nach 48 h Reaktionszeit sind in Tabelle 38 im Anhang aufgeführt).....	64
Abbildung 31: Ausbeute an Biodiesel (links) und Säurezahl (rechts) nach 48 h mit Lipozym CalB	65

Abbildung 32: Ausbeute an Biodiesel (links) und Säurezahl (rechts) nach 48 Stunden für die Variation des Wasser- und Ethanolgehaltes für die 2. Stufe der Biodieselproduktion mit Lipozym CalB.....	66
Abbildung 33: Abhängigkeit der Diglyceridkonzentration von der Ethanolkonzentration (0,5-4 mol/mol) für 2 mol/mol Wasser	66
Abbildung 34: Reaktionsgeschwindigkeit in nmol/s/mg in Abhängigkeit der eingesetzten Enzymmenge zwischen 0,125- 2 wt%	67
Abbildung 35: Ergebnisse der DoE für die Variation der DES und Enzymmenge der Zielgröße Reaktionsgeschwindigkeit in nmol/s/mg (Rosa Punkte: Gemessener Wert liegt unterhalb der simulierten Fläche; Rote Punkte: Gemessener Wert liegt oberhalb der simulierten Werte).....	68
Abbildung 36: Ergebnisse der DoE für die Variation der DES und Enzymmenge der Zielgröße Ausbeute	68
Abbildung 37: Biodieselproduktion in einem zwei Liter Rührkesselreaktor mit einem Altfett als Ausgangsstoff ohne Zwischenreinigung zusätzlich Verlauf der Bildung von Biodiesel eines Reaktorversuchs mit Rapsöl als Ausgangsstoff	71
Abbildung 38: Foto des aus Altfett produzierten Biodiesel, des Sumpfproduktes (ChCl:G) und des Kopfprodukts (Glycerin) (von links).....	73
Abbildung 39: Ausbeute an Biodiesel für fünf Recyclingansätze von ChCl:G mit Lipozym CalB	74
Abbildung 40: Reaktionsgleichung für die Synthese von 2-Ethylhexylestern	76
Abbildung 41: Konzentration der Reaktionspartner der 2EH Ester Synthese nach 48 Stunden für verschiedene Wassergehalte und die dazugehörige Säurezahl.....	77
Abbildung 42: Säurezahl der Biodiesel (links) und Kokosöl (rechts) Entsäuerung mit und ohne DES..	78
Abbildung 43: Variation des Enzymgehalts für die Entsäuerung von Biodiesel (links) und Kokosöl (rechts) mit und ohne ChCl:U	78
Abbildung 44: Säurezahlen der Entsäuerung von Biodiesel und Kokosöl für verschiedene Wassergehalte von 0,5-5 wt% bei einer Enzymmenge von 0,25 wt% für einen EtOH- Gehalt von 5 wt%	79
Abbildung 45: Säurezahlen der Variation von Ethanol und Wasser für die Entsäuerung von Biodiesel	80
Abbildung 46: Aktivität in U/mg der Lipase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LipA) in verschiedenen Lösungsmitteln bei verschiedenen Wassergehalten (Aktivität in Puffer t= 0h: 183,6 U/mg).....	85
Abbildung 47: Strukturformel Rizinolsäure	90
Abbildung 48: Konzentration der Ester, freier Fettsäuren sowie verbleibende Glyceride für die Synthese von 2-Ethylhexylestern in ChCl:G bei verschiedenen Wassergehalten durch LipA.....	91
Abbildung 49: Biodieselsynthese in ChCl:G mit verschiedenen Wassergehalten mit CalA (links) und LipA (rechts)	92

Abbildung 50: Phasenverhalten der Reaktionsansätze mit verschiedenen Lösungsmitteln	94
Abbildung 51: Schematische Darstellung der Hypothese für eine Veresterung in DES	95
Abbildung 52: Schematische Darstellung des zweistufigen Verfahrens zur Herstellung von Biodiesel	100
Abbildung 53: Schematische Darstellung des Phasenverhaltens der Synthese von Emulgatoren.....	105
Abbildung 54: SDS-Gele der kommerziellen Lipasen und der Lipasen aus der AG Jaeger	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften von CalA und CalB [47]	6
Tabelle 2: Einsatzstoffe für die Biodieselproduktion aufgeteilt in Food und non- Food Fette und Öle	15
Tabelle 3: Aus der Literatur bekannte DES, ihre Eigenschaften und Anwendungen	18
Tabelle 4: Zellextrakte für Enzymscreening Expressionsvektor und Anzucht durchgeführt von Dr. Filip Kovacic, Peter Dollinger und Dr. Nadine Katzke)	22
Tabelle 5: Verwendete Zellextrakte aus Metagenombibliotheken für das Lipasescreening.....	22
Tabelle 6: Temperaturgradient für die GC Analytik der Veresterungsreaktionen (oben) und der Biodieselreaktionen (unten).....	25
Tabelle 7: Pipettierschema für die Ermittlung der drei Extinktionen zur Berechnung der Anisidinzahl	29
Tabelle 8: Ansätze der Reaktionsgemische für das Enzymscreening.....	35
Tabelle 9: Pipettierschema Lösung B	37
Tabelle 10: Pipettierschema SDS-Gele	39
Tabelle 11: In dieser Arbeit hergestellte DES.....	40
Tabelle 12: Viskosität der drei Lösungsmittel ChCl:U, ChCl:G und Glycerin mit 10 % Wassergehalt ...	43
Tabelle 13: Synthese von Decyllaurat bzw. -oleat in organischen und hydrophilen Lösungsmitteln (DES bzw. Glycerin) und einer Vergleichsreaktion ohne Lösungsmittel (*1 verlängerte Anfangs-lag Phase, *2 Anfangs-lag Phase beobachtet)	46
Tabelle 14: Reaktionen zu Decyloleat in hydrophilen Lösungsmitteln mit verschiedenen Wassergehalten (Werte in Klammern: Nebenprodukte)	47
Tabelle 15: Vergleich der Säurezahl, der Ausbeute sowie der Reaktionsgeschwindigkeit mit unterschiedlichen Wassergehalten in verschiedenen Lösungsmitteln (Die prozentuale Wassermenge bezieht sich jeweils auf 10 g Lipidphase der Edukte).....	49
Tabelle 16: Prozentuale Aktivität von Lipozym CalB in verschiedenen hydrophilen Lösungsmitteln (Prozentuale Anteile berechnen sich aus der Reaktionsgeschwindigkeit zu dem definierten Zeitpunkt dividiert durch die Reaktionsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt t= 0 h (Rate t=0h definiert als 100%))..	55

Tabelle 17: Reaktionsrate in $\mu\text{mol}/\text{min}$ des Recyclings von Lipozym CalB in Glycerin	56
Tabelle 18: Säurezahl und Verteilung der Edukte und des Produkts vor und nach Aufreinigung durch Raffination bzw. Kurzwegdestillation	58
Tabelle 19: Edukt/ Produktverhältnis der Schwer- und Leichtsiederphase für Temperaturen zwischen 115 und 150°C	58
Tabelle 20: Variation der Basenkonzentration und die daraus resultierenden Ausbeuten an Biodiesel, die Reaktionsgeschwindigkeit und die Säurezahl nach 48 Stunden	61
Tabelle 21: Kennzahlen der Altfette im Vergleich zu reinem Rapsöl und Säurezahlen des reinen Altfetts sowie der mit Ölsäure angesäuerten Altfette	69
Tabelle 22: Ausbeuten und Säurezahlen der reinen und angesäuerten Altfette sowie Rapsöl nach 24 und 48 Stunden	70
Tabelle 23: Parameter der Aufreinigungsversuche sowie die Verteilung der Auswaagen des Kopf- und Sumpfproduktes und die vermessenen Stickstoffgehalte (TN_B)	72
Tabelle 24: Ergebnisse der Synthese von Monoglyceriden in 2-Methyl-2-butanol und DES	75
Tabelle 25: Säurezahlen und Verhältnis von Mono- und Diester für Schüttelkolbenversuche zwischen Fruktose und Laurinsäure in 30 g 2-Methyl-2-butanol nach 72 h	76
Tabelle 26: Säurezahlen der Entsäuerung von Biodiesel und Kokosöl unter Variation der eingesetzten DES Menge (0,25 wt% Enzym und 5 % (v/w) Ethanol)	80
Tabelle 27: Aktivitäten in Tris-HCl Puffer (pH=8) in U/mL bzw. U/mg sowie nach der Methode von Biuret ermittelte Proteinkonzentrationen in mg/mL der untersuchten Lipasen	81
Tabelle 28: Aktivität der Zellextrakte in U/mL (U: Kulturüberstand; UP: Lagerpuffer mit Zellbruchstücken)	82
Tabelle 29: Prozentuale Aktivität und Stabilität in den Lösungsmitteln nach $t=1$ h und 24 h ausgewählter Lipasen und Zellextrakte im Vergleich zu der Aktivität in Puffer zum Zeitpunkt $t=0$ h ..	83
Tabelle 30: Selektierte Lipasen und Zellextrakte für die Synthese relevanter Produkte in DES und Glycerin mit 25 bzw. 40 % Wassergehalt	86
Tabelle 31: Ausbeuten für die Synthese von Decyloleat aus Decanol und Ölsäure in Lösungsmitteln	87
Tabelle 32: Synthese von Isopropyllauraten aus Isopropanol und Laurinsäure in Lösungsmitteln (In Klammern Nebenprodukte: Mono- und Diglyceride)	88
Tabelle 33: Ausbeute an 2-Ethylhexylestern aus der Umesterung von Palmfett mit 2-Ethylhexanol in Lösungsmitteln (In Klammern: Gehalt freier Fettsäuren)	88
Tabelle 34: Ausbeuten an Biodiesel aus der Umesterung von Rapsöl mit Ethanol in Lösungsmitteln (In Klammern: Gehalt freier Fettsäuren)	89
Tabelle 35: Ausbeuten an Rizinolsäure bei der Hydrolyse von Rizinusöl in Lösungsmitteln	90

Tabelle 36: Vergleich des Biodiesels vor und nach Raffination mit den Spezifikationen der EN14214[151].....	104
Tabelle 37: Ausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit der 1. Stufe ausgehend von Rapsöl mit Lipozym TL in Abhängigkeit des Ethanol- und Wassergehalts	126
Tabelle 38: Verhältnis der Gesamtglyceride als Monoglyceride : Diglyceride : Triglyceride (MG:DG:TG) in Abhängigkeit des Wasser- und Ethanolgehalts normiert auf 100 %.....	126
Tabelle 39: Ausbeuten an Biodiesel sowie Verteilung der freien Fettsäuren, der Monoglyceride und Diglyceride nach 48 h Reaktionszeit der 2. Stufe der Produktion von Biodiesel durch Lipozym CalB in Abhängigkeit von Ethanol- und Wassergehalt	127
Tabelle 40: Prozentuale Werte der Aktivitäten der Lipasen und Zellextrakte bezogen auf die Aktivität zum Zeitpunkt t=0 h in Puffer in Lösungsmitteln mit unterschiedlichen Wassergehalten	129

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2-EH	2-Ethylhexanol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
a_w	Wasseraktivität
BSTFA	N,O,Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
ChAc	Cholinacetat
ChCl	Cholinchlorid
ChCl:G	DES- Cholinchlorid:Glycerin
DES	Deep Eutectic Solvent
ChCl:U	DES- Cholinchlorid:Harnstoff
kDa	Kilo Dalton
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMCS	Trimethylchlorsilan
TN_b	Total nitrogen bound

Abkürzungen verwendeter Lipasen

Kürzel	Herkunft der Lipase
A1	Phospholipase A1 aus <i>Thermomyces spec.</i>
Alc	Lipase aus <i>Alcaligenes spec.</i>
Anig	Lipase aus <i>Aspergillus niger</i>
Bcep	Lipase aus <i>Burkholderia cepacia</i>
CalA	Lipase A aus <i>Pseudozyma antarctica</i>
CalB	Lipase B aus <i>Pseudozyma antarctica</i>
Cam	Lipase aus <i>Penicillium camembertii</i>
Crug	Lipase aus <i>Candida rugosa</i>
LipA	Lipase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LipoTL	Lipase aus <i>Thermomyces lanuginosa</i>
Mjav	Lipase aus <i>Mucor javanicus</i>
PanP	Phospholipase aus <i>Porcine pancreas</i>
Pexp	Lipase aus <i>Penicillium expansum</i>
Pflu	Lipase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
PlbF	Lipase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ppan	Lipase aus <i>Porcine pancreas</i>
Pstu	Lipase aus <i>Pseudomonas stutzeri</i>
Rmie	Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i>
Rniv	Lipase aus <i>Rhizopus niveus</i>
Roq	Lipase aus <i>Penicillium roqueforti</i>
Rory	Lipase aus <i>Rhizopus oryzae</i>

I. Einleitung

I.1 Struktur und Funktion von Lipasen

Claude Bernard entdeckte bereits im Jahr 1848 eine Enzymklasse, welche die Umsetzung von nicht löslichen Öltröpfchen in lösliche Produkte katalysieren kann [1]. Diese Enzyme, sogenannte Lipasen (EC.3.1.1.3) gehören zu der Gruppe der Serinhydrolasen und gelten aufgrund ihrer Verbreitung in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen als ubiquitär [2-5]. Sie unterscheiden sich durch ihre Substratspezifität von Esterasen, da sie langkettige Acylglyceride mit einer C-Kette >10 als Substrate nutzen können [6].

Die natürliche Funktion von Lipasen ist die hydrolytische Spaltung von Triglyceriden, welche über Di- und Monoglyceride zu Fettsäuren und Glycerin abgebaut werden, Somit sind sie ein essentieller Bestandteil des Fettstoffwechsels [7]. Darüber hinaus katalysieren sie ein breites Spektrum technisch relevanter Reaktionen, wie zum Beispiel Veresterungs- und Umesterungsreaktionen, wie die Acidolyse, die Aminolyse und die Alkoholyse (Abbildung 1) [8–10]. Lipasen weisen ein pH Optimum im neutralen bis leicht alkalischen Bereich auf und sind meist stabil in einem Temperaturbereich von 30-60°C [11]. Sie besitzen ein Molekulargewicht zwischen 19 und 60 kDa [12, 13].

Struktur von Lipasen

Die erste Struktur einer Lipase aus *Rhizomucor miehei* wurde von Brady et al. im Jahr 1990 veröffentlicht [14]. Lipasen werden als α/β -Hydrolasen bezeichnet und ihre Struktur besteht aus acht zentralen, parallelen β -Faltblättern. Der zweite β -Strang ist antiparallel, die Stränge drei bis acht sind durch sechs α -Helices miteinander verbunden (Abbildung 2) [15–17]. Trotz einiger Variationen in der Anzahl der β -Faltblätter und α -Helices sowie der Länge der Schleifen bleibt die zentrale Topologie der Struktur in Lipasen erhalten. Drei Disulfidbrücken stabilisieren beispielsweise die aktive Struktur der Lipase aus *Rhizomucor miehei* [14].

Das aktive Zentrum ist eine Triade aus den drei Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat, bei einigen Lipasen ist Aspartat durch Glutamat ersetzt [14, 18]. Eine Besonderheit ist das sogenannte „Oxyanion hole“, Dieses Strukturelement sorgt während des katalytischen Zyklus für eine Stabilisierung des tetrahedralen Zwischenprodukts des Substrats, durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu zwei Aminosäuren [19]. Eine der beiden Aminosäuren befindet sich in direkter Nachbarschaft des katalytischen Serins, die andere Aminosäure am Ende des dritten β -Faltblatts [20]. Die Substratbindestelle mit der katalytischen Triade liegt oberhalb des zentralen β -Faltblatts und weist

hydrophobe Enden auf. Es gibt Unterschiede in Form, Größe und Tiefe der Taschen sowie im Aufbau durch unterschiedliche Aminosäuren [16, 21].

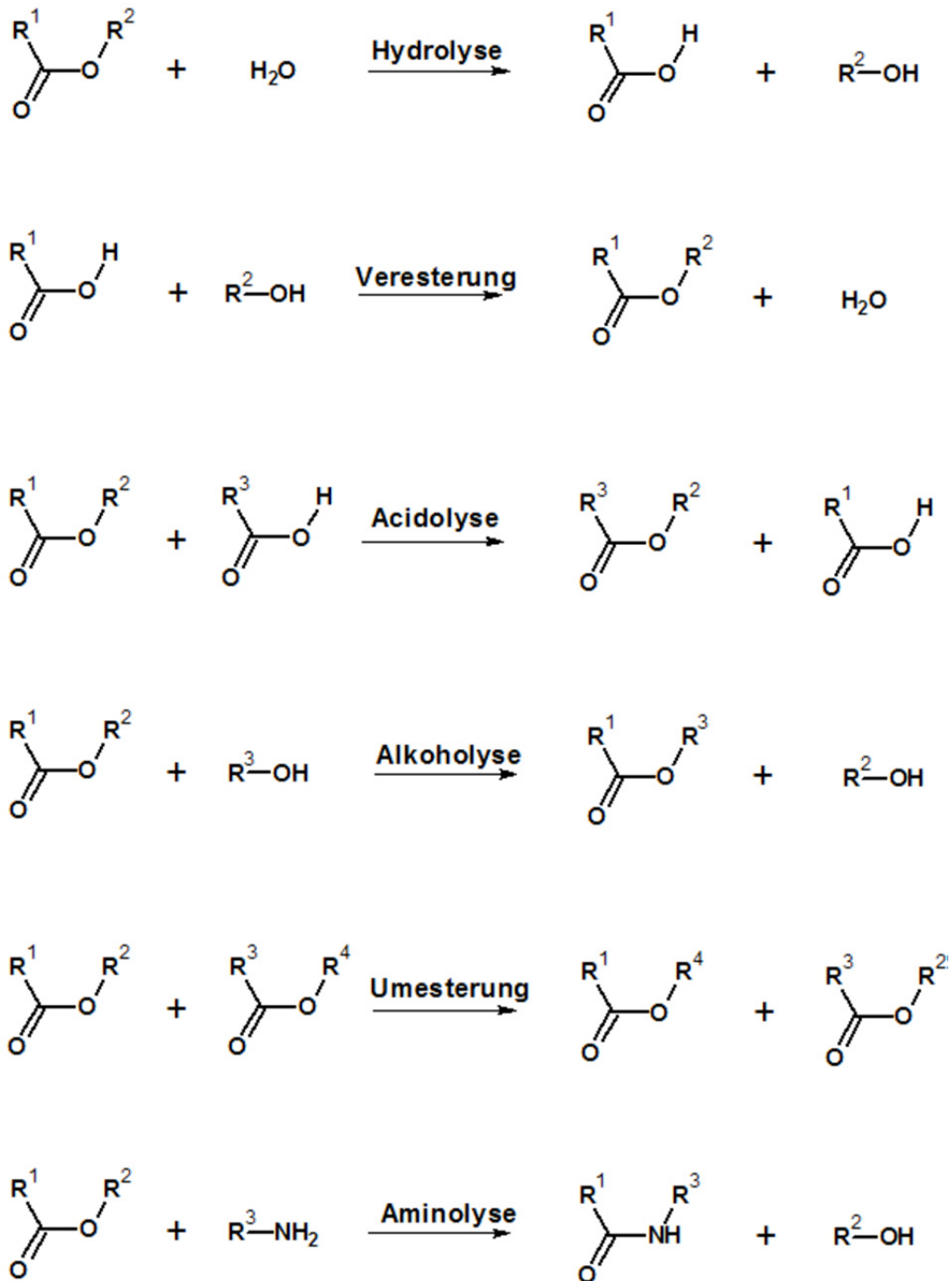


Abbildung 1: Beispielhafte Auflistung Lipase katalysierter Reaktionen [8-10]

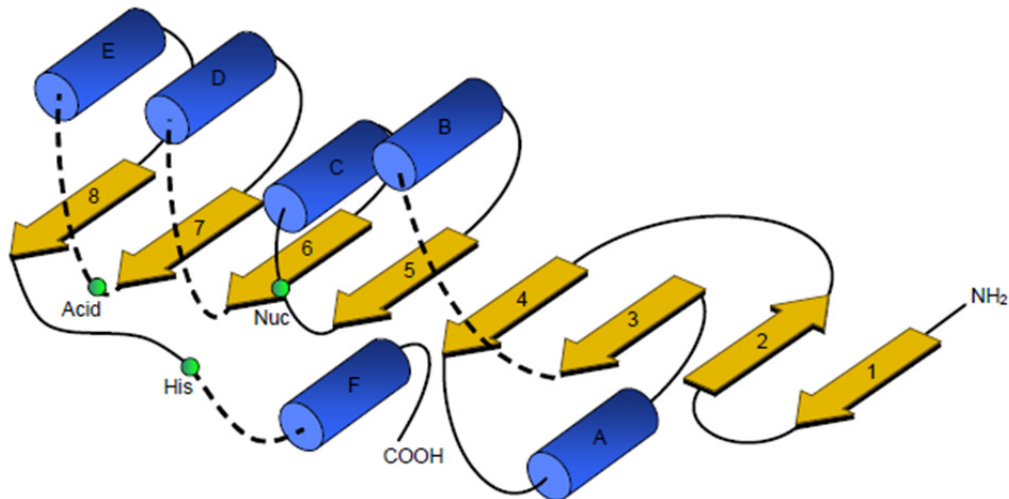


Abbildung 2: α/β -Struktur der Lipasen bestehend aus acht β -Faltblättern (1-8) und sechs α -Helices (A-F), grün markiert sind die Aminosäuren der katalytischen Triade im aktiven Zentrum [15-17]

Katalytischer Mechanismus

Der katalytische Mechanismus ist in zwei Hauptreaktionen, die Acylierung und die Deacylierung geteilt. Zunächst wird ein Proton von Serin abstrahiert und ein nukleophiler Angriff des Serins an die Carbonylgruppe des Substrats erfolgt unter Bildung eines tetrahedralen Intermediats. Dieses Zwischenprodukt wird im „Oxyanion hole“ mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit NH-Gruppen anderer Aminosäuren stabilisiert. Durch Übertragung eines Protons vom positiven Histidinrest kann ein Alkohol abgespalten werden und ein Acyl-Enzym-Komplex entsteht, somit ist der erste Schritt, die Acylierung abgeschlossen. Durch einen erneuten nukleophilen Angriff durch Wasser bildet sich ein zweites Intermediat. Hier entzieht der Histidinrest dem Wasser ein Proton, das so entstandene OH^- -Ion greift das Carbonylkohlenstoffatom der Acylgruppe an und das zweite tetrahedrale Zwischenprodukt wird gebildet. Dieses zerfällt im Anschluss in Produkt und Enzym, somit ist das Enzym für einen erneuten Katalysezyklus bereit (Abbildung 3) [22–24].

Spezifität und Selektivität der Lipasen

Pleiss et al. identifizierte drei unterschiedliche Gruppen von Substratbindestellen, welche für die Spezifität von Lipasen aufgrund ihrer unterschiedlichen Form und Größe verantwortlich sind [21]. In der Lipase aus *Rhizomucor miehei* wurde eine hydrophobe, flache Spalte an der Oberfläche des Proteins gefunden, während Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* oder *Pseudomonas spec.* trichterförmige Bindestellen aufweisen. Eine tunnelförmige Substratbindestelle wurde in der Lipase aus *Candida rugosa* identifiziert [21, 25]. Lipasen können im Allgemeinen in fünf unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden: (1) substratspezifische, (2) positionsspezifische, (3) fettsäurespezifische,

(4) stereoselektive und (5) unspezifische Lipasen [26]. Als Substrate können Lipasen ein breites Spektrum umsetzen, wie zum Beispiel niedrig- und hochmolekulare Ester, Polyolester sowie schwefelhaltige Ester und Amide [8, 27, 28]. Die Isoformen der Lipasen aus *Candida rugosa*, welche minimale Unterschiede im Aufbau ihrer tunnelförmigen Substratbindestelle aufweisen, unterscheiden sich in ihrem Vermögen Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen abzubauen [29].

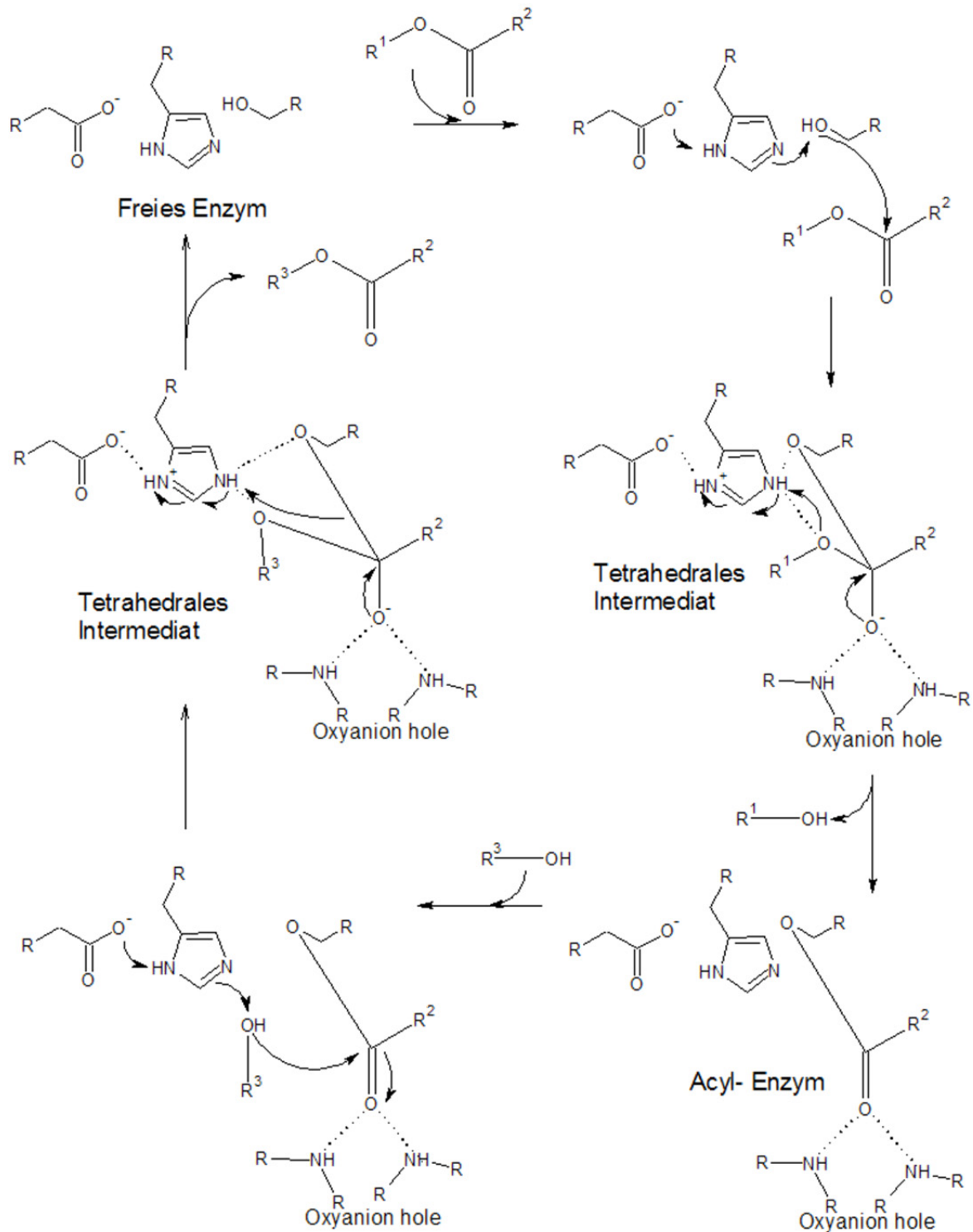


Abbildung 3: Reaktionsmechanismus einer Lipase katalysierten Reaktion [22-24]

Die Selektivität zugunsten des Sättigungsgrads der Fettsäuren wird ebenfalls durch die Größe und Form der Bindestelle beeinflusst, beispielsweise baut die Lipase A aus *Pseudozyma antarctica* bevorzugt gesättigte Fettsäuren aus Triglyceriden ab [30, 31]. Lipasen weisen meistens eine Regioselektivität zugunsten der Position der Fettsäuren in Triglyceriden (sn1,3 oder sn2) auf. Die meisten Lipasen, wie die Lipase aus *Rhizomucor miehei* besitzen eine sn1,3- Spezifität, wohingegen CalA aus *Pseudozyma antarctica* eine geringfügig erhöhte Spezifität zu sn2- gebundenen Fettsäuren besitzt [32, 33]. Weiterhin existieren unspezifische Lipasen, welche unabhängig von der Position Triglyceride hydrolysieren. Aufgrund der Struktur des aktiven Zentrums und der Substratbindestelle besitzen einige Lipasen eine erhöhte Stereoselektivität. Diese Eigenschaft wird für die Produktion enantiomerenreiner Produkte genutzt [34–38]. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Herstellung von Ibuprofen, welches als S-Isomer eine 160-fach höhere Wirkung zeigt und mittels Lipase Katalyse aus dem Racemat hergestellt wird [39, 40].

Grenzflächenaktivierung

Die meisten Lipasen weisen eine Grenzflächenaktivierung an der Grenzfläche zwischen wässriger und fetthaltiger Phase auf, jedoch besitzt beispielsweise die Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* keine Grenzflächenaktivierung [6, 41]. Der Mechanismus der Grenzflächenaktivierung ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, es wird vermutet, dass eine Konformationsänderung für die Erhöhung der Aktivität verantwortlich ist. Ein Sekundärstrukturelement (α -Helix) des Enzyms ist ein sogenanntes Lid, welches amphiphile Eigenschaften besitzt [42, 43]. Die Grenzflächenaktivierung ist verbunden mit der Konformationsänderung des Lids von der geschlossenen zur offenen Form [7, 43–45]. Diese Öffnung verändert die Eigenschaften der Oberfläche und ein großer hydrophober Bereich wird zugänglich, somit kann das meist ebenfalls hydrophobe Substrat ungehindert zum aktiven Zentrum gelangen und umgesetzt werden.

I.1.1 Porträts ausgewählter Lipasen

Lipasen aus *Pseudozyma antarctica*

Zwei kommerziell erhältliche Lipasen sind die Isoenzyme aus der psychrophilen Hefe *Pseudozyma antarctica* (früher unter dem Namen *Candida antarctica* bekannt) und gelten als die am häufigsten verwendeten Lipasen in der Industrie. Aufgrund der Markennamen Lipozym CalA und CalB werden diese Bezeichnungen in der vorliegenden Arbeit verwendet [46]. Die industriellen Enzyme werden heute rekombinant mit *Aspergillus oryzae* hergestellt. Die Unterschiede der beiden Lipasen sind in Tabelle 1 aufgeführt [47]. CalB ist eine sehr gut klassifizierte Lipase und wird in vielen Anwendungen der Industrie meist in immobilisierter Form verwendet. Mit einem Molekulargewicht von 33 kDa und 317 Aminosäuren ist sie kleiner als CalA (45 kDa) und ihr isoelektrischer Punkt liegt bei 6,0 [41, 48].

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften von CalA und CalB [47]

	CalA	CalB
Molekulargewicht [kDa]	45	33
Isoelektrischer Punkt (pI)	7,5	6,0
pH-Optimum	7	7
pH Stabilität	6-9	7-10
Grenzflächenaktivierung	Gering	Nein
Spezifität zu Triglyceriden	Sn2	Sn1,3

Beide Lipasen weisen eine hohe Thermostabilität auf, wobei die Calcium abhängige CalA sogar bei Temperaturen über 90°C effektiv arbeiten kann [47, 49, 50]. Das pH Optimum liegt für beide Lipasen bei 7, jedoch kann CalB auch in basischem Milieu arbeiten. CalB weist im Gegensatz zu CalA keine Grenzflächenaktivierung auf und besitzt kein genau definiertes Lid [7, 41, 51]. Jedoch konnten *Stauch et al.* 2015 Kristallstrukturen einer offenen und geschlossenen Form der Lipase gewinnen. Hierbei führt α -Helix 5 eine unvorhergesehene Konformationsänderung zu einer unstrukturierten Schleife durch und verschließt zusammen mit α -Helix 10 das aktive Zentrum [52].



Abbildung 4: 3D Struktur der Lipase B (links) und Lipase A (rechts) aus *Pseudozyma antarctica* (3D-Struktur aus der Protein Data Bank (PDB) (1tca; 2veo))

Die Proteinkette der CalB besteht aus zehn α -Helices und neun β -Faltblättern, die katalytische Triade ist aus den drei Aminosäuren Serin 105, Histidin 224 und Aspartat 187 zusammengesetzt [41]. CalB kann sterisch gehinderte tertiäre und sekundäre Alkohole umsetzen sowie eine große Bandbreite chiraler Komponenten [49, 53, 54]. Ein Beispiel hierfür ist die Umsetzung von 2-Phenylbut-3-yn-2-ol mit Vinylacetat, mit einer Enantioselektivität von >87 [46]. CalB besitzt lediglich eine geringe Spezifität gegenüber Triglyceridsubstraten [50]. CalA weist eine leichte Präferenz für sn2-ständigen Fettsäuren auf, diese Präferenz ist jedoch nicht ausreichend ausgeprägt, um sn2-Monoglyceride

gezielt herstellen zu können [50]. Weiterhin können trans-Fettsäuren und tertiäre Alkohole umgesetzt werden [55].

Lipase aus *Thermomyces lanuginosa*

Die Lipase aus *Thermomyces lanuginosa* (LipoTL) besitzt eine hohe Aktivität unter alkalischen Bedingungen und wird daher unter dem Synonym LipolaseTM oder Lipozym TL der Firma *Novozymes* als Waschmittelzusatzstoff verwendet [10]. Es handelt sich um ein circa 30 kDa großes Enzym mit 269 Aminosäuren und ist aus acht β -Faltblättern und fünf α -Helices aufgebaut (Abbildung 5) [43, 56].

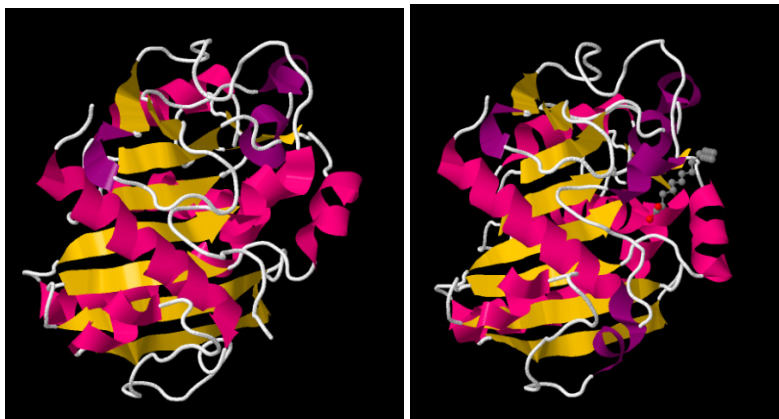


Abbildung 5: *Thermomyces lanuginosa* Lipase in der geschlossenen Form (links) und der offenen Form (rechts) mit im aktiven Zentrum gebundener Ölsäure (3D-Struktur aus der Protein Data Bank (PDB) (1dt3; 1gt6))

Die klassische katalytische Triade Serin 146, Histidin 258 und Aspartat 201 ist unter einer hydrophoben Furche lokalisiert, an der das Lid angeschlossen ist, wodurch LipoTL stark grenzflächenaktiviert wird [32, 57, 58]. Es handelt sich um eine sn1,3-spezifische Lipase [32]. Auffällig ist, dass sich bevorzugt Aggregate der Lipase bilden, wobei die monomere Form aktiver ist [59].

Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa*

LipA ist eine Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Größe von 29 kDa mit 285 Aminosäuren [60]. LipA weist alle Merkmale einer α/β -Hydrolase auf, jedoch ist sie nur aus 5 β -Faltblättern und 5 α -Helices aufgebaut, sowie zwei kleinen Faltblättern (b1,b2) und einem kleinen Lid über dem aktiven Zentrum (a4-6) (Abbildung 6) [61]. Die katalytische Triade besteht aus Serin 82, Aspartat 229 und Histidin 251 [60]. Ein Calcium-Ion besitzt eine stabilisierende Wirkung auf LipA [61]. Um eine stabile Form der LipA zu erhalten wird ein sogenanntes Helferprotein, die Foldase lipH (37,5 kDa) benötigt, welches im Periplasma für die korrekte Faltung der Lipase sorgt [60, 62]. Es existiert eine Disulfid-Brücke zwischen zwei Cysteinen (C183, C235), welche die Lipase stabilisiert, jedoch nicht für die korrekte Faltung, Interaktion mit lipH und somit der katalytischen Aktivität essentiell ist [63]. LipA

wird über den TypII-Sekretionsapparat in die Umgebung sekretiert und gilt als ein Virulenzfaktor der pathogenen *P. aeruginosa*, da es für die Zerstörung der Zellmembran anderer Organismen sorgt [61].

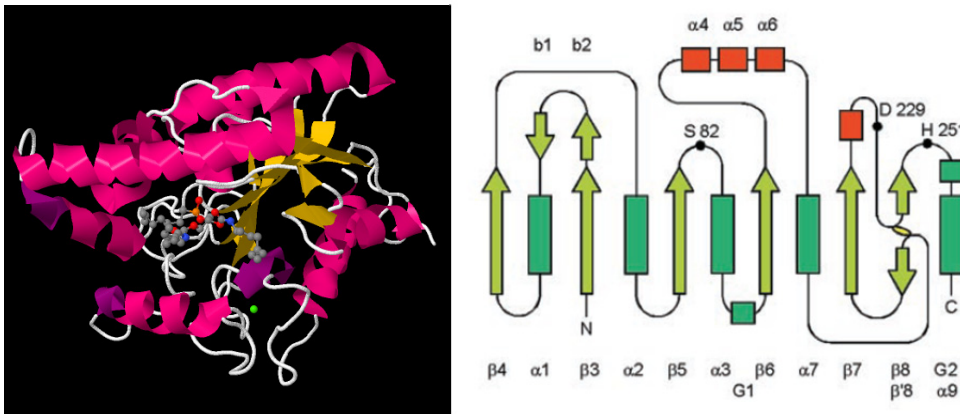


Abbildung 6: Lipase LipA aus *Pseudomonas aeruginosa* kokristallisiert mit 1,2-dioctylcarbamoyl-glycero-3-O-*p*-nitrophenyl octylphosphonat (links) und 2D-Struktur [61] (rechts) (3D-Struktur aus der Protein Data Bank (PDB) (1ex9))

LipA katalysiert die Hydrolyse von Triglyceriden bevorzugt an sn1- Position und wird ebenfalls für enantioselektive Umsetzungen genutzt [64, 65]. Es konnte beispielsweise mithilfe gerichteter Evolution eine erhöhte Enantioselektivität zugunsten des S- Isomers von 2-Methyldecansäure-*p*-nitrophenylester erreicht werden, der E- Faktor erhöhte sich von 1,1 auf 11,3 [12, 66, 67].

I.2 Lipasen in der Biokatalyse

Ungefähr 55 % der in der Biokatalyse eingesetzten Enzyme sind Hydrolasen, wobei Lipasen neben Proteasen und Carbohydrasen die meisten Einsatzgebiete haben [68, 69]. Im Vergleich zu chemischen Reaktionen erlauben Lipase katalysierte Reaktionen mildere Reaktionsbedingungen, wie geringe Temperaturen und Umgebungsdruck und die Aufreinigung der Produkte ist oftmals vereinfacht, da wenig Nebenreaktionen und somit kaum unerwünschte Nebenprodukte entstehen [9, 10, 70]. Aufgrund ihrer hohen Stabilität in organischen Lösungsmitteln und der hohen Substratvariabilität werden sie bevorzugt industriell eingesetzt. Weitere Vorteile sind ihre einfache Produktion sowie keine Kofaktoren Abhängigkeit [2].

Lipasen sind aktiv in organischen Lösungsmitteln. Als erste führten beispielsweise *Zaks und Klibanov* [71] eine Veresterung von Butansäure und Heptanol mittels einer Bauchspeicheldrüsen Lipase in organischen Lösungsmitteln durch. Von sechs getesteten Lösungsmitteln zeigten sich die besten Ergebnisse in Hexan und Toluol [71]. *Castro und Knubovets* [72] zeigten mehrere Vorteile der Reaktion von Lipasen in organischen Medien auf, wie eine veränderte Enantioselektivität sowie eine Löslichkeit von hydrophoben Edukten und Produkten, welche im Vergleich zu einer Reaktion in Wasser erhöht ist [72]. Die Regioselektivität einer Lipase kann durch die Wahl des Lösungsmittels

beeinflusst werden, beispielsweise wird bei der Umesterung von 2-Octyl-1,4-dihydroxybenzolbutansäure in Cyclohexan die C4-Position und in Acetonitril die C1-Position favorisiert [73].

Wassergehalt und Wasseraktivität in organischen Lösungsmitteln

Wichtig für den Einsatz von Lipasen in organischen Lösungsmitteln ist die Menge des eingesetzten Wassers, die maßgeblich für eine stabile Konformation des Enzyms ist [74, 75]. Für Veresterungen wird zum Beispiel möglichst wenig Wasser eingesetzt, um ein Gleichgewicht zugunsten der Produktbildung einzustellen. Durch die unterschiedlichen wasserziehenden Eigenschaften der organischen Lösungsmittel, müssen verschiedene Mengen Wasser zugegeben werden, um die Lipase in ihrer hydratisierten, aktiven Form zu erhalten [76, 77]. Diese minimale Menge Wasser wird als sogenannter Monolayer von Wasser direkt um das Enzym definiert. Das Wasser liegt an hydrophile Bereiche des Enzyms gebunden vor und sorgt für eine ausreichende Flexibilität des Enzyms [78, 79]. Dieses Wasser wird insbesondere durch polare, organische Lösungsmittel vom Enzym abgezogen und das Enzym verliert seine stabile Konformation [78]. Daher werden heute meist unpolare Lösungsmittel mit einem hohen logP-Wert verwendet, welche keinen wasserziehenden Effekt aufweisen. Der logP-Wert ist der Verteilungskoeffizient eines Lösungsmittels an einer Oktanol/Wasser-Schicht, je höher dieser ist, desto unpolarer ist das Lösungsmittel. Der Wassergehalt kann zum Beispiel über Karl-Fischer Titration ermittelt werden [80]. Eine andere Möglichkeit ist die Bestimmung der Wasseraktivität (a_w), welche in einem Bereich zwischen 0 und 1 angegeben wird. Sie ist in allen Phasen gleich groß, ist also auch ein Maß für die Konzentration von Wasser direkt in der Nähe des Enzyms [81, 82]. Nicht-immobilisierte Enzyme benötigen eine enzymespezifische minimale Wasseraktivität um aktiv zu bleiben [71, 83]. Eine Glockenfunktion kann den Zusammenhang der Aktivität der Lipase in Abhängigkeit der Wasseraktivität beschreiben. Ist wenig Wasser um das Enzym vorhanden, also bei einer kleinen Wasseraktivität, ist die aktive Konformation des Enzyms nicht gegeben und es wird eine geringe katalytische Aktivität gemessen. Wird eine große Menge Wasser eingesetzt, kann das Wasser inhibierende Effekte besitzen. Es kann als konkurrierendes Substrat im aktiven Zentrum gebunden werden oder einen limitierenden Effekt auf die Diffusion hydrophober Substrate zum aktiven Zentrum ausüben [84–86]. Ein enzymespezifisches Optimum kann für jede Lipase in Abhängigkeit des Lösungsmittels ermittelt werden. Die Lipase aus *Candida rugosa* erreicht die maximale Aktivität einer Veresterung bei einer Wasseraktivität von 0,5, die Lipase aus *Rhizopus arrhizus* beispielsweise schon bei 0,3 [85]. Es gilt daher bei verschiedenen Methoden, wie Vakuumdestillation oder Einsatz von Molekularsieb die für das Enzym essentielle Wasseraktivität zu erhalten [87].

Immobilisierung von Lipasen für den Einsatz in der Biokatalyse

Lipasen werden für industrielle Anwendungen meist immobilisiert eingesetzt, da ein Prozess einfacher zu kontrollieren ist, die Reinheit der Produkte gewährleistet werden kann und die Wiederverwendbarkeit der Enzyme steigt [88–90]. Es existieren viele Immobilisierungstechniken, wie die Adsorption auf Trägermaterialien (hydrophile Partikel wie Silika, hydrophobe Oberflächen, Ionenaustauscher) [91], kovalente Bindung an Liganden [92], Einschluss in Polymere bzw. Kieselerde-Gele sowie sogenannte CLEAs („cross-linked enzyme aggregates“) [90, 93]. Das Trägermaterial muss für den technischen Einsatz eine einfache Immobilisierung ohne große Aktivitätsverluste, ausreichend große Porengrößen, geeignete mechanische Stabilität sowie einen geringen Preis gewährleisten [90]. Durch Adsorption an ein Trägermaterial kann eine selbstinduzierte Aggregation der Enzyme und die damit verbundene geringere Aktivität umgangen werden [94]. Die Aktivität und Stabilität von Lipasen kann zum Beispiel durch Einkapselung in hydrophobe Sol-Gele erhöht werden [33, 95]. Um eine einfache Separation zu gewährleisten, können in diese Gele magnetische Partikel eingebracht werden, sodass durch Anlegen eines Magnetfeldes die immobilisierten Enzyme leicht entfernt werden können [62]. Der Einsatz von immobilisierten Enzymen bietet jedoch auch Nachteile. Der Preis für den Biokatalysator steigt durch Immobilisierung an und liegt deutlich über dem Preis der nativen Enzyme. Es entsteht eine Diffusionslimitierung der Substrate zum Biokatalysator und eine damit verbundene geringere Aktivität. Durch Auswaschen der Enzyme von dem Trägermaterial kann die Produktqualität negativ beeinflusst werden.

Einsatzgebiete von Lipasen in der Biokatalyse

Lipasen werden für eine Vielzahl an Reaktionen genutzt, von denen einige großtechnisch umgesetzt sind. Sie werden in der Chemie-, der Nahrungsmittel- und der pharmazeutischen Industrie eingesetzt sowie in der Produktion von Reinigungsmitteln und der Polymersynthese [11, 96].

Die Regioselektivität von Lipasen wird für die Produktion sogenannter „Designer Lipide“ genutzt. Es werden hauptsächlich sn1,3-spezifische Lipasen, wie die Lipase aus *Rhizomucor miehei* verwendet [97]. Es wird beispielsweise durch Austausch von ungesättigten mit gesättigten Fettsäuren an den sn1,3-Positionen die Streichbarkeit von Pflanzenfetten bei der Margarineherstellung verbessert [98]. Weiterhin ist bekannt, dass Triglyceride besser abgebaut werden, wenn Palmitinsäure an der sn2-Position des Triglycerids gebunden vorliegt, daher wird mithilfe der Lipase aus *R. miehei* Tripalmitin regioselektiv umgesetzt, sodass an den sn1,3-Positionen Palmitinsäure durch Ölsäure ersetzt wird. Dieses Produkt wird unter dem Markennamen Betapol verkauft und als Milchersatz für Säuglinge genutzt [99, 100]. In der Nahrungsmittelindustrie werden bevorzugt maßgeschneiderte Fette mit

geringerem Schmelzpunkt, wie zum Beispiel Kakaobutter hergestellt [101, 102]. Es wird die in Palmfett enthaltene Palmitinsäure enzymatisch durch Stearinsäure ersetzt [103–107].

Die Gewinnung von ω -3-Fettsäuren für die Nahrungsmittelindustrie wird mithilfe von Lipasen und ihrer besonderen Fettsäureselektivität durchgeführt [108]. Hierbei wird eine Lipase verwendet, die bevorzugt kurzkettige gesättigte Fettsäuren von den Triglyceriden des Fischöls abbaut. Somit kann eine Anreicherung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren erreicht werden [109, 110]. Die ω -3-Fettsäuren des Fischöls, wie Eicosapentaensäure (EPA; C20:5) und Docosahexaensäure (DHA; C22:6) sind essentiell und weisen entzündungshemmende Eigenschaften auf [111, 112].

Beispiele für enantioselektive Reaktionen durch Lipasen sind unter anderem die Synthese eines chiralen Zwischenprodukts für einen Antitumorwirkstoff Epothilon oder die Herstellung von *Fluriprofen*, einem nichtsteroidalen Antirheumatikum [113–115].

Durch Lipase Katalyse können bioabbaubare Polyester aus Dicarboxylsäuren (C4-C12) und einem Diol (C2-C6) gewonnen werden [27, 116, 117]. Es wird entweder eine Ringöffnung von cyclischen Monomeren, wie Lactonen durchgeführt oder die Kondensation einer Carboxylsäure und eines Diols [118]. *Linko et al.* [27] löste beispielsweise die Edukte in einem Lösungsmittel und entfernte mithilfe von Vakuum das entstehende Wasser. Unter Verwendung einer pulverförmigen Lipase aus *R. miehei* werden Molekulargewichte der Polyester zwischen 1000 und 70000 g/mol erreicht [27]. Mithilfe der Lipase Novozym 435 konnten aromatische Polyester aus Isophtalsäure und 1,6-Hexandiol mit Molekulargewichten bis zu 55000 g/mol hergestellt werden [27].

Weitere Anwendungen, wie die Hydrolyse von Fetten, die Estersynthese und die Biodieselsynthese werden im Folgenden detaillierter beschrieben.

A) Hydrolyse von Fetten

Der Einsatz von Lipasen in der Waschmittelindustrie ist mit 32 % des Marktanteils von Lipasen die größte Anwendung. Hier werden sie genutzt, um Fette zu spalten, sodass Detergentien diese einfach aus Textilien entfernen können [33, 97]. Zu Beginn war der Einsatz limitiert, da nach dem kurzen Waschvorgang nicht die gesamten Fette abgebaut werden konnten und die Lipase auf den Textilien verblieb. Mithilfe von „Protein Engineering“ konnte ein Enzym gewonnen werden, das bereits nach einem Waschgang ein gutes Ergebnis erzielt [37]. Das bekannteste Produkt ist hierbei LipolaseTM von *Novozymes* [10, 13].

In der Lederindustrie werden Lipasen ebenfalls zur Entfernung von Fetten von Haut und Fellen eingesetzt. Zur Entfernung von Ölfilmen auf Schlämmen werden Lipasen in der Abfallwirtschaft dazu genutzt, um in begasten Tanks den Sauerstofftransport zu gewährleisten [9]. In der Nahrungsmittel-

industrie werden Lipasen häufig für die Hydrolyse von Milchfett, ebenso wie für die Reifung und Aromagewinnung von Käse eingesetzt. Als Beispiel kann hier die Nutzung der Lipase aus *Penicillium roqueforti* genannt werden, durch die das typische Aroma von Blauschimmelkäse gewonnen wird [119]. Lipasen werden darüber hinaus als Nahrungsmittelzusatz in Diätmitteln eingesetzt, da durch ihren Einsatz die Abbaurate von Fetten im Körper erhöht und der natürliche Stoffwechsel unterstützt wird [8].

B) Ester für den Einsatz in Kosmetika und technischen Applikationen

Emollients werden als geschmeidig machende Zusatzstoffe in Cremes oder Lotionen eingesetzt [120]. Sie können nicht nur ein angenehmes Hautgefühl vermitteln, sondern die Haut gegen Austrocknung schützen [121]. Hierzu gehören unter anderem Decyloleat, Myristylmyristat und Cetylricinolat [28, 122]. *Hills* zeigte, dass die enzymatische Synthese von Estern durch Umesterung und Veresterung eine gute Alternative gegenüber chemischen Reaktionen darstellt [28]. Es entstehen reinere Produkte, somit werden weniger Aufreinigungsprozesse benötigt und die Kosten reduziert [121, 123]. Mehrere Prozesse zur Herstellung von Decyloleat, Cetylricinoleat, Myristylmyristat und Decylcocoat werden betrachtet und verglichen [28]. Für die Produktion von Myristylmyristat wurden ein chemischer und ein enzymatischer Prozess miteinander verglichen, die beide in industriellem Maßstab betrieben werden (Abbildung 7) [98, 124]. Der enzymatische Prozess nutzt eine immobilisierte Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* (Novozym 435), im chemischen Prozess wird als Katalysator Zinn(II)-Oxalat bei Temperaturen von bis zu 240°C verwendet. Für den Vergleich der Prozesse wurde ein „Life Cycle Assessment“ (LCA) nach ISO 14040 hinsichtlich fünf Kriterien (Energieverbrauch, globales Erderwärmungspotential, Azidifikation, die Anreicherung von Nährstoffen und die Smogbildung) durchgeführt. Die erhöhte Nachhaltigkeit und Umweltverträglichkeit werden durch Einsparungen des enzymatischen Prozesses gegenüber dem chemischen Prozess von über 60 % verdeutlicht [125].

Aracil et al. [126] führten ebenfalls vergleichende Versuche für die Herstellung von Oleyloleat durch. Es werden für die enzymatische Umsetzung mildere Reaktionsbedingungen eingesetzt und weniger Aufreinigungsschritte benötigt sowie eine verkürzte Reaktionszeit bei einem Umsatz von 98 %. Hohe Kosten werden durch den Einsatz von Enzym erreicht, sodass dieser enzymatische Prozess kaum mit der chemischen Herstellung konkurrieren kann. Durch den Einsatz eines kostengünstigeren Enzyms beziehungsweise durch einen erneuten Einsatz des Enzyms durch Recycling können die Kosten gesenkt werden. [126].

Brenneis et al. betrachtete die Selektivität einer Umesterung von Triglyceriden mit 2-Ethylhexanol mit der Lipase A aus *Pseudozyma antarctica* [30]. Von den im Palmfett enthaltenen Fettsäuren wird

zunächst die gesättigte Palmitinsäure und im Anschluss die ungesättigte Ölsäure verestert. CaIA weist zusätzlich eine höhere Spezifität zu dem verzweigten Alkohol 2-Ethylhexanol auf, als zu dem linearen Alkohol 1-Decanol [30]. Die Reaktion findet ohne Lösungsmittel statt, jedoch mit einem sehr hohen Wassergehalt, der das Gleichgewicht nur gering zu beeinflussen scheint [127]. Nach 18 Stunden und einer Temperatur von 70°C erreicht die Reaktion einen Umsatz von nahezu 100 %. Neben Isopropylmyristat und Isopropylpalmitat wird 2-Ethylhexylpalmitat als Emollient für Körperpflegeprodukte und als umweltfreundliche Schmierstoffe verwendet [128–130].

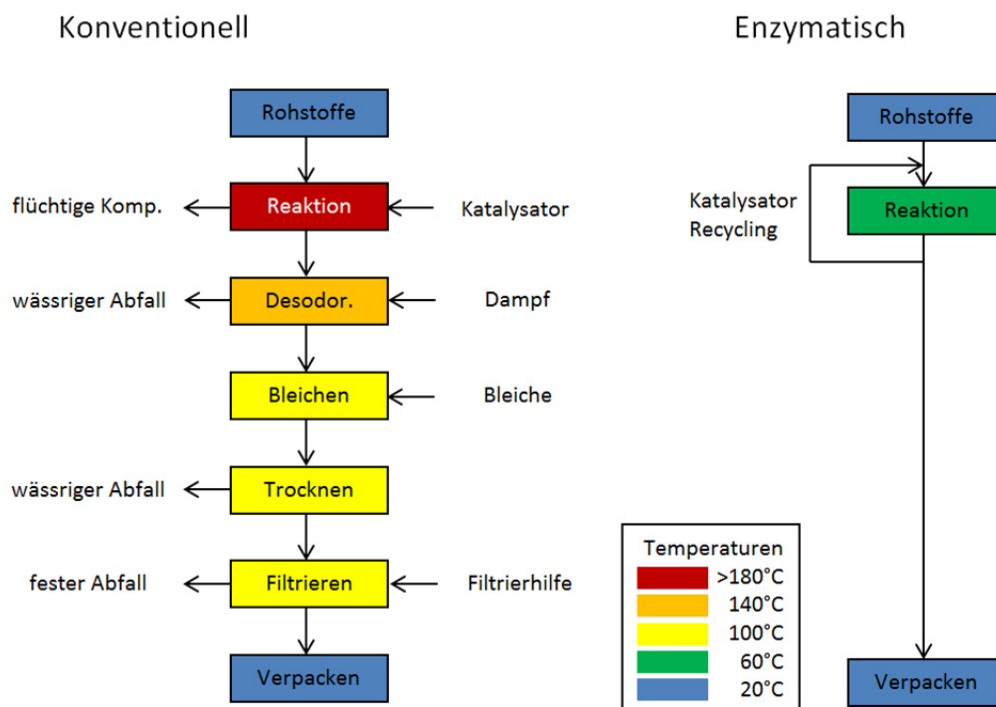


Abbildung 7: Vergleich eines chemischen und eines enzymatischen Prozesses zur Herstellung eines Emollientesters [98, 124]

Die Produktion von maßgeschneiderten Monoglyceriden als Emulgatoren wird für die Nahrungsmittel und pharmazeutische Industrie durchgeführt [33]. Chemisch werden Monoglyceride über Glycerolyse von Fetten bei Temperaturen von 220-250°C in Gegenwart anorganischer Katalysatoren unter Stickstoffatmosphäre hergestellt [131]. Enzymatisch können unterschiedliche Wege zu Monoglyceriden genutzt werden, zum einen kann eine Veresterung von Fettsäuren oder die Umesterung von Fettsäureestern mit Glycerin durchgeführt werden sowie die Glycerolyse von Fetten [132–134]. Zum anderen können unter Einsatz einer sn1,3-regiospezifischen Lipase durch Hydrolyse gezielt sn2-Monoglyceride gebildet werden [131]. Beispielsweise wurde die höchste Ausbeute einer Alkohololyse von Thunfischöl mit Ethanol bei einer Wasseraktivität von 0,43 und einer Temperatur von 60° C in Methyl-tert-butylether nach ungefähr 12 h erreicht. Es zeigte sich hierbei, dass

immobilisierte *Pseudomonas spec.* oder *P. antarctica* Lipase hohe Ausbeuten von circa 80 % an 2-Monoglyceriden mit einem hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren erzielten [135].

Zuckerester werden in der Industrie ebenfalls als Emulgatoren in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie eingesetzt sowie im Haushalt als Detergentien [9, 136]. Sie besitzen die Eigenschaft die Oberflächen-, sowie die Grenzflächenspannung zu reduzieren und stabilisieren Emulsionen aus organischen und wässrigen Flüssigkeiten [137]. Zuckerester sind nicht toxisch, bioabbaubar und einige Ester weisen antimikrobielle Wirkungen auf oder zeigen gute Eigenschaften gegen Tumorbildung [138–142]. Deutliche antimikrobielle Wirkung zeigte Ferrer et al. in der Inhibierung des Wachstums von *Bacillus spec.* und *E. coli* durch 6-O-Laurylsaccharose und 6'-O-laurylmaltose. Es wird vermutet, dass die Permeabilität der Zellmembran verändert wird, sodass viele Metabolite nicht mehr verfügbar sind und es zum Zelltod kommt [143]. Die Anti-Tumor Wirkung wurde beispielsweise auf HeLa Zellen für Fettsäureester von Maltotriose getestet mit IC₅₀ Werten zwischen 2,3 und 3,6 µM [144].

Da es bei der chemischen Umsetzung von Zuckern zu Zuckerestern meist zu Verfärbungen des Produkts durch hohe Temperaturen kommt, toxische Lösungsmittel verwendet werden und ein Katalysator zugesetzt wird, müssen diese Zuckerester sehr stark aufgereinigt werden. Auch kommt es zu einer unselektiven Veresterung der Zuckermoleküle, dies kann durch die enzymatische Umsetzung der Zucker durch Lipasen verhindert werden [49, 118]. Viele interessante Arbeiten zur enzymatischen Zuckerestersynthese wurden in mehreren Reviews dargestellt, daher wird hier nur ein kurzer Ausschnitt neuerer Arbeiten vorgestellt [118, 138, 139]. Ein wichtiger Punkt für die Synthese von Zuckerestern ist der kontinuierliche Wasserentzug, um das Gleichgewicht auf die Seite der Edukte zu verschieben. Durch Wasserentzug kann ein Umsatz bei der Reaktion von Sorbitol mit Ölsäure in 2-Methyl-2-butanol von bis zu 98 % erreicht werden, wobei der größte Teil auf den Monoester entfällt. Das entstehende Wasser wird mithilfe eines Molsiebs aus dem Lösungsmitteldampf entfernt [145]. Durch den Einsatz von zwei Lösungsmitteln konnte eine Lipase in 2-Methyl-2-butanol und Saccharose durch Zugabe von 20 % DMSO gelöst werden, es entsteht unter kontinuierlichem Abzug von Wasser ein Umsatz von 70 %, mit Monoester als Hauptprodukt [143, 146]. Im Jahr 2010 entwickelte Ye et al. ein Verfahren ohne Lösungsmittel, in dem lediglich der Zucker in kristalliner Form in einer Mischung aus Fettsäuren und circa 5 wt% Monoester enthalten war. Diese Lösung wird durch einen mit immobilisierter Lipase aus *Rhizomucor miehei* (Lipozym RM IM) gefüllten, geschlossenen Schlaufenreaktor gepumpt [147]. Mit einer Kombination aus Vakuum und Aufgabe von N₂ für den kontinuierlichen Wasserentzug wurde die höchste Ausbeute von 88 % erreicht [148]. Weiterhin wurden hydrophile ionische Flüssigkeiten verwendet, in denen die Löslichkeit von Glucose um einen Faktor von 100 gegenüber organischen Lösungsmitteln erhöht ist [149].

C) Produktion von Biodiesel

Biodiesel wird in der US Standard Spezifikation ASTM 6751-02 [150] und der EU Spezifikation EN14214 [151] als Kraftstoff auf der Basis von Monoalkylestern von langkettigen Fettsäuren definiert. Laut einer EU Direktive müssen dem Kraftstoff in Deutschland mindestens 5,75 % Biodiesel beigemischt werden [152]. Adamczak et al. hat eine Übersicht für das Jahr 2008 gegeben, in der für einzelne Länder sowie weltweit die Kapazität der Biodieselproduktion, als auch die tatsächliche Produktion aufgeführt sind (Abbildung 8) [153]. Biodiesel wird neben Europa, in den USA und verstärkt in Südamerika mit dem Schwerpunkt Brasilien sowie in Asien hauptsächlich in Japan, Malaysia und Indien produziert [154].

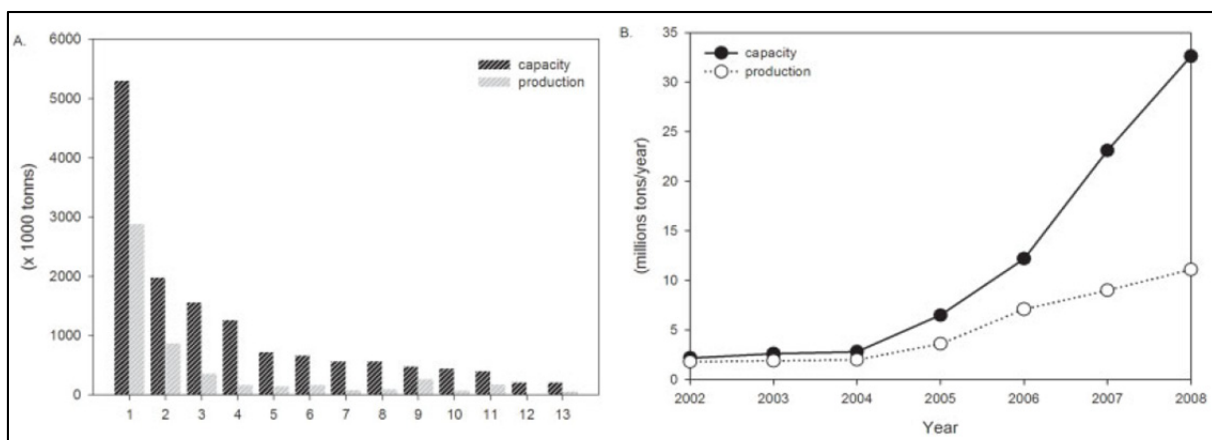


Abbildung 8: Kapazität und Produktion von Biodiesel in EU Staaten (A) sowie weltweite Produktion als Jahresverlauf (B) (1:Deutschland; 2: Frankreich; 3: Italien; 4: Österreich; 5: Großbritannien; 6: Belgien; 7: Niederlande; 8: Griechenland; 9: Polen; 10: Portugal; 11: Bulgarien; 12: Schweden; 13: Slowakei) [153]

Biodiesel zählt als nachhaltigere Variante zum petrochemisch basierten Kraftstoff und ist bioabbaubar und nicht-toxisch [153, 155, 156]. Die Emission von Treibhausgasen wie CO₂ sowie der Ausstoß von CO, NO_x und Kohlenwasserstoffen wird reduziert, da meist Rohstoffe aus nachwachsenden Quellen verwendet werden [152, 156, 157].

Tabelle 2: Einsatzstoffe für die Biodieselproduktion aufgeteilt in Food und non- Food Fette und Öle

Food Fette	Non- Food Fette
Rapsöl	Jathropa
Sonnenblumenöl	Pongamia
Palmöl	Rizinusöl
Sojaöl	Indischer Butterbaum
Erdnussöl	Kautschuk
Canolaöl	

Für die Produktion kommen pflanzliche Öle, Tierfette und Abfallfette sowie Industrieöle und Mikroalgenfette zum Einsatz [154, 158–162]. In Europa wird hauptsächlich Rapsöl verwendet, in den USA und Lateinamerika Sojaöl und in Asien Palmöl [152]. Aufgrund der anhaltenden Lebensmittelknappheit wird heute immer mehr der Fokus auf die Verwendung von nicht essbaren Ölen oder Abfallfetten gelegt (Tabelle 2) [154, 163, 164]. Als Alkohol werden meist Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, n-Butanol oder Isobutanol verwendet [165–167].

Biodiesel wird in der Regel chemisch über alkalische (NaOH, KOH, NaOCH₃) oder saure (H₂SO₄, HCl, BF₃, H₃PO₄) Katalyse hergestellt [152, 155, 168]. Es gibt mehrere Ansätze um die Herstellung von Biodiesel zu vereinfachen, um zum Beispiel den Stoffübergang zwischen Methanol und dem Öl zu verbessern oder eine einfachere Aufreinigung der Produkte zu gewährleisten.

Hier bietet die enzymatische Katalyse mehrere Vorteile.

- Mildere Reaktionsbedingungen [152, 156]
 - Moderate Temperaturen (20-60°C), Atmosphärendruck
- Einfache Aufreinigung, da keine Nebenprodukte entstehen [154]
- Geringe Produktion alkalischer bzw. saurer Prozesswasser [169]
- Hohe Reinheit der Produkte
- Einsatz von Fetten und Ölen mit hohem Anteil freier Fettsäuren möglich [152, 155, 170]

Nachteile sind jedoch die hohen Kosten für Enzyme, sowie die schnelle Deaktivierung durch kurzkettige Alkohole wie Methanol oder Ethanol [170]. Werden immobilisierte Enzyme verwendet, kann zwar die Wiederverwendbarkeit des Katalysators erhöht werden, der Preis für die Herstellung des immobilisierten Enzyms steigt jedoch ebenfalls [154]. Meist werden die immobilisierten Lipasen Novozym 435, Lipozym RM IM oder Lipozym TL IM verwendet (Novozym 435: \$2510/kg; Lipozym RM IM: \$847/kg; Lipozym TL IM: \$141/kg [170]).

Mittelbach zeigte als erstes die enzymatische Produktion von Methylestern mithilfe dreier Lipasen aus *Pseudomonas fluorescens*, *Candida spec.* und *Mucor miehei*. Unter Variation der Temperatur (25-65°C) und des Alkohols (Methanol, Ethanol und 1-Propanol) erreichte er im Labormaßstab hohe Ausbeuten in Petrolether [171]. Es gibt viele verschiedene Publikationen in denen Lipasen aus *Rhizomucor miehei*, *Rhizophus oryzae*, *Pseudozyma antarctica*, *Candida rugosa*, *Burkholderia cepacia* und *Thermomyces lanuginosa* verwendet werden [172–176]. Die Deaktivierung des Enzyms soll gering gehalten werden, daher wird meist eine stufenweise Zugabe des Alkohols durchgeführt [177]. *Shimada* et al. erreicht beispielsweise nahezu Vollumsatz von 98,4 %, bei einem dreifachen Überschuss an Methanol, welches zu Beginn der Reaktion und nach 10, 14 und 24 Stunden

zugegeben wird [177]. *Maceiras et al.* erreichten unter Verwendung von *Novozym 435* und einem Abfallbratfett einen Umsatz von 89,1 wt% im Labormaßstab [178].

Im Jahr 2007 hat die Lvming Co. Ltd. eine enzymatisch arbeitende Produktionsanlage in Shanghai in Betrieb genommen, welche mit einer Lipase aus *Candida spec.* arbeitet. Als Rohstoff wird Abfallkochfett verwendet mit einem hohen Anteil an freien Fettsäuren. Mit einer Enzymkonzentration von 0,4 wt% bezogen auf die Einwaage des Öls wird in einem Rührkesselreaktor eine Ausbeute an Biodiesel von 90 % erreicht [156, 170]. Ein neues Verfahren von *Novozymes* erreicht einen Umsatz von 97,8 % unter Verwendung von Rapsöl und einer flüssigen Lipase *Callera™ Trans L* [179]. Mit derselben Lipase haben *Cesarini et al.* Rohöl aus Sojabohnen mit einer Ausbeute von 96,3 % an Biodiesel und einer Konzentration der freien Fettsäuren an 2,5 % umgesetzt [180]. Durch Zugabe zweier Phospholipasen für die Umsetzung der Phospholipide zu Biodiesel wird eine höhere Ausbeute von 97,8 % erreicht [181].

I.3 Lipase Katalyse in hydrophilen Lösungsmitteln

Deep Eutectic Solvents (DES) wurden im Jahr 2001 erstmalig in der Literatur als vielversprechende neue Lösungsmittel vorgestellt [182]. DES sind hydrophile Lösungsmittel, welche mit Wasser und wasserlöslichen Stoffen interagieren. Sie unterscheiden sich von polaren organischen Lösungsmitteln, da sie keine Reinstoffe sind, sondern Mischungen aus zwei oder mehr Komponenten. DES werden durch einfaches Mischen von Stoffen (fest oder flüssig) die eine eutektische Mischung bilden, hergestellt. Die verbreitetste Methode hierfür ist das Mischen einer quaternären Ammoniumverbindung und eines Wasserstoffdonors, wobei eine klare Flüssigkeit entsteht, welche in einem Bereich unter 100°C flüssig ist. Es wird eine Gefrierpunktniedrigung erreicht, da die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen energetisch gegen die Gitterenergie der Einzelkomponenten favorisiert wird [183].

Das bekannteste DES besteht aus Cholinchlorid und Harnstoff und besitzt einen Gefrierpunkt von 12°C, wogegen die Festpunkte der Reinsubstanzen bei 302°C und 133°C liegen [184, 185]. *Abbott et al.* führten Versuche mit unterschiedlichen quaternären Ammoniumverbindungen und Wasserstoffdonoren durch und es zeigt sich dass, je höher das Vermögen war Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden und je asymmetrischer die Ammoniumverbindungen waren, desto niedriger war der Festpunkt der DES [184].

DES werden in der Literatur als grüne Alternativen zu den klassischen Ionischen Flüssigkeiten genannt [44]. Die hauptsächlich verwendeten Chemikalien, wie Cholinchlorid, Harnstoff und Glycerin

sind Bulkchemikalien. Cholinchlorid wird durch eine einfache Gasreaktion zwischen Trimethylamin, Ethylenoxid und HCl mit einem E-Faktor nahe null hergestellt [186, 187]. Der E-Faktor („Environmental-Faktor“) ist ein Maß für die Menge an Abfall gegen die Menge an Produkt [188]. Cholinchlorid ist bioabbaubar (93 % in 14 Tagen), weist eine hohe Biokompatibilität auf und wird in der Nahrungsmittelindustrie als Vitamin für Hühnerfutter verwendet [48, 185, 187]. Glycerin ist das Hauptnebenprodukt bei der Herstellung von Biodiesel und kostengünstig erhältlich [189].

DES aus Cholinchlorid und Harnstoff bzw. Glycerin sind sehr polare Flüssigkeiten. Nach Reichhardt's normalisierter Polaritätsskala liegt der Wert von E_T bei 0,84 (Wasser=1 und Trimethylsilan=0) [190]. Daher sind sie mit hydrophilen und polaren Substanzen wie Ethanol, Wasser und Methanol mischbar, da starke Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Chloridion ausgebildet werden [184]. Anorganische Salze (LiCl, AgCl), aromatische Säuren (Benzoessäure), Aminosäuren (D-Alanin) und Metalloxide (CuO) sowie Tenside, Zucker, CO₂ und Glycerin haben eine hohe Löslichkeit in DES [184, 191]. Das DES bestehend aus Cholinchlorid und Harnstoff ist nach Berechnung der Hammett Funktion eine leicht basische Flüssigkeit, wobei der pH Wert durch Zugabe von CO₂ bzw. N₂ verändert werden kann [185].

Tabelle 3: Aus der Literatur bekannte DES, ihre Eigenschaften und Anwendungen

Komponente 1	Komponente 2	Eigenschaften	Anwendung	
Cholinchlorid	ZnCl ₂ , SnCl ₂ , FeCl ₃ , ZnBr ₂ , CrCl ₂ *6H ₂ O	Unempfindlich gegen Wasser; nicht korrosiv	Elektrochemie, Lösungsmittel, Katalysator für Diels-Alder- Reaktionen; Lösen von Cellulose und Monosacchariden	[192– 195]
Cholinchlorid	Carboxylsäuren (Malonsäure, Zitronensäure, Benzoessäure); Lävulinsäure, Itaconsäure und Gallussäure			[194, 196]
Zucker (Sorbitol, Maltose, Mannose, Fructose, Glucose, Cyclodextrin)	Harnstoff, N,N- dimethylharnstoff, Cholinchlorid		Lösungsmittel für Diels- Alder Reaktion	[70, 197]

In Tabelle 3 sind DES bestehend aus unterschiedlichen Komponenten aufgeführt. Eine Gruppe besteht aus Cholinchlorid und Metallchloriden bzw. Bromiden als zweite Komponente. Carboxylsäuren oder andere Säuren können ebenfalls mit Cholinchlorid stabile DES ausbilden, welche unter 100°C flüssig sind. Eine Mischung aus in Pflanzen vorkommenden Metaboliten, wie beispielsweise Malon- bzw. Zitronensäure, aber auch Zucker werden als sogenannte NADES (Natural Deep Eutectic Solvents) bezeichnet. Nach dieser Theorie bilden sich zum Beispiel in Pflanzen auf natürliche Weise diese DES, damit Reaktionen mit in Wasser unlöslichen Edukten durchgeführt werden können. Diese Theorie wird von der Gruppe um *Prof. Dr. Witkamp* zurzeit näher betrachtet und in einigen Veröffentlichungen diskutiert [197–200].

DES besitzen eine geringe Flüchtigkeit und eine hohe Temperaturbeständigkeit [44]. Die Herstellung ist einfach und es wird keine Aufreinigung vor der Verwendung benötigt [191]. Sie finden in der Elektrochemie Anwendung, da sie eine gute Konduktivität besitzen, welche mit zunehmender Temperatur und mit steigender Cholinchlorid Menge steigt [184, 185]. DES finden Anwendung als Lösungsmittel oder Kosolventien in organischen und enzymatischen Reaktionen [201, 202]. Cellulose und Monosaccharide können ebenfalls gelöst werden [194, 195]. Für Diels- Alder- Reaktionen wurden DES aus Cholinchlorid und Metallchloriden als Katalysator verwendet [203].

Gorke et al. [190] haben die Alkoholyse von Ethylvalerat mit 1-Butanol in acht verschiedenen DES bestehend aus verschiedenen Ammoniumsalzen und Wasserstoffdonoren (Glycerin, Harnstoff, Zucker, $ZnCl_2$) getestet. Freie und immobilisierte Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* wiesen Aktivitäten auf, welche in fünf Fällen vergleichbar mit der Reaktion in Toluol war [205]. Die Umsetzung von Sojaöl mit Methanol in DES unter Verwendung einer immobilisierten Lipase CalB (*Novozym 435*) zu Biodiesel wurde untersucht [204]. Unter Verwendung des immobilisierten Enzyms wird ein Umsatz an Triglyceriden zu Biodiesel von 81 % in den zwei verwendeten DES bestehend aus Glycerin als Wasserstoffdonor und Cholinacetat (ChAc) beziehungsweise Cholinchlorid (ChCl) als quaternäre Ammoniumverbindung erreicht. Keine der anderen neun untersuchten Lipasen erreichten diesen Umsatz [204]. Weitere Untersuchungen beinhalten die Lipase katalysierte Aminolyse von Ethylvalerat und Butylamin in vier verschiedenen DES sowie die Alkoholyse von Vinylaurat und verschiedenen Alkoholen (C4, C8 und C18) mit höchsten Ausbeuten von 94 % mit dem kurzkettigen Alkohol [44, 191]. Für die Aufreinigung von Biodiesel im Labormaßstab wurde ein DES bestehend aus Cholinchlorid und Glycerin verwendet und ein DES mit einer molaren Zusammensetzung von 1:1 eingesetzt. Glycerin reichert sich bis zu einem Molverhältnis von 1:2 an und kann so durch einfache Sedimentation bzw. Zentrifugation entfernt werden [189].

Im Jahr 2014 wurde eine dynamische molekulare Simulation von CalB in Wasser, Harnstoff und ChCl:U durchgeführt. In Harnstoff wird CalB direkt denaturiert und kann keine Reaktion katalysieren.

In ChCl:U verhält sich die Lipase ähnlich wie in Wasser und die dreidimensionale Struktur des Proteins wird nur leicht verändert, sodass die Lipase weiterhin aktiv ist. Besonders erwähnenswert ist, dass einige Aminosäuren (Gln23, Thr267, Glu269 und Lys271) Wasserstoffbrückenbindungen mit den Bestandteilen des DES aufbauen und so die Struktur der Lipase gestärkt, die Diffusion der denaturierenden Harnstoff Moleküle gehemmt und die Lipase langsamer deaktiviert wird [48].

Reines Glycerin kann ebenfalls als hydrophiles Lösungsmittel eingesetzt werden und ist, als einziges Nebenprodukt der Biodiesel- Produktion in großem Umfang verfügbar (1,2 Millionen Tonnen, 2010) [205]. Da sich ein Überschuss an Glycerin auf dem Weltmarkt abzeichnet, entwickelten *Wolfson* et al. 2006 die Idee Glycerin als „Green Solvent“ zu verwenden [206, 207]. Beispielsweise wurden die nukleophile Substitution von Benzylchlorid und Kaliumthiocyanat und die Reduktion von Benzaldehyd mit Natriumborhydrid erfolgreich in Glycerin als Lösungsmittel durchgeführt. Seitdem wird Glycerin eine immer beliebtere Alternative zu organischen Lösungsmitteln, da es gemäß den „12 Prinzipien der grünen Chemie“ viele Anforderungen erfüllt, um als „grünes Lösungsmittel“ zu gelten [188, 205]. Es ist günstig und in großen Mengen verfügbar, einfach zu verwenden und recycelbar, außerdem gilt es als nicht toxisch, nicht entflammbar, nicht mutagen sowie nicht flüchtig [205, 207]. Glycerin ist eine süßlich schmeckende klare, farblose und geruchslose viskose Flüssigkeit, die aufgrund ihrer drei Hydroxylgruppen ähnliche Eigenschaften aufweist, wie Wasser [207]. Glycerin kann unter anderem anorganische Salze, Säuren, Basen und Übergangsmetallkomplexe lösen. Da sich auch Enzyme in Glycerin lösen, wird Glycerin in Ganzzell- Biotransformationen oder in enzymatischen Reaktionen mit isolierten Enzymen verwendet. Hier wurde als Beispiel Bäckerhefe zur Reduktion prochiraler Ketone genutzt. Eine auf Acrylharze immobilisierte CalB wurde für die Racematspaltung von sekundären Alkoholen und Aminen in Glycerin verwendet [208].

Es wird eine Ausbeute an Biodiesel aus einem sauren Öl von 98 % mittels Lipase Katalyse erreicht, wenn Glycerin zur Entfernung des Wassers verwendet wird. Hierbei wird das Glycerin während der letzten 2 % Umsetzung zu Biodiesel zugegeben [209]. *Novozymes* verwendet eine genetisch modifizierte Lipase *CalleraTM Trans L* für die Produktion von Biodiesel. Hier wird unter Einsatz einer geringen Menge an Glycerin die Menge der freien Fettsäuren am Ende der Reaktion reduziert, sodass die Ausbeute an Biodiesel erhöht werden kann. Auch kann die flüssige Lipase durch Überführung der Glycerinphase wiederverwendet werden.

I.4 Zielsetzung

Lipase katalysierte Reaktionen werden zurzeit hauptsächlich in organischen Lösungsmitteln durchgeführt und meistens eine immobilisierte in seltenen Fällen eine lyophilisierte Lipase verwendet. Auch unter Verwendung von DES wird in der Literatur lediglich der Einsatz von immobilisierten Lipasen beschrieben [44, 191].

In der vorliegenden Arbeit soll der Einsatz von nativen Lipasen in Lösungsmitteln untersucht werden. Hierbei wird der Fokus auf hydrophile Lösungsmittel, wie beispielsweise Deep Eutectic Solvents gelegt, welche als „grüne“ Alternative zu ionischen Flüssigkeiten und organischen Lösungsmitteln gelten. Die Aktivität und Stabilität der nativen Lipasen in diesen Lösungsmitteln soll evaluiert werden. Hierfür werden systematische Untersuchungen des Einflusses von Wasser auf die Aktivität des Enzyms durchgeführt und das Phasenverhalten der hydrophilen Lösungsmittel und der hydrophoben Lipide evaluiert. Im Anschluss sollen technische Prozesse entwickelt und optimiert, sowie eine Aufarbeitung der Produkte entwickelt werden. Ein Lösungsmittel-Recycling und das Recycling der Enzyme sollen betrachtet werden. In bisherigen Arbeiten wurden nur wenige Lipasen und Esterasen für den Einsatz in hydrophilen Lösungsmitteln getestet, wobei der Fokus auf Untersuchungen mit immobilisierter CalB lag. Daher sollen mithilfe eines Screenings verschiedene Lipasen untersucht und auf ihre Aktivität und Stabilität in diesen hydrophilen Lösungsmitteln sowie für die Produktion technisch relevanter Ester evaluiert werden.

II. Material und Methoden

II.1 Materialien

Alle Chemikalien hatten eine Reinheit von pro Analysis und wurden von folgenden Anbietern bezogen: VWR International, Carl Roth GmbH & Co. KG, Sigma- Aldrich Co LLC

II.1.1 Zellextrakte

Die Expression und Anzucht der untersuchten Zellextrakte wurde von Dr. Filip Kovacic, Peter Dollinger und Dr. Nadine Katzke durchgeführt. Die Vektoren der Zellextrakte 38-93 wurden von Kooperationspartnern aus Spanien (Dr. Manuel Ferrer) überlassen.

Tabelle 4: Zellextrakte für Enzymscreening Expressionsvektor und Anzucht durchgeführt von Dr. Filip Kovacic, Peter Dollinger und Dr. Nadine Katzke)

Zellextrakt	Mikroorganismus	Vektor
22-32	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET
33-37	<i>E.coli</i> DH10b	pEBP18
38-93	<i>E. coli</i> BL21	pET46

Tabelle 5: Verwendete Zellextrakte aus Metagenombibliotheken für das Lipasescreening

Nr.	Bezeichnung	Herkunft	Detail	Literatur
22	BL21(DE3) pET22TB94	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
23	BL21 (DE3)pET22TB157	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
24	BL21 (DE3)pET22TB304	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
25	BL21 (DE3)pET19TB305	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
26	BL21 (DE3) pET22TB310	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
27	BL21 (DE3) pET22TB308	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
28	BL21 (DE3) pET22TB312	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
29	BL21 (DE3)pET19TB314	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
30	BL21 (DE3)pET19TB321 fw1	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
31	BL21 (DE3)pET22TB350	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
32	BL21 (DE3)pET22TBIH8	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
33	DH10bpEBP18TB307	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
34	DH10bpEBP18TB306	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
35	DH10b pEBP18TB94	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
36	DH10bpEBP18TB303	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	
37	DH10b pEBP18TB313	Schlachthof	Abfluss- Biofilm	

38	MGS-LaE1	Arreo Lake (Spanien)	Sediment Flachwasser	[210]
39	MGS-LaE2	Arreo Lake (Spanien)	Sediment Flachwasser	[210]
40	MGS-LaE3	Arreo Lake (Spanien)	Sediment Flachwasser	[210]
41	MGS-LaE4	Arreo Lake (Spanien)	Sediment Flachwasser	[210]
42	MGS-LaE5	Arreo Lake (Spanien)	Sediment Flachwasser	[210]
43	MGS-LaE6	Arreo Lake (Spanien)	Sediment Flachwasser	[210]
44	MGS-LaE7	Arreo Lake (Spanien)	Sediment Flachwasser	[210]
45	MGS-MiIE1	Milazzo (Italien)	Meeressediment	
46	MGS-MiIE2	Milazzo (Italien)	Meeressediment	
47	MGS-MiIE3	Milazzo (Italien)	Meeressediment	
48	MGS-MiIE4	Milazzo (Italien)	Meeressediment	
49	MGS-MiIE5	Milazzo (Italien)	Meeressediment	
50	MGS-MiIE6	Milazzo (Italien)	Meeressediment	
51	MGS-MesE1	Messina (Italien)	Meeressediment	
52	MGS-MesE2	Messina (Italien)	Meeressediment	
53	MGS-MesE3	Messina (Italien)	Meeressediment	
54	MGS-MesE4	Messina (Italien)	Meeressediment	
55	MGS-MesE5	Messina (Italien)	Meeressediment	
56	MGS-MesE6	Messina (Italien)	Meeressediment	
57	MGS-ElMaxE1	El-Max (Ägypten)	Meeressediment	
58	MGS-ElMaxE2	El-Max (Ägypten)	Meeressediment	
59	MGS-ElMaxE3	El-Max (Ägypten)	Meeressediment	
60	MGS-ElMaxE4	El-Max (Ägypten)	Meeressediment	
61	MGS-ElMaxE5	El-Max (Ägypten)	Meeressediment	
62	MGS-ElMaxE6	El-Max (Ägypten)	Meeressediment	
63	MGS-ElMaxE7	El-Max (Ägypten)	Meeressediment	
64	MGS-ElMaxE8	El-Max (Ägypten)	Meeressediment	
65	MGS-ElMaxE9	El-Max (Ägypten)	Meeressediment	
66	MGS-ElMaxE10	El-Max (Ägypten)	Meeressediment	
67	MGS-BizE1	Bizerta (Tunesien)	Meeressediment	
68	MGS-BizE2	Bizerta (Tunesien)	Meeressediment	
69	MGS-BizE3	Bizerta (Tunesien)	Meeressediment	
70	MGS-BizE4	Bizerta (Tunesien)	Meeressediment	
71	MGS-PriE1	Priolo (Italien)	Meeressediment	
72	MGS-PriE2	Priolo (Italien)	Meeressediment	
73	MGS-MChE1	MarChica (Marokko)	Meeressediment	
74	MGS-AqE1	Aqaba (Jordan)	Meeressediment	
75	MGS-AqE2	Aqaba (Jordan)	Meeressediment	
76	MGS-RG1	<i>Rimicaris exoculata</i>	Tiefseegarnele	[211]
77	MGS-RG2	<i>Rimicaris exoculata</i>	Tiefseegarnele	[211]
78	MGS-RG3	<i>Rimicaris exoculata</i>	Tiefseegarnele	[211]

79	MGS-Cn1E1	Lugones (Spanien)	Bodenprobe	[212]
80	MGS-AncE1	Ancona (Italien)	Meeressediment	
81	MGS-AncE2	Ancona (Italien)	Meeressediment	
82	MGS-CCSP0084	<i>Cycloclasticus</i> ME7	Kultivierbares Bakterium	[213]
83	MGS-CCSP0211	<i>Cycloclasticus</i> ME7	Kultivierbares Bakterium	[213]
84	MGS-CCSP0528	<i>Cycloclasticus</i> ME7	Kultivierbares Bakterium	[213]
85	MGS-CCSP02178	<i>Cycloclasticus</i> ME7	Kultivierbares Bakterium	[213]
86	MGS-K_05-6	Isla Kolguev	Seewasser	[213]
87	MGS-K_06-5	Isla Kolguev	Seewasser	[213]
88	MGS-M1	Medee	Hypersalines Tiefseewasser	[214]
89	MGS-M2	Medee	Hypersalines Tiefseewasser	[214]
90	MGS-B1	Bannock	Hypersalines Tiefseewasser	[214]
91	MGS-K1	Kryos	Hypersalines Tiefseewasser	[214]
92	MGS-MT1	Matapan-Vavilov	Tiefseewasser	[214]
93	MGS-HA1	San Pablo (hydrothermale Tiefseespalte)	Kultivierbares Bakterium	[214]

II.2 Geräte

- Stickstoffmessgerät: Shimadzu LAR Quick TOC
- Gaschromatograph: Shimadzu GC2010
- Rheometer: Malvern Kinexus pro (Model KNX2100)
- Säurezahl-Analytik: Metrohm Dosimatn E535
- Kurzwegdestillation: KDL 1, UIC GmbH
- Schüttler: Infors HT Multitron Standard
- Karl- Fischer- Titration: Metrohm 870 KF Titrino plus
- 96-well-Photometer: Spectramax 190
- Feinwaage: Kern & Sohn GmbH, ABJ220-4M

II.3 Analytische Methoden

II.3.1 GC Analytik

In ein GC-Vial werden jeweils 950 µL Heptan als Lösungsmittel und 5 µL der Lipidphase der Reaktionen gegeben. Es werden zusätzlich 50 µL eines Silylierungsmittel (BSTFA+TMCS, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide + 1% Trimethylchlorosilane) eingesetzt. Hierdurch wird eine höhere Flüchtigkeit durch eine Silylierung der Hydroxylgruppen erreicht. Das Vial wird für eine

Stunde bei 80°C im Trockenschrank gelagert und im Anschluss auf den Gaschromatographen (SHIMADZU GC2010 plus) gestellt. Die Säule ist eine Biodiesel TG von Restek und Helium wird als Trägergas verwendet. Es wird jeweils 1 µL injiziert und über einen FID Detektor analysiert.

Tabelle 6: Temperaturgradient für die GC Analytik der Veresterungsreaktionen (oben) und der Biodieselreaktionen (unten)

Temperatur [°C]	Gradient [°C/min]	Haltezeit [min]
75		
180	25	0
280	10	0
380	20	0
410	15	1,5

Temperatur [°C]	Gradient [°C/min]	Haltezeit [min]
75		
145	25	0
175	12	0
205	5	0
250	20	0
410	25	1,5

Kalibriersubstanzen für GC-Analytik

Es werden in einem 2 mL Eppendorf Cup 350 mg Laurinsäure, 100 mg Ethylenglykol bzw. 138 mg Glycerin und 1,1 g 2-Methyl-2-butanol gemischt. 100 mg Molsieb 3Å werden hinzugegeben und die Reaktion durch Zugabe von Novozym 435 gestartet. Die Reaktion wird für 24 h bei 60°C und 250 rpm durchgeführt. Danach wird die Mischung bei 15000 rpm für eine Minute zentrifugiert und der Überstand für die GC Analytik verwendet.

Ermittlung Korrekturfaktoren der GC Analytik

Es werden Stocklösungen mit einer Konzentration von 10 mg/mL an Triolein, Diolein, Monolein, Ethylester und Ölsäure in Heptan hergestellt. Zu 500 µL werden jeweils 25 µL Silylierungsmittel gegeben und für eine Stunde bei 80°C im Trockenschrank inkubiert. Diese Lösungen wurden 1:10 in

Heptan verdünnt und durch die GC vermessen. Aus den GC Flächenprozent können Korrekturfaktoren zur Umrechnung in Gewichtsprozent ermittelt werden.

Dieselbe Methode wurde für die Synthese von 2-Ethylhexylestern verwendet, jedoch wird als Triglycerid das Palmfett und zur Berechnung des Korrekturfaktors der Ester 98 % reines Produkt aus der Synthese verwendet.

II.3.2 Berechnung der Ausbeuten und der Reaktionsgeschwindigkeiten

Die Konzentration an Produkt für die Emollient Estersynthese wurde aus der GC Analyse entnommen. Die Ausbeute wird mit Formel (1) berechnet.

$$\text{Ausbeute[\%]} = \frac{[\text{Fettsäure im Ester}]}{[\text{Gesamte Fettsäuren}]} \cdot 100 \quad (1)$$

Der Anteil an in Ester gebundene Fettsäuren wird aus der GC Analyse berechnet. Der gesamte Anteil an Fettsäure wird mithilfe der in Ester gebundenen Fettsäuren und der Säurezahl berechnet. Die Lipid Ratio (LR) wird nach Formel (2) berechnet. Hierbei werden die Anteile an Decanol und Ester der GC Analyse entnommen und die Fettsäure Konzentration aus der gemessenen Säurezahl berechnet. Es werden korrigierte Molmassen von Ölsäure von 280 g/mol und für Decyloleat von 420 g/mol verwendet, da in der Ölsäure ein geringer Anteil Palmitinsäure enthalten ist. Es wird eine Dichte von 0,87 kg/L für die Berechnung verwendet.

$$\text{LR} = \frac{[\text{Decylester}] \cdot I}{[\text{Decanol}] \cdot [\text{Fettsäure}] \cdot \text{mol}} \quad (2)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird zu Beginn des Reaktionsverlaufs ermittelt.

Für die Biodieselsversuche werden die Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Enzymkonzentration berechnet. Alle Werte werden als nmol/s/mg angegeben. Es wird eine Näherung der molaren Masse für Ethanol basierten Biodiesel von 310 g/mol verwendet. Enzymkonzentrationen von Lipozym CalB (34 mg/mL) und Lipozym TL (33 mg/mL) werden mit der Methode nach Biuret ermittelt.

II.3.3 Stickstoffmessung (TN_b)

Die Aufreinigung des Glycerins von ChCl:G über Kurzwegdestillation aus der Biodieselsynthese (siehe Kapitel II.6.3) wird untersucht. Hierfür wird eine Lösung (Glycerin oder ChCl:G), abhängig vom erwarteten Stickstoffanteil verdünnt oder unverdünnt in ein LAR Quick TOC Messgerät gestellt. Zwei Kanäle sind so kalibriert, dass ein maximaler Stickstoffgehalt von 50 bzw. 250 mg/L gebundener Stickstoff gemessen werden kann. Nach Injektion in einen 1200 °C heißen Ofen wird die gesamte

Probe zu Stickstoffmonoxid verdampft und über einen Chemolumineszenzdetektor der Stickstoffgehalt analysiert.

II.3.4 Wasserbestimmung der Lipidphase

Ansätze aus der Decylester Synthese werden zentrifugiert und nur die obere Lipidphase zur Bestimmung des Wassergehalts nach Karl- Fischer verwendet [80]. Mithilfe eines Titrators wird der Wassergehalt bestimmt. Hier wird das wasserfreie Methanol vorgelegt und titriert, erst dann wird die Probe zugegeben und der Wassergehalt untersucht. Die Reagenzlösungen sind auf einen Titer von 5 mg Wasser pro mL Reagenzlösung eingestellt. Dies kann je nach Alter der Reagenzlösung minimal abweichen, sodass der Titer jedes Mal neu bestimmt wurde. Daraus kann der Wassergehalt der Lipidphase bestimmt werden.

II.3.5 Viskositätsmessung

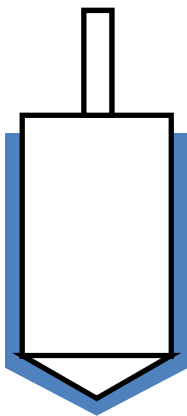


Abbildung 9:
Zylindergeometrie

Zur Messung der Viskosität wird ein Rheometer Kinexus pro (Model KNX2100) der Firma Malvern verwendet. Zunächst werden die Lösungen (ChCl:U, ChCl:G und Glycerin) mit einem Wassergehalt von 10 % hergestellt. Die Viskosität wird mit einer Zylindergeometrie gemessen (Abbildung 9). Die zu vermessende Flüssigkeit wird in das Behältnis gefüllt, der Zylinder herabgelassen und bis zu der Markierungslinie aufgefüllt. Anschließend wird ein Verschlussdeckel aufgesetzt, um eine stabile Temperatur zu gewährleisten. Zunächst wird die Viskosität für die drei Lösungsmittel ChCl:U, ChCl:G und Glycerin bei 45°C und verschiedenen Scherraten (1-1000 s⁻¹) gemessen. Dann wird bei einer Scherrate von 10 s⁻¹ die Temperaturabhängigkeit der Viskosität zwischen 25-60°C gemessen.

II.3.6 Fettchemische Kennzahlen

II.3.6.1 Säurezahl

Es werden 0,2- 5 g Fett eingewogen und in 20 mL Ethanol gelöst. Die Säurezahl wird durch Titration mit 0,1 N KOH gegen Phenolphthalein unter Verwendung eines Metrohm Dosimaten E535 ermittelt und mithilfe folgender Gleichung (3) berechnet [215].

$$SZ = \frac{\text{Verbrauch ml KOH} \cdot [\text{KOH}] \cdot M_{\text{KOH}}}{\text{Einwaage}} \quad (3)$$

II.3.6.2 Iodzahl

Es werden 50-100 mg des Fettes in einen 500 mL Erlenmeyerkolben eingewogen und in 10 mL Chloroform gelöst. Nach Zugabe von 10 mL Iodbromid (IBr) wird die Mischung für dreißig Minuten in

der Dunkelheit gelagert. Danach werden 10 mL Kaliumiodid (10 g KI auf 100mL destilliertes Wasser) und 300 mL destilliertes Wasser zugegeben. Mit 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ wird unter Rühren titriert bis nur noch eine leichte Gelbfärbung zu erkennen ist. Dann werden zwei Tropfen einer 1%igen Stärkelösung zugegeben und bis zum Farbumschlag titriert. Es wird ein Blindversuch ohne Fetteinwaage durchgeführt. Die Iodzahl wird mithilfe folgender Formel (4) berechnet.

$$IZ = \frac{(a-b) \cdot 1,269}{\text{Einwaage}} \quad (4)$$

Mit a= Verbrauch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung in mL im Blindversuch und b= Verbrauch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung im Hauptversuch [215].

II.3.6.3 Verseifungszahl

Es werden 2 g Fett eingewogen und in 25 mL ethanolischer KOH (0,5 M) gelöst. Diese Mischung wird unter Rückfluss für eine Stunde gekocht und noch heiß mit 0,5 M HCl gegen Phenolphthalein titriert bis eine klare Flüssigkeit vorliegt. Es wird ein Blindversuch ohne Fetteinwaage durchgeführt. Die Verseifungszahl wird mit folgender Formel (5) berechnet.

$$VZ = \frac{(a-b) \cdot N \cdot 56,11}{\text{Einwaage}} \quad (5)$$

Mit a= Verbrauch HCl-Lösung in mL im Blindversuch und b= Verbrauch HCl-Lösung im Hauptversuch und N=0,5 M HCl Lösung [215].

II.3.6.4 Peroxidzahl

Es wird circa 1 g Fett eingewogen und in 30 mL eines Lösungsmittelgemischs (Eisessig+Chloroform 3+2 (v/v)) gelöst. Nach Zugabe von 0,5 mL gesättigter Kaliumiodid-Lösung wird der Kolben geschlossen und genau eine Minute geschüttelt, die Lösung mit 30 mL destilliertem Wasser verdünnt und gegen 0,01 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung titriert. Kurz vor dem Verschwinden der gelben Färbung werden 0,5 mL Stärke-Lösung hinzugegeben bis eine klare Flüssigkeit vorliegt. Es wird ein Blindversuch ohne Fetteinwaage durchgeführt. Die Peroxidzahl wird mit folgender Formel (6) berechnet.

$$POZ = \frac{(a-b) \cdot c}{\text{Einwaage}} \cdot 1000 \quad (6)$$

Mit a= Verbrauch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung in mL im Blindversuch und b= Verbrauch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung im Hauptversuch und c= Konzentration der $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung in mol/L [215].

II.3.6.5 Anisidinzahl

Zur Herstellung des Anisidinreagenz werden 0,125 g p-Anisidin in einen 50 mL Messkolben eingewogen und mit Eisessig aufgefüllt. Die Extinktion des Reagenz wird gegen Isooctan vermessen, der Unterschied darf nicht größer als 0,2 sein, ansonsten muss die Lösung frisch hergestellt werden. Es werden 0,4-4 g Fett in einen 25 mL Messkolben eingewogen und mit Isooctan aufgefüllt. Zur Berechnung der Anisidinzahl werden drei Extinktionen vermessen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Pipettierschema für die Ermittlung der drei Extinktionen zur Berechnung der Anisidinzahl

Extinktion	Probelösung [mL]	Eisessig [mL]	Anisidinlösung [mL]	Isooctan [mL]
E0	5	1	-	-
E1	5	-	1	-
E2	-	-	5	1

Die Lösungen werden in Reagenzgläser pipettiert, kurz auf den Vortexer gestellt und für acht Minuten im Dunkeln gelagert. Danach wird 1 mL in eine Küvette (d=10mm) überführt und die Extinktion bei 350 nm gegen Isooctan gemessen. Die Werte werden notiert. Zur Berechnung der Anisidinzahl wird folgende Formel (7) verwendet.

$$AZ = \frac{100 \cdot Q \cdot V}{\text{Einwaage}} \cdot (1,2 \cdot (E1 - E2 - E0)) \quad (7)$$

Mit $Q=0,01$ g/mL, V = Volumen in dem Probe gelöst wurde (25 mL) und 1,2 als Korrekturfaktor [215].

II.4 Herstellung DES

Über Formel (8) wird für die Herstellung von DES der Massenanteil aus den Molanteilen berechnet.

$$w_{i,j} = \frac{x_i \times M_i}{x_i \times M_i + x_j \times M_j} \quad (8)$$

Über Formel (9) kann die jeweilige Einwaage der einzelnen Komponenten berechnet werden.

$$m_j = \frac{m_i - w_i \times m_i}{w_i} \quad (9)$$

Die Substanzen werden eingewogen und bei einer Temperatur von 60°C, auf einem Orbitalschüttler bei 250 rpm inkubiert. ChCl:U und ChCl:G werden jeweils in einer 1:2 molaren Zusammensetzung an Cholinchlorid und Harnstoff bzw. Glycerin hergestellt [184, 189].

Für die Herstellung von DES mit Ectoinen werden 1:2 molare Mischungen mit Cholinchlorid und Harnstoff hergestellt. Da sich die Substanzen nicht lösten, wurden die Ansätze bei 150°C in einen Trockenschrank gestellt.

II.4.1 Berechnung logP-Werte der verwendeten Lösungsmittel

Der logP-Wert ist der Verteilungskoeffizient des Lösungsmittels in einem Wasser/1-Octanol Gemisch. [216] Der logP-Wert ist größer eins für lipophile Substanzen und kleiner eins für hydrophile Substanzen. Die Werte werden mit dem Programm MedChem Designer (Simulations Plus Inc.) berechnet. Die Werte für die DES werden aus den Einzeldaten der zwei Komponenten bestimmt, die logP-Werte liegen jeweils unter einem Wert von -2 (Cholinchlorid: -3,4, Glycerin: -1,9, Harnstoff: -1,7).

II.5 Immobilisation von Lipozym CalB

Es werden 10 g Accurel mit 50 mL Ethanol versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Das überschüssige Ethanol wird abgenommen, 40 mL Wasser und 20 mL Lipozym CalB zugegeben und über Nacht auf dem Schüttler bei 100 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Das immobilisierte Enzym wird mittels einer Nutsche von der Flüssigkeit befreit und im Kühlschrank gelagert [217].

II.6 Biokatalytische Reaktionen

II.6.1 Probenahme

Unter Verwendung eines Lösungsmittels werden circa 0,5 mL des Reaktionsansatzes entnommen und bei 15000 rpm zentrifugiert. Aus der oberen Lipidphase wird das benötigte Probenvolumen von 5 µL entnommen und in ein GC- Vial gegeben.

II.6.2 Synthese von Emollientestern

Standardreaktionsansätze für die Veresterung von Ölsäure bzw. Laurinsäure mit Decanol werden wie folgt hergestellt. Es werden 10 g der Lipidphase, 10 g Lösungsmittel und 1 g Wasser (10 % (w/w) eingewogen. Die Lipidphase wird jeden Tag neu hergestellt. Die Mischung enthält Fettsäure und Alkohol in einem molaren Verhältnis von 1:1,1. Die Ansätze werden mindestens eine Viertelstunde auf den Schüttler gestellt, um eine Temperatur der Reaktionsmischung von 45°C zu gewährleisten, bevor durch Zugabe von 50 µL Lipozym CalB die Reaktion gestartet wird.

Es werden vergleichende Reaktionen in organischen Lösungsmitteln (Heptan, Toluol, Aceton, 2-Methyl-2-butanol) und ohne Lösungsmittel durchgeführt. Ebenfalls werden andere hydrophile Lösungsmittel (Polyethylenglykol, Ethylenglykol, Diglycerin, Sorbitol, Fructose, Saccharose) mit 5 bzw. 50 % Wasser eingesetzt.

Es werden Optimierungen des Wassergehalts in einem Bereich von 0,25 bis 6 g auf 10 g Lipidphase für Reaktionen ohne Lösungsmittel und mit Glycerin, ChCl:G und ChCl:U durchgeführt. Der Enzymgehalt (12,5 bis 200 μL) einer Standardreaktion sowie die Temperatur (25 bis 75°C) werden variiert. Das Verhältnis von Lipid- zu ChCl:U Menge wird zwischen 1:4 und 4:1 variiert. Das Edukt Verhältnis von Ölsäure zu Decanol wird in einem Bereich von 1:0,95 bis 1:1,5 variiert.

Es werden in den Lösungsmitteln Glycerin, ChCl:G und ChCl:U die Reaktionen zwischen Ölsäure bzw. Laurinsäure und Alkoholen verschiedener Kettenlängen (C2-C16) mit einem molaren Verhältnis von 1:1,1 durchgeführt.

Scale-Up der Reaktionen

Für Versuche im Rührkesselreaktor zur Decylestersynthese werden 250 g DES hergestellt und mit 250 g Lipidphase (Ölsäure und Decanol (1:1,1)) und 25 g Wasser gemischt. Sobald die Mischung die Reaktionstemperatur von 45°C erreicht hat, wird 1 mL Lipozym CalB hinzugegeben und so die Reaktion gestartet.

Die Synthese in dem Coflore- Reaktor wird mit Glycerin als Lösungsmittel und einem 1:1,1 Gemisch an Ölsäure und Decanol durchgeführt. 10 wt% Wasser und 0,5 wt % Lipozym CalB werden dem Glycerin beigemischt. Zwei Pumpen befördern die Edukte und das Medium in den Reaktor. Die Verweilzeit wird durch die Einstellung des Volumenstroms an den Pumpen eingestellt.

II.6.3 Zweistufiges Biodieselfverfahren

1. Stufe der Biodieselproduktion

Für die erste Stufe der Biodieselproduktion wird das Enzym Lipozym TL eingesetzt. Für einen Standardversuch wurden 20 g Rapsöl, 6 g Ethanol, 275 μL destilliertes Wasser und 53 mg Na_2CO_3 in einen Erlenmeyerkolben eingewogen. Der Kolben wird bei 30°C und 250 rpm auf einen Schüttler gestellt. Die Reaktion wird nach fünf Minuten durch Zugabe von 200 μL Lipozym TL gestartet. Es werden über einen Zeitraum von 48 Stunden Proben genommen. Das Gemisch nach 48 Stunden wird Biodieselvorstufe genannt und enthält keine Triglyceride kaum Diglyceride und hauptsächlich Monoglyceride als Edukte für die nächste Stufe.

Für die erste Stufe werden verschiedene Mengen an Basen (KOH: 0,005-0,1 mmol und Na_2CO_3 : 0,05-8 mmol) dem Reaktionsgemisch zugegeben. Der Enzymgehalt sowie die Temperatur werden zwischen 0,125 und 2 wt% bzw. 20 und 45°C variiert. Der Ethanol- sowie der Wassergehalt der ersten Stufe wird zwischen 0 und 14 mol/mol bzw. 0,5 und 3,0 mol/mol bezogen auf die Menge der Fettsäuren variiert.

2. Stufe der Biodieselproduktion

Die zweite Stufe der Biodieselproduktion wird mit dem Enzym Lipozym CalB durchgeführt. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten des weiteren Vorgehens.

Methode 1: Die Biodieselvorstufe wird sofort mit ChCl:G gemischt, um einen einfachen Prozess ohne zwischenzeitliche Aufreinigungsschritte zu simulieren.

Methode 2: Ethanol und Wasser werden mittels Rotationsverdampfer aus der Biodieselvorstufe entfernt, ChCl:G zugegeben und dann unterschiedliche Mengen an Wasser und Ethanol hinzugefügt. Dies wird durchgeführt, um eine genaue Information über den Ethanol- und Wassergehalt der Reaktion zu erhalten, und somit die optimale Zugabe zu ermitteln.

Für einen Standardversuch wird ein Verhältnis von DES zu Biodieselvorstufe von 1:1 (w/w) angesetzt. Die Mischungen werden bei 45°C und 250 rpm auf den Schüttler gestellt. Es wird nach fünf Minuten 200 µL Lipozym CalB hinzugegeben und so die Reaktion gestartet. Über einen Zeitraum von 48 Stunden werden Proben entnommen.

Zunächst werden vergleichende Versuche ohne und mit Lösungsmittel (ChCl:U, ChCl:G und Glycerin) durchgeführt. Der Ethanol- und Wassergehalt wird in einem Bereich von 0,25 bis 4 mol/mol bzw. 0,25 und 2,0 mol/mol bezogen auf die restliche Menge Fettsäure eingesetzt. Der Enzymgehalt wird in einem Bereich von 0,125 und 2 wt% variiert.

Design of Experiments

Mittels der Software Design-Expert® (Version: 9.0.4.1) wird ein „Design of Experiments“ (DoE) der Faktoren DES und Enzymmenge durchgeführt. Dies wird für die Entwicklung und Optimierung von Prozessen verwendet. Es sollen zur Ressourcenminimierung möglichst wenige Versuche (Einzelexperimente) durchgeführt werden, jedoch eine ausreichende Datenmenge generiert werden, sodass die Zielgrößen (Ausbeute, Reaktionsgeschwindigkeit) möglichst genau ermittelt werden können. Es müssen mindestens zwei Faktoren, wie in diesem Beispiel DES und Enzymmenge variiert werden. Diese zwei Faktoren werden gleichzeitig geändert, um so eine dreidimensionale Auftragung mittels ANOVA (*analysis of variances*) zu erhalten. Hierbei werden die Faktoren als unabhängige Variablen gehandelt und die Zielgrößen als abhängige Variablen. Es handelt sich um eine multivariate Varianzanalyse da zwei Faktoren geändert werden. Die ANOVA zeigt, ob die Faktoren signifikant sind, also wirklich einen Beitrag zu der Veränderung der Zielgrößen leisten. [218] Die Menge an DES wird mit einem Verhältnis von Biodieselvorstufe zu DES von 1:1, 1:2 und 1:3 (w/w) variiert. Die Enzymmenge wird von 0,5- 2 wt% bezogen auf die Biodieselvorstufe variiert. Es zeigt sich, dass das Model für beide Zielgrößen, also Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute an Biodiesel signifikant ist.

Für die Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde eine Zwei-Faktoren-Interaktion (2FI) gewählt, für die Ermittlung der Ausbeute eine quadratische.

Biodieselproduktion aus Altfetten

Das Ansetzen eines Versuchs unter Verwendung eines Altfettes wird genauso durchgeführt wie ein Ansatz mit Rapsöl. Es werden vier Frittier- bzw. Bratfette aus zwei Restaurants und einer Fast-Food-Kette eingesetzt. Zusätzlich werden vier Versuche mit angesäuerten Altfetten durchgeführt, hierfür wurde Ölsäure zugegeben, sodass das Altfett eine Säurezahl zwischen 16 und 18 aufweist.

Scale-Up der Reaktionen

Die Synthese von Biodiesel aus Rapsöl und Altfett wird in einem 2 Liter Rührkesselreaktor durchgeführt. Hier wird die 50-fache Menge aller Einsatzstoffe eingesetzt. Die Reaktion wird für insgesamt 48 Stunden durchgeführt und Proben genommen. In den ersten 24 Stunden wird eine Temperatur von 30°C angelegt, in den letzten 24 Stunden wird die Temperatur auf 45°C erhöht und ChCl:G zugegeben sowie mit Lipozym CalB die Reaktion erneut gestartet.

Ermittlung der Wassermenge der eingesetzten Flüssigenzyme

Es werden circa 0,5 mL der flüssigen Enzymlösung in ein Eppendorf- Cup pipettiert und gewogen. Dieses wird in einen Trockenschrank bei 80 °C für 48 h gestellt und so das Wasser verdampft, durch erneutes Wiegen konnte der Gehalt an Wasser der Enzymlösung bestimmt werden. (Lipozym TL: 20 %; Lipozym CalB: 65 %)

II.6.4 Synthese von Emulgatoren

Synthese von Emulgatoren in DES

Zu 10 g DES (ChCl:U/ChCl:G) werden 0,85 g einer Mischung aus Zucker (Saccharose, Fructose, Glucose) und Ölsäure mit eine molaren Verhältnis von 1:2 gegeben. Es werden 0,15 wt% Molsieb (3Å) eingewogen und die Reaktion mit 1,5 wt% Novozym 435 bezogen auf das DES gestartet.

Für die Herstellung von Zuckerlauraten werden Versuche im Schüttelkolben mit DES (ChCl:Fructose 1:3) durchgeführt. Auf 10 bzw. 20 g DES werden jeweils 4,25 g Laurinsäure und 4 g Fructose gegeben. Die Reaktionen werden entweder mit 5 wt% Lipozym CalB oder 3,3-5 wt% Novozym 435 bei 60°C auf dem Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Zu dem solubilisierten Enzym werden zwischen 5 und 10 wt% Wasser gegeben.

Für die Monoglyceridsynthese werden 5 g Glycerin mit 10 g Olivenöl und 0,5 g Wasser in jeweils 10 g 2-Methyl-2-butanol gemischt und 20 g ChCl:U zugegeben. Sobald das Reaktionsgemisch die

gewünschte Temperatur von 45°C erreicht hat, wird die Reaktion durch Zugabe von 0,2 g Novozym 435 gestartet.

Synthese von Emulgatoren in 2-Methyl-2-butanol

Für die Herstellung von Zuckerlauraten werden Versuche im Schüttelkolben mit 30 g 2-Methyl-2-butanol durchgeführt. Es werden jeweils 4,2 g bzw. 3,3 g Laurinsäure und 4 g bzw. 1,5 g Fructose hinzugegeben. Die Reaktionen werden mit 5 wt% immobilisiertem Lipozym CalB bei 60°C auf dem Schüttler bei 250 rpm inkubiert.

Für die Monoglyceridsynthese werden 5 g Glycerin mit 10 g Olivenöl und 0,5 g Wasser in jeweils 10 g 2-Methyl-2-butanol gemischt. Sobald das Reaktionsgemisch die gewünschte Temperatur von 45°C erreicht hat, wird die Reaktion durch Zugabe von 0,2 g Novozym 435 gestartet.

II.6.5 Synthese von 2-Ethylhexylestern

Für die Umesterung werden jeweils 10 g einer Eduktmischung an Palmfett und 2-Ethylhexanol in einem molaren Verhältnis von 1:3,3 eingesetzt. DES wird 1:1 (w/w) zugegeben und einem Standardversuch werden 2 g Wasser zugesetzt. Als Katalysator werden 25 µL Lipozym CalA hinzugegeben und die Reaktion bei 45°C und 250 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Der Wassergehalt der Reaktion wird zwischen 2,5 und 40 % variiert.

II.6.6 Biodiesel und Kokosöl Entsäuerung

Für Entsäuerungen werden Biodiesel und Kokosöl mit Ölsäure versetzt und eine Säurezahl von elf eingestellt. Es werden jeweils 20 g angesäuerter Biodiesel bzw. Kokosöl eingewogen. Für Versuche mit DES als Lösungsmittel werden jeweils 20 g ChCl:U eingesetzt. Es werden 1 mL Wasser und 1 mL Ethanol sowie 0,25 wt% Lipozym CalB bezogen auf die Einwaage an Biodiesel bzw. Kokosöl verwendet. Die Ansätze werden bei 30°C auf dem Schüttler bei 250 rpm für mindestens 120 h inkubiert. Der Enzymgehalt wird in einem Bereich von 0,1 bis 5 wt % variiert. Für die Variation des Wassergehalts werden Einsatzmengen zwischen 0,5 und 5 wt% eingesetzt. DES wird mit einem Verhältnis von 1:1 und 1:2 bezogen auf die Lipidphase eingesetzt.

II.6.1 Screening verschiedener Reaktionen mit miniaturisierten Methoden

Für einen miniaturisierten Ansatz werden zunächst DES und Glycerin Lösungen mit 25 und 40 % Wassergehalt hergestellt. Hiervon werden 200 µL in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und jeweils 200 µL des Reaktionsgemischs zugegeben. Dieser Mischung werden 20 µL der entsprechenden Enzymlösung bzw. des Zellextraktes zugegeben und für 48 h auf einen Schüttler bei 250 rpm gestellt. Nach 48 h werden Proben für die Gaschromatographie entnommen und die Ausbeute der Reaktion ermittelt.

Tabelle 8: Ansätze der Reaktionsgemische für das Enzymscreening

Reaktion	Komponente 1	Komponente 2	Verhältnis [molar]	Temperatur [°C]
Emollientester	Ölsäure	Decanol	1:1,1	30
2-Ethylhexylester	Palmfett	2-Ethylhexanol	1:3,3	45
Biodiesel	Ethanol	Rapsöl	1:3,3 (w/w)	30
Rizinusölhydrolyse	Rizinusöl			30
Isopropyllaurat	Laurinsäure	Isopropanol	1:1,1	45

II.7 Aufreinigung der Produkte

II.7.1 Raffination

Es wird die Säurezahl der Lipidphase gemessen und mithilfe der Formel für die Säurezahl (Formel (3)) berechnet, welche Menge an 1 N KOH-Lösung benötigt wird, um die freien Fettsäuren aus der Lösung zu raffinieren. Es sollte mindestens ein Überschuss von 20 % eingesetzt werden, um zu gewährleisten, dass alle freien Fettsäuren verseift werden. Die Lipidphase wird in einen Messzylinder gefüllt und mit einem Rührfisch vorsichtig gerührt. Das Zutropfen der 1 N KOH Lösung erfolgt langsam und über den gesamten Bereich der Oberfläche. Die Lösung wird für einige Zeit stehengelassen, damit eine homogene Vermischung der KOH und somit eine Reaktion stattfinden kann. Anschließend wird das Gemisch in ein Falcon-Tube gegeben und bei 4500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die obere Ölphase wird in einen Scheidetrichter gegeben und dreimal mit Wasser gewaschen, sodass verbleibende Seifen entfernt werden, das Wasser wird jeweils abgetrennt. Anschließend wird die Lösung erneut bei 4500 rpm zentrifugiert, um das gesamte Wasser mit den gelösten Seifen abzutrennen. Anschließend wird die Säurezahl der Lipidphase gemessen und eine gaschromatographische Messung durchgeführt [219].

II.7.2 Aufreinigung mittels Kurzwegdestillation

Methode 1: Es soll Decylester von nicht reagierter Ölsäure und überschüssigem Decanol befreit werden. Hierzu wird eine Kurzwegdestillation (KDL 1, UIC GmbH) mit einer Verdampfungsfläche von 0,017 m² verwendet. Zunächst wird das zu trennende Gemisch eingefüllt und die Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff gefüllt, sodass keine Leichtsieder in die Pumpen gelangen. Die Kühlfalle muss immer bis mindestens zur Hälfte gefüllt sein. Erst dann kann die Anlage zunächst mit der Drehschieberpumpe und dann mit der Öldiffusionspumpe evakuiert werden. Die Wischergeschwindigkeit beträgt 400 rpm, das höchste Vakuum von $1 \cdot 10^{-3}$ mbar wird erreicht. Der Zulaufstrom wird auf eine Zuflussrate von circa 50 mL/h manuell eingestellt und die Temperatur der Trennapparatur von 115°C bis 140°C variiert. Alkohol und Säure sammeln sich im Kopfprodukt, der Ester im Sumpf. Es wird eine zweifache Destillation des Sumpfproduktes bei 120°C durchgeführt, um

dieses möglichst rein zu erhalten.

Methode 2: Für die Biodieselsynthese wird die Kurzwegdestillation dazu verwendet das gebildete Glycerin aus dem ChCl:G abzutrennen (siehe Kapitel II.6.3). Zur Ermittlung einer geeigneten Siedetemperatur wurde zunächst reines Glycerin in die Anlage gegeben und so eine Temperatur von 80 °C bei einem Druck von $1 \cdot 10^{-3}$ mbar ermittelt. Anschließend wurden 100 g eines ChCl:G DES (1:2) hergestellt und zusätzlich mit 50 g Glycerin gemischt, um eine deutliche Anreicherung von Glycerin in dem DES zu simulieren. Die Lösung bleibt klar und farblos und ist bei Raumtemperatur flüssig. Die Wischergeschwindigkeit wurde zu 400 rpm gewählt. Eine klare, viskose Flüssigkeit wurde als Kopfprodukt gewonnen. Die Kolben werden vor und nach der Destillation gewogen und so ermittelt, wie viel Glycerin aus dem Gemisch abgetrennt wurde. Für die Abtrennung von Glycerin aus einem DES, welches in der Biodieselproduktion aus Altfett verwendet wurde, werden zwei Wischergeschwindigkeiten von 300 und 400 rpm und zwei Zutropfgeschwindigkeiten von 40 und 60 Tropfen pro min eingestellt. Die Kolben werden zur späteren Bestimmung der erhaltenen Massen ausgewogen.

II.8 Stabilität und Recycling der Lipasen

II.8.1 Stabilisierung von Lipozym CalB in ChCl:U mit Ectoinen

Zu einem Standardansatz der Decyloleatsynthese werden jeweils 0,75 g Ectoin bzw. Hydroxyectoin hinzugegeben. Als Referenz wird die Reaktionsgeschwindigkeit nach $t=0$ h aufgenommen. Für die Ermittlung der Stabilität nach 24 und 48 h wird das Enzym in einer Mischung aus ChCl:U, Wasser und Ectoin bzw. Hydroxyectoin auf einem Schüttler bei 45°C und 250 rpm gelagert und dann die Ölphase hinzugegeben. Zu bestimmten Zeiten wird eine Probe genommen, zentrifugiert bei 15000 rpm für eine Minute und die obere Ölphase für die weitere Analytik verwendet.

II.8.2 Langzeitstabilität

Für die Bestimmung der Langzeitstabilität von Lipozym CalB in DES und Glycerin werden 100 g des Lösungsmittels mit der gewünschten Menge an Wasser und 500 µL Lipozym CalB gemischt und für definierte Zeitintervalle zwischen 24 h und 50 Tagen auf einem Schüttler bei 45°C und 250 rpm gelagert. Nach diesen Zeiten wird die Lagermischung 1:1 mit der Lipidphase (bestehend aus Ölsäure und Decanol, 1:1,1) zusammengeführt und der Reaktionsverlauf aufgenommen. Zur Untersuchung der stabilisierenden Wirkung von Ölsäure, wird zu der Anfangsmischung 61,87 g Ölsäure hinzugegeben und inkubiert. Für die Aufnahme des Reaktionsverlaufs wird hier die Lagermischung mit Decanol zusammengeführt, sodass ein molares Verhältnis von Ölsäure zu Decanol von 1:1,1 vorliegt.

II.8.3 Recycling von Lösungsmitteln und Lipase

Methode 1: Ein Standardansatz der Decyloleatsynthese wird für 24 h auf dem Schüttler inkubiert. Nach dieser Zeit wird der gesamte Ansatz in ein Falcon Röhrchen überführt und bei 4500 rpm für 5 min zentrifugiert. Die obere Ölphase wird für die Analytik verwendet, die untere Lösungsmittelphase sowie die Zwischenphase in einen neuen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit Lipidphase 1:1 (w/w) versetzt und erneut für 24 h auf den Schüttler gestellt. Dies wird dreimal wiederholt.

Methode 2: Für das Recycling von ChCl:G und Lipozym CalB eines Ansatzes der Synthese von Biodiesel wird ein Standardansatz der 2. Stufe der Biodieselproduktion hergestellt (siehe Kapitel II.6.3). Es wird die vierfache Menge an Lipase im Vergleich zum Standardansatz zugegeben. Das Recycling wird wie im oberen Abschnitt durchgeführt, nur sind die Recyclingschritte hier auf 1,5 h begrenzt. Das Recycling wird fünfmal durchgeführt die letzte Stufe inkubiert über Nacht und wird nach 24 h analysiert.

II.9 Mikrotiterplatten Enzymassay

Zur Herstellung von Lösung A werden 0,0361 g p-Nitrophenoldodecanoat abgewogen und in 10 mL DMSO mithilfe eines Ultraschallbades gelöst und im Dunkeln gelagert [220]. Lösung B wird mit zwei Wassergehalten hergestellt (Tabelle 9). Lösungsmittel sind hierbei Wasser, ChCl:U, ChCl:G, Glycerin, DMSO und Aceton. Wird Aceton verwendet, wird kein Gummi Arabicum hinzugegeben.

Tabelle 9: Pipettierschema Lösung B

	25 % Wasser	40% Wasser
1 M Tris-HCl-Puffer (pH=8)	100 µL	100 µL
VE-Wasser	1,7 mL	3,45 mL
Gummi Arabicum	0,01 g	0,01 g
Triton X100	0,01 g	0,01 g
Lösungsmittel	ad 10mL	ad 10mL

Lösung C wird durch Mischen von 10 mL Lösung B und 0,555 mL Lösung A hergestellt. In eine 96-well Platte werden 20 µL einer geeigneten Verdünnung der zu vermessenden Enzymprobe vorgelegt und dann 190 µL Lösung C hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wird sofort in das Photometer gestellt und bei einer Wellenlänge von 410 nm bei 30°C die Absorption über einen Zeitraum von 60 Minuten gemessen. Für die Bestimmung der Lagerstabilität der Enzyme wird eine 1:10 Verdünnung des Enzyms bzw. des Zellextraktes mit dem jeweiligen Lösungsmittel hergestellt. Die Proben werden auf einem Schüttler bei 30°C inkubiert. Nach 1 h und 24 h wird das gelagerte Enzym auf eine geeignete

Verdünnung gebracht und wie zum Zeitpunkt $t=0$ h in einer Mikrotiterplatte die Absorption bei 410 nm bei 30°C für 60 Minuten gemessen.

II.10 Biochemische Methoden

II.10.1 Gewinnung Zellextrakte für Aktivitätstests in Lösungsmitteln

Aus einer Übernachtskultur des *E.coli* Stamms BL21(DE3) + Plasmid werden die Hauptkulturen in Erlenmeyerkolben angeimpft. Diese 56 untersuchten Stämme lagen bereits kloniert vor. Es werden 100 mL LB-Medium mit Ampicillin (100 µl/ml) verwendet. Die Kulturen werden auf einem Schüttler bei 37°C und 120 rpm bis zu einer OD_{580} von circa 0,6-0,8 inkubiert. Dann wird die Lipaseexpression mit 100 µL IPTG (1 mM) induziert und erneut auf einem Schüttler für zwei Stunden bei 18°C und 120 rpm inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen bei 4500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 5 mL Tris-HCl (50 mM, pH=8) mit Lysozym (0,1 mg/mL) und DNase (5 µg/mL) resuspendiert. Die Lösung wird dreimal eingefroren, bei 37°C wieder aufgetaut und anschließend bei 4500 rpm für 0,5 h die Zelltrümmer abzentrifugiert und die obere Phase abgenommen. Die Zellextrakte werden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch auf Eis aufgetaut.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl [221]

II.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford wird zur Ermittlung einer Eichgerade eine Stocklösung mit einer Konzentration an Albumin von 100 µg/mL hergestellt. Aus dieser Lösung werden durch geeignete Verdünnungen Lösungen mit Proteinkonzentrationen zwischen 2,5 und 100 µg/mL hergestellt. Das Bradford Reagenz (Roti®-Nanoquant 5x Konzentrat) wird mit Wasser 1:5 verdünnt. Es wird eine klare 96-well Platte verwendet, 160 µL Bradford Lösung vorgelegt und mit $n=3$ 40 µL der einzelnen Konzentrationen der Albuminlösung zupipettiert. Als Blank wird VE-Wasser verwendet. Nach fünf Minuten wird die Absorption bei 590 nm gemessen. Mit verschiedenen Enzymverdünnungen wird nach demselben Schema vorgegangen. Die Proteinkonzentration kann mithilfe der Kalibriergeraden und der gemessenen Absorption ermittelt werden [222].

II.10.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Biuret

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Biuret wird eine Albumin Stocklösung von 10 mg/mL in 0,9 % NaCl Lösung hergestellt. Es werden in eine Küvette jeweils 500 µL Biuret-Reagenz vorgelegt und eine Kalibriergerade mittels geeigneter Verdünnungen der Albumin Stocklösung und einer 0,9 % NaCl Lösung hergestellt, sodass das Endvolumen 1 mL beträgt. Das Gemisch inkubiert für circa 10 Minuten bei Raumtemperatur und wird dann bei einer Wellenlänge von 546 nm vermessen. Die Enzymlösungen werden mit 0,9 % NaCl auf eine geeignete Verdünnung gebracht. Die

Proteinkonzentration der Enzymlösungen kann mithilfe der Kalibriergeraden und der gemessenen Absorption ermittelt werden [223].

Biuret-Reagenz: 4,5 g K-Na- Tartrat in 40 mL 0,2 M NaOH lösen
 + 0,5 g CuSO₄ * 5 H₂O
 +0,5 g KI ad 100 mL 0,2 M NaOH

II.10.4 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wird eine SDS Gelelektrophorese durchgeführt [224]. Das Trenngel wird mit Isopropanol überschichtet, sodass eine gerade Oberfläche vorliegt. Nach Aushärten des Trenngels wird das Isopropanol vorsichtig entfernt und das Sammelgel zusammen pipettiert und gegossen.

Tabelle 10: Pipettierschema SDS-Gele

	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 5 %
1,5 M Tris-HCl-Puffer (pH=8,8)	5 mL	-
0,5 M Tris-HCl-Puffer (pH=6,8)	-	1,88 mL
VE-Wasser	4,1 mL	4,1 mL
87 % Glycerin	2,15 mL	-
10 % SDS	200 µL	75 µL
Acrylamid	8,35 mL	1,25 mL
10 % APS	200 µL	75 µL
TEMED	15 µL	5 µL

Nach dem Aushärten wird das Gel in eine Laufstation gespannt und diese mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Als Größenstandard wird der PageRuler™PrestainedProteinLadder verwendet. Die Proteinproben werden mit Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 94°C inkubiert. Es wird für zwei bis zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur eine Spannung pro Gel von 35 mA angelegt. Dann wird die Spannungsquelle abgestellt und das Gel in eine Wanne mit Coomassie-Färbelösung gelegt und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur darin geschwenkt. Die Färbelösung wird abgegossen und eine Entfärbelösung zugegeben. Nach zwei Stunden wird das Gel entnommen und ausgewertet.

<u>1x Laufpuffer:</u>	25 mM Tris	<u>Coomassie-Färbelösung:</u>
	192 mM Glycin	40 % (v/v) Isopropanol
	0,1 % (w/v) SDS	10 % (v/v) Essigsäure
<u>Entfärbelösung:</u>	10 % (v/v) Essigsäure	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

III. Ergebnisse

III.1 Herstellung und Charakterisierung von DES

Deep Eutectic Solvents (DES) gelten als „Green Solvents“, daher ist es ein interessanter Aspekt biokatalytische Synthesen in diesen Lösungsmitteln durchzuführen. Zur näheren Charakterisierung wurden verschiedene DES hergestellt (Tabelle 11).

Tabelle 11: In dieser Arbeit hergestellte DES

Komponente 1	Komponente 2	Verhältnis [molar]	Schmelz- temperatur [°C]	Beobachtungen bei RT	
Cholinchlorid	Harnstoff	1:2	12	Flüssig, farblos	[184, 185]
Cholinchlorid	ZnCl ₂	1:2		Viskos, schlecht gelöst	[192]
Cholinchlorid	Methylharnstoff	1:2	29	Flüssig, farblos	[184, 185]
Cholinchlorid	Oxalsäure	1:1	34	Flüssig, farblos	[185, 225]
Chlor- cholinchlorid	ZnCl ₂	1:2	23-25	Viskos, schlecht gelöst	[193]
Cholinchlorid	Zitronensäure	2:1	69	Flüssig, farblos	[185, 225]
Cholinchlorid	Glycerin	1:1	-40	Flüssig, farblos	[185, 189, 204]
Fructose	Harnstoff	60:40 (w/w)	65	Viskos, Verfärbung	[70]
Glucose	Harnstoff + CaCl ₂	50:40:10 (w/w/w)	75	Viskos, Verfärbung	[70]
Cholinchlorid	Acetamid	1:2	51	Unvollständig gelöst	[184, 185]
Cholinchlorid	Glucose	1:1; 2:1; 1:2; 1:3	15-31	Viskos, Verfärbung	[197, 199]
Cholinchlorid	Ethylenglykol	2:1		Viskos, Verfärbung	

Cholinchlorid	Diglycerin	1:1; 1:2	Viskos, Verfärbung
Cholinchlorid	Sorbitol	1:1	Viskos, Verfärbung
Cholinchlorid	Fructose	1:3	Viskos, Verfärbung [197, 198]
Cholinchlorid	Fructose+ 1,27 g Ethylglucose	1:2	Viskos, Verfärbung
Ectoin	Harnstoff	1:2	Fest
Hydroxyectoin	Harnstoff	1:2	Fest
Cholinchlorid	Ectoin	1:2	Fest
Cholinchlorid	Hydroxyectoin	1:2	Fest

DES werden meist aus quaternären Ammoniumverbindungen, wie beispielsweise Cholinchlorid und verschiedenen Wasserstoffdonoren gebildet. In der Tabelle sind einige bereits in der Literatur beschriebene DES aufgeführt sowie einige neue Mischungen. Die DES werden auf ihre Eignung als Lösungsmittel für enzymkatalysierte Reaktion zu dienen betrachtet und charakterisiert.

Die beiden DES mit $ZnCl_2$ sind sehr viskos und lösen sich bei einer Temperatur von 90 bis circa 115°C schlecht. Die DES, welche aus Cholinchlorid und Methylharnstoff, Oxalsäure, Zitronensäure und Glycerin bestehen, lösen sich sehr schnell bei einer Temperatur von maximal 80°C, die Mischung aus Cholinchlorid und Acetamid verflüssigt sich bei circa 60°C nicht vollständig. Die DES mit Fructose und Glucose sowie mit Zitronensäure werden als NADES bezeichnet. Die Theorie besagt, dass in Pflanzen in diesen Flüssigkeiten Reaktionen enzymkatalysiert in Anwesenheit von Wasser ablaufen. Aufgrund der bräunlichen Färbung und der hohen Viskosität werden sie nicht für weitere Reaktionen genutzt. Es findet die Maillard Reaktion statt, da Harnstoff ein Stickstoffatom enthält und dieses mit dem Zucker reagiert [198]. Unter Verwendung von Cholinchlorid und Diglycerin, Sorbitol und Ethylenglykol entstand bei 80°C eine ebenfalls hochviskose Flüssigkeit. Hochviskose DES wurden für die weiteren Arbeiten ausgeschlossen, da keine ausreichende Durchmischung der Edukte in diesen DES gewährleistet werden konnte. Das DES aus Cholinchlorid und Fructose wurde für die Synthese von Zuckerethern getestet.

Weiterhin wurde die Möglichkeit untersucht, mit neuen Substanzen, sogenannten Ectoinen DES herzustellen (Abbildung 10). Ectoine sind ebenfalls in der Natur vorkommende Metabolite aus extremophilen Bakterien und dienen dort der Enzymstabilisierung, sodass beim Einsatz der Ectoine als Komponente eines DES eventuell eine Stabilisierung der Lipase erreicht werden kann [226, 227]. Diese Ectoine besitzen Hydroxyverbindungen und könnten somit einfach

Wasserstoffbrückenbindungen bilden. Gemischt wurden die Substanzen mit Cholinchlorid und Harnstoff, jeweils mit einem Molverhältnis von 1:2.

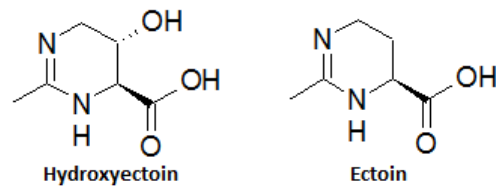


Abbildung 10: Strukturformel Hydroxyectoin und Ectoin

Bei Temperaturen bis 100°C haben sich die Mischungen nicht verflüssigt und es lagen weiterhin Feststoffe vor. Erst ab einer Temperatur von größer als 150°C kommt es bei den Mischungen mit Hydroxyectoin und Harnstoff zu einer Verfärbung und dem Verschmelzen beider Komponenten. Die Mischung aus Ectoin und Harnstoff zeigt ebenfalls eine weißlich-braune Verfärbung, beide waren jedoch sofort nach Entnahme aus dem heißen Trockenschrank wieder fest und somit als Lösungsmittel für biokatalytische Reaktionen nicht geeignet.

Das DES aus Cholinchlorid und Harnstoff (ChCl:U) ist, neben dem aus Cholinchlorid und Glycerin bestehenden DES (ChCl:G), das in der Literatur am häufigsten zitierte DES [184, 189]. Diese beiden DES wurden in der vorliegenden Arbeit aufgrund des niedrigen Festpunkts von 12 °C bzw. -40°C bevorzugt eingesetzt, da es nach dem Lösen eine klare, farblose Flüssigkeit ist, die auch bei Raumtemperatur noch flüssig vorliegt (Abbildung 11).



Abbildung 11: Cholinchlorid und Harnstoff als Reinsubstanzen und nach dem Mischen als DES

Vergleichend zu Glycerin werden die DES ChCl:U und ChCl:G hinsichtlich ihrer Viskosität näher charakterisiert. Die Viskosität wurde über einen Bereich der Scherrate von 1-1000s⁻¹ bei 45°C gemessen. Den Lösungsmitteln wurden beispielhaft jeweils 10 % Wasser zugesetzt, da hauptsächlich Reaktionen untersucht werden sollten, in denen ein geringer Wassergehalt eingesetzt wird. In Tabelle 12 sind die Mittelwerte der gemessenen Viskosität der Lösungsmittel aufgetragen, diese ist in dem vermessenen Scherratenbereich konstant. Es zeigt sich, dass reines Glycerin die höchste

Viskosität mit 55,1 mPas aufweist, wird das Glycerin 2:1 mit Cholinchlorid gemischt, sinkt die Viskosität deutlich. Das DES bestehend aus Cholinchlorid und Harnstoff weist die geringste Viskosität mit 25,0 mPas auf, dieser Wert ist um mehr als die Hälfte geringer als die Viskosität von Glycerin.

Tabelle 12: Viskosität der drei Lösungsmittel ChCl:U, ChCl:G und Glycerin mit 10 % Wassergehalt

Lösungsmittel	Viskosität [mPas]
ChCl:U	$25,0 \pm 3,3 \cdot 10^{-4}$
ChCl:G	$35,5 \pm 3,1 \cdot 10^{-4}$
Glycerin	$55,1 \pm 4,2 \cdot 10^{-4}$

Die Temperaturabhängigkeit der Lösungsmittel wurde bei einer Scherrate von 10 s^{-1} in Abhängigkeit der Temperatur zwischen 25-60°C gemessen (Abbildung 12). Es ist zu erkennen, dass die Viskosität mit steigender Temperatur deutlich abnimmt und bei 60°C sehr ähnliche Viskositäten der drei Lösungsmittel von circa 20 mPas gemessen werden. Die Viskosität von Glycerin ist bei 25°C deutlich höher als für die beiden DES. In Abbildung 13 ist die Temperaturabhängigkeit als Arrhenius-Andrade-Plot aufgetragen.

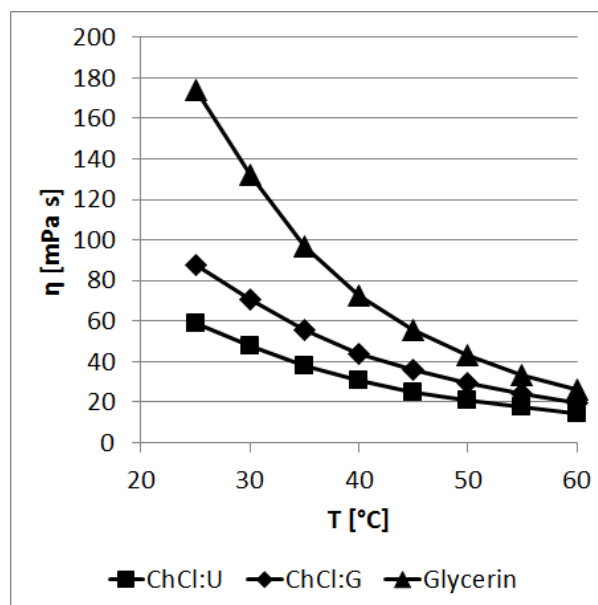


Abbildung 12: Temperaturabhängigkeit der Viskosität der drei Lösungsmittel ChCl:U, ChCl:G und Glycerin mit 10 % Wassergehalt zwischen 25-60°C

Diese Auftragung folgt der Arrhenius-Andrade-Gleichung (Formel (10)).

$$\eta = A \cdot e^{\frac{E_A}{RT}} \quad (10)$$

Über Umformung der Gleichung erhält man die folgende Geradengleichung (11)

$$\ln \eta = \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln(A) \quad (11)$$

Mit dieser Gleichung kann aus der Steigung die Fließaktivierungsenergie E_A bei einer bestimmten Temperatur in Kelvin mit $R=8,314 \text{ kJ/mol K}$ ermittelt werden.

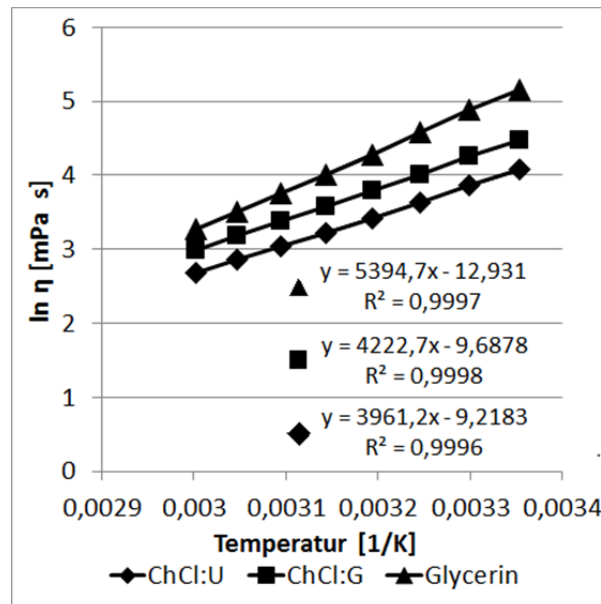


Abbildung 13: Temperaturabhängigkeit der Viskosität als Arrhenius-Andrade Plot der drei Lösungsmittel ChCl:U, ChCl:G und Glycerin mit 10 % Wassergehalt zwischen 25-60°C

Aus diesen Messungen und den Beobachtungen konnte ermittelt werden, dass keine Reaktionen bei Temperaturen unter 30°C durchgeführt werden sollten, da hier die Lösungsmittel sehr viskos sind und die Diffusion der Edukte negativ beeinflusst wird.

III.2 Synthese von Emollients

Decyloleat und Decyllaurat werden als kosmetische Ester in der Industrie verwendet (Abbildung 14). Bis heute werden die Substanzen hauptsächlich über chemische Verfahren hergestellt, Evonik stellt Emollients als einziges auch enzymatisch über Synthese mit immobilisierter Lipase Novozym 435 her [120, 125]. Als Alternative zum Einsatz immobilisierter Lipasen in Vakuumapparaturen wurde die Synthese mit einer nativen Lipase in DES untersucht.

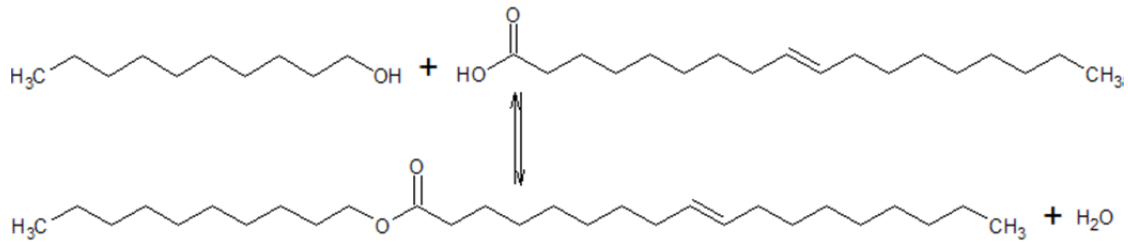


Abbildung 14: Reaktionsgleichung für die Synthese von Decyloleat aus Decanol und Ölsäure

III.2.1 Vergleich von DES mit anderen Lösungsmitteln

In einer vergleichenden Untersuchung wurde die Eignung von DES als Lösungsmittel für die Reaktionen zu Emollientestern evaluiert. Verglichen wurden Synthesen ohne Lösungsmittel mit polaren und unpolaren sowie hydrophilen Lösungsmitteln, zu denen DES gehören (Tabelle 13). Anhand der berechneten logP- Werte, die ein Maß für die Hydrophobizität sind, wurden die Lösungsmittel in unterschiedliche Gruppen unterteilt. LogP-Werte unter zwei zeigen einen polaren Charakter der Lösungsmittel Aceton und 2-Methyl-2-butanol, daher gehören diese zu den wasserziehenden Lösungsmitteln. LogP-Werte größer zwei zeigen einen stark hydrophoben, unpolaren Charakter der Lösungsmittel Toluol und Heptan. Die logP-Werte für Glycerin von -1,9 und für DES unter zwei zeigen deren stark hydrophilen Charakter. Die Ausbeuten in den polaren Lösungsmitteln sind für die Synthese beider Emollientester sehr gering, nach kurzer Zeit findet keine Reaktion mehr statt und geringe Reaktionsgeschwindigkeiten werden erreicht. In den hydrophoben Lösungsmitteln (Heptan und Toluol) werden Ausbeuten von ungefähr 94 bzw. 90 % erreicht, diese sind vergleichbar mit der Reaktion ohne Lösungsmittel. Die Reaktionsgeschwindigkeit in den hydrophoben Lösungsmitteln liegt deutlich unter dem Wert für die Reaktion ohne Lösungsmittel. Alle drei hydrophilen Lösungsmittel weisen sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeiten auf, wobei Glycerin und ChCl:G eine anfängliche lag-Phase besitzen. Hier werden die höchsten Ausbeuten an Emollientestern mit Werten > 97 % detektiert. Die Lipid Ratio, also das Verhältnis des Produkts zu den Edukten zum Ende der Reaktion, ist für die hydrophilen Lösungsmittel mit Werten > 70 deutlich höher, als für alle anderen Reaktionen. Dies spiegelt auch die geringen Säurezahlen im Gleichgewicht der Reaktion wieder, welche für die Reaktionen in hydrophilen Lösungsmitteln ebenfalls deutlich geringer ist, als für alle anderen Reaktionen.

Tabelle 13: Synthese von Decyllaurat bzw. -oleat in organischen und hydrophilen Lösungsmitteln (DES bzw. Glycerin) und einer Vergleichsreaktion ohne Lösungsmittel (*1 verlängerte Anfangs-lag Phase, *2 Anfangs-lag Phase beobachtet)

Lösungs- mittel	logP	Decyloleat [%]	Säurezahl	Ausbeute [%]	LR [l/mol]	Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
kein		89,3 \pm 0,6	11,4 \pm 0,1	91,2	38	294
2M2B	0,9	26,4 \pm 6,5	75,2 \pm 2,9	31,7	0,2	0,7 *1
Aceton	-0,1	39,2 \pm 6,7	65,6 \pm 0,8	44,2	0,5	2,4 *1
Toluol	2,5	87,3 \pm 0,2	14,6 \pm 0,1	88,8	27	73
Heptan	5,1	90,1 \pm 1,0	12,2 \pm 0,1	90,7	46	83
Glycerin	-1,9	94,4 \pm 0,5	3,2 \pm 0,1	97,5	180	297 *2
ChCl:U	< -2	94,4 \pm 0,5	2,8 \pm 0,1	97,8	193	231
ChCl:G	< -2	94,8 \pm 0,4	3,0 \pm 0,2	97,7	204	155 *2

	Decyllaurat [%]	Säurezahl	Ausbeute [%]	LR [l/mol]
kein	84,4 \pm 0,4	13,6 \pm 0,1	91,1	17
2M2B	32,5 \pm 1,9	82 \pm 1,2	39,5	0,3
Aceton	41,7 \pm 2,3	68,8 \pm 2,1	50	0,5
Toluol	88,4 \pm 0,1	10,2 \pm 1,4	93,5	33
Heptan	89,4 \pm 1,7	9,2 \pm 0,3	94,1	40
Glycerin	90,3 \pm 0,3	4,3 \pm 0,4	97,2	77
ChCl:U	92,1 \pm 0,4	2,8 \pm 0,4	98,2	143
ChCl:G	91,7 \pm 0,8	3,4 \pm 0,2	97,8	114

Die Messung des Wassergehalts über Karl-Fischer Titration wies eine circa 10-fach geringere Menge Wasser (0,28 gegen 2,5 mg H₂O/ mL Probe) in der Lipidphase für Reaktionen in DES im Vergleich zu einer Reaktion ohne Lösungsmittel auf und zeigt somit einen stark wasserziehenden Effekt der DES. Bezogen auf diesen deutlich geringeren Wassergehalt der Lipidphase lassen sich die hohen Ausbeuten und die geringen Säurezahlen durch eine Verschiebung des Gleichgewichts erklären.

Wird immobilisierte Lipase Novozym 435 als Katalysator für die Synthese von Decyloleat eingesetzt, zeigte sich keine höhere Reaktionsrate und die Ausbeute lag in derselben Größenordnung, wie für die native Lipase. Weiterhin verstopft das eingesetzte DES die Poren des Immobilisats, somit kommt es zu einer Limitierung der Diffusion der Edukte zum Enzym. Durch Waschen des Immobilisats in Wasser

konnte ein Teil der Aktivität wiedererlangt werden. Daher bot der Einsatz des teureren Novozym 435 keine Vorteile und es wurden alle weiteren Versuche mit der nativen Lipase CalB durchgeführt.

Tabelle 14: Reaktionen zu Decyloleat in hydrophilen Lösungsmitteln mit verschiedenen Wassergehalten (Werte in Klammern: Nebenprodukte)

Lösungsmittel	Wasser [%]	Säurezahl	Ausbeute [%]	Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
Ethylenglykol	5	$2,5 \pm 0,3$	92,0 (5,8)	211
	50	$5,7 \pm 0,1$	92,2 (2,9)	542
PEG 400	5	$5,4 \pm 0,2$	95,7	342
	50	$8,2 \pm 0,5$	93,5	908
Diglycerin	50	$7,3 \pm 0,1$	94,2	718
Sorbitol	50	$7,7 \pm 0,1$	93,9	584
Fructose	50	$7,9 \pm 0,1$	93,7	563
Saccharose	50	$8,5 \pm 0,1$	93,2	535

Glycerin weist neben DES ähnlich gute Eigenschaften auf, das Gleichgewicht durch einen wasserziehenden Effekt zu verschieben, daher wurden andere hydrophile Lösungsmittel ebenfalls als Medium für die Reaktion zu Decyloleat getestet. Für Ethylenglykol und PEG 400 wurden zwei verschiedene Wassergehalte eingestellt, für die restlichen vier Substanzen wurden jeweils 50 % Wasser bezogen auf die Substanz zugegeben. Die Zucker waren in weniger Wasser nicht löslich bzw. das Diglycerin war mit 5 % Wasser höchstviskos und daher für die Reaktion nicht einsetzbar. Auffallend ist, dass die Ausbeute aller Reaktionen höher ist, als unter Einsatz eines organischen Lösungsmittels bzw. ohne Lösungsmittel und ein positiver Effekt dieser Lösungsmittel auftritt (Tabelle 14). Mit Ausbeuten unter 98 % fallen die hier ermittelten Werte leicht geringer aus, als für Reaktionen in DES. Deutlich sichtbar sind die höheren Reaktionsgeschwindigkeiten, welche auf eine höhere Aktivität des Enzyms in den Lösungsmitteln hinweisen und mit steigendem Wassergehalt größer werden. Die Säurezahlen sind deutlicher höher, als unter Verwendung von DES, was auf den höheren Wassergehalt und ein hierdurch verschobenes Gleichgewicht zurückzuführen ist. Unter Verwendung von Ethylenglykol wird eine Gesamtausbeute von 97 % mit 5,8 bzw. 2,7 % Nebenprodukten erreicht (siehe Klammern). Aus der Veresterung von Ölsäure mit Ethylenglykol sind unerwünschte Nebenprodukte entstanden. Zur Identifikation dieser Nebenprodukte wurden Untersuchungen in 2-Methyl-2-butanol mit Laurinsäure und Glycerin bzw. Ethylenglykol als Edukte durchgeführt (Abbildung 15 und Abbildung 16; schwarze Linie). In grau bzw. pink dargestellt sind Reaktionen in den Lösungsmitteln Glycerin und ChCl:G bzw. Ethylenglykol. Es zeigt sich, dass bei der Reaktion in Glycerin und ChCl:G eine geringe Menge an Monoglyceriden entsteht, jedoch keine

Diglyceride. Der Anteil des Nebenproduktes zum Gesamtprodukt liegt für die Reaktion in Glycerin bei 0,44 % für die in $\text{ChCl}:\text{G}$ bei 1,44 %, in der Reaktion mit Ethylenglykol als Lösungsmittel entstehen sowohl Mono- als auch Diester (5,75 %).

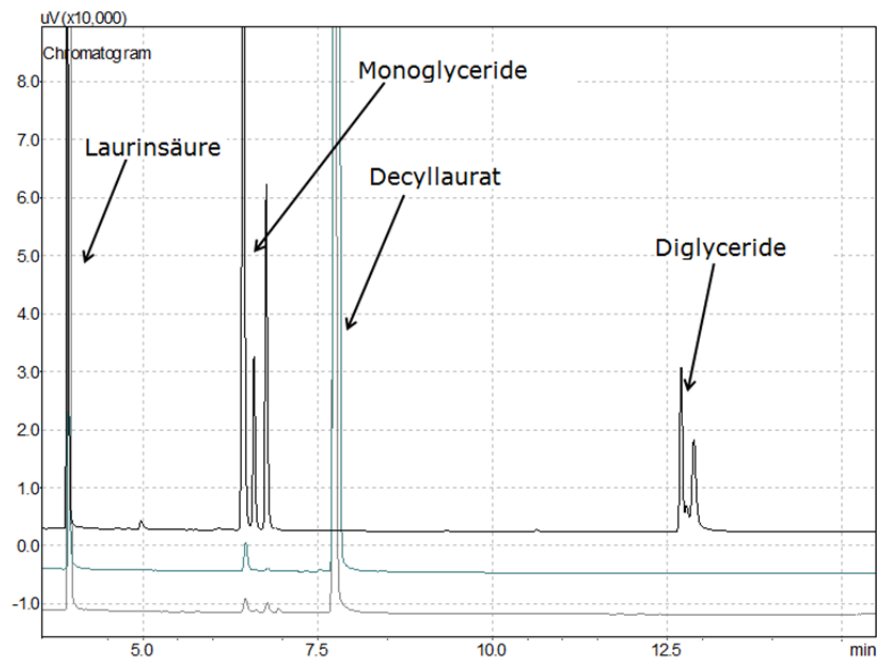


Abbildung 15: GC Overlay der Decyllaurat Synthese: Laurinsäure und Decanol in 2-Methyl-2-butanol (schwarz), in Glycerin (grau, Mitte) und $\text{ChCl}:\text{G}$ (grau, unten)

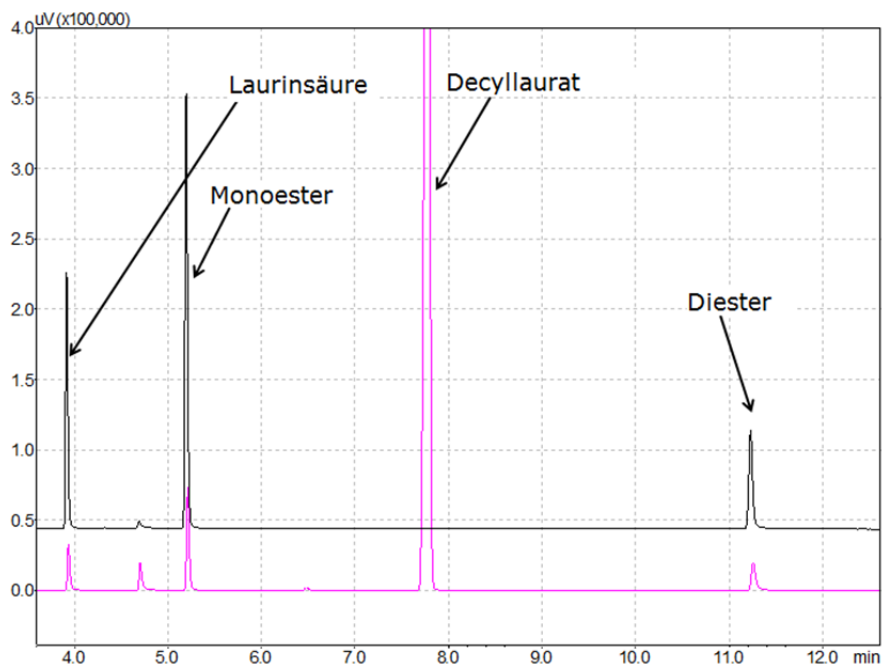


Abbildung 16: GC Overlay der Decyllaurat Synthese: Standard Reaktion in 2-Methyl-2-butanol (schwarz) und in Ethylenglykol (pink)

III.2.2 Optimierung der Reaktionsparameter

Zur Optimierung der Synthese von Emollients wurden die kritischen Parameter der Reaktion näher betrachtet. Analysiert wurden dabei der Einfluss von Wassergehalt, Temperatur, Enzymgehalt sowie das Verhältnis der Edukte und von Lösungsmittel- zu Lipidphase auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die Ausbeute im Gleichgewicht.

Variation des Wassergehalts

Verglichen wurden Reaktionen ohne und mit den hydrophilen Lösungsmitteln in Abhängigkeit des Wassergehalts (Tabelle 15).

Tabelle 15: Vergleich der Säurezahl, der Ausbeute sowie der Reaktionsgeschwindigkeit mit unterschiedlichen Wassergehalten in verschiedenen Lösungsmitteln (Die prozentuale Wassermenge bezieht sich jeweils auf 10 g Lipidphase der Edukte)

Lösungsmittel	Wasser [%]	Säurezahl	Ausbeute [%]	Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
Ohne	2,5	14,4 \pm 0,1	88,5	41,4
	10	11,2 \pm 0,1	91,1	293,5
	40	10,9 \pm 0,1	91,2	725,0
ChCl:U	2,5	108,4	6,2	27,6
	5	100,4	12,7	41,4
	10	2,8 \pm 0,1	97,8	231,3
	20	4,0 \pm 0,1	96,8	348,7
	40	5,6 \pm 0,3	95,5	521,3
ChCl:G	2,5	109,2 \pm 0,7	9,6	9,3
	10	3,0 \pm 0,1	97,7	27,6
	40	6,1 \pm 0,5	95,3	362,5
Glycerin	2,5	3,6 \pm 1,7	97,2	61,8
	5	2,2 \pm 0,1	98,3	124,3
	10	3,0 \pm 0,1	97,7	296,9
	20	4,1 \pm 0,1	96,8	410,8
	40	5,8 \pm 0,1	95,5	614,5
	60	6,7 \pm 0,1	94,8	787,1

Die Reaktionen ohne Lösungsmittel laufen alle in ein Gleichgewicht von 88,5-91,2 %. Mit steigender eingesetzter Wassermenge nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einem Wert von 725 $\mu\text{mol}/\text{min}$ zu. Alle Reaktionen mit Lösungsmitteln weisen deutlich höhere Ausbeuten an Produkt auf

als ohne Lösungsmittel (Abbildung 17). Unter Verwendung von ChCl:U und ChCl:G muss eine minimale Wassermenge von 10 % eingesetzt werden, um eine Reaktion bis ins Gleichgewicht zu erhalten, wird weniger Wasser eingesetzt, findet zu Beginn eine Reaktion statt und geringe Ausbeuten werden erreicht. Unter Verwendung von Glycerin findet bei einem Wassergehalt von 2,5 % eine Reaktion bis zu einer hohen Ausbeute von 97,2 % statt. Die Ausbeute an Produkt geht mit erhöhter Wassermenge leicht zurück, dieser Rückgang ist gering im Vergleich zum Anstieg der eingesetzten Wassermenge. Die Abnahme der Ausbeute bei höheren Wassermengen lässt sich dadurch erklären, dass Wasser ein Nebenprodukt der Reaktion ist und daher das Gleichgewicht auf die Seite der Edukte verschoben wird.

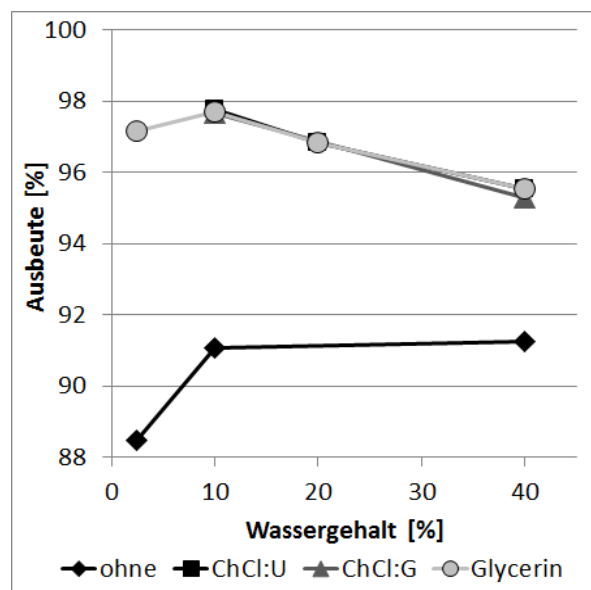


Abbildung 17: Ausbeute in Abhängigkeit des eingesetzten Lösungsmittels bei Wassergehalten zwischen 2,5 und 40 % bezogen auf die Lipidphase

Die Messung der Säurezahl, als zweite Methode zur Analyse des Umsatzes, korreliert mit der Ausbeutebestimmung über GC. Die Säurezahl im Gleichgewicht der Reaktion wird höher, je mehr Wasser eingesetzt wird. Die Säurezahl nimmt beispielsweise bei Vervielfachung der Wassermenge in ChCl:G um das Doppelte von 3,0 auf 6,1 zu.

Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt unabhängig vom Einsatz eines Lösungsmittels proportional zum Wassergehalt an (Abbildung 18). Die Reaktion in ChCl:G läuft am langsamsten ab und ohne Lösungsmittel wird die Reaktion in dem dargestellten Bereich am schnellsten katalysiert. Es muss bei der Wahl des Wassergehalts für alle Reaktionen ein Kompromiss zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute eingegangen werden und die minimal benötigte Wassermenge darf bei den Reaktionen in DES nicht unterschritten werden.

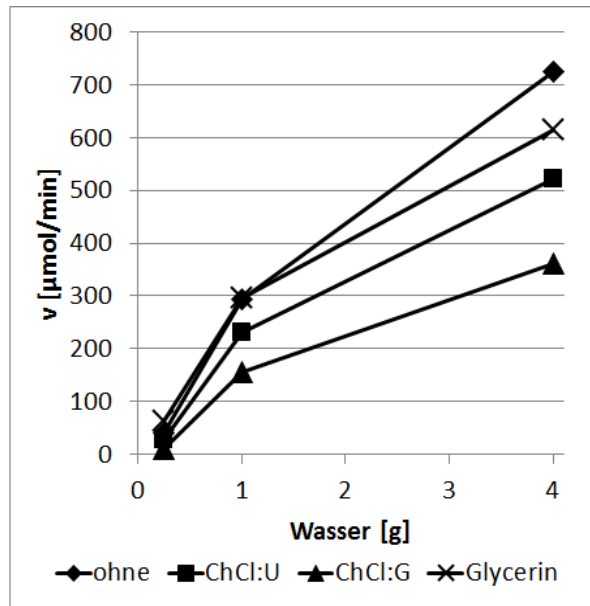


Abbildung 18: Reaktionsgeschwindigkeit in $\mu\text{mol}/\text{min}$ für verschiedene Reaktionen in Abhängigkeit des eingesetzten Lösungsmittels bei Wassergehalten von 0,25, 1 und 4 g Wasser

Einfluss von Temperatur und eingesetzter Enzymmenge

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Geschwindigkeit der Reaktion ist die Einstellung der Temperatur. Eine hohe Viskosität der Lösungsmittel wurde bei Temperaturen kleiner als 30°C gemessen, daher sollte unterhalb dieser Temperatur keine Reaktion durchgeführt werden.

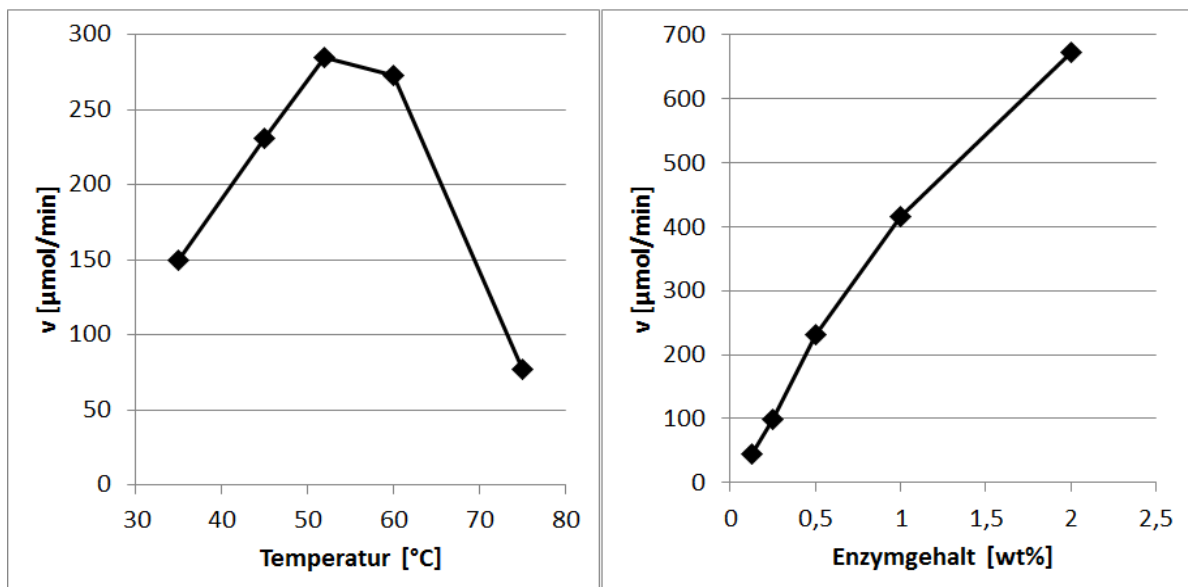


Abbildung 19: Reaktionsgeschwindigkeit der Synthesen zu Decyloleat in Abhängigkeit der Temperatur zwischen 35 und 75°C (links) und des Enzymgehalts zwischen $0,125$ und 2 wt% (rechts)

Abbildung 19 zeigt, dass das Temperaturoptimum für Lipozym CalB zwischen 45 und 60°C liegt und die höchsten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten von größer 230 $\mu\text{mol}/\text{min}$ gemessen wurden. Bei

einer Temperatur von 75°C findet eine sehr langsame Reaktion statt und erreicht nach 48 h eine Ausbeute von circa 10 %, zu Beginn wird ein Großteil des Enzyms deaktiviert.

Aus fünf vergleichenden Reaktionen mit verschiedenen Enzymeinsatzkonzentrationen wurde die optimale Enzymeinsatzmenge, als Funktion der Reaktionsgeschwindigkeit v ermittelt (Abbildung 19, rechts). Ein nahezu linearer Verlauf zeigt, dass der Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit proportional zu der eingesetzten Menge an Enzym ist.

Variation des Verhältnisses von DES zu Lipidphase

Das Optimum der Reaktionsgeschwindigkeit wird bei einem Verhältnis von 1:1 (w/w) DES zu Lipidphase erreicht (Abbildung 20). Hier ist die Reaktionsgeschwindigkeit mit circa 230 bzw. 330 $\mu\text{mol}/\text{min}$ für beide Synthesen sowohl zu Decyloleat als auch zu Decyllaurat am höchsten.

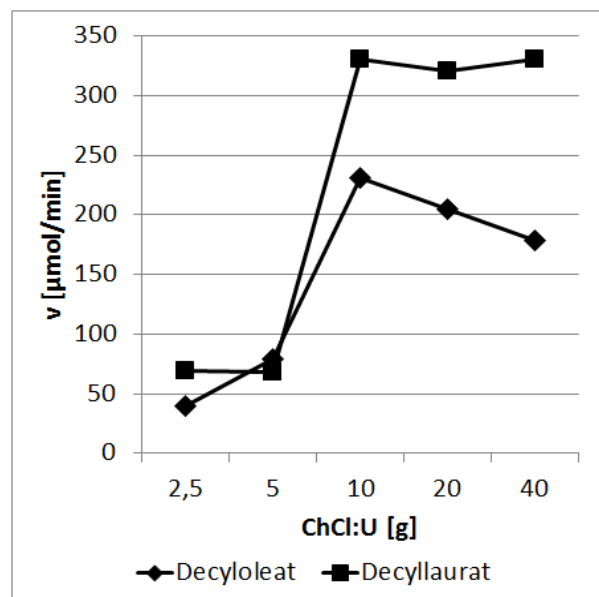


Abbildung 20: Reaktionsgeschwindigkeit für die Synthesen zu Decyloleat und Decyllaurat in Abhängigkeit der eingesetzten ChCl:U Menge (2,5-40 g DES bezogen auf 10 g Lipidphase)

Für die Reaktion zu Decyloleat sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit bei erhöhter Zugabe von ChCl:U leicht, für die Reaktion zu Decyllaurat bleibt diese in etwa derselben Größenordnung. Daher sollte ein Verhältnis von 1:1 (w/w) für die Reaktionen verwendet werden. Wird weniger DES eingesetzt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit mit Werten um 50 $\mu\text{mol}/\text{min}$ sehr gering.

Variation des Eduktverhältnisses

Für die Variation des Eduktverhältnisses wird Decanol im Unterschuss, äquimolar und im Überschuss eingesetzt (Abbildung 21). Es zeigt sich für alle drei Versuchsansätze, dass bei Einsatz von einem Unterschuss an Decanol Ausbeuten an Decylester von 92-95 % erreicht werden. Die Ausbeute

bezieht sich immer auf den Verbrauch der Ölsäure. Aus dem GC Chromatogramm kann jedoch abgelesen werden, dass auch hier ein geringer Anteil Decanol im Reaktionsgemisch verbleibt und trotz eines Überschuss an Ölsäure nicht reagiert. Deutlich bessere Ergebnisse werden durch einen äquimolaren Einsatz erzielt und ein leichter Überschuss an Decanol für die Reaktion zu Decyloleat in ChCl:U weist die höchste Ausbeute von 97,3 % auf. Wird mehr Decanol eingesetzt, sinkt die Ausbeute in ChCl:U leicht, die beiden anderen Reaktionsansätze mit einem Verhältnis von 1:1,5 weisen leicht höhere Ausbeuten an Decyloleat bzw. Decyllaurat auf, unabhängig von dem Lösungsmittel. Die Ausbeute an Decyllaurat liegt hierbei sogar bei 98,5 %. Im Hinblick auf eine technische Umsetzung wurden keine höheren Überschüsse an Decanol eingesetzt, da dieses ansonsten aufwändig abgetrennt werden müsste. Die Ergebnisse zeigen, dass für die Reaktionen ein Überschuss an Decanol von mindestens 1:1,1 verwendet werden sollte.

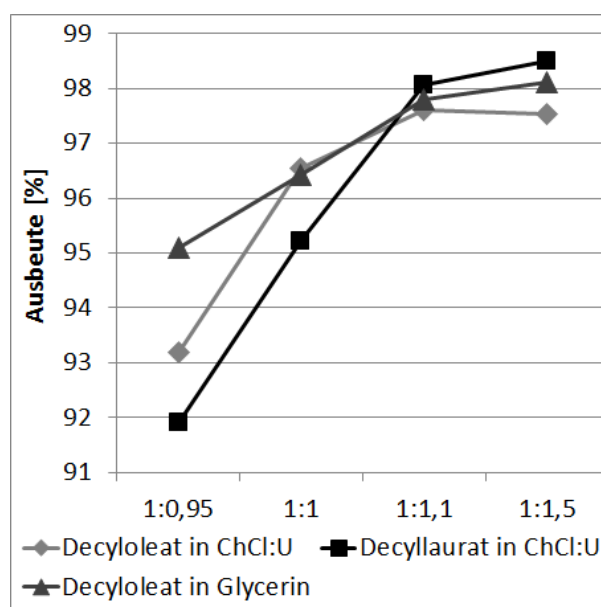


Abbildung 21: Ausbeuten an Estern in Abhängigkeit des Eduktverhältnisses von Ölsäure bzw. Laurinsäure zu Decanol in ChCl:U oder Glycerin

III.2.3 Reaktion zwischen Laurin- bzw. Ölsäure und verschiedenen Alkoholen

Die untersuchten Alkohole besitzen unterschiedliche Kettenlängen von C2 bis C16 und sind linear (Ethanol, Butanol, Decanol, Dodecanol, Hexadecanol) oder verzweigt. Isopropanol ist der einfachste sekundäre Alkohol und 2-Ethylhexanol ist ein primärer, verzweigter Alkohol. Es ist zu erkennen, dass Lipozym CalB in DES unter Verwendung kurzketziger Alkohole (C2-C4) eine schnelle Deaktivierung aufweist und somit die Reaktion zu einem frühen Zeitpunkt stoppt und unabhängig von der eingesetzten Fettsäure ist (Abbildung 22). Durch chargenweise Zugabe von Methanol wird diese Inaktivierung des Enzyms beispielsweise für die Synthese von Biodiesel verhindert [177]. In Glycerin als Lösungsmittel scheint das Enzym stabilisiert zu werden und katalysiert die entsprechende Veresterung mit den kurzketzigen Alkoholen unter Bildung von Monoglyceriden als Nebenprodukte.

Die Reaktion von 2-Ethylhexanol mit den Fettsäuren ist in ChCl:U sehr gering und unter Verwendung von Laurinsäure scheint das Enzym nach kurzer Zeit deaktiviert zu sein, da lediglich 10 % Produkt entsteht. Das Gleichgewicht einer Reaktion in ChCl:G und Glycerin wird nicht erreicht, da hier ebenfalls das Enzym deaktiviert wird und ein großer Anteil der Produkte sind erneut Monoglyceride. Das Gemisch aus 2-Ethylhexanol ist ein Enantiomergemisch, eventuell kann die verwendete Lipase Lipozym CalB nur eines der Enantiomere umsetzen.

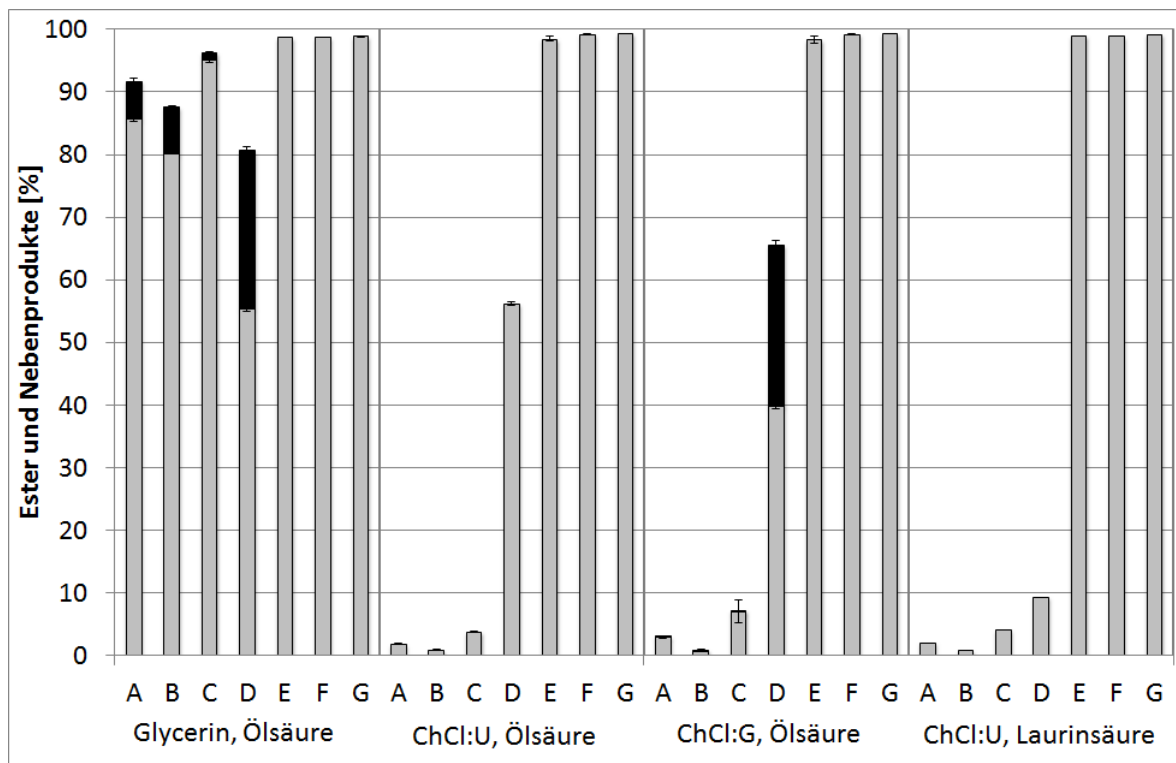


Abbildung 22: Ester und Nebenproduktkonzentration der Veresterung mit Lipozym CalB von Öl- bzw. Laurinsäure mit verschiedenen Alkoholen in Glycerin, ChCl:G und ChCl:U (A=Ethanol; B= Isopropanol; C=Butanol; D=2-Ethylhexanol; E=Decanol; F= Dodecanol; G=Hexadecanol)

Die Reaktion der langkettigen Alkohole in den Lösungsmitteln scheint keine signifikante Deaktivierung des Enzyms nach sich zu ziehen, da Ausbeuten von annähernd 100 % detektiert wurden. Auch die Wahl der Fettsäuren weist keinen signifikanten Unterschied in der Ausbeute auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass Alkohole mit einer Kettenlänge >10 sofort zugegeben werden können, Alkohole kürzerer Kettenlängen jedoch schrittweise, um die Deaktivierung der Lipase zu umgehen.

Stabilitäts- und Recyclingsuntersuchungen

Aus Stabilitätsversuchen zeigt sich, dass die Aktivität in ChCl:G nach 12,5 und 50 Tagen langsam abnimmt, wohingegen das Enzym in Glycerin stabilisiert wird und eine leicht höhere Aktivität nach der untersuchten Zeit aufweist (Tabelle 16). Nach Lagerung in ChCl:U katalysiert das Enzym bereits nach 24 h keine Reaktion zu Decyloleat. Die denaturierende Wirkung von Harnstoff ist bekannt,

daher wurde der Gehalt in dem DES verringert (1:1 und 1:2) [48]. Hierfür musste eine größere Wassermenge eingesetzt werden, um ein flüssiges Gemisch zu erhalten (26,9 bzw. 31,8 %). Bereits durch diese Maßnahme zeigt sich, dass eine Restaktivität des Enzyms in ChCl:U zu messen ist. Die Werte liegen nach 24 h bei 16,9 % bzw. 39,6 %, dies stellt eine deutliche Verbesserung dar.

Tabelle 16: Prozentuale Aktivität von Lipozym CalB in verschiedenen hydrophilen Lösungsmitteln (Prozentuale Anteile berechnen sich aus der Reaktionsgeschwindigkeit zu dem definierten Zeitpunkt dividiert durch die Reaktionsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt t= 0 h (Rate t=0h definiert als 100%))

Lösungsmittel	Wasser [%]	24 h [%]	48 h [%]	120 h [%]	12,5 Tage [%]	50 Tage [%]
ChCl:G	10				89	69,4
ChCl:U (1:2)	10				0	0
Glycerin	10				117,5	114,8
ChCl:U (1:2)	10	0	0	0		
ChCl:U (1:2) + Ölsäure	10	91,9	99	90,4		
ChCl:U (1:1)	26,9	16,9	3	0,7		
ChCl:U (1:1) + Ölsäure	26,9	101,7	100,2	101,7		
ChCl:U (2:1)	31,8	39,6	11,5	0,7		
ChCl:U (2:1) + Ölsäure	31,8	95,4	107	105,6		

Aus Syntheseversuchen war bekannt, dass nach 24 h in dem DES ChCl:U weiterhin eine Reaktion stattfindet, daher wird der Einfluss einer zweiten Phase, wie Ölsäure betrachtet. Wird diese dem Lagergemisch zugegeben, weist das Enzym nach 120 h bei einem molaren Verhältnis von 1:2 immer noch eine Restaktivität von circa 90 % auf. Wird der Anteil an Harnstoff erneut reduziert (1:1 bzw. 2:1), liegt die Restaktivität sogar bei circa 100 %. Dieser Aspekt ist sehr interessant, da die Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* dafür bekannt ist, keine Grenzflächenaktivierung aufzuweisen [7, 41]. Durch das Einbringen der zweiten Phase kann die Aktivität und Stabilität der CalB in DES, speziell in ChCl:U gewährleistet werden.

Wurden dem Lagergemisch Ectoine zugegeben, konnte keine Stabilisierung des Enzyms erreicht werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit wies zum Zeitpunkt t=0 h denselben Wert auf, wie eine Reaktion ohne Zugabe von Ectoinen und bereits nach 24 h konnte keine Reaktion detektiert werden.

Da die Stabilität des Enzyms in Glycerin groß ist (vgl. oben), wurden Recyclingversuche in diesem Lösungsmittel durchgeführt. Bei dem verwendeten Enzym Lipozym CalB handelt es sich um ein nicht immobilisiertes Enzym, daher kann die Wiederverwendung problematisch sein. Abbildung 23 zeigt, dass Glycerin ohne erneute Enzymzugabe wiederholt verwendet werden kann und nach drei Durchläufen die Ausbeute von circa 97 % nur minimal auf 96,4 % abnimmt. Hierfür wurde sowohl das

Glycerin, als auch die Zwischenphase mit frischer Lipidphase versetzt. Die geringere Abnahme der Ausbeute kann durch den steigenden Wassergehalt in dem Lösungsmittel erklärt werden, da Wasser als einziges Nebenprodukt der Veresterung entsteht.

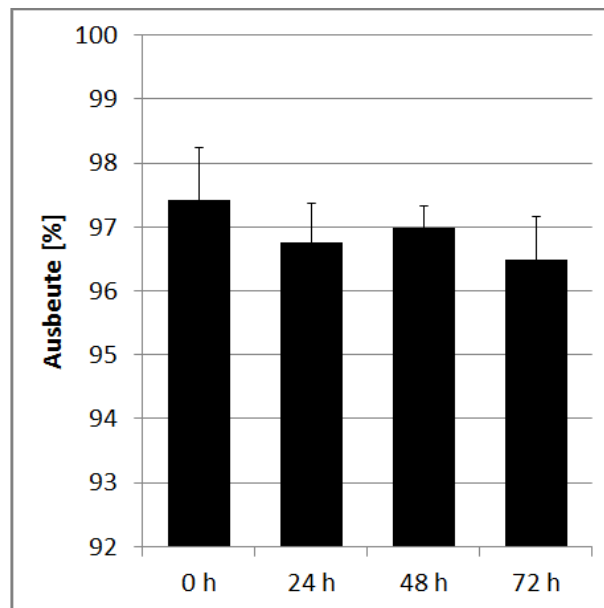


Abbildung 23: Ausbeuten der Recyclingversuche von Glycerin und Lipozym CalB für die Synthese von Decyloleat

Eine auffallend größere Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in jedem Recyclingzyklus kann durch den steigenden Wassergehalt erklärt werden (Tabelle 17). Aus der Variation des Wassergehalts der Reaktion zeigten sich ebenfalls höhere Reaktionsgeschwindigkeiten bei einem höheren Wassergehalt. Wird der Wert aus dem 1. Zyklus mit dem aus dem 4. Zyklus verglichen, zeigt sich eine Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Tabelle 17: Reaktionsrate in $\mu\text{mol}/\text{min}$ des Recyclings von Lipozym CalB in Glycerin

	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus	4. Zyklus
Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	164,0	190,2	294,1	365,6

III.2.4 Scale-Up der Emollient-Synthese und Produktaufbereitung

Eine Reaktion im Batch-Reaktor zeigt, dass die Konzentration an Decyloleat nach 48 h in derselben Größenordnung von circa 94 % eines Schüttelkolbenversuchs liegt und ein Scale-Up der Reaktion somit erfolgreich durchgeführt wurde (Abbildung 24, links). Die Reaktion läuft in dem Batch-Reaktor langsamer ab als in einem Schüttelkolben, da bereits nach 24 h das Gleichgewicht der Reaktion erreicht wurde, in dem Batch-Reaktor erst nach 48 h. Wird die Ausbeute in Abhängigkeit der im Unterschuss vorliegenden Komponente Ölsäure berechnet, liegt diese bei circa 97,6 %. Der Batch-Reaktor wird mit einem sogenannten Coflore-Reaktor verglichen, in dem im kleinen Maßstab

kontinuierlich eine Reaktion durchgeführt wird (Abbildung 24, rechts). Der Coflore- Reaktor ist eine Art Rührkesselkaskade, da hier die Edukte und das Lösungsmittel zusammen mit der Lipase in kleine Reaktionskammern gepumpt werden, welche durch schmale Kanäle miteinander verbunden sind. Durch Einstellen des Volumenstroms kann eine hydrodynamische Verweilzeit erreicht werden. Die hydrodynamische Verweilzeitverteilung des Coflore- Reaktors zeigt, dass nach einer maximal eingestellten Verweilzeit von circa 10 h eine Konzentration von 82 % Decyloleat erreicht wird. Das Gleichgewicht der Reaktion wurde noch nicht erreicht, es müsste eine noch längere Verweilzeit eingestellt werden. Es werden nach einer hydrodynamischen Verweilzeit von 10 h höhere Konzentrationen erreicht, als in dem Batch- Reaktor nach 24 h detektiert wurden. Der kontinuierliche Betrieb des Coflore- Reaktors ermöglicht daher eine höhere Produktion in kürzerer Zeit unabhängig vom produzierten Volumen. Der Scale-Up der Reaktion in einem Batch- Reaktor und dem Coflore- Reaktor ist daher möglich.

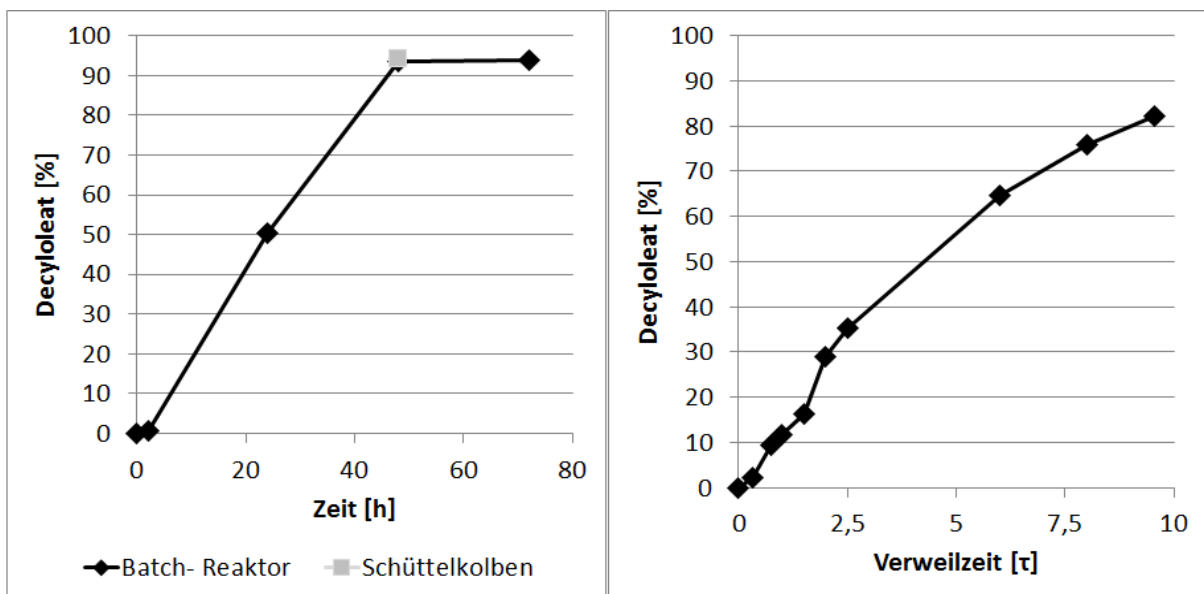


Abbildung 24: Vergleichende Auftragung der Konzentration von Decyloleat für eine Versuch in einem Batch- Reaktor, im Schüttelkolben (links) und in dem Coflore- Reaktor (Rührkesselkaskade) (rechts)

Die Lipidphase, welche mithilfe des Batch- Reaktors hergestellt wurde, wird aufgereinigt und eine Säurezahl von drei gemessen (Tabelle 18). Nach der Raffination wird eine Säurezahl von 0,1 gemessen und ist somit 30-fach geringer, als vor der Aufreinigung.

Eine Kurzwegdestillation bietet die Möglichkeit, beide Edukte aus dem Produktgemisch zu entfernen, da diese geringere Siedepunkte aufweisen, als das Produkt Decyloleat. In Vorversuchen wurde die Destillationstemperatur zwischen 115 und 150°C variiert. In der Schwersiederphase soll das Produkt mit hoher Reinheit gewonnen werden und in die Leichtsiederphase werden die Edukte Ölsäure und Decanol abgetrennt. Je geringer die Temperatur eingestellt wurde, desto höher wurde das Verhältnis

zwischen Edukt und Produkt in der Leichtsiederphase, somit wurde weniger des gewünschten Produkts mit in die Leichtsiederphase gerissen (Tabelle 19).

Tabelle 18: Säurezahl und Verteilung der Edukte und des Produkts vor und nach Aufreinigung durch Raffination bzw. Kurzwegdestillation

	Säurezahl	Decanol [%]	Ölsäure [%]	Decyloleat [%]	Ausbeute [%]
Start	3	5,49	1,27	93,24	97,65
Raffination	0,1	4,90	0,15	94,94	99,88
Destillation	0,4	0,22	0,30	99,48	99,71

Wird eine geringere Temperatur gewählt, verbleiben mehr Edukte in der Schwertsiederphase, sodass die Aufreinigung und somit die Produktqualität schlechter wird. Das beste Verhältnis von 0,26 % wurde hier bei einer Temperatur von 135°C erreicht, der Quotient aus Edukt zu Produkt ist in der Leichtsiederphase sehr gering. Es wurde daher als Kompromiss eine Destillationstemperatur von 120°C gewählt, um ein möglichst reines Produkt und einen geringen Produktverlust zu gewährleisten. Die Destillation wurde bei einem minimalen Druck von $1 \cdot 10^{-3}$ mbar und einer Wischerrotationsgeschwindigkeit von 400 rpm durchgeführt.

Tabelle 19: Edukt/ Produktverhältnis der Schwer- und Leichtsiederphase für Temperaturen zwischen 115 und 150°C

Temperatur [°C]	Edukt/Produkt [%]	
	Leichtsieder	Schwertsieder
150	5,07	0,65
135	8,61	0,26
125	18,53	0,47
120	46,91	0,53
115	69,72	0,64

Die Säurezahl nach der Destillation lag mit 0,4 immer noch deutlich unter dem Startwert von drei, die Abtrennung sowohl von Ölsäure als auch Decanol war in hohem Maß möglich. Aus diesem Grund ist diese Aufreinigungsmethode gegenüber der Raffination, in der nur die Ölsäure abgetrennt wird, zu bevorzugen.

III.3 Herstellung von Biodiesel mittels Enzymkaskade zweier Lipasen

Biodiesel wird heute hauptsächlich chemisch hergestellt und nur in wenigen Fällen enzymatisch, meist unter Verwendung einer immobilisierten Lipase, welche den größten Kostenpunkt der Synthese ausmacht. Daher wird hier ein Prozess durchgeführt, indem ausschließlich nicht immobilisierte Lipasen verwendet werden. Eine schematische Darstellung der Reaktion ist in Abbildung 25 abgebildet.

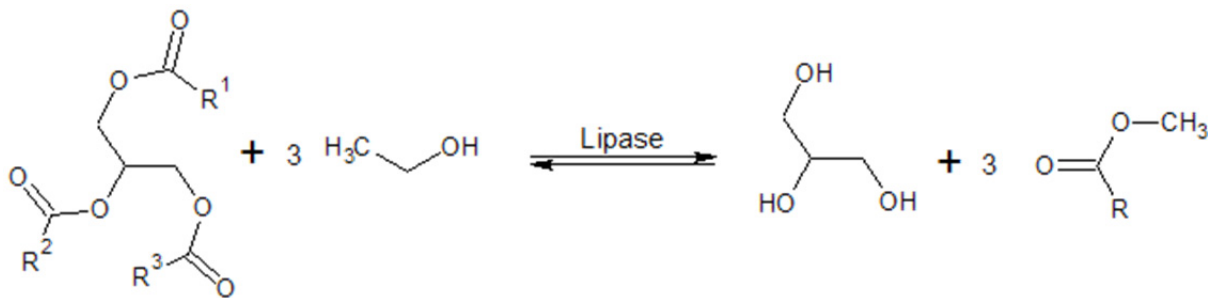


Abbildung 25: Reaktionsgleichung für die Umesterung von Biodiesel ausgehend von Triglycerid (Rapsöl) und Ethanol

Es ist bekannt, dass mithilfe des Enzyms Lipozym TL eine partielle Umesterung von Triglyceriden zum Monoglycerid und Ethylestern unter Zugabe einer Base möglich ist [228]. Immobilisierte Lipase aus *Thermomyces lanuginosa* baut bevorzugt Tri- und Diglyceride ab, besitzt jedoch aufgrund einer schwachen sn1,3-Spezifität nur geringe Aktivität auf sn2-Monoglyceride [32]. *Sinkuniene* und *Adlercreutz* zeigten am Beispiel der Reinsubstanz Triolein und synthetisierten sn2- und sn1-Monoglyceriden, dass immobilisierte Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* eine erhöhte Spezifität für Monoglyceride besitzt [229].

Untersuchungen der Reaktionsgeschwindigkeiten der nativen Enzyme zeigen eine deutliche Spezifität der Lipozym TL für Tri- und Diglyceride im Vergleich zu Monoglyceriden (Abbildung 26). Lipozym CalB weist im Gegensatz dazu eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit für den Abbau von Monoglyceriden auf und nur geringe Raten für Di- und Triglyceride. Es findet eine unspezifische Acylmigration der Fettsäuren auf die sn-1 Position des Glycerins statt, sodass diese von Lipozym TL abgebaut werden können, jedoch liegt die Geschwindigkeit für den Abbau von Monoglyceriden bei einem Wert nahe null. Diese Beobachtungen des Verhaltens der nativen Enzyme korrelieren mit den Ergebnissen mit immobilisierten Lipasen [31]. Aus der eigenen Arbeit zur Synthese von Emollients sind der wasserziehende Effekt der DES und die daraus resultierende Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der gewünschten Produkte bekannt (vgl. Kapitel III.2). Aus vergleichenden Versuchen zeigte sich, dass Lipozym TL keine Aktivität in DES bei den verwendeten geringen Wassergehalten aufweist. Daher wurde ein zweistufiger Prozess entworfen, in dem in der ersten Stufe die Reaktion von

Lipozym TL ohne Lösungsmittel mit Basenzugabe und in der zweiten Stufe die Reaktion von Lipozym CalB in DES katalysiert wird.

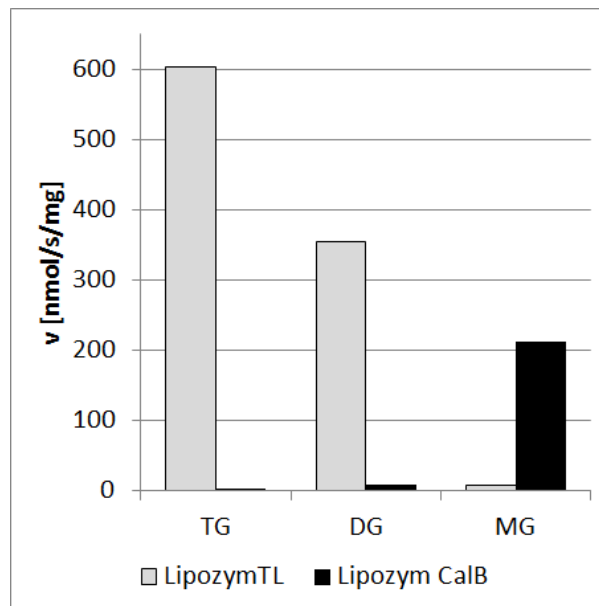


Abbildung 26: Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten des Abbaus von Tri-, Di-, und Monoglyceriden des Rapsöls durch Lipozym CalB und Lipozym TL (Reaktionsraten von Lipozym TL wurden aus Standard Umesterungen ermittelt; Reaktionsraten von Lipozym CalB wurden ausgehend von Rapsöl (TG) und Mischungen (37% Biodiesel, 25% Monoglyceride, 32% Diglyceride) für Diglycerid- Abbauraten und (70% Biodiesel, 20% Monoglyceride, 4% Diglyceride) für Monoglycerid-Abbauraten vermessen; Werte stellen keine Reaktionsraten von Reinsubstanzen dar, jedoch näherungsweise Raten einer Standard Umesterung von Rapsöl)

III.3.1 Optimierung der Reaktionsparameter der 1. Stufe

In diesem Abschnitt werden einige Parameter der 1. Stufe der Synthese von Biodiesel variiert, wie die Einsatzmenge an Base, der Gehalt an Ethanol und Wasser sowie Temperatur und Enzymgehalt und so die optimalen Bedingungen ermittelt.

Variation der Basenzugabe

Ohne Zugabe von Base findet eine sehr langsame Reaktion statt und nach 48 h wird eine Ausbeute an Biodiesel von lediglich 11,2 % erreicht (Tabelle 20). Auch die Reaktionsgeschwindigkeit von 19 nmol/s/mg ist im Vergleich zu den Reaktionen mit Basenzugabe sehr gering. Sobald ein geringer Anteil an Base zugegeben wird, findet eine Reaktion mit deutlich höheren Ausbeuten an Biodiesel statt und bestätigt somit die Aktivierung der Lipozym TL durch Basenzugabe [228]. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit von circa 625 nmol/s/mg liegt bei Zugabe von 0,025-0,05 mmol 1 N KOH vor. Wurden Konzentrationen an 1 N KOH von größer 0,1 mmol eingesetzt, wurde die Lipase TL deaktiviert und konnte die Reaktion nur in sehr geringem Maße bzw. gar nicht katalysieren. Wird Na_2CO_3 eingesetzt, werden ähnlich hohe Ausbeuten von größer als 60 % an Biodiesel erreicht. Die

höchste Reaktionsgeschwindigkeit von 554 nmol/s/mg wird unter Verwendung von 0,25 mmol Na₂CO₃ erreicht. Es liegen keine Triglyceride und lediglich 2,2 % Diglyceride bezogen auf den Gesamtansatz nach 48 h vor. Die Ausbeute an Biodiesel nimmt mit steigender Basenzugabe zu. Auffallend ist, wird mehr Na₂CO₃ verwendet, dass eine geringere Säurezahl nach 48 h detektiert wird. Na₂CO₃ wird als Trocknungsmittel verwendet, daher wird das in dem Reaktionsansatz befindliche Wasser vermutlich gebunden und somit ist die Konzentration der freien Fettsäuren geringer.

Tabelle 20: Variation der Basenkonzentration und die daraus resultierenden Ausbeuten an Biodiesel, die Reaktionsgeschwindigkeit und die Säurezahl nach 48 Stunden

Base	Base [mmol]	Biodiesel [%]	Reaktionsgeschwindigkeit [nmol/s/mg]	Säurezahl
KOH (1N)	0	11,23 ± 0,42	19	2,63 ± 0,07
	0,005	49,52 ± 0,16	297	6,61 ± 0,05
	0,01	66,47 ± 0,42	512	5,60 ± 0,04
	0,025	71,40 ± 0,13	625	5,45 ± 0,19
	0,050	70,20 ± 0,19	627	5,62 ± 0,0
	0,1	67,39 ± 0,33	614	6,31 ± 0,07
Na₂CO₃	0,05	65,52 ± 0,68	129	5,57 ± 0,11
	0,1	64,47 ± 0,40	513	5,43 ± 0,01
	0,25	66,18 ± 0,18	554	5,21 ± 0,06
	0,5	72,24 ± 0,87	500	4,95 ± 0,01
	1	72,08 ± 0,18	386	4,56 ± 0,16
	2	79,18 ± 0,37	301	3,63 ± 0,01
	4	81,65 ± 0,51	171	2,13 ± 0,00
	8	78,61 ± 1,07	122	1,23 ± 0,10

Variation der Temperatur und der eingesetzten Enzymmenge

Es zeigt sich ein deutlicher nahezu linearer Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Enzymmenge bis zu einer Einsatzmenge von 1 % auf einen Wert von 500 nmol/s/mg (Abbildung 27, links). Ab einer Einsatzmenge an Lipozym TL von 2 % nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Erwartungsgemäß sollte die Reaktion durch vermehrten Einsatz an Enzym schneller werden, da eine größere Menge Edukte umgesetzt werden können. Das Enzym liegt in der Wasserphase an der Grenzfläche vor, hier scheint zwischen einer Einsatzkonzentration von 1 und 2 wt% die Sättigung des Enzyms an der Grenzfläche vorzuliegen.

Je geringer die Temperatur gewählt wird, desto schneller läuft die Reaktion ab. Bei 20°C wird eine maximale Reaktionsrate von 633 nmol/s/mg erreicht. Ab einer Temperatur von 30°C nimmt die Reaktionsrate stark ab, daher wurde diese als Standardtemperatur für die weiteren Optimierungen gewählt, um eine hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

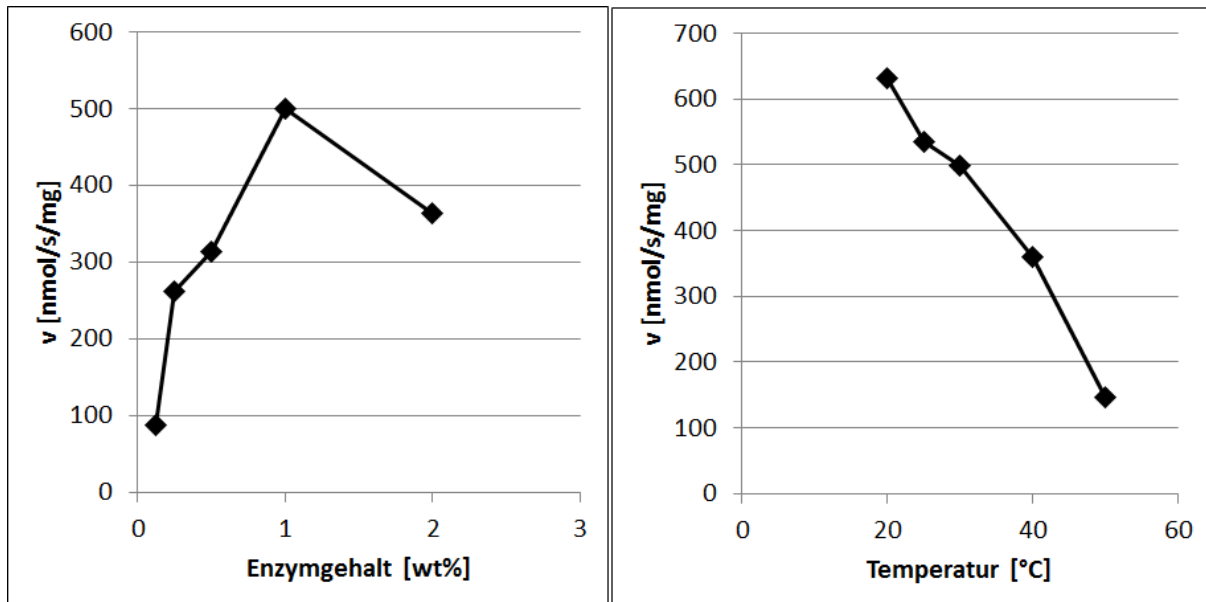


Abbildung 27: Reaktionsgeschwindigkeiten der Variation der Enzymmenge von 0,125-2 wt% (links) bei 30°C und der Temperatur von 20-50°C (rechts) mit einer Enzymmenge von 1wt%

Variation des Ethanol- und Wassergehalts

Aus den Versuchen ohne Zugabe von Ethanol zeigt sich, dass mehr freie Fettsäuren entstehen, wenn ein größerer Wassergehalt eingestellt wird (Abbildung 28). Je mehr Ethanol eingesetzt wird, desto geringer sind die Säurezahlen. Wird mehr Wasser eingesetzt, verändert sich das Gleichgewicht und das Wasser tritt mit Ethanol in Konkurrenz, sodass mehr freie Fettsäuren gebildet werden somit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Komponenten ein. Theoretisch wird ein Verhältnis von 3 mol Ethanol/mol Fettsäure benötigt, um Vollumsatz zu erreichen, da pro Mol Triglycerid 3 Mol Fettsäuren vorliegen. Liegt ein unterstöchiometrisches Verhältnis von 2 mol/mol Fettsäure an Ethanol vor, findet zunächst die Umesterung der an das Triglycerid gebundenen Fettsäuren statt und im Anschluss die Hydrolyse, da das gesamte Ethanol verbraucht ist. Dies zeigt sich durch einen deutlichen Anstieg der Säurezahl mit steigendem Wassergehalt. Bei einem Wassergehalt von 3 mol/mol Fettsäure liegt die Säurezahl bei einem Wert von circa 30. Werden überstöchiometrische Ethanolgehalte eingesetzt, nimmt die Ausbeute an Biodiesel zu, die Werte variieren zwischen 52 und 82 % (Abbildung 29, links) Je mehr Ethanol eingesetzt wird, desto höher ist die Ausbeute. Die Ausbeuten bei verschiedenen Ethanolgehalten durchlaufen alle ein Maximum in Abhängigkeit der Wassermenge. Das Maximum der Ausbeute verschiebt sich durch den Einsatz von mehr Ethanol in

Richtung der höheren Wassergehalte. Vermutlich würde auch die Reaktion mit 14 mol/mol Ethanol und einem höheren Wassergehalt ähnlich hohe Ausbeuten erreichen, wie die Reaktion mit 10 mol/mol Ethanol mit einem Wassergehalt von 2 mol/mol. Die Ausbeute an Biodiesel liegt mit 82,4 % bei einem Wassergehalt von 2 mol/mol am höchsten (Abbildung 29, links).

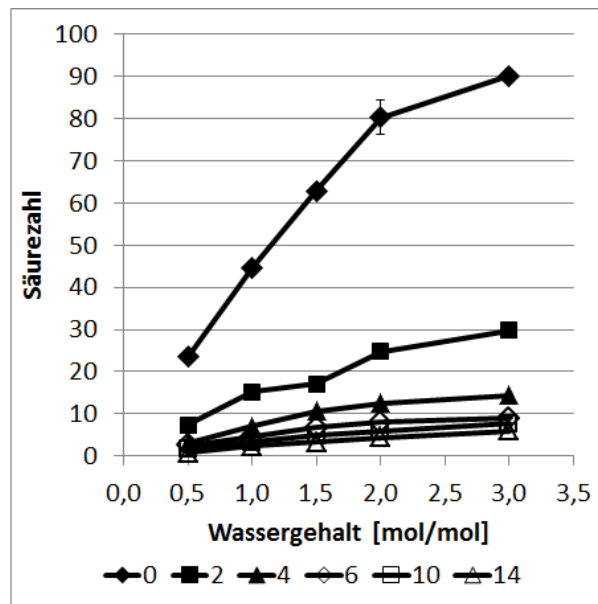


Abbildung 28: Säurezahlen der Versuche mit unterschiedlichen Ethanolgehalten (0 bis 14 mol/mol) als Funktion des Wassergehalts (0,5 bis 3,0 mol/mol)

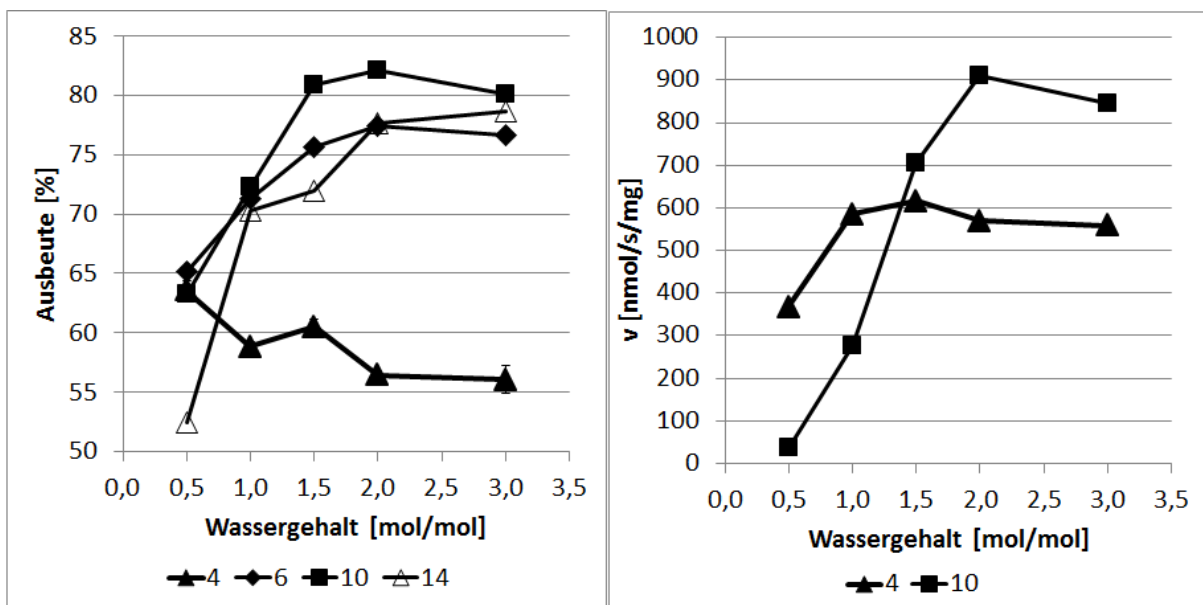


Abbildung 29: Ausbeute an Biodiesel (links) und Reaktionsgeschwindigkeit (rechts) der 1. Stufe mit Lipozym TL mit verschiedenen Ethanolgehalten in Abhängigkeit des Wassergehalts

Die maximale Reaktionsrate von 910 nmol/s/mg wird bei einem Wasseranteil von 2 mol/mol und einem Ethanolgehalt von 10 mol/mol erreicht (Abbildung 29, rechts). Deutliche Steigerungen der

Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Wassergehalt von 10 mol/mol können durch den vermehrten Einsatz von Wasser erreicht werden. Die detaillierten Werte sind im Anhang in Tabelle 37 zu finden. Neben der Bildung von Ethylestern ist der Gehalt an Tri- und Diglyceriden von Bedeutung, da Lipozym CalB lediglich eine geringe Umsetzungsrate für die Spezies besitzt (vgl. Abbildung 26). Für einen Wassergehalt von 1 mol/mol wird in Abbildung 30 exemplarisch die Verteilung der Glyceride für die verschiedenen Ethanolgehalte gezeigt. Bei einer unterstöchiometrischen Menge an Ethanol liegen circa 20 % Triglyceride zum Ende der Reaktion vor. Wird mehr Ethanol eingesetzt, werden keine Triglyceride detektiert und die Menge an Diglyceriden wird ebenfalls geringer.

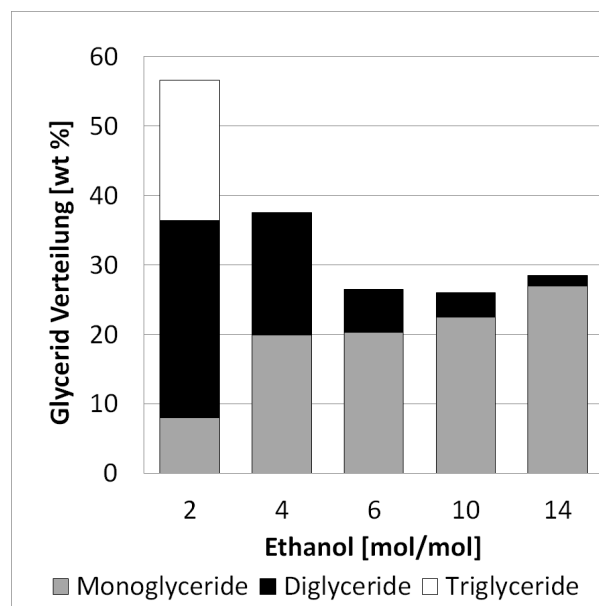


Abbildung 30: Verteilung der Glyceride nach 48 h Reaktion bei einem Wassergehalt von 1 mol/mol bei verschiedenen Ethanolgehalten (Detaillierte Werte der Verteilung der Glyceride nach 48 h Reaktionszeit sind in Tabelle 38 im Anhang aufgeführt)

Für die weitere Reaktion sollte mindestens ein Ethanolgehalt von 6 mol/mol für die erste Stufe eingesetzt werden, da unabhängig vom Wassergehalt keine Triglyceride in der Mischung verbleiben. (Tabelle 38). Bessere Ergebnisse mit geringeren Gehalten an Diglyceriden werden jedoch durch noch höhere Ethanolgehalte erreicht, jedoch wäre hierbei die Aufreinigung aufwändiger.

III.3.2 Optimierung der Reaktionsparameter der 2. Stufe

Für die zweite Stufe werden verschiedene Parameter, wie die Wahl und Menge des Lösungsmittels, der Ethanol- und Wassergehalt sowie die Enzymmenge variiert.

Variation des Lösungsmittels

Eine Reaktion mit Lösungsmittel weist deutlich höhere Ausbeuten und geringere Säurezahlen auf, als eine Reaktion ohne Lösungsmittel (Abbildung 31). Alle Reaktionen mit Lösungsmittel erreichen

Ausbeuten von Biodiesel zwischen 88 und 95 % und die Säurezahlen liegen mit Werten zwischen 1,5-4,3 deutlich unter der Säurezahl des Versuchs ohne Lösungsmittel. Die höchste Ausbeute von 95,2 % wird unter Einsatz von ChCl:G erreicht und die Säurezahl ist mit 1,5 hier am geringsten. Die niedrigste Konzentration an Monoglyceriden wird unter Verwendung von DES mit 1,7-2 wt% nach 48 h erreicht.

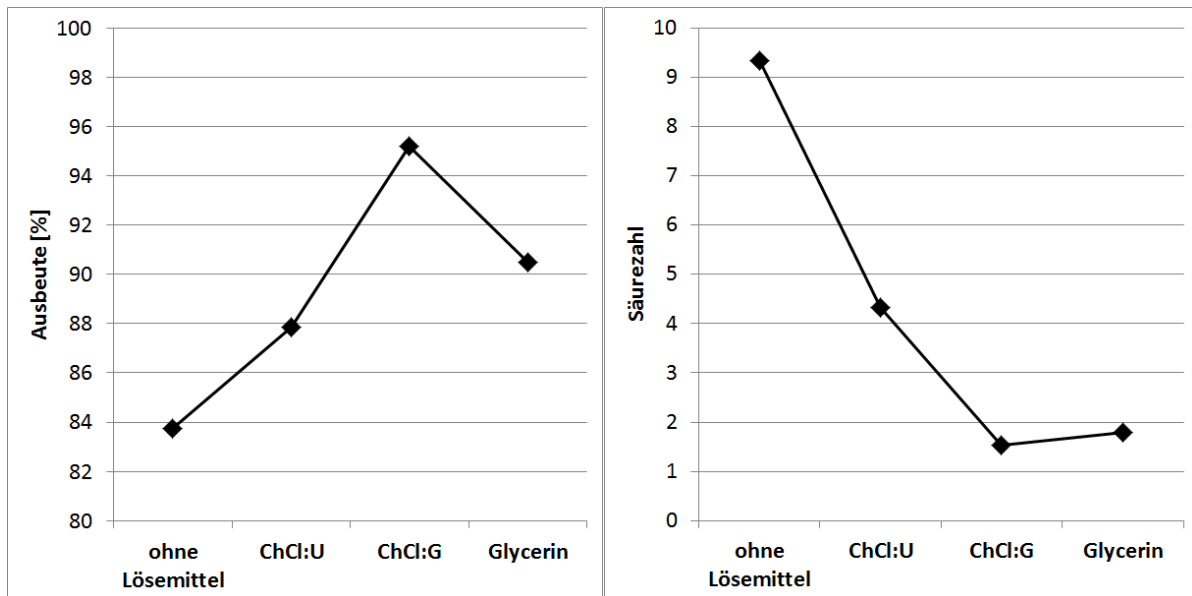


Abbildung 31: Ausbeute an Biodiesel (links) und Säurezahl (rechts) nach 48 h mit Lipozym CalB

Variation von Ethanol- und Wassergehalt

Es wurde Ethanol im Unterschuss als auch im Überschuss zugegeben, unter der Annahme, dass in der Biodieselvorstufe zwei von drei Fettsäuren bereits zu Biodiesel umgesetzt wurden. Ein geringer Anstieg der Biodieselskonzentration wird für den Einsatz von Ethanol im Unterschuss erreicht, jedoch steigt die Säurezahl mit steigendem Wassergehalt deutlich an (Abbildung 32). Ein molares Verhältnis von 1 mol/mol Fettsäure an Ethanol reicht theoretisch um die gesamten Fettsäuren, gebundene als auch freie, zu Biodiesel umzusetzen. Die höchste Ausbeute von 97,6 % wird mit 2 mol/mol Ethanol und einem Wassergehalt von 2 mol/mol erreicht, die dazu gehörende Säurezahl liegt bei 1,78. Wird mehr Ethanol eingesetzt sinkt die Ausbeute an Biodiesel wieder ab, daher sollte eine aufgereinigte Biodieselvorstufe mit maximal 2 mol/mol Ethanol und 2 mol/mol Wasser umgesetzt werden.

Weiterhin fällt auf, dass eine Abhängigkeit der Diglycerid Formation und des Diglycerid Abbaus von der Ethanolkonzentration vorliegt (Abbildung 33). Bei geringen Ethanolgehalten wird vermehrt Diglycerid gebildet. Die geringste Diglycerid Bildung wird bei hohen Ethanolgehalten von 4 mol/mol beobachtet. Abhängig von der Ethanolkonzentration nimmt die Konzentration der Diglyceride nach kurzer Zeit wieder ab.

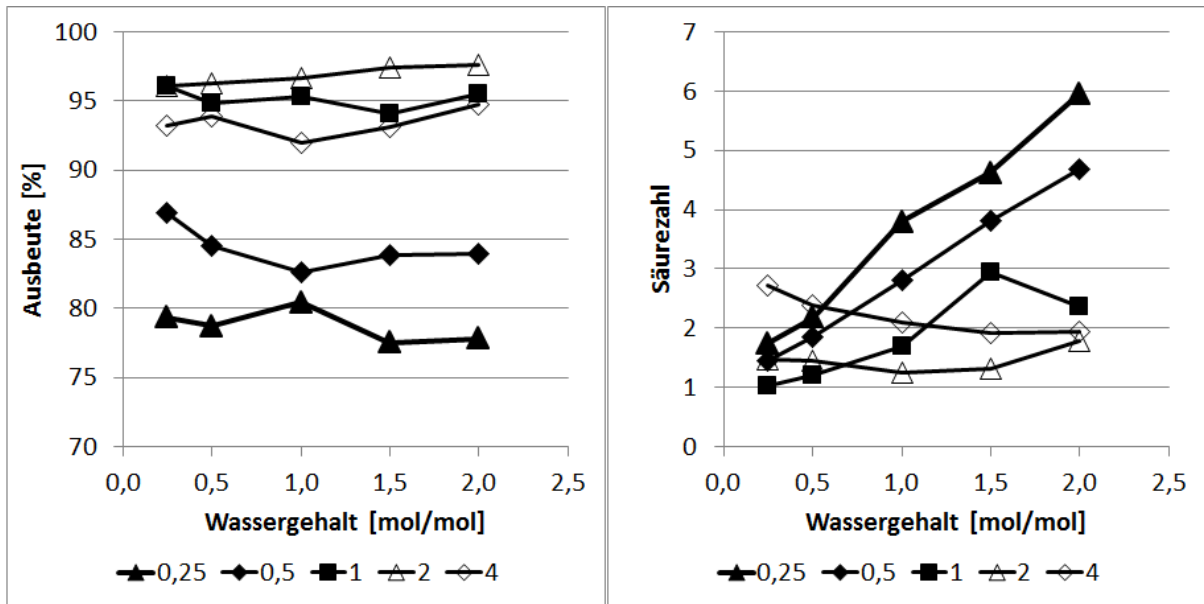


Abbildung 32: Ausbeute an Biodiesel (links) und Säurezahl (rechts) nach 48 Stunden für die Variation des Wasser- und Ethanolgehaltes für die 2. Stufe der Biodieselproduktion mit Lipozym CalB

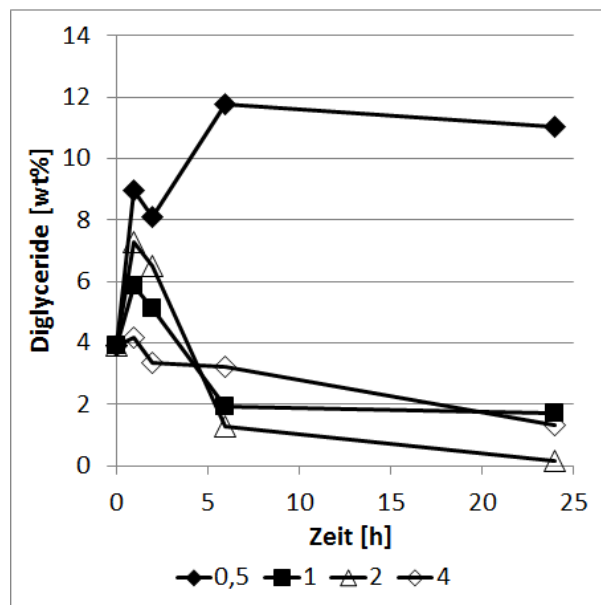


Abbildung 33: Abhängigkeit der Diglyceridkonzentration von der Ethanolkonzentration (0,5-4 mol/mol) für 2 mol/mol Wasser

Variation Enzymkonzentration

Die relative Reaktionsrate, welche nicht auf die Menge an eingesetztem Enzym bezogen wird, nimmt mit steigendem Enzymgehalt zu, es werden mehr Edukte in kürzerer Zeit umgesetzt. Es zeigt sich jedoch, dass die spezifische Reaktionsrate, welche von der Enzymkonzentration abhängig ist, in dem eingesetzten Bereich von 0,125- 2 wt% von 700 auf 200 nmol/s/mg absinkt (Abbildung 34). Daraus geht hervor, dass das einzelne Enzym bei höheren Enzymgehalten weniger Umsetzungen katalysiert.

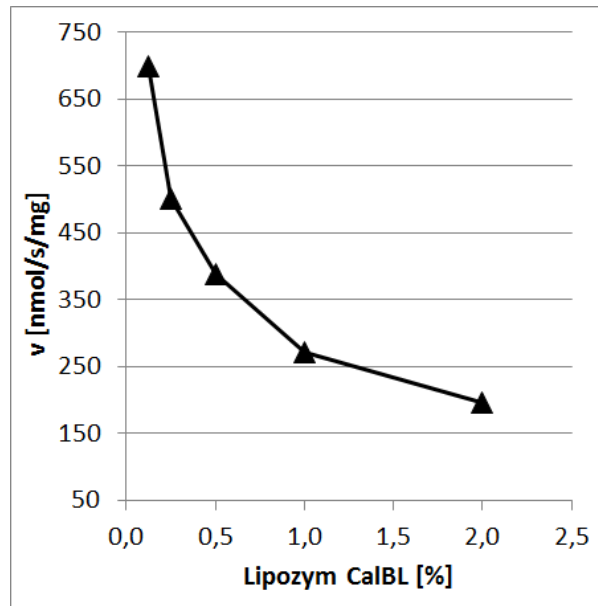


Abbildung 34: Reaktionsgeschwindigkeit in nmol/s/mg in Abhängigkeit der eingesetzten Enzymmenge zwischen 0,125- 2 wt%

Gleichzeitige Variation von DES Menge und Enzymkonzentration

In einem *Design of Experiments* (DoE) wird die Menge an DES mit einem Verhältnis von Biodieselvorstufe zu DES von 1:1, 1:2 und 1:3 (w/w) und die Enzymmenge zwischen 0,5- 2 wt% bezogen auf die Biodieselvorstufe variiert.

Die Fläche in dem 3D-Diagramm (Abbildung 35) zeigt die berechneten Werte der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Enzymmenge, welche aus den neun untersuchten Punkten mittels ANOVA ermittelt wurden. Hierbei sind die Werte nur in dem untersuchten Bereich gültig. Die resultierende Gleichung ist in Formel (12) abzulesen.

Die relative Reaktionsrate steigt, den Erwartungen nach mit steigender Enzymmenge an (Daten nicht gezeigt), jedoch zeigt sich erneut, dass die spezifische Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Enzymmenge abnimmt (Abbildung 35). Auch hier katalysiert das einzelne Enzym, bei höherer Einsatzmenge weniger Umsetzungen. Gegebenenfalls tritt hier eine Diffusionslimitierung der Edukte zum Enzym auf. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt jedoch mit einer höheren DES Einsatzmenge an. Für den geringsten Enzymgehalt von 0,5 wt% und einem Verhältnis an DES von 1:3 liegt die Geschwindigkeit bei 1630 nmol/s/mg, und somit dreimal höher als für ein Verhältnis der DES zu Lipidphase von 1:1. Dieser Effekt ist für hohe Enzymsatzmengen ebenfalls gegeben und die Reaktionsgeschwindigkeit liegt für ein Verhältnis von 1:3 bei 470 nmol/s/mg.

$$\text{Reaktionsgeschwindigkeit} = -94,25 + 48,14 \cdot \text{DES} + 222,00 \cdot \text{Enzym} - 24,64 \cdot \text{DES} \cdot \text{Enzym} \quad (12)$$

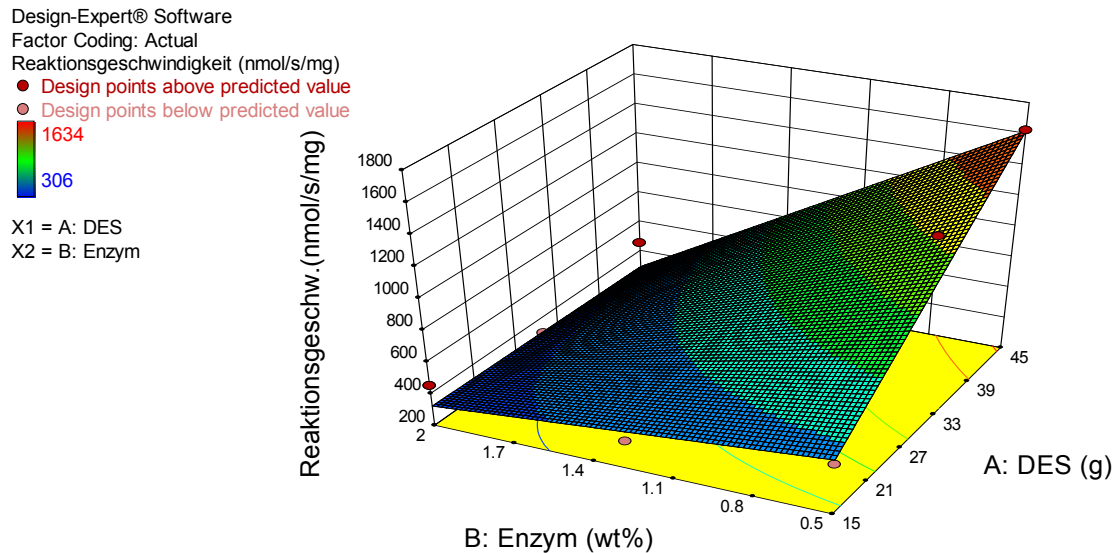


Abbildung 35: Ergebnisse der DoE für die Variation der DES und Enzymmenge der Zielgröße Reaktionsgeschwindigkeit in nmol/s/mg (Rosa Punkte: Gemessener Wert liegt unterhalb der simulierten Fläche; Rote Punkte: Gemessener Wert liegt oberhalb der simulierten Werte)

$$\text{Ausbeute} = 77,02 - 0,014 \cdot \text{DES} + 19,03 \cdot \text{Enzym} - 5,85 \cdot \text{Enzym}^2 \quad (13)$$

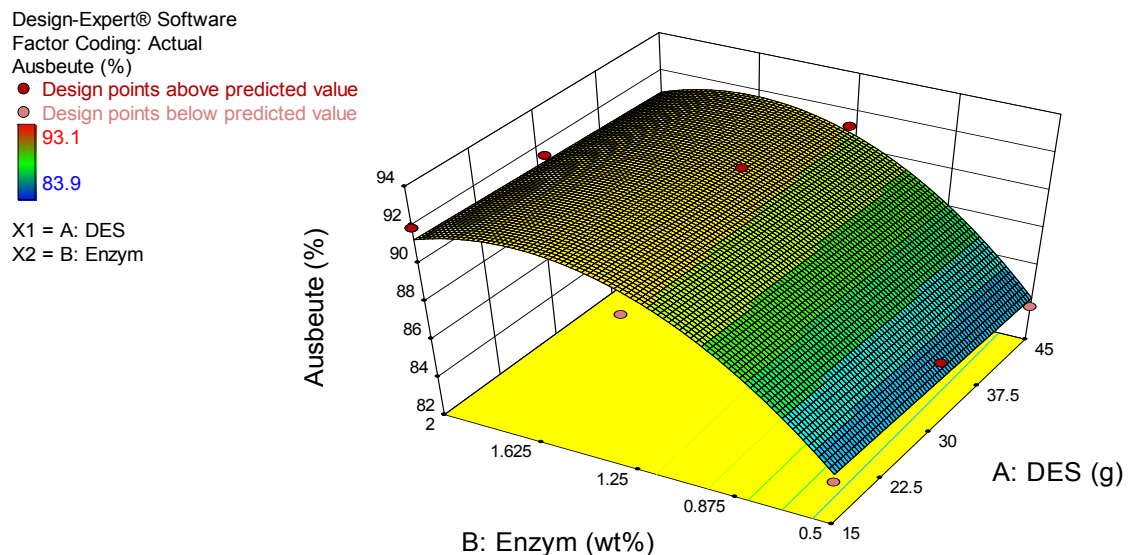


Abbildung 36: Ergebnisse der DoE für die Variation der DES und Enzymmenge der Zielgröße Ausbeute
Für die zweite Zielgröße Ausbeute wurde ebenfalls eine Gleichung ermittelt (Formel (13)). In
Abbildung 36 wird deutlich, dass mit der geringsten Enzymmenge von 0,5 wt% nach 24 h die

geringste Ausbeute an Biodiesel erreicht wurde. Je mehr Enzym eingesetzt wird, desto höher wird die ermittelte Ausbeute, unabhängig von der eingesetzten DES Menge. Dies ist eine Diskrepanz gegenüber der vorher diskutierten Reaktionsgeschwindigkeit, die bei höheren DES Mengen deutlich größer ist. Eventuell wird das Enzym durch eine höhere DES Menge nach kurzer Zeit deaktiviert und steht somit zum Ende der Reaktion nicht mehr zur Verfügung um das Gleichgewicht zu erreichen.

Bei 2 wt% Enzymmenge und einem Verhältnis von Vorstufe zu DES von 1:1 wird das Maximum der Ausbeute mit 91,9 % erreicht. 83,9 % werden erreicht, wenn ein Verhältnis von 1:3 und 0,5 wt% Enzymmenge eingesetzt wird, dieser Wert liegt lediglich 8 % darunter.

III.3.3 Biodiesel Herstellung aus Altfetten

Der Einsatz von Altfetten bietet gegenüber raffinierten Pflanzenölen den Vorteil, nicht in Konkurrenz mit der Nahrungsmittelindustrie für die Produktion von Biodiesel zu treten. Zur Evaluierung des zweistufigen Verfahrens wurden vier Altfette vergleichend eingesetzt. Zur näheren Charakterisierung der vier Altfette und dem Vergleich mit Rapsöl wurden Fettkennzahlen vermessen (Tabelle 21).

Tabelle 21: Kennzahlen der Altfette im Vergleich zu reinem Rapsöl und Säurezahlen des reinen Altfetts sowie der mit Ölsäure angesäuerten Altfette

Altfett	1	2	3	4	Rapsöl
Verseifungszahl	194.7 ± 4.0	198.2 ± 0.5	197.6 ± 0.1	203.9 ± 0.1	192,4 ± 0,1
Iodzahl	95.4 ± 4.5	116.8 ± 3.8	111.9 ± 4.8	73.1 ± 2.3	115,3 ± 0,4
Peroxidzahl	6.8 ± 1.2	28.9 ± 3.7	8.1 ± 1.4	4.7 ± 0.8	1,6 ± 0,1
Anisidinzahl	47.4 ± 2.9	50.4 ± 0.8	73.4 ± 1.9	43.2 ± 1.6	2,8 ± 0,0
Säurezahl t=0 h	1.9 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1	
Säurezahl t=0 h (angesäuert)	16.9 ± 1.2	18.6 ± 0.1	18.1 ± 0.1	18.2 ± 0.6	

Die Fette weisen eine gelbe bis bräunliche Farbe auf und jedes hat den bekannten ranzigen Geruch von altem, gebrauchtem Fett. Es zeigt sich, dass alle Öle hohe Peroxid- und Anisidinzahlen aufweisen, was ein deutliches Zeichen für einen oxidativen Abbau ist. Ein Wert unter 6 für die Peroxidzahl, meistens zwischen 0 und 3, lässt auf ein einwandfrei verwendbares Öl schließen. Liegt die Peroxidzahl über 10, weist dies auf einen oxidativen Abbau hin, sodass das Öl für die Lebensmittelindustrie nicht mehr verwendet werden sollte [215].

Die Säurezahlen der Altfette sind sehr gering, was bedeutet, dass lediglich eine geringe Menge freie Fettsäuren vorliegen. Aus Tabelle 22 wird ersichtlich, dass sowohl die 1. Stufe nach 24 h, als auch die 2. Stufe nach 48 h ähnlich hohe Ausbeuten aufweisen, wie die Synthese mit reinem Rapsöl. Die zweite Stufe wurde ohne zwischenzeitliche Aufreinigung der Biodieselvorstufe durchgeführt. Die polymeren Fraktionen der Altfette wurden bei der GC Analyse nicht betrachtet und nur die sichtbaren Lipid Fraktionen als 100 % gesetzt. Nach der 1. Stufe liegt die Ausbeute der Altfette bei circa 65 %, Altfett 4 weist eine leicht höhere Ausbeute von 68 % auf. Die Ausbeuten nach der 2. Stufe liegen bei circa 83 % und Altfett 4 weist eine Ausbeute von 86 % auf. Die Werte der Ausbeuten nach 48 Stunden sind für die angesäuerten Fette bei circa 87-90 wt% und somit über denen der unbehandelten Fette, da durch Zugabe der Ölsäure mehr freie Fettsäuren verestert werden können.

Tabelle 22: Ausbeuten und Säurezahlen der reinen und angesäuerten Altfette sowie Rapsöl nach 24 und 48 Stunden

Biodiesel Synthese 1	1	2	3	4	Rapsöl
Biodiesel [%], 1.Stufe	64.8 ± 0.2	63.5 ± 0.3	64.2 ± 0.1	68.4 ± 0.4	72,3 ± 0,2
Säurezahl, 1. Stufe	5,6 ± 0.0,03	5,6 ± 0,04	5,5 ± 0.02	6,2 ± 0.03	5,0 ± 0,01
Biodiesel [%], 2.Stufe	80.7 ± 0.3	82.5 ± 0.1	81.5 ± 0.1	87 ± 0.6	94,5 ± 0,1
Säurezahl, 2. Stufe	1,7 ± 0.07	1,6 ± 0.02	1,5 ± 0.03	1,5 ± 0.04	1,02 ± 0,03
Biodiesel Synthese 2 (angesäuerte Fette)	1	2	3	4	
Biodiesel [%], 1.Stufe	66.2 ± 0.1	66.3 ± 1.5	63.4 ± 0.2	71.1 ± 0.2	
Säurezahl, 1. Stufe	7,6 ± 0.03	7,3 ± 0.14	7,4 ± 0.10	7,8 ± 0.08	
Biodiesel [%], 2.Stufe	87.5 ± 0.5	87.8 ± 0.4	86.8 ± 0.7	90.1 ± 0.4	
Säurezahl, 2. Stufe	1,8 ± 0.04	1,7 ± 0.01	1,7 ± 0.06	1,8 ± 0.10	

Die Säurezahlen nach der 1. Stufe der beiden Versuchsansätze mit und ohne zusätzliche Ölsäurezugabe unterschieden sich um einen Wert von zwei. Die Fette mit zusätzlicher Gabe von Ölsäure weisen hier einen höheren Wert von 7-8 auf. Nach der 2. Stufe liegen die Werte der Säurezahlen jedoch in derselben Größenordnung von 1,5-1,8.

III.3.4 Scale-Up und Aufreinigung

Ein Scale-Up eines Schüttelkolbenversuchs in einen 2 L Batch- Reaktor der 1. Stufe zeigt keine signifikanten Unterschiede im Reaktionsverlauf bei der Einstellung verschiedener

Rührergeschwindigkeiten (100 und 400 rpm). Für die Versuche mit 400 rpm wurde eine mittlere Ausbeute von 72,9 % Biodiesel und mit 100 rpm von 72,8 % nach 48 h ermittelt, auch die Reaktionsgeschwindigkeiten sind nahezu gleich und es zeigt sich, dass eine bessere Durchmischung durch eine erhöhte Rührergeschwindigkeit keinen Einfluss auf die Reaktion hat.

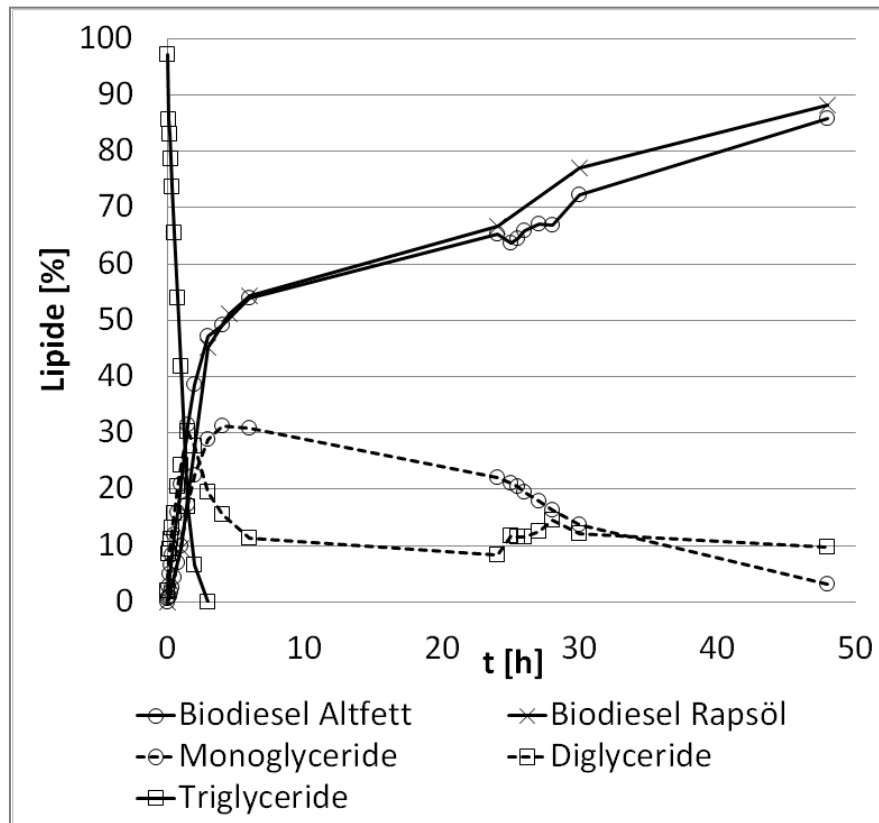


Abbildung 37: Biodieselproduktion in einem zwei Liter Rührkesselreaktor mit einem Altfett als Ausgangsstoff ohne Zwischenreinigung zusätzlich Verlauf der Bildung von Biodiesel eines Reaktorversuchs mit Rapsöl als Ausgangsstoff

Vergleichende Versuche der Umsetzung von Rapsöl oder einem Altfett in einem Batch- Reaktor zeigen kaum Unterschiede in der Synthese der 1. Stufe (Abbildung 37). Nach zwei Stunden sind keine Triglyceride in der Mischung über Gaschromatographie detektierbar und ein deutlicher Anstieg der Konzentration an Di- und Monoglyceride wird sichtbar. Die Konzentration der Diglyceride nimmt ab einem Zeitpunkt von 1 h wieder ab und es werden daraus resultierend vermehrt Monoglyceride gemessen. Die Monoglyceridabnahme läuft in einem Zeitpunkt von 4-24 Stunden langsam ab.

Bei der Zugabe des zweiten Enzyms wurde die Temperatur von 30 auf 45 °C erhöht und das Lösungsmittel ChCl:G hinzugegeben. Es wurde eine deutlich schnellere Bildung von Biodiesel zu diesem Zeitpunkt beobachtet. Die Bildung von Biodiesel mit Rapsöl läuft schneller ab, als mit Altfett. Eventuell beeinflussen die polymeren Anteile des Altfetts das Enzym Lipozym CalB negativ. Die Konzentration der Monoglyceride sinkt schnell ab und der Anteil der Diglyceride steigt an, um im

Anschluss langsam wieder abzunehmen. Nach insgesamt 48 Stunden Reaktionszeit liegt die Ausbeute an Biodiesel aus Altfett bei 85 %, dieser Wert ist vergleichbar mit der Reaktion in einem Schüttelkolben unter Verwendung von Altfett. Für den Versuch mit Rapsöl liegt die Ausbeute nach 48 h leicht darüber bei 88 %. Beide Reaktionen weisen nach insgesamt 48 h Reaktionszeit keinen Gleichgewichtszustand auf und sollten daher über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden.

Bei der Biodieselherstellung wird zu einem Prozentsatz von etwa 10 wt% Glycerin produziert, welches sich in der Lösungsmittelphase des ChCl:G anreichert. Hierdurch wird das Gleichgewicht der Reaktion negativ beeinflusst, daher sollte eine Abtrennung des Glycerins durchgeführt werden. Da DES nicht flüchtig ist, bietet sich eine Abtrennung mithilfe einer Kurzwegdestillation an, somit wird Glycerin als Kopfprodukt mit einer hohen Reinheit gewonnen. Eine Destillationstemperatur von 80°C bei einem Druck von $1 \cdot 10^{-3}$ mbar wurde eingestellt, diese Parameter wurden durch Vorversuche ermittelt (vgl. Kapitel II.7.2). Der Versuch wurde mit der aus dem großen Reaktorversuch mit Altfett gewonnenen DES-Phase durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Zutropfgeschwindigkeiten (40 und 60 Tropfen/min) und die Wischergeschwindigkeit von 300 und 400 rpm variiert (Tabelle 23). Zur Kontrolle des Reinheitsgrades des abdestillierten Glycerins werden Stickstoffmessungen mithilfe eines TOC- Geräts durchgeführt.

Tabelle 23: Parameter der Aufreinigungsversuche sowie die Verteilung der Auswaagen des Kopf- und Sumpfproduktes und die vermessenen Stickstoffgehalte (TN_B)

	Rührer- geschwindigkeit [rpm]	Tropfen/min	Glycerin (Top) [wt%]	Bottom (ChCl:G) [wt%]	TN_B (Top) [mg/L]	TN_B (Bottom) [mg/L]
1	400	60	20,63	79,37	$2,54 \pm 0,15$	50160 ± 889
2	300	60	9,10	90,90	$1,71 \pm 0,49$	47080 ± 336
3	400	40	32,64	67,64	$2,47 \pm 0,61$	57860 ± 1443

Es können bei einem Vollumsatz maximal 10,43 wt% zusätzliches Glycerin in der DES-Phase vorhanden sein. Aus der vierten und fünften Spalte wird die Verteilung des Gehalts in Gewichtsprozent des Glycerins und des DES bezogen auf die Gesamtmenge ersichtlich. Es zeigt sich, dass die zusätzliche Menge an Glycerin in Versuch 2 abgetrennt wurde. Hierbei wurden eine Rührergeschwindigkeit von 300 rpm und eine Zutropfgeschwindigkeit von 60 Tropfen/min eingestellt. Das DES weist weiterhin eine molare Zusammensetzung von circa 1:2 auf und kann als Lösungsmittel für eine weitere Reaktion eingesetzt werden. Das Kopfprodukt ist eine klare, viskose Flüssigkeit, welche ihrem äußeren Erscheinungsbild nach Glycerin ist (Abbildung 38). Es konnten keine Verunreinigungen des Glycerins durch GC- Analyse detektiert werden. Die Messung des

Stickstoffgehalts zeigt, dass mit 1,71 mg/L eine sehr geringe Stickstoffkonzentration vorliegt, welche in etwa mit der reinen Glycerins (1,32 mg/L) zu vergleichen ist. Glycerin kann also mit den in Versuch zwei gewählten Bedingungen gut in reiner Form gewonnen werden. In Versuch eins und drei wird prozentual mehr Glycerin aus dem DES-Gemisch entfernt, als durch die Reaktion zu Biodiesel produziert wird. In Versuch drei sind es insgesamt 30 wt%, somit besitzt das im Sumpf gewonnene ChCl:G nicht mehr eine molare Zusammensetzung von 1:2. Auch kann bei der Destillation beobachtet werden, dass das DES weniger fließfähig ist und kleine Kristalle am Auslass zum Kolben gebildet werden. Das DES ist bei Raumtemperatur zähflüssiger und Cholinchlorid fällt kristallin aus. In Abbildung 38 ist von links der aus Altfett produzierte Biodiesel, das Sumpfprodukt, (ChCl:G) und das Kopfprodukt (Glycerin) abgebildet. Eine deutliche gelbe Färbung der DES-Phase nach 48 h ist zu beobachten. Dies zeigt, dass ein geringer Anteil des Altfettes bzw. des entstandenen Biodiesels in der DES-Phase gebunden vorliegt, jedoch nicht durch die Destillation in das Kopfprodukt übergeht. Biodiesel und Glycerin sind klare Flüssigkeiten, welche keine weitere Aufreinigung bedürfen.

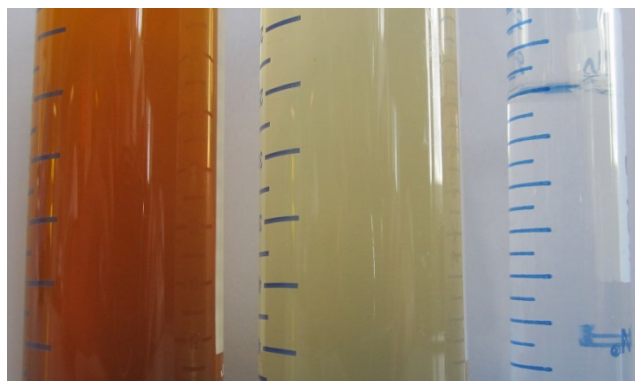


Abbildung 38: Foto des aus Altfett produzierten Biodiesel, des Sumpfproduktes (ChCl:G) und des Kopfprodukts (Glycerin) (von links)

Durch Raffination des Biodiesels kann der Gehalt an freien Fettsäuren verringert werden. Zwei verschiedene Produktgemische mit einer Säurezahl von 1,3 bzw. 1,8 wurden raffiniert. Nach der Raffination wurden Säurezahlen von 0,15 bzw. 0,18 gemessen.

III.3.5 Recycling des Enzyms

Das native Enzym kann in ChCl:G drei bis viermal recycelt werden (Abbildung 39). Durch eine Anreicherung von Glycerin als einziges Nebenprodukt der Biodieselproduktion wird das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte verschoben und somit werden in jedem Recyclingschritt geringere Ausbeuten erreicht. Aus Stabilitätsversuchen ist bekannt, dass Lipozym CalB in Glycerin mindestens 50 Tage stabil ist, durch Zugabe von Ethanol kann das Enzym ebenfalls deaktiviert werden.

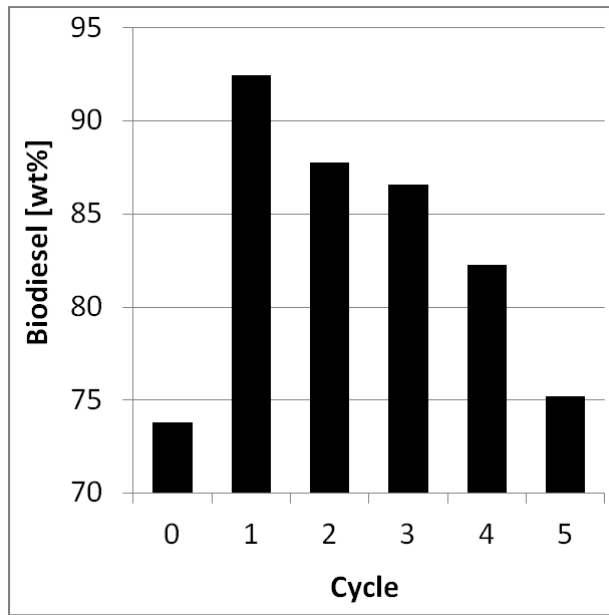


Abbildung 39: Ausbeute an Biodiesel für fünf Recyclingansätze von ChCl:G mit Lipozym CalB

III.4 Weitere technische Synthesen in DES

III.4.1 Synthese von Emulgatoren

Zur Herstellung von Mustersubstanzen wurde die Synthese von Monoglyceriden in 2-Methyl-2-butanol durchgeführt, Monoglyceride werden in der Industrie als Emulgatoren eingesetzt [33]. Es wird ein hydrophiles Edukt, das Glycerin mit einem hydrophoben Edukt, in diesem Fall Olivenöl in 2-Methyl-2-butanol gelöst. Die GC Auswertung zeigte, dass in dem System nahezu das gesamte Olivenöl hydrolysiert wurde und in der Mischung lediglich 1,5 % verblieben (Tabelle 24). Das Verhältnis von Monoglyceriden zu Diglyceriden beträgt 2,5, somit ist ein Großteil der erwünschten Monoglyceride entstanden. Jedoch entfallen 15 % des Gesamtgemischs auf freie Fettsäuren, welche nicht an Glycerin gebunden wurden. Ein zweites System mit zwei Lösungsmitteln, DES (ChCl:U) und 2-Methyl-2-butanol wurde ebenfalls für die Synthese von Monoglyceriden verwendet. Es verbleiben nach 72 h Reaktionszeit 31 % Triglyceride in der Mischung, dies zeigt, dass das Lösungsmittelsystem für die Hydrolyse keinen Vorteil bringt. Das Verhältnis von Monoglyceriden zu Diglyceriden liegt bei 0,25, somit wurden vermehrt Diglyceride gebildet.

Tabelle 24: Ergebnisse der Synthese von Monoglyceriden in 2-Methyl-2-butanol und DES

Lösungsmittel	Triglyceride [%]	Freie Fettsäuren [%]	Monoglyceride / Diglyceride
2M2B	1,5	15	2,5
2M2B + DES	31	11	0,25

Das Fazit dieses Vergleichs ist, dass in dem System mit 2-Methyl-2-butanol und DES bevorzugt Diglyceride und in dem System mit 2-Methyl-2-butanol als Lösungsmittel bevorzugt Monoglyceride gebildet werden. Die Verwendung von DES als zweites Lösungsmittel bietet daher keine Vorteile, wenn die Synthese von Monoglyceriden Ziel des Versuchs ist.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Synthese von Zuckerestern in 2-Methyl-2-butanol durchgeführt werden kann [146]. Die Löslichkeit der Zucker in 2-Methyl-2-butanol ist begrenzt, daher lag immer ungelöster Zucker vor, welcher nach Reaktion des gelösten Zuckers mit Laurinsäure gelöst wurde. In Schüttelkolbenversuchen reduziert sich die Säurezahl von einem Startwert von 100 auf einen Wert von 35 (Tabelle 25). Das Verhältnis von Mono- zu Diester lag für den Versuch mit 4 g Fruktose und 4,2 g Laurinsäure bei 0,51, dies zeigt, dass deutlich mehr Diester gebildet wurden. In dem Versuch mit 1,5 g Fruktose und 3,3 g Laurinsäure ist das Verhältnis 1, es wurden also ebenso viele Diester, wie Monoester gebildet. Dies ist ein interessanter Aspekt, da erwartet wurde, dass bei einem Versuch in dem die Edukte in einem Verhältnis von circa 1:1 (w/w) vorliegen mehr Monoester verbleiben, als in einem Versuch, indem ein Verhältnis der Edukte von 1:2 (w/w) eingesetzt wird.

Tabelle 25: Säurezahlen und Verhältnis von Mono- und Diester für Schüttelkolbenversuche zwischen Fructose und Laurinsäure in 30 g 2-Methyl-2-butanol nach 72 h

Fructose [g]	Laurinsäure [g]	Säurezahl nach 72 h	Monoester / Diester
4	4,2	35	0,51
1,5	3,3	35	1

Für die Synthese von Zuckerestern in einem DES aus Cholinchlorid und Fructose (1:3) konnte keine Reduktion der Säurezahl detektiert werden. Auch für weitere Reaktionsansätze in anderen DES, wie ChCl:U und ChCl:G, indem die Zucker gut löslich waren, wurde keine Reaktion detektiert.

III.4.2 Synthese von Schmierstoffen

Die Umesterung von Palmfett mit 2-Ethylhexanol (2-EH) ohne Lösungsmittel mit der solubilisierten Lipase Lipozym CalA wurde bereits von der Gruppe um Brenneis et al. durchgeführt (Abbildung 40) [127]. Die Ester des Palmfetts werden bevorzugt als Schmierstoffe in der Industrie und als Emollients und Wachse in der Kosmetik verwendet [128, 130, 230]. Die Triglyceride des Palmfetts bestehen aus zwei Hauptfettsäuren, der gesättigten Palmitinsäure (C16:0) und der einfach ungesättigten Ölsäure (C18:1), sodass hauptsächlich 2-Ethylhexylester dieser Fettsäuren entstehen.

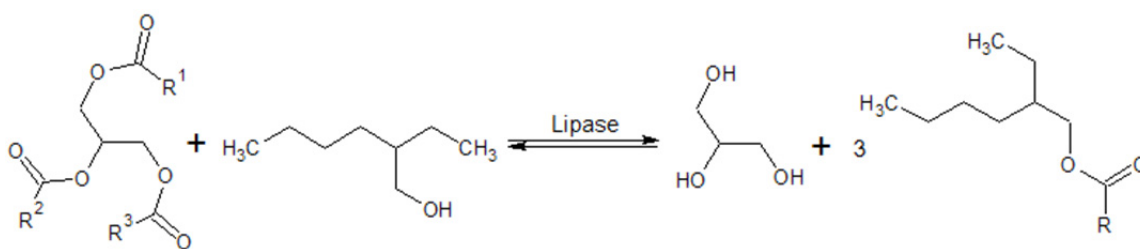


Abbildung 40: Reaktionsgleichung für die Synthese von 2-Ethylhexylestern

Die Reaktion findet bevorzugt bei einem hohen Wassergehalt statt, da so die Hydrolyse der Triglyceride gesteigert wird, hierbei entsteht ein hoher Gehalt an freien Fettsäuren [127]. Wichtig ist hierbei, dass die freien Fettsäuren mit dem 2-Ethylhexanol verestert werden und eine möglichst geringe Konzentration im Reaktionsgemisch verbleiben. Nach Brenneis *et al.* [30] wird in einem System ohne Lösungsmittel zuerst die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure von den Triglyceriden abgespalten und dann die ungesättigte Ölsäure unter Verwendung der Lipase Lipozym CalA. Hohe Umsätze des Palmfetts wurden für einen Versuch ohne Lösungsmittel und für einen Versuch mit ChCl:U als Lösungsmittel erreicht. Die Säurezahl war für den Versuch mit ChCl:G als Lösungsmittel mit einem Wert von vier um die Hälfte geringer, da hier der wasserziehende Effekt des DES das Gleichgewicht der Reaktion verschoben hat und somit weniger freie Fettsäuren gebildet wurden. Der Wassergehalt der Lipidphase wurde mittels Karl-Fischer- Titration ermittelt und es zeigte sich,

vergleichbar mit der Emollient Synthese, ein geringerer Wassergehalt für die Reaktion in DES von 1,1 mg/mL im Vergleich zu 2,9 mg/mL.

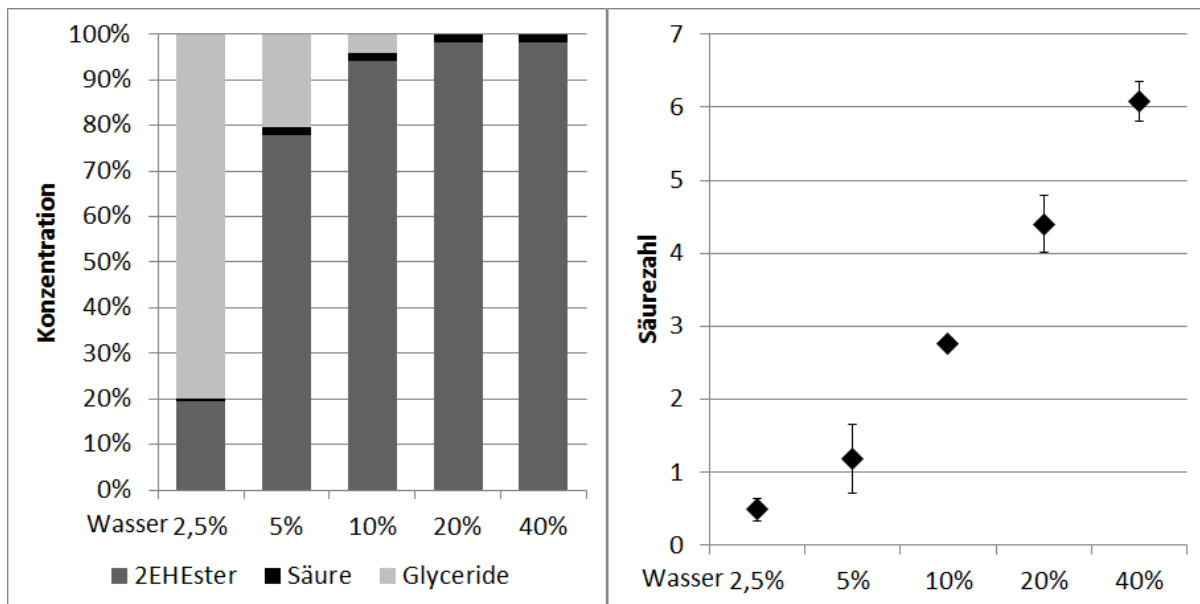


Abbildung 41: Konzentration der Reaktionspartner der 2EH Ester Synthese nach 48 Stunden für verschiedene Wassergehalte und die dazugehörige Säurezahl

Wird der Wassergehalt variiert, zeigt sich, dass die Reaktionen mit 2,5 und 5 % Wasser nach 48 h nicht in das Gleichgewicht gelaufen sind und noch Glyceride in der Mischung zu finden sind (Abbildung 41). Ab einem Wassergehalt von 20 % liegen keine Glyceride vor und es wird eine geringe Säurezahl von circa 4,5 gemessen. Die Säurezahl nimmt mit steigendem Wassergehalt zu und liegt bei 2,5 % Wasserzugabe bei einem Wert 0,5 und für eine Wasserzugabe von 40 % ungefähr bei 6.

III.4.3 Entsäuerung von Biodiesel und Kokosöl

Kokosöl wird für die Herstellung von Fettalkoholen und Tensiden verwendet und besitzt auf natürliche Weise einen hohen Gehalt an freien Fettsäuren. Eine alkalische Umesterung kann nicht durchgeführt werden, da der Katalysator die freien Fettsäuren verseifen würde. Besitzt Biodiesel als fertiges Produkt einen zu hohen Gehalt an freien Fettsäuren, so entspricht er nicht den Spezifikationen der EN14214 [151] und darf nicht eingesetzt werden, somit muss eine aufwändige Raffination mit hohem Produktverlust durchgeführt werden. Daher bietet eine einfache Methode der Entsäuerung viele Vorteile.

In einem ersten Versuch zeigte sich, dass die Entsäuerung von Biodiesel bzw. Kokosöl mittels Veresterung der freien Fettsäuren mit Ethanol in CH_2Cl_2 möglich ist und Vorteile gegenüber einer Reaktion ohne Lösungsmittel aufweist (Abbildung 42). Es zeigt sich eine deutliche Abnahme unter Verwendung von DES von einer Startsäurezahl von elf auf eine Säurezahl von vier für die Entsäuerung

von Biodiesel und von eins für Kokosöl. Ebenso deutlich kann eine Zunahme der Säurezahl der Reaktion ohne DES beobachtet werden.

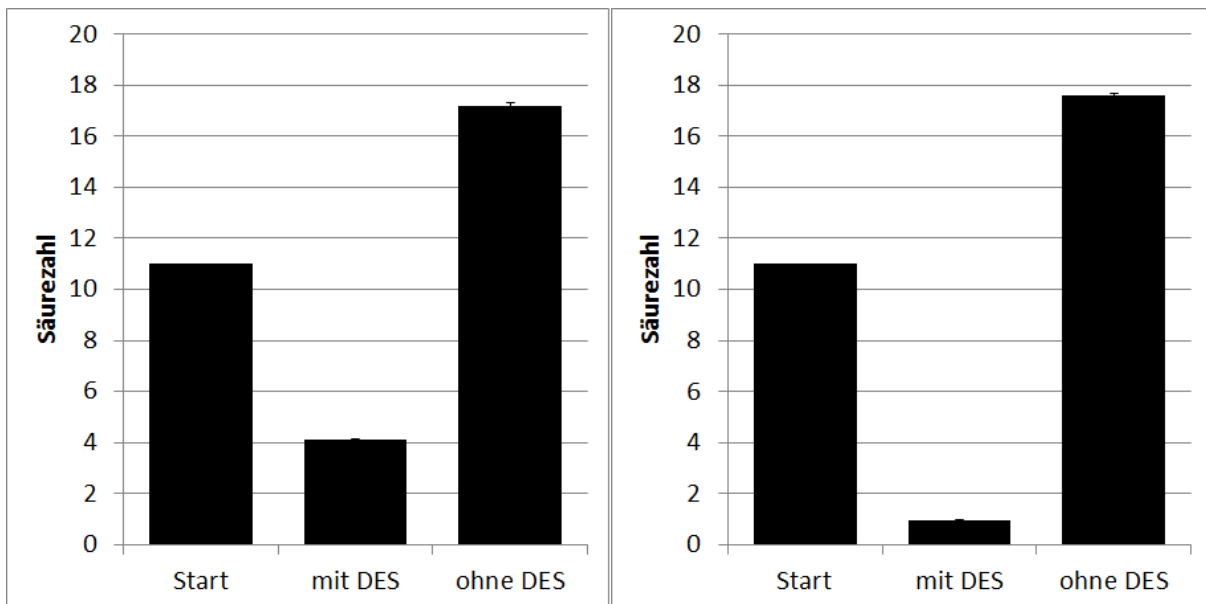


Abbildung 42: Säurezahl der Biodiesel (links) und Kokosöl (rechts) Entsäuerung mit und ohne DES

Diese Versuche zeigen, dass der Einsatz von ChCl:U eine Entsäuerung des Biodiesels und des Kokosöls ermöglicht. Daher werden in den nächsten Kapiteln einige Parameter, wie Enzymgehalt, Wassergehalt und eingesetzte Ethanolmenge variiert.

Variation der eingesetzten Enzymmenge

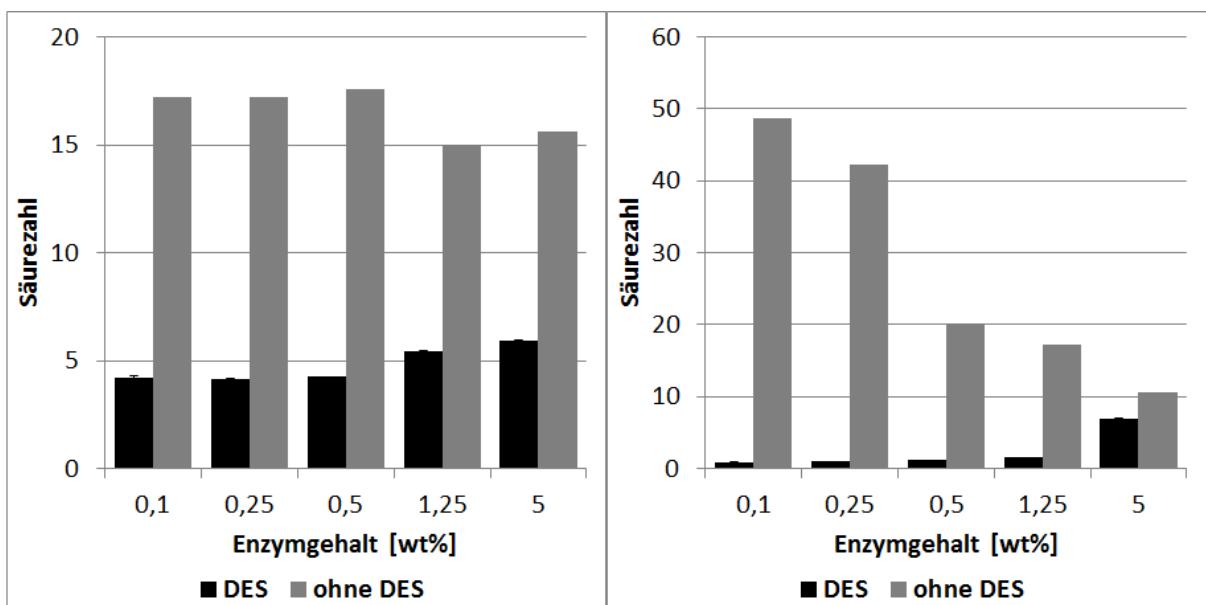


Abbildung 43: Variation des Enzymgehalts für die Entsäuerung von Biodiesel (links) und Kokosöl (rechts) mit und ohne ChCl:U

In Abbildung 43 ist links eine deutliche Abnahme der Säurezahl bei verschiedenen Enzymgehalten von 0,1-5 wt% unter Verwendung von ChCl:U der Entsäuerung von Biodiesel zu erkennen. Die Säurezahl wird mindestens um die Hälfte von der Startsäurezahl 11 auf Werte zwischen 4,2 und 5,9 reduziert. Wird kein DES verwendet, steigt die Säurezahl auf Werte zwischen 14,5 und 17,5.

Für die Entsäuerung von Kokosöl zeigt sich ebenfalls eine Abnahme der Säurezahl unter Einsatz von ChCl:U. Wird kein ChCl:U verwendet ist auch hier ein deutlicher Anstieg der Säurezahl nach 120 h zu beobachten. Dieser Anstieg ist größer je weniger Enzym eingesetzt wird. Bei einer Enzymeinsatzkonzentration von 5,0 wt% liegt der Wert der Säurezahl nach 120 h bei circa 11. Es zeigt sich eine geringe Abhängigkeit für die Entsäuerung von Biodiesel, jedoch eine hohe Abhängigkeit für die Entsäuerung von Kokosöl für die Reaktionen ohne Lösungsmittel. Dieser Zusammenhang ist interessant, da ein vergleichbarer Anstieg für beide Entsäuerungen angenommen wurde.

Variation von Wasser- und Ethanolmenge

Es zeigt sich für die Entsäuerung von Kokosöl, dass der Wassergehalt eine untergeordnete Rolle spielt, da die Säurezahl konstant bei einem Wert von circa eins liegt (Abbildung 44).

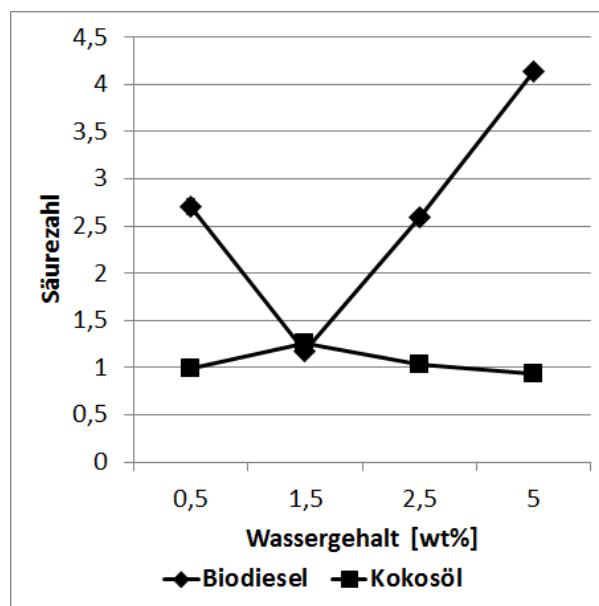


Abbildung 44: Säurezahlen der Entsäuerung von Biodiesel und Kokosöl für verschiedene Wassergehalte von 0,5-5 wt% bei einer Enzymmenge von 0,25 wt% für einen EtOH- Gehalt von 5 wt%

Für die Entsäuerung von Biodiesel weist ein Wassergehalt von 1,5 wt% die geringste Säurezahl von circa eins auf. Wird der Wassergehalt verändert liegt die Säurezahl höher. Über den Reaktionsverlauf zeigt sich eine langsamere Reaktion mit wenig Wasser (0,5 wt%), als die Reaktionen mit 2,5 bzw. 5,0 wt% Wasser, welche nach 72 h ins Gleichgewicht laufen. Daher sollte für die Entsäuerung von Biodiesel mindestens 1,5 wt% Wasser eingesetzt werden.

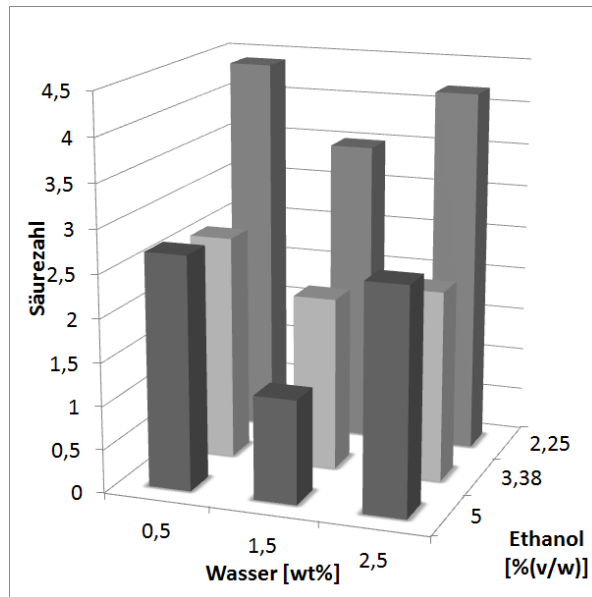


Abbildung 45: Säurezahlen der Variation von Ethanol und Wasser für die Entsäuerung von Biodiesel

Wird der Ethanol- und der Wassergehalt gleichzeitig variiert, werden höhere Säurezahlen mit einer geringen Ethanolmenge (2,25 % (v/w)) detektiert, als mit 3,38 bzw. 5 % (Abbildung 45). Theoretisch besteht bereits bei der kleinsten eingesetzten Ethanolkonzentration die Möglichkeit den gesamten Anteil an Fettsäuren zu verestern, da hier ein molarer Überschuss von 4,4 gegenüber den freien Fettsäuren vorliegt. Mit der mittleren Wasserkonzentration von 1,5 wt% wird für jede Ethanolkonzentration die geringste Säurezahl erreicht. Werden 5 % (v/w) Ethanol eingesetzt, liegt die Säurezahl nach 120 h bei 1,2. Der Gehalt an freien Fettsäuren konnte also unter diesen Bedingungen auf circa 10 % der Anfangsmenge reduziert werden.

Einfluss des DES-Gehalts

Die Säurezahl für die Entsäuerung von Biodiesel ist mit 2,7 niedriger, wenn ein Verhältnis der DES zu Lipidphase von 1:2 eingesetzt wird, als für ein Verhältnis von 1:1 (4,1) (Tabelle 26). Wird Kokosöl eingesetzt liegt die Säurezahl unabhängig von der DES Menge bei circa 1, sodass hier kein Effekt zu beobachten ist.

Tabelle 26: Säurezahlen der Entsäuerung von Biodiesel und Kokosöl unter Variation der eingesetzten DES Menge (0,25 wt% Enzym und 5 % (v/w) Ethanol)

	ÖI/DES 1:1	ÖI/DES 1:2
Biodiesel	4,1 ± 0,03	2,7 ± 0,13
Kokosöl	0,9 ± 0,01	1,1 ± 0,03

III.5 Enzymscreening in DES

In den vorherigen Kapiteln wurde gezeigt, dass kommerziell verfügbare Lipasen verschiedene Synthesen technischer Ester in DES durchführen können (Emollientester, Biodiesel, Schmierstoffe). Diese Lipasen sind in einem großen Umfang kommerziell erhältlich und besitzen eine hohe Stabilität. Um für verschiedene Reaktionen weitere geeignete Lipasen zu finden, wurde ein Screening von insgesamt 93 kommerziellen und aufgereinigten Lipasen sowie von Zellextrakten aus Metagenomdatenbanken durchgeführt. Diese Zellextrakte wurden von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.

III.5.1 Screening mit Nitrophenol-Assay

Die Aktivität der im Screening eingesetzten 93 Lipasen wurde in einem Mikrotiterplatten Assay über die Hydrolyse von *p*-Nitrophenoldodecanoat ermittelt (Tabelle 27 und Tabelle 28).

Tabelle 27: Aktivitäten in Tris-HCl Puffer (pH=8) in U/mL bzw. U/mg sowie nach der Methode von Biuret ermittelte Proteinkonzentrationen in mg/mL der untersuchten Lipasen

Nr.	Bezeichnung	U/mL	Proteinkonzentration	
			[mg/mL]	U/mg
1	<i>P. antarctica</i> Lipase A	14910	46,3	321,87 ± 0,00
2	<i>P. antarctica</i> Lipase B	707	24,0	29,52 ± 0,00
3	<i>C. rugosa</i> Lipase	1126	10,5	107,55 ± 0,01
4	<i>T. lanuginosa</i> Lipase	1341	31,1	43,13 ± 0,00
5	<i>R. miehei</i> Lipase	1616	19,1	84,84 ± 0,01
6	<i>P. expansum</i> Lipase	4,56	16,2	0,28 ± 0,01
7	<i>P. camembertii</i> Lipase	0,45	7,3	0,06 ± 0,00
8	<i>P. roqueforti</i> Lipase	0,75	6,3	0,12 ± 0,00
9	<i>A. niger</i> Lipase	1,54	17,5	0,09 ± 0,00
10	<i>B. cepacia</i> Lipase	3306	6,2	530,59 ± 0,01
11	<i>P. fluorescens</i> Lipase	2385	37,7	63,19 ± 0,01
12	<i>R. niveus</i> Lipase	9,3	23,5	0,40 ± 0,01
13	<i>R. oryzae</i> Lipase	54,1	6,5	8,28 ± 0,02
14	<i>M. javanicus</i> Lipase	26,9	22,8	1,18 ± 0,01
15	<i>Alcaligenes spec</i> Lipase	1280	42,5	30,14 ± 0,01
16	<i>P. pancreas</i> Lipase	8,01	10,5	0,77 ± 0,00
17	<i>P. stutzeri</i> Lipase	10340	30,2	342,57 ± 0,00
18	<i>P. pancreas</i> Phospholipase	0		0

19	<i>T.l.</i> Phospholipase A1	1320	28,7	45,99 ± 0,00
20	<i>P. aeruginosa</i> Lipase (PlbF)	3057	8,3	367,31 ± 0,02
21	<i>P. aeruginosa</i> Lipase (LipA)	275	1,5	183,6 ± 0,03

Tabelle 28: Aktivität der Zellextrakte in U/mL (U: Kulturüberstand; UP: Lagerpuffer mit Zellbruchstücken)

Nr.	Aktivität [U/mL]	44	0	70	9,43 ± 0,00
22	0	45	1713 ± 0,00	71	0
23	279,55 ± 0,01	46	0	72	0
24	2621,5 ± 0,00	47	8,44 ± 0,03	73	0
24U	0	48	23,06 ± 0,09	74	7,31 ± 0,00
25	0	49	873,17 ± 0,01	75	0,95 ± 0,00
26	326,87 ± 0,01	50	84,52 ± 0,01	76	4,32 ± 0,00
27	3,91 ± 0,00	51	352,67 ± 0,00	77	2,73 ± 0,00
28	246,13 ± 0,01	52	2,01 ± 0,00	78	41,63 ± 0,00
28U	0	53	0,45 ± 0,00	79	0
29	31,19 ± 0,02	54	0	80	0
30	0	55	0	81	3,16 ± 0,00
31	0	56	2,39 ± 0,00	82	0,96 ± 0,00
32	9,06 ± 0,01	57	0,40 ± 0,00	83	0
32UP	69,77 ± 0,01	58	0	84	2,75 ± 0,00
33	0	59	0	85	29,4 ± 0,00
34	0	60	13,24 ± 0,00	86	5,11 ± 0,00
35	0	61	0	87	4,58 ± 0,00
36	0	62	8,82 ± 0,00	88	19,17 ± 0,00
37	9,45 ± 0,01	63	0	89	3,34 ± 0,00
38	0,96 ± 0,00	64	0	90	0,47 ± 0,00
39	0	65	93,4 ± 0,00	91	10,07 ± 0,00
40	3,08 ± 0,01	66	0	92	0,39 ± 0,00
41	0,37 ± 0,00	67	25,93 ± 0,00	93	0
42	0,30 ± 0,00	68	0,72 ± 0,00		
43	55,52 ± 0,01	69	8,22 ± 0,00		

Die Proteinkonzentration der kommerziellen und aufgereinigten Lipasen wurde mit der Methode von Biuret bestimmt und die Aktivität in U/mg berechnet. Eine Proteinbestimmung mit der Methode

nach Bradford zeigte zu geringe Konzentrationen. *Nicolas* et al. betrachteten ebenfalls den Zusammenhang, dass mit der Methode nach Bradford eine zu geringe Proteinkonzentration der Lipozym CalB gemessen wurde [231]. Die Reinheit der kommerziellen und aufgereinigten Lipasen ist mithilfe einer SDS-Page überprüft worden (Abbildung 54). Es zeigt sich jeweils die Bande der Lipase, wobei einige mehrere Isoenzyme aufweisen, wie beispielsweise *Candida rugosa*. Die Aktivität der Zellextrakte ist in U/mL angegeben, da eine Bestimmung der Enzymkonzentration nicht möglich war.

Einige sehr aktive Lipasen mit einer Aktivität in Puffer von > 100 U/mg konnten ermittelt werden (*P. antarctica* Lipase A (1), *C. rugosa* (3), *B. cepacia* (10), *P. stutzeri* (17), *P. aeruginosa* Lipase (PlbF (20), LipA (21))), somit wurde eine hohe Hydrolyseaktivität zugunsten des Nitrophenolesters aufgezeigt. Einige Lipasen weisen jedoch auch sehr geringe Aktivität mit Werten zwischen 0,06- 0,40 U/mg auf, wie beispielsweise die Lipase aus *P. camembertii* (7), *P. roqueforti* (8), *A. niger* (9) und *R. niveus* (12).

Etwa die Hälfte der Zellextrakte weist hydrolytische Aktivität gegenüber dem Nitrophenolester auf, für Zellextrakt 24 wurde sogar ein sehr hoher Wert von 2621 U/mL detektiert. Es ist bekannt, dass die Klone 24 und 28 Lipasen sekretieren können, daher wurde der Kulturüberstand mit LB-Medium ebenfalls auf hydrolytische Aktivität getestet (24U und 28U). Offensichtlich wurde die Lipase nicht sekretiert, da keine Aktivität in dem Zellüberstand gemessen wurde. Die abzentrifugierten Zelltrümmer (22-37) wurden in Puffer resuspendiert und auf Aktivität getestet und es zeigte sich, dass für Klon 32 Aktivität gemessen werden konnte (32UP). Eventuell handelt es sich um eine an die Zellwände gebundene Lipase. Dieser Zellwandüberstand wurde für die weiteren Untersuchungen nicht näher betrachtet, da keine einheitliche Menge der Zelltrümmer pipettiert werden konnte. Für die weiteren Aktivitätsmessungen wurden nur die Enzyme bzw. Zellextrakte verwendet, welche eine Aktivität in Puffer aufwiesen.

III.5.2 Aktivität und Stabilität in Lösungsmitteln

Es wird die Aktivität in ChCl:G, ChCl:U, Glycerin, Aceton und Dimethylsulfoxid mit Wassergehalten von jeweils 25 und 40 % vermessen. Detaillierte Ergebnisse sind als prozentuale Aktivität im Vergleich zu der Aktivität in Puffer zum Zeitpunkt t=0 h für alle vermessenen Enzyme und Zellextrakte im Anhang in Tabelle 40 aufgetragen.

Tabelle 29: Prozentuale Aktivität und Stabilität in den Lösungsmitteln nach t=1 h und 24 h ausgewählter Lipasen und Zellextrakte im Vergleich zu der Aktivität in Puffer zum Zeitpunkt t=0 h

		6	8	15	21	27
ChCl:U 25 %	t=0h	508,4	668,3	65,9	398,1	15,8
	t=1h	1163,0	0,0	111,7	426,0	0,0
	t=24h	91,4	0,0	55,8	361,0	0,0

ChCl:U 40 %	t=0h	101,3	44,2	123,0	303,4	78,7
	t=1h	157,5	0,0	231,6	252,7	0,0
	t=24h	0,0	0,0	212,7	97,6	0,0
ChCl:G 25 %	t=0h	327,5	1140,4	20,1	201,2	23,5
	t=1h	1239,0	2686,7	8,4	149,8	0,0
	t=24h	197,4	395,6	2,8	46,4	0,0
ChCl:G 40 %	t=0h	1649,5	6148,9	105,3	459,0	66,5
	t=1h	2584,1	24955,6	189,6	1182,2	357,8
	t=24h	15939,3	24955,6	155,1	1803,1	413,6
Glycerin 25 %	t=0h	13,2	31,3	24,9	35,2	0,0
	t=1h	0,0	0,0	17,6	11,2	0,0
	t=24h	0,0	0,0	1,5	6,4	0,0
Glycerin 40 %	t=0h	73,4	66,4	67,2	16,8	49,1
	t=1h	205,0	0,0	10,2	66,0	0,0
	t=24h	361,1	0,0	8,2	31,9	0,0
		38	43	51	62	65
ChCl:U 25 %	t=0h	78,3	4,1	3,1	18,2	6,7
	t=1h	0,0	0,0	0,0	0,0	11,8
	t=24h	0,0	0,0	0,0	0,0	5,4
ChCl:U 40 %	t=0h	167,1	102,8	54,3	0,0	51,0
	t=1h	0,0	0,0	16,7	0,0	29,9
	t=24h	0,0	0,0	2,5	0,0	22,8
ChCl:G 25 %	t=0h	172,4	10,7	1,1	25,7	5,0
	t=1h	0,0	70,8	10,2	0,0	5,8
	t=24h	0,0	21,3	3,4	0,0	19,1
ChCl:G 40 %	t=0h	216,1	78,0	2,0	117,7	15,2
	t=1h	851,0	145,2	29,0	248,4	100,9
	t=24h	823,2	115,5	26,7	305,1	67,7
Glycerin 25 %	t=0h	76,3	9,0	3,2	16,4	2,3
	t=1h	0,0	52,3	3,2	38,2	24,3
	t=24h	0,0	0,0	11,0	44,4	14,9
Glycerin 40 %	t=0h	128,1	85,8	12,5	267,1	47,5
	t=1h	0,0	38,9	3,0	351,8	60,0
	t=24h	0,0	55,2	4,8	328,5	41,5
		69	78	81	86	89
ChCl:U 25 %	t=0h	11,8	7,2	28,2	23,9	78,1
	t=1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	t=24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ChCl:U 40 %	t=0h	0,0	57,6	51,5	68,2	243,0
	t=1h	0,0	34,5	0,0	0,0	379,4
	t=24h	0,0	16,6	0,0	0,0	319,0
ChCl:G 25 %	t=0h	5,6	5,5	0,0	39,7	41,9
	t=1h	0,0	41,8	0,0	0,0	0,0
	t=24h	0,0	59,0	0,0	0,0	0,0

ChCl:G 40 %	t=0h	132,4	18,0	144,4	107,1	177,5
	t=1h	117,4	60,3	299,6	385,2	288,1
	t=24h	186,9	66,7	329,6	712,0	294,6
Glycerin 25 %	t=0h	15,9	2,4	29,6	29,6	45,1
	t=1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	t=24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Glycerin 40 %	t=0h	373,9	41,3	78,7	69,5	81,2
	t=1h	404,9	54,3	392,9	388,8	574,1
	t=24h	308,2	52,0	343,9	410,6	525,2

Es zeigt sich eine deutliche Aktivitätssteigerung für verschiedene Lipasen und Zellextrakte in den unterschiedlichen Lösungsmitteln. Auffällig ist die Aktivitätssteigerung der Lipasen aus *P. expansum* (6) und *P. roqueforti* (8) auf Werte von mehreren 100 % in z.B. ChCl:G mit 40 % Wassergehalt. Auch die Zellextrakte Nr. 27 und 38 weisen deutliche Aktivitätssteigerungen in ChCl:G und Glycerin mit jeweils 40 % Wassergehalt auf. Besonders auffallend ist, dass die erhöhten Aktivitäten erst nach Lagerung in diesen Lösungsmitteln gemessen wurden. Tendenziell weisen die Lipasen und Zellextrakte weniger erhöhte Aktivitäten in Glycerin auf, als in DES. Einige weitere interessante Kandidaten (43, 51, 62, 65, 69, 78, 81, 86 und 89) wurden ermittelt und es zeigt sich, dass die Aktivität in Lösungsmitteln mit einem höheren Wassergehalt tendenziell größer sind, als mit einem geringeren Wassergehalt. Auch kann eine deutliche Tendenz höherer Aktivitäten und Lagerstabilitäten der Zellextrakte in ChCl:G als in ChCl:U und Glycerin beobachtet werden. Die Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (LipA, 21) weist hohe Aktivität in DES auf (Abbildung 46). Diese Aktivität wird durch Lagerung in ChCl:G noch erhöht und eine deutliche Steigerung erreicht.

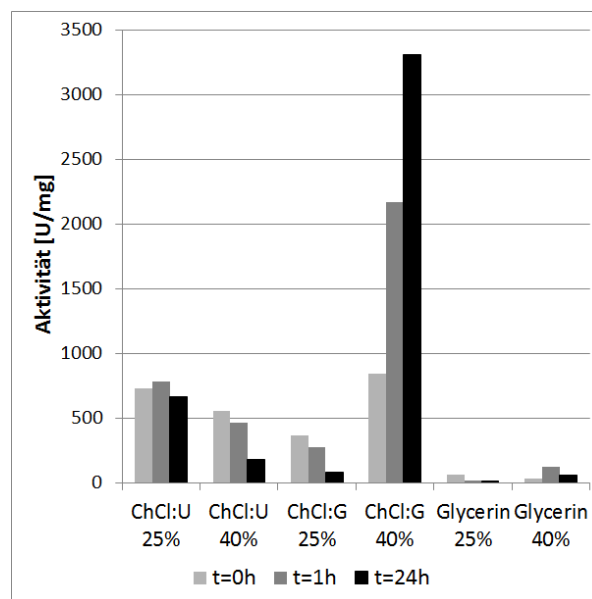


Abbildung 46: Aktivität in U/mg der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (LipA) in verschiedenen Lösungsmitteln bei verschiedenen Wassergehalten (Aktivität in Puffer t= 0h: 183,6 U/mg)

Es wird eine Auswahl der Lipasen und Zellextrakte für die im nächsten Kapitel durchgeführten Reaktionen getroffen. Hierfür wurden gezielt Lipasen bzw. Zellextrakte nach folgenden Kriterien ausgewählt: 1. hohe Aktivität in Puffer zum Zeitpunkt t=0 h und/oder 2. eine bestätigte Aktivität in dem jeweiligen Lösungsmittel mit einer hohen Lagerstabilität (Tabelle 30).

Tabelle 30: Selektierte Lipasen und Zellextrakte für die Synthese relevanter Produkte in DES und Glycerin mit 25 bzw. 40 % Wassergehalt

ChCl:U 25%	ChCl:U 40%	ChCl:G 25%	ChCl:G 40%		Glycerin 40%	
Pexp	Bcep	Roq	Pexp	60	Mjav	86
LipA	CalA	Pexp	Roq	62	CalB	89
CalB	LipA	LipA	LipA	65	Pstu	24
Alc	Pstu	CalB	Mjav	69	38	37
LipoTL	Alc	38	CalB	78	43	
PlbF	Pflu	43	Crug	81	52	
	CalB		LipoTL	86	60	
	23		Rmie	89	62	
	24		Pstu	24	65	
	38		CalA	26	69	
	51		Bcep	27	74	
	65		Alc		78	
	78		38		81	
	89		43		84	

III.5.3 Screening verschiedener Reaktionen mit miniaturisierten Methoden

Nach erfolgreichem Abschluss des Screenings auf Aktivität und Lagerstabilität der Lipasen in den Lösungsmitteln, wird mit einigen selektierten Enzymen die Synthese verschiedener technischer Produkte untersucht.

Es wurden fünf Reaktionen durchgeführt:

- Synthese von Decyloleat aus Decanol und Ölsäure
- Synthese von Isopropyllauraten aus Isopropanol und Laurinsäure
- Synthese von 2-EH-Estern aus 2-Ethylhexanol und Palmfett
- Herstellung von Biodiesel aus Rapsöl und Ethanol
- Hydrolyse von Rizinusöl

Mithilfe der kommerziellen Lipasen und LipA konnten Umsätze in den verschiedenen Reaktionen detektiert werden, mit den Zellextrakten nicht, da eventuell die Konzentration der Zellextrakte zu gering war.

Tabelle 31: Ausbeuten für die Synthese von Decyloleat aus Decanol und Ölsäure in Lösungsmitteln

ChCl:U 25%	Ausbeute [%]	ChCl:U 40%	Ausbeute [%]	ChCl:G 25%	Ausbeute [%]	ChCl:G 40%	Ausbeute [%]	Glycerin 40%	Ausbeute [%]
Pexp	0,0	Bcep	91,4	Roq	0,0	Pexp	1,3	Mjav	86,5
LipA	0,0	CalA	30,5	Pexp	0,0	Roq	0,0	CalB	91,2
CalB	92,7	LipA	3,3	LipA	6,4	LipA	6,0	Pstu	82,6
Alc	6,3	Pstu	0,0	CalB	91,9	Mjav	62,0		
LipoTL	22,5	Alc	0,0			CalB	92,4		
PlbF	0,0	Pflu	8,7			Crug	91,1		
		CalB	92,0			LipoTL	93,1		
						Rmie	93,3		
						Pstu	10,3		
						CalA	12,2		
						Bcep	92,1		
						Alc	93,3		

Es zeigt sich, dass ein Großteil der untersuchten Lipasen in der Lage ist, die Veresterung von Decanol mit Ölsäure durchzuführen, lediglich PlbF, Roq und Pexp sind unabhängig von der Wahl des Lösungsmittels nicht in der Lage diese Reaktion zu katalysieren (Tabelle 31). LipA und Pflu weisen nach 48 h geringe Ausbeuten an Decyloleat von kleiner als 10 % auf. CalB weist, wie aus dem Kapitel Emollientester Synthese bekannt, neben anderen Lipasen, wie der Lipase aus *Burkholderia cepacia* (Bcep) und *Thermomyces lanuginosa* (LipoTL) hohe Ausbeuten von > 90 % an Decyloleat auf. Für die Lipase aus *Pseudomonas stutzeri* (Pstu) zeigt sich beispielsweise eine deutliche Abhängigkeit der Ausbeute von der Wahl des Lösungsmittels, in ChCl:G wird eine Ausbeute von 10,3 % erreicht, in Glycerin 82,6 %.

Die Synthese von Isopropyllauraten konnte von der Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* mit einer Ausbeute von maximal 77,8 % durchgeführt werden (Tabelle 32). Die Lipase A aus demselben Organismus zeigte eine Ausbeute von 57 % in ChCl:G mit 40 % Wassergehalt, in ChCl:U von 2,52 %. Alle anderen Lipasen katalysieren die Reaktion mit dem sekundären, kurzkettigen Alkohol kaum oder gar nicht. Auffallend ist, dass unter Verwendung von Glycerin und ChCl:G als Lösungsmittel vermehrt Mono- und Diglyceride im Vergleich zu dem gewünschten Produkt Isopropyllaurat gebildet werden. Hier wird Glycerin gegenüber Isopropanol, das eine starke denaturierende Wirkung besitzt, bevorzugt als Edukt verwendet.

Tabelle 32: Synthese von Isopropyllauraten aus Isopropanol und Laurinsäure in Lösungsmitteln (In Klammern Nebenprodukte: Mono- und Diglyceride)

ChCl:U 25%	Produkt [%]	ChCl:U 40%	Produkt [%]	ChCl:G 25%	Produkt [%]	ChCl:G 40%	Produkt [%]	Glycerin 40%	Produkt [%]
Pexp	0,0	Bcep	0,0	Roq	0,7	Pexp	0,7	Mjav	0,4
LipA	0,7	CalA	2,5	Pexp	0,7	Roq	0,6	CalB	63,2 (3,6; 11,3)
CalB	77,8	LipA	0,7	LipA	0,7	LipA	1,0	Pstu	7,9 (11,3; 6,5)
Alc	0,0	Pstu	0,0	CalB	76,3 (3,6; 4,3)	Mjav	0,0		
LipoTL	0,0	Alc	0,0			CalB	69,2 (1,5; 6,6)		
PlbF	0,0	Pflu	0,0			Crug	0,9		
		CalB	74,4			LipoTL	0,7		
						Rmie	0,7 (10,7)		
						Pstu	0,0		
						CalA	57,1 (2,8)		
						Bcep	0,0		
						Alc	0,0		

Tabelle 33: Ausbeute an 2-Ethylhexylestern aus der Umesterung von Palmfett mit 2-Ethylhexanol in Lösungsmitteln (In Klammern: Gehalt freier Fettsäuren)

ChCl:U 25%	Ausbeute [%]	ChCl:U 40%	Ausbeute [%]	ChCl:G 25%	Ausbeute [%]	ChCl:G 40%	Ausbeute [%]	Glycerin 40%	Ausbeute [%]
Pexp	8,1 (1,4)	Bcep	98,6 (1,2)	Roq	15,7 (3,4)	Pexp	8,1 (1,7)	Mjav	27,0 (7,4)
LipA	98,6 (1,2)	CalA	93,8 (1,4)	Pexp	7,6 (2,0)	Roq	4,4 (1,1)	CalB	6,6 (1,7)
CalB	10,7 (2,6)	LipA	98,7 (1,2)	LipA	98,4 (1,5)	LipA	98,3 (1,4)	Pstu	98,6 (1,4)
Alc	98,7 (1,2)	Pstu	98,7 (1,1)	CalB	13,5 (2,2)	Mjav	8,9 (12,5)		
LipoTL	51,2 (9,3)	Alc	98,7 (1,2)			CalB	10,9 (2,1)		
PlbF	0,0	Pflu	57,5 (3,9)			Crug	1,8 (0,7)		
		CalB	7,8 (2,3)			LipoTL	79,5 (4,8)		
						Rmie	87,1 (4,9)		
						Pstu	98,8 (1,1)		
						CalA	98,8 (1,1)		
						Bcep	98,4 (1,2)		
						Alc	98,3 (1,2)		

Einige Lipasen wie LipA, Alc, CalA, Pstu und Bcep weisen hohe Ausbeuten von größer als 90 % für die Synthese von 2-EH-Estern in den Lösungsmitteln auf und der Gehalt an freien Fettsäuren ist mit 1,1-1,5 % sehr gering (Tabelle 33). Diese Lipasen können beide Enantiomere des verzweigten Alkohols 2-EH umsetzen, weisen also keine Enantioselektivität auf. Interessant ist besonders, dass einige Lipasen, wie beispielsweise LipA, die Synthese von 2-EH-Estern mit höheren Ausbeuten katalysiert, als die in der Literatur beschriebene und in dieser Arbeit verwendete Lipase CalA. Andere Lipasen katalysieren diese Reaktion jedoch entweder gar nicht oder sehr begrenzt.

Nicht alle Lipasen, welche den verzweigten Alkohol 2-Ethylhexanol umsetzen konnten, können den kurzkettigen und stark denaturierenden Alkohol Ethanol umsetzen. Interessante Ergebnisse für die Synthese von Biodiesel zeigen die Lipase aus *Thermomyces lanuginosa* (LipoTL) und *Pseudomonas stutzeri* (Pstu) in ChCl:G mit einem hohen Wassergehalt von 40 % mit Ausbeuten um 80 % (Tabelle 34). Eine ähnlich hohe Ausbeute von 80,1 bzw. 83,3 % weisen die Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (LipA) in ChCl:G mit 25 % Wassergehalt und erneut *Pseudomonas stutzeri* (Pstu) in Glycerin mit 40 % Wassergehalt auf. Jedoch liegt in allen vier Fällen der Gehalt an freien Fettsäuren mit 4,7- 8,4 % sehr hoch. Diese Lipasen können dementsprechend den kurzkettigen und stark denaturierenden Alkohol Ethanol umsetzen. Keine Umsetzungen werden von PlbF, Pexp und Roq sowie Mjav detektiert und die Ausbeuten der restlichen Lipasen sind ebenfalls gering.

Tabelle 34: Ausbeuten an Biodiesel aus der Umesterung von Rapsöl mit Ethanol in Lösungsmitteln (In Klammern: Gehalt freier Fettsäuren)

ChCl:U 25%	Ausbeute [%]	ChCl:U 40%	Ausbeute [%]	ChCl:G 25%	Ausbeute [%]	ChCl:G 40%	Ausbeute [%]	Glycerin 40%	Ausbeute [%]
Pexp	0,0	Bcep	42,9 (8,1)	Roq	0,0	Pexp	0,0	Mjav	31,2 (5,8)
LipA	37,6 (6,8)	CalA	7,8 (1,7)	Pexp	0,5 (1,3)	Roq	0,0	CalB	5,1 (0,4)
CalB	11,6 (0,8)	LipA	5,4 (4,7)	LipA	80,1 (4,7)	LipA	1,8 (2,4)	Pstu	83,3 (8,4)
Alc	2,7 (4,9)	Pstu	51,1 (7,4)	CalB	32,1 (0,8)	Mjav	0,8 (2,0)		
LipoTL	30,3 (2,9)	Alc	17,6 (11,5)			CalB	2,4 (0,5)		
PlbF	0,0	Pfluo	17,5 (7,5)			Crug	9,9 (2,9)		
		CalB	0,0			LipoTL	79,0 (5,8)		
						Rmie	49,5 (4,3)		
						Pstu	79,4 (7,6)		
						CalA	51,2 (3,9)		
						Bcep	56,5 (5,7)		
						Alc	41,9 (10,3)		

Rizinusöl besitzt aufgrund einer Hydroxylgruppe an der C12- Stelle interessante Eigenschaften für weitere Reaktionen zu technisch relevanten Produkten, daher wäre eine Anreicherung dieser Säure von Interesse.

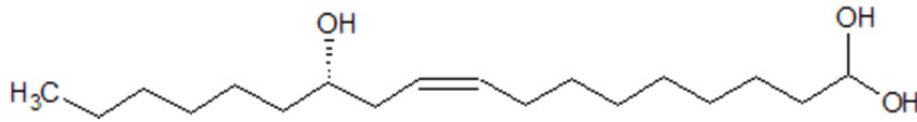


Abbildung 47: Strukturformel Rizinolsäure

Rizinusöl besteht zu 77- 83 % aus Rizinolsäure, daher kann eine maximale Ausbeute an Rizinolsäure bei der Hydrolyse des Öls in diesem Größenbereich entstehen. Dieser Wert wird von keiner der getesteten Lipasen erreicht. Es zeigt sich, dass nach 48 h in jedem Ansatz noch Triglyceride detektiert wurden und somit kein Vollumsatz der Hydrolyse des Rizinusöls erreicht wurde. Die höchste Ausbeute an Rizinolsäure von 53,0 % wird in Glycerin mit einem Wassergehalt von 40 % mithilfe der Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* erreicht (Tabelle 35). Eine Nebenproduktbildung konnte mittels GC nicht detektiert werden.

Tabelle 35: Ausbeuten an Rizinolsäure bei der Hydrolyse von Rizinusöl in Lösungsmitteln

ChCl:U 25%	Ausbeute [%]	ChCl:U 40%	Ausbeute [%]	ChCl:G 25%	Ausbeute [%]	ChCl:G 40%	Ausbeute [%]	Glycerin 40%	Ausbeute [%]
Pexp	21,1	Bcep	42,7	Roq	19,2	Pexp	24,5	Mjav	27,1
LipA	25,6	CalA	20,9	Pexp	18,4	Roq	22,8	CalB	53,0
CalB	32,3	LipA	32,2	LipA	22,6	LipA	14,0	Pstu	26,0
Alc	29,6	Pstu	22,2	CalB	0,0	Mjav	25,6		
LipoTL	39,9	Alc	35,0			CalB	39,2		
PlbF	0,0	Pflu	30,7			Crug	20,1		
		CalB	19,3			LipoTL	37,3		
						Rmie	26,8		
						Pstu	17,8		
						CalA	17,7		
						Bcep	36,0		
						Alc	32,9		

III.5.4 Vergleichende Untersuchungen mit LipA und CalA

CalA wird in der Literatur für die Umesterung von Palmfett mit 2-Ethylhexanol verwendet [127]. In dem Screening zeigte LipA vergleichbar hohe Ausbeuten des Esters mit geringem Gehalt an freien

Fettsäuren, daher wurde eine Variation des Wassergehalts durchgeführt, um so einen direkten Vergleich mit der Umesterung durch CalA zu erhalten (vgl. Abbildung 41) (Abbildung 48).

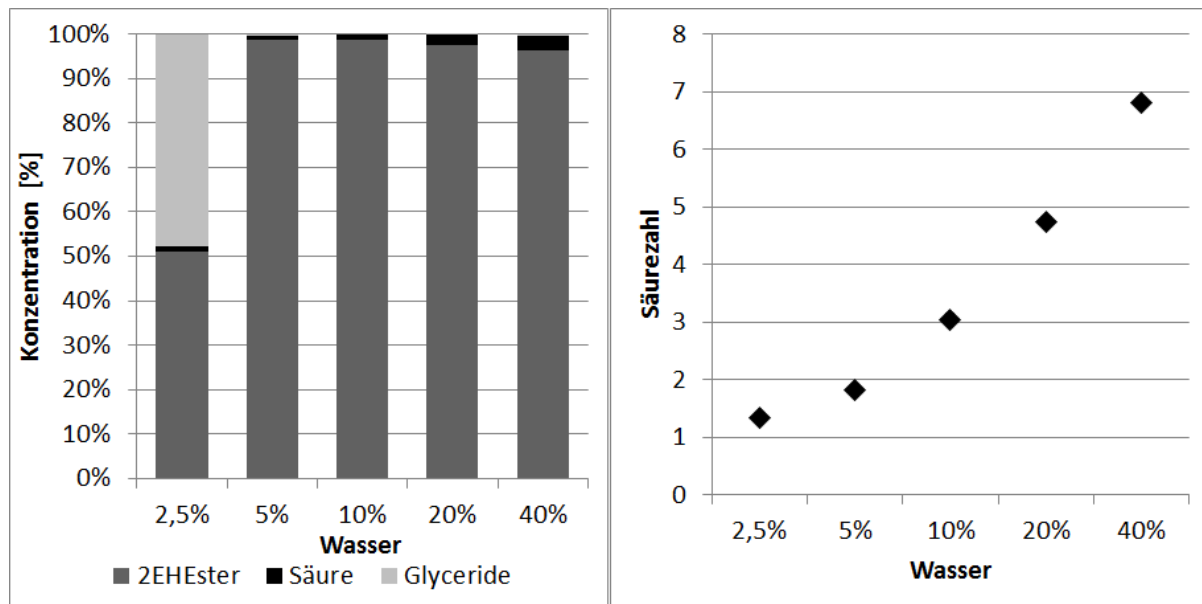


Abbildung 48: Konzentration der Ester, freier Fettsäuren sowie verbleibende Glyceride für die Synthese von 2-Ethylhexylestern in ChCl:G bei verschiedenen Wassergehalten durch LipA

Die Ausbeute an Ester liegt bei Werten größer 96 % für Wassergehalte von 5 bis 40 %, für einen Wassergehalt von 2,5 % wurde das Gleichgewicht nach 48 h noch nicht erreicht. Für Wassergehalte von 10 % und 20 % konnten keine Tri- oder Diglyceride detektiert werden, für 20 % wurden weiterhin keine Monoglyceride in den Chromatogrammen detektiert. Die Ausbeute von 2-Ethylhexylestern liegt bei 98,7 %, die restlichen 1,3 % entfallen auf freie Fettsäuren. Es zeigt sich ein leichter Anstieg der Säurezahl mit steigendem Wassergehalt, jedoch korreliert die Zunahme der Säurezahl nicht mit der Menge an zugegebenem Wasser. Wird eine achtfache Wassermenge eingesetzt (5 % auf 40 %) nimmt die Säurezahl nur um einen Faktor von 3,5 zu. Bei der Umsetzung mit CalA mussten mindestens Wassergehalte von 20 % eingesetzt werden, um eine Reaktion nach 48 h ins Gleichgewicht zu erhalten. Die Säurezahl ist hier bei einem Wassergehalt von 40 % mit einem Wert von sechs leicht geringer.

Vergleichende Reaktionen der zwei Lipasen aus *Pseudozyma antarctica* (CalA) und aus *Pseudomonas aeruginosa* (LipA) für die Synthese von Biodiesel mit ChCl:G als Lösungsmittel zeigen deutliche Unterschiede in der Ausbeute an Biodiesel (Abbildung 49). CalA katalysiert mit einem geringen Wassergehalt von 1 % keine Reaktion, erst mit höheren Wassergehalten werden Ausbeuten an Biodiesel von maximal 60 % für einen Wassergehalt von 25 % erreicht. Wird mehr Wasser eingesetzt, sinkt die Ausbeute wieder und die Konzentration an freien Fettsäuren nimmt leicht zu. Ethanol

besitzt anscheinend einen denaturierenden Effekt auf CalA, daher findet keine Reaktion ins Gleichgewicht statt.

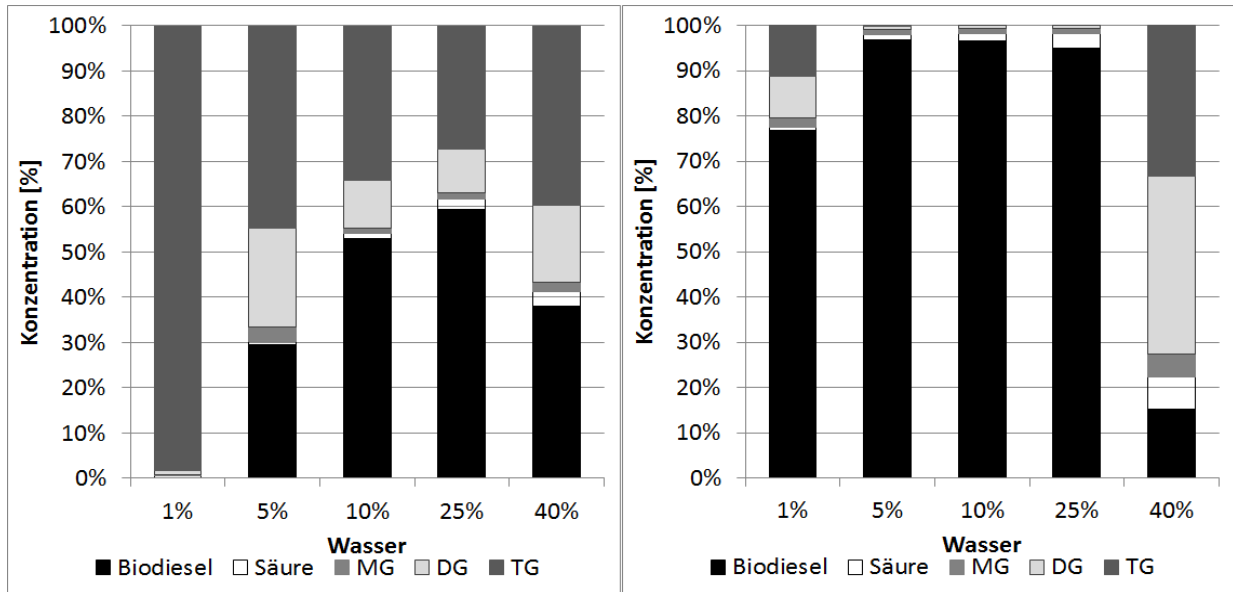


Abbildung 49: Biodieselsynthese in ChCl:G mit verschiedenen Wassergehalten mit CalA (links) und LipA (rechts)

Diese denaturierende Wirkung ist für die Lipase LipA aus *Pseudomonas aeruginosa* geringer, da bereits mit einem Wassergehalt von 1 % eine Reaktion zu Biodiesel stattfindet. Bei diesem geringen Wassergehalt ist das Gleichgewicht nach insgesamt 72 h noch nicht erreicht. Ausbeuten von > 95 % zeigen sich für Wassergehalte von 5 bis 25 %. Wird mehr Wasser eingesetzt, steigt die Konzentration der freien Fettsäuren leicht von 0,8 % auf 3,2 % an. Bei einem Wassergehalt von 40 % zeigte sich ebenfalls ein Rückgang der Ausbeute an Biodiesel und ein deutlicher Anstieg der freien Fettsäuren.

IV. Diskussion

Herstellung von DES

Zu Beginn der Arbeit wurden für die enzymkatalysierten Reaktionen geeignete Lösungsmittelsysteme identifiziert und mehrere Deep Eutectic Solvents hergestellt. Die DES aus Cholinchlorid und Harnstoff bzw. Glycerin weisen geeignete niedrige Schmelzpunkte von 12°C und -40°C auf [184, 204]. Sie bilden eine klare Flüssigkeit mit einer ausreichend geringen Viskosität bei niedrigen Temperaturen. Ihre gute Mischbarkeit mit Wasser ermöglicht eine einfache Einstellung des Wassergehalts für die Lipase katalysierten Reaktionen. Aus diesen Gründen wurden diese DES als Lösungsmittel in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die DES bestehend aus $ZnCl_2$ und Cholinchlorid bzw. Chlorcholinchlorid wiesen eine sehr hohe Viskosität und sehr hohe Schmelzpunkte auf. Da enzymkatalysierte Reaktionen bei moderaten Temperaturen durchgeführt werden, musste von der Verwendung dieser DES abgesehen werden. Wurden Säuren als zweite Komponente verwendet, war die Möglichkeit der Nebenreaktion gegeben, sodass auch diese DES nicht für Lipase katalysierte Reaktionen verwendet wurden. Unter Verwendung von Zuckern nahm das Gemisch eine bräunliche Färbung an und wies eine sehr hohe Viskosität auf. Diese bräunliche Färbung lässt sich auf die Maillard-Reaktion zurückführen, welche durch das Stickstoffatom des Cholinchlorids ermöglicht wurde. Diese Färbung könnte sich nach der Reaktion negativ auf die Farbe des Produkts auswirken. Das DES aus Fructose und Cholinchlorid wurde für die Synthese von Zuckerestern verwendet, da hier eine Nebenreaktion mit Fructose lediglich zu dem gewünschten Produkt führen könnte. Auch eine hohe Viskosität war ein Ausschlusskriterium, da so die Diffusion der Edukte zum Enzym limitiert werden könnten.

Ectoine dienen in extremophilen Mikroorganismen der Enzymstabilisierung, daher wäre es interessant Ectoine als eine Komponente eines DES einzusetzen und so eine mögliche höhere Stabilität nativer Lipasen zu gewährleisten [226, 227]. Die Synthese von DES mit einer Ectoin Komponente brachte keinen Erfolg, obwohl eine ausreichende Menge an Hydroxylgruppen zur Knüpfung der Wasserstoffbrückenbindungen vorlag. Da es sich bei den Stickstoffverbindungen nicht um quaternäre Ammoniumverbindungen handelte, war auch die Synthese mit Harnstoff erfolglos.

IV.1 Einsatz von nativen Lipasen in hydrophilen Lösungsmitteln

Es wurden bereits einige Lipase katalysierte Reaktionen in DES durchgeführt, jedoch wurden hauptsächlich immobilisierte Enzyme verwendet [44, 191]. In dieser Arbeit wurde der Einsatz der nativen Lipase Lipozym CalB mit dem Einsatz der immobilisierten Variante Novozym 435 für eine Synthesereaktion verglichen. Beide Enzyme konnten die Synthese in hydrophilen Lösungsmitteln

speziell in DES katalysieren, jedoch scheint das DES die Poren des Trägermaterials des immobilisierten Enzyms zu verstopfen, da die Reaktion bei Einsatz von sehr wenig Enzym nach kurzer Zeit stoppte. Erst nach Waschen des immobilisierten Enzyms mit Wasser konnte erneut eine Reaktion detektiert werden. Da der Einsatz des immobilisierten Enzyms keine deutlichen Vorteile brachte, wurde die Prozessentwicklung, auch im Hinblick auf die Investitionskosten auf Basis von nativen Lipasen durchgeführt.

Vergleich von DES mit anderen Lösungsmitteln

Es wurden vergleichende Reaktionen in organischen Lösungsmitteln und hydrophilen Lösungsmitteln, wie DES und Glycerin durchgeführt. *Bornscheuer* und *Kazlauskas* stellten in Untersuchungen fest, dass unpolare Lösungsmittel besser für die Enzymkatalyse geeignet sind als polare Lösungsmittel [37]. *Laane* et al. teilte diese Lösungsmittel in drei Gruppen in Abhängigkeit ihres logP-Wertes ein und charakterisiert das Aktivitätsverhalten von Enzymen. In polaren Lösungsmitteln mit einem logP-Wert von < 2 tritt geringe Aktivität auf, für Lösungsmittel mit logP- Werten zwischen $2 < \log P < 4$ ist die Vorhersage schwer und für Lösungsmittel mit einem hohen logP- Wert > 4 können hohe Ausbeuten erreicht werden [216, 232].

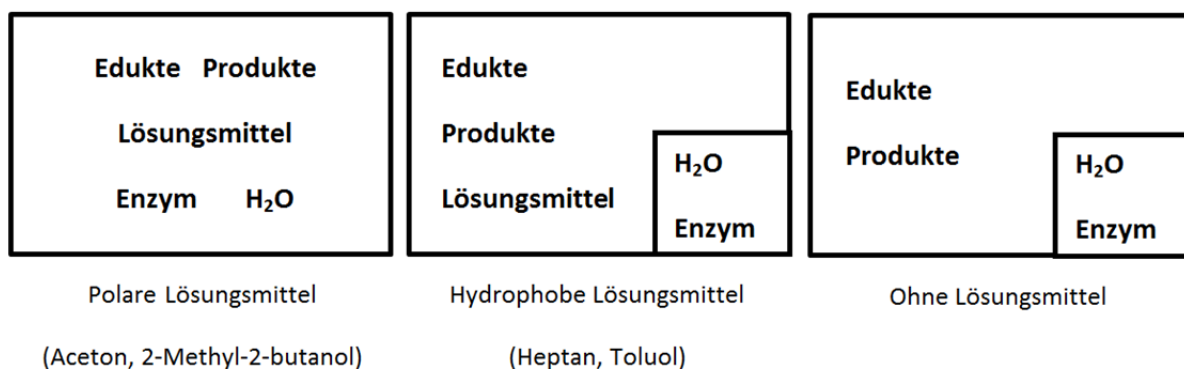


Abbildung 50: Phasenverhalten der Reaktionsansätze mit verschiedenen Lösungsmitteln

Das Phasenverhalten der Ansätze mit organischen und ohne Lösungsmittel wird in Abbildung 50 exemplarisch dargestellt. In polaren Lösungsmitteln mit einem logP- Wert < 2 , wie Aceton und 2-Methyl-2-butanol befindet sich das Wasser in derselben Phase, wie das Enzym, somit wird das Gleichgewicht früher mit geringen Ausbeuten von unter 50 % erreicht. Ein kontinuierlicher Wasserentzug mittels Vakuum oder Molsieb wäre eine Möglichkeit das Gleichgewicht der Reaktion weiter auf die Seite der Produkte zu verschieben. Jedoch ist bekannt, dass polare Lösungsmittel dem Enzym das für eine stabile Konformation essentielle Wasser entziehen und dieses somit denaturiert wird [74–76]. Die Reaktionen in den hydrophoben Lösungsmitteln Toluol und Heptan (logP-Wert 2,5 bzw. 5,1) erreichen eine Ausbeute von ungefähr 94 % bzw. 90 % mit einer, im Vergleich mit den

polaren Lösungsmitteln, relativ hohen Reaktionsgeschwindigkeit. Es bilden sich zwei Phasen, die Lösungsmittelphase mit den Edukten und dem Produkt und eine Wasserphase in der das Enzym gelöst vorliegt. In direkter Umgebung des Enzyms liegt dementsprechend eine hohe Wassermenge vor, sodass das Gleichgewicht der Reaktion bei diesen Ausbeuten erreicht ist. Ein ähnliches Verhalten wird für eine Reaktion ohne Lösungsmittel beobachtet, auch hier liegt das Enzym in der Wasserphase vor und das Gleichgewicht wird somit früher erreicht.

Die höchsten Ausbeuten zeigen sich in den Reaktionen unter Verwendung von hydrophilen Lösungsmitteln, was auf den ersten Blick im Widerspruch zum Befund von *Laane et al.* steht, dass eine schlechte Aktivität bei einem logP-Wert < 2 gemessen wird [216, 232]. Dieser Widerspruch kann jedoch über ein unterschiedliches Phasenverhalten der beiden Lösungsmittel (polar und hydrophil) erklärt werden (vgl. Abbildung 50, links und Abbildung 51).

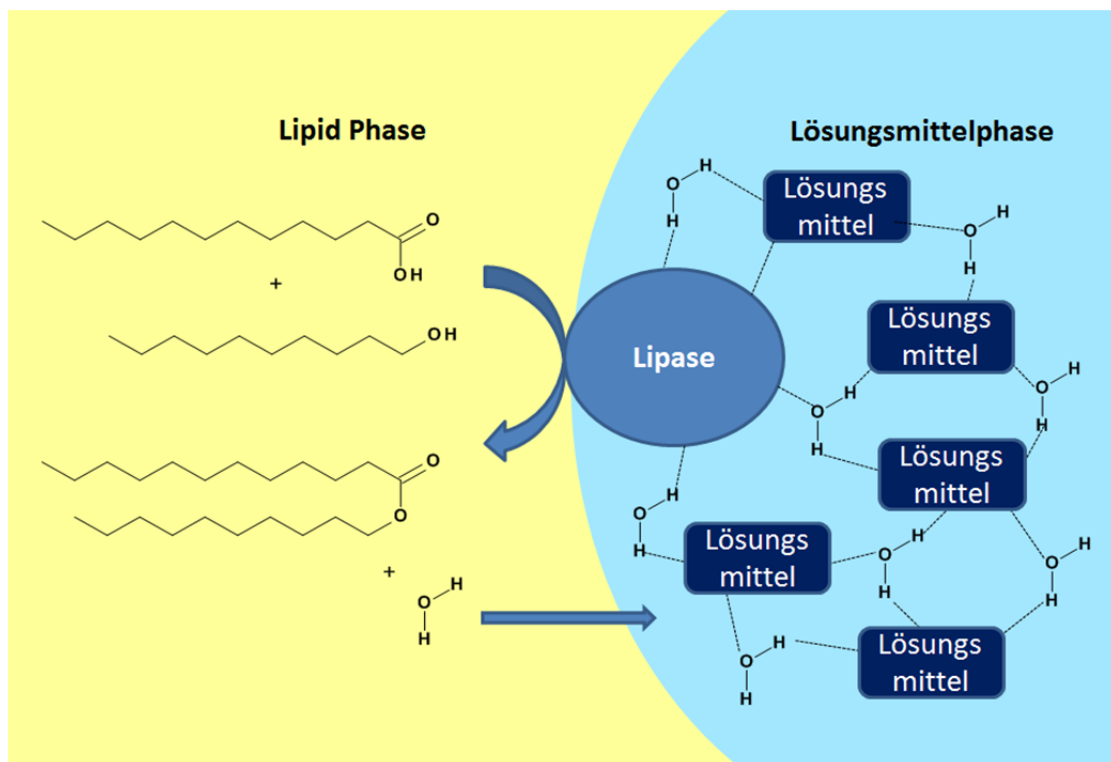


Abbildung 51: Schematische Darstellung der Hypothese für eine Veresterung in DES

Wird DES als hydrophiles Lösungsmittel verwendet bilden sich zwei Phasen, eine DES- und eine Lipidphase, die native Lipase befindet sich an der Grenzfläche. In der Lipidphase (gelb), findet die Lipase katalysierte Veresterung einer Fettsäure mit einem Alkohol statt, als einziges Nebenprodukt entsteht Wasser. Dieses Wasser wird in das Wasserstoffbrückengerüst des DES eingebaut. Das DES entzieht dem Enzym jedoch nicht das für eine stabile Konformation benötigte Wasser und gewährleistet so die Stabilität und Aktivität. Da das Wasser nicht mehr in der Lipidphase vorliegt und in der hydrophilen Lösungsmittelphase gebunden ist, wird das Gleichgewicht der Reaktion auf die

Seite der Produkte verschoben. Somit kann durch den Einsatz von DES die Ausbeute des Produktes auf Werte bis > 97 % erhöht werden.

Der wasserziehende Effekt von DES wurde mittels Karl-Fischer-Titration [80] bestätigt, da in der Lipidphase einer Reaktion mit DES eine 10-fach geringere Menge Wasser detektiert wurde, als in der Lipidphase einer Reaktion ohne Lösungsmittel. Die Reaktion in DES kann bis zu einem höheren Gleichgewichtszustand ablaufen, da kontinuierlich Wasser der Lipidphase entzogen wird. Jedoch hatte dies keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der Lipase, da diese über einen Zeitraum von 48 Stunden die Reaktion katalysieren konnte.

Der wasserziehende Effekt kann auf andere hydrophile Lösungsmittel übertragen werden. Glycerin, Ethylenglykol, Polyethylenglykol und Diglycerin sowie die in Wasser gelösten Zucker weisen ebenfalls hohe Ausbeuten an Emollientestern auf. Die zwei Reaktionen in Ethylenglykol zeigen jedoch Nebenproduktbildung, sodass dieses Lösungsmittels für die Synthese von Emollients ohne Nebenproduktbildung nicht geeignet ist. Es zeigt sich insbesondere für Polyethylenglykol, dass eine zehnfache Menge an Wasser geringfügig niedrigere Ausbeuten an Ester bedingt (5 % Wasser: 95,7 %; 50 % Wasser: 93,5 %). Wie erwartet sind die Reaktionsgeschwindigkeiten bei einem höheren Wassergehalt beispielsweise für Polyethylenglykol deutlich größer (5 % Wasser: 342 $\mu\text{mol}/\text{min}$; 50 % Wasser: 908 $\mu\text{mol}/\text{min}$).

IV.2 Synthese von Emollients

Es wurde gezeigt, dass Emollientester wie Decyloleat und Decyllaurat in DES als Lösungsmittel mithilfe einer freien Lipase Lipozym CalB mit einer hohen Ausbeute und nach Aufreinigung mit einer hohen Reinheit hergestellt werden können.

Optimierung der Reaktionsparameter

Detaillierte Untersuchungen zu den einzelnen Parametern führten zu folgenden optimalen Bedingungen:

- 1) Reaktionstemperatur 45°C
- 2) minimaler Wassergehalt: 10 % für DES und 2,5 % für Glycerin
- 3) Verhältnis DES zu Eduktphase von 1:1
- 4) Verhältnis der Edukte (Ölsäure:Decanol) von 1:1,1

Bei der Optimierung des Wassergehalts wurde wie erwartet eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit bei einem höheren Wassergehalt beobachtet. Die Ausbeuten der Reaktionen ohne Lösungsmittel verändern sich kaum, da das Enzym in der Wasserphase vorliegt und vollständig von Wasser

umgeben ist. Es ist bekannt, dass native Lipasen für eine stabile Konformation einen minimalen Wassergehalt benötigen, dies scheint ebenfalls für die Verwendung von hydrophilen Lösungsmitteln, wie DES und Glycerin zu gelten. Für die beiden DES ChCl:U und ChCl:G muss mindestens eine Wassermenge von 10 % bezogen auf die Lipidphase eingesetzt werden, um eine Reaktion ins Gleichgewicht zu erhalten. Bei einer Reaktion in Glycerin scheint die minimale Wassermenge unter 2,5 % zu liegen. Geringere Wassermengen wurden nicht untersucht, da die Reaktionsgeschwindigkeit mit 61,8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ sehr gering ist und die Reaktion in den betrachteten 48 h Reaktionszeit ins Gleichgewicht laufen sollte.

Als optimaler Temperaturbereich wurden Werte zwischen 45 und 60°C ermittelt, da bei einer Temperatur von 75°C der Großteil des Enzyms denaturiert wird und somit keine Reaktion katalysieren kann. Wird eine Temperatur von 35°C verwendet, ist das Gemisch sehr viskos und die Diffusion der Reaktionspartner limitiert. Für den Einsatz einer bestimmten Enzymmenge muss abgewägt werden, ob der Preis von mehr Enzym die höhere Reaktionsgeschwindigkeit aufwiegt. Wird die doppelte Menge Enzym eingesetzt, steigt die Reaktionsgeschwindigkeit linear an und es kann in kürzerer Zeit mehr Produkt erhalten werden.

Wird das Verhältnis von DES Menge zu Lipidphase variiert, zeigt sich bei einem Verhältnis von 1:1 (w/w) eine der höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten für die Synthese von Decyloleat von 230 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Wird weniger DES eingesetzt ist die Reaktionsrate deutlich geringer, wird mehr eingesetzt wird lediglich ein geringer Anstieg detektiert und die Ausbeuten der Reaktionen unterscheiden sich nach 48 h für unterschiedliche höhere DES Einsatzmengen kaum.

Im Hinblick auf die Aufreinigung und der technischen Realisierbarkeit sollte ein Verhältnis von 1:1,1 an Ölsäure zu Decanol gewählt werden, da der Aufwand die geringe Ausbeutesteigerung bei einem Verhältnis von 1:1,5 nicht kompensieren kann.

Variation der Edukte

Die Alkoholvariation für die Veresterung von Laurin- bzw. Ölsäure zeigt, dass für langkettige, lineare Alkohole hohe Ausbeuten erreicht werden. Für kurzkettige Alkohole sollte eine stufenweise Zugabe der Alkohole erfolgen, sodass das Enzym nicht deaktiviert wird [177]. Eventuell kann CalB durch eine ausgeprägte Enantioselektivität nur eines der Enantiomere von 2-Ethylhexanol umsetzen, da in ChCl:U ein maximaler Umsatz von 50 % erreicht wird [46]. In ChCl:G als Lösungsmittel scheint Glycerin in Konkurrenz mit 2-EH zu treten, da hier als Nebenprodukte Monoglyceride gebildet werden. In Glycerin als Lösungsmittel beschränkt sich diese Konkurrenz jedoch nicht nur auf 2-EH sondern auf alle kurzkettigen Alkohole. CalB wird in Glycerin stabilisiert, da Ausbeuten an Estern mit den kurzkettigen Alkoholen zwischen 55 und 95 % erreicht werden.

Stabilitäts- und Recyclinguntersuchungen

Es konnte gezeigt werden, dass die Stabilität des Enzyms in DES gewährleistet ist. In Glycerin und ChCl:G sinkt die Aktivität der Lipase nur langsam innerhalb von 12,5 bis 50 Tagen ab, beziehungsweise wird sogar leicht erhöht (115 % nach 50 Tagen in Glycerin). Wird ein DES mit einem Molverhältnis von 1:2 aus Cholinchlorid und Harnstoff verwendet, ist nach 24 h keine Aktivität messbar. Es ist bekannt, dass Harnstoff eine denaturierende Wirkung auf Enzyme besitzt [48]. Daher wurde ein anderes molares Verhältnis der Komponenten des DES verwendet. Wird weniger Harnstoff eingesetzt weist das Enzym nach 24 h noch eine geringe Aktivität auf. Da Lipasen an der Grenzfläche aktiv sind (vgl. Abbildung 51), wurde untersucht, ob durch Einbringen einer zweiten Phase ein stabilisierender Effekt auf die Lipase erreicht werden kann. Nach Zugabe von Ölsäure konnte nach 120 h eine verbleibende Aktivität von 90 % gemessen werden. Das Enzym scheint durch Einstellung einer Grenzfläche stabiler gegen die denaturierende Wirkung von Harnstoff zu sein, dies ist ein interessanter Aspekt, da Lipozym CalB eigentlich keiner Grenzflächenaktivierung unterliegt [7, 41]. Gegebenenfalls ist jedoch für eine stabile Konformation diese Grenzfläche wichtig, da die Ölsäure im aktiven Zentrum gebunden wird und so das Enzym vor einer Deaktivierung schützt.

Es zeigt sich, dass ein Recycling des Enzyms mit Glycerin bis zu dreimal möglich ist und eine Aktivitätssteigerung durch Lagerung in Glycerin erreicht wird. Eventuell kann dies mit dem Modell des „Imprinting“ von Enzymen verglichen werden. Hier werden Enzyme zusammen mit Inhibitoren, Substratanaloga oder nukleophilen Substraten gelagert, meist in lyophilisierter Form [233]. Diese Enzyme weisen danach eine erhöhte Stabilität und Aktivität auf. Eine Hypothese ist die Verhinderung der Bildung von inaktiven Mikrokonformationen des aktiven Zentrums. Eine andere besagt, dass der Aufbau des aktiven Zentrums durch Bindung eines Substratanaloga in eine Konformation gebracht wird, welche die Katalyse favorisiert und fördert [234, 235]. Glycerin kann zum Beispiel in der Synthese von Monoglyceriden als Alkoholkomponente verwendet werden und ist dementsprechend auch ein Substrat der Lipase. Eine Lagerung der Lipase in dem dreiwertigen Alkohol Glycerin, hier als Lösungsmittel verwendet, könnte einen ähnlichen Effekt wie das „Imprinting“ erreichen und somit eine erhöhte Stabilität gewährleisten. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Aktivitätssteigerung durch eine erhöhte Wassermenge erreicht wird, da Wasser als einziges Nebenprodukt der Veresterung gebildet wird. Dieser Aspekt könnte durch weitere Recyclingversuche in DES betrachtet werden, auch hier wird Wasser freigesetzt und müsste daher für eine Aktivitätssteigerung sorgen.

Scale-Up und Aufreinigung

Ein Scale-Up der Reaktion in einem Batch- Reaktor ist möglich und es werden vergleichbar hohe Ausbeuten wie in einem Schüttelkolbenreaktor erhalten, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit

geringer ist. Eine Reaktion im Schüttelkolben erreichte bereits nach 24 h eine Konzentration an Decyloleat von 94 %, zu diesem Zeitpunkt lag die Konzentration im Batch- Reaktor bei circa 50 %. Die Produktion von Decyloleat kann kontinuierlich in einem Coflore- Reaktor durchgeführt werden. Es handelt sich hierbei um eine Art Rührkesselkaskade, in die die Einsatzstoffe mittels zweier Pumpen eingebracht werden. Durch Einstellen des Volumenstroms kann die hydrodynamische Verweilzeit eingestellt werden, somit variiert die Ausbeute am Ausgang des Reaktors. Je länger die Reaktanden im Reaktor verbleiben, desto höher wird die Ausbeute des Produkts. Nach den hier eingestellten 10 h ist das Gleichgewicht der Reaktion noch nicht erreicht, daher sollte eine etwas längere Verweilzeit eingestellt werden. Der Wert der Ausbeute liegt jedoch in derselben Größenordnung, wie für den Versuch im Batch- Reaktor nach 24 h somit kann in kürzerer Zeit dieselbe Ausbeute erreicht werden.

Zwei unterschiedliche Aufreinigungsmethoden, Raffination und Kurzwegdestillation wurden erfolgreich durchgeführt. Es zeigte sich, dass bevorzugt eine Kurzwegdestillation genutzt werden sollte, da hier gleichzeitig Ölsäure und Decanol in hohem Maß abgetrennt werden. Wird lediglich eine Raffination durchgeführt, ist zwar der Ölsäuregehalt geringer, jedoch liegt das im Überschuss eingesetzte Decanol weiterhin im Gemisch vor. Es müssen daher alle Vor- und Nachteile der beiden Methoden in Bezug auf Kosten und geforderter Reinheit der Produkte abgewogen werden. In einigen Fällen dürfen beispielsweise langkettige Fettalkohole in der Formulierung für Kosmetika verbleiben. Für diesen Fall wäre die Raffination zu bevorzugen, da diese im technischen Maßstab deutlich günstiger ist und einen geringeren Energieaufwand benötigt. Die Kurzwegdestillation führt zu einem hochreinen Produkt, ist jedoch eine sehr teure Methode mit hohen Investitionskosten für die Anlage.

IV.3 Herstellung von Biodiesel mittels Enzymkaskade zweier Lipasen

Für die Herstellung von Biodiesel mit einer hohen Reinheit wurde ein Zwei- Stufen Verfahren entwickelt, welches in Abbildung 52 schematisch dargestellt ist. Im grau schraffierten Bereich ist die Reaktion aufgeteilt in die 1. und 2. Stufe abgebildet. In die 1. Stufe werden zu dem Fett bzw. Öl Ethanol, Wasser und eine Base zugegeben und die Reaktion durch Zugabe von Lipozym TL gestartet. Ist diese Reaktion ins Gleichgewicht gelaufen, wird in der 2. Stufe das Lösungsmittel CHCl_3 und das Lipozym CalB zugegeben. Außerhalb des grauen Bereichs wird die Aufreinigung von Biodiesel und Lösungsmittel dargestellt. Nach Trennung der Lösungsmittel- und der Produktphase ist zum einen die Abtrennung von Glycerin aus DES und zum anderen die Aufreinigung des Biodiesel von Ethanol, Wasser und freien Fettsäuren abgebildet. In einführenden Versuchen konnte keine Aktivität der Lipozym TL in DES bei den eingesetzten geringen Wassergehalten detektiert werden. Daher war es nicht möglich, beide Lipasen gleichzeitig in einem Reaktor mit DES als Lösungsmittel einzusetzen, somit wurde das hier vorgestellte Zwei- Stufen Verfahren implementiert.

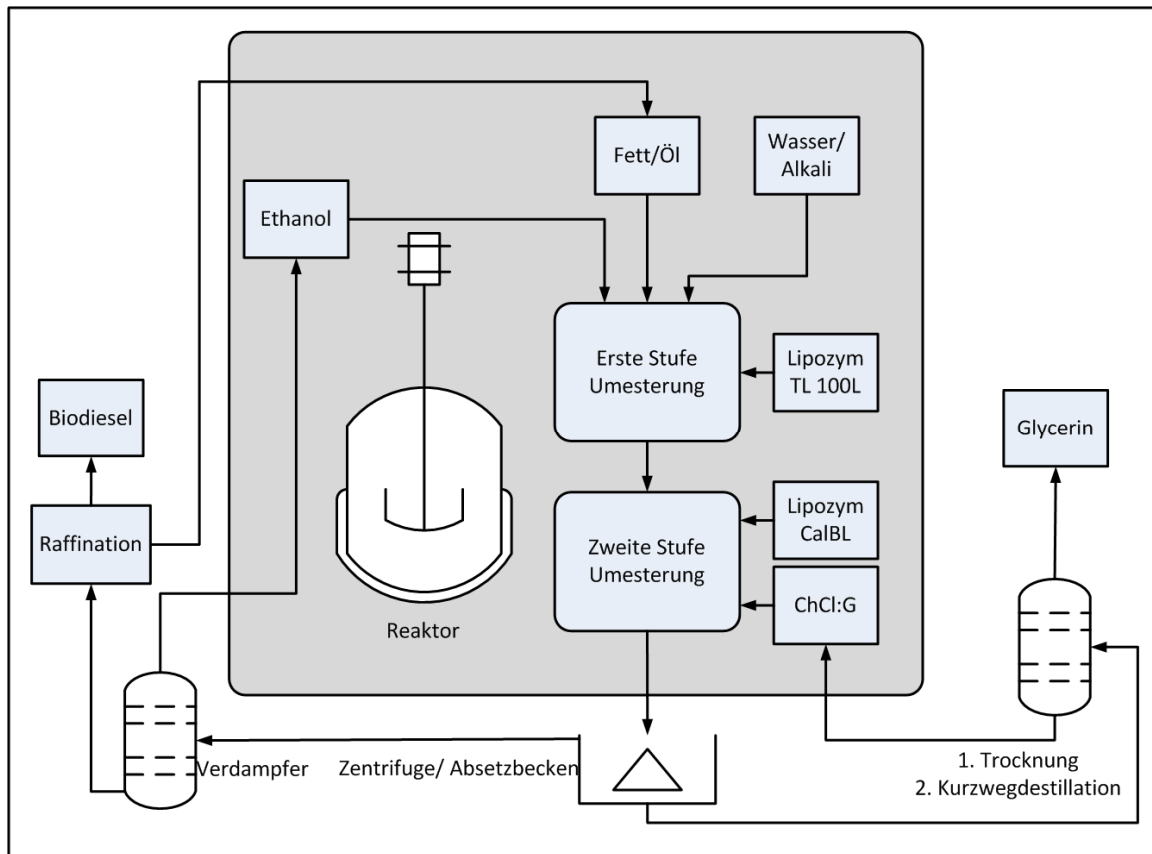


Abbildung 52: Schematische Darstellung des zweistufigen Verfahrens zur Herstellung von Biodiesel
Optimierung der 1. Stufe der Umesterung

Aus der Literatur ist bekannt, dass *Thermomyces* Lipase eine Grenzflächenaktivierung aufweist [236]. Belegt wurde dies durch eine höhere Ausbeute an Biodiesel in der ersten Stufe nach Zugabe von Base (KOH oder Na_2CO_3). Durch Zugabe der Base werden Partialglyceride und Seifen gebildet und die Lipase wird an der Grenzfläche aktiviert [228]. Wird keine Base zugegeben, sind Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute sehr gering. Sobald Base zugegeben wird, sind in dem Endgemisch nach 48 h keine Triglyceride mehr detektierbar. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit wird bei einer Zugabe von 0,05 mmol KOH bzw. von 0,25 mmol Na_2CO_3 erreicht. Wird mehr als 0,1 mmol KOH zugegeben findet keine Reaktion statt, ab hier wird das Enzym deaktiviert. Auffallend ist, dass bei einer höheren Na_2CO_3 Konzentration die Säurezahlen kleiner werden. Vermutlich werden in diesem Fall vermehrt Seifen gebildet, welche nicht mehr durch die Säurezahlmessung detektiert werden und somit nicht zu Biodiesel umgesetzt werden. Eine andere Möglichkeit ist die Bindung des Wassers an Na_2CO_3 , sodass weniger freie Fettsäuren gebildet werden können, diese Fähigkeit wird beispielsweise zur Trocknung von Räumen genutzt. Eine etwa 10-fach niedrigere optimale Konzentration von KOH kann durch die Basenstärke von pK_b von -1,7 im Vergleich zu Na_2CO_3 mit einem pK_b von 3,7 erklärt werden. Laut Literatur handelt es sich bei Lipozym TL um eine sn1,3-spezifische Lipase [32], jedoch

werden Werte für die Ausbeute von mehr als den theoretisch möglichen 66 % erreicht. Dies lässt darauf schließen, dass es zu einer unspezifischen Acylmigration der Fettsäuren auf die sn1,3-Position des Triglycerids kommt oder auch ein geringer Anteil der sn2-ständigen Fettsäuren abgebaut wird.

Die Variation des Enzymgehalts zeigt, dass eine Enzymkonzentration von 1 wt% nicht überschritten werden muss, da ab hier keine höheren Reaktionsraten gemessen wurden. Vermutlich liegt ab diesem Wert eine maximale Ausnutzung des Platzes des Enzyms an der Phasengrenzfläche vor. Die Optimierung der Temperatur für die 1. Stufe zeigt, dass unter einer Temperatur von 30°C das Temperaturoptimum liegen muss, da ab dieser Temperatur die Geschwindigkeit der Reaktion stark abnimmt. Es scheint sehr viel Enzym bei Temperaturen von 45°C deaktiviert zu werden. Bereits ab einer Temperatur von 20°C wird das Enzym langsam deaktiviert, da ab hier die Reaktionsrate abnimmt. Als Standardtemperatur wurde daher 30°C gewählt, da zur Einstellung einer Temperatur von 20 °C in Abhängigkeit der Raum- bzw. Außentemperatur eine aktive Kühlung notwendig ist und diese im Produktionsmaßstab teuer in der Umsetzung ist.

Die Ausbeute an Biodiesel und die Menge an freien Fettsäuren ist abhängig von der Konzentration an Ethanol und Wasser. Diese beiden Substanzen konkurrieren um die Bindestelle am aktiven Zentrum des Enzyms und können mit den am Triglycerid gebundenen Fettsäuren reagieren. Es stellt sich daher ein Gleichgewicht zwischen der Menge des produzierten Biodiesels und des Gehalts der unerwünschten freien Fettsäuren ein. Wird mehr Wasser eingesetzt, steigt zwar die Reaktionsgeschwindigkeit, jedoch werden auch vermehrt freie Fettsäuren gebildet. Diese können in der 2. Stufe zu dem gewünschten Produkt umgesetzt werden.

Optimierung der 2. Stufe der Umesterung

Wird für die 2. Stufe ein hydrophiles Lösungsmittel eingesetzt, kann eine geringere Säurezahl erreicht werden im Vergleich zu einer Reaktion ohne Lösungsmittel. Hier wird ebenfalls die Fähigkeit des DES genutzt, Wasser aus der Mischung zu adsorbieren und somit das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite des gewünschten Produktes zu verschieben. Unter Verwendung des Lösungsmittels ChCl:G ist die gemessene Ausbeute am höchsten und die Säurezahl am geringsten. Es wird bei unterschiedlichen Ethanol- und Wasserkonzentrationen eine anfängliche Diglyceridbildung beobachtet, was auf das komplexe Phasenverhalten der Lösung zurückgeführt werden kann. Monoglyceride besitzen emulgierende Eigenschaften, sodass mehr Glycerin in die Lipidphase gezogen wird und es zu einer konkurrierenden Veresterung der Monoglyceride zu Diglyceriden in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration kommt. Durch zeitgleiche Bildung von Ethylestern und einer daraus resultierenden geringeren Ethanolkonzentration verändert sich das Phasenverhalten erneut, somit findet anschließend eine verstärkte Reaktion der Di- und Monoglyceride zu Biodiesel statt.

Die spezifische Reaktionsrate, welche auf die Menge an eingesetztem Enzym bezogen wird, zeigt, dass das einzelne Enzym bei höheren Einsatzkonzentrationen weniger Umsetzungen katalysiert. Durch den Einsatz von mehr Enzym wird gegebenenfalls die Diffusion der Edukte zum Enzym erschwert und die Reaktionsgeschwindigkeit fällt ab.

Wird bei der gleichzeitigen Variation der DES und Enzymmenge eine größere Menge an DES eingesetzt, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich zu. Durch mehr DES wird die Oberfläche der Zwischenphase vergrößert, sodass mehr Enzym aktiv die Reaktion katalysieren kann. Interessant ist, dass die Ausbeute zwar von der Enzymkonzentration, jedoch kaum von der DES Menge beeinflusst wird. Bei einer Enzymmenge von 2 wt% wird eine höhere Ausbeute erreicht als mit 0,5 wt%. Eigentlich ist zu erwarten, dass die Ausbeute nur von der DES Menge abhängig ist und mit steigender Einsatzmenge an Lösungsmittel sinkt oder steigt. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Enzym zwar mit einer höheren DES-Menge am Anfang der Reaktion eine höhere Reaktionsrate aufweist, durch den vermehrten Einsatz an Lösungsmittel das Enzym jedoch deaktiviert wird und somit die Reaktion nach 48 h noch nicht im Gleichgewicht ist.

Einsatz von Altfetten

Im Hinblick auf die Lebensmittelknappheit ist die Verwendung von Fetten und Ölen, welche nicht mehr von der Nahrungsmittelindustrie verwendet werden eine vielversprechende Alternative. Werden alte, gebrauchte Frittier- oder Bratfette genutzt, kommt es zu einer Kaskadennutzung. Diese Fette werden ansonsten ausschließlich zur Energiegewinnung durch Verbrennung genutzt oder illegal entsorgt [164]. Nach der 1. Stufe liegen die Werte der Ausbeuten und Säurezahlen der Reaktionen mit Altfetten in etwa derselben Größenordnung wie für die Reaktion mit Rapsöl. Es zeigt sich, dass nach der 2. Stufe hohe Ausbeuten von 81 bis 87 % bei Reaktionen mit vier Altfetten mithilfe des Zwei-Stufen Verfahrens erhalten werden können und geringe Säurezahlen nach der 2. Stufe von 1,5-1,7 erreicht werden. Die Ausbeuten der vier Ansätze mit angesäuertem Altfett liegen mit 86-90 % leicht höher, da hier die zudosierte Ölsäure ebenfalls umgesetzt wurde. Die Säurezahlen liegen mit Werten um 1,7-1,8 geringfügig höher. Diese Ausbeuten liegen jedoch leicht unter denen von reinem Rapsöl (94,5 %) und die Säurezahl ist mit 1,02 geringer. In den Altfetten können Reste von Salzen, Wasser oder Fremdkörper, wie beispielsweise Paniermehl enthalten sein, Salze könnten das Enzym deaktivieren. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Phospholipide, welche natürlicherweise enthalten sind, nicht abgebaut werden können.

Recycling von CalB

Lipozym CalB kann zusammen mit dem Lösungsmittel recycelt und für mehrere Umsetzungen genutzt werden. Nach mehreren Recyclingsschritten wird das Enzym durch wiederholte Zugabe des

kurzkettigen Ethanol deaktiviert und die Reaktionsrate sinkt, sodass nach derselben Zeit weniger Produkt entsteht. Daher könnte eine chargenweise Zugabe des Ethanol eine Deaktivierung des Enzyms teilweise verhindern. Eine andere Möglichkeit, die sich negativ auf die Ausbeute der Reaktion auswirkt, ist eine Anreicherung von Glycerin in dem Reaktionsgemisch, daher sollte zwischenzeitlich eine Abtrennung des Glycerins durchgeführt werden. Durch Nutzung eines nativen Enzyms wird dieses durch Abtrennung des Glycerins mithilfe thermischer Verfahren deaktiviert. Wird immobilisiertes Enzym verwendet, könnte dieses vor Abtrennung des überschüssigen Glycerins ebenfalls abgetrennt werden und somit wiederverwendet werden. Der Einsatz von immobilisiertem Enzym ist jedoch nicht möglich, da das DES die Poren des Immobilisats verstopft.

Scale-Up und Aufreinigung

Das Scale-Up der Umsetzung von Altfetten in einem 2 Liter Reaktor ist positiv zu bewerten, da hier vergleichbar hohe Ausbeuten an Biodiesel wie für Reaktionen in Schüttelkolben erreicht werden können. Für die Reaktion im Reaktor wurden die einzelnen Stufen jeweils über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt. Die 2. Stufe im Reaktor läuft langsamer ab, als eine Reaktion im Schüttelkolben und das Gleichgewicht wurde nach 24 h noch nicht erreicht, dies könnte durch ein Verlängern der Reaktionszeit der 2. Stufe ermöglicht werden. Durch Einsatz einer Kombination aus Lipasen und Phospholipasen, wie *Cesarini et al.* es beschreiben, könnte die Ausbeute vor Raffination weiter erhöht werden, da auch die enthaltenen Phospholipide zu Biodiesel umgesetzt werden [180]. Vor einer Raffination wird mittels Evaporation das überschüssige Wasser und Ethanol aus dem Biodiesel abgetrennt. Da als einziges Nebenprodukt freie Fettsäuren entstehen, reicht es hier, im Gegensatz zu der Synthese von Emollients, eine Raffination durchzuführen. Abschließend zeigt Tabelle 36 die Zusammensetzung eines Produktes mit der höchsten Ausbeute an Biodiesel vor und nach Raffination und zum Vergleich die Anforderungen der EN 14214 [151]. Mithilfe der Raffination können mehrere Spezifikationen der EN14214 erreicht werden. Der Gehalt an Biodiesel liegt mit 97,6 % über den mindestens geforderten 96,5 %. Auch die Säurezahl trifft mit einem Wert von 0,15 bzw. 0,18 die Spezifikationen von Werten <0,5. Der Wert des freien Glycerins liegt mit 0,008 wt% deutlich unter den geforderten 0,02 wt%. Lediglich die Gehalte der Glyceride und des totalen Glycerids müssen durch weitere Versuche und Prozessoptimierungen verbessert werden. *Novozymes* verwendet eine genetisch modifizierte Lipase *CalleraTM Trans L* für die Produktion von Biodiesel und erreicht eine Ausbeute von 95,4 % mit einem Säuregehalt von 3,3 wt% [209]. Hier wird unter Einsatz einer geringen Menge an Glycerin die Menge der freien Fettsäuren am Ende der Reaktion reduziert, sodass die Ausbeute an Biodiesel erhöht werden kann. Wird zu viel Wasser entfernt, verliert die Lipase ihre Aktivität. Mit weniger als 1 % freier Fettsäuren ist der Gehalt in diesem vorgestellten Zwei- Stufen Verfahren deutlich geringer.

Tabelle 36: Vergleich des Biodiesels vor und nach Raffination mit den Spezifikationen der EN14214[151]

Parameter	Vor Raffination	Nach Raffination	EN14214
Biodiesel [wt%]	96,4	97,6	96,5
Monoglyceride [wt%]	1,8	1,42	0,7
Diglyceride [wt%]	0,61	0,59	0,2
Triglyceride [wt%]	0,28	0,32	0,2
Freies Glycerin [wt%]	0,04	0,008	0,02
Gesamtglycerin [wt%]	0,62	0,49	0,25
Säurezahl	1,3 / 1,8	0,15 / 0,18	0,5

Die Aufreinigung des ChCl:G von überschüssigem Glycerin wird mithilfe einer Kurzwegdestillation erfolgreich durchgeführt. Hierdurch werden zwei Vorteile erreicht, zum einen kann Glycerin als Wertprodukt mit einer hohen Reinheit erhalten und verkauft werden und zum anderen kann das Lösungsmittel für die Synthese von Biodiesel wiederverwendet werden. Durch eine einfache Messung des Stickstoffgehalts konnte die Reinheit des Glycerins beurteilt werden. Die hier ermittelten Stickstoffgehalte des Glycerins liegen mit 1,71 mg/mL nur leicht über denen von reinem Glycerin (1,32 mg/mL), sodass die Abtrennung von Glycerin erfolgreich war.

IV.4 Weitere technische Synthesen in DES

Synthese von Emulgatoren

Die Synthese von Zuckerestern als Vergleichssubstanzen in 2-Methyl-2-butanol wurde erfolgreich durchgeführt. Wurden DES als Lösungsmittel verwendet, fand jedoch keine Reaktion zu den gewünschten Zuckerestern statt.

Die Synthese zu Monoglyceriden als Vergleichssubstanzen wurde ebenfalls in 2-Methyl-2-butanol durchgeführt. Hier wird ein hohes Verhältnis von Mono- zu Diglyceriden von 2,5 erreicht. Wird ein DES als zweites Lösungsmittel verwendet, so wird das eingesetzte Olivenöl in geringem Maß hydrolysiert und das Verhältnis von Mono- zu Diglyceriden ist mit 0,25 sehr gering, sodass der zusätzliche Einsatz von DES keinen Vorteil bringt, sollen gezielt Monoglyceride hergestellt werden. Das Phasenverhalten beider Reaktionen kann durch die schematische Abbildung 53 erklärt werden. Wird in einer Reaktion lediglich 2-Methyl-2-butanol als Lösungsmittel eingesetzt, befinden sich die Edukte zusammen mit dem Enzym in einer Phase und die Reaktion kann ablaufen. Beispielsweise liegt Glycerin in derselben Phase wie das Olivenöl vor, daher kann hier eine verstärkte Umesterung zu Monoglyceriden beobachtet werden. Die Synthese von Zuckerestern kann ebenfalls ablaufen, jedoch entstehen hauptsächlich Diester. Wird DES als Lösungsmittel eingesetzt, befinden sich die

Edukte in unterschiedlichen Phasen und die Reaktion ist dementsprechend diffusionslimitiert. Glycerin wird nur mit einer sehr geringen Konzentration in der Lipidphase gelöst, somit kann nur begrenzt eine Umesterung stattfinden und es findet somit hauptsächlich eine Hydrolyse des Olivenöls statt und Diglyceride entstehen. Zucker sind mit einer noch geringeren Konzentration in der Lipidphase löslich, daher lag die Reaktion vermutlich unter dem Detektionslimit.

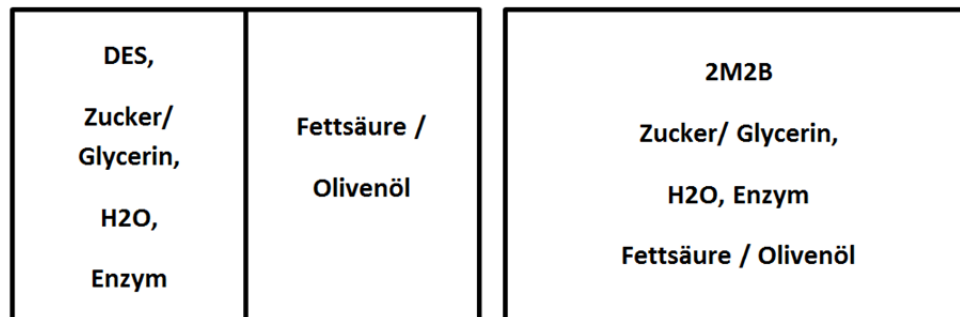


Abbildung 53: Schematische Darstellung des Phasenverhaltens der Synthese von Emulgatoren

Auch der Einsatz von 2-Methyl-2-butanol als Lösungsvermittler in der Synthese von Monoglyceriden kann diese starke Abtrennung der zwei Phasen nicht positiv beeinflussen. Eine Möglichkeit wäre, unter Bildung einer ausreichenden Menge Monoglyceride eine emulgierende Wirkung zu erhalten und somit das starre Phasenverhalten aufzulösen. Eine Idee wäre daher eine geringe Menge der Produkte in den Syntheseansatz einzubringen, um diesen Effekt direkt am Anfang zu erhalten.

Synthese von Schmierstoffen

Es zeigt sich, dass die Synthese von Schmierstoffen durch die Umesterung von Palmfett mit 2-Ethylhexanol mit sehr hohen Ausbeuten mithilfe des Lösungsmittels ChCl:G durchgeführt werden kann. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist hier von der eingesetzten Wassermenge abhängig. Je mehr Wasser zu Beginn der Reaktion eingesetzt wird, desto schneller läuft die Reaktion ab. Bei Wassergehalten von größer als 20 % sind nach 48 h keine Glyceride mehr in der Lösung zu detektieren, sodass ein Umsatz von 100 % erreicht wird. Die Säurezahl nimmt mit steigenden Wassergehalten zu, beispielsweise steigt die Säurezahl bei einem doppelten Einsatz an Wasser (20 zu 40 %) von 4,3 auf 6,0. *Brenneis et al.* erzielte ohne Lösungsmittel deutlich höhere Konzentrationen an unerwünschten freien Fettsäuren [30]. Aus Messungen des Wassergehalts nach Karl-Fischer-Titration wird, vergleichbar mit der Emollient Synthese, ein geringerer Wassergehalt in der Lipidphase der Reaktion mit DES detektiert. Dies zeigt, dass auch für die Synthese von 2-EH- Estern das eingesetzte Wasser durch Adsorption im Lösungsmittel gebunden wird und somit das Gleichgewicht auf die Seite der Estersynthese verschoben wird, wodurch die geringeren Säurezahlen erklärt werden können.

Entsäuerung von Biodiesel und Kokosöl

Die Entsäuerung von Biodiesel und Kokosöl bietet unter Verwendung von ChCl:U deutliche Vorteile gegenüber Reaktionen ohne Lösungsmittel. Die Säurezahlen sinken unabhängig von den untersuchten Parametern unter Verwendung von DES ab. Wird kein DES verwendet, wird eine Zunahme der Säurezahl und somit des Gehalts an freien Fettsäuren gemessen. Da eine freie Lipase verwendet wird, muss eine geringe Menge Wasser zur Verfügung gestellt werden, um die aktive Konformation des Enzyms zu gewährleisten, daher findet eine Hydrolyse der Glyceride bzw. des Biodiesels statt. Wird DES verwendet, kann die Fähigkeit des Lösungsmittels genutzt werden, das Wasser in das Gerüst zu adsorbieren, somit kann die aktive Konformation des Enzyms gewährleistet werden, jedoch keine Hydrolyse als Nebenreaktion stattfinden, stattdessen wird die Veresterung der freien Fettsäuren katalysiert und die Säurezahl nimmt ab.

Bei der Variation des Wassergehalts zeigt sich keine Abhängigkeit für die Entsäuerung von Kokosöl in dem untersuchten Bereich. Für die Entsäuerung von Biodiesel wird die niedrigste Säurezahl für einen Wassergehalt von 1,5 wt% erreicht. Bei der geringsten Wasserzugabe von 0,5 wt% scheint nach 72 h das Gleichgewicht noch nicht erreicht, daher sollten immer höhere Wasserkonzentrationen verwendet werden. Wird der Gehalt der DES bezogen auf die Lipidphase verändert, zeigt sich, dass für die Entsäuerung von Biodiesel der Einsatz von mehr DES einen Vorteil bringt, da hier eine geringere Säurezahl gemessen wird. Eine Erklärung wäre, dass das vergrößerte Volumen die deaktivierende Wirkung des Ethanol auf das Enzym minimiert. Für die Entsäuerung von Kokosöl zeigt sich kein Effekt auf die Säurezahl für einen erhöhten Einsatz von DES.

Es kann mit DES als Lösungsmittel eine schnelle Entsäuerung der zwei Einsatzstoffe erreicht werden. Die restlich verbleibenden freien Fettsäuren können dementsprechend einfach und ohne große Verluste durch Raffination aus dem Biodiesel oder dem Kokosöl entfernt werden.

IV.5 Enzymscreening in DES

Es wurde ein Enzymscreening verschiedener Lipasen in Bezug auf Aktivität und Stabilität in DES durchgeführt. Bisher wurden hauptsächlich immobilisierte Lipasen erfolgreich für den Einsatz in DES verwendet [44, 190, 191, 204]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Einsatz nativer Lipasen, wie der hier verwendeten CalA und CalB aus *P. antarctica* möglich ist. Zur Identifikation anderer aktiver und stabiler Lipasen in hydrophilen Lösungsmitteln wurde daher dieses Screening durchgeführt.

Neben 19 kommerziellen Lipasen wurden zwei aufgereinigte Lipasen (LipA und PlbF) sowie 72 Zellextrakte getestet. Lediglich 0,001-1 % aller Mikroorganismen sind kultivierbar, dies bedeutet somit, dass mehr als 99 % der Organismen und ihre Enzyme nicht einfach gewonnen und untersucht

werden können [69, 237, 238]. Daher wurden spezielle Bibliotheken eingerichtet, in denen Informationen in Form von Gensequenzen zu finden sind, welche nach Klonierung in Wirtszellen exprimiert und auf ihre spezifische Aktivität getestet werden können. Eine Vorauswahl der hier untersuchten Zellextrakte wurde im Hinblick auf Esterasen/Lipasen Aktivität bereits durchgeführt. Zellextrakte 22-37 wurden aus einem Abfluss- Biofilm eines Schlachthofs gewonnen. Zellextrakte 38-93 wurden aus unterschiedlichen Biotopen, wie beispielsweise Tiefseesedimenten aus Meeren und Seen gewonnen (Tabelle 5). Einige wurden in Screenings bereits auf Aktivität zugunsten verschiedener Edukte getestet, wie beispielsweise Zellextrakt 43, der eine Tendenz besitzt, Nitrophenolester umzusetzen [210]. Die Autoren ordneten jedoch alle untersuchten Zellextrakte eher der Esterasen Familie zu [210–214].

In einem Mikrotiterplatten Assay zeigten sich deutlich unterschiedliche Aktivitäten in Tris-HCl Puffer (pH=8) für alle 93 untersuchten Lipasen und Zellextrakte bei der Hydrolyse eines Nitrophenolesters. Hohe Aktivitäten von größer als 100 U/mg werden von den Lipasen aus *P. antarctica* (CaIA), *C. rugosa* (Crug), *B. cepacia* (Bcep), *P. stutzeri* (Pstu) und *P. aeruginosa* (PlbF und LipA) erreicht. Etwa die Hälfte der Zellextrakte weist keine detektierbare Aktivität auf. Entweder handelt es sich um Esterasen, welche lediglich Substrate mit C- Ketten < 10 abbauen können oder die Expression des Enzyms war so gering, dass die Hydrolyseaktivität nicht detektiert werden konnte. Weitere Möglichkeiten sind die Bildung von „Inclusion Bodies“ oder ein pH- Optimum in einem anderen Bereich. Für die übrigen Lipasen werden Werte von 0,3 bis maximal 2621,5 U/mL (Zellextrakt 24) detektiert, 80 % hiervon liegen in einem Bereich zwischen 0,5 und 10 U/mL. Interessant ist hierbei, dass der Zellextrakt 32 eine geringe Aktivität von 9,06 U/mL aufweist, wird jedoch der Lysepuffer mit den Zellbruchstücken auf Aktivität untersucht, weist dieser eine deutlich höhere Aktivität von 69,77 U/mL auf. Gegebenenfalls handelt es sich bei dieser Lipase um eine zellwandassoziierte Lipase und sollte daher in weiteren Arbeiten näher betrachtet werden. Wird die Aktivität und Lagerstabilität der Lipasen und Zellextrakte gemessen, zeigt sich, dass tendenziell die meiste Aktivität in den hydrophilen Lösungsmitteln gemessen wird. Einige kommerzielle Lipasen, wie z.B. aus *Alcaligenes spec.* oder *P. stutzeri* weisen auch in DMSO mit 40 % Wassergehalt hohe prozentuale Aktivitäten und eine gute Lagerstabilität auf. Besonders interessant sind die Lipasen aus *P. expansum* und *P. roqueforti*, da hier in DES eine deutlich höhere Aktivität als in Puffer gemessen wurde. Zu beachten ist jedoch, dass die Aktivität in Puffer sehr gering im Vergleich zu Aktivitäten von anderen vermessenen Lipasen ist. Die Zellextrakte aus Metagenombibliotheken scheinen tendenziell höhere Aktivitäten in ChCl:G und Glycerin mit jeweils 40 % Wasser zu haben, als in ChCl:U. Eventuell besitzen sie eine geringere Resistenz gegen die denaturierende Wirkung von Harnstoff.

Eine besonders interessante Lipase ist LipA aus *P. aeruginosa*, da sie in DES, besonders in ChCl:G mit 40 % Wassergehalt deutliche Aktivitätssteigerungen gegenüber Puffer aufweist und auch bei geringen Wassergehalten eine hohe Aktivität besitzt. Interessant ist insbesondere, dass die Aktivität im Gegensatz zu allen anderen getesteten Lipasen steigt, wenn das Enzym in ChCl:G für 1 h bzw. 24 h gelagert wurde.

Die Auswahl der untersuchten Lipasen für weitergehende Untersuchungen wurde mithilfe zweier Kriterien getroffen. Die Enzyme mussten hohe prozentuale Aktivitäten und Lagerstabilitäten in Bezug auf die Aktivität in Puffer zum Zeitpunkt $t=0$ h in den untersuchten Lösungsmitteln aufweisen und bzw. oder eine hohe Aktivität in Puffer. 13 der kommerziellen Lipasen und beide aufgereinigten Lipasen sowie 19 Zellextrakte wurden für die weiteren Untersuchungen in Lösungsmitteln ausgewählt. Das erste Kriterium erfüllen beispielsweise die Lipase aus *P. roqueforti* oder *P. expansum*, da diese eine geringe Aktivität in Puffer aufweisen, jedoch eine höhere Aktivität in den Lösungsmitteln mit einer guten Lagerstabilität. Das zweite Kriterium wird durch den Zellextrakt 24 erfüllt, da dieser mit 2621 U/mL die höchste Aktivität in Puffer aufwies, jedoch nur eine sehr geringe prozentuale Aktivität in den untersuchten Lösungsmitteln. Beide Kriterien erfüllte beispielsweise die LipA aus *P. aeruginosa*.

Synthesen kommerziell relevanter Ester

Es wurden insgesamt fünf Testreaktionen in Lösungsmitteln durchgeführt, die meisten der kommerziellen Lipasen sowie LipA zeigten eine sehr gute Aktivität, die Zellextrakte waren im gewählten Konzentrationsbereich nicht aktiv. Die kommerziellen Lipasen und LipA sind aufgereinigte Enzyme, welche in hohen Konzentrationen eingesetzt werden konnten. Anhand von SDS- Gelen wurden für die Zellextrakte deutlich geringere Konzentrationen der Lipasen ermittelt. Es konnten daher keine detaillierteren Untersuchungen mit den Metagenom basierten Enzymen durchgeführt werden.

Es zeigt sich, dass einige Lipasen, wie die Lipase B aus *P. antarctica* sowie *B. cepacia*, *C. rugosa*, *R. miehei* und *P. stutzeri* die Synthese von Decyloleat gut katalysieren können und eine hohe Ausbeute erreichen (Tabelle 31). Interessant ist jedoch, dass die Lipase aus *M. javanicus*, welche eine sehr geringe Aktivität in der Hydrolyse von *p*-Nitrophenyldodecanoat aufweist, die Reaktion in ChCl:G und Glycerin mit jeweils 40 % Wassergehalt ebenfalls bis zu Ausbeuten von 62 - 86,5 % katalysieren kann. Ein sekundärer Alkohol, wie Isopropanol wird im Vergleich zum linearen 1-Decanol, mit hoher Aktivität von CalB und begrenzt von CalA als Edukt für die Reaktion zu Isopropylauraten verwendet (Tabelle 32). Dies zeigt das Vermögen von CalB und CalA sekundäre Alkohole umzusetzen [54, 55].

Andere Lipasen bevorzugen an Stelle von Isopropanol das als Lösungsmittel verwendete Glycerin als Alkoholkomponente, somit entstehen Mono- und Diglyceride als Nebenprodukte.

Die Synthese von 2-Ethylhexylestern aus Palmfett wird in der Literatur mit CalA durchgeführt [30]. Die durchgeführten Screenings zeigen, dass mehrere Lipasen, wie beispielsweise LipA, Alc, CalA, Pstu und Bcep ähnliche oder sogar bessere Ergebnisse in den hydrophilen Lösungsmitteln aufweisen. Auffallend ist, dass der Großteil der Lipasen, welcher die Veresterung von Decanol und Ölsäure katalysieren konnte, die Umesterung von Palmfett mit 2-Ethylhexanol nicht katalysiert. Lipasen aus *B. cepacia* und *Alcaligenes spec.* bildeten hier eine Ausnahme, beide sind scheinbar unspezifisch in der Wahl der Edukte. Alle hier erwähnten Lipasen können den verzweigten Alkohol 2-Ethylhexanol ohne eine deutliche Enantioselektivität umsetzen.

Die Synthese von Biodiesel kann durch verschiedene Lipasen, wie z.B. der Lipase aus *T. lanuginosa* (LipoTL) und *P. stutzeri* durchgeführt werden. Erneut zeigt sich, dass die Lipase aus *P. stutzeri* ein hohes Substratspektrum aufweist, da auch der kurzkettige Alkohol Ethanol umgesetzt werden kann. Biodiesel wird durch LipA bevorzugt bei dem geringen Wassergehalt von 25 % mit einer Ausbeute von 80 % in ChCl:G gebildet. Aus der Literatur ist bekannt, dass LipoTL eine hohe Spezifität auf sn1,3-ständige Fettsäuren an Triglyceriden besitzt und somit kein Vollumsatz mit dieser Lipase erreicht werden kann, wie aus dem Kapitel über die Synthese von Biodiesel bekannt ist [32]. Ein deutlich höherer Wassergehalt, als er in dem Zwei-Stufen Verfahren eingesetzt wurde, ist die Erklärung, dass LipoTL Aktivität in DES aufweist. Werden weniger als 40 % Wasser eingesetzt, wies LipoTL auch in diesem Screening keine Aktivität in DES auf.

In der Hydrolyse von Rizinusöl konnte keine besondere Spezifität einer der Lipasen auf Rizinolsäure gefunden werden. Es handelt sich bei der Rizinolsäure um eine ungesättigte Fettsäure, welche an C12 eine Hydroxylgruppe aufweist. Es konnte lediglich für die Lipasen aus *P. stutzeri*, *P. aeruginosa* (LipA) und *P. antarctica* (CalA) beobachtet werden, dass zunächst verstärkt die gesättigten Fettsäuren, sowie Ölsäure hydrolysiert wurden und erst dann die Rizinolsäure.

Vergleichende Untersuchungen mit LipA und CalA

Es ist bekannt, dass CalA zu einer eigenen Hydrolase Superfamilie (abH38) gehört, welche neben der Lipase aus *Candida parapsilosis* die Umesterung von Triglyceriden mit kurzkettigen Alkoholen gegenüber der Hydrolyse bevorzugt [239, 240]. Daher werden sehr geringe Fettsäuregehalte, auch bei hohen Wassergehalten als Nebenreaktion gebildet. Dieser Effekt kann ebenfalls für LipA beobachtet werden und somit wurde ein Vergleich der beiden Enzyme für die beiden Umesterungen zu 2-EH-Estern und Biodiesel unternommen.

Die Variation des Wassergehalts für die Synthese von 2-EH-Estern zeigte hohe Ausbeuten mit einem geringen Gehalt an freien Fettsäuren für beide Enzyme. Unter Verwendung von 20 % Wasser wird eine sehr hohe Ausbeute von 98,7 % durch die Lipase LipA erreicht. Es konnten keine Restglyceride in dem Gemisch detektiert werden und lediglich 1,3 % freie Fettsäuren. Leicht geringere Ausbeuten wurden für die Umesterung durch CalA beobachtet und der Gehalt an freien Fettsäuren war geringfügig höher. LipA und CalA können beide Enantiomere des verzweigten Alkohols 2-Ethylhexanol umsetzen, besitzen also keine Enantioselektivität.

Unter Verwendung von LipA für die Synthese von Biodiesel konnten bei Wassergehalten von 10 % und 25 % keine Triglyceride mehr detektiert werden und eine maximale Ausbeute von 96,8 % wurde erreicht. CalA erreichte eine maximale Ausbeute an Biodiesel von 60 % bei einem Wassergehalt von 25 %. Besonders auffällig ist, dass LipA bei einem geringen Wassergehalt von lediglich 1 % hohe Ausbeuten an Biodiesel erreicht, CalA weist hier keine Aktivität auf. Bei hohen Wassergehalten von 40 % ist LipA weniger aktiv, da hier nach 48 h kein Gleichgewicht erreicht wird, somit scheint das Optimum dieser Lipase bei geringen Wassergehalten zu liegen. Die Ausbeuten an Biodiesel mit LipA sind mit 96,8 % ohne weitere Optimierungen vergleichbar hoch, wie in dem oben beschriebenen 2-Stufen Verfahren mit LipoTL und CalB. Weitere Untersuchungen können insbesondere für die Umesterungen mit LipA erfolgsversprechende Ergebnisse bringen.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte der Einsatz von nativen Lipasen hinsichtlich ihrer Aktivität und Stabilität in hydrophilen Lösungsmitteln evaluiert werden. Als hydrophile Lösungsmittel wurden bevorzugt neuartige „Green Solvents“, sogenannte Deep Eutectic Solvents (DES), verwendet.

In einem Screening von unterschiedlichen DES wurden Cholinchlorid Mischungen mit Harnstoff (ChCl:U) und Glycerin (ChCl:G) als besonders geeignet eingestuft, da sie eine ausreichend geringe Viskosität bei moderaten Temperaturen besitzen. Die nativen Enzyme Lipozym CalA und CalB waren sehr aktiv und stabil in den verwendeten hydrophilen Lösungsmitteln. In Stabilitätsversuchen zeigte sich, dass CalB in Glycerin und ChCl:G bis zu 50 Tage aktiv verbleibt und bei Verwendung von ChCl:U durch Einbringen einer zweiten Phase für 120 h stabilisiert wird. In vergleichenden Reaktionen mit organischen Lösungsmitteln wurde beobachtet, dass das Gleichgewicht einer Synthesereaktion durch den Einsatz von DES auf die Seite des Produkts verschoben wurde. Es wurde beispielsweise mit der nativen CalB eine Ausbeute von >97 % des Esters Decyloleat in DES erreicht, im Vergleich zu maximal 94 % Ausbeute in organischen Lösungsmitteln. Eine Erklärung hierfür kann die wasserziehende Wirkung der hydrophilen DES- Phase sein, die die Konzentration an Wasser in der Lipidphase absenkt. Bestätigt wurde diese Hypothese durch Analyse des Wassergehalts der Lipidphase, welcher für eine Reaktion in DES mit 0,28 mg/mL etwa zehnfach geringer ist im Vergleich zu 2,5 mg/mL ohne DES. In einer aus den Untersuchungsergebnissen abgeleiteten Modellvorstellung findet die enzymatische Reaktion an der Grenzfläche zwischen Lipid- und DES- Phase statt. Freiwerdendes Wasser wird der Lipidphase entzogen und im Wasserstoffbrückenbindungs- System der DES fest gebunden, womit das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte verschoben wird. Eine Stabilisierung des nativen Enzyms an der DES- Lipid- Grenzfläche über Wasserstoffbrückenbindungen zur DES- Phase wird postuliert. Untersuchungen zeigten, dass ein Wassergehalt von 10 % notwendig ist, um eine ausreichende Aktivität und Stabilität zu gewährleisten.

Die gute Aktivität und Stabilität nativer Lipasen in hydrophilen Lösungsmitteln wurde für die Herstellung technisch relevanter Ester genutzt. Hierbei wurden die Synthese von kosmetischen Estern (Emollients) und Zuckerestern sowie Umesterungsreaktionen zur Herstellung von Biodiesel, Schmierstoffen oder Monoglyceriden evaluiert.

Durch Optimierung von Parametern, wie beispielsweise der Temperatur (45-60°C) oder dem Verhältnis von DES zu Lipidphase (1:1 (w/w)) wird eine hohe Ausbeute von 97,3 % Decyloleat ohne aktive Wasserentfernung erreicht. Da die Synthese des kosmetischen Esters annähernd äquimolar durchgeführt wurde, sind eine leichte Aufarbeitung und eine hohe Reaktorausbeute möglich. Mithilfe einer Kurzwegdestillation wurde eine maximale Ausbeute an Decyloleat von 99,7 % erreicht. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das Enzym mit der hydrophilen Phase über Separation

abgetrennt und mindestens dreimal für die Synthese kosmetischer Ester wiederverwendet werden kann.

Für die Synthese von Biodiesel über Umesterung wurde ein zweistufiges enzymatisches Verfahren mit einer Enzymkaskade zweier nativer Lipasen aus *T. lanuginosa* (LipoTL) und *P. antarctica* (CalB) entwickelt und hohe Ausbeuten von 97,6 % an Biodiesel nach Raffination erreicht. In der zweiten Stufe wird das hydrophile ChCl:G eingesetzt und somit die Ausbeute im Vergleich zu einer Reaktion ohne Lösungsmittel um circa 9 % erhöht. Das DES kann mithilfe einer Kurzwegdestillation von Glycerin befreit und für eine erneute Synthese wiederverwendet werden. Durch alkalische Raffination wurde Biodiesel gewonnen, welcher den Spezifikationen der europäischen Biodieselnorm EN14214 hinsichtlich der Ausbeute an Biodiesel und der minimalen Glycerinkonzentration entspricht. Weiterhin konnte Biodiesel mit einer Ausbeute von 88 % ohne Raffination oder weiterer Optimierungen aus vier Altfetten hergestellt werden.

Zur Evaluierung eines breiteren Spektrums an Lipasen für die Katalyse in DES wurde ein Screening von insgesamt 93 Enzymen durchgeführt. Im Anschluss wurden 34 dieser Enzyme für weitere Untersuchungen ausgewählt, welche in diesem initialen Screening hohe Aktivität in Puffer und/oder in einem der untersuchten Lösungsmittel aufwiesen. Beispielsweise konnten fünf der untersuchten Lipasen die Synthese von 2-EH-Estern mit Ausbeuten von > 90 % durchführen (LipA, Alc, CalA, Pstu, Bcep). Neben CalB konnte die Synthese von Decyloleat mit Ausbeuten von mindestens 93 % von den Lipasen aus *T. lanuginosa* und *R. miehei* durchgeführt werden. Insbesondere die nicht kommerziell verfügbare LipA aus *Pseudomonas aeruginosa* zeigte hohe Umsätze an 2-Ethylhexylestern und Biodiesel in DES bei Variation des Wassergehalts. Hierbei konnten beispielsweise Ausbeuten an Biodiesel von 97 %, mit einem sehr geringen Gehalt an freien Fettsäuren von 1 % erreicht werden. Auffallend war, dass LipA im Gegensatz zu allen kommerziell verfügbaren Lipasen bei deutlich geringeren Wassergehalten in DES katalytisch aktiv war.

VI. Summary

The aim of this PhD thesis was the evaluation of the application of native lipases with high activity and stability in hydrophilic solvents. Hydrophilic solvents are for example so-called deep eutectic solvents (DES). In a screening mixtures of choline chloride with urea (ChCl:U) or glycerol (ChCl:G) were most favorable for enzyme transformations due to their low viscosity at moderate temperatures. Native lipases Lipozyme CalA and CalB from *P. antarctica* showed the highest activities and stabilities in these hydrophilic solvents. Stability testing of native CalB exhibited high activity in glycerol and in the ChCl:G mixture over 50 days. In ChCl:U the enzyme can be stabilized for at least 120 h by addition of a second lipid phase. Furthermore synthesis of decyl oleate with native Lipozyme CalB showed higher yields in DES compared to reactions in organic solvents with maximum

yields of > 97 % compared to 94 %. The shift of equilibrium towards the ester product in DES was most probably caused by a water-adsorbing effect. This was further verified by measuring the water content in the lipid phase, which was tenfold lower for reactions in DES with 0,28 mg/ml compared to 2,5 mg/mL without DES. Based on these findings a model was proposed, in which the enzymatic reaction occurs at the interface of the lipid and DES phase and the released water is adsorbed into the DES hydrogen bonds network, thus shifting the equilibrium towards the ester product. Stabilization of the native enzyme at the interface by hydrogen bonding to the DES-phase is postulated and a minimum amount of water of 10 % was determined to gain optimum activity and stability.

The high activity and sufficient stability of native lipases in hydrophilic solvents were utilized for the production of technically relevant esters. The synthesis of cosmetic esters (emollients) and sugar esters as well as transesterification reactions for the production of biodiesel, lubricants or monoglycerides were evaluated. With optimizations of reaction parameters like temperature or DES to lipid ratio high decyl oleate yields of up to 97,3 % were achieved without water removal. Reaction conditions applying nearly equimolar amounts of educts allowed an easy purification with high reactor yields. Using short path distillation decyl oleate of 99,7 % purity was obtained. Additionally, the native enzyme was separated with the hydrophilic solvents and reused successfully three times for the production of cosmetic esters.

High biodiesel yields of 97,6 % were achieved by a two-step transesterification approach with native lipases from *T. lanuginosa* (LipoTL) in step 1 and *P. antarctica* (CalB) in step 2. Hydrophilic ChCl:G was added in the second step and yields were 9 % higher than in reactions without solvents. ChCl:G could be recycled utilizing short path distillation and used for further reaction cycles. After an alkaline refinement step the biodiesel almost reached the specifications of the European biodiesel norm EN14214 for biodiesel content and residual glycerol. It is also possible to use frying oil and grease as starting material with biodiesel yields of around 88 %.

A screening of 93 enzymes was performed to assess the activity and stability of lipases in DES. 34 suitable candidates, which showed high activity and stability in the hydrophilic solvents during the initial screening, were chosen for further testing in ester synthesis and transesterification reactions. Five lipases showed yields greater than 90 % for the synthesis of 2-ethylhexylesters (LipA, Alc, CalA, Pstu, Bcep). Besides CalB, the lipases of *T. lanuginosa* and *R. miehei* could catalyze the reaction towards decyl oleate with yields of higher than 93 %. Especially the non-commercial lipase LipA from *Pseudomonas aeruginosa* showed high yields in transesterification reactions towards biodiesel and 2-ethylhexylesters. Biodiesel was obtained in a yield of 97 % with only 1 % free residual fatty acids. Compared to other commercial lipases LipA remained active at very low water concentrations.

VII. Literaturverzeichnis

- [1] R. Zechner; FAT FLUX: enzymes, regulators, and pathophysiology of intracellular lipolysis, *EMBO Molecular Medicine* **2015**, *7* (4), 359–362.
- [2] K.-E. Jaeger, T. Eggert; Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, *13*, 390–397.
- [3] J. Pfeffer, S. Richter, J. Nieveler, C.-E. Hansen, R. B. Rhlid, R. D. Schmid, M. Rusnak; High yield expression of lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *72* (5), 931–938.
- [4] K. Buchholz, V. Kasche, U. Bornscheuer, Biocatalysts and Enzyme Technology, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2005**.
- [5] L. Casa-Gogoy, S. Duquesne, F. Bordes, G. Sandoval, A. Marty; Lipases: An Overview, In: *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*: 3–30 (Eds: G. Sandoval), Humana Press Inc. New York **2012**.
- [6] R. Verger; Interfacial activation of lipases: facts and artifacts, *Trends in Biotechnology* **1997**, *15*, 23–38.
- [7] P. Trodler, J. Pleiss; Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents, *BMC structural biology* **2008**, *8*, 9.
- [8] N. N. Gandhi; Applications of Lipase, *The Journal of American Oil Chemists' Society* **1997**, *74* (6), 621–634.
- [9] G. P. Rizzi, H. M. Taylor; A Solvent-free Synthesis of Sucrose Polyesters, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1978**, *55*, 398–401.
- [10] A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc; Lipases and their industrial application, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2004**, *118*, 155–170.
- [11] N. Verma, S. Thakur, A. Bhatt; Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review), *International Research Journal of Biological Sciences* **2012**, *1* (8), 88–92.
- [12] K.-E. Jaeger, M. T. Reetz; Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology* **1998**, *16*, 396–403.
- [13] K.-E. Jaeger, S. Ransac, B. Dijkstra, C. Colson, M. vanHeuvel, O. Misset; Bacterial lipases, *FEMS Microbiology Reviews* **1994**, *15*, 29–63.
- [14] L. Brady, A. Brzozowski, Z. Derewanda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. Turkenberg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, L. Thim, U. Menge; A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase, *Nature* **1990**, *434*, 767–770.
- [15] P. Trodler; Untersuchung von Lipasen - Elektrostatik, Selektivität und Einfluss von Lösungsmitteln auf Struktur und Dynamik, *Dissertation*, Universität Stuttgart **2008**.
- [16] D. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. Franken, M. Harel, J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J. Sussmann, K. Verschueren, A. Goldman; The a/b hydrolase fold, *Protein Engineering* **1992**, *5* (3), 197–211.
- [17] K.-E. Jaeger, B. Dijkstra, M. Reetz; Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, *Annual Review of Microbiology* **1999**, *53*, 315–351.
- [18] M. T. Reetz; Lipases as practical biocatalysts, *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6* (2), 145–150.
- [19] J. Pleiss, M. Fischer, M. Peiker, C. Thiele, R. D. Schmid; Lipase engineering database Understanding and exploiting sequence- structure- function relationship, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, *10*, 491–508.
- [20] J. Schrag, T. Vernet, L. Laramee, D. Thomas, A. Recktenwald, M. Okoniewska, E. Ziomek, M. Cygler; Redesigning the active site of *Geotrichum candidum* lipase, *Protein Engineering* **1994**, *8* (8), 835–842.

- [21] J. Pleiss, M. Fischer, R. D. Schmid; Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site, *Chemistry and Physics of Lipids* **1998**, *93*, 67–80.
- [22] Methods in Biotechnology, Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols, Vol. 15 (Eds: E. N. Vulfson, P. Halling, H. Holland), Humana Press Inc., Totawa, New Jersey **2001**.
- [23] J. Pleiss; Molecular Basis of Specificity and Stereoselectivity of Microbial Lipases toward Triacylglycerols, In: *Enzymes in Lipid Modification*: 85–99 (Eds: U. Bornscheuer), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2000**.
- [24] H. Beer, G. Wohlfahrt, J. McCarthy, D. Schomburg, R. Schmid; Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants, *Protein Engineering* **1996**, *9* (6), 507–517.
- [25] S. Naik, A. Basu, R. Saikia, B. Madan, P. Paul, R. Chaterjee, J. Brask, A. Svendesen; Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *65*, 18–23.
- [26] J. Metzger, U. Bornscheuer; Lipids as renewable resources: Current state of chemical and biotechnological conversion and diversification, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *71*, 13–22.
- [27] Y. Linko, M. Lämsä, X. Wu, E. Uosukainen, J. Seppälä, P. Linko; Biodegradable products by lipase biocatalysis, *Journal of Biotechnology* **1998**, *66*, 41–50.
- [28] G. Hills; Industrial use of lipases to produce fatty acid esters, *European Journal of Lipid Science and Technology* **2003**, *105*, 601–607.
- [29] N. Lopez, M. Pernas, L. Pastrana, A. Sanchez, F. Valero, M. Rua; Reactivity of pure candida rugosa lipase isoenzymes (Lip1, Lip2 and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media, *Biotechnology Progress* **2004**, *20*, 65–73.
- [30] R. Brenneis, B. Baeck, G. Kley; Alcoholysis of waste fats with 2-ethyl-1-hexanol using *Candida antarctica* lipase A in a large scale, *European Journal of Lipid Science and Technology* **2004**, *106*, 809–814.
- [31] A. Singh, Mukhopadhyay; Overview of Fungal Lipases: A review, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2012**, *166*, 486–520.
- [32] R. Fernandez-Lafuente; Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *62*, 197–212.
- [33] R. Sharma, Y. Chisti, U. Banerjee; Production, purification, characterization and applications of lipases, *Biotechnology Advanced* **2001**, *19*, 627–662.
- [34] A. Sigmund, W. Hong, R. Shapiro, R. DiCosimo; Chemoenzymatic Synthesis of cis-4-Hydroxy-D-proline, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2001**, *343* (6-7), 587–590.
- [35] S. Ransac, E. Rogalska, Y. Gargouri, A. Deveer, F. Paltauf, G. de Haas, R. Verger; Stereoselectivity of lipases Hydrolysis of enantiomeric glyceride analogues by gastric and pancreatic lipases, a kinetic study using monomolecular film technique, *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 20263–20270.
- [36] H. Kiyota, E. Higashi, T. Koike, T. Oritani; Lipase- catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12* (7), 1035–1038.
- [37] U. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, Hydrolases in organic solvents, 2nd ed., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2006**.
- [38] O. Park, S. Lee; Stereoselective lipases from *Burkholderia* sp., cloning and their application to preparation of methyl (R)-N-(2,6-dimethylphenyl)alaninate, a key intermediate for (R)-Metalaxyl, *Journal of Biotechnology* **2005**, *120* (2), 174–182.
- [39] L. Yon, F. Gonawan, A. Kamaruddin, M. Uzir; Enzymatic Deacemization of (R,S)- Ibuprofen Ester via Lipase- catalyzed Membrane Reactor, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2013**, *52* (27), 9441–9453.
- [40] A. Mustranta; Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen, *Applied microbiology and biotechnology* **1992**, *38* (1), 61–66.

- [41] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones; The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*, *Structure (London, England 1993)* **1994**, *2* (4), 293–308.
- [42] P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M. E. Leser, R. Miller; Lipases at interfaces: a review, *Advances in Colloid and Interface Science* **2009**, *147-148*, 237–250.
- [43] A. Brzozowski, H. Savage, C. Verma, J. Turkenberg, D. Lawson, A. Svendsen, S. Patkar; Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* Lipase, *Biochemistry* **2000**, *39*, 15071–15082.
- [44] E. Durand, J. Lecomte, B. Baréa, G. Piombo, E. Dubreucq, P. Villeneuve; Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions, *Process Biochemistry* **2012**, *47* (12), 2081–2089.
- [45] T. Maruyama, M. Najajima, S. Ichikawa, H. Nabetani, S. Furusaki, M. Seki; Oil-water Interfacial Activation of Lipases for Interesterification of Triglyceride and Fatty Acid, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2000**, *77* (11), 1121–1127.
- [46] P. de Dominguez Maria, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert; Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2005**, *37*, 36–46.
- [47] O. Kirk, M. Würtz Christensen; Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a unique Origin, *Organic Process Research & Development* **2002**, *6*, 446–451.
- [48] H. Monhemi, M. R. Housaindokht, A. A. Moosavi-Mohahedi, M. R. Bozorgmehr; How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea: choline chloride deep eutectic solvents, *Phys Chem Chem Phys* **2014**, *16*, 14882–14893.
- [49] H. Seino, T. Uchibori, T. Nishitani, S. Inamasu; Enzymatic Synthesis of Carbohydrate Esters of Fatty Acid (I) Esterification of Sucrose, Glucose, Fructose and Sorbitol, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1984**, *61* (11), 1761–1765.
- [50] E. Anderson, K. Larsson, O. Kirk; One biocatalyst- Many applications: The use of *Candida antarctica* B- lipase in organic synthesis, *Biocatalysis and Biotransformation* **1998**, *16*, 181–204.
- [51] D. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Berfors, A. Sandström, J.-E. Bäckwell, S. Mowbray; X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation, *Journal of Molecular Biology* **2008**, *376* (1), 109–119.
- [52] B. Stauch, S. Fisher, M. Cianci; Open and closed states of *Candida antarctica* Lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation, *Journal of Lipid Research* **2015**, *In Press*.
- [53] J. Uppenberg, N. Öhrner, M. Norin, K. Hult, G. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T. A. Jones; Crystallographic and Molecular- Modelling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols, *Biochemistry* **1995**, *34*, 16838–16851.
- [54] A. Magnusson, M. Takwa, A. Hamber, K. Hult; An S-Selective lipase was created by rational redesign and the enantioselectivity increased with temperature, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 4582–4585.
- [55] R. Kourist, U. Bornscheuer; Biocatalytic synthesis of optically active tertiary alcohols, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2011**, *91*, 505–517.
- [56] S. Yapoudijan, M. Ivanova, A. Brzozowski, S. Patkar, J. Vind, A. Svendsen, R. Verger; Binding of *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase to the mixed micelles of cis-parinaric acid/NaTDC, *European Journal of Biochemistry* **2002**, *269*, 1613–1621.
- [57] S. Santini, J. Crowet, A. Thomas, M. Paquot, P. Thonart, J. Wathelet, C. Blecker, G. Lognay, R. Brasseur, L. Lins, B. Charlotiaux; Study of *Thermomyces lanuginosa* lipase in the presence of tributylglycerol and water, *Biophysical Journal* **2009**, *96*, 4814–4825.
- [58] A. I. Salis, M. Monduzzi, V. Solinas, P. Adlercreutz; The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adopted for organic media than a typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*, *Biochimica et Biophysica Acta* **2003**, *1646*, 145–151.

- [59] J. Palomo, M. Fuentes, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, J. Guisan, R. Fernandez-Lafuente; General Trend of Lipase to Self-Assemble Giving Bimolecular Aggregates Greatly Modifies the Enzyme Functionality, *Biomacromolecules* **2003**, *4* (1), 1–6.
- [60] K. Jaeger, S. Ransac, H. Koch, F. Ferrato, B. Dijkstra; Topological characterization and modeling of the 3d structure of lipases from *Pseudomonas aeruginosa*, *FEBS Letters* **1993**, *332* (1,2), 143–149.
- [61] M. Nardini, D. Lang, K. Liebeton, K. Jaeger, B. Dijkstra; Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* Lipase in the open conformation, *The Journal of Biological Compounds* **2000**, *275* (40), 31219–31225.
- [62] M. Reetz, K. Jaeger; Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases, *Chemistry and Physics of Lipids* **1998**, *936*, 3–14.
- [63] H. Funken; Physiologische und regulatorische Konsequenzen der Überproduktion einer Lipase in *Pseudomonas*, *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2010**.
- [64] E. Rogalska, C. Cudrey, F. Ferrato, R. Verger; Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases, *Chirality* **1993**, *5* (1), 24–30.
- [65] P. Villeneuve, M. Pina, D. Montet, J. Graille; Determination of lipase specificities through the use of chiral triglycerides and their racemics, *Chemistry and Physics of Lipids* **1995**, *76*, 109–113.
- [66] K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. Dijkstra, M. Reetz, K. Jaeger; Directed evolution of an enantioselective lipase, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 709–718.
- [67] M. Reetz, S. Wilensek, D. Zha, K. Jaeger; Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple- Cassette Mutagenesis, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (19), 3589–3591.
- [68] F. Hasan, A. A. Shah, A. Hameed; Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, *39*, 235–251.
- [69] A. Hidalgo, U. Bornscheuer; Directed Evolution of Lipases and Esterases for Organic Synthesis, In: *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*: 159–179 (Eds: R. Patel), CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL **2007**.
- [70] G. Imperato; New organic solvents based on Carbohydrates, *Dissertation*, Universität Regensburg / Università degli studi di Pisa **2006**.
- [71] A. Zaks, A. M. Klibanov; Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, *82* (10), 3192–3196.
- [72] G. Castro, T. Knubovets; Homogeneous Biocatalysis in Organic Solvents and Water-Organic Mixtures, *Critical Reviews in Biotechnology* **2003**, *23* (3), 195–231.
- [73] E. F.-M. A. Rubio, A. M. Klibanov; Effect of the solvent on enzyme regioselectivity, *Journal of American Chemical Society* **1991**, *113*, 695–696.
- [74] R. Affleck, Z. Xu, V. Suzawa, K. Focht, D. Clark, J. Dordick; Enzymatic catalysis and dynamics in low- water environments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, 1100–1104.
- [75] J. Broos, A. Visser, J. Engbersen, W. Verboom, A. van Hoek, D. Reinhoudt; Flexibility of enzymes suspended in organic solvents probed by time- resolved fluorescence anisotropy, *Journal of American Chemical Society* **1995**, *117*, 12657–12663.
- [76] R. Valivety, P. Halling, A. Macrae; Reaction rate suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents, *Biochimica et Biophysica Acta* **1992**, *1118*, 218–222.
- [77] A. Zaks, A. M. Klibanov; The effect of water on enzyme action in organic media, *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, *17*, 8017–8021.
- [78] T. Anthonsen, B. Sjursnes; Importance of water activity for enzyme catalysis in non- aqueous organic systems, In: *Methods and Tools in Biosciences and Medicine*: 14–35, Methods in Non Aqueous enzymology (Eds: M. Gupta), Birkhäuser Verlag. Basel, Schweiz **2000**.

- [79] R. Branco, M. Graber, V. Denis, J. Pleiss; Molecular Mechanism of the Hydration of *Candida antarctica* lipase B in the gas phase: Water adsorption isotherms and molecular dynamics simulations, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2913–2919.
- [80] K. Fischer; Neues Verfahren zur maßanalytischen Bestimmung des Wassergehalts von Flüssigkeiten und festen Körpern, *Angewandte Chemie* **1935**, *48* (26), 394–396.
- [81] P. Halling; Organic liquids and biocatalysts: theory and practice, *Trends in Biotechnology* **1989**, *7*, 50–52.
- [82] A. Petterson, P. Adlercreutz, B. Mattiason; A water activity control system for enzymatic reactions in organic media, *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, *97* (2), 235–239.
- [83] G. Bell, P. Halling, L. May, B. Moore, D. Robb, R. Ulijn, R. Valivety; Methods for Measurement and Control of Water in Nonaqueous Biocatalysis, In: *Methods in Biotechnology: 105–126*, Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols, Vol. 15 (Eds: E. N. Vulfson, P. Halling, H. Holland), Humana Press Inc. Totawa, New Jersey **2001**.
- [84] R. Valivety, P. Halling, A. Macrae; Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media, *Biotechnology Letters* **1993**, *15* (11), 1133–1138.
- [85] E. Wehtje, P. Adlercreutz; Lipases have similar water activity profiles in different reactions, *Biotechnology Letters* **1997**, *11* (6), 537–540.
- [86] R. Valivety, P. Halling, A. Peilow, A. Macrae; Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media, *European Journal of Biochemistry* **1994**, *222*, 461–466.
- [87] E. Wehtje, P. Adlercreutz; Water Activity Control in Organic Media by Equilibration Through Membranes, In: *Methods in Biotechnology: 127–134*, Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols, Vol. 15 (Eds: E. N. Vulfson, P. Halling, H. Holland), Humana Press Inc. Totawa, New Jersey **2001**.
- [88] F. Plou, M. Barandiaran, M. Calvo, A. Ballesteros, E. Pastor; High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein, *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, *18*, 66–71.
- [89] M. Kamori, T. Hori, Y. Yamashita, Y. Hirose, Y. Naoshima; Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics support, toyonite, and the reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, *9*, 269–274.
- [90] J. Bosley, A. Peilow; Immobilization of lipases for use in non- aqueous reaction systems, In: *Methods and Tools in Biosciences and Medicine: 52–69*, Methods in Non Aqueous enzymology (Eds: M. Gupta), Birkhäuser Verlag. Basel, Schweiz **2000**.
- [91] P. Adlercreutz; Immobilisation and application of lipases in organic media, *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 6406–6436.
- [92] G. Fernandez-Lorente, Terreni, ., C. Mateo, A. Bastida, R. Fernandez-Lafuente, P. Dalmases, J. Hugueta, J. Guisan; Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilisation: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase, *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *28*, 389–396.
- [93] R. A. Sheldon; Immobilization of Enzymes as Cross- Linked Enzyme Aggregates: A Simple Method for Improving Performance, In: *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries: 351–362* (Eds: R. Patel), CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL **2007**.
- [94] G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, P. Armisen, P. Sabuquillo, C. Mateo, J. Guisan; Engineering of enzymes via immobilization and post- immobilization techniques: Preparation of enzyme derivatives with improved stability in organic media, In: *Methods and Tools in Biosciences and Medicine: 37–51*, Methods in Non Aqueous enzymology (Eds: M. Gupta), Birkhäuser Verlag. Basel, Schweiz **2000**.
- [95] J. Khan, E. N. Vulfson; Microencapsulation of Enzymes and Cells for nonaqueous Biotransformations, In: *Methods in Biotechnology: 31–40*, Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols, Vol. 15 (Eds: E. N. Vulfson, P. Halling, H. Holland), Humana Press Inc. Totawa, New Jersey **2001**.
- [96] D. Sharma, B. Sharma, A. Shukla; Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review, *Biotechnology* **2011**, *10* (1), 23–40.

- [97] R. D. Schmid, R. Verger; Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 1608–1633.
- [98] U. Schörken, P. Kempers; Lipid biotechnology: Industrially relevant production processes, *European Journal of Lipid Science and Technology* **2009**, *111*, 627–645.
- [99] H. Cai, Y. Li, M. Zhao, G. Fu, J. Lai, F. Feng; Immobilization, Regiospecificity Characterization and Application of *Aspergillus oryzae* Lipase in the Enzymatic Synthesis of the Structured Lipid 1,3-Dioleoyl-2-Palmitoylglycerol, *Public Library of Science One* **2015**, *10* (7).
- [100] C. Akoh, X. Xu; Enzymatic Production of betapol and Other Specialty Fats, In: *Lipid Biotechnology*: 461–478 (Eds: T. Kuo, H. Gardner), Marcel Dekker, Inc. New York **2002**.
- [101] S. Kadivar, N. de Clercq, D. van de Walle, K. Dewettinck; Optimisation of enzymatic synthesis of cocoa butter equivalent from high oleic sunflower oil, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2014**, *94* (7), 1325–1331.
- [102] K. Liu, H. Chang; Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase, *Food Chemistry* **2007**, *100* (4), 1303–1311.
- [103] A. Macrae; Lipase- Catalyzed Interesterification of Oils and Fats, *Journal of American Oil Society* **1983**, *60*, 291–294.
- [104] S. Bloomer, P. Adlercreutz, B. Mattiasson; Triglyceride Interesterification by Lipases. 1. Cocoa Butter Equivalents From a Fraction of Palm Oil, *Journal of American Oil Society* **1990**, *67* (8), 519–524.
- [105] F. Padley; Chocolate and Confectionary Fats, In: *Lipid Technologies and Applications*: 391–432 (Eds: F. Gunstone, F. Padley), Marcel Dekker, Inc. New York.
- [106] A. Rozendaal, A. Macrae; Interesterification of Oils and Fats, In: *Lipid Technologies and Applications*: 223–264 (Eds: F. Gunstone, F. Padley), Marcel Dekker, Inc. New York.
- [107] I. Mohamed; Lipase-catalyzed acidolysis of palm mid fraction oil with palmitic and stearic Fatty Acid mixture for production of cocoa butter equivalent, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2013**, *171* (3), 655–666.
- [108] D. Cowan; Enzymes in lipid production and modification- Current knowledge and future perspectives, *Lipid Technology* **2008**, *20* (10).
- [109] R. Diks, J. Bosley; The Exploitation of Lipase Selectivities for the Production of Acylglycerols, In: *Enzymes in Lipid Modification*: 3–22 (Eds: U. Bornscheuer), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim **2000**.
- [110] Y. Shimada, A. Sugihara, Y. Tominaga; Production of Functional Lipids Containing Polyunsaturated Fatty Acids with Lipases, In: *Enzymes in Lipid Modification*: 128–147 (Eds: U. Bornscheuer), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim **2000**.
- [111] P. Bispo, I. Batista, R. Bernardino, N. Bandarra; Preparation of triacylglycerols rich in omega-3-fatty acids from sardine oil using rhizomucor miehei lipase: Focus in the EPA/DHA ratio, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2014**, *172* (4), 1866–1881.
- [112] T. Lee, R. Hoover, J. Williams, R. Sperling, J. Ravalese, B. Spur, D. Robinson, E. Corey, R. Lewis, K. Austen; Effect of Dietary Enrichment with Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on in Vitro Neutrophil and Monocyte Leukotriene Generation and Neutrophil Function, *The New England Journal of medicine* **1985**, *312*, 1217–1224.
- [113] P. Odman, L. Wessjohann, U. Bornscheuer; Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of acyloins, *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70* (23), 9551–9555.
- [114] B. Zhu, J. Panek; Total synthesis of epothilone A, *Organic Letters* **2000**, *2* (17), 2575–2578.
- [115] H. Zhang, Y. Wang, C. Ching; R-stereopreference analysis of lipase Novozym 435 in kinetic resolution of flurbiprofen, *Chirality* **2007**, *19* (4), 245–249.
- [116] B. Yeniad, H. Naik, A. Heise; Lipases in polymer chemistry, *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **2011**, *125*, 69–95.
- [117] V. Farrugia, J. Wosnick, K. Pouw, P. Gerroir; Polyester synthesis, *EP 2 116 608 A2*.
- [118] S. Kobayashi; Lipase- catalyzed polyester synthesis- A green polymer chemistry, *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **2010**, *86*, 338–365.

- [119] I. Wolf, C. Meinardi, C. Zalazar; Production of flavour compounds from fat during cheese ripening by action of lipases and esterases, *Protein and Peptide Letters* **2009**, *16* (10), 1235–1243.
- [120] M. Ansorge-Schumacher, O. Thum; Immobilised lipases in the cosmetics industry, *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 6475–6490.
- [121] V. Heinrichs, O. Thum; Biocatalysis for the production of care specialties, *Lipid Technology* **2005**, *17* (4), 82–87.
- [122] R. Mühlhausen, A. Jupke, A. Mehrwald; Verfahrensentwicklung einer enzymkatalysierten Fettsäureveresterung mittels Prozeßsimulation, *Fett/Lipid* **1997**, *99* (11), 392–399.
- [123] R. Kourist, F. Hollmann, G. Nguyen; Lipases as sustainable biocatalysts for the sustainable industrial production of fine chemicals and cosmetics, *JSM Biotechnology and Biomedical Engineering* **2014**, *2* (1), 1029.
- [124] O. Thum, Biokatalyse - Eine nachhaltige Methode zur Herstellung kosmetischer Ester, <http://archiv.aktuelle-wochenschau.de/2008/woche40/woche40.html> **2015**. 07.09.2015.
- [125] O. Thum, K. M. Oxenboll; Biocatalysis- A sustainable method for the production of emollient esters, *SÖFW Journal* **2008**, *134*, 44–47.
- [126] J. Aracil, M. Vicente, M. Martinez, M. Poulina; Biocatalytic processes for the production of fatty acid esters, *Journal of biotechnology* **2006**, *124* (1), 213–223.
- [127] R. Brenneis, B. Baeck; Esterification of fatty acids using *Candida antarctica* lipase A in water-abundant systems, *Biotechnology Letters* **2012**, *34*, 1459–1463.
- [128] H. Wichmann, M. Bahadir; Bio-based Ester Oils for Use as Lubricants in Metal Working, *Clean* **2007**, *35* (1), 49–51.
- [129] J. Hesselbach, C. Herrmann, R. Bock, T. Dettmer, G. Kley, P. Köcher, R. Brenneis, R. Meyer-Pittroff, O. Falk, A. Hansen; Kühlschmierstoffe aus technischen tierischen Fetten und Altspeisefetten - Herstellung, Technologie und Ökobilanzierung, *Transkript (Sonderheft, Nachhaltige Biokatalyse)* **2003**, 24–27.
- [130] P. Choudhury, B. Bhunia; Industrial application of lipases: A review, *Biopharm Journal* **2015**, *1* (2), 41–47.
- [131] U. Bornscheuer; Lipase-katalysierte Synthese von Monoglyceriden, *Fat Science Technology* **1995**, *97* (7/8), 241–249.
- [132] P. Fregolente, G. Pinto, M. Wolf-Maciel, R. Filho; Monoglyceride and diglyceride production through lipase-catalyzed glycerolysis and molecular distillation, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, *160* (7), 1879–1887.
- [133] C. Martinez, J. Vinay, R. Brieva, C. Hill, H. Garcia; Preparation of mono- and diacylglycerols by enzymatic esterification of glycerol with conjugated linoleic acid in hexane, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2005**, *125* (1), 63–75.
- [134] J. Pfeffer, A. Freund, R. Bel-Rhliid, C. Hansen, M. Reuss, R. Schmid, S. Maurer; Highly efficient enzymatic synthesis of 2-monoacylglycerides and structured lipids and their production on a technical scale, *Lipids* **2007**, *42* (10), 947–953.
- [135] S. Wongsakul, P. Prasertsan, U. Bornscheuer, A. H-Kittikun; Synthesis of 2-monoglycerides by alcoholysis of palm oil and tuna oil using immobilized lipases, *European Journal of Lipid Science and Technology* **2003**, *105*, 67–73.
- [136] R. O. Feuge, H. J. Zeringue, T. J. Weiss, M. Brown; Preparation of Sucrose Esters by Interesterification, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1970**, *47*, 56–60.
- [137] A. Ducret, A. Giroux, M. Trani, R. Lortie; Characterization of enzymatically prepared biosurfactants, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1996**, *73*, 109–113.
- [138] A. Gumel, M. Annuar, T. Heidelberg, Y. Chisti; Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters, *Process Biochemistry* **2011**, *46*, 2079–2090.
- [139] J. Kennedy, H. Kumar, P. Panesar, S. Marwaha, R. Goyal, A. Parmar, Kaur. S; Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2006**, *81*, 866–876.

- [140] S. Furukawa, Y. Akiyoshi, G. O'Toole, H. Ogihara, Y. Morinaga; Sugar fatty acid ester inhibit biofilm formation by food-borne pathogenic bacteria, *International Journal of Food Microbiology* **2010**, *138* (1-2), 176–180.
- [141] A. Janssen, C. Klabbers, M. Franssen, K. van't Riet; Enzymatic synthesis of carbohydrate esters in 2-pyrrolidone, *Enzyme and Microbial Technology* **1991**, *13*, 565–572.
- [142] J. Chopineau, D. McCafferty, M. Therisod, A. M. Klibanov; Production of Biosurfactants from Sugar Alcohols and Vegetable Oils Catalyzed by Lipases in a Nonaqueous Medium, *Biotechnology and Bioengineering* **1988**, *31*, 208–214.
- [143] M. Ferrer, J. Soliveri, F. Plou, N. Lopez-Cortes, D. Reyes-Duarte, M. Christensen, J. Copa-Patino, A. Ballesteros; Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties, *Enzyme and Microbial Technology* **2005**, *36*, 391–398.
- [144] M. Ferrer, G. Perez, F. Plou, J. Castell, A. Ballesteros; Anti-tumor activity of fatty acid maltotriose esters obtained by enzymatic synthesis, *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2005**, *42*, 35–39.
- [145] A. Ducret, A. Giroux, M. Trani, R. Lortie; Enzymatic preparation of biosurfactants from sugar or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure, *Biotechnology and Bioengineering* **1995** (48), 214–221.
- [146] M. Ferrer, M. Cruces, M. Berbanbe, A. Ballesteros, F. Plou; Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixture, *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, *65* (1), 10–16.
- [147] R. Ye, S. Pyo, D. Hayes; Lipase-Catalyzed Synthesis of Saccharide-Fatty Acid Esters Using Suspensions of Saccharide Crystals in Solvent-Free Media, *Journal of the American Oil Society* **2010**, *87*, 281–293.
- [148] R. Ye, D. Hayes; Optimization of the solvent-free lipase- catalyzed synthesis of fructose-oleic acid ester through programming of water removal, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2011**, *88*, 1351–1359.
- [149] Z. Yang, Z. Huang; Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids, *Catalysis Science & Technology* **2012**, *2*, 1767–1775.
- [150] ASTM International, Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels, ASTM International, West Conshohocken, PA, 75.160.20 (D6751-15), www.astm.org.
- [151] Deutsches Institut für Normung e.V., Flüssige Mineralölerzeugnisse - Fettsäure-Methylester (FAME) zur Verwendung in Dieselmotoren und als Heizöl - Anforderungen und Prüfverfahren **2014** (14214).
- [152] P. Nielsen, J. Brask, L. Fjerbaek; Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations, *European Journal of Lipid Science and Technology* **2008**, *110*, 692–700.
- [153] M. Adamczak, U. Bornscheuer, W. Bednarski; The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel, *European Journal of Lipid Science and Technology* **2009**, *111*, 808–813.
- [154] A. Guldhe, B. Singh, T. Mutanda, K. Permaul, F. Bux; Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2015**, *41*, 1447–1464.
- [155] X. Fan, X. Niehus, G. Sandoval; Lipases as Biocatalyst for biodiesel production, In: *Methods in molecular biology*: 471–483, Vol. 861, Lipases and Phospholipases, Vol. 861 (Eds: J. Walker), Humana Press Springer Science +Business Media. New York **2012**.
- [156] T. Tan, J. Lu, K. Nie, L. Deng, F. Wang; Biodiesel production with immobilized lipase: A review, *Biotechnology Advanced* **2010**, *28*, 628–634.
- [157] J. van Gerpen; Biodiesel processing and production, *Fuel Processing Technology* **2005**, *86*, 1097–1107.
- [158] M. Soumanou, U. Bornscheuer; Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil, *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, *33* (1), 97–103.

- [159] P. Lv, X. Wang, Z. Yuan, T. Tan; Conversion of Soybean Oil to Biodiesel Fuel with Immobilized *Candida* Lipase on Textile Cloth, *Energy Sources, Part A* **2008**, *30* (9), 872–879.
- [160] K.-T. Lee, T. Foglia, K.-S. Chang; Production of Alkyl Ester as Biodiesel from Fractionated Lard and Restaurant Grease, *Journal of American Oil Chemists' Society* **2002**, *79* (2), 191–195.
- [161] A. Lara Pizarro, E. Park; Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth, *Process Biochemistry* **2003**, *7* (6), 1077–1082.
- [162] F. Xue, X. Zhang, H. Luo, T. Tan; A new methods for preparing raw material for biodiesel production, *Process Biochemistry* **2006**, *41* (7), 1699–1702.
- [163] S. Pinzi, D. Leiva-Candia, I. Lopez-Garcia, M. Redel-Macias, M. Dorado; Latest trends in feedstocks for biodiesel production, *Biofuels, Bioproduction & Biorefining* **2014**, *8*, 126–143.
- [164] S. Al-Zuhair, A. Almenhali, I. Hamad, M. Alshehhi, N. Alsuwaidi, S. Mohamed; Enzymatic production of biodiesel from used/waste vegetable oils: Design of a pilot plant, *Renewable Energy* **2011**, *36* (10).
- [165] E. Hernandez-Martin, C. Otero; Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM, *Bioresource Technology* **2008**, *99* (2), 277–286.
- [166] M. Raita, V. Champreda, N. Laosiripojana; Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert-butanol system, *Process Biochemistry* **2010**, *45* (6), 829–834.
- [167] L. Nelson, T. Foglia, W. Mamer; Lipase- Catalyzed Production of Biodiesel, *Journal of American Oil Chemists' Society* **1996**, *73* (9), 1191–1195.
- [168] U. Onken, A. Behr, *Chemische Prozesskunde: Lehrbuch der Technischen Chemie, Band 3*, Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2003**.
- [169] K. Jegannathan, C. Eng-Seng, P. Ravindra; Economic assessment of biodiesel production: Comparison of alkali and biocatalyst processes, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2011**, *15*, 745–751.
- [170] E. Aguiéiras, E. Cavalcanti-Oliveira, D. Freire; Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases, *Fuel Processing Technology* **2015**, *159*, 52–67.
- [171] M. Mittelbach; Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1990**, *67* (3), 168–170.
- [172] M. Talukder, S. Tamalampudy, C. Li, L. Yanglin, J. Wu, A. Kondo; An improved method of lipase preparation incorporating both solvent treatment and immobilization onto matrix, *Biochemical Engineering Journal* **2007**, *33*, 60–65.
- [173] O. Orcaire, P. Buisson, A. Pierre; Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2006**, *42* (3-4), 106–113.
- [174] P. Shao, X. Meng, J. He, P. Sun; Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock, *Food and Bioproducts Processing* **2008**, *86* (4), 283–289.
- [175] A. Hsu, K. Jones, T. Foglia, W. Mamer; Optimization of alkyl ester production from grease using a phyllosilicate sol-gel immobilized lipase, *Biotechnology Letters* **2003**, *25* (20), 1713–1716.
- [176] N. Dizge, B. Keskinler; Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase, *Biomass and Bioenergy* **2008**, *32* (12), 1274–1278.
- [177] Y. Shimada, Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, Y. Tominaga; Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1999**, *76* (7), 789–793.
- [178] R. Maceiras, M. Vega, C. Costa, P. Ramos, M. Marquez; Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil, *Fuel Processing Technology* **2009**, *88*, 2130–2134.
- [179] A. Pedersen, M. Nordblad, P. Nielsen, J. Woodley; Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *105*, 89–94.

- [180] S. Cesarini, P. Diaz, P. Nielsen; Exploring a new, soluble lipase for FAMEs production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock, *Process Biochemistry* **2013**, *48*, 484–487.
- [181] S. Cesarini, R. Falkenberg Haller, P. Diaz, P. Nielsen; Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils, *Biotechnology for Biofuels* **2014**, *7*, 29.
- [182] A. P. Abbott, G. Capper, D. Davies, H. Munro, R. Rasheed, V. Tambyrajah; Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains, *Chemical Communications* **2001**, 2010–2011.
- [183] C. A. Nkuku, R. J. LeSuer; Electrochemistry in Deep Eutectic Solvents, *The Journal of Physical Chemistry* **2007**, *111*, 13271–13277.
- [184] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah; Novel Solvent Properties of Choline Chloride/ Urea Mixtures, *Chemical Communications* **2003**, 70–71.
- [185] Q. Zhang, K. Vigier, S. Royer, F. Jerome; Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 7108–7146.
- [186] A. P. Abbott, R. C. Harris, K. S. Ryder, C. D'agostino, L. F. Gladden, M. D. Mantle; Glycerol eutectics as sustainable solvent systems **2011** (*13*), 82–90.
- [187] M. Hayyan, M. A. Hashim, A. Hayyan, M. A. Al-Saadi, I. M. AlNashef, M. E. Mirghani, O. K. Saheed; Are deep eutectic solvents benign or toxic?, *Chemosphere* **2013**, *90*, 2193–2195.
- [188] P. Anastas, J. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford.
- [189] A. P. Abbott, P. M. Cullis, M. J. Gibson, R. C. Harris, E. Raven; Extraction of glycerol from biodiesel into a eutectic based ionic liquid, *Green Chemistry* **2007** (*9*), 868–872.
- [190] J. T. Gorke, F. Sreenc, R. J. Kazlauskas; Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents, *Chemical Communications* **2008**, 1235–1237.
- [191] E. Durand, J. Lecomte, P. Villeneuve; Deep eutectic solvents: Synthesis application and focus on lipase-catalyzed reactions, *European Journal of Lipid Science and Technology* **2013**, *115*, 379–385.
- [192] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah; Quaternary ammonium zinc- or tin-containing ionic liquids: water insensitive, recyclable catalysts for Diels-Alder reactions, *Green Chemistry* **2002** (*4*), 24–26.
- [193] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed; Ionic Liquids Based upon Metal Halide/Substituted Quaternary Ammonium Salt Mixtures, *Inorganic Chemistry* **2004**, *43* (*11*), 3447–3452.
- [194] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed; Ionic liquid analogues formed from hydrated metal salts, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2004**, *10* (*15*), 3769–3774.
- [195] A. P. Abbott, T. J. Bell, S. Handa, B. Stoddart; O-Acetylation of cellulose and monosaccharides using a zinc based ionic liquid, *Green Chemistry* **2005**, *7*, 705–707.
- [196] Z. Maugeri, P. de Dominguez Maria; Novel choline-chloride-based deep-eutectic-solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols, *RSC Advances* **2012**, *2*, 421–425.
- [197] J. van Spronsen; Reactions and Separations in Green Solvents, *Dissertation*, Technische Universitat Delft **2010**.
- [198] A. Hayyan, F. Mjalli, I. AlNashef, T. Al-Wahaibi, Y. Al-Wahaibi, M. Hashim; Fruit sugar- based deep eutectic solvents and their physical properties, *Thermochimica Acta* **2012**, *541*, 70–75.
- [199] A. Hayyan, F. Mjalli, I. AlNashef, Y. Al-Wahaibi, T. Al-Wahaibi, M. Hashim; Glucose- based deep eutectic solvents: Physical properties, *Journal of Molecular Liquids* **2013**, *178*, 137–141.
- [200] Y. H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I. Arends, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte; Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?, *Plant Physiology* **2011**, *156*, 1701–1705.
- [201] S. Handy, K. Lavender; Organic synthesis in deep eutectic solvents: Paal-Knorr reactions, *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*, 4377–4379.

- [202] D. Lindberg, M. de La Fuente Revenga, M. Widersten; Deep eutectic solvents (DESs) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis, *Journal of Biotechnology* **2010**, *147*, 169–171.
- [203] C. Vidal, L. Merz, J. Garcia-Alvarez; Deep eutectic solvents: biorenewable reaction media for Au(I)-catalysed cycloisomerisations and one-pot tandem cycloisomerisation/Diels–Alder reactions, *Green Chemistry* **2015**, *17* (7), 3870–3878.
- [204] H. Zhao, C. Zhang, T. D. Crittle; Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, *85–86*, 243–247.
- [205] E. Durand, J. Lecomte, B. Baréa, E. Dubreucq, R. Lortie, P. Villeneuve; Evaluation of deep eutectic solvent-water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids, *Green Chemistry* **2013**, *15*, 2275–2282.
- [206] A. Wolfson, C. Dlugy, D. Tavor, J. Blumenfeld, Y. Shotland; Baker's yeast catalyzed asymmetric reduction in glycerol, *Tetrahedron Letters* **2006**, *17*, 2043–2045.
- [207] Y. Gu, F. Jerome; Glycerol as a sustainable solvent for green chemistry, *Green Chemistry* **2010**, *12*, 1127–1138.
- [208] C. Dlugy, A. Wolfson; Lipase catalyze glycerolysis for kinetic resolution of racemates, *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2007**, *30*, 327–330.
- [209] Y. Watanabe, T. Nagao, Y. Nishida, Y. Takagi, Y. Shimada; Enzymatic Production of Fatty Acid Methyl Esters by Hydrolysis of Acid Oils Followed by Esterification, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2007**, *84*, 1015–1021.
- [210] M. Martinez-Martinez, M. Alcaide, A. Tchigvintsev, O. Reva, J. Polaina, R. Bargiela, M. Guazzaroni, A. Chicote, A. Canet, F. Valero, E. Eguizabal, M. del Carmen Guerrero, A. Yakunin, M. Ferrer; Biochemical Diversity of Carboxyl Esterases and Lipases from Lake Arreo (Spain): a Metgenomic Approach, *Applied and Environmental Microbiology* **2013**, *79* (12), 3553–3562.
- [211] M. Alcaide, A. Tchigvintsev, M. Martinez-Martinez, A. Popovic, O. Reva, A. Lafraya, R. Bargiela, T. Nechitaylo, R. Matesanz, M.-A. Cambon-Bonavita, M. Jebbar, M. Yakimov, A. Savchenko, O. Golyshina, A. Yakunin, P. Golyshin, M. Ferrer; Identification and Characterization of Carboxyl Esterases of Gill Chamber-Associated Microbiota in Deep-Sea Shrimp *Rimicaris exoculata* by Using Functional Metagenomics, *Applied and Environmental Microbiology* **2015**, *81* (6), 2125–2136.
- [212] M. Martinez-Martinez, I. Lores, C. Pena-Garcia, R. Bargiela, D. Reyes-Duarte, M. Guazzaroni, A. Pelaez, J. Sacher, M. Ferrer; Biochemical studies on a versatile esterase that is most catalytically active with polyaromatic esters, *Microbial Biotechnology* **2014**, *7*, 184–191.
- [213] M. Alcaide, J. Tornes, P. Stogios, X. Xu, C. Gertler, R. Di Leo, R. Bargiela, A. Lafraya, M. Guazzaroni, N. Lopes-Cortes, T. Chernikova, O. Golyshina, T. Nechitaylo, I. Plumeier, D. Pieper, M. Yakimov, A. Savchenko, P. Golyshin, M. Ferrer; Single residues dictate the co-evolution of dual esterases: MCP hydrolases from the a/b hydrolase family, *Biochemical Journal* **2013**, *454*, 157–166.
- [214] M. Alcaide, P. Stogios, A. Lafraya, A. Tchigvintsev, R. Flick, R. Bargiela, T. Chernikova, O. Reva, T. Hai, C. Leggewie, N. Katzke, V. La Cono, R. Matesanz, M. Jebbar, K. Jaeger, M. Yakimov, A. Yakunin, P. Golyshin, O. Golyshina, A. Savchenko, M. Ferrer; Pressure adaption is linked to thermal adaption in salt-saturated marine habitats, *Environmental Microbiology* **2015**, *17* (2), 332–345.
- [215] R. Matissek, G. Steiner, M. Fischer, *Lebensmittelanalytik*, 5th ed., Springer Spektrum, Berlin **2014**.
- [216] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Verger; Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnology and Bioengineering* **1987**, *30*, 81–87.
- [217] A. Hagström, M. Nordblad, P. Adlercreutz; Biocatalytic polyester acrylation-process optimization and enzyme stability, *Biotechnology and Bioengineering* **2009**, *102* (3), 693–699.
- [218] K. Siebertz, D. van Bebber, T. Hochkirchen, *Statistische Versuchsplanung: Design of Experiments (DoE)*, VDI-Buch, Springer, Heidelberg **2010**.

- [219] H.-J. Fiebig, Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart **2015**.
- [220] M. Kordel, B. Hofmann, D. Schomburg, R. Schmid; Extracellular Lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Data, *Journal of Bacteriology* **1991**, *173* (15), 4836–4841.
- [221] J. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York **1972**.
- [222] M. Bradford; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248–254.
- [223] A. Gornall, C. Bardawill, M. David; Determination of serum proteins by means of biuret reaction, *Journal of Biological Chemistry* **1949**, *177* (2), 751–766.
- [224] U. Laemmli; Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [225] A. P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed; Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 9142–9147.
- [226] M. Pittelkow; Synthese und physiologische Funktion der chemischen Chaperone Ectoin und Hydroxyectoin, *Dissertation*, Philipps- Universität Marburg **Mai, 2011**.
- [227] M. Kurz; Mikrobielle Moleküle gegen Stress, *BIOforum* **2008** (4).
- [228] U. Schörken, S. Both, F. Bongardt, D. Stuhlmann; Herstellung und Verwendung von Monoglyceriden, *DE10 2005 002 711 A1*, **2005**.
- [229] D. Sinkuniene, P. Adlercreutz; Effects of regioselectivity and lipid class specificity of lipases on transesterification, exemplified by biodiesel production, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2014**, *91*, 1283–1290.
- [230] K. Hill; Fats and oils as oleochemical raw material, *Pure and Applied Chemistry* **2000**, *72* (7).
- [231] P. Nicolas, V. Lasalle, M. Ferreira, Importance of the analytical method choice for enzyme loading determination in immobilization.
- [232] C. Laane; Medium- engineering for bioorganic synthesis, *Biocatalysis* **1987**, *1*, 17–22.
- [233] M. Gupta; Non- Aqueous enzymology: Issues and Perspectives, In: *Methods and Tools in Biosciences and Medicine: 1–13*, Methods in Non Aqueous enzymology (Eds: M. Gupta), Birkhäuser Verlag. Basel, Schweiz **2000**.
- [234] J. Rich, V. Mozhaev, J. Dordick, D. Clark, Y. Khmelnsky; Molecular imprinting of enzymes with water-insoluble ligands for nonaqueous biocatalysis, *Journal of American Chemical Society* **2002**, *124*, 5254–5255.
- [235] J. Rich, J. Dordick; Imprinting Enzymes for Use in Organic Media, In: *Methods in Biotechnology: 13–18*, Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols, Vol. 15 (Eds: E. N. Vulfson, P. Halling, H. Holland), Humana Press Inc. Totawa, New Jersey **2001**.
- [236] O. Berg, Y. Cajal, G. Butterfoss, R. Grey, M. Alsina, B. Yu, M. Jain; Interfacial activation of triglyceride lipase from *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa*: kinetic parameters and a basis for control of the lid, *Biochemistry* **1998**, *37*, 6615–6627.
- [237] W. Streit, R. Schmitz; Metagenomics-the key to the uncultured microbes, *Current Opinion in Biotechnology* **2004**, *7*, 492–498.
- [238] P. Lorenz, J. Eck; Screening for novel industrial biocatalysts, *Engineering in Life Sciences* **2004**, *4*, 501–504.
- [239] M. Subileau, H. Nozach, M. Perez-Gordo, E. Dubreucq; The 3D model of the lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*, a tool for the elucidation of structural determinants in CAL- A lipase superfamily, *Biochimica et Biophysica Acta* **2015**, *1854*, 1400–1411.
- [240] D. Briand, E. Dubreucq, J. Grimaud, P. Galzy; Substrate Specificity of the Lipase from *Candida parapsilosis*, *Lipids* **1995**, *30*, 747–754.

VIII. Anhang

Tabelle 37: Ausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit der 1. Stufe ausgehend von Rapsöl mit Lipozym TL in Abhängigkeit des Ethanol- und Wassergehalts

Ethanol	H ₂ O	Ausbeute [%]	v (nmol/s/mg)
2	0,5	44,7	252
2	1	35,7	403
2	1,5	45,5	557
2	2	60,2	690
2	3	54,9	877
4	0,5	63,6	368
4	1	58,8	586
4	1,5	60,5	616
4	2	56,4	569
4	3	56,1	559
6	0,5	65,2	154
6	1	71,3	393
6	1,5	75,6	556
6	2	77,5	461
6	3	76,7	598
10	0,5	63,2	37
10	1	72,3	277
10	1,5	80,9	705
10	2	82,1	910
10	3	80,1	846
14	0,5	52,5	32
14	1	70,3	89
14	1,5	72,0	1025
14	2	77,7	722
14	3	78,7	780

Tabelle 38: Verhältnis der Gesamtglyceride als Monoglyceride : Diglyceride : Triglyceride (MG:DG:TG) in Abhängigkeit des Wasser- und Ethanolgehalts normiert auf 100 %

Ethanolgehalt [mol/mol]	2	4	6	10	14
Wassergehalt [mol/mol]					
0,5	19:61:20	60:40:0	68:32:0	84:16:0	42:54:4
1	14:50:36	53:47:0	77:23:0	87:13:0	95:5:0
1,5	14:61:26	44:51:4	74:26:0	98:2:0	97:3:0
2	13:60:27	53:47:0	76:24:0	98:2:0	100:0:0
3	10:55:35	47:50:4	73:27:0	93:7:0	100:0:0

Tabelle 39: Ausbeuten an Biodiesel sowie Verteilung der freien Fettsäuren, der Monoglyceride und Diglyceride nach 48 h Reaktionszeit der 2. Stufe der Produktion von Biodiesel durch Lipozym CalB in Abhängigkeit von Ethanol- und Wassergehalt

Ethanol [mol/mol]	H₂O [mol/mol]	EE [wt%]	FA [wt%]	MG [wt%]	DG [wt%]
0.25	0.25	79.4 ±0.55	0.9 ±0.02	3.0	16.8
0.25	0.5	78.7 ±0.72	1.1 ±0.01	3.7	16.5
0.25	1	80.5	1.9 ±0.06	3.6	14
0.25	1.5	77.5 ±0.09	2.3 ±0.01	3.7	16.4
0.25	2	77.8 ±0.55	3 ±0.01	3.8	15.4
0.5	0.25	86.9 ±0.68	0.7 ±0.02	3.2	9.2
0.5	0.5	84.6 ±0.25	0.9 ±0.01	3.3	11.2
0.5	1	82.6 ±0.91	1.4 ±0.01	3.3	12.7
0.5	1.5	83.9 ±0.3	1.9 ±0.05	3.1	11.1
0.5	2	83.9 ±0.65	2.4 ±0.01	3.2	10.6
1	0.25	96.1 ±0.11	0.5 ±0.01	1.9	1.5
1	0.5	94.8 ±0.38	0.6 ±0.01	2.2	2.3
1	1	95.4 ±0.08	0.8 ±0.04	2.1	1.7
1	1.5	94.1 ±0.12	1.5 ±0.03	2.1	2.2
1	2	95.5 ±0.57	1.2 ±0.01	1.8	1.5
2	0.25	96.1 ±0.13	0.7 ±0.01	1.7	1.4
2	0.5	96.3 ±0.65	0.7 ±0.01	1.6	1.3
2	1	96.7 ±0.17	0.6 ±0.01	1.7	1
2	1.5	97.4 ±0.27	0.7 ±0.01	1.5	0.4
2	2	97.6 ±0.17	0.9 ±0.02	1.4	0.1
4	0.25	93.2 ±0.13	1.4 ±0.02	2.6	2.8
4	0.5	93.9 ±0.21	1.2 ±0.01	2.4	2.5
4	1	91.9 ±0.35	1.1 ±0.01	2.5	4.5
4	1.5	93.2 ±0.14	1 ±0.01	2.3	3.5
4	2	94.7 ±0.12	0.5 ±0.01	2.2	2.6

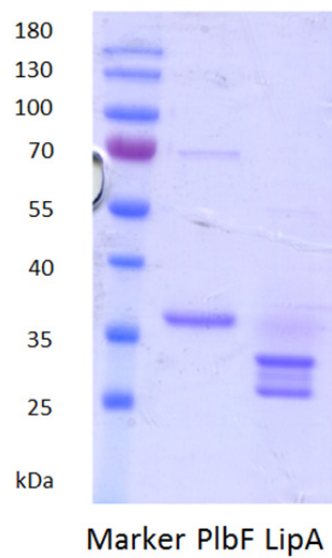
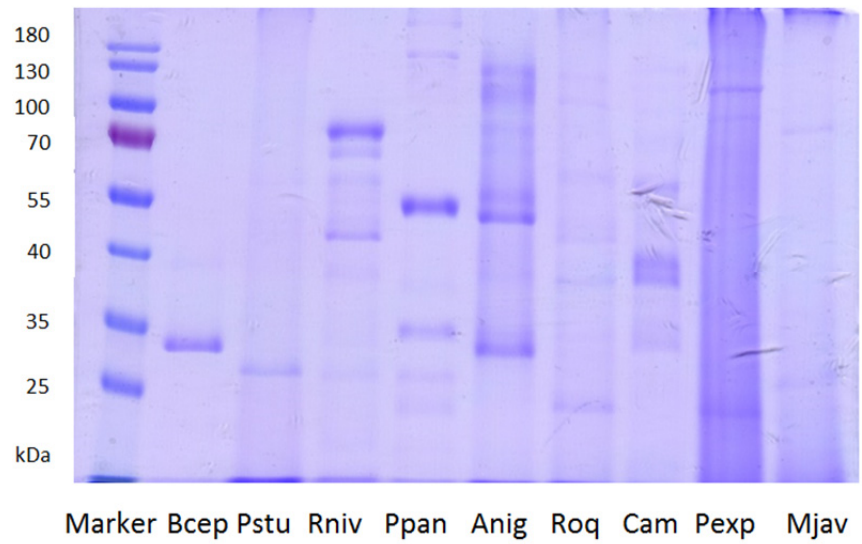
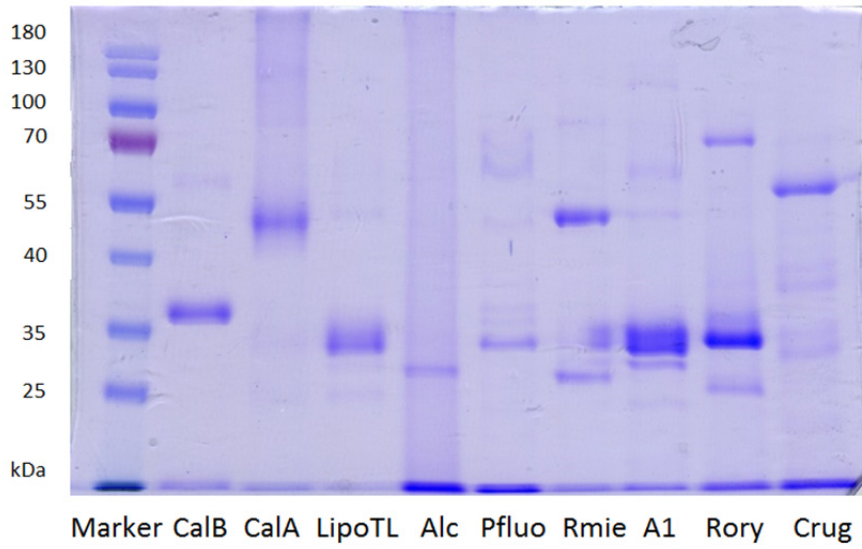


Abbildung 54: SDS-Gele der kommerziellen Lipasen und der Lipasen aus der AG Jaeger

Tabelle 40: Prozentuale Werte der Aktivitäten der Lipasen und Zellextrakte bezogen auf die Aktivität zum Zeitpunkt t=0 h in Puffer in Lösungsmitteln mit unterschiedlichen Wassergehalten

	Messzeit	1	2	3	4	5	6	7
ChCl:U 25 %	0h	77,5	58,4	39,6	34,9	43,0	508,4	14,4
	1h	80,0	54,2	0,0	432,9	99,1	1163,0	0,0
	24h	51,6	38,4	0,0	128,0	172,9	91,4	0,0
ChCl:U 40 %	0h	96,4	105,8	27,5	0,0	14,4	101,3	0,0
	1h	152,3	631,9	44,9	0,8	30,0	157,5	0,0
	24h	160,7	604,3	7,6	0,4	21,9	0,0	0,0
ChCl:G 25 %	0h	31,5	5,5	5,9	90,8	38,8	327,5	0,0
	1h	16,2	0,8	0,0	45,0	47,8	1239,0	0,0
	24h	11,2	0,3	0,0	3,6	28,6	197,4	0,0
ChCl:G 40 %	0h	67,2	23,4	91,5	50,4	250,7	1649,5	66,7
	1h	132,0	69,8	1580,5	363,3	758,2	2584,1	0,0
	24h	194,2	94,8	744,1	645,2	3020,6	15939,3	0,0
Glycerin 25 %	0h	7,8	12,0	15,1	2,9	17,9	13,2	0,0
	1h	2,2	2,1	18,3	0,9	3,7	0,0	0,0
	24h	3,6	0,3	1,9	0,8	1,6	0,0	0,0
Glycerin 40 %	0h	41,2	37,2	32,4	14,0	12,7	73,4	31,1
	1h	82,7	52,3	45,4	3,3	55,2	205,0	0,0
	24h	17,7	49,9	44,9	3,0	6,3	361,1	0,0
Aceton 25 %	0h	74,1	15,5	0,0	0,0	0,0	8,2	34,4
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aceton 40 %	0h	96,7	184,8	127,1	227,8	12,5	247,8	0,0
	1h	0,0	41,9	0,0	216,6	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 25 %	0h	1,2	7,1	1,6	18,0	1,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 40 %	0h	2,1	30,5	9,7	224,1	1,2	0,0	0,0
	1h	102,7	246,6	8,9	188,1	0,0	0,0	0,0
	24h	219,3	286,0	4,5	78,6	0,0	0,0	0,0
	Messzeit	8	9	10	11	12	13	14
ChCl:U 25 %	0h	668,3	7,5	39,7	34,8	4,2	10,5	32,4
	1h	0,0	0,0	44,6	3,7	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	84,7	2,6	0,0	0,0	0,0
ChCl:U 40 %	0h	44,2	14,0	97,6	79,5	3,6	1,2	13,7
	1h	0,0	0,0	701,0	161,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	671,0	205,6	0,0	0,0	0,0
ChCl:G 25 %	0h	1140,4	0,0	4,9	3,2	61,2	101,8	120,5
	1h	2686,7	0,0	1,9	1,6	236,6	289,6	165,7
	24h	395,6	0,0	3,4	1,4	0,0	176,0	39,1
ChCl:G 40 %	0h	6148,9	14,5	40,2	19,2	92,6	50,3	355,2
	1h	24955,6	0,0	344,7	103,3	0,0	238,8	2742,9

	24h	24955,6	0,0	429,9	83,9	0,0	0,0	1730,3
Glycerin 25 %	0h	31,3	0,0	15,1	16,7	7,5	8,9	13,7
	1h	0,0	0,0	12,0	16,1	0,0	13,2	68,9
	24h	0,0	0,0	0,7	1,9	0,0	0,0	34,8
Glycerin 40 %	0h	66,4	12,6	43,9	25,3	10,8	4,2	116,2
	1h	0,0	0,0	325,4	66,1	0,0	30,9	134,5
	24h	0,0	0,0	329,5	43,8	0,0	35,3	137,3
Aceton 25 %	0h	48,2	74,9	7,0	15,6	20,1	0,0	3,6
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aceton 40 %	0h	0,0	0,0	70,2	69,2	256,8	53,7	391,3
	1h	0,0	0,0	45,1	28,4	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 25 %	0h	0,0	0,0	8,6	0,9	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	16,2	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	6,2	0,0	0,0	0,0
DMSO 40 %	0h	0,0	0,0	14,0	18,7	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	1028,3	328,7	0,0	0,0	42,4
	24h	0,0	0,0	812,5	296,5	0,0	0,0	31,9
	Messzeit	15	16	17	19	20	21	23
ChCl:U 25 %	0h	65,9	46,2	69,9	11,3	164,0	398,1	4,5
	1h	111,7	0,0	64,1	0,4	0,0	426,0	0,0
	24h	55,8	0,0	83,1	0,0	0,0	361,0	0,0
ChCl:U 40 %	0h	123,0	40,8	379,7	15,3	97,6	303,4	74,3
	1h	231,6	0,0	529,6	22,6	2,8	252,7	50,1
	24h	212,7	0,0	530,0	15,1	0,0	97,6	57,6
ChCl:G 25 %	0h	20,1	16,7	10,1	44,0	3,7	201,2	2,0
	1h	8,4	0,0	1,2	6,3	1,4	149,8	8,8
	24h	2,8	0,0	1,0	3,7	0,7	46,4	9,5
ChCl:G 40 %	0h	105,3	67,2	66,8	38,6	69,9	459,0	22,5
	1h	189,6	0,0	387,0	60,7	24,7	1182,2	5,8
	24h	155,1	0,0	287,7	75,2	8,0	1803,1	33,7
Glycerin 25 %	0h	24,9	29,8	17,4	5,9	11,8	35,2	1,1
	1h	17,6	0,0	2,3	1,7	1,0	11,2	6,0
	24h	1,5	0,0	2,3	1,0	0,6	6,4	3,8
Glycerin 40 %	0h	67,2	53,4	47,6	14,3	40,4	16,8	53,7
	1h	10,2	0,0	169,2	26,7	6,9	66,0	24,9
	24h	8,2	0,0	62,2	6,3	24,0	31,9	30,1
Aceton 25 %	0h	13,9	33,2	51,6	0,2	0,0	179,0	0,2
	1h	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	36,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aceton 40 %	0h	267,2	116,8	349,6	28,9	46,0	2831,0	53,6
	1h	7,2	0,0	106,0	0,0	0,0	13,6	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO	0h	6,0	0,0	20,4	0,0	0,5	51,5	0,0

25 %	1h	0,0	0,0	19,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	7,2	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 40 %	0h	29,0	0,0	63,7	10,6	2,5	58,2	0,0
	1h	285,3	0,0	600,3	8,0	84,2	887,9	0,0
	24h	238,1	0,0	167,2	1,2	65,2	126,9	0,0
	Messzeit	24	26	27	28	29	32	37
ChCl:U 25 %	0h	0,5	0,4	15,8	1,0	5,5	10,6	4,2
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ChCl:U 40 %	0h	21,8	6,0	78,7	20,5	28,1	53,6	29,8
	1h	17,3	0,0	0,0	5,5	0,0	0,0	0,0
	24h	16,3	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0
ChCl:G 25 %	0h	12,0	1,0	23,5	0,9	5,3	0,0	9,9
	1h	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ChCl:G 40 %	0h	24,3	19,3	66,5	9,2	18,8	14,2	21,1
	1h	22,7	27,4	357,8	36,9	28,6	0,0	67,7
	24h	21,4	27,4	413,6	30,8	23,0	0,0	88,2
Glycerin 25 %	0h	9,9	0,9	0,0	0,7	2,9	9,1	5,3
	1h	1,6	6,9	0,0	3,9	0,0	0,0	83,6
	24h	0,7	11,9	0,0	3,8	0,0	0,0	0,0
Glycerin 40 %	0h	29,0	35,6	49,1	14,2	19,0	12,4	22,3
	1h	30,0	7,7	0,0	13,2	0,0	0,0	113,4
	24h	28,1	28,7	0,0	23,5	0,0	0,0	155,2
Aceton 25 %	0h	0,0	0,2	18,2	0,2	3,6	6,9	16,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aceton 40 %	0h	0,0	0,0	26,6	7,5	13,4	7,3	261,8
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 40 %	0h	0,9	0,0	0,0	1,9	8,5	0,0	19,4
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Messzeit	38	40	41	42	43	45	47
ChCl:U 25 %	0h	78,3	15,6	0,0	0,0	4,1	0,1	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ChCl:U 40 %	0h	167,1	27,7	300,0	423,1	102,8	0,0	10,8
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ChCl:G	0h	172,4	0,0	0,0	0,0	10,7	0,7	21,9

25 %	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	70,8	0,0	30,8
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	21,3	0,0	0,0
ChCl:G 40 %	0h	216,1	50,6	190,9	264,3	78,0	2,1	27,1
	1h	851,0	0,0	0,0	0,0	145,2	2,6	113,2
	24h	823,2	0,0	0,0	0,0	115,5	1,8	0,0
Glycerin 25 %	0h	76,3	0,0	0,0	0,0	9,0	0,2	10,8
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	52,3	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Glycerin 40 %	0h	128,1	23,6	146,4	0,0	85,8	2,8	26,7
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	38,9	1,3	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	55,2	1,0	0,0
Aceton 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aceton 40 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 25 %	0h	54,6	19,9	169,1	223,1	0,8	0,0	5,5
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 40 %	0h	0,0	24,7	201,8	0,0	1297,8	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Messzeit								
		48	49	50	51	52	53	56
ChCl:U 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ChCl:U 40 %	0h	3,2	0,4	1,1	54,3	0,0	0,0	30,1
	1h	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0
ChCl:G 25 %	0h	9,1	0,3	1,0	1,1	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	10,2	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	3,4	0,0	0,0	0,0
ChCl:G 40 %	0h	27,3	5,0	2,6	2,0	66,5	176,2	45,6
	1h	47,2	15,8	0,0	29,0	0,0	0,0	0,0
	24h	29,8	9,4	0,0	26,7	0,0	0,0	0,0
Glycerin 25 %	0h	4,9	2,1	8,1	3,2	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,8	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	11,0	0,0	0,0	0,0
Glycerin 40 %	0h	13,4	41,4	37,7	12,5	161,2	0,0	34,6
	1h	0,0	1,4	11,3	3,0	438,7	0,0	0,0
	24h	0,0	3,8	0,0	4,8	290,6	0,0	0,0
Aceton 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Aceton 40 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 25 %	0h	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	96,3	19,1
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 40 %	0h	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Messzeit								
		57	60	62	65	67	68	69
ChCl:U 25 %	0h	120,2	13,1	18,2	6,7	6,5	0,0	11,8
	1h	0,0	0,0	0,0	11,8	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	5,4	0,0	0,0	0,0
ChCl:U 40 %	0h	295,9	42,6	0,0	51,0	42,3	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	29,9	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	22,8	0,0	0,0	0,0
ChCl:G 25 %	0h	0,0	10,5	25,7	5,0	0,0	0,0	5,6
	1h	0,0	0,0	0,0	5,8	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	19,1	0,0	0,0	0,0
ChCl:G 40 %	0h	253,3	32,9	117,7	15,2	18,6	0,0	132,4
	1h	0,0	34,7	248,4	100,9	0,0	0,0	117,4
	24h	0,0	44,4	305,1	67,7	0,0	0,0	186,9
Glycerin 25 %	0h	0,0	6,7	16,4	2,3	2,4	0,0	15,9
	1h	0,0	0,0	38,2	24,3	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	44,4	14,9	0,0	0,0	0,0
Glycerin 40 %	0h	121,1	25,5	267,1	47,5	12,8	122,6	373,9
	1h	0,0	60,4	351,8	60,0	0,0	0,0	404,9
	24h	0,0	69,5	328,5	41,5	0,0	0,0	308,2
Aceton 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aceton 40 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 40 %	0h	0,0	7,3	0,0	199,9	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Messzeit								
		70	74	75	76	77	78	81
ChCl:U 25 %	0h	0,0	0,0	55,1	10,5	49,6	7,2	28,2
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

ChCl:U 40 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	125,1	57,6	51,5
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	34,5	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,6	0,0
ChCl:G 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	62,9	0,0	5,5	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	41,8	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	59,0	0,0
ChCl:G 40 %	0h	8,1	23,5	48,8	20,0	61,2	18,0	144,4
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	60,3	299,6
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,7	329,6
Glycerin 25 %	0h	10,1	9,2	0,0	8,9	24,0	2,4	29,6
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Glycerin 40 %	0h	32,0	32,4	96,8	28,6	294,6	41,3	78,7
	1h	73,9	90,3	0,0	0,0	0,0	54,3	392,9
	24h	0,0	109,9	0,0	0,0	0,0	52,0	343,9
Aceton 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aceton 40 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 40 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	89,7	10,4	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Messzeit								
		82	84	85	86	87	88	89
ChCl:U 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	23,9	29,3	0,0	78,1
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ChCl:U 40 %	0h	0,0	38,2	31,8	68,2	61,7	4,5	243,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	379,4
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	319,0
ChCl:G 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	39,7	0,0	0,0	41,9
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ChCl:G 40 %	0h	39,2	19,1	18,4	107,1	39,1	28,2	177,5
	1h	0,0	0,0	0,0	385,2	75,0	0,0	288,1
	24h	0,0	0,0	0,0	712,0	0,0	0,0	294,6
Glycerin 25 %	0h	0,0	0,0	2,8	29,6	41,3	4,6	45,1
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Glycerin 40 %	0h	100,7	42,4	9,6	69,5	42,1	8,0	81,2
	1h	0,0	385,2	44,5	388,8	229,9	55,7	574,1

	24h	0,0	309,5	0,0	410,6	0,0	0,0	525,2
Aceton 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aceton 40 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 25 %	0h	0,0	0,0	0,0	0,0	10,4	0,0	12,9
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO 40 %	0h	0,0	0,0	0,0	42,6	37,3	0,0	75,6
	1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

	Messzeit	89	90	91
ChCl:U 25 %	0h	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0
ChCl:U 40 %	0h	0,0	0,0	234,8
	1h	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0
ChCl:G 25 %	0h	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0
ChCl:G 40 %	0h	178,6	9,1	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0
Glycerin 25 %	0h	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0
Glycerin 40 %	0h	180,7	8,7	0,0
	1h	2139,3	0,0	0,0
	24h	1896,4	0,0	0,0
Aceton 25 %	0h	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0
Aceton 40 %	0h	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0
DMSO 25 %	0h	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0
DMSO 40 %	0h	0,0	0,0	0,0
	1h	0,0	0,0	0,0
	24h	0,0	0,0	0,0

Eidesstaatliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundlagen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Beatrice Kleiner