

# Entwicklung von Verfahren zur enzymatischen Epoxidierung von Pflanzenölen und Fettsäurederivaten

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik  
der Universität Stuttgart zur Erlangung  
der Würde eines Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von  
Fabian Haitz  
aus Schutterwald

Hauptberichter:	Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hirth
1. Mitberichter:	Prof. Dr. rer. nat. Markus Pietzsch
2. Mitberichter:	Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors
Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Hauer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2017

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie der Universität Stuttgart

Stuttgart, 2018



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst, lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

---

Fabian Haitz



---

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>XI</b>
<b>Abstract</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Motivation und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
1.1 Motivation	1
1.2 Ziele dieser Arbeit	2
<b>2 Einleitung und Stand der Technik</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Verfügbarkeit und Verwendung pflanzlicher Öle in der chemischen Industrie</b>	<b>4</b>
2.1.1 Pflanzenöl-basierte Chemikalie	5
2.1.2 Eigenschaften und Verwendung von Epoxiden und Pflanzenöl-basierten Epoxiden	6
<b>2.2 Chemische und enzymatische Epoxidierung von pflanzlichen Rohstoffen</b>	<b>9</b>
2.2.1 Chemische Epoxidierung	9
2.2.2 Enzymatische Epoxidierung	11
2.2.2.1 <i>Enzyme zur direkten Epoxidierung</i>	12
2.2.2.2 <i>Enzyme zur indirekten Epoxidierung</i>	16
2.2.3 Gegenüberstellung von chemischer und enzymatischer Epoxidierung	19
<b>3 Untersuchung der Epoxidierung mit Lipasen und Auswahl geeigneter Enzyme</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Anforderungen an ein Enzym zur Etablierung eines Prozesses zur enzymatischen Epoxidierung</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Stand der Wissenschaft zur Lipase-katalysierten Epoxidierung</b>	<b>22</b>
3.2.1 Grundlagen der Lipase-katalysierten Hydrolyse und Perhydrolyse	22
3.2.2 Literaturübersicht zur Lipase-katalysierten Epoxidierung von Ölsäure	27
3.2.3 Enzymstabilität bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung	28

---

<b>3.3 Methodenentwicklung zur Untersuchung der Lipase-katalysierten Persäurebildung</b>	<b>32</b>
3.3.1 Verwendete Enzyme	32
3.3.2 Epoxidierung von Ölsäure mit nicht-immobilisierten Lipasen	33
3.3.3 <i>In silico</i> -Untersuchungen zur Perhydrolase-Aktivität bei Lipasen	34
3.3.4 Epoxidierung von Ölsäure mit immobilisierten Lipasen	34
3.3.5 Stabilität verschiedener immobilisierter CalB-Varianten bei der Epoxidierung von Ölsäure	35
<b>3.4 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>35</b>
3.4.1 Untersuchung der Epoxidierung von Ölsäure mit nicht-immobilisierten Lipasen	35
3.4.2 <i>In silico</i> -Vergleich der untersuchten Lipasen auf Aminosäuresequenz-Ebene	37
3.4.3 Kinetische Untersuchung der Epoxidierung von Ölsäure mit verschiedenen immobilisierten Lipasen	39
3.4.4 Einfluss von Temperatur und Waschschritten auf die Stabilität verschiedener immobilisierter CalB-Varianten	44
<b>3.5 Schlussfolgerungen zur Auswahl geeigneter Enzyme und <i>in silico</i>-Untersuchung der Perhydrolase-Aktivität bei Lipasen</b>	<b>48</b>
<b>4 Auslegung von Verfahren zur Epoxidierung verschiedener Pflanzenölbasierter Substrate</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Anforderungen an die Auswahl geeigneter Rohstoffe und Anpassung der Verfahren</b>	<b>50</b>
<b>4.2 Stand der Technik zur Epoxidierung von Triglyzeriden, Fettsäuremethylestern, Fettsäuren, Alkenen und Dicarbonsäureestern</b>	<b>50</b>
4.2.1 Epoxidierung von Triglyzeriden und Charakterisierung entsprechender Epoxide	51
4.2.2 Epoxidierung von Fettsäure- und Dicarbonsäureestern	57
4.2.3 Epoxidierung von freien Fettsäuren	60
4.2.4 Epoxidierung von Alkenen	63

---

<b>4.3 Methoden zur Epoxidierung verschiedener Pflanzenöl-basierter Molekülgruppen</b>	<b>66</b>
4.3.1 Methoden zur Charakterisierung verschiedener Pflanzenöle und Pflanzenölepoxide	66
4.3.2 Untersuchung des Einflusses von Temperatur, Zeit, Enzym- und Lösemittelmenge auf die Epoxidierung von $\alpha$ -Linolensäure- und Erucasäure-reiche Triglyzeride	66
4.3.3 Vorhersagemodelle zur enzymatischen Epoxidierung von $\alpha$ -Linolensäure- und Erucasäure-reichen Triglyzeriden	68
4.3.4 Umsetzung verschiedener Pflanzenöle	68
4.3.5 Untersuchung des Einflusses verschiedener Wasserstoffperoxidzugabevarianten auf die Stabilität von Novozym® 435 bei der Epoxidierung von Sojaöl	69
4.3.6 Enzymatische Epoxidierung von Fettsäuremethylestern, freien Fettsäuren, Dicarbonsäuren und Alkenen mit Novozym® 435	69
<b>4.4 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>72</b>
4.4.1 Charakterisierung verschiedener Pflanzenöle	73
4.4.2 Methodenentwicklung zur Epoxidierung von Triglyzeriden	75
4.4.2.1 <i>Epoxidierung von Drachenkopföl in Toluol und n-Heptan</i>	75
4.4.2.2 <i>Bewertung des Einflusses von Temperatur, Zeit, Lösemittel- und Enzymmenge bei der Epoxidierung von Senf- und Drachenkopföl</i>	77
4.4.2.3 <i>Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle bei optimierten Reaktionsbedingungen</i>	85
4.4.2.4 <i>Einfluss der Fettsäurezusammensetzung auf die Viskosität nativer und epoxidierter Pflanzenöle</i>	88
4.4.2.5 <i>Einfluss der Fettsäurezusammensetzung auf das Schmelz- und Kristallisationsverhalten verschiedener nativer und epoxidierter Pflanzenöle</i>	93
4.4.2.6 <i>Untersuchung der Stabilität von Novozym® 435 bei der Epoxidierung von Sojaöl mit verschiedenen Wasserstoffperoxid-Förderraten</i>	108
4.4.3 Methodenentwicklung zur Epoxidierung von Fettsäuremethylestern am Beispiel von Ölsäuremethylester	115
4.4.4 Methodenentwicklung zur Epoxidierung verschiedener freier Fettsäuren am Beispiel von Öl-, Linol-, $\alpha$ -Linolen-, Eruca- und Tallölfettsäuren	119

---

4.4.5	Methodenentwicklung zur Epoxidierung langkettiger Dicarbonsäuren am Beispiel von 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure	124
4.4.6	Methodenentwicklung zur Epoxidierung langkettiger Alkene am Beispiel von 9-Octadecen	126
<b>4.5</b>	<b>Schlussfolgerungen zur Rohstoff-angepassten Verfahrensauslegung und Rohstoffauswahl</b>	<b>128</b>
<b>5</b>	<b>Maßstabsvergrößerung der Enzym-katalysierten Epoxidierung</b>	<b>130</b>
<b>5.1</b>	<b>Kriterien zur Maßstabsvergrößerung mehrphasiger Reaktionssysteme bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung</b>	<b>130</b>
<b>5.2</b>	<b>Maßstabsvergrößerung bei nicht-mischbaren flüssig/flüssig Reaktionssystemen</b>	<b>131</b>
5.2.1	Klassische Rühraufgaben, Standardreaktoren und Grundlagen zur Maßstabsübertragung	132
5.2.2	Rühren nicht-mischbarer flüssig/flüssig-Systeme	134
5.2.3	Tropfenbruch und Koaleszenz	140
5.2.4	Messung der Tropfengrößenverteilung in dispersen Systemen	142
<b>5.3</b>	<b>Methodenentwicklung zur Maßstabsvergrößerung der enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopföl</b>	<b>143</b>
5.3.1	Verwendete Reaktoren und Reaktorcharakterisierung	143
5.3.2	Untersuchung des Einflusses verschiedener Prozessparameter auf die Tropfengrößenverteilung	145
5.3.3	Epoxidierung von Drachenkopföl im 1 L- und 10 L-Maßstab	147
<b>5.4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>148</b>
5.4.1	Einfluss von Rührerdrehzahl, Lösemittel- und Dispersphasenanteil auf die Tropfengrößenverteilung und Epoxidierung im 1 L-Reaktor	149
5.4.2	Maßstabsvergrößerung der Epoxidierung von Drachenkopföl im 1 L- und 10 L-Maßstab	159
<b>5.5</b>	<b>Schlussfolgerungen zur Maßstabsvergrößerung der enzymatischen Epoxidierung</b>	<b>161</b>



---

<b>6 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>163</b>
<b>6.1 Zusammenfassung</b>	<b>163</b>
<b>6.2 Ausblick</b>	<b>168</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>169</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>186</b>
<b>8.1 Materialien</b>	<b>186</b>
8.1.1 Verwendete Chemikalien	186
8.1.2 Verwendete Geräte	187
<b>8.2 ANOVA-Analysen zur Auswertung der statistischen Versuchspläne</b>	<b>188</b>
<b>8.3 Analytische Methoden</b>	<b>189</b>
8.3.1 Bestimmung der Lipase-Aktivität freier und immobilisierter Lipase mittels p-Nitrophenyloktanoat-Assay	189
8.3.2 Dünnschichtchromatographie	191
8.3.3 Titrimetrische Bestimmung der Jodzahl	193
8.3.4 Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Triglyzeriden und der Umsetzung von Ölsäure zu Epoxystearinsäure mittels GC-FID	194
8.3.5 Titrimetrische Bestimmung des Epoxidsauerstoffs	197
8.3.6 Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie	198
8.3.7 Dichtebestimmung der Fluide	200
8.3.8 Rheologische Charakterisierung mittels Rotationsviskosimeter	200
8.3.9 Untersuchung des Schmelz- und Kristallisationsverhaltens mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (DDK)	203
8.3.10 Bestimmung der Grenzflächenspannung mittels Pendant-Drop-Methode	216
8.3.11 In-situ-Messung der Tropfengrößenverteilung mittels 3D-ORM-Technologie	217
<b>Danksagung</b>	<b>222</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>224</b>
<b>Wissenschaftliche Beiträge</b>	<b>226</b>



---

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
CalB	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>
CPO	Chlorperoxidase
d <sub>32</sub>	Sauterdurchmesser
D	Reaktordurchmesser
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMC	Dimethylcarbonat
DPA	Dispersphasenanteil
d <sub>R</sub>	Rührerdurchmesser
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
EA	Erucasäure
EC-Nummer	<i>European Commission number</i>
EDA	13,14-Epoxydocosansäure
ELSD	Lichtstredetektor ( <i>Evaporative Light Scattering Detector</i> )
EME	Epoxytstearinsäuremethylester
EO	Ethylenoxid
ESA	Epoxytstearinsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und Mitarbeiter
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
FDH	Formiat-Dehydrogenase
FS	Fettsäure
FS-ME	Fettsäuremethylester
g	Gramm
GC-FID	Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektor
Gew.%	Massenprozent
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IZ	Jodzahl
L	Liter
LA	Linolsäure

---

$\alpha$ -LA	$\alpha$ -Linolensäure
MEOA	Monoepoxyoctadecensäure
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
MML	Lipase aus <i>Mucor miehei</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
n.v.	nicht verfügbar
OA	Ölsäure
OA-ME	Ölsäuremethylester
OO	Epoxidsauerstoffgehalt ( <i>oxirane oxygen content</i> )
OO <sub>max</sub>	Maximal möglicher Epoxidsauerstoffgehalt
PGL	Lipase aus <i>Pseudozyma graminicola</i>
PO	Propylenoxid
PPL	Lipase aus <i>Pseudozyma parantarctica</i>
PRL	Lipase aus <i>Pseudozyma rugulosa</i>
PSHL	Lipase aus <i>Pseudozyma shanxiensis</i>
PSL	Lipase aus <i>Pseudozyma siamensis</i>
PTL	Lipase aus <i>Pseudozyma tsukubaensis</i>
P <sub>v</sub>	Volumenspezifischer Leistungseintrag
RAL	Lipase aus <i>Rhizopus arrhizus</i>
Re	Reynoldszahl
RML	Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i> (zuvor <i>Mucor miehei</i> )
RNL	Lipase aus <i>Rhizopus niveus</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSM	<i>Response surface methodology</i>
RSO-ME	Rapsölfettsäuremethylester
RT	Raumtemperatur
SBO-ME	Sojaölfettsäuremethylester
StyAB	Styrenmonooxygenase (Zweikomponenten-Enzym aus StyA und StyB)
StyA	Oxygenase der Styrenmonooxygenase
StyB	Reduktase der Styrenmonooxygenase
t	Zeit
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TG	Triglyzerid
TGV	Tropfengrößenverteilung
TLL	Lipase aus <i>Thermomyces lanuginosus</i>
We	Weberzahl

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Am häufigsten in pflanzlichen Ölen vorkommende Fettsäuren [10, 19].	4
Abbildung 2: Struktur der heterocyclischen Epoxidgruppe [20].	7
Abbildung 3: Prileschajew Epoxidation einer ungesättigten Verbindung.	10
Abbildung 4: Reaktionszyklus einer Häm-enthaltenden Peroxidase [66].	13
Abbildung 5: Reaktionsschema der biokatalytischen Epoxidierung von Styrenderivaten mit einer bakteriellen Styrolmonooxygenase [83].	14
Abbildung 6: Reaktionszyklus einer Häm-enthaltenden Monooxygenase [66].	15
Abbildung 7: Prozess zur Bildung eines Epoxids auf Basis der Haloperoxidase-katalysierten Halogenierung und einer nachfolgend Umsetzung mit einer Halohydrin epoxidase [66, 107].	17
Abbildung 8: Lipase-katalysierte Epoxidierung von Fettsäurederivaten mittels Peroxyfettsäure.	18
Abbildung 9: Sekundärstruktur eines Proteins mit $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung [132, 137].	23
Abbildung 10: Spaltung einer Esterverbindung mit Hilfe der hydrolytischen Aktivität von Serin-Hyrolasen, modifiziert nach [136, 139].	25
Abbildung 11: (A) Model zum zweiten Übergangszustand bei der Persäurebildung mit PFE Leu29Pro, (B) vorgeschlagener molekulare Grundlagen zur Perhydrolase-Aktivität der mutierten Arylesterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> PFE Leu29Pro [140].	26
Abbildung 12: Ausbildung der im Vergleich zu PFE Leu29Pro schwächeren Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoffatom von Trp28 und der Peroxidhydroxygruppe in der nativen PFE [140].	26
Abbildung 13: Native Struktur der Lipase B aus <i>Candida antarctica</i> (CalB, kürzlich umklassifiziert zu <i>Pseudozyma antarctica</i> ).	31
Abbildung 14: Phylogenetische Analyse der verschiedenen hinsichtlich der Fähigkeit zur Epoxidierung untersuchten Lipasen.	39
Abbildung 15: Ölsäureumsatz der chemo-enzymatischen Epoxidierung mittels verschiedener immobilisierter Lipasen.	41
Abbildung 16: Vergleich der Stabilität von Novozym® 435 und CalB kovalent immobilisiert auf Immobead 150 für die Epoxidierung von 1 M Ölsäure in Toluol bei 40 °C.	45
Abbildung 17: Vergleich der Stabilität von Novozym® 435 und CalB kovalent immobilisiert auf Immobead 150 für die Epoxidierung von 1 M Ölsäure in Toluol bei 50 °C.	46
Abbildung 18: Lipase-katalysierte chemo-enzymatische Epoxidierung von Triglyzeriden.	51
Abbildung 19: Epoxidierung verschiedener Alkene unter Einsatz verschiedener Cosubstrate zur Bildung einer aktivierten Persäure.	64
Abbildung 20: Schema der Produktaufbereitung nach der enzymatischen Epoxidierung von Pflanzenölen.	67
Abbildung 21: Darstellung der verschiedenen Verfahrensvarianten zur Epoxidierung unterschiedlicher Pflanzenölderivate mit Verweisen auf die entsprechenden Teilkapitel im Ergebnisteil.	72

---

Abbildung 22: Vergleich der Epoxidierung von Drachenkopföl mit der immobilisierten Lipase B aus <i>Candida antarctica</i> (Novozym® 435) in (A) Toluol oder (B) <i>n</i> -Heptan als Lösemittel. ....	76
Abbildung 23: Reproduzierbarkeit einer beispielhaften Parameterkombination bei der enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopf- und Senföl (7,5 mg pro mmol C=C, 40 °C, 12 h Reaktionszeit, 50 Gew.% Lösemittel). ....	79
Abbildung 24: Konturplots zur Epoxidierung von Drachenkopföl. ....	81
Abbildung 25: Konturplots zur Epoxidierung von Senföl. ....	82
Abbildung 26: Mittlerer gemessener Epoxidsauerstoffgehalt (schwarz) und Epoxid- ausbeute (grau) bei der Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle. ....	86
Abbildung 27: Vergleich der dynamischen Viskosität verschiedener nativer Pflanzenöle (schwarz) und der entsprechenden epoxidierten Pflanzenöle (grau) (n = 3). ....	89
Abbildung 28: Korrelation zwischen der Viskosität der nativen Pflanzenöle und der gemessenen Jodzahl pro mittlere Kettenlänge. ....	91
Abbildung 29: Abhängigkeit der Viskosität von der Kettenlänge (A) und der Anzahl der C=C- Doppelbindungen (B). ....	91
Abbildung 30: Lineare Abhängigkeit der Viskositätsänderung bei verschiedenen epoxidierten Pflanzenölen vom Epoxidsauerstoffgehalt. ....	92
Abbildung 31: DSC-Thermogramme für (A) natives Drachenkopföl und (B) epoxidiertes Drachenkopföl. ....	95
Abbildung 32: DSC-Thermogramme für (A) natives Sojaöl und (B) epoxidiertes Sojaöl. ....	97
Abbildung 33: DSC-Thermogramme für (A) natives Senföl und (B) epoxidiertes Senföl. ....	98
Abbildung 34: Vergleich mittels DSC gemessener Offset-Temperaturen der Schmelz- kurven unterschiedlicher nativer Öle und deren enzymatisch hergestellten Epoxiden (Heizrate - 10 °C min <sup>-1</sup> , -50 bis 100 °C). ....	101
Abbildung 35: Vergleich der mittels DSC gemessenen Onset-Temperaturen der Kristallisationskurven unterschiedlicher nativer Öle und deren enzymatisch hergestellten Epoxide (Kühlrate - 10 °C min <sup>-1</sup> , 100 bis -50 °C). ....	103
Abbildung 36: Korrelation zwischen der Umwandlungstemperatur des größten Schmelz- peaks der nativen Pflanzenöle und der gemessenen Jodzahl pro mittlere Kettenlänge (Heizrate: 10 °C min <sup>-1</sup> , Bereich: -100 bis 50 °C). ....	105
Abbildung 37: Vergleich der enzymatischen Epoxidierung von Sojaöl bei (A) einmalige Zugabe einer 30%igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung zu Reaktionsbeginn und (B) Zugabe einer 30%igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung mit konstanter Fließrate über 12 h bei jeweils 40 °C. ...	109
Abbildung 38: Vergleich der enzymatischen Epoxidierung von Sojaöl bei (A) Zugabe einer 30%igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung mit konstanter Fließrate über 19 h, (B) Zugabe einer 15%igen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung mit konstanter Fließrate über 21 h und 40 °C. ....	110
Abbildung 39: Stabilität von Novozym® 435 bei der Epoxidierung von Sojaöl mit verschiedenen Wasserstoffperoxidzugabevarianten bei 40 °C. ....	113
Abbildung 40: Lösemittel-frei Epoxidierung von technischem Ölsäuremethylester (84 %, bereitgestellt von DHW). ....	116

---

Abbildung 41: Epoxidierung von Ölsäuremethylester in einem Toluol/Methanol-Gemisch beziehungsweise Dimethylcarbonat (DMC) im Vergleich zur Umsetzung in Toluol. ....	117
Abbildung 42: Simultane Epoxidierung und Veresterung von Ölsäure (OA) in einem Toluol/Methanol-Gemisch beziehungsweise Dimethylcarbonat (DMC) im Vergleich zur Umsetzung in Toluol. ....	118
Abbildung 43: Rückveresterung von Epoxystearinsäure aus einem mit Natrium- oder Magnesiumsulfat getrockneten Gemisch aus Epoxystearinsäuremethylester und Epoxystearinsäure bei 40 °C (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : Wassergehalt nach Trocknung 1,05%, MgSO <sub>4</sub> : Wassergehalt nach Trocknung 0,274%). ....	119
Abbildung 44: Dünnschichtchromatographische Analyse der Umsetzung von (A) Ölsäure (OA), (B) Linolsäure (LA), (C) Linolensäure ( $\alpha$ -LA), (D) Erucasäure (EA) und (E) Tallölfettsäuren (TOFA) bei optimierten Reaktionsbedingungen. ....	122
Abbildung 45: Chemo-enzymatische Epoxidierung verschiedener technischer Fettsäuren und Tallölfettsäure-Fractionen. ....	123
Abbildung 46: Epoxidierung der fermentativ hergestellten 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure in Toluol (Tol) mit Novozym <sup>®</sup> 435 bei Raumtemperatur. ....	125
Abbildung 47: Epoxidierung und simultane Veresterung der fermentativ hergestellten 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure in Ethylacetat mit Novozym <sup>®</sup> 435 bei Raumtemperatur. ....	126
Abbildung 48: Dünnschichtchromatographische Analyse der CalB-katalysierten chemo-enzymatischen Epoxidierung von 9-Octadecen in Dimethylcarbonat (DMC) als Lösemittel. ....	127
Abbildung 49: (A) Skizze eines bewehrten Rührreaktors mit Scheibenrührer nach [213], (B) geometrische Standardverhältnis in einem Rührreaktor mit Scheibenrührer [208, 210-212, 215]. ....	135
Abbildung 50: Verschiedene Deformationsweisen eines Tropfens hervorgerufen durch Wirbel [218]. ....	141
Abbildung 51: Schematische Darstellung der Koaleszenz [230-232]. ....	142
Abbildung 52: Schematische Darstellung des Rührreaktors mit Abmaßen (A), 1 L-Reaktor mit Strombrecher (B) und 10 L-Reaktor mit Strombrecher (C). ....	144
Abbildung 53: Einfluss der Rührerdrehzahl $n$ auf den zu erzielenden Sauterdurchmesser $d_{32}$ bei einem Lösemittelanteil von 60 Gew.% und einem Dispersphasenanteil von 0,343 (2 Mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Mol C=C). ....	150
Abbildung 54: Einfluss der Rührerdrehzahl auf die Epoxidierung von Drachenkopföl im 1 L-Reaktor. ....	151
Abbildung 55: Einfluss des Lösemittelanteils auf die dynamische Viskosität $\eta$ der organischen Phase (A) und Grenzflächenspannung $\sigma$ zwischen organischer Phase und wässriger Wasserstoffperoxidlösung (B). ....	152
Abbildung 56: Einflüsse des Lösemittelanteils auf den erzielten Sauterdurchmesser $d_{32}$ bei 1000 rpm und einem realen Dispersphasenanteil für eine Wasserstoffperoxid dosierung von 2 Mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pro Mol C=C. ....	153

---

Abbildung 57: Einfluss des Lösungsmittelanteils bei der Epoxidierung von Drachenkopfl im 1 L-Reaktor. ....	154
Abbildung 58: Sauterdurchmesser $d_{32}$ in Abhängigkeit vom Dispersphasenanteil bei der Dispergierung von $H_2O_2$ in Drachenkopfl/Toluol-Gemisch (60 Gew.%) bei Drehzahlen von 600, 1000 und 1400 rpm.....	157
Abbildung 59: Einfluss des Dispersphasenanteil aufgrund verschiedener Wasserstoffperoxidmengen auf die Epoxidierung von Drachenkopfl im 1 L-Reaktor. ....	158
Abbildung 60: Sauterdurchmesser $d_{32}$ im 1 L- und 10 L-Reaktor bei Verwendung von reinem Drachenkopfl und einem Dispersphasenanteil $\varphi = 0,343$ bei den auf Basis eines konstanten volumenspezifischen Leistungseintrages berechneten Drehzahlen (siehe Formel 17). ....	160
Abbildung 61: Vergleich der Epoxidierung von Drachenkopfl im 1 L- und 10 L-Maßstab. .	160
Abbildung 62: Lipase-katalysierte Hydrolyse von von 4-Nitrophenyloktanoat unter Freisetzung von 4-Nitrophenol.....	189
Abbildung 63: Beispielhafte Darstellung einer entwickelten und gefärbten Dünnschichtchromatographie-Platte.....	193
Abbildung 64: Beispielchromatogramm zur Bestimmung der Ölsäure- und Epoxystearinsäurekonzentration für eine Probe des Stabilitätstests. Die Probe wurde dem ersten Ansatz der Epoxidierung mittels CalB auf Immobead 150 nach dem 7. Reaktionszyklus bei 50 °C entnommen. ....	195
Abbildung 65: Chromatogramm des Stabilitätstests zur Bestimmung der Ölsäure- und Epoxystearinsäurekonzentration mittels GC-FID. Die untersuchte Probe entstammt der Epoxidierung mittels CalB auf Immobead 150 nach dem 1. Reaktionszyklus bei 50 °C. ....	196
Abbildung 66: Kalibriergeraden zur Ermittlung der Ölsäure- und Epoxystearinsäurekonzentration durch Gaschromatographie-FID.....	196
Abbildung 67: FT-IR-Spektren zu nativem Drachenkopfl und verschiedenen Drachenkopfl epoxidchargen mit unterschiedlichem Epoxidsauerstoffgehalt (OO). Die Durchlaufnummer entspricht dem jeweiligen Ansatz aus der Durchführung des statistischen Versuchsplans (siehe Tabelle 17). ....	199
Abbildung 68: FT-IR-Spektren zu nativem Senfl und verschiedenen Senfl epoxidchargen mit unterschiedlichem Epoxidsauerstoffgehalt (OO). Die Durchlaufnummer entspricht dem jeweiligen Ansatz aus der Durchführung des statistischen Versuchsplans (siehe Tabelle 17). ....	199
Abbildung 69: Fließkurven für native (schwarz) und epoxidierte Pflanzenöle (grau). Gezeigt sind die Fließkurven von (A) Krambeöl - KBO, (B) Reisöl – RCO, (C) Senfl - SO, (D) Erucarapsöl - ERSO, (E) Rapsöl - RSO und (F) Sesamöl - SEO. ....	201
Abbildung 70: Fließkurven für native (schwarz) und epoxidierte Pflanzenöle (grau) - Fortsetzung von Abbildung 69. Gezeigt sind die Fließkurven von (G) Maiskeimöl - MKO, (H) Sojaöl - SBO, (I) Schwarzkümmelöl - SKO, (J) Sonnenblumenöl - SFO, (K) Traubenkernöl - TKO und (L) Holunderkernöl - HO.....	202



---

Abbildung 71: Fließkurven für native (schwarz) und epoxidierte Pflanzenöle (grau) - Fortsetzung von Abbildung 70. Gezeigt sind die Fließkurven von (M) Leinsamenöl - LSO und (N) Drachenkopfl - DO. ....	203
Abbildung 72: DSC-Thermogramme für (A) natives Krambeöl (KBO) und (B) epoxidiertes Krambeöl (KBOE). ....	204
Abbildung 73: DSC-Thermogramme für (A) natives Reisöl (RCO) und (B) epoxidiertes Reisöl (RCOE). ....	205
Abbildung 74: DSC-Thermogramme für (A) natives Erucarapsöl (ERSO) und (B) epoxidiertes Erucarapsöl (ERSOE). ....	206
Abbildung 75: DSC-Thermogramme für (A) natives Rapsöl (RSO) und (B) epoxidiertes Rapsöl (RSOE). ....	207
Abbildung 76: DSC-Thermogramme für (A) natives Sesamöl (SEO) und (B) epoxidiertes Sesamöl (SEOE). ....	208
Abbildung 77: DSC-Thermogramme für (A) natives Maiskeimöl (MKO) und (B) epoxidiertes Maiskeimöl (MKOE). ....	209
Abbildung 78: DSC-Thermogramme für (A) natives Schwarzkümmelöl (SKO) und (B) epoxidiertes Schwarzkümmelöl (SKOE). ....	210
Abbildung 79: DSC-Thermogramme für (A) natives Sonnenblumenöl (SFO) und (B) epoxidiertes Sonnenblumenöl (SFOE). ....	211
Abbildung 80: DSC-Thermogramme für (A) natives Traubenkernöl (TKO) und (B) epoxidiertes Traubenkernöl (TKOE). ....	212
Abbildung 81: DSC-Thermogramme für (A) natives Safloröl (SAO) und (B) epoxidiertes Safloröl (SAOE). ....	213
Abbildung 82: DSC-Thermogramme für (A) natives Holunderkernöl (HO) und (B) epoxidiertes Holunderkernöl (HOE). ....	214
Abbildung 83: DSC-Thermogramme für (A) natives Leinsamenöl (LSO) und (B) epoxidiertes Leinsamenöl (LSOE). ....	215
Abbildung 84: Küvette mit der organischen Phase. Die wässrige Phase wird über eine Kapillare in die organische Phase eingedrückt. In der Abbildung ist die Tropfenbildung zu erkennen, kurz bevor sich der Tropfen ablöst. ....	217
Abbildung 85: Kontaktwinkelmessgerät OCA 40 Micro der Firma DataPhysics Instruments GmbH zur Bestimmung der Grenzflächenspannung nach der Pendant Drop Methode. ....	217
Abbildung 86: Grundaufbau des 3D-ORM Gerätes. ....	218
Abbildung 87: (A) Zusammenhang zwischen dem vom Laserstrahl abgetasteten Tropfen und dem entstehenden elektrischen Laufzeitsignal. (B) Beziehung des Durchmessers des abgetasteten Kreises und der Sehnenlänge des Tropfens [235]. ....	219
Abbildung 88: Benutzeroberfläche der Auswertesoftware MCSA 1.0.4. ....	220

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fettsäurezusammensetzung und Jahresproduktion 2015/2016 für verschiedene pflanzliche Öle. ....	5
Tabelle 2: Folgereaktionen auf Basis eines Epoxids als Intermediat [20, 26-28]. ....	7
Tabelle 3: Zusammenfassung chemischer und biotechnologischer Verfahren zur Epoxidierung Pflanzenöl-basierter Substrate: Reaktionsbedingungen, Lösemiteileinsatz, Vor- und Nachteile. ....	20
Tabelle 4: Lipase-katalysierte Epoxidierung von Ölsäure mit der immobilisierten Lipase B aus <i>C. antarctica</i> (Novozym® 435). ....	27
Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten nicht-immobilisierten Lipasen. ...	32
Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten immobilisierten Lipasen. ....	33
Tabelle 7: Zusammenfassung der für eine Epoxidierung positiv getesteten Enzyme. ....	36
Tabelle 8: Sequenzidentität (I) und -ähnlichkeit (S) zwischen verschiedenen Lipasen aus unterschiedlichen <i>Pseudozyma</i> sp. (in %) basierend auf einem paarweisen Sequenzvergleich mit CalB unter Verwendung der EMBOSS Needle Software und Einsatz einer BLOSUM62-Matrix. ....	38
Tabelle 9: Spezifische Umsatzraten bei der Epoxidierung von 1 M Ölsäure in Toluol mit verschiedenen immobilisierten Lipasen bei 30, 40 und 50 °C. ....	42
Tabelle 10: Lipase-katalysierte Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle (Lipase B aus <i>C. antarctica</i> immobilisiert auf Acrylharz, Novozym® 435). ....	53
Tabelle 11: Viskosität und Schmelzpunkt verschiedener Pflanzenölepoxyde in Zusammenhang mit Jodzahl und Epoxidsauerstoffgehalt (OO). ....	55
Tabelle 12: Schmelzpunkte verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren und der entsprechenden Triacylglyceride [162, 163]. ....	56
Tabelle 13: Lipase-katalysierte Epoxidation verschiedener Fettsäuremethylester und Dicarbonsäuredimethylester mit Novozym® 435. ....	58
Tabelle 14: Lipase-katalysierte Epoxidation verschiedener Fettsäuren mit der auf Acrylharz immobilisierten Lipase B aus <i>C. antarctica</i> (Novozym® 435). ....	61
Tabelle 15: Lipase-katalysierte Epoxidation verschiedener Alkene mit der auf Acrylharz immobilisierten Lipase B aus <i>C. antarctica</i> (Novozym® 435). ....	65
Tabelle 16: Fettsäurezusammensetzung (in %), mittlere Molmasse auf Basis der Fettsäurezusammensetzung, Jodzahl für die hinsichtlich der chemo-enzymatischen Epoxidierung getesteten Pflanzenöle inklusiver der zugegebenen freie Fettsäuren und daraus resultierender maximal möglicher Epoxidsauerstoffgehalt (in %). ....	74
Tabelle 17: Ergebnisse zum jeweils mit Senf- und Drachenkopföl durchgeführten statistischen Versuchsplan. Untersucht wurden der Einfluss von Enzymmenge, Temperatur, Zeit und Lösemittelmenge bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung von Senföl (SO) und Drachenkopföl (DO) in jeweils 27 Einzelansätzen. ....	78

---

Tabelle 18: Mathematische Modelle zur Beschreibung des Epoxidsauerstoffgehalts (OO) in Abhängigkeit der Temperatur, Zeit Lösemittel- und Enzymmenge für Drachenkopf- und Senföl. ....	80
Tabelle 19: Auswahl optimierter Prozessbedingungen zur Epoxidierung von Drachenkopf- und Senföl mit Hilfe des Optimierungstools von Design-Expert® .....	85
Tabelle 20: Vergleich der mittels DSC ermittelten Onset-/Offset-Temperaturen und des Temperaturbereichs verschiedener nativer und epoxidierter Öle für die Schmelz- und Kristallisationskurve (Heiz- und Kühlrate: 10 °C min <sup>-1</sup> , Bereich: -100 bis 50 °C).....	99
Tabelle 21: Vergleich der mittels DSC gemessenen Umwandlungstemperaturen verschiedener nativer und epoxidierter Öle beim Schmelzen (Heizrate: 10 °C min <sup>-1</sup> , Bereich: -100 bis 50 °C).....	104
Tabelle 22: Vergleich der mittels DSC gemessenen Umwandlungstemperaturen verschiedener nativer und epoxidierter Öle bei der Kristallisation (Kühlrate: 10 K min <sup>-1</sup> , Bereich: 50 bis -100 °C). ....	106
Tabelle 23: Spezifische Produktbildungsrate bei der enzymatischen Epoxidierung von Sojaöl mit Novozym® 435 mit unterschiedlichen Wasserstoffperoxid-zugabevarianten. ....	111
Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Wasserstoffperoxidzugabevarianten auf die Stabilität von Novozym® 435 bei der Epoxidierung von Sojaöl. ....	114
Tabelle 25: Bestimmung von theoretischer Jodzahl (IZ <sub>theor.</sub> ), Epoxidsauerstoffgehalt (OO), Epoxidausbeute (Y(OO)) und Säurezahl (SZ) für aufbereitete Epoxide aus zwei verschiedenen technischen Ölsäuremethylestern (70% - Sigma-Aldrich, 84% - DHW Oleochemicals).....	115
Tabelle 26: Fettsäuregehalt in %, Jodzahl und theoretisch maximal möglicher Epoxidsauerstoffgehalt für verschiedene technische Fettsäuren und unterschiedliche Tallölfettsäure-Fractionen. ....	120
Tabelle 27: Charakteristische Abmessungen der verwendeten Rührreaktoren. ....	144
Tabelle 28: Übersicht zu verschiedenen Betriebszuständen bei der Bestimmung der Tropfengrößenverteilung im mit einem 6-Blatt-Scheibenrührer gerührten Zweiphasensystem mit Hilfe eines Sequip <i>in-situ</i> PAT Sensors bei 30 °C.....	146
Tabelle 29: Auflistung der untersuchten Prozessbedingungen bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopföl im 1 L- und 10 L-Maßstab.....	148
Tabelle 30: Übersicht zur enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopföl bei verschiedenen Lösemittelanteilen. ....	155
Tabelle 31: Masse an epoxidiertem Drachenkopföl für die verschiedenen Reaktionsansätze nach 24 h bei Variation des Dispersphasenanteils. ....	158
Tabelle 32: Übersicht der Längenmaße und Betriebsparameter für die chemo-enzymatische Epoxidierung im 1, 10 und im 100 L Reaktor für 60 Gew. % und $\phi = 0,343$ mit Scheibenrührer und Strombrecher. ....	161

---

Tabelle 33: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Herstellers.....	186
Tabelle 34: Auflistung der benutzten Geräte mit Angabe des Herstellers und dem Ort/Land des Herstellers.....	187
Tabelle 35: ANOVA-Analyse zur Auswertung des statistischen Versuchsplans zur Untersuchung des Einflusses von Temperatur, Zeit, Enzym- und Lösemittelmenge bei der enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopföl.....	188
Tabelle 36: ANOVA-Analyse zur Auswertung des statistischen Versuchsplans zur Untersuchung des Einflusses von Temperatur, Zeit, Enzym- und Lösemittelmenge bei der enzymatischen Epoxidierung von Senföl.....	189
Tabelle 37: Lösungen und Reagenzien zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von Lipasen. ....	190
Tabelle 38: Zusammensetzung der mobilen Phase und des Detektionsmittels zur Untersuchung der Epoxidierung Pflanzenöl-basierter Edukte. ....	191
Tabelle 39: Zusammensetzung und Konzentration der Stammlösungen zur Bestimmung des Epoxidsauerstoffes. ....	197
Tabelle 40: Auflistung verschiedener empirischer Korrelationsgleichungen zur Berechnung des Sauterdurchmessers mit Verwendung eines 6-Blatt Scheibenrührers. ....	221

---

## Kurzfassung

In den vergangenen Jahren ist das Interesse der chemischen Industrie an der Nutzung nachwachsender Rohstoffe zur Herstellung von Grund- und Feinchemikalien stark gestiegen. Gründe hierfür sind die Verknappung fossiler Rohstoffe, die damit verbundene Notwendigkeit zur Entwicklung geeigneter Verfahren zur ganzheitlichen Nutzung nachwachsender Rohstoffquellen und die vielseitigen Nutzungsmöglichkeiten, die sich auf Basis der Verwendung verschiedener nachwachsender Ausgangsstoffe ergeben. Zu den wichtigsten nachwachsenden Rohstoffen für die chemische Industrie gehören pflanzliche Öle. Die 2015/2016 weltweit produzierte Menge der neun wichtigsten pflanzlichen Öle lag bei etwa 178 Mio. Tonnen. Pflanzliche Öle werden in der chemischen Industrie häufig funktionalisiert, um in verschiedenen Anwendungsgebieten eingesetzt werden zu können. Eine interessante Funktionalisierung stellt die Epoxidierung der in verschiedenen Fettsäuren enthaltenen C=C-Doppelbindung dar. Die so erzeugten Pflanzenöl-basierten Epoxide können beispielsweise als Weichmacher in Kunststoffen, als Monomerbausteine zur Herstellung von Polymeren oder als Intermediate zur Herstellung von Schmierstoffen verwendet werden.

Zur Epoxidierung von Pflanzenölen und daraus gewinnbaren Fettsäurederivaten können Enzyme eingesetzt werden. In der Literatur wurde die Epoxidierung verschiedener ungesättigter Substrate mit der Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* (früher *Candida antarctica*, CalB) beschrieben. Die Epoxidierung erfolgt dabei vergleichbar zur chemischen Synthese über eine von der Lipase gebildete Persäure. Die Persäurebildung wurde bisher allerdings nur für wenige Lipasen beschrieben. Das Reaktionssystem besteht dabei aus zwei nicht-mischbaren flüssigen Phasen und häufig einem heterogenen Katalysator. Als Substrate wurden fast ausschließlich pflanzliche Öle aus dem Lebensmittelbereich untersucht. Eine vergleichende Prozessoptimierung unter Berücksichtigung der Substrateigenschaften wurde bisher nicht durchgeführt. Eine umfangreiche Charakterisierung der enzymatisch hergestellten Epoxidderivate steht noch aus. Außerdem wurde die Skalierbarkeit der auch als chemoenzymatische Epoxidierung bezeichneten Synthese bisher nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 18 verschiedene freie Lipasen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Persäurebildung untersucht und die damit verbundene Epoxidierung am Beispiel von Ölsäure für neun ausgewählte Lipasen gezeigt. Dabei wurden fünf neue CalB-ähnliche Lipasen aus verschiedenen *Pseudozyma* sp. identifiziert und auf Aminosäureebene mit der Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* (CalB) verglichen.

Die Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle und Pflanzenöl-basierter Derivate wurde unter Verwendung einer immobilisierten Lipase optimiert. Die Optimierung der enzymatischen Epoxidierung zweier nicht im Lebensmittelbereich eingesetzter Pflanzenöle, Drachenkopf- und

Senföl, erfolgte mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung. Als Einflussgrößen wurden die Enzym- und Lösemittelmenge, die Inkubationszeit und die Reaktionstemperatur variiert. Durch die Auswahl dieser beiden hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung sehr unterschiedlichen Pflanzenöle konnte eine Prozessoptimierung unter Berücksichtigung der Substratcharakteristika erfolgen. Dabei wurden für beide Öle Epoxidausbeuten von über 90 % erzielt. Die in dieser Arbeit für zwei verschiedene Pflanzenöle optimierten Reaktionsparameter konnten erfolgreich auf die Umsetzung von 15 verschiedenen Pflanzenölen übertragen werden. Für alle Öle wurden Epoxidausbeuten von 70 bis über 95 % erreicht. Die unterschiedlichen enzymatisch hergestellten Pflanzenölepoxide wurden umfangreich hinsichtlich der Viskosität sowie des Schmelz- und Kristallisationsverhaltens charakterisiert. Dabei wurden die Ergebnisse erstmals in Bezug auf die Fettsäurezusammensetzung der Substrate diskutiert. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit erfolgreich die Epoxidierung verschiedener Fettsäurederivate gezeigt. Dabei wurden Fettsäuremethylester, verschiedene freie Fettsäuren, 9-Octadecen-1,18-dicarbonsäure und 9-Octadecen mit hohen Epoxidausbeuten umgesetzt.

Die Skalierbarkeit der chemo-enzymatischen Epoxidierung wurde in dieser Arbeit erfolgreich am Beispiel der Umsetzung von Drachenkopföl bis in den 10 L-Maßstab gezeigt. Als geeignetes Maßstabsübertragungskriterium wurde der konstante volumenspezifische Leistungseintrag identifiziert. Im Zuge der Maßstabsübertragung wurde außerdem der Einfluss verschiedener Prozessparameter, wie des Lösemittel- und Dispersphasenanteils sowie der Rührerdrehzahl auf die im Reaktor erzielte Tropfengrößenverteilung beschrieben. Zur *in-situ*-Messung der Tropfengrößenverteilung wurde ein 3D-ORM-System eingesetzt. Die sich bei spezifischen Prozessbedingungen einstellende charakteristische Tropfengrößenverteilung wurde in Form des sogenannten Sauterdurchmessers  $d_{32}$  dargestellt und anschließend in Zusammenhang mit den jeweils erzielten Epoxidierungsraten diskutiert.

---

## Abstract

In the last years, there has been an increasing interest of the chemical industry to produce basic and fine chemicals from renewable raw materials. Reasons are the shortage of fossil feedstocks and the resulting necessity to develop processes for the holistic utilization of alternative renewable raw materials. Additionally, the application of renewable feedstocks facilitates a broad range of applications due to its versatile composition. Plant oils are one of the most important renewable raw materials in chemical industry. The overall production volume of the nine most important vegetable oils was in the range of 171 million tons in 2013/2014. Plant oils are functionalised in many cases before they are used in different products. An interesting chemical modification is depicted by the epoxidation of unsaturated double bonds that are available in many fatty acid chains. The obtained plant oil-based epoxides can be used as stabilisers and plasticisers in polymers, as polymer building blocks or as intermediates during production of lubricants.

Enzymes can catalyse the epoxidation of plant oils and plant oil-based substrates. The enzymatic epoxidation of various unsaturated molecules has been described in literature for the lipase B from *Pseudozyma antarctica* (formerly *Candida antarctica*, CalB). The reaction mechanism is similar to that of the chemical process and utilizes a peroxy acid that is produced by the lipase. The formation of peroxy acids has been described only for a limited number of enzymes. The reaction system is commonly composed of two almost immiscible liquid phases and a solid catalyst in some cases. The plant oil substrates that have been tested up to now have been mainly related to the food sector. A comparative process optimisation that also considers the substrate composition has not been performed before. Additionally, an extensive characterisation of chemo-enzymatically produced epoxides is outstanding. Another topic that has not been addressed until now is the scalability of the enzymatic epoxidation process.

Within this work, 18 different lipases have been investigated regarding their ability to catalyse the formation of peroxy acids and the subsequent epoxidation of oleic acid as model substrate was shown for nine enzymes. Within this group, five new CalB-like lipases have been isolated from various *Pseudozyma* sp. and compared at amino acid level with CalB.

The epoxidation of diverse plant oils and plant oil-based derivatives has been optimised using an immobilized lipase. The optimisation of the enzymatic epoxidation was performed for two plant oils not related to the food sector, namely dragonhead and mustard oil, using a statistical approach. The enzyme and solvent amount, the incubation time and the reaction temperature were selected as determining factors. By selecting two different plant oils that differ strongly in the fatty acid composition it was possible to optimise process conditions with respect to the substrate composition. During the investigation of described process conditions, epoxide yields

over 90 % were obtained for dragonhead as well as mustard oil. The optimised process conditions obtained with this work were transferred successfully to the conversion of 15 different plant oils with various fatty acid compositions. Epoxide yields in the range of 70 to 90 % were achieved for all 15 plant oils. The enzymatically produced epoxidized plant oils were characterised regarding viscosity as well as melting and crystallisation behaviour. The resulting product characteristics were discussed in relation to the fatty acid composition of the used plant oils. In addition to the epoxidation of miscellaneous plant oils, also fatty acid derivatives were investigated. The epoxidation of fatty acid methyl esters, different free fatty acids, 9-octadecen-1,18-dicarboxylic acid and 9-octadecen was shown with high conversions.

The last topic of this work was related to the scalability of the enzymatic epoxidation process. In this work, the scale-up was successfully shown during the conversion of dragonhead oil in reaction scales up to 10 L. The constant volume specific power input was shown to be an appropriate scale-up criterion for the enzymatic epoxidation. In the course of investigations regarding the scale-up also the influence of different process conditions (solvent amount, volume fraction of dispersed phase and stirrer speed) on the droplet size distribution was analysed utilizing a 3D-ORM system for *in-situ* measurements. The results obtained during measurements of the droplet size distribution were finally discussed in relation to epoxidation rates achieved under similar process conditions.



---

# 1 Motivation und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der enzymatischen Herstellung von Epoxiden aus Pflanzenölen und Pflanzenölderivaten. In Kapitel 1.1 und 1.2 werden die Motivation für diese Arbeit dargelegt und die entsprechenden Ziele formuliert.

## 1.1 Motivation

Das Interesse der chemischen Industrie an der Nutzung nachwachsender Rohstoffe wie beispielsweise Lignozellulose-haltiger Pflanzen oder pflanzlicher Öle zur Herstellung von Grund- oder Feinchemikalien ist in den letzten Jahren stark gestiegen. Als Gründe hierfür sind neben der Verknappung fossiler Rohstoffe und der damit verbundenen Notwendigkeit zur Entwicklung geeigneter Verfahren zur ganzheitlichen Nutzung nachwachsender Rohstoffe auch die vielseitigen Nutzungsmöglichkeiten zu nennen, die sich auf Basis der Verwendung verschiedener nachwachsender Rohstoffe ergeben [1-3].

Pflanzliche Öle stellen einen der wichtigsten nachwachsenden Rohstoffe für die chemische Industrie dar [2, 4-6]. Der Weltmarkt für die neun wichtigsten pflanzlichen Öle betrug 2015/2016 etwa 178 Mio. Tonnen [7]. Der Großteil dieser Öle fand im Lebensmittelbereich Verwendung. Zwischen 1999/2000 und 2009/2010 stieg der Anteil der nicht-lebensmittel-technisch eingesetzten Öle von etwa 10 % auf über 20 % an. Dieser Anstieg ist auf ein Wachstum der oleochemischen Industrie und speziell der Biodieselproduktion zurückzuführen [8, 9]. Zur Anwendung von pflanzlichen Ölen in der chemischen Industrie ist häufig eine Funktionalisierung erforderlich. Eine interessante Variante der Funktionalisierung stellt die Epoxidierung der in verschiedenen Fettsäuren enthaltenen C=C-Doppelbindung dar [3, 4, 10]. Die Herstellung Pflanzenöl-basierter Epoxide erfolgt mit Hilfe der sogenannten Prileschajew-Reaktion. Bei dieser Reaktion erfolgt der Sauerstofftransfer auf die C=C-Doppelbindung durch eine Persäure. Als Katalysator werden üblicherweise anorganische Säuren wie beispielsweise Schwefelsäure verwendet. Durch den Einsatz stark saurer Katalysatoren verringert sich die Selektivität der Umsetzung, weil es durch das saure Reaktionsmedium in Kombination mit einer Reaktionstemperatur von etwa 60 °C zur ungewollten Öffnung des Epoxidrings kommen kann [11-13]. Zusätzlich zu dem technischen Problem beim Umgang mit starken Säuren (Korrosion) entstehen bei der Produktaufarbeitung durch die nötige Neutralisation hohe Salzfrachten [14, 15].

Eine Alternative zur chemischen Synthese von Epoxiden aus Pflanzenölen stellte die sogenannte chemo-enzymatische Epoxidierung dar. Die Enzym-katalysierte Reaktion bietet die Möglichkeit, ein funktionelles Epoxidmonomer aus nachwachsenden Rohstoffen unter

---

milden Bedingungen herzustellen und bei der chemischen Herstellung eine mögliche Nebenproduktbildung zu vermeiden [16-18]. Bisher wurde die Eignung für die enzymatische Epoxidierung nur für wenige Enzyme untersucht. Strukturelle Merkmale von einzelnen bei der Epoxidierung katalytisch aktiven Enzymen wurden dabei nicht vollständig identifiziert. Als Substrate wurden zumeist Pflanzenöle aus dem Lebensmittelbereich eingesetzt. Aufgrund der wenigen untersuchten Substratvarianten kann derzeit keine eindeutige Aussage zum Einfluss von Substratcharakteristika auf die einzustellenden Prozessbedingungen bei der enzymatischen Epoxidierung getroffen werden. Eine umfangreiche Charakterisierung der Produkteigenschaften verschiedener enzymatisch hergestellter Pflanzenölepoxide wurde noch nicht durchgeführt. Die enzymatische Umsetzung erfolgte ausschließlich im kleinen Labormaßstab. Untersuchungen zur Skalierbarkeit der chemo-enzymatischen Epoxidierung wurden bisher noch nicht durchgeführt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die in Kapitel 1.2 aufgeführten Ziele für diese Arbeit formuliert.

## **1.2 Ziele dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Enzym-katalysierten Verfahren für die Herstellung von biobasierten Epoxiden aus Pflanzenölen und Pflanzenöl-basierten Derivaten. Zur Erreichung dieses Ziels wurden folgende Teilziele formuliert:

*Untersuchung der Epoxidierung mit verschiedenen freien und immobilisierten Lipasen und Auswahl geeigneter Enzyme (siehe Kapitel 3)*

Die Auswahl geeigneter Biokatalysatoren spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens. Bisher wurden nur wenige Enzyme identifiziert, die die enzymatische Epoxidierung katalysieren. Deshalb sollten in dieser Arbeit weitere Enzyme untersucht werden, um so das Spektrum geeigneter Enzyme zu erweitern und ein besseres Verständnis für den Einfluss spezifischer Enzymmerkmale aufzubauen. Auf Basis dieser Untersuchungen sollte ein geeignetes Enzym für die Auslegung von Verfahren zur enzymatischen Epoxidierung von Pflanzenöl-basierten Edukten in Kapitel 4 ausgewählt werden.

*Auslegung optimierter Verfahren zur enzymatischen Epoxidierung ausgewählter Pflanzenöl-basierter Substrate und umfangreiche Charakterisierung der epoxidierten Produkte (siehe Kapitel 4)*

Bei der Auswahl der Rohstoffe sollten neben Substraten aus dem Lebensmittelsektor vor allem nicht-essbare Pflanzenöle betrachtet werden. Die Pflanzenöle sollten so ausgewählt werden, dass sie durch eine unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung die Herstellung eines

breiten Spektrums verschiedener Epoxidöle und Epoxidderivate mit unterschiedlichem Epoxidsauerstoffgehalt ermöglichen. Bei der Prozessoptimierung und Auswahl geeigneter Reaktionsbedingungen sollten die Substrateigenschaften berücksichtigt werden. Ziel war es dabei, möglichst hohe Umsätze und Epoxidausbeuten zu erreichen. Bei der Auslegung des Verfahrens sollten die Reaktionsbedingungen in dieser Arbeit so gewählt werden, dass der verwendete Biokatalysator möglichst stabil ist. Die verschiedenen enzymatisch hergestellten Epoxidderivate sollten umfangreich charakterisiert werden, um so den Einfluss des jeweiligen Substrats auf die Produkteigenschaften zu beschreiben und Korrelationen zwischen Substrat- und Produkteigenschaften zu identifizieren.

#### *Maßstabsvergrößerung der Enzym-katalysierten Epoxidierung (siehe Kapitel 5)*

Nach Auswahl geeigneter Reaktionsbedingungen sollten systematische Untersuchungen zur Skalierbarkeit des mehrphasigen Reaktionssystems erfolgen. Ziel war es dabei, den Einfluss verschiedener Prozessbedingungen, wie der Rührerdrehzahl, auf die Epoxidierung im skalierbaren Reaktionssystem zu untersuchen. In einem ersten Schritt sollten geeignete Reaktoren und Rührer ausgewählt werden. Außerdem sollte die sich im dynamischen Gleichgewicht einstellende Tropfengrößenverteilung in Zusammenhang mit der Epoxidierung diskutiert und ein geeignetes Kriterium zur Maßstabsübertragung identifiziert werden. Die Eignung des gewählten Maßstabsübertragungskriteriums zur Skalierung der chemoenzymatischen Epoxidierung sollte durch Untersuchungen in verschiedenen Reaktorgrößen demonstriert werden, um die Basis zur Auslegung größerer Reaktionsmaßstäbe zu schaffen.

Die Kapitel 3 bis 5 wurden jeweils folgendermaßen aufgebaut:

- Anforderungsprofil zur Definition der Auswahlkriterien und Einflussgrößen
- Stand der Wissenschaft und Technik
- Spezifischer Methodenteil zur Beschreibung des Vorgehens
- Ergebnisse und Diskussion
- Schlussfolgerungen.

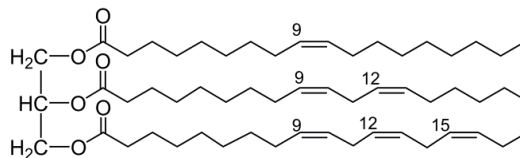
In Kapitel 6 wurden die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst und ein kurzer Ausblick auf mögliche weiterführende Arbeiten gegeben. Die Darstellung der Kapitelübergreifend verwendeten Materialien und analytischen Methoden erfolgt im Anhang (siehe Kapitel 8).

## 2 Einleitung und Stand der Technik

Das nachfolgende Kapitel 2 beschäftigt sich allgemein mit pflanzlichen Ölen und deren Verfügbarkeit für die chemische Industrie. In Kapitel 2.1 sollen pflanzliche Öle hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung vorgestellt und deren Eigenschaften als Substrat für die chemische Industrie thematisiert werden. Kapitel 2.1.1 gibt einen Überblick zu bereits auf Basis von Pflanzenölen hergestellten Chemikalien. Die Epoxidgruppe als einfachste sauerstoffhaltige heterozyklische Verbindung wird in Abschnitt 2.1.2 beschrieben. In diesem Abschnitt werden verschiedenste Folgereaktionen aufgeführt, die ausgehend von Epoxiden durchgeführt werden können. Außerdem werden unterschiedliche Anwendungsgebiete Pflanzenöl-basierter Epoxide beschrieben. Eine allgemeine Einführung in die chemische und enzymatische Epoxidierung pflanzlicher Öle erfolgt in den Teilkapiteln 2.2.1 und 2.2.2.

### 2.1 Verfügbarkeit und Verwendung pflanzlicher Öle in der chemischen Industrie

Pflanzenöle bestehen aus Triglyzeriden, also Estern von überwiegend langkettigen Carbonsäuren und Glycerin, die sich durch den unterschiedlichen Gehalt an eingebauten Fettsäuren unterscheiden (siehe Abbildung 1) [4].



Triglyzerid mit Ölsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure als Fettsäurerest (von oben nach unten)

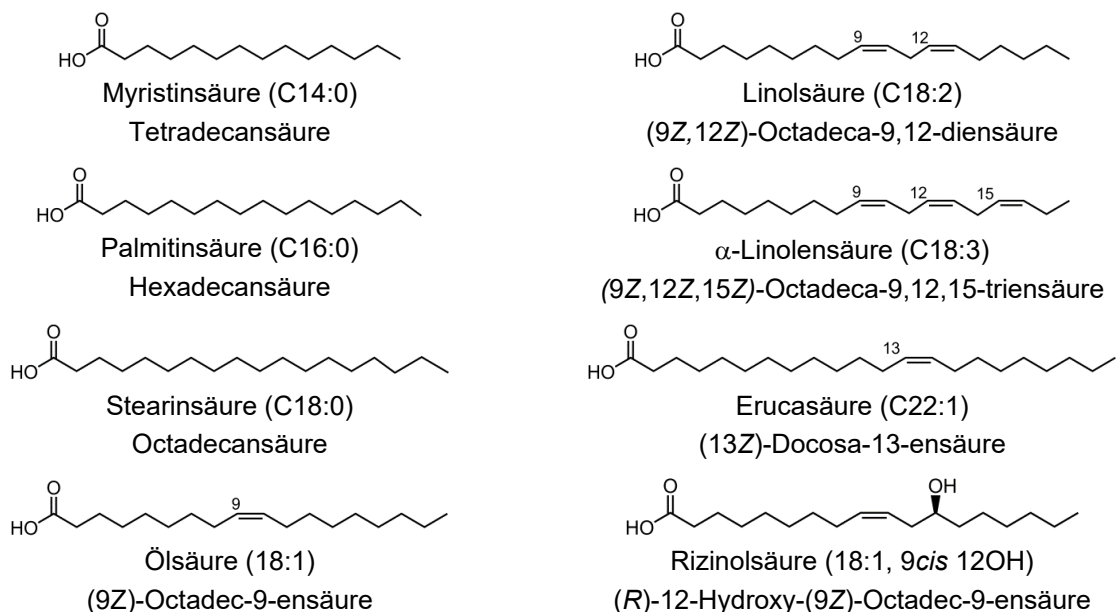


Abbildung 1: Am häufigsten in pflanzlichen Ölen vorkommende Fettsäuren [10, 19].

Eine beispielhafte Struktur eines Triglyzerides und die am häufigsten in Pflanzenölen vorkommenden gesättigten und ungesättigten Fettsäuren sind in Abbildung 1 dargestellt. In Tabelle 1 sind Fettsäuregehalte für die vier mengenmäßig wichtigsten pflanzlichen Öle, Palm-, Soja-, Raps- und Sonnenblumenöl, zusammengefasst. Zusätzlich ist die Fettsäurezusammensetzung von Leinsamenöl aufgeführt, das sich durch einen hohen Gehalt an  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3, Fettsäurekette mit 18 Kohlenstoffatomen und drei *cis*-Doppelbindungen) auszeichnet (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Fettsäurezusammensetzung und Jahresproduktion 2015/2016 für verschiedene pflanzliche Öle.**

Angegeben ist der prozentuale Anteil verschiedener Fettsäuren und die weltweite Produktionsmenge des jeweiligen Öls in Mio. Tonnen für den Produktionszeitraum 2015/2016 [4, 7, 10, 20, 21].

Fettsäure	Palmöl	Sojaöl	Rapsöl*	Sonnenblumenöl	Leinsamenöl
Myristinsäure (C14:0)	0,5-3	-	-	-	-
Palmitinsäure (C16:0)	40-47	8-11	4-5	5-7	5-7
Stearinsäure (C18:0)	2-7	3-5	0,5-2	3-6	3-5
Ölsäure (C18:1)	36-42	20-28	51-70	18-28	12-34
Linolsäure (C18:2)	7-12	50-56	15-30	60-68	14-26
$\alpha$ -Linolensäure (C18:3)	-	6-10	5-14	-	35-65
Arachinsäure (C20:0)	0-0,5	0-0,5	<2	-	0,3-1
Produktionsmenge (Mio. t)	59,40	52,14	27,63	15,13	-

\*00-Rapsöl (Neues Rapsöl): Durch Pflanzenzucht so verändert, dass geringe Mengen Erucasäure enthalten sind [4].

### 2.1.1 Pflanzenöl-basierte Chemikalien

Triglyzeride bieten aufgrund ihrer Struktur aus chemischer Sicht zwei reaktive Zentren zur Funktionalisierung, zum einen die C=C-Doppelbindung und zum anderen die Carbonsäurefunktion, die im Triglyzerid in Form eines Esters vorliegt [3]. Über einen langen Zeitraum hinweg wurden Derivatisierungen mit einem Anteil von über 90 % an der Carboxygruppe vorgenommen, während nur etwa 10 % der untersuchten Reaktionen eine Umsetzung der ungesättigten Fettsäurekette zum Ziel hatten [22, 23].

Bei der Umsetzung von Triglyzeriden an der Carboxyfunktion sind die Hydrolyse mit Wasser und die Umesterung mit Methanol (Methanolyse) zu nennen. Die Hydrolyse wird häufig in kontinuierlich betriebenen Kolonnen bei 250 °C und 20 bis 60 bar ohne Katalysator durchgeführt, wobei das freiwerdenden Glycerin permanent im Gegenstromverfahren mit Wasser aus dem Reaktionsgemisch extrahiert wird, um so Hydrolysegrade von bis zu 98 % zu erzielen

und freie Fettsäuren (FS) als Produkt zu erhalten [22]. Die Herstellung von Fettsäuremethylestern (FS-ME) aus Triglyzeriden und Methanol erfolgt ebenfalls in kontinuierlich arbeitenden Reaktionskolonnen bei 240 °C und 100 bar und wird alkalisch katalysiert. In einer Verfahrensvariante können FS-ME durch eine ebenfalls alkalisch katalysierte Veresterung freier Fettsäuren mit Methanol bei 250 °C und 10 bar synthetisiert werden [22, 24]. FS und FS-ME können im Anschluss durch Hochdruckhydrierung bei 200 bis 250 °C und Wasserstoffdrücken zwischen 250 und 300 bar unter Einsatz von festen Metalloxid-haltigen Mischkatalysatoren zu linearen, primären, aliphatischen Fettalkoholen hydriert werden. Mit speziellen zinkhaltigen Mischkatalysatoren können dabei Fettalkohole erzeugt werden, bei denen die im Substrat ursprünglich enthaltene Doppelbindung erhalten bleibt [4, 22, 24]. Aus den auf diesem Wege hergestellten Fettalkoholen können weitere Produkte synthetisiert werden. Fettamine aus Fettalkoholen sind in Anwesenheit von Dehydrierungskatalysatoren und Ammoniak bei 210 bis 260 °C gewinnbar. Weitere wichtige Folgeprodukte auf Basis von Fettalkoholen sind verschiedene Tenside. Eine übergeordnete Rolle spielen die Fettalkoholethoxylate (nichtionischen Tensiden), die Fettalkoholsulfate und -ethersulfate (anionischen Tensiden) [4].

Neben den beschriebenen Umsetzungsmöglichkeiten an der Carboxylgruppe sind katalytische Derivatisierungsvarianten an der C=C-Doppelbindung von Bedeutung. Es ist aus dem Bereich der Petrochemie bekannt, dass eine Reihe verschiedener Reaktionen insbesondere dann an der olefinischen Doppelbindung erfolgen können, wenn zur Steuerung von Aktivität und Selektivität Übergangsmetallkatalysatoren verwendet werden. Als beispielhafte Reaktionen können hier Additionen an die Doppelbindung, Oligomerisierung, Oxidation zu Epoxiden, Carbonsäuren und Aldehyden oder Metathese-Reaktionen genannt werden. Diese meist an kurzkettigen reaktiven Molekülen mit endständiger Doppelbindung durchgeführten Reaktionen können allerdings nicht einfach auf ungesättigte Oleochemikalien übertragen werden. Die meist langkettigen sterisch anspruchsvolleren ungesättigten Fettstoffe treten wegen der Disubstitution der C=C-Doppelbindung und der räumlichen Struktur zum einen nur schwer mit dem Katalysator in Wechselwirkung. Zum anderen besitzen sie bereits eine funktionelle Gruppe in Form einer Carboxyl-, Carboxylester- oder Alkoholfunktion, die stabile Bindungen mit Übergangsmetallkatalysatoren eingehen und diese damit inaktivieren können [4, 25].

### 2.1.2 Eigenschaften und Verwendung von Epoxiden und Pflanzenöl-basierten Epoxiden

Epoxide sind wichtige Intermediate in der industriellen organischen Chemie und können sowohl aus petrochemisch basierten Alkenen als auch Pflanzenöl-basierten ungesättigten Derivaten hergestellt werden. Diese Epoxide werden üblicherweise auf chemischem Weg synthetisiert. Epoxide, häufig auch als Oxirane bezeichnet, sind aufgrund ihrer heterogenen



Die wichtigsten niedermolekularen Epoxidverbindungen sind Ethylenoxid, Propylenoxid und Epichlorhydrin. Ethylenoxid (EO) wird bevorzugt durch direkte Oxidation von Ethylen mit Luftsauerstoff oder molekularem Sauerstoff unter Verwendung von Silber-basierten Katalysatoren hergestellt [29-31]. Der weltweite Bedarf an EO lag 2012 bei ungefähr 20 Millionen Tonnen. Dieser Bedarf zeigt die industrielle Bedeutung von EO als funktioneller Monomerbaustein für Folgereaktionen [31, 32]. Als zweites wichtiges Oxiran ist Propylenoxid (PO) mit einer weltweiten Produktion von etwa 10 Millionen Tonnen im Jahr 2012 zu nennen [32, 33]. Die industrielle Herstellung von PO erfolgt im Wesentlichen mit dem Chlorhydrinprozess oder einer indirekten Oxidation mit Hilfe von organischen Peroxiden [33-35]. Das dritte industriell wichtige niedermolekulare Epoxid ist Epichlorhydrin mit einer Jahresproduktionsmenge von circa 1,8 Millionen Tonnen [36, 37]. Der industriell dominierende Prozess basiert auf einer mehrstufigen Umsetzung von Propylen und Chlorgas. Im ersten Schritt wird Propylen mit  $\text{Cl}_2$  zu Allylchlorid umgesetzt. Anschließend reagiert Allylchlorid mit Hypochlorsäure zu einem Gemisch aus 1,3-Dichlor-2-propanol und 2,3-Dichlor-1-propanol im Verhältnis 3:1. Im letzten Reaktionsschritt wird dieses Gemisch durch eine Behandlung mit Natriumhydroxid zu Epichlorhydrin umgesetzt [38]. Mittlerweile existieren Prozessalternativen zur Herstellung von Epichlorhydrin, die auf dem Einsatz von Glycerin als nachwachsenden Rohstoff basieren. In einem zweistufigen Verfahren wird Glycerin zuerst in einer Carbonsäure-katalysierten Hydrochlorierung zu 1,3-Dichlor-2-propanol konvertiert, das analog zum bisherigen Prozess auf Basis von Propylen unter Einsatz von Natriumhydroxid zu Epichlorhydrin umgewandelt wird [38]. Erste industrielle Anlagen zur Umsetzung von Glycerin zu Epichlorhydrin wurden bereits in Betrieb genommen [36, 39-41].

Das bedeutendste höhermolekulare Epoxid auf Basis von Sojaöl (epoxidiertes Sojaöl, ESBO) wurde 2012 mit einer produzierten Menge von 240.000 Tonnen pro Jahr auf chemischem Weg hergestellt [42]. Das Verfahren zur chemischen Epoxidierung wird in Kapitel 2.2.1 genauer vorgestellt. Epoxidiertes Sojaöl findet als Stabilisationsmittel oder Weichmacher in Kunststoffen Verwendung. Der Einsatz epoxidierter Pflanzenöl zur Stabilisierung und Weichmachung von chloriertem Kautschuk wurde bereits 1951 patentiert. Durch den Einsatz epoxidierter Öle können Versprödung und Verfärbung vom Kautschuk vermieden werden, wobei ESBO das beste Verhalten zeigte [43, 44]. Ishiaku *et al.* verglichen ESBO und Di-2-ethylhexylphthalat (DEHP) als Weichmacher in einem thermoplastischen Elastomer aus Polyvinylchlorid und epoxidiertem natürlichen Kautschuk und konnten zeigen, dass ESBO eine interessante Alternative zu DEHP darstellt [44]. Witnauer *et al.* verwendeten epoxidierte Diacetomonoglyzeride erfolgreich als Weichmacher für Polyvinylchlorid [45] und Gan *et al.* berichteten über einen entsprechenden Einsatz epoxidierter Ester auf Basis von Palmolein [46]. Des Weiteren wurde epoxidiertes Palmöl als Weichmacher in Polymilchsäure



genutzt [47]. Als Beispiel für eine industrielle Produktlinie kann die durch Arkema vertriebene Vikoflex®-Reihe aufgeführt werden. In dieser Reihe werden verschiedene Epoxyderivate, unter anderem epoxidiertes Sojaöl und epoxidiertes Leinöl, angeboten und für verschiedene Anwendungen empfohlen [48].

Neben dem Einsatz als Stabilisierungsmittel oder Weichmacher können epoxidierte Pflanzenöle auch Anwendung bei der Herstellung von Schmierstoffen finden, da der Einsatz nicht-modifizierter Pflanzenöle als Schmierstoff aufgrund einer niedrigen Oxidationsstabilität und schlechter Eigenschaften bei niedrigen Temperaturen oft nicht vorteilhaft ist [49]. Epoxidierte Pflanzenöle und Fettsäureepoxide dienen bei der Herstellung von Schmierstoffen in der Regel als Intermediate und wurden beispielsweise mit verschiedenen Alkoholen unter Verwendung saurer Katalysatoren durch Ringöffnung zum Hydroxyether umgesetzt. Durch eine Umsetzung der dabei entstehenden freien Hydroxylgruppe mit Säureanhydrid zu einer Esterfunktion und Zugabe eines Stockpunkt-Erniedrigers (engl. *pour point depressant*) konnten stark reduzierte Stockpunkte bis zu -45 °C erreicht werden [49-54].

Ein weiteres Einsatzgebiet epoxidierter Pflanzenöle sind Polymeranwendungen. Crivello und Narayan setzten verschiedene epoxidierte Triglyzeride erfolgreich in einer photoinitierten kationischen Polymerisation zur Herstellung von dünnen Schichten ein [55]. Overeem *et al.* untersuchten den Einsatz von Epoxiden auf Basis hochlinolensäurehaltiger Pflanzenöle als Vernetzter in Pulverbeschichtungen und konnten eine Eignung als Ersatz für den als giftig eingestuften Isocyanursäuretris-(2,3-epoxypropyl)-ester (TGIC) zeigen. Der Einsatz epoxidierter Triglyzeride führte allerdings zu einer nicht vorteilhaften Erniedrigung der Glasübergangstemperatur  $T_g$  und verstärkter Vergilbung [56]. Weitere Ansätze zur Verwendung von epoxidierten Pflanzenölen als Crosslinker wurden von Buisman zusammengefasst [57].

## 2.2 Chemische und enzymatische Epoxidierung von pflanzlichen Rohstoffen

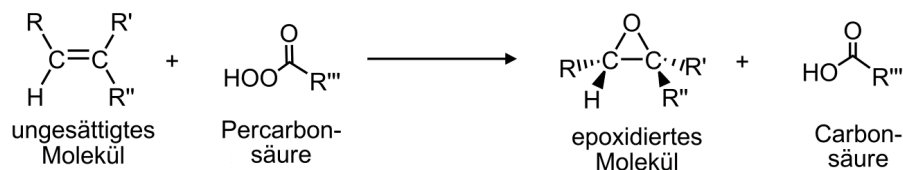
Diese Arbeit beschäftigt sich mit der enzymatischen Herstellung von Epoxiden auf Basis von Pflanzenölen und Pflanzenölderivaten. In Abschnitt 2.2.1 wird das industriell eingesetzte Verfahren zur chemischen Epoxidierung pflanzlicher Öle vorgestellt und in Kapitel 2.2.2 auf die im Fokus dieser Arbeit stehende enzymatische Epoxidierung mit unterschiedlichen Enzymklassen eingegangen, um die Methoden in Kapitel 2.2.3 mit ihren Vor- und Nachteilen gegenüberzustellen.

### 2.2.1 Chemische Epoxidierung

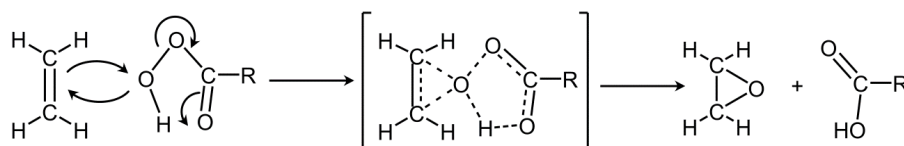
Die Herstellung Pflanzenöl-basierter Epoxide erfolgt im industriellen Maßstab mittels der Prileschajew-Reaktion (siehe Abbildung 3 A), hauptsächlich ausgehend von Sojaöl (240.000 t/a, 2012) [42]. Nikolaus Prileschajew, nach dem die Reaktion benannt wurde,

berichtete 1909 über die Umsetzung ungesättigter Moleküle wie 1-Octen oder 1-Decen mit Benzoylhydroperoxid zum entsprechenden Epoxid [58]. Epoxide entstehen bei der Prileschajew-Methode durch die Reaktion der olefinischen Doppelbindungen mit einer Percarbonsäure. Die Percarbonsäure, meist Perameisen- oder Peressigsäure, wird bevorzugt *in situ* durch eine Säure-katalysierte Oxidation der jeweiligen Carbonsäure mit Wasserstoffperoxid gebildet [12, 13, 25, 58, 59]. Der in Abbildung 3 B dargestellte Reaktionsmechanismus, der auf einem bityklischen Übergangszustand basiert, wurde 1950 von P. D. Bartlett vorgeschlagen [60]. Die Persäure-induzierte Epoxidierung ist eine stereospezifische Reaktion, bei der *cis*-Olefine zu *cis*-Epoxiden und *trans*-Olefine zu *trans*-Epoxiden umgesetzt werden [20, 61, 62]. Die Reaktion ist mit einer Reaktionswärme von etwa  $250 \text{ kJ mol}^{-1}$  stark exotherm und erfordert ein effizientes Kühlsystem zur Wärmeabfuhr [15, 20]. Als Katalysator werden häufig starke anorganische Säuren wie Schwefelsäure verwendet, die in Kombination mit der vorliegenden Reaktionstemperatur zu unerwünschten Nebenreaktionen führen können [11-13]. Bei der Produktaufarbeitung fallen aufgrund der erforderlichen Neutralisation außerdem hohe Salzfrachten an [14, 15].

A



B



**Abbildung 3: Prileschajew Epoxidation einer ungesättigten Verbindung.**

**(A) Bildung eines Epoxids durch Oxidation eines ungesättigten Substrates mit einer Percarbonsäure, (B) vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die Percarbonsäure-induzierte Epoxidation nach Bartlett, modifiziert nach [60, 63].**

Die Methode auf Basis der *in situ*-Persäurebildung wurde für eine Reihe unterschiedlicher Substrate untersucht. Cai *et al.* konnten eine Beschleunigung der Epoxidierung von Sojaöl mit *in situ* gebildeter Peressigsäure unter Verwendung geringer Mengen konzentrierter Schwefelsäure durch eine Temperaturerhöhung von 45 auf 75 °C zeigen, detektierten aber eine vermehrte Ringöffnung durch eine Abnahme des Epoxidsauerstoffgehaltes [12]. Rangarajan *et al.* stellte ein Modell zur Beschreibung der Epoxidierung von Sojaöl mit Essigsäure als Sauerstoffträger und Schwefelsäure als Katalysator im zweiphasigen Reaktionssystem vor [15]. Die Epoxidierung von *Hevea brasiliensis*-Öl, Neemöl und Madhucaöl mit *in*

*situ* gebildeter Perameisensäure wurde ebenfalls untersucht [64]. Neben der als Sauerstoffträger fungierenden Carbonsäure beeinflusst auch die Wahl der flüssigen anorganischen Säure die Reaktionsrate. Dinda *et al.* verglichen die Effektivität von Schwefel-, Phosphor-, Salpeter- und Salzsäure bei der Umsetzung von Baumwollsaamenöl. Es wurde gezeigt, dass Schwefelsäure in Kombination mit Essigsäure als Sauerstoffüberträger die beste Variante zur Umsetzung von Baumwollsaamenöl darstellt [13].

Die Epoxidbildungsrate kann durch elektronenspendende Gruppen, zum Beispiel eine Alkylgruppe, an einem Kohlenstoffatom der C=C-Doppelbindung beschleunigt werden, während elektronenziehende Gruppen wie beispielsweise Chlor-, Hydroxyl- oder Carboxylgruppen einen gegenläufigen Effekt bewirken [20, 65]. Im Gegensatz zu der Wirkung auf die Reaktivität der Doppelbindung führend elektronenziehende Gruppen an der Persäure durch eine gesteigerte Elektrophilie zu einer erhöhten Reaktivität und damit einer gesteigerten Epoxidbildungsrate. Elektronenspende Gruppen reduzieren die Reaktionsrate. Chlorperbenzoesäure ist beispielsweise ein schnelleres Epoxidierungsreagenz als Perbenzoesäure [20]. Ein weiterer einflussreicher Faktor bei der Epoxidierung pflanzlicher Öle liegt in der Auswahl eines geeigneten Lösemittels. Hydrophile Lösemittel reduzieren die Reaktionsrate aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Persäuremolekül. Besser geeignet sind chlorierte oder aromatischen Lösemittel [20].

### 2.2.2 Enzymatische Epoxidierung

Aufgrund des Einsatzes starker Mineralsäuren als Katalysator zur Persäurebildung bei der chemischen Epoxidierung Pflanzenöl-basierter Edukte, der vergleichsweise hohen Temperatur und der damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Prozessführung zur Vermeidung unerwünschter Nebenprodukte aufgrund einer Epoxidringöffnung, ist eine Prozessalternative sehr interessant. Die enzymatische Epoxidierung stellt eine interessante Alternativen dar. Dabei kommen Enzyme zum Einsatz, die eine Reaktion bei milden Temperaturen und ohne Verwendung starker Säuren als Katalysator ermöglichen und damit eine Nebenproduktbildung aufgrund einer Säure-katalysierten Ringöffnung vermeiden [18].

Die bekanntesten Enzymklassen, die eine katalytische Aktivität zur Bildung von Epoxiden zeigen, gehören zu der Klasse der Oxidoreductase (EC 1) oder der Hydrolasen (EC 3). Neben den Enzymklassen kann zur Unterscheidung unterschiedlicher Biokatalysatoren auch die Art der katalysierten Epoxidierung verwendet werden. Dabei gibt es die Enzymgruppen, die eine direkte Epoxidierung des ungesättigten Substrates ohne einen aktivierten Sauerstoffträger katalysieren (Chlorperoxidasen EC 1.11.1.10, und Monooxygenasen EC.1.14) oder Enzyme, die eine indirekte Epoxidierung durch die Bildung eines aktivierten Sauerstoffträgers, zum Beispiel in Form eine Persäure, ermöglichen (Lipasen, Triacylglycerollipasen, EC 3.1.1.3). In

---

den folgenden Abschnitten soll eine Unterteilung unterschiedlicher bisher beschriebener Enzyme mit Epoxidbildungsaktivität anhand der Art der katalytischen Eigenschaften in die direkte und indirekte Epoxidierung erfolgen.

### 2.2.2.1 Enzyme zur direkten Epoxidierung

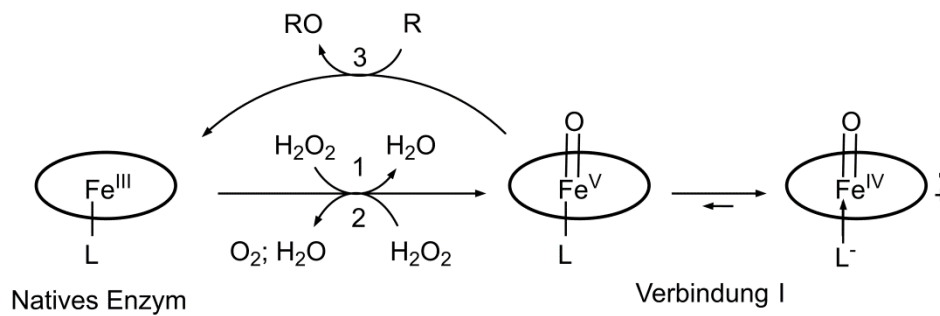
Die direkte enzymatische Epoxidierung erfolgt durch Enzyme, die zur Umsetzung des ungesättigten Substrates keine Intermediate beispielsweise in Form einer Peroxycarbonsäure bilden, sondern das Edukt direkt im aktiven Zentrum des Enzyms zum Beispiel mit Hilfe eines Ferrylsauerstofftransfer-Mechanismus zum entsprechenden Epoxid umgesetzt werden. Die Enzyme finden sich vor allem in der Enzymklasse der Oxidoreductasen (EC 1). Nachfolgend erfolgt eine Zusammenfassung zu den einzelnen Enzymklassen mit beschriebener katalytischer Aktivität zur Bildung von Epoxiden direkt im aktiven Zentrum. Dabei wird auf die jeweiligen Reaktionsmechanismen und umgesetzten Edukte eingegangen.

#### *Peroxidasen (EC 1.11.x)*

Deurzen *et al.* fassten verschiedene durch Peroxidasen katalysierte Oxidationsreaktionen zusammen und beschrieben dabei auch den generellen Mechanismus für Häm-enthaltende Peroxidasen (siehe Abbildung 4). Dabei wird die Häm-Gruppe, die in Form eines Eisen(III)-Protoporphyrin IX vorliegt, durch Wasserstoffperoxid zu einer Eisen(V)-Oxo-Spezies oxidiert, die allerdings überwiegend als kationisches Eisen(IV)-Oxoporphyrin-Intermediat vorliegt. Dieses Intermediat wird auch als Verbindung I bezeichnet und ähnelt sehr dem Eisen(V)-Oxo-Intermediat aus dem katalytischen Zyklus der Monooxygenasen (siehe Abbildung 6). Peroxidasen können diese Eisen(V)-Oxo-Spezies direkt aus dem nativen Enzym und Wasserstoffperoxid bilden, während Monooxygenasen Sauerstoff und ein weiteres Cosubstrat benötigen, das zwei Wasserstoffatome übertragen kann. Die Verbindung I kann anhand verschiedener Reaktionsmechanismen zum nativen Enzym reduziert werden, wobei die Epoxidierung mittels eines Sauerstofftransfers auf ein organisches Substrat erfolgt (siehe Reaktionsschritt 3 in Abbildung 4, R = organisches Substrat). Eine oxidative Halogenierung erfolgt vergleichbar durch Häm- und nicht-Häm-Haloperoxidasen, wenn statt einer organischen Substanz ein Halogenid umgesetzt wird (siehe Reaktionsschritt 3 in Abbildung 4, R = Halogenid). Es sind auch Metall-freie Haloperoxidasen bekannt, bei denen von der Bildung eines Percarbonsäure-Intermediates ausgegangen wird [66].

Für Chlorperoxidasen (CPO, EC 1.11.1.10) wurde eine direkte Epoxidierung verschiedener Alkene mit Wasserstoffperoxid als Cosubstrat beschrieben [66-70]. Für die direkte Epoxidierung von Styren mit einer Chlorperoxidase unter Verwendung von  $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$  wurde des

Weiteren gezeigt, dass der Epoxidsauerstoff in Styrenoxid quantitativ aus dem Wasserstoffperoxid stammt. Als Nebenprodukt wurden signifikante Mengen Phenylacetaldehyd detektiert [69]. Dabei wurde ein P450-ähnlicher Ferrylsauerstofftransfer-Mechanismus postuliert [69, 71, 72]. Die direkte CPO-katalysierte Epoxidierung kurzkettiger Alkene verläuft mit hoher Stereo- und Enantioselektivität [69, 71, 73, 74].



**Abbildung 4: Reaktionszyklus einer Häm-enthaltenden Peroxidase [66].**

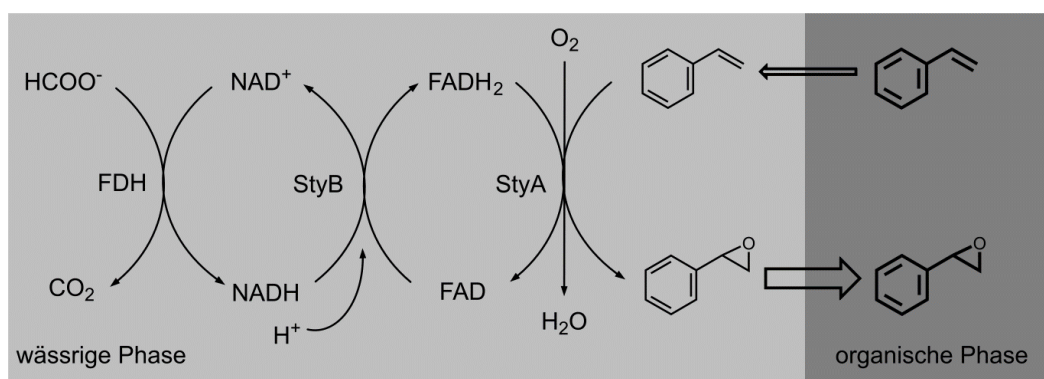
Eine der vielseitigsten Peroxidasen ist die Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago*. Eine stereoselektive Umsetzung linearer und zyklischer *cis*-Olefine wurde von Zaks und Dodds beschrieben, wobei kleine nichtsubstituierte Moleküle bevorzugt wurden, deren Doppelbindung nicht weiter als zwei Kohlenstoffatome vom Kettenende entfernt war. Nichtsubstituierte lineare Olefine mit terminaler Doppelbindung und einer Kettenlänge von mehr als sieben Kohlenstoffatomen wurden hingegen nur mit schlechten Ausbeuten zu Epoxiden umgesetzt. Die enantioselektive Umsetzung 1,1-disubstituierter aromatischer und aliphatischer Olefine zum Epoxid konnte ebenfalls erfolgreich gezeigt werden [66, 74, 75]. Die schlechte Epoxidausbeute bei der Umsetzung von terminalen Alkenen wurde anschließend auf eine suizidale Bildung von *N*-Alkylporphyrin und einem damit verbundenen Aktivitätsverlust zurückgeführt [76].

Neben linearen und zyklischen *cis*-Olefinen wurden auch verschiedene funktionalisierte *cis*-Alkene wie beispielsweise 3-Pentensäureethylester, 5-Bromo-2-penten, Acrylat-basierte Diene und Dimethylhexadien erfolgreich mit CPO und *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) zu den korrespondierenden Epoxiden umgesetzt. TBHP erschien aufgrund der im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  geringeren Sensitivität von CPO und einem damit verbundenen reduzierten Aktivitätsverlust vorteilhaft [72, 77, 78]. Lakner und Hager beschrieben außerdem die erfolgreiche Synthese von (*R*)-(-)-Mevalonolacton unter Verwendung der CPO-katalysierten Epoxidierung von Ethyl-3-methylbut-3-enoat [79]. Die Epoxidierung von Inden mit CPO und TBHP in wässrigem und wasserfreiem Medium wurde von Manoj *et al.* untersucht. Im wässrigen Medium wurde eine Mischung aus *cis*- und *trans*-Diolen detektiert, während das entsprechende Epoxid aus einem wasserfreien Glycerol-basierten Reaktionsmedium extrahiert werden konnte [80].

Rai *et al.* setzten erfolgreich Methoden des *Protein Engineerings* ein, um die katalytische Aktivität der Chlorperoxidase (CPO) aus *C. fumago* zur Bildung von Epoxiden zu erhöhen und gleichzeitig eine Reduktion der hohen Katalase-Aktivität und der damit verbundenen Wasserstoffperoxidzerersetzung herbeizuführen. Dabei konnten zusätzlich Enzymvarianten mit erhöhter Stabilität in ternären Mikroemulsionen aus Toluol, Isopropanol und Wasser isoliert werden [81]. Die Epoxidierung von Styren mit CPO in ternären Systemen, bestehend aus *n*-Hexan, Isopropanol und Wasser beziehungsweise  $\alpha$ -Pinen, Isopropanol und Wasser, wurde von Tzialla *et al.* untersucht. Mit zunehmendem Wasseranteil wurde für beide Systeme eine zunehmende katalytische Aktivität von CPO gezeigt, während im Gegensatz dazu die Stabilität von CPO mit zunehmendem Wasseranteil abnahm [82].

### *Monooxygenasen (EC 1.14.x)*

Hofstetter *et al.* berichteten über die Epoxidierung verschiedener Styrenderivate mit einer bakteriellen wasserlöslichen FAD/NADH-abhängige Styrenmonooxygenase (StyAB, EC 1.14.14.11) aus *Pseudomonas* sp. VLB120. Bei StyAB handelt es sich um einen Enzymkomplex, bestehend aus einer Oxygenase StyA, die die Epoxidierung unter Verbrauch von  $\text{FADH}_2$  und  $\text{O}_2$  katalysiert, und einer Reduktase StyB, die FAD unter Verbrauch von NADH und  $\text{H}^+$  zu  $\text{FADH}_2$  regeneriert und  $\text{NAD}^+$  freisetzt. Die Regeneration von  $\text{NAD}^+$  zu NADH wird bei Hofstetter *et al.* durch Einsatz einer Formiat-Dehydrogenase-Mutante (FDH) aus *Pseudomonas* sp. 101 mit erhöhter Lösungsmittelstabilität, gesteigerter Substrataffinität und Formiat als Substrat realisiert, wobei  $\text{CO}_2$  freigesetzt wird. Die Konversion der Styrenderivate erfolgte in einem zweiphasigen Reaktionssystem mit Dodecan als organische Phase, um die Substrat- und Produktkonzentration in der wässrigen enzymhaltigen Phase zu minimieren und eine Inaktivierung von StyA durch hohe Edukt- und Produktkonzentrationen zu vermeiden. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 5 dargestellt.

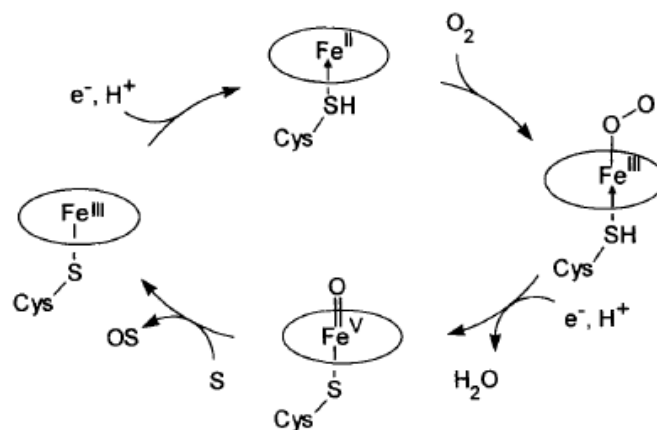


**Abbildung 5: Reaktionsschema der biokatalytischen Epoxidierung von Styrenderivaten mit einer bakteriellen Styrolmonooxygenase [83].**

**FDH = Formiat-Dehydrogenase; StyB = Reductase; StyA = Oxygenase;  $\text{R}_1 = \text{H, Cl}$ ;  $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H, CH}_3$ .**

Weitere Substrate wurden ebenfalls mit dem StyAB-System zu deren Epoxiden umgesetzt [83-89]. Der Einsatz eines organometallischen Komplexes wie (2,2'-Bipyridyl)-(Pentamethylcyclopentadienyl)-Rhodium oder einer direkten elektrochemischen Methode zur Regeneration des FADH<sub>2</sub>Equivalentes bei der Styren-Epoxidierung mit StyA und damit der Ersatz des zuvor beschriebenen FDH/StyB-Systems wurde von Hollmann *et al.* beschrieben [90, 91].

Das Oxygenase-Kompartiment StyA der Styrenmonooxygenase (StyAB) ist in der Lage molekularen Sauerstoff *in situ* zu aktivieren, wodurch reaktive Sauerstoff-Donoren wie beispielsweise Persäuren überflüssig werden. Der katalytische Zyklus zur Aktivierung des molekularen Sauerstoffs ist in Abbildung 6 gezeigt [66, 73, 83, 92].



**Abbildung 6: Reaktionszyklus einer Häm-enthaltenden Monooxygenase [66].**

Eine weitere Untergruppe der Monooxygenasen, für die eine Epoxidierung beschrieben wurde, ist die Gruppe der Cytochrom P450-Monooxygenase. Eine der am häufigsten beschriebenen Varianten für die Epoxidierung von Styren ist Cytochrom P450<sub>cam</sub> (EC 1.14.15.1) aus *Pseudomonas putida*. Ortsspezifische Mutagenese (*Site-specific Mutagenesis*) wurde eingesetzt, um die Styrenoxid-Bildungsrate zu erhöhen und gleichzeitig eine Nebenproduktbildung von beispielsweise Phenylacetaldehyd zu vermeiden. Elektrochemische Varianten zur Cofaktor-Regeneration wurden ebenfalls beschrieben [93-97]. Çelik *et al.* beschrieben die regio- und enantioselektive Epoxidierung von Linolensäure zu 15,16-Epoxyoctadeca-9,12-diensäure mit Cytochrom P450<sub>BM3</sub> aus *Bacillus megaterium* [98].

#### *Peroxygenasen (EC1.14.x.y.)*

Blee *et al.* konnten die Epoxidierung verschiedener ungesättigter Fettsäuren mit Hilfe einer unter Verwendung von Detergenz gelösten und teilweise gereinigten Peroxygenase aus Sojabohnen und Einsatz von Cumenhydroperoxid in einem Natriumacetat-Puffer zeigen. Bei der Epoxidierung von Linolsäure wurde eine deutliche Präferenz der Umsetzung der Doppelbindung in der 9,10-Position und eine geringe Bildung des Diepoxids festgestellt [99,

100]. Piazza *et al.* zeigten die Epoxidierung von Fettsäuren, Fettsäuremethylestern, verschiedenen Alkenen und Natriumoleat mit einer membrangestützten Peroxygenase aus Hafersamen und verglichen die Eignung von t-Butylhydroperoxid, Cumenhydroperoxid, Harnstoff-gebundenem Wasserstoffperoxid und wässrigem Wasserstoffperoxid in Puffer und Heptan. Die beste Epoxidausbeute wurde in Puffer in Kombination mit t-Butylhydroperoxid erzielt [101-103]. Ergänzend zeigten Piazza und Foglia die Epoxidierung von i-Butylamiden auf Basis von Leinsamenöl in Hexan als Lösemittel [104]. Die simultane Hydrolyse und Epoxidierung mit einem Enzymextrakt aus Hafersamen wurde ebenfalls von Piazza und Foglia gezeigt [105].

#### 2.2.2.2 Enzyme zur indirekten Epoxidierung

Bei der indirekten oder im Folgenden auch als chemo-enzymatische Epoxidierung bezeichneten Methode katalysiert das Enzym die Umsetzung des Eduktes zum Epoxid nicht direkt im aktiven Zentrum, sondern die Bildung eines Intermediates. Dieses Zwischenprodukt wird im Folgeschritt entweder durch einen weiteren katalytischen Schritt zum Epoxid umgesetzt, wie beispielsweise bei der Umsetzung des mit Hilfe einer Haloperoxidase gebildeten Halohydrins durch eine Halohydrinepoxidase [66], oder reagiert autokatalytisch mit dem ungesättigten Molekül, wie die durch eine Lipase gebildete Peroxycarbonsäure [16, 18, 106].

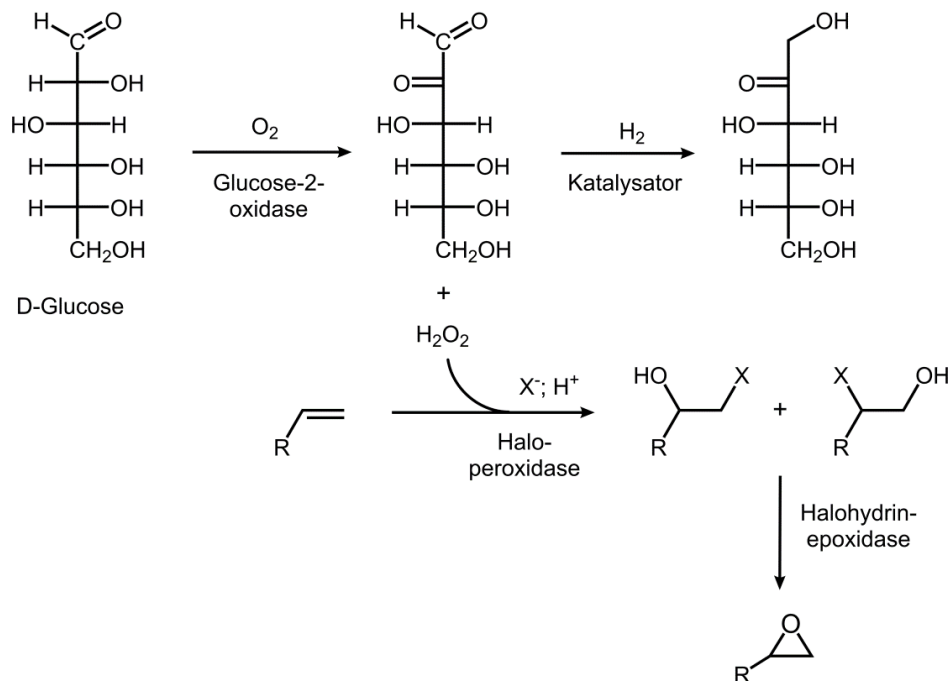
##### *Haloperoxidasen (EC 1.11.x.x)*

Haloperoxidasen stellen eine besondere Gruppe innerhalb der Peroxidasen dar und katalysieren die Halogenierung organischer Substrate. Metall-enthaltende Peroxidasen wurden bereits im vorigen Abschnitt im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur direkten Epoxidierung beschrieben. Alternativ kann die Bildung eines Epoxides mit Haloperoxidasen über ein Halohydrin als Intermediat laufen, das wie in Abbildung 7 gezeigt, in einem weiteren Reaktionsschritt entweder chemisch oder mittels einer Halohydrinepoxidase zum Epoxid umgesetzt wird [66, 107].

In Zusammenhang mit der indirekten Epoxidierung sind auch Metall-freie Haloperoxidasen zu nennen [66]. Einige dieser Cofaktor-unabhängigen Haloperoxidasen zeigen eine für  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen typische Faltung und weisen eine ebenfalls für Hydrolasen charakteristische katalytische Triade aus Serin (Ser), Asparaginsäure (Asp) und Histidin (His) auf [108, 109]. Die Halogenierung erfolgt dabei anhand eines in wässrigem Acetat- oder Propionatpuffer gebildeten Percarbonsäureintermediates, das die Oxidation von Bromid zu Brom bewirkt. Brom wiederum setzt Olefine in wässrigem Milieu zu Halogenhydrinen um [109, 110]. Eine weitere Variante der indirekten Oxidation von Alkenen zu Epoxiden stellt die Glutathion- oder



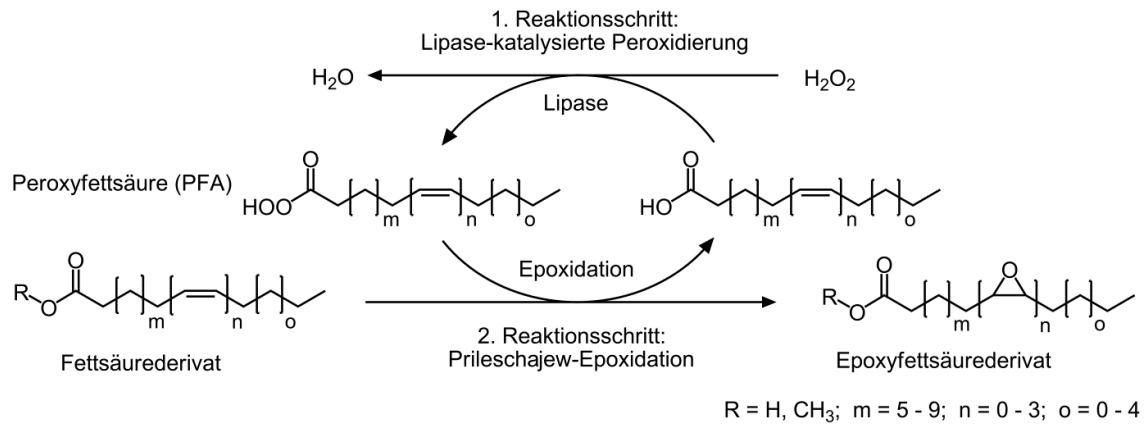
4-Methylphenol-abhängigen Cooxidation von Styren zu Styrenoxid und Benzaldehyd mit einer Meerrettichperoxidase dar [66, 111, 112].



**Abbildung 7: Prozess zur Bildung eines Epoxids auf Basis der Haloperoxidase-katalysierten Halogenierung und einer nachfolgend Umsetzung mit einer Halohydrin-epoxidase [66, 107].**

### Lipasen

Im Vergleich zur in Kapitel 2.2.1 beschriebenen chemischen Epoxidierung mit kurzkettigen Percarbonsäuren können bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung auch Lipasen eingesetzt werden, um die Synthese der benötigten Percarbonsäure aus Carbonsäure und Wasserstoffperoxid zu katalysieren [16, 18, 106]. Der generelle Reaktionsmechanismus der Lipase-katalysierten Epoxidierung ist schematisch in Abbildung 8 für Pflanzenöl-basierte Fettsäurederivate dargestellt. Die Reaktion lässt sich in zwei Reaktionsschritte unterteilen. Im ersten Schritt wird durch die Lipase die Persäurebildung direkt aus einem Pflanzenölderivat, beispielsweise einer Fettsäure oder einem Fettsäuremethylester, und Wasserstoffperoxid als Cosubstrat katalysiert. Im zweiten autokatalytischen Schritt wird ein ungesättigtes Fettsäurederivat durch die zuvor *in situ* gebildete Peroxyfettsäure zum entsprechenden Epoxid und der Carbonsäure umgesetzt. Der Mechanismus entspricht der für die chemische Epoxidierung (siehe Kapitel 2.2, Abbildung 3) beschriebenen Prileschajew-Reaktion [16, 17, 106]. Aufgrund des zweiten autokatalytischen Reaktionsschrittes und der Bildung der Persäure direkt aus dem zu epoxidierenden Substrat wird diese Reaktion auch häufig als „Selbst“-Epoxidierung bezeichnet [113, 114].



**Abbildung 8: Lipase-katalysierte Epoxidierung von Fettsäurederivaten mittels Peroxyfettsäure. Die Peroxyfettsäure wird von der Lipase direkt aus der eingesetzten Fettsäure und Wasserstoffperoxid hergestellt, modifiziert nach [16, 17, 106, 113].**

Die in Abbildung 8 dargestellte chemo-enzymatische Epoxidierung erfolgt meist in einem zweiphasigen flüssig/flüssig-Reaktionsgemisch, weil die Fettsäurederivate aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften sehr schlecht in dem häufig als wässrige Wasserstoffperoxidlösung eingesetzten Oxidationsmittel löslich sind. Lipasen sind für ein solches zweiphasiges Reaktionssystem bevorzugt geeignet, weil sie aufgrund ihrer natürlichen katalytischen Aktivität, der hydrolytischen Spaltung von Triglyzeriden, in der Grenzschicht zwischen der organischen Ölphase und der Wasserphase aktiv sind [115]. Damit sind Lipasen besonders gut zur Umsetzung hydrophober Substrate einsetzbar, die beispielweise in einem organischen Lösungsmittel gelöst sind. Die Lipase-katalysierte Bildung einer Peroxycarbonsäure aus Carbonsäure und wässrigem Wasserstoffperoxid als einzigem Cosubstrat wurde erstmals von Björkling *et al.* im Jahr 1990 beschrieben. Dabei wurde die Fähigkeit zur Synthese von Peroxyoctansäure mit Lipasen aus *Candida antarctica*, *Humicola* sp., *Candida cylindracea* und *Pseudomonas* sp. sowie die anschließende Epoxidierung von Cyclohexen, 3-Ethylpent-2-en und Tetramethylethylen gezeigt [16]. Die Umsetzung von 40 verschiedenen Carbonsäuren zu Peroxycarbonsäuren mit der immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* (Novozym® 435) und 60%igem wässrigem Wasserstoffperoxid wurde von Rüschen. Klaas und Warwel über die nachfolgende Epoxidierung von 1-Octen untersucht [116].

### 2.2.3 Gegenüberstellung von chemischer und enzymatischer Epoxidierung

In den Kapiteln 2.2.1 und 2.2.2 wurden die chemische und enzymatische Epoxidierung mit unterschiedlichen Enzymklassen vorgestellt. Bei der Enzym-katalysierten Reaktion von ungesättigten Substraten zu Epoxiden wurde in die direkte und indirekte Umsetzung unterschieden. In Tabelle 3 sind die verschiedenen Methoden gegenübergestellt und Angaben zu den allgemeinen Reaktionsbedingungen aufgeführt. Außerdem werden die Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode eingeschätzt.

Die chemische Epoxidierung unter Einsatz starker mineralischer Säuren zeichnet sich vor allem durch die schnelle Reaktion und einen hohen Umsatz an C=C-Doppelbindungen aus. Dem gegenüber stehen eine herausfordernde Prozessführung aufgrund der stark exothermen Reaktion, Korrosion von Anlagenteilen durch die verwendeten starken Säuren, eine Reduktion der Selektivität bedingt durch die Säure-katalysierte Ringöffnung und eine hohe Salzfracht wegen der Neutralisation der starken Säure bei der Produktaufarbeitung [11-13, 15].

Die Enzym-katalysierten Epoxidierungsreaktionen bieten im Vergleich zur chemischen Methode den Vorteil einer höheren Selektivität aufgrund der mildereren Reaktionsbedingungen. Die Epoxidierung mit Chlorperoxidasen, Monooxygenasen und Haloperoxidasen erfolgt jedoch bevorzugt in wässrigen Puffersystemen und ermöglicht daher in Bezug auf die Epoxidierung hydrophober Edukte nur geringe Substratkonzentrationen. Die Enzymsysteme sind teilweise sehr komplex und benötigen im Fall der Monooxygenasen zusätzlich NADH als Cofaktor. Damit wird ein System zur Cofaktor-Regeneration erforderlich, was in gesteigerten Kosten resultiert. Die Stabilität dieser Enzyme ist häufig begrenzt und erschwert eine technische Umsetzung zusätzlich [68, 69, 71-74, 81, 83, 93, 97, 108-110].

Im Gegensatz zu den Peroxidasen und Monooxygenasen zeigen Lipasen auch eine Aktivität in organischen Lösemitteln und eignen sich daher besser zur Umsetzung hydrophober Substrate. Die Stabilität der Lipasen in organischen Lösemitteln ist vergleichsweise hoch. Allerdings kann es in Anwesenheit des erforderlichen Oxidationsmittels zur Inaktivierung des Enzyms kommen [16-18, 106, 113, 117-119].

Auf Basis dieser zusammenfassenden Gegenüberstellung ist die Enzymklasse der Lipasen besonders interessant für die Umsetzung Pflanzenöl-basierter Derivate zu deren Epoxiden. Daher werden in den nachfolgenden Kapiteln ausschließlich Lipasen untersucht. In Kapitel 3 wird ausführlicher auf die Lipase-katalysierte Epoxidierung eingegangen.

**Tabelle 3: Zusammenfassung chemischer und biotechnologischer Verfahren zur Epoxidierung Pflanzenöl-basierter Substrate: Reaktionsbedingungen, Lösemittelleinsatz, Vor- und Nachteile.**

Methode	Reaktionsbedingungen	Umsetzung in org. Lösemitteln	Vorteile	Nachteile	Ref.
Chemische Epoxidierung	>50 °C H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Ameisen- oder Essigsäure Mineralsäuren: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	ja	schnelle Reaktion hoher Umsatz an C=C-Doppelbindungen	Einsatz starker Mineralsäuren Gefahr der Nebenproduktbildung und damit reduzierte Selektivität Korrosion	[11-13, 15, 20, 22]
Direkte Epoxidierung mit Chlorperoxidasen	wässriges Puffersystem, Cosubstrat: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	n.b.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> als Cosubstrat hohe Stereoselektivität hohe Enantioselektivität	schlechte Umsetzung in org. Lösemitteln niedrige Substratkonzentration mäßige Ausbeute Nebenproduktbildung geringe Enzymstabilität Oxidation von Toluol hohe Katalase-Aktivität	[68, 69, 71-74, 81, 110]
Direkte Epoxidierung mit Monooxygenasen	Cosubstrat: O <sub>2</sub> , NADH, (FAD)	n.b.	hohe Stereoselektivität hohe Enantioselektivität	Cofaktor-Regeneration meist komplexe Enzymsysteme geringe Enzymstabilität Nebenproduktbildung	[73, 83, 93, 97]
Indirekte Epoxidierung mit Haloperoxidasen	Cosubstrat: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Acetat- oder Propionatpuffer	n.b.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> als Cosubstrat	Bildung von Persäuren aus Fettsäuren nicht beschrieben Aktivität nur in Acetat- und Propionatpuffer	[109, 110] [108]
Indirekte Epoxidierung mit Lipasen	Cosubstrat: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ja	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> als Cosubstrat hohe Aktivität in organischen Lösemitteln geringe Nebenproduktbildung	Inaktivierung durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[16, 17, 106, 113, 117-119]

n.b. nicht beschrieben

---

### **3 Untersuchung der Epoxidierung mit Lipasen und Auswahl geeigneter Enzyme**

Die natürliche katalytische Aktivität von Lipasen liegt in der Hydrolyse von Triglyzeriden und der damit verbundenen Abspaltung von meist hydrophoben Fettsäuren. Aufgrund dieser nativen Funktion besteht großes Potential zum Einsatz von Lipasen bei der Umsetzung hydrophober nur beschränkt in wässrigem Medium lösbarer Substrate. Bei der chemoenzymatischen Epoxidierung benötigen sie Wasserstoffperoxid als Cosubstrat. Bisher wurde die Lipase-katalysierte Epoxidierung nur für wenige Vertreter dieser Enzymklasse gezeigt. Eine systematische Betrachtung verschiedener Lipasen hinsichtlich der Aktivität zur Perhydrolyse mit Wasserstoffperoxid fand bisher nur mit wenigen Lipasen statt. Ein Teilaspekt dieser Arbeit befasst sich daher mit der Untersuchung verschiedener Lipasen aus unterschiedlichen Wirtsorganismen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung von Persäuren und der damit verbundenen autokatalytischen Epoxidierung von Ölsäure als Modellsubstrat. Die verschiedenen Lipasen werden auf Basis ihrer Aminosäuresequenz mit Hilfe bioinformatischer Werkzeuge verglichen, um mögliche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Enzymstruktur und Persäurebildung zu identifizieren. Im letzten Schritt sollten die am besten geeignet erscheinenden Lipasen in immobilisierter Form auf ihre Stabilität bei der Epoxidierung von Ölsäure analysierte und für weitere Untersuchungen ausgewählt werden.

#### **3.1 Anforderungen an ein Enzym zur Etablierung eines Prozesses zur enzymatischen Epoxidierung**

Die in dieser Arbeit untersuchten Lipasen sollten verschiedene Merkmale aufweisen, um für die enzymatische Epoxidierung Pflanzenöl-basierter Edukte in Frage zu kommen. Die Anforderungen an ein potentiell geeignetes Enzym werden nachfolgend aufgelistet:

- Das Enzym sollte die Persäurebildung möglichst direkt aus langkettigen Fettsäuren und Wasserstoffperoxid-Addukten katalysieren, ohne zusätzlich kurzkettige Carbonsäuren zugeben zu müssen.
- Das Enzym sollte die Aktivität zur Persäurebildung in organischem Lösemittel zeigen, da die Reaktion aufgrund von möglichen Viskositäts- oder Schmelzpunkterhöhungen beim entstehenden Produkt in Lösemittel erfolgen muss, um eine Verfestigung des Reaktionsansatzes zu vermeiden.
- Das Enzym sollte eine hohe Aktivität und Stabilität bei Temperaturen zwischen 25 und 50 °C aufweisen.

- Das Enzym sollte eine möglichst hohe Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid zeigen.
- Durch die Temperatur- und Oxidationsstabilität sollte eine hohe Rezyklierbarkeit durch Verwendung immobilisierter Enzymvarianten ermöglicht werden.

### 3.2 Stand der Wissenschaft zur Lipase-katalysierten Epoxidierung

Zur Einführung in dieses Kapitel sollen in Abschnitt 3.2.1 die molekularen Grundlagen zur katalytischen Aktivität von Lipasen bei der Hydrolyse und Perhydrolyse dargestellt werden. In Kapitel 3.2.2 wird die chemo-enzymatische Epoxidierung von Ölsäure mit Lipasen als Biokatalysator zusammengefasst, weil Ölsäure für diese Arbeit als Modellsubstrat zur Untersuchung der Fähigkeit verschiedener Lipasen zur Persäurebildung ausgewählt wurde. Abschließend werden in Unterkapitel 3.2.3 Informationen zur Stabilität von Lipasen bei der Exposition mit Wasserstoffperoxid zusammengestellt.

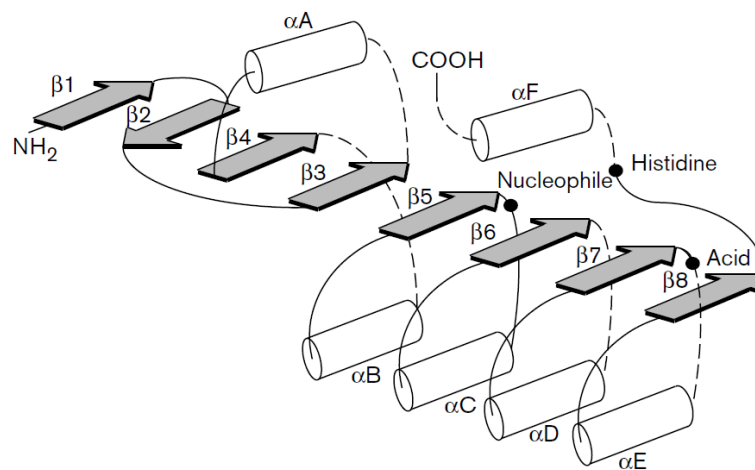
#### 3.2.1 Grundlagen der Lipase-katalysierten Hydrolyse und Perhydrolyse

Die natürliche Funktion von Lipasen besteht in der Hydrolyse von Triglyzeriden zu Di- und Monoglyzeriden und freien Fettsäuren. Im Falle einer vollständigen Hydrolyse wird Glycerin freigesetzt. Die meisten Lipasen benötigen zur Entfaltung ihrer vollständigen katalytischen Aktivität eine sogenannte Grenzflächenaktivierung. Dazu muss es zur Ausbildung einer Grenzfläche zwischen einer hydrophoben Phase und einer Wasserphase kommen. Dieses Aktivierungsphänomen ist auf ein hydrophobes Oligopeptid einiger Lipasen zurückzuführen, das den Eingang zum aktiven Zentrum des Enzyms bedeckt und den Zugang der Substrate verhindert. Das hydrophobe Oligopeptid wird auch als Deckel bezeichnet und besteht aus ein oder zwei kurzen  $\alpha$ -Helices, die über ein flexibles Strukturelement mit dem Enzym verknüpft sind [120-122]. Dieser Deckel klappt auf, wenn eine Grenzfläche mit hydrophober Umgebung vorhanden ist und ermöglicht so den Zugang zur Bindungstasche [123-125]. Die Aktivierung kann in hydrophoben organischen Lösemitteln erfolgen, da bereits kleinste Mengen Wasser in der gefalteten Enzymstruktur in direkter Nähe zum aktiven Zentrum zur Ausbildung einer lokalen Grenzfläche ausreichen und damit der Deckel geöffnet wird [126]. Es gibt auch Lipasen, die keine Grenzflächenaktivierung benötigen. Beispiele sind die Lipasen aus *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* und die Lipase B aus *Candida antarctica* [127-130]. Die letzte Lipase wird oft mit CalB abgekürzt und ist kommerziell in einer auf Acrylharz immobilisierten Form unter dem Handelsnamen Novozym® 435 erhältlich. CalB blieb bisher die gebräuchliche Abkürzung dieser Lipase, obwohl *Candida antarctica* kürzlich durch eine Neuklassifizierung in *Pseudozyma antarctica* umbenannt wurde [119, 131].

Alle Lipasen enthalten eine typische katalytische Triade aus Serin (Ser oder S), Histidin (His oder H) und Asparaginsäure (Asp oder D) oder in selteneren Fällen auch Glutaminsäure (Glu oder E). Sie zeigen eine charakteristische  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung, vergleichbar zu der von Esterasen, Proteasen oder Haloperoxidasen (siehe Abbildung 9). Lipasen sind im Allgemeinen aktiv über einen breiten pH- und Temperaturbereich und haben ihr Optimum häufig bei pH 7 - 9 und 30 - 40 °C [123, 132]. Die meisten bisher beschriebenen Lipasen zeigen folgende Gemeinsamkeiten [133-136]:

- Die sequentielle Anordnung der katalytischen Triade folgt dem Schema Ser - Asp/Glu - His.
- Die Struktur des Enzyms enthält zumeist 8  $\beta$ -Stränge.
- Das nukleophile Serin (Ser) der katalytischen Triade findet sich innerhalb der als nukleophiler Ellbogen bezeichneten Schleife zwischen dem C-terminalen Ende des 5.  $\beta$ -Stranges und der  $\alpha$ -Helix C in dem konservierten Pentapeptid Gly/Ala - X - Ser - X - Gly.
- Der Säurerest Asp oder Glu liegt als Teil der katalytischen Triade auf einer Schleife nach dem 6. oder 7.  $\beta$ -Strang
- Das Histidin der katalytischen Triade befindet sich hinter dem  $\beta$ -Strang 8.

In Abbildung 9 ist die typische Sekundärstruktur eines Proteins mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung zur Veranschaulichung der Gemeinsamkeiten dieser Enzymfamilie dargestellt.



**Abbildung 9: Sekundärstruktur eines Proteins mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung [132, 137].**

$\alpha$ -Helices sind durch weiße Zylinder gekennzeichnet,  $\beta$ -Faltblätter durch graue Pfeile und die AS der katalytischen Triade durch schwarze Punkte.

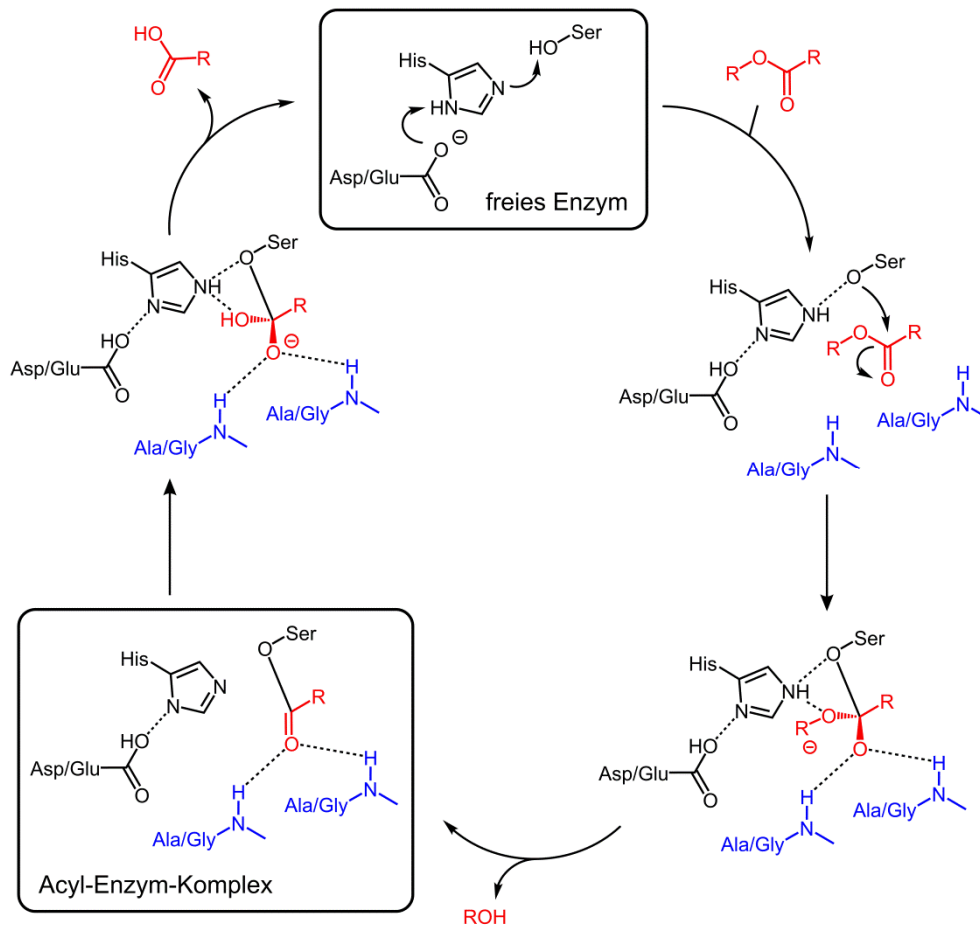
Der von Carter *et al.* 1988 aufgeklärte Reaktionsmechanismus zur Hydrolyse von Esterbindungen ist in Abbildung 10 dargestellt. Beginnend von dem freien Enzym wird das Serin der katalytischen Triade (siehe Abbildung 10, Aminosäuren (AS) der katalytischen Triade in

schwarz hervorgehoben) durch die Übertragung eines Protons auf Histidin stark nukleophil. Das nukleophile Serin greift im Folgeschritt das bereits mit Hilfe von Van-der-Waals-Kräften in der Substratbindungstasche gebundene Carbonylkohlenstoffatom des Esters an. Dabei wird eine tetrahedrale Zwischenstufe erzeugt, die durch Ausbildung von Wasserstoffbindungen in der sogenannten Oxyanion-Bindungstasche stabilisiert wird (siehe Abbildung 10, blau hervorgehobene Aminosäuren). Die AS zur Stabilisierung des Übergangszustandes sind neben den katalytischen AS ein wichtiger Bestandteil des aktiven Zentrums. Ausgangspunkt für die Ausbildung der stabilisierenden Wasserstoffbrücken sind Amidprotonen von zwei AS. Die eine stabilisierende Aminosäure (AS) ist in der Nähe des katalytisch aktiven Serins zu finden. Die Andere liegt auf einer Schleife gegenüber der katalytischen Triade. Durch Abspaltung eines Alkoholates wird im zweiten Schritt ein Acyl-Enzymkomplex gebildet. Dieser Komplex wird im anschließenden Hydrolyseschritt nach der Bildung eines erneuten tetrahedralen Übergangszustandes gespalten. Dabei werden die Carbonsäure und das anfängliche Enzym freigesetzt [120, 121, 136-139]. Die Substratbindungstasche ist bei Lipasen meist relativ groß und weist einen hydrophoben Charakter auf. Aufgrund der Struktur unterschieden Pleiss *et al.* drei Untergruppen: (I) Lipasen mit einer Spalt-ähnlichen Bindungstasche nahe der Enzymoberfläche, (II) Lipasen mit einer Trichter-ähnlichen und solche mit Tunnel-ähnlicher Tasche (III). Die Lipase B aus *C. antarctica* gehört nach Pleiss *et al.* beispielsweise zu denen mit Trichter-förmiger Substratbindungstasche [120, 121, 138].

Der in Abbildung 10 dargestellte Mechanismus zur Hydrolyse von Esterbindungen kann in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid auch zur Bildung einer für die Epoxidierung erforderlichen Peroxycarbonsäure führen und wird als Perhydrolyse bezeichnet [16, 106, 140]. Diese Perhydrolyse-Aktivität wird nicht als generelle Nebenaktivität von Serinhydrolasen verstanden, da einige Enzyme dieser Gruppe, wie beispielsweise Subtilisin, keine Perhydrolyse-Aktivität zeigen. Damit ist das Vorhandensein der katalytischen Triade aus Ser-His-Asp nicht das alleinige Kriterium zur Ausbildung dieser Nebenaktivität [140].

Molekulare Grundlagen zu dieser Nebenaktivität einiger Serinhydrolasen wurden von Bernhardt *et al.* und Kazlauskas *et al.* auf Basis einer Mutation in einer Arylesterase aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE) postuliert [140, 141]. Bernhardt *et al.* konnten in einem Abgleich der Aminosäuresequenzen von sechs Esterasen und sechs Perhydrolysen, die früher als Metall-freie Haloperoxidasen klassifiziert waren, untereinander und mit der Arylesterase aus *Pseudomonas fluorescens* gemeinsame und sich unterscheidende Aminosäurepositionen identifizieren. Der Sequenzvergleich ergab 15 innerhalb der Esterasegruppe und 57 innerhalb der Perhydrolysegruppe konservierte Aminosäurepositionen.



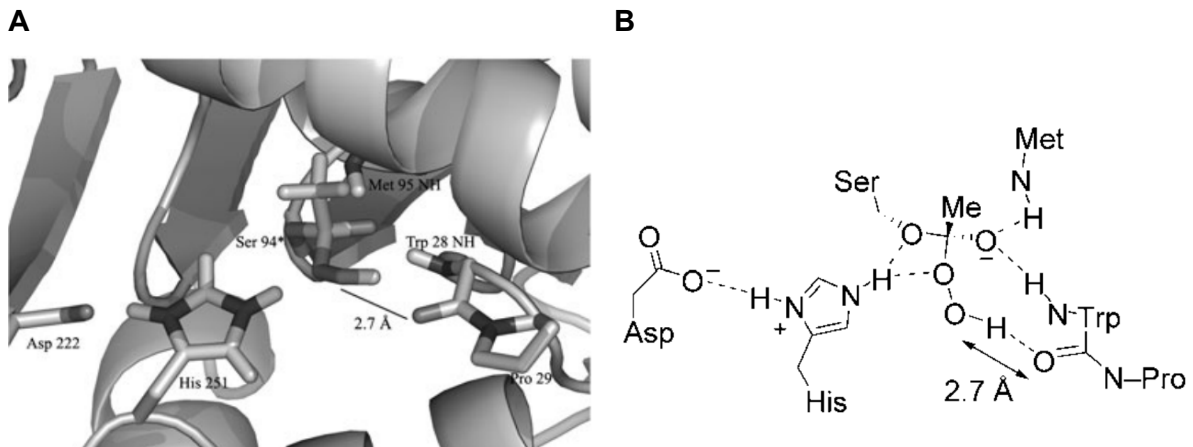


**Abbildung 10: Spaltung einer Esterverbindung mit Hilfe der hydrolytischen Aktivität von Serin-Hyrolasen, modifiziert nach [136, 139].**

**Darstellung der Substrate in rot, der Aminosäuren der katalytischen Triade in schwarz und stabilisierende Aminosäuren des Oxyanion-Bindungstasche in blau.**

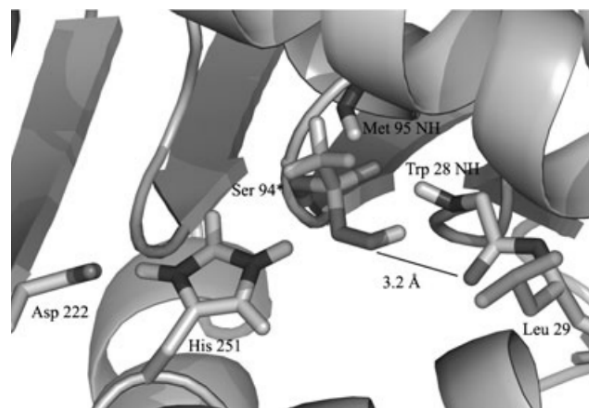
Besondere Bedeutung wurde dabei für die bei Perhydrolasen in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisierten Aminosäuren Pro29, Glu99 und Ile227 erwartet. Diese drei AS liegen bei den Perhydrolasen in einem Abstand  $<12 \text{ \AA}$  zum  $O^\gamma$  des konservierten katalytischen Serins an Position 94 [140]. Im Vergleich zu den Perhydrolasen befindet sich in PFE an Position 29 ein Leucin (Leu) [142]. Durch eine zielgerichtete Mutagenese an Position 29 der PFE und einem Austausch von Leucin (Leu) mit Prolin (Pro) konnten Bernhardt *et al.* die Perhydrolase-Aktivität von PFE um einen Faktor von 28 erhöhen. Die hydrolytische Aktivität bei der Spaltung von p-Nitrophenylacetat wurde dabei um den Faktor 100 reduziert. Molekulare Modellierung wurde eingesetzt, um strukturelle Grundlagen für die gesteigerte Perhydrolase-Aktivität in PFE Leu29Pro darzustellen. Als Ausgangsbasis zur Strukturanalyse wurde die Kristallstruktur der nativen PFE (PDB ID: 1VA4) nach Cheeseman *et al.* gewählt und anschließend das Leucin an Position 29 durch Prolin ersetzt und modelliert. Die so erhaltene Struktur wurde durch Überlappen des eingeführten Prolin-Rests mit Pro29 der Chlorperoxidase aus *Pseudomonas fluorescens* (CPO-F, PDB ID: 1A8S) verglichen und eine identische Konformation festgestellt.

Unter der Annahme, die Perhydrolyse erfolge nach einem Esterase-typischen Mechanismus, modellierten Bernhardt *et al.* den zweiten Übergangszustand, um den Angriff von Wasserstoffperoxid am Acyl-Enzym-Komplex darzustellen. In PFE Leu29Pro wurde eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoffatom von Trp28 und der Peroxid-Hydroxygruppen mit einem O-O-Abstand von 2,7 Å festgestellt (siehe Abbildung 11). Dieser Abstand ist identisch zu dem der entsprechenden Bindung in CPO-F. [140].



**Abbildung 11: (A) Model zum zweiten Übergangszustand bei der Persäurebildung mit PFE Leu29Pro, (B) vorgeschlagener molekulare Grundlagen zur Perhydrolyse-Aktivität der mutierten Arylesterase aus *Pseudomonas fluorescens* PFE Leu29Pro [140].**

Im Vergleich dazu ist die gleiche Bindung in der nativen PFE mit einem Abstand von 3,2 Å deutlich schwächer ausgeprägt (siehe Abbildung 12) [140].



**Abbildung 12: Ausbildung der im Vergleich zu PFE Leu29Pro schwächeren Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoffatom von Trp28 und der Peroxidhydroxygruppe in der nativen PFE [140].**

Weiterführende Untersuchungen von PFE Leu29Pro mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bekräftigten die von Bernhardt *et al.* modellierten Strukturmerkmale zur Ausbildung einer stärkeren Wasserstoffbrückenbindung durch Drehung von Trp28 [143].

Auf Basis dieser Erkenntnisse ist davon auszugehen, dass eine stärker ausgeprägte Stabilisierung des zweiten Übergangszustandes von entscheidender Bedeutung für eine hohe Perhydrolase-Aktivität ist. Kazlauskas *et al.* gehen davon aus, dass die Erkenntnisse aus Untersuchungen zur erhöhten Perhydrolase-Aktivität in PFE einen vergleichbaren Effekt bei der Mutation von Lipasen zur Folge haben. Experimentelle wurde eine erhöhte Perhydrolase-Aktivität durch Mutation von Lipasen nicht belegt [141].

### 3.2.2 Literaturübersicht zur Lipase-katalysierten Epoxidierung von Ölsäure

In dieser Arbeit wurde Ölsäure (OA) als Modellsubstrat zur Untersuchung der Perhydrolase-Aktivität von Lipasen verschiedenen Ursprungs ausgewählt. Die Reaktionstemperatur in Kombination mit dem Einsatz von Lösemittel ist bei der Epoxidierung von Ölsäure besonders zu berücksichtigen. Zum einen hat die Temperatur Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die Enzymstabilität. Zum anderen sollte das Reaktionsprodukt Epoxystearinsäure (ESA) mit seinem deutlich erhöhten Schmelzpunkt von etwa 57 °C [114] in flüssiger Form gehalten werden, um einen vollständigen Umsatz der OA zu ermöglichen. In Tabelle 4 wird ein Überblick zu verschiedenen Reaktionsansätzen, den Reaktionsbedingungen und erreichten Umsätzen beziehungsweise Ausbeuten für die Lipase-katalysierte Epoxidierung von Ölsäure mit der immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* (Novozym® 435) dargestellt. Die einzelnen Ansätze werden anschließend im Detail erläutert.

**Tabelle 4: Lipase-katalysierte Epoxidierung von Ölsäure mit der immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* (Novozym® 435).**

Reaktionsbedingungen							Umsatz <sup>a</sup> Ausbeute <sup>b</sup> (%)	Ref.
T (°C)	c <sub>0</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	t (h)	Molver- hältnis (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :C=C)	Spez. Enzymmenge (g mol <sup>-1</sup> )	Lösungs- mittel			
23	0,5	12	1,1*	20	Toluol	97 <sup>b</sup>	[114]	
23	2	12	1,1*	20	Toluol	90 <sup>b,2</sup>	[114]	
23	3.2	24	1,1*	20	-	23 <sup>b</sup>	[114]	
RT	0,5	16	1,5	20	Toluol	72 <sup>b</sup>	[113]	
30	0,4	2,75	1,6	12	Toluol	94 <sup>b,1,2</sup>	[144]	
40	0,45	5	1,3	28	Toluol	100 <sup>a</sup>	[145]	
40	3,2	12	1,1*	20	-	60 <sup>b,2</sup>	[114]	
50	3,2	6	1,1*	20	-	90 <sup>b</sup>	[114]	

<sup>RT</sup>Raumtemperatur, <sup>n. v.</sup> nicht verfügbar, <sup>1</sup>Ausbeute basierend auf der Bestimmung des Epoxidsauerstoffgehaltes, <sup>2</sup>Ausbeute aus einem Diagramm abgeleitet, \*Wasserstoffperoxidzugabe schrittweise im Abstand von 15 min innerhalb der ersten 4 h.

Wie Tabelle 4 verdeutlicht, erfolgten die meisten Untersuchungen zur Epoxidierung von Ölsäure unter Einsatz von Toluol als organisches Lösemittel. Dabei wurden von Orellana-Coca *et al.* mit Ölsäurekonzentrationen bis 2 M bei 23 °C innerhalb von 12 h Ausbeuten bis 90 % erzielt [113, 114, 144, 145]. Im Gegensatz dazu erreichten Warwel und Rüschen-Klaas bei Raumtemperatur (nicht genauer definiert) unter Verwendung eines höheren Wasserstoffperoxidüberschusses bei gleichem Enzymeinsatz trotz einer längeren Inkubationszeit bei einer Ölsäurekonzentration von 0,5 M nur 72 % Ausbeute [113]. Miao *et al.* konnten bei der Umsetzung von 0,45 M Ölsäure in Toluol im 1 mL Maßstab nach 5 h Reaktionszeit bei 40 °C und einem Enzymeinsatz von 28 g Novozym® 435 pro Mol Ölsäure eine Epoxidausbeute von 100 % erzielen [145]. Eine lösemittelfreie Epoxidierung von Ölsäure war bei 23 °C aufgrund der Präzipitation des Reaktionsproduktes ESA nur mit einer Ausbeute von 23 % möglich. Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 40 °C wurde die Ausbeute bei der lösemittelfreien Umsetzung auf etwa 60 % gesteigert. Eine weitere Temperaturerhöhung auf 50 °C resultierte in 90 % ESA-Ausbeute. Bei der lösemittelfreien Umsetzung von Ölsäure zu Epoxystearinsäure wurde bei Reaktionstemperaturen von mehr als 40 °C und einer Inkubationszeit über 12 h allerdings die Bildung von Estoliden als Nebenprodukt beobachtet [114].

Yadav und Manjula Devi untersuchten die Epoxidierung von Ölsäure in Toluol bei 30 °C mit dem Ziel, die Reaktion mit einem kinetischen Modell zu beschreiben und nutzen einen geordneten bi-bi-Mechanismus zur Anpassung an ihre experimentellen Daten. Ihre Untersuchungen zeigten einen Anstieg der Umsatzrate in einem mittels 6-blättrigem Schrägblattrührer (*six-bladed, pitched turbine impeller*) gerührten 100 mL Reaktor mit 4 cm Innendurchmesser bis zu einer Drehzahl von 650 rpm, einen damit minimalen externen Stofftransferwiderstand und eine nachfolgende Abnahme mit weiter zunehmender Drehzahl aufgrund erhöhten Partikelabriebs oder reduziertem Enzym-Substrat-Kontakt. Intrapartikuläre Stofftransferlimitierungen konnten Yadav und Manjula Devi durch Verwendung unterschiedlicher Partikelgrößen und dabei gleichbleibender Umsatzraten und Kalkulation des Thiele-Moduls und des Weisz-Prater Kriteriums ( $C_{WP}$ ) ausschließen. In einem ausgewählten Reaktionsansatz konnten Yadav und Manjula Devi nach 2,75 h bei 30 °C und einem spezifischen Enzymeinsatz von 12 g Novozym® 435 pro Mol Doppelbindung eine Epoxidausbeute von etwa 94 % erzielen [144].

### 3.2.3 Enzymstabilität bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung

Die Stabilität eines Enzyms ist ein wesentlicher Faktor für dessen Einsatz in biokatalytischen Konversionen. Bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung spielen die Exposition des Enzyms gegenüber dem Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid und die dabei vorliegende

Reaktionstemperatur eine bedeutende Rolle. Der Einfluss der Wasserstoffperoxidexposition auf die Enzymaktivität wurde speziell für CalB auf verschiedenen Ebenen untersucht. Zum einen wurde die Prozessstabilität während aufeinanderfolgender Reaktionszyklen betrachtet, zum anderen wurde der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur der Lipase untersucht. In dieser Arbeit sollen verschiedene Lipasen zuerst hinsichtlich ihrer Aktivität zur Perhydrolyse untersucht und anschließend in Bezug auf deren Stabilität analysiert werden. Nachfolgend werden verschiedene Untersuchungen zur Stabilität von CalB bei der Epoxidierung aus prozesstechnischer Sicht und auf Enzymstrukturebene zusammengefasst, um verschiedene Einflussgrößen auf die Enzymstabilität vorzustellen.

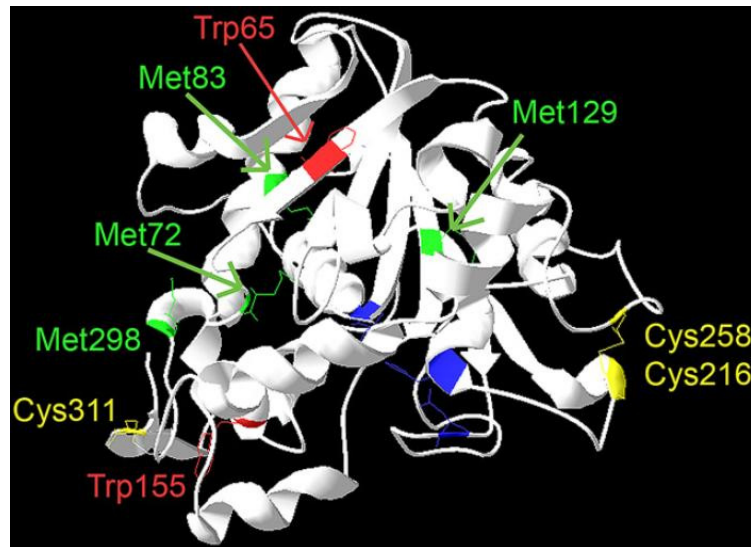
Warwel und Rüschen gen. Klaas untersuchten die Stabilität der auf Acrylharz immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* während der Epoxidierung von 1,4 M Ölsäure in Toluol mit schrittweiser Zugabe von 60-prozentiger wässriger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und einem Substrateinsatz von 32 g Ölsäure pro g Novozym® 435 und Zyklus. Auffällig bei diesen Untersuchungen ist der molare Überschuss an Ölsäure im Verhältnis zum eingesetzten Wasserstoffperoxid. Pro Mol Ölsäure wurden 0,44 Mole Wasserstoffperoxid eingesetzt, wodurch ein maximaler Umsatz von Ölsäure zu Epoxystearinsäure von 44 % erreicht werden kann. Die Ausbeute wurde hingegen relativ zur eingesetzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge definiert und betrug nach Abschätzung aus deren Diagramm nach 15 Reaktionszyklen noch etwa 65 %. Daraus ergibt sich ein Ölsäureumsatz von etwa 29 % bezogen auf die eingesetzte Ölsäuremenge. In 15 Reaktionszyklen wurden etwa 200 g Epoxystearinsäure pro g Novozym® 435 hergestellt [113]. Orellana-Coca *et al.* untersuchten die Stabilität von Novozym® 435 in einer lösemittelfreien Umsetzung von Ölsäuremethylester bei 50 °C und einer Inkubationszeit von 6 h. Das Masseverhältnis von Methyloleat zu Novozym® 435 betrug 8,79. Wasserstoffperoxid wurde als 30-prozentige Lösung mit 10 % stöchiometrischem Überschuss über 4 h im Abstand von jeweils 15 min zugegeben. Orellana-Coca *et al.* erhielten in den ersten fünf Reaktionszyklen einen Umsatz von 85 %, während im sechsten Zyklus noch 20 % umgesetzt wurden [114]. Weitere Untersuchungen zur Prozessstabilität wurden mit  $\alpha$ -Pinen [146] oder (+)-3-Caren [147] als Substrat und Octansäure als Sauerstofftransporter durchgeführt und jeweils hohe Aktivitätsverluste nach fünf Reaktionszyklen festgestellt. Törnvall *et al.* untersuchten den Einfluss von Lösemittel, Wasserstoffperoxid, Peroxyfettsäure und Epoxyfettsäure auf die Stabilität von immobilisierter CalB und konnten einen leichten Aktivitätsverlust durch Epoxystearinsäure bei 50 °C zeigen, während Ölsäure, Peroxypalmitinsäure und ein Gemisch aus Toluol und Wasser keine nennenswerte Inaktivierung zeigten. Den größten Einfluss hatte die Wasserstoffperoxidkonzentration zusammen mit der Reaktionstemperatur. In Gegenwart einer 6 bis 12 M wässrigen Wasserstoffperoxidlösung verlor das Enzympräparat bei 60 °C schnell an Aktivität, während es bei 20 °C in Kombination mit einer 6 M Lösung nach 48 h noch

etwa 90% Restaktivität zeigte [117].

Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Enzymstruktur von CalB wurde von Törnvall *et al.* auf molekularer Ebene untersucht. Eine gereinigte freie Form von CalB wurde verschiedenen konzentrierten wässrigen Wasserstoffperoxidlösungen über unterschiedliche Inkubationszeiten ausgesetzt. Anschließend wurden strukturelle Änderungen mit Hilfe von Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS), Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD), SDS-Page und dynamischer Lichtstreuung (DLS) analysiert. Im ersten Schritt untersuchten Törnvall *et al.* Änderungen der Proteinmasse mit Hilfe von Nano-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (Nano-ESI-MS). Die Proteinmasse der unbehandelten nicht-glykosylierten CalB lag bei 34640 Da inklusive C- und N-terminaler Tags mit einer Masse von 1620 Da, die der glykosylierten Form bei 35590 Da. Nach einer Exposition des Proteins in höherkonzentrierten wässrigen Wasserstoffperoxidlösungen für mehr als 30 min war eine Proteinmasse aufgrund eines zunehmend diffusen Proteinspektrums nicht mehr bestimmbar. Interessanterweise wurde eine erhöhte Stabilität der glykosylierten CalB-Variante festgestellt nachdem die Proteinhülle dieser Variante nach einer Inkubation von 30 min in 0,2 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung bei 40 °C noch eindeutig erkennbar war [119].

Aufgrund der diffusen Proteinspectra bei einer Inkubation von freier CalB in 0,2 – 2 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösungen bei 40 °C untersuchten Törnvall *et al.* die Spaltung des Proteingerüsts mittels LC/MS/MS. Nach einer Inkubation von CalB in 2 M Wasserstoffperoxidlösung wurde im Vergleich zu einer Wasserinkubation ein vollständig anderer Satz an Peptiden mit teilweise oxidierten Aminosäuren detektiert. Die Spaltung trat dabei hauptsächlich nach den Aminosäuren Lysin (Lys, K), Arginin (Arg, R), Leucin (Leu, L), Tyrosin (Tyr, Y) oder Tryptophan (Trp, W) auf, deren Peptidbindungen besonders anfällig gegenüber einer Proteasespaltung sind. Zusätzlich zur Proteinspaltung untersuchten Törnvall *et al.* die Aminosäureoxidation. Die Aminosäure Methionin an Position 298 (M298) lag bereits ohne Wasserstoffperoxidbehandlung in oxidiertem und nichtoxidiertem Form vor, da sie aufgrund ihrer räumlichen Anordnung an der äußeren Oberfläche des Enzyms leichter zugänglich für oxidierende Substanzen ist. Nach drei Stunden Inkubation in 0,2 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösungen bei 40 °C lagen die drei weiteren Methionine (M72, M83 und M129) und beide Tryptophanreste (W65 und W155) in oxidiertem Form vor (siehe Abbildung 13), wobei beide Aminosäuren auch in nichtoxidiertem Form detektierbar waren. Zusätzlich wurden drei Cysteinreste (Cys, C) in Form von Cysteinsäure nachgewiesen, was auf eine Spaltung der Disulfidbrücken durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hindeutet. Eine Oxidation der im aktiven Zentrum liegenden Aminosäuren Histidin (His, H) oder Tyrosin (Tyr, Y) wurde nicht detektiert [119].

Änderungen der Sekundärstruktur von CalB durch Wasserstoffperoxid wurden von Törnvall *et al.* mit Hilfe der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) analysiert. Strukturänderungen waren bereits nach einer Inkubation von CalB für drei Stunden bei 40 °C in 2 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zu beobachten. Eine typische *Random Coil*-Struktur wurde nach 24 h Inkubation in 1 – 2 M Wasserstoffperoxidlösung festgestellt und deutet auf einen Verlust der Sekundärstruktur hin. Zusätzlich zu Veränderungen der Sekundärstruktur zeigten Törnvall *et al.* mit Hilfe der Messung der dynamischen Lichtstreuung die Bildung von Aggregaten in Folge von Wasserstoffperoxidbehandlung [119].



**Abbildung 13: Native Struktur der Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB, kürzlich umklassifiziert zu *Pseudozyma antarctica*).**

Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind in blau dargestellt, die hinsichtlich Oxidation empfindlichen Aminosäuren in verschiedenen Farben: Methionine (Met, grün), Disulfidbrücken (gelb), Tryptophane (Trp, rot) [119].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Untersuchung des Einflusses von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf nicht-immobilisierte CalB wurde interessanterweise bei vorangegangenen Betrachtungen von Törnvall *et al.* die Bildung von Peptiden bei der Exposition der immobilisierten CalB (Novozym® 435) mit 0 – 6 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei sonst vergleichbaren Bedingungen nicht festgestellt [118].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Untersuchung der Stabilität der immobilisierten CalB in wenigen Fällen unter teilweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-limitierten Bedingungen erfolgte und eine Betrachtung in Kombination mit Triglyzeriden noch nicht beschrieben ist. Auf molekularer Ebene wurden bereits Effekte der Wasserstoffperoxidexposition auf einzelne Aminosäuren und die Enzymstruktur beschrieben. Die weitere Untersuchung dieser Effekte und möglicher Ansätze zur Proteinmodifikation sind allerdings nicht Gegenstand dieser Arbeit.

### 3.3 Methodenentwicklung zur Untersuchung der Lipase-katalysierten Persäurebildung

In den folgenden Abschnitten wird die Methodik zur Untersuchung verschiedener freier und immobilisierter Lipasen hinsichtlich deren Perhydrolase-Aktivität vorgestellt.

#### 3.3.1 Verwendete Enzyme

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit hinsichtlich der Fähigkeit zur Persäurebildung untersuchten freien nicht-immobilisierten Lipasen zusammengefasst.

**Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten nicht-immobilisierten Lipasen.**

Nicht-immobilisierte Lipase	spez. p-NPO-Aktivität <sup>1</sup> in <sup>a</sup> U mg <sup>-1</sup> oder <sup>b</sup> U mL <sup>-1</sup>	Lieferant / Hersteller
<i>Candida antarctica</i> Lipase B (CaLB)	2,11 ± 0,05 <sup>a</sup>	
<i>Aspergillus sp.</i> (AL)	0,031 ± 0,002 <sup>a</sup>	
<i>Candida cylindracea</i> (CCL)	3,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	
<i>Rhizomucor miehei</i> (RML)	0,95 ± 0,14 <sup>a</sup>	
<i>Rhizopus niveus</i> (RNL)	n. d.	
<i>Rhizopus arrhizus</i> (RAL) entspr. <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL)	0,0178 ± 0,007 <sup>a</sup>	Sigma-Aldrich
Lipase from <i>hog pancreas</i> (PL)	0,186 ± 0,009 <sup>a</sup>	
<i>Pseudomonas cepacia</i> (PCL)	2,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (PFL)	18,2 ± 2,8 <sup>a</sup>	
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	22,6 ± 2,3 <sup>b</sup>	
<i>Pseudozyma aphidis</i> Lipase (PAL) DSM 70725	7,6 ± 0,6 <sup>b</sup>	
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> Lipase (PHL) CBS 10077	0,102 ± 0,006 <sup>b</sup>	
<i>Pseudozyma parantarctica</i> Lipase (PPL) CBS 10005	0,27 ± 0,03 <sup>b</sup>	
<i>Pseudozyma rugulosa</i> Lipase (PRL) CBS 34696	0,61 ± 0,09 <sup>b</sup>	Fraunhofer
<i>Pseudozyma shanxiensis</i> Lipase (PSHL) CBS 10075	1,53 ± 0,01 <sup>b</sup>	IGB
<i>Pseudozyma siamensis</i> Lipase (PSL) CBS 9960	0,279 ± 0,004 <sup>b</sup>	
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i> Lipase (PTL) CBS 422.96	0,0179 ± 0,001 <sup>b</sup>	
<i>Pseudozyma graminicola</i> (PGL) CBS 10092	0,264 ± 0,01 <sup>b</sup>	

<sup>1</sup>Bestimmung der Aktivität nicht-immobilisierter Lipasen anhand der Hydrolyse von p-Nitrophenyloktanoat (p-NPO) nach Abschnitt 8.3.1; <sup>n.d.</sup>Hydrolyse von p-NPO nicht detektierbar.

Lipase-Extrakte der einzelnen *Pseudozyma sp.* wurden durch Kultivierung in mit Sojaöl versetztem Komplexmedium bei pH 6 hergestellt. Das Kulturmedium enthielt pro Liter 2 g Natriumnitrat, 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,2 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 1 g Hefeextrakt, 40 g Glukose und 80 mL Sojaöl. Die Zellmasse wurde mit Hilfe von Zentrifugation abgetrennt, der Kulturüberstand über Vivaspin Ultrafiltrationszentrifugenröhrchen (MWCO



10000) aufkonzentriert und die Lipaseaktivität des Konzentrats beziehungsweise einer in 50 Vol.% Glycerin stabilisierten Form anhand der Hydrolyse von 4-Nitrophenyloctanoat bestimmt (siehe Kapitel 8.3.1). Die Lipaseaktivität wurde dazu verwendet, vergleichbare spezifische Enzymaktivität bei der Epoxidierung von Ölsäure einzusetzen.

Zusätzlich zu den nicht-immobilisierten Lipasen wurden die in Tabelle 6 aufgeführten immobilisierten Lipasen für die Epoxidierung von Ölsäure getestet. Die beiden immobilisierten CalB-Varianten wurden aufgrund der im Vergleich zu RML und TLL höheren katalytischen Aktivität bei der Epoxidierung von Ölsäure hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht.

**Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten immobilisierten Lipasen.**

Enzympräparat	spez. p-NPO-Aktivität <sup>1</sup> in <sup>a</sup> U g <sup>-1</sup>	Lieferant	Ort/Land
CalB (Polyacrylharz) Novozym® 435	157 ± 20	Novozymes A/S	Bagvaerd / Dänemark
CalB (Immobead 150)	78 ± 10	Sigma-Aldrich	Steinheim / Deutschland
RML (Immobead 150)	6 ± 1	Sigma-Aldrich	Steinheim / Deutschland
TLL (Immobead 150)	698 ± 85	Sigma-Aldrich	Steinheim / Deutschland

<sup>1</sup>Spezifische Aktivitäten ermittelt mit Hilfe des Lipase-Aktivitätsassay modifiziert nach „Current Protocols in Food Analytical Chemistry“ [145], Durchführung siehe Abschnitt 8.3.1.

### 3.3.2 Epoxidierung von Ölsäure mit nicht-immobilisierten Lipasen

Verschiedene nicht-immobilisierte Lipasen wurden zur Epoxidierung von Ölsäure als Modellsubstrat eingesetzt, um deren katalytische Aktivität zur Persäurebildung zu untersuchen. Ölsäure wurde als Substrat ausgewählt, da diese Fettsäure in einer Vielzahl pflanzlicher Öle enthalten ist und damit repräsentativ für ein breites Substratspektrum steht. Des Weiteren sollten geeignete Lipasen in der Lage sein Persäuren direkt aus bereits im Pflanzenöl enthaltenen Fettsäuren zu bilden.

Die Untersuchung der Ölsäureepoxidierung erfolgte bei Raumtemperatur in mit Hilfe eines Magnetrührers bei 750 rpm gerührten 4 mL Glasfläschchen mit Schraubdeckel. Als Substrat wurde 0,3 M Ölsäure in Toluol mit 10 Gew. % wässrige Wasserstoffperoxidlösung oder Harnstoff-gebundenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Edukt (UHP) in einem Molverhältnis vom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu C=C-Doppelbindung von 1,1:1 versetzt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 2,3 mL. Die verschiedenen Lipase-Präparate wurden mit einer spezifischen Aktivität von 0,2 bis 10 p-NPO-U pro mmol C=C-Doppelbindung eingesetzt, um eine vergleichbaren Einsatz an Lipase-Aktivität zu

gewährleisten. Nach 0, 2, 4, 8 und 24 h Inkubationszeit wurden 100 µL Probe entnommen, 5-fach mit Methanol verdünnt und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert (siehe Abschnitt 8.3.2).

### 3.3.3 In silico-Untersuchungen zur Perhydrolase-Aktivität bei Lipasen

Eine strukturierte Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Aminosäuresequenz, Enzymstruktur und Perhydrolyse-Aktivität wurde bisher nicht durchgeführt. Ein Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit dem Sequenzvergleich unterschiedlicher Lipasen mit und ohne Perhydrolyse-Aktivität, um Unterschiede zwischen beiden Gruppen identifizieren zu können. Zum Vergleich verschiedener Aminosäuresequenzen wurden Jalview und EMBOSS Needle verwendet. Als Substitutionsmatrix kam eine BLOSUM62-Matrix zum Einsatz [148]. Ein phylogenetischer Stammbaum sollte mit der MEGA4-Software erstellt werden [149].

### 3.3.4 Epoxidierung von Ölsäure mit immobilisierten Lipasen

Der zeitliche Verlauf der Epoxidierung von 1 M Ölsäure in Toluol zu 9,10-Epoxystearinsäure wurde mit unterschiedlichen immobilisierten Lipasen bei Reaktionstemperaturen von 30, 40 und 50 °C mit 1,1-fachem Wasserstoffperoxidüberschuss bezogen auf die Kohlenstoffdoppelbindungen untersucht. Verglichen wurden die Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) in adsorptiv auf Polyacrylharz (Novozym® 435, CalB Polyacryl) und kovalent auf Immobead 150 (CalB Immobead 150) immobilisierter Form. Des Weiteren wurden die Lipasen aus *Rhizomucor miehei* (RML) und aus *Thermomyces lanuginosus* (TLL) eingesetzt, die kovalent an Immobead 150 gebunden waren.

Zum Vergleich der vier immobilisierten Lipasen wurde auf Basis der in Tabelle 6 aufgeführten spezifischen Aktivitäten (Bestimmung siehe Abschnitt 8.3.1) eine substratspezifische p-NPO-Aktivität von 0,8 U pro mmol C=C-Doppelbindung eingesetzt. Es wurden 3,14 mL der 1 M Ölsäure-Stammlösung in 10 mL-Reagenzgläser mit Schraubdeckel im Heidolph Synthesis 1 Parallelsynthesegerät zusammen mit dem immobilisierten Enzym auf die jeweilige Temperatur erwärmt. Zum Start der Reaktion wurden 353 µL 30 prozentige Wasserstoffperoxidlösung zugeben. Der auf die eingesetzte molare Menge an Ölsäure bezogene stöchiometrische Überschuss an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lag bei 10 %. Die Ansätze wurden bei 1000 rpm geschüttelt. Bis zu einer Inkubationszeit von 16 h wurden im zweistündigen Abstand jeweils 50 µL Probe entnommen. Die Probenanalytik erfolgte mit Hilfe von Dünnschicht- und Gaschromatographie (siehe Kapitel 8.3.2 und 8.3.4).

### 3.3.5 Stabilität verschiedener immobilisierter CalB-Varianten bei der Epoxidierung von Ölsäure

Die Stabilität der auf Polyacrylharz adsorptiv (Novozym® 435) und auf Immobead 150 kovalent immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* wurde für die Epoxidierung von Ölsäure untersucht. Verglichen wurde die Stabilität bei Reaktionstemperaturen von 40 und 50 °C. Außerdem sollte der Einfluss des Waschens mit Toluol zwischen den einzelnen Reaktionszyklen betrachtet werden. Die Durchführung der einzelnen Reaktionszyklen erfolgte wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Die Inkubationszeit eines Reaktionszyklus betrug 14 h. Nach Beendigung eines Zyklus wurde das Reaktionsmedium mit einer 2 mL Spritze und Kanüle abgezogen und die Enzymträger vollständig in den Glasgefäßen zurückgehalten. Die Proben wurden zentrifugiert und die wässrige Wasserstoffperoxidphase entfernt. Die Ansätze mit zusätzlichem Waschschrift zwischen den aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen wurden dreimal mit 2,5 mL Toluol gewaschen. Zwischen den einzelnen Zyklen erfolgte eine Lagerung der verwendeten Enzyme bei 4 °C. Die Analytik für die Stabilitätsbetrachtung erfolgte über Dünnschicht- und Gaschromatographie (siehe Kapitel 8.3.2 und 8.3.4).

## 3.4 Ergebnisse und Diskussion

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zur Untersuchung verschiedener Lipasen hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität zur Persäurebildung dargestellt und diskutiert. In Kapitel 3.4.1 werden nicht-immobilisierte Lipasen anhand der Epoxidierung von Ölsäure untersucht, um potentiell geeignete Enzyme zu identifizieren, das verfügbare Enzymspektrum zu erweitern und so die Grundlage für weitere Betrachtungen auf molekularer Ebene zu legen (siehe Abschnitt 3.4.2). Die Epoxidierung von Ölsäure mit unterschiedlichen immobilisierten Lipasen wird in Kapitel 3.4.3 betrachtet. Der Fokus wurde in diesem Abschnitt auf die zuvor in Abschnitt 3.4.1 identifizierten Lipasen gelegt. Abschließend wurden in Teilkapitel 3.4.4 zwei verschiedene immobilisierte Lipasenvarianten hinsichtlich ihrer Stabilität bei der Epoxidierung von Ölsäure verglichen, um ein Enzympräparat für weitere Untersuchungen in nachfolgenden Kapiteln auszuwählen.

### 3.4.1 Untersuchung der Epoxidierung von Ölsäure mit nicht-immobilisierten Lipasen

Im ersten Teil dieser Arbeit stand die Auswahl geeigneter Enzyme für die Epoxidierung von Pflanzenöl-basierten Substraten im Fokus. Zur Untersuchung der Eignung einer Auswahl verschiedener Lipasen wurde die Epoxidierung von Ölsäure als Modellreaktion ausgewählt. Ziel war es, neue Enzyme zu identifizieren, die die Bildung von Epoxiden katalysieren. Außerdem sollten verschiedene Lipasen mit bioinformatischen Methoden auf Sequenzebene verglichen werden, um für Lipasen mit Perhydrolyse-Aktivität charakteristische Struktur-

merkmale aufzudecken. Es wurden acht am Fraunhofer IGB hergestellte Lipasen aus unterschiedlichen *Pseudozyma* sp. und neun kommerziell verfügbare Lipasen in nicht-immobilisierter Form verwendet. Als Referenzenzym kam die Lipase B aus *Candida antarctica* zum Einsatz. Als Substrat wurde Ölsäure (OA) ausgewählt, da sie als einfach ungesättigte Fettsäure in vielen Pflanzenölen vorkommt und somit repräsentativ für eine Vielzahl Pflanzenöl-basierter Substrate zu sehen ist. Durch die Wahl dieses Modellsubstrates sollte sichergestellt werden, dass die Lipasen Persäure direkt aus langkettigen Fettsäuren bilden können. Zuerst wurde von den einzelnen Enzympräparaten die Lipaseaktivität mit dem p-Nitrophenyloktanoat-Assay bestimmt und die Aktivität zur Berechnung der einzusetzenden Enzymmenge benutzt. Für einzelne Lipasepräparate (*Aspergillus* sp., *Rhizopus niveus* und *Rhizopus arrhizus*) konnte keine eindeutige Lipaseaktivität gegen p-Nitrophenyloktanoat ermittelt werden. Hier wurden jeweils spezifische Mengen pro mmol C=C eingesetzt. Die Experimente wurden mit einer 10%-igen Wasserstoffperoxidlösung durchgeführt, um so eine mögliche Inaktivierung des freien Enzyms zu reduzieren. Es konnten neue Lipasen identifiziert werden, die eine Persäurebildung katalysieren und somit für die Epoxidierung von Ölsäure (OA) einsetzbar waren. Tabelle 7 zeigt eine qualitative Bewertung der getesteten Enzyme.

**Tabelle 7: Zusammenfassung der für eine Epoxidierung positiv getesteten Enzyme.**

**Untersucht wurde der Umsatz von Ölsäure zu Epoxystearinsäure mit unterschiedlichen Lipasen als freies Enzym.**

Lipase	c(OA) in mol/L	spez. Aktivität in U/mmol C=C	ESA-Bildung
<i>Candida antarctica</i> (CalB) ( <i>Pseudozyma antarctica</i> )	0,3	10	+++
<i>R. miehei</i> (RML)	0,3	10	++
<i>Rhizopus arrhizus</i> (RAL) entspr. <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL)	0,3	560 mg/mmol C=C	+++
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	0,3	10	++
<i>Pseudozyma aphidis</i> (PAL)	1	1,28	++
<i>Pseudozyma parantarctica</i> (PPL)	0,3	0,2	+
<i>Pseudozyma rugulosa</i> (PRL)	0,3	0,2	+
<i>Pseudozyma siamensis</i> (PSL)	0,3	0,2	+
<i>Pseudozyma graminicola</i> (PGL)	0,3	0,2	+

+++ : hoher Umsatz >50 Flächen-% ESA-Anteil nach 24 h; ++ : guter Umsatz >30 Flächen-% ESA-Anteil nach 24 h;

+ : geringer Umsatz >10 Flächen-% ESA-Anteil nach 24 h (basierend auf DC-Analysen)

Die Bildung von Epoxystearinsäure (ESA) konnte für die Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB), die kommerziell verfügbaren Lipasen aus *Mucor miehei* (MML), *Rhizopus arrhizus* (RAL), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) und die am IGB hergestellten Lipasen aus *Pseudozyma aphidis* (PAL-B), *Pseudozyma parantarctica* (PPL-B), *Pseudozyma rugulosa* (PRL-B), *Pseudozyma siamensis* (PSL-B) und *Pseudozyma graminicola* (PGL-B) nachgewiesen werden. Für alle anderen in Tabelle 5 aufgeführten Lipasen war die Bildung von Epoxiden nicht nachweisbar.

Für die Lipase B aus *Candida antarctica* und die Lipase aus *Mucor miehei* wurde die Bildung von Persäure aus Octansäure von Björkling *et al.* gezeigt. Die Peroctansäure wurde zur Epoxidierung verschiedener Alkene verwendet. Außerdem wurde die Bildung von Persäure mit immobilisierten Lipasen aus *Humicola* sp. und *Pseudomonas* sp. nachgewiesen [16, 106]. Cuperus *et al.* konnten die Epoxidierung von Ölsäure mit einer Membran-gebundenen Lipase aus *Rhizopus javanicus* zeigen. Der Ölsäureumsatz war allerdings geringer als mit der Lipase aus *Candida antarctica* [150]. Eine auf einem Keramikmaterial immobilisierte Lipase aus *Burkholderia cepacia* wurde von Corrêa *et al.* zur Epoxidierung von Ölsäure eingesetzt [151]. Die anderen in Tabelle 7 aufgeführten Lipasen wurden bisher nicht hinsichtlich der Epoxidierung untersucht und stellen so eine Erweiterung des zur Epoxidierung verfügbaren Enzymspektrums dar. Bisher erfolgte kein Vergleich zwischen den einzelnen Lipasen auf molekularer Ebene, der den Fokus auf der Aktivität zur Persäurebildung legte. Daher sollten die in dieser Arbeit untersuchten und in der Literatur beschriebenen Lipasen im nachfolgenden Abschnitt vergleichend auf Aminosäureebene betrachtet werden.

#### 3.4.2 *In silico*-Vergleich der untersuchten Lipasen auf Aminosäuresequenz-Ebene

In dieser Arbeit wurden insgesamt 18 verschiedene Lipasen aus unterschiedlichen Mikroorganismen hinsichtlich der Eignung zur Epoxidierung von Ölsäure eingesetzt und für neun Enzyme die Bildung von 9,10-Epoxystearinsäure gezeigt. Diese Lipasen wurden in Tabelle 7 zusammengefasst. Auffallend war, dass sechs der neun gefundenen Lipasen aus Stämmen der Gattung *Pseudozyma* kamen. Die Aminosäuresequenzen waren vor dieser Arbeit allerdings nur für die Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* (früher *Candida antarctica*) und *Pseudozyma aphidis* bekannt. Daher wurden die Aminosäuresequenzen der untersuchten Lipasen der anderen *Pseudozyma* sp. am Fraunhofer IGB mittels Genom Walking vollständig oder teilweise identifiziert [152]. In Tabelle 8 ist ein Aminosäuresequenzvergleich der Lipasen aus verschiedenen *Pseudozyma* sp. mit der Aminosäuresequenz der Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* (früher *Candida antarctica*, CalB) gezeigt. Die Lipasen wurden bezüglich Identität und Ähnlichkeit verglichen. Es wurde festgestellt, dass die gefundenen *Pseudozyma*-Lipasen in unterschiedlich hohem Maße ähnlich zur Referenzlipase aus *Candida*

*antarctica* waren. In Kapitel 3.4.1 konnte für die *Pseudozyma*-Lipasen mit einer Sequenzidentität zu CalB von etwa 90 % oder höher (PAL-B, PRL-B, PPL-B und PSL-B) auch eine Epoxidierung von Ölsäure festgestellt werden. Bei geringerer Sequenzidentität (<75 %) im Falle von PGL-B, PHL-B und PSHL-B wurden unterschiedliche Ergebnisse bei der Epoxidierung von Ölsäure erhalten. Für PGL-B wurde 9,10-Epoxystearinsäure detektiert, während für PHL-B und PSHL-B keine Bildung von epoxidierter Ölsäure nachgewiesen werden konnte. Daher können aus der Untersuchung der Epoxidierung von Ölsäure mit verschiedenen *Pseudozyma*-Lipasen keine eindeutigen Schlussfolgerungen bezüglich der Fähigkeit zur Persäurebildung auf Basis eines Sequenzvergleiches gezogen werden.

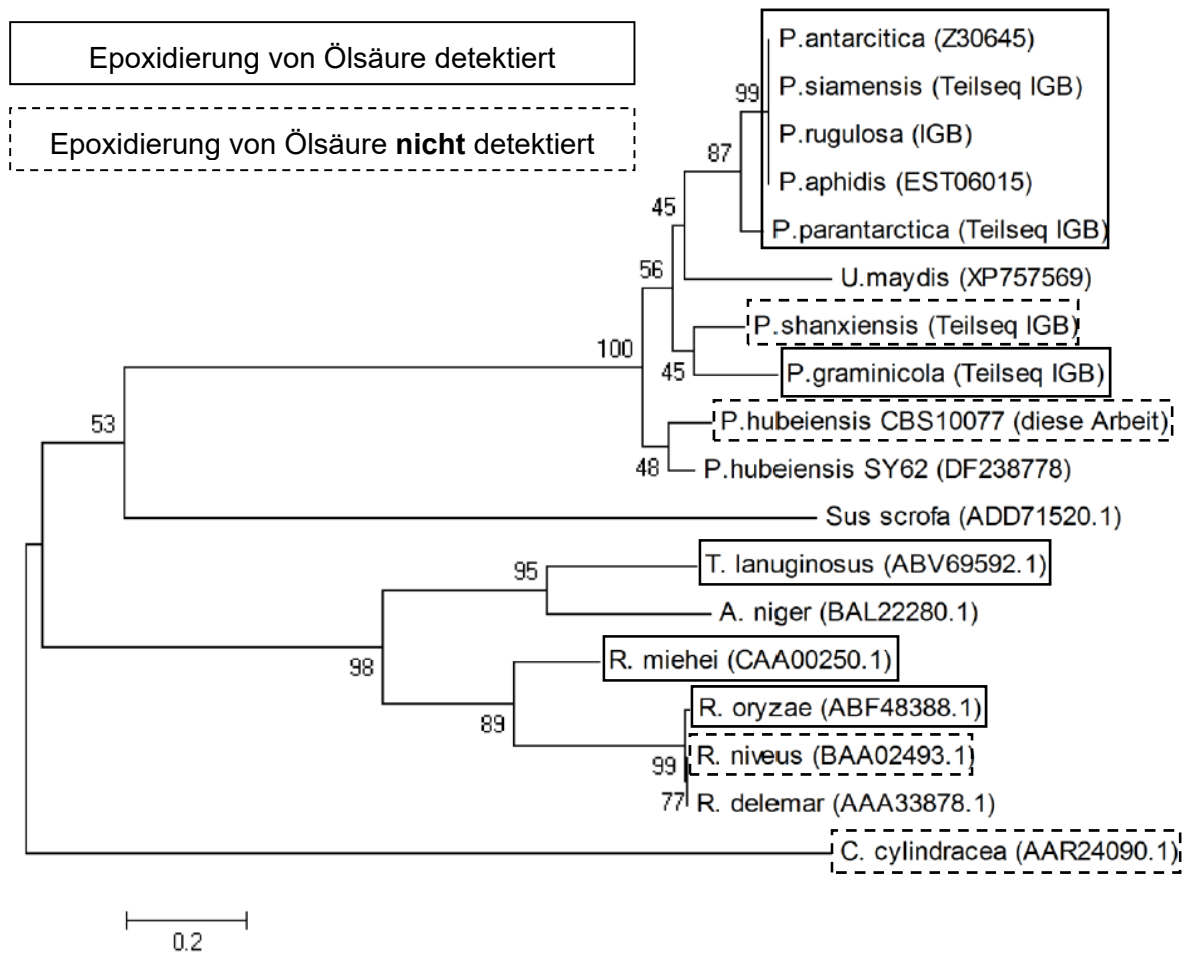
**Tabelle 8: Sequenzidentität (I) und -ähnlichkeit (S) zwischen verschiedenen Lipasen aus unterschiedlichen *Pseudozyma* sp. (in %) basierend auf einem paarweisen Sequenzvergleich mit CalB unter Verwendung der EMBOSS Needle Software und Einsatz einer BLOSUM62-Matrix.**

	PAL-B	PRL-B	PHL-B*	PSHL-B*	PPL-B (partiell)	PGL-B (partiell)	PSL-B (partiell)
<b>CalB</b>	99,4 (I/S)	99,7 (I/S)	71,4 (I) 79,9 (S)	74,6 (I) 86,3 (S)	89,7 (I) 94,0 (S)	73,0 (I) 85,1 (S)	100 (I/S)

\*keine Epoxidbildung bei der Umsetzung von Ölsäure detektiert;

CalB: Lipase B aus *Candida antarctica*, PAL-B: Lipase B aus *Pseudozyma aphidis*, PRL-B: Lipase B aus *Pseudozyma rugulosa*, PHL-B: Lipase B aus *Pseudozyma hubeiensis*, PSHL-B: Lipase B aus *Pseudozyma shanxiensis*, PPL-B: Lipase B aus *Pseudozyma parantarctica* mit partieller Sequenzinformation (331 Aminosäuren), PGL-B: Lipase B aus *Pseudozyma graminicola* mit partieller Sequenzinformation (291 Aminosäuren), PSL-B: Lipase B aus *Pseudozyma siamensis* mit partieller Sequenzinformation (116 Aminosäuren)

Eine phylogenetische Einordnung der unterschiedlichen untersuchten Lipasen in einen Stammbaum ist in Abbildung 14 dargestellt. Dabei wurden neben den Lipasen aus verschiedenen *Pseudozyma* sp. auch weitere Lipasesequenzen mit aufgenommen, die in dieser Arbeit betrachtet wurden. In Abbildung 14 finden sich die Lipasen mit hoher Sequenzidentität zu CalB im selben Ast, während sich Lipasen mit zunehmend abweichender Sequenzidentität im Stammbaum von dieser Gruppe entfernen. Es ist allerdings auch zu erkennen, dass einige Lipasen, für die eine Bildung von 9,10-Epoxystearinsäure in dieser Arbeit oder die Bildung von Persäuren in der Literatur gezeigt wurde, im Stammbaum deutlich entfernt von der Gruppe der zu CalB ähnlichen Lipasen zu finden sind. Dazu gehört vor allem die Lipase aus *Rhizomucor miehei* (früher *Mucor miehei*), die auch von Björkling *et al.* erfolgreich für die Bildung von Persäure aus Octansäure mit nachfolgender Epoxidierung verschiedener Alkene eingesetzt werden konnte [16, 106]. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Persäurebildung vermehrt in der Gruppe der CalB-ähnlichen Lipasen aus unterschiedlichen *Pseudozyma* sp. vertreten ist, während hinsichtlich der Aminosäuresequenz weiter entfernt liegende Lipasen nur vereinzelt eine Aktivität zur Bildung der Persäure aufwiesen.



**Abbildung 14: Phylogenetische Analyse der verschiedenen hinsichtlich der Fähigkeit zur Epoxidierung untersuchten Lipasen.**

Für die mit durchgezogener Linie umrandeten Lipasen wurde die Bildung von 9,10-Epoxy-stearinsäure detektiert, während für die Lipasen mit gestricheltem Rahmen kein Epoxidbildung nachgewiesen wurde. Die nicht eingerahmten Lipasen wurde zur Erweiterung des Stammbaumes aufgenommen.

### 3.4.3 Kinetische Untersuchung der Epoxidierung von Ölsäure mit verschiedenen immobilisierten Lipasen

Die Kinetik der Ölsäureepoxidierung wurde für die immobilisierten Lipasen aus *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus* und zwei Varianten der immobilisierten CalB jeweils bei 30, 40 und 50 °C untersucht, weil diese vier Lipasen bei der Untersuchung der Epoxidierung mit freien Enzymen die höchsten Umsätze zeigten. Zum Vergleich der immobilisierten Lipasen wurde die Aktivität auf Basis der Hydrolyse von p-Nitrophenyloctanoat bestimmt (siehe Anhang, Abschnitt 8.3.1). Die gemessenen Aktivitäten sind in Tabelle 6 aufgelistet. Zur Untersuchung der Epoxidierungskinetik von 1 M Ölsäure (3,14 mmol) in Toluol wurden 0,8 p-NPO-U pro Millimol Ölsäure von jedem Immobilisat eingesetzt. Die Epoxidierung wurde mittels Dünnschicht- (siehe Kapitel 8.3.2) und Gaschromatographie analysiert (siehe Abschnitt 8.3.4). Ziel war es, die Eignung verschiedener immobilisierter Lipasen zur Epoxidierung eines

repräsentativen Pflanzenölderivates zu zeigen und die verschiedenen Präparate auf Basis eines spezifischen Aktivitätseinsatzes zu vergleichen. Die geeignetsten Varianten sollten für weiterführende Stabilitätsuntersuchungen ausgewählt und Reaktionsbedingungen dafür festgelegt werden.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse der Epoxidierung von Ölsäure mit (A) Novozym® 435, (B) CalB immobilisiert auf Immobead 150 und (C) *Rhizomucor miehei* Lipase (RML) immobilisiert auf Immobead 150 dargestellt. Die Reaktionsansätze mit der auf Immobead 150 immobilisierten Lipase aus *Thermomyces lanuginosus* (TLL) zeigten bei einer Reaktionstemperatur von 30, 40 und 50 °C basierend auf einer dünnschichtchromatographischen Analyse nur eine geringe Umsetzung von Ölsäure (OA) zu Epoxystearinsäure (ESA). Daher wurde die geringe Umsetzung von OA mit immobilisierter TLL nicht mit Hilfe der Gaschromatographie quantifiziert. In Referenzansätzen mit Wasserstoffperoxid ohne Enzymzugabe wurde keine Ölsäureumsetzung festgestellt. In Abbildung 15 wurden jeweils der Umsatz von Ölsäure (OA) und die Ausbeute an Epoxystearinsäure (ESA) über die Zeit für die Reaktionstemperaturen von 30, 40 und 50 °C gezeigt.

Bei der Epoxidierung von Ölsäure mit Novozym® 435 lag der Umsatz (berechnet nach Formel 27 in Kapitel 8.3.4) bei 30 °C nach 12 h bei 92 % (siehe Abbildung 15 A1). Die ESA-Ausbeute (berechnet nach Formel 27 in Kapitel 8.3.4) betrug zu diesen Zeitpunkten etwa 73 %. Die gaschromatographische Bestimmung von Epoxystearinsäure unterlag dabei größeren Schwankungen als die der freien Fettsäure. Bei 40 °C war die Ölsäure nach 12 h zu über 94 % umgesetzt und eine ESA-Ausbeute von 83 % erreicht. Durch eine Erhöhung der Temperatur auf 50 °C wurde die Reaktion weiter beschleunigt und erreichte nach 8 h ein Umsatz von 96 %. Die ESA-Ausbeute lag entsprechend nach 8 h bei etwa 97 %. Zusammengefasst nimmt die Reaktionsrate mit zunehmender Temperatur bei der Epoxidierung von Ölsäure mit Novozym® 435 erwartungsgemäß zu (vergleiche Tabelle 9).

Die Ergebnisse der Epoxidierung von Ölsäure mit auf Immobead 150 immobilisierter CalB sind in Abbildung 15 B dargestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten bei 30 und 40 °C waren bei der Umsetzung mit CalB Immobead 150 vergleichbar (siehe Tabelle 9). Nach 8 h Inkubation wurde jeweils ein Ölsäureumsatz von 92 % erreicht. Im Vergleich zu einer Reaktion bei 30 und 40 °C lag der Ölsäureumsatz bei 50 °C bereits nach 4 h bei 96 %.



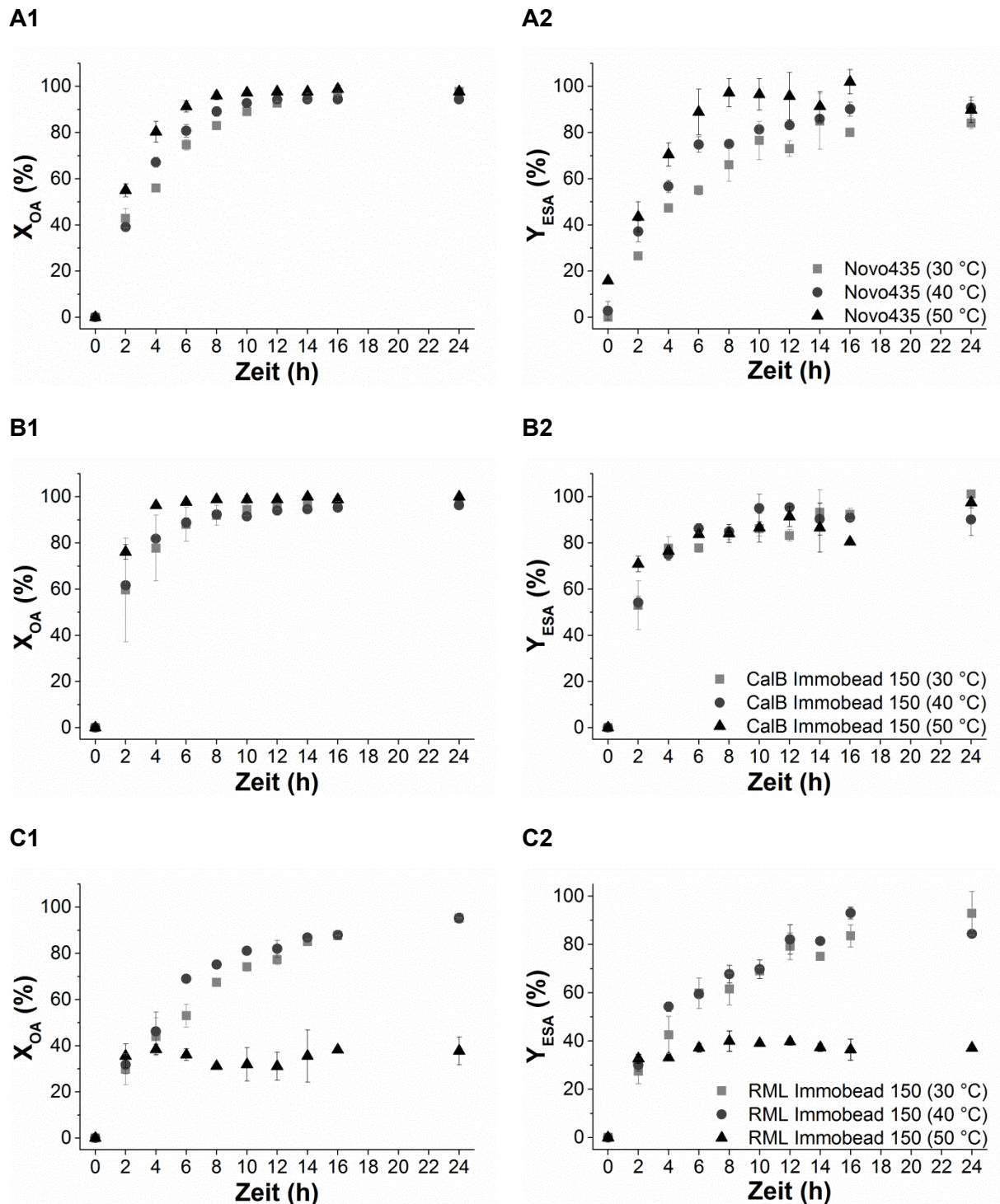


Abbildung 15: Ölsäureumsatz der chemo-enzymatischen Epoxidierung mittels verschiedener immobilisierter Lipasen.

(A) Novozym® 435 (CalB adsorptiv immobilisiert auf Polyacryl-Träger, (B) CalB Immobead 150 (CalB kovalent immobilisiert auf Epoxy-funktionalisiertem Methacrylat-Copolymer) und (C) RML Immobead 150 (*R. miehei* Lipase kovalent immobilisiert auf Epoxy-funktionalisiertem Methacrylat-Copolymer). Spalte 1 zeigt jeweils den Ölsäure (OA)-Umsatz und Spalte 2 die zugehörige Epoxystearinsäure (ESA)-Ausbeute in Prozent über der Zeit. Die Konzentrationen zur Berechnung des Umsatzes und der Ausbeute wurden mittels Gaschromatographie ermittelt und anschließend gemittelt dargestellt ( $n = 2$ ).

Die Umsetzung von Ölsäure zu Epoxystearinsäure mit RML auf Immobead 150 resultiert bei 30 °C nach 12 h in 78 % und bei 40 °C in ungefähr 82 % Umsatz. Nach 24 h Inkubation mit RML Immobead 150 waren bei 30 und 40 °C jeweils 95 % Ölsäureumsatz erreicht. Im Gegensatz dazu konnte Ölsäure bei 50 °C mit RML Immobead 150 nur innerhalb der ersten zwei Stunden zu etwa 36 % umgesetzt werden.

**Tabelle 9: Spezifische Umsatzraten bei der Epoxidierung von 1 M Ölsäure in Toluol mit verschiedenen immobilisierten Lipasen bei 30, 40 und 50 °C.**

Der Vergleich der Umsatzraten bezieht sich auf die ersten zwei Stunden der Inkubation.

Enzympräparat	Temperatur in °C	Spezifische Ölsäureumsatzrate in g OA g <sup>-1</sup> Immob. h <sup>-1</sup>
Novozym® 435	30	12,2 ± 1,2
	40	11,1 ± 0,5
	50	15,6 ± 0,9
CalB Immobead 150	30	8,4 ± 3,2
	40	8,64 ± 0,08
	50	10,7 ± 0,5
RML Immobead 150	30	0,30 ± 0,07
	40	0,32 ± 0,04
	50	0,43 ± 0,03

Es konnte gezeigt werden, dass CalB auf Immobead 150 bei 50 °C nach 4 h über 95 % Umsatz zeigte. Im Vergleich dazu erreichte man mit CalB auf Polyacrylharz (Novozym® 435) bei 50 °C nach 8 h einen vollständigen Umsatz. Dabei ist jedoch zu beachten, dass von CalB auf Immobead 150 aufgrund der geringeren spezifischen p-NPO-Aktivität etwa die doppelte Masse im Vergleich zu Novozym® 435 eingewogen wurde. Die geringere Einwaage bei Novozym® 435 führt bei einer mit der von CalB Immobead 150 vergleichbaren Partikelgrößenverteilung zu einer kleineren Oberfläche. Aufgrund der reduzierten Grenzfläche kann es zu Massentransferlimitierungen und trotz des Einsatzes vergleichbarer Enzymaktivität derselben Lipase (CalB) zu einer reduzierten Reaktionsrate kommen. Dies liefert eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Ausbeute zu Beginn der Reaktion. Vergleicht man jedoch die in Tabelle 9 definierten auf die eingesetzte Enzymmenge bezogenen spezifischen Ölsäureumsatzraten, so stellt man für Novozym® 435 eine höhere Umsatzrate im Vergleich zu CalB Immobead 150 fest. Damit sind beim Einsatz gleicher Enzymmassen vergleichbare Umsätze in den ersten Reaktionsstunden zu erwarten.

Für RML und TLL wurden im Vergleich zu den zwei Varianten von CalB deutlich geringere Umsatzraten oder kein Umsatz von Ölsäure festgestellt. Eine Massentransferlimitierung

aufgrund einer geringen Grenzfläche zwischen Enzymträgermaterial und flüssigem Reaktionsmedium ist für RML Immobead 150 auszuschließen, weil von RML Immobead 150 wegen der geringeren spezifischen p-NPO-Aktivität (siehe Tabelle 6) im Vergleich zu den CalB-Varianten größere Mengen eingesetzt wurden und damit eine größere Grenzfläche zwischen Träger und Reaktionsmedium bei RML zur Verfügung stand. Ein negativer Einfluss des Immobead 150-Trägermaterials, der durch im Vergleich zum Polyacrylharzträger von CalB veränderte physikalisch-chemische Eigenschaften entstehen könnte, ist für RML Immobead 150 ebenfalls auszuschließen, da für CalB Immobead 150 hohe Ölsäureumsatzraten detektiert wurden. Das Trägermaterial selbst könnte die Reaktion zum Beispiel durch einen sehr stark hydrophoben Charakter und die Ausbildung einer stark hydrophoben Grenzschicht verlangsamen, da es durch die Grenzschicht zur limitierten Verfügbarkeit von Wasserstoffperoxid und damit einer verlangsamtten Bildung der Persäure kommen könnte [153]. Demnach ist der geringere Ölsäureumsatz mit RML Immobead 150 auf eine geringere Perhydrolyse-Aktivität im Vergleich zu CalB zurückzuführen.

Für den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuch waren die Reaktionsbedingungen folgende: Für Novozym<sup>®</sup> 435 wurden 5 g mol<sub>C=C</sub><sup>-1</sup>, für CalB auf Immobead 150 10,1 g mol<sub>C=C</sub><sup>-1</sup>, für RML 141,8 g mol<sub>C=C</sub><sup>-1</sup> und für TLL 1,1 g mol<sub>C=C</sub><sup>-1</sup> verwendet. Es wurde eine 1 M Lösung von Ölsäure in Toluol und ein 1,1-facher Überschuss an 30 %igem Wasserstoffperoxid verwendet. Die Reaktion wurde über 24 h für 30, 40 und 50 °C analysiert.

Warwel und Rüschen. Klaas beschrieben die enzymatische Epoxidierung einer 0,5 M Ölsäure-Lösung in Toluol mit 20 g Novozym<sup>®</sup> 435 pro Mol<sub>C=C</sub> bei Raumtemperatur. Eine 60-prozentige Wasserstoffperoxidlösung wurde mit 1,5 eq. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bezogen auf die Anzahl an Doppelbindungen schrittweise über einen Zeitraum von 6 h zugegeben. Nach 16 h Reaktionszeit wurde eine Ausbeute von 72 % erreicht. Informationen zur Umsatzrate wurden dabei nicht erhoben [154]. Im Vergleich zu der chemo-enzymatischen Epoxidierung, wie sie von Rüschen. Klaas und Warwel durchgeführt wurde, konnte in dieser Arbeit mit Novozym<sup>®</sup> 435 bei 30 °C, 40 °C und 50 °C nach spätestens 12 h ein vollständiger Umsatz der Ölsäure bei höherer Substratkonzentration erreicht werden. Rüschen. Klaas und Warwel verwendeten eine höhere spezifische Enzymmenge und höhere Wasserstoffperoxidkonzentration, jedoch eine geringere Reaktionstemperatur. Der geringere Umsatz nach 16 h könnte damit auf eine geringere Umsatzrate aufgrund einer niedrigeren Temperatur zurückzuführen sein. Zusätzlich kann angenommen werden, dass es trotz der schrittweisen Zugabe der sehr hochkonzentrierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (60 Gew. % entspricht ungefähr 22 M) zu einer starken Inaktivierung des Enzyms kam. Die Beschleunigung der Inaktivierung von Novozym<sup>®</sup> 435 durch steigende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen wurde auch von Törnvall *et al.* gezeigt [117].

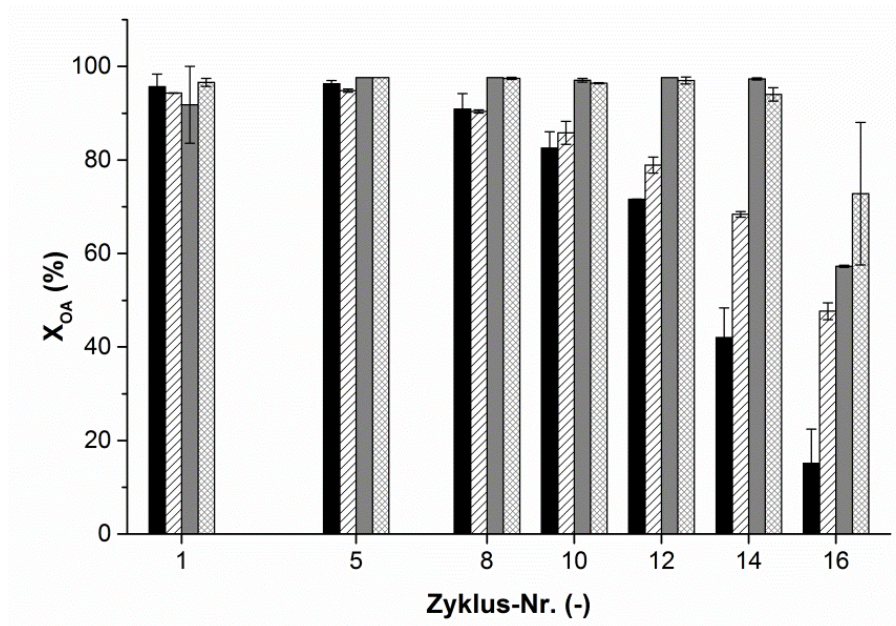
#### 3.4.4 Einfluss von Temperatur und Waschschritten auf die Stabilität verschiedener immobilisierter CalB-Varianten

Verschiedene Varianten der immobilisierten Lipase B aus *Candida antarctica* wurden in dieser Arbeit erfolgreich für die enzymatische Epoxidierung von Ölsäure eingesetzt. In einem weiterführenden Schritt sollte die Stabilität von Novozym® 435 (CalB immobilisiert auf Acrylharz) und der auf Immobead 150 immobilisierten CalB-Variante verglichen werden. Ziel war es, den Einfluss der Reaktionstemperatur und eines Waschschrattes mit Toluol zwischen den Reaktionszyklen zu beschreiben. Untersucht wurde die Stabilität beider Präparate bei 40 und 50 °C mit und ohne Waschen zwischen den einzelnen Zyklen. Ein Reaktionszyklus entsprach der Umsetzung von 1 M Ölsäure in Toluol über 14 h Reaktionszeit bei der jeweiligen Temperatur. Die Reaktionszeit wurde auf Basis der in Abschnitt 3.4.3 dargestellten kinetischen Untersuchungen der Epoxidierung von Ölsäure definiert. Die Reaktionsansätze wurden qualitativ mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Methode siehe Anhang, Kapitel 8.3.2) und quantitativ mittels Gaschromatographie (Methode siehe Anhang, Abschnitt 8.3.4) analysiert. Der Umsatz und die Ausbeute wurden auf Basis der gemessenen Ölsäure- und 9,10-Epoxystearinsäurekonzentrationen berechnet.

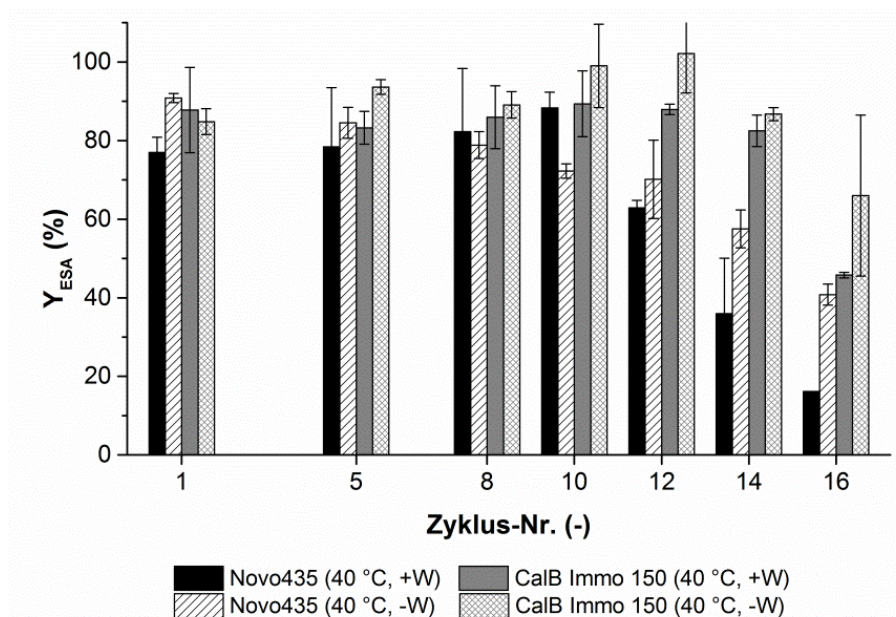
Reaktionszyklen zur quantitativen Bestimmung des Ölsäureumsatzes und der Epoxystearinsäureausbeute wurden auf Basis vorangegangener dünnschichtchromatographischer Analysen ausgewählt. Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse zur Umsetzung von Ölsäure bei 40 °C sind in Abbildung 16 dargestellt. Für Novozym® 435 (schwarzer und schwarz schraffierter Balken) wurde in den ersten 10 Reaktionszyklen jeweils ein Ölsäureumsatz von über 80 % erreicht, während die CalB-Variante immobilisiert auf Immobead 150 (grauer und mit grau schraffierter Balken) auch nach 14 Reaktionszyklen noch einen Ölsäureumsatz von über 90 % ermöglichte (siehe Abbildung 16 A). Des Weiteren wurde festgestellt, dass sich ein zusätzlicher Waschschratt zwischen den einzelnen Reaktionszyklen negativ auf die Aktivität auswirkt. Dieser Effekt wird bei der adsorptiv immobilisierten CalB-Variante Novozym® 435 besonders deutlich. Nach 14 und 16 Reaktionszyklen ist für Novozym® 435 mit zusätzlichem Waschschratt (schwarzer Balken) und ohne Waschschratt (schwarz schraffierter Balken) ein deutlicher Unterschied im Ölsäureumsatz von etwa 30 % nach Zyklus 14 zu erkennen (siehe Abbildung 16).

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse zur Epoxidierung von Ölsäure mit Novozym® 435 und CalB Immobead 150 bei 50 °C sind in Abbildung 17 zusammengefasst. Auf Basis der Untersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie wurden die Zyklen 1, 3, 5, 7 und 8 ausgewählt. Mit CalB auf Immobead 150 wurde bei 50 °C nach sieben Zyklen ein höherer Ölsäureumsatz erzielt als mit Novozym® 435.

A



B



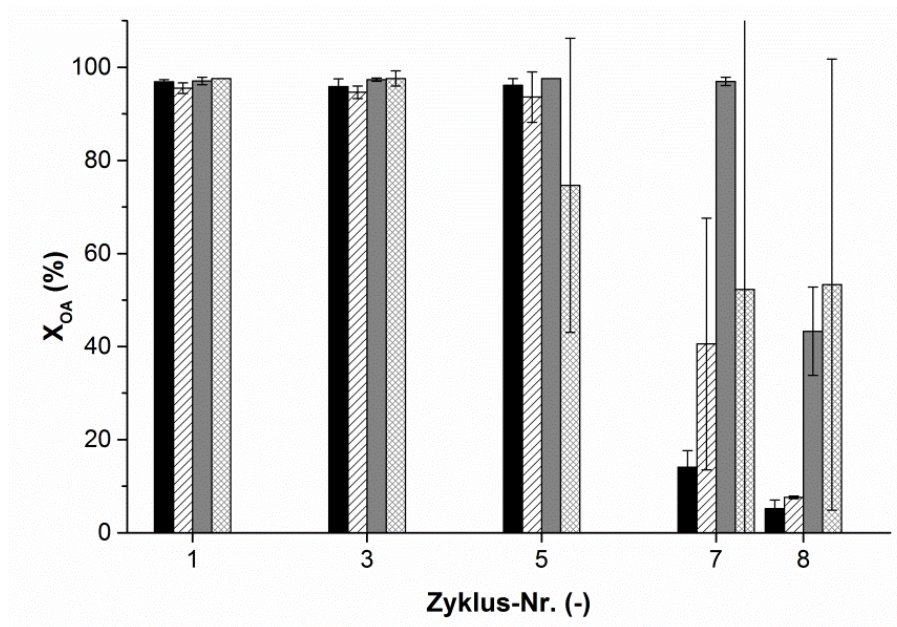
**Abbildung 16: Vergleich der Stabilität von Novozym® 435 und CalB kovalent immobilisiert auf Immobead 150 für die Epoxidierung von 1 M Ölsäure in Toluol bei 40 °C.**

**Mit (+W) und ohne (-W) Waschschrift zwischen 16 aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen mit einer Inkubationszeit von je 14 h: (A) Ölsäureumsatz und (B) und Epoxystearinsäureausbeute (n=2).**

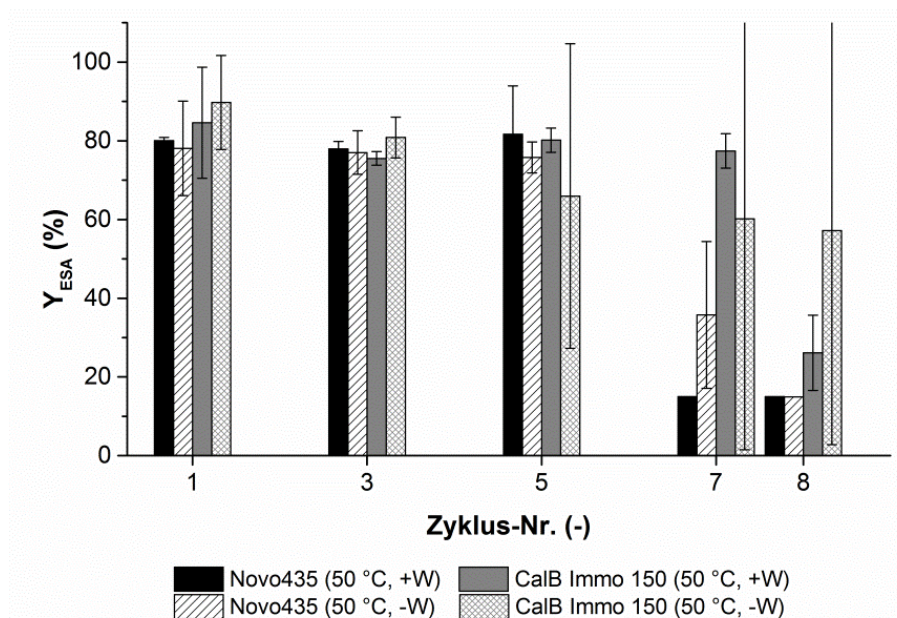
Insgesamt ist bei 50 °C im Vergleich zu einer Reaktion bei 40 °C eine erheblich beschleunigte Inaktivierung der Enzyme festzustellen, was sich in einer deutlich geringeren Zykluszahl niederschlägt. Demnach sind 50 °C aus Sicht der Enzymstabilität weniger geeignet zur Epoxidierung von Ölsäure. Der negative Einfluss eines zusätzlichen Waschens zwischen den

Reaktionszyklen konnte bei 50 °C für Novozym® 435 durch die Ergebnisse aus Zyklus 7 bestätigt werden. Dieser Effekt zeigt sich für Novozym® 435 nach sieben und für CalB Immo 150 nach acht Zyklen (siehe Abbildung 17 A).

**A**



**B**



**Abbildung 17: Vergleich der Stabilität von Novozym® 435 und CalB kovalent immobilisiert auf Immo 150 für die Epoxidierung von 1 M Ölsäure in Toluol bei 50 °C.**

Mit (+W) und ohne (-W) Waschschrift zwischen acht aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen mit einer Inkubationszeit von 14 h: (A) Ölsäureumsatz und (B) Epoxystearinsäureausbeute (n=2).

Zum Vergleich der verschiedenen CalB-Varianten und der Beschreibung des Einflusses eines zusätzlichen Waschens mit Toluol zwischen den aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen wurde die gebildete Masse an ESA pro Enzymmasse für 16 Zyklen summiert. Da die ESA-Konzentration nicht für alle Zyklen gemessen wurde, wurde für die nicht mittels GC analysierten Zyklen die ESA-Konzentration der darauffolgend gemessenen Konzentration angenommen. Für Novozym® 435 bei 40 °C ergaben sich für die Reaktion mit Waschen eine katalytische Produktivität von etwa 537 g ESA pro g Enzym nach 16 Zyklen. Durch das Weglassen des Waschens konnte die katalytische Produktivität für Novozym® 435 auf 635 g ESA pro g Immobilisat gesteigert und ein zusätzlicher Prozessschritt eingespart werden. Für CalB auf Immobead 150 ergab sich mit Waschen eine Produktivität von 357 g ESA pro g Enzym und ohne Waschen von 397 g ESA pro g Enzym. Betrachtet man somit neben dem zu erreichenden Umsatz über eine maximale Zykluszahl auch die pro Immobilisatmenge produzierte Produktmenge, so ist die katalytische Produktivität von Novozym® 435 im Vergleich zu CalB Immobead 150 bei 40 °C höher.

Warwel und Rüschen gen. Klaas untersuchten die Stabilität von Novozym® 435 ebenfalls bei der Epoxidierung von Ölsäure in Toluol bei einer Konzentration von 1,4 mol L<sup>-1</sup> und Raumtemperatur. Wasserstoffperoxid wurde als 60 %ige Lösung schrittweise über 6 h zugegeben. Dabei wurde allerdings ein Verhältnis von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu C=C-Doppelbindungen von 0,44 zu 1 eingesetzt. Damit konnten maximal 44 % der eingesetzten Ölsäuremenge umgesetzt werden. Als Reaktionsprodukt entstand ein Gemisch aus Ölsäure und Epoxid, das zur Gewinnung der reinen 9,10-Epoxystearinsäure aufgearbeitet werden musste. Nach 15 Reaktionszyklen von je 16 h konnten Warwel und Rüschen gen. Klaas noch etwa 60 % Umsatz relativ zur eingesetzten Wasserstoffperoxidmenge erzielen. Das entspricht einem Ölsäureumsatz von etwa 30 %. Insgesamt wurden 200 g ESA pro g Novozym® 435 gebildet [113]. Orellana-Coca *et al.* untersuchten die Stabilität von Novozym® 435 in einer lösemittelfreien Umsetzung von Methyloleat bei 50 °C und einer Inkubationszeit von 6 h. Wasserstoffperoxid wurde als 30 %ige Lösung mit einem Verhältnis von 1,1 Mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Mol C=C-Doppelbindung über 4 h zugegeben. Orellana-Coca *et al.* erhielten in den ersten fünf Reaktionszyklen einen Umsatz von 85 %, während im sechsten Zyklus noch 20 % umgesetzt wurden. Insgesamt wurden so 40 g epoxidierter Ölsäuremethylester pro g Novozym® 435 gebildet [114].

Im Vergleich zu den Untersuchungen von Warwel und Rüschen gen. Klaas beziehungsweise Orellana-Coca *et al.* konnte die katalytische Produktivität bei der Epoxidierung von Ölsäurederivaten in dieser Arbeit durch die Wahl eines Reaktionssystems mit organischem Lösemittel, einer angepassten Wasserstoffperoxidkonzentration und der Einsparung zusätzlicher Waschschriffe um den Faktor 3,2 beziehungsweise 15,9 gesteigert werden.

---

### 3.5 Schlussfolgerungen zur Auswahl geeigneter Enzyme und *in silico*-Untersuchung der Perhydrolase-Aktivität bei Lipasen

In dieser Arbeit wurden 18 nicht-immobilisierte Lipasen aus verschiedenen Mikroorganismen in der Epoxidierung von Ölsäure untersucht und die Bildung von 9,10-Epoxystearinsäure für neun Enzyme gezeigt. Darunter waren fünf neue Lipasen aus unterschiedlichen Spezies der Gattung *Pseudozyma* und CalB als Referenzenzym aus derselben Gattung. Für die neuen Lipasen wurden die Aminosäuresequenzen mittels *Genome Walking* ermittelt [152]. Je höher die Sequenzidentität zu CalB war, desto stärker schien die Aktivität zur Persäurebildung ausgeprägt zu sein. Allerdings wurde die Epoxidierung von Ölsäure auch für Lipasen gezeigt, die nur eine geringe Sequenzidentität zu CalB aufwiesen. Daher war keine eindeutige Beziehung zwischen der Fähigkeit zur Persäurebildung und der zur Ausbildung dieser Eigenschaft benötigten Aminosäuresequenzmuster feststellbar. Auf Basis der Untersuchung nicht-immobilisierter Lipasen wurden geeignete Lipasen ausgewählt, die in weiteren Experimenten als immobilisierte Varianten charakterisiert werden sollten. Zu dieser Auswahl gehörten zwei Immobilisatvarianten von CalB und die auf Immobead 150 immobilisierten Lipasen aus *Thermomyces lanuginosis* und *Rhizomucor miehei*. Die spezifische Ölsäureumsatzrate, bezogen auf die eingesetzte Masse an Enzympräparat, war für die auf Acrylharz (Novozym® 435) und Immobead 150 immobilisierte CalB deutlich höher als für die ebenfalls auf Immobead 150 immobilisierte Lipase aus *Rhizomucor miehei*. In weiteren Experimenten wurden daher die immobilisierten CalB-Varianten hinsichtlich ihrer Stabilität bei der Epoxidierung von Ölsäure verglichen. Mit der auf Immobead 150 immobilisierten CalB konnten bei 40 °C 14 Reaktionszyklen mit über 90 % Ölsäureumsatz erzielt werden, während mit Novozym® 435 der Ölsäureumsatz nach 10 Zyklen unter 90 % fiel. Vergleicht man jedoch die pro Masse Enzympräparat gebildete Masse 9,10-Epoxystearinsäure (ESA) in Summe über 16 Zyklen bei Ansätzen ohne zusätzlichen Waschschrift zwischen den einzelnen Zyklen, so schneidet Novozym® 435 mit 635 g ESA pro g Immobilisat im Vergleich zu CalB Immobead 150 mit knapp 400 g ESA pro g Präparat besser ab. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Untersuchungen in dieser Arbeit Novozym® 435 als Biokatalysator ausgewählt.



---

## 4 Auslegung von Verfahren zur Epoxidierung verschiedener Pflanzenöl-basierter Substrate

Pflanzenöle stellen aufgrund ihrer variablen Fettsäurezusammensetzung und der daraus herstellbaren Fettsäurederivate einen vielseitigen Rohstoff zur Synthese epoxidierter Monomerbausteine dar. Der Einfluss der Fettsäurezusammensetzung von Triglyzeriden auf Prozessgrößen wie Lösemiteleinsetz, Reaktionstemperatur, Reaktionszeit und Enzymmenge wurde bisher nicht in Abhängigkeit vom jeweils eingesetzten Pflanzenöl analysiert. Auch die enzymatische Epoxidierung unterschiedlicher Pflanzenöle mit verschiedener Fettsäurezusammensetzung und der Einfluss der Substratcharakteristika auf die Eigenschaften der biokatalytisch hergestellten Epoxide wurden bisher nicht systematisch untersucht.

In dieser Arbeit wird in Kapitel 4.4.2.1 der Einfluss von Heptan und Toluol auf die Epoxidierung von Drachenkopföl untersucht und ein geeignetes Lösemittel ausgewählt. Der Einfluss der Lösemittelmenge, Enzymmenge, Temperatur und Inkubationszeit auf die Epoxidierung von Senf- und Drachenkopföl wird in Abschnitt 4.4.2.2 systematisch analysiert. Durch die Auswahl dieser beiden Öle, die sich durch ein sehr unterschiedliches Fettsäurespektrum in Form eines hohen Gehaltes an Eruca- oder  $\alpha$ -Linolensäure auszeichnen, soll die Vielfalt verfügbarer Pflanzenöle abgebildet und der Einfluss unterschiedlicher Substratcharakteristika auf die Einstellung geeigneter Prozessbedingungen beschrieben werden. Nach Auswahl geeigneter Prozessbedingungen und der Klärung der Frage des Einflusses verschiedener Substrateigenschaften wird in Abschnitt 4.4.2.3 untersucht, ob sich unter optimierten Bedingungen weitere pflanzliche Öle mit hohen Epoxidausbeuten umsetzen lassen. Ergänzt werden die Untersuchungen zur Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle durch eine ausführlichen Substrat- und Produktcharakterisierung, die Aufstellung von Korrelationen zur Verknüpfung von Substrat- und Produktmerkmalen und Untersuchungen zur Enzymstabilität während der Pflanzenölepoxidierung (siehe Kapitel 4.4.2.4, 4.4.2.5 und 4.4.2.6). Abgeschlossen wird Kapitel 4.4 durch die Untersuchung von Prozessvarianten zur enzymatischen Epoxidierung verschiedener Fettsäurederivate, die durch zusätzliche Prozessschritte aus Triglyzeriden gewonnen werden können. Diese zusätzlichen Prozessschritte resultieren in höheren Substratkosten und machen daraus gewonnene Epoxide besonders für speziellere Anwendungen mit spezifischen technischen Anforderungen interessant.

---

## **4.1 Anforderungen an die Auswahl geeigneter Rohstoffe und Anpassung der Verfahren**

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung effizienter biokatalytischer Verfahren zur Umsetzung unterschiedlicher Pflanzenöle und daraus herstellbaren Derivaten wie Fettsäuremethylestern, freien Fettsäuren, langkettigen Dicarbonsäuren und Fettsäure-basierten Alkenen.

Unter einem effizienten Verfahren wird ein Prozess verstanden, bei dem Einflussgrößen wie die eingesetzte Enzym- und Lösemittelmenge auf ein Minimum reduziert und hohe Substratumsätze innerhalb einer akzeptablen Inkubationszeit erzielt werden, um so möglichst hohe Raum-Zeit-Ausbeuten zu erzielen. Der enzymatische Prozess soll bei niedrigen Reaktionstemperaturen erfolgen, um eine mögliche Nebenproduktbildung aufgrund höherer Temperaturen zu vermeiden, einen positiven Effekt auf die Enzymstabilität durch niedrigere Temperaturen zu erzielen und außerdem Energie einzusparen. Das Substratspektrum sollte möglichst umfangreich sein, um zum einen für die gewünschte Anwendung spezifische Monomerbausteine herstellen zu können und zum anderen eine gewisse Flexibilität bei der Rohstoffbeschaffung zu ermöglichen. Bei der Auswahl der Rohstoffe sollte eine direkte Konkurrenz zu Lebensmittel-technischen Anwendungen vermieden werden. Zur Erreichung dieser Ziele sind systematische Untersuchungen durchzuführen, die den Einfluss von verschiedenen Prozessgrößen auf die Umsetzung von Substraten mit verschiedenen Eigenschaften in Zusammenhang betrachten. Daher wurden in dieser Arbeit unterschiedliche native Pflanzenöle, die teilweise nicht im Lebensmittelbereich eingesetzt werden können, und daraus herstellbare Derivate systematisch untersucht, um den Einfluss verschiedener Prozessgrößen auf die enzymatische Epoxidierung zu beschreiben.

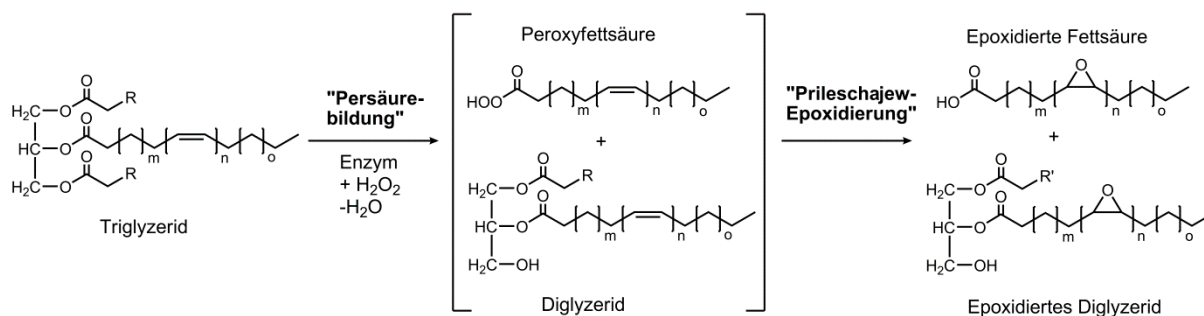
## **4.2 Stand der Technik zur Epoxidierung von Triglyzeriden, Fettsäuremethylestern, Fettsäuren, Alkenen und Dicarbonsäureestern**

In den nachfolgenden Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.4 wird ein Überblick über die Epoxidierung von Pflanzenölen, Fettsäuremethylestern, freien Fettsäuren, Dicarbonsäureestern und Alkenen gegeben, um die Grundlagen zur enzymatischen Epoxidierung Pflanzenöl-basierter Substrate darzustellen und mögliche Einflussgrößen hervorzuheben. Zu Beginn wird die Umsetzung der direkt aus Ölsaaten gewonnen Triglyzeride vorgestellt, während die weiteren Abschnitte die Konversion der Substrate aufgreifen, die durch zusätzliche Prozessschritte aus Triglyzeriden hergestellt werden können.

## 4.2.1 Epoxidierung von Triglyzeriden und Charakterisierung entsprechender Epoxide

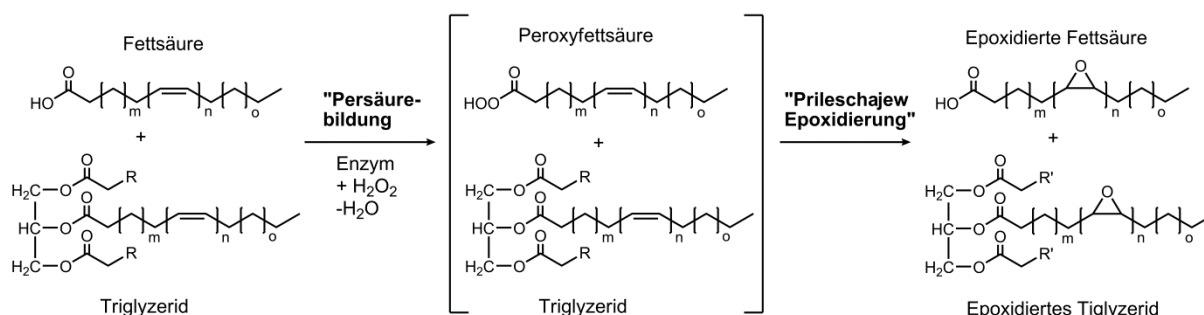
Die enzymatische Epoxidierung von Triglyzeriden basiert auf der Umsetzung von direkt aus Pflanzenölsaaten gewinnbaren Substraten. Die so erhaltenen Triglyzeridepoxide spielen, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, aus anwendungstechnischer Sicht im Vergleich zu Epoxiden aus anderen Pflanzenölderivaten die wichtigste Rolle. Nachfolgend wird die enzymatische Umsetzung von pflanzlichen Ölen zu Epoxiden vorgestellt. Die enzymatische Epoxidierung von Triglyzeriden erfolgt durch Perhydrolyse der Estergruppen. Dabei entstehen, wie in Abbildung 18 A gezeigt, Diglyzeride und Percarbonsäuren, die die enthaltenen Doppelbindungen zu Epoxiden umsetzen. Rüschen gen. Klaas und Warwel konnten zeigen, dass durch die Zugabe eines geringen Anteils freier Fettsäuren die Bildung von Mono- und Diglyzeriden vermieden werden kann. Durch die Zugabe der freien Fettsäure wird eine Rückveresterung der im Falle der (Per-)Hydrolyse frei werdenden Hydroxylgruppe durch die Lipase bewirkt (siehe Abbildung 18 B) und so die Akkumulation epoxidierter Mono- und Diglyzeride im Produkt vermieden [17, 18].

A



$m = 5 - 9$ ;  $n = 0 - 3$ ;  $o = 0 - 4$ ;  $R = \text{un-/gesättigte Kohlenstoffkette}$ ;  $R' = \text{gesättigte/epoxidierte Kohlenstoffkette}$

B



$m = 5 - 9$ ;  $n = 0 - 3$ ;  $o = 0 - 4$ ;  $R = \text{un-/gesättigte Kohlenstoffkette}$ ;  $R' = \text{gesättigte/epoxidierte Kohlenstoffkette}$

**Abbildung 18: Lipase-katalysierte chemo-enzymatische Epoxidierung von Triglyzeriden.**

**(A) ohne Zugabe freier Fettsäuren unter Bildung eines Produktgemisches aus epoxidierten freien Fettsäuren, Mono-, Di- und Triglyzeriden, (B) mit Zugabe freier Fettsäuren und Erzeugung eines Produktgemisches aus epoxidierten freien Fettsäuren und Triglyzeriden. [17, 18]**

Die Anzahl der Veröffentlichungen im Bereich der enzymatischen Epoxidierung pflanzlicher Öle ist im Vergleich derer zur Umsetzung von Pflanzenölderivaten gering. In Tabelle 10 wird eine Übersicht zur enzymatischen Epoxidierung von Triglyzeriden zusammengestellt. Dabei werden zuerst Öle mit einem hohen Anteil einfach ungesättigter Fettsäuren, und damit einer niedrigen Jodzahl, und anschließend die mit einem zunehmenden Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren betrachtet.

Sun *et al.* untersuchten die Epoxidierung von Maiskeimöl und *Sapindus mukorossi* Öl mit Novozym® 435 mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung [155, 156]. Bei der Umsetzung von *Sapindus mukorossi* Öl variierten Sun *et al.* die Prozessparameter Reaktionszeit (4 bis 10 h), Temperatur (30 bis 70 °C), den molaren Überschuss an Wasserstoffperoxid bezogen auf die eingesetzte Menge an Doppelbindung (Verhältnis zwischen 1:1 und 7:1) und den Einfluss der Dosierung an Novozym® 435 im Bereich von 1 bis 3 Gew. % relativ zur Masse an eingesetztem Öl. *Sapindus mukorossi* Öl wies eine Jodzahl von 84,9 auf und zeichnete sich entsprechend durch einen sehr hohen Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren von mehr als 75 % (51 % Öl- und 23 % Gadoleinsäure) aus. Die Ölkonzentration in der organischen Phase wurde konstant bei 0,175 M gehalten, wobei der organischen Phase 28 % Stearinsäure relativ zur Masse Öl zugesetzt wurden. Der höchste Epoxidsauerstoffgehalt wurde mit 4,6 % (ca. 90 % der maximalen Ausbeute) nach 7 h Inkubation bei 50 °C, einem molaren Verhältnis von Wasserstoffperoxid zu C=C-Doppelbindung von 4:1 und einer Enzymdosierung von 2 Gew.% relativ zur Masse an Öl erreicht [156].

Für die enzymatische Epoxidierung von Maiskeimöl, das bei einer Jodzahl von 115 einen höheren Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren als *Sapindus mukorossi* Öl aufwies (ca. 33,6 % Ölsäure, 49 % Linolsäure), wurden ebenfalls verschiedene Einflussgrößen untersucht. Dabei wurden die Reaktionstemperatur (35 bis 65 °C), die Zugabe von Stearinsäure (14 bis 42 Gew. %), das molare Verhältnis an Wasserstoffperoxid zu C=C-Doppelbindung (0,7:1 bis 4,7:1) und die Reaktionszeit (8 bis 12 h) betrachtet. Die Triglyzeridkonzentration in der organischen Phase variierte aufgrund der verschiedenen Stearinsäuremengen zwischen 0,160 und 0,167 mol L<sup>-1</sup>, während die Enzymdosierung mit 6,4 g Novozym® 435 pro Mol C=C-Doppelbindung für alle Ansätze konstant gehalten wurde. Unter Einstellung der optimierten Reaktionsbedingungen, die mit einer Reaktionstemperatur von 35 °C, einer Inkubationszeit von 10 h, einer Stearinsäurezugabe von 28 % relativ zur Masse an Öl und einem Verhältnis von Wasserstoffperoxid zu C=C-Doppelbindung von 2,7:1 definiert wurden, konnte ein Epoxidsauerstoffgehalt von 5,8 % erzielt werden, der einem relativen Umsatz von 85,3 % entspricht [155].

Tabelle 10: Lipase-katalysierte Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle (Lipase B aus *C. antarctica* immobilisiert auf Acrylharz, Novozym® 435).

Substrat	Reaktionsbedingungen							Lösungs- Mittel	Umsatz <sup>a</sup> Ausbeute <sup>b</sup> (%)	OO (%)	Ref.
	Jodzahl (g Jod/100 g) (max. OO (%))	T (°C)	c <sub>0</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	t (h)	Mol- verhältnis (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :C=C)	Spezifische Enzymmenge (g mol <sup>-1</sup> C=C)					
<i>Sapindus mukorossi</i> Kernöl	84,9 (5,1)	50	0,18	7	4	5,9	Toluol	90	4,6	[156]	
Rapsöl	112 (6,6)	40	0,1	10 – 66	1,5	20	Toluol	99 <sup>a,1</sup> 80 <sup>b,2</sup>	5,3	[17]	
	112 (6,5)	RT	0,1	16	1,5	20	Toluol	99 <sup>a,1</sup> 82 <sup>b,2</sup>	5,3	[18]	
Maiskeimöl	115 (6,8)	35	0,16	10	2,7	6,4	Toluol	85,3 <sup>b,2</sup>	5,8	[155]	
Sonnen- blumenöl	n.v.	40	0,1	10 – 66	1,5	20	Toluol	88 <sup>b,2</sup>	n.v.	[17]	
	123 (7,2)	RT	0,1	16	1,5	20	Toluol	88 <sup>a,1</sup> 88 <sup>b,2</sup>	6,3	[18]	
Sojaöl	130 (7,6)	RT	0,09	16	1,5	20	Toluol	99 <sup>a,1</sup> 93 <sup>b,2</sup>	7,1	[18]	
	131 (7,6)	50	0,48	24	1	8	Toluol	87 <sup>a</sup>	6,6	[157]	
Leinöl	203 (11,35)	40	0,1	10 - 66	1,5	20	Toluol	91 <sup>a,1</sup> 71 <sup>b,2</sup>	8,1	[17]	
	184 (10,4)	RT	0,06	16	1,5	20	Toluol	98 <sup>a,1</sup> 95 <sup>b,2</sup>	9,9	[18]	

<sup>OO</sup>Epoxidsauerstoffgehalt, <sup>RT</sup>Raumtemperatur; <sup>n.v.</sup> nicht verfügbar; <sup>1</sup>Umsatz basierend auf der Bestimmung der Jodzahl; <sup>2</sup>Ausbeute auf Basis des gemessenen Epoxidsauerstoffgehaltes; <sup>3</sup>wässrige Wasserstoffperoxid-Phase in separatem Blasensäulenreaktor im Überschuss bereitgestellt; <sup>4</sup>Ausbeute aus einem Diagramm abgeschätzt

Rüsch gen. Klaas und Warwel zeigten erfolgreich die Epoxidierung von Raps-, Sonnenblumen-, Soja- und Leinsamenöl. Diese Öle zeichneten sich in dieser Reihenfolge durch einen steigenden Gehalt an Fettsäuren mit mehreren Doppelbindungen aus, was sich durch eine zunehmende Jodzahl zeigt. Bei relativ niedrigen Ölkonzentrationen von 0,1 M Triglyzerid bezogen auf die organische Phase erzielten Rüsch gen. Klaas und Warwel hohe Umsätze (>90 % Reduktion der Jodzahl) und hohe Epoxidausbeuten. Eine weiterführende Betrachtung hinsichtlich des Einflusses von Lösemittel-, Wasserstoffperoxid- oder Enzymmenge erfolgte jedoch nicht [17, 18].

Vlček und Petrović hingegen untersuchten den Einfluss von Enzym-, Wasserstoffperoxid-, Lösemittel- und Ölsäuremenge in Abhängigkeit von der Zeit bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung von Sojaöl (Jodzahl 131), indem sie jeweils eine Einflussgröße variierten, während die anderen Größen konstant gehalten wurden. Bei diesem Vorgehen kann passieren, dass nicht die geeignetste Parameterkombination gefunden wird, wenn einzelne Einflussfaktoren miteinander in Wechselwirkung stehen. Vlček und Petrović konnten in verschiedenen Ansätzen auf Basis der gemessenen Jodzahl Umsätze über 95 % erzielen. Nach Vlček und Petrović wurden die besten Ergebnisse bei der Epoxidierung von Sojaöl innerhalb von 24 h bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C erreicht, wenn ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu C=C-Verhältnis knapp über eins und eine Enzymdosierung von 8 g Novozym® 435 pro Mol C=C-Doppelbindung (entspricht 4 Gew. % relativ zur Masse an Öl) verwendet werden. Als Lösemittelmenge wurden 110 Gew. % Toluol relativ zur eingesetzten Masse an Öl (entspricht einer Triglyzeridkonzentration von 0,48 M in der organischen Phase) eingesetzt. Zusätzlich wurden bis zu 25 Mol% freie Fettsäuren (4,8 Gew. % relativ zur Masse Öl) zugegeben [157].

Bei den Untersuchungen von *Sun et al.* zur enzymatischen Epoxidierung von *Sapindus mukorossi* und Maiskeimöl fällt auf, dass die Einstellungen der Prozessvariablen Reaktionstemperatur und molares Verhältnis von Wasserstoffperoxid zu C=C-Doppelbindung in extremen Bereichen gewählt wurden. Aus Sicht der Enzymstabilität sind sowohl hohe Temperaturen (>50 °C) als auch hohe Wasserstoffperoxidverhältnisse (>2:1) nicht zu bevorzugen, da beide Faktoren wesentlichen Einfluss auf die Inaktivierung des Biokatalysators ausüben [117-119, 158]. Beim Einsatz hoher Wasserstoffperoxidverhältnisse kommt außerdem hinzu, dass zum einen aufgrund der großen Wasserstoffperoxidmenge die Raum-Zeit-Ausbeute nachteilig beeinflusst wird und zum anderen selbst bei einer vollständigen Umsetzung des Pflanzenöls noch erhebliche Restmengen an Wasserstoffperoxid im Reaktionsansatz vorhanden sind, die entsprechend im Zusammenhang mit dem Abfallmanagement berücksichtigt werden müssen. Zusätzlich wäre erstrebenswert, den Einsatz eines organischen Lösemittels weitestgehend zu minimieren, um so die Raum-Zeit-Ausbeute

zu erhöhen, eventuell Vorteile hinsichtlich konstruktiver Reaktormerkmale wie zum Beispiel Maßnahmen zum Explosionsschutz zu erzielen und bei vollständigem Verzicht auf den Einsatz organischer Lösemittel zudem den Schritt der Lösemittelabtrennung einzusparen. Sun *et al.* und Rüschen, Klaas und Warwel führten ihre Experimente mit relativ hohem Lösemittelsatz und damit niedrigen Triglyzeridkonzentrationen ( $< 0,175 \text{ M}$ ) durch, während Vlček und Petrović den Einflussfaktor Lösemittelmenge bei der Umsetzung von Sojaöl betrachteten. Weiterführende Untersuchungen zum Einfluss von beispielsweise der Lösemittelmenge bei der Umsetzung nicht-konventioneller Pflanzenöle mit sehr unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung im Kombination mit anderen Prozessparametern wie Reaktionstemperatur, Inkubationszeit und Enzymdosierung stehen noch aus und sollten im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden.

### Charakterisierung von Pflanzenölen und deren Epoxiden

Die Viskosität und das Schmelzverhalten pflanzlicher Öle und deren Epoxide spielen je nach geplanter Anwendung eine wichtige Rolle. Ein hoher Epoxidsauerstoffgehalt ist wichtig für den Einsatz als Additiv in Kunststoffen, während bei der Verwendung als Reaktivverdünner eine geringe Viskosität von Bedeutung ist [18, 159, 160]. Eine Übersicht zu Charakteristika verschiedener Pflanzenölepoxyde ist in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11: Viskosität und Schmelzpunkt verschiedener Pflanzenölepoxyde in Zusammenhang mit Jodzahl und Epoxidsauerstoffgehalt (OO).**

Epoxid	Jodzahl (g Jod/100 g)	OO (%)	$\eta$ (mPa*s) (T (°C))	Schmelzpunkt (°C)	Ref.
<i>Vernonia galamensis</i> Öl, natürlich	86	3,8-4,1	112 (25)	10,8	[18, 159]
Sonnenblumen- /Leinöl-Epoxid (3:1), enzymatisch	92	3,8	143 (20)	-	[18]
Soja-/Leinöl-Epoxid (3:1), enzymatisch	81	4,0	108 (20)	-	[18]
Rapsöl-Epoxid	4,1	4,9	83,4 (40)	-12 <sup>1</sup>	[161]
Sojaöl-Epoxid	-	7,0	445 (25)	-10,2	[20, 159]
<i>Vernonia galamensis</i> Öl- Epoxid, chemisch	-	8,2	fest (25)	32,3	[159]
Leinöl-Epoxid	-	8,9	1470 (25)	-8,2	[159]

<sup>1</sup>Angegeben als Stockpunkt (*pour point*)

Rüsch gen. Klaas und Warwel konnten die Viskosität des natürlich vorkommenden epoxidierten Öls aus *Vernonia galamensis* (112 mPa\*s) durch eine partielle Epoxidierung von Gemischen aus Sonnenblumen- und Leinöl (143 mPa\*s) oder Soja- und Leinöl (108 mPa\*s) näherungsweise nachahmen, indem sie epoxidierte Gemische mit vergleichbarer Jodzahl und ähnlichem Epoxidsauerstoffgehalt herstellten [18]. Carlson und Chang verglichen die Eigenschaften von chemisch epoxidiertem *Vernonia galamensis* Öl (EVO) mit denen von epoxidiertem Soja- (ESBO) und Leinöl (ELSO). Der erhöhte Schmelzpunkt von EVO im Vergleich zu ELSO und ESBO wurde auf dessen chemische Reinheit zurückgeführt, da sich EVO durch eine geringere Vielfalt an Triglyzeriden mit unterschiedlicher Anzahl an Epoxidgruppen auszeichnete. Außerdem wurde ein deutlicher Unterschied der Viskosität von ESBO und ELSO festgestellt [159].

In Tabelle 12 sind zum Vergleich Schmelzpunkte verschiedener Fettsäuren zusammengefasst, um den Einfluss von Kettenlänge und Gehalt an C=C-Doppelbindungen darzustellen. Gesättigte Fettsäuren haben einen höheren Schmelzpunkt als Ungesättigte. Der Schmelzpunkt steigt außerdem mit zunehmender Kettenlänge an. Im Gegensatz dazu erniedrigt sich die Schmelztemperatur bei gleicher Kettenlänge mit zunehmendem Gehalt an in natürlichen Fettsäuren üblicherweise vorkommenden *cis*-Doppelbindungen. So hat  $\alpha$ -Linolensäure den niedrigsten Schmelzpunkt der C18-Fettsäuren. Außerdem ist bekannt, dass zum Schmelzen gesättigter Fettsäuren mehr Energie benötigt wird [162].

**Tabelle 12: Schmelzpunkte verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren und der entsprechenden Triacylglyzeride [162, 163].**

Fettsäure	Schmelzpunkt - Fettsäure (°C)	Schmelzpunkt - Triacylglyzerid (°C)
Palmitinsäure (C16:0)	62,8	65,5
Stearinsäure (C18:0)	69,6	73,0
Ölsäure (C18:1)	16,3	5,5
Linolsäure (C18:2)	-5,2	-13,1
$\alpha$ -Linolensäure (C18:3)	-11,0	-24,2
Gadoleinsäure (C20:1)	24,5	n. v.
Behensäure (C22:0)	80,0	81,0
Erucasäure (C22:1)	34,7	n. v.

Untersuchungen der entsprechenden Triacylglyzeride haben einen ähnlichen Einfluss der Fettsäuren gezeigt, wobei für die Triglyzeride der gesättigten Fettsäuren jeweils ein minimal höherer Schmelzpunkt detektiert wurde als für die freie Fettsäure (siehe Tabelle 12). Im Gegensatz dazu war die Schmelztemperatur der Triglyzeride ungesättigter Fettsäuren im



---

Vergleich zur entsprechenden freien Säure geringer. Des Weiteren wird die Schmelztemperatur von der polymorphen Form, die durch unterschiedlich schnelles Abkühlen erzeugt wird, beeinflusst. Unterschieden wird zwischen  $\alpha$ ,  $\beta'$  und  $\beta$ -Form. Die instabilste Form mit dem niedrigsten Schmelzpunkt ist die  $\alpha$ -Form und wird durch sehr schnelles Abkühlen erhalten. In Tabelle 12 sind die Schmelzpunkte der stabilsten  $\beta$ -Form aufgeführt. Die dazwischenliegende  $\beta'$ -Form erhält man durch adäquates Abkühlen. Die  $\alpha$ -Form von Triolein hat einen Schmelzpunkt von  $-32\text{ °C}$  im Vergleich zu  $-12\text{ °C}$  in der  $\beta'$ -Form und  $5,5\text{ °C}$  in der stabilsten  $\beta$ -Form. Dieser Unterschied resultiert aus einer veränderten Packungsdichte und räumlichen Ausrichtung in den drei verschiedenen polymorphen Formen [163]. Auf Basis der Kenntnisse zum Schmelzverhalten verschiedener reiner Fettsäuren und Fettsäure-homogener Triglyzeride ist anzunehmen, dass verschiedene Fettsäuren das Schmelzverhalten von inhomogenen nativen Triglyzeriden in ähnlicher Weise beeinflussen.

#### 4.2.2 Epoxidierung von Fettsäure- und Dicarbonsäureestern

Die Epoxidierung von Fettsäuremethylestern kann aufgrund einer niedrigeren Viskosität des Substrates und einer im Vergleich zu epoxidierten Pflanzenölen ebenfalls geringeren Viskosität der Fettsäuremethylesterepoxyde sowohl aus prozess- als auch anwendungstechnischer Sicht vorteilhaft sein. Die niedrigere Viskosität kann eine Reduktion der eingesetzten Lösemittelmenge ermöglichen oder dessen Verwendung vermeiden. Eine Vermeidung des Lösemiteleinsatzes in großtechnischen Anlagen kann den Prozess deutlich erleichtern, weil sicherheitsrelevante Maßnahmen zum Explosionsschutz und zur Lösemittelrückgewinnung überflüssig werden [114]. Der Einsatz niedrigviskoser Epoxide ist beispielsweise bei der Anwendung als Reaktivverdünner von Vorteil [159, 160].

Epoxidierte Dicarbonsäureester stellen eine besondere Gruppe an Monomeren dar, die sich beispielsweise zur Herstellung von Polyestern eignen [164]. In Tabelle 13 werden Untersuchungen zur Epoxidierung verschiedener Fettsäuremethylester zusammengefasst. Einzelne Ansätze werden genauer erläutert, wobei auf den Einfluss des Lösemiteleinsatzes und die Wasserstoffperoxidzugabe eingegangen wird.

Tabelle 13: Lipase-katalysierte Epoxidation verschiedener Fettsäuremethylester und Dicarbonsäuredimethylester mit Novozym® 435.

Substrat	Reaktionsbedingungen						Umsatz <sup>a</sup> (%) Ausbeute <sup>b</sup> (%)	Ref.
	T (°C)	c <sub>0</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	t (h)	Molverhältnis (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :C=C)	Spez. Enzymmenge (mg mmol <sup>-1</sup> C=C)	Lösungs- mittel		
Ölsäure- methylester	23	0,5	24	1,1	20	Toluol	90 <sup>a</sup> (84 <sup>b,1</sup> , 6 <sup>b,2</sup> )	[114]
	50	2,9	6	1,1	20	-	100 <sup>a</sup> (75 <sup>b,1</sup> , 25 <sup>b,2</sup> )	[114]
Rapsöl- methylester	40	0,5	10-66	1,5	20	Toluol	95 <sup>a</sup> (68 <sup>b,1</sup> , 16 <sup>b,3</sup> , 4 <sup>b,4</sup> )	[17]
	40	3,0	6	1,1	11	-	90 <sup>a</sup>	[165]
Sonnenblumenöl- methylester	30	0,4	16	2,0	20	DCM <sup>5</sup>	99 <sup>a</sup>	[166]
Tallöl- methylester	40	2,9	12	1,1	9	-	82 <sup>a</sup>	[165]
Sojaöl- methylester	55	0,5	12	2,8	6	Toluol	89 <sup>b</sup>	[167]
	55,4	0,5	7,3	2,93	7,6	Toluol	83 <sup>b</sup>	[168]
Δ <sup>9</sup> -Octadecen-1,18- dimethylester	RT	0,5	72	1,5	20	Methyl- acetat	99 <sup>b</sup>	[164]

<sup>RT</sup>Raumtemperatur; <sup>1</sup>9,10-Epoxyoctadecansäuremethylester (Epoxyoctadecansäuremethylester, EME); <sup>2</sup>9,10-Epoxyoctadecansäure (Epoxyoctadecansäure, ESA); <sup>3</sup>9,10-12,13-Diepoxyoctadecansäuremethylester, <sup>4</sup>9,10-12,13-15,16-Trieпоxyoctadecansäuremethylester, <sup>5</sup>Dichloromethan (DCM), <sup>6</sup>9,10-Dihydroxyoctadecansäure.

Orellana-Coca *et al.* untersuchten den Einfluss des Lösemiteleinsatzes auf die Epoxidierung von Ölsäuremethylester (OA-ME) und das dabei erhaltene Produktspektrum (siehe Tabelle 13). Hohe OA-ME-Umsätze zu Epoxystearinsäuremethylester (EME) und freier Epoxystearinsäure (ESA) konnten sowohl im lösemittelfreien als auch im Toluol-gelösten Ansatz erzielt werden. Interessanterweise konnten Orellana-Coca *et al.* deutliche Unterschiede bei der Bildung von ESA zeigen. Während das Reaktionsprodukt bei der lösemittelfreien Umsetzung bei 50 °C aus 75 % EME und 25 % ESA bestand, konnte bei der Reaktion in Toluol (0,5 M OA) bei Raumtemperatur mit 84 % EME und 6 % ESA eine deutlich höhere Selektivität erreicht werden [114].

Rüsch gen. Klaas und Warwel untersuchten die Epoxidierung von OA-ME in Methylacetat (MeAc) in einem kontinuierlich betriebenen Festbettreaktor mit Novozym® 435 als Katalysator. Dabei konnten Umsätze von 75 % mit Ausbeuten im Bereich von 80 % über einen Betriebszeitraum von vier Monaten erzielt werden. Nach diesem Betriebszeitraum zeigte der Katalysator interessanter Weise noch 86 % seiner anfänglichen Aktivität [169]. Neben der Epoxidierung von OA-ME untersuchten Rüsch gen. Klaas und Warwel auch die Epoxidierung von Rapsölmethylester (RSO-ME) und konnten 95 % Umsatz erlangen [17]. Hagström *et al.* betrachteten die Umsetzung von RSO-ME in einem lösemittelfreien Reaktionssystem mit dem Fokus auf der Wasserstoffperoxidzugabe. Die spezifische Produktausbeute konnte auf bis zu 76 Gramm RSO-ME-Epoxid pro Gramm Katalysator gesteigert werden, indem die Wasserstoffperoxidkonzentration durch eine kontrollierte Zuführung im Reaktor konstant auf 1,5 M reguliert wurde [170]. Im Vergleich zu den Untersuchungen von Hagström *et al.* konnten Törnvall *et al.* bei der lösemittelfreien Umsetzung vom RSO-ME mit reduziertem Enzymeinsatz und 10 % stöchiometrischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Überschuss nach sechs Stunden Inkubation bei 40 °C 90 % Umsatz erzielen (siehe Tabelle 13). In einem ähnlichen Ansatz mit Tallölfettsäuremethylestern (TO-ME) erhielten Törnvall *et al.* nach 12 Stunden einen Umsatz von 82 % [165]. Schneider *et al.* analysierten den Einfluss der Zugabe von Oktansäure auf die Epoxidierung von Sonnenblumenölmethylester (SFO-ME) in Dichlormethan (DCM) als Lösemittel. Dabei konnten Schneider *et al.* im zweiphasigen Reaktionssystem mit DCM und Oktansäure einen Umsatz >90 % zeigen (siehe Tabelle 13) [166]. Lu *et al.* untersuchten den Einfluss der Zugabe von gesättigten Carbonsäuren mit einer Kettenlänge von C2 bis C22 auf die Epoxidierung von Sojaölmethylester (SBO-ME) in Toluol. Es wurde eine zunehmende Epoxidierungsrate mit zunehmender Kettenlänge der zugegebenen Carbonsäure gezeigt. Im Gegensatz dazu ging der Umsatz mit zunehmender Anzahl an C=C-Doppelbindungen bei gleichbleibender Kettenlänge vermutlich aufgrund zunehmender sterischer Hinderung zurück. Eine zusätzliche Hydroxylgruppe in der Kohlenstoffkette, wie sie beispielsweise in Rizinolsäure vorliegt, führt zu einer noch stärkeren Hinderung der Epoxidierungsreaktion [167]. Die enzymatische

---

Epoxidierung ungesättigter Dicarbonsäuredimethylester in Methylacetat wurde von Warwel *et al.* mit Novozym® 435 gezeigt [164].

#### 4.2.3 Epoxidierung von freien Fettsäuren

Epoxidierte Fettsäuren können zur Herstellung biobasierter Polyester eingesetzt werden [145, 171]. Bei der Herstellung dieser Fettsäureepoxide ist zu beachten, dass sowohl die Fettsäuren als auch die Epoxyfettsäuren höhere Schmelzpunkte als die entsprechenden Methylester oder Triglyzeride haben. Daher sollte die Epoxidierung von freien Fettsäuren entweder unter Einsatz von Lösemitteln oder bei einer erhöhten Reaktionstemperatur durchgeführt werden, um ein Festwerden des Reaktionsansatzes zu vermeiden [10, 114, 162, 165, 172]. In Tabelle 14 sind verschiedene in der Literatur beschriebene Ergebnisse zur chemo-enzymatischen Epoxidierung freier ungesättigter Fettsäuren zusammengefasst.

Warwel und Rüschen gen. Klaas untersuchten die chemo-enzymatische Epoxidierung verschiedener ungesättigter Carbonsäuren mit Kohlenstoffkettenlängen im Bereich von C7 bis C18. Unter Verwendung der immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* und Toluol als Lösungsmittel konnten ausgehend von Öl-, Petroselin-, Rizinol- und Linolsäure Epoxid- ausbeuten im Bereich von 72 bis 83 % nach 16 h Inkubation bei Raumtemperatur erzielt werden. Carbonsäuren mit einer mittleren Kettenlänge von 10 bis 14 C-Atomen und terminaler Doppelbindung waren deutlich schwieriger umzusetzen. Epoxidausbeuten zwischen 61 und 68 % konnten durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 40 °C und eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 h erreicht werden. Im Zusammenhang mit der Epoxidierung der C10- bis C14-Fettsäuren mit terminaler Doppelbindung konnten Warwel und Rüschen gen. Klaas weiterhin zeigen, dass niedrigere Umsatzraten bei diesen Edukten neben einer geringeren Reaktivität der terminalen Doppelbindung auch auf eine niedrigere Persäurebildungsrate, ausgehend von den entstehenden  $\omega$ -Epoxy-carbonsäuren, zurückzuführen sind.  $\alpha,\beta$ - ungesättigte Fettsäuren konnten in Übereinstimmung mit entsprechenden Ansätzen mittels der klassischen Prileschajew-Reaktion nur mit geringen Epoxidausbeuten umgesetzt werden, wobei Warwel und Rüschen gen. Klaas durch einen kombinierten Ansatz mit 1-Octen zeigen konnten, dass die Lipase auch aus  $\alpha,\beta$ - ungesättigten Fettsäuren entsprechende Persäuren bilden kann. Interessanter Weise konnte bei der enzymatischen Umsetzung von 6-Heptensäure keine Bildung der entsprechenden  $\omega$ -Epoxyheptensäure beobachtet werden, obwohl das Edukt nach Inkubation nicht mehr nachweisbar war [113].

Tabelle 14: Lipase-katalysierte Epoxidation verschiedener Fettsäuren mit der auf Acrylharz immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* (Novozym® 435).

Substrat	Reaktionsbedingungen						Umsatz <sup>a</sup> (%) Ausbeute <sup>b</sup> (%)	Ref.
	T (°C)	c <sub>0</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	t (h)	Molverhältnis (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :C=C)	Spezifische Enzymmenge (mg mmol <sup>-1</sup> C=C)	Lösungs- mittel		
13-Tetradecensäure	40	0,5	72	1,5	20	Toluol	68 <sup>b</sup>	[113]
6-Octadecensäure	RT	0,5	16	1,5	20	Toluol	77 <sup>b</sup>	[113]
12-(R)-Hydroxy-9-Octa- decensäure (Rizinolsäure)	RT	0,5	16	1,5	20	Toluol	78 <sup>b</sup>	[113]
9,12-Octadecadiensäure (Linolsäure)		0,25	16	1,5	20	Toluol	83 <sup>b</sup>	[113]
	RT	0,32	16	1,5	3	Aceton	92,4 <sup>a,1</sup>	[173]
		0,5	24	1,8	10	Toluol	93 <sup>a</sup>	[171]
	n.v.	0,5	22	1,2	10	Toluol	100 <sup>a</sup> (40 <sup>a,3</sup> , 60 <sup>a,4</sup> )	[174]
	30	0,5	8	4,0	10	Toluol	100 <sup>a</sup>	[172]
9,12,15-Octadecatriensäure (α-Linolensäure)	RT	0,5	24	1,2	6,7	Toluol	88 <sup>a</sup>	[171]
	n.v.	0,5	10	1,1	13,3	Toluol	100 <sup>a</sup> (20 <sup>a,5</sup> , 50 <sup>a,6</sup> , 30 <sup>a,7</sup> )	[174]
Wiesenschaumkraut- Fettsäuren	20 – 45	1,6	n.v.	1,25	13	Toluol	80 <sup>b</sup>	[175]
	20 – 45	1,6	n.v.	1,25	13	DCM <sup>2</sup>	98 <sup>b</sup>	[175]

n.v. nicht verfügbar; <sup>RT</sup>Raumtemperatur; <sup>1</sup>Umsatz berechnet auf Basis des gemessenen Epoxidsauerstoffgehalts; <sup>2</sup>Dichloromethan (DCM); <sup>3</sup>Monoepoxyoctadecensäure; <sup>4</sup>Diepoxyoctadecensäure; <sup>5</sup>Monoepoxyoctadecadiensäure; <sup>6</sup>Diepoxyoctadecensäure; <sup>7</sup>Triepoxyoctadecensäure

---

Orellana-Coca *et al.* entwickelten eine HPLC-Methode zur schnellen Quantifizierung unterschiedlicher Fettsäureepoxide. Mit der eingesetzten C18-Umkehrphasen-Säule waren Orellana-Coca *et al.* in der Lage, freie ungesättigte und epoxidierte Fettsäuren nach Anzahl und Position der Doppelbindung oder der Oxiran-Gruppe zu trennen und mittels Lichtstreuendetektor (Evaporative Light Scattering Detector - ELSD) zu quantifizieren. Die eingesetzten Fettsäureepoxidderivate wurden mit Hilfe der enzymatischen Epoxidierung mit Novozym® 435 aus den entsprechenden freien Fettsäuren hergestellt. Die maximal erzielten Umsätze, ausgehend von Öl-, Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure, sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

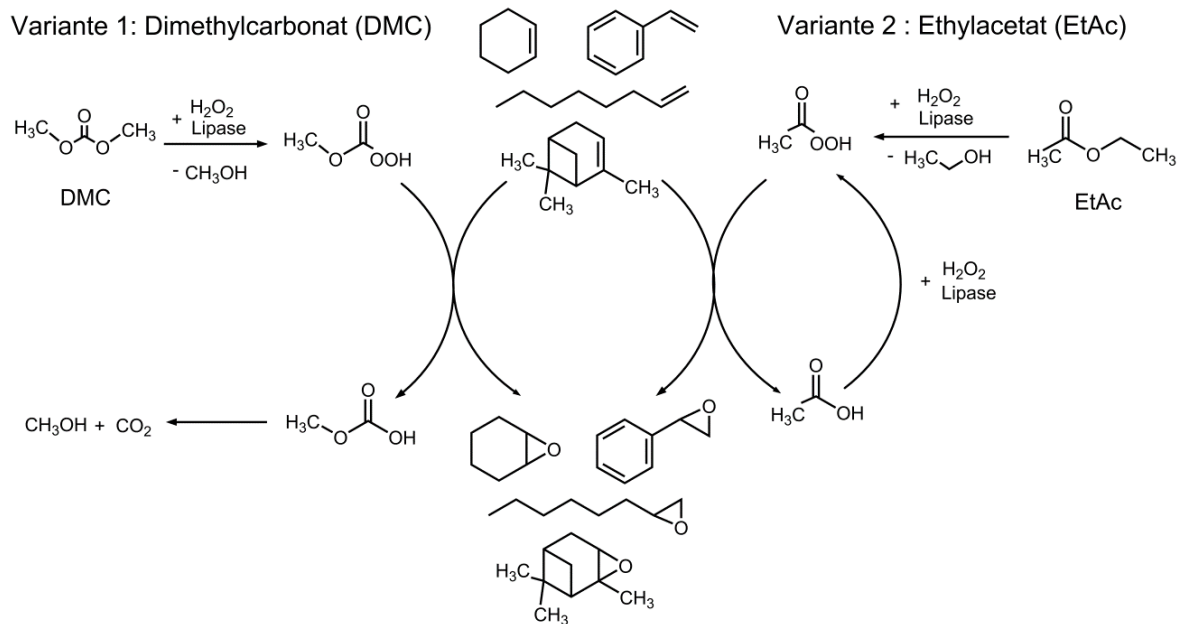
Im Zusammenhang mit der Entwicklung der HPLC-Methode konnten Orellana-Coca *et al.* außerdem zeigen, dass bei der enzymatischen Epoxidierung von Linolsäure keine Präferenz zwischen der 9,10- und 12,13-Doppelbindung zu beobachten ist, während bei der Umsetzung von  $\alpha$ -Linolensäure zuerst die Doppelbindungen in Position 9,10 und 15,16 epoxidiert werden. [174]

Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte die Epoxidierung von Linolsäure in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessparameter, wie beispielsweise Wasserstoffperoxidzugabe und Reaktionstemperatur. Hohe Umsätze konnten bis zu einer Linolsäurekonzentration von 2 Mol pro Liter bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C erzielt werden, während eine lösemittelfreie Umsetzung zur Diepoxyoctadecensäure (Schmelzpunkt 78 °C) nur bei 60 °C mit hohen Ausbeuten möglich war [172]. Ähnliche Ergebnisse wurden von Orellana-Coca *et al.* bei der lösemittelfreien Epoxidierung von Ölsäure publiziert. Dabei waren hohe Ausbeuten an Epoxyoctadecensäure (Schmelzpunkt 57 °C) bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C möglich [114]. Neben Toluol konnte auch Aceton erfolgreich als Lösungsmittel zur Epoxidierung von Linolsäure eingesetzt werden. Kudanga *et al.* erzielten bis zu 93% Epoxidausbeute bei der Enzym-katalysierten Umsetzung von 0,32 M Linolsäure in Aceton mit Novozym® 435 innerhalb von 16 h (siehe Tabelle 14) [173]. Abdullah *et al.* nutzten die statistische Versuchsplanung in Form der *response surface methodology* (RSM) zur Optimierung der Herstellung von 9(12)-10(13)-Monoepoxy-12(9)-octadecensäure (MEOA) und betrachteten dabei Enzymmenge, Wasserstoffperoxidmenge und Reaktionszeit als kritische Einflussfaktoren. Im Optimum konnten dabei Ausbeuten von ungefähr 89 % Monoepoxyoctadecensäure erzielt werden [176]. Uyama *et al.* erzielten in einem vergleichbaren Reaktionsansatz mit 0,5 M Linolsäure in Toluol bei Raumtemperatur und einem Überschuss an Wasserstoffperoxid von 1,8 Mol pro Mol Doppelbindung einen Umsatz von 93 % (siehe Tabelle 14) [171]. Frykman und Isbell untersuchten die Epoxidierung von Wiesenschaumkrautfettsäuren (64 % 5-Eicosen-, 19 % 5,13-Docosadien-, 3 % 5-Docosen- und 13 % Erucasäure) mit Novozym® 435 und Dichlormethan als Lösemittel und erreichten 98 % der theoretisch maximalen Epoxidausbeute (siehe Tabelle 14). In einem alternativen Ansatz mit Toluol konnten Frykman und Isbell aufgrund der

Bildung von 6-Hydroxy- $\delta$ -Lactonen (12 %) und Diolen (3 %) lediglich eine Epoxidausbeute von 80 % erreichen (siehe Tabelle 14) [175]. Törnvall *et al.* erzielten unter Einsatz von Novozym® 435 in einer lösemittelfreien Umsetzung von Tallölfettsäuren bei 40 °C eine Epoxidausbeute von 80 % in der ausgefallenen Fraktion und 69 % in der flüssigen Phase. Die Wasserstoffperoxidzugabe erfolgte kontinuierlich [165].

#### 4.2.4 Epoxidierung von Alkenen

Die Lipase-katalysierte Bildung von Percarbonsäuren kann auch zur Epoxidierung von Alkenen eingesetzt werden. Alkenoxide können mit Hilfe weiterer Reaktionsschritte unter Öffnung des Epoxidringes beispielsweise zur Herstellung von Tensid-ähnlichen Strukturen eingesetzt werden [177-179]. Im Vergleich zur Epoxidierung von Fettsäuren oder Fettsäurederivaten muss dem Reaktionsansatz bei der Lipase-katalysierten Umsetzung von Alkenen zu Alkenoxiden zusätzlich eine Carbonsäure oder ein Carbonsäureester zugesetzt werden. Der Zusatz ist nötig, damit die Lipase die zur Epoxidierung nötige Persäure aus Carbonsäure und Wasserstoffperoxid bilden kann. Zur Bereitstellung dieser Carbonsäurefunktion sind verschiedene Ansätze in der Literatur beschrieben. Die erste Möglichkeit besteht darin, einer Lösung aus Edukt und organischem Lösemittel eine gesättigte Carbonsäure zuzusetzen und die Umsetzung dieser Carbonsäure mit Wasserstoffperoxid zur Percarbonsäure durch Zugabe der Lipase zu katalysieren. Ein häufig genutztes System besteht aus einer Mischung aus Alken, Oktansäure und Hexan als Lösemittel [16, 106, 180]. In einigen Ansätzen kann das Alken auch ohne Zugabe eines Lösemittels epoxidiert werden [106]. Zwei alternative Ansätze sind in Abbildung 19 dargestellt. Dabei dienen speziell ausgewählte Lösemittel, wie beispielsweise Ethylacetat oder Dimethylcarbonat (DMC), als Acyldonor für die Lipase-katalysierte Persäurebildung [181-183]. Die in Abbildung 19 dargestellten Varianten zur Epoxidierung von Alkenen bieten im Vergleich zu der Variante mit organischem Lösemittel und Zugabe einer Carbonsäure den Vorteil, dass die Zugabe einer zusätzlichen Komponente als Acyldonor zum Reaktionsansatz vermieden werden kann. Durch die Verwendung von Dimethylcarbonat (DMC) als Cosubstrat zur Bildung eines Persäuremoleküls wird außerdem die Akkumulation freier Carbonsäuren im Reaktionsansatz vermieden, weil der bei der Umsetzung von DMC entstehende Kohlensäuremonomethylester in Methanol und Kohlenstoffdioxid zerfällt. Dadurch können auch Säure-sensitive Moleküle erfolgreich epoxidiert werden [182]. In Tabelle 15 sind einige Ansätze zur Epoxidierung von linearen terminalen oder internen Alkenen zusammengestellt. Die einzelnen Ansätze sind nach der Kettenlänge des verwendeten Alkens sortiert.



**Abbildung 19: Epoxidierung verschiedener Alkene unter Einsatz verschiedener Cosubstrate zur Bildung einer aktivierten Persäure.**

**Variante 1: Dimethylcarbonat mit Lipase-katalysierter Bildung von Monomethylperkohlsäure und anschließendem Zerfall zu Methanol und Kohlenstoffdioxid. Variante 2: Ethylacetat und Lipase-katalysierte Bildung von Peressigsäure und Ethanol mit möglicher Wiederverwendung von Essigsäure, modifiziert nach [181-183].**

Bei der Umsetzung von Alkenen spielt neben der notwendigen Zugabe eines Cosubstrates vor allem die Reaktivität des Eduktes eine große Rolle. Die Epoxidierung terminaler Alkene ist langsamer als die von Alkenen mit interner Doppelbindung [181]. Aufgrund dessen werden zur Umsetzung terminaler Alkene längere Inkubationszeiten oder erhöhte Reaktionstemperaturen verwendet, wie in Tabelle 15 zusammenfassend dargestellt ist. Bei der Epoxidierung von 0,1 M 1-Octen in Dimethylcarbonat (DMC) wurde nach 16 h bei 40 °C beispielsweise eine Ausbeute von 67 % erreicht, während für 4-Octen bei 20 °C und sonst gleichen Bedingungen bereits 92 % erzielt wurden. Ein entsprechender Effekt wurde auch beim Vergleich der Umsetzung von 1-Tetradecen und 7-Tetradecen in DMC beobachtet. Auch bei der Verwendung von Ethylacetat als Cosubstrat werden terminale Alkene langsamer umgesetzt als die entsprechenden internen Alkene [181, 182].



Tabelle 15: Lipase-katalysierte Epoxidation verschiedener Alkene mit der auf Acrylharz immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* (Novozym® 435).

Substrat	Reaktionsbedingungen							Umsatz <sup>c</sup> (%) Ausbeute <sup>d</sup> (%)	Ref.
	T (°C)	c <sub>0</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	t (h)	Molverhältnis (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :C=C) aq. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>a</sup> , UHP <sup>b,1</sup>	Spez. Enzymmenge (mg mmol <sup>-1</sup> C=C)	Sauerstoff- überträger	Lösungs- mittel		
1-Hexen	27	0,67	161	1,1 <sup>b</sup>	50	Ethylacetat	Ethylacetat	73 <sup>d</sup>	[183]
	50	n.v.	24	1,5 <sup>a</sup>	13	Tetradecansäure	-	73 <sup>d</sup>	[106]
1-Octen	40	0,1	16	5 <sup>a</sup>	200	DMC <sup>2</sup>	DMC <sup>2</sup>	67 <sup>d</sup>	[182]
	27	0,67	46	1,1 <sup>b</sup>	50	Ethylacetat	Ethylacetat	85 <sup>d</sup>	[183]
4-Octen	20	0,1	16	5 <sup>a</sup>	200	DMC <sup>2</sup>	DMC <sup>2</sup>	92 <sup>d</sup>	[182]
	20	0,1	24	1,5 <sup>a</sup>	20	Ethylacetat	Ethylacetat	94 <sup>d</sup>	[181]
1-Nonen	35	0,06	12	7,3 <sup>a</sup>	27	Phenyllessigsäure	Chloroform	90	[184]
1-Decen	50	n.v.	24	1,5 <sup>a</sup>	13	Tetradecansäure	-	82 <sup>d</sup>	[106]
1-Dodecen	50	n.v.	24	1,5 <sup>a</sup>	13	Tetradecansäure	-	79 <sup>d</sup>	[106]
1-Tetradecen	50	n.v.	24	1,5 <sup>a</sup>	13	Tetradecansäure	-	85 <sup>d</sup>	[106]
	40	0,1	16	5 <sup>a</sup>	200	DMC <sup>2</sup>	DMC <sup>2</sup>	69 <sup>d</sup>	[182]
	40	0,1	16	5 <sup>a</sup>	100	Ethylacetat	Ethylacetat	71 <sup>d</sup>	[181]
7-Tetradecen	20	0,1	16	5 <sup>a</sup>	200	DMC <sup>2</sup>	DMC <sup>2</sup>	100 <sup>d</sup>	[182]
	20	0,1	24	1,5 <sup>a</sup>	20	Ethylacetat	Ethylacetat	90 <sup>d</sup>	[181]
1-Hexadecen	50	n.v.	24	1,5 <sup>a</sup>	13	Tetradecansäure	-	80 <sup>d</sup>	[106]

n.v. nicht verfügbar, <sup>1</sup>Harnstoff-Wasserstoffperoxid (Urea hydrogen peroxide, UHP), <sup>2</sup>Dimethylcarbonat (DMC)

---

### 4.3 Methoden zur Epoxidierung verschiedener Pflanzenöl-basierter Molekülgruppen

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Auslegung von Verfahren zur enzymatischen Epoxidierung verschiedener aus Pflanzenölen gewinnbarer Molekülgruppen. Für unterschiedliche ausgewählte Substrate, wie beispielsweise Triglyzeride, Fettsäure-methylester oder freie Fettsäuren, sind verschiedene Prozessparameter von übergeordneter Bedeutung. Nachfolgend wird die Methodik zur Charakterisierung und Umsetzung ausgewählter Pflanzenölderivate vorgestellt.

#### 4.3.1 Methoden zur Charakterisierung verschiedener Pflanzenöle und Pflanzenölepoxide

Die Fettsäurezusammensetzung verschiedener Pflanzenöle wurde mittels GC-FID-Methode (siehe Anhang, Kapitel 8.3.4) bestimmt, um die Experimente auslegen zu können. Zur weiteren Charakterisierung der eingesetzten Pflanzenöle wurden die Jodzahlen jeweils von einer Stammlösung mit bereits zugesetzter freier Fettsäure nach DIN EN ISO 3961:1999 bestimmt (siehe Anhang, Abschnitt 8.3.3) [185]. Die einzelnen Experimente zur Epoxidierung der verschiedenen Pflanzenöle und Fettsäurederivate wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (siehe Anhang, Kapitel 8.3.2), sowie der titrimetrischen Bestimmung des Epoxidsauerstoffgehaltes untersucht (siehe Anhang, Kapitel 8.3.5). Zur weiteren Charakterisierung der ausgewählten Pflanzenöle und der enzymatisch hergestellten Pflanzenölepoxide wurde die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (siehe Anhang, Kapitel 8.3.6), rheologische Messmethoden (siehe Anhang, Kapitel 8.3.8) und die dynamische Differenzkalorimetrie (siehe Anhang, Abschnitt 8.3.9) eingesetzt.

#### 4.3.2 Untersuchung des Einflusses von Temperatur, Zeit, Enzym- und Lösemittelmenge auf die Epoxidierung von $\alpha$ -Linolensäure- und Erucasäure-reiche Triglyzeride

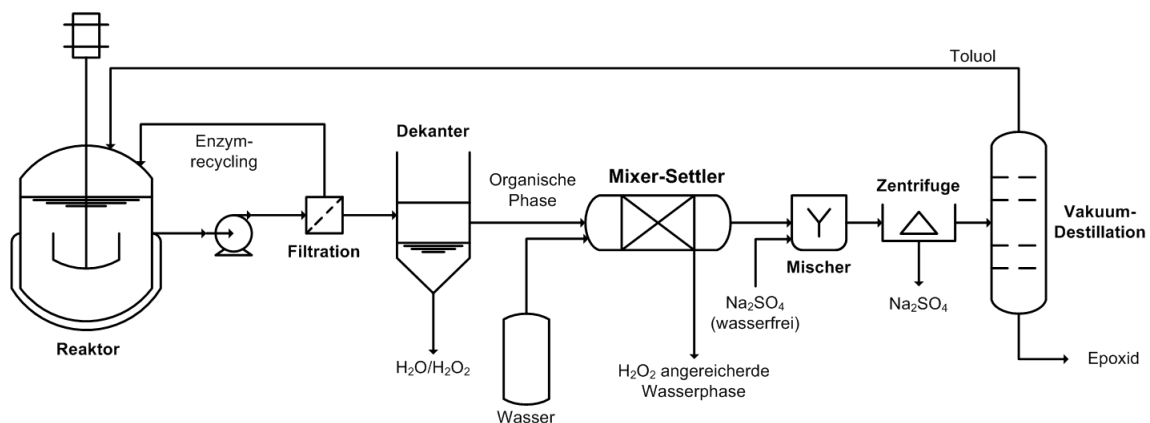
Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Prozessparameter auf die chemoenzymatische Epoxidierung von Drachenkopfföl ( $\alpha$ -Linolensäure-reich) und Senföl (Erucasäure-reich) wurde mit Hilfe der Software Design-Expert® ein statistischer Versuchsplan erstellt. Als Einflussfaktoren wurden die Enzym- und Lösemittelmenge, die Temperatur und die Reaktionszeit definiert. Der Versuchsraum wurde wie folgt begrenzt:

- Enzymmenge: 5 bis 10 Gramm pro Mol Doppelbindung.
- Reaktionstemperatur: 30 bis 50 °C
- Reaktionszeit: 6 bis 18 h
- Lösemittelmenge: 25 bis 75 Gewichtsprozent bezogen auf die Gesamtmasse der organischen Phase.

Als Versuchsdesign wurde ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan mit vier Einflussfaktoren auf zwei Faktorstufen gewählt. Der Plan sieht neben dem Zentralpunkt sogenannte Sternpunkte vor, bei denen ein Faktor bei sonst mittleren Einstellungen der drei verbleibenden Einflussgrößen außerhalb des eigentlichen Versuchsraumes variiert wird. Erstellt wurde der Versuchsplan mit Design-Expert® 7.1.5. Der vollständige Versuchsplan mit 27 Einzelexperimenten ist in Abschnitt 4.4.2.2 (siehe Tabelle 17) zusammen mit den experimentellen Ergebnissen dargestellt und wurde für Senf- und Drachenkopföl angewandt.

Als Substrat wurden Drachenkopf- und Senföl jeweils mit fünf Stoffmengenprozent technischer Ölsäure (bezogen auf die Molmenge an C=C-Doppelbindungen) eingesetzt, um der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Bildung von Di- und Monoglyzeriden durch die Fettsäureabspaltung vorzubeugen. Die Menge an 30 %-iger wässriger Wasserstoffperoxidlösung wurde so angepasst, dass pro Mol vorhandener Doppelbindungen im Substrat zwei Mole Wasserstoffperoxid zur Verfügung stehen. Damit wird eine Limitierung der Reaktion durch Wasserstoffperoxidmangel ausgeschlossen. Die einzelnen Experimente wurden in 50 mL Weithalskolben mit Zentrifugalrührer bei 450 rpm durchgeführt und mit einer geregelten Heizplatte auf die entsprechende Temperatur gebracht. Als Katalysator wurde die immobilisierte Lipase B aus *C. antarctica* (Novozym® 435, Novozymes A/S) eingesetzt.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das immobilisierte Enzym mittels Filtration abgetrennt, die wässrige Wasserstoffperoxidphase mittels Zentrifugation separiert, anschließend entnommen und die verbleibende organische Phase dreimal mit gleichen Volumina an vollentsalztem Wasser gewaschen. Das Gemisch wurde zwischen den einzelnen Waschschrritten bei 4500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und die wässrige Phase erneut entnommen.



**Abbildung 20: Schema der Produktaufbereitung nach der enzymatischen Epoxidierung von Pflanzenölen.**

Anschließend wurde die organische Phase mit 10 Gew. % wasserfreiem Natriumsulfat für eine Stunde getrocknet. Das Natriumsulfat wurde durch Zentrifugieren bei 4500 rpm für fünf Minuten von der flüssigen Phase getrennt, der Überstand abgenommen und das Sediment

verworfen. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer unter Vakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 60 °C und einem minimalen Vakuum von 50 mbar abgetrennt. Die beschriebenen Aufreinigungsschritte sind in Abbildung 20 schematisch dargestellt.

#### 4.3.3 Vorhersagemodelle zur enzymatischen Epoxidierung von $\alpha$ -Linolensäure- und Erucasäure-reichen Triglyzeriden

Zur Beschreibung des Einflusses von Lösemittelmenge, Enzymmenge, Reaktionstemperatur und Inkubationszeit auf die Epoxidierung zweier nicht-konventioneller Pflanzenöle wurde ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan mit Hilfe der Software Design Expert® 7.1.5 erstellt (siehe Abschnitt 4.3.2). Die generelle Formel zur Beschreibung einer Zielgröße in Abhängigkeit von vier unabhängigen Variablen ist in Formel 1 aufgeführt.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 (\beta_i \times X_i) + \sum_{i=1}^4 (\beta_{i,i} \times X_i^2) + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 (\beta_{i,j} \times X_i \times X_j) \quad \text{Formel 1}$$

Die zu beschreibende Zielgröße Y ist der Epoxidsauerstoffgehalt.  $\beta_0$  ist eine Konstante,  $b_i$  sind Koeffizienten der linearen Terme,  $b_{i,i}$  Koeffizienten der quadratischen Terme,  $b_{i,j}$  Koeffizienten der Wechselwirkungsterme und  $X_i$  beziehungsweise  $X_j$  die unabhängigen Variablen [156, 186]. Eine multiple Regressionsanalyse und eine Varianzanalyse (ANOVA) zur Untersuchung der Signifikanz und Eignung der erhaltenen Beschreibungsmodelle wurde ebenfalls mit Design Expert® durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  wurde eingesetzt, um die Anpassung des polynomischen Modells an die experimentellen Daten zu evaluieren. F-Test und t-Test wurden zur Prüfung der Signifikanz der Regressionskoeffizienten verwendet.

#### 4.3.4 Umsetzung verschiedener Pflanzenöle

Die Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle erfolgte in einem 250 mL Rundkolben mit Schikane und zwei Seitenstützen. Der Reaktor wurde für 24 h bei einer Temperatur von 35 °C und einer Drehzahl von 450 rpm mit einem Schrägblattrührer inkubiert.

Dem jeweiligen Pflanzenöl wurden fünf Stoffmengenprozent pro Mol C=C-Doppelbindung einer 90%igen technischen Ölsäure zugesetzt. Das Öl wurde in Toluol gelöst, so dass die Toluolmasse 60 Gew. % der organischen Phase betrug. Zur organischen Phase wurden 7,5 g pro Mol C=C-Doppelbindung der auf Polyacrylharz immobilisierten Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym® 435, Novo Nordisk) gegeben. Nachdem die Kolben für etwa 5 min temperiert wurden, wurde die Reaktion durch Zugabe von 30%iger  $H_2O_2$ -Lösung gestartet, wobei deren Menge so berechnet ist, dass pro C=C-Doppelbindung zwei Moleküle  $H_2O_2$

---

vorhanden waren. Reaktionsabbruch und Produktaufarbeitung erfolgten wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben. Die Reaktionsansätze wurden mit Hilfe der titrimetrischen Epoxidsauerstoffbestimmung nach Abschnitt 8.3.5 analysiert.

#### 4.3.5 Untersuchung des Einflusses verschiedener Wasserstoffperoxidzugabevarianten auf die Stabilität von Novozym® 435 bei der Epoxidierung von Sojaöl

Die Methode zur Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle wurde in Abschnitt 4.3.4 beschrieben. Zur Untersuchung des Einflusses der Wasserstoffperoxidzugabe auf die Stabilität von Novozym® 435 wurden Experimente mit Sojaöl als industriell bedeutendstes Substrat zur Herstellung Pflanzenöl-basierter Epoxide durchgeführt. Hierbei wurde die in Abschnitt 4.3.4 beschriebene Methode hinsichtlich der Wasserstoffperoxidzugabe variiert. Wasserstoffperoxid wurde mit 10 % stöchiometrischem Überschuss bezogen auf die umzusetzende Menge an C=C-Doppelbindungen zugegeben. Die Reaktionstemperatur betrug 40 °C.

In einem Experimentenblock wurde die gesamte Wasserstoffperoxidmenge zum Reaktionsbeginn einmalige als 30%ige wässrige Lösung zugeführt. Bei den weiteren Versuchsreihen wurden zum Start der Reaktion 5 Mol % der Gesamtwasserstoffperoxidmenge als 10%ige wässrige Wasserstoffperoxidlösung zugegeben. Die restliche Wasserstoffperoxidmenge wurde folgendermaßen konstant mittels Schlauchpumpen zudosiert:

- als 30%ige wässrige Wasserstoffperoxidlösung über 12 h
- als 30%ige wässrige Wasserstoffperoxidlösung über 19 h
- als 15%ige wässrige Wasserstoffperoxidlösung über 21 h

Alle Untersuchungen zur Stabilität erfolgten in Doppelbestimmung. Die Probenahme erfolgte nach 4, 8, 12 und 24 h. Analysiert wurden die Proben mittels titrimetrischer Bestimmung des Epoxidsauerstoffgehaltes (siehe Kapitel 8.3.5).

#### 4.3.6 Enzymatische Epoxidierung von Fettsäuremethylestern, freien Fettsäuren, Dicarbonsäuren und Alkenen mit Novozym® 435

##### *Epoxidierung freier Fettsäuren*

Die Lipase-katalysierte Epoxidierung wurde für Öl-, Linol-,  $\alpha$ -Linolen- und Erucasäure als technische Fettsäuren und verschiedene Tallölfettsäurefraktionen untersucht. Dazu wurden die immobilisierte Lipase B aus *C. antarctica* (Novozym® 435) verwendet. Die Reaktion erfolgte in 50 mL Rundkolben unter Rühren mit einem Zentrifugalrührer bei 450 rpm. Die Konzentration der einzelnen Fettsäure betrug 1,5 Mol L<sup>-1</sup>. Als Lösungsmittel kam Toluol zum Einsatz.

Wasserstoffperoxid wurde als 30 Gew. % wässrige Lösung im Verhältnis von 1,1 Mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  pro Mol C=C-Doppelbindung einmalig zu Reaktionsbeginn zugegeben. Das immobilisierte Enzym wurde mit  $10 \text{ g Mol}^{-1}$  C=C-Doppelbindungen dosiert. Die Umsetzung von Öl-, Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure erfolgte bei einer Temperatur von  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Zur Umsetzung von Erucasäure wurde die Temperatur auf  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  erhöht. Die Reaktionszeit betrug jeweils 24 Stunden. Alle Ansätze wurden dreifach durchgeführt. Die Epoxidausbeute wurde jeweils nach Abtrennung des Lösemittels für eine Inkubationszeit von 24 h durch titrimetrische Bestimmung des Epoxidsauerstoffgehaltes ermittelt.

#### *Epoxidierung von Ölsäuremethylester und Rückveresterung hergestellter Epoxystearinsäure*

Die Epoxidierung zweier technischer Ölsäuremethylesterchargen erfolgte mit einer Konzentration von 1,5 M in Toluol beziehungsweise Dimethylcarbonat oder lösemittelfrei. Die Inkubation erfolgte in 250 mL Rundkolben mit Schikane und Propellerrührer bei 450 rpm und  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Wasserstoffperoxid wurde mit 10 Mol % Überschuss bezogen auf die eingesetzte Menge an C=C-Doppelbindungen als 30%ige wässrige Lösung einmalig zu Reaktionsbeginn zugegeben. Novozym<sup>®</sup> 435 kam mit einer Dosierung von  $10 \text{ g mol}^{-1}$  C=C-Doppelbindung zum Einsatz. Die Aufarbeitung erfolgte bis auf die Lösemittelabtrennung wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben. Die Reaktionsansätze wurden mit Dünnschichtchromatographie (Methode siehe Kapitel 8.3.2) und hinsichtlich Epoxidsauerstoffgehalt (Methode siehe 8.3.5) analysiert.

Aufgrund der bei der enzymatischen Epoxidierung von Fettsäuremethylestern entstehenden freien Epoxystearinsäure (ESA) wurden weitere Experimente zur Rückveresterung mit Methanol durchgeführt. Dazu wurde das zuvor hergestellte Gemisch aus Epoxystearinsäuremethylester (EME) und freier Epoxystearinsäure nach Abtrennung der wässrigen Wasserstoffperoxidphase und Waschen mit vollentsalztem Wasser mit 10 Gew. % wasserfreiem Natrium- oder Magnesiumsulfat getrocknet und der Restwassergehalt mit Karl-Fischer-Titration bestimmt. Zur Rückveresterung wurden 2 g des Gemisches aus Epoxystearinsäuremethylester und freier Epoxystearinsäure in 10 mL Reaktionsgefäße gegeben, 5 g Novozym<sup>®</sup> 435 pro Mol Epoxid zugegeben und zum Reaktionsstart 8 Gew. % Methanol (ca.  $0,85 \text{ Mol MeOH pro Mol EME + ESA}$ ) bezogen auf die Masse an Epoxid zudosiert. Die Reaktionsansätze wurden mit einer Schüttelfrequenz von 700 rpm bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  für 24 h inkubiert. Nach 24 h Reaktion wurde die gleiche Menge Methanol erneut zugegeben und für weitere 24 h geschüttelt. Die Proben wurden dünn-schichtchromatographisch analysiert (Methode siehe Kapitel 8.3.2).

### *Simultane Epoxidierung und Veresterung von Ölsäure*

Zur Herstellung von Epoxystearinsäuremethylester wurden neben der Umsetzung von Ölsäuremethylester weitere Ansätze zur simultanen Epoxidierung und Veresterung ausgehend von freier Ölsäure untersucht. Dazu wurden jeweils Ölsäurekonzentrationen von 1,5 M in Toluol, Dimethylcarbonat (DMC) und einem Toluol-Methanol-Gemisch angesetzt und in 10 mL Reaktionsgefäßen bei 1000 rpm und 40 °C inkubiert. Der Methanol-Gehalt im Toluol-Methanol-Gemisch wurde so kalkuliert, dass pro Mol Fettsäure 1,1 Mol Methanol zugesetzt und eine vollständige Veresterung theoretisch ermöglicht wurde. Wasserstoffperoxid wurde mit einem Verhältnis von 1,1 Mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Mol C=C-Doppelbindung in einem Schritt zum Reaktionsbeginn zugegeben. Die Enzymdosierung wurde auf 20 g Novozym® 435 pro Mol C=C-Doppelbindung festgelegt. Die Analyse der Proben erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (Methode siehe Kapitel 8.3.2):

### *Epoxidierung von 9-Octadecen-1,18-dicarbonsäure*

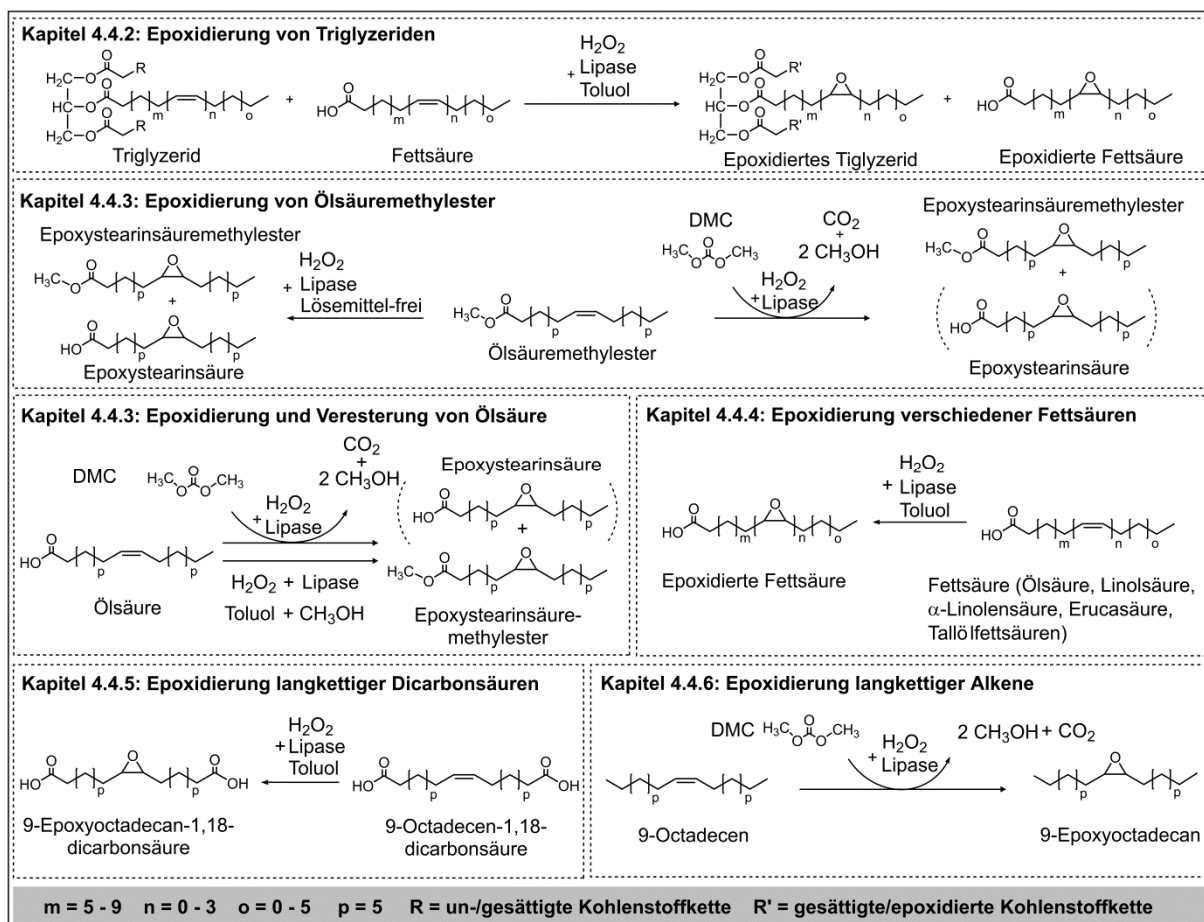
Als weiteres Substrat wurde die enzymatische Epoxidierung der am Fraunhofer IGB hergestellten 9-Octadecen-1,18-dicarbonsäure (C18:1-DCA) mit 20 g Novozym® 435 pro Mol Substrat betrachtet. Der Gehalt an C18:1-DCA lag bei 87 % und einem Restgehalt an Ölsäure von 13 %. Es wurde eine 0,1 M C18:1-DCA-Lösung in Toluol oder Ethylacetat angesetzt. Die Ölsäurekonzentration lag entsprechend bei 0,017 M. Es wurden 1,1 Mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Mol C=C-Doppelbindung verwendet. Die Umsetzung erfolgte in 10 mL-Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur und 1000 rpm für 24 h. Die Probenanalytik erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Methode siehe Abschnitt 8.3.2).

### *Epoxidierung von 9-Octadecen*

Zusätzlich zu den Fettsäurederivaten wurden 1-Octadecen und 9-Octadecen enzymatisch mit Novozym® 435 umgesetzt. 9-Octadecen wurde als Koppelprodukt bei der Synthese von 9-Octadecen-1,18-dicarbonsäuredimethylester mit Hilfe einer Metathese-Reaktion vom Fraunhofer ICT zur Verfügung gestellt. Für 1- und 9-Octadecen wurde jeweils eine 0,75 M Lösung in Dimethylcarbonat oder Ethylacetat angesetzt und in 50 mL Reaktionsgefäßen mit 15 g Novozym® 435 pro Mol C=C bei 40 °C und 1000 rpm inkubiert. Wasserstoffperoxid wurde als 30%ige wässrige Lösung mit 10 Mol% Überschuss bezogen auf die eingesetzte Menge an C=C-Doppelbindungen zu Reaktionsbeginn zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 48 h. Die Analytik erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (siehe Abschnitt 8.3.2).

## 4.4 Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit wurden verschiedene Pflanzenöl-basierte Substrate chemo-enzymatisch zu Epoxiden umgesetzt, um den Einfluss verschiedener Reaktionsparameter auf die Synthese beschreiben zu können. In Abbildung 21 ist der Aufbau des Ergebnisteils schematisch dargestellt. Abschnitt 4.4.1 widmet sich der Charakterisierung verschiedener verwendeter Pflanzenöle. In Kapitel 4.4.2 werden die Ergebnisse zur enzymatischen Epoxidierung der unterschiedlichen Pflanzenöle dargestellt. Die Umsetzung von Ölsäuremethylester in verschiedenen Reaktionsansätzen wird in Kapitel 4.4.3 betrachtet. Ein Vergleich der enzymatischen Epoxidierung verschiedener freier Fettsäuren erfolgt in Abschnitt 4.4.4. Die Kapitel 4.4.5 und 4.4.6 beschäftigen sich abschließend mit der Umsetzung von 9-Octadecen-1,18-dicarbonsäure und 9-Octadecen.



**Abbildung 21:** Darstellung der verschiedenen Verfahrensvarianten zur Epoxidierung unterschiedlicher Pflanzenölderivate mit Verweisen auf die entsprechenden Teilkapitel im Ergebnisteil.



#### 4.4.1 Charakterisierung verschiedener Pflanzenöle

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl verschiedener Pflanzenöle hinsichtlich ihrer Eignung für die chemo-enzymatische Epoxidierung mit Lipasen untersucht. Für die Auslegung der Reaktionsansätze ist dabei die Kenntnis der Fettsäurezusammensetzung der pflanzlichen Öle von entscheidender Bedeutung, um beispielsweise die nötige Wasserstoffperoxidmenge kalkulieren zu können. Daher wurden die Pflanzenöle mit Hilfe der Gaschromatographie auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht (siehe Anhang, Abschnitt 8.3.4). Zusätzlich zur Fettsäurezusammensetzung wurde die Jodzahl für die Gemische aus Pflanzenöl und zugegebener freier Fettsäure bestimmt (siehe Anhang, Kapitel 8.3.3). Auf Basis dieser Ergebnisse lassen sich die mittlere Molmasse, der mittlere Gehalt an Mol C=C-Doppelbindungen pro Mol Triglyzerid und der maximal erreichbare Epoxidsauerstoffgehalt berechnen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgeführt und von links nach rechts mit zunehmendem Gehalt an C=C-Doppelbindungen sortiert.

Durch die Auswahl von Pflanzenölen mit unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung wurde ein umfangreiches Substratspektrum zur Verfügung gestellt, das repräsentativ für einen Großteil der für die Epoxidierung interessanten Triglyzeride steht. Eine erfolgreiche Epoxidierung dieser Öle sollte es ermöglichen, den Einfluss verschiedener Pflanzenölzusammensetzungen auf die erzielbaren Produkteigenschaften zu beschreiben. Die in Tabelle 16 zusammengefassten Öle wiesen Jodzahlen im Bereich von 85 bis knapp 200 g Jod pro 100 g Öl auf. Senf-, Krambe- und Erucarapsöl zeigten einen sehr hohen Anteil der einfach ungesättigten Erucasäure mit einer Kohlenstoffkettenlänge von 22 C-Atomen. Im Vergleich zu diesen Ölen mit überwiegend einfach ungesättigten Fettsäuren zeichneten sich Lein-, Holunder- und Drachenkopfl mit Jodzahlen von über 170 durch einen sehr hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure aus. Den höchsten Gehalt der dreifach ungesättigten Linolensäure wies mit 54 bis 62 % Drachenkopfl auf. Zu den Ölen mit einem mittleren Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren gehörten Raps-, Sesam-, Maiskeim-, Soja-, Schwarzkümmel-, Sonnenblumen-, Traubenkern- und Safloröl, was sich auch durch Jodzahlen im Bereich zwischen 105 und 145 ausdrückte. Der Gehalt an zweifach ungesättigter Linolsäure nahm in der Aufzählungsreihenfolge zu, während der Ölsäuregehalt abnahm. Diese acht Öle enthielten allerdings kaum Linolensäure (C18:3). Literaturvergleiche zu diesen Ölen zeigen eine ähnliche Fettsäurezusammensetzung [6, 10, 22, 56, 162, 163, 187-189].

**Tabelle 16: Fettsäurezusammensetzung (in %), mittlere Molmasse auf Basis der Fettsäurezusammensetzung, Jodzahl für die hinsichtlich der chemoenzymatischen Epoxidierung getesteten Pflanzenöle inklusiver der zugegebenen freie Fettsäuren und daraus resultierender maximal möglicher Epoxidsauerstoffgehalt (in %).**

	KBO	RCO	SO (DoE)	SO	ERSO	RSO	SEO	MKO	SBO	SKO	SFO	TKO	SAO	HO	LSO	DO (DoE)	DO
C16:0	-	22,3	3,3	-	-	5,6	11,1	12,6	12,8	13,4	8,1	8,9	6,6	8,6	7,5	7,3	9,0
C18:0	-	2,7	2,4	-	-	2,6	5,9	2,6	4,1	3,1	4,3	5,3	2,9	-	5,4	3,2	3,1
C18:1	17,6	45,6	22,8	23,8	14,8	60,8	42,7	35,8	27,8	21,4	33,6	21,5	10,1	14,0	22,8	10,8	15,6
C18:2	10,1	29,4	9,0	10,2	13,1	21,9	40,3	49,0	50,2	58,5	54,0	64,3	80,3	41,1	20,7	13,2	18,1
C18:3	6,9	-	8,9	10,2	8,6	9,0	-	-	5,0	-	-	-	-	36,3	43,6	61,7	54,3
C20:1	3,4	-	10,1	10,4	5,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-
C20:2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-	-	-	-	-	-
C22:0	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:1	58,1	-	36,9	42,1	58,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-
C24:1	1,6	-	2,7-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MW(Öl) <sup>1</sup>	993	866	961	972	985	878	875	873	871	875	876	875	875	872	874	869	872
mol C=C mol <sup>-1</sup> TG	3,93	3,22	3,79	4,21	4,21	4,11	3,84	4,16	4,45	4,41	4,42	4,68	5,32	6,40	6,10	7,02	6,71
IZ <sup>2</sup> (Öl+OA)	85 ± 1	95,2 ± 0,6	100 ± 1	104 ± 3	96,3 ± 2	107 ± 2	114 ± 4	111 ± 1	125 ± 2	122 ± 2	124 ± 2	130 ± 1	144 ± 3	171 ± 4	172 ± 1	186 ± 4	176 ± 5
OO <sub>max</sub> <sup>3</sup>	4,96	5,66	5,93	6,14	5,72	6,32	6,70	6,55	7,30	7,14	7,23	7,58	8,34	9,73	9,80	10,5	10,0

KBO - Krambeöl, RCO - Reisöl, SO - Senföl, ERSO - Erucarapsöl, RSO - Rapsöl, SEO - Sesamöl, MKO - Maiskeimöl, SBO - Sojaöl, SKO - Schwarzkümmelöl, SFO - Sonnenblumenöl, TKO - Traubenkernöl, SAO - Safloröl, HO - Holunderkernöl, LSO - Leinsamenöl, DO – Drachenkopfl

C16:0 Palmitinsäure, C18:0 Stearinsäure, C18:1 Ölsäure, C18:2 Linolsäure, C18:3  $\alpha$ -Linolensäure, C20:1 Gadoleinsäure, C20:2 Eicosadiensäure, C22:0 Behensäure, C22:1 Erucasäure, C24:1 Nervensäure

<sup>1</sup>Mittlere Molmasse berechnet aus der Fettsäurezusammensetzung in g mol<sup>-1</sup>; <sup>2</sup>Jodzahl bestimmt nach der Methode nach Wijs in g Jod 100 g<sup>-1</sup> (DIN EN ISO 3961); <sup>3</sup>Maximal möglicher Epoxidsauerstoffgehalt in Massenprozent berechnet auf Basis der gemessenen Jodzahl für die jeweilige Stammlösung aus Öl und freier Fettsäure nach [13].

#### 4.4.2 Methodenentwicklung zur Epoxidierung von Triglyzeriden

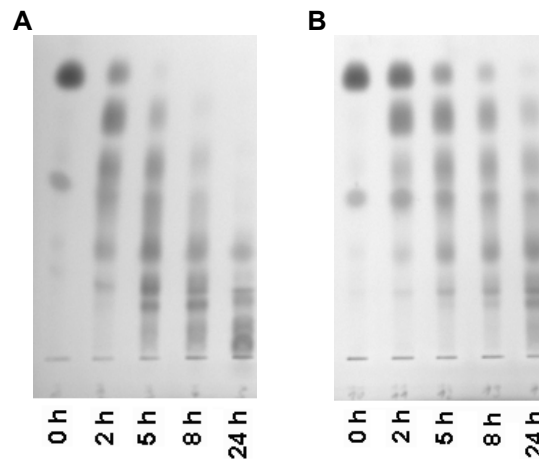
Im den nachfolgend Abschnitten wird die enzymatische Epoxidierung von Triglyzeriden beschrieben. Zuerst wird der Einfluss von Toluol und Heptan auf die Umsetzung von Drachenkopföl diskutiert (siehe 4.4.2.1). In Kapitel 4.4.2.2 wird der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die Umsetzung zweier hinsichtlich der Fettsäurezusammensetzung sehr unterschiedlicher Pflanzenöle systematisch betrachtet, um zum einen optimierte Reaktionsbedingungen festzulegen und zum anderen zu vergleichen, ob sehr unterschiedliche Substratzusammensetzungen verschiedene Prozessbedingungen erfordern. In den Kapiteln 4.4.2.3 bis 4.4.2.5 wird die enzymatische Umsetzung sehr unterschiedlicher Pflanzenöle vorgestellt und die hergestellten Pflanzenölepoxide umfangreich hinsichtlich deren Viskosität und Schmelzverhalten charakterisiert, um die Produkteigenschaften abschließend mit den Substrateigenschaften in Korrelation zu bringen. Im letzten Teilabschnitt wird die Enzymstabilität der immobilisierten CalB bei der Umsetzung von Sojaöl in Abhängigkeit verschiedener Wasserstoffperoxidzugabevarianten betrachtet (siehe Kapitel 4.4.2.6).

##### 4.4.2.1 Epoxidierung von Drachenkopföl in Toluol und *n*-Heptan

Im Vorfeld der Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Prozessgrößen bei der enzymatischen Epoxidierung von Pflanzenölen, wie beispielsweise der Enzymdosierung oder der erforderlichen Lösemittelmenge, wurde in dieser Arbeit ein Vorversuch zur Eignung zweier verschiedener Lösemittel durchgeführt. Dabei sollten *n*-Heptan und Toluol als Lösemittel verglichen werden. Die Auswahl eines geeigneten Lösemittels kann einerseits die Reaktion selbst entscheidend beeinflussen und andererseits eine Aufarbeitung des Reaktionsproduktes, beispielsweise aufgrund eines niedrigeren Siedepunktes und einer damit einfacheren Lösemittelrückgewinnung, erleichtern [190]. *n*-Heptan würde im Vergleich zu Toluol besonders Vorteile im Bereich der Lösemittelrückgewinnung bieten, da es mit einem Siedepunkt von 98 °C einen um 13 °C niedrigeren Siedepunkt aufweist wie Toluol. Beide Lösemittel sind sehr gut zum Lösen pflanzlicher Öle geeignet und weisen einen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ( $\log K_{OW}$ ) größer 2,38 auf [191, 192].

In Abbildung 22 ist das Ergebnis der dünnschichtchromatographischen Analyse der Epoxidierung von Drachenkopföl in Toluol (A) und *n*-Heptan (B) als Lösemittel mit Novozym® 435 als Biokatalysator dargestellt. In der jeweils linken Bahn sind das native Drachenkopföl als obere Bande und die supplementierte Ölsäure als mittlere schwächere Bande zu erkennen. Durch die Epoxidierung werden polare Gruppen in das Triglyzerid und die freie Fettsäure eingebracht und dadurch stärkere Wechselwirkungen mit der polaren stationären Phase auf Basis von Silicagel erzeugt. Aufgrund dessen sind Molekülbanden mit

hohem Epoxidgehalt in Abbildung 22 A und B im Vergleich zum nativen Triglyzerid wegen einer geringeren Laufstrecke bei der Entwicklung mit dem unpolaren Laufmittel weiter unten zu detektieren. Anhand der dargestellten DC-Analysen ist zu erkennen, dass die Umsetzung im zeitlichen Verlauf in Toluol (siehe Abbildung 22 A) schneller verläuft als in *n*-Heptan (siehe Abbildung 22 B).



**Abbildung 22: Vergleich der Epoxidierung von Drachenkopfföl mit der immobilisierten Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym® 435) in (A) Toluol oder (B) *n*-Heptan als Lösemittel.**

Entsprechend der in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse lässt sich festhalten, dass die Lipase-katalysierte Epoxidierung von Drachenkopfföl in Toluol schneller erfolgt als in *n*-Heptan. Die verlangsamte Umsetzung lässt sich auf die stärker unpolaren Eigenschaften von *n*-Heptan zurückführen. Es ist anzunehmen, dass Wasserstoffperoxid aufgrund der stärker unpolaren Eigenschaften von *n*-Heptan im Vergleich zu Toluol in geringeren Mengen in der organischen Phase zur Verfügung steht und die enzymatische Bildung der zur Epoxidierung erforderlichen Persäure damit langsamer erfolgt. Die verlangsamte Bildung der Persäure in *n*-Heptan resultiert insgesamt in einer langsameren Epoxidierung. Eine Persäurebildung wurde für unterschiedliche Lösemittel wie Toluol, Hexan, Aceton oder Butanon bereits beschrieben [16, 106, 173, 193]. Kirk *et al.* konnten eine effizientere Persäurebildung in Hexan im Vergleich zu Butanon zeigen [193]. Kim *et al.* verglichen Toluol ( $\log K_{OW}$  2,38), *n*-Hexan ( $\log K_{OW}$  3,65), Tetrahydrofuran ( $\log K_{OW}$  0,70) und Methylethylketon ( $\log K_{OW}$  0,74) in der Epoxidierung von Cardanol unter Verwendung von Essigsäure als Cosubstrat zur Persäurebildung. Die beste Epoxidausbeute konnten Kim *et al.* mit 95,3 % in Toluol erzielen, während die Ausbeute in *n*-Hexan bei 86 % lag. Die Ausbeuten in den polareren Lösemitteln Tetrahydrofuran und Methylethylketon lag knapp über 80 % [191]. Auf Grundlage der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse waren in *n*-Heptan ebenfalls eine Persäurebildung und damit eine Epoxidierung von Drachenkopfföl zu erwarten, obwohl ein direkter Vergleich dieser beiden Lösemittel nicht beschrieben wurde. Basierend auf den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen wurde für die weiteren Untersuchungen Toluol als Lösemittel ausgewählt.

#### 4.4.2.2 Bewertung des Einflusses von Temperatur, Zeit, Lösemittel- und Enzymmenge bei der Epoxidierung von Senf- und Drachenkopföl

Die chemo-enzymatische Epoxidierung von Senf- und Drachenkopföl wurde mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung unter Variation der Faktoren Enzymmenge, Temperatur, Zeit und Lösemittelmenge untersucht, um den Einfluss dieser Prozessgrößen auf die zu erreichende Epoxidausbeute bei der enzymatischen Epoxidierung mit Novozym® 435 zu beschreiben und entsprechend optimierte Parametereinstellungen für die beiden Öle zu definieren (Vorgehen siehe Abschnitt 4.3.2). Die Analyse der einzelnen Parameterkombinationen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie, FT-IR und titrimetrischer Epoxidsauerstoffbestimmung (Methoden siehe Anhang, Abschnitt 8.3.2, 8.3.5 und 8.3.6). Die statistische Analyse und Erstellung der mathematischen Modelle mittels Design-Expert® basiert ausschließlich auf den gemessenen Epoxidsauerstoffwerten.

Für Drachenkopf- und Senföl wurde die Jodzahl (JZ) nach Zugabe von 5 Mol % technischer Ölsäure bezogen auf den Gehalt an C=C-Doppelbindungen bestimmt und daraus der maximal mögliche Epoxidsauerstoffgehalt errechnet. Für Drachenkopföl mit Ölsäure ergab sich eine JZ von  $186 \text{ g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$  und für Senföl mit Ölsäure eine JZ von  $100 \text{ g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ . Daraus ergaben sich entsprechend Formel 26 für Drachenkopf- und Senföl maximale Epoxidsauerstoffwerte von 10,5 % respektive 5,9 %.

Die Ergebnisse der Epoxidsauerstoffgehaltsbestimmung für die 27 unabhängigen Reaktionsansätze mit Senf- und Drachenkopföl sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Basierend auf vorangegangenen qualitativen Analysen wie der FT-IR-Spektroskopie (siehe Anhang, Abbildung 67 und Abbildung 68) waren die Ergebnisse der Bestimmung des Epoxidsauerstoffgehaltes zu erwarten. Für Drachenkopföl wurde der höchste Epoxidsauerstoffgehalt mit 9,8 % in Ansatz 18 (siehe Tabelle 17), einem sogenannten Sternpunkt mit dem höchsten spezifischen Enzymeinsatz (11 g Novozym® 435 pro Mol C=C), mittlerer Temperatur (40 °C), mittlerer Reaktionszeit (12 h) und mittlerer Lösemittelmenge (50 Gew. % bezogen auf die Gesamtmasse der organischen Phase, 100 Gew.% relativ zur eingesetzten Masse Öl) gemessen. Einer der niedrigsten OO-Werte (2,4 %) wurde für Ansatz 1 mit minimalen Parameterwerten bestimmt. Dieser niedrige Umsatz war auch basierend auf der qualitativen Dünnschichtchromatographie und dem FT-IR-Spektrum aufgrund des verbleibenden für C=C-Doppelbindungen charakteristischen Peaks bei etwa  $3010 \text{ cm}^{-1}$  zu erwarten.

**Tabelle 17: Ergebnisse zum jeweils mit Senf- und Drachenkopfl durchgeführten statistischen Versuchsplan. Untersucht wurden der Einfluss von Enzymmenge, Temperatur, Zeit und Lösemittelmenge bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung von Senfl (SO) und Drachenkopfl (DO) in jeweils 27 Einzelansätzen.**

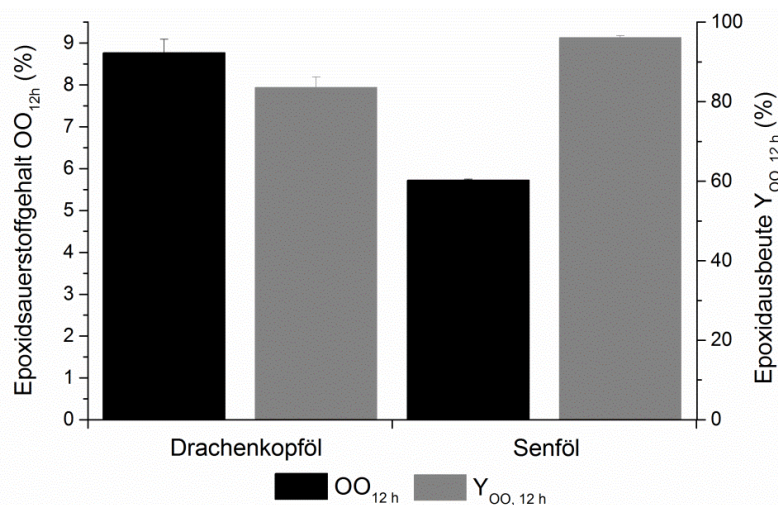
Angegeben sind die eingesetzten Parameterwerte und die experimentell erzielten Ergebnisse in Form von Epoxidsauerstoffgehalt (OO) und Ausbeute Y(OO).

Nr.	Enzym (g/mol <sub>C=C</sub> )	Temperatur (°C)	Zeit (h)	Lösemittel		OO <sub>SO</sub> (%)	Y <sub>SO(OO)</sub> (%)	OO <sub>DO</sub> (%)	Y <sub>DO(OO)</sub> (%)
				rel. zu m(Org.) <sup>a</sup>	rel. zu m(Öl) <sup>b</sup>				
				(Gew. %)	(Gew. %)				
1	5,0	30,0	6,0	25,0 / 33,3	25,0 / 33,3	0,6	10,8	2,4	23,2
2	10,0	30,0	6,0	25,0 / 33,3	25,0 / 33,3	0,9	14,7	4,0	38,2
3	5,0	50,0	6,0	25,0 / 33,3	25,0 / 33,3	0,7	12,0	1,8	16,7
4	10,0	50,0	6,0	25,0 / 33,3	25,0 / 33,3	1,1	17,9	2,7	26,1
5	5,0	30,0	18,0	25,0 / 33,3	25,0 / 33,3	1,2	20,3	3,8	36,5
6	10,0	30,0	18,0	25,0 / 33,3	25,0 / 33,3	1,8	31,0	8,4	80,1
7	5,0	50,0	18,0	25,0 / 33,3	25,0 / 33,3	0,7	12,2	2,2	21,0
8	10,0	50,0	18,0	25,0 / 33,3	25,0 / 33,3	1,6	27,0	2,9	27,7
9	5,0	30,0	6,0	75,0 / 300,0	75,0 / 300,0	2,9	48,6	5,2	49,6
10	10,0	30,0	6,0	75,0 / 300,0	75,0 / 300,0	4,0	67,7	7,4	70,0
11	5,0	50,0	6,0	75,0 / 300,0	75,0 / 300,0	3,0	51,2	4,1	39,2
12	10,0	50,0	6,0	75,0 / 300,0	75,0 / 300,0	5,1	85,4	8,0	75,9
13	5,0	30,0	18,0	75,0 / 300,0	75,0 / 300,0	5,2	87,7	9,2	87,2
14	10,0	30,0	18,0	75,0 / 300,0	75,0 / 300,0	6,0	101,4	9,5	90,0
15	5,0	50,0	18,0	75,0 / 300,0	75,0 / 300,0	4,1	69,8	4,6	44,1
16	10,0	50,0	18,0	75,0 / 300,0	75,0 / 300,0	6,1	102,6	8,3	79,1
17	4,0	40,0	12,0	50,0 / 100,0	50,0 / 100,0	2,6	44,1	4,7	44,7
18	11,0	40,0	12,0	50,0 / 100,0	50,0 / 100,0	5,9	99,4	9,8	93,8
19	7,5	25,9	12,0	50,0 / 100,0	50,0 / 100,0	3,3	55,0	7,8	74,2
20	7,5	54,1	12,0	50,0 / 100,0	50,0 / 100,0	1,7	28,3	3,3	31,3
21	7,5	40,0	3,5	50,0 / 100,0	50,0 / 100,0	1,9	31,3	4,1	39,1
22	7,5	40,0	20,5	50,0 / 100,0	50,0 / 100,0	5,8	98,5	7,8	74,1
23	7,5	40,0	12,0	14,6 / 17,2	14,6 / 17,2	1,6	26,6	4,0	37,8
24	7,5	40,0	12,0	85,4 / 582,8	85,4 / 582,8	5,3	89,7	7,9	74,9
25	7,5	40,0	12,0	50,0 / 100,0	50,0 / 100,0	5,7	96,1	8,4	80,5
26	7,5	40,0	12,0	50,0 / 100,0	50,0 / 100,0	5,7	96,6	8,9	85,0
27	7,5	40,0	12,0	50,0 / 100,0	50,0 / 100,0	5,7	95,6	9,0	85,2

<sup>a</sup>Masse an Toluol bezogen auf die Masse der gesamten organischen Phase bestehend aus Toluol, technischer Ölsäure und Triglyzerid, <sup>b</sup>Masse Toluol bezogen auf die Masse von Öl und Ölsäure.

Bei der quantitativen Analyse der Senfölsansätze wurde für Ansatz 16 mit ausschließlich hohen Parameterwerten (10 g Novozym® 435 pro Mol C=C, 50 °C, 18 h und 75 Gew. % Lösemittel) der höchste Epoxidgehalt mit 6,1 % bestimmt. Vergleichbar zu den Untersuchungen mit Drachenkopföl wurde für Senföl ebenfalls in Ansatz 1 mit ausschließlich minimalen Parameterwerten der niedrigste Epoxidsauerstoffgehalt von 0,6 % bestimmt.

Anhand des gemessenen Epoxidsauerstoffgehalts konnte mittels Design-Expert® 7.1.5 für beide pflanzlichen Öle ein mathematisches Modell erstellt werden. Das Modell beschreibt den Epoxidsauerstoffgehalt in Abhängigkeit der vier Einflussgrößen. Für beide Pflanzenöle wurde zunächst ein quadratisches Modell mit allen Gleichungstermen erstellt und anschließend durch Eliminieren nicht-signifikanter Terme auf ein reduziert-quadratisches Modell herabgesetzt. Beide Modelle erwiesen sich als signifikant. Die Modelle und deren korrigiertes Bestimmtheitsmaß sind in Tabelle 18 dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß beschreibt die Summe der Fehlerquadrate, die durch das Modell erklärt werden. Das korrigierte Bestimmtheitsmaß berücksichtigt dabei die Anzahl der Faktoren, die zur Erklärung des Modells eingehen. Ein Bestimmtheitsmaß nahe eins bedeutet, dass das Modell den Zusammenhang zwischen den Parametern und dem gemessenen Epoxidsauerstoffgehalt gut beschreibt.



**Abbildung 23: Reproduzierbarkeit einer beispielhaften Parameterkombination bei der enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopf- und Senföl (7,5 mg pro mmol C=C, 40 °C, 12 h Reaktionszeit, 50 Gew.% Lösemittel).**

Eine Parameterkombination innerhalb des Versuchsplans, der sogenannte Mittelpunkt, wurde in einem dreifachen Ansatz durchgeführt und analysiert (Ansatz 25 bis 27, siehe Tabelle 17). Durch die mehrfache Bestimmung des Mittelpunktes können Aussagen zur Reproduzierbarkeit der Parameterkombinationen gemacht werden. Für Drachenkopföl ergab sich für die drei Mittelpunkte ein OO-Wert von  $8,8 \pm 0,3$  % und für Senföl ein OO-Wert von  $5,7 \pm 0,1$  % (siehe Abbildung 23). Aufgrund dieser Ergebnisse kann von einer hohen Reproduzierbarkeit einzelner Parameterkombinationen ausgegangen werden.

Die Modelle der beiden pflanzlichen Öle unterscheiden sich, wie aus der Zusammenfassung in Tabelle 18 zu erkennen ist. Die verschiedenen Parameter gehen in unterschiedlichem Ausmaß in die Vorhersage des OO-Gehaltes ein. Auch die Wechselwirkungen der Einflussgrößen sind unterschiedlich stark gewichtet. Die mathematischen Modellgleichungen zur Beschreibung des Einflusses der vier Prozessgrößen auf den erzielbaren Epoxidsauerstoffgehalt bei der Umsetzung von Senf- und Drachenkopfol sind in Tabelle 18 aufgeführt.

**Tabelle 18: Mathematische Modelle zur Beschreibung des Epoxidsauerstoffgehalts (OO) in Abhängigkeit der Temperatur, Zeit Lösemittel- und Enzymmenge für Drachenkopf- und Senföl.**

**Einheiten der einzelnen Einflussgrößen: Enzymmenge in g/mol<sub>C=C</sub>, Temperatur in °C, Zeit in h und Lösemittelmenge (LM Menge) in Gew.% der organischen Phase.**

Ölsorte	Modell	Gleichung	Adj R <sup>2</sup> (ANOVA)
Drachenkopf-öl	Reduziertes quadratisches Modell	OO-Gehalt = - 26,0774	0,8619
		+ 0,5016 * Enzymmenge	
		+ 0,8832 * Temperatur	
		+ 1,1713 * Zeit	
		+ 0,2089 * LM Menge	
		- 0,0108 * Temperatur * Zeit	
		- 0,0108 * Temperatur <sup>2</sup>	
		- 0,0244 * Zeit <sup>2</sup>	
		- 0,0014 * LM Menge <sup>2</sup>	
Senföl	Reduziertes quadratisches Modell	OO-Gehalt = - 33,1033	0,9805
		- 0,0008 * Enzymmenge	
		+ 1,5722 * Temperatur	
		+ 0,1249 * Zeit	
		+ 0,1393 * LM Menge	
		+ 0,0038 * Enzymmenge * LM Menge	
		- 0,0033 * Temperatur * Zeit	
		+ 0,0018 * Zeit * LM Menge	
		- 0,0192 * Temperatur <sup>2</sup>	
		- 0,0012 * LM Menge <sup>2</sup>	

Die reduzierten quadratischen Modelle beschreiben den Zusammenhang zwischen den Parametern und der Zielgröße in einem 5-dimensionalen Raum. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 24 und Abbildung 25 als Zusammenfassung in Konturdiagrammen dargestellt. Es wurde ein tabellarisches Schema aus einzelnen Konturdiagrammen und einem übergeordneten Achsenschema gewählt, um den Zusammenhang aller fünf Größen (Enzymmenge, Temperatur, Zeit, Lösemittelmenge und Epoxidsauerstoffgehalt) darzustellen. Die Konturdiagramme zeigen den Einfluss zweier Parameter auf den in Form von Niveaulinien dargestellten Epoxidsauerstoffgehalt. Die beiden übrigen Parameter sind innerhalb des



einzelnen Konturplots konstant und werden auf der übergeordneten Achse auf drei Stufen variiert. Für Drachenkopföl ist in Abbildung 24 in den einzelnen Schaubildern die Zeit über der Temperatur aufgetragen, weil sich auf Basis der ANOVA-Analyse (siehe Anhang, Tabelle 35) für diese beiden Prozessparameter eine signifikante Wechselwirkung ergab ( $p$ -Wert 0,0170). Die übergeordneten Achsen zeigen die Lösemittelmenge (vertikal) und die Enzymmenge (horizontal). Hohe Epoxidsauerstoffgehalte sind im Konturdiagramm an einer zunehmend starken Rotfärbung zu erkennen. Bei der Umsetzung von Drachenkopföl konnten die höchsten Epoxidsauerstoffgehalte beim Einsatz hoher Lösemittelmengen (75 Gew. %), hoher Enzymmengen (10 g mol<sub>C=C</sub><sup>-1</sup>), langer Reaktionszeiten von 12 bis 18 h und geringen Temperaturen zwischen 30 und 40 °C erzielt werden.

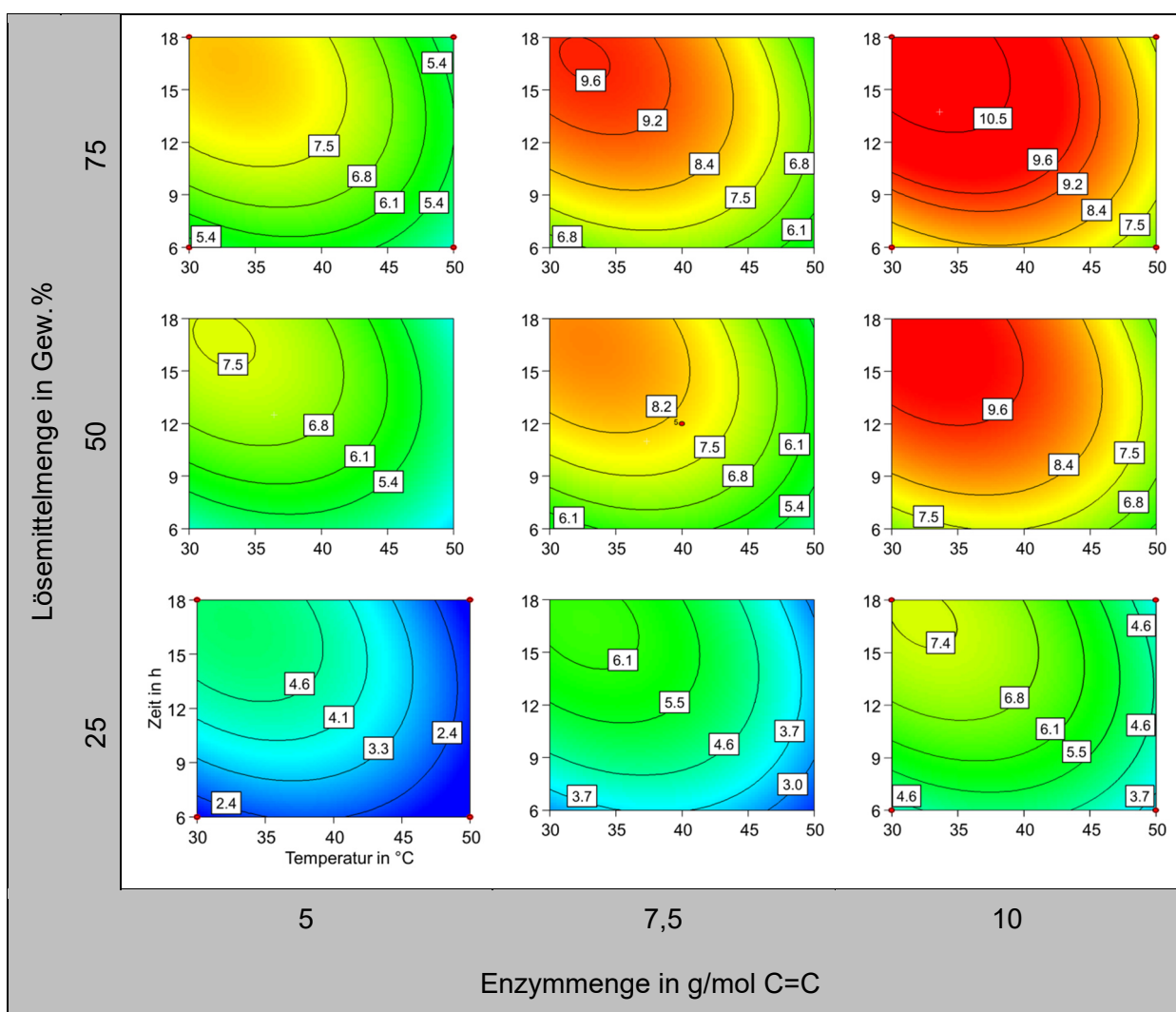


Abbildung 24: Konturplots zur Epoxidierung von Drachenkopföl.

Dargestellt ist die Abhängigkeit des Epoxidsauerstoffgehaltes von den Einflussfaktoren Temperatur (x-Achse) und Zeit (y-Achse) im individuellen Schaubild bei jeweils gleichem Enzym- (x-Achse) und Lösemittelleinsatz (y-Achse) der übergeordneten Größenskala.

Aus den in Abbildung 24 dargestellten Konturdiagrammen wird deutlich, dass eine Reduktion der Enzymmenge auf  $7,5 \text{ g mol}_{\text{C}=\text{C}}^{-1}$  einen größeren Einfluss auf den OO-Gehalt hatte, als die Verminderung der Lösemittelmengen von 75 auf 50 Gew. %. So wären nach Vorhersage des Modells für hohe Enzymmengen ( $10 \text{ g mol}_{\text{C}=\text{C}}^{-1}$ ) und mittlere Lösemittelmengen (50 Gew. %) bei langen Reaktionszeiten und geringen Temperaturen Epoxidsauerstoffwerte von 9,6 % zu erreichen. Dies entspricht einer Ausbeute von 89,5 %.

Bei Senföl wurde in den Einzeldiagrammen in Abbildung 25 die Lösemittelmenge über der Zeit aufgetragen, weil diese beiden Einflussgrößen laut ANOVA-Analyse (siehe Anhang, Tabelle 36) am stärksten voneinander abhängig sind (p-Wert 0,0029). In horizontaler Richtung wurde auf der übergeordneten x-Achse die Enzymmenge und in vertikaler Richtung auf der y-Achse die Temperatur jeweils auf drei Stufen variiert.

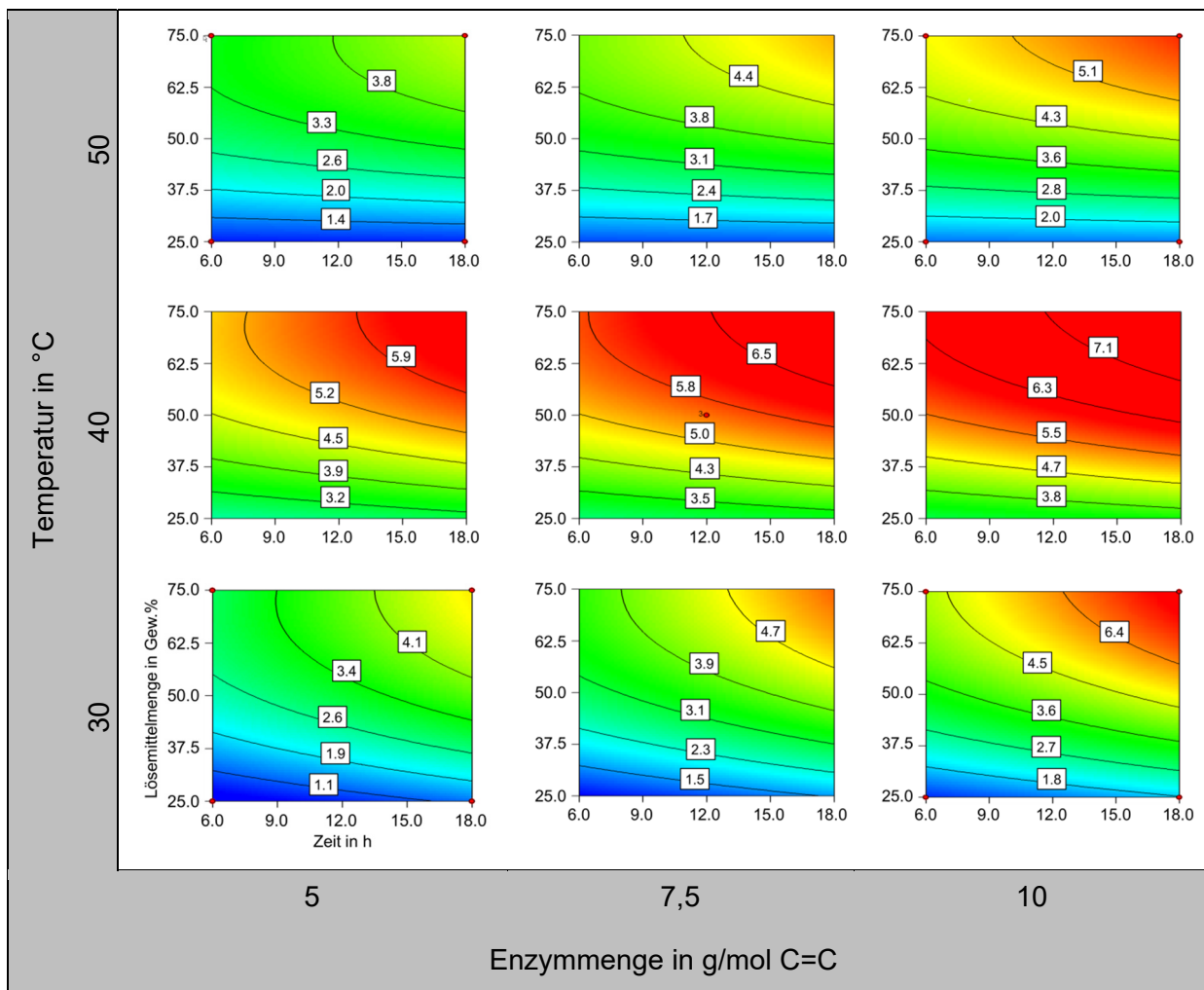


Abbildung 25: Konturplots zur Epoxidierung von Senföl.

Dargestellt ist die Abhängigkeit des Epoxidsauerstoffgehaltes von den Einflussfaktoren Zeit (x-Achse) und Lösemittelmenge (y-Achse) in den individuellen Schaubildern bei jeweils gleichem Enzymeinsatz (x-Achse) und gleicher Temperatur (y-Achse) auf der übergeordneten Größenskala.

Aus den einzelnen Konturplots in Abbildung 25 wird ersichtlich, dass hohe OO-Gehalte mit langen Reaktionszeiten (12-18 h) und hohen Lösemittelmengen (55 - 75 Gew.%) erreicht werden konnten. Außerdem wurden hohe Epoxidsauerstoffwerte bei mittlerer Temperatureinstellung (40 °C) und mittlerem bis hohem Enzymeinsatz (7,5 bis 10 g mol<sub>C=C</sub><sup>-1</sup>) erzielt. Der höchste errechnete OO-Wert liegt bei 7,1 %. Das entspricht einer Ausbeute von über 120 %. Auf Basis der Modellgleichung zur Beschreibung des Epoxidgehaltes in Abhängigkeit von den untersuchten Einflussgrößen wurden somit Epoxidsauerstoffgehalte oberhalb des theoretisch maximal möglichen Epoxidsauerstoffgehaltes kalkuliert. Der höchste tatsächlich gemessene Epoxidsauerstoffgehalt lag für Senföl in Ansatz 16, mit ausschließlich maximalen Parameterwerten, bei 6,1 %. Zusammenfassend zeigten die Modelle für Drachenkopf- und Senföl, dass sich hohe Temperaturen nachteilig auf den zu erreichenden Epoxidsauerstoffgehalt auswirkten und eine hohe Enzymmenge sich erwartungsgemäß positiv auf den OO-Gehalt auswirkte. Kurze Inkubationszeiten und niedrige Lösemittelmengen führten zu geringeren Epoxidsauerstoffgehalten.

Vlček und Petrović untersuchten den Einfluss von Lösemittel- und Enzymmenge während der Epoxidierung von Sojaöl mit Novozym® 435, das mit einer Jodzahl von 131 g Jod pro 100 g Öl hinsichtlich des Gehaltes an C=C-Doppelbindungen zwischen Drachenkopf- und Senföl liegt. Dabei wurde der Einfluss des jeweiligen Parameters bei sonst konstanten Einstellungen untersucht. Bei sehr hohen Lösemittelmengen von 440 Gew. % relativ zur Masse an Öl, einer Reaktionstemperatur von 50 °C und einem Wasserstoffperoxideinsatz von 2 Mol pro Mol C=C-Doppelbindung wurde von Vlček und Petrović eine Erhöhung der Umsatzrate mit gesteigerter Enzymdosierung beobachtet. Unterhalb einer Enzymdosierung von 4 Gew.% relativ zur Masse Öl wurde von Vlček und Petrović eine Abnahme im nach 24 h erzielten Umsatz gezeigt [157]. Ähnliche Beobachtungen zum Einfluss der Enzymmenge wurden von Sun *et al.* bei der Epoxidierung von Maiskeimöl mit einer Jodzahl von 115 g J<sub>2</sub> pro 100 g Öl und *Sapindus mukorossi* Öl (JZ 84,8 g J<sub>2</sub> pro 100 g) bei Lösemittelanteilen von 500 beziehungsweise 430 Gew.% relativ zur verwendeten Masse Öl gemacht [155, 156]. Ein vergleichbarer Einfluss der Enzymdosierung wurde in dieser Arbeit für Drachenkopf- und Senföl festgestellt.

Untersuchungen von Vlček und Petrović zum Einfluss der eingesetzten Lösemittelmenge zeigten eine deutliche Abnahme der Umsatzrate und Umsätze nach 24 h Inkubation mit Lösemittelmengen unter 110 Gew. % relativ zur eingesetzten Menge an Öl. So konnten von Vlček und Petrović nach 24 h Reaktionszeit mit 22 Gew. % Lösemittel und 4 Gew. % Enzympräparat bei 50 °C etwa 50 % Umsatz erzielt werden [157]. Für Drachenkopf- und Senföl zeigte sich eine ähnliche Tendenz, wobei die Epoxidausbeuten bei niedrigem Lösemittelanteil und 50 °C nach 18 h bei etwa 27% lagen.

Sun *et al.* untersuchten den Einfluss der Reaktionstemperatur bei der Umsetzung von Maiskeimöl im Bereich von 35 bis 65 °C und bei *Sapindus mukorossi* Öl zwischen 30 und 70 °C und beobachteten jeweils einen Rückgang der Epoxidausbeute bei Reaktionstemperaturen über 50 °C infolge von Epoxidringöffnung und Enzyminaktivierung [155, 156]. In der vorliegenden Arbeit wurden Reaktionstemperaturen unter 50 °C eingesetzt. Für Drachenkopföl, mit dem aufgrund des sehr hohen Gehalts an C=C-Doppelbindungen im Vergleich zu den in der Literatur systematisch untersuchten Ölen sehr hohe Epoxidsauerstoffgehalte erzielt werden konnten, wurde bereits bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C ein Ausbeuterückgang im Vergleich zu Ansätzen mit einer Temperatur von 30 °C festgestellt. Diese Beobachtung lässt sich durch eine höhere Reaktivität des hochepoxidierten Drachenkopföls im Vergleich zu epoxidiertem Soja-, Maiskeim- oder *Sapindus mukorossi* Öl begründen. Gestützt wird diese Begründung auch durch entsprechende Untersuchungen zur Epoxidierung von Senföl, bei denen ein Rückgang der Epoxidausbeute mit einer Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C nicht zu beobachten war. Damit ist die Auswahl der geeigneten Reaktionstemperatur stark vom eingesetzten Substrat abhängig. Reaktionstemperaturen über 50 °C sollten für Substrate mit einem mäßigen Gehalt an C=C-Doppelbindungen vermieden werden, während für Substrate mit einem hohen Gehalt an Doppelbindungen, wie beispielsweise Drachenkopf- oder Leinsamenöl, bereits Temperaturen um 50 °C zu Einbußen in der Epoxidausbeute führen.

Auf Grundlage der mathematischen Modelle kann eine Parameteroptimierung durchgeführt werden. Für die jeweilige Problemstellung können dadurch optimale Werte für die Enzymmenge, die Reaktionstemperatur, die Reaktionszeit und die Lösemittelmenge ermittelt und der Epoxidsauerstoffgehalt zu dieser Parameterkombination vorhergesagt werden. Die Optimierung wurde mit Design-Expert® durchgeführt. Die Software schlägt dabei in der Regel für eine vorgegebene Problemstellung mehrere optimale Parameterkombinationen vor. Für beide Pflanzenöle wurde die Optimierung für eine Fragestellung durchgeführt.

Das Ziel der Optimierung war, die Einflussfaktoren Enzymmenge und Lösemittelmenge zu minimieren, die Zeit und Temperatur innerhalb des Versuchsraumes zu halten, während der Epoxidsauerstoffgehalt maximiert werden und dabei im Bereich zwischen 80 % und 100 % liegen sollte. Aufgrund der Überbestimmung des Senfölmodells (vergleiche Abbildung 25), wurde dieser Bereich für Senföl bis 120 % erweitert. So wird sichergestellt, dass das Maximum des Epoxidsauerstoffgehaltes für dieses Modell vorhergesagt wird. Diese Optimierung lieferte für Drachenkopföl eine Enzymmenge von 8,2 g mol<sub>C=C</sub><sup>-1</sup>. Die Temperatur lag bei 33 °C. Bei einer relativ langen Reaktionszeit von 16,8 h und einer mittleren Lösemittelmenge von 56,4 Gew. % wird rechnerisch ein OO-Wert von 9,5 % erreicht, dies entspricht einer Ausbeute von 90,5 %. Für Senföl lag die optimale Enzymmenge bei 5,3 g mol<sub>C=C</sub><sup>-1</sup>, die Temperatur bei

40 °C, die Reaktionszeit bei 18,0 h und die Lösemittelmenge bei 56,6 Gew. % bezogen auf die organische Phase. Diese Parameterzusammensetzung führt auf Basis der Modellgleichung zu einem OO-Gehalt von 6,0 %, dies entspricht einer Ausbeute von 101,7 %.

**Tabelle 19: Auswahl optimierter Prozessbedingungen zur Epoxidierung von Drachenkopf- und Senföl mit Hilfe des Optimierungstools von Design-Expert®.**

	Ziel	Gewichtung	Min	Max	Vorhergesagtes Optimum		
					DO	SO	
Enzymmenge (g mol <sub>C=C</sub> <sup>-1</sup> )	Minimum	4	5	10	8,2	5,3	
Temperatur (°C)	Im Bereich	-	30	50	33	40	
Zeit (h)	Im Bereich	-	6	18	16,8	18,0	
Lösemittelmenge (Gew.%)	Minimum	4	25	75	56,4	56,6	
Erwarteter OO-Wert (%)	Maximum	5	DO	8,4	10,5	9,5	-
			SO	4,7	7,1	-	6,0

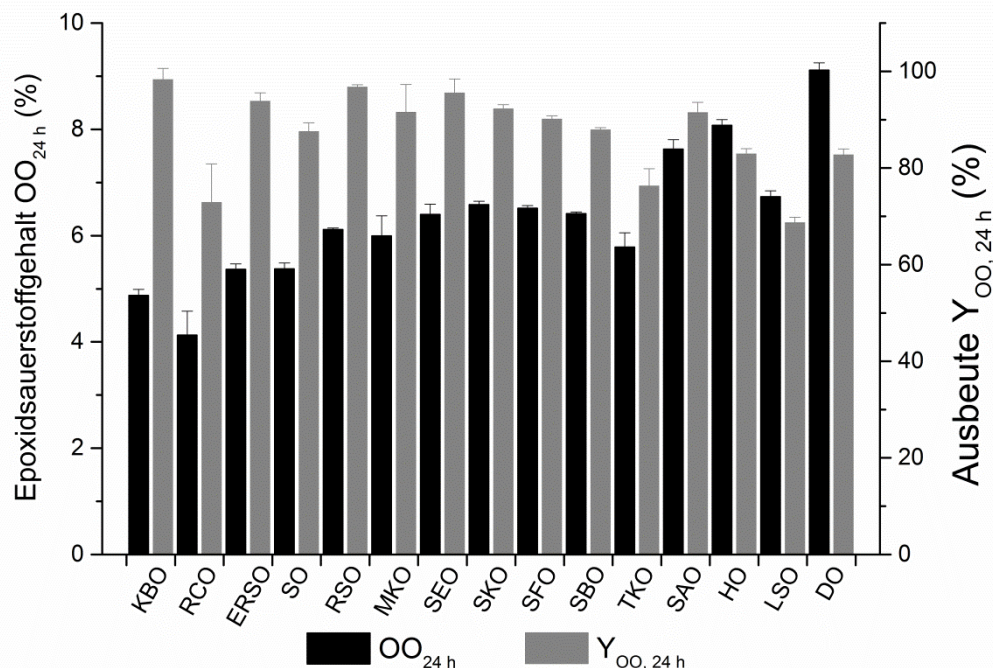
Diese optimierten Parameterkombinationen wurden anschließend im Rahmen einer Evaluierung experimentell überprüft. Für Drachenkopföl konnte ein Epoxidsauerstoffgehalt von  $8,9 \pm 0,1$  % erreicht werden, was einer Ausbeute von ca. 82,5 % entspricht. Damit liegt der erreichte Epoxidgehalt etwas unter dem, der für diese Parameterkombination durch das Modell vorhergesagt wurde (9,5 %). Bei Senföl wurden in Evaluierungsexperimenten Epoxidsauerwerte von  $5,4 \pm 0,2$  % erzielt. Der vorhergesagte Wert für Senföl lag im Vergleich dazu bei 6,0 %. Die Evaluierungsexperimente zeigten somit, dass die ermittelten Modellgleichungen für Drachenkopf- und Senföl die Zielgröße „Epoxidsauerstoffgehalt“ mit guter Genauigkeit vorhersagen.

#### 4.4.2.3 Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle bei optimierten Reaktionsbedingungen

Der Prozess zur Epoxidierung der beiden ausgewählten nicht-essbaren Pflanzenöle (Drachenkopf- und Senföl) wurde mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung für zwei hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung sehr unterschiedliche Öle untersucht und geeignete Prozessbedingungen im Hinblick auf Reaktionstemperatur, Zeit, Enzym- und Lösemittelmenge definiert. Zur Erweiterung des Substratspektrums wurden weitere Pflanzenöle bei optimierten Reaktionsbedingungen mit einer Enzymdosierung von 7,5 g Novozym® 435 pro Mol C=C-Doppelbindung, einem Lösemittelanteil von 60 Gew. %, einem Wasserstoffperoxidverhältnis vom 2 Mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Mol C=C-Doppelbindung und einer Reaktionstemperatur von 33 °C für 24 h umgesetzt. Aufgrund des massenmäßig festgelegten Lösemittelanteils bezogen auf die Gesamtmasse der organischen Phase von 60 Gew. %

ergaben sich wegen der unterschiedlichen mittleren Molmasse verschiedener Pflanzenöle Triglyzeridkonzentrationen im Bereich von 0,336 bis 0,389 M. Dieser Konzentrationsbereich liegt deutlich über den zumeist in der Literatur eingesetzten Konzentrationen, die im Bereich von 0,06 bis 0,2 M liegen [17, 18, 155-157].

Die erhaltenen Epoxidprodukte wurden hinsichtlich Epoxidsauerstoffgehalt, Viskosität und Schmelzverhalten charakterisiert, um den Einfluss der Fettsäurezusammensetzung der verwendeten Pflanzenöle auf die zu erzielenden Produktcharakteristika zu beschreiben. Zur weiteren Bewertung der chemo-enzymatischen Epoxidierungsreaktion wurde die Ausbeute für die einzelnen Pflanzenöle auf Basis des theoretisch maximal möglichen Epoxidsauerstoffgehaltes ( $OO_{\max}$ , siehe auch Tabelle 16) berechnet. Der Epoxidsauerstoffgehalt und die Ausbeute für die chemo-enzymatisch epoxidierten Pflanzenöle sind in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26:** Mittlerer gemessener Epoxidsauerstoffgehalt (schwarz) und Epoxidausbeute (grau) bei der Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle.

Die Epoxidsauerstoffausbeute ( $Y_{OO}$ ) wurde auf Basis des maximal erreichbaren OO-Gehalts aus Tabelle 16 berechnet. KBO - Krambeöl, RCO - Reisöl, SO - Senföl, ERSO - Erucarapsöl, RSO - Rapsöl, SEO - Sesamöl, MKO - Maiskeimöl, SBO - Sojaöl, SKO - Schwarzkümmelöl, SFO – Sonnen-blumenöl, TKO - Traubenkernöl, SAO - Safloröl, HO - Holunderkernöl, LSO - Leinsamenöl, DO – Drachenkopfl.

Abbildung 26 zeigt, dass mit der chemo-enzymatischen Epoxidierung bei den in der vorliegenden Arbeit optimierten Reaktionsbedingungen für alle verwendeten Pflanzenöle nach 24 h Reaktionszeit Epoxidausbeuten zwischen 70 und >90 % erzielt werden konnten. Es ist bei den verschiedenen eingesetzten Ölen mit Ausbeuten im Bereich von 70 % nicht

auszuschließen, dass Bestandteile des verwendeten Pflanzenöls einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von Novozym® 435 ausüben und es daher zu niedrigeren Ausbeuten nach vergleichbarer Reaktionszeit kam. Beim Einsatz von Novozym® 435 zur Herstellung von Biodiesel aus pflanzlichen Ölen zeigte sich, dass Phospholipide die enzymatische Abspaltung von Fettsäuren aus Triacylglyceriden hemmen [194]. Bei der Epoxidierung von  $\alpha$ -Pinen wurde ein inhibitorischer Effekt nach Zugabe von mehr als 2 M Octansäure beobachtet [195].

Kinetische Untersuchungen von Vlček *et al.* haben gezeigt, dass Reaktionsbedingungen, wie die Menge an Lösemittel, die Enzymkonzentration und die Reaktionstemperatur, entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute der Reaktion haben [157]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflussfaktoren für unterschiedliche Öle untersucht, die sich hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung deutlich unterscheiden, und so optimierte Reaktionsbedingungen definiert (siehe Kapitel 4.4.2.2). Es hat sich herausgestellt, dass sich die optimierten Reaktionsbedingungen im untersuchten Versuchsraum je nach verwendetem Pflanzenöl hinsichtlich minimierter Enzymmenge und vor allem auch der optimalen Reaktionstemperatur unterscheiden. Reaktionstemperaturen von mehr als 40 °C hatten bei Senf- und Drachenkopfl eine Abnahme der Epoxidsauerstoffausbeute zur Folge. Bei Temperaturen um 30 °C war der Umsatz bei Senföl mit einem sehr hohen Anteil einfach ungesättigter Fettsäuren stärker limitiert als bei Drachenkopfl mit einem hohen Anteil dreifach ungesättigter Linolensäure. Dieser Effekt ist auf die geringere Reaktivität der C=C-Doppelbindung einfach ungesättigter Fettsäure zurückzuführen [163]. Rüschen, Klaas und Warwel konnten bei der enzymatischen Epoxidierung von Raps-, Sonnenblumen-, Soja- und Leinsamenöl unter Verwendung einer höheren Enzymdosierung von 20 g Novozym® 435 mol<sup>-1</sup> C=C-Doppelbindung und einer deutlich geringeren Substratkonzentration von 0,1 M vergleichbare Epoxidausbeuten von 80 bis 96 % erzielen. Aufgrund der geringeren Substratkonzentration wurden bei vergleichbaren Inkubationszeiten allerdings im Vergleich zu dieser Arbeit geringere Raum-Zeitenausbeuten erreicht [17, 18]. Sun *et al.* untersuchten die Epoxidierung von Maiskeimöl und *Sapindus mukorossi* Öl bei Substratkonzentrationen unter 0,2 M für Öle mit einer Jodzahl unter 115 g J<sub>2</sub> pro 100 g Öl [155, 156]. Bei der Umsetzung von Maiskeimöl konnten Sun *et al.* unter Zugabe von 28 Gew.% Stearinsäure, einem molaren Verhältnis von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu C=C-Doppelbindungen von 2,7 und 35 °C nach 10 h Reaktionszeit eine Epoxidausbeute von 85 % erzielen [155]. In der vorliegenden Arbeit lag die Zugabe von freien Fettsäuren mit maximal 12 Gew. % und Wasserstoffperoxid mit 2 Mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Mol C=C-Doppelbindung deutlich unterhalb der von Sun *et al.* eingesetzten Mengen. Bei der Umsetzung von *Sapindus mukorossi* Öl (JZ 84,9 g J<sub>2</sub> pro 100 g Öl) setzten Sun *et al.* bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C sogar 4 Mol Wasserstoffperoxid pro Mol C=C-Doppelbindung ein und erhielten nach 7 h Reaktionszeit eine Epoxidausbeute von 90 % [156]. Die Zugabe

von Wasserstoffperoxid im hohen molaren Überschuss und eine Inkubation bei hohen Temperaturen sind allerdings aus Sicht der Enzymstabilität zu vermeiden [117-119]. Damit sind die im Rahmen dieser Arbeit optimierten Reaktionsbedingungen den in der Literatur beschriebenen Bedingungen aufgrund der gesteigerten Raum-Zeit-Ausbeuten und wegen der geringeren Beanspruchung des Biokatalysators durch höhere Temperaturen in Kombination mit hoher Wasserstoffperoxidexposition vorzuziehen.

#### 4.4.2.4 Einfluss der Fettsäurezusammensetzung auf die Viskosität nativer und epoxidierter Pflanzenöle

##### *Untersuchung des Einflusses der Epoxidierung auf die Viskosität der Pflanzenöle*

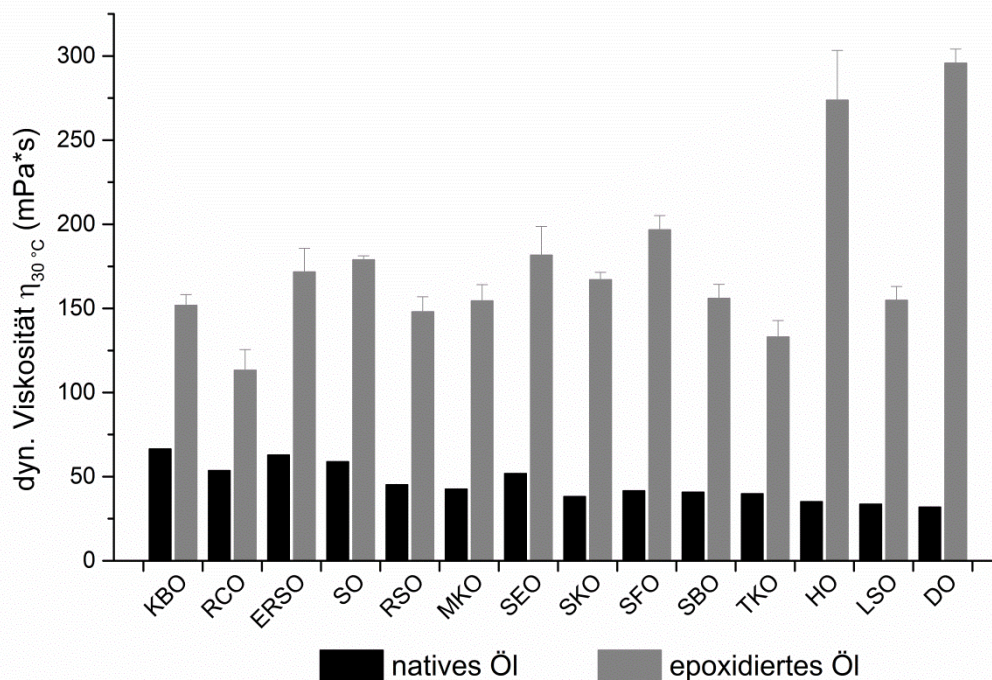
Die Viskosität stellt eine wichtige Kenngröße für mögliche Anwendungsgebiete epoxidierter Pflanzenöle dar. Bei der Umsetzung nativer Öle zu deren Epoxiden kann die Viskosität oder eine mögliche Viskositätsänderung den Prozess aufgrund sich ändernder Durchmischung beeinflussen. So hängt die Wahl eines geeigneten Rührers für chemische Modifikationen im industriellen Maßstab von der Viskosität des Substrates und des Produktes ab [196].

Zur Charakterisierung des Fließverhaltens der nativen und epoxidierten Öle wurde die Schubspannung bei in logarithmischen Schritten erhöhten Scherraten im Bereich von  $0,1 \text{ s}^{-1}$  bis  $1000 \text{ s}^{-1}$  gemessen. Es wurde gezeigt, dass es sich bei den verwendeten Ölen und deren Epoxiden um newtonsche Fluide handelt, deren Fließverhalten durch die Viskosität charakterisiert werden kann. Das newtonsche Verhalten ließ sich aus dem linearen Verlauf der Auftragung der Schubspannung über die Scherrate ableiten. Ab einer Scherrate von etwa  $10 \text{ s}^{-1}$  wurde für alle nativen und epoxidierten Öle eine konstante von der Scherrate unabhängige Viskosität gemessen. Entsprechende Fließkurven wurden im Anhang dargestellt (siehe Anhang, Abbildung 69 bis Abbildung 71).

Um die Auswirkung der Epoxidierung auf die Viskosität zu beurteilen, wurde nach der Bestimmung des Fließverhaltens die Viskosität der nativen und epoxidierten Öle bei einer Temperatur von  $30 \text{ °C}$  und einer konstanten Scherrate von  $60 \text{ s}^{-1}$  gemessen. Die gemessenen dynamischen Viskositäten sind graphisch in Abbildung 27 dargestellt. Das Drachenkopfföl hat mit  $31,9 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  die geringste gemessene Viskosität während Krambeöl mit einem Wert von  $66,8 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  die höchste Viskosität der nativen Pflanzenöle aufweist. Für Leinsamenöl, das im Vergleich zu Drachenkopfföl einen etwas geringeren Gehalt mehrfach ungesättigter Fettsäuren aufweist, wurde in der Literatur eine geringfügig niedrigere Viskosität von  $33 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  aufgeführt [163]. In der vorliegenden Arbeit wurde für Leinsamenöl mit  $33,7 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  eine vergleichbare dynamische Viskosität gemessen. Zu den im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Viskositäten wurden vergleichbare Werte auch für Soja-, Sonnenblumen- und Erucarapsöl veröffentlicht.



So wurde für Erucarapsöl von Thomas eine Viskosität von 60 mPa\*s beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit bei 62,8 mPa\*s lag [163]. Unterschiede lassen sich auf kleinere Differenzen in der Fettsäurezusammensetzung zurückführen. Für Krambeöl, das wie Erucarapsöl einen Erucasäuregehalt von 58 % aufweist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Viskosität von 66,8 mPa\*s gemessen. Der Viskositätsunterschied kann durch den geringeren Gehalt mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Krambeöl begründet werden. Im Vergleich zu den nativen Ölen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Viskosität in den epoxidierten Pflanzenölen (siehe Abbildung 27).



**Abbildung 27: Vergleich der dynamischen Viskosität verschiedener nativer Pflanzenöle (schwarz) und der entsprechenden epoxidierten Pflanzenöle (grau) (n = 3).**

**KBO - Krambeöl, RCO - Reisöl, SO - Senföl, ERSO - Erucarapsöl, RSO - Rapsöl, SEO - Sesamöl, MKO - Maiskeimöl, SBO - Sojaöl, SKO - Schwarzkümmelöl, SFO - Sonnenblumenöl, TKO - Traubenkernöl, HO - Holunderkernöl, LSO - Leinsamenöl, DO - Drachenkopfl.**

Wie erwartet zeigte sich für alle epoxidierten Pflanzenöle eine Zunahme der Viskosität gegenüber dem nativen Pflanzenöl. Untersuchungen von Sharma *et al.* mit epoxidiertem Ölsäure-, Linolsäure- und Linolensäuremethylester haben gezeigt, dass die Viskosität bei epoxidiertem Linolensäuremethylester mit drei Oxirangruppen deutlich höher war als bei den Fettsäureestern mit geringerem Oxirananteil. Die Zunahme der Viskosität beruht auf den zusätzlichen Elektronenpaaren, die in der Oxirangruppe enthalten sind. Diese Elektronenpaare verursachen stärkere intermolekulare Wechselwirkungen im Pflanzenöl und erhöhen damit die Viskosität [197]. Neben der Erhöhung der Viskosität durch stärkere intermolekulare

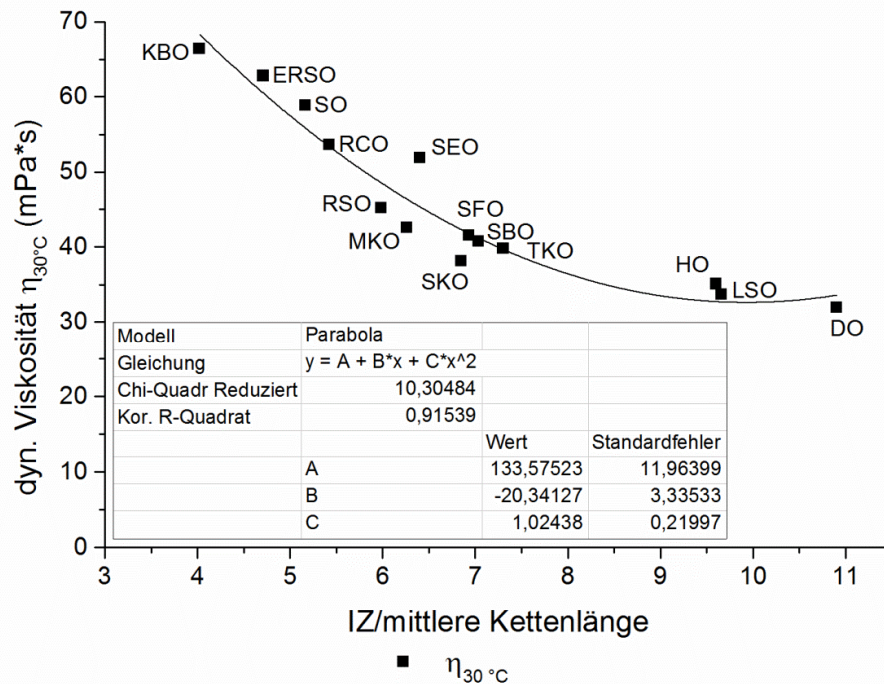
Wechselwirkungen können auch Polymerisationsprodukte zu einer Viskositätserhöhung beitragen. Eine Auswahl an epoxidierten Öle wurde daher freundlicherweise bei der Firma Hobum Oleochemicals GmbH mit Hilfe von Gel-Permeations-Chromatographie (GPC, System Gold V711 der Firma Beckman) auf Polymerisationsprodukte hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Triglyzeridanteil in epoxidiertem Drachenkopföl bei 89 %, bei Senfölepoxyd bei 91 % und bei epoxidiertem Schwarzkümmelöl bei 93 % lag. Der Triglyzeridanteil lag in einem zur chemischen Epoxidierung vergleichbaren Bereich, wobei der Polymeranteil bei der enzymatischen Epoxidierung geringer war. Im Vergleich dazu war der Monomeranteil bei der enzymatischen Epoxidierung im Vergleich zur chemischen Variante höher. Grund dafür ist die verfahrensbedingte Zugabe freier Fettsäuren bei der enzymatischen Umsetzung [198]. Im Vergleich zu dem Triglyzeridgehalt der enzymatisch epoxidierten Pflanzenöle bestehen native Öle üblicherweise zu 96 bis 99 % aus einer komplexen Mischung von Triglyzeriden [189]. Durch die GPC-Untersuchungen konnte der Erhalt der Triglyzeridstruktur bei der enzymatischen Epoxidierung gezeigt und eine Viskositätserhöhung aufgrund von Polymerisationsprodukten ausgeschlossen werden.

*Beschreibung des Zusammenhangs zwischen der Viskosität und den Eigenschaften der Pflanzenöle und deren Epoxide*

Die Viskosität des nativen Pflanzenöls mit fünf Molprozent Ölsäure wurde gegen die Jodzahl pro mittlere Kettenlänge des Pflanzenöls auf der x-Achse aufgetragen, um eine mögliche Korrelation zwischen der Viskosität und der Pflanzenölstruktur zu identifizieren (siehe Abbildung 28). Dabei wurde die mittlere Kettenlänge nach der Formel 2 aus der Fettsäurezusammensetzung berechnet.

$$\bar{K} = \frac{\sum x_i \cdot nC}{\sum x_i} \quad \text{Formel 2}$$

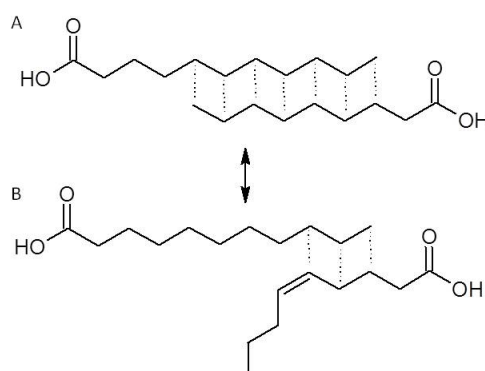
Durch die Auftragung der Viskosität der nativen Pflanzenöle gegen die auf die mittlere Kettenlänge bezogene Jodzahl erhält man einen Zusammenhang, der sich durch eine Funktion 2. Ordnung der Form  $y = 1,0 x^2 - 20 x + 133$  annähern lässt. Durch die Wahl der Kettenlängen-bezogenen Jodzahl als Parameter auf der x-Achse wurde berücksichtigt, dass die Viskosität eines Öls sowohl von der Länge der Fettsäuren als auch von der Anzahl der C=C-Doppelbindungen abhängt (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28: Korrelation zwischen der Viskosität der nativen Pflanzenöle und der gemessenen Jodzahl pro mittlere Kettenlänge.**

KBO - Krambeöl, RCO - Reisöl, SO - Senföl, ERSO - Erucarapsöl, RSO - Rapsöl, SEO - Sesamöl, MKO - Maiskeimöl, SBO - Sojaöl, SKO - Schwarzkümmelöl, SFO - Sonnen-blumenöl, TKO - Traubenkernöl, HO - Holunderkernöl, LSO - Leinsamenöl, DO - Drachenkopfl.

Die Jodzahl ist ein Maß für den Gehalt an C=C-Doppelbindungen in 100 g Öl. Der Anteil ungesättigter Kohlenstoffbindungen beeinflusst die Viskosität wesentlich, da die C=C-Doppelbindungen aufgrund der üblicherweise in natürlichen Fettsäuren vorliegenden *cis*-Konfiguration ein Abknicken der geraden Fettsäure zur Folge haben. Dieses Abknicken der Fettsäurekette führt zu einer Schwächung der Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Teilen der Fettsäure und damit zu einer geringeren Viskosität.



**Abbildung 29: Abhängigkeit der Viskosität von der Kettenlänge (A) und der Anzahl der C=C-Doppelbindungen (B).**

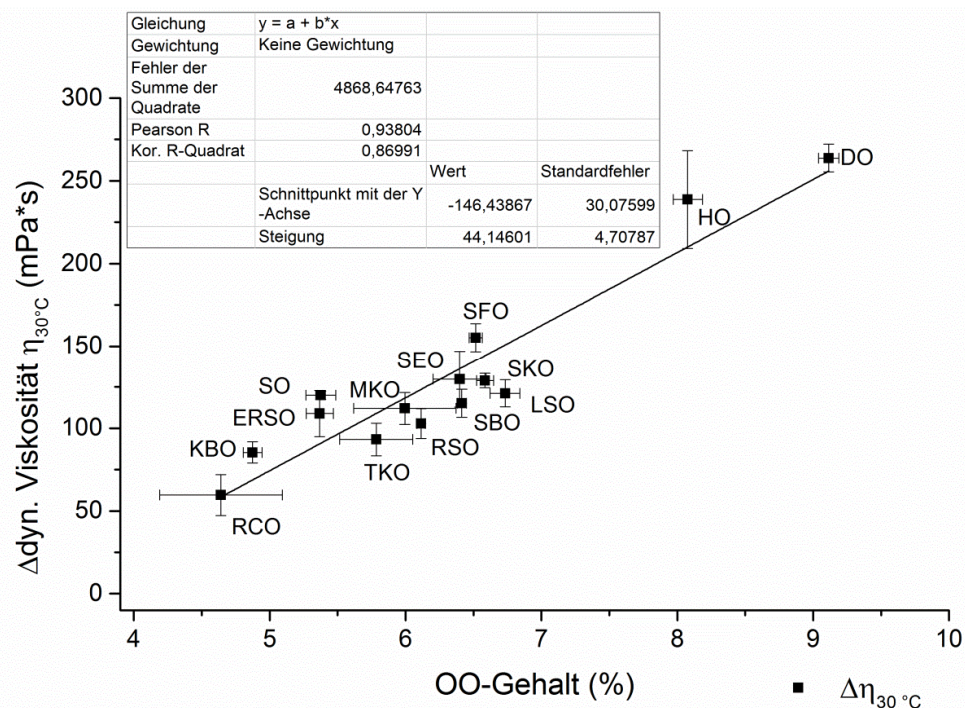
Die Viskosität langer gesättigter Fettsäuren ist aufgrund der vielen intermolekularen Wechselwirkungen sehr hoch. Durch C=C-Doppelbindungen werden die Wechselwirkungen geschwächt und die Viskosität nimmt ab.

Entgegen dem Effekt der abgewinkelten Kohlenstoffkette wirkt die Länge der unpolaren Kohlenwasserstoffkette. Zwischen langen Ketten mit mehr Kohlenstoffatomen bilden sich vermehrt induzierte stärkere van-der-Waals-Kräfte aus, die die Viskosität erhöhen [163, 199]. Für die Darstellung von Korrelationsbeziehungen müssen beide Faktoren berücksichtigt werden. Daher wurde die Jodzahl als Maß für die C=C-Doppelbindungen ins Verhältnis zur mittleren Kettenlänge der im Öl enthaltenen Fettsäuren gesetzt.

In Abbildung 27 ist die Zunahme der dynamischen Viskosität aufgrund der Umsetzung des nativen Öls zum Epoxid für unterschiedliche Pflanzenöle dargestellt. Zur Beschreibung des Einflusses der Epoxidierung wurde in Abbildung 30 die Differenz zwischen der Viskosität des epoxidierten Öls und des nativen Öls (berechnet nach Formel 3) direkt gegen den gemessenen Epoxidsauerstoffgehalt aufgetragen.

$$\Delta \text{Viskosität} = \text{Viskosität (epoxy. Öl)} - \text{Viskosität (natives Öl)}$$

Formel 3



**Abbildung 30: Lineare Abhängigkeit der Viskositätsänderung bei verschiedenen epoxidierten Pflanzenölen vom Epoxidsauerstoffgehalt.**

**KBO - Krambeöl, RCO - Reisöl, SO - Senföl, ERSO - Erucarapsöl, RSO - Rapsöl, SEO - Sesamöl, MKO - Maiskeimöl, SBO - Sojaöl, SKO - Schwarzkümmelöl, SFO – Sonnenblumenöl, TKO - Traubenkernöl, HO - Holunderkernöl, LSO - Leinsamenöl, DO – Drachenkopföl.**

Die Viskositätsänderung wurde als Variable zur Auftragung auf der y-Achse gewählt, um so direkt den Einfluss des Epoxidierungsgrades verschiedener Öle auf deren Viskosität darzustellen. Durch die Bereinigung der Viskosität des Epoxidöls um die des nativen Pflanzenöls werden die Effekte unterschiedlicher Fettsäurekettenlänge und vorhandener

Krümmungen aufgrund von *cis*-Doppelbindungen berücksichtigt und dadurch eine im Vergleich zur direkten Auftragung der Viskosität über den Epoxidsauerstoffgehalt bessere Anpassung erreicht. Der Zusammenhang zwischen der Viskositätsänderung und dem Epoxidsauerstoffgehalt ließ sich durch die Geradengleichung mit der Formel  $y = 44 x - 146$  annähern. Damit steht die Viskositätszunahme bei epoxidierten Pflanzenölen direkt linear in Zusammenhang mit dem im Pflanzenöl vorliegenden Epoxidgehalt.

Die Viskositätszunahme in epoxidierten Pflanzenölen ist auf die verstärkten Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten zurückzuführen. In nativen Ölen existieren schwache auf induzierten Dipolen beruhende van-der-Waals-Kräfte. Durch die Addition von Sauerstoffatomen an die Doppelbindung der Kohlenstoffkette treten vermehrt Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den freien Elektronen des Sauerstoffatoms und den polar gebundenen Wasserstoffatomen benachbarter Fettsäuren auf, die eine verstärkte Wechselwirkung zwischen den Molekülen erzeugen und so die Viskosität erhöhen [197].

#### 4.4.2.5 Einfluss der Fettsäurezusammensetzung auf das Schmelz- und Kristallisationsverhalten verschiedener nativer und epoxidierter Pflanzenöle

Das Schmelz- und Kristallisationsverhalten kann neben der in Abschnitt 4.4.2.4 behandelten Viskosität bei der Auswahl epoxidierter Pflanzenöle für eine spezifische Anwendung von entscheidender Bedeutung sein. Während für einen Einsatz als Additiv in Kunststoffen oft ein hoher Epoxidsauerstoffgehalt wichtig ist, spielt bei der Verwendung als Reaktivverdünner in Farben und Lacken eine geringe Viskosität des Epoxidderivates eine große Rolle [18, 159, 160]. Im Hinblick auf die Verarbeitung zum Endprodukt kann auch das Schmelz- und Kristallisationsverhalten der Epoxide Bedeutung haben. Eine Kristallisation des als Reaktivverdünner verwendeten Epoxidöls bei moderaten Temperaturen könnte beispielsweise den Gebrauch der Formulierung als homogenes Gemisch erschweren. Eine Kristallisation des Epoxidderivates sollte auch während der Epoxidierungsreaktion vermieden werden, da es aufgrund einer Verfestigung des Reaktionsansatzes zu unvollständigen Umsätzen kommen kann [114]. Aus diesen Gründen beschäftigt sich ein Teil dieser Arbeit mit der Charakterisierung des Schmelz- und Kristallisationsverhalten unterschiedlicher nativer und epoxidierter Pflanzenöle mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (DKK, engl. *DSC – Differential Scanning Calorimetry*), um so den Einfluss der Epoxidierung auf das Schmelz- und Kristallisationsverhalten in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat zu beschreiben. In diesem Zusammenhang wurden 15 native Pflanzenöle und deren enzymatisch hergestellte Epoxide charakterisiert.

Zur Unterscheidung unterschiedlicher Pflanzenöle eignen sich nach Schlussfolgerungen von Tan und Man (2000, 2003) vor allem die Offset-Temperatur der Schmelzkurve und die Onset-

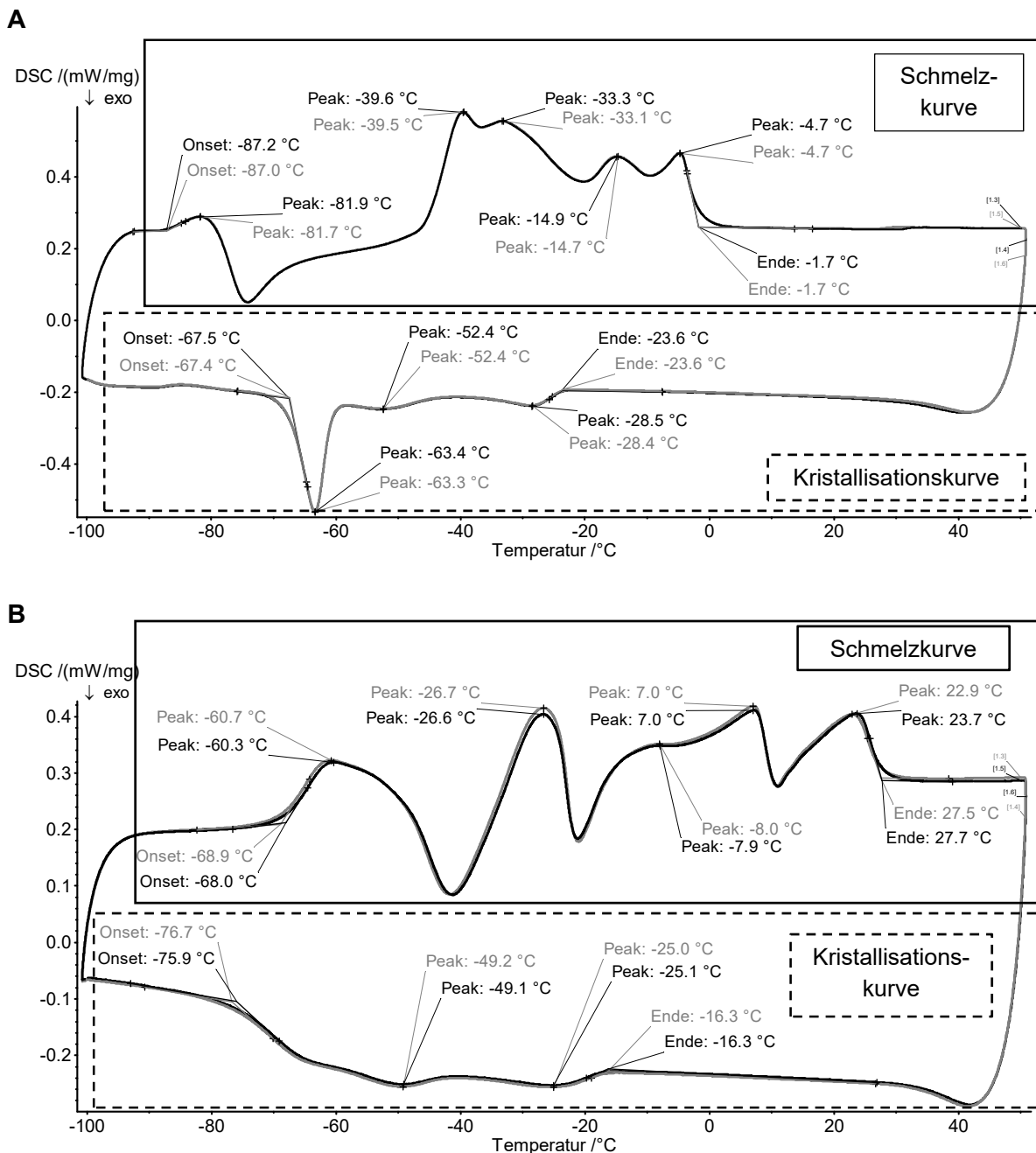
Temperatur der Kristallisationskurve [189, 200]. Untersuchungen zum Einfluss der Heizrate ergaben eine geringe Verschiebung von Offset- und Umwandlungstemperaturen hin zu höheren Temperaturen für zunehmende Heizraten [189]. Entsprechende Betrachtungen zum Effekt verschiedener Kühlraten ergaben Verschiebungen von Onset- und Umwandlungstemperaturen hin zu niedrigeren Temperaturen bei erhöhten Kühlraten [201]. Sowohl für den Schmelz- als auch den Kristallisationsvorgang wurde eine erhöhte Signalintensität mit zunehmender Heiz- oder Kühlrate detektiert. Bei niedrigen Kühlraten zwischen 1 und 5 °C min<sup>-1</sup> wurde ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis festgestellt, wodurch eine Bestimmung der Onset-Temperatur erschwert wurde [201-203]. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der nativen und epoxidierten Pflanzenöle eine Heiz- und Kühlrate von jeweils 10 °C min<sup>-1</sup> ausgewählt.

In Abbildung 31 bis Abbildung 33 sind Thermogramme für drei der 15 untersuchten nativen und epoxidierten Pflanzenöle gezeigt, um beispielhaft den Einfluss der unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung auf das Schmelz- und Kristallisationsverhalten grafisch darzustellen. Es wurden Drachenkopf-, Soja- und Senföl ausgewählt, um jeweils ein Öl aus der Gruppe mit hohem  $\alpha$ -Linolensäure-, Linolsäure- oder Erucasäuregehalt abzubilden. Die DSC-Thermogramme der anderen Pflanzenöle und deren Epoxide sind im Anhang in Abschnitt 8.3.9 gezeigt (siehe Abbildung 72 bis Abbildung 83).

Die Offset-Temperatur der Schmelzkurve entspricht dem Schnittpunkt zwischen der Tangente an der abfallenden Seite des letzten Schmelzpeaks und der extrapolierten Verlängerung der Basislinie. In Abbildung 31 bis Abbildung 33 findet sich die Offset-Temperatur in dem jeweils oberen Kurvenpaar am rechten Ende der Schmelzkurve. Im Gegensatz dazu entspricht die Onset-Temperatur der Kristallisationskurve dem Schnittpunkt zwischen der Tangente am Beginn des ersten Peaks und der Basislinie. Entsprechend ist die Onset-Temperatur der Kristallisationskurven in Abbildung 31 bis Abbildung 33 jeweils in dem unteren Kurvenpaar ebenfalls auf der rechten Seite zu erkennen. Bei der Auswertung von DSC-Thermogrammen werden neben der Onset- und Offsettemperatur üblicherweise der Bereich als Differenz zwischen Onset- und Offset und die als Umwandlungstemperaturen bezeichneten Temperaturen der jeweiligen Peakmaxima angegeben [189, 201-204].

In Abbildung 31 sind die Thermogramme von Drachenkopföl mit einem  $\alpha$ -Linolensäuregehalt von 54 % (siehe Tabelle 16) und dessen Epoxid dargestellt. Es ist eine deutliche Verschiebung der Schmelzkurve des epoxidierten Drachenkopföls (siehe Abbildung 31 B) im Vergleich zum nativen Drachenkopföl (siehe Abbildung 31 A) sowohl auf Basis von Onset- und Offset-Temperatur als auch auf Basis der Umwandlungstemperaturen der endothermen Schmelzpeaks hin zu höheren Temperaturen zu erkennen. Die Offset-Temperatur beim nativen

Drachenkopflag lag bei  $-1,7\text{ °C}$  und verschob sich aufgrund der Epoxidierung um  $29,3\text{ °C}$  auf  $27,6\text{ °C}$  beim Drachenkopflepoxyd. Neben den verschobenen Onset-, Offset- und Umwandlungstemperaturen ist auch ein verändertes Kurvenprofil zu erkennen.



**Abbildung 31:** DSC-Thermogramme für (A) natives Drachenkopflag und (B) epoxidiertes Drachenkopflag.

Das jeweils obere Kurvenpaar entspricht der Schmelzkurve mit vorwiegend endothermen Schmelzpeaks, das untere Kurvenpaar repräsentiert den durch exotherme Peaks gekennzeichneten Kristallisationsvorgang (Heiz- und Kühlrate  $-10\text{ °C min}^{-1}$ , Bereich  $-100$  bis  $50\text{ °C}$ ).

Bei Betrachtung der Kristallisationskurven ist zuerst eine Erhöhung der Onset-Temperatur von  $-23,6\text{ °C}$  beim nativen Drachenkopflag auf  $-16,3\text{ °C}$  beim Drachenkopflepoxyd zu beobachten.

Des Weiteren war der im nativen Drachenkopföl ausgeprägte Kristallisationspeak bei  $-63,4\text{ °C}$  im Epoxidöl nicht mehr zu detektieren (siehe Abbildung 31 A und B).

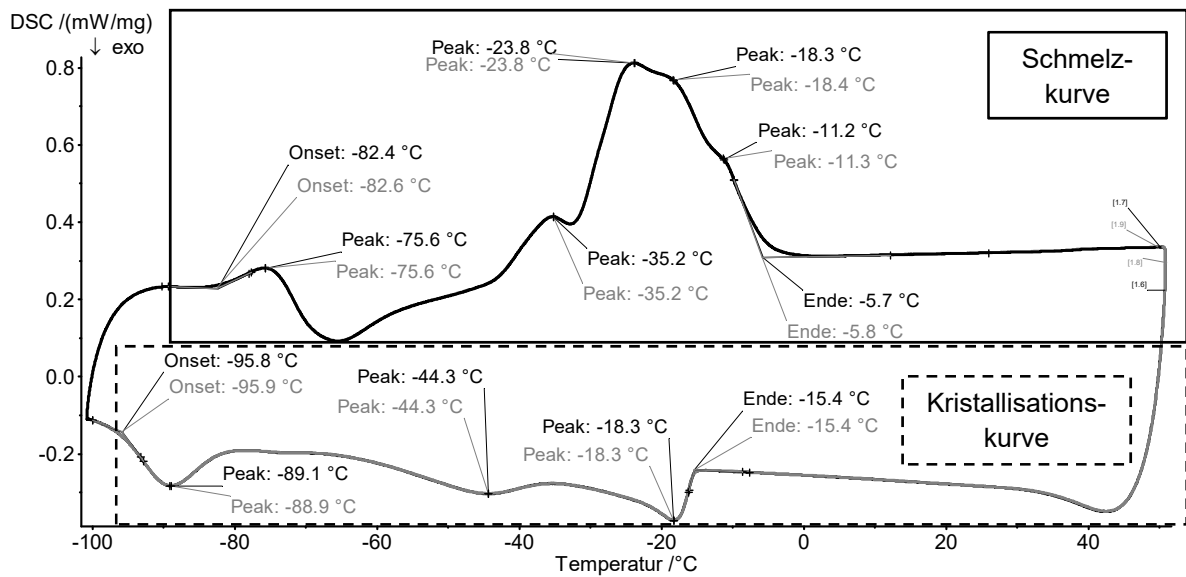
Abbildung 32 zeigt die Schmelz- und Kristallisationskurven von Sojaöl (A) und Sojaölepoxid (B). Im Vergleich zu Drachenkopföl zeichnet sich Sojaöl durch einen hohen Gehalt an Linolsäure von 50 % und einen geringen  $\alpha$ -Linolensäureanteil von 5 % aus (siehe Tabelle 16). Die Schmelzkurve von Sojaöl ist durch einen sehr ausgeprägten Hauptschmelzpeak mit mehreren Schulterpeaks auf der rechten abfallenden Seite charakterisiert. Die Umwandlungstemperatur des intensivsten endothermen Schmelzpeaks ist beim nativen Sojaöl mit  $-23,8\text{ °C}$  höher als die bei Drachenkopföl mit  $-39,6\text{ °C}$  während die Offset-Temperatur mit  $-5,8\text{ °C}$  unter der von Drachenkopföl mit  $-1,7\text{ °C}$  lag. Die Offset-Temperatur der Schmelzkurve von Sojaölepoxid (siehe Abbildung 32) erhöhte sich aufgrund der Epoxidierung auf  $10,7\text{ °C}$ . Damit fiel die Offset-Verschiebung mit  $16,5\text{ °C}$  geringer aus als bei Drachenkopföl. Sojaölepoxid zeigte in der Schmelzkurve einen Hauptschmelzpeak bei einer Umwandlungstemperatur von  $-15,8\text{ °C}$ , während Drachenkopfölepoxid mehrere Schmelzpeaks mit vergleichbarer Intensität zeigte.

Die Kristallisation von Sojaöl begann mit einer Onset-Temperatur von  $-15,4\text{ °C}$  im Gegensatz zu Drachenkopföl mit  $-23,6\text{ °C}$  bei einer höheren Temperatur. Die Onset-Temperatur von Sojaölepoxid war mit  $-10,3\text{ °C}$  im Vergleich zum nicht-funktionalisierten Sojaöl leicht erhöht. Damit war auch die Onset-Temperatur-Verschiebung bei Sojaöl mit  $5,1\text{ °C}$  geringer als bei Drachenkopföl mit  $7,3\text{ °C}$ . Im Vergleich zu dem Hauptkristallisationspeak bei nativem Drachenkopföl bei  $-63,4\text{ °C}$  war beim Sojaöl kein in dieser Form ausgeprägter Hauptpeak zu detektieren. Im Gegensatz dazu wurde bei Sojaölepoxid ein exothermer Hauptpeak bei  $-38,3\text{ °C}$  ermittelt, während Drachenkopfölepoxid keinen deutlichen Hauptkristallisationspeak zeigte.

Im Vergleich zu den Thermogrammen von Drachenkopföl, Sojaöl und deren Epoxide sind die in Abbildung 33 gezeigten Schmelz- und Kristallisationskurven von Senföl durch ein homogeneres Kurvenprofil charakterisiert. Die Schmelzkurven von Senföl und Senfölepoxid zeigen jeweils zwei deutlich ausgeprägte endotherme Schmelzpeaks. Die Onset-, Offset- und Umwandlungstemperaturen der Schmelzkurve sind bei Senfölepoxid im Vergleich zu nativem Senföl um 18 bis  $25\text{ °C}$  hin zu höheren Temperaturen verschoben. Die Umwandlungstemperaturen der beiden Schmelzpeaks bei Senföl lagen mit  $-12,8$  und  $3\text{ °C}$  deutlich über denen von nativem Drachenkopf- und Sojaöl. Die Offset-Temperatur von Senfölepoxid hingegen lag mit  $21,9\text{ °C}$  zwischen denen von Sojaölepoxid mit  $8,0\text{ °C}$  und Drachenkopfölepoxid mit  $27,6\text{ °C}$ .



A



B

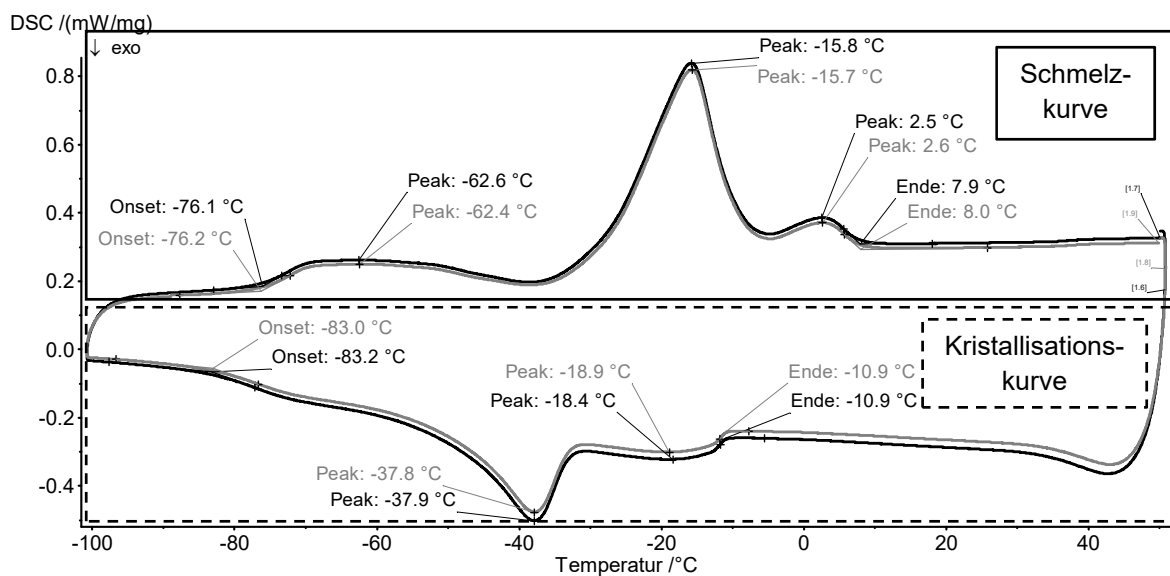
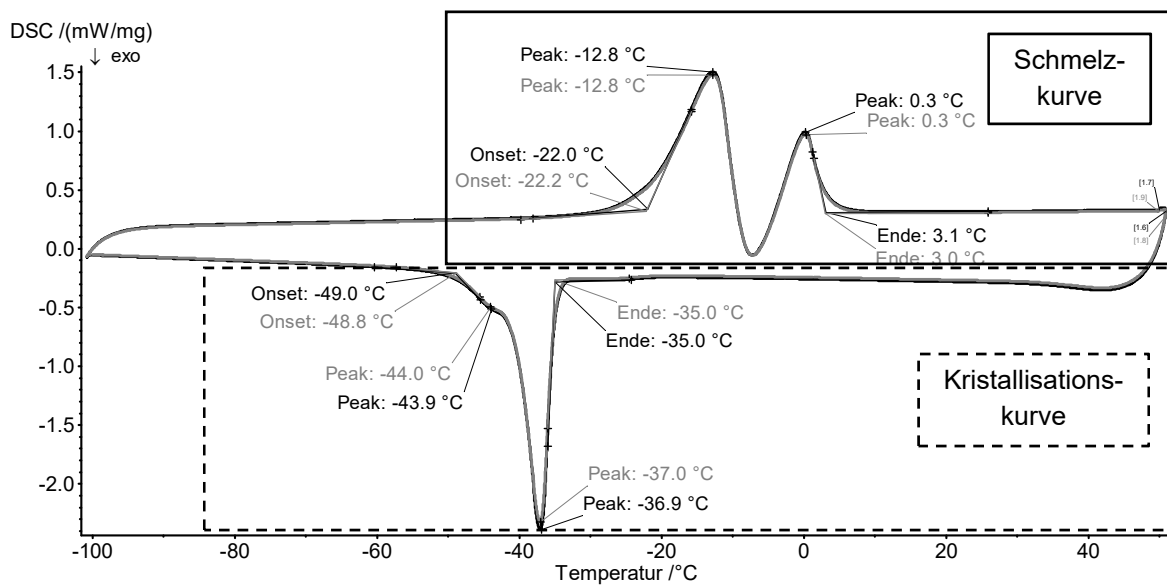


Abbildung 32: DSC-Thermogramme für (A) natives Sojaöl und (B) epoxidiertes Sojaöl.

Das jeweils obere Kurvenpaar entspricht der Schmelzkurve mit vorwiegend endothermen Schmelzpeaks, das untere Kurvenpaar repräsentiert den durch exotherme Peaks gekennzeichneten Kristallisationsvorgang (Heiz- und Kühlrate  $-10\text{ °C min}^{-1}$ , Bereich  $-100$  bis  $50\text{ °C}$ ).

Im Unterschied zu Drachenkopf- und Sojaöl waren die Kristallisationsvorgänge bei Senföl und Senfölepoxyd jeweils durch einen einzelnen ausgeprägten Kristallisationspeak gekennzeichnet. Die Onset-Temperatur bei der Kristallisation von Senfölepoxyd lag mit  $-3,4\text{ °C}$  über der von Drachenkopf- und Sojaölepoxyd, während die Onset-Temperatur von nativem Senföl mit  $-35,0\text{ °C}$  deutlich unter der von nativem Drachenkopf- und Sojaöl zu finden war.

A



B

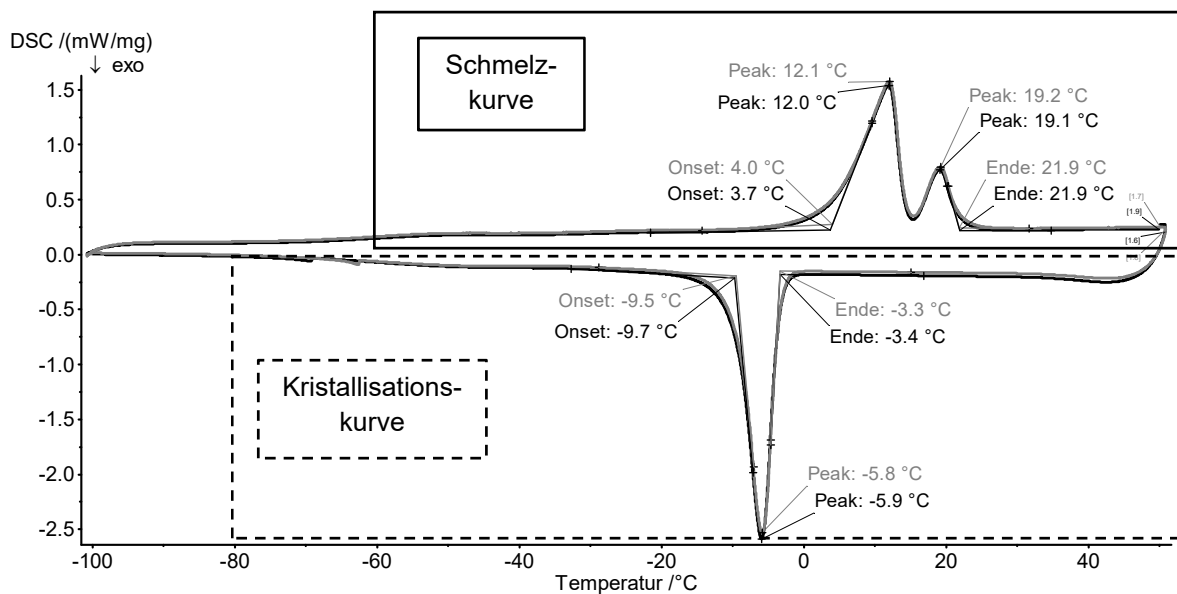


Abbildung 33: DSC-Thermogramme für (A) natives Senföl und (B) epoxidiertes Senföl.

Das jeweils obere Kurvenpaar entspricht der Schmelzkurve mit vorwiegend endothermen Schmelzpeaks, das untere Kurvenpaar repräsentiert den durch exotherme Peaks gekennzeichneten Kristallisationsvorgang (Heiz- und Kühlrate  $-10\text{ °C min}^{-1}$ , Bereich  $-100$  bis  $50\text{ °C}$ ).

Auf Basis der in Abbildung 31 bis Abbildung 33 dargestellten Thermogramme von Drachenkopf-, Soja- und Senföl wurde der Einfluss verschiedener Fettsäurezusammensetzungen und der Epoxidierung auf das Schmelz- und Kristallisationsverhalten beispielhaft für drei Öle dargestellt. Als wesentliche Vergleichsgrößen wurden die Offset-Temperatur der Schmelzkurve und die Onset-Temperatur der Kristallisationskurve angeführt. In Tabelle 20

sind die Onset- und Offset-Temperaturen der Schmelz- und Kristallisationskurven für alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzenöle zusammengefasst.

**Tabelle 20: Vergleich der mittels DSC ermittelten Onset-/Offset-Temperaturen und des Temperaturbereichs verschiedener nativer und epoxidierter Öle für die Schmelz- und Kristallisationskurve (Heiz- und Kühlrate: 10 °C min<sup>-1</sup>, Bereich: -100 bis 50 °C).**

To: Temperaturonset; Tf: Temperaturoffset

	Schmelzkurve			Kristallisationskurve		
	To (°C)	Tf (°C)	Spanne (°C)	To (°C)	Tf (°C)	Spanne (°C)
KBO OA	-18,5 ± 0,1	<b>11,2 ± 0,0</b>	29,7 ± 0,1	<b>-28,3 ± 0,1</b>	-41,4 ± 0,1	13,1 ± 0,0
KBOE ESA	5,6 ± 0,3	<b>20 ± 3</b>	15,0 ± 3	<b>0,6 ± 0,5</b>	-8,1 ± 1,2	8,7 ± 0,7
RCO OA	n. d.	<b>2,1 ± 0,1</b>	n. d.	<b>-9,4 ± 0,1</b>	-85,4 ± 0,3	75,1 ± 0,4
RCOE ESA	n. d.	<b>18,0 ± 0,2</b>	n. d.	<b>-6,8 ± 0,1</b>	-48,3 ± 0,2	42,6 ± 0,1
SO OA	-22,1 ± 0,1	<b>3,1 ± 0,1</b>	25,2 ± 0,1	<b>-35,0 ± 0,1</b>	-48,9 ± 0,2	13,9 ± 0,2
SOE ESA	4,3 ± 0,6	<b>21,9 ± 0,1</b>	17,6 ± 0,6	<b>-1,5 ± 2,1</b>	-8,4 ± 1,4	6,9 ± 0,8
ERSO OA	-20,5 ± 0,1	<b>8,6 ± 0,1</b>	29,1 ± 0,1	<b>-31,1 ± 0,1</b>	-41,2 ± 0,2	10,1 ± 0,2
ERSOE ESA	6,3 ± 0,2	<b>20,7 ± 0,2</b>	14,5 ± 0,3	<b>0,7 ± 0,8</b>	-6,6 ± 0,3	7,3 ± 0,7
RSO OA	-33,4 ± 0,2	<b>-8,4 ± 0,1</b>	25 ± 0,2	<b>-20,5 ± 0,3</b>	-79,4 ± 0,3	58,9 ± 0,5
RSOE ESA	-12,9 ± 0,1	<b>31,1 ± 0,9</b>	43,9 ± 0,8	<b>-21,8 ± 0,3</b>	-27,9 ± 0,3	6,1 ± 0,1
SEO OA	-82,9 ± 0,2	<b>-5,5 ± 0,1</b>	77,5 ± 0,2	<b>-12,3 ± 0,1</b>	-92,3 ± 0,3	80,0 ± 0,3
SEOE ESA	-72,0 ± 0,3	<b>21,9 ± 0,5</b>	42,5 ± 0,9	<b>-8,2 ± 0,1</b>	-39,0 ± 0,1	30,8 ± 0,1
MKO OA	-81,5 ± 0,1	<b>-7,5 ± 0,1</b>	74,0 ± 0,2	<b>-18,9 ± 0,1</b>	-94,3 ± 0,1	75,4 ± 0,1
MKOE ESA	-76,0 ± 0,2	<b>13,8 ± 0,1</b>	89,8 ± 0,2	<b>-12,8 ± 0,1</b>	-83,5 ± 0,1	70,7 ± 0,1
SBO OA	-82,5 ± 0,2	<b>-5,8 ± 0,1</b>	76,8 ± 0,1	<b>-15,4 ± 0,1</b>	-95,9 ± 0,1	80,5 ± 0,1
SBOE ESA	-75,4 ± 1,0	<b>9,3 ± 1,6</b>	84,7 ± 0,7	<b>-10,6 ± 0,4</b>	-82,8 ± 0,4	72,2 ± 0,2
SKO OA	-84,2 ± 0,3	<b>-9,9 ± 0,1</b>	74,4 ± 0,4	<b>-20,5 ± 0,1</b>	-98,0 ± 0,3	77,5 ± 0,3
SKOE ESA	-74,4 ± 0,7	<b>18,4 ± 0,4</b>	97,3 ± 6,0	<b>-15,4 ± 0,2</b>	-81,9 ± 0,9	66,6 ± 0,7
SFO OA	-81,5 ± 0,3	<b>-6,0 ± 0,1</b>	75,5 ± 0,3	<b>-17,6 ± 0,1</b>	-96,3 ± 0,1	78,7 ± 0,1
SFOE ESA	-78,5 ± 0,5	<b>10,8 ± 0,4</b>	89,3 ± 0,5	<b>-11,7 ± 0,4</b>	-86,5 ± 1,4	74,8 ± 1,2
TKO OA	-83,2 ± 0,1	<b>-6,9 ± 0,1</b>	76,3 ± 0,1	<b>-18,9 ± 0,2</b>	-97,7 ± 0,5	78,8 ± 0,3
TKOE ESA	-81,0 ± 0,1	<b>20,2 ± 0,1</b>	101,2 ± 0,1	<b>-16,1 ± 0,1</b>	-89,0 ± 0,1	73,0 ± 0,1
SAO OA	-84,4 ± 0,1	<b>-5,5 ± 0,1</b>	78,9 ± 0,2	<b>-19,2 ± 0,1</b>	-98,9 ± 0,5	79,8 ± 0,4
SAOE ESA	-71,0 ± 0,5	<b>9,9 ± 0,1</b>	80,9 ± 0,4	<b>-33,6 ± 0,1</b>	-78,7 ± 0,2	45,2 ± 0,1
HO OA	-84,7 ± 0,9	<b>-2,7 ± 0,1</b>	82,0 ± 0,9	<b>-42,7 ± 0,2</b>	-82,7 ± 0,3	40,0 ± 0,5
HOE ESA	-68,9 ± 0,1	<b>13,1 ± 0,1</b>	82,0 ± 0,1	<b>-23,6 ± 0,1</b>	-77,0 ± 0,3	53,4 ± 0,3
LSO OA	-85,0 ± 0,1	<b>-4,6 ± 0,1</b>	80,4 ± 0,1	<b>-16,2 ± 0,1</b>	-71,2 ± 0,1	55,1 ± 0,1
LSOE ESA	-77,1 ± 0,6	<b>23,6 ± 0,6</b>	100,6 ± 0,1	<b>-9,9 ± 0,1</b>	-84,9 ± 0,2	75,0 ± 0,3
DO OA	-87,1 ± 0,2	<b>-1,7 ± 0,1</b>	85,4 ± 0,2	<b>-23,6 ± 0,1</b>	-67,5 ± 0,1	43,9 ± 0,1
DOE ESA	-69,7 ± 1,5	<b>27,8 ± 0,4</b>	97,5 ± 1,8	<b>-16,6 ± 0,4</b>	-77,9 ± 1,9	61,3 ± 1,6

KBO/KBOE - Krambeöl/-epoxid, RCO/RCOE - Reisöl/-epoxid, SO/SOE - Senföl/-epoxid, ERSO/ERSOE - Erucarapsöl/-epoxid, RSO/RSOE - Rapsöl/-epoxid, SEO/SEOE - Sesamöl/-epoxid, MKO/MKOE - Maiskeimöl/-epoxid, SBO - Sojaöl/-epoxid, SKO/SKOE - Schwarzkümmelöl/-epoxid, SFO/SFOE - Sonnenblumenöl/-epoxid, TKO/TKOE - Traubenkernöl/-epoxid, SAO/SAOE - Safloröl/-epoxid, HO/HOE - Holunderkernöl/-epoxid, LSO/LSOE - Leinsamenöl/-epoxid, DO/DOE - Drachenkopfl/-epoxid, OA - Ölsäure, ESA – Epoxystearinsäure.

Es wurde festgestellt, dass sich sowohl die Offset-Temperatur der Schmelzkurve als auch die Onset-Temperatur der Kristallisationskurve durch die Einbringung von Epoxidgruppen in das ungesättigte Triglyzerid erhöhen. Das unterschiedliche Schmelzverhalten der nativen Öle lässt sich durch die jeweilige Fettsäurezusammensetzung in Kombination mit dem Schmelzverhalten der freien Fettsäuren und den Triglyzeriden diskutieren, die dreimal mit derselben Fettsäure verestert sind. Die Schmelztemperatur der freien Fettsäure nimmt mit steigender Kettenlänge zu während sie mit zunehmendem Gehalt an C=C-Doppelbindungen abnimmt. Die Schmelztemperatur der gesättigten Fettsäure ist somit höher als die der entsprechenden ungesättigten FS mit gleicher Kettenlänge (siehe Tabelle 12) [162].

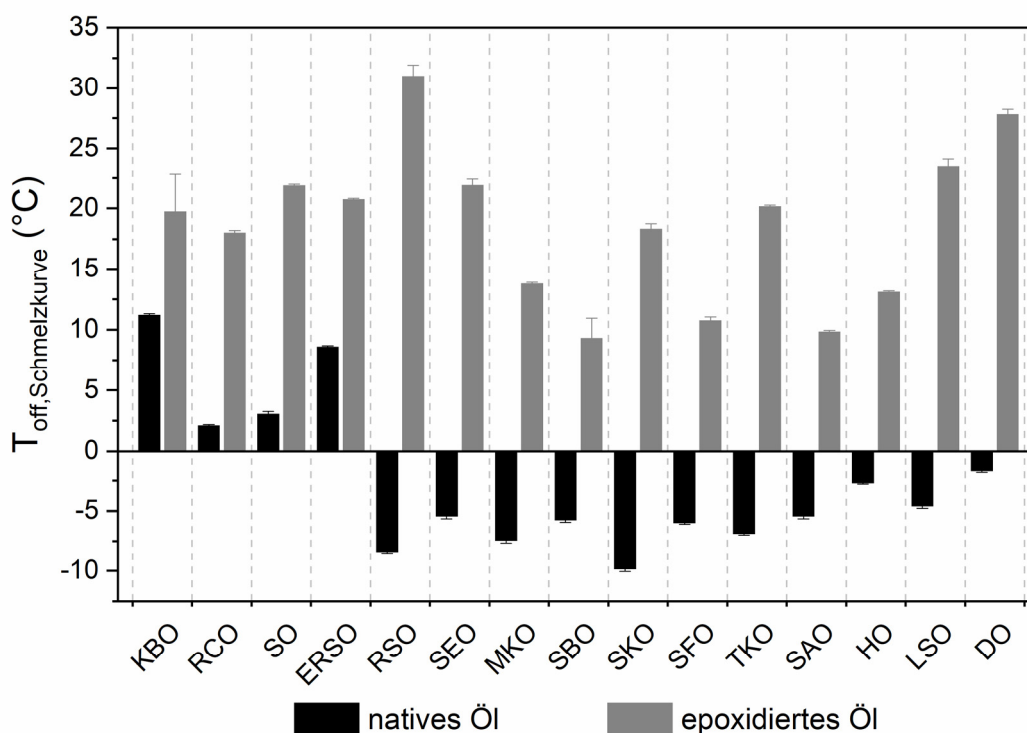
Für Triglyzeride mit drei identischen Fettsäureresten wurde ein unterschiedliches Verhalten für gesättigte und ungesättigte Fettsäuren beobachtet. Während die Schmelztemperatur von Triglyzeriden mit drei gleichen gesättigten Fettsäuren oberhalb der der freien Fettsäure lag, waren die Schmelztemperaturen bei Triglyzeriden mit drei identischen ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zur freien Fettsäure niedriger (siehe Tabelle 12) [163].

Vergleicht man die Schmelzkurven von Drachenkopf-, Soja- und Senföl, so ist der Effekt verschiedener Kettenlängen und des Gehaltes an C=C-Doppelbindungen bei Betrachtung der Schmelzpeaks erkennbar. Beim  $\alpha$ -Linolensäure-reichen Drachenkopföl war der Hauptschmelzpeak mit maximaler Peakhöhe bereits bei  $-39\text{ °C}$  zu beobachten, während dieser bei Sojaöl mit einem hohen Linolsäureanteil bei  $-23,8\text{ °C}$  und bei Erucasäure-reichem Senföl sogar erst bei  $-12,8\text{ °C}$  zu detektieren war.

In Tabelle 20 sind neben den bisher dargestellten Werten für Drachenkopf-, Soja- und Senföl die Onset- und die Offset-Temperatur der Schmelz- und Kristallisationskurve zusammen mit dem Schmelz- und Kristallisationsbereich für alle 15 untersuchten Pflanzenöle und deren Epoxide zusammengefasst, sofern eine Auswertung dieser Kenngrößen anhand der Thermogramme möglich war. Ein Vergleich der Offset-Temperatur der Schmelzkurven der einzelnen nativen Öle mit der der zugehörigen Epoxide zeigte bei allen Ölen eine Temperaturerhöhung. Auch die Onset-Temperatur der Schmelzkurven war aufgrund der Epoxidierung erhöht. Damit ist der Schmelzbereich epoxidierter Öle zu höheren Temperaturen hin verschoben. Vergleichbare Beobachtungen wurden im Zusammenhang mit den Kristallisationskurven gemacht. Mit Ausnahme von Rapsöl waren die Onset- und Offset-Temperaturen der Kristallisationskurven aller Epoxidöle im Vergleich zu der des ungesättigten Substrates hin zu höheren Temperaturen verschoben. Demnach beginnt die Verfestigung epoxidierter Triglyzeride bei deutlich höheren Temperaturen.

Die Verschiebung der Offset-Temperaturen der Schmelzkurven aller epoxidierten Öle (graue Balken) im Vergleich zu denen der nativen Substrate (schwarze Balken) ist in Abbildung 34

zur Veranschaulichung grafisch dargestellt. Eine deutliche Verschiebung hin zu höheren Temperaturen ist bei allen Substraten zu erkennen. Die Öle wurden in Abbildung 34 von links nach rechts mit zunehmender Jodzahl aufgeführt. Bei allen Ölen mit einer Jodzahl über 105 g Jod pro 100 g Öl, das heißt von Raps- bis Drachenkopfl, und einem geringen Anteil gesättigter Fettsäuren oder einfach ungesättigter C22-Fettsäuren lag die Offset-Temperatur unterhalb von 0 °C. Für die Schmelzkurven dieser Öle mit einem zunehmend höheren Gehalt mehrfach ungesättigter C18-Fettsäuren war allerdings keine weitere Erniedrigung der Offset-Temperatur durch beispielsweise einen zunehmenden Gehalt an  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3) zu beobachten. Ein hoher Gehalt an gesättigter Palmitinsäure führt bei Reisöl zu einer Offset-Temperatur über 0 °C. Bei Krambe-, Senf- und Erucarapsöl resultierte der hohe Gehalt an Erucasäure (C22:1) mit 58, 42 und 58 % in hohen Offset-Temperaturen der Schmelzkurven von 11,2, 3,1 und 8,6 °C. Erucarapsöl unterscheidet sich von Krambeöl durch seinen Gehalt an Linol- und Linolensäure, der mit 13,1 beziehungsweise 8,6 % jeweils höher liegt als bei Krambe mit 10,1 beziehungsweise 6,9 %, was zu einer geringeren Offset-Temperatur bei Erucarapsöl im Vergleich zu Krambeöl führte.



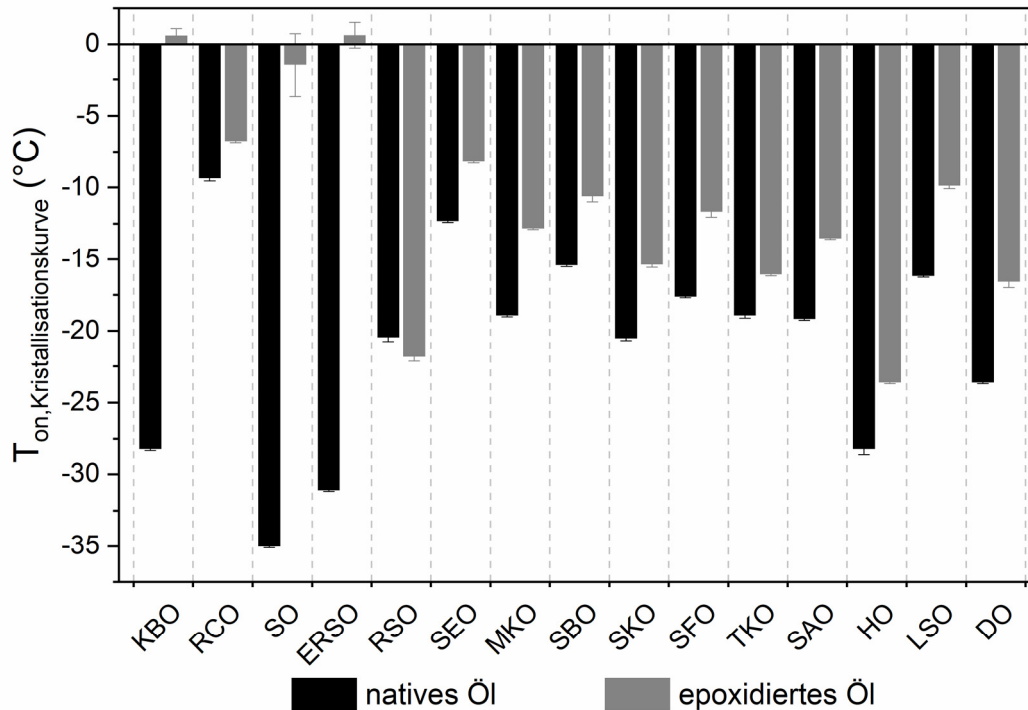
**Abbildung 34:** Vergleich mittels DSC gemessener Offset-Temperaturen der Schmelzkurven unterschiedlicher nativer Öle und deren enzymatisch hergestellten Epoxiden (Heizrate - 10 °C min<sup>-1</sup>, -50 bis 100 °C).

KBO - Krambeöl, RCO - Reisöl, SO - Senföl, ERSO - Erucarapsöl, RSO - Rapsöl, SEO - Sesamöl, MKO - Maiskeimöl, SBO - Sojaöl, SKO - Schwarzkümmelöl, SFO - Sonnenblumenöl, TKO - Traubenkernöl, SAO - Safloröl, HO - Holunderkernöl, LSO - Leinsamenöl, DO - Drachenkopfl.

Senföl unterscheidet sich von den beiden anderen Erucasäure-reichen Ölen in seinem mit 42 % im Vergleich zu 58 % niedrigeren C22:1-Gehalt und hat daher eine niedrigere Offset-Temperatur von 3,1 °C. Es ist bekannt, dass sich der Schmelzpunkt mit einem zunehmenden Anteil langkettiger Fettsäuren erhöht und ein steigender Anteil kurzkettiger oder ungesättigter Fettsäuren diesem Effekt entgegenwirkt [163]. Für natives Raps-, Sesam-, Maiskeim-, Soja-, Sonnenblumen-, Traubenkern- und Safloröl wurden vergleichbare Offset-Temperaturen bei gleicher Heizrate und selbem Temperaturbereich beschrieben, die nur 2 bis 6 °C von den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Offset-Temperaturen abwichen [52, 202]. Offset-Temperaturen von Pflanzenölepoxiden wurden bisher in der Literatur nicht zum Vergleich herangezogen.

Der in Abbildung 35 dargestellte Vergleich der Onset-Temperaturen nativer und epoxidierter Triglyzeride zeigte mit Ausnahme von Rapsöl eine Erhöhung der Onset-Temperatur der Kristallisationskurve beim Epoxidöl. Besonders auffallend war die Erhöhung der Onset-Temperatur um 27,5 bis über 30 °C bei den Erucasäure-reichen Ölen aus Krambe, Senf und Erucaraps. Die Onset-Temperatur der Kristallisationskurven ist sowohl für native als auch epoxidierte Öle niedriger als der Offset der jeweiligen Schmelzkurven. Entsprechende Beobachtungen wurden von Tan *et al.* 2000 beschrieben [189].

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Onset-Temperatur der Kristallisationskurve und der Jodzahl bei nativen Ölen oder dem Epoxidsauerstoffgehalt bei Epoxidölen konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden, obwohl ein deutlicher Einfluss des Gehaltes an Epoxidgruppen nachgewiesen wurde. In Bezug auf die Onset-Temperatur der entsprechenden Kristallisationskurven sind für Raps-, Sesam-, Maiskeim-, Soja-, Sonnenblumen-, Traubenkern- und Safloröl zu den in dieser Arbeit bestimmten Werten vergleichbare Temperaturen von Man *et al.* und Adhvaryu *et al.* publiziert [201, 203]. Von Adhvaryu *et al.* ermittelte Vergleichswerte zum Kristallisations-Onset bei nativem und epoxidiertem Sojaöl zeigten eine gute Übereinstimmung mit denen von chemo-enzymatisch hergestelltem ESBO. Der Onset des nativen SBO lag mit -13,2 °C etwas oberhalb von dem hier beschriebenen Onset mit -15,4 °C. Selbiges galt für ESBO mit einem Onset bei -9,5 °C im Vergleich zu enzymatisch hergestelltem ESBO mit -10,6 °C [203]. Eine Erhöhung der Onset-Temperatur war damit sowohl bei chemisch als auch enzymatisch hergestelltem ESBO zu beobachten.



**Abbildung 35: Vergleich der mittels DSC gemessenen Onset-Temperaturen der Kristallisationskurven unterschiedlicher nativer Öle und deren enzymatisch hergestellten Epoxide (Kühlrate – 10 °C min<sup>-1</sup>, 100 bis -50 °C).**

**KBO - Krambeöl, RCO - Reisöl, SO - Senföl, ERSO - Erucarapsöl, RSO - Rapsöl, SEO - Sesamöl, MKO - Maiskeimöl, SBO - Sojaöl, SKO - Schwarzkümmelöl, SFO - Sonnenblumenöl, TKO - Traubenkernöl, SAO - Safloröl, HO - Holunderkernöl, LSO - Leinsamenöl, DO - Drachenkopfl.**

In Tabelle 21 sind die Umwandlungstemperaturen der Schmelzkurven für alle nativen und epoxidierten Öle aufgelistet. Die Umwandlungstemperaturen der Hauptschmelzpeaks sind jeweils fett gedruckt hervorgehoben, um eine Verschiebung im Kurvenprofil zu verdeutlichen. Ein Vergleich der Umwandlungstemperaturen zeigt für alle Epoxidöle eine Temperaturerhöhung des Hauptschmelzpeaks im Vergleich zum nativen Öl und entspricht damit den bereits auf Basis der Offset-Temperatur der Schmelzkurven gemachten Beobachtungen. Zusätzlich zu den Hauptschmelzpeaks lag der letzte beobachtete Schmelzpeak bei allen epoxidierten Ölen in Übereinstimmung mit den erhöhten Offset-Temperaturen der Schmelzkurve bei einer höheren Temperatur. In der Literatur sind teilweise Umwandlungstemperaturen für native und epoxidierte Öle verfügbar. Tan und Man untersuchten das Schmelzverhalten verschiedener Öle bei einer Heizrate von 10 °C min<sup>-1</sup> und fanden bei Rapsöl vergleichbare Umwandlungstemperaturen von -27,0 und -17,1 °C, die bei Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit bei -27,2 und -14,3 °C lagen. Vergleichbare Umwandlungstemperaturen wurden ebenfalls für natives Sesam-, Maiskeim-, Soja-, Sonnenblumen-, Traubenkern- und Safloröl berichtet [52, 202]. Vergleichsdaten zum Schmelzverhalten epoxidierter Pflanzenöle sind in begrenztem Umfang verfügbar [52, 204].

**Tabelle 21: Vergleich der mittels DSC gemessenen Umwandlungstemperaturen verschiedener nativer und epoxidierter Öle beim Schmelzen (Heizrate: 10 °C min<sup>-1</sup>, Bereich: -100 bis 50 °C).**

Peak-Nr.	1 T °C	2 T °C	3 T °C	4 T °C	5 T °C	6 T °C
KBO OA	-10,7 ± 0,1	<b>7,7 ± 0,1</b>	-	-	-	-
KBOE ESA	<b>13,9 ± 0,1</b>	18,9 ± 0,2	-	-	-	-
RCO OA	<b>-15,5 ± 0,1</b>	-6,0 ± 0,3	-	-	-	-
RCOE ESA	<b>-14,3 ± 0,1</b>	-3,2 ± 0,3	12,4 ± 0,1	-	-	-
SO OA	<b>-12,8 ± 0,1</b>	0,3 ± 0,1	-	-	-	-
SOE ESA	<b>12,2 ± 0,2</b>	19,2 ± 0,1	-	-	-	-
ERSO OA	-14,2 ± 0,1	-1,3 ± 0,1	<b>-5,6 ± 0,1</b>	-	-	-
ERSOE ESA	<b>13,7 ± 0,2</b>	18,3 ± 0,1	-	-	-	-
RSO OA	-27,2 ± 0,1	<b>-14,3 ± 0,1</b>	-	-	-	-
RSOE ESA	<b>-3,4 ± 0,2</b>	22,5 ± 0,4	-	-	-	-
SEO OA	-75,7 ± 0,3	-63,0 ± 0,2	-31,6 ± 0,1	<b>-20,6 ± 0,1</b>	-13,9 ± 0,1	-
SEOE ESA	-49,8 ± 0,7	<b>-8,9 ± 0,1</b>	10,7 ± 0,2	-	-	-
MKO OA	-75,0 ± 0,1	-33,2 ± 0,3	<b>-22,8 ± 0,1</b>	<b>-18,3 ± 0,3</b>	-	-
MKOE ESA	-62,7 ± 0,5	<b>-13,0 ± 0,1</b>	7,2 ± 0,1	-	-	-
SBO OA	-75,6 ± 0,1	-35,2 ± 0,1	<b>-23,8 ± 0,1</b>	<b>-18,4 ± 0,1</b>	-11,3 ± 0,1	-
SBOE ESA	-60,8 ± 2,1	<b>-14,5 ± 1,5</b>	-3,3 ± 0,9	-	-	-
SKO OA	-77,9 ± 0,1	-40,7 ± 0,3	<b>-29,1 ± 0,1</b>	<b>-19,3 ± 0,2</b>	-	-
SKOE ESA	-65,8 ± 0,3	-35,3 ± 0,2	-18,8 ± 0,3	<b>-3,1 ± 0,3</b>	4,8 ± 0,2	-
SFO OA	-74,7 ± 0,3	-34,5 ± 0,3	<b>-23,5 ± 0,1</b>	<b>-21,1 ± 0,4</b>	-10,0 ± 0,3	-
SFOE ESA	-60,5 ± 0,5	<b>-13,5 ± 0,1</b>	5,0 ± 0,1	-	-	-
TKO OA	-76,3 ± 0,1	-36,8 ± 0,2	<b>-25,3 ± 0,1</b>	-12,1 ± 0,3	-	-
TKOE ESA	-72,6 ± 0,2	-39,4 ± 0,1	-25,3 ± 0,1	<b>-17,3 ± 0,1</b>	-0,2 ± 0,3	15,2 ± 0,1
SAO OA	-77,9 ± 0,2	-62,6 ± 2,2	-39,6 ± 0,2	<b>-11,9 ± 0,2</b>	-	-
SAOE ESA	-50,7 ± 0,7	<b>1,7 ± 0,1</b>	-	-	-	-
HO OA	-80,1 ± 0,1	<b>-36,2 ± 0,1</b>	-20,3 ± 0,1	-5,6 ± 0,1	-	-
HOE ESA	-61,8 ± 0,3	-45,3 ± 0,1	-26,6 ± 0,1	-8,8 ± 0,3	<b>9,1 ± 0,1</b>	-
LSO OA	-80,0 ± 0,1	-47,5 ± 0,2	-39,1 ± 0,1	<b>-30,3 ± 0,1</b>	<b>-24,9 ± 0,9</b>	-9,7 ± 0,3
LSOE ESA	-68,7 ± 1,2	-28,2 ± 0,8	-17,6 ± 0,7	<b>-7,4 ± 0,3</b>	<b>5,8 ± 0,9</b>	<b>19,4 ± 0,5</b>
DO OA	-81,8 ± 0,2	<b>-39,6 ± 0,1</b>	<b>-33,2 ± 0,2</b>	-14,8 ± 0,2	-4,7 ± 0,1	-
DOE ESA	-60,9 ± 0,7	-27,1 ± 0,5	-8,0 ± 0,1	<b>6,6 ± 0,5</b>	<b>23,2 ± 0,5</b>	-

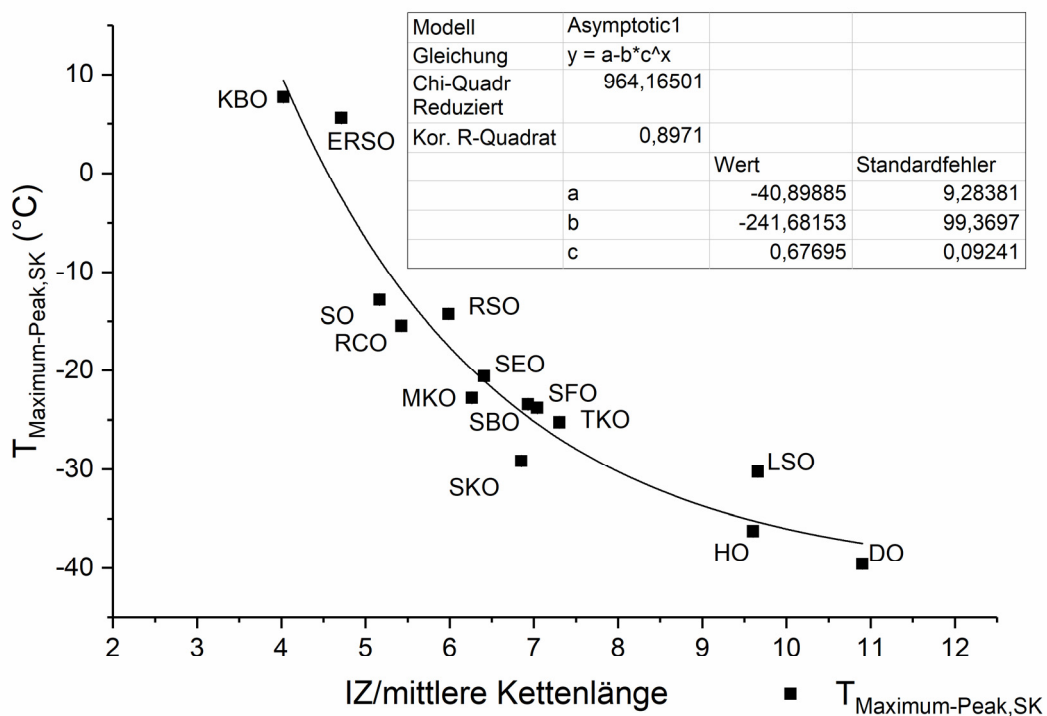
KBO/KBOE - Krambeöl/-epoxid, RCO/RCOE - Reisöl/-epoxid, SO/SOE - Senföl/-epoxid, ERSO/ERSOE - Erucarapsöl/-epoxid, RSO/RSOE - Rapsöl/-epoxid, SEO/SEOE - Sesamöl/-epoxid, MKO/MKOE - Maiskeimöl/-epoxid, SBO - Sojaöl/-epoxid, SKO/SKOE - Schwarzkümmelöl/-epoxid, SFO/SFOE - Sonnenblumenöl/-epoxid, TKO/TKOE - Traubenkernöl/-epoxid, SAO/SAOE - Safloröl/-epoxid, HO/HOE - Holunderkernöl/-epoxid, LSO/LSOE - Leinsamenöl/-epoxid, DO/DOE - Drachenkopfföl/-epoxid, OA - Ölsäure, ESA - Epoxystearinsäure.

Für epoxidiertes Sojaöl wurden unabhängig voneinander von Campanella *et al.* und Guo *et al.* Umwandlungstemperaturen von -14 und -6 °C beziehungsweise -17 und -3 °C bei einer Heizrate von 10 C min<sup>-1</sup> bestimmt, während die Umwandlungstemperaturen beim im Rahmen dieser Arbeit enzymatisch hergestellten Sojaölepoxid bei -14,5 und -3,3 °C lagen [52, 204].



Zusätzlich untersuchten Campanella *et al.* das Schmelzverhalten von epoxidiertem Sonnenblumenöl und fanden dabei Umwandlungstemperaturen von -11 und 0 °C [52]. Die Umwandlungstemperaturen bei enzymatisch epoxidiertem Sonnenblumenöl lagen mit -13,5 und 5,0 °C in einem vergleichbaren Bereich.

Für die in Tabelle 21 fett hervorgehobenen Umwandlungstemperaturen der Schmelzpeaks mit höchster Intensität lässt sich, ähnlich wie bei der Viskosität nativer Öle, eine Korrelation mit der auf die mittlere Kettenlänge bezogenen Jodzahl grafisch darstellen und mit einem exponentiellen Ansatz asymptotisch an die niedrigsten Umwandlungstemperaturen der nativen Öle mit hohem Anteil an  $\alpha$ -Linolensäure annähern (siehe Abbildung 36). Eine eindeutige Korrelation zwischen den größten Umwandlungspeaks der Epoxidöle und dem Epoxidsauerstoffgehalt war nicht festzustellen.



**Abbildung 36: Korrelation zwischen der Umwandlungstemperatur des größten Schmelzpeaks der nativen Pflanzenöle und der gemessenen Jodzahl pro mittlere Kettenlänge (Heizrate: 10 °C min<sup>-1</sup>, Bereich: -100 bis 50 °C).**

**KBO - Krambeöl, RCO - Reisöl, SO - Senföl, ERSO - Erucarapsöl, RSO - Rapsöl, SEO - Sesamöl, MKO - Maiskeimöl, SBO - Sojaöl, SKO - Schwarzkümmelöl, SFO - Sonnenblumenöl, TKO - Traubenkernöl, HO - Holunderkernöl, LSO - Leinsamenöl, DO - Drachenkopfl.**

Eine Gegenüberstellung der Umwandlungstemperaturen der Hauptkristallisationspeaks zeigt ebenfalls eine Verschiebung hin zu höheren Temperaturen für epoxidierte Öle, wobei die Intensität der Kristallisationspeaks in den meisten nativen und epoxidierten Ölen geringer ist als die der Schmelzpeaks (siehe Tabelle 22).

**Tabelle 22: Vergleich der mittels DSC gemessenen Umwandlungstemperaturen verschiedener nativer und epoxidierter Öle bei der Kristallisation (Kühlrate: 10 K min<sup>-1</sup>, Bereich: 50 bis -100 °C).**

Peak-Nr.	1 T °C	2 T °C	3 T °C	4 T °C
KBO OA	-36,9 ± 0,2	<b>-30,2 ± 0,0</b>	-	-
KBOE ESA	<b>-2,9 ± 0,6</b>	-	-	-
RCO OA	<b>-75,8 ± 0,1</b>	-39,6 ± 0,2	<b>-12,8 ± 0,1</b>	-
RCOE ESA	<b>-36,8 ± 0,2</b>	-15,5 ± 0,1	-	-
SO OA	-44,0 ± 0,1	<b>-37,0 ± 0,1</b>	-	-
SOE ESA	<b>-4,3 ± 1,8</b>	-	-	-
ERSO OA	-37,8 ± 0,1	<b>-32,7 ± 0,1</b>	-	-
ERSOE ESA	<b>-2,5 ± 0,2</b>	-	-	-
RSO OA	<b>-71,8 ± 0,1</b>	-44,9 ± 0,2	-29,1 ± 0,1	-
RSOE ESA	<b>-23,6 ± 0,3</b>	-	-	-
SEO OA	<b>-83,2 ± 0,2</b>	-40,9 ± 0,1	<b>-14,7 ± 0,1</b>	-
SEOE ESA	<b>-31,1 ± 0,1</b>	-16,6 ± 0,1	-	-
MKO OA	<b>-87,3 ± 0,1</b>	-46,5 ± 0,3	<b>-22,9 ± 0,1</b>	-
MKOE ESA	<b>-33,7 ± 0,2</b>	-22,3 ± 0,3	-	-
SBO OA	<b>-89,0 ± 0,2</b>	-44,3 ± 0,1	<b>-18,3 ± 0,1</b>	-
SBOE ESA	<b>-38,1 ± 0,4</b>	-19,1 ± 0,6	-	-
SKO OA	<b>-91,2 ± 0,2</b>	-72,5 ± 0,4	<b>-45,8 ± 0,1</b>	<b>-23,4 ± 0,1</b>
SKOE ESA	-70,6 ± 0,2	<b>-42,2 ± 0,5</b>	-22,7 ± 0,5	-
SFO OA	<b>-90,1 ± 0,1</b>	-45,5 ± 0,1	<b>-20,9 ± 0,1</b>	-
SFOE ESA	-76,3 ± 0,3	<b>-35,8 ± 0,4</b>	-21,5 ± 0,3	-
TKO OA	<b>-91,3 ± 0,2</b>	<b>-67,3 ± 0,1</b>	-44,5 ± 0,3	-23,4 ± 0,1
TKOE ESA	-79,4 ± 0,3	<b>-53,9 ± 0,2</b>	-42,0 ± 0,1	-
SAO OA	<b>-93,7 ± 0,1</b>	<b>-72,3 ± 0,1</b>	-50,8 ± 0,3	-24,8 ± 0,3
SAOE ESA	-67,1 ± 0,2	<b>-40,9 ± 0,2</b>	-	-
HO OA	-87,5 ± 0,1	<b>-58,3 ± 0,1</b>	-50,2 ± 0,1	-
HOE ESA	-66,7 ± 0,2	-54,4 ± 0,1	-44,6 ± 0,2	-30,5 ± 0,3
LSO OA	<b>-66,0 ± 0,1</b>	-46,5 ± 0,3	-20,5 ± 0,2	-
LSOE ESA	-74,2 ± 0,4	<b>-49,3 ± 0,2</b>	-17,4 ± 0,3	-
DO OA	-89,7 ± 0,3	<b>-63,4 ± 0,1</b>	-52,4 ± 0,1	-28,5 ± 0,1
DOE ESA	-63,5 ± 0,4	<b>-50,1 ± 1,1</b>	-25,7 ± 0,8	-

KBO/KBOE - Krambeöl/-epoxid, RCO/RCOE - Reisöl/-epoxid, SO/SOE - Senföl/-epoxid, ERSO/ERSOE - Erucarapsöl/-epoxid, RSO/RSOE - Rapsöl/-epoxid, SEO/SEOE - Sesamöl/-epoxid, MKO/MKOE - Maiskeimöl/-epoxid, SBO - Sojaöl/-epoxid, SKO/SKOE - Schwarzkümmelöl/-epoxid, SFO/SFOE - Sonnenblumenöl/-epoxid, TKO/TKOE - Traubenkernöl/-epoxid, SAO/SAOE - Safloröl/-epoxid, HO/HOE - Holunderkernöl/-epoxid, LSO/LSOE - Leinsamenöl/-epoxid, DO/DOE - Drachenkopfföl/-epoxid, OA - Ölsäure, ESA - Epoxystearinsäure.

Bei Reis-, Raps-, Sesam-, Maiskeim-, Soja-, Schwarzkümmel-, Sonnenblumen-, Traubenkern- und Safloröl waren jeweils zwei oder drei Hauptkristallisationspeaks zu erkennen, die in einer ähnlichen Intensität von der Basislinie abwichen. Die Umwandlungstemperaturen dieser Kristallisationspeaks sind vergleichbar zu bereits in der Literatur beschrieben [201]. Für diese

---

Öle wurde ein aufgrund der Epoxidierung entstehender Hauptkristallisationspeak detektiert, dessen Umwandlungstemperatur deutlich über der des Kristallisationspeaks mit der niedrigen Temperatur beim entsprechenden nativen Öl lag. Für epoxidiertes Sojaöl wurde in der vorliegenden Arbeit eine Umwandlungstemperatur des Hauptkristallisationspeaks von  $-38,1\text{ °C}$  bestimmt, während Campanella *et al.* eine Kristallisationstemperatur von  $-35\text{ °C}$  berichteten [52]. Abweichend davon lag der Kristallisationspeak von ESBO bei Guo *et al.* bei  $-25\text{ °C}$  [204]. Die Niedrigtemperaturpeaks waren in den epoxidierten Ölen nicht mehr zu beobachten. Eine direkte Korrelation zwischen den Hauptkristallisationspeaks sowohl des nativen als auch des epoxidierten Öls mit Substratcharakteristika wie Jodzahl oder Epoxidsauerstoffgehalt war nicht zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es aufgrund der Epoxidierung der pflanzlichen Öle sowohl zu einem veränderten Schmelzverhalten als auch einem veränderten Kristallisationsverhalten kommt. Die Onset-, Offset- und Umwandlungstemperaturen der intensivsten Schmelz- und Kristallisationspeaks sind zu höheren Temperaturen hin verschoben. Bei nativen ungesättigten Ölen tritt der Effekt vermehrt ausgebildeter stärkerer van-der-Waals-Kräfte bei einem hohen Gehalt an langkettigen Fettsäuren auf, wodurch auch das Schmelzverhalten beeinflusst wird [163, 199]. Dieser Einfluss wurde in der vorliegenden Arbeit bereits bei der Untersuchung der Viskosität unterschiedlicher nativer Pflanzenöle beobachtet. Das Einbringen von Epoxidgruppen führt zur vermehrten Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die im Vergleich zu van-der-Waals-Kräften einen stärkeren Einfluss auf intermolekulare Wechselwirkungen haben und so eine Verschiebung der Schmelz- und Kristallisationsbereiche hin zu höheren Temperaturen bewirken [197]. Dieser Effekt macht sich besonders stark bei den Ölen mit einem hohen Anteil einfach ungesättigter C22-Fettsäuren bemerkbar, bei denen eine deutliche Verschiebung vor allem der Kristallisationskurve zu beobachten war. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Schmelz- oder Kristallisationsverhalten und den Substrat- beziehungsweise Produkteigenschaften ist aufgrund der sehr inhomogenen Zusammensetzung allerdings schwierig darzustellen. Eine weitere Untersuchung zur Änderung des Schmelz- und Kristallisationsverhaltens von Triglyzeriden und den daraus herstellbaren Epoxiden könnte mit Fettsäure-homogenen Triglyzeriden wie Glyceroltrioleat, Glyceroltrilinoleat oder Glyceroltrilinolenat erfolgen.

#### 4.4.2.6 Untersuchung der Stabilität von Novozym® 435 bei der Epoxidierung von Sojaöl mit verschiedenen Wasserstoffperoxid-Förderraten

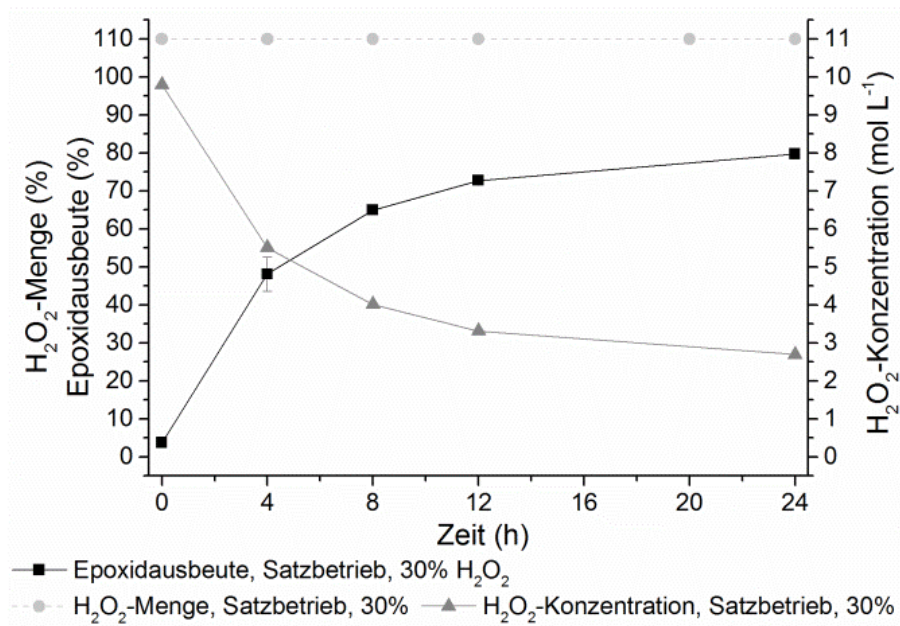
Die Stabilität zweier Varianten der immobilisierten Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym® 435 und CalB Immobead 150) wurde bei der Epoxidierung von Ölsäure bereits in Kapitel 3.4.4 untersucht. Auf Basis der katalytischen Produktivität pro Gramm Enzympräparat wurde Novozym® 435 als geeignetes Enzympräparat ausgewählt. Im nachfolgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse zur Stabilität von Novozym® 435 bei der Umsetzung freier Fettsäuren um weitere Untersuchungen zur enzymatischen Epoxidierung von Sojaöl als bedeutendstes Substrat bei der chemischen Herstellung Pflanzenöl-basierter Epoxide erweitert werden. Ziel war es, pro Gramm eingesetztem Enzympräparat eine maximale Menge an epoxidiertem Sojaöl herzustellen. Im Fokus stand dabei die Untersuchung des Einflusses verschiedener Wasserstoffperoxidzugaberaten und zweier unterschiedlicher Wasserstoffperoxidkonzentrationen auf die Stabilität des Enzyms. Die Reaktion erfolgte bei einem Lösemittelanteil von 60 Gew. % Toluol bezogen auf die Masse der organischen Phase, einer Enzymdosierung von 7,5 g Novozym® 435 pro Mol C=C-Doppelbindung, einem Wasserstoffperoxidüberschuss von 10 Mol% bezogen auf die Menge an C=C-Doppelbindungen und einer Reaktionstemperatur von 40 °C. Die Inkubationszeit je Reaktionszyklus betrug 24 h.

In Abbildung 37 und Abbildung 38 sind die Ergebnisse der enzymatischen Epoxidierung von Sojaöl für folgende Wasserstoffperoxidzugabevarianten dargestellt:

- Einmalige Zugabe der gesamten Wasserstoffperoxidmenge als 30%ige wässrige Lösung zum Reaktionsstart (siehe Abbildung 37 A)
- 5 Gew. % der Gesamtwasserstoffperoxidmenge zu Reaktionsbeginn als 10%ige wässrige Lösung, gefolgt von einer
  - konstanten Zugabe der Restmenge als 30%ige wässrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung über 12 h (siehe Abbildung 37 B)
  - konstanten Zugabe der Restmenge als 30%ige wässrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung über 19 h ( siehe Abbildung 38 A)
  - konstanten Zugabe der Restmenge als 15%ige wässrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung über 21 h (siehe Abbildung 38 B)

Gezeigt ist jeweils die Epoxidausbeute basierend auf dem titrimetrisch bestimmten Epoxidsauerstoffgehalt (■), die zugegebene Wasserstoffperoxidmenge relativ zur Gesamtmenge an C=C-Doppelbindungen (●) und die aus der Differenz der zugegebenen Wasserstoffperoxidmenge und der zum jeweiligen Reaktionszeitpunkt erzielten Epoxidausbeute berechneten Wasserstoffperoxidkonzentration in der wässrigen Phase (▲).

A



B

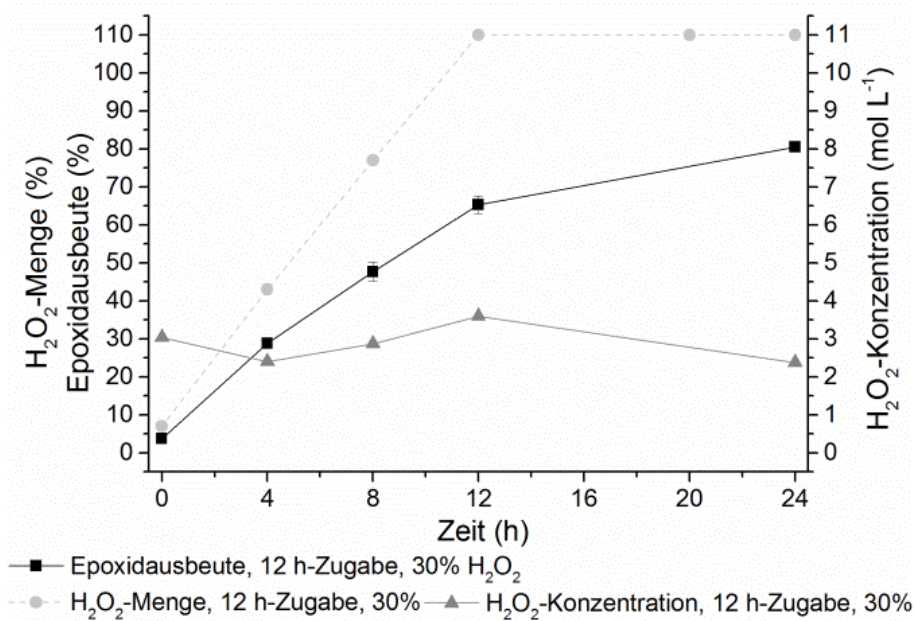
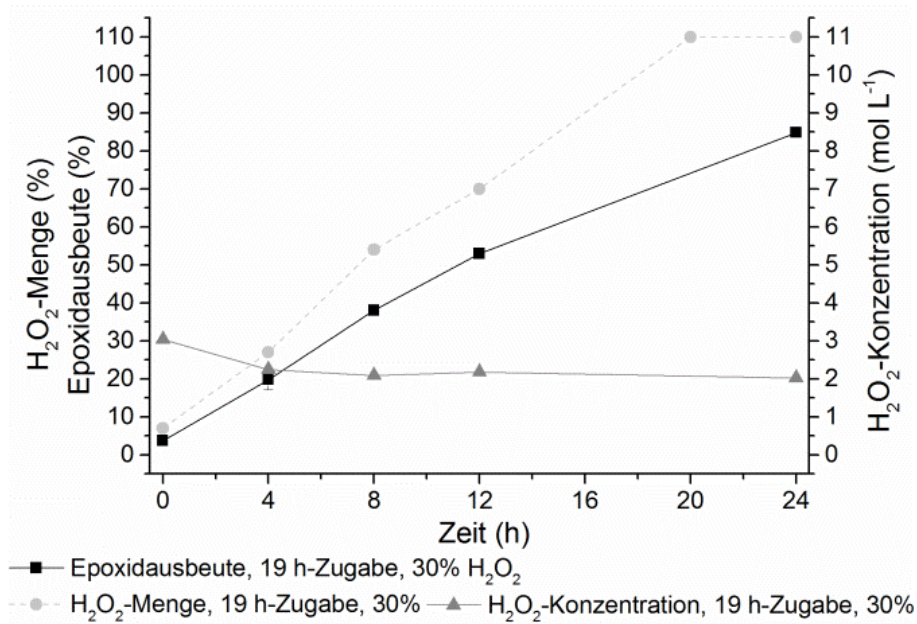


Abbildung 37: Vergleich der enzymatischen Epoxidierung von Sojaöl bei (A) einmalige Zugabe einer 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zu Reaktionsbeginn und (B) Zugabe einer 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung mit konstanter Fließrate über 12 h bei jeweils 40 °C.

Dargestellt sind die (■) Epoxidausbeute auf Basis der Bestimmung des Epoxidsauerstoffgehaltes, (●) zugegebene Wasserstoffperoxidmenge relativ zur eingesetzten Menge an C=C-Doppelbindungen und (▲) kalkulierte Wasserstoffperoxidkonzentration basierend auf der erzielten Epoxidausbeute.

A



B

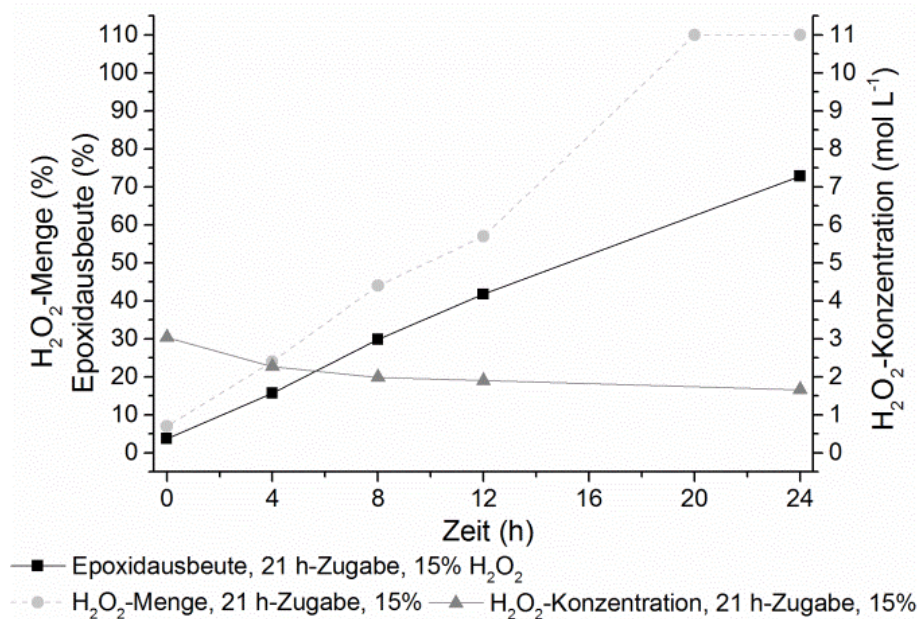


Abbildung 38: Vergleich der enzymatischen Epoxidierung von Sojaöl bei (A) Zugabe einer 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung mit konstanter Fließrate über 19 h, (B) Zugabe einer 15%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung mit konstanter Fließrate über 21 h und 40 °C.

Dargestellt sind die (■) Epoxidausbeute auf Basis der Bestimmung des Epoxidsauerstoffgehaltes, (●) zugegebene Wasserstoffperoxidmenge relativ zur eingesetzten Menge an C=C-Doppelbindungen und (▲) kalkulierte Wasserstoffperoxidkonzentration basierend auf der erzielten Epoxidausbeute.

Aus Abbildung 37 A und B, beziehungsweise Abbildung 38 A ist in Kombination mit Tabelle 23 eine Abnahme der Reaktionsrate mit zunehmend verlangsamer Wasserstoffperoxidzugabe unter Verwendung der 30%igen Wasserstoffperoxidlösung beispielsweise auf Basis der nach

4 h Reaktionszeit erreichten Epoxidausbeute zu erkennen. Während bei einer einmaligen Zugabe der gesamten Wasserstoffperoxidmenge zu Beginn der Reaktion nach 4 h bereits eine Epoxidausbeute von 50 % erreicht wurde (siehe Abbildung 37 A), lag diese bei Zugabe der 30%igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung über 19 h nach 4 h erst bei etwa 20 % (siehe Abbildung 38 A). Die maximale Reaktionsrate wurde auf Basis des Verlaufs der Epoxidausbeute (■) unter sonst vergleichbaren Reaktionsbedingungen damit bei einmaliger Zugabe der gesamten Wasserstoffperoxidmenge zum Reaktionsbeginn erreicht (siehe Abbildung 37 A und Tabelle 23). Bei Einsatz der 30%igen Wasserstoffperoxidlösung konnte sowohl bei einmaliger als auch konstanter Wasserstoffperoxidzugabe über 12 oder 19 h nach 24 h Reaktionszeit eine Epoxidausbeute von über 80 % erreicht werden. Im Gegensatz dazu lag die Epoxidausbeute bei konstanter Zudosierung einer 15%igen Wasserstoffperoxidlösung über 21 h nach 24 h bei 73 %. Diese Beobachtung lässt zusammen mit den niedrigeren spezifischen Produktbildungsrate auf eine reduzierte Wasserstoffperoxidverfügbarkeit und damit eine verlangsamte Persäurebildung durch Verwendung der geringer konzentrierten 15%igen Wasserstoffperoxidlösung im Vergleich zur 30%igen Lösung schließen. Ein Vergleich der in Abbildung 38 A und B dargestellten Epoxidausbeuten mit Zudosierung einer 30%igen oder 15%igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung über einen Zeitraum von 19 bzw. 21 h zeigt bereits in den ersten Stunden der Reaktion geringere Ausbeuten mit der 15%igen Lösung. So lag die Epoxidausbeute bei Zugabe der 15%igen Lösung nach 12 h Reaktionszeit bei 42 % während die Ausbeute bei der um 8% höheren zugegebenen Wasserstoffperoxidmenge mit der 30%igen Lösung bereits bei 53 % lag.

**Tabelle 23: Spezifische Produktbildungsrate bei der enzymatischen Epoxidierung von Sojaöl mit Novozym® 435 mit unterschiedlichen Wasserstoffperoxidzugabevarianten.**

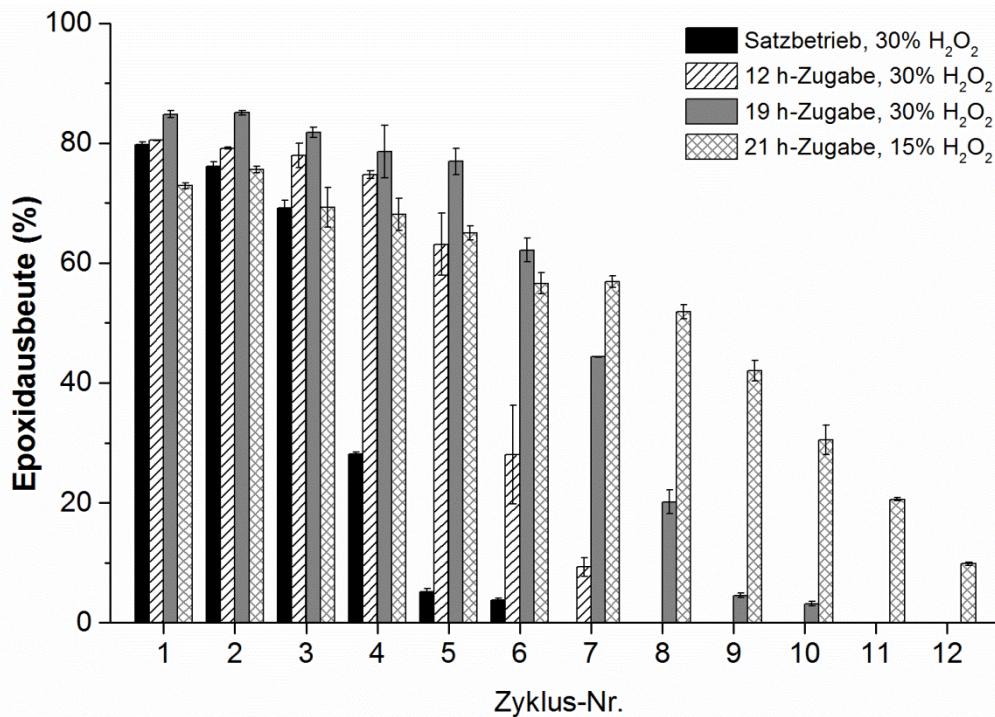
Inkubationsintervall (h)	spezifische Produktbildungsrate (mmol Epoxid g <sup>-1</sup> Novozym® 435 h <sup>-1</sup> )			
	30 % Satzbetrieb	30 % 12 h-Zugabe	30 % 19 h-Zugabe	15 % 21 h-Zugabe
0 bis 4	16,04	9,61	6,58	5,24
4 bis 8	5,61	6,28	6,10	4,70
8 bis 12	2,61	5,88	4,97	3,97
12 bis 24	0,78	1,68	3,54	3,46

Basierend auf der zugegebenen Wasserstoffperoxidmenge und der entsprechenden Volumina an vorhandener Wasserphase wurde unter Berücksichtigung der zum jeweiligen Reaktionszeitpunkt erzielten Epoxidausbeute eine maximale Wasserstoffperoxidkonzentration für die wässrige Phase unter der Annahme berechnet, dass keine Zersetzung von Wasserstoffperoxid oder Akkumulation von Persäure erfolgte. In Abbildung 37 A ist der Verlauf der

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration für den Satzbetrieb zu erkennen. Zu Reaktionsbeginn lag die Wasserstoffperoxidkonzentration der 30 Gew. %igen Lösung bei 9,8 mol L<sup>-1</sup>. Im Verlauf der Reaktion nimmt die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration aufgrund der enzymatisch katalysierten Persäurebildung und der nachfolgenden Epoxidierung ab und lag nach 4 h Reaktion bei 5,5 mol L<sup>-1</sup> und nach 24 h Reaktionszeit noch bei 2,7 mol L<sup>-1</sup>. Im Vergleich dazu lag die maximale Wasserstoffperoxidkonzentration bei Zugabe einer 10 Gew. %-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und einer konstanten Dosierung der Restwasserstoffperoxidmenge als 30%ige Lösung über 12 h nach 12 h Inkubation bei 3,6 mol L<sup>-1</sup>. Dabei war zwischen 4 und 12 h Reaktionszeit eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akkumulation zu beobachten, die sich in Form einer leicht ansteigenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration zeigte (siehe Abbildung 37 B). Durch eine Verlängerung des Dosierzeitraumes auf 19 h wurde eine Akkumulation von Wasserstoffperoxid über die Reaktionszeit vermieden. Die Endkonzentration bei Dosierung der 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung über 19 h lag nach 24 h Reaktion bei etwa 2,0 mol L<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 38 A) und bei einem entsprechenden Dosierzeitraum mit 15%iger Lösung bei 1,7 mol L<sup>-1</sup>.

Im Anschluss an die Untersuchungen des Einflusses verschiedener Wasserstoffperoxidzugabevarianten auf die Umsetzung von Sojaöl wurde zusätzlich deren Einfluss auf die Stabilität von Novozym® 435 analysiert. Dazu wurden mehrere aufeinanderfolgende Reaktionszyklen entsprechend der in Abbildung 37 und 38 vorgestellten Varianten durchgeführt, indem das Enzympräparat durch Filtration abgetrennt und damit neue Reaktionsdurchläufe gestartet wurden. Zum Vergleich der Stabilität der immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* wurde der Epoxidsauerstoffgehalt nach 24 h Inkubationszeit bestimmt und ausgehend davon die Epoxidausbeute berechnet. Die Epoxidausbeuten sind in Abbildung 39 für 12 aufeinanderfolgende Reaktionszyklen zusammengefasst. Im ersten Reaktionszyklus war die Epoxidausbeute nach 24 h bei der Zufuhr von 15%iger Wasserstoffperoxidlösung mit 73 % geringer als mit den drei Varianten unter Verwendung einer 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. Für die Ansätze mit einmaliger Zugabe der 30%igen Wasserstoffperoxidlösung zu Reaktionsbeginn war bereits im 4. Zyklus eine deutliche Abnahme der Epoxidausbeute zu erkennen, die nach 24 h noch 28 % betrug. Vlček und Petrović untersuchten die Stabilität von Novozym® 435 ebenfalls bei der Epoxidierung von Sojaöl bei ähnlichen Prozessbedingungen und einmaliger Wasserstoffperoxidzugabe. Dabei konnten Vlček und Petrović bei einer mit 25 °C im Vergleich zur vorliegenden Arbeit geringeren Reaktionstemperatur nach 24 h Reaktionszeit in den ersten vier Reaktionszyklen jeweils eine Epoxidausbeute von etwa 72 % erzielen. In den nachfolgenden Durchläufen wurde allerdings ein deutlicher Aktivitätsverlust festgestellt [157].





**Abbildung 39: Stabilität von Novozym® 435 bei der Epoxidierung von Sojaöl mit verschiedenen Wasserstoffperoxidzugabevarianten bei 40 °C.**

Dargestellt ist die Epoxidsauerstoffausbeute nach jeweils 24 h Reaktionszeit. 100% Ausbeute entsprechen einem Epoxidsauerstoffgehalt von 7,3%.

Der vierte zusätzliche Reaktionszyklus mit einer Ausbeute größer 70 % bei Vlček und Petrović lässt sich auf eine in Vergleich zu der vorliegenden Arbeit reduzierte Temperatur und eine dadurch verringerte Inaktivierung zurückführen. Bei Zugabe der 30%igen Lösung über 12 h konnte noch im 6. Zyklus eine Ausbeute von etwa 30 % erreicht und die Inaktivierung somit bereits reduziert werden. Durch eine Erhöhung der Dosierzeit auf 19 h konnte unter Zugabe der 30%igen Lösung im 7. Reaktionszyklus noch eine Ausbeute von 45 % erzielt werden. Durch eine gleichzeitige Reduzierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration auf 15 % ließ sich die Ausbeute im 7. Durchlauf auf 58% erhöhen. Im 10. Reaktionszyklus konnten bei Zugabe der 15%igen Lösung noch 30 % Epoxidausbeute erreicht werden.

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Stabilitätsbetrachtung mit Novozym® 435 und Sojaöl als Substrat nochmals zusammengefasst. Dazu wurden zum Vergleich der verschiedenen Wasserstoffperoxidzugabevarianten die über alle Reaktionszyklen gebildete molare Menge an Epoxidgruppen bezogen auf die eingesetzte Masse an Novozym® 435 dargestellt. Außerdem wurde die gebildete Masse an epoxidiertem Sojaöl (ESBO) auf die Masse an Enzym bezogen und für Epoxidausbeuten von mindestens 70, 50 und 20 % je Reaktionsansatz aufsummiert.

**Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Wasserstoffperoxidzugebavarianten auf die Stabilität von Novozym® 435 bei der Epoxidierung von Sojaöl.**

**Gesamtmenge über alle Zyklen: insgesamt hergestellte Menge an Epoxidgruppen in Mol pro g Enzymimmobilisat bis zum vollständigen Aktivitätsverlust. Anzahl der 24 h-Zyklen mit einer Epoxidausbeute von mehr als 70 %, mehr als 50 % und mehr als 20 % zusammen mit der jeweils pro g Enzymimmobilisat hergestellten Menge an epoxidiertem Sojaöl (ESBO).**

	mol Epoxid g <sup>-1</sup> N435	Y > 70%		Y > 50%		Y > 20%	
		Zyklen	g ESBO g <sup>-1</sup> N435	Zyklen	g ESBO g <sup>-1</sup> N435	Zyklen	g ESBO g <sup>-1</sup> N435
30% Batch	0,35	2	57,1	3	85,4	4	112,9
30% 12 h-Zugabe	0,56	4	114,2	5	142,4	6	169,8
30% 19 h-Zugabe	0,72	5	143,1	6	171,3	8	226,4
15% 21 h-Zugabe	0,83	4	113,7	8	226,1	11	308,6

Bei den Reaktionsansätzen mit Zuführung der 15%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung über 21 h konnte mit 0,83 Mol Epoxid pro g Novozym® 435 die größte Menge an Epoxidgruppen bis zum vollständigen Aktivitätsverlust hergestellt werden. Vergleicht man die innerhalb von 24 h-Reaktionszyklen herstellbare Menge an ESBO mit einer Epoxidausbeute größer 70 %, so konnte unter Einsatz einer 30%igen Wasserstoffperoxidlösung zusammen mit einem Dosierintervall von 19 h pro Gramm Katalysator 143 Gramm ESBO und damit am meisten Produkt hergestellt werden. Für die 12 h-Zugabe mit 30%iger und die 21 h-Zugabe mit 15%iger Wasserstoffperoxidlösung ergaben sich mit etwa 114 g ESBO (Y > 70 %) pro Gramm immobilisierter CalB vergleichbare hergestellte Mengen an ESBO mit einer Epoxidausbeute über 70 %. Ein Vergleich der pro Gramm Enzympräparat hergestellten Mengen an ESBO mit Epoxidausbeuten von über 50 % beziehungsweise über 20 % ergab hingegen deutliche Vorteile für die Verwendung der 15%igen wässrigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung im Vergleich zu allen Ansätzen mit 30%iger. Im Vergleich der verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabevarianten konnte gezeigt werden, dass der Aktivitätsverlust pro Reaktionszyklus durch Verlängerung der Dosierungszeit und Reduktion der Wasserstoffperoxidkonzentration verringert und die damit herstellbare Epoxidmenge erhöht werden kann. Basierend auf den Ergebnissen der Epoxidierung mit 15%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung ist zu erwarten, dass eine Erhöhung der pro Gramm Katalysator produzierbaren Menge an ESBO mit einer Epoxidausbeute über 70 % durch eine Verlängerung der Inkubationszeit ab Zyklus 5 erzielt werden kann, da eine Epoxidausbeute von 30 % im 10. Zyklus eine vorhandene Restaktivität bestätigt.

#### 4.4.3 Methodenentwicklung zur Epoxidierung von Fettsäuremethylestern am Beispiel von Ölsäuremethylester

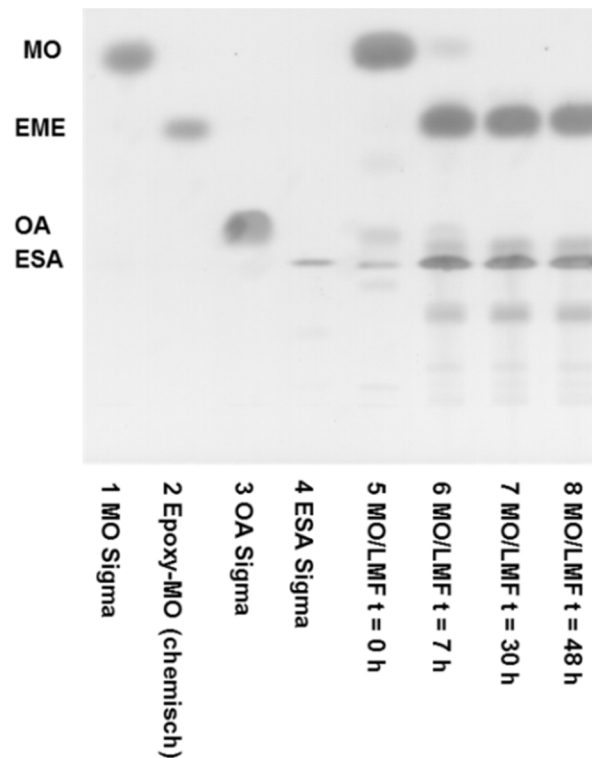
Alternativ zur Epoxidierung von Triglyzeriden (siehe Kapitel 4.4.2) können auch Fettsäuremethylester als Substrat zur Herstellung Pflanzenöl-basierter Epoxide eingesetzt werden. Die geringere Viskosität von Fettsäuremethylestern bietet im Vergleich zu pflanzlichen Ölen den Vorteil, dass auch eine lösemittelfreie Umsetzung mit hohen Ausbeuten möglich ist [114, 163]. In Tabelle 25 sind die theoretische Jodzahl ( $I_{Z_{\text{theor.}}}$ ), der titrimetrisch bestimmte Epoxidsauerstoffgehalt und die im Epoxidprodukt gemessene Säurezahl (SZ) für die enzymatische Epoxidierung von technischem Ölsäuremethylester aufgeführt. In dieser Arbeit konnten bei der lösemittelfreien Umsetzung zweier technischer Ölsäuremethylester jeweils Epoxidausbeuten über 90 % erzielt werden. Vergleichbare Ausbeuten konnten ausgehend von Rapsölmethylester [17] und Ölsäuremethylester [114] in lösemittelfreien Ansätzen oder von Sonnenblumenölmethylester in Dichlormethan als Lösemittel [166] erreicht werden.

**Tabelle 25: Bestimmung von theoretischer Jodzahl ( $I_{Z_{\text{theor.}}}$ ), Epoxidsauerstoffgehalt (OO), Epoxidausbeute (Y(OO)) und Säurezahl (SZ) für aufbereitete Epoxide aus zwei verschiedenen technischen Ölsäuremethylestern (70% - Sigma-Aldrich, 84% - DHW Oleochemicals).**

Proben	$I_{Z_{\text{theor.}}}$ (g I <sub>2</sub> /100g) <sup>a</sup>	OO (%)	Y(OO) (%)	SZ (mg KOH/g)
Techn. Ölsäuremethylester, 70%	85	4,69	92,2	41,2
Techn. Ölsäuremethylester, 84%	94,7	5,13	91,1	n. a.

<sup>a</sup>Theoretische Jodzahl des Substrats nach Rüscher gen. Klaas 1999:  $I_Z = (n \cdot 25380) / M$  mit n als Anzahl an C=C-Bindungen pro Molekül und M als Molmasse des jeweiligen Substrats [18].

Die in Tabelle 25 aufgeführte hohe Säurezahl resultiert aus der Lipase-katalysierten (Per)-Hydrolyse sowie der dabei freigesetzten Fettsäuren und kann je nach weiterer Anwendung ein unerwünschtes Nebenprodukt darstellen. Die entstehende freie Fettsäure und deren Epoxid ist ebenfalls aus der in Abbildung 40 dargestellten dünnschichtchromatographischen Analyse im unteren Bereich der Platte zu erkennen. Orellana-Coca *et al.* fanden bei der lösemittelfreien enzymatischen Epoxidierung von Ölsäuremethylester einen Anteil an freier Epoxystearinsäure im Reaktionsprodukt von ungefähr 30 % [114].



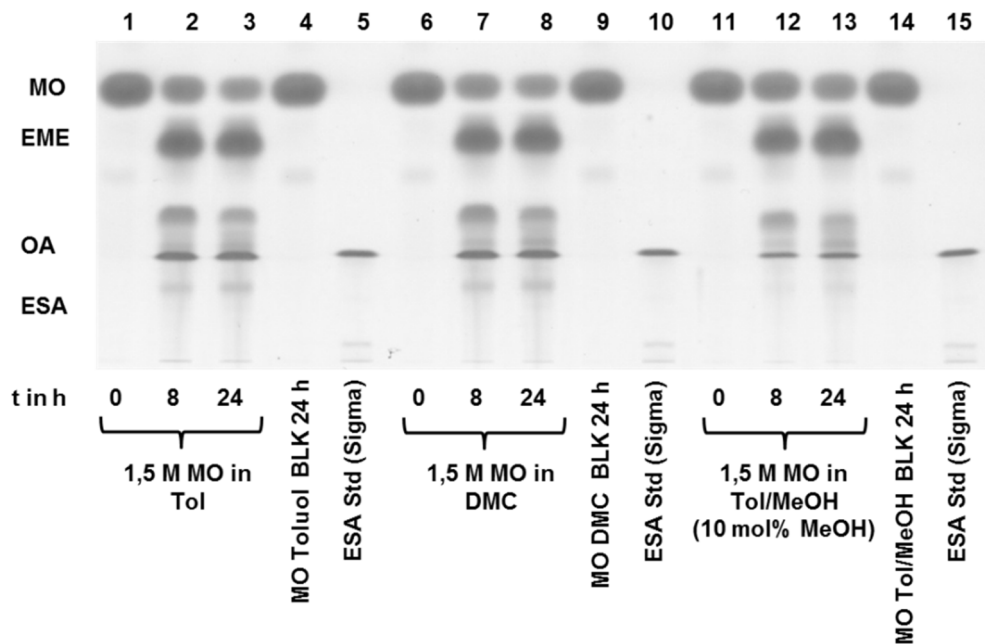
**Abbildung 40:** Lösemittel-frei Epoxidierung von technischem Ölsäuremethylester (84 %, bereitgestellt von DHW).

MO - Ölsäuremethylester, EME - Epoxystearinsäuremethylester, OA - Ölsäure, ESA – Epoxy-stearinsäure.

Ausgehend von den Ergebnissen der lösemittelfreien enzymatischen Epoxidierung von Ölsäuremethylester und der dabei entstehenden freien Epoxyfettsäuren wurden in dieser Arbeit weitere Prozessvarianten untersucht, die eine Minimierung des Anteils freier Epoxyfettsäuren zum Ziel hatten.

### Simultane Epoxidierung und Veresterung von Ölsäuremethylester

Als erste Prozessvariante wurde in der vorliegenden Arbeit die simultane Epoxidierung und Rückveresterung von Ölsäuremethylester in Toluol als Lösemittel und Methanol in 10%igem Überschuss als Cosubstrat untersucht. Durch Verwendung des unpolaren Lösemittels sollte die Esterbildung begünstigt werden [114, 205]. In einem alternativen Ansatz wurde die Umsetzung von Ölsäuremethylester in Dimethylcarbonat als Lösemittel und Cosubstrat in der vorliegenden Arbeit betrachtet. Dimethylcarbonat kann bei der Lipase-katalysierten Epoxidierung als Substrat zur Persäurebildung eingesetzt werden, wobei Methanol freigesetzt wird [182]. Dieses Methanol steht zur Rückveresterung der freien Fettsäuren zur Verfügung. Abbildung 41 zeigt das Analysenergebnis der Dünnschichtchromatographie.

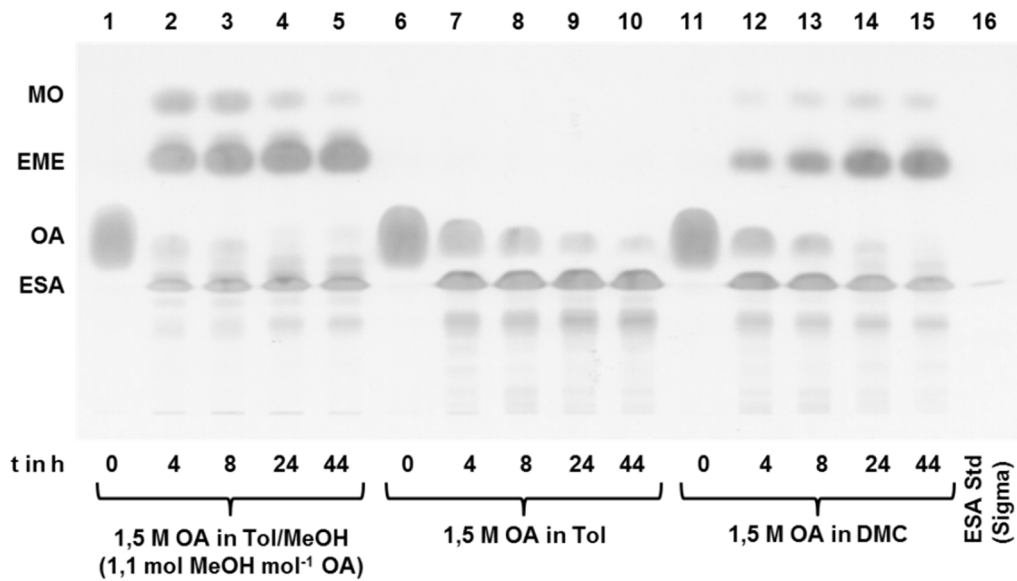


**Abbildung 41: Epoxidierung von Ölsäuremethylester in einem Toluol/Methanol-Gemisch beziehungsweise Dimethylcarbonat (DMC) im Vergleich zur Umsetzung in Toluol.**

Die Epoxidierung von Methyloleat erfolgte sowohl in beiden Ansätzen in Toluol als auch im Ansatz mit Dimethylcarbonat als Lösemittel. In allen drei Prozessvarianten war die Entstehung von freier Ölsäure (OA) und freier Epoxystearinsäure (ESA) zu beobachten. Während der Anteil von OA und ESA bei der enzymatischen Epoxidierung von Methyloleat in Toluol (siehe Abbildung 41, Bahn 1 - 3) oder Dimethylcarbonat (siehe Abbildung 41, Bahn 6 - 8) basierend auf den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie vergleichbar war, konnte der Anteil freier Säuren durch Zugabe von Methanol verringert werden (siehe Abbildung 41, Bahn 11 - 13). Ausgehend vom Ölsäuremethylester war eine vollständige Umsetzung zu Epoxid innerhalb einer Reaktionszeit von 24 h nicht möglich.

### Simultane Epoxidierung und Veresterung von Ölsäure

Aufgrund der unvollständigen Epoxidierung von MO unter Einsatz von Toluol als Lösemittel wurde als zusätzliche Prozessvariante die simultane Epoxidierung und Veresterung von technischer Ölsäure untersucht. Es wurden zur simultanen Epoxidierung und Veresterung von MO vergleichbare Reaktionsbedingungen mit einer Substratkonzentration von 1,5 M Ölsäure in Toluol, Dimethylcarbonat (DMC) oder einem Gemisch aus Toluol und Methanol (MeOH) mit einem Verhältnis von 1,1 mol MeOH mol<sup>-1</sup> OA eingesetzt. In Abbildung 42 ist das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie dargestellt. Ölsäure konnte sowohl im Ansatz mit Toluol und Methanol (siehe Abbildung 42, Bahn 2 - 5) als auch mit Dimethylcarbonat (siehe Abbildung 42, Bahn 12 - 15) zu Epoxystearinsäuremethylester umgesetzt werden.



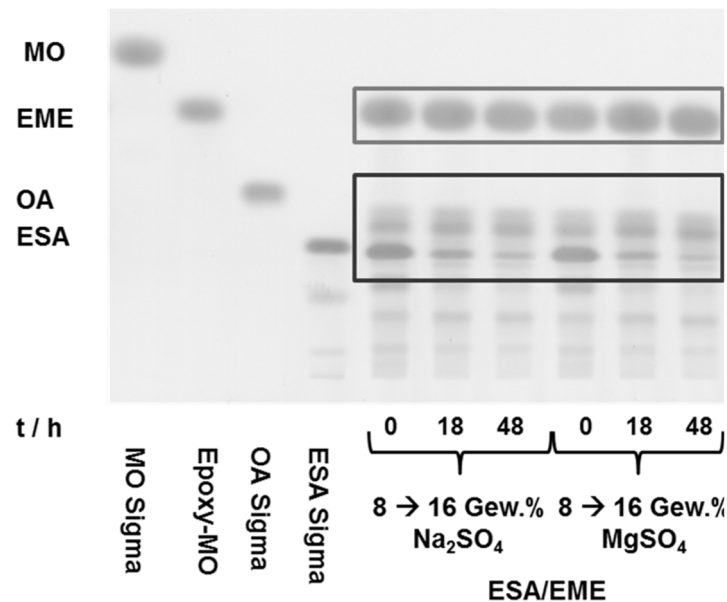
**Abbildung 42: Simultane Epoxidierung und Veresterung von Ölsäure (OA) in einem Toluol/Methanol-Gemisch beziehungsweise Dimethylcarbonat (DMC) im Vergleich zur Umsetzung in Toluol.**

Der Anteil an nicht epoxidiertem Ölsäuremethylester und nicht umgesetzter Ölsäure war im Vergleich zur Umsetzung von Methyloleat (siehe Abbildung 41) geringer. Die Veresterung von OA erfolgte im Ansatz mit Toluol und MeOH aufgrund der direkten Verfügbarkeit von MeOH schneller als im Ansatz mit Dimethylcarbonat, weil die Lipase Methanol in dieser Variante zuerst durch (Per-)Hydrolyse von DMC freisetzen musste. Zum Vergleich wurde in Abbildung 42 (Bahn 7 - 10) die Epoxidierung von Ölsäure in Toluol gezeigt, bei der keine Veresterung stattfand.

### **Lösemittelfreie Rückveresterung freier Epoxystearinsäure aus dem Produktgemisch der lösemittelfreien Epoxidierung**

Basierend auf den Ergebnissen der lösemittelfreien Umsetzung von Ölsäuremethylester und der dabei entstehenden freien Fettsäureepoxide sollte in dieser Arbeit zusätzlich die Rückveresterung aus dem Epoxystearinsäuremethylester/Epoxystearinsäure-Gemisch betrachtet werden, nachdem eine Reduktion des Anteils freier Fettsäuren bei der Epoxidierung von Methyloleat in Toluol unter Zugabe von Methanol erfolgreich gezeigt werden konnte. Dazu sollte aufgearbeitetes Reaktionsprodukt in einem anschließenden Schritt mit Lipase und Methanol wieder verestert werden. Als Trocknungsmittel für die organische Phase wurden Natrium- und Magnesiumsulfat verglichen. Magnesiumsulfat war mit einem Wassergehalt von 0,274 % im Vergleich zu Natriumsulfat mit 1,05 % Wasseranteil das effektivere Trocknungsmittel. Zur Rückveresterung der freien Epoxystearinsäure wurde zu Reaktionsbeginn 8 Gew. % Methanol zugegeben und nach 24 h Inkubation auf 16 Gew. % erhöht. Die dünnschichtchromatographische Analyse zur Rückveresterung der freien Epoxystearinsäure

ist in Abbildung 43 gezeigt. Ein Vergleich des mit Natrium- beziehungsweise Magnesiumsulfat getrockneten Produktgemisches zeigt trotz des unterschiedlichen Restwassergehaltes keinen Unterschied bei der Rückveresterung. Bei beiden Ansätzen ist bereits nach 18 h eine deutliche Reduktion des Anteils der freien Epoxystearinsäure festzustellen. Nach Verdopplung der Methanolkonzentration und einer Reaktionszeit von bis zu 48 h konnte eine weitere Reduktion der Epoxystearinsäurebande durch Veresterung erreicht werden.



**Abbildung 43:** Rückveresterung von Epoxystearinsäure aus einem mit Natrium- oder Magnesiumsulfat getrockneten Gemisch aus Epoxystearinsäuremethylester und Epoxystearinsäure bei 40 °C (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Wassergehalt nach Trocknung 1,05%, MgSO<sub>4</sub>: Wassergehalt nach Trocknung 0,274%).

#### 4.4.4 Methodenentwicklung zur Epoxidierung verschiedener freier Fettsäuren am Beispiel von Öl-, Linol-, $\alpha$ -Linolen-, Eruca- und Tallölfettsäuren

Die Epoxidierung verschiedener freier Fettsäuren wurde unter Verwendung der immobilisierten Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym® 435) optimiert. Es wurden technische Ölsäure (OA, C18:1), Linolsäure (LA, C18:2),  $\alpha$ -Linolensäure ( $\alpha$ -LA, C18:3), Eruca-säure (EA, C22:1) und verschiedene vom Fraunhofer ICT zur Verfügung gestellte destillativ aufgereinigte Fraktionen an Tallöl-Fettsäuren (VDL, TOFA) betrachtet. Die Zusammensetzungen der einzelnen technischen Fettsäurefraktionen sind in Tabelle 26 aufgeführt. Ziel war es, unterschiedliche Fettsäurefraktionen mit möglichst hohen Produktausbeuten ohne Bildung von Präzipitaten umzusetzen. Die Schmelztemperatur der entstehenden Produkte war ein wesentliches Kriterium. Epoxystearinsäure hat als Reaktionsprodukt der Epoxidierung von Ölsäure einen Schmelzpunkt von 57 °C. Bei Reaktionstemperaturen deutlich unterhalb dieses Schmelzpunktes musste ein Lösemittel eingesetzt werden, um eine Produktpräzipitation zu vermeiden und hohe Produktausbeuten zu erzielen [114, 172]. Der Effekt der Verfestigung des

Reaktionsansatzes durch hohe Schmelzpunkte des Produktes tritt bei Umsetzung von Linol-, Linolen- und Erucasäure noch stärker auf. 9,10-12,13-Diepoxy-stearinsäure hat als Reaktionsprodukt bei der Umsetzung von Linolsäure einen Schmelzpunkt von 78 °C [174]. Die Umsetzung verschiedener freier Fettsäuren sollte daher in dieser Arbeit unter Berücksichtigung der Schmelzpunkte der Substrate und Reaktionsprodukte unter Verwendung geeigneter Lösemittelkonzentrationen und Reaktionstemperaturen erfolgen.

**Tabelle 26: Fettsäuregehalt in %, Jodzahl und theoretisch maximal möglicher Epoxidsauerstoffgehalt für verschiedene technische Fettsäuren und unterschiedliche Tallölfettsäure-Fractionen.**

Name	OA	LA	$\alpha$ -LA	EA	VDL dest1	TOFA dest1	TOFA dest2
Palmitinsäure (C16:0)	-	-	5,3	-	-	-	-
Stearinsäure (C18:0)	-	-	4,0	-	-	-	-
Ölsäure (C18:1)	90,0	25,0	24,5	10,0	36,4	36,3	36,1
Linolsäure (C18:2)	8,0	64,9	14,4	-	36,3	36,7	35,6
$\alpha$ -Linolensäure (C18:3)	-	-	50,6	-	8,80	9,1	8,4
Erucasäure (C22:1)	-	-	-	90			
Isodextropimarsäure	-	-	-	-	0,82	0,9	1,5
Summe	98	89,9	98,8	100	82,3	83,0%	81,6
$I_{Z_{\text{theoretisch}}}$ (g I <sub>2</sub> / 100 g) nach [18]	95,4	140	187	76,5	124	126	123
OO <sub>max</sub> nach [13]	5,67	8,1	10,5	4,6	7,2	7,3	7,2
Lieferant	Sigma-Aldrich		ABCR		Fraunhofer ICT		

OA: technische Ölsäure (90%), LA: technische Linolsäure (60 - 74%),  $\alpha$ -LA technische Linolensäure (45 - 65%), technische Erucasäure (90%)

Die enzymatische Epoxidierung freier Fettsäuren wurden in gerührten Rundkolben im 50 mL-Reaktionsvolumen durchgeführt, um ausreichende Produktmengen zur Quantifizierung der Reaktionsausbeute mittels titrimetrischer Bestimmung des Epoxidsauerstoffgehaltes (Methode siehe Kapitel 8.3.5) herzustellen. Die Fettsäuren wurden jeweils in einer Konzentration von 1,5 mol L<sup>-1</sup> in Toluol eingesetzt. Die 30%ige Wasserstoffperoxidlösung wurde in Verhältnis von 1,1 mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Mol C=C-Doppelbindung zu Reaktionsbeginn zugegeben. Die immobilisierte Lipase wurde spezifisch bezogen auf den Gehalt an Doppelbindungen mit 10 g mol<sup>-1</sup> zugegeben. Die Umsetzung von Öl-, Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure erfolgte bei einer Temperatur von 40 °C. Zur Umsetzung von Erucasäure wurde die Temperatur auf 50 °C erhöht. Durch die Auswahl einer geeigneten Substratkonzentration in Kombination mit der entsprechenden Reaktionstemperatur konnten die in Tabelle 26 aufgeführten Substrate auf Basis dünnschichtchromatographischer Untersuchungen (siehe

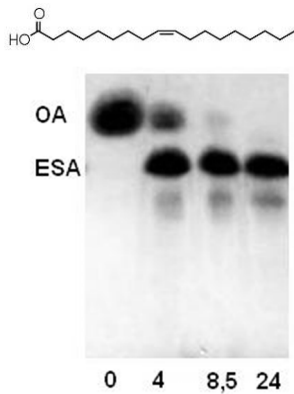


---

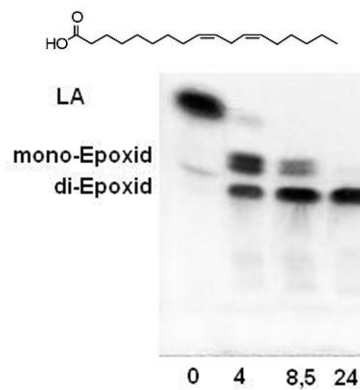
Abbildung 44) ohne Produktpräzipitation und einer damit verbundenen Einschränkung der Reaktion zu annähernd 100 % zu den entsprechenden Epoxiden umgesetzt werden.

Abbildung 44 A zeigt die Umsetzung von Ölsäure (OA) zu Epoxystearinsäure (ESA). In Abbildung 44 B ist die Epoxidierung von Linolsäure (99 %) zu Mono- und Di-Epoxiden dargestellt. Nach 24 h konnte ein annähernd vollständiger Umsatz zum Di-Epoxid erreicht werden. In Abbildung 44 C ist die enzymatische Umsetzung von technischer  $\alpha$ -Linolensäure dargestellt. Linolensäure konnte nach 24 h zum Tri-Epoxid umgesetzt werden. Außerdem sind weitere Banden oberhalb des Tri-Epoxides zu erkennen, die auf Epoxystearinsäure aus Ölsäure, 9,10-12,13-Diepoxystearinsäure aus der enthaltenen Linolsäure und zum Di-Epoxid umgesetzte  $\alpha$ -Linolensäure zurückzuführen sind. Eine vollständige Umsetzung von Erucasäure zu Epoxybehensäure (siehe Abbildung 44 D) konnte bereits nach 8,5 h erreicht werden. Die Epoxidierung unterschiedlicher Tallölfettsäure-Fractionen (TOFA, bereitgestellt vom Fraunhofer ICT) wurde aufgrund des überwiegenden Gehaltes an Öl- und Linolsäure bei gleicher Fettsäurekonzentration, Enzymdosierung und 40 °C durchgeführt. Auch die TOFA-Fractionen konnten nach 24 h annähernd vollständig zu 9,10-Epoxystearinsäure und 9,10-12,13-Diepoxystearinsäure umgesetzt werden (siehe Abbildung 44 E). Im oberen Bereich der DC waren weitere Banden zu erkennen, die im Verlauf der Reaktion ebenfalls umgesetzt wurden. Es handelte sich dabei vermutlich um Fettsäureester und Harzsäurereste.

**A: Ölsäure**



**B: Linolsäure**

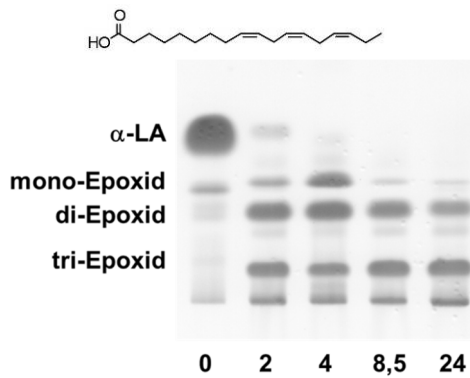


OA: Ölsäure  
(9Z)-Octadec-9-ensäure

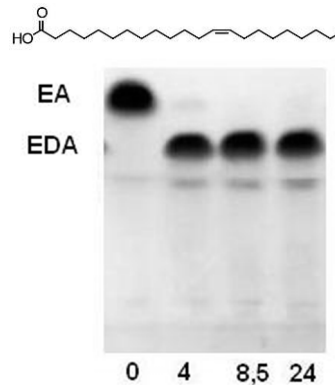
LA: Linolsäure  
(9Z,12Z)-Octadeca-9,12-diensäure

$\alpha$ -LA: Linolensäure  
(9Z,12Z,15Z)-Octadeca-9,12,15-triensäure

**C:  $\alpha$ -Linolensäure**



**D: Erucasäure**



ESA:  
Epoxystearinsäure  
9,10-Epoxyoctadecensäure

EA: Erucasäure  
(13Z)-Docosensäure

EDA:  
Epoxybehensäure  
(13,14-Epoxydocosensäure)

**E: Tallölfettsäure-Fractionen**

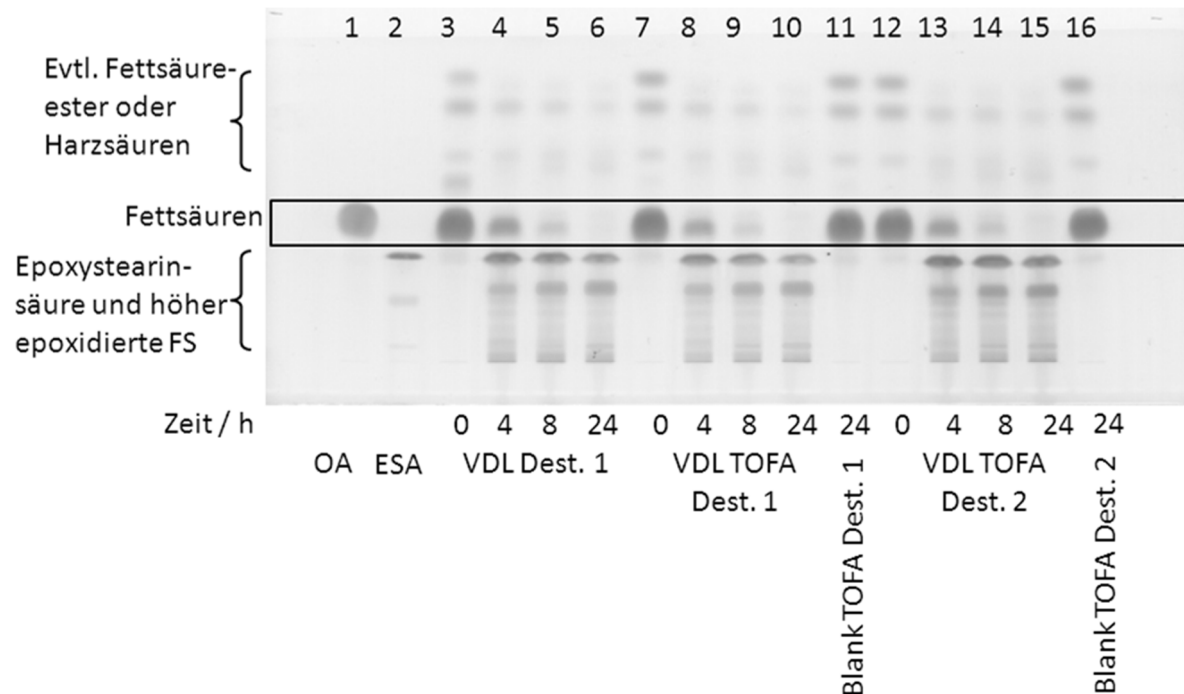
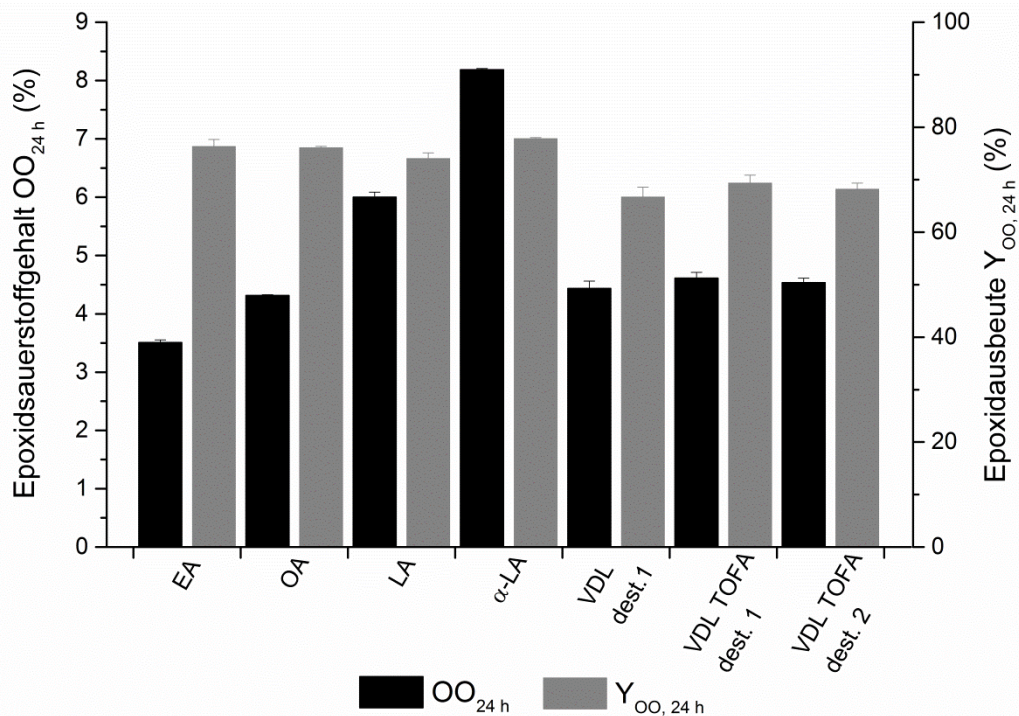


Abbildung 44: Dünnschichtchromatographische Analyse der Umsetzung von (A) Ölsäure (OA), (B) Linolsäure (LA), (C) Linolensäure ( $\alpha$ -LA), (D) Erucasäure (EA) und (E) Tallölfettsäuren (TOFA) bei optimierten Reaktionsbedingungen.

Ergänzend zur dünn-schicht-chromatographischen Untersuchung wurden die Reaktionsansätze nach 24 h Inkubation aufgearbeitet und deren Epoxidsauerstoffgehalt bestimmt. Die Epoxidausbeute wurde basierend auf dem maximal möglichen Epoxidsauerstoffgehalt berechnet, der mit Hilfe der theoretischen Jodzahl des Substrates (siehe Tabelle 26) errechnet werden kann. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 gezeigt. Für alle Fettsäure-Fractionen konnte eine Epoxidausbeute von über 70% erzielt werden.



**Abbildung 45: Chemo-enzymatische Epoxidierung verschiedener technischer Fettsäuren und Tallölfettsäure-Fractionen.**

Dargestellt sind der Epoxidsauerstoffgehalt (OO) und die Epoxidausbeute ( $Y(OO)$ ) für die Epoxidierung mit Novozym® 435 bei 40 °C (OA: technische Ölsäure; LA: technische Linolsäure;  $\alpha$ -LA: technische Linolensäure; VDL dest. 1, VDL TOFA dest. 1, VDL TOFA dest. 2: Tallölfettsäure-Fractionen) beziehungsweise 50 °C (technische Erucasäure).

Vergleichbare Epoxidausbeuten konnten von Orellana-Coca *et al.* bei höherer spezifischer Enzymdosierung und geringerer Substratkonzentration für Linol- und Linolensäure erzielt werden. Bei Erhöhung der Linolsäurekonzentration auf 1,5 M stellten Orellana-Coca *et al.* die Bildung eines teilweise präzipitierenden Reaktionsproduktes bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C fest, was eine unvollständige Durchmischung der Reaktionsansätze und verlängerte Reaktionszeiten zur Folge hatte [172, 174]. Mit Ölsäure wurde von Orellana-Coca *et al.* bei einem im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit 4-fach höheren Enzymsatz und einer um den Faktor 3 reduzierten Substratkonzentration eine Epoxidausbeute von >95 % erzielt [174]. Törnvall *et al.* untersuchten die enzymatische Epoxidierung von Tallöl-Fettsäuren (TOFA) bei 40 °C und erhielten bei einer lösemittelfreien Umsetzung mit höherem spezifischen

Enzymeinsatz ein Reaktionsprodukt mit einem Präzipitatanteil von über 30% und unter 80% Umsatz an Doppelbindungen. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur führte bei TOFA hingegen zu einer weiter reduzierten Produktausbeute aufgrund von Ringöffnung und Oligomerisierung [114, 165]. Aus diesem Grund ist die in dieser Arbeit vorgeschlagene Epoxidierung von 1,5 M TOFA in Toluol bei 40 °C aus Sicht der Produktausbeute und Vermeidung von Folgeprodukten aufgrund von Ringöffnungsreaktionen vorteilhaft.

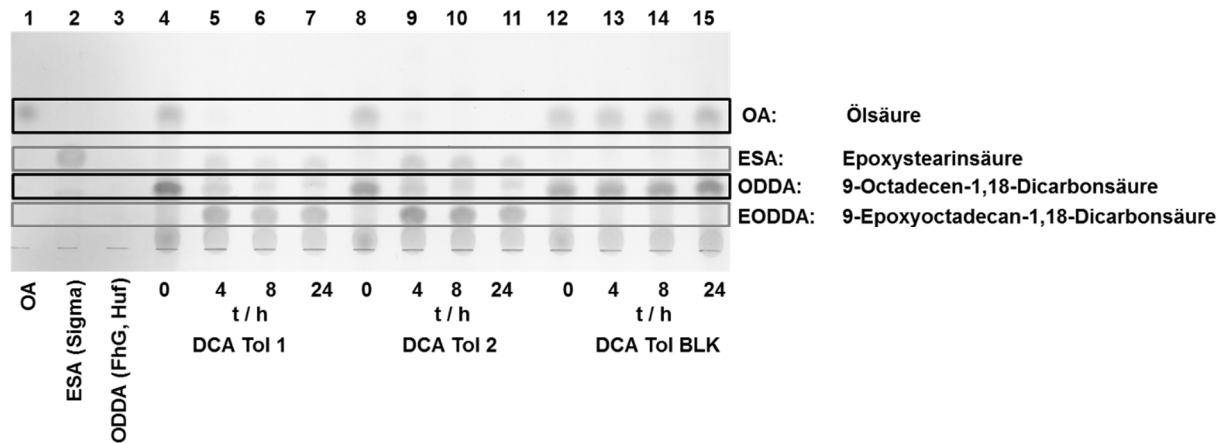
#### 4.4.5 Methodenentwicklung zur Epoxidierung langkettiger Dicarbonsäuren am Beispiel von 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure

Bi- und multifunktionelle Monomerbausteine sind aus anwendungstechnischer Sicht von besonderem Interesse für die chemische Industrie, weil sie sich aufgrund mehrerer reaktiver Gruppen im Molekül zu polymeren vernetzten Strukturen umsetzen lassen [2]. Zu diesen Monomerbausteinen gehören Dicarbonsäuren, die durch mikrobielle Umsetzung aus Monocarbonsäuren gewonnen werden können. Dabei können auch ungesättigte Fettsäuren eingesetzt werden [206]. Mit Hilfe der Metathesereaktion werden chemisch Dicarbonsäuredimethylester hergestellt, die ebenfalls als Substrat für die enzymatische Epoxidierung eingesetzt werden können [164]. Durch Epoxidierung der erhaltenen ungesättigten Dicarbonsäuren kann eine weitere funktionelle Gruppe in das Molekül eingebracht und so zusätzliche Anwendungsgebiete eröffnet werden. So konnten beispielsweise epoxidierte langkettige Dicarbonsäuremethylester zur Herstellung von Polyestern eingesetzt werden. Der Schmelzpunkt des ungesättigten C18-Dicarbonsäuredimethylesters lag bei 23 °C, während der Schmelzpunkt des entsprechenden Epoxids mit 35 °C erhöht war [164].

Langkettige ungesättigte Dicarbonsäuren sind im Gegensatz zu den meisten ungesättigten Fettsäuren und den Dicarbonsäuredimethylestern bereits bei Raumtemperatur fest [206]. Daher sollte in dieser Arbeit die Epoxidierung mikrobiell hergestellter freier Dicarbonsäuren in organischen Lösemitteln untersucht werden, um so die Möglichkeit zur Herstellung weiterer interessanter Monomerbausteine zu evaluieren. Dabei wurde die Umsetzung von 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure (ODDA) zum entsprechenden Epoxid (EODDA) in Toluol durchgeführt (Methode siehe Abschnitt 4.3.6).

In Abbildung 46 ist die dünnschichtchromatographische Analyse der enzymatischen Epoxidierung von ODDA in Toluol dargestellt. Als Referenzen wurden Ölsäure (OA) und die polarere Epoxystearinsäure (ESA) auf den Bahnen 1 und 2 aufgetragen. Ab Bahn 4 ist die Umsetzung von ODDA und der enthaltenen Restmenge an OA zu sehen. Nach vier Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde Ölsäure vollständig zum Ölsäureepoxid umgesetzt, während ODDA noch nicht vollständig epoxidiert wurde. Nach 24 h Reaktion bestand das Produkt aus einer Mischung von Epoxystearinsäure (ESA) und 9-Epoxyoctadecan-1,18-

Dicarbonsäure (EODDA). In den Referenzansätzen ohne Enzymzugabe (siehe Abbildung 46, Bahn 12 – 15) war auch nach 24 h keine Umsetzung zu erkennen. Damit konnte die enzymatische Epoxidierung von 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure bei Raumtemperatur erfolgreich gezeigt werden.



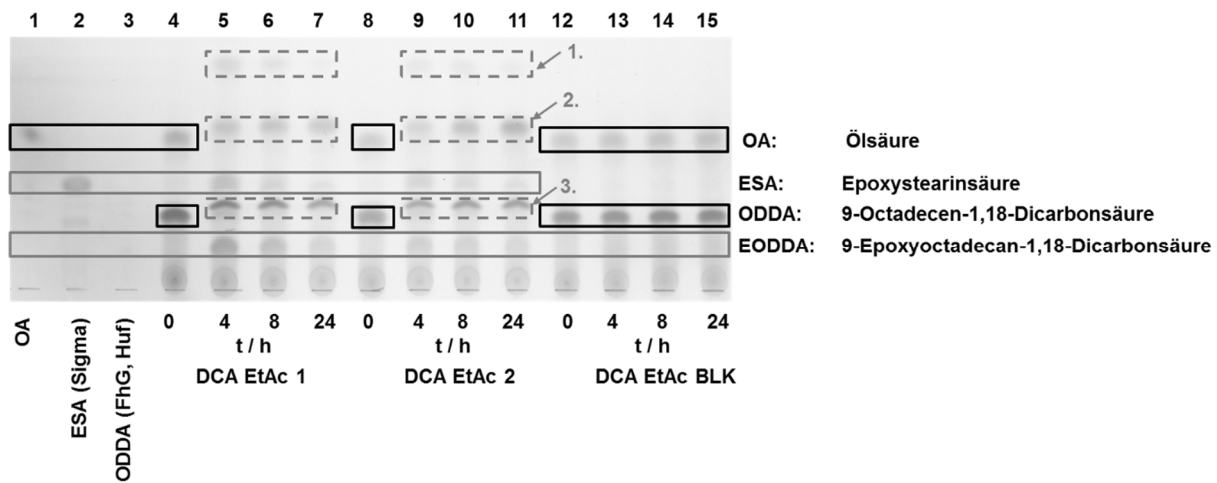
**Abbildung 46:** Epoxidierung der fermentativ hergestellten 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure in Toluol (Tol) mit Novozym® 435 bei Raumtemperatur.

**OA:** Ölsäure, **ESA:** Epoxystearinsäure, **ODDA:** 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure, **DCA:** Fermentativ hergestelltes Gemisch von Ölsäure und 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure, **EODDA:** 9-Epoxyoctadecan-1,18-Dicarbonsäure, **BLK:** Referenzansatz ohne Zugabe von Enzym.

In einem weiteren Ansatz wurde Ethylacetat als Lösemittel und Cosubstrat eingesetzt. Ethylacetat konnte entsprechend der von Rüschen gen. Klaas *et al.* [181, 182] beschriebenen katalytischen Aktivität der immobilisierten CalB in einem Hydrolyse- oder Perhydrolyseschritt zu Ethanol und Essigsäure beziehungsweise Peressigsäure umgesetzt werden (siehe Abschnitt 4.3.6). Ethanol kann in einem weiteren Lipase-katalysierten Schritt zur Veresterung der Dicarbonsäure eingesetzt werden. Auf diesem Wege können zwei unterschiedliche enzymatische Reaktionen in einem Reaktionsansatz kombiniert werden. Aufgrund dieser Reaktionsauslegung konnte eine simultane Epoxidierung und Veresterung für mikrobiell hergestellte Dicarbonsäure gezeigt werden. In Abbildung 47 ist das Ergebnis der Dünnschichtchromatografie zu sehen.

Im Vergleich zu den in Abbildung 46 zu erkennenden Banden sind in den Bahnen 5 bis 7 und 9 bis 11 in Abbildung 47 zusätzlich Produktbanden in mit gestrichelten grauen Linien hervorgehobenen Rechtecken zu erkennen, die auf die Bildung von 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäuremonoethylester (1), 9-Epoxyoctadecan-1,18-Dicarbonsäurediethylester (2) und 9-Epoxyoctadecan-1,18-Dicarbonsäuremonoethylester (3) hindeuten. Außerdem war nach einer Reaktionszeit von 4 h eine deutliche Bande auf Höhe von 9-Epoxyoctadecan-1,18-Dicarbonsäure zu erkennen, die im weiteren Reaktionsverlauf aufgrund der fortlaufenden

Veresterung abnahm. In einem ähnlichen Reaktionsansatz konnten Warwel *et al.* eine Epoxidierung von 9-Octadecen-1,18-dimethylester zeigen [164].



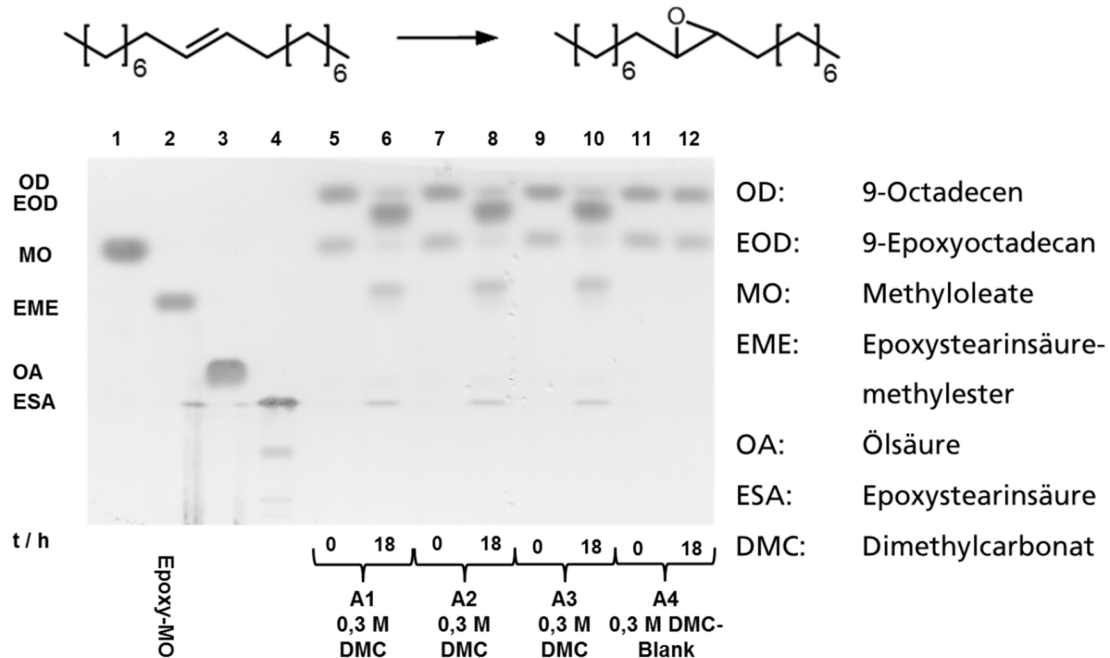
**Abbildung 47: Epoxidierung und simultane Veresterung der fermentativ hergestellten 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure in Ethylacetat mit Novozym® 435 bei Raumtemperatur.**

Mögliche neue Reaktionsprodukte in Rechtecken mit gestrichelten grauen Linien: (1) 9-Octadecen-1,18-dicarbonsäuremonoethylester, (2) 9-Epoxyoctadecan-1,18-dicarbonsäurediethylester und (3) 9-Epoxyoctadecan-1,18-dicarbonsäuremonoethylester.

#### 4.4.6 Methodenentwicklung zur Epoxidierung langkettiger Alkene am Beispiel von 9-Octadecen

Alkene können ähnlich wie ungesättigte Pflanzenöl-basierte Substrate mit Hilfe einer Lipase und wässrigem Wasserstoffperoxid epoxidiert werden. Die dabei entstehenden Alkenoxide können mit verschiedenen Folgereaktionen zu interessanten Produkten umgesetzt werden [177, 179, 207]. In dieser Arbeit sollte als Substrat ein langkettiges Alken eingesetzt werden, das bei der chemischen Herstellung von  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuredimethylestern aus Ölsäuremethylester mittels Metathese anfällt. Als Koppelprodukt entsteht bei dieser Reaktion 9-Octadecen, das destillativ vom Edukt und dem hergestellten Dicarbonsäuredimethylester abgetrennt werden kann. Dieses Koppelprodukt soll zur ganzheitlichen Verwertung aller Produkte anhand der chemo-enzymatischen Epoxidierung funktionalisiert werden. 9-Epoxyoctadecan könnte beispielsweise zu einer Tensid-ähnlichen Verbindung umgesetzt werden. 9-Octadecen wurde vom Fraunhofer ICT aus einem Produktgemisch der Metathesereaktion aufgereinigt und zur Verfügung gestellt. Die enzymatische Epoxidierung von 9-Octadecen wurde in Dimethylcarbonat (DMC) unter Verwendung der immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* (Novozym® 435) untersucht. Dabei diente DMC als Lösemittel und als Cosubstrat zur Lipase-katalysierten Persäurebildung. Die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Analyse sind in Abbildung 48 dargestellt. Es war eine annähernd vollständige Umsetzung von 9-Octadecen (OD) und Ölsäuremethylester (MO) zu Produkten mit polareren Eigenschaften zu

erkennen. Diese Produkte wiesen aufgrund der gesteigerten Polarität der Epoxide geringere Laufstrecken auf der polaren Silica-DC-Platte auf. Außerdem war eine schwache Bande an Epoxystearinsäure (ESA) zu erkennen, die durch teilweise Hydrolyse von Ölsäuremethylester bzw. Epoxystearinsäuremethylester entstand.



**Abbildung 48:** Dünnschichtchromatographische Analyse der CalB-katalysierten chemoenzymatischen Epoxidierung von 9-Octadecen in Dimethylcarbonat (DMC) als Lösemittel.

Rüsch gen. Klaas und Warwel untersuchten die enzymatische Epoxidierung von linearen Alkenen bis zu einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen mit terminaler oder interner Doppelbindung. Dabei konnten sie bei einer im Vergleich zur vorliegenden Arbeit um den Faktor 3 reduzierten Substratkonzentration, 4,5-fachem Wasserstoffperoxidüberschuss und 10-fach höherem spezifischem Enzymeinsatz nach 16 h Inkubation Epoxidausbeuten zwischen 69 % mit terminalem 1-Tetradecen und annähernd 100 % mit 7-Tetradecen erzielen. Zur Umsetzung von 1-Tetradecen wurde die Reaktionstemperatur im Vergleich zu 7-Tetradecen von 20 auf 40 °C erhöht. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Rüsch gen. Klaas und Warwel bei der Umsetzung von 1- und 4-Octen erhalten [181, 182]. Die deutlich geringere Reaktivität der terminalen Doppelbindung wurde in dieser Arbeit bei der Umsetzung von 1-Octadecen bestätigt.

---

## 4.5 Schlussfolgerungen zur Rohstoff-angepassten Verfahrensauslegung und Rohstoffauswahl

Die Entwicklung effizienter Verfahren zur enzymatischen Epoxidierung von Pflanzenölen und Pflanzenöl-basierten Derivaten war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit. Ein effizientes Verfahren zur enzymatischen Epoxidierung von Pflanzenölderivaten sollte einen möglichst geringen Einsatz an Enzym und Lösemittel erfordern aber dennoch hohe Substratumsätze innerhalb einer akzeptablen Inkubationszeit ermöglichen, um so möglichst hohe Raum-Zeit-Ausbeuten zu erzielen. Daher wurde zuerst der Einfluss von Enzym- und Lösemittelmenge, Reaktionstemperatur und Zeit auf die Epoxidierung von zwei unterschiedlichen nicht-essbaren Pflanzenölen systematisch mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung untersucht. Drachenkopf- und Senföl unterschieden sich dabei wesentlich in ihrer Fettsäurezusammensetzung. Drachenkopföl wies einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Linolensäure auf und Senföl zeigte einen hohen Gehalt an Erucasäure. Durch die Auswahl dieser beiden Öle konnte auch der Zusammenhang des Einflusses verschiedener Parameter in Kombination mit den Substrateigenschaften untersucht und optimierte Prozessbedingungen ausgewählt werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Ölen wurde in der geeigneten Reaktionstemperatur festgestellt. Drachenkopföl konnte bei Temperaturen um 30 °C mit Epoxid- ausbeuten von bis zu 95 % umgesetzt werden. Temperaturen über 40 °C hatten eine deutliche Reduktion der Epoxidausbeute zur Folge. Für Senföl wurden 40 °C als geeignete Reaktionstemperatur festgelegt und Epoxidausbeuten über 97 % erzielt. Durch die Reduktion des Lösemiteleinsatzes auf 50 bis 60 Gew. % relativ zur Masse der organischen Phase konnte die Raum-Zeit-Ausbeute im Vergleich zu Sun *et al.* oder Rüschen, Klaas und Warwel gesteigert werden [17, 18, 155, 156].

Auf Basis der optimierten Prozessbedingungen wurden 15 zuvor im Rahmen dieser Arbeit umfangreich charakterisierte kommerzielle und nicht-kommerzielle Pflanzenöle enzymatisch epoxidiert und Ausbeuten von 70 bis 95 % erzielt. Die hergestellten Epoxide wurden anschließend mittels rheologischer Messungen und dynamischer Differenzkalorimetrie hinsichtlich Viskosität, Schmelz- und Kristallisationsverhalten untersucht und mit Substrateigenschaften wie der Fettsäurezusammensetzung korreliert. Auf Basis dieser Korrelationen kann die Viskosität eines definierten Pflanzenöls in Abhängigkeit vom Epoxidgehalt abgeschätzt und für eine entsprechende Anwendung ausgewählt werden. Der Einfluss der Epoxidierung auf das Schmelz- und Kristallisationsverhalten von Pflanzenölepoxiden wurde ebenfalls gezeigt. Der Schmelzbereich der Epoxide war im Vergleich zu den nativen Ölen deutlich hin zu höheren Temperaturen verschoben. Auch die Kristallisation setzte bei den Pflanzenölepoxiden bereits bei höheren Temperaturen ein. Die in der vorliegenden Arbeit



dargestellten Erkenntnisse zum Schmelz- und Kristallisationsverhalten können bei der Auswahl geeigneter Pflanzenölepoxide von Bedeutung sein, wenn ein Festwerden der Epoxidkomponente beispielsweise in Lack- oder Klebstoffanwendungen bei moderaten Temperaturen vermieden werden sollte.

Die Stabilität des Biokatalysators sollte bei der Auswahl von Prozessbedingungen nicht außer Acht gelassen werden. Die Prozessstabilität der verwendeten immobilisierten Lipase B aus *Candida antarctica* stellt einen wichtigen Faktor für einen wirtschaftlichen Prozess dar, wurde allerdings in der Literatur nicht umfassend bei der Epoxidierung von pflanzlichen Ölen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Wasserstoffperoxidzugabe auf die Prozessstabilität von Novozym® 435 analysiert. Die Stabilität konnte durch den Einsatz einer konstanten Wasserstoffperoxidzugabe, die Anpassung des Zugabezeitraums und der Wasserstoffperoxidkonzentration von 5 auf 12 Zyklen bis zum vollständigen Aktivitätsverlust gesteigert werden. Vlček und Petrović fanden zum Vergleich bei der Epoxidierung von Sojaöl mit Novozym® 435 bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C einen drastischen Aktivitätsverlust im fünften Zyklus [157].

Die Epoxidierung von Pflanzenöl-basierten Derivaten wie freien Fettsäuren und Dicarbonsäuren sollte aufgrund des Schmelzpunktes des Substrates oder des hergestellten Epoxides in Lösemitteln erfolgen. Dabei konnte die Epoxidierung von Öl-, Linol-,  $\alpha$ -Linolen- und Tallölfettsäuren bei einer Konzentration von 1,5 M und einer Temperatur von 40 °C mit hohen Ausbeuten ohne Bildung von Präzipitaten gezeigt werden. Zur vollständigen Epoxidierung von Erucasäure war bei dieser Konzentration eine Erhöhung der Temperatur auf 50 °C erforderlich. Im Gegensatz zu freien Fettsäuren konnte die enzymatische Epoxidierung von Ölsäuremethylester auch in lösemittelfreien Ansätzen mit hohen Ausbeuten durchgeführt werden. Dabei entstand, wie von Orellana-Coca *et al.* beschrieben [114], ein signifikanter Anteil an Epoxystearinsäure. Der Anteil von Epoxystearinsäure konnte in dieser Arbeit in einem Ansatz von 1,5 M Methyloleat in Toluol unter Zugabe von MeOH reduziert werden. Des Weiteren wurde eine Rückveresterung von Epoxystearinsäure aus einem Gemisch mit Epoxystearinsäuremethylester durch Zugabe von Methanol gezeigt. Die Epoxidierung ungesättigter 9-Octadecen-1,18-dicarbonsäure konnte in dieser Arbeit erfolgreich gezeigt und dabei Moleküle mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen hergestellt werden. Die Umsetzung von 9-Octadecen, das als Koppelprodukt bei der Metathese von Ölsäuremethylester anfällt, konnte durch Einsatz von Dimethylcarbonat als Lösemittel und Cosubstrat für die Lipase-katalysierte Persäurebildung realisiert werden. Das hergestellte 9-Epoxyoctadecan kann aufgrund der eingebrachten reaktiven Gruppe weiter umgesetzt werden. So kann das bei der Metathese von Ölsäure entstehende Koppelprodukt ebenfalls einer Wertschöpfungskette zugeführt werden.

---

## 5 Maßstabsvergrößerung der Enzym-katalysierten Epoxidierung

Neue Produkte und Verfahren in der chemischen und biotechnologischen Industrie werden zuerst im Labor entwickelt, um sie anschließend in den Technikums- und Industriemaßstab zu übertragen. In der Entwicklungsphase werden reaktions- und verfahrenstechnische Parameter optimiert, um eine hohe Ausbeute und Selektivität zu erzielen. Während der Maßstabsübertragung besteht das Ziel darin, das im Labor optimierte Verfahren mit einem vergleichbaren Reaktionsverlauf in einer geometrisch größeren Produktionsanlage zu realisieren. Diese Maßstabsvergrößerung wird auch als *Scale-up* bezeichnet [208, 209].

Der Einfluss verschiedener reaktionstechnischer Prozessgrößen, wie beispielsweise der Enzymdosierung, der Reaktionstemperatur und der Lösemittelmenge bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung nicht-lebensmittelrelevanter Pflanzenöle wurde bereits in Abschnitt 4.4.2.2 untersucht und für diese Öle optimierte Reaktionsbedingungen festgelegt. In dieser Arbeit sollte die chemo-enzymatische Epoxidierung auf Basis der zuvor erzielten Ergebnisse in einen größeren Reaktionsmaßstab übertragen werden. Da die chemo-enzymatische Epoxidierung ein dreiphasiges Reaktionssystem aus zwei praktisch nicht-mischbaren flüssigen Phasen und einem auf einem festen Trägermaterial immobilisierten Biokatalysator umfasst, sollte der Fokus der Untersuchungen auf die Durchmischung der beiden flüssigen Phasen und dem sich daraus ergebenden Einfluss auf die Epoxidierung gelegt werden. Zur Charakterisierung der Durchmischung der beiden Phasen sollte die Tropfengrößenverteilung *in situ* gemessen und mit den Ergebnissen zur chemo-enzymatischen Epoxidierung verknüpft werden, um ein geeignetes Kriterium zur Maßstabsvergrößerung auszuwählen und anhand von Untersuchungen im größeren Reaktionsmaßstab zu evaluieren.

Nachfolgend werden zunächst die Grundlagen zur Maßstabsvergrößerung von Prozessen in Rührreaktoren vorgestellt und die Besonderheiten beim Scale-up mehrphasiger Reaktionssysteme betrachtet (siehe Kapitel 5.2). Ein Fokus soll dabei auf die Durchmischung von annähernd unmischbaren Flüssigkeiten gelegt werden (siehe Abschnitt 5.2.2). Hier spielen Tropfenbruch, Koaleszenz und die *in situ*-Bestimmung von Tropfengrößenverteilungen eine wesentliche Rolle.

### 5.1 Kriterien zur Maßstabsvergrößerung mehrphasiger Reaktionssysteme bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung

Die chemo-enzymatische Epoxidierung erfolgt in einem dreiphasigen System aus einer organischen, das Pflanzenöl enthaltenden Phase, einer wässrigen Phase und einem festen Katalysator. Der Stofftransfer zwischen diesen Phasen wird in dieser Arbeit als wichtiger

---

Faktor im Zusammenhang mit der Reaktionsgeschwindigkeit betrachtet. Dabei wird der Phasengrenzfläche zwischen den zwei Flüssigphasen eine übergeordnete Bedeutung zugeordnet, während die spezifische Oberfläche des festen Biokatalysators bei gleichbleibender eingesetzter Menge nicht durch verfahrenstechnische Einflussgrößen wie die Rührerdrehzahl beeinflusst werden kann. Nachfolgend werden Kriterien aufgeführt, die die Ausbildung einer spezifischen Phasengrenzfläche beeinflussen [144, 208-210]:

- Rührerdrehzahl
- Dispersphasenanteil
- Grenzflächenspannung zwischen den flüssigen Phasen
- Viskosität der kontinuierlichen und dispersen Phase

Diese vier Parameter werden als wesentliche Faktoren vermutet und sollten in dieser Arbeit hinsichtlich ihres Einflusses bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung untersucht werden. In den nachfolgenden Abschnitten sollen die zuvor angesprochenen Grundlagen zur Maßstabsübertragung in Bezug auf die mehrphasigen Reaktionssysteme zusammengefasst werden, um ein weitreichenderes Verständnis für die Aufgabenstellung beim Scale-up der chemo-enzymatischen Epoxidierung zu vermitteln.

## **5.2 Maßstabsvergrößerung bei nicht-mischbaren flüssig/flüssig Reaktionssystemen**

Nachfolgend soll auf spezielle Gesichtspunkte bei der Vergrößerung gerührter Reaktoren zum Dispergieren ineinander nicht-mischbarer Flüssigkeiten eingegangen werden (siehe Abschnitt 5.2.1 und 5.2.2), um die Grundlagen zur Betrachtung des Scale-up der chemo-enzymatischen Epoxidierung zu vermitteln. Dabei wird der Fokus auf das Durchmischen mehrphasiger flüssig/flüssig-Gemische in Rührreaktoren gelegt, um in den folgenden Abschnitten ein geeignetes Kriterium zur Maßstabsübertragung identifizieren zu können. Ergänzt werden diese Betrachtungen durch einen Abschnitt zu Tropfenbruch und Koaleszenz (siehe Kapitel 5.2.3).

Zur Charakterisierung der Durchmischung des bei der enzymatischen Epoxidierung vorliegenden flüssig/flüssig-Systems und der experimentellen Evaluierung des ausgewählten Kriteriums zur Maßstabsvergrößerung sollte in dieser Arbeit die Tropfengrößenverteilung im Reaktionssystem bestimmt werden. Methoden zur Messung der Tropfengrößenverteilung in Dispersionen werden in Abschnitt 5.2.4 vorgestellt.

### 5.2.1 Klassische Rühraufgaben, Standardreaktoren und Grundlagen zur Maßstabsübertragung

Rührreaktoren gehören zu den am häufigsten eingesetzten Reaktortypen in der chemischen und biotechnologischen Industrie. Der Rührer hat je nach Anwendung folgende Haupt-rühraufgaben zu erfüllen [210-213]:

- Homogenisieren – Ausgleichen von Konzentrations- und Temperaturgradienten
- Intensivieren des Wärmeaustausches
- Suspendieren von Feststoffen in Flüssigkeiten
- Dispergieren von Gasen in Flüssigkeiten
- Dispergieren zweier ineinander nicht-mischbarer Flüssigkeiten

Bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung besteht die Hauptrühraufgabe im Mischen zweier annähernd nicht-mischbarer flüssiger Phasen, also im Dispergieren. Damit steht auch bei der Maßstabsvergrößerung dieses Verfahrens der Dispergierprozess mit Hilfe eines Rührers im Fokus. Zur Betrachtung einer solchen physikalisch-technischen Herausforderung wird beim Scale-up die Ähnlichkeitstheorie oder auch Modelltheorie eingesetzt. Nach dieser Theorie sind zwei Vorgänge untereinander vollständig ähnlich, wenn sie sich in geometrisch ähnlichen Räumen abspielen und alle Kennzahlen, die den Vorgang beschreiben, den gleichen Zahlenwert haben ( $\pi = \text{idem}$ ) [209, 214]. Auf unterschiedliche Kennzahlen soll in den folgenden Abschnitten eingegangen werden. Im Zusammenhang mit der Maßstabsübertragung werden nachfolgend Modell-/Laborausführung (Index M) und Hauptausführung (technisch nächstgrößerer Maßstab, Index H) unterschieden.

Die geometrische Ähnlichkeit kann beim Einsatz klassischer Rührreaktoren durch Auswahl geeigneter Reaktoren in der Modell- und Hauptausführung realisiert werden. Die Hauptausführung stellt eine lineare Vergrößerung des Modellmaßstabs dar, bei der alle Längenmaße des Rührreaktors in einem festen Verhältnis zur entsprechenden Abmessung im Labormaßstab stehen. Dazu gehören beispielsweise der Reaktordurchmesser  $D$ , der Rührerdurchmesser  $d_R$ , die Abmessungen der Strombrecher oder die Füllhöhe  $H$ . Dieses feste Verhältnis wird als Maßstabsfaktor  $\mu$  bezeichnet und nach Formel 4 berechnet [209, 214].

$$\mu = l_H / l_M \quad (l \text{ als beliebige Längenmaße)} \quad \text{Formel 4}$$

$l_H, l_M$                       Längenabmessungen in der Haupt- und Modellausführung

Des Weiteren sollte beim Scale-up auch die stoffliche Ähnlichkeit eingehalten werden. Dies erfolgt durch Verwendung gleicher Stoffsysteme in der Modell- und Hauptausführung. Auch Parameter, die die Stoffwerte des Mediums beeinflussen, wie die Temperatur, müssen dabei

Beachtung finden [209, 214, 215].

Während die geometrische und stoffliche Ähnlichkeit in Modell- und Hauptausführung durch Auswahl entsprechender Reaktoren und Stoffsysteme umgesetzt werden können, sind zur Einhaltung der physikalischen Ähnlichkeit meist dimensionshomogen formulierte Kennzahlen anzuwenden, die ein chemisches oder technisches Problem allgemein gültig und unabhängig vom Größenmaßstab beschreiben. Diese Kennzahlen werden mit Hilfe der Dimensionsanalyse ermittelt. Eine ausführliche Beschreibung zum Vorgehen bei der Dimensionsanalyse findet sich zum Beispiel in Zlokarnik 2005 [209]. Die so erhaltenen dimensionslosen Kennzahlen können anschließend als Übertragungskriterium beim Scale-up eingesetzt werden. Dabei wird der Zahlenwert der ausgewählten dimensionslosen Kennzahl in unterschiedlichen Größenausführungen konstant gehalten. In der Regel können nicht mehr als zwei dieser Ähnlichkeitsbedingungen konstant gehalten werden [209, 214]. Die Verwendung dimensionsloser Kennzahlen soll nachfolgend am Beispiel der Reynoldszahl vorgestellt werden.

Die Reynoldszahl ist eine Größe zur Beschreibung des Strömungszustandes in einem Rührreaktor und kann als Verhältnis von Trägheits- zu Reibungskräften interpretiert werden [212]. Sie kann bei der Maßstabsvergrößerung als Übertragungskriterium dienen, wobei die Reynoldszahl in Modell- und Hauptausführung denselben Zahlenwert ( $Re_M = Re_H$ ) annehmen muss. Das Vorgehen zur Berechnung einer Rührerdrehzahl in der Hauptausführung auf Basis einer konstanten Reynoldszahl ist in Formel 5 und Formel 6 dargestellt [209, 210, 212]. Der Maßstabsfaktor wird mit  $\mu = 10$  angenommen.

$$Re_M = Re_H \quad \longrightarrow \quad \left( \frac{n \cdot d_R^2 \cdot \rho}{\eta} \right)_M = \left( \frac{n \cdot d_R^2 \cdot \rho}{\eta} \right)_H \quad \text{Formel 5}$$

$Re_M, Re_H$	Reynoldszahlen in Modell- und Hauptausführung
$n$	Rührerdrehzahl
$d_R$	Rührerdurchmesser
$\rho$	Dichte der Flüssigkeit
$\eta$	dynamische Viskosität der Flüssigkeit

Bei Verwendung des gleichen Stoffsystems in Modell- und Hauptausführung können aufgrund der gleichen Stoffwerte die Dichte und die dynamische Viskosität in Formel 5 eliminiert werden. In der Folge ergibt sich unter Verwendung eines Maßstabsfaktors von  $\mu = 10$  die Formel 6.

$$(n \cdot d_R^2)_M = (n \cdot d_R^2)_H \quad \longrightarrow \quad n_H = \frac{n_M}{\mu^2}$$

Formel 6

$$\text{mit } \mu = \frac{d_{R,H}}{d_{R,M}} = 10 \quad \longrightarrow \quad n_H = \frac{n_M}{100}$$

$n_H, n_M$  Rührerdrehzahl in Haupt- und Modellausführung  
 $d_H, d_M$  Rührerdurchmesser in Haupt- und Modellausführung

Damit ergibt sich in der Hauptausführung bei einem Maßstabsfaktor von 10 eine 100-fach geringere Rührerdrehzahl. Im Falle eines *Scale-down* zur Untersuchung von im technischen Maßstab problematischen Prozessen kann es im Umkehrschluss zu sehr hohen Drehzahlen in der Modellausführung kommen, um das Übertragungskriterium einer konstanten Reynoldszahl einzuhalten [209-212, 214].

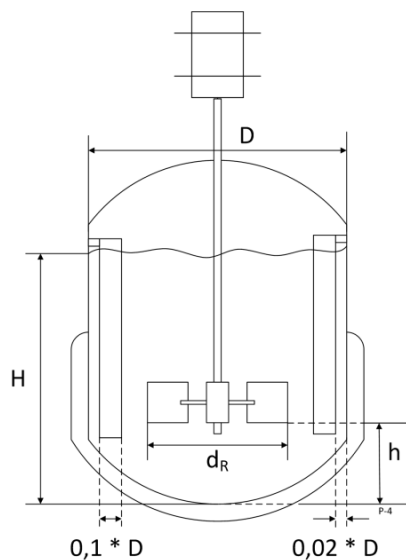
### 5.2.2 Rühren nicht-mischbarer flüssig/flüssig-Systeme

Der Prozess der chemo-enzymatischen Epoxidierung ist charakterisiert durch ein annähernd nicht-mischbares System aus organischer und wässriger Flüssigkeit. Bei der Durchmischung eines solchen Reaktionsgemisches aus ineinander nicht-löslichen Flüssigkeiten besteht das Ziel in der Vergrößerung der Phasengrenzfläche zwischen der dispersen in Tropfen zerkleinerten Phase und der sie umgebenden kontinuierlichen Phase. Der Prozess wird als Dispergieren bezeichnet. Durch die Vergrößerung der Phasengrenzfläche können Extraktionsprozesse oder chemische Reaktionen beschleunigt werden [210-212]. Welche der beiden flüssigen Phase dispergiert wird, hängt von verschiedenen Umständen ab. Meist liegt die Phase mit geringerem Volumenanteil als disperse Phase vor. Liegen die beide Phasen in einem ähnlichen Volumenverhältnissen vor ( $0,5 \pm 0,2$ ), spielen Startbedingungen wie beispielsweise die Positionierung des Rührers eine Rolle. Dabei kann es zur Phaseninversion kommen, bei der die disperse Phase in die kontinuierliche Phase umschlägt und umgekehrt [210, 213, 216]. Der Anteil der dispersen Phase, bezogen auf das Gesamtvolumen, wird dabei als Dispersphasenanteil  $\varphi$  bezeichnet. Der Dispersphasenanteil wird nach Formel 7 bestimmt.

$$\varphi = \frac{V_D}{V_D + V_K} \quad \text{Formel 7}$$

$\varphi$  Dispersphasenanteil der Dispersion in % oder -  
 $V_D$  Volumen der dispersen Phase in L  
 $V_K$  Volumen der kontinuierlichen Phase in L

Für Dispergierprozesse eignen sich vor allem Scheiben- und Zahnscheibenrührer. Diese Rührer erzeugen beim Rotieren hohe Scherkräfte, die zur Zerteilung der dispersen Phase in kleine Tropfen benötigt werden. Die erzeugte Richtung der Strömung verläuft dabei primär in radialer Richtung. In Abbildung 49 sind für einen mit einem Scheibenrührer ausgestatteten Reaktor charakteristische Abmessungsverhältnisse gezeigt [208, 210-213, 215].

**A****B****Geometrische Verhältnisse**

$$d_R/D = 0,3$$

$$H/D = 1$$

$$h/d_R = 1$$

**Strombrecher**

$$\text{Abstand zur Reaktorwand} = 0,02 * D$$

$$\text{Breiter} = 0,1 * D$$

**Abbildung 49: (A) Skizze eines bewehrten Rührreaktors mit Scheibenrührer nach [213], (B) geometrische Standardverhältnis in einem Rührreaktor mit Scheibenrührer [208, 210-212, 215].**

Der vom Scheibenrührer ausgehende radiale Förderstrahl wird an der Wand in einen unteren und einen oberen Bereich geteilt. Der Rührer wird im unteren Reaktorbereich eingebaut. Der Abstand  $h$  vom Reaktorboden entspricht standardmäßig dem Rührerdurchmesser  $d_R$ . Eine zunehmende Verringerung der Einbauhöhe wirkt sich bei einem radialfördernden Rührer negativ auf das Strömungsverhalten aus, da sich die Newtonzahl dabei verringert und zudem die Zirkulation des Mediums unter dem Rührer behindert wird [210, 211, 213].

Bei zentrisch in einem zylindrischen Behälter eingebauten Rührern wird die Flüssigkeit ohne Einbau von Strombrechern in Rotation versetzt. Es kommt zur Ausbildung einer Trombe. Wenn die Trombe die Rührerebene erreicht, kommt es zu einem meist unerwünschten Lufteintrag und einer Abnahme des Leistungseintrages. Außerdem kann es aufgrund der fehlenden Flüssigkeitslagerung im Extremfall zum Bruch der Rührwelle kommen. Senkrecht entlang der Reaktorwand eingebaute Strombrecher verhindern die Ausbildung einer Trombe und damit verbundene unerwünschte Effekte. Bei dem Einsatz von Scheibenrührern sollten Strombrecher verwendet werden, da sich dadurch der Leistungseintrag um bis zu einem Faktor von 20 steigern lässt [210, 211, 213].

Der zum Dispergieren beschränkt mischbarer Medien einsetzbare Scheibenrührer sollte im turbulenten Strömungszustand mit  $Re > 10^4$  betrieben werden, um zum einen für einen ausreichenden Energieeintrag zur Zerteilung der dispersen Phase zu sorgen und zum anderen für vergleichbare Strömungsverhältnisse in den verschiedenen großen Reaktorausführungen zu sorgen. Das Strömungsverhalten lässt sich dabei in drei folgenden Strömungsbereiche einteilen [208, 210, 211, 216]:

1. laminarer Strömungsbereich:  $Re < 10$ , Medium fließt in nicht durchmischten Schichten, Einsatz von Strombrechern nicht nötig, Zähigkeitskraft überwiegt Trägheitskraft
2. Übergangsbereich:  $10 < Re < 10^4$ , Einfluss der Zähigkeitskräfte nimmt mit Zunahme der Reynoldszahl ab, Trägheitskräfte nehmen zu
3. turbulenter Strömungsbereich:  $Re > 10^4$ , kein Einfluss der Zähigkeitskräfte

Beim Dispergieren im Rührbehälter stellt sich nach einer gewissen Rührzeit ein Gleichgewichtszustand zwischen Tropfenbruch- und Koaleszenzvorgängen ein, der durch eine spezifische Tropfengrößenverteilung charakterisiert ist. Da Tropfenbruch und Koaleszenz bei der Durchmischung nicht-löslicher flüssiger Phasen eine große Bedeutung haben, wird in Kapitel 5.2.3 näher auf diese Vorgänge eingegangen. Zur vereinfachten Darstellung dieser Tropfengrößenverteilung wird häufig eine mittlere repräsentative Tropfengröße als sogenannter Sauterdurchmesser  $d_{32}$  angegeben. Der Sauterdurchmesser lässt sich nach Formel 8 berechnen und setzt dabei die Summe der Volumina aller kugelförmigen Tropfen ins Verhältnis zu deren Oberfläche [210-212, 214, 217].

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n d_{p,i}^3}{\sum_{i=1}^n d_{p,i}^2} \quad \text{Formel 8}$$

$d_{32}$	Sauterdurchmesser in $\mu\text{m}$
$n$	Anzahl der Tropfen
$d_{p,i}$	Durchmesser des Tropfens $i$ in $\mu\text{m}$

Der Sauterdurchmesser steht im direkten Zusammenhang mit der volumenbezogenen Phasengrenzfläche, die nach Formel 9 berechnet werden kann [210-212, 214, 217].



$$a = \frac{A}{V} = \frac{\sum_{i=1}^n \pi \cdot d_{P,i}^2}{\sum_{i=1}^n \left( \pi \cdot \frac{d_{P,i}^3}{6} \right)} = \frac{6 \cdot \varphi}{d_{32}} \quad \text{Formel 9}$$

a	Grenzfläche bezogen auf das Volumen der dispersen Phase $\varphi$
$d_{32}$	Sauterdurchmesser in $\mu\text{m}$
n	Anzahl der Tropfen
$d_{P,i}$	Durchmesser des Tropfens i in $\mu\text{m}$
$\varphi$	Dispersphasenanteil in -

Der Sauterdurchmesser bzw. die Phasengrenzfläche sind nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes unter Verwendung von gegebenen Rührerarten und Reaktoreinbauten im Behälter von den in Formel 10 aufgeführten Größen abhängig [210, 212, 214]:

$$d_{32} \text{ bzw. } a = f(n, d_R, g, \rho_D, \rho_K, \nu_D, \nu_K, \sigma, \varphi) \quad \text{Formel 10}$$

$d_{32}$	Sauterdurchmesser
a	Grenzfläche bezogen auf das Volumen der dispersen Phase $\varphi$
n	Rührerdrehzahl
$d_R$	Rührerdurchmesser
g	Erdbeschleunigung
$\rho_D, \rho_K$	Dichte der dispersen und der kontinuierlichen Phase
$\nu_D, \nu_K$	kinematischen Viskosität der dispersen und der kontinuierlichen Phase
$\sigma$	Grenzflächenspannung zwischen den flüssigen Phasen
$\varphi$	Dispersphasenanteil

Wie aus Formel 9 hervorgeht, ist beim Dispergieren ein möglichst kleiner Sauterdurchmesser erwünscht, da dieser gleichbedeutend mit einer großen Phasengrenzfläche und einem verbesserten Stoffaustausch zwischen den beiden Flüssigkeiten ist. Aus der Literatur sind verschiedene empirisch ermittelte mathematische Formulierungen bekannt, die zur Berechnung des Sauterdurchmessers in einem spezifischen Stoffsystem herangezogen wurden. In diesen Formeln ist die Weberzahl als dimensionslose Kennzahl enthalten, die zur Charakterisierung von Dispersionsvorgängen verwendet wird. Die Weberzahl ist als Maß für den Deformationsgrad eines Tropfens aufzufassen. Sie stellt das Verhältnis der Trägheitskraft zur Oberflächenkraft  $\sigma$  dar (siehe Formel 11). Die Trägheitskraft führt zur Deformierung der Tropfen und muss größer als die den Tropfen stabilisierende Oberflächenkraft sein, um eine Tropfenzerkleinerung zu ermöglichen [210, 212-214].

$$We = \frac{\rho \cdot n^2 \cdot d_R^3}{\sigma} \quad \text{Formel 11}$$

We	Weberzahl
$\rho$	Dichte als mittlere Dicht des Gesamtgemisches
n	Rührerdrehzahl
$d_R$	Rührerdurchmesser
$\sigma$	Grenzflächenspannung zwischen den flüssigen Phasen

Der Term der Trägheitskraft beinhaltet die Dichte  $\rho$ , die Drehzahl des Rührers n und den Rührerdurchmesser  $d_R$ . Bei einem gegebenen Stoffsystem ist die Weberzahl vor allem von der Rührerdrehzahl und dem Rührerdurchmesser abhängig. Die Weberzahl wird mit zunehmender Drehzahl größer. Je größer die Weberzahl wird, desto größer sind die auf den Tropfen wirkenden deformierenden Kräfte und umso kleiner sind die zu erwartenden Tropfen [218].

Die empirischen Formeln zur Berechnung des Sauterdurchmessers in gerührten Dispersionen basieren auf der Annahme isotroper Turbulenz, da sie der Turbulenztheorie nach Kolmogorov entstammen [217-219]. Dabei wird angenommen, dass der Energieeintrag in den Rührreaktor überall gleich groß ist und somit homogene, isotrope Turbulenz herrscht. Mit dieser Annahme kann nach Formel 12 eine maximale stabile Tropfengröße  $d_{\max}$  in Abhängigkeit von der Weberzahl und dem Durchmesser des Rührers  $d_R$  berechnet werden.

$$\frac{d_{\max}}{d_R} = C_1 \left( \frac{n^2 \cdot d_R^3 \cdot \rho}{\sigma} \right)^{-0,6} = C_1 \cdot We^{-0,6} \quad \text{Formel 12}$$

$d_{\max}$	Maximal stabiler Tropfendurchmesser
$C_1$	Reaktor- und Betriebsparameter-spezifische Konstante
$\rho$	Dichte als mittlere Dicht des Gesamtgemisches
n	Rührerdrehzahl
$d_R$	Rührerdurchmesser
$\sigma$	Grenzflächenspannung zwischen den flüssigen Phasen
We	Weberzahl

Der maximal stabile Tropfendurchmesser  $d_{\max}$  ist proportional zum Sauterdurchmesser  $d_{32}$  [218, 219], wonach sich Formel 13 ergibt.

$$\frac{d_{32}}{d_R} = C_2 \cdot We^{-0,6} \quad \text{Formel 13}$$

$d_{32}$	Sauterdurchmesser
$d_R$	Rührerdurchmesser
$C_2$	Reaktor- und Betriebsparameter-spezifische Konstante
We	Weberzahl

Formel 13, in der keine Koaleszenzvorgänge berücksichtigt sind, kann um weitere Terme erweitert werden, in denen beispielsweise durch Einführung des Dispersphasenanteils  $\varphi$  und zusätzlicher Konstanten auch die Koaleszenz berücksichtigt wird. Mit Formel 14 werden die Konstanten  $C_4$  und  $C_3$  eingeführt.  $C_4$  ist dabei von dem verwendeten Rührer und  $C_3$  von der Koaleszenzneigung des verwendeten Reaktionssystems abhängig. Bei leicht koaleszierenden Systemen wird ein hoher Wert für  $C_3$  (<20) verwendet und bei geringer Koaleszenzneigung ein niedriger Wert (>3) [213, 219-223].

$$\frac{d_{32}}{d_R} = C_4 \cdot (1 + C_3 \cdot \varphi) \cdot We^{-0,6} \quad \text{Formel 14}$$

$d_{32}$	Sauterdurchmesser
$d_R$	Rührerdurchmesser
$C_4$	Rührerspezifische Konstante
$C_3$	Stoffsystemspezifische Konstante zur Beschreibung der Tendenz zum Koaleszieren
$We$	Weberzahl

Nach Formel 14 führt ein höherer Dispersphasenanteil  $\varphi$  zur Erhöhung des Sauterdurchmessers, weil zum einen die auftretende Turbulenz gedämpft und zum anderen die Koaleszenzrate gesteigert werden kann [213, 219-223]. Weitere Varianten zur empirischen Berechnung des Sauterdurchmessers berücksichtigen zusätzlich die Viskositäten der dispersen und kontinuierlichen Phase. Eine Übersicht ist im Anhang (siehe 8.3.11, Tabelle 40) dargestellt.

Beim Dispergieren eines nicht-mischbaren Zweiphasensystems, wie es bei der chemoenzymatischen Epoxidierung vorliegt, ist die Phasengrenzfläche zwischen den beiden Flüssigkeiten einer der wichtigsten Parameter. Beim Scale-up soll die gleiche volumenbezogene Phasengrenzfläche, die mit einem gleichbleibenden Sauterdurchmesser  $d_{32}$  einhergeht, in der Modell- und Hauptausführung erzielt werden. Der Sauterdurchmesser kann konstant gehalten werden, wenn in der Labor- und der technischen Anlage die gleiche volumenspezifische Rührleistung  $P_V$  aufgebracht wird. Dieses Skalierungskriterium ist als Büche-Theorem bekannt. Für viele Rühraufgaben ist es ein guter Kompromiss für das Scale-up und zahlreiche nach dem Büche-Theorem ausgelegte Reaktoren arbeiten sehr erfolgreich. Um die volumenspezifische Rührleistung in der Hauptausführung  $(P_V)_H$  entsprechend der im Modell  $(P_V)_M$  einzustellen, muss die erforderliche Drehzahl in der Hauptausführung je nach vorliegendem Strömungszustand nach einer der Formeln 15 bis 17 berechnet werden [210, 211, 213, 214, 216].

▪ Laminarer Bereich  $n_H = n_M$  Formel 15

▪ Übergangsbereich  $n_H = n_M \cdot \mu^{\frac{2-2m}{3-m}}$  mit  $m = \frac{1}{4}: n_H = n_H \cdot \mu^{-6/11}$  Formel 16  
 $\approx n_M \cdot \mu^{-1/2}$

▪ Turbulenter Bereich  $n_H = n_M \cdot \mu^{-\frac{2}{3}}$  Formel 17

$n_H$  Rührerdrehzahl in der Hauptausführung  
 $n_M$  Rührerdrehzahl in der Modellausführung  
 $\mu$  Maßstabsfaktor

Mit Zunahme der Turbulenz im Reaktor kann die gleiche volumenspezifische Rührleistung  $P_V$  mit immer kleiner werdenden Drehzahlen erreicht werden [214, 216]. Da sich Dispergierprozesse größtenteils im turbulenten Strömungsbereich abspielen, ist Formel 17 für das Scale-up der chemo-enzymatischen Epoxidierung relevant.

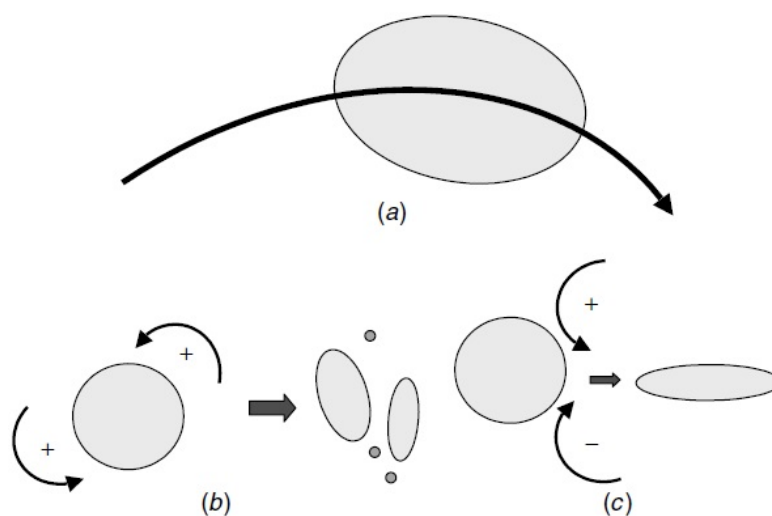
### 5.2.3 Tropfenbruch und Koaleszenz

Beim Dispergieren spielen die Tropfenzerkleinerung und Koaleszenz eine wichtige Rolle. Die für eine disperse Flüssigphase erzielbare Tropfengrößenverteilung im Reaktor wird durch das Auftreten von Wirbeln, die durch den Rührer erzeugten Scherkräfte und das Strömungsverhalten des Mediums bestimmt. Im Reaktor entstehen beim Rühren nicht-mischbarer Medien Bereiche, die von Koaleszenz dominiert werden und Bereiche, in denen die Tropfen zerteilt werden und Tropfenbruch überwiegt. Die Tropfenzerkleinerung erfolgt aufgrund starker Turbulenzen und Wirbel in der Nähe des Rührers [224]. Koaleszenz-dominierte Bereiche treten aufgrund einer geringeren Turbulenzintensität in der Nähe der Reaktorwand und in den oberen und unteren Bereichen des Reaktors auf [216].

Die Tropfen werden ununterbrochen zerteilt und koaleszieren wieder. Dabei wird ein dynamisches Gleichgewicht erreicht, das durch eine charakteristische Tropfengrößenverteilung gekennzeichnet ist [216, 224-226]. Auf beide Phänome wird nachfolgend eingegangen. Besonders in von Koaleszenz geprägten Dispersionen ist eine Untersuchung der Tropfengrößenverteilung von geeigneten Messmethoden abhängig. In Abschnitt 5.2.4 werden daher Ansätze zur Online-Messung der Tropfengrößenverteilung vorgestellt.

### Tropfenbruch

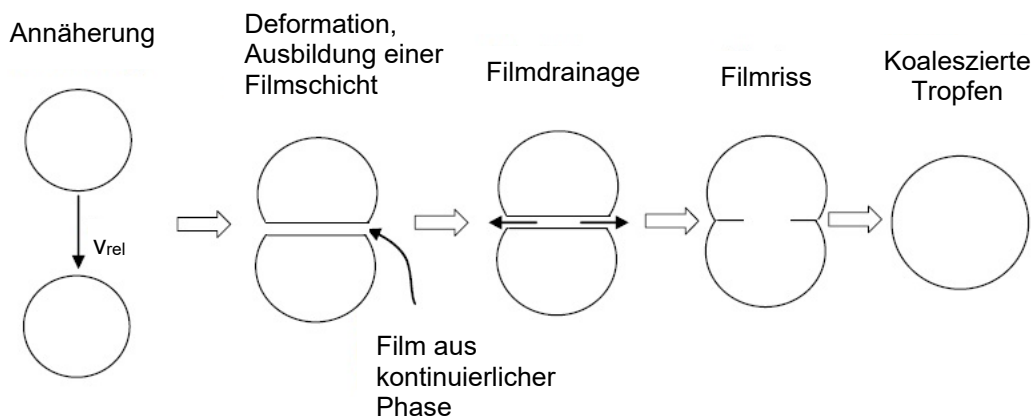
Die Größe der durch den Rührer erzeugten Wirbel ist entscheidend für die Zerkleinerung von Tropfen. Werden Tropfen von größeren Wirbeln getroffen, rotieren diese meist innerhalb des Wirbels und werden nicht zerschlagen. Besitzt der Wirbel jedoch die gleiche Größe oder ist kleiner als der Tropfen, kann dieser verformt werden und zerbrechen [216, 217, 224]. Das Zerteilen eines Tropfens in mehrere kleinere Tropfen wird durch mechanische Kräfte verursacht, die vom umgebenden Medium, vom Rührer und Reaktoreinbauten ausgehen. Diesen Kräften stehen die Oberflächen- und Viskositätskräfte entgegen, die als Widerstandskräfte bezeichnet werden. Übertreffen die Kräfte, die vom Fluid ausgehen, die Widerstandskräfte, kommt es zur Deformation und schließlich zum Brechen des Tropfens [216, 217, 224, 226, 227]. Alle Deformationskräfte, die das Zerteilen eines Tropfens verursachen können, werden unter dem Begriff der Scherkräfte zusammengefasst. Dies kann der Aufprall des Tropfens auf die Reaktorwand, den Rührer oder den Strombrecher sein. Wird ein Tropfen beispielsweise durch auftretende Kräfte deformiert, muss dieser nicht gleich zerteilt werden. Die Oberflächenspannung versucht dabei die Oberfläche des Tropfens möglichst gering zu halten, indem er den deformierten Tropfen in seine ursprüngliche sphärische Form zwingt. In Abbildung 50 sind verschiedene Deformationsweisen eines Tropfens dargestellt. Durch große Wirbel wird der Tropfen lediglich mitgetragen (a), bei gleichgerichteten Wirbeln wird dieser zerschlagen (b) und durch entgegengesetzt rotierende Wirbel kommt es zur Verformung des Tropfens, jedoch nicht zum Tropfenbruch (c) [218]. Die Tropfengrößenverteilung im dynamischen Gleichgewicht hängt des Weiteren von der Viskosität der dispersen und kontinuierlichen Phase und der zwischen ihnen vorliegenden Grenzflächenspannung ab [218, 225, 226, 228, 229].



**Abbildung 50: Verschiedene Deformationsweisen eines Tropfens hervorgerufen durch Wirbel [218].**

### Koaleszenz

Kommt es zur Kollision zweier Tropfen in turbulenzärmeren Regionen, kann es bei ausreichend langem Kontakt zum Zusammenschluss der Tropfen, der sogenannten Koaleszenz, kommen [224]. Die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens von Tropfen steigt mit zunehmendem Dispersphasenanteil und lokalen Geschwindigkeitsschwankungen [216, 227]. Die Koaleszenzwahrscheinlichkeit zweier aufeinandertreffender Tropfen hängt dabei von der Aufprallkraft, der Oberflächenbeschaffenheit und der Zeit des Kontaktes der Tropfen ab. Das Zusammentreffen zweier Tropfen führt jedoch nicht zwangsweise zum Koaleszieren. Wenn sich zwei Tropfen annähern und daraufhin verformen, bleibt zuerst ein dünner Film der kontinuierlichen Phase zwischen den beiden Tropfen bestehen. Dieser Film muss im nächsten Schritt von den sich annähernden Tropfen verdrängt werden. Nach Erreichen einer kritischen Stärke kommt es zum Filmriss und der anschließenden Koaleszenz. Der Koaleszenzvorgang zweier Tropfen ist schematisch in Abbildung 51 dargestellt [230-232].



**Abbildung 51: Schematische Darstellung der Koaleszenz [230-232].**

Wird die kritische Stärke nicht unterschritten oder berühren sich die Tropfen nicht lange genug, damit es zur Ausbildung der Filmdrainage kommt, können sich die Tropfen voneinander entfernen und die Koaleszenz bleibt aus [218, 224, 230-232].

#### 5.2.4 Messung der Tropfengrößenverteilung in dispersen Systemen

Die Tropfengrößenverteilung (TGV) in einem dispersen System aus nicht-mischbaren Flüssigkeiten ist ein wichtiger Faktor zur Bewertung der Durchmischung und hat bei chemischen Reaktionen einen wesentlichen Einfluss auf die Reaktionsrate [233]. Aus diesem Grund ist es zur Beschreibung des Reaktionssystems erforderlich, die TGV möglichst direkt im Reaktionssystem zu messen.

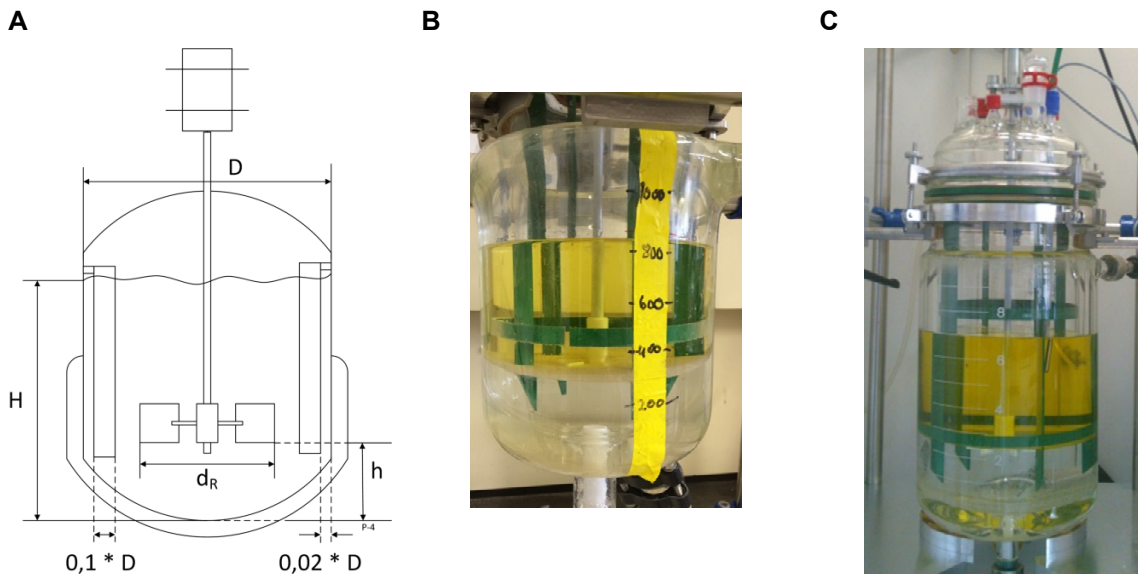
Die *in-situ*-Messung der TGV gewinnt besonders bei konzentrierten Dispersionen mit einem hohen Dispersphasenanteil an Bedeutung. Bestehende „off-line“-Analysemethoden, wie die Bildanalyse, der Coulter-Zähler oder Laserdiffraktometrie, benötigen hierzu eine Probenahme und starke Verdünnung, bevor die Tropfengröße gemessen werden kann. Bei der Probenahme und Vorbereitung zur Analyse kann es aufgrund von Koaleszenz zu einer deutlichen Veränderung der gemessenen Tropfengrößenverteilung (TGV) kommen. Das Reaktionsgemisch bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung stellt eine instabile Dispersion von Wasserstoffperoxid in einem Gemisch aus organischem Lösemittel und Pflanzenöl dar. Die Dispersion müsste zur Bestimmung der TGV mit einer „off-line“-Messmethode zusätzlich durch Einsatz geeigneter Emulgatoren stabilisiert werden, was wiederum einen signifikanten Einfluss auf die TGV hat. Daher kommen zur Messung der Tropfengrößenverteilung bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung nur alternative Methoden zur *in-situ*-Bestimmung in Frage. Die 3D-ORM-Technologie (Optische Rückreflexionsmessung), die UAS-Technologie (Ultrasound Attenuation Spectroscopy) oder die Endoskop-basierte *in-situ*-Bildanalyse stellen solche Alternativen dar [217, 219, 234]. Bei diesen Methoden werden Tropfengrößenverteilungen „in-line“ und *in-situ* erfasst. Die Messung kann in Dispersionen mit hohem Dispersphasenanteil erfolgen. Da die UAS-Technologie eine längere Messzeit und die *in-situ*-Bildanalyse einen hohen Zeitaufwand mit sich bringen, ist die 3D-ORM-Technologie die erste Wahl für die Bestimmung der Tropfengröße in Dispersionen [235, 236]. Eine Einführung in das Messprinzip der 3D-ORM-Technologie, die zur *in-situ*-Bestimmung der Tropfengröße in dieser Arbeit zum Einsatz kam, findet sich in Abschnitt 8.3.11.

### 5.3 Methodenentwicklung zur Maßstabsvergrößerung der enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopfl

In den nachfolgenden Abschnitten werden die verwendeten Reaktoren, Geräte und Methoden vorgestellt, die zur Untersuchung der Skalierbarkeit der chemo-enzymatischen Epoxidierung und der Bestimmung von Tropfengrößenverteilung in Abhängigkeit ausgewählter Prozessgrößen in dieser Arbeit verwendet wurden.

#### 5.3.1 Verwendete Reaktoren und Reaktorcharakterisierung

Nachfolgend werden die verwendeten Reaktoren, der Versuchsaufbau zur Bestimmung der Tropfengrößenverteilung mittels *in-situ*-PAT-Sensor und die chemo-enzymatische Epoxidierung im größeren Reaktionsmaßstab vorgestellt. Es wurden Rührreaktoren im 1 L- (Abbildung 52 B) und 10 L-Maßstab (Abbildung 52 C) verwendet. Eine schematische Darstellung der verwendeten Rührreaktoren ist in Abbildung 52 (A) zu erkennen.



**Abbildung 52: Schematische Darstellung des Rührreaktors mit Abmaßen (A), 1 L-Reaktor mit Strombrecher (B) und 10 L-Reaktor mit Strombrecher (C).**

Die ausgewählten Abmessungen und Reaktorkonfigurationen werden nachfolgend in Tabelle 27 aufgeführt.

**Tabelle 27: Charakteristische Abmessungen der verwendeten Rührreaktoren.**

Parameter	1 L	10 L
Reaktordurchmesser D (mm)	100	200
Füllhöhe $h_{liq}$ (mm)	100	200
Füllvolumen V (L)	0,8	6,75
$h_{liq}/D$ (-)	1	
$d_R$ (mm)	38	75
Rührblatthöhe $h_{R,B}$ (mm)	8	15
Rührblattbreite $b_{R,B}$ (mm)	10	18,8
$D/d_R$ (-)	2.63	2.67
$d_R/h_R$ (-)	1	
Anströmbreite Strombrecher: $0,1 * D$ (mm)	10	20
Abstand Strombrecher zu Reaktorwand: $0,02 * D$ (mm)	2	4
Anzahl der Strombrecherleisten nach DIN 28131 [237]	4	
Skalierungsfaktor $\mu$	-	2

Beide Reaktoren waren mit einem Heizmantel zur Temperierung über einen externen Thermostat ausgestattet. Als Rührer wurde jeweils ein 6-Blatt-Scheibenrührer verwendet, der



aufgrund seiner radialen Förderrichtung und der erzeugten hohen Scherkräfte häufig für Dispersionsapplikationen eingesetzt wird [210, 211, 213]. Zur Durchmischung des Zweiphasensystems wurde ein Rührmotor mit Drehmomentanzeige (Heidolph RZR 2102 control) verwendet. Die Strombrecher wurden speziell für beide Reaktoren angefertigt und können als Einhängkorb mit Hilfe eines Strombrecherrings in die Reaktoren integriert werden. Die Strombrecher wurden zum Schutz vor wässriger Wasserstoffperoxidlösung mit einer Polytetrafluorethylen-Beschichtung (PTFE) versehen.

### 5.3.2 Untersuchung des Einflusses verschiedener Prozessparameter auf die Tropfengrößenverteilung

Bei der Maßstabsvergrößerung der chemo-enzymatischen Epoxidierung wurde beim Dispergieren der beiden nicht-löslichen Flüssigphasen der Einfluss des Sauterdurchmessers  $d_{32}$  auf den Verlauf der Epoxidierung im Labormaßstab untersucht und anschließend in der größerskaligen Anlage konstant gehalten. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die erhaltene Tropfengrößenverteilung und damit den erzielten Sauterdurchmesser untersucht.

Für die Bestimmung der Tropfengrößenverteilung wurde ein Particle Analyzer Technology (PAT) Sensor System der Firma Sequip S+E GmbH mit der dazugehörigen MCSA-Software 1.0.4 verwendet. Die Messung der Tropfengrößenverteilung erfolgte im 1 L Reaktor 2 mm oberhalb der Rühreraustrittsebene. Vergleichbare Sondenpositionierungen wurden beispielsweise von Lovick *et al.* 2005 oder Kraume *et al.* 2012 beschrieben [212, 217].

Als Stoffsystem wurde ein Gemisch bestehend aus Drachenkopföl, technischer Ölsäure, verschiedenen Massenanteilen an Toluol und Wasserstoffperoxid (30 %) verwendet. Untersucht wurde der Einfluss des Lösemittelanteils, des Dispersphasenanteils  $\varphi$  und der Drehzahl  $n$  auf das sich jeweils ausbildende dynamische Gleichgewicht der Tropfengrößenverteilung, das in Form des Sauterdurchmessers  $d_{32}$  dargestellt wurde. Während der Tropfengrößenbestimmung wurde das Nettodrehmoment ermittelt, um somit den Leistungseintrag durch den verwendeten 6-Blatt-Scheibenrührer nach Formel 18 berechnen zu können.

$$P = M_{\text{Netto}} \cdot 2 \cdot \pi \cdot n \quad \text{Formel 18}$$

P	Nettoleistung des Rührers in W
$M_{\text{Netto}}$	Nettodrehmoment in Nm
$\omega$	Winkelgeschwindigkeit in $\text{min}^{-1}$
n	Drehzahl des Rührers in $\text{min}^{-1}$

Die dem jeweiligen Betriebszustand entsprechenden Newton- und Reynoldszahlen wurden nach Formel 19 und 20 berechnet.

$$Ne = \frac{P}{\bar{\rho} \cdot n^3 \cdot d^5} \quad \text{Formel 19}$$

$$Re = \frac{n \cdot d^2 \cdot \bar{\rho}}{\bar{\eta}} \quad \text{Formel 20}$$

Da die Berechnung dieser Kennzahlen streng genommen nur für homogene Flüssigkeiten gilt, wurden die Formeln 19 und 20 für Dispersionen angepasst, indem die mittleren Dichten und Viskositäten der Stoffsysteme eingesetzt wurden. Die Berechnung der mittleren Dichte und der mittleren Viskosität erfolgte nach Formel 21 und 22.

$$\bar{\rho} = \rho_K \cdot (1 - \varphi) + \rho_D \cdot \varphi \quad \text{Formel 21}$$

$$\bar{\eta} = \frac{\eta_K}{1 + \varphi} \cdot \left[ 1 + 1,5 \cdot \varphi \cdot \frac{\eta_D}{\eta_D + \eta_K} \right] \quad \text{Formel 22}$$

In Tabelle 28 sind die verschiedenen Einstellungen der Betriebsbedingungen zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Prozessparameter auf die zu erzielende Tropfengrößenverteilung zusammengefasst.

**Tabelle 28: Übersicht zu verschiedenen Betriebszuständen bei der Bestimmung der Tropfengrößenverteilung im mit einem 6-Blatt-Scheibenrührer gerührten Zweiphasensystem mit Hilfe eines Sequip *in-situ* PAT Sensors bei 30 °C.**

Lösungsmittelanteil (Gew. % bezogen auf Masse der org. Phase)	$\varphi$ (-)	Drehzahl (rpm)	Reaktor
0	0,343	1000, 1400	1 L
	0,575	1000	
10	0,343	630, 880	10 L
	0,575	630	
20	0,343	1000, 1400	
	0,517	1000	
40	0,343	1000, 1400	
	0,442	1000	
60	0,343	600, 1000, 1400	1 L
	0,281	600, 1000, 1400	
	0,207	600, 1000, 1400	
80	0,343	1000, 1400	
	0,205	1000	

Zur Bestimmung des dynamischen Gleichgewichtes der Tropfengrößenverteilung wurde der Reaktor über einen Trichter mit Verlängerungsschlauch bis zum Reaktorboden zuerst mit der organischen Phase aus Drachenkopföl, technischer Ölsäure und Toluol befüllt. Anschließend wurde das jeweilige Volumen der wässrigen Wasserstoffperoxidlösung ebenfalls über den Trichter am Reaktorboden zugeführt, um zum einen unnötige Aerosolbildung zu vermeiden und zum anderen beim Start der Messung von vollständig getrennten flüssigen Phasenbestandteilen ausgehen zu können. Die Temperierung auf 30 °C erfolgte mit einem Thermostat (Huber Ministat 240) über einen im Reaktionsmedium platziertem Temperatursensor und entsprechender Regelung. Zur Einstellung des dynamischen Gleichgewichtes wurde das Zweiphasengemisch bei den jeweiligen Betriebsbedingungen für mindestens 60 min gerührt, bevor die Aufnahme der Tropfengrößenverteilung in der Rühreraustrittsebene erfolgte. Das dynamische Gleichgewicht der Tropfengrößenverteilung wurde anschließend über einen Zeitraum von mindestens 30 min aufgezeichnet, um eventuell mögliche Änderungen in der Tropfengrößenverteilung aufgrund eines noch nicht eingestellten Gleichgewichtszustandes beobachten zu können. Das Messsystem wurde so eingestellt, dass alle gemessenen Tropfen aufsummiert wurden und nach 10 s eine Messpunktausgabe erfolgte. Die Messsonde wurde durch spezielle Stativklammern mit einem Eintrittswinkel von circa 11° in Rührerdrehrichtung in den Reaktor eingeführt, damit die Strömung auf den Sensorkopf gerichtet ist und die Linse der Messsonde die Tropfen möglichst gut erfassen kann. Für jeden Betriebszustand wurde ein frisches Reaktionsgemisch verwendet.

### 5.3.3 Epoxidierung von Drachenkopföl im 1 L- und 10 L-Maßstab

Um den Einfluss der unter bestimmten Betriebsbedingungen erhaltenen Tropfengrößenverteilung auf die chemo-enzymatische Epoxidierung beschreiben zu können, wurden bei entsprechenden Einstellungen auch die enzymatische Epoxidierung des verwendeten Drachenkopföls mit 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung und Novozym® 435 untersucht. Die chemo-enzymatische Epoxidierung von Drachenkopföl wurde bei verschiedenen Prozessbedingungen im bewehrten 1 L- und 10 L-Glasreaktor durchgeführt. Das prinzipielle Vorgehen bei der enzymatischen Epoxidierung und die Aufarbeitung der Reaktionsansätze wurde bereits in Abschnitt 4.3.2 und 4.3.4 beschrieben. Als Rührer wurde in beiden Reaktorgrößen der 6-Blatt-Scheibenrührer verwendet. Charakteristische Daten zu den beiden Reaktionssystemen wurden bereits in Tabelle 27 zusammengefasst. Die Temperatur des Reaktionsgemisches wurde auf 30 °C geregelt. Dem Reaktionsgemisch aus Drachenkopföl und Toluol wurden pro Mol C=C-Doppelbindung 5 Mol% Ölsäure zugegeben. Pro Mol C=C-Doppelbindung wurden 7,5 g Novozym® 435 eingesetzt. Zusätzlich zum Lösungsmittelanteil wurde durch Anpassung der Wasserstoffperoxidmenge auch der Dispersphasenanteil  $\phi$  variiert. Der Einfluss der

Drehzahl  $n$  wurde ebenfalls untersucht. Eine Übersicht der Prozessbedingungen ist in Tabelle 29 dargestellt.

**Tabelle 29: Auflistung der untersuchten Prozessbedingungen bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopfol im 1 L- und 10 L-Maßstab.**

Lösungsmittelanteil (Gew. %)	$\varphi$ (-)	mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / mol C=C	Drehzahl (rpm)	Reaktor
0	0,575	2	1000	1 L
20	0,517	2	1000	
40	0,442	2	1000	
	0,343	2	350, 600, 1000, 1400	
60	0,281	1,5	1000	
	0,207	1,0	1000	
60	0,343	2	*630	10 L

\*Berechnet nach Formel 17 auf Basis einer Drehzahl von 1000 rpm im 1 L-Maßstab

Für die spätere Bestimmung des Epoxidsauerstoffgehaltes wurden nach 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden 5 ml Reaktionsvolumen aus der organischen Phase mittels Glaspipette entnommen. Die Gesamtdauer der Reaktion betrug jeweils 24 Stunden.

## 5.4 Ergebnisse und Diskussion

In den nachfolgenden Abschnitten sollen die Ergebnisse zur Untersuchung der Skalierbarkeit der chemo-enzymatischen Epoxidierung vorgestellt werden. Da es sich bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung um ein Verfahren auf Basis eines mehrphasigen Reaktionssystems handelt, wurde ein wesentlicher Einfluss der Tropfengrößenverteilung auf die Reaktionsgeschwindigkeit vermutet. Die Tropfengrößenverteilung hängt von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise der Rührerdrehzahl, den Viskositäten der zu dispergierenden Phasen oder dem Dispersphasenanteil ab. In Kapitel 5.4.1 wird daher der Einfluss dieser Prozessgrößen auf die sich einstellende Tropfengrößenverteilung und damit erzielbaren Umsatzraten bei der enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopfol beschrieben. Die Ergebnisse der Maßstabsvergrößerung in den 10 L-Maßstab werden in Abschnitt 5.4.2 dargestellt. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgen in Kapitel 5.4.2 Berechnungen zur Auslegung des Reaktionssystems bis zum 100 L-Maßstab.

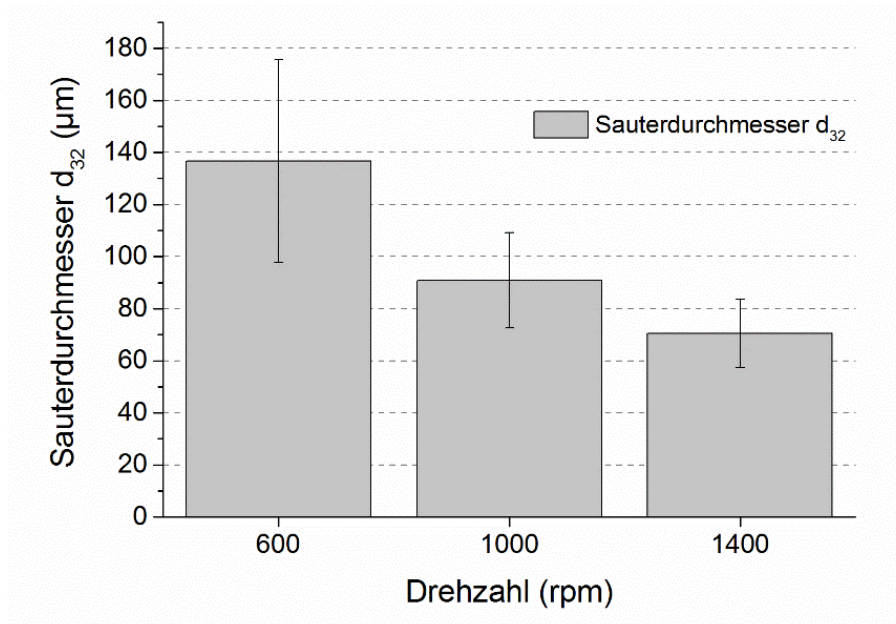
#### 5.4.1 Einfluss von Rührerdrehzahl, Lösemittel- und Dispersphasenanteil auf die Tropfengrößenverteilung und Epoxidierung im 1 L-Reaktor

Zur Maßstabsvergrößerung zweiphasiger flüssig/flüssig-Reaktionssysteme kann ein konstanter volumenspezifischer Rührerleistungseintrag als Kriterium gewählt werden, um einen konstante Sauterdurchmesser  $d_{32}$  und somit eine konstante volumenbezogene Phasengrenzfläche in verschiedenen Größenmaßstäben realisieren zu können [210]. Für die Maßstabsvergrößerung der chemo-enzymatischen Epoxidierung ist die Kenntnis über die volumenspezifische Phasengrenzfläche und den damit verbundenen Reaktionsverlauf von großer Bedeutung. Ist die volumenspezifische Rührerleistung, die zur Herstellung einer bestimmten Tropfengrößenverteilung benötigt wird, bekannt, kann diese beim Scale-up beibehalten und die gleiche Tropfengrößenverteilung im technischen Maßstab erzielt werden. Im 1 L-Maßstab (Abmessungen siehe Tabelle 27) wurden grundlegende Experimente durchgeführt, um den Einfluss von Rührerdrehzahl, Lösemittelanteil und Dispersphasenanteil (DPA) auf die zu erzielenden Tropfengrößenverteilungen und Reaktionsraten in einem aufgrund seiner standardisierten geometrischen Abmessungen skalierbaren Reaktionssystem zu evaluieren.

##### *Einfluss der Drehzahl auf die Tropfengrößenverteilung und Epoxidierung im 1 L-Reaktor*

Die chemo-enzymatische Epoxidierung von Drachenkopfol wurde bei Drehzahlen von 350, 600, 1000 und 1400 rpm durchgeführt, um deren Einfluss auf die Reaktionsrate zu untersuchen. Dabei wurde jeweils ein Lösemittelanteil von 60 Gew. % und ein Dispersphasenanteil von 0,343 (30%ige Lösung, 2 Mol  $H_2O_2$  pro Mol  $C=C$ ) eingesetzt. Mit zunehmender Drehzahl wurden aufgrund eines gesteigerten volumenspezifischen Leistungseintrages geringere Tropfengrößen und folglich kleinere Sauterdurchmesser bei vergrößerter Phasengrenzfläche erwartet. Dadurch sollte der Stofftransfer zwischen den beiden Phasen erhöht und eine schnellere Umsetzung erzielt werden. Um die Abhängigkeit der Tropfengrößenverteilung (TGV) von der Rührerdrehzahl zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die bei entsprechenden Drehzahlen erhaltene Tropfengrößenverteilung in-situ bestimmt und in Form des Sauterdurchmessers  $d_{32}$  zusammengefasst. In Abbildung 53 ist der Sauterdurchmesser in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl bei konstantem Lösemittel- und Dispersphasenanteil dargestellt. Der Lösemittel- und Dispersphasenanteil wurde bei der Messung der TGV jeweils so gewählt, wie er auch bei der enzymatischen Epoxidierung eingesetzt wurde. Es ist zu erkennen, dass der Sauterdurchmesser mit zunehmender Drehzahl und damit zunehmendem volumenspezifischen Leistungseintrag kleiner wurde und so eine größere Phasengrenzfläche zum Stoffübergang zur Verfügung steht. Die vergrößerte Phasengrenzfläche führte bei der enzymatischen Epoxidierung erwartungsgemäß zu einer

gesteigerten Umsatzrate (siehe Abbildung 54).



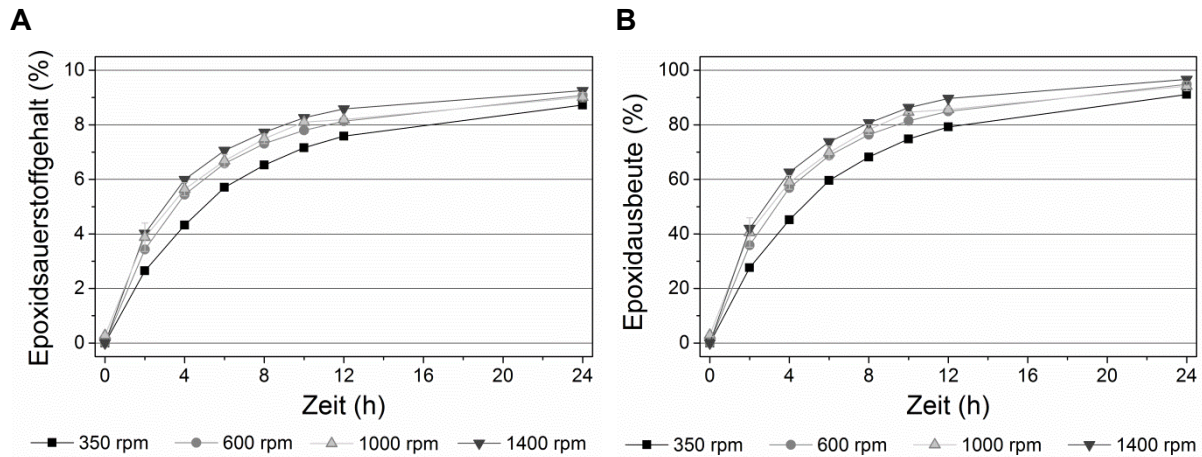
**Abbildung 53:** Einfluss der Rührerdrehzahl  $n$  auf den zu erzielenden Sauterdurchmesser  $d_{32}$  bei einem Lösemittelanteil von 60 Gew.% und einem Dispersphasenanteil von 0,343 (2 Mol  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Mol  $\text{C}=\text{C}$ ).

Vergleichbare Beobachtungen zum Einfluss der Rührerdrehzahl auf die erhaltene Tropfengrößenverteilung und den daraus resultierenden Sauterdurchmesser wurden für unterschiedliche Stoffsysteme beschrieben, wobei als kontinuierliche Phase sowohl Wasser als auch organische Lösemittel betrachtet wurden [217, 223, 238-242]. Zusätzlich zu größeren Sauterdurchmessern wurden in der vorliegenden Arbeit bei Drehzahlen von 350 und 600 rpm inhomogene Zonen im oberen Reaktorbereich festgestellt, die aufgrund geringerer Turbulenz nicht vollständig durchmischt waren und dadurch zu einer Abnahme der Reaktionsrate beigetragen haben.

In Abbildung 54 sind der Epoxidsauerstoffgehalt und die Epoxidausbeute in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen Drehzahlen bei konstantem Lösemittel- und Dispersphasenanteil dargestellt. Aus Abbildung 54 ist zu erkennen, dass die Reaktionsrate durch Erhöhung der Drehzahl gesteigert werden kann. Zu jedem Zeitpunkt wurde durch eine höhere Drehzahl eine höhere Epoxidausbeute erzielt.

Der Effekt der gesteigerten Drehzahl ist am stärksten zwischen 350 und 600 rpm zu erkennen. Damit wurde die eingehende Erwartung einer erhöhten Umsatzrate durch Steigerung der Drehzahl bestätigt. Nach 24 h wurden Ausbeuten von 91 (350 rpm) bis maximal 97 % (1400 rpm) erreicht. Yadav und Manjula Devi konnten in einem kleineren Reaktionssystem (100 mL) einen vergleichbaren Einfluss der Rührerdrehzahl auf die Reaktionsrate bei der

Epoxidierung von Ölsäure beobachten. Als Rührer wurde ebenfalls ein 6-Blatt-Scheibenrührer eingesetzt. Der Dispersphasenanteil war bei einem ähnlichen Verhältnis von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu C=C-Doppelbindung mit  $\varphi = 0,055$  aufgrund niedrigerer Substratkonzentration allerdings deutlich geringer [144].

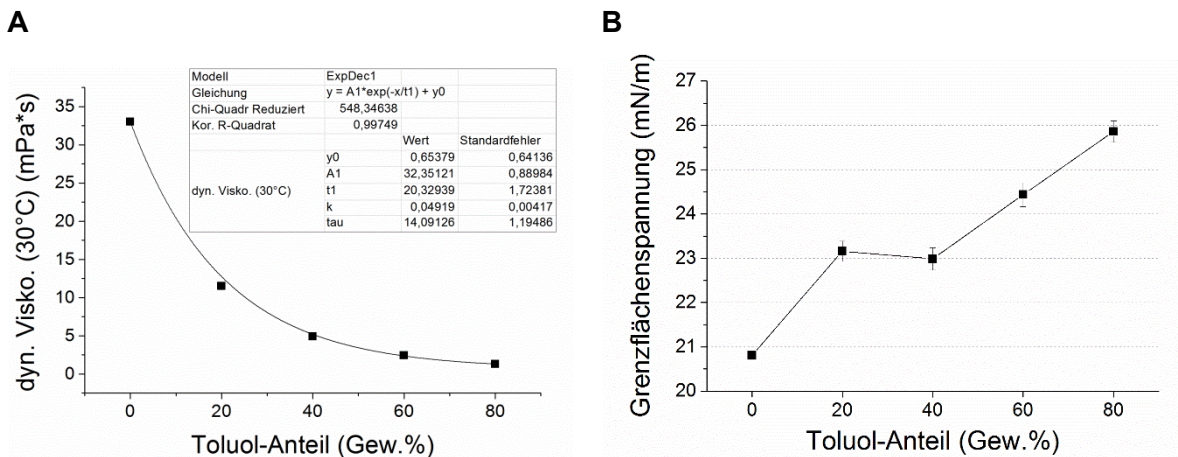


**Abbildung 54:** Einfluss der Rührerdrehzahl auf die Epoxidierung von Drachenkopfl im 1 L-Reaktor.

Dargestellt ist (A) der Epoxidsauerstoffgehalt und (B) die Epoxidausbeute über die Reaktionszeit bei der Verwendung von 60 Gew. % Lösungsmittel, 7,5 g Novozym® 435 pro Mol C=C, einer Reaktionstemperatur von 33 °C und einem Dispersphasenanteil von 0,343 (2 Mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  pro Mol C=C).

#### *Einfluss des Lösemittelanteils auf die Tropfengrößenverteilung und Epoxidierung im 1 L-Reaktor*

Nachfolgend sollte der Einfluss des Lösemittelanteils auf die Tropfengrößenverteilung und die bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung erzielbare Umsatzrate untersucht werden. Dazu wurden Experimente mit Lösemittelanteilen von 0, 20, 40 und 60 Gew. % durchgeführt. Als Drehzahl wurde aufgrund der Ergebnisse aus vorangegangenen Betrachtungen 1000 rpm ausgewählt, um Limitationen durch die Drehzahl zu vermeiden. Es wurde der reale Dispersphasenanteil zur jeweiligen Lösemittelkonzentrationen verwendet, sodass 2 Mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  pro Mol C=C-Doppelbindung eingesetzt wurden. Zu den einzelnen Lösemittelanteilen wurde zuerst die TGV bestimmt. Außerdem wurde das Reaktionssystem für den jeweiligen Lösemittelanteil hinsichtlich dynamischer Viskosität der organischen Phase (Methode siehe Kapitel 8.3.8) und Grenzflächenspannung zwischen den beiden gegeneinander gesättigten flüssigen Phasen (Methode in Abschnitt 8.3.10) charakterisiert. In Abbildung 55 sind die dynamische Viskosität und die Grenzflächenspannung in Abhängigkeit vom Lösemittelanteil der organischen Phase dargestellt.



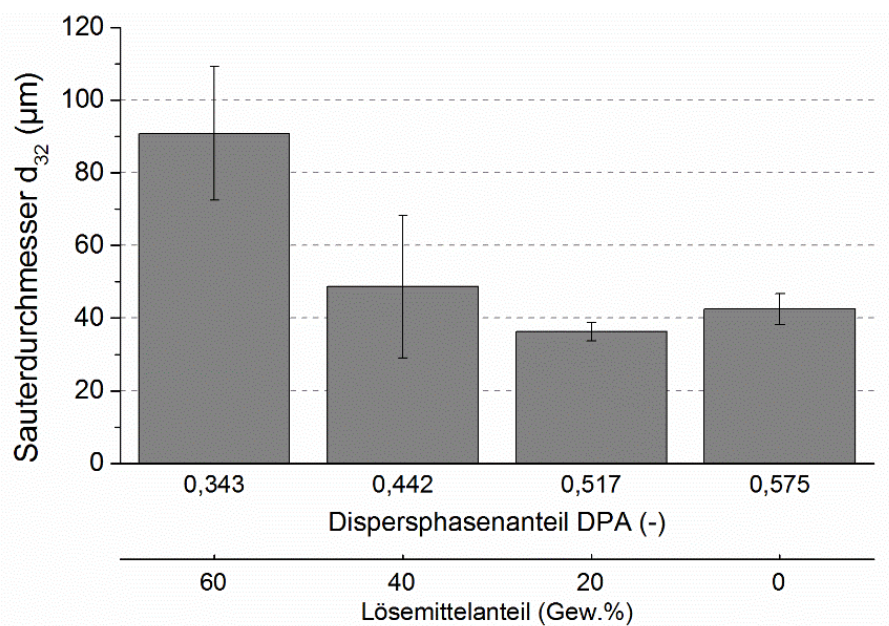
**Abbildung 55: Einfluss des Lösemittelanteils auf die dynamische Viskosität  $\eta$  der organischen Phase (A) und Grenzflächenspannung  $\sigma$  zwischen organischer Phase und wässriger Wasserstoffperoxidlösung (B).**

Aus Abbildung 55 ist zu erkennen, dass die dynamische Viskosität der organischen Phase erwartungsgemäß mit zunehmendem Lösemittelanteil abnahm, während die Grenzflächenspannung zwischen organischer und wässriger Phase zunahm. Die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und reinem Toluol wurde in der Literatur mit 28 bis 36 mN/m angegeben und bestätigt damit den in dieser Arbeit beobachteten Anstieg der Grenzflächenspannung mit zunehmendem Toluolgehalt [219, 243]. Die dynamische Viskosität von reinem Toluol beträgt nach Literaturangaben 0,52 bis 0,59 mPa\*s und stützt damit die Beobachtung der abnehmenden dynamischen Viskosität der organischen Phase mit zunehmendem Toluolanteil [219, 243].

Der Einfluss des Lösemittelanteils auf den Sauterdurchmesser wurde basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen des Einflusses der Rührerdrehzahl bei 1000 rpm analysiert. In Abbildung 56 ist der Sauterdurchmesser in Abhängigkeit vom Lösemittelanteil und dem für 2 Mol  $H_2O_2$  pro Mol C=C-Doppelbindung resultierenden Dispersphasenanteil gezeigt. Bei einer Reduktion des Lösemittelanteils von 60 auf 40 Gew. % nimmt der Sauterdurchmesser trotz eines zunehmenden Dispersphasenanteils ab und fällt von 90  $\mu m$  auf etwa 50  $\mu m$ . Bei der Dispergierung zweier nicht-mischbarer Flüssigkeiten mit gleichbleibender Zusammensetzung der beiden Phasen und damit gleichbleibender Viskosität und Grenzflächenspannung steigt der Sauterdurchmesser typischer Weise mit zunehmendem Dispersphasenanteil an [216, 219, 221, 243]. Daher ist bei der Dispergierung der wässrigen und organischen Phase bei der enzymatischen Epoxidierung neben dem Dispersphasenanteil und der Rührerdrehzahl auch die Zusammensetzung der organischen Phase, die die Viskosität der organischen Phase und die Grenzflächenspannung zwischen organischer und wässriger Phase deutlich beeinflusst (siehe Abbildung 55 A und B), von entscheidender Bedeutung für den erzielten



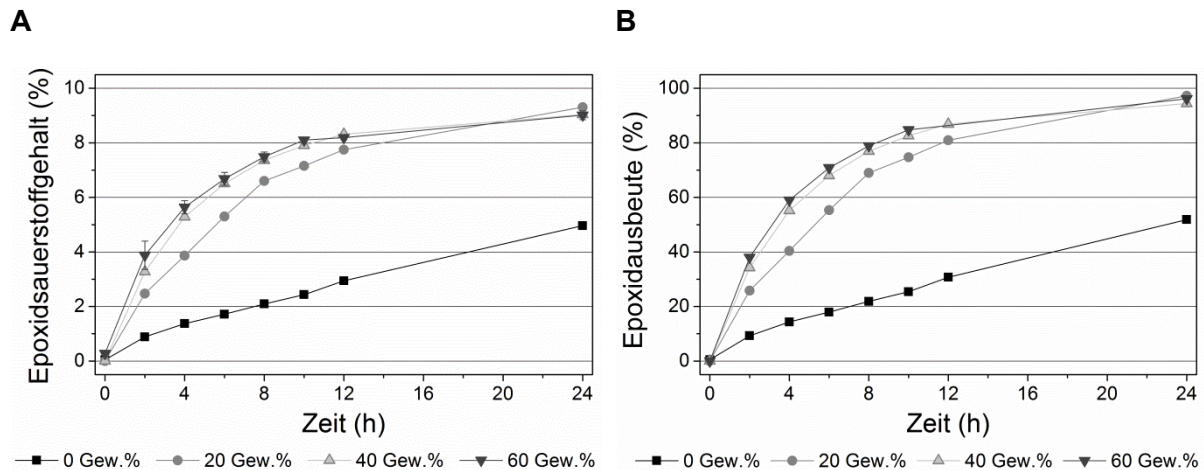
Sauterdurchmesser. Die Änderung der dynamischen Viskosität der organischen Phase und der Grenzflächenspannung zwischen organischer Phase und wässriger Wasserstoffperoxidphase wurden bereits in Abbildung 55 in Abhängigkeit des Lösemittelanteils dargestellt. In der Literatur sind allerdings nur wenige Daten zur Beschreibung des Einflusses von Viskosität und Grenzflächenspannung auf den Sauterdurchmesser verfügbar. Arai *et al.* untersuchten den Einfluss der Viskosität der dispersen Phase und fanden eine beträchtliche Zunahme des maximalen Tropfendurchmessers oberhalb einer Viskosität von 10 mPa\*s [216, 244]. Im Umkehrschluss kann eine zunehmende Viskosität der kontinuierlichen Phase aufgrund einer Reduktion des Lösemittelanteils zu einer Stabilisierung der dispergierten Tropfen nach der Zerkleinerung führen und so kleinere Sauterdurchmesser ermöglichen (siehe Abbildung 55 A und Abbildung 56). Eine erhöhte Grenzflächenspannung zwischen beiden flüssigen Phasen resultiert in einem zunehmenden Koaleszenzbestreben, da das auf eine Minimierung der potentiellen Energie bestrebte reale System diese nur durch Verkleinerung der Phasengrenzfläche erreichen kann [216, 228]. Der Effekt der zunehmenden Koaleszenz mit steigender Grenzflächenspannung konnte in der vorliegenden Arbeit auch bei dem Stoffsystem für die chemo-enzymatische Epoxidierung festgestellt werden. Der Effekt zeigt sich in einem größeren Sauterdurchmesser bei höherem Lösemittelanteil (siehe Abbildung 55 B und Abbildung 56).



**Abbildung 56: Einflüsse des Lösemittelanteils auf den erzielten Sauterdurchmesser  $d_{32}$  bei 1000 rpm und einem realen Dispersphasenanteil für eine Wasserstoffperoxid dosierung von 2 Mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  pro Mol  $\text{C}=\text{C}$ .**

In Abbildung 57 sind der Epoxidsauerstoffgehalt und die Ausbeute in Abhängigkeit von der Reaktionszeit für die enzymatische Umsetzung von Drachenkopfol mit verschiedenen

Lösemittelanteilen bei 1000 rpm dargestellt. Wie man anhand der in Abbildung 57 dargestellten Reaktionsverläufe erkennt, stieg die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmendem Lösungsmittelanteil an. Der Effekt war am stärksten zwischen 0 und 20 Gew. % Lösungsmittel zu beobachten. Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurden unter Einsatz von Toluol bei verschiedenen Lösungsmittelanteilen vergleichbare Epoxidausbeuten von jeweils über 95 % erzielt. Wurde jedoch auf den Einsatz von Lösungsmittel gänzlich verzichtet, war nach 24 Stunden mit 50 % eine deutlich geringere Ausbeute festzustellen.



**Abbildung 57:** Einfluss des Lösungsmittelanteils bei der Epoxidierung von Drachenkopfl im 1 L-Reaktor.

Dargestellt sind (A) der Epoxidsauerstoffgehalt und (B) die Epoxidausbeute über die Reaktionszeit bei der Verwendung von 7,5 g Novozym® 435 pro Mol C=C, 2 Mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Mol C=C, einer Temperatur von 33 °C und 1000 rpm mit Scheibenrührer und Strombrecher.

Durch eine Verringerung des Lösungsmittelanteils konnte die Raum-Zeit-Ausbeute erhöht werden, obwohl ein höherer Dispersphasenanteil zur vollständigen Umsetzung eingesetzt werden muss. Mit einem geringeren Lösungsmittelanteil wurde eine größere Menge Drachenkopfl bezogen auf das gesamte Reaktionsvolumen eingesetzt. So wurden bei 20 Gew. % Lösungsmittelanteil vergleichbare Epoxidbildungsraten wie bei höheren Lösungsmittelanteilen erzielt und nach 24 h bezogen auf das Reaktionsvolumen die größte Menge Epoxidöl mit einer Ausbeute von über 95 % gebildet. In Tabelle 30 ist eine Übersicht zu den bei unterschiedlichen Lösungsmittelanteilen eingesetzten Substratmengen, erzeugten Epoxidmengen und erzielten Epoxidbildungsraten gegeben. Bei der Epoxidierung werden C=C-Doppelbindungen zu Epoxidgruppen umgesetzt. So erhöht sich die Molmasse von epoxidiertem Pflanzenöl mit jedem Mol an gebildetem Epoxid um 16 g. Daher lag die erzeugte Produktmenge über der eingesetzten Substratmenge.

**Tabelle 30: Übersicht zur enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopföl bei verschiedenen Lösemittelanteilen.**

Lösungsmittel- anteil (Gew. %), $\varphi$ (-) n (rpm)	m (ÖI+OA) (g)	n(C=C) mol	Ausbeute nach 24 h (%)	Epoxidöl pro Ansatz nach 24 h (g)	Ausbeute nach 6 h (%)	Umsatzrate (mol Epoxid- gruppe/ h) bis 6 h
0; 0,575; 1000	312,3	2,25	51,85	331,0	17,9	0,067
20; 0,517; 1000	280,6	2,02	97,19	312,1	55,3	0,187
40; 0,442; 1000	240,1	1,73	94,39	266,2	68,0	0,196
60; 0,343; 1000	186,2	1,34	96,13	206,9	70,9	0,159

Aus Tabelle 30 ist zu erkennen, dass für den lösungsmittelfreien Ansatz nach 24 h Reaktionszeit mit einer Epoxidausbeute von knapp über 50 % eine deutlich geringere Ausbeute als mit Lösemittelsatz erzielt wurde. Dabei war eine Zugabe von 20 Gew. % Toluol ausreichend, um eine maximale volumenbezogenen Epoxidbildungsrate zu erreichen. Nimmt man für die verschiedenen Reaktionsansätze eine lineare Umsatzrate für die ersten 6 Stunden an, so wurde bei der Verwendung von 40 Gew. % Lösemittel die höchste Umsatzrate festgestellt. Im Gegensatz dazu verläuft die Epoxidierung ohne Lösungsmittel deutlich langsamer, was auf einen limitierten Stofftransport aufgrund der höheren Viskosität der organischen Phase zurückgeführt werden kann. Die reduzierte Epoxidbildungsrate konnte allerdings nicht mit einer reduzierten Phasengrenzfläche aufgrund eines vergrößerten Sauterdurchmessers erklärt werden. Aus Abbildung 56 ist zu erkennen, dass der Sauterdurchmesser in der Rührerebene bei Lösemittelanteilen von 0 bis 40 Gew. % annähernd konstant war. Nach Formel 9 ergibt sich bei einem konstanten Sauterdurchmesser mit zunehmendem Dispersphasenanteil eine vergrößerte volumenspezifische Phasengrenzfläche. Eine mögliche Erklärung für eine reduzierte Umsatzrate beim lösemittelfreien Ansatz könnte eine stärker ausgeprägte organische Grenzschicht am hydrophoben Enzymträgermaterial sein, die sich aufgrund der höheren Viskosität um den Träger bildet und so die Verfügbarkeit von Wasserstoffperoxid am Enzym limitiert [245-248]. Der Effekt der sich ausbildenden dickeren Grenzschicht könnte durch eine Erhöhung der Rührerdrehzahl reduziert werden. Eine erhöhte Rührerdrehzahl könnte allerdings auch eine mechanische Zerstörung des Enzymträgers nach sich ziehen [248].

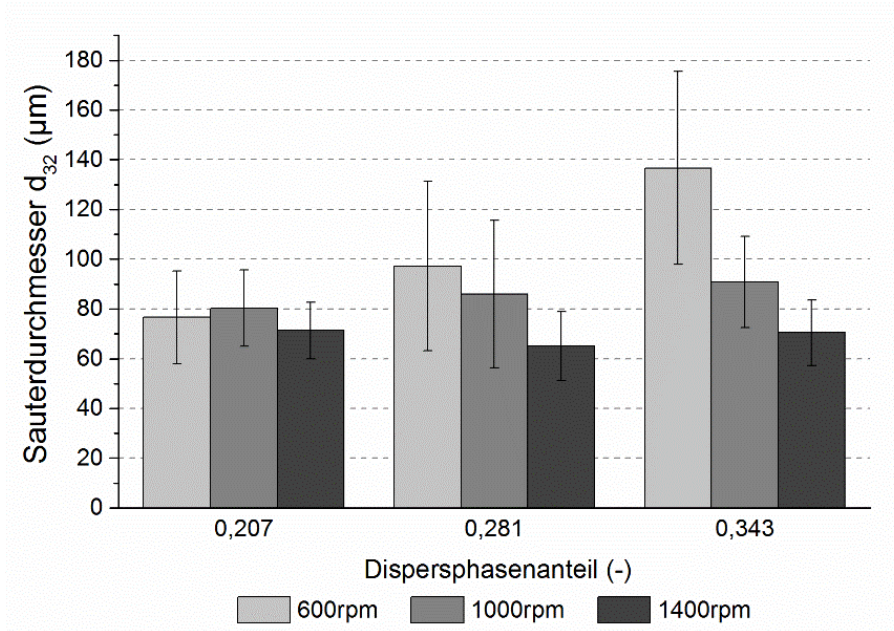
Vlček und Petrovič fanden unter Variation des Lösemittelanteils bei der enzymatischen Epoxidierung von Sojaöl einen optimalen Lösemittelanteil von rund 50 Gew. % und erhielten nach 24 h bei 50 °C eine Ausbeute von 97 %. Bei der lösemittelfreien Umsetzung von SBO wurde mit knapp 30 % Epoxidausbeute ebenfalls eine deutliche Abnahme des Umsatzes beobachtet [157]. Bei der Epoxidierung von Drachenkopföl im 1 L-Maßstab hingegen konnte

auch mit geringerem Lösungsmittelanteil von 20 Gew. % eine Ausbeute von 97 % erreicht werden. Rüschen, Klaas und Warwel konnten hohe Ausbeuten von 88 bis 96 % nach bereits 16 h erreichen. Dabei wurde jedoch mit rund 90 Gew. % ein deutlich höherer Lösemittelanteil eingesetzt [18].

#### *Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Tropfengrößenverteilung und Epoxidierung im 1 L-Reaktor*

Um den Einfluss des Dispersphasenanteils zu ermitteln, wurden Experimente mit 60 Gew. % Lösemittelanteil bei 1000 rpm und Dispersphasenanteilen von 0,207, 0,281 und 0,343 durchgeführt, die einem Verhältnis von 1, 1,5 und 2 Mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  pro Mol C=C-Doppelbindungen entsprechen. Beim Einsatz von 1 Mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  pro Mol C=C-Doppelbindung ist gerade ausreichend Wasserstoffperoxid verfügbar, um alle im Substrat verfügbaren C=C-Doppelbindungen umsetzen zu können. Mit steigendem Dispersphasenanteil und einem damit verbundenen Überschuss an  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann eine gesteigerte Umsatzrate erwartet werden, weil die Persäurebildung aufgrund der gesteigerten Verfügbarkeit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ebenfalls erhöht ist. Diesem Effekt können ein erhöhter Sauterdurchmesser und möglicherweise eine damit verbundene Reduktion der volumenspezifischen Phasengrenzfläche entgegenwirken.

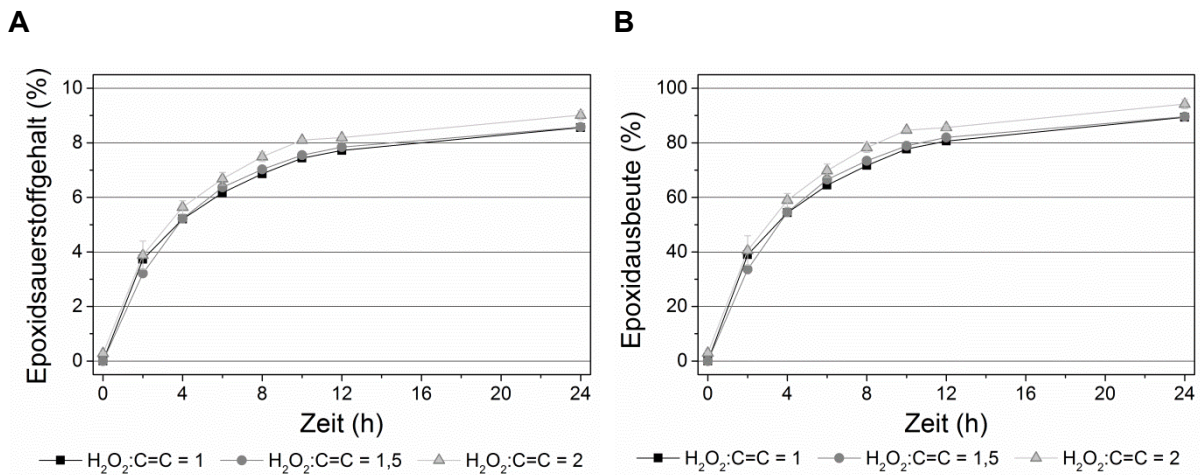
Der Einfluss des Dispersphasenanteils auf den erzielten Sauterdurchmesser ist in Abbildung 58 in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl dargestellt. Während bei einer Drehzahl von 600 rpm mit zunehmendem Dispersphasenanteil auch eine Zunahme des Sauterdurchmessers zu beobachten war, konnte bei 1000 rpm keine Vergrößerung von  $d_{32}$  mit gesteigertem Wasserstoffperoxidanteil mehr detektiert werden. Damit nimmt die volumenbezogene Phasengrenzfläche mit erhöhtem DPA zu. Bei der enzymatischen Epoxidierung wurde festgestellt, dass die bei 1000 rpm und einem Dispersphasenanteil von 0,207 erzielte Phasengrenzfläche ausreicht, um dem Enzym genügend Wasserstoffperoxid für eine maximale Persäurebildungsrate zu Verfügung zu stellen (siehe auch Abbildung 59). Die Reduktion des Sauterdurchmessers durch Erhöhung der Rührerdrehzahl wurde bereits in einem vorangegangenen Abschnitt für die chemo-enzymatische Epoxidierung beschrieben. Die Erhöhung des Sauterdurchmessers mit zunehmendem Dispersphasenanteil wurde beispielsweise von Mersmann und Großmann erläutert [216]. Gründe für die größeren Tropfendurchmesser sind zum einen die Dämpfung der Turbulenzintensität und zum anderen gesteigerte Koaleszenzvorgänge wegen der höheren Kollisionswahrscheinlichkeit der Tropfen bei erhöhtem Dispersphasenanteil [208, 216, 221, 226].



**Abbildung 58: Sauterdurchmesser  $d_{32}$  in Abhängigkeit vom Dispersphasenanteil bei der Dispergierung von  $H_2O_2$  in Drachenkopfl/Toluol-Gemisch (60 Gew.%) bei Drehzahlen von 600, 1000 und 1400 rpm.**

In Abbildung 59 sind der Epoxidsauerstoffgehalt und die Epoxidausbeute in Abhängigkeit von der Reaktionszeit unter Verwendung verschiedener Dispersphasenanteile bei einer Drehzahl von 1000 rpm dargestellt. Aus Abbildung 59 ist kein eindeutiger Unterschied in der Epoxidbildungsrate bei verschiedenen Wasserstoffperoxidverhältnissen zu erkennen. Damit sind weder der Enzym-katalysierte Schritt zur Bildung der Persäure noch die nachfolgende Prileschajew-Epoxidierung bei einer Rührerdrehzahl von 1000 rpm und mindestens einem Mol  $H_2O_2$  pro Mol C=C-Doppelbindung limitiert. Es wurden jedoch geringe Unterschiede in der nach 24 h erzielten Epoxidausbeute festgestellt. Durch Einsatz von zwei Mol  $H_2O_2$  pro Mol C=C-Doppelbindung ( $\varphi = 0,343$ ) konnte die Epoxidausbeute im Vergleich zu einem  $H_2O_2$ :C=C-Verhältnis von 1 von 89 auf 96 % gesteigert werden. Vlček und Petrovič konnten bei Verwendung von 1 und 2 Mol  $H_2O_2$  pro Mol C=C-Doppelbindung ähnliche Ausbeuten bei der Umsetzung von Sojaöl erzielen [157].

Bei der Verwendung von einem Mol  $H_2O_2$  pro Mol C=C-Doppelbindung ( $\varphi = 0,207$ ) wurde bei der Umsetzung von Drachenkopfl eine Ausbeute von 89 % erzielt (siehe Abbildung 59 B). Damit liegt in der Wasserstoffperoxidlösung noch maximal 10 % der zu Beginn eingesetzten Wasserstoffperoxidmenge vor. Aus ökologischer Sicht sollte die verwendete Menge an Wasserstoffperoxid und damit der verwendete Dispersphasenanteil möglichst gering gehalten werden, um die Entsorgungskosten zu minimieren [157].



**Abbildung 59:** Einfluss des Dispersphasenanteil aufgrund verschiedener Wasserstoffperoxidmengen auf die Epoxidierung von Drachenkopfl im 1 L-Reaktor.

Dargestellt sind (A) der Epoxidsauerstoffgehalt und (B) die Epoxidausbeute über die Reaktionszeit bei der Verwendung von 7,5 g Novozym® 435 pro Mol C=C, 60 Gew.% Toluol, einer Temperatur von 33 °C und 1000 rpm mit Scheibenrührer und Strombrecher (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:C=C = 1 entspricht DPA 0,207; 1,5 entspricht DPA 0,281; 2 entspricht DPA 0,343).

Durch die Reduktion des Dispersphasenanteils wurde bei gleichbleibender Lösemittelkonzentration zudem eine auf das Reaktionsvolumen bezogen größere Menge an Drachenkopfl eingesetzt. Eine Übersicht zur Epoxidierung von Drachenkopfl mit unterschiedlichen Wasserstoffperoxidverhältnissen zeigt Tabelle 31.

**Tabelle 31:** Masse an epoxidiertem Drachenkopfl für die verschiedenen Reaktionsansätze nach 24 h bei Variation des Dispersphasenanteils.

Lösungsmittel-Anteil (Gew. %) $\varphi$ (-) n (rpm)	m(Öl+OA) (g)	n(C=C) (mol)	Ausbeute nach 24h (%)	Epoxidöl pro Ansatz nach 24h (g)	Ausbeute nach 6h (%)	Umsatzrate (mol Epoxid/h) bis 6h
60; 0,343; 1000	186,2	1,34	96,13	206,9	70,9	0,159
60; 0,281; 1000	203,7	1,47	89,60	224,7	66,5	0,163
60; 0,207; 1000	224,8	1,62	89,37	247,9	64,5	0,174

Aus Tabelle 31 ist zu erkennen, dass bei gleichem Reaktionsvolumen mit einem Dispersphasenanteil von  $\varphi = 0,207$  die größte Menge an Epoxidöl innerhalb von 24 h hergestellt wurde. Die Epoxidbildungsraten über die ersten 6 h waren bei verschiedenen DPAs ähnlich. Entscheidend für die Auswahl des einzusetzenden Wasserstoffperoxidverhältnisses kann neben ökologischen Gesichtspunkten auch die für eine spezifische Anwendung erforderliche Epoxidausbeute sein. Reicht eine Epoxidausbeute von etwa 90 % zur Erfüllung der Anforderungen einer spezifischen Anwendung aus, so kann ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:C=C-Verhältnis von 1

---

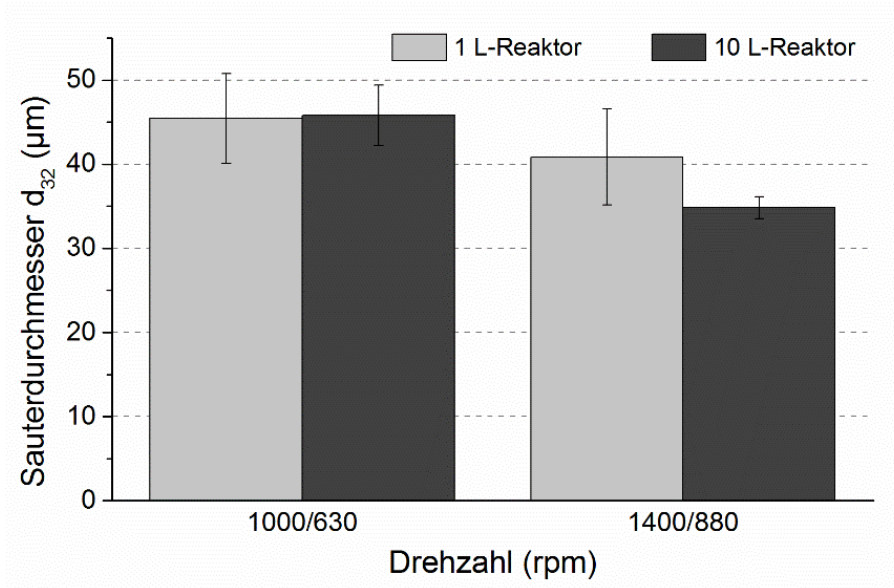
und damit eine Dispersphasenanteil von 0,207 eingesetzt werden. Dadurch können Kosten eingespart und die Stabilität des Enzyms aufgrund der minimalen Exposition gegenüber Wasserstoffperoxid gesteigert werden.

#### 5.4.2 Maßstabsvergrößerung der Epoxidierung von Drachenkopfol im 1 L- und 10 L-Maßstab

Die vorangegangenen Experimente im 1 L-Maßstab hatten zum einen das Ziel, relevante Prozessgrößen in einem skalierbaren Reaktionssystem zu evaluieren und zum anderen Basisdaten für eine Maßstabsvergrößerung in den 10 L-Maßstab zu liefern.

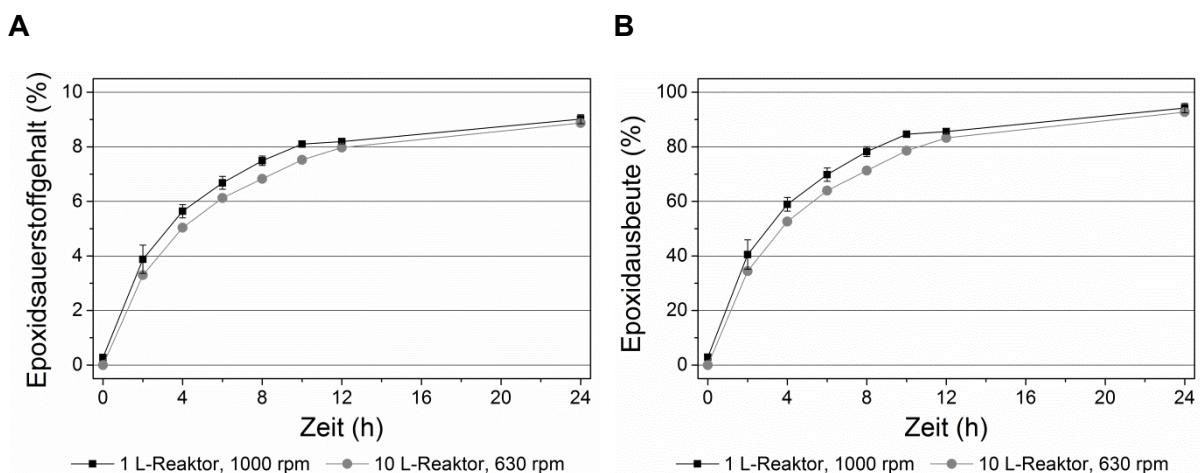
Als Übertragungskriterium sollte aufgrund des mehrphasigen Reaktionssystems die volumenspezifische Rührleistung herangezogen werden. Die Berechnung der benötigten Rührerdrehzahl in der Hauptausführung auf Basis von Modellversuchen unter Annahme eines turbulenten Strömungsregims wurde bereits in Abschnitt 5.2.2 (Formel 17) vorgestellt. Als Basis zur Evaluierung der Skalierbarkeit der chemo-enzymatischen Epoxidierung in den 10 L-Maßstab sollte ein Experiment im 1 L-Maßstab mit 60 Gew. % Lösemittel, einem Dispersphasenanteil von 0,343 und einer Rührerdrehzahl von 1000 rpm unter Verwendung eines 6-Blatt-Scheibenrührers mit Strombrecher genutzt werden. Nach Formel 17 ergibt sich für die Ausführung im 10 L-Maßstab mit Strombrecher und 6-Blatt-Scheibenrührer eine Rührerdrehzahl von 630 rpm, um einen gleichbleibenden volumenbezogenen Leistungseintrag zu gewährleisten.

Die Eignung des konstanten volumenspezifischen Leistungseintrages zur Dispergierung bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung wurde zuerst durch einen Vergleich der erzielten Sauterdurchmesser im 1 und 10 L-Maßstab überprüft. In Abbildung 60 sind die bei entsprechend berechneten Drehzahlen im 1 und 10 L-Maßstab erzielten Sauterdurchmesser gegenübergestellt. Auf Basis einer Drehzahl von 1000 rpm im 1 L-Maßstab ergab sich bei 630 rpm im 10 L-Maßstab ein annähernd identischer Sauterdurchmesser. Durch eine Erhöhung der Drehzahl im 10 L-Maßstab auf 880 rpm wurde ein minimal geringerer Sauterdurchmesser erhalten. Die Differenz zwischen 1 und 10 L-Maßstab lag jedoch im Fehlerbereich der Messung. Ein minimal geringerer Sauterdurchmesser im größeren Maßstab kann mit höheren Maximalwerten der örtlichen Energiedissipation in direkter Rührerumgebung beim 10 L-Reaktor erklärt werden [216].



**Abbildung 60:** Sauterdurchmesser  $d_{32}$  im 1 L- und 10 L-Reaktor bei Verwendung von reinem Drachenkopfol und einem Dispersphasenanteil  $\phi = 0,343$  bei den auf Basis eines konstanten volumenspezifischen Leistungseintrages berechneten Drehzahlen (siehe Formel 17).

Der Verlauf der chemo-enzymatischen Epoxidierung im 1 L- und 10 L-Maßstab ist in Abbildung 61 anhand des Epoxidsauerstoffgehaltes und der Epoxidausbeute über die Reaktionszeit dargestellt. Nach 24 Stunden wurden in beiden Maßstäben bei vergleichbaren Umsatzraten Ausbeuten von jeweils über 95 % erzielt. Damit konnte gezeigt werden, dass sich der konstante volumenspezifische Leistungseintrag in unterschiedlichen Reaktorgrößen als Kriterium zur Maßstabsvergrößerung bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung eignet.



**Abbildung 61:** Vergleich der Epoxidierung von Drachenkopfol im 1 L- und 10 L-Maßstab.

Dargestellt ist (A) der Epoxidsauerstoffgehalt und (B) die Epoxidsauerstoffausbeute für einen Ansatz im 1 L-Reaktor mit Scheibenrührer und Strombrecher bei 1000 rpm (schwarz) und einem Vergleichsansatz im 10 L-Maßstab bei 630 rpm (grau). Weitere Reaktionsbedingungen: 7,5 g Novozym® 435 pro Mol C=C, 60 Gew.% Toluol, 33 °C, 2 Mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Mol C=C.



Auf Basis dieser Ergebnisse können Reaktionsbedingungen in entsprechend konstruierten größerskaligen Reaktor ausgelegt werden. In Tabelle 32 ist eine Übersicht über die Längenmaße und die erforderlichen Betriebsparameter für einen 1, 10 und 100 L-Reaktor dargestellt. Als Basis zur Kalkulation wurden Reaktionsbedingungen aus einem Experiment mit einem Lösemittelanteil von 60 Gew. %, einem Dispersphasenanteil von 0,343 und einer Drehzahl von 1000 rpm im 1 L-Maßstab verwendet. Die im jeweiligen Maßstab erforderliche Rührerdrehzahl konnte mit Formel 17 berechnet werden.

**Tabelle 32: Übersicht der Längenmaße und Betriebsparameter für die chemo-enzymatische Epoxidierung im 1, 10 und im 100 L Reaktor für 60 Gew. % und  $\phi = 0,343$  mit Scheibenrührer und Strombrecher.**

Parameter <sup>(1)</sup>	1 L	10 L	100 L <sup>(2)</sup>
D <sub>B</sub> (mm)	100	200	498
H <sub>F</sub> (mm)	100	200	498
d <sub>R</sub> (mm)	38	75	190
$\mu$	-	2	4,98
V (L)	0,8	6,75	90
n (rpm)	1000	630	340
P <sub>V</sub> (W/m <sup>3</sup> )	1178	1178	1178

<sup>1</sup>D<sub>B</sub>: Behälterinnendurchmesser, H<sub>F</sub>: Füllhöhe, d<sub>R</sub>: Rührerdurchmesser,  $\mu$ : Maßstabsfaktor bezogen auf den 1 L-Reaktor, V: Flüssigkeitsvolumen, n: Rührerdrehzahl, P<sub>V</sub>: volumenspezifischer Leistungseintrag

<sup>2</sup>Daten unter Annahmen eine 6-Blatt-Scheibenrührers und einem entsprechenden Strombrecher im 100L-Reaktor (Basisfall ist die Umsetzung im 1L-Reaktor)

Unter diesen Betriebsbedingungen kann von einer gleichen volumenspezifischen Rührleistung P<sub>V</sub> in allen Reaktoren und damit auch von dem gleichen Sauterdurchmesser ausgegangen werden. Damit sollte im 100 L-Reaktor eine vergleichbare Umsatzrate und selben Epoxid- ausbeute erzielt werden können.

## 5.5 Schlussfolgerungen zur Maßstabsvergrößerung der enzymatischen Epoxidierung

Die Skalierbarkeit der chemo-enzymatischen Epoxidierung konnte in dieser Arbeit erfolgreich unter Verwendung eines konstanten volumenspezifischen Leistungseintrages als Maßstabsübertragungskriterium gezeigt werden. Durch Einsatz eines 3D-ORM-Systems konnte der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die erzielbare Tropfengrößenverteilung untersucht und in Form des Sauterdurchmessers dargestellt werden. So wurde gezeigt, dass

---

bei der lösemittelfreien Epoxidierung von Drachenkopföl die Umsatzrate und Ausbeute trotz eines kleineren Sauterdurchmessers im Vergleich zu Ansätzen mit Lösemittel deutlich geringer war. Die geringere Reaktionsgeschwindigkeit im lösemittelfreien Ansatz lässt sich durch eine limitierte Substratverfügbarkeit am immobilisierten Biokatalysator aufgrund einer sich ausbildenden dickeren laminaren Grenzschicht erklären. Epoxidausbeuten von über 95 % konnten bei der enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopföl im 1 L-Maßstab bereits ab einem Lösemittelanteil von 20 Gew. % bezogen auf die Masse der organischen Phase erzielt werden, obwohl ein im Vergleich zum lösemittelfreien Ansatz vergleichbarer Sauterdurchmesser festgestellt wurde. Daher ist davon auszugehen, dass die sich am festen Biokatalysator ausbildende laminare Grenzschicht aufgrund der durch das Lösemittel reduzierten Viskosität dünner wird und so die bessere Verfügbarkeit der Substrate am Biokatalysator zu einer deutlichen Steigerung der Umsatzrate führt. Zusammenfassend können auf Basis der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse größere Reaktionsmaßstäbe unter Verwendung entsprechender Reaktoren ausgelegt werden.

---

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Als Ziel dieser Arbeit wurde die Entwicklung von Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Pflanzenölepoxiden und Pflanzenöl-basierten Epoxidderivaten formuliert. Es wurden folgende Unterziele definiert, um das Gesamtziel zu erreichen:

1. Auswahl geeigneter Enzyme zur enzymatischen Epoxidierung von Pflanzenölderivaten
2. Optimierung der Verfahren zur enzymatischen Epoxidierung hin zu höheren Raum-Zeit-Ausbeuten
3. Untersuchung des Einflusses verschiedener Substratzusammensetzungen auf die einzustellenden Prozessbedingungen
4. Beschreibung des Einflusses der Substratzusammensetzung auf die Eigenschaften der hergestellten Epoxide
5. Maßstabsvergrößerung der chemo-enzymatischen Epoxidierung.

Die Unterziele wurden in den Kapiteln 3 bis 5 thematisch behandelt. Dabei wurden die einzelnen Abschnitte bereits im Rahmen einer Schlussfolgerung zusammengefasst (siehe Unterkapitel 3.5, 4.5 und 5.5). Im nachfolgenden Abschnitt 6.1 sollen die wesentlichen Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit nochmal in einer kurzen Zusammenfassung dargestellt und ein Ausblick (siehe Kapitel 6.2) auf mögliche zukünftige Arbeiten gegeben werden.

### 6.1 Zusammenfassung

#### *Untersuchung der Persäurebildung und Epoxidierung mit verschiedenen Lipasen und Auswahl geeigneter Enzyme*

In der vorliegenden Arbeit wurden 18 verschiedene nicht-immobilisierte Lipasen für die Epoxidierung von Ölsäure untersucht (siehe Kapitel 3.4.1). Dabei wurde die Bildung von 9,10-Epoxystearinsäure für neun Lipasen detektiert. Darunter waren fünf neue Lipasen, die durch verschiedene *Pseudozyma* sp. bei der Kultivierung in mit Sojaöl versetztem Kulturmedium in den Kulturüberstand sekretiert wurden. Für die neuen Lipasen wurden die Aminosäuresequenzen mittels *Genome Walking* ermittelt [152], um so einen Sequenzvergleich mit der als Referenzenzym eingesetzten Lipase B aus *Pseudozyma antarctica* (früher *Candida antarctica*, CalB) auf Aminosäureebene zu ermöglichen. Die Sequenzidentität zu CalB lag zwischen 71 % bei der Lipase aus *Pseudozyma hubeiensis* CBS 10077 und über 99 % bei den Lipasen aus *Pseudozyma aphidis* DSM 70725 und *Pseudozyma rugulosa* CBS 34696. Je höher die Sequenzidentität zu CalB war, desto stärker war die Aktivität zur Persäurebildung ausgeprägt (siehe Kapitel 3.4.2). Neben den Lipasen aus verschiedenen *Pseudozyma* sp.

zeigten die nicht-immobilisierten Lipasen aus *Rhizomucor miehei* und *Thermomyces lanuginosus* einen Ölsäureumsatz zu 9,10-Epoxystearinsäure von mehr als 30 %. Diese beiden Lipasen zeigten jedoch keine hohe Sequenzidentität im Vergleich zu CalB. Daher sind nicht ausschließlich auf einer Sequenzidentität zu CalB basierende Strukturmerkmale von Lipasen für die Persäurebildung und die damit verbundene Epoxidierung verantwortlich. Auf Basis des Vergleichs verschiedener freier Lipasen wurden geeignete Enzyme ausgewählt und als immobilisierte Varianten eingesetzt. Es wurden zwei Immobilisatvarianten von CalB und die auf Immobead 150 immobilisierten Lipasen aus *Thermomyces lanuginosus* und *Rhizomucor miehei* bei der Epoxidierung von Ölsäure verglichen (siehe Abschnitt 3.4.3). Die auf die Immobilisatmasse bezogenen spezifischen Ölsäureumsatzraten waren für die auf Acrylharz (Novozym® 435) oder Immobead 150 immobilisierte Lipase B aus *P. antarctica* (CalB) deutlich höher als für die auf Immobead 150 immobilisierte Lipase aus *R. miehei*. Für die Lipase aus *T. lanuginosus* konnte keine Epoxidbildung bei der immobilisierten Variante nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden die beiden immobilisierten CalB-Varianten für weitere Untersuchungen ausgewählt und hinsichtlich ihrer Stabilität bei der Epoxidierung von Ölsäure verglichen (siehe Teilabschnitt 3.4.4). Die Zyklusstabilität der auf Immobead 150 immobilisierten CalB war mit 14 Reaktionszyklen und einem jeweiligen Ölsäureumsatz von 90 % höher als bei Novozym® 435 mit 10 Zyklen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich ein zusätzlicher Waschschrift zwischen den Reaktionszyklen im Gegensatz zu dem üblicherweise in der Literatur beschriebenen Vorgehen nachteilig auf die Enzymstabilität auswirkte. Ein Vergleich der pro Gramm Biokatalysator gebildeten Produktmenge an 9,10-Epoxystearinsäure (ESA) zeigte, dass Novozym® 435 mit insgesamt 635 g ESA eine höhere Ausbeute als CalB Immobead 150 mit knapp 400 g ESA ermöglichte. Daher wurde für die Epoxidierung verschiedener Pflanzenöl-basierter Substrate und die Untersuchungen zur Maßstabsvergrößerung Novozym® 435 als Biokatalysator ausgewählt.

#### *Epoxidierung Pflanzenöl-basierter Molekülgruppen*

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von effizienten Enzym-katalysierten Verfahren zur Epoxidierung von verschiedenen aus Pflanzenölen herstellbaren Molekülgruppen. Als Pflanzenölderivate wurden Triacylglyceride, Fettsäuremethylester, verschiedene frei Fettsäuren, 9-Octadecen-1,18-dicarbonsäure und 9-Octadecen ausgewählt und deren Epoxidierung mit Novozym® 435 untersucht.

Im ersten Schritt wurde die enzymatische Epoxidierung nativer nicht im Lebensmittelsektor eingesetzter Pflanzenöle optimiert. Als wesentliche Einflussgrößen wurden die Enzym- und Lösemittelmenge, die Reaktionstemperatur und die Reaktionszeit ausgewählt. Der Einfluss dieser Prozessgrößen wurde mit Hilfe eines statistischen Versuchsplanes untersucht. In

diesem Zusammenhang wurden zwei nicht-essbare Pflanzenöle, Drachenkopf- und Senföl, betrachtet. Durch die Auswahl dieser beiden Öle, die sich stark in ihrer Fettsäurezusammensetzung unterschieden, konnte auch der Einfluss der Substrateigenschaften untersucht und optimierte Prozessbedingungen in Abhängigkeit vom ausgewählten Rohstoff identifiziert werden. Die vier ausgewählten Prozessgrößen zeigten bei der statistischen Auswertung mittels Design-Expert® jeweils einen signifikanten Einfluss auf die erzielbare Epoxidausbeute bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung. Die Reaktionsparameter Inkubationszeit, Enzym- und Lösemittelmenge zeigten bei beiden Pflanzenölen tendenziell ähnliche Einflüsse. So konnten bei beiden Substraten bei geringem Lösemittelanteil (25 Gew. %) und kurzen Inkubationszeiten (<12 h) nur mäßige Epoxidausbeuten im Bereich von 10 bis 35 % erreicht werden. Der Lösemittelanteil bei optimierten Reaktionsbedingungen lag in dieser Arbeit für beide Öle zwischen 50 und 60 Gew. % relativ zur Masse der gesamten organischen Phase. Im Vergleich zu Sun *et al.* oder Rüschen, Klaas und Warwel wurde der Lösemittelseinsatz deutlich reduziert und so die Raum-Zeit-Ausbeute gesteigert [17, 18, 155, 156]. Die Enzymmenge wurde relativ zur Menge vorhandener C=C-Doppelbindungen eingesetzt. Bei einer optimierten Enzymdosierung von 7,5 bis 8,5 g pro Mol Doppelbindung wurden nach einer Inkubationszeit von 16 bis 18 h Epoxidausbeuten von über 80 % bei Drachenkopföl und über 90 % bei Senföl erzielt. Der größte Unterschied zwischen beiden Ölen zeigte sich bei der Untersuchung des Einflusses der Reaktionstemperatur. Bei der enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopföl konnten Epoxidausbeuten von bis zu 95 % bei Temperaturen im Bereich um 30 °C erreicht werden, während eine Temperaturerhöhung auf über 40 °C eine deutliche Reduktion der Epoxidausbeute zur Folge hatte. Im Vergleich dazu wurde für Senföl eine optimierte Reaktionstemperatur von 40 °C festgelegt und so Epoxidausbeuten von über 95 % erzielt. Bei 50 °C wurde für beide Öle bereits eine Abnahme der Epoxidausbeute im Vergleich zu niedrigeren Temperaturen bei sonst vergleichbaren Reaktionsbedingungen festgestellt. Damit wurden in der vorliegenden Arbeit geeignete Prozessbedingungen für die enzymatische Epoxidierung von Triglyzeriden in Abhängigkeit von Substratcharakteristika definiert, die auf ein breites Spektrum verschiedener Pflanzenöle übertragbar waren.

Die Übertragbarkeit der optimierten Prozessbedingungen auf verschiedene Substrate wurde für 15 zuvor umfangreich charakterisierte kommerzielle und nicht-kommerzielle Pflanzenöle demonstriert. Dabei wurden unter Verwendung von 60 Gew. % Lösemittel, einer Enzymdosierung von 7,5 g Novozym® 435 pro Mol C=C-Doppelbindung, einer Inkubationszeit von 24 h und einer Temperatur von 35 °C Epoxidausbeuten von 70 bis 95 % erzielt. Die chemo-enzymatisch hergestellten Pflanzenölepoxide wurden anschließend hinsichtlich Viskosität, Schmelz- und Kristallisationsverhalten charakterisiert. Die erhaltenen Produkteigenschaften

---

wurden im nächsten Schritt mit Substrateigenschaften wie der Fettsäurezusammensetzung oder dem bei der Epoxidierung erzielten Epoxidsauerstoffgehalt korreliert. Die Viskosität der verschiedenen nativen Pflanzenöle konnte bei einer Auftragung über die auf eine mittlere Fettsäurekettenlänge bezogene Jodzahl mit guter Näherung durch eine Funktion 2. Ordnung beschrieben werden. Außerdem konnte die Viskositätsänderung bei verschiedenen Ölen infolge der Epoxidierung in einem linearen Ansatz mit dem Epoxidsauerstoffgehalt korreliert werden. Auf Basis dieser Korrelationen kann die Viskosität eines definierten Pflanzenölepoxids in Abhängigkeit vom Epoxidgehalt abgeschätzt und für eine entsprechende Anwendung ausgewählt werden. Außerdem wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Epoxidierung auf das Schmelz- und Kristallisationsverhalten verschiedener Pflanzenöle analysiert. Bei allen Epoxidölen war eine deutliche Verschiebung des Schmelz- und Kristallisationsbereiches im Vergleich zu den nativen Substraten festzustellen. Eine mathematische Korrelation der Schmelz- und Kristallisationscharakteristika mit Substrat- oder Produkteigenschaften war, im Gegensatz zur Beschreibung der Viskosität, nicht möglich. Dennoch können die in dieser Arbeit erlangten Kenntnisse zum Schmelz- und Kristallisationsverhalten bei der Auswahl von Pflanzenölepoxiden für spezifische Anwendungen von Bedeutung sein, wenn beispielsweise ein Kristallisieren der Epoxidkomponente bei moderaten Temperaturen vermieden werden soll.

Ergänzend zum Stabilitätsvergleich verschiedener immobilisierter CalB-Varianten bei der Umsetzung von Ölsäure wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Wasserstoffperoxidzugabe auf die Prozessstabilität von Novozym® 435 während der Epoxidierung von Sojaöl untersucht. Dabei wurde Wasserstoffperoxid einmalig oder kontinuierlich über verschiedene Zugabezeiträume zugeführt. Außerdem wurde der Einfluss der Wasserstoffperoxidkonzentration auf die Prozessstabilität betrachtet. Durch die Einführung der kontinuierlichen Wasserstoffperoxidzugabe, die Anpassung des Zugabezeitraums und der Wasserstoffperoxidkonzentration konnte die Prozessstabilität in dieser Arbeit von 5 auf 12 Zyklen bis zum vollständigen Aktivitätsverlust gesteigert werden. Zum Vergleich fanden Vlček und Petrović bei der Epoxidierung von Sojaöl mit Novozym® 435 bei einer geringeren Reaktionstemperatur von 25 °C bereits einen drastischen Aktivitätsverlust im fünften Zyklus [157].

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Epoxidierung verschiedener Pflanzenölbasierter Derivate analysiert. Die Umsetzung freier Fett- und Dicarbonsäuren wurde aufgrund der Schmelzpunkte der Substrate oder Epoxide in Lösemittel durchgeführt. Öl-, Linol-,  $\alpha$ -Linolen- und Tallölfettsäuren konnten bei einer Konzentration von 1,5 M und einer Temperatur von 40 °C mit Epoxidausbeuten im Bereich von 80 % ohne Präzipitatbildung umgesetzt werden. Bei Erucasäure war bei dieser Konzentration eine Erhöhung der Temperatur auf 50 °C erforderlich, um eine vollständige Umsetzung zu erzielen.

Die enzymatische Epoxidierung von Ölsäuremethylester konnte in lösemittelfreien Ansätzen mit hohen Ausbeuten durchgeführt werden. Das Reaktionsprodukt enthielt jedoch einen signifikanten Anteil an 9,10-Epoxystearinsäure, wie bereits von Orellana-Coca *et al.* beschrieben wurde [114]. In dieser Arbeit wurde daher die enzymatische Epoxidierung von 1,5 M Methyloleat in Toluol unter Zugabe von MeOH untersucht. Der Anteil von 9,10-Epoxystearinsäure im Produktgemisch konnte so deutlich reduziert werden. Außerdem wurde die Rückveresterung von 9,10-Epoxystearinsäure aus einem Produktgemisch mit Epoxystearinsäuremethylester durch Zugabe von Methanol erfolgreich gezeigt. Des Weiteren konnte die fermentativ aus Ölsäure hergestellte 9-Octadecen-1,18-dicarbonsäure erfolgreich in dieser Arbeit epoxidiert werden. Die Epoxidierung von 9-Octadecen wurde durch die Verwendung von Dimethylcarbonat als Lösemittel und Cosubstrat realisiert.

### *Maßstabsvergrößerung der chemo-enzymatischen Epoxidierung*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren die Maßstabsübertragung der chemo-enzymatischen Epoxidierung bis in den 10 L-Maßstab durchgeführt. Dabei konnte die Skalierbarkeit erfolgreich für die enzymatische Funktionalisierung von Drachenkopföl unter Verwendung eines konstanten volumenspezifischen Leistungseintrages als Maßstabsübertragungskriterium gezeigt werden. Der Einsatz dieses Skalierungskriteriums ermöglichte dabei die Ausbildung einer gleichbleibenden volumenspezifischen Phasengrenzfläche und damit eine Übertragung des Prozesses in einen größeren Maßstab bei vergleichbarem Reaktionsverlauf. In diesem Zusammenhang konnte der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die erzielte Tropfengrößenverteilung durch Verwendung eines 3D-ORM-Systems beschrieben werden. Zur Darstellung wurde der Sauterdurchmesser gewählt. Die Untersuchungen zur Tropfengrößenverteilung wurden mit Ergebnissen aus der chemo-enzymatischen Epoxidierung im selben Reaktionssystem verknüpft. Es wurde unter anderem gezeigt, dass bei der lösemittelfreien Epoxidierung von Drachenkopföl die Umsatzrate im Vergleich zu Ansätzen mit Lösemittel trotz eines gleichen oder kleineren Sauterdurchmessers deutlich geringer war. Die Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit konnte daher durch eine Einschränkung der Substratverfügbarkeit am immobilisierten Biokatalysator erklärt werden. Aufgrund der höheren Viskosität beim lösemittelfreien Ansatz kommt es zur Ausbildung einer dickeren laminaren Grenzschicht und damit zu einer Substratlimitierung. Im 1 L-Maßstab konnten bei der Umsetzung von Drachenkopföl bereits ab einem Lösemittelanteil von 20 Gew. % Epoxidausbeuten von über 95 % nach 24 h Inkubation bei 30 °C erzielt werden, obwohl ein im Vergleich zum lösemittelfreien Ansatz vergleichbarer Sauterdurchmesser festgestellt wurde. Aufgrund der durch den Lösemiteleinsatz reduzierten Viskosität des Reaktionsmediums bildete sich am Biokatalysator eine dünnere laminare Grenzschicht aus,

---

die im Vergleich zum lösemittelfreien Ansatz eine gesteigerte Umsatzrate ermöglichte. Auf Basis der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse können somit größere Reaktionsmaßstäbe ausgelegt werden.

## 6.2 Ausblick

Die chemo-enzymatische Epoxidierung wurde in dieser Arbeit für verschiedenste Pflanzenöl-basierte Substrate erfolgreich optimiert und dabei hohe Epoxidausbeuten erzielt. Zukünftige Arbeiten könnten ihren Fokus auf die Untersuchung des Einflusses struktureller Enzymmerkmale auf die katalytische Aktivität von Lipasen zur Bildung von Persäuren legen. Ein besseres Verständnis der Enzymstruktur-Funktionsbeziehung kann dann die Grundlagen zur Optimierung der spezifischen Aktivität mit Hilfe von *Protein Engineering* darstellen. Ein weiterer Ansatz im Bereich der Enzymmodifikation kann die Erhöhung der Enzymstabilität gegenüber Oxidationsmitteln wie Wasserstoffperoxid zum Ziel haben.

Aus prozesstechnischer Sicht können auf Basis der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse weitere Untersuchungen zur Steigerung der Prozessstabilität der eingesetzten Lipase folgen. Eine Exposition der aktuell eingesetzten Lipase B aus *P. antarctica* gegenüber hohen Wasserstoffperoxidkonzentrationen sollte dabei vermieden werden. Ein möglicher Ansatz wäre hier die Separation des Biokatalysators von der wässrigen Wasserstoffperoxidphase. Insgesamt sollten die zukünftigen Untersuchungen die Reduktion der Katalysatorkosten zum Ziel haben.

Die Maßstabsvergrößerung wurde in dieser Arbeit bis in den 10 L-Reaktor durchgeführt. Eine Übertragung in größere Reaktionsmaßstäbe kann auf Basis des in dieser Arbeit identifizierten Maßstabsübertragungskriteriums erfolgen. Entsprechende Berechnungen zur Übertragung in den 100 L-Maßstab wurden bereits in Kapitel 5.4.2 vorgestellt.



---

## 7 Literaturverzeichnis

1. Busch, R., et al., *Nutzung nachwachsender Rohstoffe in der industriellen Stoffproduktion*. Chemie Ingenieur Technik, 2006. **78**(3): p. 219-228.
2. Behr, A. and J.P. Gomes, *The refinement of renewable resources: New important derivatives of fatty acids and glycerol*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2010. **112**(1): p. 31-50.
3. Hill, K., *Fats and oils as oleochemical raw materials*. Pure and Applied Chemistry, 2000. **72**(7): p. 1255-1264.
4. Behr, A. and A. Westfechtel, *Katalytische Prozesse bei der Wertstoffgewinnung aus natürlichen Ölen und Fetten*. Chemie Ingenieur Technik, 2007. **79**(5): p. 621-636.
5. Metzger, J.O., *Fats and oils as renewable feedstock for chemistry*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2009. **111**(9): p. 865-876.
6. Xia, Y. and R.C. Larock, *Vegetable oil-based polymeric materials: synthesis, properties, and applications*. Green Chemistry, 2010. **12**(11): p. 1893-1909.
7. USDA, *Oilseeds: World Markets and Trade*. 2016-08.
8. Gunstone, F.D., *Non-food uses of vegetable oils*. Lipid Technology, 2011. **23**(1): p. 24-24.
9. Gunstone, F.D., *Supplies of vegetable oils for non-food purposes*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011. **113**(1): p. 3-7.
10. Seniha Güner, F., Y. Yağcı, and A. Tuncer Erciyes, *Polymers from triglyceride oils*. Progress in Polymer Science, 2006. **31**(7): p. 633-670.
11. Swern, D., et al., *Hydroxylation of Monounsaturated Fatty Materials with Hydrogen Peroxide*. Journal of the American Chemical Society, 1945. **67**(10): p. 1786-1789.
12. Cai, C., et al., *Studies on the kinetics of in situ epoxidation of vegetable oils*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2008. **110**(4): p. 341-346.
13. Dinda, S., et al., *Epoxidation of cottonseed oil by aqueous hydrogen peroxide catalysed by liquid inorganic acids*. Bioresource Technology, 2008. **99**(9): p. 3737-3744.
14. Rios, L.A., et al., *Mesoporous and amorphous Ti-silicas on the epoxidation of vegetable oils*. Journal of Catalysis, 2005. **232**(1): p. 19-26.
15. Rangarajan, B., et al., *Kinetic parameters of a two-phase model for in situ epoxidation of soybean oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1995. **72**(10): p. 1161-1169.
16. Björkling, F., S.E. Godtfredsen, and O. Kirk, *Lipase-mediated formation of peroxy-carboxylic acids used in catalytic epoxidation of alkenes*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1990(19): p. 1301-1303.

17. Rüschen gen. Klaas, M. and S. Warwel, *Chemoenzymatic epoxidation of unsaturated fatty acid esters and plant oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996. **73**(11): p. 1453-1457.
18. Rüschen gen. Klaas, M. and S. Warwel, *Complete and partial epoxidation of plant oils by lipase-catalyzed perhydrolysis*. Industrial Crops and Products, 1999. **9**(2): p. 125-132.
19. Köckritz, A. and A. Martin, *Oxidation of unsaturated fatty acid derivatives and vegetable oils*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2008. **110**(9): p. 812-824.
20. Siemel, G., R. Rieth, and K.T. Rowbottom, *Epoxides*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
21. Höfer, R., et al., *Oleochemical polyols — A new raw material source for polyurethane coatings and floorings*. Journal of Coatings Technology, 1997. **69**(869): p. 65-72.
22. Baumann, H., et al., *Natürliche Fette und Öle – nachwachsende Rohstoffe für die chemische Industrie*. Angewandte Chemie, 1988. **100**(1): p. 41-62.
23. Richtler, H.J. and J. Knaut, *Challenges to a mature industry: Marketing and economics of oleochemicals in Western Europe*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1984. **61**(2): p. 160-175.
24. Kreutzer, U., *Manufacture of fatty alcohols based on natural fats and oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1984. **61**(2): p. 343-348.
25. Behr, A., *Anwendungsmöglichkeiten der homogenen Übergangsmetallkatalyse in der Fettchemie*. Lipid / Fett, 1990. **92**(10): p. 375-388.
26. Smith, J.G., *Synthetically useful reactions of epoxides*. Synthesis, 1984. **1984**(08): p. 629-656.
27. Posner, G.H. and D.Z. Rogers, *Organic reactions at alumina surfaces. Mild and selective opening of epoxides by alcohols, thiols, benzeneselenol, amines, and acetic acid*. Journal of the American Chemical Society, 1977. **99**(25): p. 8208-8214.
28. Werdelmann, B.W., *Fettchemie als Aufgabe*. Fette, Seifen, Anstrichmittel, 1974. **76**(1): p. 1-8.
29. Lefort, T., *Process for the production of ethylene oxide*. French patent, 1931. **729952**.
30. Rebsdorf, S. and D. Mayer, *Ethylene Oxide*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
31. Lee, H.-J., et al., *Toward a CO<sub>2</sub>-free ethylene oxide process: Homogeneous ethylene oxide in gas-expanded liquids*. Chemical Engineering Science, 2010. **65**(1): p. 128-134.
32. Teles, J.H., et al., *Oxidation*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2015, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
33. Tsuji, J., et al. *Development of New Propylene Oxide Process*. 2006 03.05.2013, 10:11]; Available from: [http://www.sumitomo-chem.co.jp/english/rd/report/theses/docs/20060100\\_ely.pdf](http://www.sumitomo-chem.co.jp/english/rd/report/theses/docs/20060100_ely.pdf).

- 
34. Kahlich, D., U. Wiechern, and J. Lindner, *Propylene Oxide*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
  35. Nijhuis, T.A., et al., *The Production of Propene Oxide: Catalytic Processes and Recent Developments*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2006. **45**(10): p. 3447-3459.
  36. de Jong, E., et al., *Product developments in the bio-based chemicals arena*. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012. **6**(6): p. 606-624.
  37. Danov, S.M., A.V. Sulimov, and A.V. Ovcharova, *Effect of Technological Parameters on the Process of Epichlorohydrin Synthesis*. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 2012. **85**: p. 62-66.
  38. Bell, B.M., et al., *Glycerin as a Renewable Feedstock for Epichlorohydrin Production. The GTE Process*. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 2008. **36**(8): p. 657-661.
  39. Liu, G.Y.T., et al., *Chlorohydrins*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
  40. www.chemweek.com. *Vinythai Starts up Epichlorohydrin Plant in Thailand*. 2012 [cited 2015 15/04/2015; 6:27 p.m.]; Available from: [http://www.chemweek.com/regions/southeast\\_asia/thailand/Vinythai-Starts-up-Epichlorohydrin-Plant-in-Thailand\\_41631.html](http://www.chemweek.com/regions/southeast_asia/thailand/Vinythai-Starts-up-Epichlorohydrin-Plant-in-Thailand_41631.html).
  41. <http://coatings.specialchem.com>. *Dow Epoxy and Shanghai Tian Yuan Huasheng Sign Long Term Raw Materials Supply Agreements for Two Proposed Plants in Shanghai* 2008 [cited 2015 15/05/2015; 6:30 p.m.]; Available from: <http://coatings.specialchem.com/news/industry-news/dow-epoxy-and-shanghai-tian-yuan-huasheng-sign-long-term-raw-materials-supply-agreements-for-two-10171>.
  42. Kralisch, D., et al., *Transfer of the epoxidation of soybean oil from batch to flow chemistry guided by cost and environmental issues*. *ChemSusChem*, 2012. **5**(2): p. 300-311.
  43. Niederhauser, W.D., *Chlorinated Rubber and epoxidized oils*, R.H. Company, Editor. 1951. p. 3.
  44. Ishiaku, U.S., et al., *The effect of an epoxidized plasticizer on the thermo-oxidative ageing of poly(vinyl chloride)/epoxidized natural rubber thermoplastic elastomers*. *Polymer International*, 1998. **45**(1): p. 83-91.
  45. Witnauer, L.P., et al., *Epoxy Esters as Plasticizers and Stabilizers for Vinyl Chloride Polymers*. *Industrial & Engineering Chemistry*, 1955. **47**(11): p. 2304-2311.
  46. Gan, L.H., et al., *Epoxidized esters of palm olein as plasticizers for poly(vinyl chloride)*. *European Polymer Journal*, 1995. **31**(8): p. 719-724.
  47. Al-Mulla, E., et al., *Properties of epoxidized palm oil plasticized polylactic acid*. *Journal of Materials Science*, 2010. **45**(7): p. 1942-1946.
  48. Arkema. 2015 [cited 2015 16.04.2015, 9:15]; Available from: <http://www.arkema.com/en/products/product-finder/range-viewer/Vikoflex-epoxidized-vegetable-oils/?t=2>.

- 
49. Hwang, H.-S. and S. Erhan, *Modification of epoxidized soybean oil for lubricant formulations with improved oxidative stability and low pour point*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2001. **78**(12): p. 1179-1184.
  50. Hwang, H.-S. and S.Z. Erhan, *Synthetic lubricant basestocks from epoxidized soybean oil and Guerbet alcohols*. Industrial Crops and Products, 2006. **23**(3): p. 311-317.
  51. Lathi, P.S. and B. Mattiasson, *Green approach for the preparation of biodegradable lubricant base stock from epoxidized vegetable oil*. Applied Catalysis B: Environmental, 2007. **69**(3-4): p. 207-212.
  52. Campanella, A., et al., *Lubricants from chemically modified vegetable oils*. Bioresource Technology, 2010. **101**(1): p. 245-254.
  53. Salimon, J., N. Salih, and E. Yousif, *Chemically modified biolubricant basestocks from epoxidized oleic acid: Improved low temperature properties and oxidative stability*. Journal of Saudi Chemical Society, 2011. **15**(3): p. 195-201.
  54. Salimon, J., B.M. Abdullah, and N. Salih, *Optimization of the oxirane ring opening reaction in biolubricant base oil production*. Arabian Journal of Chemistry, 2011(0).
  55. Crivello, J.V. and R. Narayan, *Epoxidized triglycerides as renewable monomers in photoinitiated cationic polymerization*. Chemistry of Materials, 1992. **4**(3): p. 692-699.
  56. Overeem, A., et al., *Seed oils rich in linolenic acid as renewable feedstock for environment-friendly crosslinkers in powder coatings*. Industrial Crops and Products, 1999. **10**(3): p. 157-165.
  57. Buisman, G., *Biodegradable binders and cross-linking agents from renewable resources*. Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions, 1999. **82**(3): p. 127-130.
  58. Prileschajew, N., *Oxydation ungesättigter Verbindungen mittels organischer Superoxyde*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1909. **42**(4): p. 4811-4815.
  59. Swern, D., G.N. Billen, and J.T. Scanlan, *Hydroxylation and Epoxidation of Some 1-Olefins with Peracids*. Journal of the American Chemical Society, 1946. **68**(8): p. 1504-1507.
  60. Bartlett, P.D., *Recent Work on the Mechanisms of Peroxide Reactions*. Rec. Chem. Prog., 1950. **11**: p. 47-50.
  61. Witnauer, L.P. and D. Swern, *X-Ray Diffraction and Melting Point-Composition Studies on the 9,10-Epoxy- and Dihydroxystearic Acids and 9,10-Epoxyoctadecanols*. Journal of the American Chemical Society, 1950. **72**(8): p. 3364-3368.
  62. Swern, D., *Epoxidation and hydroxylation of ethylenic compounds with organic peracids*. Organic reactions, 1953.
  63. OrganicChemistryPortal. 2011 27.07.2014, 18:20]; Available from: <http://www.organische-chemie.ch/OC/Namen/priles1.gif>.

- 
64. Gamage, P.K., M. O'Brien, and L. Karunanayake, *Epoxidation of some vegetable oils and their hydrolysed products with peroxyformic acid - optimised to industrial scale*. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 2009. **37**(4): p. 229-240.
65. Swern, D., *Electronic Interpretation of the Reaction of Olefins with Organic Peracids*. Journal of the American Chemical Society, 1947. **69**(7): p. 1692-1698.
66. van Deurzen, M.P.J., F. van Rantwijk, and R.A. Sheldon, *Selective oxidations catalyzed by peroxidases*. Tetrahedron, 1997. **53**(39): p. 13183-13220.
67. McCarthy, M.B. and R.E. White, *Functional differences between peroxidase compound I and the cytochrome P-450 reactive oxygen intermediate*. Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(15): p. 9153-8.
68. Geigert, J., et al., *Epoxidation of alkenes by chloroperoxidase catalysis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1986. **136**(2): p. 778-782.
69. Ortiz de Montellano, P.R., et al., *Structure-mechanism relationships in hemoproteins. Oxygenations catalyzed by chloroperoxidase and horseradish peroxidase*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(24): p. 11641-11646.
70. Elfarra, A.A., R.J. Duescher, and C.M. Pasch, *Mechanisms of 1,3-butadiene oxidations to butadiene monoxide and crotonaldehyde by mouse liver microsomes and chloroperoxidase*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1991. **286**(1): p. 244-251.
71. Colonna, S., et al., *Enantioselective epoxidation of styrene derivatives by chloroperoxidase catalysis*. Tetrahedron: Asymmetry, 1993. **4**(6): p. 1325-1330.
72. Dembitsky, V.M., *Oxidation, epoxidation and sulfoxidation reactions catalysed by haloperoxidases*. Tetrahedron, 2003. **59**(26): p. 4701-4720.
73. Allain, E.J., et al., *Highly enantioselective epoxidation of disubstituted alkenes with hydrogen peroxide catalyzed by chloroperoxidase*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(10): p. 4415-4416.
74. Zaks, A. and D.R. Dodds, *Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric oxidations: substrate specificity and mechanistic study*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(42): p. 10419-10424.
75. Dexter, A.F., et al., *Highly Enantioselective Epoxidation of 1,1-Disubstituted Alkenes Catalyzed by Chloroperoxidase*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(23): p. 6412-6413.
76. Dexter, A.F. and L.P. Hager, *Transient Heme N-Alkylation of Chloroperoxidase by Terminal Alkenes and Alkynes*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(2): p. 817-818.
77. Hu, S., et al., *Selective enzymatic epoxidation of dienes: generation of functional enantiomerically enriched diene monoepoxy monomers*. Tetrahedron Letters, 2002. **43**(38): p. 6763-6766.
78. Hu, S. and L.P. Hager, *Asymmetric epoxidation of functionalized cis-olefins catalyzed by chloroperoxidase*. Tetrahedron Letters, 1999. **40**(9): p. 1641-1644.

- 
79. Lakner, F.J. and L.P. Hager, *Chloroperoxidase as Enantioselective Epoxidation Catalyst: An Efficient Synthesis of (R)-(-)-Mevalonolactone*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1996. **61**(11): p. 3923-3925.
80. Manoj, K.M., F.J. Lakner, and L.P. Hager, *Epoxidation of indene by chloroperoxidase*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000. **9**(1-3): p. 107-111.
81. Rai, Gyan P., et al., *Directed Evolution of Chloroperoxidase for Improved Epoxidation and Chlorination Catalysis*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2001. **343**(6-7): p. 638-645.
82. Tziialla, A.A., et al., *Enhanced catalytic performance and stability of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in surfactant free ternary water-organic solvent systems*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2008. **51**(1-2): p. 24-35.
83. Hofstetter, K., et al., *Biokatalytische asymmetrische Epoxidierung kombiniert mit NADH-Regenerierung in organisch-wässrigen Emulsionen*. *Angewandte Chemie*, 2004. **116**(16): p. 2215-2218.
84. Schmid, A., et al., *Integrated Biocatalytic Synthesis on Gram Scale: The Highly Enantioselective Preparation of Chiral Oxiranes with Styrene Monooxygenase*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2001. **343**(6-7): p. 732-737.
85. Tishkov, V.I., et al., *Catalytic Properties and Stability of a *Pseudomonas* sp.101 Formate Dehydrogenase Mutants Containing Cys-255-Ser and Cys-255-Met Replacements*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993. **192**(2): p. 976-981.
86. Park, J.-B., et al., *The efficiency of recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst for stereospecific epoxidation*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006. **95**(3): p. 501-512.
87. Lin, H., et al., *Styrene monooxygenase from *Pseudomonas* sp. LQ26 catalyzes the asymmetric epoxidation of both conjugated and unconjugated alkenes*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010. **67**(3-4): p. 236-241.
88. Julsing, M.K., et al., *Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012. **109**(5): p. 1109-1119.
89. Lin, H., Y. Liu, and Z.-L. Wu, *Asymmetric epoxidation of styrene derivatives by styrene monooxygenase from *Pseudomonas* sp. LQ26: effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -substituents*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2011. **22**(2): p. 134-137.
90. Hollmann, F., et al., *Stereospecific Biocatalytic Epoxidation: The First Example of Direct Regeneration of a FAD-Dependent Monooxygenase for Catalysis*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(27): p. 8209-8217.
91. Hollmann, F., et al., *Direct Electrochemical Regeneration of Monooxygenase Subunits for Biocatalytic Asymmetric Epoxidation*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(18): p. 6540-6541.
92. Panke, S., et al., *Production of enantiopure styrene oxide by recombinant *Escherichia coli* synthesizing a two-component styrene monooxygenase*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000. **69**(1): p. 91-100.

- 
93. Fruetel, J.A., et al., *Calculated and experimental absolute stereochemistry of the styrene and .beta.-methylstyrene epoxides formed by cytochrome P 450cam*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(18): p. 6987-6993.
  94. Nickerson, D.P., et al., *The catalytic activity of cytochrome P450cam towards styrene oxidation is increased by site-specific mutagenesis*. FEBS Letters, 1997. **405**(2): p. 153-156.
  95. Mayhew, M.P., et al., *Improving the Cytochrome P450 Enzyme System for Electrode-Driven Biocatalysis of Styrene Epoxidation*. Biotechnology Progress, 2000. **16**(4): p. 610-616.
  96. Reipa, V., M.P. Mayhew, and V.L. Vilker, *A direct electrode-driven P450 cycle for biocatalysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(25): p. 13554-13558.
  97. Vilker, V., et al., *Challenges in capturing oxygenase activity in vitro*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999. **76**(11): p. 1283-1289.
  98. Celik, A., et al., *Enantioselective epoxidation of linolenic acid catalysed by cytochrome P450BM3 from Bacillus megaterium*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2005. **3**(15): p. 2688-2690.
  99. Blée, E. and F. Schuber, *Efficient epoxidation of unsaturated fatty acids by a hydroperoxide-dependent oxygenase*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(22): p. 12887-94.
  100. Blee, E. and F. Schuber, *Stereochemistry of the epoxidation of fatty acids catalyzed by soybean peroxygenase*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990. **173**(3): p. 1354-1360.
  101. Piazza, G.J., T.A. Foglia, and A. Nuñez, *Epoxidation of fatty acids with membrane-supported peroxygenase*. Biotechnology Letters, 2000. **22**(3): p. 217-221.
  102. Piazza, G., T. Foglia, and A. Nuñez, *Optimizing reaction parameters for the enzymatic synthesis of epoxidized oleic acid with oat seed peroxygenase*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2001. **78**(6): p. 589-592.
  103. Piazza, G.J., A. Nuñez, and T.A. Foglia, *Epoxidation of fatty acids, fatty methyl esters, and alkenes by immobilized oat seed peroxygenase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **21**(3): p. 143-151.
  104. Piazza, G. and T. Foglia, *Preparation of fatty amide polyols via epoxidation of vegetable oil amides by oat seed peroxygenase*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2005. **82**(7): p. 481-485.
  105. Piazza, G. and T. Foglia, *One-pot synthesis of fatty acid epoxides from triacylglycerols using enzymes present in oat seeds*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2006. **83**(12): p. 1021-1025.
  106. Björkling, F., et al., *Lipase catalyzed synthesis of peroxycarboxylic acids and lipase mediated oxidations*. Tetrahedron, 1992. **48**(22): p. 4587-4592.
  107. Neidleman, S.L., W.F. Amon, and J. Geigert, *Preparation of epoxides and glycols from gaseous alkenes*. 1981, Google Patents.

- 
108. Hecht, H.J., et al., *The metal-ion-free oxidoreductase from Streptomyces aureofaciens has an [alpha]/[beta] hydrolase fold*. Nat Struct Mol Biol, 1994. **1**(8): p. 532-537.
109. Kirk, O. and L. Sparre Conrad, *Metallfreie Haloperoxidasen: Fakt oder Artefakt?* Angewandte Chemie, 1999. **111**(7): p. 1031-1033.
110. Picard, M., et al., *Metallfreie bakterielle Haloperoxidasen als ungewöhnliche Hydrolasen: Aktivierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Bildung von Peressigsäure*. Angewandte Chemie, 1997. **109**(11): p. 1245-1248.
111. Ortiz de Montellano, P. and L. Grab, *Cooxidation of styrene by horseradish peroxidase and glutathione*. Molecular pharmacology, 1986. **30**(6): p. 666-669.
112. Ortiz de Montellano, P.R. and L.A. Grab, *Cooxidation of styrene by horseradish peroxidase and phenols: a biochemical model for protein-mediated cooxidation*. Biochemistry, 1987. **26**(17): p. 5310-5314.
113. Warwel, S. and M. Rüschen-Klaas, *Chemo-enzymatic epoxidation of unsaturated carboxylic acids*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1995. **1**(1): p. 29-35.
114. Orellana-Coca, C., et al., *Chemo-enzymatic epoxidation of oleic acid and methyl oleate in solvent-free medium*. Biocatalysis and Biotransformation, 2005. **23**(6): p. 431-437.
115. Anderson, E.M., K.M. Larsson, and O. Kirk, *One Biocatalyst—Many Applications: The Use of Candida Antarctica B-Lipase in Organic Synthesis*. Biocatalysis and Biotransformation, 1998. **16**(3): p. 181-204.
116. Rüschen-Klaas, M. and S. Warwel, *Lipase-catalyzed preparation of peroxy acids and their use for epoxidation*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 1997. **117**(1-3): p. 311-319.
117. Törnqvist, U., et al., *Stability of immobilized Candida antarctica lipase B during chemo-enzymatic epoxidation of fatty acids*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(3): p. 447-451.
118. Törnqvist, U., et al., *Mass spectrometric analysis of peptides from an immobilized lipase: focus on oxidative modifications*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. **23**(18): p. 2959-2964.
119. Törnqvist, U., et al., *Structural, functional and chemical changes in Pseudozyma antarctica lipase B on exposure to hydrogen peroxide*. Biochimie, 2010. **92**(12): p. 1867-1875.
120. Pleiss, J., et al., *Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence–structure–function relationships*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000. **10**(5): p. 491-508.
121. Pleiss, J., M. Fischer, and R.D. Schmid, *Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site*. Chemistry and Physics of Lipids, 1998. **93**(1–2): p. 67-80.
122. Desnuelle, P., L. Sarda, and G. Ailhaud, *Inhibition de la lipase pancréatique par le diéthyl-p-nitrophényl phosphate en émulsion*. Biochimica et biophysica Acta, 1960. **37**(3): p. 570-571.



- 
123. Bornscheuer, U.T., et al., *Optimizing lipases and related enzymes for efficient application*. Trends in Biotechnology, 2002. **20**(10): p. 433-437.
  124. Jaeger, K.-E., et al., *Bacterial lipases*. FEMS Microbiology Reviews, 1994. **15**(1): p. 29-63.
  125. Derewenda, U., et al., *Current progress, in crystallographic studies of new Lipases from filamentous fungi*. Protein Engineering, 1994. **7**(4): p. 551-557.
  126. Balcão, V.M., A.L. Paiva, and F. Xavier Malcata, *Bioreactors with immobilized lipases: State of the art*. Enzyme and Microbial Technology, 1996. **18**(6): p. 392-416.
  127. Verger, R., *'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts*. Trends in Biotechnology, 1997. **15**(1): p. 32-38.
  128. Schmid, R.D. and R. Verger, *Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications*. Angewandte Chemie International Edition, 1998. **37**: p. 1608 - 1633.
  129. Ransac, S., et al., *The Kinetics, Specificities and Structural Features of Lipases*, in *Molecular Dynamics of Biomembranes*, J.F. Op den Kamp, Editor. 1996, Springer Berlin Heidelberg. p. 265-304.
  130. Martinelle, M., M. Holmquist, and K. Hult, *On the interfacial activation of Candida antarctica lipase A and B as compared with Humicola lanuginosa lipase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1995. **1258**(3): p. 272-276.
  131. Dodson, G.G., *Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation*. Faraday discussions, 1992. **93**: p. 95-105.
  132. Ollis, D.L., et al., *The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold*. Protein Engineering, 1992. **5**(3): p. 197-211.
  133. Holmquist, M., *Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms*. Current Protein and Peptide Science, 2000. **1**(2): p. 209-235.
  134. Uppenberg, J., et al., *The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica*. Structure, 1994. **2**(4): p. 293-308.
  135. Uppenberg, J., et al., *Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from Candida antarctica reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols*. Biochemistry, 1995. **34**(51): p. 16838-16851.
  136. Rusnak, M., *Untersuchungen zur enzymatischen Enantiomerentrennung von Glykoethern und Etablierung neuer Methoden des synthetischen Shufflings*, in *Geo- und Biowissenschaften*. 2004, Stuttgart. p. 186.
  137. Nardini, M. and B.W. Dijkstra,  *$\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing*. Current Opinion in Structural Biology, 1999. **9**(6): p. 732-737.
  138. Fischer, M. and J. Pleiss, *The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(1): p. 319-321.
  139. Carter, P. and J.A. Wells, *Dissecting the catalytic triad of a serine protease*. Nature, 1988. **332**(6164): p. 564-568.

- 
140. Bernhardt, P., K. Hult, and R.J. Kazlauskas, *Molecular Basis of Perhydrolase Activity in Serine Hydrolases*. *Angewandte Chemie*, 2005. **117**(18): p. 2802-2806.
  141. Kazlauskas, R., J. and P. Bernhardt, *Increasing perhydrolase activity in esterase and/or lipases*. 2006: United States. p. 14.
  142. Cheeseman, J.D., et al., *Structure of an aryl esterase from Pseudomonas fluorescens*. *Acta Crystallographica Section D*, 2004. **60**(7): p. 1237-1243.
  143. Yin, D.L., et al., *Switching Catalysis from Hydrolysis to Perhydrolysis in Pseudomonas fluorescens Esterase*. *Biochemistry*, 2010. **49**(9): p. 1931-1942.
  144. Yadav, G. and K. Manjula Devi, *A kinetic model for the enzyme-catalyzed self-epoxidation of oleic acid*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001. **78**(4): p. 347-351.
  145. Miao, S., et al., *Chemoenzymatic synthesis of oleic acid-based polyesters for use as highly stable biomaterials*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2008. **46**(12): p. 4243-4248.
  146. Skouridou, V., H. Stamatis, and F.N. Kolisis, *A Study on the Process of Lipase-catalyzed Synthesis of  $\alpha$ -pinene Oxide in Organic Solvents*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2003. **21**(6): p. 285-290.
  147. Moreira, M.A. and M.G. Nascimento, *Chemo-enzymatic epoxidation of (+)-3-carene*. *Catalysis Communications*, 2007. **8**(12): p. 2043-2047.
  148. Waterhouse, A.M., et al., *Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(9): p. 1189-1191.
  149. Tamura, K., et al., *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution*, 2007. **24**(8): p. 1596-1599.
  150. Cuperus, F.P., et al., *Lipases Used for the Production of Peroxycarboxylic Acids*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1994. **9**(1-4): p. 89-96.
  151. Corrêa, F.d.A., et al., *Epoxidation of oleic acid catalyzed by PSCI-Amano lipase optimized by experimental design*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012. **81**(0): p. 7-11.
  152. Werner, N., et al., *Identification of novel CAL-B type lipases as biocatalysts for the chemo-enzymatic epoxidation of plant oils*. in preparation.
  153. Hanefeld, U., L. Gardossi, and E. Magner, *Understanding enzyme immobilisation*. *Chemical Society Reviews*, 2009. **38**(2): p. 453-468.
  154. Warwel, S. and M. Rüschen-Klaas, *Chemo-enzymatic epoxidation of unsaturated carboxylic acids*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1995. **1**: p. 29-35.
  155. Sun, S., et al., *Enzymatic Epoxidation of Corn Oil by Perstearic Acid*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2011: p. 1-5.
  156. Sun, S., et al., *Enzymatic epoxidation of Sapindus mukorossi seed oil by perstearic acid optimized using response surface methodology*. *Industrial Crops and Products*, 2011. **33**(3): p. 676-682.

- 
157. Vlček, T. and Z. Petrović, *Optimization of the chemoenzymatic epoxidation of soybean oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2006. **83**(3): p. 247-252.
158. Kim, H.S., Q.A.T. Le, and Y.H. Kim, *Development of thermostable lipase B from *Candida antarctica* (CalB) through in silico design employing B-factor and RosettaDesign*. Enzyme and Microbial Technology, 2010. **47**(1-2): p. 1-5.
159. Carlson, K.D. and S.P. Chang, *Chemical epoxidation of a natural unsaturated epoxy seed oil from *Vernonia galamensis* and a look at epoxy oil markets*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1985. **62**(5): p. 934-939.
160. Gerbase, A., et al., *Epoxidation of Soybean Oil by the Methyltrioxorhenium-CH<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Catalytic Biphasic System*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002. **79**(2): p. 179-181.
161. Wu, X., et al., *The study of epoxidized rapeseed oil used as a potential biodegradable lubricant*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000. **77**(5): p. 561-563.
162. Anneken, D.J., et al., *Fatty Acids*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
163. Thomas, A., *Fats and fatty oils*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000.
164. Warwel, S., C. Demes, and G. Steinke, *Polyesters by lipase-catalyzed polycondensation of unsaturated and epoxidized long-chain  $\alpha,\omega$ -dicarboxylic acid methyl esters with diols*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2001. **39**(10): p. 1601-1609.
165. Törnvall, U., et al., *Biocatalytic production of fatty epoxides from rapeseed & tall oil derivatives: Process & environmental evaluation*. Industrial Biotechnology, 2009. **5**(3): p. 184-192.
166. Schneider, R.d.C.S., et al., *Chemo-enzymatic epoxidation of sunflower oil methyl esters*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2009. **20**: p. 1473-1477.
167. Lu, H., et al., *Enzymatic epoxidation of soybean oil methyl esters in the presence of free fatty acids*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2010. **112**(10): p. 1101-1105.
168. Lu, H., et al., *Enzymatic epoxidation of biodiesel optimized by response surface methodology*. African Journal of Biotechnology, 2012. **11**(59): p. 12356-12363.
169. Rüschen, M. and S. Warwel, *Kontinuierliche chemo-enzymatische Epoxidation an einem Festbett-Katalysator*. Nachwachsende Rohstoffe für die Chemie, 7. Symposium, Dresden, 2001.
170. Hagström, A.E.V., et al., *Chemo-enzymatic epoxidation—process options for improving biocatalytic productivity*. Biotechnology Progress, 2011. **27**(1): p. 67-76.
171. Uyama, H., et al., *Enzymatic Synthesis and Curing of Biodegradable Epoxide-Containing Polyesters from Renewable Resources*. Biomacromolecules, 2003. **4**(2): p. 211-215.

- 
172. Orellana-Coca, C., et al., *Chemo-enzymatic epoxidation of linoleic acid: Parameters influencing the reaction*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2005. **107**(12): p. 864-870.
173. Kudanga, T., et al., *Chemo-enzymatic functionalisation of lignocellulose materials using oxiranes*. Process Biochemistry, 2010. **45**(9): p. 1557-1562.
174. Orellana-Coca, C., et al., *Analysis of fatty acid epoxidation by high performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection and mass spectrometry*. Chemistry and Physics of Lipids, 2005. **135**(2): p. 189-199.
175. Frykman, H. and T. Isbell, *Synthesis of 6-hydroxy  $\delta$ -lactones and 5,6-dihydroxy eicosanoic/docosanoic acids from meadowfoam fatty acids &lt;i>via&/i>; a lipase-mediated self-epoxidation*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997. **74**(6): p. 719-722.
176. Abdullah, B.M., N. Salih, and J. Salimon, *Optimization of the chemoenzymatic mono-epoxidation of linoleic acid using D-optimal design*. Journal of Saudi Chemical Society, 2014. **18**(3): p. 276-287.
177. Dierker, M. and H.J. Schäfer, *Surfactants from oleic, erucic and petroselinic acid: Synthesis and properties*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2010. **112**(1): p. 122-136.
178. Warwel, S., et al., *Surfactants from glucamines and  $\omega$ -epoxy fatty acid esters*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2001. **103**(10): p. 645-654.
179. zu Putlitz, B., et al., *New Cationic Surfactants with Sulfonium Headgroups*. Langmuir, 2000. **16**(7): p. 3214-3220.
180. Miura, Y. and T. Yamane, *Epoxidation of alkanes and cycloalkanes by microbial lipases immobilized with photo-crosslinkable resin prepolymer*. Biotechnology Letters, 1997. **19**(7): p. 611-613.
181. Rüschen Klaas, M. and S. Warwel, *Chemo-enzymatic epoxidation of olefins by carboxylic acid esters and hydrogen peroxide*, in *Proceedings of the DGMK-Conference "Selective Oxidations in Petrochemistry"*. 1998: Hamburg. p. 233-239.
182. Rüschen Klaas, M. and S. Warwel, *Chemoenzymatic Epoxidation of Alkenes by Dimethyl Carbonate and Hydrogen Peroxide*. Organic Letters, 1999. **1**(7): p. 1025-1026.
183. Ankudey, E.G., H.F. Olivo, and T.L. Peeples, *Lipase-mediated epoxidation utilizing urea-hydrogen peroxide in ethyl acetate*. Green Chemistry, 2006. **8**(10): p. 923-926.
184. Abdulmalek, E., et al., *Optimization of Lipase-Mediated Synthesis of 1-Nonene Oxide Using Phenylacetic Acid and Hydrogen Peroxide*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. **13**(10): p. 13140-13149.
185. DIN, *Tierische und pflanzliche Fette und Öle - Bestimmung der Iodzahl (ISO 3961 : 1996) - Deutsche Fassung EN ISO 3961 : 1999*, in *DIN EN ISO 3961 : 1999-08*. 1999, Beuth Verlag GmbH: Berlin. p. 7.
186. Siebertz, K., D. van Bebber, and T. Hochkirchen, *Statistische Versuchsplanung - Design of Experiments (DoE)*. 2010, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

- 
187. Meier, M.A., J.O. Metzger, and U.S. Schubert, *Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science*. Chemical Society Reviews, 2007. **36**(11): p. 1788-1802.
  188. Lligadas, G., et al., *Plant oils as platform chemicals for polyurethane synthesis: current state-of-the-art*. Biomacromolecules, 2010. **11**(11): p. 2825-2835.
  189. Tan, C.P. and Y.B. Che Man, *Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: Comparison of thermal properties and chemical composition*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000. **77**(2): p. 143-155.
  190. Dordick, J.S., *Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents*. Enzyme and Microbial Technology, 1989. **11**(4): p. 194-211.
  191. Kim, Y.H., et al., *Enzymatic epoxidation and polymerization of cardanol obtained from a renewable resource and curing of epoxide-containing polycardanol*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007. **45**(1-2): p. 39-44.
  192. Strompen, S., *Process development of a solvent-free, chemoenzymatic reaction sequence for the enantioselective synthesis of  $\beta$ -amino acid esters*, in *Institut für Technische Biokatalyse*. 2012, Technische Universität Hamburg-Harburg.
  193. Kirk, O., et al., *Enzyme Catalyzed Degradation and Formation of Peroxycarboxylic Acids*. Biocatalysis and Biotransformation, 1994. **11**(1): p. 65-77.
  194. Du, W., et al., *Novozym 435-catalysed transesterification of crude soya bean oils for biodiesel production in a solvent-free medium*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2004. **40**(2): p. 187-190.
  195. Skouridou, V., H. Stamatis, and F.N. Kolisis, *Lipase-mediated epoxidation of  $\alpha$ -pinene*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **21**(1-2): p. 67-69.
  196. Mersmann, A., W.-D. Eickenkel, and M. Käppel, *Auslegung und Maßstabsvergrößerung von Rührapparaten*. Chemie Ingenieur Technik, 1975. **47**(23): p. 953-964.
  197. Sharma, B.K., K.M. Doll, and S.Z. Erhan, *Oxidation, friction reducing, and low temperature properties of epoxy fatty acid methyl esters*. Green Chemistry, 2007. **9**: p. 469-474.
  198. Blumenstein, M., *Untersuchung zu Polymerisationsprodukten in enzymatisch epoxidierten Pflanzenölen*, H.O. GmbH, Editor. 2014.
  199. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie*. Vol. 6. 2007: Elsevier. 1224.
  200. Tan, C.-P. and Y. Man, *Analysis of Edible Oils by Differential Scanning Calorimetry*, in *Advances in Lipid Methodology—Five* (Eds. RO Adlof) pp. 2003. p. 1-42.
  201. Man, Y.B.C. and C.P. Tan, *Comparative differential scanning calorimetric analysis of vegetable oils: II. Effects of cooling rate variation*. Phytochemical Analysis, 2002. **13**(3): p. 142-151.
  202. Tan, C. and Y. Man, *Comparative differential scanning calorimetric analysis of vegetable oils: I. Effects of heating rate variation*. Phytochemical Analysis, 2002. **13**(3): p. 129-141.

- 
203. Adhvaryu, A., S.Z. Erhan, and J.M. Perez, *Wax appearance temperatures of vegetable oils determined by differential scanning calorimetry: effect of triacylglycerol structure and its modification*. *Thermochimica Acta*, 2002. **395**(1–2): p. 191-200.
204. Guo, A., Y. Cho, and Z.S. Petrović, *Structure and properties of halogenated and nonhalogenated soy-based polyols*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2000. **38**(21): p. 3900-3910.
205. Valivety, R.H., et al., *Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991. **38**(10): p. 1137-1143.
206. Huf, S., et al., *Biotechnological synthesis of long-chain dicarboxylic acids as building blocks for polymers*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011. **113**(5): p. 548-561.
207. Warwel, S., et al., *Polymers and surfactants on the basis of renewable resources*. *Chemosphere*, 2001. **43**(1): p. 39-48.
208. Kraume, M., *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik: Grundlagen und apparative Umsetzung*. 2003, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
209. Zlokarnik, M., *Scale-up - Modellübertragung in der Verfahrenstechnik*. Vol. 2. 2005: Wiley. 295.
210. Zlokarnik, M., *Rührtechnik: Theorie und Praxis*. Vol. 1. 1999, Heidelberg: Springer.
211. Zlokarnik, M., *Stirring*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
212. Kraume, M., *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik - Grundlagen und apparative Umsetzung*. Vol. 2. 2012: Springer-Verlag. 656.
213. Kraume, M., *Mischen und Rühren: Grundlagen und moderne Verfahren*, ed. M. Kraume. 2003, Wiley Online Library: Wiley-VCH.
214. Stieß, M., *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie 1*. Vol. 3. 2009: Springer-Verlag. 504.
215. Zlokarnik, M., *Scale-Up in Chemical Engineering*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
216. Mersmann, A. and H. Großmann, *Dispergieren im flüssigen Zweiphasensystem*. *Chemie Ingenieur Technik*, 1980. **52**(8): p. 621-628.
217. Lovick, J., et al., *Drop size distribution in highly concentrated liquid-liquid dispersions using a light back scattering method*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2005. **80**(5): p. 545-552.
218. Paul, E.L., V.A. Atiemo-Obeng, and S.M. Kresta, *Handbook of industrial mixing: science and practice*. 2004: John Wiley & Sons.
219. Kraume, M., A. Gäbler, and K. Schulze, *Influence of Physical Properties on Drop Size Distribution of Stirred Liquid-Liquid Dispersions*. *Chemical Engineering & Technology*, 2004. **27**(3): p. 330-334.

- 
220. Angle, C.W. and H.A. Hamza, *Predicting the sizes of toluene-diluted heavy oil emulsions in turbulent flow Part 2: Hinze–Kolmogorov based model adapted for increased oil fractions and energy dissipation in a stirred tank*. Chemical Engineering Science, 2006. **61**(22): p. 7325-7335.
221. Pacek, A.W., et al., *The influence of impeller type on mean drop size and drop size distribution in an agitated vessel*. Chemical Engineering Science, 1999. **54**(19): p. 4211-4222.
222. Davies, G., *Mixing and coalescence phenomena in liquid–liquid systems*. Science and practice of liquid-liquid extraction, 1992. **1**: p. 245.
223. Pacek, A.W., C.C. Man, and A.W. Nienow, *On the Sauter mean diameter and size distributions in turbulent liquid/liquid dispersions in a stirred vessel*. Chemical Engineering Science, 1998. **53**(11): p. 2005-2011.
224. Shinnar, R., *On the behaviour of liquid dispersions in mixing vessels*. Journal of Fluid Mechanics, 1961. **10**(02): p. 259-275.
225. Calabrese, R.V., T.P.K. Chang, and P.T. Dang, *Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors. Part I: Effect of dispersed-phase viscosity*. AIChE Journal, 1986. **32**(4): p. 657-666.
226. Nishikawa, M., F. Mori, and S. Fujieda, *Average drop size in a liquid-liquid phase mixing vessel*. Vol. 20. 1987, Tokyo, JAPON: Society of Chemical Engineers.
227. Nishikawa, M., et al., *Scale-up of liquid-liquid phase mixing vessel*. Vol. 20. 1987, Tokyo, JAPON: Society of Chemical Engineers.
228. Wang, C.Y. and R.V. Calabrese, *Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors. Part II: Relative influence of viscosity and interfacial tension*. AIChE Journal, 1986. **32**(4): p. 667-676.
229. Calabrese, R.V., C.Y. Wang, and N.P. Bryner, *Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors. Part III: Correlations for mean size and drop size distribution*. AIChE Journal, 1986. **32**(4): p. 677-681.
230. Eckstein, A. and A. Vogelpohl, *Untersuchungen zur Tropfen-Tropfen-Koaleszenz*. Chemie Ingenieur Technik, 1999. **71**(5): p. 480-483.
231. Gäbler, A., *Experimentelle Untersuchungen, Modellierung und Simulation gerührter Flüssig-flüssig-Systeme mit veränderlichen Stoff-und Betriebsparametern*. 2007: Verlag Dr. Hut.
232. Michalski, F., *Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Tropfengrößenverteilung in gerührten flüssig/flüssig-Systemen*. 2011, Technische Universität Berlin.
233. Schwartz, F.H. and A. Haase, *Tropfengröße in geregelten Verhältnissen*. P&A - Prozesstechnik und Automation, 2004(Juni): p. 14-16.
234. Ritter, J. and M. Kraume, *Inline-Meßtechnik zur Tropfengrößenbestimmung in flüssigen Zweiphasensystemen bei hohen Dispersphasenanteilen*. Chemie Ingenieur Technik, 1999. **71**(7): p. 717-720.

- 
235. Daniels, R., *In situ-Partikelgrößenanalyse in konzentrierten Dispersionen*. 2004: BASF Skin Care Forum.
236. Helmdach, L., F. Schwartz, and J. Ulrich, *Process Control Using Advanced Particle Analyzing Systems: Applications from Crystallization to Fermentation Processes*. Chemical Engineering & Technology, 2014. **37**(2): p. 213-220.
237. DIN, *DIN 28131:1992-09 Rührer und Stromstörer für Rührbehälter*. 1992, Deutsches Institut für Normung: Berlin.
238. Mlynek, Y. and W. Resnick, *Drop sizes in an agitated liquid-liquid system*. AIChE Journal, 1972. **18**(1): p. 122-127.
239. Coualoglou, C.A. and L.L. Tavlarides, *Drop size distributions and coalescence frequencies of liquid-liquid dispersions in flow vessels*. AIChE Journal, 1976. **22**(2): p. 289-297.
240. Collias, D.I. and R.K. Prud'homme, *Diagnostic techniques of mixing effectiveness: the effect of shear and elongation in drop production in mixing tanks*. Chemical Engineering Science, 1992. **47**(6): p. 1401-1410.
241. Zhou, G. and S.M. Kresta, *Evolution of drop size distribution in liquid-liquid dispersions for various impellers\**. Chemical Engineering Science, 1998. **53**(11): p. 2099-2113.
242. Gäbler, A., et al., *Transiente Tropfengrößen- verteilungen in gerührten Flüssig/Flüssig-Dispersionen*. Chemie Ingenieur Technik, 2005. **77**(1-2): p. 80-84.
243. Pacek, A.W., A.W. Nienow, and I.P.T. Moore, *On the structure of turbulent liquid-liquid dispersed flows in an agitated vessel*. Chemical Engineering Science, 1994. **49**(20): p. 3485-3498.
244. Arai, K., et al., *EFFECT OF DISPERSED-PHASE VISCOSITY ON THE MAXIMUM STABLE DROP SIZE FOR BREAKUP IN TURBULENT FLOW*. Journal of Chemical Engineering of Japan, 1977. **10**(4): p. 325-330.
245. Barros, R.J., E. Wehtje, and P. Adlercreutz, *Mass transfer studies on immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin biocatalysts prepared by deposition for use in organic medium*. Biotechnology and Bioengineering, 1998. **59**(3): p. 364-373.
246. Murty, V.R., J. Bhat, and P.K.A. Muniswaran, *Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2002. **7**(2): p. 57-66.
247. Yadav, G.D. and K.M. Devi, *Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling*. Chemical Engineering Science, 2004. **59**(2): p. 373-383.
248. Liese, A. and L. Hilterhaus, *Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6236-6249.
249. Pinsirodom, P. and K.L. Parkin, *Lipase Assays*, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001.



- 
250. Europäisches Komitee für Normung, *Norm DIN EN ISO 3961 in Animal and vegetable fats and oils - Determination of iodine value (ISO 3961 : 1996), Deutsche Fassung DIN EN ISO 3961 : 1999*. 1999.
251. AOCS Official Method Cd 9-57, *Sampling and analysis of commercial fats and oils - Oxirane Oxygen*. 1997.
252. Hesse, M., H. Meier, and B. Zeeh, *Spectroscopic methods in organic chemistry*. Thieme foundations of organic chemistry series. 2008, Thieme, New York: Thieme Verlag. ix, 453 p.
253. Krüss. *Dichtemessung*. 2013 [cited 2013 26. November 2013]; Available from: <http://www.kruss.de/theorie/messungen/oberflaechenspannung/dichtemessung.html>.
254. Breitwieser, M. *Anwendungen: Ober- und Grenzflächenspannung - Phänomene/Begriffe*. 2014 [cited 2014 27. Februar 2014]; Available from: <http://www.imeter.de/imeter-methoden/oberflaechenspannung-und-grenzflaechenspannung/phaenomene-begriffe.html>.
255. Zerfa, M. and B.W. Brooks, *Prediction of vinyl chloride drop sizes in stabilised liquid-liquid agitated dispersion*. Chemical Engineering Science, 1996. **51**(12): p. 3223-3233.

## 8 Anhang

### 8.1 Materialien

#### 8.1.1 Verwendete Chemikalien

In Tabelle 33 sind die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien mit Angaben zu den Herstellern aufgelistet, sofern sie nicht zuvor in anderen Abschnitten aufgeführt wurden.

**Tabelle 33: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Herstellers.**

Chemikalien	Lieferant	Ort/Land
Aceton, technisch	Brenntag GmbH	Plochingen / D
Aceton (LiChrosolv)	Merck	Darmstadt / D
4-Anisaldehyd $\geq 97,5\%$	Roth	Karlsruhe / D
Bromwasserstoff 33 wt. % in Essigsäure	Sigma-Aldrich	Steinheim / D
Diethylether $>99,5\%$ , zur Synthese, stabilisiert	Roth	Karlsruhe / D
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat $> 99,5\%$ , p.A.	Roth	Karlsruhe/ D
Essigsäure $\geq 96\%$ , z.A.	Th. Geyer	Renningen / D
Glacial Acetic Acid Ph. Eur.	VWR	Leuven / BE
Gum arabic	Fluka	Buchs / CH
Kaliumsäurephthalat	Fluka Chemie	Buchs / CH
Kaliumiodid $\geq 99,5\%$ p.a.	Roth	Karlsruhe / D
Kristallviolett	Merck	Darmstadt / D
Magnesiumsulfat (wasserfrei)	Merck	Darmstadt / D
Methanol	Th. Geyer	Renningen / D
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Merck	Darmstadt / D
n-Heptan ROTISOLV® HPLC	Roth	Karlsruhe / D
Ölsäure, technical grade (90 %)	Sigma-Aldrich	Steinheim / D
Ölsäuremethylester, technical grade (70 %)	Sigma-Aldrich	Steinheim / D
Petrolether	Merck	Darmstadt / D
p-Nitrophenol	Sigma-Aldrich	Steinheim / D
p-Nitrophenyloktanoat	Sigma-Aldrich	Steinheim / D
Stärke	Sigma-Aldrich	Steinheim / D
Schwefelsäure 95 - 97 %, zur Analyse	Merck	Darmstadt / D
TLC-Silicagel 60 F254 Alufolien 20x10cm;	Merck	Darmstadt / D
Toluol, reinst	Th. Geyer	Renningen / D
Triton X100, reinst	Roth	Karlsruhe / D
Wasserstoffperoxid 30 %, Ph. Eur., stabilisiert	Roth	Karlsruhe / D
Wijs-Lösung (Iodmonochlorid in Essigsäure)	Th. Geyer	Renningen / D

## 8.1.2 Verwendete Geräte

In Tabelle 34 sind die Geräte aufgeführt, die verwendet wurden.

**Tabelle 34: Auflistung der benutzten Geräte mit Angabe des Herstellers und dem Ort/Land des Herstellers.**

Geräte	Lieferant	Ort / Land
Analysenwaage Cubis® d=0,1 mg	Sartorius	Göttingen / D
Automatic TLC Sampler 4	CAMAG	Muttenz / CH
Carousel 6 Plus Reaction Station™	Radleys	Saffron Walden/ UK
Carousel Tech Stirring Hotplate	Radleys	Saffron Walden/ UK
Carousel Temperature Controller	Radleys	Saffron Walden/ UK
Chromatogram Immersion Device III	CAMAG	Muttenz / CH
DC-Simultanentwicklungskammer	DESAGA	Wiesloch / D
Dynamisches Differenzkalorimeter DSC 200 F3 Maia®	NETZSCH	Selb / D
FT-IR-Spektrometer EQUINOX 55	Bruker Optics	Ettlingen / D
Feinwaage BP410, d = 0,01 g	Sartorius	Göttingen / D
Glasreaktor 1 L mit Heizmantel und Strombrecher; DN100	Normag	Illmenau / D
Glasreaktor 10 L mit Heizmantel und Strombrecher; DN200	KGW-Isotherm	Karlsruhe / D
Heating Bath B-491	Büchi	Essen / D
Heißluftgebläse HL 1620 S	Steinel	Herzebrock- Clarholz / D
Infinite® 200 Pro NanoQuant	Tecan	Männedorf / CH
Kieselgel Platten 60 F <sub>254</sub>	Merck	Darmstadt / D
Kompakt-Umlaufkühler F250	Julabo	Seelbach / D
Kontaktwinkelmessgerät OCA 40 (Pendant Drop Methode)	DataPhysics Instruments	Filderstadt / D
Magnetrührer lab disc [stream]	IKA	Staufen / D
Ministat 240	Huber	Offenburg / D
Multi-Thermometer	Ludwig Schneider	Wertheim / D
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra	Zizers / D
Rheometer MCR301 mit Messsystem CC17	Anton Paar	Graz / AUT
Rotationsverdampfer Rotavapor R-114	Büchi	Essen / D
Rührwerk RZR 2102 control	Heidolph Instruments	Schwabach / D
Scheibenrührer (PTFE-beschichtet) d=38 mm	Bola	Grünsfeld / D
Scheibenrührer (PTFE-beschichtet) d=75 mm	Bola	Grünsfeld / D

Schrägblattrührer (PTFE-beschichtet) d=40 mm	Bola	Grünsfeld / D
Schüttler	Infors AG	Bottmingen / CH
Sequip PAT System Messsonde zur Tropfengrößenbestimmung	Sequip S+E GmbH	Düsseldorf / D
Synthesis 1 Liquid 24 Parallelsynthesegerät	Heidolph	Kelheim / D
Tensiometer K12/HR Mk4 mit Dichtemessfunktion	Krüss	Hamburg / D
Thermodbad Haake L	Haake	Karlsruhe / D
Thermostat Haake D8	Haake	Karlsruhe / D
Tischzentrifuge, Heraeus Megafuge, 16R	Thermo Scientific	Karlsruhe / D
Tornado™ IS6 Overhead Stirring System	Radleys	Saffron Walden/ UK
Kompakt-Titrierapparat nach Pellet(25 mL, Klasse AS)	Brand	Wertheim / D
Vacuum Controller V-850	Büchi	Essen / D
Waage, 3802 MP d=0,1g	Sartorius	Göttingen / D
Wasserbad WTE var 3185 Assistent®	Karl Hecht	Sondheim / D
Wasserstrahlpumpe	Brand	Wertheim / D

## 8.2 ANOVA-Analysen zur Auswertung der statistischen Versuchspläne

In Tabelle 35 und Tabelle 36 sind die ANOVA-Analysen zur Auswertung der statistischen Versuchspläne gezeigt.

**Tabelle 35: ANOVA-Analyse zur Auswertung des statistischen Versuchsplans zur Untersuchung des Einflusses von Temperatur, Zeit, Enzym- und Lösemittelmenge bei der enzymatischen Epoxidierung von Drachenkopfl.**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	165,75	8	20,72	21,29	< 0.0001	significant
A-Enzymmenge	31,46	1	31,46	32,32	< 0.0001	
B-Temperatur	23,31	1	23,31	23,95	0.0001	
C-Zeit	17,14	1	17,14	17,61	0.0005	
D-Lösemittelmenge	55,81	1	55,81	57,34	< 0.0001	
BC	6,74	1	6,74	6,92	0.0170	
B <sup>2</sup>	10,34	1	10,34	10,62	0.0044	
C <sup>2</sup>	6,85	1	6,85	7,04	0.0162	
D <sup>2</sup>	7,02	1	7,02	7,22	0.0151	
Residual	17,52	18	0,97			
Lack of Fit	17,36	16	1,09	13,71	0.0700	not significant
Pure Error	0,16	2	0,08			
Cor Total	183,27	26				

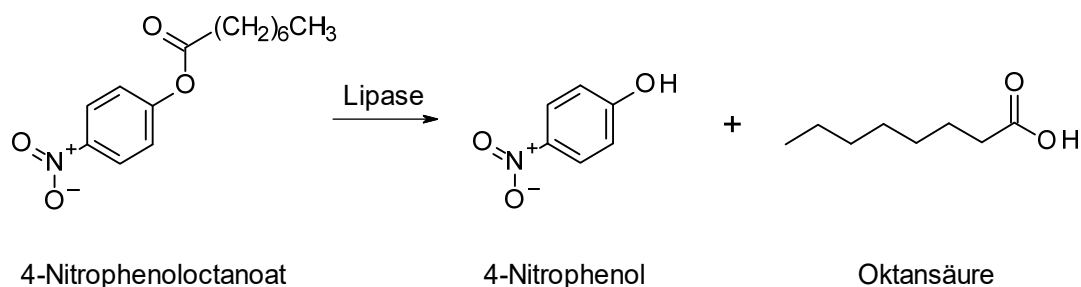
**Tabelle 36: ANOVA-Analyse zur Auswertung des statistischen Versuchsplans zur Untersuchung des Einflusses von Temperatur, Zeit, Enzym- und Lösemittelmenge bei der enzymatischen Epoxidierung von Senföl.**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	98,89	9	10,99	123,95	< 0.0001	significant
A-Enzymmenge	3,98	1	3,98	44,94	< 0.0001	
B-Temperatur	0,002	1	0,002	0,03	0.8736	
C-Zeit	4,41	1	4,41	49,70	< 0.0001	
D-Lösemittelmenge	50,59	1	50,59	570,62	< 0.0001	
AD	0,91	1	0,91	10,30	0.0068	
BC	0,63	1	0,63	7,10	0.0194	
CD	1,19	1	1,19	13,39	0.0029	
B^2	17,75	1	17,75	200,27	< 0.0001	
D^2	2,74	1	2,74	30,87	< 0.0001	
Residual	1,15	13	0,09			
Lack of Fit	1,15	11	0,11	122,69	0.0081	significant
Pure Error	0,002	2	0,0009			
Cor Total	100,05	22				

### 8.3 Analytische Methoden

#### 8.3.1 Bestimmung der Lipase-Aktivität freier und immobilisierter Lipase mittels p-Nitrophenyloktanoat-Assay

Die Lipase-Aktivitätsbestimmung erfolgte mit einem nach „Current Protocols in Food Analytical Chemistry“ [249] modifizierten Assay auf Basis der hydrolytischen Spaltung von p-Nitrophenyloktanoat (p-NPO). Das Reaktionsschema ist in Abbildung 62 dargestellt.



**Abbildung 62: Lipase-katalysierte Hydrolyse von 4-Nitrophenyloktanoat unter Freisetzung von 4-Nitrophenol.**

**Tabelle 37: Lösungen und Reagenzien zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von Lipasen.**

Lösung/Reagenz	Konzentration/Zusammensetzung
0,1 M Phosphatpuffer in VE-Wasser, pH 7 (1 L)	9,63 g L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Dihydrat 6,81 g L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Dihydrat
Puffer Detergenz Lösung (300 mL)	5 g L <sup>-1</sup> Triton X 100 + 1 g L <sup>-1</sup> Gum arabic in 0,1 M Phosphatpuffer
p-NPO-Substrat-Stammlösung	5 mM in Acetonitril
p-NP Stammlösung	5 mM in 0,1 M Phosphatpuffer
p-NP Standardlösung (0,5 mM)	2 mL p-NP Stammlösung + 2 mL Acetonitril + 16 mL Puffer Detergenzlösung

Zur Bestimmung der Aktivität nicht-immobilisierter Lipasen wurden 10 mg lyophilisierte Lipase in 10 mL 0,1 M Phosphatpuffer resolubilisiert. Die Messung der Freisetzung von p-Nitrophenol erfolgte in 96-Well-Platten durch Zugabe einer auf 37 °C vortemperierten 0,5 mM p-Nitrophenyloktanoat-Lösung in 0,1 M Puffer-Detergenz-Lösung zu 10 µL einer geeigneten Lipaseverdünnung und Bestimmung der p-Nitrophenolfreisetzung bei 405 nm in einem ebenfalls auf 37 °C temperierten UV-Reader in einem Zeitintervall von 1 min über mindestens 15 min. Die Lipaseverdünnung ist so zu wählen, dass über mehrere Minuten hinweg eine lineare Freisetzung von p-NP zu detektieren ist.

Die Aktivitätsbestimmung immobilisierter Lipasen erfolgte durch Einwaage einer geeigneten Menge in 50 mL Reaktionsgefäß. Je zu analysierender Lipase wurden drei Ansätze und eine Leerwertbestimmung ohne Enzym vermessen. Jeder Ansatz wurde mit 2 mL des 0,1 M Phosphatpuffers versetzt (siehe Tabelle 37) und auf 37 °C temperiert. Die 5 mM p-NPO-Substrat-Stammlösung (siehe Tabelle 37) und 18 mL der Puffer-Detergenz-Lösung wurden separat auf 37 °C temperiert. 2,25 mL der 5 mM p-NPO-Stammlösung wurden mit 18 mL Puffer-Detergenz-Lösung gemischt und 18 mL dieses Gemisches zum Reaktionsstart zum vortemperierten Enzym zugeben.

Die Ansätze wurden bei 400 rpm geschüttelt und nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 und 10 Minuten wurden jeweils 500 µL Probe entnommen, durch 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und bis zur Messung auf Eis gelagert. Zur Berechnung der freigesetzten p-Nitrophenolmenge wurde eine Kalibriergerade mit p-Nitrophenol im Bereich von 0 bis 0,5 mM aufgenommen.

Zur Messung der Extinktion wurden jeweils 100 µL der Proben (Proben der Kalibriergeraden, der Ansätze mit Enzym und des Leerwertes) auf eine 96-Well Platte in Doppelbestimmung aufgetragen. Die Extinktion wurde mit dem Nano Quant infinite M200 Pro (Tecan) bei 405 nm und der Tecan-Software i-control (Version 1.8) gemessen.

Um die Kalibriergerade darzustellen, wurde die Extinktion bei 405 nm in einem Schaubild über der p-NP Konzentration aufgetragen. Über die Steigung und den y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden wurde mittels Formel 23 die p-NP Konzentration der Proben für jeden Zeitpunkt berechnet und als Funktion der Zeit dargestellt.

$$c_{p\text{-NP}, t} = \frac{E_{405, \text{Probe}, t} - b_{\text{Kalibriergerade}}}{m_{\text{Kalibriergerade}}} \quad \text{Formel 23}$$

$c_{p\text{-NP}, t}$	p-Nitrophenol Konzentration zum Zeitpunkt t, in Mikromol pro Milliliter
$E_{405, \text{Probe}, t}$	Extinktion der Probe bei 405 nm zum Zeitpunkt t
$b_{\text{Kalibriergerade}}$	y-Achsenabschnitt der p-Nitrophenol Kalibriergerade
$m_{\text{Kalibriergerade}}$	Steigung der p-Nitrophenol Kalibriergerade, in 1 pro Millimol

Die Steigung des linearen Bereichs abzüglich der Steigung des Leerwertes ergab den Anstieg der p-NP-Konzentration mit der Zeit, welcher im Folgenden mit  $v_0$  bezeichnet wird. Mit  $v_0$ , der Masse der eingewogenen Lipase und dem Reaktionsvolumen wurde die spezifische Aktivität des Enzyms entsprechend Formel 24 berechnet. Die spezifische Lipaseaktivität gibt an, wie viel Mikromol p-NP aus p-NPO pro Milligramm Lipase und Minute freigesetzt werden.

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{v_0 \cdot V_{\text{Reaktion}}}{m_{\text{Enzym}}} \quad \text{Formel 24}$$

spezifische Aktivität	Lipaseaktivität bezogen auf die Einwaage der Lipase, in Unit pro Milligramm
$v_0$	Anstieg der p-Nitrophenolkonzentration mit der Zeit im Linearen Bereich, abzüglich der Steigung des Blanks, in Mikromol pro Milliliter und Minute
$V_{\text{Reaktion}}$	Reaktionsvolumen im Heidolph Glasgefäß, in Milliliter
$m_{\text{Enzym}}$	Masse des Enzyms, in Milligramm

### 8.3.2 Dünnschichtchromatographie

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) kann der zeitliche Verlauf der Epoxidierung verschiedener Pflanzenöl-basierter Substrate qualitativ verfolgt werden.

Die mobile Phase besteht aus n-Heptan, Diethylether und 96 % Essigsäure (siehe Tabelle 38). Das Detektionsmittel besteht aus 96-prozentige Essigsäure, 96-prozentiger Schwefelsäure, 4-Anisaldehyd und vollentsalztes Wasser (siehe Tabelle 38).

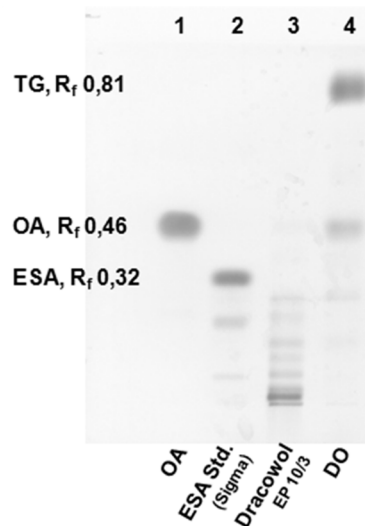
**Tabelle 38: Zusammensetzung der mobilen Phase und des Detektionsmittels zur Untersuchung der Epoxidierung Pflanzenöl-basierter Edukte.**

Lösung	Menge (mL)	Substanzen
Mobile Phase	50	n-Heptan
	50	Diethylether
	1	96 % Essigsäure
Detektionsmittel	100	96 % Essigsäure
	3	96 % Schwefelsäure
	1	4-Anisaldehyd
	98	VE-Wasser

Die Probenverdünnung freier Fettsäuren und freier Dicarbonsäuren erfolgte mit Methanol. Pflanzliche Ölen und Fettsäuremethylester wurden mit Aceton verdünnt. Die Probenauftragung erfolgte mit einem automatischen Probenauftragungsgerät (Camag Automatic TLC Sampler 4) in Kombination mit der Software WinCat. Es wurden jeweils 2 µL der verdünnten Proben und der verdünnten Referenzsubstanz auf die Kieselgelplatte aufgetragen. Die Kieselgelplatten wurden in einer gesättigten DC-Simultanentwicklungskammer (CAMAG) bis 1,5 cm unterhalb des oberen Plattenrandes entwickelt und nach der Entnahme im Abzug getrocknet.

Die entwickelten und getrockneten Platten wurde mit Hilfe einer automatischen Tauchvorrichtung in das Detektionsmittel getaucht. Die oberflächentrockenen Platten wurden zur Detektion der Banden mit dem Heißluftfön erhitzt. Das entstehende Bandenmuster kann durch einen Vergleich mit entsprechenden Referenzsubstanzen und durch Berechnung der Retentionsfaktoren ( $R_f$ -Werte) zur qualitativen Bewertung der enzymatischen Epoxidierung herangezogen werden. Der  $R_f$ -Wert gibt das Verhältnis der Strecke zwischen Auftragungspunkt und Substanz zu der Strecke zwischen Auftragungspunkt und Laufmittelfront an. In Abbildung 63 ist ein Dünnschichtchromatogramm von Ölsäure, Epoxystearinsäure, epoxidiertem Leinsamenöl und Drachenkopfföl dargestellt. Die Ölsäure hat im Vergleich zu Epoxystearinsäure einen größeren  $R_f$ -Wert, weil Epoxystearinsäure aufgrund der polaren Struktur der Epoxidgruppe stärker mit der stationären Phase in Wechselwirkung tritt und eine reduzierte Löslichkeit in der mobilen Phase aufweist, wodurch sie insgesamt weniger schnell mit dem Laufmittel wandert. Entsprechendes gilt für epoxidiertes Leinsamenöl mit einem erhöhten Anteil polarer funktioneller Gruppen im Vergleich zum unpolaren nicht funktionalisierten Triglyzerid beim Drachenkopfföl (vergleiche Abbildung 63).





**Abbildung 63:** Beispielhafte Darstellung einer entwickelten und gefärbten Dünnschichtchromatographie-Platte.

Aufgetragen sind, in entsprechender Reihenfolge, Ölsäure (OA), Epoxystearinsäure (ESA Standard Sigma), chemisch epoxidiertes Leinsamenöl (Dracowol EP 10/3), Drachenkopfföl (DO) mit einer geringen Menge Ölsäure. Die Retentionsfaktoren für das Drachenkopffriglycerid (TG), Ölsäure (OA) und Epoxystearinsäure (ESA) sind dargestellt.

### 8.3.3 Titrimetrische Bestimmung der Jodzahl

Die Jodzahl (JZ) ist eine Maßzahl für den ungesättigten Charakter eines Öls oder Fettes. Sie wird durch DIN EN ISO 3961: 1999 als die Masse an Jod definiert, die an 100 g der Prüfmenge addiert werden kann. Die Jodzahl-Bestimmung erfolgte in modifizierter Form nach DIN EN ISO 3961: 1999 [250]. Die Mengenangaben wurden entsprechend halbiert.

Die Auswahl der Prüfmengen erfolgt auf Basis der zu erwartenden Jodzahl. Die Proben wurden mit 5 mL Eisessig und 5 mL Petrolether gelöst und jeweils 12,5 mL Wijs-Lösung hinzugefügt. Proben, für die eine JZ unter 150 zu erwarten war, wurden für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Inkubationszeit bei Prüfsubstanzen mit einer erwarteten JZ über 150 betrug 2 h (siehe [250]). Nach Zugabe von 10 mL einer 100 g L<sup>-1</sup> Kaliumiodidlösung und 75 mL vollentsalztes Wasser hinzugegeben. Die Proben und entsprechende Referenzansätze wurden mit 0,1 M Natriumthiosulfat-Standardlösung unter Schütteln titriert, bis die durch das Jod entstandene Gelbfärbung fast verschwunden war. Daraufhin wurden 500 µL einer 5 g L<sup>-1</sup> Stärkelösung zugegeben und bis zum Verschwinden der Blaufärbung weiter titriert.

Die Jodzahl der jeweiligen Probe wurde durch Einsetzen der zur Titration von Probe und Blank benötigten Volumina, der Konzentration der Natriumthiosulfatlösung und der Masse der Prüfmenge in Formel 25 errechnet.

$$JZ = \frac{12,69 \times c \times (V_{\text{Blank}} - V_{\text{Probe}})}{m_{\text{Probe}}} \quad \text{Formel 25}$$

JZ	Jodzahl, in Gramm Jod pro 100 g Prüfmenge
c	Konzentration der Natriumthiosulfatlösung, in Mol pro Liter
V <sub>Blank</sub>	Volumen der für den Referenzansatz verbrauchten Natriumthiosulfatlösung, in Milliliter
V <sub>Probe</sub>	Volumen der für die Bestimmung verbrauchten Natriumthiosulfatlösung, in Milliliter
m <sub>Probe</sub>	Masse der Prüfmenge, in Gramm

Auf Basis der experimentell bestimmten Jodzahl kann nach Formel 26 der maximal mögliche Epoxidsauerstoffgehalt für das jeweilige Substrat berechnet werden [13].

$$OO_{\text{th.}} = \left( \frac{JZ_0 / 2 \times A_i}{100 + (JZ_0 / 2 \times A_i) \times A_O} \right) \times A_O \times 100 \quad \text{Formel 26}$$

Hierbei ist JZ<sub>0</sub> die Jodzahl des Pflanzenöl-basierten Edukts, A<sub>i</sub> die Atommasse von Jod (126,9) und A<sub>O</sub> die Atommasse von Sauerstoff.

#### 8.3.4 Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Triglyzeriden und der Umsetzung von Ölsäure zu Epoxystearinsäure mittels GC-FID

Die gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung unterschiedlicher Öle und der Umsetzung von Ölsäure wurde auf einer Agilent 7890A GC mit Agilent GC Injector 120 und Flammenionisationsdetektor (Detektortemperatur 300 °C) von der Arbeitsgruppe „Chemische Analytik“ am Fraunhofer IGB durchgeführt. Als Trennsäule wurde eine Agilent HP-5 Kolonne ((5% Phenyl)-methylpolysiloxane) mit 30 m x 320 µm x 0,25 µm eingesetzt. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet: 160 °C für 2 min, 15 °C min<sup>-1</sup> bis 190 °C (1 min, isotherm), 2 °C min<sup>-1</sup> bis 216 °C und 25 °C min<sup>-1</sup> bis 310 °C (5 min, isotherm), die Gesamtlaufzeit pro Probe lag bei 26,76 min. Das Trägergas war Helium mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 mL min<sup>-1</sup>. Das Injektionsvolumen betrug 1 µL bei einer Injektortemperatur von 280 °C und einem Splitverhältnis von 25:1. Die Identität der Produkte wurde durch Vergleich mit authentischen Proben festgestellt.

Ölsäure konnte basierend auf der in Abbildung 66 dargestellten Kalibriergeraden in einem Konzentrationsbereich von 16,0 bis 1000 mg L<sup>-1</sup> gemessen werden. Für Epoxystearinsäure lag der lineare Bereich zwischen 105,6 und 860 mg L<sup>-1</sup>. Einzelne Proben wurden entsprechend diesem quantifizierbaren Bereich mit Methanol verdünnt.

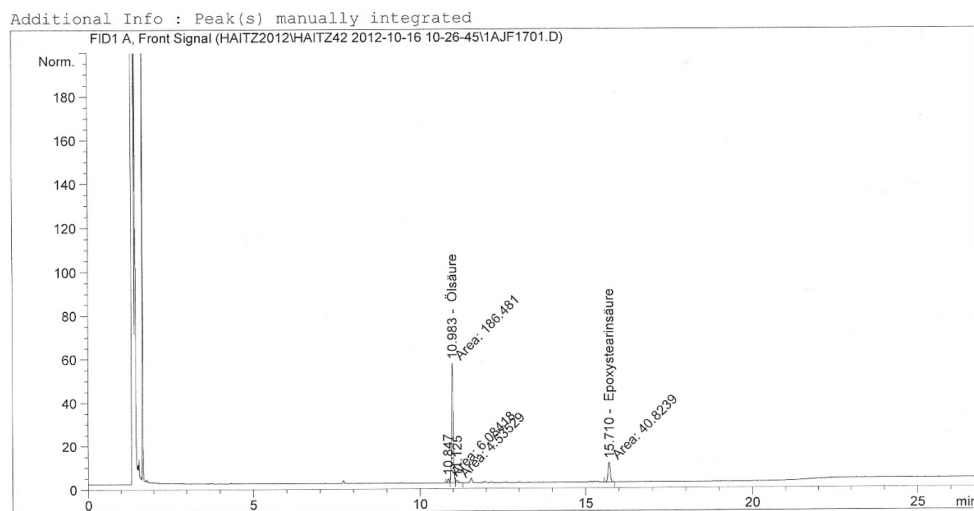
Die mittels Gaschromatographie ermittelten Konzentrationen der Ölsäure (OA) und Epoxystearinsäure (ESA) wurden zur graphischen Darstellung in prozentuale Umsätze und Ausbeuten umgerechnet (vergleiche Formel 27 und Formel 28). Der Ölsäureumsatz

errechnete sich aus der Differenz der Ölsäurekonzentration zu Beginn und der Ölsäurekonzentration zum jeweiligen Zeitpunkt geteilt durch die Anfangskonzentration. Angegeben wurde der Umsatz in Prozent. Das Verhältnis der ESA-Konzentration zum jeweiligen Zeitpunkt zur maximalen ESA Konzentration entspricht der Ausbeute.

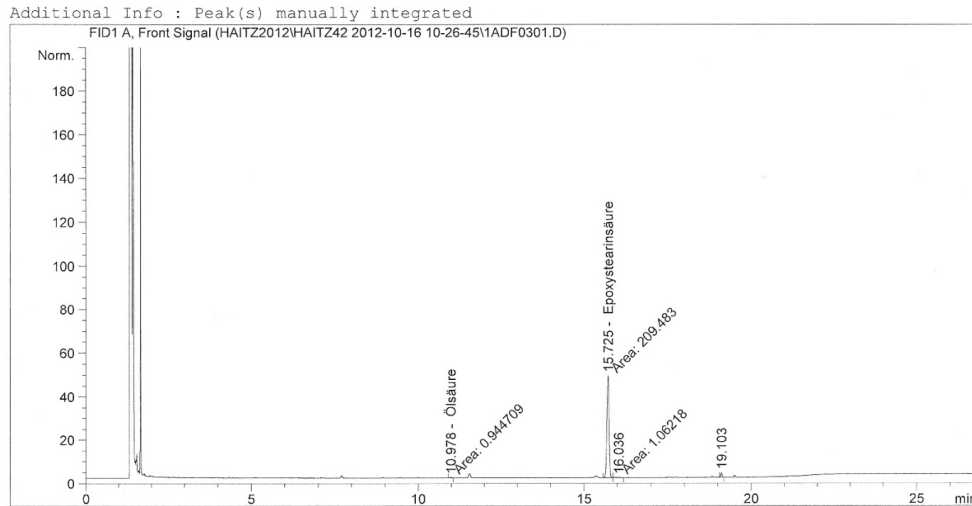
$$X(OA) = \frac{C_{0, OA} - C_{t, OA}}{C_{0, OA}} \quad \text{Formel 27}$$

$$Y(ESA) = \frac{M_{OA} * C_{t, ESA}}{C_{0, OA} M_{ESA}} \quad \text{Formel 28}$$

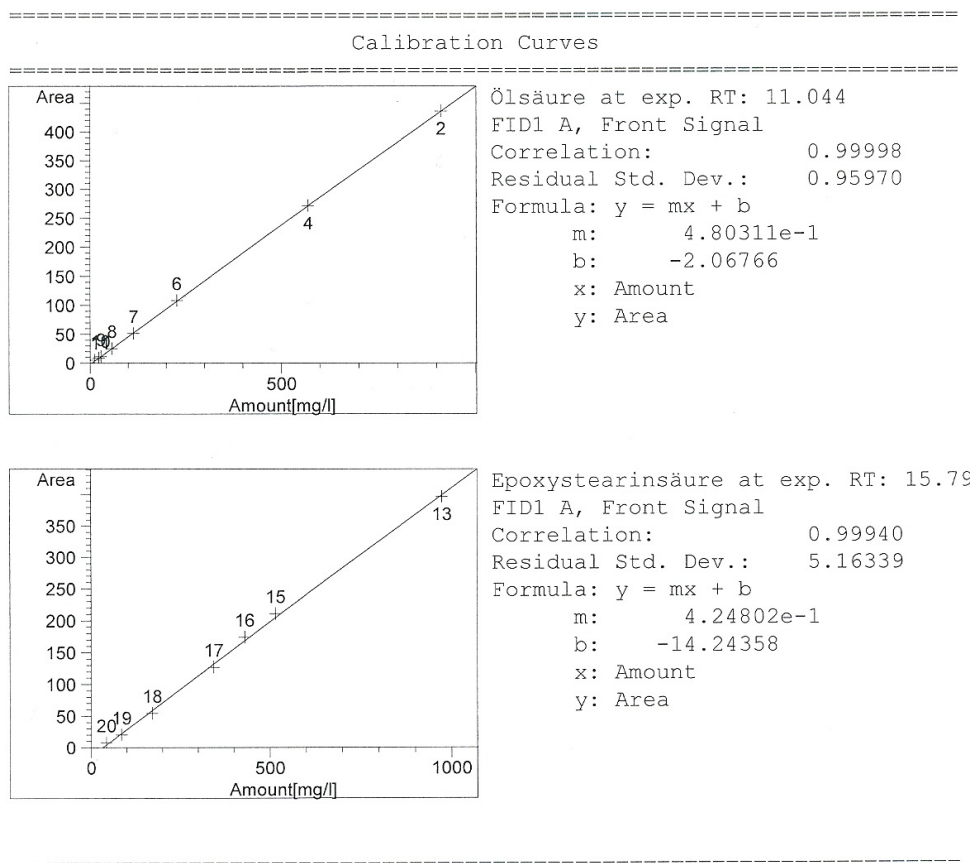
$X(OA)$	Ölsäureumsatz in Prozent
$Y(ESA)$	Epoxystearinsäureausbeute in Prozent
$C_{0, OA}$	Anfangskonzentration der Ölsäure in Gramm pro Liter
$C_{t, OA/ESA}$	Konzentration der Ölsäure/ Epoxystearinsäure zum Zeitpunkt t in Gramm pro Liter
$M_{OA/ESA}$	Molare Masse der Ölsäure/ Epoxystearinsäure in Gramm pro Mol



**Abbildung 64: Beispielchromatogramm zur Bestimmung der Ölsäure- und Epoxystearinsäurekonzentration für eine Probe des Stabilitätstests. Die Probe wurde dem ersten Ansatz der Epoxidierung mittels CalB auf Immobead 150 nach dem 7. Reaktionszyklus bei 50 °C entnommen.**



**Abbildung 65: Chromatogramm des Stabilitätstests zur Bestimmung der Ölsäure- und Epoxystearinsäurekonzentration mittels GC-FID. Die untersuchte Probe entstammt der Epoxidierung mittels CalB auf Immobead 150 nach dem 1. Reaktionszyklus bei 50 °C.**



**Abbildung 66: Kalibriergeraden zur Ermittlung der Ölsäure- und Epoxystearinsäurekonzentration durch Gaschromatographie-FID.**

### 8.3.5 Titrimetrische Bestimmung des Epoxidsauerstoffs

Der Epoxidsauerstoffgehalt wurde nach der offiziellen Methode Cd 9-57 der American Oil Chemists' Society durch direkte Titration mit Bromwasserstoff bestimmt und gibt den Gewichtsanteil des in Epoxidgruppen gebundenen Sauerstoff einer Prüfmenge an [251].

Die eingesetzten Reagenzien sind in Tabelle 39 aufgeführt. Zur Herstellung der 0,1 M HBr-Lösung wurden 6,13 g 33-prozentigen Bromwasserstofflösung in einen Messkolben mit 200 mL vorgelegtem Eisessig eingewogen und anschließend zu 250 mL aufgefüllt (vergleiche Tabelle 39).

**Tabelle 39: Zusammensetzung und Konzentration der Stammlösungen zur Bestimmung des Epoxidsauerstoffes.**

Lösung	Menge/ Konzentration/ Zusammensetzung
Bromwasserstoff-Lösung in Eisessig	0,1 M = 24,52 g HBr L <sup>-1</sup>
Kristallviolett in Eisessig	0,1 g in 100 mL = 1 g L <sup>-1</sup>

Zur Standardisierung der 0,1 M Bromwasserstofflösung wurden 0,4 g Kaliumsäurephthalat in ein 50 mL Reaktionsgefäß eingewogen, unter Erwärmen in 10 mL Eisessig gelöst, 0,1 mL Kristallviolettlösung zugegeben und mit Bromwasserstofflösung bis zu einem Farbumschlag von violett zu blaugrün titriert. Die Normalität der Bromwasserstofflösung wurde nach Formel 29 berechnet [251].

$$N = \frac{m_{\text{Kaliumsäurephthalat}}}{204,2 \times V_{\text{HBr}}} \quad \text{Formel 29}$$

N Normalität der Bromwasserstofflösung, in Gramm pro Liter

$m_{\text{Kaliumsäurephthalat}}$  Masse des verwendeten Kaliumsäurephthalat, in Gramm

$V_{\text{HBr}}$  Volumen der titrierten Bromwasserstofflösung, in Liter

Zur Epoxidsauerstoffbestimmung wurden 0,3 bis 0,5 g Probe in einen 50 mL Erlenmeyerkolben mit Schliff eingewogen, in 10 mL Aceton gelöst, mit 100  $\mu\text{L}$  Kristallviolettindikatorlösung versetzt und mit einer geschlossenen Titrationsapparatur mit standardisierter 0,1 M Bromwasserstofflösung bis zum blaugrünen Farbumschlag titriert. Die Berechnung des Epoxidsauerstoffgehaltes erfolgte gemäß Formel 30.

$$OO_{\text{exp.}} = \frac{1,60 \times V_{\text{HBr}} \times N}{m} \quad \text{Formel 30}$$

$OO_{\text{exp.}}$	Oxiran Sauerstoff, in Prozent
$V_{\text{HBr}}$	Volumen der titrierten Bromwasserstofflösung, in Liter
$N$	Normalität der Bromwasserstofflösung, in Gramm pro Liter, entspricht in diesem Fall der Molarität
$m$	Masse der Prüfmenge, in Gramm

Auf Basis des theoretisch maximal möglichen Epoxidsauerstoffgehaltes ( $OO_{\text{th.}}$ ) kann unter Kenntnis des experimentell bestimmten Epoxidsauerstoffgehaltes einer Probe ( $OO_{\text{exp.}}$ ) eine relative Ausbeute an Epoxid ( $Y_{\text{C=C,rel.}}$ ) nach Formel 31 berechnet werden.

$$X_{\text{C=C,rel.}} = \frac{OO_{\text{exp.}}}{OO_{\text{th.}}} \times 100 \quad \text{Formel 31}$$

### 8.3.6 Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie

Zur qualitativen Untersuchung der Umsetzung Pflanzenöl-basierte Edukte wurde die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) eingesetzt. Mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie können Molekülschwingungen und -rotationen durch die Absorption von Strahlung im infraroten Bereich angeregt werden, die entsprechend der zur Anregung nötigen Wellenzahl funktionellen Gruppen organischer Moleküle zugeordnet werden können [252].

Die Aufnahme von FT-IR-Spektren erfolgte mit einem EQUINOX 55 Spektrometer (Bruker) mit einer SensIR Diamant ATR Einheit in einem Wellenzahl-Bereich von 4000 bis 400  $\text{cm}^{-1}$ . Die Probemenge lag je Messung bei etwa 10  $\mu\text{L}$ . Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software OPUS.

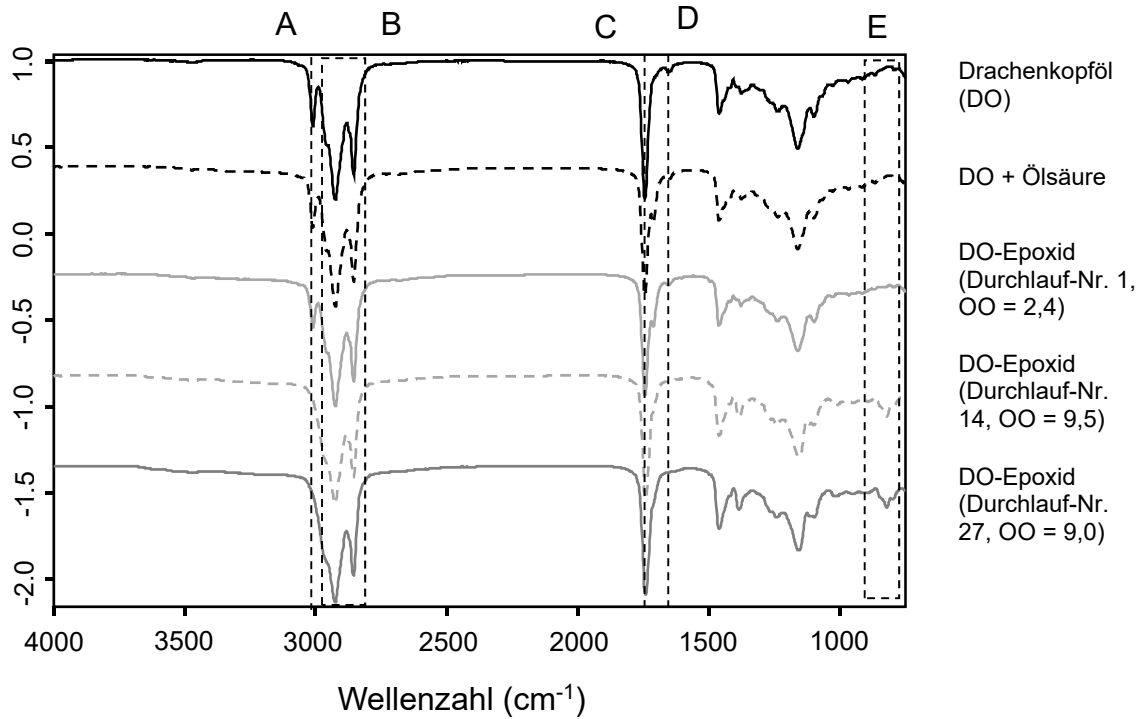


Abbildung 67: FT-IR-Spektren zu nativem Drachenkopföl und verschiedenen Drachenkopfölepoxidchargen mit unterschiedlichem Epoxidsauerstoffgehalt (OO). Die Durchlaufnummer entspricht dem jeweiligen Ansatz aus der Durchführung des statistischen Versuchsplans (siehe Tabelle 17).

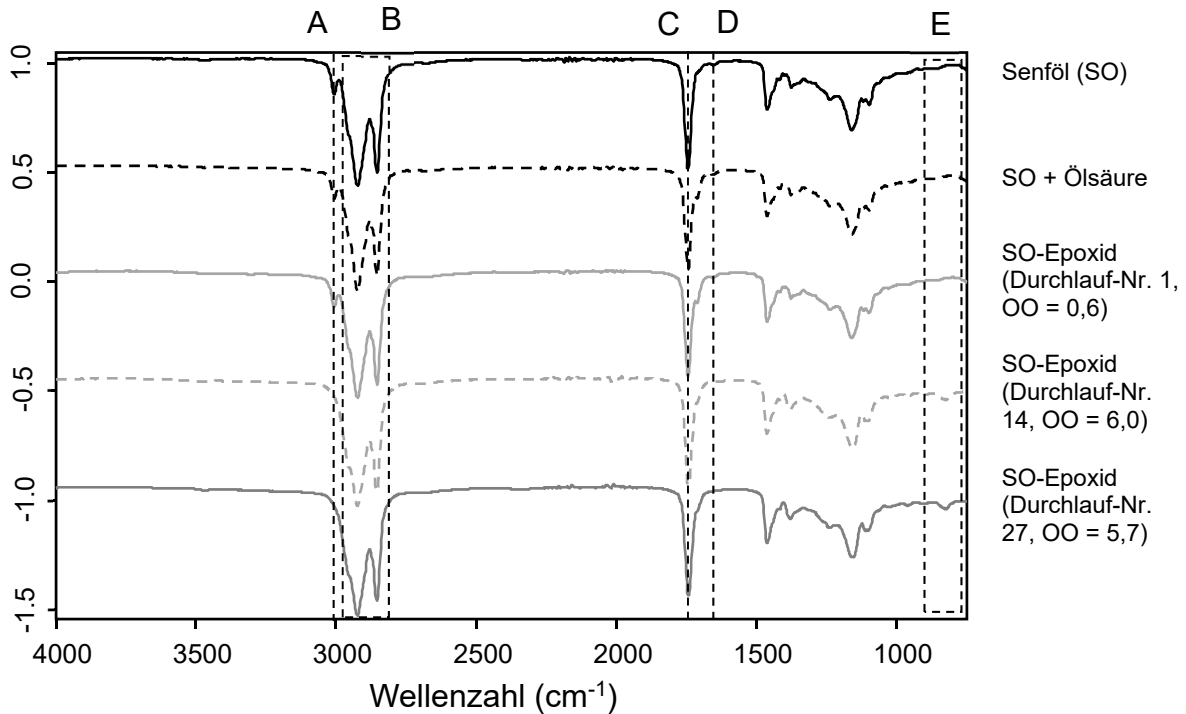


Abbildung 68: FT-IR-Spektren zu nativem Senföl und verschiedenen Senfölepoxidchargen mit unterschiedlichem Epoxidsauerstoffgehalt (OO). Die Durchlaufnummer entspricht dem jeweiligen Ansatz aus der Durchführung des statistischen Versuchsplans (siehe Tabelle 17).

A	3040 – 3010 cm <sup>-1</sup>	ungesättigte (C-H)-Valenzschwingung der CH <sub>2</sub> -Gruppen
B	2960 – 2859 cm <sup>-1</sup>	gesättigte (C-H)-Valenzschwingung
C	1750 – 1735 cm <sup>-1</sup>	(C=O)-Valenzschwingung
D	1680 – 1620 cm <sup>-1</sup>	(C=C)-Valenzschwingung
E	900 – 800 cm <sup>-1</sup>	(C-O)-Valenzschwingung

### 8.3.7 Dichtebestimmung der Fluide

Die Dichten unterschiedlicher Proben wurden in Zusammenarbeit mit Veronika Schönhaar (Fraunhofer IGB, Abteilung Grenzflächentechnologie und Materialwissenschaften) mit einem Multi-Tensiometer K12/HR Mk4 der Firma Krüss GmbH und entsprechender Dichtemessfunktion auf dem Prinzip der Auftriebskraft ermittelt. Die Dichte der zu bestimmenden Flüssigkeit kann mit Formel 32 nach Kenntnis der Dichte des Messkörpers, der Gewichtskraft des Messkörpers in Luft und der Gewichtskraft des Messkörpers in der Flüssigkeit berechnet werden [253]. Gemessen wurde die Dichte von Drachenkopföl, mit Ölsäure gemischtem Drachenkopföl, reinem Toluol, Ölsäure, Ölsäuremethylester und Wasserstoffperoxid (30 %), sowie von verschiedenen Drachenkopföl-Ölsäure-Toluol-Gemischen mit verschiedenen Massenanteilen an Toluol (20, 40, 60, 80 Gew.-%). Die mittlere Temperatur bei allen Messungen betrug 30 °C.

$$\rho_L = \rho_{MK} * \frac{G_{MKA} - G_{MKL}}{G_{MKA}} \quad \text{Formel 32}$$

$\rho_L$ :	Dichte der Flüssigkeit in kg m <sup>-3</sup>
$\rho_{MK}$ :	Dichte des Messkörpers in kg m <sup>-3</sup>
$G_{MKA}$ :	Gewichtskraft des Messkörpers in Luft in N
$G_{MKL}$ :	Gewichtskraft des Messkörpers in der Flüssigkeit in N

### 8.3.8 Rheologische Charakterisierung mittels Rotationsviskosimeter

Die Viskosität der von mit Ölsäure versetzten Pflanzenöl sowie der daraus enzymatisch hergestellten Epoxide wurde mit einem Rheometer MCR 301 Zylindermesssystem CC17 bestimmt. Dazu wurden 5 mL der jeweiligen Probe in den Messzylinder überführt und auf 30°C temperiert.

Zuerst wurde für jede Probe das Fließverhalten mit Hilfe einer logarithmischen Rampe mit zunehmender Scherrate von 0,1 s<sup>-1</sup> bis 1000 s<sup>-1</sup> bestimmt. Für die jeweilige Scherrate wurde die Schubspannung gemessen. Anhand des Fließverhaltens kann zwischen newtonschem und nicht-newtonschem Fließverhalten unterschieden werden. Newtonsches Fließverhalten ist durch eine proportionale Änderung der Schubspannung in Abhängigkeit von der Scherrate gekennzeichnet. Der konstante Proportionalitätsfaktor zwischen beiden Größen entspricht der



Viskosität. Nach der Aufnahme der Fließkurve wurde die Viskosität der nativen und epoxidierten Öle aufgrund des durchweg newtonschen Fließverhaltens in einer weiteren Messung bei konstanter Scherrate von  $60 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Die Proben wurden dazu auf  $30 \text{ °C}$  temperiert und anschließend die Viskosität über 2 Minuten in einem Intervall von 6 s bei einer Scherrate von  $60 \text{ s}^{-1}$  gemessen.

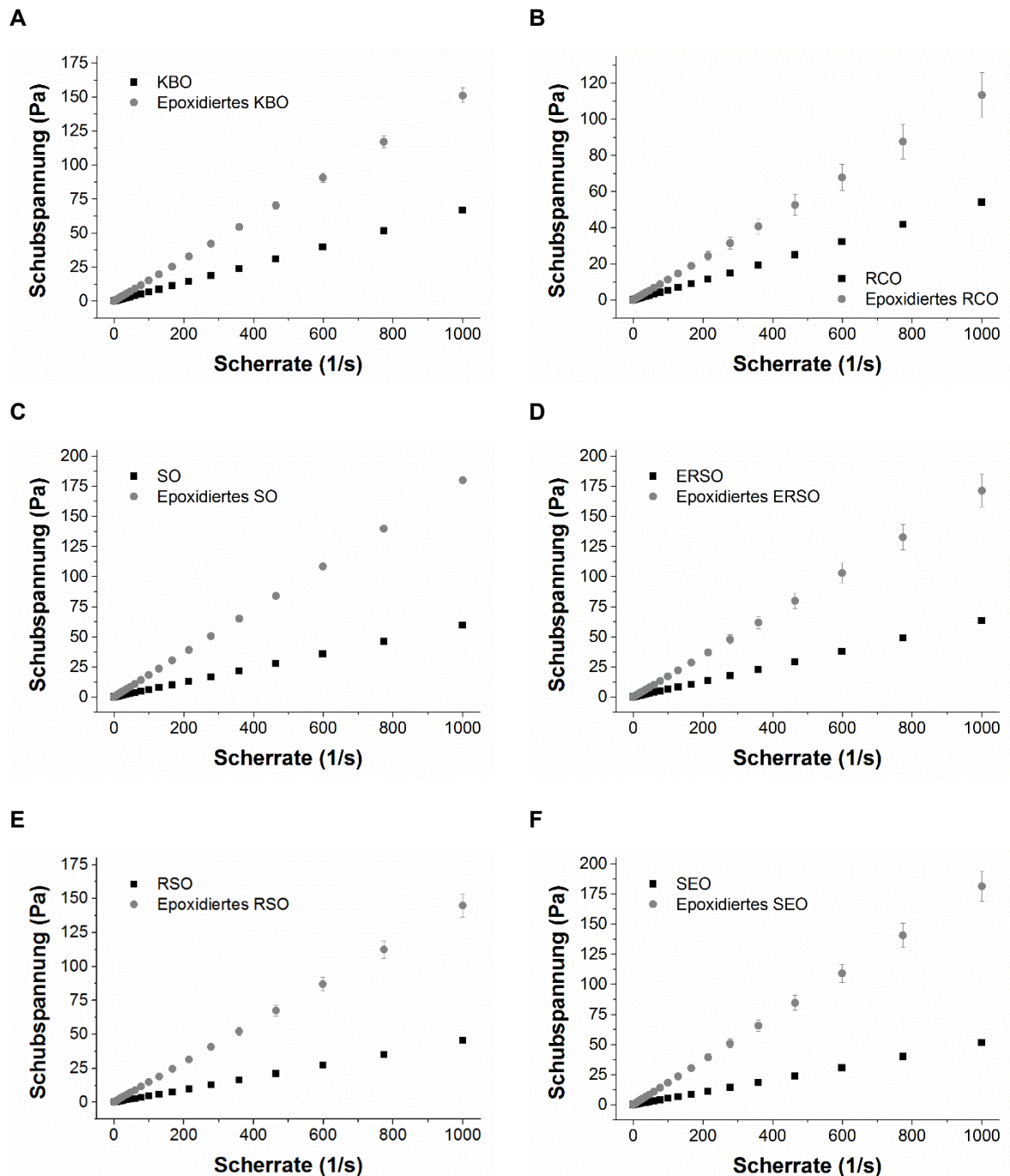
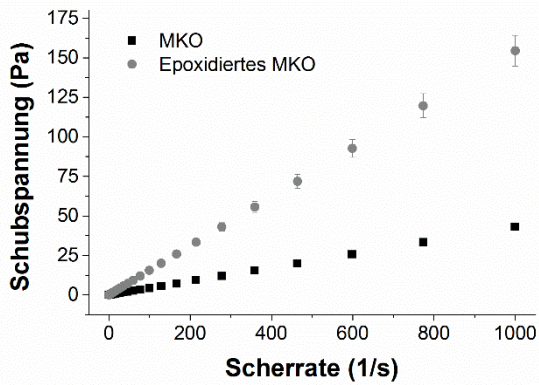
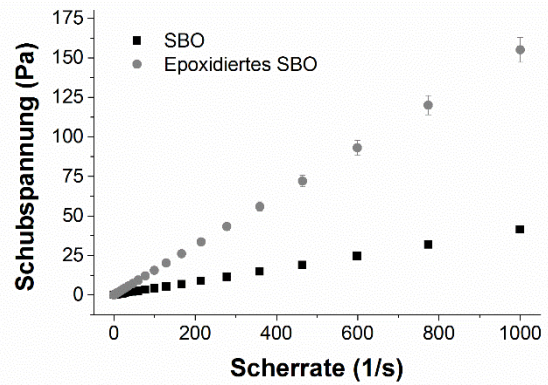


Abbildung 69: Fließkurven für native (schwarz) und epoxidierte Pflanzenöle (grau). Gezeigt sind die Fließkurven von (A) Krambeöl - KBO, (B) Reisöl - RCO, (C) Senföl - SO, (D) Erucarapsöl - ERSO, (E) Rapsöl - RSO und (F) Sesamöl - SEO.

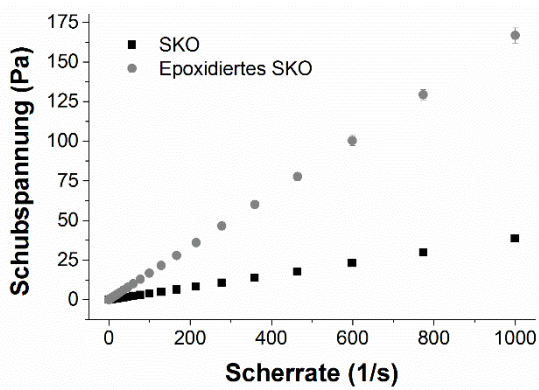
G



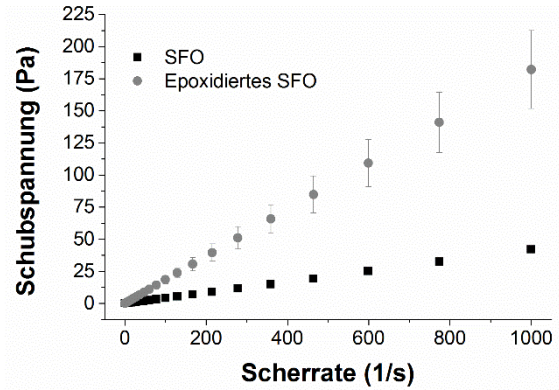
H



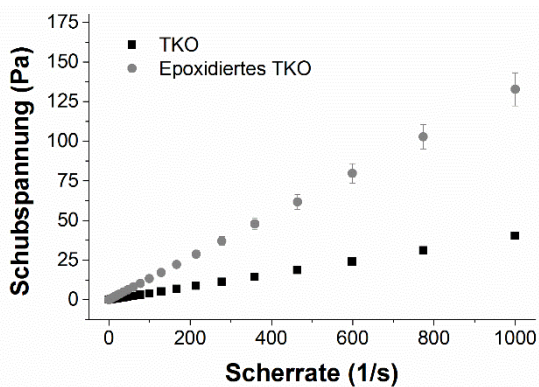
I



J



K



L

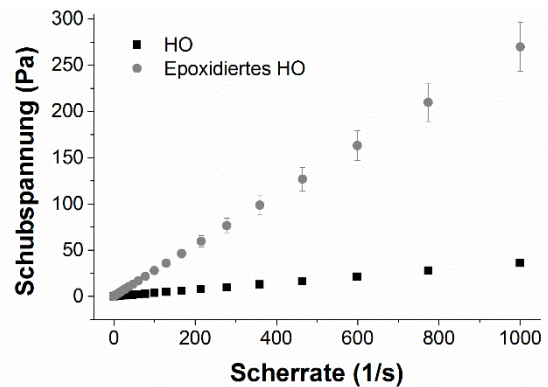
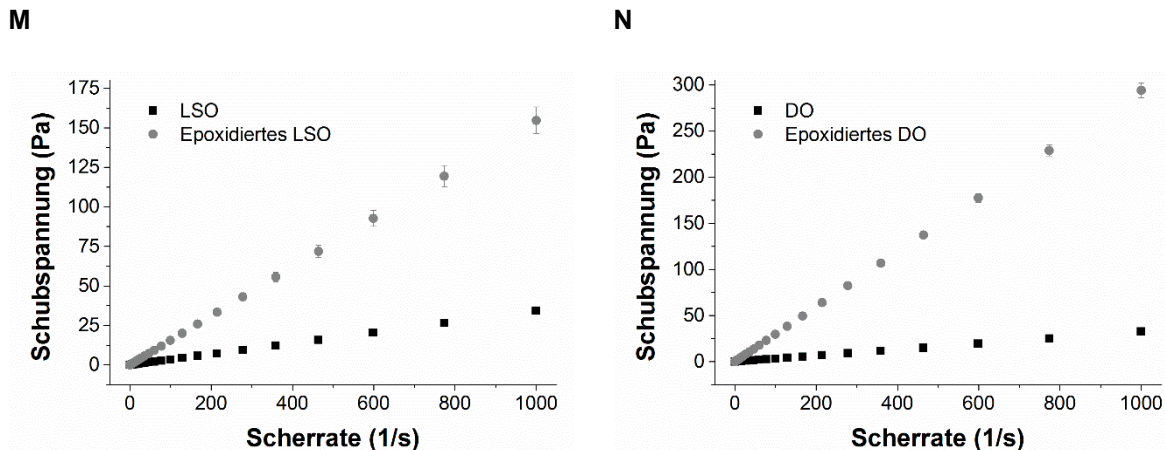


Abbildung 70: Fließkurven für native (schwarz) und epoxidierte Pflanzenöle (grau) - Fortsetzung von Abbildung 69. Gezeigt sind die Fließkurven von (G) Maiskeimöl - MKO, (H) Sojaöl - SBO, (I) Schwarzkümmelöl - SKO, (J) Sonnenblumenöl - SFO, (K) Traubenkernöl - TKO und (L) Holunderkernöl - HO.



**Abbildung 71: Fließkurven für native (schwarz) und epoxidierte Pflanzenöle (grau) - Fortsetzung von Abbildung 70. Gezeigt sind die Fließkurven von (M) Leinsamenöl - LSO und (N) Drachenkopfföl - DO.**

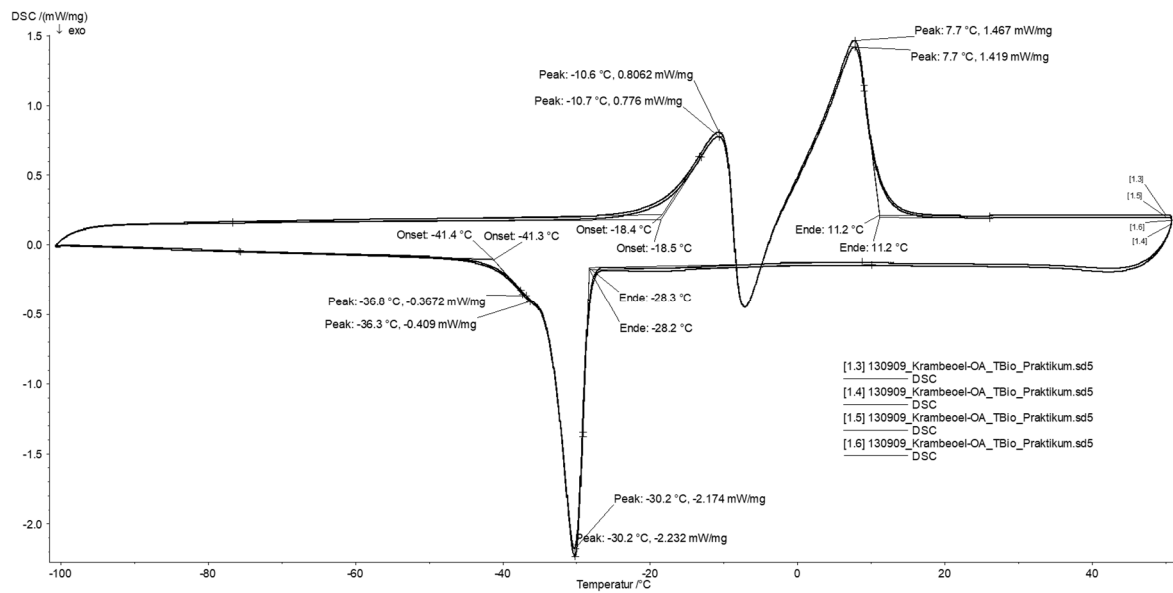
### 8.3.9 Untersuchung des Schmelz- und Kristallisationsverhaltens mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (DDK)

Die dynamische Differenzkalorimetrie DDK wurde zur Untersuchung der Phasenübergänge beim Aufheizen und Abkühlen verschiedener nativer und epoxidierter Pflanzenöle eingesetzt. Zur Messung wurde ein Dynamisches Differenzkalorimeter DSC 200 F3 Maia® der Firma Netzsch eingesetzt. Die Phasenübergänge wurden in einem Temperaturbereich von  $-100\text{ °C}$  bis  $+50\text{ °C}$  bestimmt. Die Aufheiz- und Abkühlrate wurde auf  $10\text{ °C min}^{-1}$  festgelegt. Zum Vergleich des Schmelz- und Kristallisationsverhaltens verschiedener nativer und epoxidierter Pflanzenöle wurden Temperaturonset, Temperaturoffset, Temperaturbereich und Umwandlungstemperaturen gemäß Tan und Che Man mit Hilfe der Software *Proteus Analysis* ermittelt [189, 201, 202]. In Abschnitt 4.4.2.5 (Abbildung 31 bis Abbildung 33) wurden DSC-Thermogramme beispielhaft für Drachenkopf-, Soja-, Senföl und die daraus chemoenzymatisch hergestellten Epoxide dargestellt. Nachfolgend werden die DSC-Thermogramme für folgende untersuchten Pflanzenöle und Pflanzenölepoxide aufgeführt.

- Krambeöl/-epoxid (KBO/KBOE)
- Reisöl/-epoxid (RCO/RCOE)
- Erucarapsöl/-epoxid (ERSO/ERSOE)
- Rapsöl/-epoxid (RSO/RSOE)
- Sesamöl/-epoxid (SEO/SEOE)
- Maiskeimöl/-epoxid (MKO/MKOE)
- Schwarzkümmelöl/-epoxid (SKO/SKOE)
- Sonnenblumenöl/-epoxid (SFO/SFOE)
- Traubenkernöl/-epoxid (TKO/TKOE)
- Safloröl/-epoxid (SAO/SAOE)
- Holunderkernöl/-epoxid (HO/HOE)
- Leinsamenöl/-epoxid (LSO/LSOE)

Die DSC-Analyse erfolgte jeweils für zwei unabhängige Proben. Die DSC-Thermogramme zu den oben aufgeführten Pflanzenölen sind in Abbildung 72 bis Abbildung 83 dargestellt.

A



B

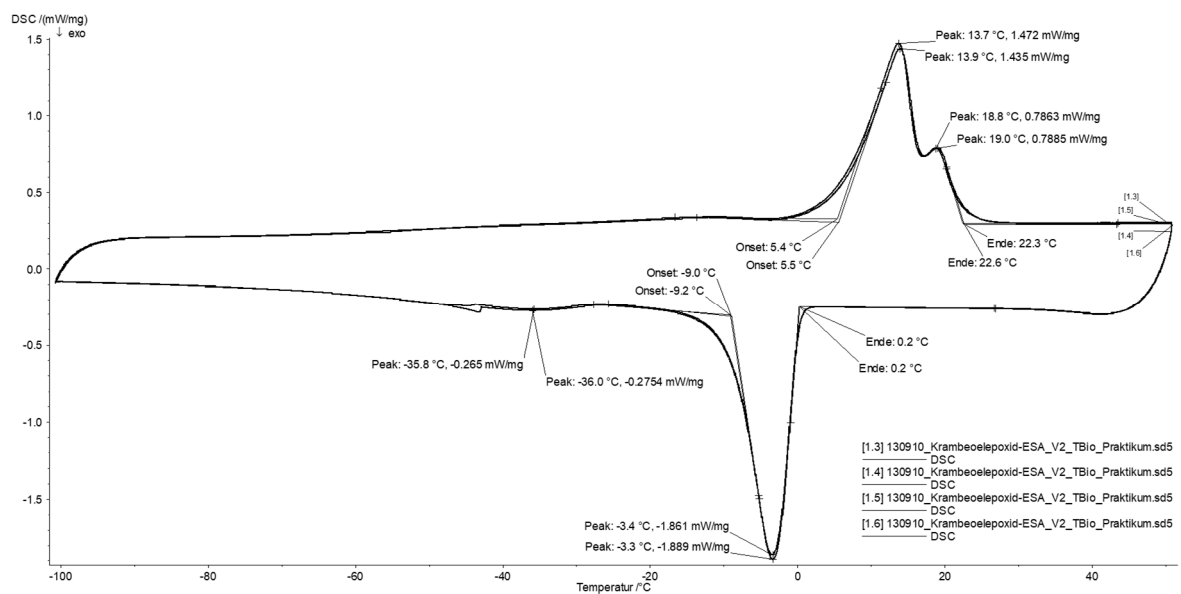
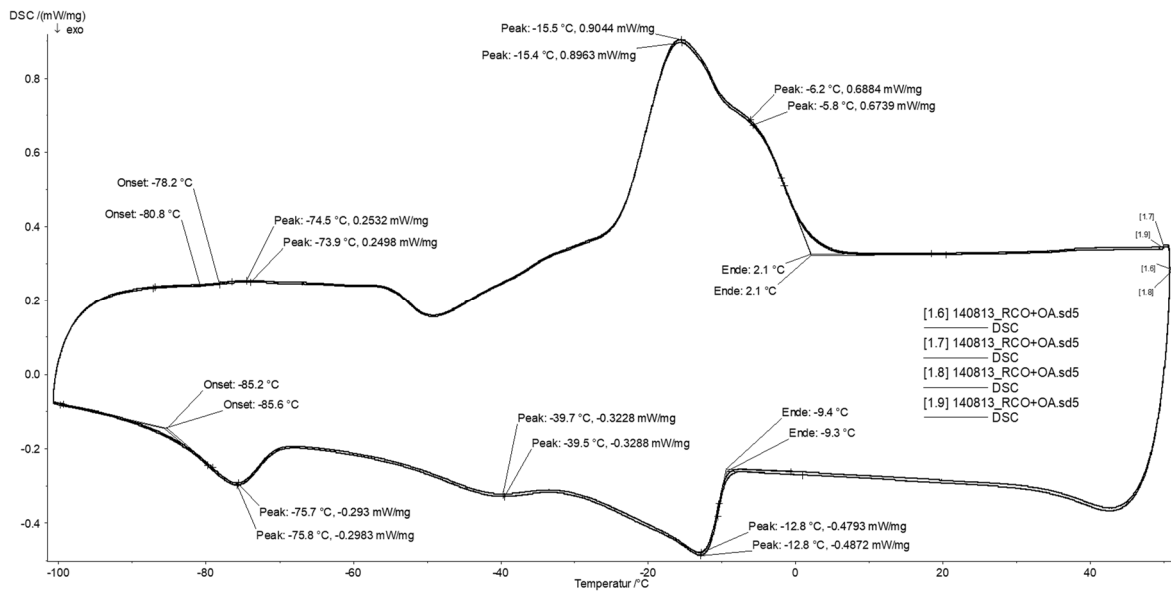


Abbildung 72: DSC-Thermogramme für (A) natives Krambeöl (KBO) und (B) epoxidiertes Krambeöl (KBOE).

A



B

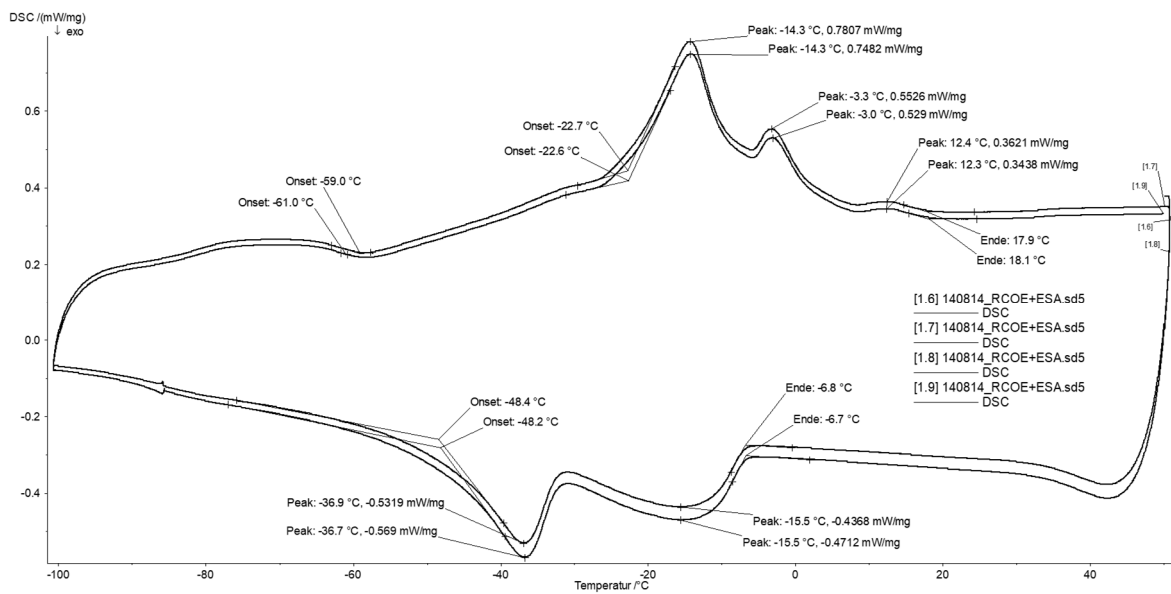
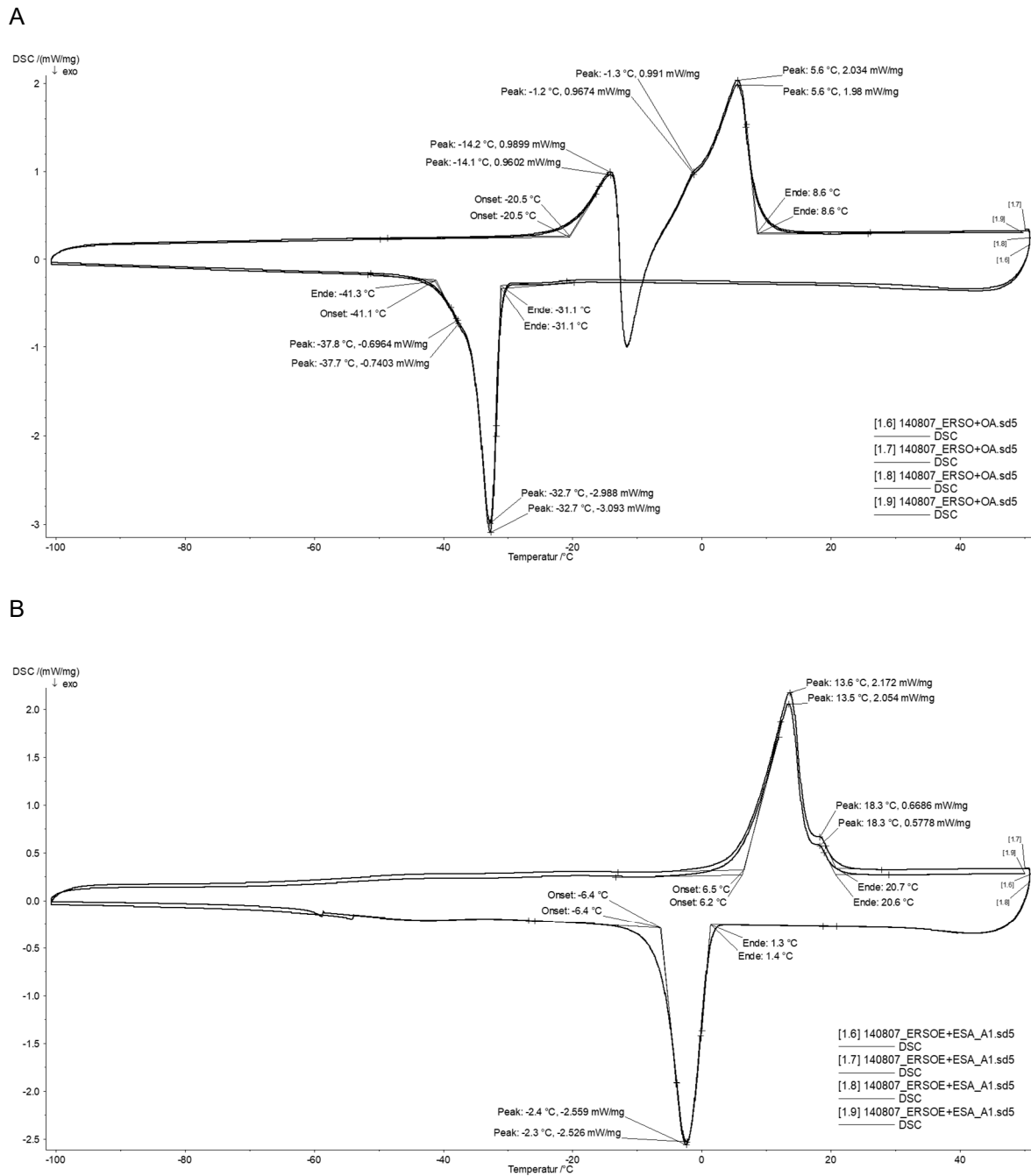
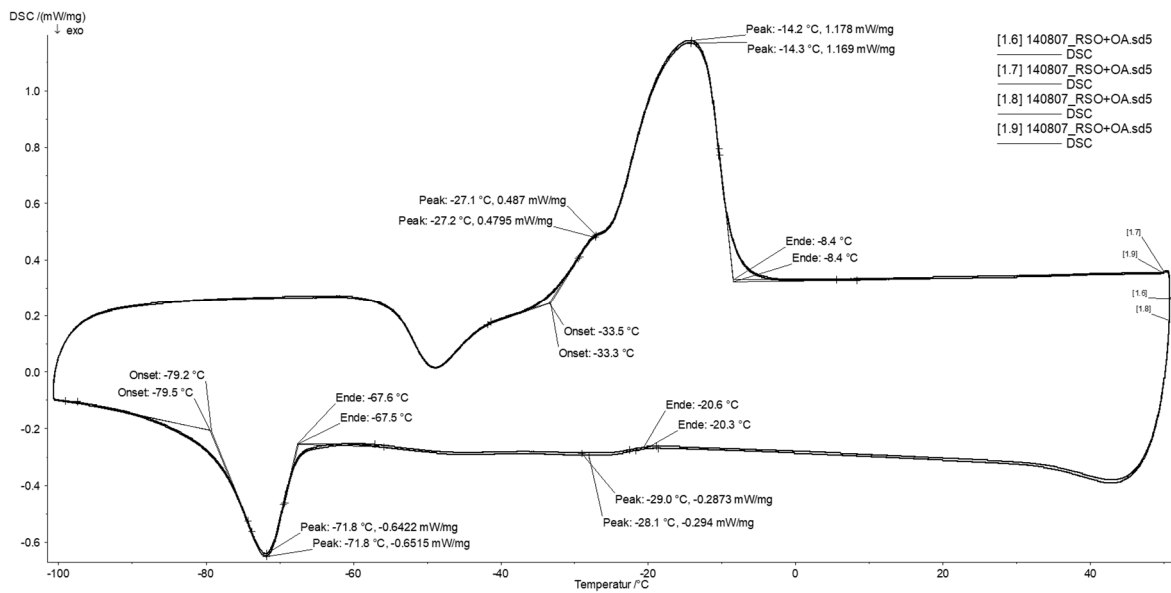


Abbildung 73: DSC-Thermogramme für (A) natives Reisöl (RCO) und (B) epoxidiertes Reisöl (RCOE).



**Abbildung 74: DSC-Thermogramme für (A) natives Erucarapsöl (ERSO) und (B) epoxidiertes Erucarapsöl (ERSOE).**

A



B

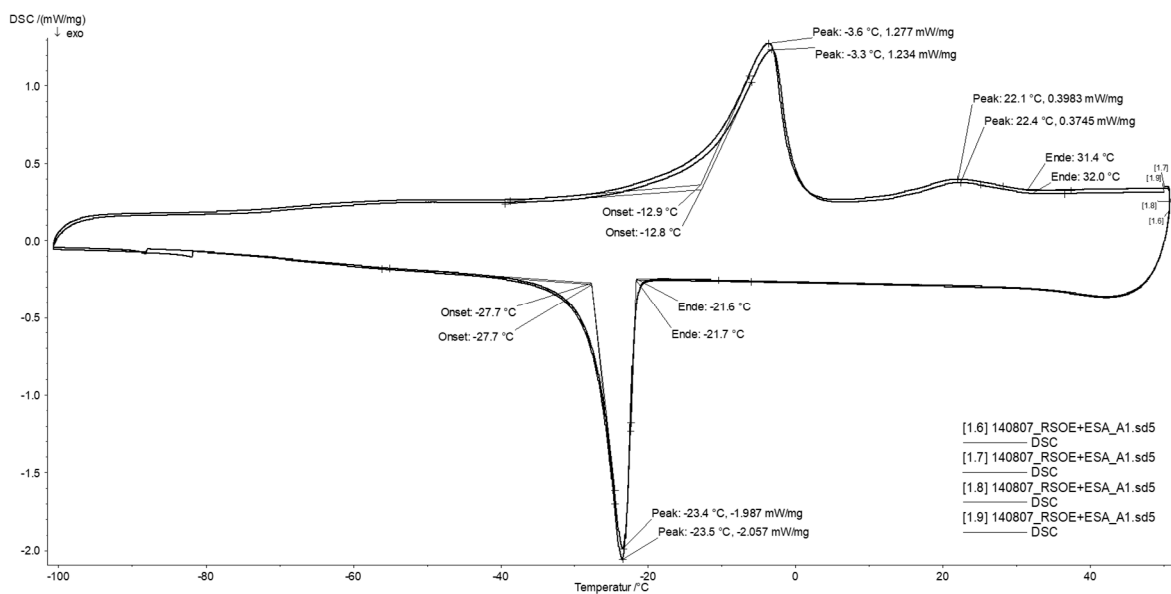
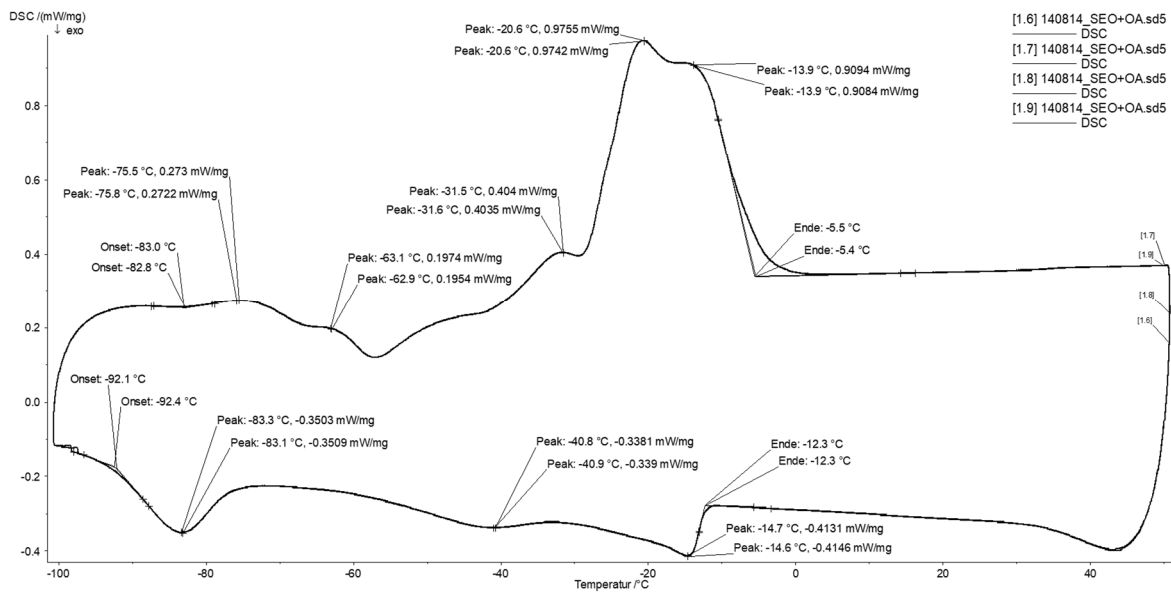


Abbildung 75: DSC-Thermogramme für (A) natives Rapsöl (RSO) und (B) epoxidiertes Rapsöl (RSOE).

A



B

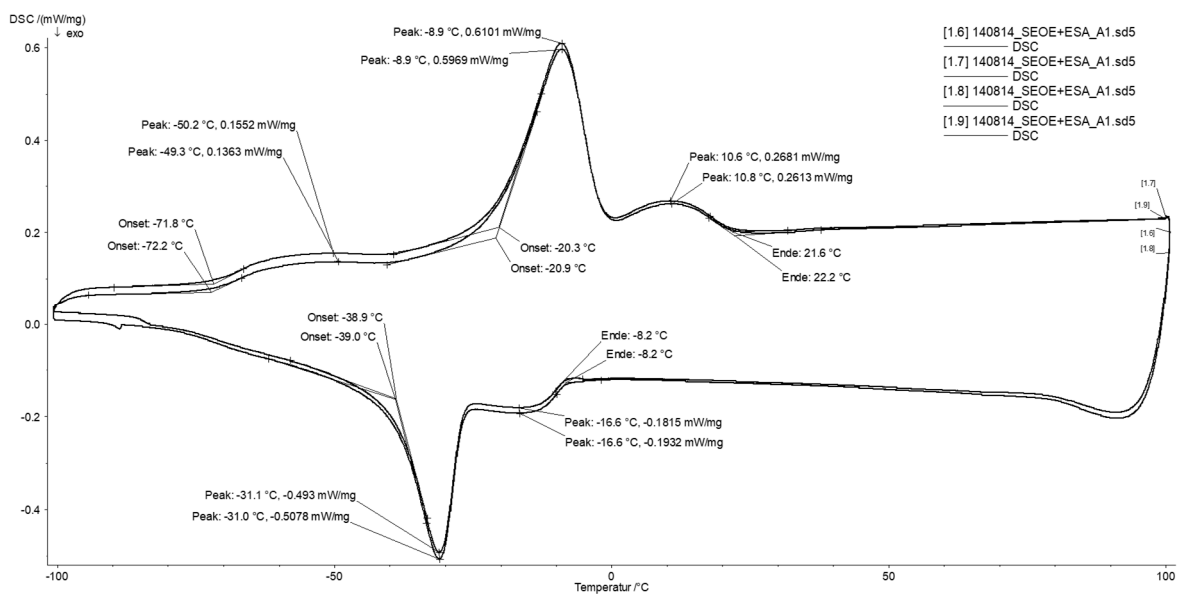
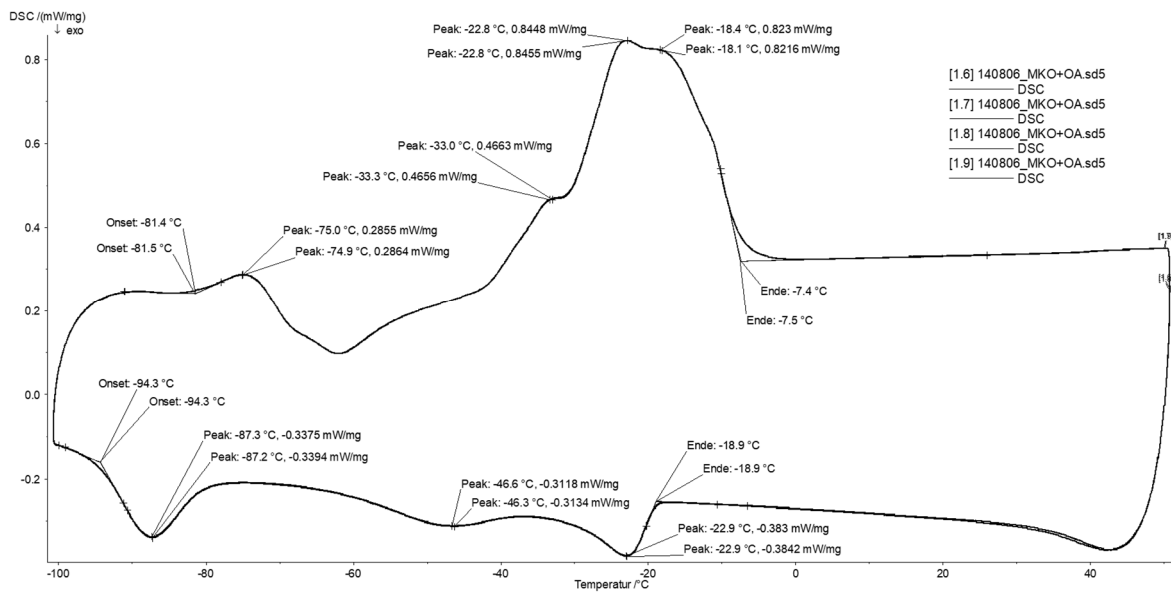


Abbildung 76: DSC-Thermogramme für (A) natives Sesamöl (SEO) und (B) epoxidiertes Sesamöl (SEOE).



A



B

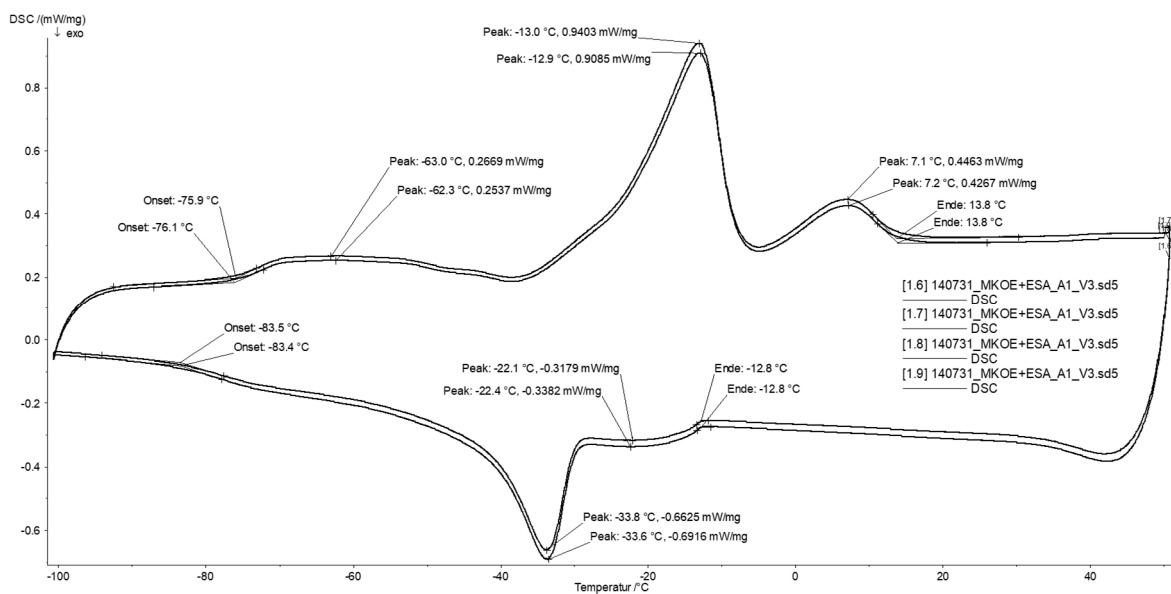
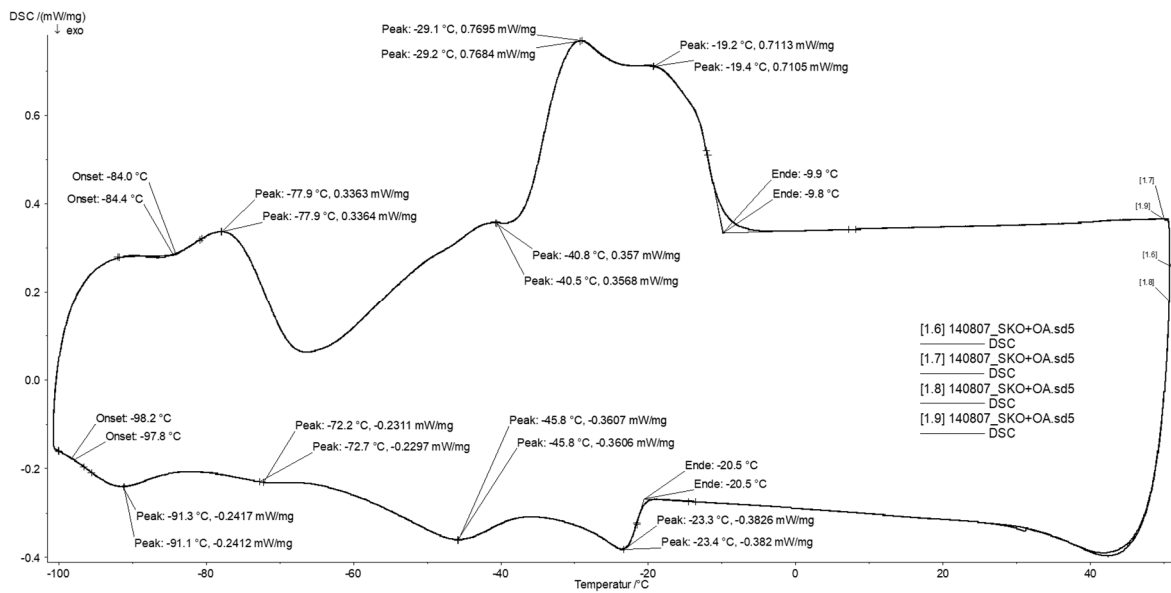


Abbildung 77: DSC-Thermogramme für (A) natives Maiskeimöl (MKO) und (B) epoxidiertes Maiskeimöl (MKOE).

A



B

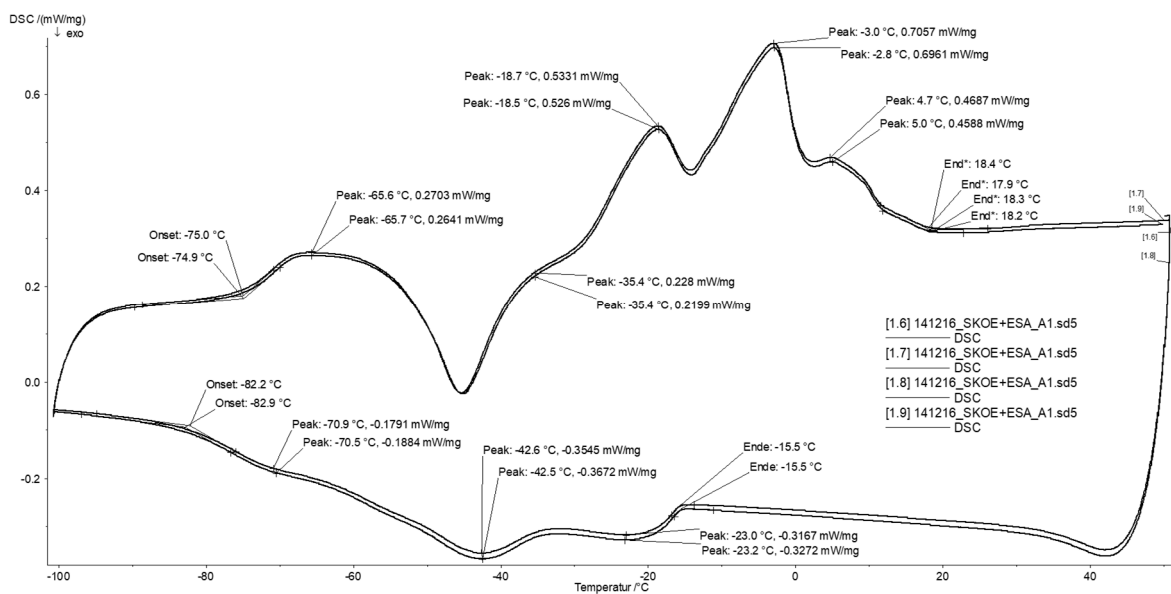
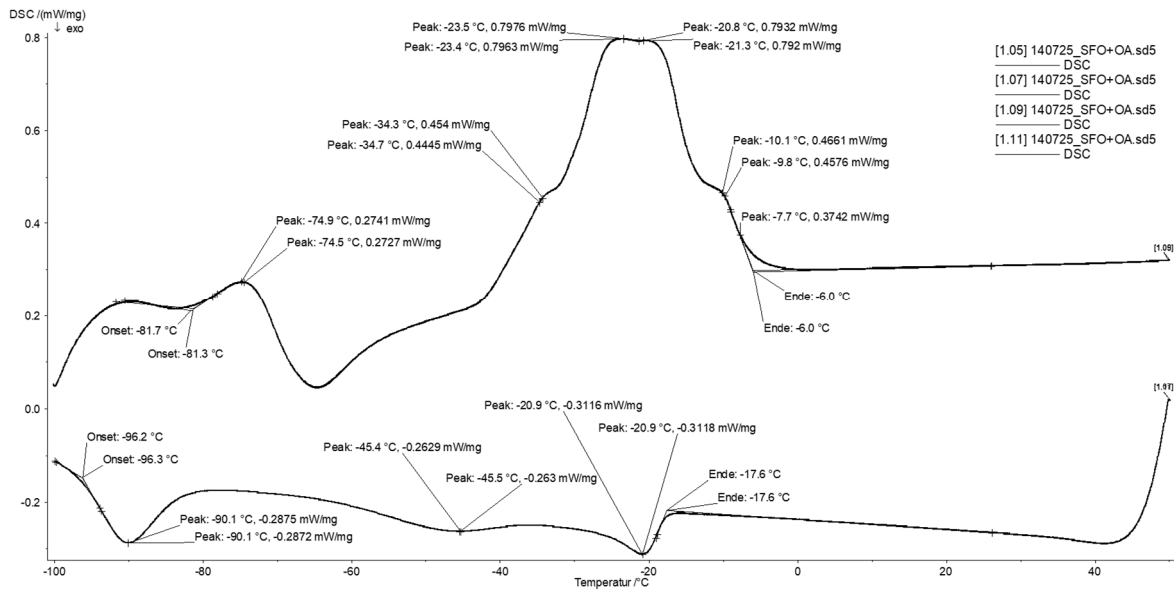


Abbildung 78: DSC-Thermogramme für (A) natives Schwarzkümmelöl (SKO) und (B) epoxidiertes Schwarzkümmelöl (SKOE).

A



B

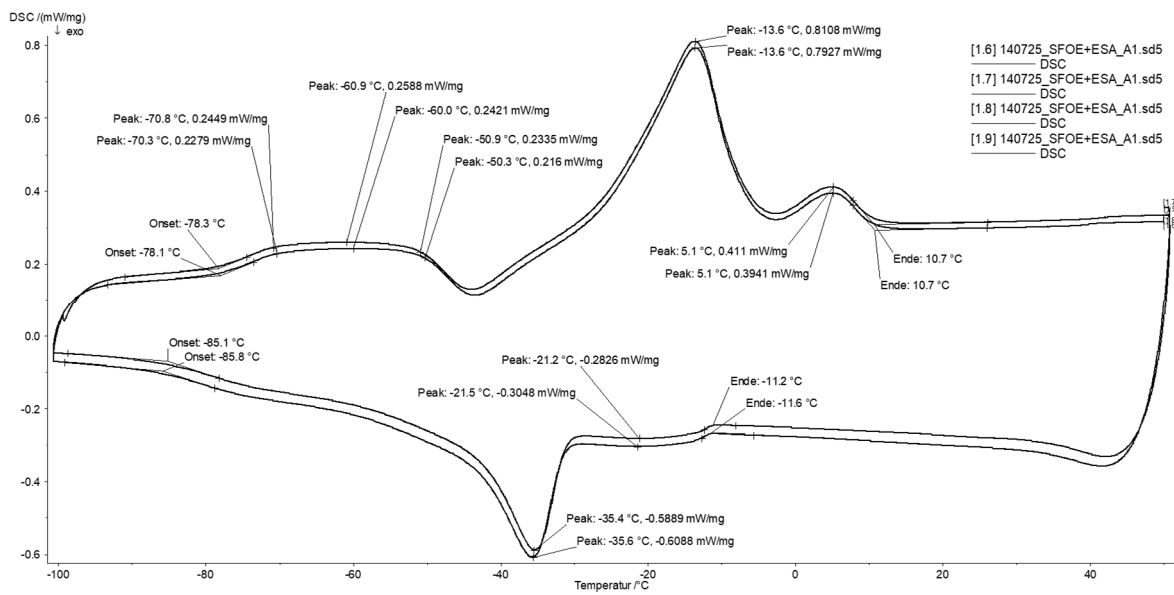
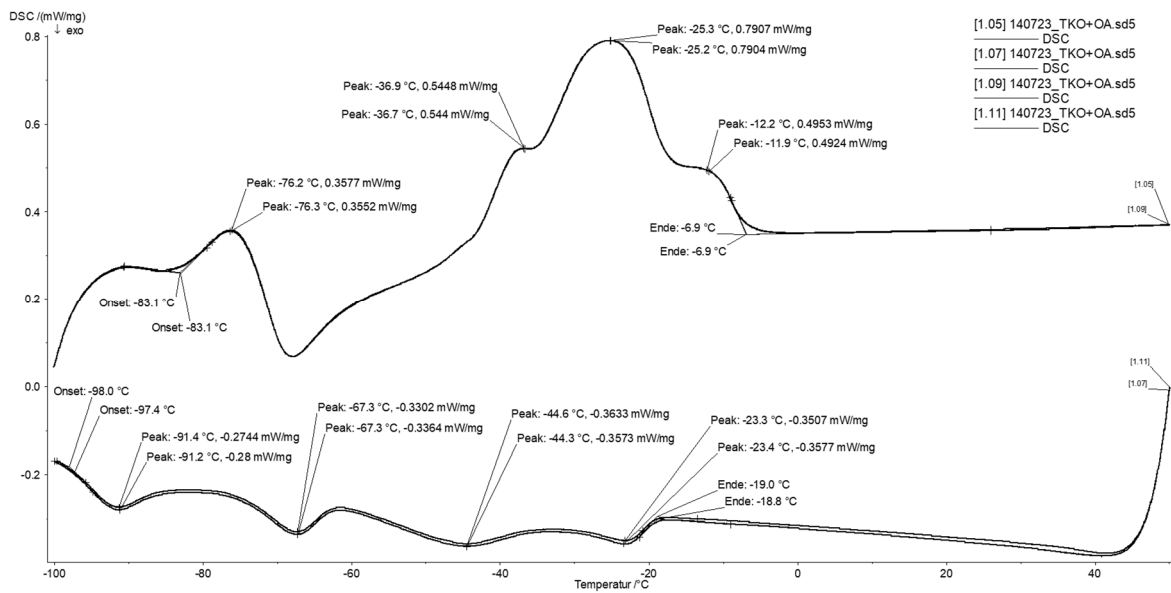


Abbildung 79: DSC-Thermogramme für (A) natives Sonnenblumenöl (SFO) und (B) epoxidiertes Sonnenblumenöl (SFOE).

A



B

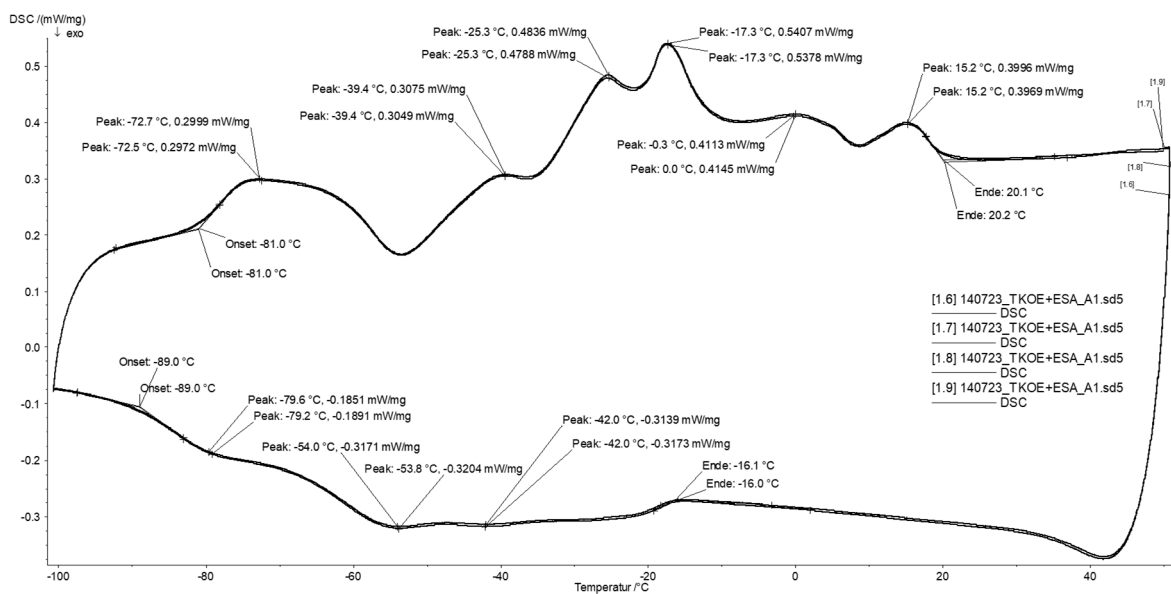
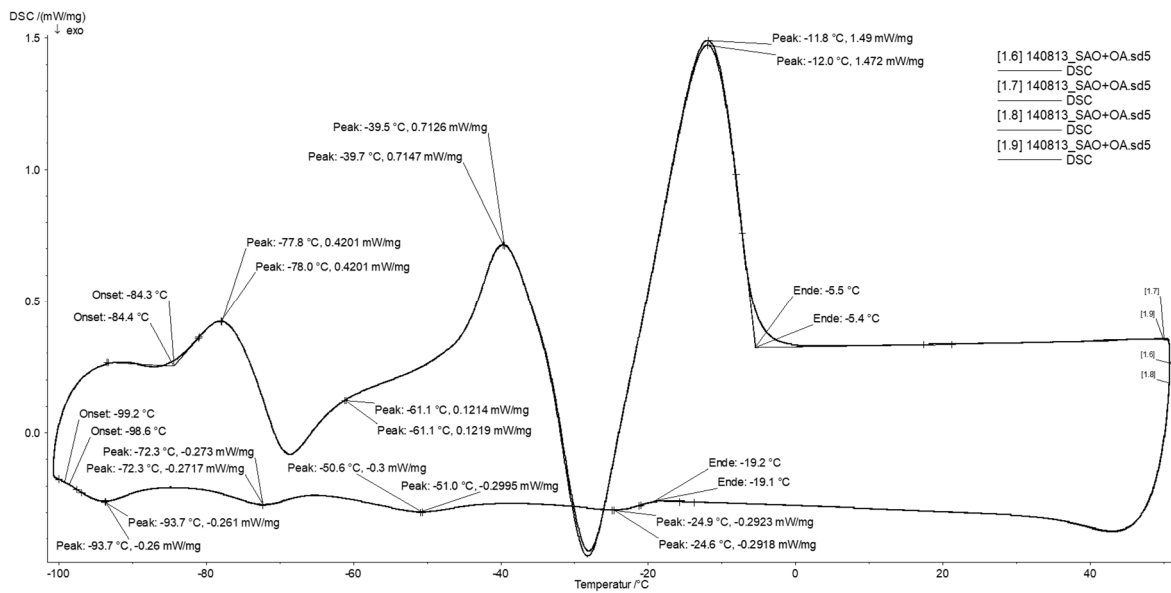


Abbildung 80: DSC-Thermogramme für (A) natives Traubenkernöl (TKO) und (B) epoxidiertes Traubenkernöl (TKOE).

A



B

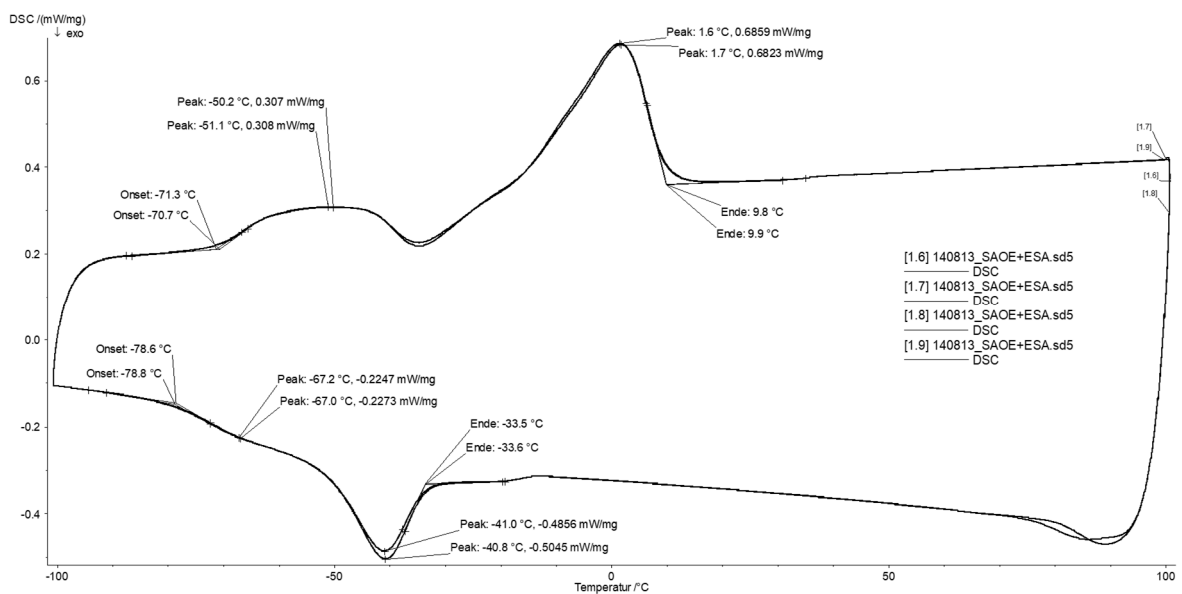
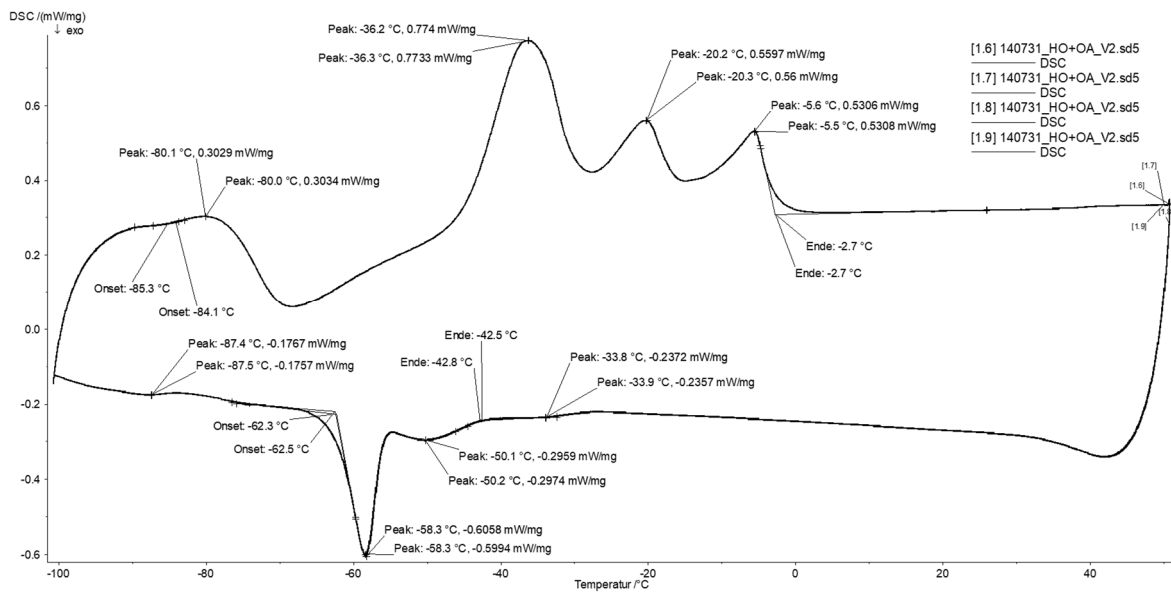


Abbildung 81: DSC-Thermogramme für (A) natives Safloröl (SAO) und (B) epoxidiertes Safloröl (SAOE).

A



B

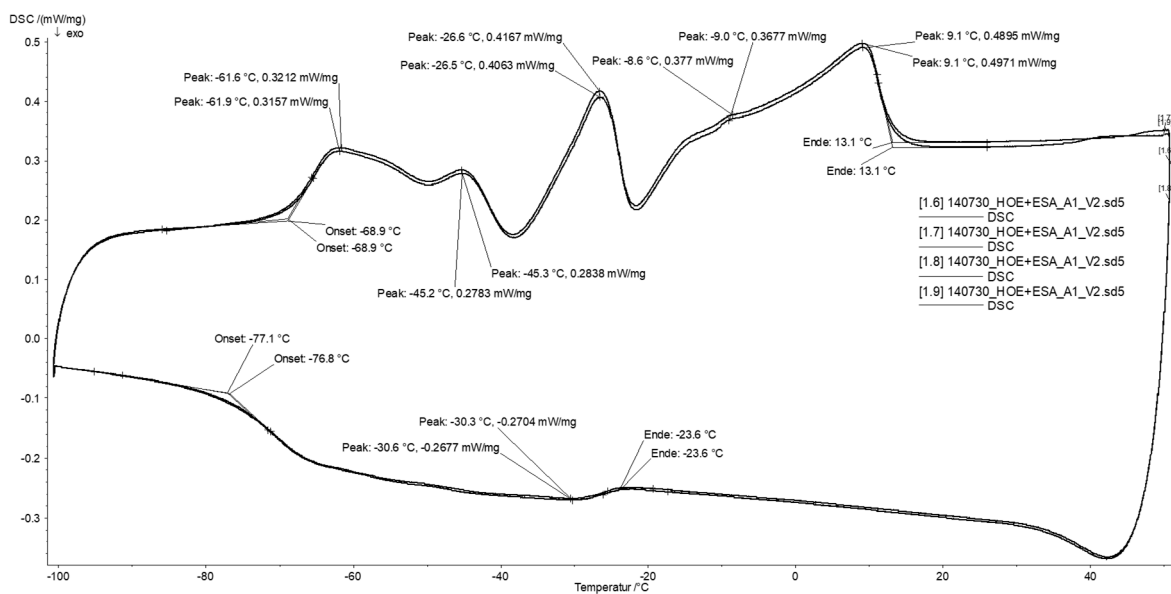
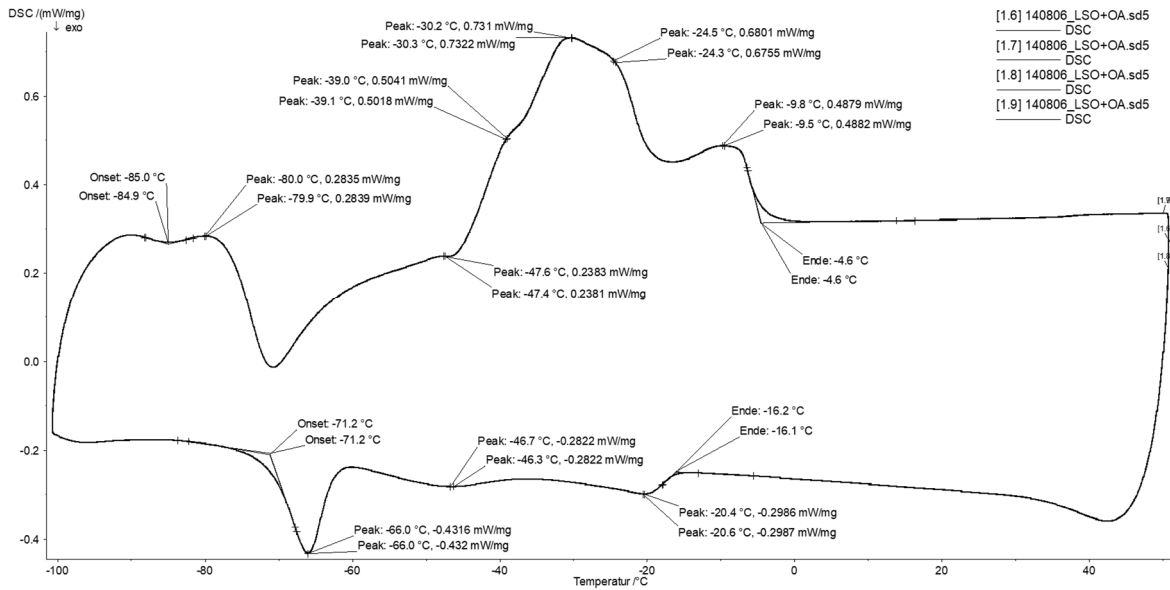
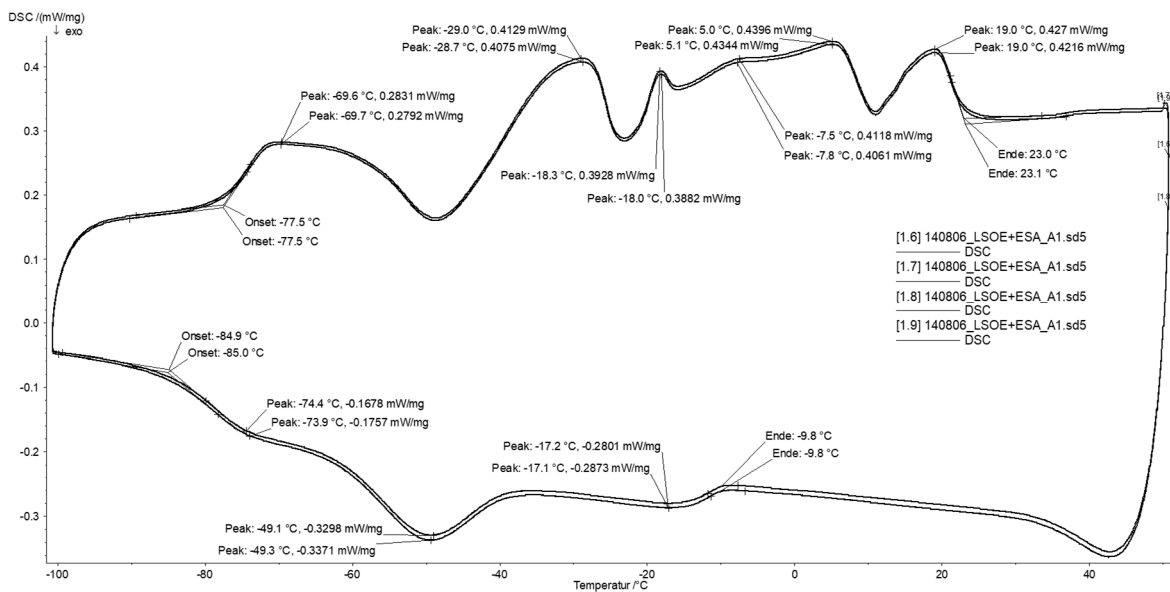


Abbildung 82: DSC-Thermogramme für (A) natives Holunderkernöl (HO) und (B) epoxidiertes Holunderkernöl (HOE).

A



B



**Abbildung 83: DSC-Thermogramme für (A) natives Leinsamenöl (LSO) und (B) epoxidiertes Leinsamenöl (LSOE).**

Das jeweils obere Kurvenpaar entspricht der Schmelzkurve mit vorwiegend endothermen Schmelzpeaks, das untere Kurvenpaar repräsentiert den durch exotherme Peaks gekennzeichneten Kristallisationsvorgang (Heiz- und Kühlrate – 10 °C min<sup>-1</sup>, Bereich -100 bis 50 °C).

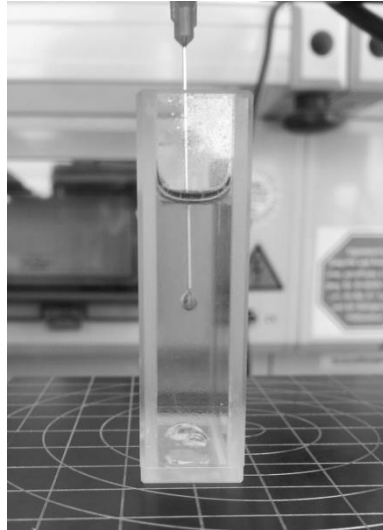
### 8.3.10 Bestimmung der Grenzflächenspannung mittels Pendant-Drop-Methode

Zur Bestimmung der Grenzflächenspannung zwischen zwei eingeschränkt mischbaren Flüssigkeiten wurde in dieser Arbeit die Pendant-Drop-Methode verwendet. Bei den beiden Flüssigkeiten handelte es sich um eine organische Phase aus Pflanzenöl, Ölsäure und Toluol als Lösemittel und eine wässrige 30 Gew. % Wasserstoffperoxidphase. Unter der Grenzflächenspannung wird die Spannung an der Trennflächen zweier in diesem Fall kondensierter Phasen verstanden die nur begrenzt ineinander mischbar sind [214, 254].

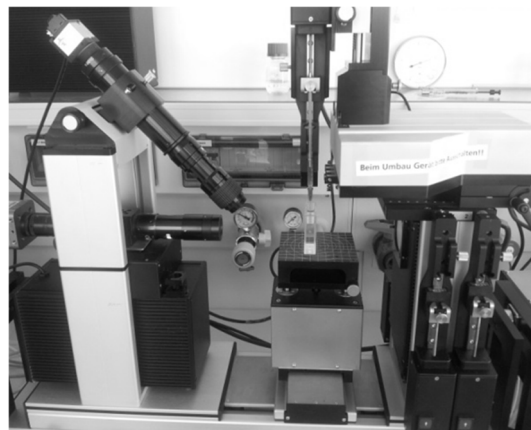
Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Veronika Schönhaar (Fraunhofer IGB, Abteilung Grenzflächentechnologie und Materialwissenschaften) durchgeführt. Gemessen wurden die Grenzflächenspannungen zwischen verschiedenen Mischungsverhältnissen von Drachenkopfl, Ölsäure und Toluol als organische Phase und wässrigem Wasserstoffperoxid (30 Gew.%). Der Toluolgehalt wurde mit Masseanteilen von 0, 20, 40, 60 und 80 Gew. % variiert. Vor jeder Messung wurden 50 mL der organischen Phase und 50 mL der wässrigen Wasserstoffperoxidphase in einem Scheidetrichter gegeneinander ausgeschüttelt, um gegeneinander gesättigte Phasen zu erhalten. Anschließend wurden die Phasen im Scheidetrichter wieder voneinander getrennt.

Bei der Pendant-Drop-Methode wird die Dichtere der beiden Phasen über eine Kapillare in die Phase mit geringerer Dichte eingetropft (siehe Abbildung 84). Aufgrund der Erdbeschleunigung und der sich zwischen beiden Flüssigkeiten ausbildenden Grenzflächenspannung entsteht eine charakteristische Tropfenform, die mit einem Kamerasystem aufgezeichnet wird. Die entscheidende Form des Tropfens entsteht kurz bevor sich dieser von der Kapillare ablöst. Aus den Krümmungsradien und anderen geometrischen Abmessungen des Tropfens lässt sich zusammen mit der Erdbeschleunigung und den Dichten der beiden Phasen die Grenzflächenspannung berechnen [254]. Gemessen wurde die Grenzflächenspannung mit einem Kontaktwinkelmessgerät OCA 40 Micro der Firma DataPhysics Instruments GmbH (siehe Abbildung 85).





**Abbildung 84: Küvette mit der organischen Phase. Die wässrige Phase wird über eine Kapillare in die organische Phase eingedrückt. In der Abbildung ist die Tropfenbildung zu erkennen, kurz bevor sich der Tropfen ablöst.**



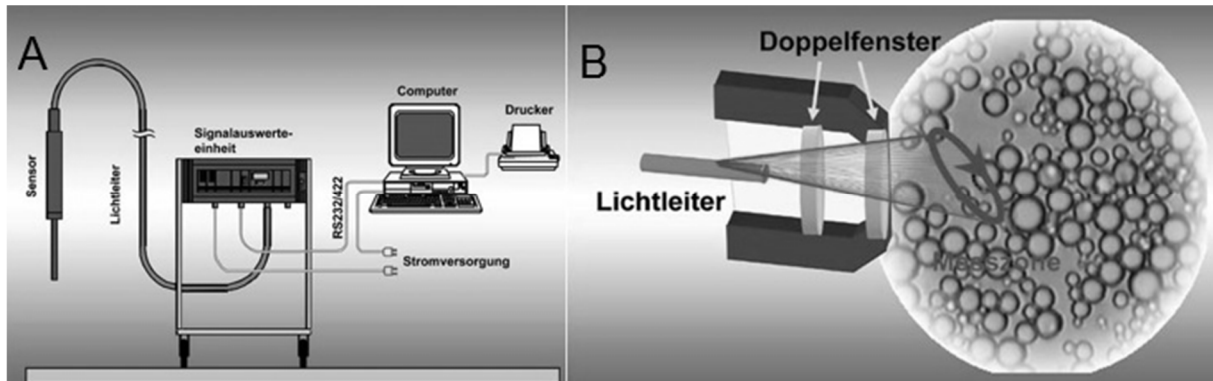
**Abbildung 85: Kontaktwinkelmessgerät OCA 40 Micro der Firma DataPhysics Instruments GmbH zur Bestimmung der Grenzflächenspannung nach der Pendant Drop Methode.**

**Auf der Hebebühne in der Mitte der Apparatur wird die Küvette mit der organischen Phase platziert. Das Kamerasystem für die Auswertung ist links angebracht.**

#### 8.3.11 In-situ-Messung der Tropfengrößenverteilung mittels 3D-ORM-Technologie

Das 3D-ORM Messsystem besteht im Wesentlichen aus dem Sensor, einer Signalauswerteeinheit und einem Computer, der mit der MCSA-Software zum Auswerten ausgestattet ist. Der Aufbau ist in Abbildung 86 A schematisch dargestellt. Als Lichtquelle dient eine Laserdiode, die sich in der Signalauswerteeinheit befindet und die das Licht über einen Lichtleiter zwischen Gerät und Sensor überträgt. Im Sensor wird das Licht durch einen Kollimator, ein Keilfenster, einer Fokuslinse und durch zwei Saphir-Fenster geleitet. Die Fokuslinse rotiert dabei exzentrisch, um den Laserstrahl auf eine Kreisbahn zu bringen. Der

Fokuspunkt bewegt sich dabei in einem dreidimensionalen Raum vor dem Sondenfenster. Trifft dieser Laserstrahl einen Tropfen, so wird das Licht von dem Tropfen reflektiert. In der Messsonde wird das Licht dann von einem optischen System aufgenommen und zu einem Detektor geleitet, der die Größe des Tropfens bestimmt. Das Messprinzip ist in Abbildung 86 B dargestellt [235].



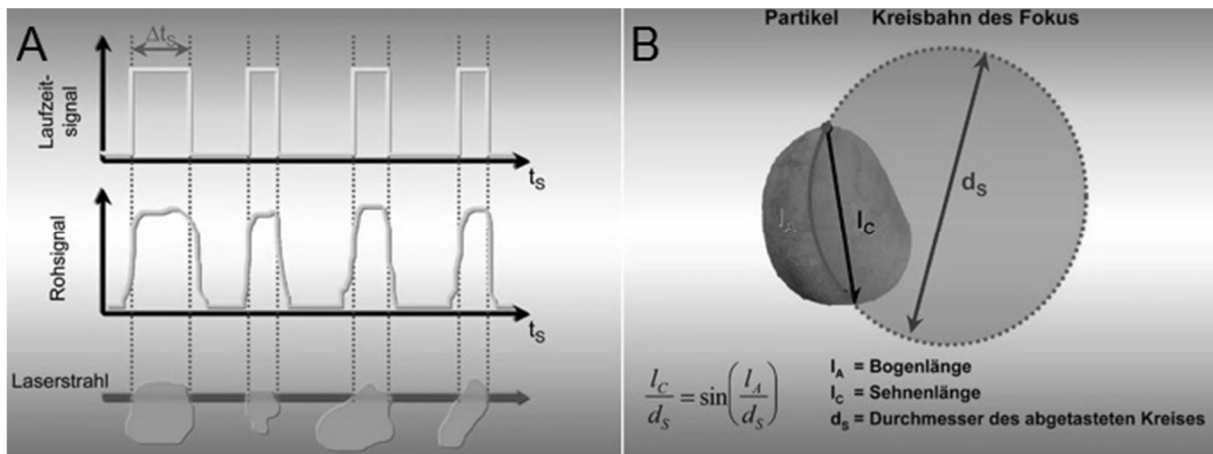
**Abbildung 86: Grundaufbau des 3D-ORM Gerätes.**

**(A) Der Messaufbau besteht aus Sensor, Signalauswerteeinheit und Computer. (B) Schema des Messprinzips der 3D-ORM Technologie bei welchem der Fokuspunkt die Partikel vor dem Sondenfenster abtastet [235].**

Die Tropfengröße wird dabei aus der Zeitspanne bestimmt, die der Laserstrahl zum Abtasten des fokussierten Tropfens benötigt. Der Detektor wandelt dabei das reflektierte Licht in ein elektrisches Signal um. In Abbildung 87 A wird der Zusammenhang zwischen dem abgetasteten Tropfen und dem resultierenden elektrischen Signal verdeutlicht. Die Sehnenlänge  $l_C$  des Tropfens, die sich daraus ergibt, ist proportional zum Laufzeitsignal eines Pulses. Mit der Abtastgeschwindigkeit des Fokuspunktes des Lasers  $v_s$  und der Laufzeit  $\Delta t_s$  ergibt sich nach Formel 33 die Berechnung der Sehnenlänge eines abgetasteten Tropfens [235].

$$l_C = v_s \cdot \Delta t_s \quad \text{Formel 33}$$

Wird die Sehnenlänge jedoch einfach aus der Laufzeit des Pulses abgeleitet, ergibt sich daraus ein systematischer Fehler. Der Fehler steht im direkten Zusammenhang mit dem vom Laser abgetasteten Durchmesser und der Sehnenlänge des Tropfens, der tatsächlich vorliegt. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 87 B dargestellt und die darin enthaltene Formel gibt die Beziehung zwischen Bogenlänge  $l_A$  und Sehnenlänge  $l_C$  des Tropfens wieder.

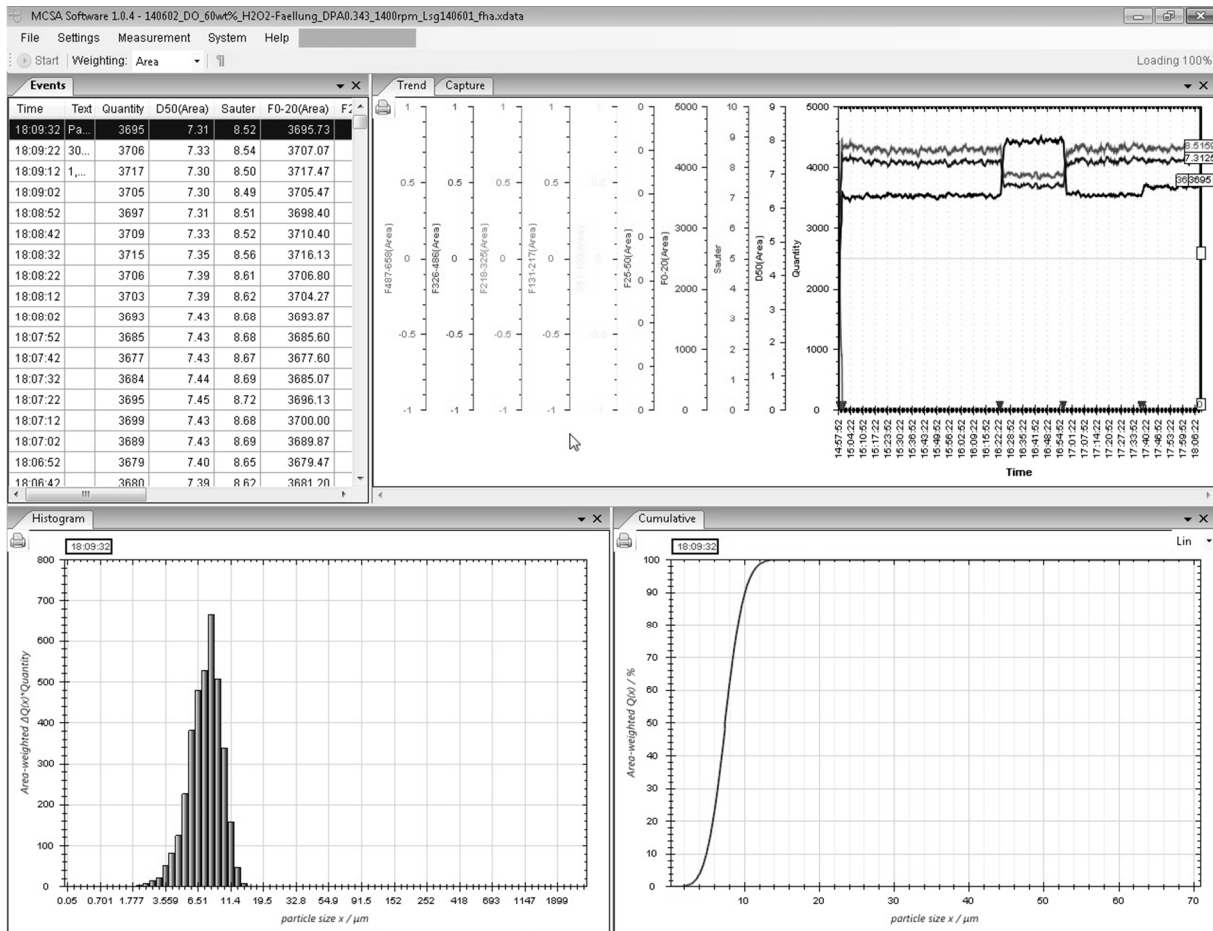


**Abbildung 87: (A) Zusammenhang zwischen dem vom Laserstrahl abgetasteten Tropfen und dem entstehenden elektrischen Laufzeitsignal. (B) Beziehung des Durchmessers des abgetasteten Kreises und der Sehnenlänge des Tropfens [235].**

Der vorliegende systematische Fehler kann nach Formel 34 abgeschätzt werden [235].

$$\frac{l_A - l_C}{l_A} \approx \frac{100\%}{6} \left( \arcsin\left(\frac{l_C}{d_s}\right) \right)^2 \approx \frac{100\%}{6} \left( \frac{l_C}{d_s} \right)^2 \quad \text{Formel 34}$$

Der Detektor unterteilt dann die ankommenden Rohsignale mit einer elektronischen Filtereinheit in „Gut-Werte“ und „Schlecht-Werte“. Die „Schlecht-Werte“ werden verworfen, wobei die Kriterien für diese Auswahl die Symmetrie und die Flankensteilheit der Pulse darstellen. Zur weiteren Auswertung wird eine Sehnenlängenverteilung von der Signalwertereinheit an den Computer weitergegeben. Dort kann mithilfe der Software MCSA die Auswertung der Messungen erfolgen. Aus den Sehnenlängen der abgetasteten Tropfen wird dort eine TGV errechnet, die in unterschiedlichster Art dargestellt werden kann. Die Darstellung kann in Form einer Volumeverteilung, Anzahlverteilung, RRSB Verteilung oder als Trendsignal erfolgen. In Abbildung 88 ist eine typische Darstellung der Software abgebildet, aus der die verschiedenen Darstellungsweisen und Parameter entnommen werden können [235].



**Abbildung 88: Benutzeroberfläche der Auswertesoftware MCSA 1.0.4.**

In Tabelle 40 ist ein umfassender Überblick über die bestehenden Korrelationsgleichungen im Hinblick auf die durchgeführten Experimente dargestellt. Darüber hinaus gibt es noch eine Vielzahl weiterer Gleichungen. Diese weichen jedoch in Bezug auf den Dispersphasenanteil zu stark von den Dispersphasenanteilen ab, die für diese Arbeit relevant sind. Aus diesem Grund sollen die in Tabelle 40 dargestellten Korrelationsgleichungen als Überblick angeführt werden. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass sich die dargestellten Modelle in ihrer Neigung zur Koaleszenz, den verwendeten Stoffsystemen und den Geometrien der Behälter stark unterscheiden. Auch die verwendeten Messmethoden reichen von der in-situ Fotografie über die Probennahme und anschließender Mikrophotographie bis hin zur Mikroskopanalyse.

**Tabelle 40: Auflistung verschiedener empirischer Korrelationsgleichungen zur Berechnung des Sauterdurchmessers mit Verwendung eines 6-Blatt Scheibenrührers.**

Literatur	Korrelationsgleichung	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	φ	ρ <sub>D</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	ρ <sub>K</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	η <sub>D</sub> (mPa*s)	η <sub>K</sub> (mPa*s)	σ (mN/m)	Bemerkungen bezüglich Messtechnik und System
Brown, Pitt 1970 [220]	$\frac{d_{32}}{d} = C_4(1 + C_3\varphi)We^{C_5}$	3,14	0,51	-0,6	0,05- 0,3	0,783- 0,838	0,972- 0,998	0,59- 3,30	1,0- 1,28	1,9- 50	d=10 cm D=30 cm n=4,2-7,5rps in-situ Photographie Petroleum(disperse Phase) und Wasser(kontinuierliche Phase)
Mlynek, Resnik 1972 [238]	$\frac{d_{32}}{d} = C_4(1 + C_3\varphi)We^{C_5}$	5,4	0,058	-0,6	0,025- 0,34	1,055	1	-	1	41	d=10 D=29 n=2,3-8,3rps in-situ Photographie durch Einkapselung der Tropfen Wasser und Mischung aus Tetrachlormethan / Isooctan
Godfrey, Grillic 1977 [220]	$\frac{d_{32}}{d} = C_4(1 + C_3\varphi)We^{C_5}$	3,6	0,058	-0,6	0,05- 0,5	0,783- 0,829	0,986- 0,997	2,05- 8,6	0,98- 1,19	1,9- 34,5	d=5,1 cm D=15,2 cm n=8,33-15,0 rps unbewehrter quadratischer Kessel Probenentnahme
Zerfa, Brooks 1995 [255]	$\frac{d_{32}}{d} = C_4(1 + C_3\varphi)We^{C_5}$	3,1	0,027	-0,6	0,01- 0,4	0,840	0,986	0,05	0,504	11,0- 14,47	n= 250-800rpm Probenentnahme und Photographie Vinylchlorid als disperse Phase, destilliertes Wasser als kontinuierliche Phase
Collias, Prudhomme 1992 [240]	$\frac{d_{32}}{d} = C_4(1 + C_3\varphi)(\eta_d/\eta_c) We^{C_5}$	1,4	0,097	-0,71	0,03- 0,12	0,92-1	1,02	0,677- 100	8,43	3,27- 45,05	d=4,83cm D=14,5cm n=160-570rpm PVA(3%) in Wasser (kontinuierliche Phase); Monochlorbenzol(55%)+Toluol(45%) (disperse Phase) Elektronischer Partikelzähler + Mikroskopanalyse

---

## Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Hirth, der mir die Möglichkeit zur Durchführung meiner Doktorarbeit am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP) in Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Biotechnologie (IGB) gab. Ich danke Ihm für seine Betreuung, sein stetiges Engagement und das entgegengebrachte Vertrauen. Diese Unterstützung hat wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen. Des Weiteren möchte ich bei Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch und Herrn Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors für die Übernahme der Zweitgutachten danken. Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei Frau Dr.-Ing. Susanne Zibek möchte ich mich vielmals für Ihr Vertrauen und die langjährige Unterstützung danken. Als Leiterin der Arbeitsgruppe „Industrielle Biotechnologie (WBT)“, in deren Umfeld diese Arbeit entstand, stand Sie mir stets im Rahmen unserer wissenschaftlichen Diskussionen zur Seite und leistete somit ebenfalls einen wesentlichen Beitrag bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn apl. Prof. Dr. Steffen Rupp danke ich ganz herzlich für seine Unterstützung und die Möglichkeit über Jahre hinweg ein Teil der Abteilung „Molekulare Biotechnologie (MBT)“ am Fraunhofer IGB zu sein. Der gesamten MBT möchte ich für die ausgesprochen freundliche Arbeitsatmosphäre danken. Ein besonderer Dank gilt dabei der Arbeitsgruppen WBT, dessen wissenschaftliche und studentische Mitarbeiter durch Ihre Kollegialität und Unterstützung sehr hilfreich waren. Ein besonders herzlicher Dank geht an meine langjährigen Bürokollegen Lisa Blaschke, Dominik Rais, Björn Vater, Paula Carrillo und Thomas Hahn, die einerseits stets hohe Bereitschaft zur fachlichen Diskussion an den Tag legten, mir aber auch andererseits abseits wissenschaftlicher Fragestellungen eine schöne Zeit am Institut ermöglichten und mir als Freunde ans Herz gewachsen sind.

Darüber hinaus möchte ich Frau Dr. Nicole Werner und Herrn Dipl.-Ing. Georg Geiger für die Unterstützung bei der Untersuchung unterschiedlicher Lipasen aus verschiedenen *Pseudozyma* spp. danken. Herrn Dipl.-Ing. Christopher Hänel danke ich für die Hilfe bei der rheologischen Charakterisierung von Pflanzenölen und Pflanzenölepoxiden. Frau Veronika Schönhaar (M.Sc.) danke ich für die Messungen zur Dichte verschiedene Reaktionsgemische und der entsprechenden Grenzflächenspannungen. Frau Kuhnt und Frau Dettling danke ich für die Einarbeitung in die Dynamische Differenzkalometrie. Herrn Felix Remppel und seinem Team der mechanischen Werkstatt der Universität Stuttgart danke ich für die Anfertigung der Strombrecher und die außergewöhnlich flexible Bearbeitung kurzfristiger Anfragen. Frau Ulrike Götz danke ich für die kooperative Durchführung der GC-FID-Messungen zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung verschiedener Pflanzenöle.

Meinen Studenten Lisa Blaschke, Nina Denneler, Carine Momeni, Maja Ziegler, Nicolas Schlosser, Sebastian Dürr, Felicitas Wahl und Helena Henkel möchte ich für die hervorragende Laborarbeit danken.

Meinen Eltern, meinem Bruder Thilo, der sich der gleichen Herausforderung in der Abteilung UBT gestellt hat und stets ein offenes Ohr für mich hatte, und meiner Schwester möchte ich für die Unterstützung und Motivation ganz herzlich danken. Ohne Ihre Hilfe hätte ich es wohl kaum bis zu diesem Punkt geschafft. Meinen Freunden in meiner Heimat möchte ich vor allem für das Verständnis danken, dass unsere gemeinsame Zeit durch meine Doktorarbeit vorübergehend zwangsläufig limitiert wurde.

Zu guter Letzt möchte ich meiner lieben Freundin Carmen Testa danken. Sie war mit Ihrer fortwährenden Unterstützung, Ihren liebevollen Aufmunterungen und motivierenden Worten immer für mich da.

---

## Lebenslauf

**Fabian Haitz, M.Sc.**

Dachswaldweg 52

70569 Stuttgart

Mobil: +49 (0) 176 34993161

E-Mail: fabian-haitz@web.de

Geburtsdatum 20. Februar 1985

Geburtsort Offenburg

Nationalität deutsch

Familienstand ledig




---

### Promotion

**05/2011 – heute**      **Universität Stuttgart**, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP und Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik

**Arbeitstitel:**

„Entwicklung von Verfahren zur enzymatischen Epoxidierung von Pflanzenölen und Fettsäurederivaten“

---

### Studium

**2009 - 2010**      **Studium zum Master of Science (M.Sc.) Process Engineering, Hochschule Offenburg (Abschluss 1,2)**

03/2010 – 09/2010      **Masterarbeit**

„Prozessentwicklung zur Produktion von C5- und C6-Zuckern als biobasierte Plattformchemikalien aus Lignocellulose“

**Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB in Stuttgart**, Abteilung Molekulare Biotechnologie, Arbeitsgruppe Industrielle Biotechnologie

03/2009 - 06/2009      Auslandsstudium im Masterstudiengang Process Engineering (MPE) an der **Universität Olsztyn (Polen)**

2005 - 2009      **Studium zum Bachelor of Science (B.Sc.) Verfahrenstechnik mit Schwerpunkt Biotechnologie, Hochschule Offenburg (Abschluss 1,7)**

**Bachelorarbeit**

„Erstellung einer automatischen Messwerterfassung am Beispiel der Produktion von 2,5-Diketo-gluconsäure mit *Gluconobacter oxydans*“

09/2007 - 02/2008      **Integriertes Praxissemester**

io•li•tec Ionic Liquids Technologies GmbH & Co. KG, Denzlingen



---

## Zivildienst

07/2004 - 03/2005      Spastiker Verein in Offenburg, Tätigkeit im Fahrdienst

---

## Schulbildung

2001 - 2004      Wirtschaftsgymnasium in Offenburg, Abschluss: Abitur (2,6)  
1995 - 2001      Theodor-Heuss-Realschule in Offenburg, Abschluss: Mittlere Reife (2,1)  
1991 - 1995      Grundschule, Schutterwald

---

## Berufliche und studienbegleitende Tätigkeiten

09/2015 - heute      Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik IGB im Bereich industrielle Biotechnologie  
**Projekte:**  
CL-Care: Herstellung und Charakterisierung von Cellobioselipide als multifunktionale Zusätze in Kosmetika und Körperpflege-Produkten  
Surglyco: Enhanced fermentative and biocatalytic conversion strategies of renewables to tailor made glycolipid biosurfactants

05/2011 – 08/2015      Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik IGB im Bereich industrielle Biotechnologie  
**Projekte:**  
BioConSepT: „Integration of Bio-Conversion and Separation Technology for the production and application of platform chemicals from 2<sup>nd</sup> generation biomass“  
Integrierte Bioproduktion: „Integrierte chemisch-biotechnologische Herstellung von Synthesebausteinen auf Basis nachwachsender Rohstoffe in einer Bioraffinerie“

10/2010 – 04/2011      Wissenschaftliche Hilfskraft am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Abteilung Molekulare Biotechnologie

10/2009 - 01/2010      Wissenschaftliche Hilfskraft, Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik der Hochschule Offenburg

---

Stuttgart, Dezember 2016

Fabian Haitz

---

## Wissenschaftliche Beiträge

### Publikation

- Haitz F. and Radloff S., S. Rupp, M. Fröhling, T. Hirth, S. Zibek (eingereicht 07/2016): Biochemical Process Development and Economic-Ecological Evaluation for the Chemo-Enzymatic Epoxidation of *Lallemantia Iberica* Seed Oil, Applied Biochemistry and Biotechnology
- Haitz, F., S. Rupp, T. Hirth, S. Zibek (2015): Buch „Industrial Biocatalysis“, ISBN 978-981-4463-88-1 (Hardcover), 978-981-4463-89-8 (eBook); Editor – Prof. Dr. Peter Grunwald; Titel des Buchbeitrages: Lipase-catalyzed epoxidation of fatty compounds and alkenes.
- Torkler, S., Haitz, F., Zibek, S., Patzsch, K., Hirth, T. (2015): Integrierte Bioproduktion – Pflanzliche Öle für die chemische Industrie, CAV – Chemie Anlagen Verfahren 2/2015, S. 24-25
- Helber, N., Vater, B., Haitz, F., Torkler, S., Patzsch, K., Zibek, S. (2014): Herstellung von Enzymen – Maßstabsübertragung vom Laborprozess zur Pilotanlage, GIT Labor-Fachzeitschrift 9/2014.
- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2013): Herstellung Pflanzenöl-basierter Epoxide - Chemo-enzymatische Epoxidierung als Alternative zur chemischen Synthese, GIT Labor-Fachzeitschrift 3/2013.

### Vorträge

- Haitz, F., S. Rupp, S. Zibek (2016). Scale-up of the chemo-enzymatic epoxidation. ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 12. - 15. September 2016, Eurogress Aachen.
- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2016). Chemo-Enzymatic Epoxidation of Triacylglycerides: Influence of Hydrogen Peroxide Addition on Enzyme Stability. RRB-12 - 12<sup>th</sup> International Conference on Renewable Resources & Biorefineries, May 31<sup>st</sup>, 2016, Ghent, Belgium
- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2016). Optimization and scale-up of the chemo-enzymatic epoxidation. ECO-BIO 2016 – Challenges in Building a Sustainable Biobased Economy, 8<sup>th</sup> March 2016, Rotterdam, The Netherlands
- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2012). Optimization and process engineering for the chemo-enzymatic epoxidation of fatty acids and non-conventional plant oils.ACHEMA 2012 - 30<sup>th</sup> International Exhibition Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology, Frankfurt, Germany.

- 
- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2012). Chemo-enzymatic epoxidation of non-conventional plant oils – process optimization using response surface methodology, 3<sup>rd</sup> International Workshop of COST Action CM0903 (UBIOCHEM): Sustainable production of fuels/energy, materials & chemicals from biomass, Thessaloniki, Greece.

**Poster**

- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2012). Comparison of chemo-enzymatic epoxidation of oleic acid with different immobilized lipases. 5<sup>th</sup> Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry. Karlsruhe, Germany, Abiosus e.V.
- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2012). Optimization of the chemo-enzymatic epoxidation of non-conventional plant oils by RSM, 3. Kooperationsforum Biopolymere, Straubing, Germany.
- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2012). Optimization of the chemo-enzymatic epoxidation of non-conventional plant oils by RSM, 7<sup>th</sup> CeBiTec-Symposium 2012 - Bio-integrated Organic Synthesis in Industry: Biocatalytic Breakthroughs, Industrial Processes, Emerging Fields, Bielefeld, Germany.