

Steuerung der Reaktionsselektivität der biokatalytischen Fettsäureestersynthese

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von
Sören Baum

aus
Henstedt-Ulzburg

2018

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese
 2. Gutachterin: Prof. Dr.-Ing. Irina Smirnova
- Prüfungsvorsitzende: Prof. Dr.-Ing. Kerstin Kuchta

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2018

Publikationsliste

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

S. Baum, E. Ritter, I. Smirnova, M. Schilling, A. Liese; "The role of phase behavior in the enzyme catalyzed synthesis of glycerol monolaurate"; RSC Advances; **2016**; 6(38); pp 32422-32429

S. Baum, Dr. M. Schilling, Dr. D. Sellin, Prof. A. Liese; "Steuerung der Reaktionsselektivität von Biotransformationen mittels Online-FTIR-Analytik"; Chem. Ing. Tech.; **2014**; 86 (9); pp 1574-1592

Müller, Jakob; Baum, Soeren; Hilterhaus, Lutz; Eckstein, Marrit; Thum, Oliver; Liese, Andreas "Simultaneous Determination of Mono-, Di- and Triglycerides in Multiphase Systems by Online FT-IR Spectroscopy"; Analytical Chemistry; **2011**; 83 (24); pp 9321-9327

Buchkapitel

S. Baum, J. J. Mueller, L. Hilterhaus, M. Eckstein, O. Thum, A. Liese; "The Bubble Column Reactor: A Novel Reactor Type for Cosmetic Esters"; Applied Biocatalysis - From Fundamental Science to Industrial Application; editors: L. Hilterhaus, A. Liese, U. Kettling, G. Antranikian; Wiley-VCH; **2015**

Vorträge auf Fachkonferenzen

ProcessNet-Jahrestagung und 31. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Karlsruhe, Deutschland; "Control of Regioselectivity in Biotransformation by online FTIR Analysis", S. Baum, M. Schilling, D. Sellin, W. Streit, A. Liese; **2014**

BIOKATALYSE2021 Cluster-Jahrestreffen, Hamburg, Deutschland; "Steuerung der Reaktionsselektivität der biokatalytischen Fettsäureestersynthese"; S. Baum, Dr. M. Schilling, Dr. D. Sellin, Dr. J. Chow, Prof. Dr. rer. nat. W. Streit, Prof. Dr. rer. nat. A. Liese; **2014**

Posterpräsentationen

Biocat2014, Hamburg, Deutschland; "Online Control of Fed Batch Biotransformation by FTIR Analysis - A Useful Tool for Process Analysis Control Technology (PACT) -"; S. Baum, H. Berger, D. Sellin, M. Schilling, J. Chow, W. Streit, A. Liese; **2014**

Biomaterials – Made in Bioreactors, Radebeul, Deutschland; "Online Process Control of a Fed-Batch Bioconversion by Means of ATR-FTIR Spectroscopy"; S. Baum, M. Schilling, D. Sellin, L. Hilterhaus, A. Liese; **2014**

EuroPACT - 3rd European Conference on Process Analytics and Control Technology, Barcelona, Spanien; "In situ process control of a fed-batch biotransformation by means of ATR-Fourier Transform Infrared spectroscopy"; S. Baum, M. Schilling, F. Cabirol, D. Sellin, L. Hilterhaus, A. Liese; **2014**

6th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry, Karlsruhe, Deutschland; "Monitoring of glyceride synthesis in multiphase system by ATR-Fourier transform infrared spectroscopy"; S. Baum, M. Schilling, F. Cabirol, L. Hilterhaus, A. Liese; **2013**

ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologie, Karlsruhe, Deutschland; "Analysis of the reaction selectivity for a multiphase system by online Fourier transform infrared spectroscopy"; S. Baum, J.J. Mueller, O. Thum, M. Eckstein, L. Hilterhaus, A. Liese; **2012**

Biocat2012, Hamburg, Deutschland; "In situ differentiation between mono-, di-, and triglycerids in multiphase system by online Fourier Transform Infrared spectroscopy"; S. Baum, J. J. Müller, O. Thum, M. Eckstein, L. Hilterhaus, A. Liese; **2012**

Abstract

Mono und –diacylglyceride (MAGs & DAGs) sind industriell bedeutende funktionelle Inhaltsstoffe mit einer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie. Verbraucher und Chemiekonzerne sind zudem auf der Suche nach einen nachhaltigeren Syntheseweg. Hierbei stehen Ressourcen- und Energieersparnisse sowie der verwendete Katalysator im Vordergrund. Es besteht aber aus industrieller Sicht zurzeit die größte Herausforderung in einer direkten lösungsmittelfreien Synthese von hochreinen MAGs oder DAGs, und zwar aufgrund des Phasenverhaltens der Reaktionssysteme und der daraus resultierenden geringen Reaktionsselektivitäten. In der vorliegenden Dissertation soll diese Herausforderung zusammen mit der im Zeitalter der vierten industriellen Revolution (Industrie 4.0) zunehmend wichtigen kontinuierlichen Prozessüberwachung und dem Bestreben, Produktionsprozesse zu automatisieren, bearbeitet werden. Um diese Prozessüberwachung und automatisierende -steuerung zu ermöglichen wird eine reproduzierbare Online-Analytik für Mehrphasenreaktionen benötigt, was aber mittels konventioneller in-situ Probenanalytik im Reaktor nicht ohne weiteres gewährleistet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch Anwendung von 5 Gew.-% des amphoteren Tensids Cocoamidopropyl-Betain (CAPB) in der Biokatalyse zum einen eine Steigerung der Selektivität um >10% von MAG aufgezeigt und zum anderen eine Steigerung der Löslichkeit von Glycerol um ca. 15 Mol.-% in der unpolaren Reaktionsphase. Dabei wurden im Reaktionsgleichgewicht MAG-Anteile von 64 Mol.-% erreicht (bezogen auf MAG + DAG +TAG in der lipiden Phase). Diese Ergebnisse sind vergleichbar zu dem Einsatz des organischen Lösungsmittels *tert*-Butanol. Durch den Einsatz von CAPB wurde die Reaktionsselektivität bezüglich Glycerolmonolaurat bei der enzymatischen Veresterung von Glycerol und Laurinsäure um 9 % und bei der enzymatischen Glycerolyse von Glyceroltrilaurat um 17 % gesteigert im Vergleich zur lösungsmittelfreien Reaktion. Des Weiteren wurden in dieser Arbeit erste Schritte in Richtung Digitalisierung und Automatisierung unternommen. Mit der Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) unter Anwendung des Messprinzips der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) wurde eine Online-FTIR-Analytik erfolgreich etabliert und zur Prozesssteuerung einer einphasigen Biotransformation von 1-Decanol und Laurinsäure verwendet. Hierbei wurde die Zulauftrate von 1-Decanol bei der Fed-Batch Biotransformation diskontinuierlich und kontinuierlich gesteuert. Ebenso war es mit Einschränkungen auch möglich die Mehrphasenreaktionen online zu überwachen. Hierbei gelang es die Reaktionsteilnehmer Glycerol, Laurinsäure, sowie die Partialglyceride Glycerolmono-, -di und –trilaurat simultan durch die chemometrische Modellierung mit Partial-Least-Squares Regression (PLS) und Indirect Hard Modellierung (IHM) in der lipiden Reaktionsphase mit einem Vorhersagefehler RMSEP < 6 Mol.-% mittels ATR-FTIR-Spektroskopie online zu verfolgen. Die Einschränkungen ergaben sich bei der Messung im Gesamtsystem bei Reaktionen mit Glycerol im Überschuss. Hierbei sind die Vorhersagefehler RMSEP auf über 15 Mol.-% angestiegen. Der Grund dafür ist die Kombination der ATR-Messmethode und des Phasenverhaltens des Systems, wodurch eine reproduzierbare Messung nicht mehr gewährleistet werden kann.

Auf Basis der Ergebnisse aus beiden Teilen dieser Arbeit konnte die Möglichkeit einer reproduzierbaren Online-Analytik im gesamten Mehrphasenreaktionssystem durch den Einsatz von CAPB und die dadurch bedingte Veränderung des Phasenverhaltens, die zur Steigerung der Selektivität bzgl. Glycerolmonolaurat führte, gezeigt werden.

Ich danke...

Herrn Prof. Andreas Liese für die interessante Aufgabenstellung, das Vertrauen und die umfangreiche Unterstützung.

Frau Prof. Irina Smirnova für die Übernahme des Zweitgutachtens und die hilfreiche Begleitung meiner Arbeit.

Frau Prof. Kerstin Kuchta für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Martin Schilling für die sehr gute Zusammenarbeit und die Unterstützung von Seiten der Evonik Industries AG.

Dr. Jennifer Chow und Prof. Wolfgang Streit von der Universität Hamburg für die tolle Zusammenarbeit innerhalb unseres Projektes „Steuerung der Reaktionsselektivität der biokatalytischen Fettsäureestersynthese“.

Dr. Daniel Sellin, Dr. Joscha Kleber, Katharina Ule und Janine Baum für die Korrektur der Arbeit und die vielen hilfreichen Anregungen.

Dr. Thomas Gerlach und Dr. Erich Ritter vom Institut Thermische Verfahrenstechnik für deren inhaltlichen Input und Diskussionen zum Thema Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte.

dem gesamten Institut für Technische Biokatalyse für die lehrreiche und lustige Zeit.

meinen ehemaligen Bürokollegen Dr. Christian Scherkus und Dr. Bastian Kannengiesser für die unvergessliche Bürozeit. Ich vermisse diese Büroatmosphäre immer noch.

meinen Masterstudenten, Bachelorstudenten und Praktikanten M. Sc. Valentina Daskalova, M. Sc. Helge Berger, M. Sc. Elena Eßer, M. Sc. Yasmin Goes, B. Sc. Nadine Zerle, M Sc. Arul, M. Sc. Juan Viamonte, die entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

den Mitgliedern des BMBF Clusters „Biokatalyse 2021“ für die abwechslungsreichen Clustermeetings und Kooperationen.

den Kollegen aus den Instituten der Verfahrenstechnik an der TU Hamburg-Harburg für die interdisziplinäre Zusammenarbeit.

meiner gesamten Familie, die mir während meines Studiums und auch während des Abschlusses der Arbeit immer an meiner Seite gestanden hat.

meiner Frau Janine, die immer an mich geglaubt hat.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Enzyme als Biokatalysatoren	2
1.2 Lipasen und Esterasen (EC.3.1.1.3)	3
1.2.1 Immobilisierte Lipasen	4
1.3 Emulgatoren	5
1.3.1 Partialglyceride	6
1.4 Phasenverhalten	6
1.4.1 Modellierung des Flüssig-Flüssig-Gleichgewichts mit COSMO-RS	8
1.5 Vorstellung der Reaktionssysteme	9
1.5.1 Enzymatische Veresterung	9
1.5.2 Enzymatische Glycerolysis	13
1.6 Blasensäulenreaktor	14
1.7 IR-Spektroskopie	15
1.8 Chemometrie und multivariate Datenanalyse	17
1.8.1 <i>Partial least squares</i> -Algorithmus	18
1.8.2 <i>Indirect Hard Model</i> -Algorithmus	20
2 Stand der Technik	22
2.1 Übersicht der Strategien zur gezielten Synthese von MAG	22
2.2 Einsatz der FT-MIR Spektroskopie zur Online-Prozessüberwachung und -steuerung..	24
3 Motivation und Zielsetzung	26
4 Charakterisierung der untersuchten Reaktionssysteme	27
4.1 Veresterung von 1-Decanol mit Laurinsäure	28
4.1.1 Untersuchung der Modellreaktion	28
4.1.2 Batch-Reaktion	30
4.1.3 Fed-Batch-Reaktion	32
4.2 Synthese von Partialglyceriden	34
4.2.1 Veresterung von Glycerol mit Laurinsäure	34
4.2.2 Glycerolyse von Glyceroltrilaurat	37
4.3 Untersuchung des Phasenverhaltens	39
4.3.1 Binäre Systeme - T,x-Diagramm	39
4.3.2 Dreiecksdiagramm der ternäre Systeme	42
4.3.3 Verteilungskoeffizienten	44

4.4 Untersuchung der Acylmigration	47
4.5 Untersuchung der Mehrphasenreaktionen	50
4.5.1 Veresterung von Glycerol und Laurinsäure	50
4.5.2 Glycerolyse von Glyceroltrilaurat	68
4.5.3 Vergleichende Diskussion Veresterung und Glycerolyse	72
5 Optimierung der Reaktionen bezüglich Glycerolmonolaurat.....	73
6 Online-Analyse der Reaktionssysteme mittels FTIR-Spektroskopie	82
6.1 Einführung in die FTIR-Spektroskopie und Chemometrie für die Reaktionssysteme....	82
6.2 Auswertung mittels Partial Least Squares-Algorithmus (PLS).....	85
6.2.1 Veresterung von Glycerol und Laurinsäure im Überschuss	86
6.2.2 Veresterung von Glycerol im Überschuss und Laurinsäure	90
6.2.3 Veresterung von Glycerol und Laurinsäure als Fed-Batch Reaktion mit Laurinsäurezufuhr	95
6.2.4 Glycerolyse von Glyceroltrilaurat	100
6.3 Auswertung mittels Indirect Hard Modeling - IHM.....	106
6.3.1 Veresterung von Glycerol und Laurinsäure im Überschuss	107
6.3.2 Veresterung von Glycerol im Überschuss und Laurinsäure	112
6.3.3 Veresterung von Glycerol und Laurinsäure als Fed-Batch Reaktion mit Laurinsäurezufuhr	117
6.3.4 Glycerolyse von Glyceroltrilaurat	121
6.4 Vergleich PLS – IHM.....	126
7 Prozesssteuerung einer Fed-Batch Veresterung	128
7.1 Kalibrierung und Validierung des chemometrischen Modells	129
7.2 Diskontinuierliche Prozesssteuerung	131
7.3 Kontinuierliche Prozesssteuerung.....	135
8 Übergreifende Diskussion & Ausblick	139
9 Zusammenfassung.....	145
Anhang	147
A Material & Methoden	147
A.1 Materialien.....	147
A.1.1 Chemikalien.....	147
A.1.2 Geräte	147
A.2 Methoden.....	148
A.2.1 Analytikmethoden.....	148
A.2.2 Chemometrie	153

A.2.3 Synthesen.....	157
B Symbol- und Abkürzungsverzeichnis.....	159
C Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	161
C.1 Tabellenverzeichnis.....	161
C.2 Abbildungsverzeichnis.....	162
D Literaturverzeichnis	168

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird die biokatalytische Synthese von Fettsäureestern betrachtet. Sie werden als Emulgatoren in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie angewendet, beispielsweise in Lotionen und Cremes. Das Interesse sowohl aus Sicht der Chemiekonzerne, als auch der Verbraucher, diesen Syntheseweg „grün“ zu gestalten, wächst fortan. Nachwachsende Rohstoffe wie beispielsweise Fettsäuren, Glycerol oder Glycerolderivate stellen einige wenige Moleküle dar, die die Rohstoffbasis weg von Erdölkomponenten verschieben sollen [Biermann et al. 2011; Haas und Skerra 2008]. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Synthese von Fettsäureestern in einem Blasensäulenreaktor betrachtet [Hilterhaus et al. 2008]. Es wurde detailliert die Reaktion von Glycerol und einer Fettsäure oder eines Glyceroltriglycerids untersucht. Bei dieser Art von Reaktionen entsteht eine Vielzahl von Glycerolpartialglyceriden als mögliche Produkte. Dabei ist es von großem Interesse ein bestimmtes Produktverhältnis von Glycerolmono-, di- und triglyceriden oder eine hohe Reinheit bezüglich eines Glycerolpartialglycerids zu erhalten. Insbesondere das Glycerolmonoglycerid ist dabei interessant aufgrund seiner bevorzugten Emulgierfähigkeit. In der USA werden beispielsweise 85000 Tonnen Glycerolmono- und diglyceride jährlich verbraucht [Zhong et al. 2014]. Die Reaktionsselektivität spielt hierbei eine übergeordnete Rolle. In dieser Arbeit wird durch die Charakterisierung des Reaktionsmechanismus und durch die Betrachtung des Phasenverhaltens der Reaktionssysteme ein besseres Verständnis für die Reaktionsselektivität bei der gezielten Synthese von Glycerolmonoglyceriden erhalten. Die Untersuchungen wurden zusätzlich durch die Anwendung der FTIR-Spektroskopie unterstützt. Die Online-FTIR-Analytik ermöglicht es dabei, direkt aus dem Reaktor Informationen in Echtzeit zu gewinnen und die Daten für eine Prozesssteuerung zu nutzen. Die Grundlagen für das Verständnis der Arbeit werden in dieser Einleitung dargestellt. In den einzelnen Ergebniskapiteln werden die zum Verständnis nötigen theoretischen Grundlagen separat eingeführt. In der Einleitung wird nur kurz auf die in Abbildung 1.1 dargestellten Themen eingegangen:

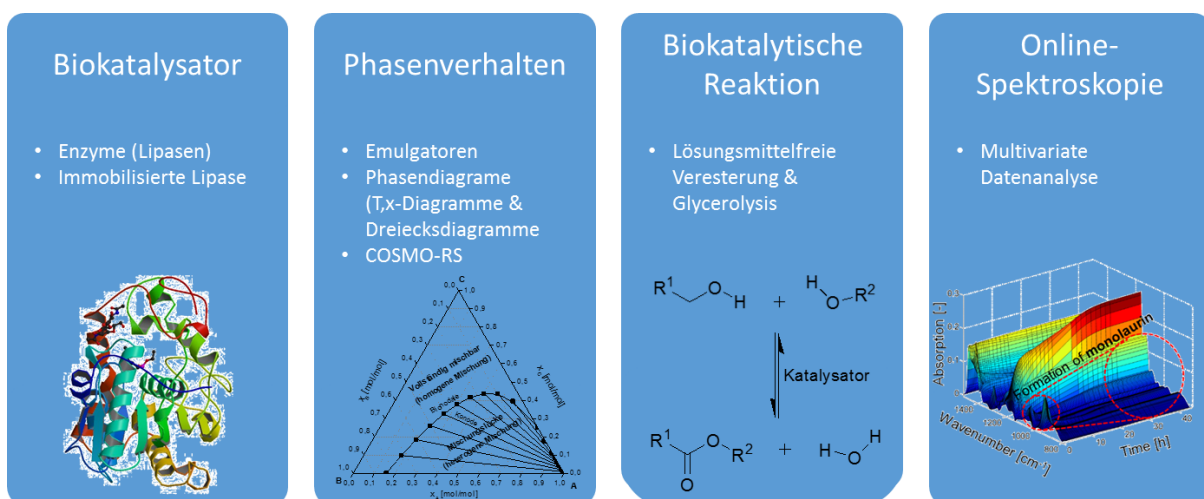


Abbildung 1.1: Themendarstellung in der Einleitung

1.1 Enzyme als Biokatalysatoren

Bei der chemischen Reaktion zwischen Molekülen, beispielsweise in lebenden Zellen, müssen einerseits die Reaktionspartner chemisch kompatibel zueinander sein und zusätzlich eine bestimmte Energie aufweisen, damit es zur Reaktion kommen kann. Diese Energie wird Aktivierungsenergie genannt und ist entscheidend dafür, ob die Reaktion zwischen den Molekülen stattfinden kann. Die Aktivierungsenergie muss für eine Reaktion überwunden werden. Katalysatoren dienen hierbei als Reaktionsbeschleuniger, indem sie die Aktivierungsenergie durch das vorübergehende Binden an die Substrate und die dadurch verbundene chemische Modifikation der Moleküle, herabsetzen (siehe Abbildung 1.2) [Bisswanger 2000].

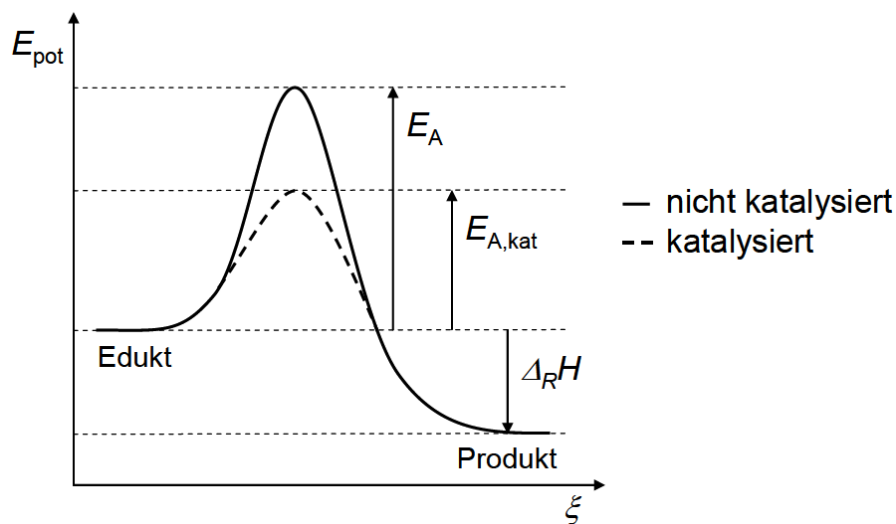


Abbildung 1.2: Energiediagramm einer nicht katalysierten und einer katalysierten Reaktion. Die Energieniveaus von Edukt und Produkt, ihre Aktivierungsenergien E_A sowie die Reaktionsenthalpie $\Delta_R H$ sind in Abhängigkeit der Reaktionskoordinate ξ aufgetragen [K. Goldberg 2005].

Ein weiteres Charakteristikum von Katalysatoren ist, dass sie aus einer chemischen Reaktion ohne Veränderung hervorgehen. Neben der großen Vielfalt an chemischen Katalysatoren, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, gibt es eine große Vielzahl an Biokatalysatoren (Enzyme). Enzyme sind Proteine, die aus Aminosäuren bestehen und über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind und so eine spezifische räumliche Struktur bilden. Sie können aufgrund ihrer spezifischen Struktur mit einer Vielzahl von Molekülen reagieren. Das aktive Zentrum des Enzyms, welches aus spezifischen Aminosäureresten besteht, ist der Bereich des Proteins, an der die Reaktion stattfindet. Während der Reaktion binden dort die Substrate und es wird vorübergehend ein Enzym-Substrat-Komplex gebildet. Zwischen den Aminosäuren und dem gebundenen Substrat kommt es zu Ladungsübergängen. Somit kommt es zu einer Veränderung der Moleküle (Abspaltung und Einbindung von Atomen und Molekülen) und das Produkt wird gebildet und im Anschluss freigesetzt. Nach der Reaktion tritt das Enzym unverändert im Ausgangszustand aus der chemischen Reaktion hervor und kann weitere Reaktionen katalysieren. Biokatalysatoren besitzen im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren meist eine ausgeprägte Reaktionsselektivität aufgrund der vielfältigen Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum. Somit kann eine starke Selektivität der

Substrate erreicht werden [Löffler und Petrides 2013]. Je nach den Reaktionen, die Enzyme katalysieren, sind diese in sechs Enzymklassen einzuteilen (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Einteilung der Enzymklassen [Liese et al. 2006].

Enzymklasse	Reaktionstyp	Beispiel
1. Oxidoreduktasen	Oxidations-/Reduktions-Reaktionen	Oxidase
2. Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen	Transaminase
3. Hydrolasen	Hydrolyse Reaktion	Lipase/Esterase
4. Lyasen	Spaltung/Bildung von Bindungen: C-C, C-O, C-N	Aspartase
5. Isomerasen	Isomerisierungs-Reaktion	Glucose-Isomerase
6. Ligasen	Spaltung/Bildung von Bindungen unter Energieverbrauch: C-C, C-O, C-N	DNA-Ligase

In der vorliegenden Arbeit wird mit Lipasen gearbeitet. Diese gehören zur dritten Enzymklasse, der Hydrolasen. Sie stellen für die Industrie eine wichtige Untergruppe dar. Im folgenden Unterkapitel wird auf die Lipasen und deren Besonderheiten eingegangen.

1.2 Lipasen und Esterasen (EC.3.1.1.3)

Lipasen und Esterasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen und stellen eine wichtige Untergruppe dar. Mehrere Eigenschaften machen die Lipasen zu sehr interessanten Biokatalysatoren in der Chemie. Sie besitzen ein sehr großes Substratspektrum, sind sehr stereo-, regio- und enantioselektiv und sie katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen. Lipasen und Esterasen katalysieren Hydrolyse-, Veresterungs-, Glycerolyse-, Alkohololyse- und Umesterungsreaktionen [Bornscheuer 2000]. In der Natur übernehmen Hydrolasen eine wichtige Funktion für die Verdauung, denn sie brechen größere Moleküle zu kleineren auf. Lipasen beispielsweise hydrolysieren Lipide (Triglyceride) unter Wasserverbrauch zu Glycerol und Fettsäuren [Bornscheuer und Kazlauskas 2006]. Eine bedeutende Rolle nehmen sie in industriellen Prozessen ein, wie z. B. der Veresterung von Fettsäuren und Alkoholen zur Synthese von Esterverbindungen, die beispielsweise als Emulgatoren ihre Verwendung finden. Bei der biokatalytischen Reaktion spielt die katalytische Triade aus den Aminosäuren Asparagat, Histidin und Serin eine wichtige Rolle [Kraut 1977]. Durch einen Protonenentzug wird das Serin katalytisch aktiv und das Nucleophil greift am Carboxylkohlenstoff einer Carbonsäure an, wodurch ein Enzym-Substrat-Komplex entsteht und Wasser gebildet wird. Letztlich reagiert die Hydroxylgruppe des zweiten Substrates Alkohol mit dem Enzym-

Substrat-Komplex und es wird das Produkt Carbonsäureester gebildet und das ursprüngliche Enzym wird wieder frei.

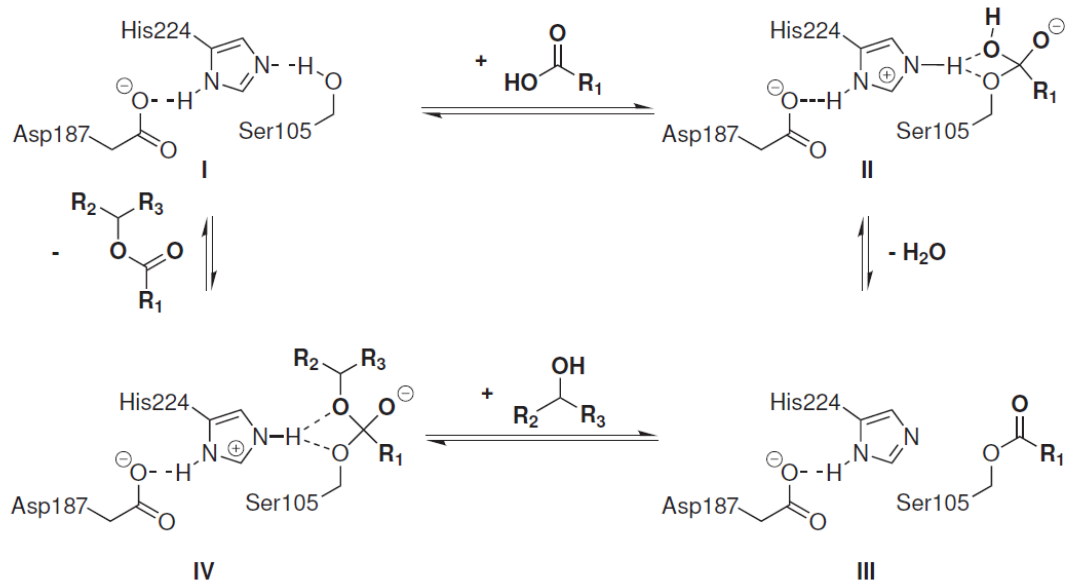


Abbildung 1.3: Reaktionsmechanismus einer enzymatischen Veresterung durch eine Lipase/Esterase. Unter Wasserabspaltung wird aus der Säure und dem Alkohol ein Ester über die drei Aminosäuren Asparagat, Histidin und Serin gebildet [Hilterhaus 2007].

Lipasen und Esterasen können basierend auf ihrer Spezifität und Selektivität in drei Gruppen eingeteilt werden [Bornscheuer 2000]:

1. Regiospezifische Lipasen
2. Fettsäurespezifische Lipasen
3. Lipasen, welche spezifisch für bestimmte Acylglycerine sind, z. B. Mono-, Di- oder Triacylglyceride.

Lipasen werden außerdem in vielen anderen Industriezweigen angewendet. In der Herstellung von Waschmitteln werden beispielsweise durch Lipasen wichtige Detergenzien synthetisiert. Für die Kosmetikindustrie sind die Modifikation von natürlichen Fetten und Ölen und die Synthese von Zuckerestern und einfachen Estern zur Herstellung von Kosmetikinhaltsstoffen wichtig. So werden beispielsweise Moleküle, die als Konsistenzgeber in Cremes dienen, enzymatisch produziert [Thum 2004; Buchholz et al. 2012]. Biokatalysatoren machen einen großen Anteil der Produktionskosten aus, da sie vergleichsweise teure Katalysatoren sind. Die Wiederverwendbarkeit der Katalysatoren und die damit verbundenen Kosteneinsparungen sind wichtige Kriterien für die Industrie. Daher werden Enzyme auf unterschiedlichsten Trägermaterial immobilisiert.

1.2.1 Immobilisierte Lipasen

In industriellen Prozessen ist der Einsatz von Biokatalysatoren oftmals eine große Herausforderung. Einen nicht unerheblichen Anteil an den Prozesskosten stellen die

Enzymkosten dar. Außerdem können freie Enzyme oftmals nur mit hohem technischem Aufwand aus dem Reaktionsmedium abgetrennt werden [Hopp 2000]. Membrantechnologien ermöglichen eine Methode zur Zurückhaltung von freien Enzymen. Dabei ergeben sich jedoch durch starke Druckverluste im System verursacht durch die hohe Viskosität der Prozessflüssigkeit oftmals erhebliche Probleme. Die Immobilisierung eines Katalysators auf einen inerten Träger ist eine attraktive Alternative. Dadurch können Biokatalysatoren effizienter abgetrennt und wiederverwendet werden [Liese et al. 2006]. Zusätzlich kann durch die Immobilisierung neben der Wiederverwendbarkeit auch die Stabilität des Enzyms in vielen Fällen erhöht werden. Es haben sich verschiedene Methoden zur Immobilisierung von Enzymen etabliert. Es kann bei der Immobilisierung zwischen adsorptiver, ionischer, kovalenter Bindung, sowie der Quervernetzung (cross linked enzyme aggregate: CLEA) und dem Einschluss von Enzymen in eine Matrix unterschieden werden [Buchholz et al. 2012]. In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich das Immobilisat Novozym 435® verwendet. Dabei liegt die Lipase B aus *Candida antarctica* adsorptiv auf einem porösen Polymethacrylat-Träger vor.

1.3 Emulgatoren

Eine Emulsion ist eine kolloidale Dispersion, in der eine Flüssigkeit in Form von kleinen Tröpfchen in einer weiteren kontinuierlichen Flüssigkeitsphase dispergiert ist. Aufgrund unterschiedlicher Polaritäten sind beide Flüssigkeiten nicht miteinander mischbar [Schramm 2006]. Oftmals ist die eine Flüssigkeit aufgrund von z. B. Hydroxylfunktionen eine polare Komponente wie Wasser und die andere Flüssigkeit aufgrund von Kohlestoffwasserketten eine unpolare Komponente wie Öl. So wird grundsätzlich zwischen zwei Typen der Emulsion unterschieden [Möbius et al. 2001]:

- Öl in Wasser (O/W) Emulsion, in der Öltröpfchen in Wasser dispergiert sind und
- Wasser in Öl (W/O) Emulsion, in der Wassertröpfchen in Öl dispergiert sind.

Unter Einbringung von Energie, z. B. durch das Mischen mit einem Rührorgan, kann die Emulsion stabilisiert werden, sodass die Tröpfchen homogen im System dispergiert sind. Sobald die Emulsion jedoch in einer Ruhephase ist, kommt es zur Koaleszenz der Tröpfchen bis sich beide Phasen komplett entmischt haben. Der Einsatz von Emulgatoren kann dieses Phänomen beeinflussen. Emulgatoren sind grenzflächenaktive Moleküle, die sich grundsätzlich aus zwei funktionellen Gruppen zusammensetzen, wobei die eine Gruppe hydrophile und die andere Gruppe hydrophobe Eigenschaften besitzt. Aufgrund des amphiphilen Charakters lagern sich Emulgatoren bevorzugt an der Grenzfläche zweier nicht mischbaren Flüssigkeiten an (siehe Abbildung 1.4).

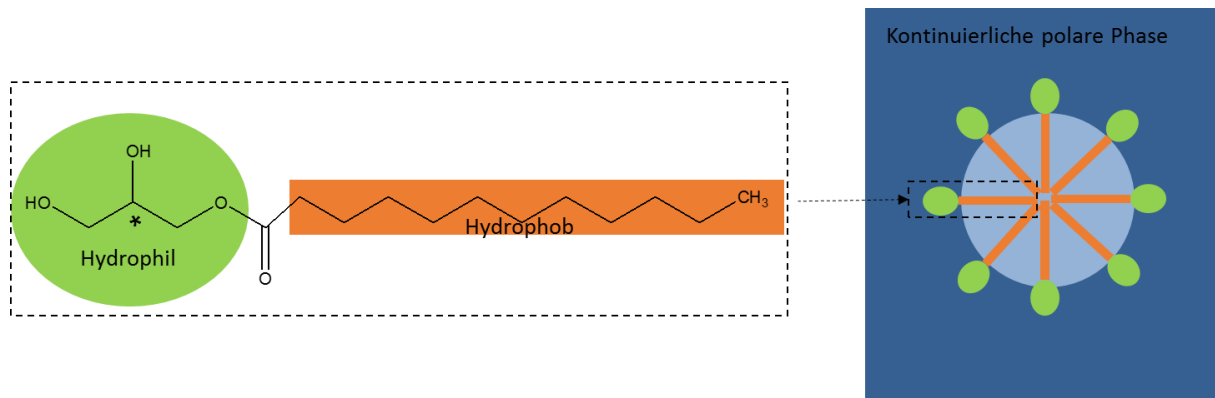


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines Emulgators anhand Glycerol-1-monolaurats (links). Der Glycerolrest stellt den hydrophilen Kopf dar und die C11-Kette stellt den hydrophoben Teil dar. Aufbau einer Mizelle (rechts).

Durch die charakteristische Struktur der Emulgatoren und deren Oberflächenaktivität wird die Grenzflächenspannung beider Phasen reduziert und die Emulsion erheblich stabilisiert [Hasenhuettl 2008]. Durch das Charakteristikum dieser Moleküle wird die Bedeutung für die Industrie deutlich. In unterschiedlichsten Industriezweigen sind Emulgatoren unverzichtbar [Bährle-Rapp 2013]. Beispielsweise werden diese in der Lebensmittelindustrie bei der Herstellung von Margarine verwendet oder in der Kosmetikindustrie als Konsistenzgeber in Cremes und Duschgelen zugesetzt. Industriell wichtige Emulgatoren stellen Partialglyceride dar.

1.3.1 Partialglyceride

Partialglyceride sind Moleküle, deren Basis Glycerol ist und mindestens eine Hydroxylfunktion des Glycerols frei ist, also nicht verestert ist (siehe Abbildung 1.4). Dazu gehören Glycerolmono- und diacylglyceride. Eine wesentlich höhere Oberflächenaktivität weisen Glycerolmonoacylglyceride (MAG) im Gegensatz zu Glyceroldiacylglyceriden (DAG) auf, da MAG zwei freien Hydroxylfunktionen besitzt. Glycerolmono- und diacylglyceride aus Speisefetten sind die am meisten verwendeten Emulgatoren (75% Anteil) in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie [Zhong et al. 2014]. Sie sind weltweit als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen und gehören in Europa der Zusatzstoffklasse E471 an [Negi 2006]. Glycerolmonoacylglyceride können als oberflächenaktive Substanzen das Phasenverhalten eines Mehrphasensystems beeinflussen.

1.4 Phasenverhalten

Das Phasenverhalten der Mehrkomponentensysteme kann unter Zuhilfenahme von sogenannten T,x-Diagrammen (siehe Abbildung 1.5; T: Temperatur, x: Molenbruch) für binäre Systeme, sowie Dreiecksdiagrammen (siehe Abbildung 1.6) für ternäre Systeme beschrieben werden. Das Flüssig-Flüssig-Gleichgewicht eines binären Systems für Komponente A und B ist in Abbildung 1.5 durch ein T,x-Diagramm dargestellt. Die Löslichkeitskurve trennt den Bereich

der Mischungslücke (heterogene Mischung) vom homogenen Bereich mit vollständiger Mischbarkeit. Im Bereich der Mischungslücke zerfallen die Mischungspunkte in zwei koexistierende Phasen entlang einer waagerechten Konoden in eine A-reiche Phase und eine B-reiche Phase [Baehr und Kabelac 2012]. Die Zusammensetzung beider koexistierenden Phasen innerhalb der Mischungslücke bleibt konstant bei einer Temperatur. Es ändern sich jeweils nur die Volumina der beiden Phasen. Das vorliegende T,x -Diagramm ist ein T,x -Diagramm mit oberer kritischer Entmischungstemperatur. Eine Temperaturerhöhung bewirkt in diesem Fall eine Verkleinerung der Mischungslücke. Beim Erreichen der kritischen Entmischungstemperatur werden beide Phasen identisch [Lüdecke und Lüdecke 2013].

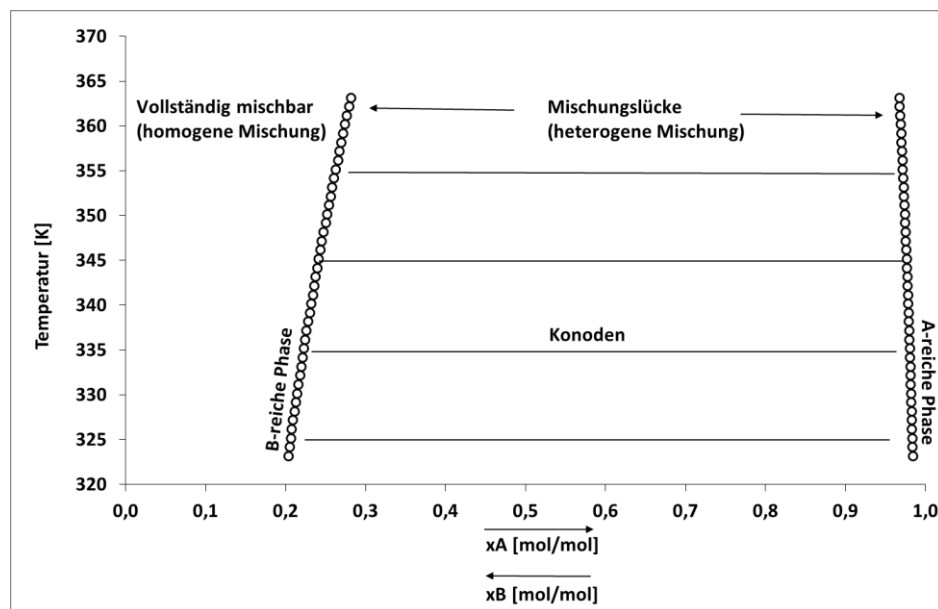


Abbildung 1.5: T,x -Diagramm Ausschnitt für ein binäres System aus den Komponenten A, B.

Die Darstellung der Zusammensetzung von Dreikomponentensystemen (beispielsweise Komponente A, B und C), sogenannten ternären Systemen, erfolgt in einem gleichseitigen Dreieck. Hierbei entsprechen die Eckpunkte des Dreiecks den Reinstoffkomponenten A, B und C des ternären Systems. Entlang der Dreiecksseite ändert sich der Molenbruch der Komponenten bis zur nächsten Ecke. Die Seiten des Dreiecksdiagramms beschreiben die jeweiligen binären Systeme bei konstanter Temperatur und Druck. Der Bereich innerhalb des Dreiecks stellt die Zusammensetzung des ternären Gemisches dar und die Dreiecksseite \overline{AB} in Abbildung 1.6 das binäre System für die Komponenten A und B bei einer konstanten Temperatur (siehe Abbildung 1.5). In diesem binären System existieren im Gleichgewicht eine A-reiche Phase und eine B-reiche Phase, in der anteilig die Komponente A gelöst ist. Das binäre System \overline{BC} ist beispielsweise vollständig ineinander mischbar bei dieser konstanten Temperatur und diesem Druck. Wird diesem binären System \overline{AB} nun die Komponente C hinzugefügt, verteilt sich die Komponente C entlang der Konoden in zwei koexistierende Phasen. Die Konoden verbinden jeweils die Zustandspunkte der beiden Phasen [Baehr und Kabelac 2012]. Werden alle Endpunkte der Konoden miteinander verbunden ergibt sich die Binodale. Diese trennt den homogenen Bereich mit vollständiger Mischbarkeit von dem Bereich der Mischungslücke, welches eine heterogene Mischung ist, ab. Im Bereich der

Mischungslücke liegt ein Zweiphasengebiet vor, in dem Mischungspunkte entlang der Konoden zu zwei koexistierenden Phasen zerfallen. Dabei ist Zusammensetzung der beiden koexistierenden Phasen für eine Konode konstant. Es ändert sich jeweils nur die Volumina der beiden Phasen [Lüdecke und Lüdecke 2013].

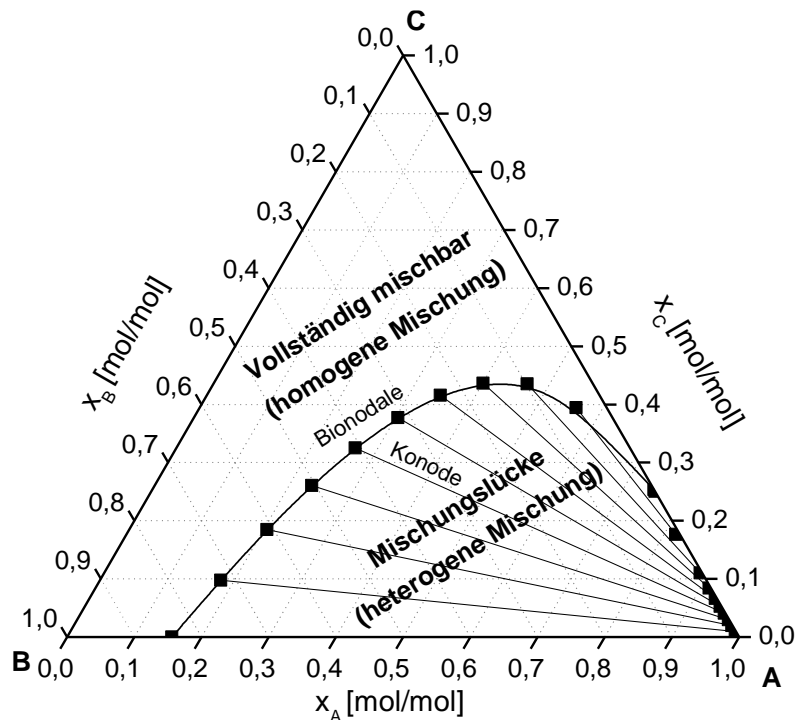


Abbildung 1.6: Dreiecksdiagramm für ein ternäres System aus den Komponenten A, B, C bei konstanter Temperatur und Druck.

1.4.1 Modellierung des Flüssig-Flüssig-Gleichgewichts mit COSMO-RS

COSMO-RS (kurz für „Conductor-like screening model“ für „real solvents“) basiert auf Berechnung der Quantenchemie und der statistischen Thermodynamik und wird für die Modellierung von molekularen Wechselwirkungen von Molekülen in flüssigen Systemen genutzt [Klamt 1995, 2018; Klamt und Eckert 2000; Klamt et al. 2009; Klamt et al. 1998]. Die COSMO-Berechnungen liefert die Ladungsdichte s , aus der anhand der Häufigkeitsverteilung die Verteilungsfunktion der Ladungsdichte $P(s)$ erstellt werden kann. Das Verteilungsprofil (σ -Profil) ist für jedes Molekül individuell [Buggert 2008].

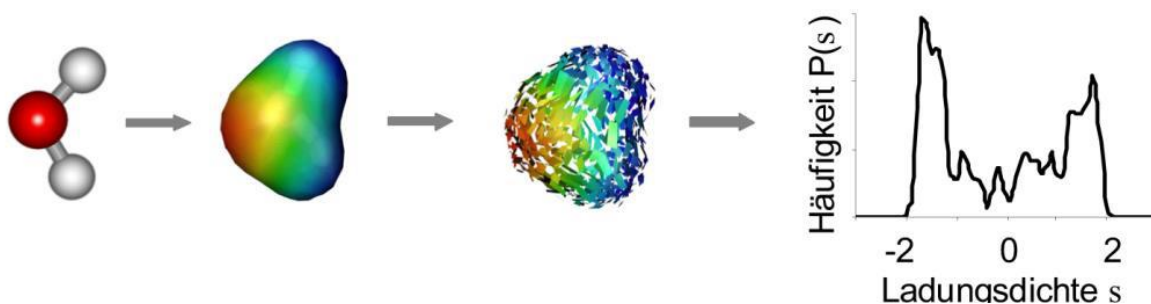


Abbildung 1.7: Entstehung des Sigma-Profiles von Wasser aus der Molekülstruktur [Spuhl et al. 2003].

Abbildung 1.7 zeigt beispielhaft das Vorgehen zur Berechnung des σ -Profils für Wasser. Im Wassermolekül tragen die Wasserstoffatome eine positive Partialladung, welche im σ -Profil durch den negativen Peak dargestellt wird. Das Sauerstoffatom besitzt eine negative Partialladung im Wassermolekül und trägt entsprechend zum positiven Peak im σ -Profil bei. Die Ergebnisse der COSMO-RS Berechnung liefern letztlich ein pseudochemisches Potenzial μ_i der Komponente i in der Mischung, aus der dann Aktivitätskoeffizienten berechnet werden können. Damit können Vorhersagen bezüglich Verteilungskoeffizienten und Phasengleichgewichten getroffen werden [Buggert 2008].

1.5 Vorstellung der Reaktionssysteme

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Lipase-katalysierte Reaktionssysteme eingehend und näher betrachtet. Dabei wurde jeweils die Lipase B aus *Candida antarctica* als Immobilisat Novozym 435® (NVZ 435®) verwendet.

Bei der Untersuchung der Reaktionen mit Glycerol als Triol wurde die Reaktionsselektivität in zwei Reaktionsmechanismen – der Veresterung und der Glycerolysis - untersucht. Diese ist bei der Reaktion mit dem dreiwertigen Alkohol Glycerol und Laurinsäure als gesättigte Fettsäure oder Glyceroltrilaurat (TL) als Triacylglycerid von großem Interesse, da hier aufgrund der drei Hydroxylfunktionen des Glycerols mehrere Produkte entstehen können. Die Reaktionsselektivität gibt Aufschluss darüber, wie selektiv bei der Reaktion ein Hauptprodukt von mehreren möglichen Produkten gebildet wird.

Anhand der Veresterung von 1-Decanol als Monoalkohol und Laurinsäure als Fettsäure wurde eine Online-Prozesssteuerung mittels Fourier Transform Infrarot Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie) etabliert. Im Folgenden werden diese Reaktionssysteme vorgestellt.

1.5.1 Enzymatische Veresterung

Bei der Lipase-katalysierten Veresterung reagieren im aktiven Zentrum der Lipase ein Alkohol und eine Carbonsäure in einer reversiblen Gleichgewichtsreaktion in mehreren Zwischenstufen zu einem Carbonsäureester unter Abspaltung von Wasser (siehe Kapitel 1.2).

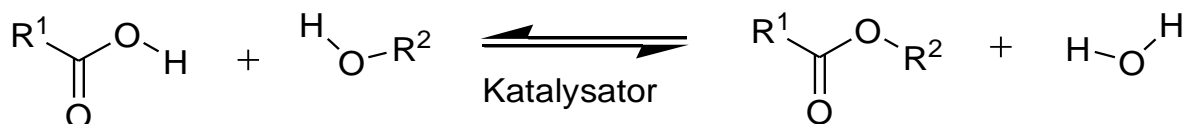


Abbildung 1.8: Vereinfachtes Reaktionsschema einer Veresterung.

Monoalkohol

Bei der enzymatischen Veresterung von 1-Decanol mit Laurinsäure spielt die Reaktionsselektivität keine Rolle, da 1-Decanol als Monoalkohol nur eine Hydroxylfunktion besitzt. Nach der Reaktion mit Laurinsäure entsteht neben Wasser das Hauptprodukt Decyllaurat. Das

Nebenprodukt Wasser wird in einem Blasensäulenreaktor durch Strippen mit trockener Luft aus dem Reaktionssystem ausgetragen. Somit verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht nach Le Chatelier auf die Seite der Produkte, in diesem Fall zu Decyllaurat. Dieses ist ein nicht-ionisches Tensid, welches als Weichmacher in der kosmetischen Industrie eingesetzt wird [Goldenberg 1971]. Das flüssige Reaktantengemisch ist bei der Reaktionstemperatur von 65 °C einphasig. Der heterogene Katalysator Novozym 435® liegt suspendiert im Reaktionssystem vor. 1-Decanol ist bei der Reaktion nicht nur Reaktionsteilnehmer, sondern auch Löslichkeitsvermittler für die Laurinsäure.

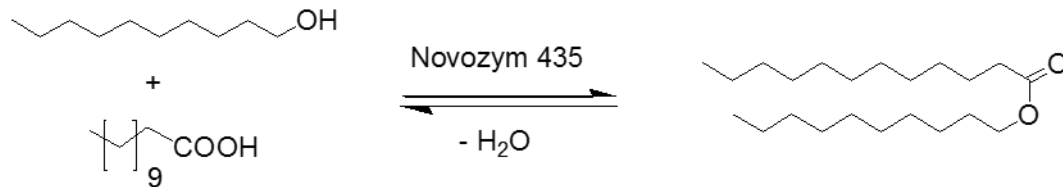


Abbildung 1.9: Reaktionsschema der enzymatischen Veresterung von 1-Decanol und Laurinsäure zu Decyllaurat. Das Reaktionswasser wird im Blasensäulenreaktor durch Strippen mit trockener Luft aus dem System ausgetragen, um das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite zu schieben.

Triol

Bei der Reaktion von Fettsäuren mit Glycerol als dreiwertigen Alkohol (Triol) entstehen Fettsäureglycerolester. Dabei wird zwischen Glycerolmono-, -di und triacylglyceriden unterschieden (MAG, DAG & TAG), je nach Anzahl der mit dem Glycerolmolekül veresterten Fettsäuremoleküle. Bei der enzymatischen Reaktion von Laurinsäure und Glycerol können demnach eine Vielzahl von Produkten entstehen (siehe Abbildung 1.13): Glycerol-1-monolaurat (1-ML), Glycerol-2-monolaurat (2-ML), Glycerol-1,2-dilaurat (1,2-DL), Glycerol-1,3-dilaurat (1,3-DL) und Glyceroltrilaurat (TL). Bei der Synthese von Monoacylglyceriden aus Glycerol und Laurinsäure ist die Reaktionsselektivität ein sehr wichtiger Parameter, der Informationen darüber liefert, wie selektiv die Synthese von MAG verläuft. Eine lösungsmittelfreie Synthese von hochreinem MAG ist kommerziell nicht realisierbar aufgrund der niedrigen Reaktionsselektivität bezüglich MAG und der geringen Mischbarkeit der Substrate Glycerol und Laurinsäure. Glycerol ist durch die drei Hydroxylfunktionen ein sehr polares Molekül, wohingegen die Laurinsäure durch die lange Kohlenstoffwasserkette (gesättigte C12-Fettsäure) ein unpolares Molekül darstellt. Die beiden Substrate sind im flüssigen Aggregatzustand nicht miteinander mischbar. Das Reaktantengemisch ist bei der Reaktionstemperatur von 65 °C zweiphasig und flüssig. Der unpolare heterogene Katalysator Novozym 435® liegt suspendiert in der unpolaren Phase und in der Grenzschicht zur polaren Glycerol-Phase vor.

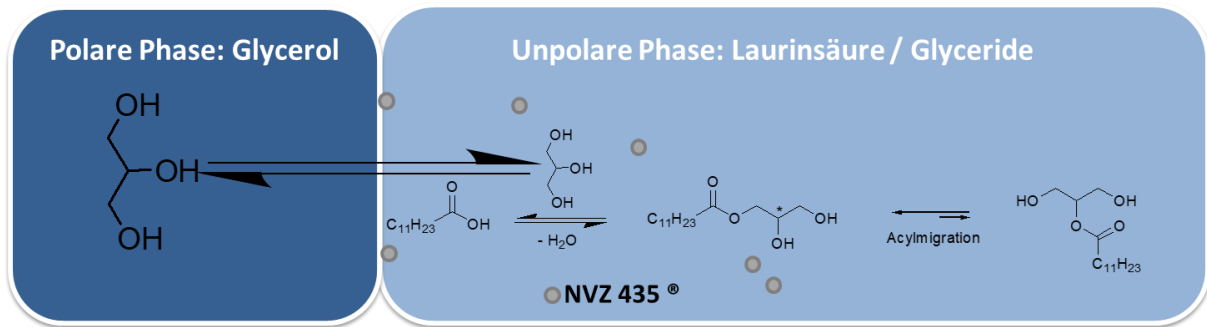


Abbildung 1.10: Vereinfachtes Reaktionsschema der enzymatischen Veresterung von Laurinsäure und Glycerol zu Glycerol-1-monolaurat (1-ML). Zusätzlich ist die Mehrphasigkeit des Reaktionssystems schematisch dargestellt (dunkelblau (links): polare Glycerol-Phase; hellblau (rechts): unpolare Phase). Als Nebenprodukte entstehen Glycerol-2-monolaurat (2-ML), Glycerol-1,2-dilaurat (1,2-DL), Glycerol-1,3-dilaurat (1,3-DL) und Glyceroltrilaurat (TL). Das Reaktionswasser wird im Blasensäulenreaktor durch Strippen mit trockener Luft aus dem System ausgetragen, um das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite zu schieben.

Bei der klassischen Veresterungsreaktion von Glycerol und Laurinsäure handelt es sich um eine konkurrierende Folgereaktion (detaillierte Darstellung in Kapitel 4). Die während der Reaktion entstehenden Fettsäureglycerolester ML, DL und TL sind nur in der unpolaren Laurinsäure-Phase löslich. Aufgrund der Molekülstruktur der Partialglyceride ML und DL steigt das Löslichkeitsvermögen von Glycerol in der unpolaren Phase während der Reaktion an (das Phasenverhalten der Reaktionssysteme wird in Kapitel 4 „Charakterisierung der Reaktionen“ detailliert untersucht).

Einschub: Konkurrierende Folgereaktionen

Durch folgendes Schema kann das System einer konkurrierenden Folgereaktion veranschaulicht werden [Hofmann et al. 1992]:



Für die Stoffmengenänderungsgeschwindigkeiten ergeben sich folgende Beziehungen:

$$r_1 = -k_1 c_1 c_2 = \frac{dc_1}{dt} \quad (3)$$

$$r_2 = -k_1 c_1 c_2 - k_2 c_3 c_2 = \frac{dc_2}{dt} \quad (4)$$

$$r_3 = k_1 c_1 c_2 - k_2 c_3 c_2 = \frac{dc_3}{dt} \quad (5)$$

$$r_4 = k_2 c_3 c_2 = \frac{dc_4}{dt} \quad (6)$$

Konzentration c $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$

Geschwindigkeitskoeffizient k $\left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{s}} \right]$

Reaktionsgeschwindigkeit r $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{s}} \right]$

Es ergeben sich Reaktionen von formal zweiter Ordnung, falls die Konzentrationen der Reaktionspartner in gleicher Größenordnung liegen. Drei Möglichkeiten der Reaktionsführung ergeben sich (vgl. Abbildung 1.11).

1. A2 wird vorgelegt und A1 wird langsam zugegeben (Fedbatch)

Hierbei reagiert das Zwischenprodukt A3 sofort weiter, weil A2 im Überschuss vorliegt. Der sich ergebende Konzentrationsverlauf ist qualitativ in Abbildung 1.12 links dargestellt.

2. A1 wird vorgelegt und A2 wird langsam zugegeben (Fedbatch)

Hierbei reagiert A2 in zwei Parallelreaktionen zu den Produkten A3 und A4 weiter. Der sich ergebende Konzentrationsverlauf ist qualitativ in Abbildung 1.12 rechts dargestellt.

3. A1 und A2 wird gleichzeitig in den Reaktor gegeben (Batch)

Auch hier reagiert A2 in zwei Parallelreaktionen zu den Produkten A3 und A4 weiter. Es ergibt sich also der gleiche Reaktionsverlauf wie in Option 2, weil die Parallelreaktionen bezüglich des Reaktanden A2 nach der gleichen Reaktionsordnung ablaufen.

Bei Parallelreaktionen mit gleicher Reaktionsordnung lässt sich die Produktverteilung nicht durch die Konzentrationsführung beeinflussen [Hofmann et al. 1992]. Eine Beeinflussung ist nur durch die Veränderung des Verhältnisses der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 möglich (z. B. durch Temperaturänderung oder Katalysatorwahl). Diese Betrachtungen gelten unter der Annahme eines einphasigen Reaktionssystems und unter Vernachlässigung der Rückreaktionen (Hydrolyse).

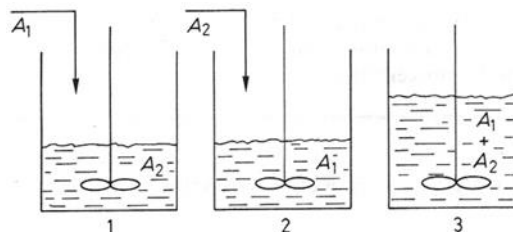


Abbildung 1.11: Unterschiedliche Reaktionsführung bei konkurrierenden Folgereaktionen; 1: A2 wird vorgelegt und A1 wird langsam zugegeben; 2: A1 wird vorgelegt und A2 wird langsam zugegeben; 3: A1 und A2 wird gleichzeitig in den Reaktor gegeben [Hofmann et al. 1992].

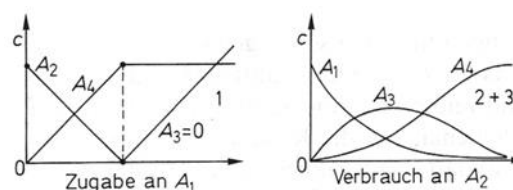


Abbildung 1.12: Konzentrationsverläufe entsprechend der Zugabe Strategien nach Abbildung 1.11 [Hofmann et al. 1992].

1.5.2 Enzymatische Glycerolysis

Eine weitere Alternative Partialglyceride, speziell Glycerolmonolaurat, zu synthetisieren, stellt die Glycerolyse von Glyceroltrilaurat dar. Bei der Glycerolyse handelt es sich um eine Umesterungsreaktion von Glyceroltrilaurat (TL) mit Glycerol zu den Partialglyceriden 1,2-DL, 1,3-DL, 2-ML und 1-ML. Die Glycerolyse ist verglichen zur klassischen Veresterungsreaktion eine parallel laufende Reaktion (detaillierte Darstellung in Kapitel 4). Bei der Glycerolyse liegt ebenfalls bei der Reaktionstemperatur von 65 °C ein mehrphasiges Reaktionssystem vor. Glycerol als eines der beiden Substrate stellt hierbei die polare Phase dar und TL als zweites Substrat die unpolare Phase. Der Biokatalysator NVZ 435® liegt suspendiert in der unpolaren Phase, sowie in der Grenzschicht vor.

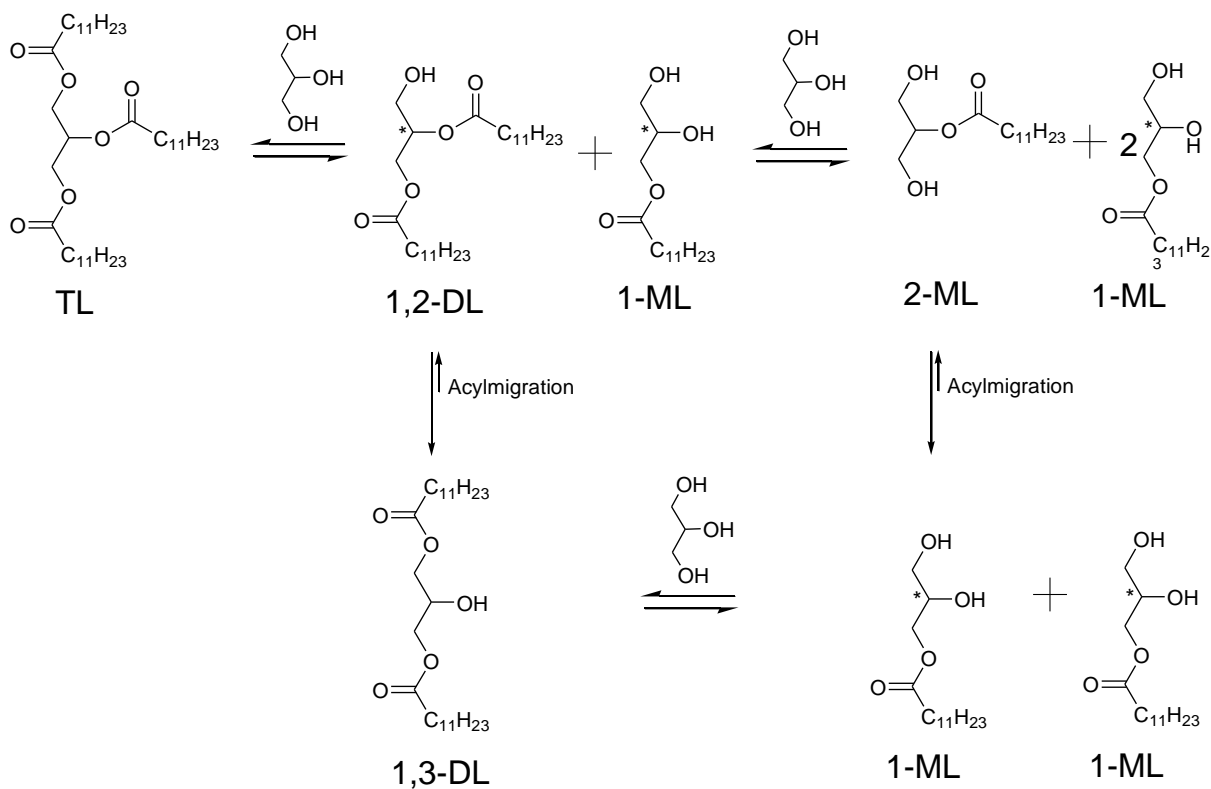


Abbildung 1.13: Reaktionsschema der enzymatischen Glycerolyse von Glyceroltrilaurat (TL) zu Glycerol-1-monolaurat (1-ML). Als Nebenprodukte entstehen Glycerol-2-monolaurat (2-ML), Glycerol-1,3-dilaurat (1,3-DL) und Glycerol-1,2-dilaurat (1,2-DL).

Zunächst reagieren Glycerol und TL zu 1,2-DL und 1-ML. Der biokatalytischen Reaktion ist zusätzlich eine Acylmigration überlagert, die rein chemisch abläuft. Hier lagert sich eine Acylgruppe am Glyceridmolekül um. Durch die Acylmigration bildet sich 1,3-DL, welches dann wieder mit Glycerol weiter zu 1-ML reagiert. Zusätzlich reagiert 1,2-DL mit Glycerol zu 2-ML, welches wiederum durch eine Acylmigration zu 1-ML umgewandelt werden kann.

1.6 Blasensäulenreaktor

Der Blasensäulenreaktor ist ein Mehrphasenreaktor und besitzt ein breites Anwendungsfeld. Meistens kommt der Reaktor für Reaktionen, bei denen mindestens ein Gas und eine Flüssigkeit involviert sind, zum Einsatz [Deckwer und Field 1992]. Außerdem eignet sich der Blasensäulenreaktor für heterogene lösungsmittelfreie Biokatalysen mit viskosen Reaktanden [Hilterhaus et al. 2008] (siehe Abbildung 1.14).

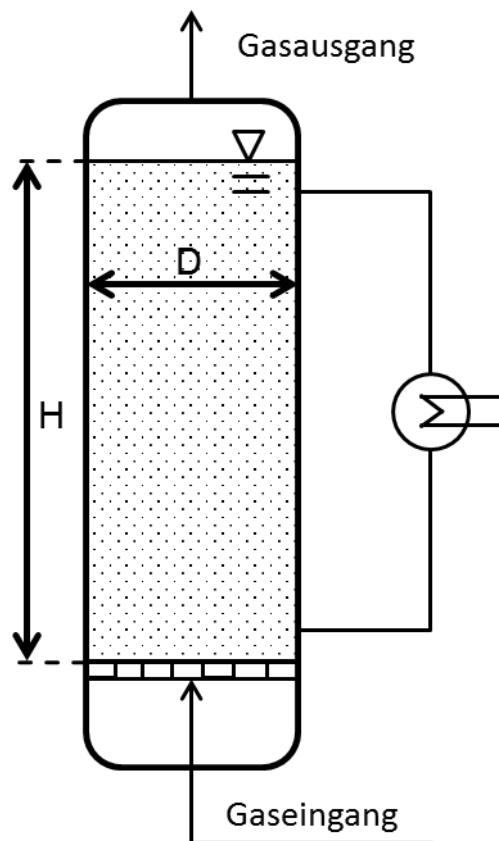


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung eines Blasensäulenreaktors [Hilterhaus et al. 2008; Baum et al. 2016].

Der Blasensäulenreaktor ist im Allgemeinen dadurch charakterisiert, dass in eine Flüssigkeit ein Gas eingebracht wird. Der Energieeintrag wird über die disperse Gasphase gewährleistet. Am Boden des Blasensäulenreaktors wird dafür Gas durch eine perforierte Platte geleitet und Gasblasen steigen entlang des Zylinders auf und formen eine Gas-/Flüssigkeits-Grenzschicht. Dadurch ist ein optimaler Gas-Flüssigkeitsaustausch gewährleistet. Die Gas-Phase erfüllt hierbei zwei Funktionen. Einerseits dient sie der schonenden Durchmischung der Reaktionsmischung mit geringem mechanischem Stress auf die heterogenen Biokatalysatoren. Andererseits benötigt der Blasensäulenreaktor keine beweglichen Einbauten, wodurch die Scherkräfte, die durch einen Rührer verursacht würden, minimiert werden und die Langzeitstabilität des heterogenen Biokatalysators erhöht wird. Außerdem wird durch den Eintrag des Gases Reaktionswasser aus dem Reaktor getragen und das thermodynamische Gleichgewicht kann auf die Seite der Produkte verschoben werden [Baum et al. 2016]. In der vorliegenden Arbeit wird der Blasensäulenreaktor für ein Vier-Phasen

Reaktionssystem eingesetzt (siehe Abbildung 1.15). Die flüssige Phase setzt sich dabei aus dem viskosen Glycerol als polare Phase und der Laurinsäure (Veresterung) oder Glyceroltrilaurat (Glycerolyse) als unpolare Phase zusammen. Die synthetisierten Partialglyceride ML und DL liegen ebenfalls in der unpolaren Phase vor. Die heterogenen Biokatalysatoren bilden eine dritte feste Phase, wobei sie als dispergierte Partikel in der unpolaren Phase und an der Grenzschicht zur polaren Phase vorliegen. Die vierte Phase stellt die eingebrachte Luft dar, die dem Stoffaustausch zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase dient.

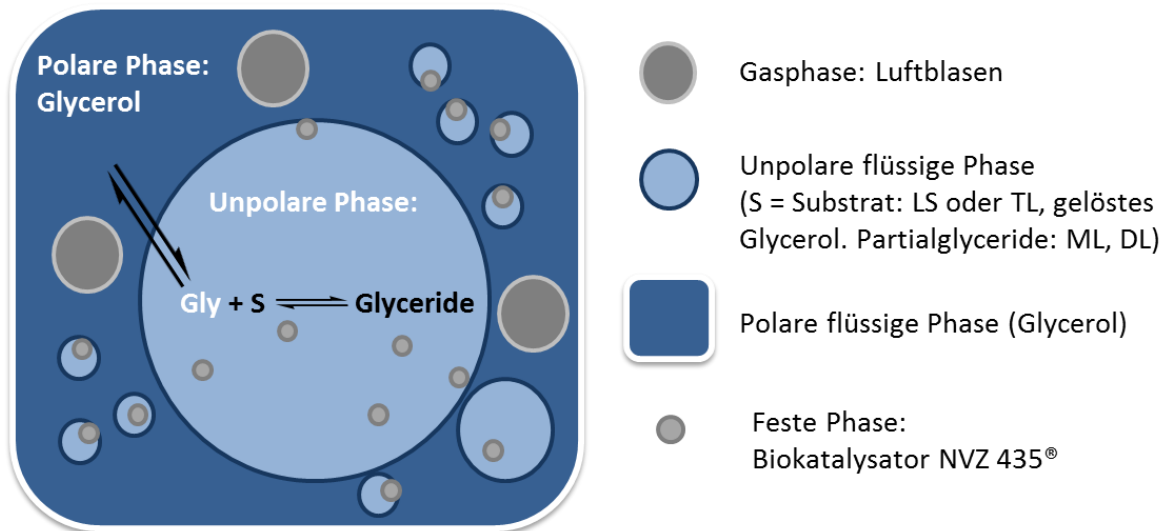


Abbildung 1.15: Schematische Darstellung des Mehrphasen-Reaktionssystems. In diesem Beispiel liegt Glycerol im Überschuss vor und stellt somit die kontinuierliche polare Phase dar. LS, TL, sowie die Partialglyceride ML, DL stellen die dispergierte unpolare Phase dar. Der Biokatalysator liegt dispergiert in der unpolaren Phase, sowie in der Grenzschicht zur polaren Phase vor.

1.7 IR-Spektroskopie

Spektroskopische Messmethoden bekommen eine immer größere Bedeutung in der chemischen Industrie. Die steigende Kompaktheit, das sinkende Preisniveau und die immer besser werdenden Rechnerleistungen zur multivariaten Datenanalyse tragen immens dazu bei, dass diese Methoden fortan Einzug in die Industrie finden werden [Kessler 2012].

Die Infrarot-Spektroskopie ist eine Schwingungsspektroskopie und beruht auf der Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung mit den funktionellen Gruppen von Molekülen. Dabei wird in Nahinfrarot (NIR im Wellenlängenbereich: 700 - 2500 nm oder Wellenzahlbereich: 4000 – 14200 cm^{-1}), mittleren IR-Bereich (MIR im Wellenlängenbereich: 2500 -15400 nm oder Wellenzahlbereich: 650 – 4000 cm^{-1}) und fernes IR (FIR im Bereich ab 15,4 μm) unterschieden (siehe Abbildung 1.16).

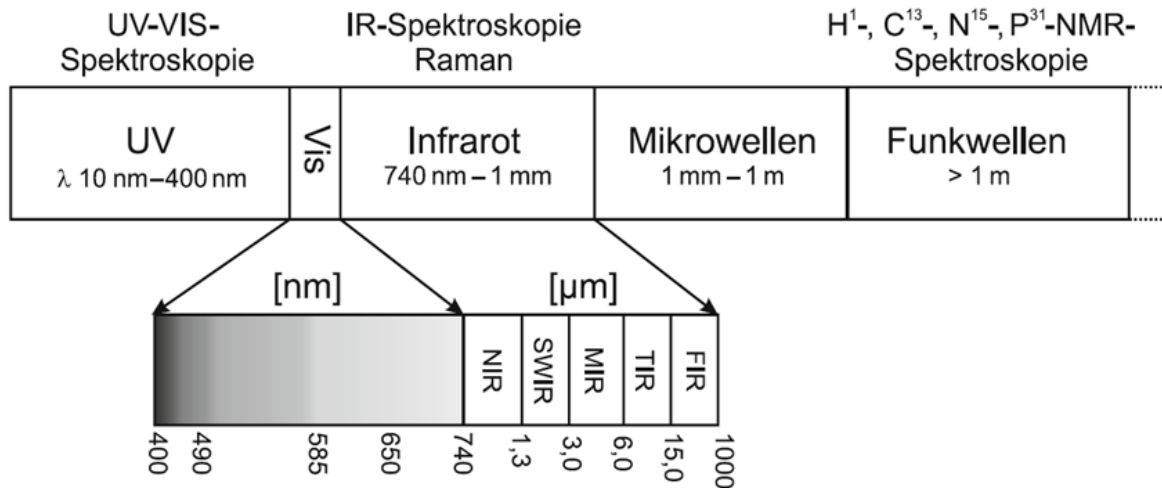


Abbildung 1.16: Das elektromagnetische Spektrum [Chmiel 2011].

Im mittleren Infrarot werden Absorptionsbanden detektiert, die im Wesentlichen Grundsvingungen funktioneller Gruppen im Molekül zuzuordnen sind [Kessler 2012]. Die Lage der Absorptionsbande wird in der Einheit Wellenzahl [cm^{-1}] angegeben. Diese ist antiproportional zur Wellenlänge. Der MIR-Bereich wird in zwei Bereiche unterteilt. Im Bereich oberhalb von 1500 cm^{-1} absorbieren funktionelle Gruppen der Moleküle. Im Bereich unterhalb von 1500 cm^{-1} , im sogenannten Fingerprint Bereich, absorbieren neben den funktionellen Gruppen der Moleküle zusätzlich die Gerüstsvingungen der Moleküle. Daher können auch strukturähnliche Moleküle unterschieden werden. Jedes Molekül besitzt sozusagen einen eigenen „Fingerabdruck“ [Otto 2011].

In situ Lichtleitersonden, die unter Ausnutzung des Prinzips der abgeschwächten Totalreflexion (ATR, engl. attenuated total reflection) funktionieren, machen die IR-Spektroskopie im mittleren IR auch für die Prozesstechnik interessant. Die ATR-Sonden können einfach in den Reaktor implementiert werden im Gegensatz zur Transmissionsmessung, in der das Infrarotanregungslicht ein Teil, des zu untersuchenden Mediums, im Bypass durchlaufen muss. Außerdem kommt es bei der Transmissionsmessung in Mehrphasensystemen durch Lichtstreuungseffekte zu Verfälschungen in der Messung. Dieses Problem tritt bei der Messung mit dem ATR Prinzip nicht mehr auf, da die Absorptionsbanden des Mediums an der Oberfläche eines ATR-Kristalls wiedergegeben werden (siehe Abbildung 1.17). Über flexible Fasern (hier Silberhalogenid für Infrarotstrahlung im MIR) werden die Strahlungen zu einem Reflexionselement (IRE), meist Kristalle mit einem hohen Brechungsindex (hier Diamant), geführt. An der Oberfläche des IRE werden die Strahlungen gebrochen und zum Detektor zurückgeführt. Ein Teil der Strahlung dringt in das angrenzende Medium, welches einen geringeren Brechungsindex aufweist als Diamant, ein und wird absorbiert. An der ATR-Kristall Oberfläche entsteht durch die interne Reflexion eine sogenannte evaneszente Welle, die in das angrenzende Medium eindringt und absorbiert wird [Kessler 2012].

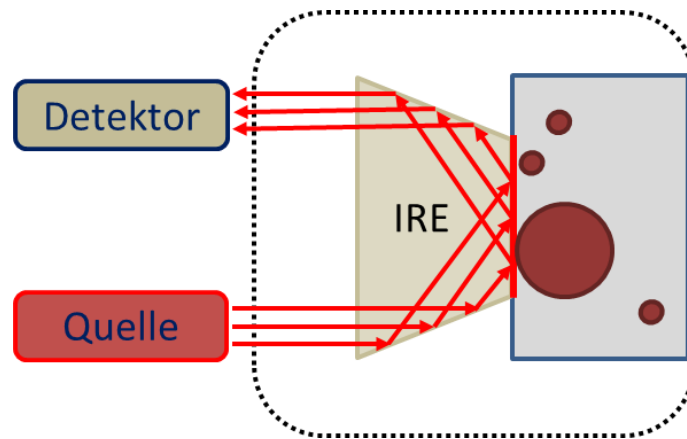


Abbildung 1.17: Prinzip eines ATR (attenuated total reflection)-Kristalls.

Die Eindringtiefe der evaneszenten Welle liegt im Bereich von 0,5 bis 5 μm [Chmiel 2011] und berechnet sich nach Formel 8 wie folgt [Kessler 2012]:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta) - n_2^2}} \quad (7)$$

Eindringtiefe der evaneszenten Welle	d_p	[nm]
Wellenlänge der einfallenden Strahlung	λ	[nm]
Brechungsindex des ATR-Kristalls (Diamant = 2,4)	n_1	[-]
Brechungsindex des Mediums	n_2	[-]
Einfallswinkel der Strahlung	θ	[°]

1.8 Chemometrie und multivariate Datenanalyse

Die Chemometrie findet Anwendung bei der Analyse und Auswertung von komplexen Datenmengen, so auch bei den spektralen Daten der IR-Spektroskopie. Dabei werden für die multivariate Datenanalyse gezielt Methoden aus der Statistik und Mathematik angewendet. Das Hauptziel hierbei ist zum einen die Einordnung und Klassifizierung der Daten durch die Reduktion der Datenmenge auf ein Bruchteil der Daten mit einem relevanten Informationsgehalt. In der Regel rechnen mathematische Algorithmen aus dem komplexen Datensatz die Teile heraus, die relevante Information enthalten, sodass die Daten z.B. klassifiziert werden können. Aus einem großen Datensatz können so beispielsweise Messwerte zusammengefasst werden, die den gleichen Informationsgehalt besitzen. Eine Methode, die so zum Einsatz kommt, ist die Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. Principal Component Analysis) [Kessler 2012]. Auf die Hauptkomponentenanalyse wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Durch die Klassifizierung und die damit verbundene Reduktion der Datenmengen der IR-spektroskopischen Messung können zunächst qualitative Datenauswertungen durchgeführt werden. Aus den spektralen Daten können jedoch nur bedingt quantitative Informationen gewonnen werden. Mit Hilfe von Algorithmen der

multivariaten Regressionsverfahren werden funktionale Zusammenhänge zwischen einfach messbaren Größen (z. B. Absorptionsspektren) mit schwer messbaren Größen (Zielgrößen, z. B. Produktkonzentration) hergestellt. Durch sogenannte chemometrische Modelle können qualitative und quantitative Aussagen über die Konzentration der Produkte und Edukte in einer Reaktionsmischung getroffen werden [Kessler 2007].

Bei der multivariaten Regression wird zwischen Soft- und Hardmodell unterschieden. Beim sog. Softmodell ist die Kenntnis der inneren Beschaffenheit des Systems nicht notwendig und wird bei der Modelbildung nicht berücksichtigt. Beispiel hierfür ist der Partial-Least-Squares-Algorithmus (PLS Regression, siehe Kapitel 1.8.1), welcher auf statistische Methoden der Mathematik zurückgreift. Diese multivariate Regressionsmethode hat sich in der chemischen Analytik besonders durchgesetzt. Beim Hardmodell wird statt linearer Regressionsmethoden aus der Statistik, ein nichtlineares, phänomenologisches Modell verwendet, welches die wesentlichen spektralen Eigenschaften nachbildet [Engel et al. 2009]. Hier findet der „*Indirect Hard Modell*“ Algorithmus (IHM) Anwendung (IHM Algorithmus, siehe Kapitel 1.8.2).

1.8.1 Partial least squares-Algorithmus

Die Anfänge hatte die PLS-Regression in den frühen 70er Jahren durch Herman Wold, der für die Auswertung von ökonomischen Daten einen Algorithmus entwickelte [Wold 1974]. Ende der 70er Jahre gab es dann die ersten Anwendungen der PLS-Regression in der Chemie zur Auswertung von komplexen Datenmengen [Gerlach et al. 1979]. Inzwischen gehört die PLS-Regression zu der am meisten etablierten multivariaten Regressionsmethode. In vielen Wissenschaften findet diese Anwendung zur Auswertung von hoch komplexen Datenmengen [Kessler 2007].

Der PLS-Algorithmus verknüpft in einem gemeinsamen Modell mehrere Y-Werte (Zielgrößen wie z.B. Eduktkonzentration und Produktkonzentration) mit multiplen X-Werten (Messgrößen: hier die Absorptionsspektren). Die Korrelation geschieht über eine Transformation der Konzentrations- und Spektrenmatrix (Y und X) in sogenannte score-Matrizen (T und U) und loading-Matrizen (P' und Q'), sowie Fehlermatrizen (E und F). Über ein iteratives Verfahren werden die Parameter variiert, um die Fehlermatrizen zu minimieren (siehe Abbildung 1.18). Auf eine genaue Herleitung wird hier verzichtet und auf die folgende Quelle verwiesen [Kessler 2007].

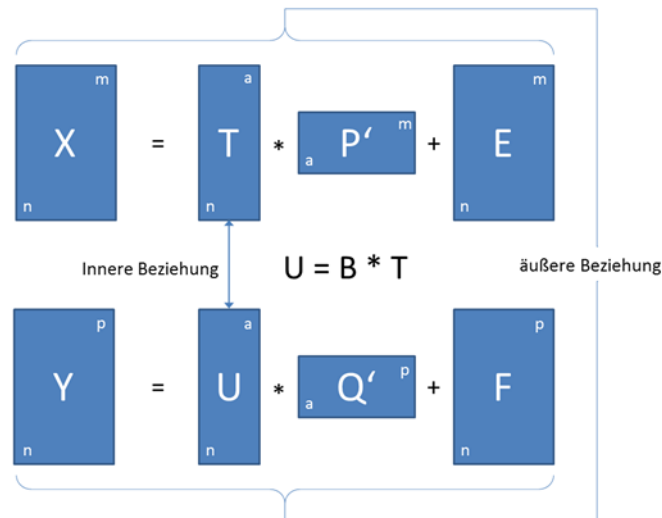
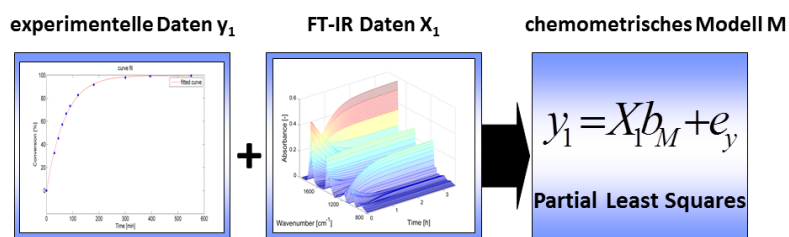


Abbildung 1.18: Mathematische Zusammenhänge für die Verknüpfung der Messgrößeninformationen X (Absorptionsspektren) mit den Zielgrößeninformationen Y (Konzentrationsdaten), (X = Spektrenmatrix, Y = Konzentrationsmatrix; T, U = score-Matrizen; P', Q' = loading-Matrizen; E, F = Restmatrizen; B = Verbindungsmatrix)

Der Vorteil der PLS-Regression ist, dass keinerlei Informationen über das zu modellierende System als solches notwendig sind (Blackbox-Ansatz). Ein wesentlicher Nachteil ist, dass eine Anwendung des Modells auf nicht kalibrierte Bereiche, d.h. eine Extrapolation z. B. auf andere Temperaturbereiche streng genommen nicht möglich ist. Die Kalibrierung bei der PLS-Regression ist zeitaufwändig und muss regelmäßig überprüft werden. Es werden bei der PLS-Regression außerdem nichtlineare Effekte wie Banden-Verschiebungen oder Bandenform-Veränderungen, sowie Basislinieneffekte nicht berücksichtigt [Engel et al. 2009]. Abbildung 1.19 zeigt die Vorgehensweise der Modellerstellung mittels der PLS-Regression.

1. Entwicklung eines chemometrischen Modells



2. Anwendung des chemometrischen Modells (externe Validierung)

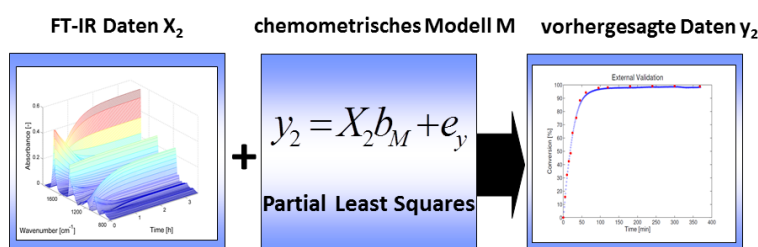


Abbildung 1.19: Erstellen eines multivariaten Modells über die Verknüpfung von Konzentrationsdaten mit den Infrarotspektren und Validierung bzw. Anwendung des Modells zur Auswertung von unbekanntem Spektren [Müller 2012].

Bei der PLS-Regression ist das Kalibriermodell und das Spektralmodell identisch und die Modellbildung erfolgt in einem Schritt. Über den PLS-Algorithmus werden in diesem Fall zunächst die Konzentrationsdaten Y_1 mit den Spektrendaten X_1 in Korrelation gebracht. Dabei entsteht ein sogenanntes chemometrisches Modell. Für die Modellbildung ist es wichtig, eine maximale Anzahl an Hauptkomponenten n festzulegen. Die Hauptkomponenten stellen Faktoren dar, die das spektrale System am besten darstellen. Diese Anzahl dieser Komponenten stellt den Rang n der Matrix dar und bestimmt die Anzahl der Faktoren, die das System am genauesten beschreiben. Werden zu viele Faktoren gewählt, kann es zum *Overfitting* kommen. Dabei werden zufällige Veränderungen (z. B. Rauschen) eventuell im Modell berücksichtigt und eine genaue Vorhersage ist nicht mehr gewährleistet. Im Gegensatz dazu kann es zum *Underfitting* kommen, sobald zu wenige Faktoren für die Modellerstellung gewählt werden. Dabei kann das Modell weniger genau vorhersagen als es die Daten erlauben (siehe Abbildung 1.20). Eine Faustregel für die Wahl der Faktoren für die Modellerstellung mittels PLS-Regression liefert Kessler: „Die minimale Anzahl der Kalibrierproben sollte die zu erwartende Anzahl der Hauptkomponenten multipliziert mit vier nicht unterschreiten.“ [Kessler 2007]. Die Summe aus Modellfehler (Kalibrierfehler) und Schätzfehler stellt den Gesamtfehler des Modells dar und wird Vorhersagefehler genannt.

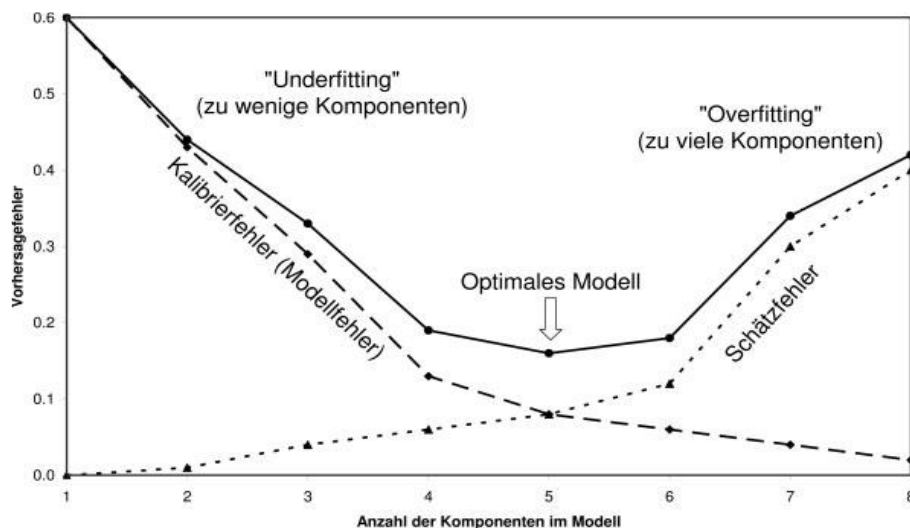


Abbildung 1.20: Prinzipielle Zusammensetzung des Validierfehlers bei der multivariaten Kalibrierung in Abhängigkeit von der Modellkomplexizität (Rang) [Kessler, 2005].

1.8.2 Indirect Hard Model-Algorithmus

Beim der *Indirect Hard Model-Regression* (IHM) wird statt linearer Regressionsmethoden aus der Statistik ein nichtlineares, phänomenologisches Modell verwendet, welches die wesentlichen spektralen Eigenschaften nachbildet [Engel et al. 2009]. Dieser Algorithmus berücksichtigt nichtlineare spektrale Phänomene wie Basislinienseffekte, Bandenformänderungen und -verschiebungen [Kriesten et al. 2008]. Im Gegensatz zur PLS-Regression wird dadurch die Anwendung auf nicht kalibrierte Bereiche ermöglicht, d.h. eine Extrapolation auf andere Temperaturbereiche ist erlaubt. Dabei setzt sich das IHM-Modell aus

zwei Teilmodellen zusammen, dem Spektralmodell (siehe Abbildung 1.21 oben) und dem Kalibriermodell (siehe Abbildung 1.21 unten). Im ersten Schritt wird das Spektralmodell erstellt. Hierfür werden die mathematischen Modelle zu den spektralen Eigenschaften des zu modellierenden Systems erstellt. Durch die Anpassung parametrisierter Banden-Funktionen an die Reinstoffspektren, können nichtlineare Effekte, wie Temperaturänderungen oder Wechselwirkungen zwischen den Molekülen, berücksichtigt werden. Im zweiten Schritt entsteht das Kalibriermodell. Hier findet, wie bei der PLS-Regression, die Korrelation der spektralen Daten mit Konzentrationsdaten statt. Das Kalibriermodell ist durch das Trennen vom Spektralmodell unabhängig von nichtlinearen Effekten [Engel et al. 2009].

Erstellung eines Indirect Hard Modells (IHM)

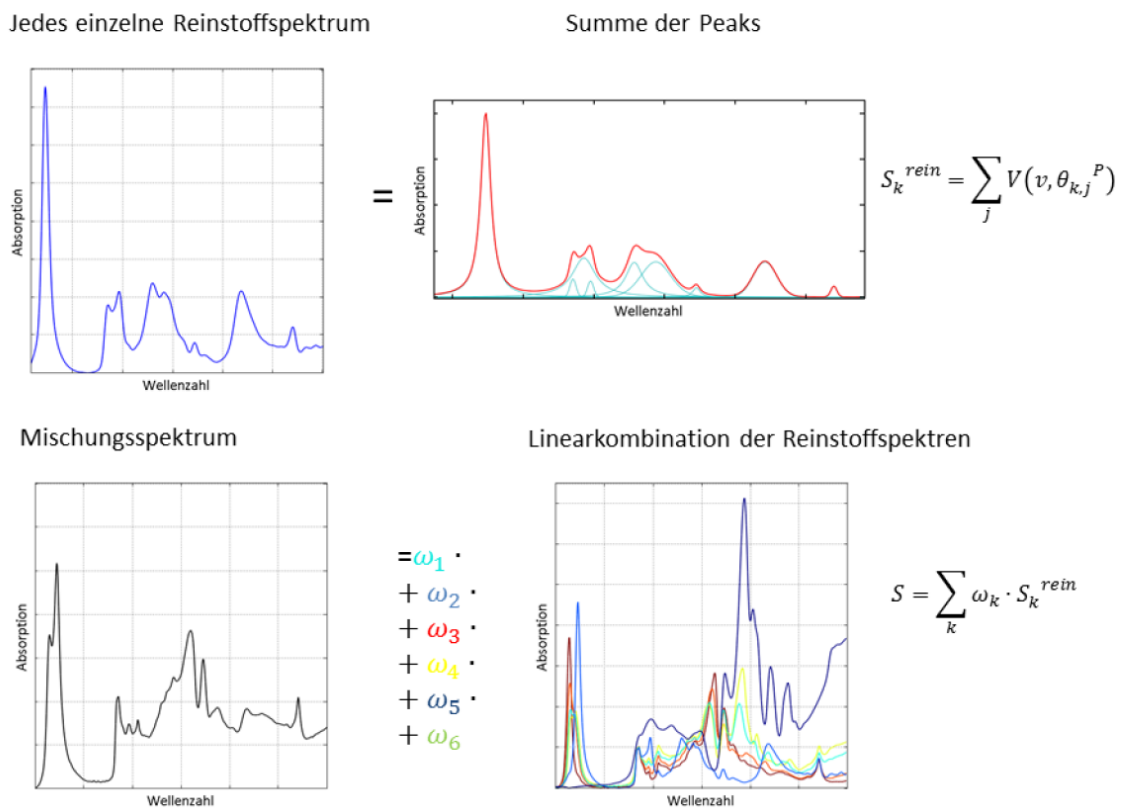


Abbildung 1.21: Schritte des *Indirect Hard Modeling* von Mischungsspektren zur Bestimmung der Konzentrationen einzelner Komponenten. Reinstoffmodell S_k^{rein} ist die Summe der Voigt-Funktionen $V(v, \theta_{k,j}^P)$ welche von der Wellenzahl v und dem Vektor $\theta_{k,j}^P$ der *peak*-Parameter aller *peaks* abhängt. Das Mischungsmodell S ist die Summe der Reinstoffmodelle S_k^{rein} multipliziert mit den Gewichtungsfaktoren ω_k [Kriesten et al. 2008].

2 Stand der Technik

In diesem Kapitel soll der Stand der Technik für die untersuchten Thematiken dieser Arbeit kurz dargestellt werden. Im Folgenden wird auf den Reaktionsmechanismus bezüglich Monoacylglyceride (MAG) eingegangen, sowie auf die Anwendung der Online-Spektroskopie zur Überwachung und Steuerung eines Prozesses.

2.1 Übersicht der Strategien zur gezielten Synthese von MAG

Monoacylglyceride (MAGs) sind nichtionische Tenside, die durch ihre emulgierenden Eigenschaften, einen großen Anwendungsbereich in der Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikindustrie besitzen. Besonders MAGs besitzen aufgrund ihrer molekularen Struktur, mit zwei freien Hydroxylfunktionen, eine hohe Oberflächenaktivität. Deshalb werden besonders MAGs (teilweise DAGs) beispielsweise als Verdickungsmittel in der Lebensmittelindustrie eingesetzt und haben dort einen weltweiten Marktanteil von 75 % [Corma et al. 1998; Hasenhuettl 2008]. Daher ist die Herstellung von MAG industriell wichtig. Hier werden MAGs herkömmlich durch eine chemische Glycerolysis von TAGs oder durch eine Veresterung von Glycerol und einer Fettsäure mit starken Säuren als Katalysator bei über 200 °C hergestellt. Je nach Substratverhältnis kann der MAG-Anteil in der Lipid-Phase (MAG + DAG + TAG) 35-60 Gew.-% erreichen. Dabei ist die maximale MAG Ausbeute durch das Reaktionsgleichgewicht und die Löslichkeit beider Substrate in einander limitiert. Hierbei führt eine weitere Erhöhung der Glycerolkonzentration nicht zur weiteren MAG-Bildung, da die Löslichkeit von Glycerol in der Lipid-Phase limitiert ist und sich ein Zweiphasen-System ausbildet. Um höhere MAG-Ausbeuten zu erhalten, müssen die Reaktionsmischungen nach der Reaktion weiter aufgereinigt werden, beispielsweise durch Molekulardestillation. Die weiteren Aufreinigungsschritte wirken sich erheblich auf die Produktionskosten aus. [Negi 2006; Damstrup et al. 2006; Hasenhuettl 2008]. Weitere Syntheserouten zur Produktion von MAG's sind die direkte und die partielle Hydrolyse eines TAGs oder die Umesterung zwischen Glycerol und eines Fettsäureesters [da S.Machado et al. 2000]. In den vergangenen Jahrzehnten wurden umfangreiche Forschungen durchgeführt, um chemische, als auch biokatalytische Reaktionsrouten mit hoher Selektivität bezüglich MAG zu identifizieren. So berichtete Zhong et al. in 2014 in einem *Review* Artikel über mehrere Strategien zur Erhöhung der MAG Selektivität in der Reaktion. Die wichtigsten Strategien sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet. Dazu gehören die selektive Ausfällung von MAG während der Reaktion [McNeill und Yamane 1991], das rationale Design von Katalysatoren [Díaz et al. 2001; Jerome et al. 2004] sowie die Nutzung von Solvationseffekten [Damstrup et al. 2006; Guo und Xu 2005].

Tabelle 2.1: Übersicht zu den Strategien zur Erhöhung der Selektivität bezüglich MAG [Zhong et al. 2014]. Alle gegebenen Ergebnisse beziehen sich auf den MAG-Anteil in der Lipid Phase. (MAG: Monoacylglycerid, DAG: Diacylglycerid und TAG: Triacylglycerid).

Strategie	Selektive Ausfällung von MAG	Rationales Design von heterogenen Katalysatoren		Solvatation
		Porendurchmesser	Katalysatoroberfläche	
Prinzip	Temperatur ↓ => MAG Löslichkeit in der Reaktionsmischung ↓	$\emptyset_{\text{Pore}} < \emptyset_{\text{DAG}}$	$C_{\text{Glycerol, Oberfläche}} > C_{\text{Ester, Oberfläche}}$ Limitierung in der DAG/TAG Bildung	K_{eq} $A + B \rightleftharpoons C + D$ $K_{\text{eq}} = \frac{\alpha_C \alpha_D}{\alpha_A \alpha_B} = \frac{\chi_C \chi_D \gamma_C \gamma_D}{\chi_A \chi_B \gamma_A \gamma_B}$
Idee	Reaktionsgleichgewicht verschiebt sich auf die Seite des Produkts MAG	Unterbindung der DAG/TAG Bildung	Hydrophile Oberfläche interagiert bevorzugt mit Glycerol	Mischbarkeit der Reaktanten ↓ Lösungsmittel X interagiert bevorzugt mit Komponente C (MAG) => Aktivitätskoeffizient $\gamma_{\text{MAG}} \downarrow$ => Molare Fraktion $\chi_{\text{MAG}} \uparrow$
Ergebnis	Glycerolyse von Olivenöl mit 90 % MAG -16 h bei 42 °C - 4 d bei 5 °C	Veresterung von Glycerol & Laurinsäure mit 75 % MAG Anteilen	81 % MAG Selektivität, 60 % MAG molare Ausbeute (basierend auf Glycerol)	(a) 80% MAG in tert.-Alkohol (b) Bis zu 90 % MAG in Glycerolyse
Nachteil	Reaktionsgeschwindigkeit ↓	Nur für Veresterungsreaktionen & keine Enzyme	Keine Enzyme + Reaktion im Lösungsmittel DMSO	- Ionische Flüssigkeiten (giftig). - Org. Lösungsmittel (großer Aufwand im Downstream Processing)
Quelle	[McNeill und Yamane 1991]	[Díaz et al. 2001]	[Jerome et al. 2004]	(b)[Guo und Xu 2005] (a)[Damstrup et al. 2006]

Bei der Ausfällung von MAG in der Reaktion wird eine Erniedrigung der Löslichkeit von MAG in der Reaktionsmischung durch Temperaturabsenkungen herbeigeführt. Dadurch verschiebt sich das thermodynamische Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite (MAG) durch den Entzug von MAG aus der Reaktionsmischung und bei der Glycerolyse von Olivenöl werden 90 % MAG-Anteile in der Lipid-Phase erreicht. Der Hauptnachteil dieser Strategie sind die niedrigen Reaktionsgeschwindigkeiten aufgrund der benötigten niedrigen Temperatur. Daher ist dieser Ansatz nicht anwendbar in der Industrie.

Wird der Porendurchmesser oder die Oberfläche eines heterogenen Katalysators rational designt, kann dadurch gezielt Einfluss auf die Reaktionsselektivität genommen werden. Einerseits wird der Porendurchmesser so gestaltet, dass kein DAG Molekül durch die Pore zum Katalysator durchdringen kann. Somit wird die DAG und TAG-Bildung bei einer Veresterung gehemmt. Bis zu 75 % MAG-Anteile wurden in der Lipid-Phase erreicht. Zusätzlich kann die Oberfläche des Katalysators so designt werden, dass bevorzugt Glycerol mit der hydrophilen Katalysatoroberfläche interagiert. Die Glycerolkonzentration an der Katalysatoroberfläche ist demnach größer als die Esterkonzentration und die Bildung von DAG und TAG sind dadurch ergänzend limitiert. Dabei konnten 81 % MAG -Selektivität erreicht werden. Hauptnachteile dieser beiden Strategien sind, dass diese bis heute nicht für die Biokatalyse genutzt werden können und das Lösungsmittel, wie z. B. DMSO, eingesetzt werden müssen.

Eine weitere mögliche Strategie ist der Solvationseffekt, bei dem organischen Lösungsmittel wie *tert*-Pentanol oder ionische Flüssigkeiten eingesetzt werden, um die Reaktionsselektivität bezüglich MAG zu steigern. In diesem Fall wird die Löslichkeit der Reaktanten, speziell die von Glycerol, in der Lipid-Phase erhöht. Dies führt zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts zu MAG. Die Hauptnachteile sind hierbei jedoch die Anwendung von giftigen Lösungsmitteln und deren aufwendigen Downstream-Prozessen. Eine neuartige Strategie stellt die Anwendung von amphoteren Tensiden dar, die selbst für kosmetische Produkte verwendet werden und auf die in dieser Arbeit der Diskussionsfokus gelegt werden soll (siehe Kapitel 5).

2.2 Einsatz der FT-MIR Spektroskopie zur Online-Prozessüberwachung und -steuerung

Im Zeitalter der industriellen Digitalisierung und der Industrie 4.0 nimmt der Einsatz an Analyseverfahren zur Echtzeitüberwachung und Steuerung von Prozessen stetig zu und wird unter dem Begriff Prozessanalysetechnik (PAT) zusammengefasst. In der Petrochemie haben sich PAT neben klassischen Messgrößen wie Temperatur und Druck bereits fest etabliert. Dadurch wächst das Prozesswissen und dadurch kann die Prozesseffizienz gesteigert werden. Im Life-Science-Bereich, speziell in der Biotechnologie, hat diese Entwicklung ebenfalls begonnen [Gerlach et al. 2016]. Die Echtzeitüberwachung mittels Online-Analytik ist in der Biotechnologie noch nicht so stark verankert wie in der klassischen Chemiebranche. Jedoch zeigt die „Technology Roadmap 2005-2015“ [Abele et al. 2005] einen eindeutigen Trend, dass auch in der Life-Science-Branche die Verwendung von Online-Analytik stark zunimmt. Unter

den Technologien zählt die MIR-Spektroskopie zu den innovativsten Technologien ab 2015 [Maiwald 2010]. Eine Weiterentwicklung von MIR-Spektrometern ist die Miniaturisierung der Messgeräte [Babel et al. 2013; Geörg et al. 2015]. Durch die so gewonnene Kompaktheit und die damit verbundene Preissenkung wird das Interesse an der MIR-Spektroskopie und deren Einsatzmöglichkeiten als Online-Analytik weiter steigen.

So sind unterschiedlichste Anwendungen der MIR Spektroskopie für die Online-Analytik bekannt. Beispielsweise sind Kristallisationsprozesse in der Pharmaindustrie Grundoperationen, bei denen die MIR-Spektroskopie zur Echtzeiterfassung der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung eingesetzt werden [Févotte 2002]. In der Biotechnologie wird die MIR-Spektroskopie zur Überwachung und Steuerung von Kultivierungsprozessen eingesetzt [Pollard et al. 2001; Haake et al. 2009]. Darüber hinaus wird die Analyse-Technik für die Überwachung von enzymatischen Synthesen eingesetzt [Natalello et al. 2013; Zhang et al. 2013].

Ergänzend wird in der Literatur beschrieben wie gewonnene Daten aus der Prozessüberwachung unter Verwendung der MIR-Spektroskopie direkt für die Prozesssteuerung verwendet werden können. Beispielsweise findet die Messtechnik Anwendung bei der Prozesssteuerung von Kristallisationen in der Pharmaindustrie, um Kristalle mit definierter Größe herzustellen [Fujiwara et al. 2005; Liotta und Sabesan 2004; Grön et al. 2003]. Nagy und Braatz beschreiben verschiedene Lösungsansätze der Prozesssteuerung mittels eines PI-Reglers (PI-Regler verstärken die Prozessvariable durch einen proportionalen und integralen Anteil) zur Optimierung der Kristallisation bezüglich Kristallgröße und polymorpher Identität [Nagy und Braatz 2012].

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit am Institut der Technischen Biokatalyse wurde bereits FT-MIR-Spektroskopie mittels einer ATR-Sonde zur Überwachung von ein- und mehrphasigen enzymatischen Reaktionen verwendet. Unter anderem wurde die FT-MIR-Spektroskopie mit gängiger Offline-Referenzanalytik wie Titration, GC und HPLC verglichen und kalibriert. Dabei stellte sich heraus, dass bedingt durch die Inhomogenität eines Mehrphasensystems die Probennahme für die Offline-Analytik erschwert wird und die Genauigkeit der Bestimmung durch den Einsatz eines FT-MIR-Spektrometers erhöht werden konnte [Müller et al. 2010].

3 Motivation und Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen enzymatische Syntheserouten von Glycerolmonolaurat (ML) in Bezug auf die Reaktionsselektivität zu ML untersucht werden. Dazu werden im Folgenden zwei Reaktionsmechanismen, die Veresterung von Glycerol und Laurinsäure, sowie die Glycerolyse von Glyceroltrilaurat detailliert erforscht. Ein Ziel hierbei ist es ein erweitertes Prozessverständnis für die komplexen Vorgänge, im Speziellen die möglichen Einflussfaktoren auf die Reaktionsselektivität bezüglich Glycerolmonolaurat, zu erreichen.

Forschungsgegenstand sind dabei die Untersuchung des Phasenverhaltens der Mehrphasensysteme, die Untersuchung der Acylgruppenwanderung am Glycerid-Molekül, sowie die Auswirkung von inerten Löslichkeitsvermittlern auf das Phasenverhalten und die damit verbundene Auswirkung auf die Reaktionsselektivität. Dafür wird das amphotere Tensid Cocoamidpropyl Betain mit dem aus der Literatur bekannten organischen Lösungsmittel *tert*-Butanol verglichen. Ein Ziel hierbei ist es, die Syntheseroute durch die Steigerung der Selektivität bezüglich Glycerolmonolaurat zu optimieren.

Für eine simultane automatisierte Bestimmung der Konzentrationen aller Reaktionskomponenten in den hier untersuchten komplexen Mehrphasensystemen soll eine Online-FTIR-Analytik entwickelt werden, welche die Konzentrationen aller Komponenten automatisch und mit einer hohen Datendichte *in-situ* bestimmen kann und als Grundlage für eine spätere Prozesssteuerung dienen soll. Dafür soll zunächst das weniger komplexe einphasige Reaktionssystem von 1-Decanol und Laurinsäure mit der Online-ATR-FTIR-Analytik im Hinblick auf den Reaktionsfortschritt und die zeitlichen Konzentrationsverläufe der Reaktionskomponenten untersucht und eine Prozesssteuerung zur automatisierten Dosierung von 1-Decanol im Fed-Batch-Verfahren etabliert werden. Diese Kenntnisse sollen dann nachfolgend auf die Mehrphasensysteme übertragen werden. Im Fokus hierbei steht in erster Linie die Online-FTIR-Analyse für Mehrphasensysteme zu etablieren. Untersuchungsgegenstand in dieser Arbeit ist hierbei der Vergleich zweier mathematischer Algorithmen, dem PLS-Algorithmus (Partial Least Squares) und dem IHM-Algorithmus (Indirect Hard Model), zur chemometrischen Auswertung der FTIR-Spektren. Das Ziel hierbei ist es, eine Online-Analytik mittels ATR-FTIR-Spektroskopie für die Mehrphasensysteme zu entwickeln, welche eine direkte Bestimmung aller Konzentrationen im Reaktor ermöglicht.

4 Charakterisierung der untersuchten Reaktionssysteme

Gegenstand dieses Kapitels ist die Darstellung und Untersuchung folgender Reaktionssysteme:

1. Die enzymatische Veresterung von 1-Decanol als Monoalkohol mit Laurinsäure (Batch und Fed-Batch Reaktionsführung).
 - Diese Reaktion dient als Modellsystem für die Prozesssteuerung einer Biotransformation mittels FT-MIR-Spektroskopie (siehe Kapitel 7).
2. Die enzymatische Veresterung von Glycerol als Triol mit Laurinsäure
 - Laurinsäure als unpolare Komponente im Überschuss (Batch Reaktionsführung)
 - Glycerol als polare Komponente im Überschuss (Batch und Fed-Batch Reaktionsführung im Vergleich)
3. Die enzymatische Glycerolyse von Glyceroltrilaurat als polare Komponente im Überschuss (Batch Reaktionsführung).
 - Die Reaktionen mit Glycerol als Triol dienen der Untersuchung der Reaktionsselektivität bezüglich Glycerolmonolaurat.

Anhand folgender Untersuchungsparameter wurden alle Reaktionssysteme experimentell analysiert:

- Beschreibung des Reaktionsmechanismus
- Untersuchung des Phasenverhaltens bei den Reaktionen mit zwei flüssigen Phasen
 - Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte in Tx-Diagrammen und Dreiecksdiagrammen
- Offline-Analyse der Reaktionsverläufe
 - Konzentration-Zeit Verläufe
 - Umsatz-Zeit-Verläufe
 - Ausbeute A^{*}
 - Selektivität S^{*}
- Untersuchung der Acylmigration mittels NMR Spektroskopie^{*}

Alle Reaktionen wurden in einem Blasensäulenreaktor (siehe Kapitel 1.6) unter Verwendung des Biokatalysators Novozym 435[®] (NVZ 435[®] - Lipase B aus *Candida antarctica* ist adsorptiv auf einem hydrophoben Polymethacrylat immobilisiert) durchgeführt. Dabei wurde Druckluft als gasförmiges Medium zur Durchmischung und zum Austrag von Reaktionswasser im Blasensäulenreaktor verwendet.

^{*} Untersuchungsparameter zur Darstellung der Reaktionsselektivität bzgl. Glycerolmonolaurat.

4.1 Veresterung von 1-Decanol mit Laurinsäure^a

Dieses Reaktionssystem, welches ebenfalls als Modellreaktion zur Prozesssteuerung (siehe Kapitel 7) verwendet wurde, ist ein vierphasiges Reaktionssystem (siehe Abbildung 4.1). Die beiden Substrate 1-Decanol und Laurinsäure sowie das Produkt Decyllaurat stellen die erste flüssige, kontinuierliche Phase dar. Hierbei dient 1-Decanol gleichzeitig als Löslichkeitsvermittler für die Laurinsäure und das Produkt Decyllaurat. Dies hat Vorteile für die spätere beschriebene Etablierung der FTIR-Online-Spektroskopie mittels ATR-Sonde zur Prozesssteuerung, da ausschließlich in der kontinuierlichen, flüssigen Phase gemessen wird (auf die Online-Prozesssteuerung der Modellreaktion wird in Kapitel 7 eingegangen). Bei der Veresterungsreaktion, katalysiert durch die Lipase B aus *Candida antarctica*, eingesetzt in immobilisierter Form als NVZ 435[®], entsteht neben Decyllaurat als Produkt ebenfalls äquimolar das Nebenprodukt Wasser. Dieses sogenannte Reaktionswasser ist in der kontinuierlichen Phase dispergiert und bildet die zweite flüssige Phase. Der Biokatalysator NVZ 435[®] ist in der kontinuierlichen Phase als Feststoffpartikel suspendiert und liegt als dritte Phase vor. In einem Blasensäulenreaktor wird Luft als Gasphase (vierte Phase) zur Durchmischung durch den Reaktor geleitet. Zusätzlich zur Durchmischung wird das Nebenprodukt Wasser durch Strippen mit der Gasphase ausgetragen und nach Le Chatelier [Le Chatelier 1887] verschiebt sich durch den Entzug eines Produkts das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite und das Hauptprodukt Decyllaurat wird weiter gebildet.

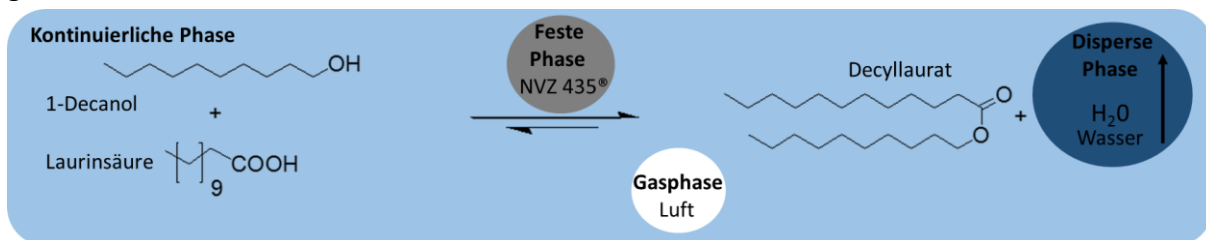


Abbildung 4.1: Reaktionsschema des 4-Phasensystems der enzymatischen Synthese von Decyllaurat. Kontinuierliche Phase: 1-Decanol, Laurinsäure & Decyllaurat; disperse Phase: Wasser; feste Phase: Biokatalysator (NVZ 435[®]); Gasphase: Luft.

4.1.1 Untersuchung der Modellreaktion

Zur Untersuchung der Modellreaktion wurden Batch-Versuche mit unterschiedlichen Substratverhältnissen sowie Fed-Batch-Versuche durchgeführt (siehe Tabelle 4.1). Bei den Batch-Versuchen wurden beide Substrate im Blasensäulenreaktor vorgelegt, auf 55,6 °C temperiert und durch einen Luftvolumenstrom von 0,75 L/min durchmischt (siehe Abbildung 4.2 links). Bei den Fed-Batch-Versuchen wurde jeweils die Laurinsäure im Blasensäulenreaktor bei 55,6 °C vorgelegt und 1-Decanol aus einem separaten Becherglas zugeführt (siehe Abbildung 4.2 rechts). Bei der manuellen Zugabe wurde in definierten Zeitabständen jeweils 20 mmol (3,8 mL) 1-Decanol mittels einer Pipette zum Reaktor hinzugegeben. Beim Fed-Batch

^a Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Valentina Daskalova erzeugt: Prozessautomatisierung einer enzymatischen Veresterung, *Masterarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2013

mit konstanter Zulauftrate von 1-Decanol wurden konstant 0,4 mL/min (2,1 mmol/min) zugeführt. Durch die Zugabe des Biokatalysators NVZ 435® wurden die Reaktionen jeweils gestartet. Neben der Probenentnahme für die Referenzanalytik wurden parallel mittels einer ATR-Sonde *in situ* FT-MIR spektroskopische Messungen durchgeführt. Die im Folgenden durchgeführten Reaktionen dienen als Datensatz für die chemometrische Modellierung. Die Chemometrie ist ein wichtiger Bestandteil der Etablierung einer Online-Prozesssteuerung (auf die FT-MIR-Spektroskopie, chemometrische Modellierung und die Prozesssteuerung wird in Kap 7 eingegangen).

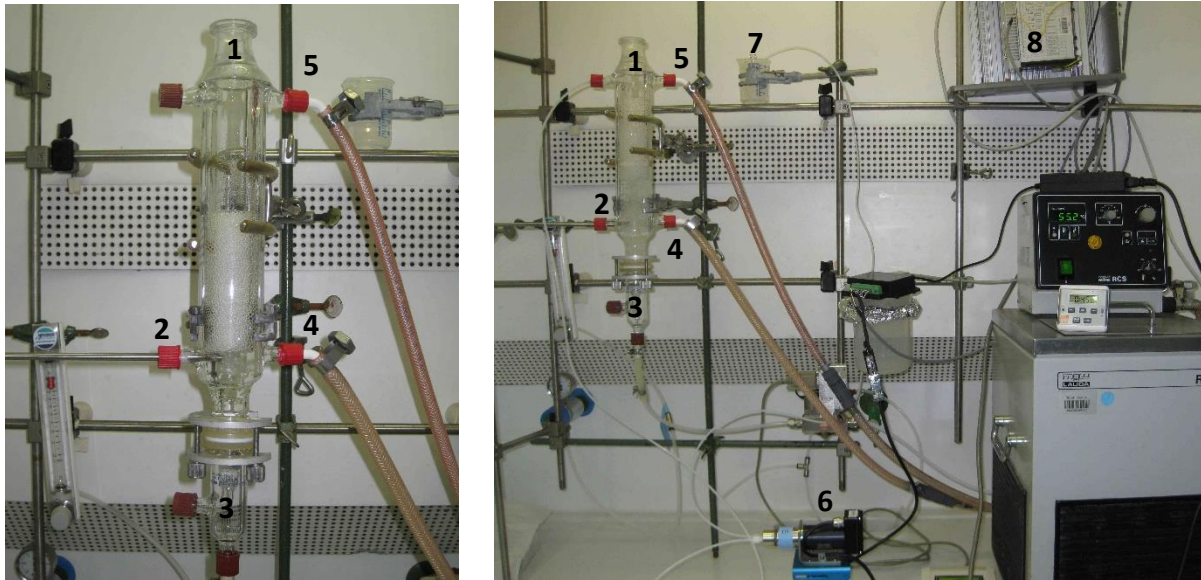


Abbildung 4.2: Versuchsaufbau für die Batch-Reaktion (links) und die Fed-Batch-Reaktion (rechts). Einzelne Komponenten: 400 mL Blasensäulenreaktor (1), integrierte ATR-FT-MIR-Sonde (2), Druckluft-Begasung (3), Zu- und Ablauf für den Thermomantel (4,5), Mikrozahnrumppe (6), Vorlagebehälter 1-Decanol (7), Mess- und Steuerungsgerät mit analogen/digitalen Ein- und Ausgängen (8). (Gerätespezifikationen siehe Anhang A.1.2 Geräte).

Tabelle 4.1: Durchgeführte Versuche mit unterschiedlichen Molverhältnissen als Batch-Reaktion und Fed-Batch-Reaktion. 40,0 g Laurinsäure (LS) und 31,7 g 1-Decanol (1-DeOH) entsprechen 200 mmol.

^{a,b} Bei den Fed-Batch-Versuchen wurden 200 mmol LS im Blasensäulenreaktor vorgelegt und 200 mmol 1-DeOH wurde jeweils in einen separaten Behälter gefüllt. ^c Manueller Fed-Batch: Zugabe von jeweils 20 mmol 1-DeOH (3,8 mL) in definierten Zeitabständen. ^d Fed- Batch mit konstanter Fedrate von 1-DeOH von 0,4 mL/min (2,1 mmol/min).

Versuchsparameter		Molverhältnis ^a LS/1-DeOH	Masse Substrate ^b LS [g] / 1-DeOH [g]	Masse NVZ 435® [g]
Batch	äquimolar	1,00 / 1,00	40,00 / 31,70	0,72
	Überschuss 1-DeOH	0,67 / 1,00	26,80 / 31,70	0,59
	Überschuss LS	1,50 / 1,00	60,00 / 31,70	0,92
Fed-Batch	nicht kontinuierlicher Feed 1-DeOH ^c	1,00 : 1,00	40,00 / 31,70	0,72
	kontinuierlicher Feed (0,4 mL/min 1-DeOH) ^d	1,00 : 1,00	40,00 / 31,70	

4.1.2 Batch-Reaktion

Zunächst wurde eine Batch-Reaktion mit einem geringen Überschuss an LS als Substratverhältnis durchgeführt und mittels Säurezahl-Titration (siehe Abbildung 4.3 oben, Umsatzverlauf der Laurinsäure) und GC sowie der Wasseranteil, der während der Reaktion akkumuliert (siehe Abbildung 4.3 unten, Stoffmengenverläufe) analysiert.

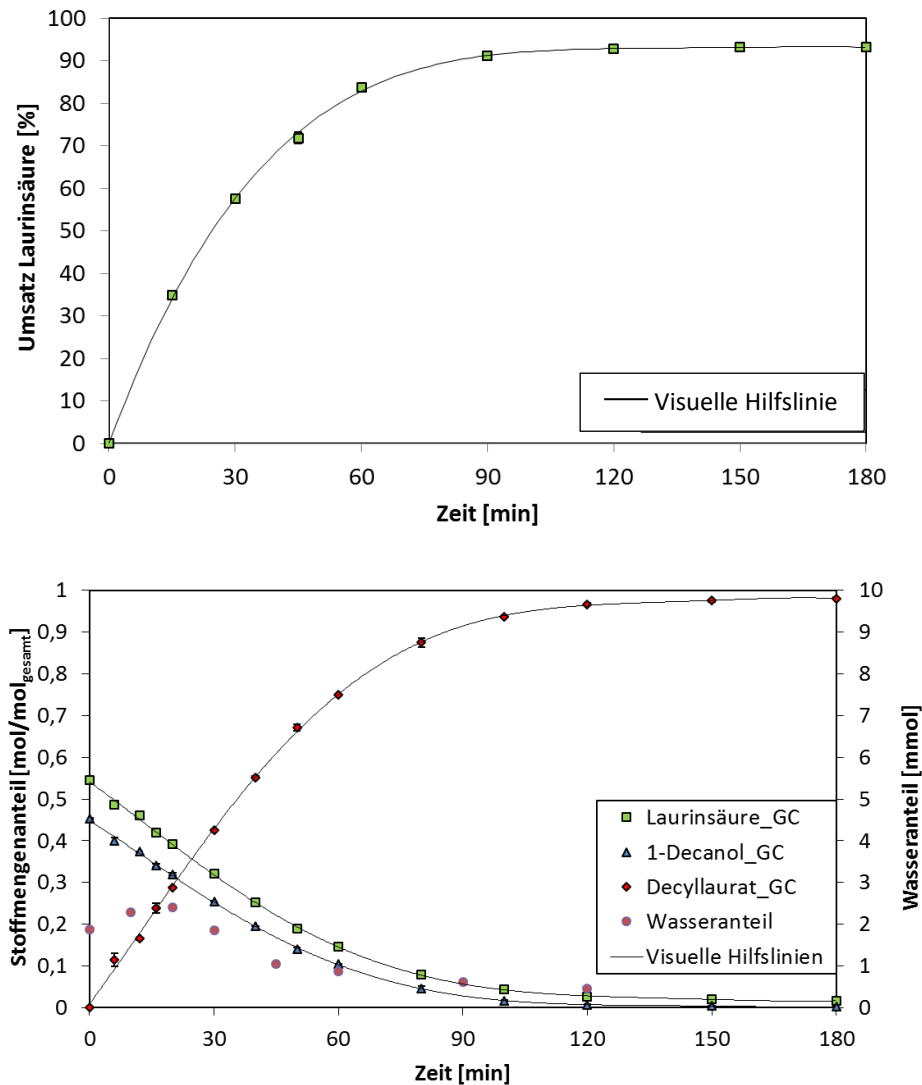


Abbildung 4.3: Umsatzverlauf (oben) und Stoffmengenverläufe der einzelnen Komponenten (unten) einer Batch-Reaktion von Laurinsäure und 1-Decanol im Blasensäulenreaktor. **Reaktionsbedingungen:** T = 55,6 °C, Luftbegasungsrate 0,75 L/min bei 1 atm., 1 Gew.-% (0,72 g) Novozym 435®, 200 mmol (40 g) Laurinsäure, 180 mmol (28,53 g) 1-Decanol.

In Abbildung 4.3 ist zu erkennen, dass das Reaktionsgleichgewicht nach 120 Minuten bei einem Umsatz an Laurinsäure von ca. 95 % erreicht ist. Dabei wird ein Umsatz von 93 % über die Bestimmung mit der Säurezahltitration ermittelt (siehe Abbildung 4.3 oben) und von 97 % über die Bestimmung durch die GC Analyse (siehe Abbildung 4.3 unten). Die Reaktion wurde laut GC-Analyse mit einem geringen Überschuss an Laurinsäure gestartet und entspricht nicht exakt einem äquimolaren Verhältnis (siehe Abbildung 4.3 unten). Beide Substrate nehmen

gleichmäßig mit zunehmender Reaktionszeit ab und Decyllaurat bildet sich. Anhand der Karl-Fischer-Titration wurde der Wasseranteil im Reaktionsgemisch in Stoffmenge (mmol) bestimmt. Das Nebenprodukt Wasser wird kontinuierlich aus dem Blasensäulenreaktor ausgetragen und in der Reaktionsmischung akkumuliert sich somit nur eine sehr geringe Menge. Zu Beginn der Reaktion beträgt der Wasseranteil bereits 2 mmol. Durch den Austrag des Wassers mittels Desorption in die trockene Luft, die in den Blasensäulenreaktor eingebracht wird, verschiebt sich nach Le Chatelier das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite und der Stoffmengenanteil von Decyllaurat nähert sich bei hohen Umsätzen von Laurinsäure an einen Stoffmengenanteil von eins an. Durch die hohe anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit steigt die Wasser-Akkumulationsmenge auf ein Maximum von ca. 3 mmol Wasser nach 20 min an (siehe Abbildung 4.3). Die Bildungsrate von Wasser ist zu diesem Zeitpunkt höher als die Austragsrate von Wasser. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Hinreaktion zum Produkt nimmt über die Reaktionszeit ab und ist im Reaktionsgleichgewicht gleich der der Rückreaktion. Im Gleichgewicht wurde eine Wassermenge von $< 0,5$ mmol bestimmt. So konnte gezeigt werden, dass der Blasensäulenreaktor ein geeigneter Reaktortyp für Veresterungsreaktionen ist, da durch die eingebrachte Luft das Wasser effizient ausgetragen werden kann. Hierbei ist zu beobachten, dass der Austrag von Wasser aus unpolaren Reaktionssystemen schneller und effizienter funktioniert als aus polaren Reaktionssystemen, in denen sich das Wasser in der polaren Phase lösen kann [Müller 2012].

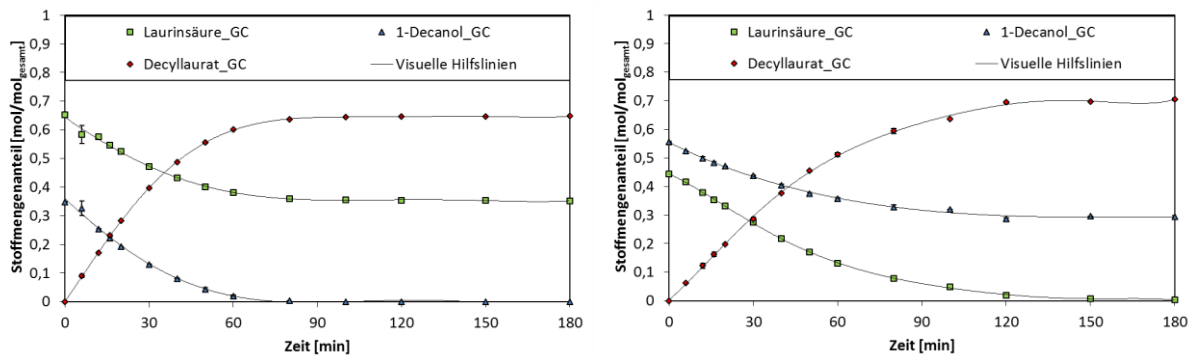


Abbildung 4.4: Stoffmengenverläufe der einzelnen Komponenten einer Batch-Reaktion mit Überschuss Laurinsäure (links) und Überschuss 1-Decanol (rechts) im Blasensäulenreaktor. **Reaktionsbedingungen links:** $T = 55,6$ °C, Luftbegasung mit 0,75 L/min bei 1 atm., 1 Gew.-% (0,92 g) Novozym 435®, 300 mmol (60 g) Laurinsäure, 200 mmol (31,7 g) 1-Decanol. **Reaktionsbedingungen rechts:** $T = 55,6$ °C, Luftbegasung mit 0,75 L/min bei 1 atm., 1 Gew.-% (0,59 g) Novozym 435®, 134 mmol (26,8 g) Laurinsäure, 200 mmol (31,7 g) 1-Decanol.

In Abbildung 4.4 sind die Stoffmengenverläufe der einzelnen Komponenten jeweils für eine Batch-Reaktion mit Überschuss an Laurinsäure (Abbildung 4.4 links) und Überschuss an 1-Decanol (Abbildung 4.4 rechts) dargestellt. Das Substrat das im Unterschuss vorliegt, wird in beiden Fällen zum Ende der Reaktion komplett umgesetzt. Der Unterschied ist, dass die Umsetzung von 1-Decanol im Reaktionssystem mit Laurinsäure im Überschuss (Abbildung 4.4 links) schneller ist und nach ca. 80 Minuten das Reaktionsgleichgewicht erreicht wird. Im Reaktionssystem mit 1-Decanol im Überschuss (Abbildung 4.4 rechts) wird das Reaktionsgleichgewicht erst nach ca. 120 min erreicht. Die Lipase B aus *Candida antarctica*

besitzt eine höhere Affinität zum Substrat 1-Decanol. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der enzymatischen Veresterung ist der nucleophile Angriff am Carboxylkohlenstoff der Laurinsäure.

4.1.3 Fed-Batch-Reaktion

Des Weiteren wurden für die Modellreaktion von 1-Decanol und Laurinsäure Fed-Batch-Experimente durchgeführt, die ebenfalls als Datensatz zur chemometrischen Modellierung herangezogen worden sind. Dieser zusätzliche Datensatz ist die Grundlage einer Prozesssteuerung mittels FT-MIR-Spektroskopie für eine Fed-Batch-Reaktionsführung. Die aufgenommenen ATR-FTIR-Spektren der manuellen Fed-Batch-Experimente dienen als Kalibrierdatensatz für das chemometrische Modell, welches später für die Prozesssteuerung eingesetzt wurde. Das Fed-Batch-Experiment mit kontinuierlicher Zuführung von 1-Decanol diente zur externen Validierung des chemometrischen Modells (siehe Kap. 7). Zunächst wurde eine Fed-Batch-Reaktion mit manueller Zugabe von 1-Decanol durchgeführt (siehe Abbildung 4.5). Es wurden jeweils 5 Minuten nach jedem Messpunkt erneut 20 mmol (3,8 mL) 1-Decanol per Pipette manuell zugeführt. Die GC-Messpunkte bis zu einer Versuchsdauer von ca 370 Minuten stellen jeweils die Stoffmengenanteile im wieder erreichten Reaktionsgleichgewicht dar, in welchem die zugeführte Menge an 1-Decanol vollständig mit der Laurinsäure zu Decyllaurat umgesetzt worden ist. Insgesamt wurden 180 mmol (34,2 mL) 1-Decanol zu der Reaktionsmischung dosiert. Bei der letzten Dosierung wurde kurz nach der Zugabe ein Messpunkt analysiert. Bei 380 Minuten tritt eine Verdünnung durch die Zugabe von 1-Decanol ein, da an diesem Messpunkt der Verdünnungseffekt durch 1-Decanol die Reaktion überlagert und sich der Messpunkt nicht in einem thermodynamischen Gleichgewicht befindet.

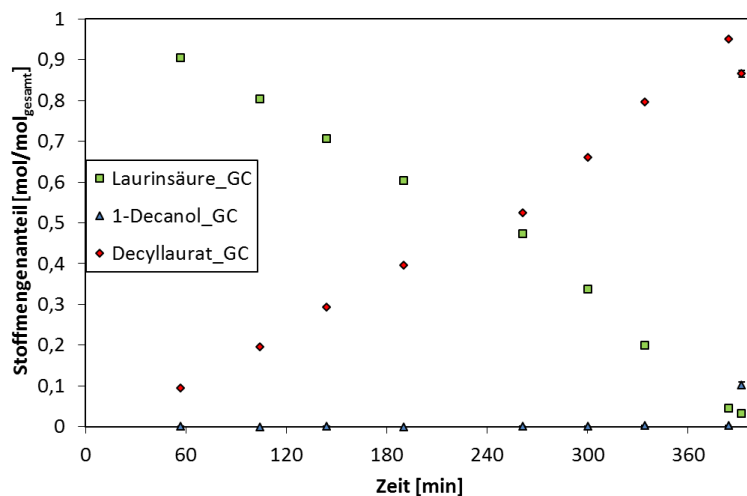


Abbildung 4.5: Stoffmengenverläufe der einzelnen Komponenten der Fed-Batch-Reaktion im Blasensäulenreaktor mit manueller Dosierung von 1-Decanol.

Reaktionsbedingungen: T = 55,6 °C, Luftbegasung mit 0,75 L/min. bei 1 atm, 1 Gew.-% (0,72 g) Novozym 435®, 200 mmol (40,0 g) Laurinsäure im Reaktor vorgelegt, jeweils 20 mmol (3,8 mL) 1-Decanol 5 min nach jedem Messpunkt und zu Beginn der Reaktion manuell per Pipette zugeführt.

In Abbildung 4.6 ist der Stoffmengenverlauf des Fed-Batch-Experiments mit kontinuierlicher Zugabe von 1-Decanol mit einer Feed-Rate von 0,4 mL/min (2,1 mmol/min) dargestellt. Hier wurde 1-Decanol mit einer Mikrozahnrumppe in den Reaktor gefördert. Die Versuchsdauer betrug 60 Minuten. Dieses Experiment wurde zur externen Validierung des chemometrischen Modells in Kapitel 7 herangezogen.

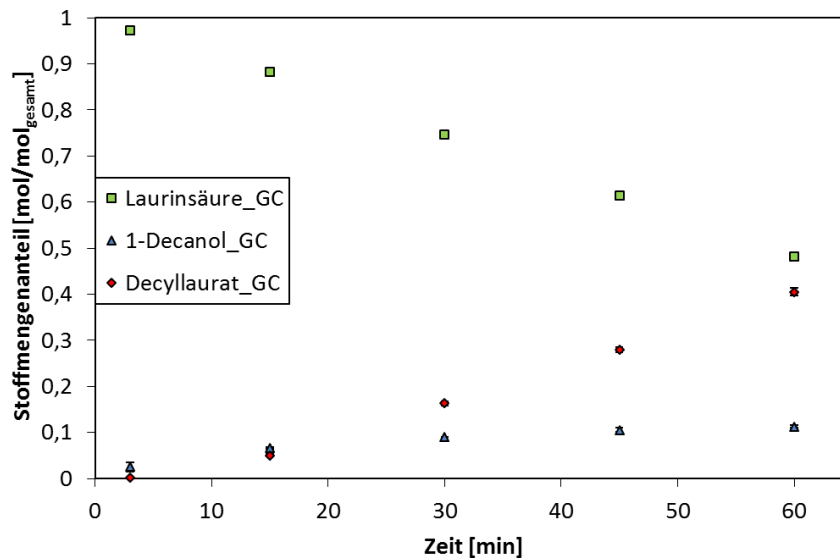


Abbildung 4.6: Stoffmengenverläufe der einzelnen Komponenten der Fed-Batch-Reaktion im Blasensäulenreaktor mit konstanter Dosierung von 1-Decanol.

Reaktionsbedingungen: $T = 55,6\text{ °C}$, Luftbgasung mit 0,75 L/min. bei 1 atm, 1 Gew.-% (0,72 g) Novozym 435®, 200 mmol (40,0 g) Laurinsäure im Reaktor vorgelegt, konstant 0,4 mL/min (2,1 mmol/min) 1-Decanol per Mikrozahnrumppe zugeführt.

Die Zugabe von 1-Decanol wurde nach 60 Minuten gestoppt. In dieser Reaktionszeit von 60 Minuten wurden insgesamt 24 mL (126 mmol) 1-Decanol dem Reaktor zugeführt. Das entspricht am Ende der Reaktion in etwa einer Batch-Reaktion mit Laurinsäure im Überschuss mit einem molaren Substratverhältnis von ca. 1,5 / 1,0 (Laurinsäure/1-Decanol). Im Vergleich mit der Batch-Reaktion mit Laurinsäure im Überschuss (siehe Abbildung 4.4 links) welche einen Decyllaurat-Stoffmengenanteil von 0,4 bereits nach 30 Minuten besitzt, verläuft diese schneller als die Fed-Batch-Reaktion mit 0,4 nach 60 Minuten. Bei der Batch-Reaktion wurden 0,92 g NVZ 435® auf insgesamt 500 mmol Substrate (300 mmol Laurinsäure und 200 mmol 1-Decanol) eingesetzt. Das entspricht einem relativen Wert von $1,84\text{ mg}_{\text{NVZ345}^\circ}/\text{mmol}_{\text{Substrat}}$. Bei der Fed-Batch-Reaktion wurden im Vergleich $2,21\text{ mg}_{\text{NVZ345}^\circ}/\text{mmol}_{\text{Substrat}}$ eingesetzt (0,72 mg NVZ 435® auf 200 mmol Laurinsäure und 126 mmol 1-Decanol). Somit kann die langsamere Reaktionsgeschwindigkeit nicht durch unterschiedliche Anteile von Enzym-Präparat erklärt werden. Bei der Fed-Batch-Reaktion ist jedoch eine deutlich geringere Stoffmenge an 1-Decanol vorhanden verglichen zur Batch-Reaktion, wodurch die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit limitiert war. Nach 60 Minuten hat sich beim Fed-Batch der Stoffmengenanteil von 1-Decanol zu 0,113 mol/mol_{gesamt} akkumuliert. Der Stoffmengenanteil der Laurinsäure liegt nach 60 Minuten durch die Umsetzung zu Decyllaurat und einem überlagerten Verdünnungseffekt bei 0,482 mol/mol_{gesamt}. Durch die Umsetzung beider

Substrate sind $0,405 \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}}$ Decyllaurat entstanden. Bei der Batch Reaktion liegt diese Zusammensetzung schon nach 30 Minuten vor (siehe Abbildung 4.4 links).

4.2 Synthese von Partialglyceriden

Bei der Lipase-katalysierten Synthese von Partialglyceriden, bestehend aus Glycerol und Laurinsäure als Fettsäurerest, werden im Folgenden die zwei verschiedenen Synthesewege vorgestellt und analysiert. Zum einen die lösungsmittelfreie enzymatische Veresterung von Glycerol und Laurinsäure und zum anderen die lösungsmittelfreie enzymatische Glycerolyse von Glyceroltrilaurat.

4.2.1 Veresterung von Glycerol mit Laurinsäure

Die Veresterungsreaktion zur Untersuchung der Reaktionsselektivität ist ein 4-Phasen-System (siehe Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8). Dabei stellt Glycerol als Triol die polare Phase dar. Laurinsäure als zweites Substrat sowie Glycerolmono-, di- und trilaurat bilden die unpolare Phase. Die eingebrachte Luft im Blasensäulenreaktor bildet die Gasphase. Diese dient neben der Durchmischung auch dem Austrag des Nebenprodukts Wasser. Je nachdem wie das molare Verhältnis der beiden Substrate zum Beginn der Reaktion ist oder sich während der Reaktion verändert, bilden sich unterschiedliche Mehrphasensysteme aus. Bei einem Überschuss an Laurinsäure stellen Laurinsäure und die Glyceride die kontinuierliche Phase dar, in der das polare Glycerol dispergiert ist (siehe Abbildung 4.7). Sobald Glycerol im Überschuss vorliegt, stellt das polare Glycerol die kontinuierliche Phase dar, in der die Laurinsäure sowie die Glyceride als unpolare Phase in Tröpfchen dispergiert sind (siehe Abbildung 4.8).

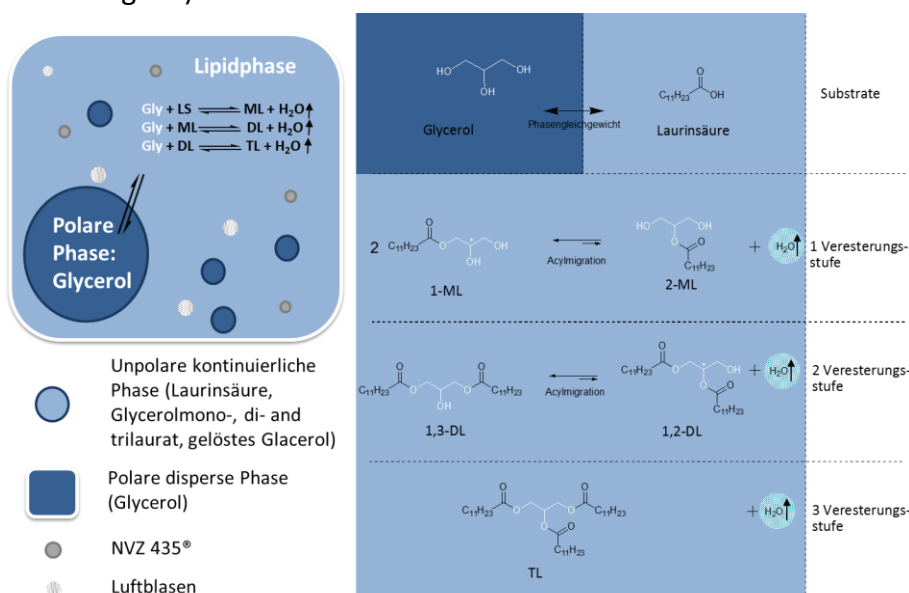


Abbildung 4.7: Reaktionsschema der Veresterung von Glycerol als Triol mit Laurinsäure im Überschuss. 1-ML: Glycerol-1-monolaurat, 2-ML: Glycerol-2-monolaurat, 1,3-DL: Glycerol-1,3-dilaurat, 1,2-DL: Glycerol-1,2-dilaurat, TL: Glyceroltrilaurat.

Die Veresterungsreaktion wird wiederum durch die Lipase B aus *Candida antarctica* katalysiert (Novozym 435®=NVZ 435®). Die Lipase B ist adsorptiv auf einem hydrophoben porösen Carrier aus Polymethacrylat immobilisiert, was dazu führt, dass der Biokatalysator NVZ 435® jeweils in der unpolaren Phase als Feststoffpartikel suspendiert und nur an der Grenzphase zum Glycerol vorliegt. Die Reaktion findet demnach ausschließlich in der unpolaren Phase statt. Damit das Glycerol an der Reaktion teilnehmen kann, muss sich ein Anteil in die unpolare Phase lösen. Mit der Zunahme vom Reaktionsprodukt Glycerolmonolaurat ML steigt die Löslichkeit von Glycerol in der unpolaren Phase (siehe Kapitel 4.3). Es liegt ein Phasengleichgewicht für Glycerol zwischen der polaren Phase (Glycerol) und der unpolaren Phase (Laurinsäure und Glyceride) vor, welches durch ML verschoben werden kann.

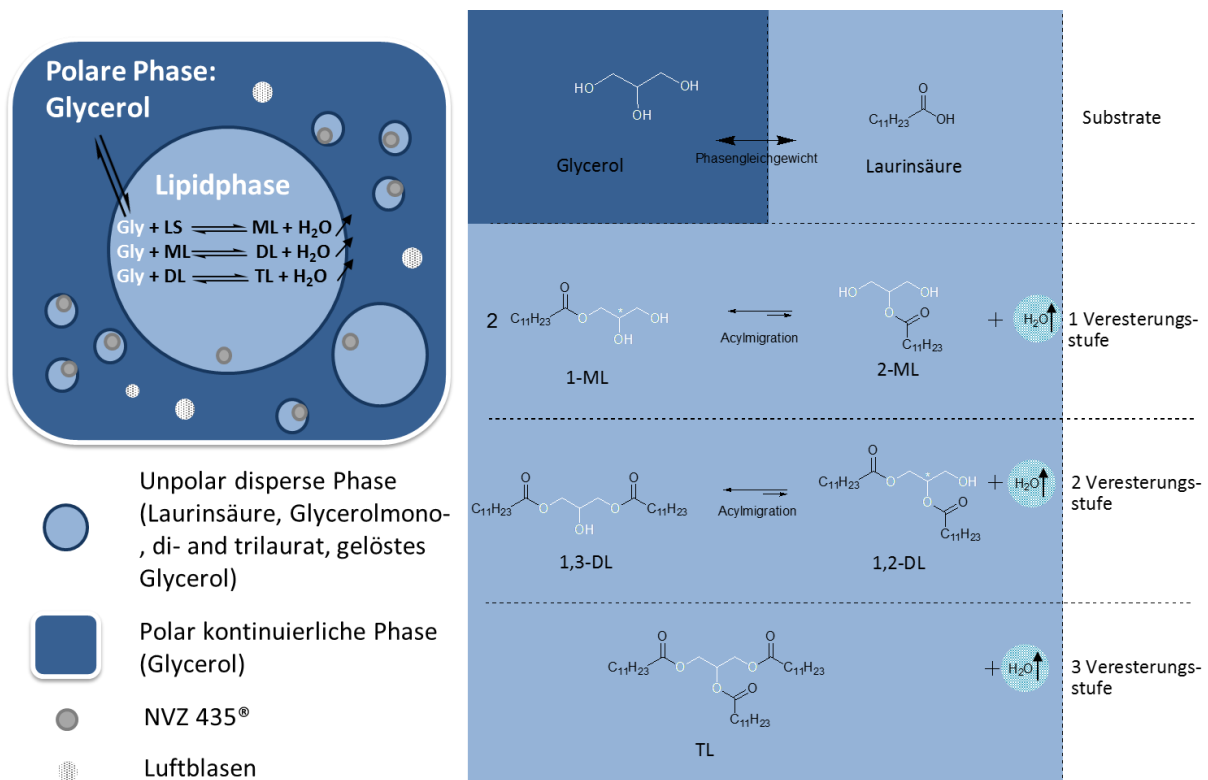
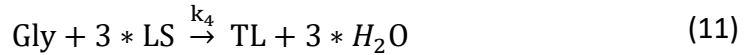


Abbildung 4.8: Reaktionsschema der Veresterung von Glycerol (Gly) als Triol mit Laurinsäure (LS). Glycerol liegt im Überschuss vor. 1-ML: Glycerol-1-monolaurat, 2-ML: Glycerol-2-monolaurat, 1,3-DL: Glycerol-1,3-dilaurat, 1,2-DL: Glycerol-1,2-dilaurat, TL: Glyceroltrilaurat.

Bei der Veresterungsreaktion von Glycerol und Laurinsäure handelt es sich um eine konkurrierende Folgereaktion. Dabei werden die Substrate Glycerol (Gly) und Laurinsäure (LS) in einer mehrstufigen Veresterungsreaktion unter Abspaltung des Nebenproduktes Wassers zu den Produkten Glycerolmonolaurat (ML), Glyceroldilaurat (DL) und Glyceroltrilaurat (TL) umgesetzt. Die Partialglyceride liegen in Form der Isomere Glycerol-1-monolaurat und Glycerol-2-monolaurat sowie Glycerol-1,3-dilaurat und Glycerol-1,2-dilaurat vor. Der biokatalytischen Reaktion ist eine Acylmigration überlagert. Dabei lagert sich eine Acylgruppe von einem sekundären Kohlenstoffatom am Glyceridmolekül an ein primäres Kohlenstoffatom um. Für das betrachtete Reaktionssystem ergeben sich folgende Reaktionsgleichungen (1-3), wobei folgende Einschränkungen vorliegen: Es werden keine Isomere betrachtet, die

Reaktionsprodukte ML, DL, TL und LS sind beliebig miteinander mischbar, während Gly nicht mischbar mit LS ist (siehe Kapitel 4.3). Das Abspaltungsprodukt Wasser wird in folgender Betrachtung vernachlässigt. Gleichung 11 stellt die makroskopische Gesamtgleichung dar.



Folgende Gleichungen für die Reaktionsgeschwindigkeiten r für die einzelnen Produkte ergeben sich daraus:

$$r_{\text{ML}} = c_{\text{LS}} * (k_1 c_{\text{Gly}} - k_2 c_{\text{ML}}) \quad (12)$$

$$r_{\text{DL}} = c_{\text{LS}} * (k_2 c_{\text{ML}} - k_3 c_{\text{DL}}) \quad (13)$$

$$r_{\text{TL}} = k_3 c_{\text{DL}} c_{\text{LS}} \quad (14)$$

Für die Gleichgewichtskonstanten ergeben sich daraus folgende vereinfachte Gleichungen (Annahme: Minimale Stoffmenge Laurinsäure wird im thermodynamischen Reaktionsgleichgewicht vernachlässigt):

$$K_{1,\text{Veresterung}} = \frac{x_{\text{ML}} * x_{\text{H}_2\text{O}}}{x_{\text{Gly}} * x_{\text{LS}}} \quad (15)$$

$$K_{2,\text{Veresterung}} = \frac{x_{\text{DL}} * x_{\text{H}_2\text{O}}}{x_{\text{ML}} * x_{\text{LS}}} \quad (16)$$

$$K_{3,\text{Veresterung}} = \frac{x_{\text{TL}} * x_{\text{H}_2\text{O}}}{x_{\text{DL}} * x_{\text{LS}}} \quad (17)$$

$$K_{4,\text{Veresterung}} = \frac{x_{\text{TL}} * x_{\text{H}_2\text{O}}^3}{x_{\text{Gly}} * x_{\text{LS}}^3} \quad (18)$$

Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i r_i $[\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}]$

Geschwindigkeitskoeffizient der Komponente i k_i $[\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}]$

Stoffmengenkonzentration c_i $[\text{mol L}^{-1}]$

Stoffmengenanteil x_i $[\text{mol mol}^{-1}]$

Die Gleichungen (12-14) hängen gleichermaßen von der Konzentration der Laurinsäure c_{LS} ab. Dahingegen wird die Bildung von Glycerolmonolaurat zusätzlich durch die Konzentration an Glycerol c_{Gly} beeinflusst (Gleichung 12). So kann der Anteil an Glycerolmonolaurat im Endprodukt durch die Erhöhung der Konzentration an Glycerol bewirkt werden [McNeill et al. 1990; Hasenhuettl 2008].

4.2.2 Glycerolyse von Glyceroltrilaurat

Die Glycerolysereaktion von Glyceroltrilaurat zur Untersuchung der Reaktionsselektivität ist ebenso ein 4-Phasen-System (siehe Abbildung 4.9). Dabei stellt Glycerol als Triol die polare Phase dar. Glyceroltrilaurat als zweites Substrat, sowie die Partialglyceride Glycerolmono- und dilaurat bilden die unpolare Phase. Das verwendete Glyceroltrilaurat wurde im 2-L Maßstab in einem Blasensäulenreaktor selbst synthetisiert. Das Endprodukt enthält dabei noch geringe Anteile an Laurinsäure, Glycerolmono- und dilaurat. Die eingebrachte Luft im Blasensäulenreaktor ist die Gasphase. Diese dient bei der Glycerolyse hauptsächlich der Durchmischung. Zusätzlich soll dadurch das Nebenprodukt Wasser ausgetragen werden, welches durch eine Reaktion des Restanteils Laurinsäure mit Glycerol entstehen kann. Die Glycerolyse wird durch den Biokatalysator Novozym 435® (NVZ 435®) katalysiert. Dieser ist in der unpolaren Phase, sowie in der Grenzphase zum Glycerol als Feststoffpartikel suspendiert. Das polare Glycerol muss sich ebenfalls in der unpolaren Phase lösen, in der die Reaktion stattfindet. Es liegt hier ein Phasengleichgewicht zwischen der polaren Phase (Glycerol) und der unpolaren Phase (Glyceride) vor. Bei der Glycerolyse von Glyceroltrilaurat handelt es sich um eine parallel verlaufende Umesterungsreaktion. Dabei werden die Substrate Glycerol (Gly) und Glyceroltrilaurat (TL) zu den Produkten Glycerolmonolaurat (ML) und Glyceroldilaurat (DL) umgesetzt. Die Partialglyceride liegen in Form der Isomere Glycerol-1-monolaurat (1-ML) und Glycerol-2-monolaurat (2-ML) sowie Glycerol-1,3-dilaurat (1,3-DL) und Glycerol-1,2-dilaurat (1,2-DL) vor. Durch den regioselektiven Biokatalysator NVZ 435® werden zunächst 1,2-DL und 1-ML gebildet. Durch die Überlagerung der chemischen Acylmigration bildet sich 1,3-DL. Dieses wird mit Glycerol wiederum zu 1-ML umgesetzt. 1,2-DL wird mit Glycerol weiter durch die regioselektive Umesterung zu 2-ML und 1-ML umgesetzt. 2-ML wird durch die Acylmigration chemisch zu 1-ML umgewandelt.

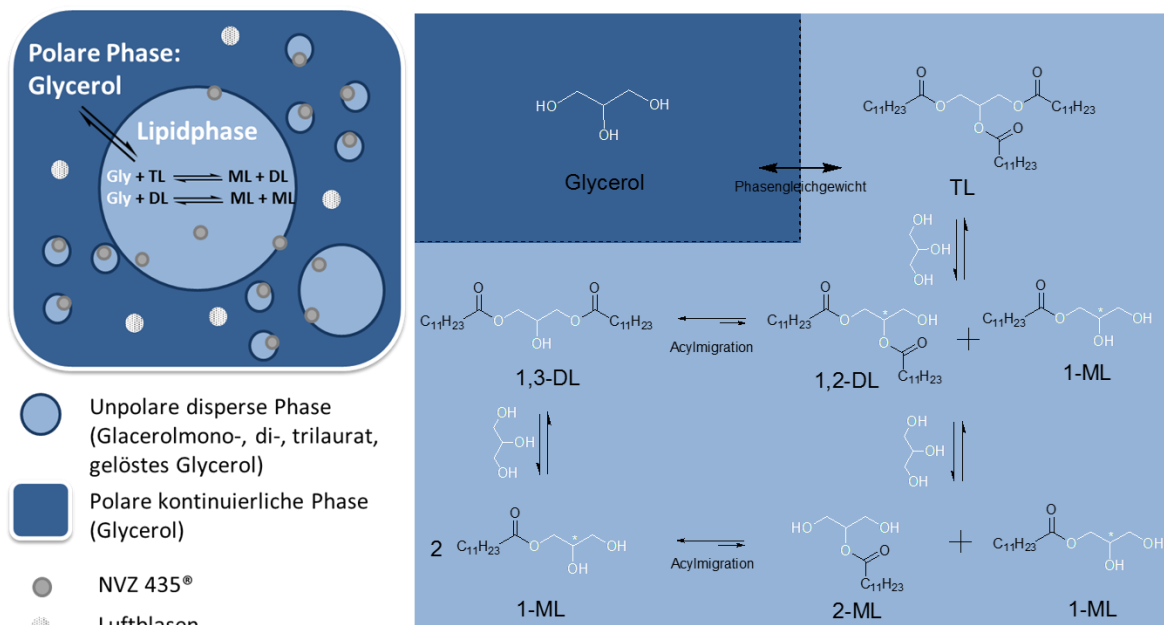


Abbildung 4.9: Reaktionsschema der Glycerolyse von Glyceroltrilaurat (TL). 1-ML: Glycerol-1-monolaurat, 2-ML: Glycerol-2-monolaurat, 1,3-DL: Glycerol-1,3-dilaurat, 1,2-DL: Glycerol-1,2-dilaurat.

Für das betrachtete Reaktionssystem ergeben sich folgende Reaktionsgleichungen (19-21) unter Beachtung folgender Einschränkungen: Es werden keine Isomere betrachtet, die Reaktionsprodukte ML, DL, und TL sind beliebig miteinander mischbar, während Glycerol nur zum Teil in der unpolaren Phase löslich ist [siehe Kapitel 4.3.2].

Reaktionsgleichungen:



Gleichgewichtskonstanten:

$$K_{1,\text{Glycerolyse}} = \frac{x_{\text{ML}} * x_{\text{DL}}}{x_{\text{GLY}} * x_{\text{TL}}} \quad (22)$$

$$K_{2,\text{Glycerolyse}} = \frac{x_{\text{ML}}^2}{x_{\text{GLY}} * x_{\text{DL}}} \quad (23)$$

$$K_{3,\text{Glycerolyse}} = \frac{x_{\text{ML}}^3}{x_{\text{GLY}}^2 * x_{\text{TL}}} \quad (24)$$

4.3 Untersuchung des Phasenverhaltens^b

In diesem Unterkapitel wird das Phasenverhalten der Mehrphasenreaktionen (vergleiche Kapitel 4.2.1 & 4.2.2) experimentell untersucht und mit der Modellrechnung mittels COMOS-RS verglichen. Dabei werden folgende Komponenten der Reaktion betrachtet: Laurinsäure (LS), Glycerol (Gly), Glycerolmonolaurat (ML), Glyceroldilaurat (DL), Glyceroltrilaurat (TL). Wiederum werden zur Vereinfachung keine Isomere der Partialglyceride berücksichtigt. Zunächst werden die binären Systeme aller Reaktionsteilnehmer in Temperatur-Molenbruch-Diagrammen (T,x-Diagrammen) beschrieben (siehe Kapitel 4.3.1). Das Flüssig-Flüssig-Gleichgewicht der ternären Systeme aus Kombinationen der Reaktionsteilnehmer können in Dreiecksdiagrammen dargestellt werden (siehe Kapitel 4.3.2). In Kapitel 4.3.3 werden die Verteilungskoeffizienten der Glyceride in einer Glycerol/Laurinsäure Mischung diskutiert.

4.3.1 Binäre Systeme - T,x-Diagramm

Das Flüssig-Flüssig-Gleichgewicht eines binären Systems aus Glycerol und Laurinsäure (LS) und Glycerol (Gly) und Glyceride (ML, DL, TL) kann in einem T,x-Diagramm dargestellt werden. Folgende binäre Systeme werden dargestellt: Gly/LS, Gly/ML, Gly/DL & Gly/TL.

Binäre Gemische aus Laurinsäure / Glyceride

Die Untersuchung der binären Systeme aus Laurinsäure und den Glyceriden ML, DL und TL (siehe Abbildung 4.10) hat gezeigt, dass die binären Systeme keine Mischungslücke bilden. Alle Komponenten sind komplett ineinander löslich und das System bleibt einphasig. Daher wird auf die Darstellung in einem T,x-Diagramm verzichtet.



Abbildung 4.10: Binäre Gemische (jeweils $x = 0,5$) aus LS/ML, LS /DL und LS /TL bei 65 °C (von links nach rechts).

^b Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von B.Sc. Nadine Zerle erzeugt: Untersuchung des Phasenverhaltens von Glycerin, Laurinsäure und deren Partialglyceriden, *Bachelorarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2014

Binäre Gemische aus Glycerol / Laurinsäure & Glycerol / Glyceride

Die binären Systeme mit Glycerol als eine Komponente bilden jeweils 2-Phasen Mischungen aus (siehe Abbildung 4.11). Da die untere Versuchstemperatur von 65°C zu dicht am Schmelzpunkt von Glycerolmonolaurat ($T_{\text{Schmelz,ML,Literatur}} = 63 \text{ °C}$) liegt, wurde die minimale Versuchstemperatur auf 70 °C für die Phasentrennung von Glycerol und ML gesetzt. Außerdem wurden alle binären Systeme bei einer maximalen Versuchstemperatur von 75 °C untersucht.

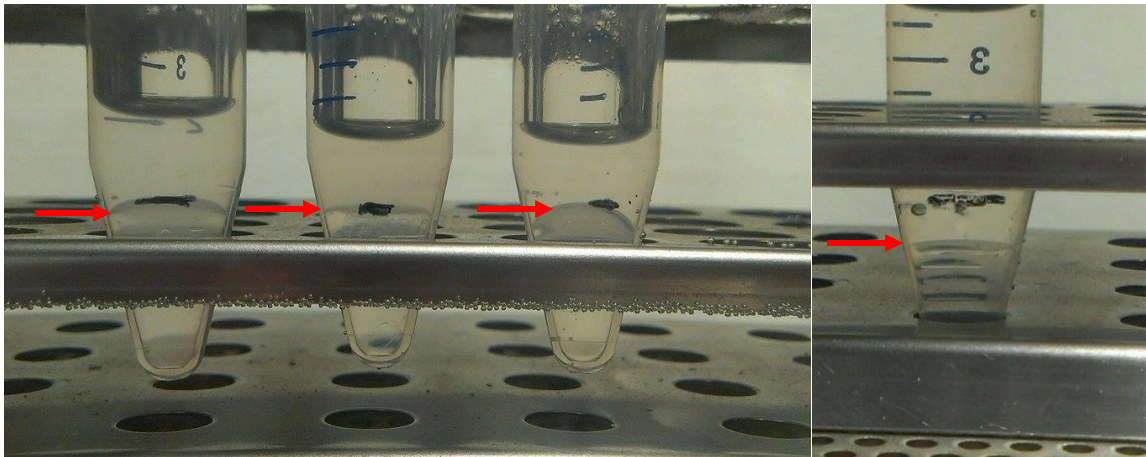


Abbildung 4.11: Binäre Gemische aus Gly + LS, Gly + DL und Gly + TL bei 65 °C (von links nach rechts), sowie Gly + ML bei 70 °C (ganz rechts). Die roten Pfeile zeigen die Phasengrenzfläche beider Phasen in den Fotografien an.

In der Abbildung 4.11 zeigen die roten Pfeile die Grenzschicht zwischen der oberen polaren Glycerol-reichen Phase und der unteren unpolaren Phase an. Die Phasenzusammensetzungen der untersuchten Systeme sind in Abbildung 4.12 anhand des Molenbruchs von Gly in den zwei Phasen dargestellt. Die Proben wurden dreifach angesetzt, jeweils doppelt bestimmt und die Mittelwerte aus 6 Messwerten mit der Standardabweichung (Fehlerbalken) aufgetragen. In der Abbildung 4.12 sind des Weiteren die mit CORMO-RS modellierten Daten als Linien aufgetragen. Der rechte Rand der Abbildung 4.12 bei $x_{\text{Gly}} \rightarrow 1$ stellt die Glycerol-reiche Phase dar (entspricht der oberen Phase in Abbildung 4.11). Der linke Rand der Abbildung 4.12 bei $x_{\text{Gly}} \rightarrow 0$ stellt die unpolare Phase dar (entspricht der unteren Phase in Abbildung 4.11). Der Bereich zwischen den beiden Randpunkten stellt die Mischungslücke dar, in der die Zusammensetzung der binären Mischung entlang waagerechter Konoden in jeweils eine Glycerol-reiche Phase (rechts) und eine unpolare Phase (links) zerfällt. Die experimentellen Daten (Symbole in Abbildung 4.12) zeigen, dass sich bei der Phasentrennung dieser binären Systeme jeweils eine polare Glycerol-Phase und eine unpolare Phase, in der Glycerol zum Teil gelöst vorliegt, ausbilden. Die unpolare Phase besteht in diesem Fall hauptsächlich aus der zweiten Komponente des binären Systems (hier LS oder den Glyceriden ML, DL und TL). Ebenfalls ist in der Abbildung 4.12 zu erkennen, dass sich der Anteil an gelösten Glycerol in der unpolaren Phase von TL über DL und LS zu ML steigert. In der Glycerolmonolaurat-reichen Phase löst sich am meisten Glycerol. Bei allen binären Systemen steigt die Löslichkeit des Glycerols in der unpolaren Phase mit steigender Temperatur

(65°C/70°C auf 75°C). Dadurch wird die Mischungslücke aller hier untersuchten binären Systeme mit steigender Temperatur kleiner.

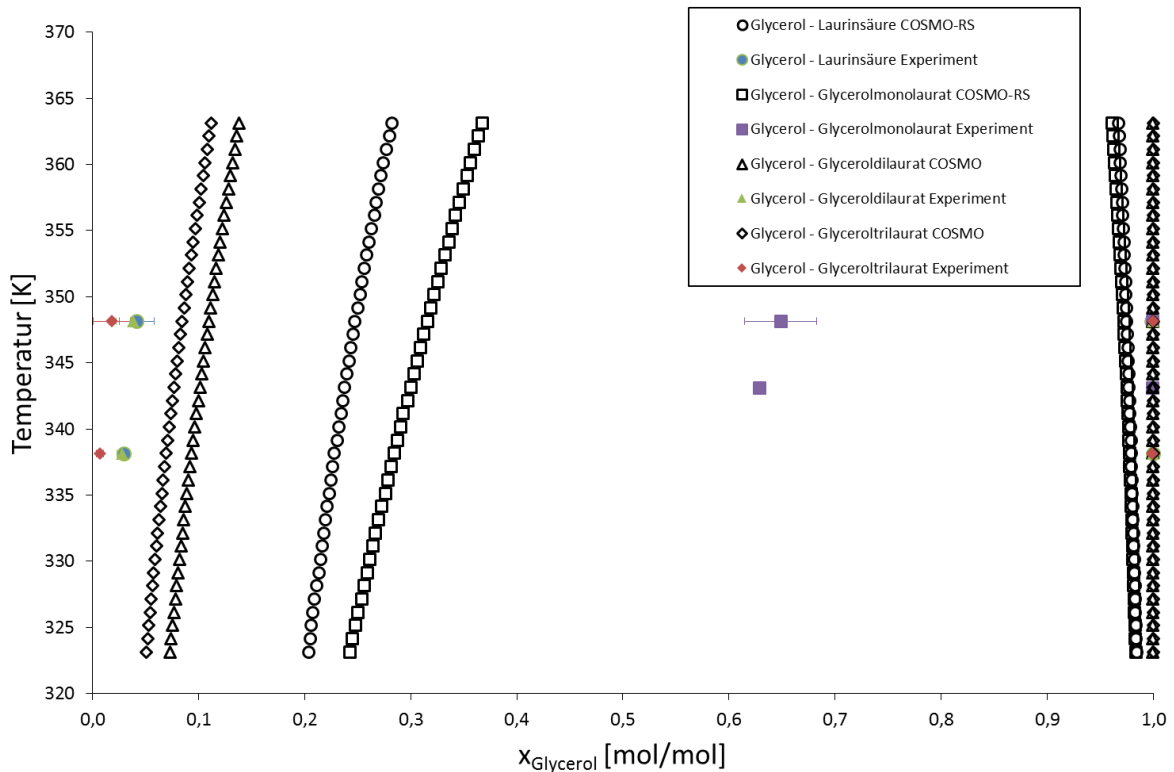


Abbildung 4.12: : T,x-Diagramm zum Vergleich von experimentell bestimmten Daten (geschlossene Symbole) sowie mittels COSMO-RS berechneter Daten (offene Symbole) aller untersuchten binären Systeme: Gly/LS, Gly/ML, Gly/DL und Gly/TL.

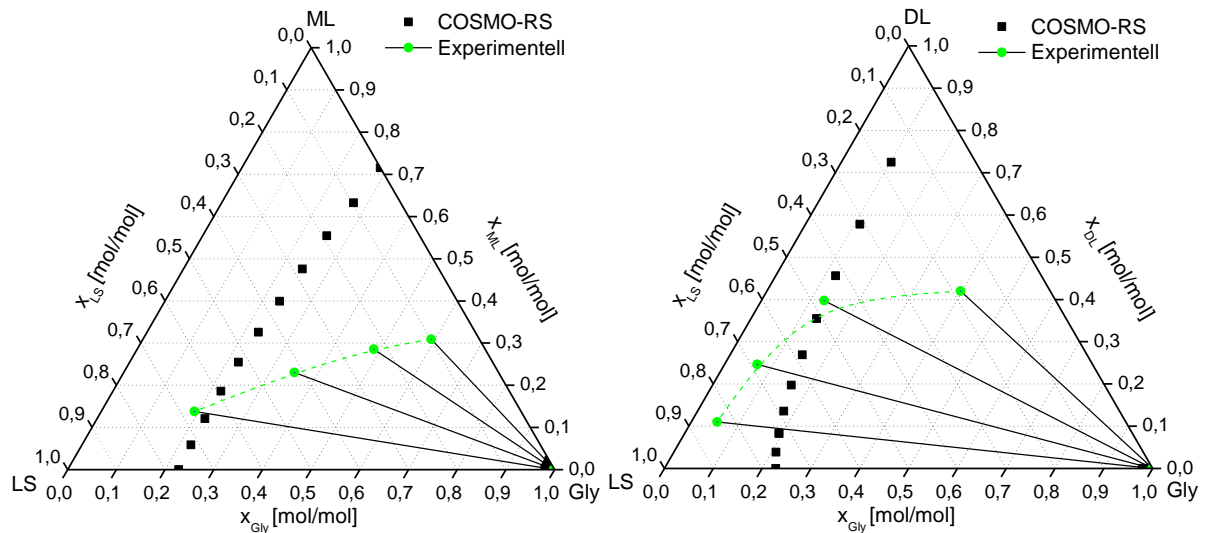
Der Vergleich der experimentellen Daten mit COSMO-RS zeigt, dass COSMO-RS die Tendenz, welcher Stoff Glycerol am besten löst, richtig darstellt. Sowohl aus den Versuchswerten als auch aus den Daten von COSMO-RS geht hervor, dass sich Glycerol am wenigsten in TL löst und die Mischungslücke daher auf der linken Seite des Diagramms am größten ist. Auch die Tendenz, dass sich Glycerol aufsteigend in Glyceroldilaurat, Laurinsäure und Glycerolmonolaurat besser löst, gibt das theoretische Modell richtig wieder. Die Mischungslücke für die binären Systeme Gly/LS, Gly/TL und Gly/DL wird durch COSMO-RS unterschätzt und für Gly/ML stark überschätzt. Lediglich die Glycerol-reiche Phase (rechter Rand in der Abbildung 4.12) wird für das System Gly/DL und Gly/TL richtig abgeschätzt. Für die Systeme Gly/LS und Gly/ML wird die Glycerol-reiche Phase überschätzt. COSMO-RS berechnet eine geringe Löslichkeit an LS und ML in der Glycerol-reichen Phase. Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Messdaten und der Vergleich, dass sich COSMO-RS als Modell eignet, um die Tendenzen des Mischungsverhaltens der Komponenten qualitativ richtig vorherzusagen. Aus der Literatur bekannt ist, dass die Wahl der Konformere (beschreibt die räumliche Anordnung der Moleküle) einen großen Einfluss auf die Güte der Vorhersage durch COSMO-RS hat, speziell für große Moleküle wie es Glycerolmono-, di- und trilaurat sind [Buggert et al. 2009; Jakobtorweihen et al. 2013; Mokrushina et al. 2012]. Um zuverlässige Prognosen für die Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte dieser reinen Konformere in den genannten Systeme zu

erhalten, sind weitere Messungen oder Studien in Bezug auf die Auswahl angemessener Konformere notwendig. COSMO-RS dient in der vorangestellten Untersuchung lediglich der Abschätzung der Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte der untersuchten Mehrphasensysteme.

4.3.2 Dreiecksdiagramm der ternäre Systeme

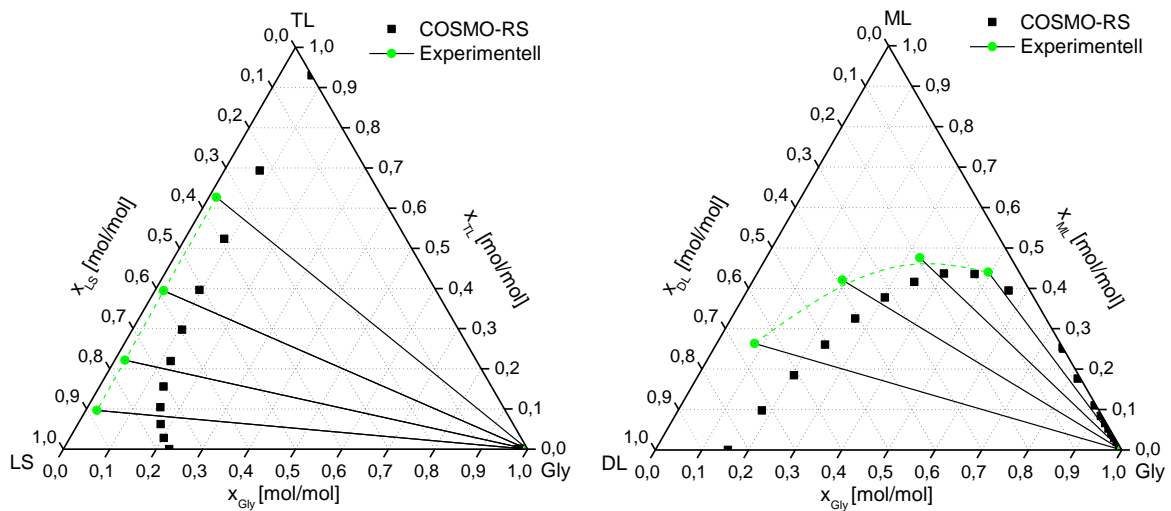
Das Flüssig-Flüssig-Gleichgewicht der ternären Systeme aus Glycerol, Laurinsäure und den Glyceriden ML, DL und TL sind ebenfalls bei einer Temperatur von 65 °C in den Dreiecksdiagrammen in Abbildung 4.13 a-f dargestellt (vergleiche Kapitel 1.4). Die Seiten der Dreiecksdiagramme stellen jeweils die binären Systeme dar und die Eckpunkte stellen die Reinstoffe dar. Dabei sind jeweils experimentelle Daten (grüne Kreise in Abbildung 4.13 a-f) und mit COSMO-RS modellierte Daten (schwarze Quadrate in Abbildung 4.13 a-f) aufgetragen. Zuerst werden die experimentellen Daten beschrieben und diskutiert. Im Anschluss folgt auf den Vergleich mit den modellierten Daten aus COSMO-RS eingegangen.

Die untersuchten ternären Systeme zeigen unterschiedlich ausgebildete Mischungslücken. Jedes ternäre System beinhaltet Glycerol als eine polare Komponente im Gesamtsystem. Die Dreikomponentensysteme in Abbildung 4.13 a-c weisen jeweils Laurinsäure als zweite Komponente und die Glyceride ML, DL, TL als dritte Komponente im Gesamtsystem auf. Die ternären Systeme Abbildung 4.13 d-f beinhalten jeweils die Glyceride ML, DL, TL als zweite und dritte Komponente. Es wird deutlich, dass sich bei allen ternären Systemen zwei Phasen ausbilden. In der rechten unteren Ecke der Dreiecksdiagramme bildet sich jeweils eine polare Glycerol-Phase. Im Bereich zu der linken Dreiecksseite bildet sich jeweils eine unpolare Lipid-Phase, in der Laurinsäure und die Glyceride ML, DL und TL enthalten sind, sowie zu Teilen Glycerol gelöst vorliegt. Der Bereich dazwischen stellt die Mischungslücke der ternären Systeme dar, in der eine heterogene Zweiphasenmischung vorliegt. Mischungspunkte in diesem Bereich zerfallen entlang der Konoden in zwei koexistierende Phasen. Bei einem Vergleich der ternären Systeme aus Abbildung 4.13 a-c wird deutlich, dass die Mischungslücke von ML zu DL und TL größer wird. Dabei besitzt das ternäre System Gly/LS/ML (siehe Abbildung 4.13 a) die kleinste Mischungslücke. Darüber hinaus wird aus der Abbildung 4.13 d-f ersichtlich, dass ternäre Mischungen, die Glycerolmonolaurat enthalten, kleinere Mischungslücken ausbilden als Systeme ohne ML. Der Grund dafür ist das ML polarer ist als DL und TL und es besitzt eine große Oberflächenaktivität aufgrund seiner Molekülstruktur mit zwei Hydroxylgruppen. ML besitzt daher eine höhere Wasserstoffbrückenbindungskapazität verglichen mit DL und TL.



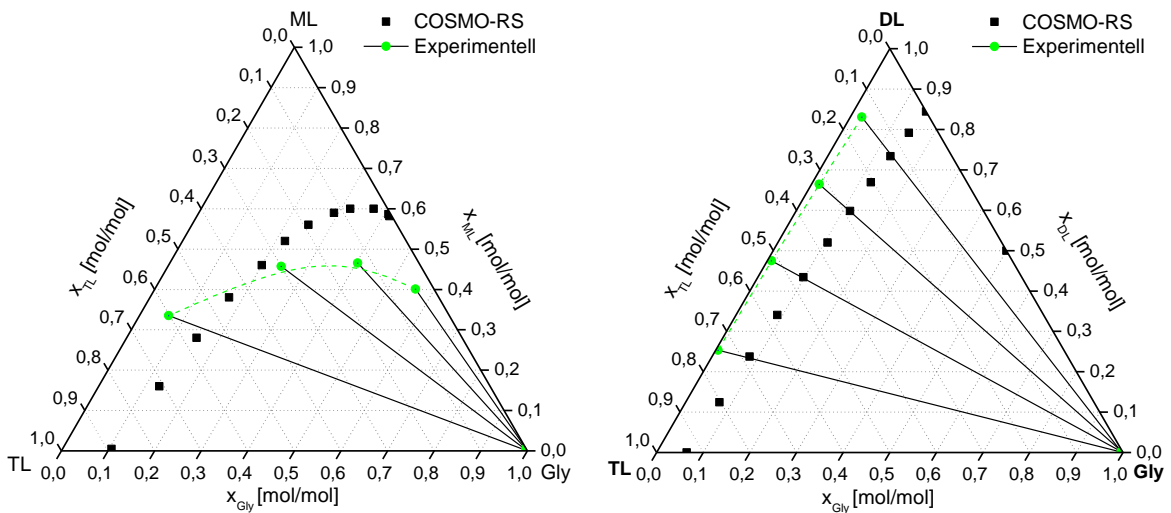
a) Ternäres System aus Gly, ML, LS

b) Ternäres System aus Gly, DL, LS



c) Ternäres System aus Gly, TL, LS

d) Ternäres System aus Gly, ML, DL



e) Ternäres System aus Gly, ML, TL

f) Ternäres System aus Gly, DL, TL

Abbildung 4.13: Dreiecksdiagramme (Experiment: grüne Kreise; COSMO-RS: schwarze Quadrate) der Systeme aus Gly, LS und den Glyceriden ML, DL und TL bei 65 °C.

In der unpolaren Lipid-Phase steigt die Wasserstoffbrückenbindungskapazität bei der Anwesenheit von ML und führt zu einem Anstieg der Löslichkeit von Glycerol in dieser Phase.

Ein Vergleich der experimentellen Daten und den Modelldaten aus COSMO-RS zeigt, dass die Prognosen mit COSMO-RS für die Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte der ternären Systeme nicht mit den experimentellen Daten übereinstimmen, jedoch die Tendenzen der Ergebnisse richtig wiedergegeben werden. Einzig der Zerfall eines Mischungspunktes in der Mischungslücke in die polare Glycerol-Phase wird bei allen Dreikomponentensystemen richtig modelliert. Die Tendenz, dass die Mischungslücke der ternären Systeme in Abbildung 4.13 a-c von ML zu DL und TL zunimmt, wird richtig prognostiziert. Zudem wird durch Berechnung mittels COSMO-RS ebenfalls die Annahme bestätigt, dass sich die Mischungslücke verkleinert, sobald ML als eine Komponente im System vorhanden ist (siehe Abbildung 4.13 d-f). Zusammenfassend gilt, dass COSMO-RS die Trends aus den experimentellen Daten gut wiedergibt. Sowohl bei den experimentellen Messungen also auch bei der Berechnung mit COSMO-RS nimmt die Größe der Mischungslücke von Glycerolmono- über di- bis hin zu trilaurat zu. Die Wahl der Konformere hat bei den Dreikomponentensystemen ebenfalls einen großen Einfluss auf die Vorhersage durch COSMO-RS (vergleiche Kapitel 4.3.1). In dieser Arbeit wird COSMO-RS lediglich als Tool zur Abschätzung der Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte verwendet und die Ergebnisse der kleinsten Mischungslücke bei ML sind für die weiteren Arbeiten von Bedeutung.

4.3.3 Verteilungskoeffizienten

In einem Zweiphasensystem verteilt sich eine dritte Komponente i zwischen beiden Phasen so, dass das chemische Potenzial der dritten Komponente in beiden Phasen gleich ist. Der Verteilungskoeffizient P_i gibt das Verhältnis der molaren Konzentrationen der Komponente i in beiden Phasen an. In welcher Phase sich die dritte Komponente i besser löst, kann aus diesem Wert abgeleitet werden [Baum 2018; Stephan und Mayinger 2013].

Im vorliegenden Fall werden die Verteilungskoeffizienten der Glyceride ML, DL, TL in einer binären Mischung aus Glycerol und Laurinsäure experimentell bestimmt und mit den aus COSMO-RS modellierten Daten verglichen. Die Verteilungskoeffizienten $P_i^{LS,Gly}$ für die Glyceride ($i = ML, DL, TL$) können über die Verhältnisse der Konzentrationen c_i^{LS} und c_i^{Gly} in der jeweiligen Phase berechnet werden:

$$P_i^{LS,Gly} = \frac{c_i^{LS}}{c_i^{Gly}} \quad (25)$$

Für die Gleichheit der chemischen Potentiale gilt folgender Ausdruck:

$$\gamma_i^{LS} * x_i^{LS} = \gamma_i^{Gly} * x_i^{Gly} \quad (26)$$

γ_i : Aktivitätskoeffizienten

x_i : Molenbrüche

$\left[\frac{\text{mol}}{\text{mol}} \right]$

Für die Molenbrüche gilt:

$$x_i^{LS} = \frac{n_i^{LS}}{n_{LS}} = c_i^{LS} * V_{LS,M} \quad (27)$$

$$x_i^{Gly} = \frac{n_i^{Gly}}{n_{Gly}} = c_i^{Gly} * V_{Gly,M} \quad (28)$$

n : Stoffmenge [mol]

c : Konzentration $\left[\frac{mol}{L}\right]$

$V_{i,M}$: molares Volumen bei $T = 65^\circ C$ $\left[\frac{L}{mol}\right]$

$$V_{LS,M} = 0,232 \left[\frac{L}{mol}\right]$$

$$V_{Gly,M} = 0,074 \left[\frac{L}{mol}\right]$$

Somit ergibt sich für die experimentelle Bestimmung der Verteilungskoeffizienten folgende Gleichung:

$$P_{i,Exp}^{LS,Gly} = \frac{x_i^{LS} * V_{Gly,M}}{x_i^{Gly} * V_{LS,M}} \quad (29)$$

Aus der gaschromatographischen Analyse werden die Molenbrüche x_i in der jeweiligen Phase erhalten. Mittels COSMO-RS werden die Aktivitätskoeffizienten γ_i ermittelt, die zur Berechnung der Prognose des Verteilungskoeffizienten $P_{i,COSMO-RS}$ herangezogen werden:

$$P_{i,COSMO-RS}^{LS,Gly} = \frac{\gamma_i^{Gly} * V_{Gly,M}}{\gamma_i^{LS} * V_{LS,M}} \quad (30)$$

Die Ergebnisse der so berechneten Verteilungskoeffizienten der drei Glyceride ML, DL und TL in einer binären Mischung aus Glycerin und Laurinsäure bei $65^\circ C$ sind in Tabelle 4.2 logarithmisch dargestellt:

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Verteilungskoeffizienten der Glyceride in einer binären Mischung aus Glycerol (Gly) und Laurinsäure (LS) bei $65^\circ C$.

Glyceride	Experiment $\log p^{LS,GLY}$	COSMO-RS $\log p^{LS,GLY}$
Glycerolmonolaurat (ML)	$1,83 \pm 0,15$	1,38
Glyceroldilaurat (DL)	$1,80 \pm 0,05$	3,03
Glyceroltrilaurat (TL)	$1,83 \pm 0,06$	4,40

Die log P-Werte der experimentellen, sowie die mit COSMO-RS prognostizierten Verteilungskoeffizienten der Glyceride ML, DL und TL sind deutlich größer als 1. Daher gilt für

die Glyceride, dass sie sich überwiegend in der Lipid-Phase befinden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen aus Kapitel 4.3.1 und 4.3.2, in dem gezeigt wurde, dass sich alle Glyceride mit Laurinsäure, jedoch kaum in Glycerol lösen. Die Unterschiede der experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten zwischen den Glyceriden sind vernachlässigbar klein, wodurch die Werte als annähernd konstant angenommen werden können. Es wäre jedoch ein Anstieg der Verteilungskoeffizienten von Glycerolmonolaurat nach Glyceroltrilaurat zu erwarten. Wie schon erwähnt ist Glycerolmonolaurat mit seinen zwei Hydroxylgruppen polarer als Glyceroldi- und trilaurat. Den Erwartungen nach müsste sich ML daher besser in Glycerol lösen als TL und sich ein Anstieg der Verteilungskoeffizienten ergeben. Der Grund für die annähernd konstanten Werte der Verteilungskoeffizienten ist auf die Auswertung der gaschromatographischen Analyse zurückzuführen. Zunächst wurde eine sehr geringe Menge von 0,01 g Glycerid in das binäre System gegeben. Da sich die Glyceride kaum bis gar nicht im Glycerol lösen, könnten bei der Auswertung der Peakflächen aus dem Gaschromatogramm Ungenauigkeiten aufgetreten sein. Da die Peaks nahe der Detektionsgrenze liegen, sind diese mit größeren Fehlern behaftet. Bei der Bestimmung der Flächen muss deshalb von größeren Fehlern ausgegangen werden, die sich zwangsläufig auf die berechneten Konzentrationen in der Glycerol-Phase auswirken.

Die mit COSMO-RS prognostizierten Verteilungskoeffizienten zeigen hingegen einen Anstieg in den log P-Werten von Glycerolmonolaurat nach Glyceroltrilaurat. Die Polarität an ML ist von den betrachteten Glyceriden am höchsten aufgrund seiner zwei Hydroxylfunktionen. Daher wird eine bessere Löslichkeit von ML in Glycerol erwartet. Die Polarität von TL ist am geringsten, weshalb es sich am schlechtesten im Glycerol lösen lässt. Diese Überlegungen lassen sich mit dem Anstieg der Verteilungskoeffizienten von ML über DL nach TL bestätigen.

4.4 Untersuchung der Acylmigration

Wie bereits in Unterkapitel 4.2 erwähnt wird bei der Reaktion von Glycerol mit Laurinsäure oder mit Glyceroltrilaurat die biokatalytische Reaktion von einer chemischen Reaktion der ML und DL, der Acylmigration, überlagert. Hierbei lagern sich die Acylgruppen in einer Gleichgewichtsreaktion vom C2-Atom des Partialglycerids um auf ein C1-Atom (siehe Abbildung 4.14). Da die Lage am C1-Atom thermodynamisch stabiler ist und somit begünstigt wird, liegt das Gleichgewicht auf dieser Seite.

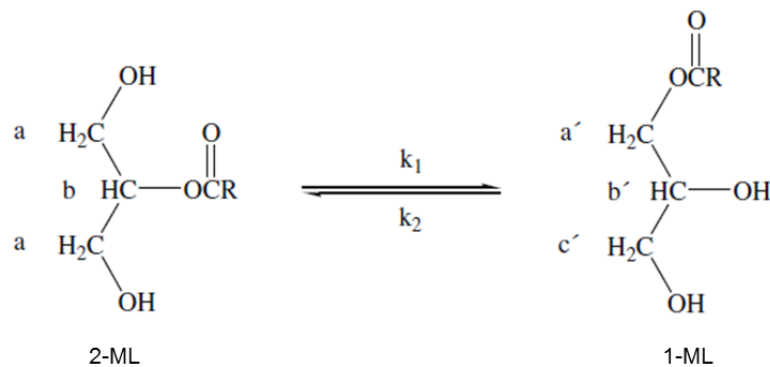


Abbildung 4.14: Reaktionsschema der Acylmigration am Beispiel der Reaktion von Glycerol-2-monolaurat (2-ML) zu Glycerol-1-monolaurat (1-ML) [Compton et al. 2007]. R: $C_{11}H_{23}$, k_1/k_2 : Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten; a,b,a',b',c': Zuordnung der Wasserstoffatome im 1H -NMR-Spektrum (siehe Abbildung 4.15).

Für die Untersuchung der Acylmigration wurde vom Projektpartner Evonik Industrie AG synthetisiertes Glycerol-2-monolaurat mit einer Reinheit von 90 Gew.-% (Verunreinigungen: 7 Gew.-% Glycerol, 3 Gew.-% Ethyllaurat) 13 Tage lang bei 65 °C in einem Rührkesselreaktor eingesetzt. Die während der Reaktion genommen Proben wurden bis zur Untersuchung mittels 1H -NMR-Spektroskopie eingefroren. Es soll mit Hilfe der NMR-Daten ein zeitlicher Reaktionsverlauf der Acylmigration bestimmt und durch ein kinetisches Modell beschrieben werden.

Zunächst werden aus den experimentellen Daten (1H -NMR Spektren) die molaren Anteile an 2-ML und 1-ML über die Flächen H_b und $H_{b'}$ der Signale b und b' bestimmt (vergleiche Abbildung 4.15). Der Molenbruch von 2-ML berechnet sich wie folgt:

$$x_{2-ML,EXP} = \frac{H_b}{H_b + H_{b'}} \quad (31)$$

Aus der experimentellen Bestimmung der molaren Anteile an 2-ML und 1-ML werden folgende Annahmen für die Modellierung abgeleitet:

- Der molare Anteil von 2-ML liegt vor Beginn der Acylmigration bei $x_{2-ML,0} = 90$ Mol.-%.
- Der molare Anteil an 2-ML im Reaktionsgleichgewicht ist $x_{2-ML,GGW} = 32,4$ Mol.-%. nach 310 h

- Die Gleichgewichtskonstante $K_{2-ML,1-ML} = 56,2$ wurde aus den experimentellen Werten im Gleichgewicht der Reaktion nach 310 h bestimmt.

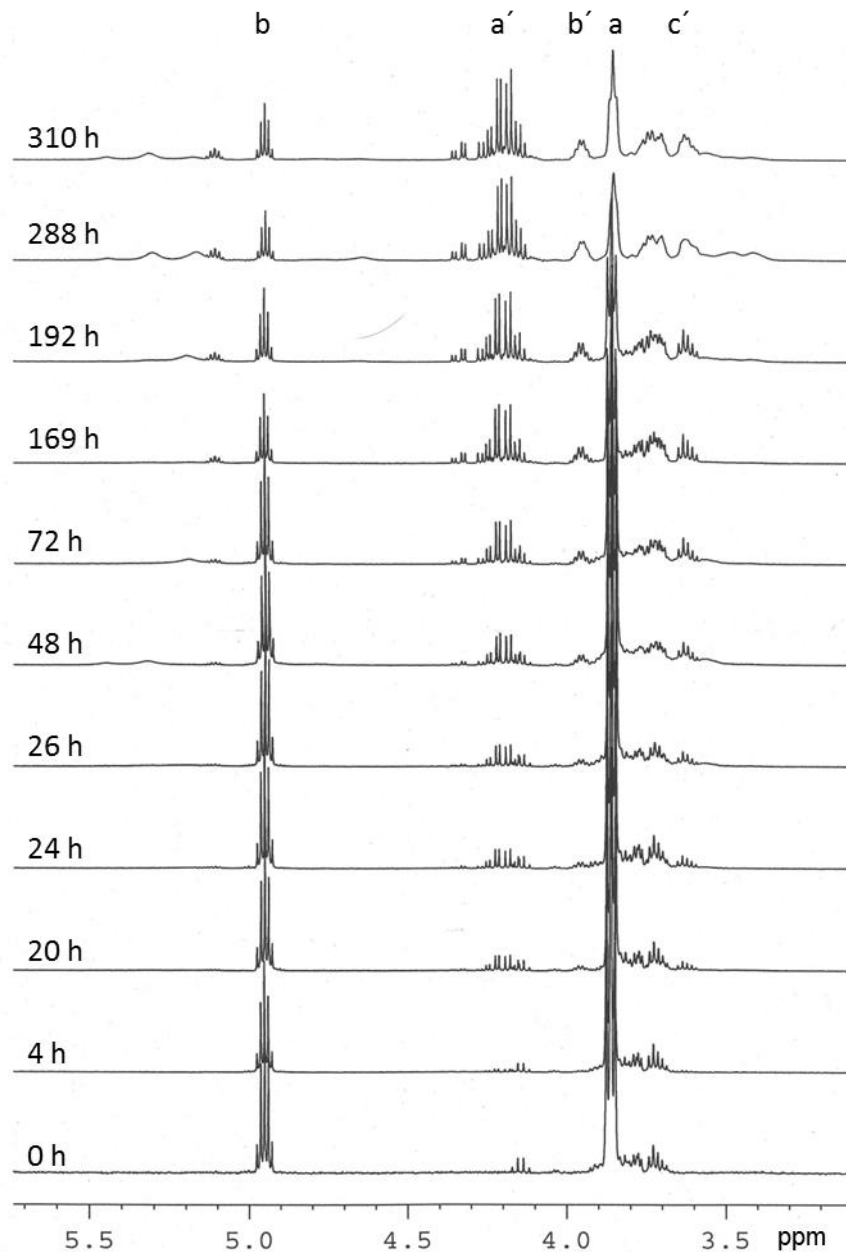


Abbildung 4.15: ¹H-NMR-Spektren (CDCl₃, 400 MHz) der 11 zeitlichen Versuchsproben, die den Reaktionsverlauf der Acylmigration von 2-ML zu 1-ML bei 65 °C über einer Zeit von 310 h darstellen.

Die folgenden Gleichungen zeigen die Herleitung des kinetischen Modells zur Beschreibung der Acylmigration von 2-ML zu 1-ML. Die Gleichgewichtskonstante $K_{2-ML,1-ML}$ kann wie folgt dargestellt werden:

$$K_{2-ML,1-ML} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{x_{2-ML}}{x_{1-ML}} \quad (32)$$

Die zeitliche Änderung des molaren Anteils von 2-ML ($\frac{dx_{2-ML}}{dt}$) kann mit Hilfe des Ersetzes des Ausdrucks für den molaren Anteil an 1-ML mit $x_{1-ML} = x_{2-ML,0} - x_{2-ML}$ beschrieben werden:

$$\frac{dx_{2-ML}}{dt} = -k_1 * x_{2-ML} + k_2 * (x_{2-ML,0} - x_{2-ML}) \quad (33)$$

Diese Reaktionsgeschwindigkeit ist im Gleichgewicht der Reaktion gleich null und mit der Gleichgewichtskonzentration $x_{2-ML,GGW}$ ergibt sich folgende Gleichung:

$$0 = -k_1 * x_{2-ML,GGW} + k_2 * (x_{2-ML,0} - x_{2-ML,GGW}) \quad (34)$$

Nach Einsetzen und Integration der Gleichung (33) ergibt sich folgender Ausdruck:

$$t = (k_1 + k_2)^{-1} * \ln \left(\frac{x_{2-ML,0} - x_{2-ML,GGW}}{x_{2-ML} - x_{2-ML,GGW}} \right) \quad (35)$$

Mit $k_1 + k_2 = (K_{2-ML,1-ML} + 1) * k_1 / K_{2-ML,1-ML} = C * k_1$ und Umstellung der Gleichung (35) folgt:

$$x_{2-ML,t} = \left(\frac{x_{2-ML,0} - x_{2-ML,GGW}}{\exp^{Ck_1 t}} \right) + x_{2-ML,GGW} \quad (36)$$

Somit ergibt sich ein Ausdruck für die zeitlich Berechnung des molaren Anteils an 2-ML, der zur Modellierung der Geschwindigkeitskonstante k_1 genutzt werden kann und somit zur Beschreibung des Reaktionsverlaufes verwendet wird (siehe Abbildung 4.16).

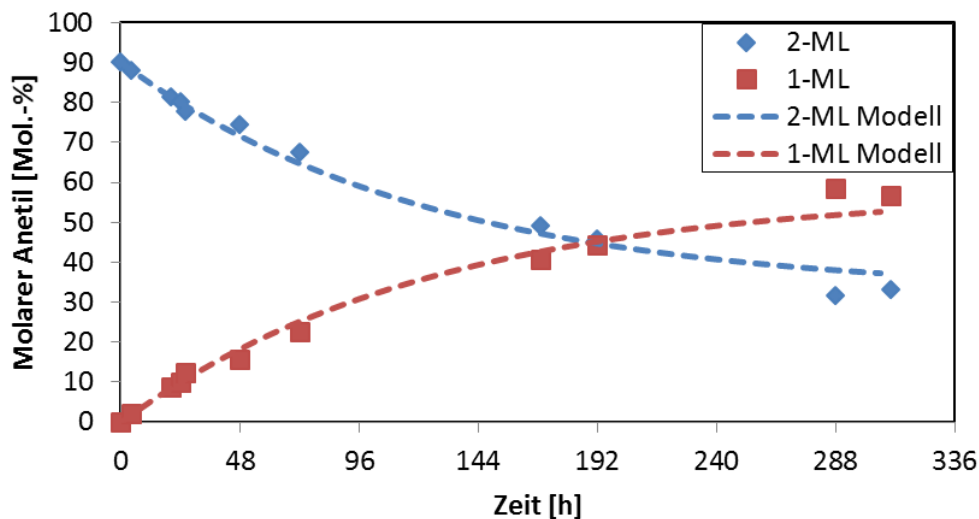


Abbildung 4.16: Experimenteller (Symbole) und modellierter (gestrichelte Linien) Reaktionsverlauf der Acylmigration von Glycerol-2-monolaurat (2-ML, blau) zu Glycerol-1-monolaurat (1-ML, rot).
Reaktionsbedingungen: Durchgeführt bei 65 °C über einer Zeit von 310 h in einem Rührkesselreaktor.

Somit wurden folgende kinetische Parameter bestimmt:

k_1	k_2	Halbwertszeit $t_{1/2}$
$7,86 \cdot 10^{-3} \left[\frac{1}{h} \right]$	$0,14 \cdot 10^{-3} \left[\frac{1}{h} \right]$	86,65 [h]

Die Untersuchungen zeigen, dass das Gleichgewicht der Acylmigration auf der Seite von Glycerol-1-monolaurat liegt. Da die Acylmigration keinen Einfluss auf die enzymatische Reaktion hat und die Reaktionsselektivität im Fokus liegt, kann die Acylmigration in den weiteren Auswertungen vernachlässigt werden.

4.5 Untersuchung der Mehrphasenreaktionen

In diesem Unterkapitel werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Reaktionsselektivität bezüglich Glycerolmonolaurat (ML) am Beispiel zweier Reaktionen, der enzymatischen Veresterung (siehe Kapitel 4.5.1) und der enzymatischen Glycerolyse (siehe Kapitel 4.5.2), detailliert dargestellt. Wie bereits erwähnt wird bei den folgenden Ergebnissen nicht zwischen den Isomeren Glycerol-1-monolaurat und Glycerol-2-monolaurat, sowie Glycerol-1,3-dilaurat und Glycerol-1,2-dilaurat unterschieden. Die Reaktionen sollen bezüglich der Reaktionsselektivität zu Glycerolmonolaurat (ML) untersucht werden.

4.5.1 Veresterung von Glycerol und Laurinsäure^{cd}

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Veresterung von Glycerol mit Laurinsäure dargestellt. Dabei wurde die Reaktion als Batch-Reaktion und als Fed-Batch-Reaktion mit Laurinsäure-Zuführung durchgeführt.

Batch-Reaktion: Einfluss des Substratverhältnisses und der Temperatur

Bei den in einem Blasensäulenreaktor durchgeführten Batch-Experimenten wurden die Substrate Glycerol und Laurinsäure je nach Substratverhältnis in den vorgewärmten Reaktor gegeben. Nach dem Schmelzvorgang und der Equilibrierung der Reaktionstemperatur sowie der Durchmischung durch die aufsteigenden Blasen, wurde die Reaktion durch die Zugabe des Biokatalysators Novozym 435® gestartet. Exemplarisch werden die Reaktionsverläufe von zwei Experimenten gezeigt, sowohl eine Reaktion mit Laurinsäure in Überschuss (siehe Abbildung 4.17) als auch ein Reaktion mit Glycerol in Überschuss (siehe Abbildung 4.18). Zusätzlich wird auf das Phasenverhalten bei der Reaktion mit Überschuss an Glycerol

^c Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von B.Sc. Yasmin Goes erzeugt: Multivariate Datenanalyse enzymatischer Veresterungen durch Indirect Hard Modeling, *Bachelorarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2013

^d Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Helge Berger erzeugt: FTIR basierte online Prozesssteuerung einer Biotransformation in mehrphasigen Reaktionssystemen, *Masterarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2014

eingegangen (siehe Abbildung 4.19). In Abbildung 4.20 bis Abbildung 4.22 ist der Temperatureffekt und der Effekt des Substratverhältnisses auf die Selektivität bezüglich Glycerolmonolaurat dargestellt.

Batch-Reaktion mit LS im Überschuss:

In folgender Abbildung ist der zeitliche Verlauf der Reaktandenzusammensetzung für ein Batch-Experiment mit einem molaren Glycerol/Laurinsäure-Verhältnis von 1:3 gezeigt. Die unpolare Laurinsäure und die unpolaren Reaktionsteilnehmer bilden die kontinuierliche unpolare Phase und Glycerol liegt in Tröpfchen dispergiert in dieser vor (siehe Kapitel 4.2.1 Abbildung 4.7).

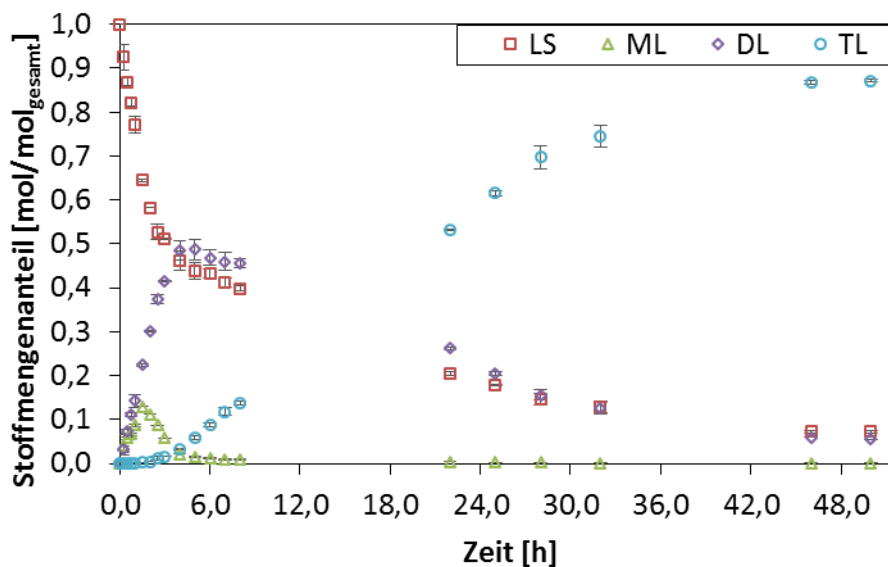


Abbildung 4.17: Reaktionsverlauf einer Batch-Reaktion im Blasensäulenreaktor mit Laurinsäure im Überschuss. Glycerol wurde nicht gemessen. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 1:3, Gesamtansatzgröße: 88 g, 2 Gew.-% Novozym 435®, T = 60 °C; Luftbegasung mit 0,75 L/min, Blasensäulenreaktor.

Beschreibung:

Der Stoffmengenanteil an Glycerolmonolaurat und -dilaurat nimmt in den ersten 1,5 h annähernd linear bis zu einem maximalen Wert an ML von 13,0 Mol.-% und 22,4 Mol.-% an DL zu. Im weiteren Verlauf wird ML mit Laurinsäure weiter zu DL umgesetzt bis zu einem maximalen Wert von 48,5 Mol.-% DL nach 4 h Reaktionszeit. Die Laurinsäure wird bis dahin zu 53,9 % umgesetzt. Ab 4 h überwiegt die langsamere Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von DL mit LS zu TL. Am Ende der durchgeführten Reaktionszeit nach 50 h wurde eine Produktzusammensetzung mit 87,17 Mol.-% TL, 5,48 Mol.-% DL, 0,05 Mol.-% ML und 7,3 Mol.-% LS bei einem Umsatz an LS von 92,7 % erreicht.

Batch-Reaktion mit Glycerol im Überschuss:

In Abbildung 4.18 ist der zeitliche Verlauf der Reaktandenzusammensetzung für ein Batch-Experiment mit einem molaren Glycerol/Laurinsäure-Verhältnis von 2:1 gezeigt. Das polare Substrat Glycerol liegt nun als kontinuierliche polare Phase vor, in der die unpolaren Reaktionsteilnehmer in Tröpfchen dispergiert sind (siehe Kapitel 4.2.1 Abbildung 4.8).

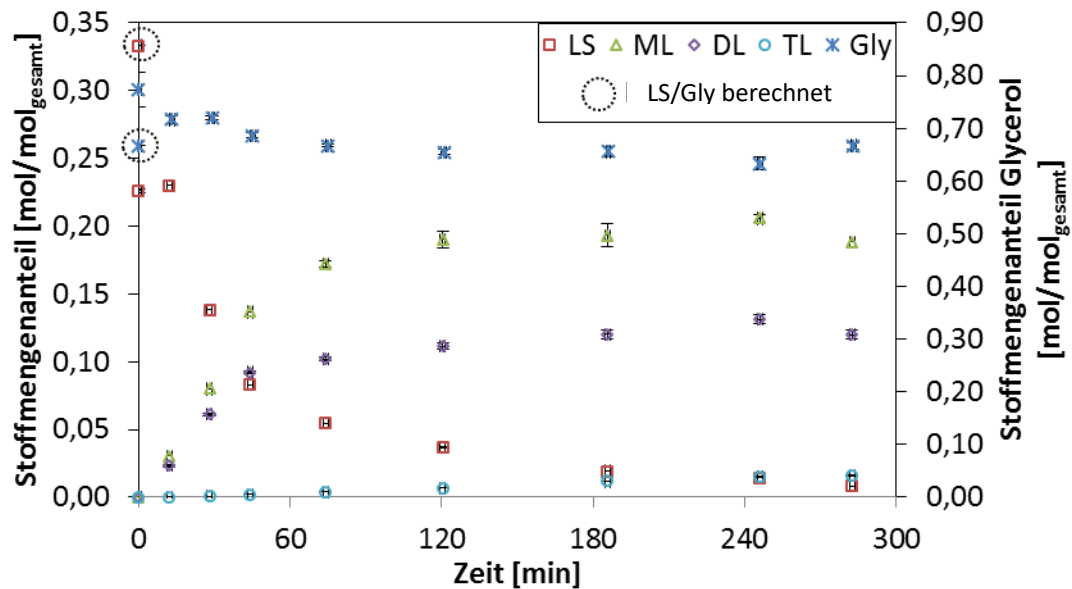


Abbildung 4.18: Reaktionsverlauf einer Batch-Reaktion mit Glycerol im Überschuss. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 2:1, Gesamtansatzgröße: 144,65 g, 2 Gew.-% Novozym, 435®, T = 65 °C; Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

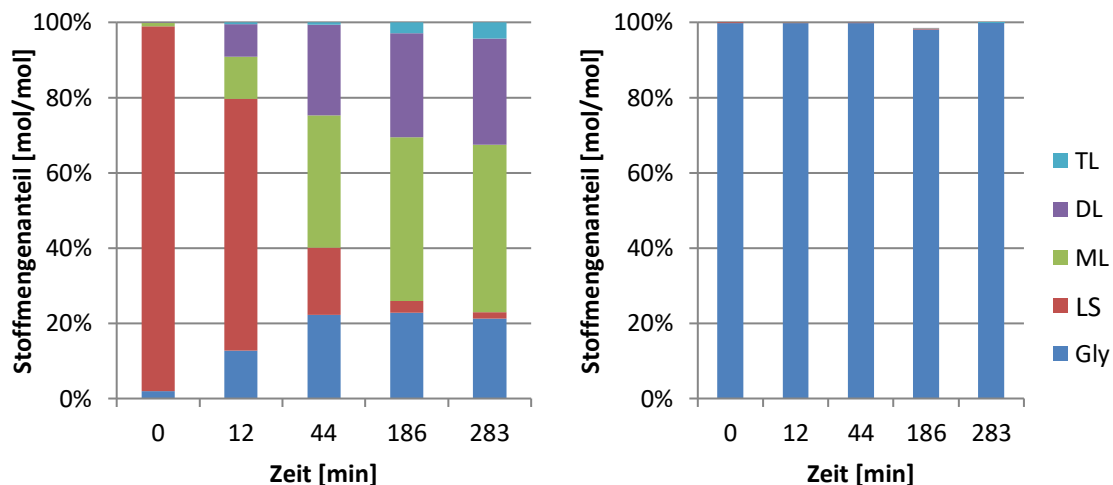


Abbildung 4.19: Zusammensetzung der dispersen unpolaren Phase (Links) und der polaren Phase (Rechts) über den Reaktionsverlauf in einem Blasensäulenreaktor (vgl. Abbildung 4.18). **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 2:1, Gesamtansatzgröße: 144,65 g, 2 Gew.-% Novozym, 435®, T = 65 °C; Luftbegasung mit 1,0 L/min.

Beschreibung:

Der Stoffmengenanteil an ML und DL nimmt in den ersten 50 min. linear zu bis zu einem Wert von 13,7 Mol.-% ML und 9,2 Mol.-% DL bis zu einem Umsatz an LS von 75,2 %. Nach 120 min. bleiben die Stoffmengenanteile von ML und DL konstant bei ca. 19 Mol.-% ML und 12 Mol.-% DL. Das unpolare Substrat LS nimmt exponentiell von einem Startwert von 33,3 Mol.-% bis 0,8 Mol.-% ab nach 283 min. Der Stoffmengenanteil von TL steigt beginnend bei 100 min. langsam und linear auf 1,6 Mol.-% an. Der Stoffmengenanteil des polaren Glycerols nimmt in den ersten 100 min. ab auf 66 Mol.-% und bleibt ab diesem Zeitpunkt konstant.

In Abbildung 4.19 ist die Zusammensetzung der dispersen unpolaren (links) und der polaren kontinuierlichen Phase (rechts) dargestellt. Die kontinuierliche polare Phase setzt sich fast ausschließlich während der gesamten Reaktionszeit aus Glycerol zusammen (>99,9 Mol.-%). Die unpolare disperse Phase setzt sich zu Beginn der Reaktion fast ausschließlich aus Laurinsäure zusammen (> 98 Mol.-%). Bedingt durch die Probenaufbereitung kommt es zu einer autokatalytischen Veresterung. Dabei entsteht in sehr geringer Menge ML (< 0,09 mol/mol_{gesamt}). Dies verursacht den geringen Anteil an ML zu Reaktionsbeginn in Abbildung 4.19 (links). LS nimmt entsprechend seines fortschreitenden Umsatzes in der dispersen Phase ab. Die Komponenten LS, ML, DL und TL liegen ausschließlich in der unpolaren dispersen Phase vor, weswegen sich die Stoffmengenanteile in dieser Phase analog zu Abbildung 4.18 verändern. Dabei bleibt das Verhältnis von ML zu DL über die gesamte Reaktionszeit gleich. Mit der Bildung an ML steigt die Löslichkeit von Glycerol in der unpolaren Phase (siehe Kapitel 4.3.2) und der Anteil steigt bis ca. 22 Mol.-% nach 44 min an. Bis zum Ende der Reaktion nimmt der Anteil von ML weiter zu, trotz der lösungsvermittelnden Wirkung von ML auf Glycerol bleibt der Anteil an Glycerol in der unpolaren Phase konstant. Dies begründet sich durch die Konzentrationen von DL, TL und LS, die das Phasenverhalten durch geringe Anteile verändern können (siehe Unterkapitel 4.3).

Diskussion der Batch-Experimente:

Die Batch-Experimente haben gezeigt, dass ein Überschuss an Glycerol und das daraus resultierende Phasenverhalten die Bildung von ML begünstigt. Das ist ebenfalls schon aus der Literatur bekannt (vgl. Kapitel 4.2.1). Bei der Betrachtung der Reaktionsgleichungen der Veresterung (siehe Gleichungen (8) bis (11)) und der Gleichungen für die Reaktionsgeschwindigkeiten (siehe Gleichungen (12) bis (14)) wird dieser Effekt deutlich. Nach dem Prinzip von Le Chatelier verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite hin zu ML bei einer Erhöhung des Anteils des Substrates Glycerol (siehe Gleichungen (8) und (12)). Glycerol hat bei der Veresterung mit Laurinsäure nur bei der Bildung von ML einen Einfluss. Die Bildung von DL und TL sind konkurrierende Folgereaktionen. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden Umsatz, Ausbeute, Selektivität und molarer Produktanteil an ML wie folgt berechnet (n_i = Stoffmenge der Komponente i):

$$\text{Umsatz} = X = \frac{\text{umgesetzte Menge Substrat}}{\text{eingesetzte Menge Substrat}} = \frac{n_{\text{LS},0} - n_{\text{LS},i}}{n_{\text{LS},0}} \quad (37)$$

$$\text{Ausbeute} = Y_{\text{ML}} = \frac{\text{gebildete Menge Produkt}}{\text{eingesetzte Menge Substrat}} = \frac{n_{\text{ML},i}}{n_{\text{LS},0}} \quad (38)$$

$$\text{Selektivität} = S_{\text{ML}} = \frac{\text{gebildete Menge Produkt}}{\text{umgesetzte Menge Substrat}} = \frac{n_{\text{ML},i}}{n_{\text{LS},0} - n_{\text{LS},i}} = \frac{\text{Ausbeute}}{\text{Umsatz}} \quad (39)$$

$$\text{Produktanteil} = \frac{\text{gebildete Menge Produkt}}{\text{gebildete Menge Produkt} + \text{Nebenprodukt}} = \frac{n_{\text{ML}}}{n_{\text{ML}} + n_{\text{DL}} + n_{\text{TL}}} \quad (40)$$

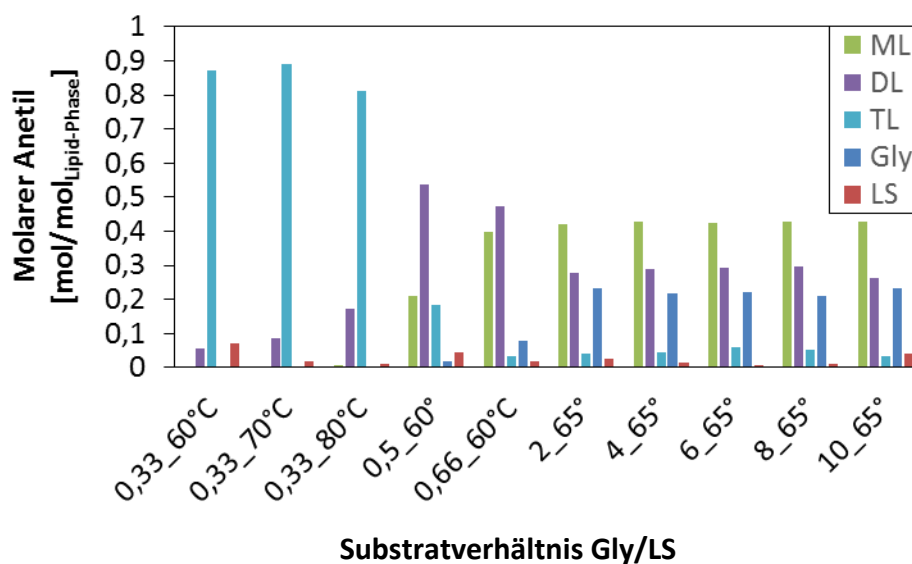


Abbildung 4.20: Produktzusammensetzung in der unpolaren Phase im Reaktionsgleichgewicht.

In der Abbildung 4.20 sind die Stoffmengenanteile der Zusammensetzung in der unpolaren Lipid-Phase am Reaktionsende im Reaktionsgleichgewicht mit verschiedenen Substratverhältnissen Glycerol/Laurinsäure für verschiedene Reaktionstemperaturen dargestellt. Bei Überschuss an Laurinsäure mit einem Verhältnis von 0,33 führt die Veresterungsreaktion zu einem kompletten Umsatz an LS und es liegt nahezu ausschließlich TL mit einem Restanteil an DL im Reaktionsgleichgewicht vor. Bei einer Erhöhung des Substratverhältnisses in Richtung Glycerol verschiebt sich die Produktzusammensetzung in Richtung DL und ML als Hauptbestandteile der Produktzusammensetzung am Ende der Reaktion. Bei einem Überschuss von 2:1 und 1,5:1 an Laurinsäure ist zu erkennen, dass zunächst DL den Hauptbestandteil der Lipid-Phase ausmacht (Substratverhältnis 0,5 und 0,66) und bei weitere Erhöhung des Glycerol-Anteils, ML den Hauptbestandteil der Produktmischung darstellt (Substratverhältnis ≥ 2). Des Weiteren laufen die Veresterungsreaktionen mit einem Überschuss an Glycerol alle in ein Reaktionsgleichgewicht mit ähnlicher Produktzusammensetzung von einem ML-Anteil von > 40 Mol.-% (siehe Abbildung 4.20). Der absolute Anteil der Glyceride am Gesamtsystem ist bei den

Experimenten mit Überschuss an Glycerol jedoch bei dem kleinsten Substratverhältnis am größten. Zum Vergleich: 35,2 Mol.-% Glyceride bei einem Glycerol zu Laurinsäure Verhältnis von 2:1 und 10,3 % Mol.-% Glyceride bei einem Glycerol zu Laurinsäure Verhältnis von 6:1.

In Abbildung 4.21 sind die Temperatur- und Substratverhältnisabhängigkeit für die Selektivität an ML für die Veresterungsreaktionen mit Laurinsäure in Überschuss dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Temperatur nur einen minimalen Effekt auf die Selektivität bezüglich ML bei Umsätzen bis ca. 65 % LS hat. Bei Umsätzen größer 65 % hat die Temperatur keinen Einfluss mehr auf die Reaktionsselektivität bezüglich ML. Eine Erhöhung des Glycerolanteils zu LS von 1:3 zu 1:2 am Substratverhältnis erhöht die Selektivität bezüglich ML um 0,2 bei gleichen Laurinsäureumsätzen.

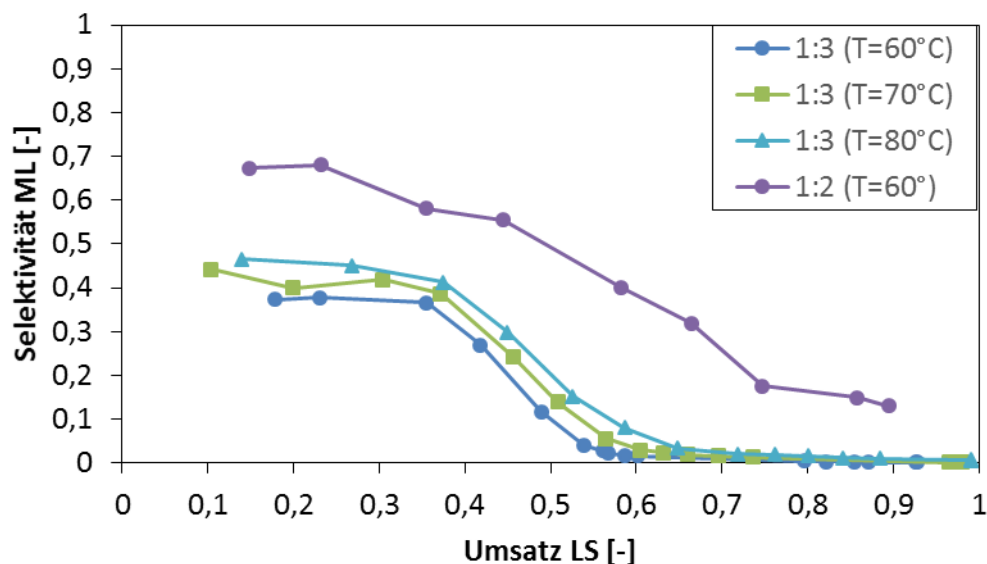


Abbildung 4.21: Selektivität von ML in Abhängigkeit des Umsatzes von LS für die Temperaturen von 60 °C bis 80 °C und einem Substratverhältnis von Glycerol zu Laurinsäure von 1:3 und 1:2.

In Abbildung 4.22 ist die Substratabhängigkeit für die Selektivität an ML für die Veresterungsreaktionen mit Glycerol in Überschuss dargestellt. Der Trend aller Verläufe ist wie zu erwarten ähnlich. Die Erhöhung des Glycerolanteils bei der Veresterungsreaktion mit Glycerol in Überschuss hat keinen signifikanten Einfluss auf die Selektivität bezüglich ML. Der Trend bestätigt die Annahme, dass alle Reaktionen in dasselbe thermodynamische Reaktionsgleichgewicht laufen. Die höchste Selektivität bezüglich ML wird bei der Batch-Reaktion mit einem Substratverhältnis von 2:1 bei einem Laurinsäureumsatz von ca. 90 % erreicht.

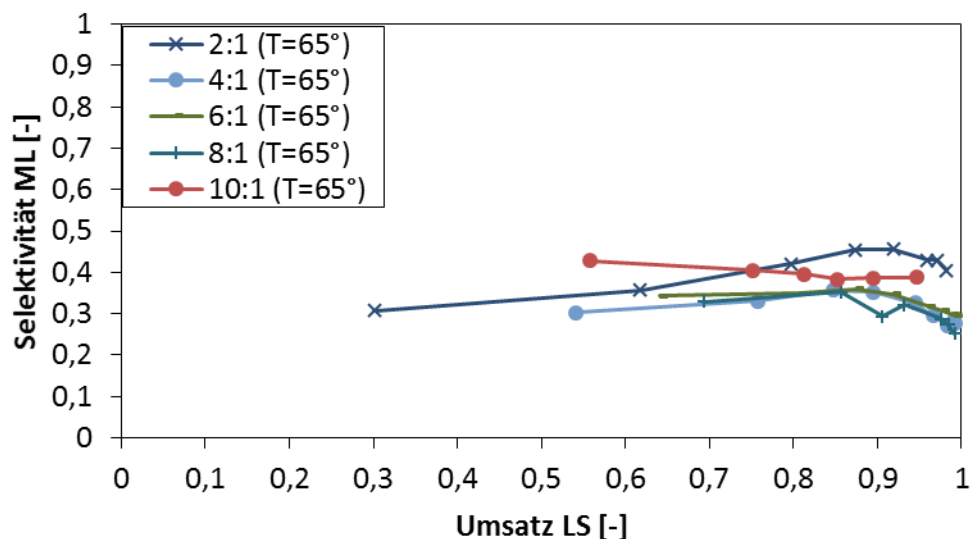


Abbildung 4.22: Selektivität von ML in Abhängigkeit des Umsatzes von LS für fünf unterschiedliche Substratverhältnisse von Glycerol zu Laurinsäure von 2:1 bis 10:1.

Bei der Betrachtung der Ausbeute von ML (siehe Abbildung 4.23) treffen die Schlussfolgerungen aus Abbildung 4.21 & Abbildung 4.22 zum Einfluss des Substratverhältnisses und der Temperatur ebenfalls zu.

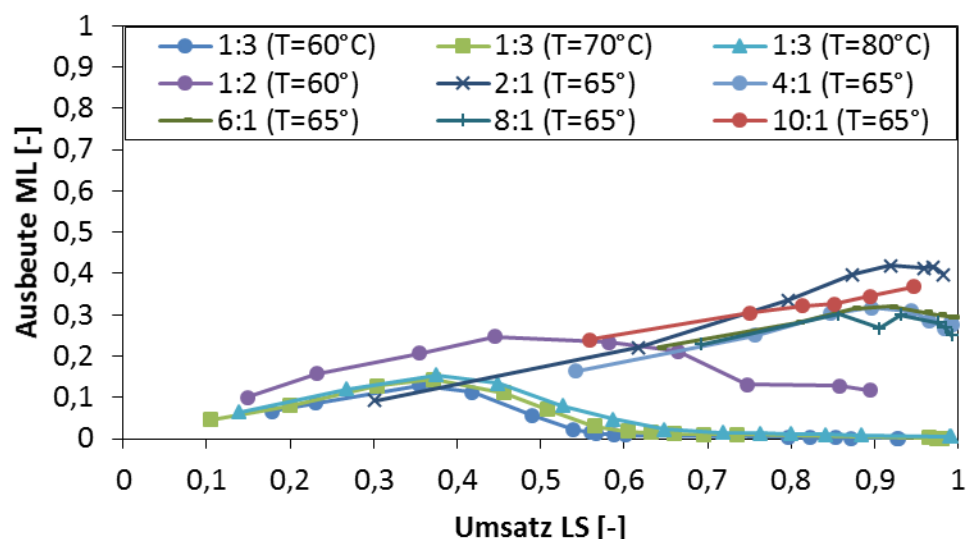


Abbildung 4.23: Ausbeute von ML in Abhängigkeit des Umsatzes von LS für 7 unterschiedliche Substratverhältnisse von Glycerol zu Laurinsäure. Im Gly-Überschuss von 10:1 bis 2:1 und im LS-Überschuss von 1:2 und 1:3. Bei mit Reaktionstemperaturen von 60 °C, 65 °C, 70 °C und 80 °C.

Aus der Abbildung 4.23 wird zusätzlich zu der bereits oben gezeigten Selektivität ein besserer Gesamteindruck aller Veresterungsreaktionen im Hinblick auf den wichtigen Parameter der Ausbeute von ML deutlich. Alle Reaktionen haben zu Beginn der Reaktion, also bei niedrigem Umsatz an LS, einen linearen Anstieg der Ausbeute an ML. Das Maximum der Ausbeute an ML verschiebt sich mit steigendem Glycerolanteil beim Substratverhältnis zu höheren

Laurinsäureumsätzen. Die maximale Ausbeute wird bei den Veresterungsversuchen mit Überschuss an Glycerol erzielt, bei Laurinsäureumsätzen größer 90 %.

Tabelle 4.3: Einfluss der Temperatur und des Substratverhältnisses bei der enzymatischen Veresterung von Glycerol mit Laurinsäure im Batchreaktor. Die dargestellte Werte sind jeweils die Endwerte der Experimente in der unpolaren Phase. Katalysator: Novozym 435®. Varianz/Fehler/Ungenauigkeitsangabe der Werte durch Dreifachbestimmung; *Nur Einfachbestimmung und durchgeführt von Evonik Industries AG in Essen; ** Nur Einfachbestimmung am Ende der Reaktion in der Lipidphase nach der Phasentrennung

Substrat- verhältnis Gly/LS	Zusammensetzung im Gleichgewicht in der unpolaren Phase [Mol.-%]					$X_{LS,GGW}$ [%]	Anteil ML_{GGW} [%]	Anteil ML_{max} [%]	X_{LS} bei ML_{max} [%]
	Gly	LS	ML	DL	TL				
1:3 (T=60°C)	0,00 ±0,15	7,30 ±0,15	0,05 ±0,00	5,48 ±0,02	87,17 ±0,17	92,70 ±0,15	0,05 ±0,00	54,54 ±4,83	7,51 ±1,50
1:3 (T=70°C)	0,00 ±0,15	1,96 ±0,15	0,17 ±0,00	8,71 ±0,01	89,16 ±0,02	98,04 ±0,01	0,17 ±0,00	44,00 ±0,02	10,43 ±0,01
1:3 (T=80°C)	0,00 ±0,06	0,91 ±0,06	0,72 ±0,05	17,29 ±0,29	81,08 ±0,40	99,09 ±0,06	0,73 ±0,05	46,20 ±0,13	13,89 ±0,60
1:2 * (T=60°C)	1,94	4,59	21,12	53,88	18,47	93,09	22,60	55,05	28,96
1:1,5 * (T=60°C)	7,83	1,72	39,85	47,28	3,33	97,13	44,05	58,26	58,78
2:1 (T=65°)	23,50 ±0,61	2,69 ±0,36	42,10 ±0,08	27,69 ±0,08	4,01 ±0,09	98,25 ±0,04	57,04 ±0,08	61,94 ±0,14	87,40 ±0,07
4:1 ** (T=65°)	21,81	1,53	42,98	29,02	4,65	99,29	56,07	60,38	84,75
6:1 ** (T=65°)	21,99	0,66	42,27	29,12	5,95	99,23	54,66	60,72	87,47
8:1 ** (T=65°)	20,94	0,98	42,97	29,70	5,41	99,23	55,03	63,01	85,66
10:1 ** (T=65°)	23,36	4,07	42,93	26,17	3,47	94,67	59,15	62,70	85,25

In Tabelle 4.3 sind die experimentellen Daten am Reaktionsende aller Veresterungsreaktionen tabellarisch dargestellt. Zudem sind der Umsatz an LS im Endpunkt (Gleichgewicht der Reaktion), der Anteil an ML in der unpolaren Lipid-Phase, sowie der maximale Anteil an ML und der vorliegende Umsatz an ML an diesem Punkt während der Reaktion gegeben. Deutlich zu erkennen ist, dass der Anteil an ML am Reaktionsende in der Lipid-Phase mit steigendem Glycerolanteil am Substratverhältnis steigt. Beispielsweise liegt der molare Anteil an ML bei

ca. 57 Mol.-%. am Ende der Veresterungsreaktion mit einem Substratverhältnis Gly:LS von 2:1
Eine weitere Erkenntnis aus dieser Untersuchung ist, dass der maximale molare Anteil an ML
in der Lipid-Phase bei Veresterungsreaktionen mit Überschuss an LS bei niedrigen
Laurinsäureumsätzen liegt und bei Reaktionen mit Überschuss an Glycerol bei hohen
Umsätzen an LS liegt.

Fed-Batch-Reaktion: Einfluss der Laurinsäurezulauftrate und der Biokatalysatorbeladung

Die Durchführung der Fed-Batch-Experimente erfolgte in einem Blasensäulenreaktor. Das Substrat Glycerol wurde in den vorgewärmten Reaktor (siehe Abbildung 4.24 a) vorgelegt und auf die Reaktionstemperatur vorgewärmt. Nach Equilibrierung der Reaktionstemperatur wurde zum Start der Reaktion der Biokatalysator Novozym 435[®] zugegeben. Die Zufuhr von trockener Luft am Reaktorboden des Blasensäulenreaktors (siehe Abbildung 4.24 f) ermöglichte eine Durchmischung der Reaktionsmischung und den Austrag des Nebenproduktes Wasser, welches bei der Veresterungsreaktion entsteht. Die Laurinsäure wurde mittels einer Mikrozahnradpumpe (siehe Abbildung 4.25 a) aus einem Vorlagebehälter (siehe Abbildung 4.25 b) über einen Doppelmantelheizschlauch (siehe Abbildung 4.24 c, Details siehe Abbildung 4.25 rechts) in den Blasensäulenreaktor gefördert. Der Vorlagebehälter und die Mikrozahnradpumpe wurden in einem Heizschrank (siehe Abbildung 4.24 b, detaillierte Darstellung in Abbildung 4.25 links) bei 65 °C platziert, damit die Laurinsäure auf Reaktionstemperatur vortemperiert wird.



Abbildung 4.24: Versuchsaufbau für einen Fed-Batch-Versuch: a) Blasensäulenreaktor b) Heizschrank c) Doppelmantelheizschlauch für den Laurinsäurezulauf d) FTIR-ATR-Sonde e) Wasserbad f) Druckluftbegasung

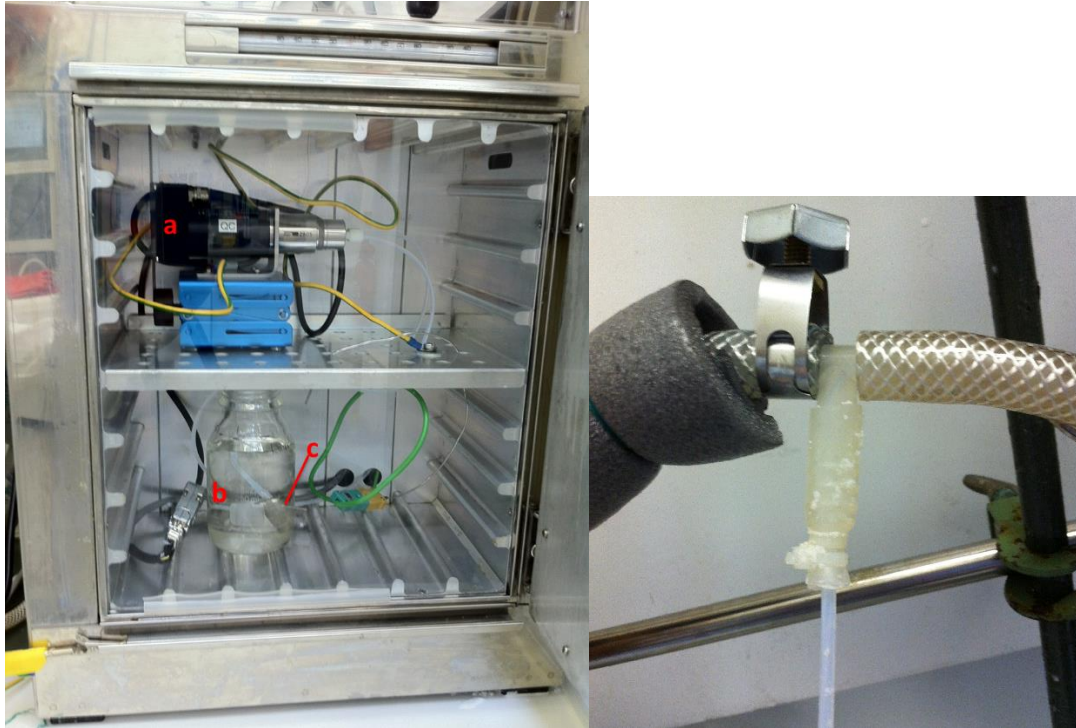


Abbildung 4.25: links: Heihschrank mit Plexiglas Frontscheibe; a) Mikrozahnradepumpe, b) Laurinsäurevorlage-Behälter c) Zulaufschlauch saugseitig mit 10 µm Sinterfilter; rechts: Ausgang Doppelmantelheizschlauch.

Die Veresterungsreaktion startet mit der Zugabe von Laurinsäure über den Doppelmantelheizschlauch (siehe Abbildung 4.25 rechts). Exemplarisch werden die Reaktionsverläufe von zwei Versuchen mit unterschiedlicher Laurinsäurezulauftrate bei gleicher Biokatalysatorbeladung gezeigt (siehe Abbildung 4.26 und Abbildung 4.27). Darüber hinaus wird auf das Phasenverhalten bei der Fed-Batch-Reaktion eingegangen (siehe Abbildung 4.28 & Abbildung 4.29). Im Anschluss werden in Tabelle 4.4 der Einfluss der Laurinsäurezulauftrate und der Einfluss der Biokatalysatorbeladung auf die Bildungsraten der einzelnen Glyceride diskutiert. Des Weiteren wird vergleichend zu den Batch-Reaktionen die Selektivität und Ausbeute in Abhängigkeit des Umsatzes an LS dargestellt und diskutiert. In der abschließenden Diskussion zum Unterkapitel 4.5.1 werden die Batch und Fed-Batch-Experimente hinsichtlich der Bildung von Glycerolmonolaurat vergleichend diskutiert und gegenübergestellt.

Fed-Batch-Reaktion mit einer Laurinsäurezulauftrate von 0,1 mL/min:

Abbildung 4.26 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktandenzusammensetzung für ein Fed-Batch-Experiment mit einer Laurinsäurezulauftrate von 0,1 mL/min und einer Biokatalysatorbeladung von 6 Gew.-% bezogen auf anfängliche Ansatzgröße von 60 g. Das im Reaktor vorgelegte polare Glycerol bildet die kontinuierliche Phase aus. Die zugeführte unpolare Laurinsäure und die unpolaren Glyceride als Produkte bilden die disperse unpolare Phase aus (vgl. Kapitel 4.2.1 Abbildung 4.8).

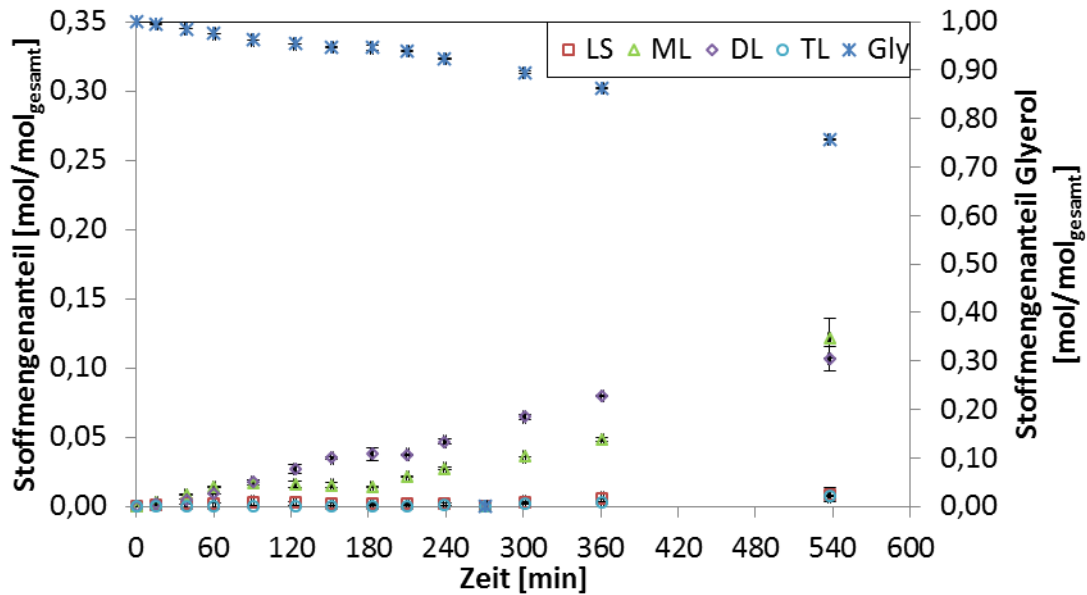


Abbildung 4.26: Reaktionsverlauf einer Fed-Batch-Reaktion mit Laurinsäurezulauf von 0,1 mL/min. **Reaktionsbedingungen:** Zulauftrate LS: 0,1 mL/min (LS gesamt zugeführt: 200,4 mmol); T = 65 °C; 6 Gew.-% Enzym bezogen auf das Anfangsgewicht im Reaktor $m_{0,\text{Glycerol}} = 60,47\text{g}$ ($n_{0,\text{Glycerol}} = 656,6\text{ mmol}$); Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

Beschreibung:

Der Stoffmengenanteil an Glycerol sinkt über den gesamten Reaktionszeitraum linear ab von 100 Mol.-% auf ca. 76 Mol.-% nach 540 min. Die Abnahme des Glycerolanteils an der gesamten Reaktormischung ist bedingt durch zwei überlagerte Effekte. Zum einen wird das Glycerol mit der zugeführten LS zu den Glyceriden umgesetzt. Zum anderen wird durch die Zuführung der LS die Gesamtstoffmenge im Reaktor erhöht, wodurch der Stoffmengenanteil an Glycerol sinkt oder Glycerol durch LS verdünnt wird. Im Vergleich zum Fed-Batch-Experiment mit einer 2,5-fachen höheren Laurinsäurezufuhr bei gleicher Biokatalysatorbeladung bildet sich in der Reaktionszeit von 360 min. ca. 8 Mol.-% DL, nur etwa 4,8 Mol.-% ML und 0,3 Mol.-% TL. In der gleichen Zeit ist der Stoffmengenanteil an zugeführter LS nahe bei 0 Mol.-%. Dieses Fed-Batch-Experiment wurde demnach bei Substratlimitierung durchgeführt. Zum Ende der Reaktion bei 540 min. nähert sich ML (12,1 Mol.-%) an DL (10,6 Mol.-%) an. TL wird mit 0,7 Mol.-% nur in sehr geringen Mengen gebildet. Der Stoffmengenanteil an LS bleibt bis zum Ende der Reaktion sehr niedrig und liegt bei 0,7 Mol.-%.

Fed-Batch-Reaktion mit einer Laurinsäurezulauftrate von 0,25 mL/min:

Abbildung 4.27 zeigt den zeitliche Verlauf der Reaktandenzusammensetzung für ein Fed-Batch-Experiment mit einer Laurinsäurezufuhr von 0,25 mL/min bei gleicher Biokatalysatorbeladung von 6 Gew.-%. Das im Reaktor vorgelegte polare Glycerol bildet ebenfalls die kontinuierliche Phase aus. Die zugeführte unpolare Laurinsäure und die unpolaren Glyceride als Produkte bilden die disperse unpolare Phase aus (vgl. Kapitel 4.2.1 Abbildung 4.8).

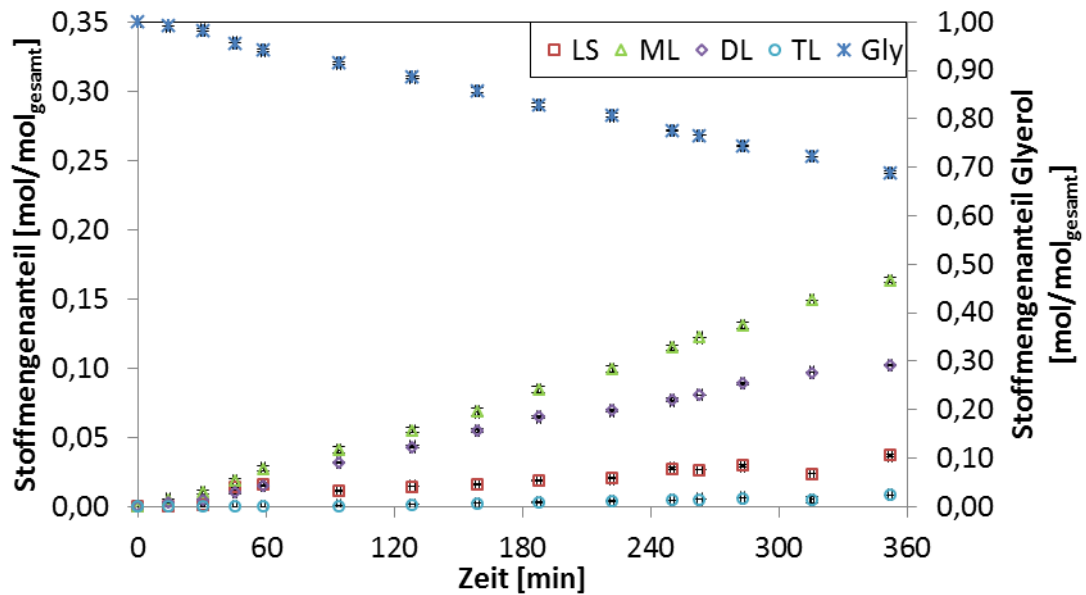


Abbildung 4.27: Reaktionsverlauf einer Fed-Batch-Reaktion mit Laurinsäurezulauf von 0,25 mL/min. **Reaktionsbedingungen:** Zulauftrate LS: **0,25 mL/min** (LS gesamt zugeführt: 387,9 mmol); T = 65 °C; 6 Gew.-% Enzym bezogen auf das Anfangsgewicht im Reaktor $m_{0,\text{Glycerol}} = 75,3\text{g}$ ($n_{0,\text{Glycerol}} = 817,4\text{ mmol}$); Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

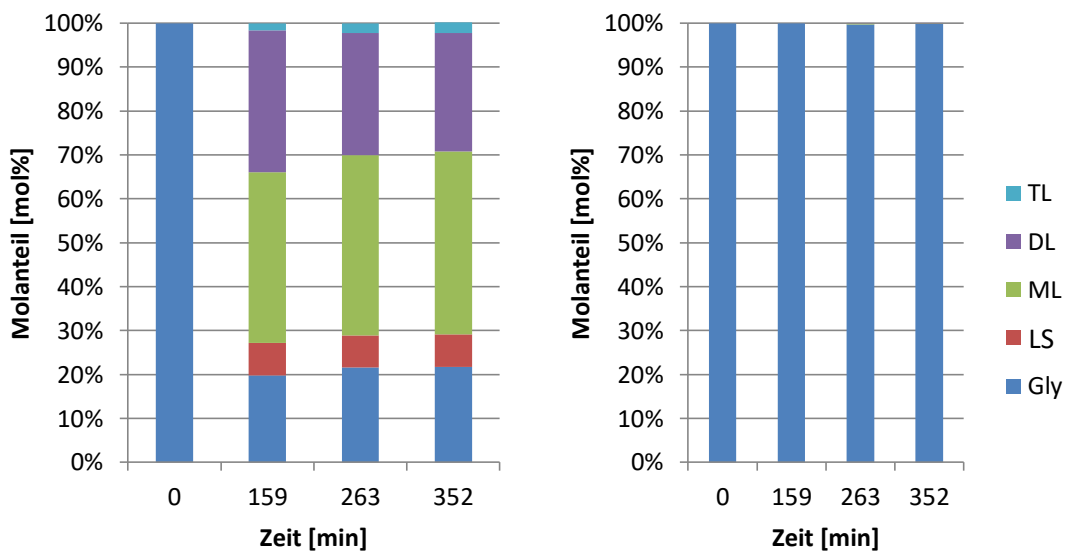


Abbildung 4.28: Links: Zusammensetzung der dispersen unpolaren Phase über den Reaktionsverlauf. Rechts: Zusammensetzung der polaren Phase über den Reaktionsverlauf (vgl. Abbildung 4.27). **Reaktionsbedingungen:** Zulauftrate LS: **0,25 mL/min** (LS gesamt zugeführt: 387,9 mmol); T = 65 °C; 6 Gew.-% Enzym bezogen auf das Anfangsgewicht im Reaktor $m_{0,\text{Glycerol}} = 75,3\text{g}$ ($n_{0,\text{Glycerol}} = 817,4\text{ mmol}$); 1,0 L/min Luftvolumenstrom, Blasensäulenreaktor.

Beschreibung:

Der Stoffmengenanteil an Glycerol sinkt innerhalb von ca. 360 min von 100,0 Mol.-% auf 69,0 Mol.-% ab. Das Absinken des Glycerolanteils ist hier ebenfalls bedingt durch die Reaktion und die Zufuhr an LS. Der Stoffmengenanteil der LS akkumuliert trotz Zuführung auf 3,7 Mol.-% nach 360 min. Die Zufuhrrate ist demnach größer als die Umsatzrate von LS. Die

Stoffmengenanteile an ML und DL steigen zum Reaktionsende linear auf 16,3 Mol.-% und 10,2 Mol.-% an, wohingegen TL nur in sehr geringen Mengen mit 0,85 Mol.-% gebildet wird.

In Abbildung 4.28 ist die Zusammensetzung der dispersen unpolaren Phase (links) und die Zusammensetzung der polaren kontinuierlichen Phase (rechts) dargestellt. Die kontinuierliche polare Phase setzt sich analog zum Batch-Experiment (vgl. Abbildung 4.19) fast ausschließlich aus Glycerol zusammen (>99,9 Mol.-%). Die unpolare disperse Phase ist zum Zeitpunkt Null nicht vorhanden und setzt sich im Folgenden entsprechend des Reaktionsverlaufes in Abbildung 4.27 aus ca. 41,0 Mol.-% ML, 28,0 Mol.-% DL, 2,4 Mol.-% TL, 7,4 Mol.-% LS und 21,2 Mol.-% gelösten Glycerol zusammen und bleibt über den gesamten Verlauf konstant.

Diskussion der Fed-Batch-Experimente:

Die Experimente haben gezeigt, dass bei Substratlimitierung der LS, also bei niedrigen Zulaufzeiten und entsprechend hoher Biokatalysatorbeladung, die Bildung an DL bevorzugt wird. Bei diesen Experimenten wird die zugeführte Menge an LS direkt mit ML zu DL umgesetzt (vergleiche Experimente mit 0,25 mL/min Laurinsäurezulaufzeit und unterschiedlichen Biokatalysatorbeladung in Tabelle 4.4.) Wird die Laurinsäurezulaufzeit bei gleicher Biokatalysatorbeladung verdoppelt, führt dieses in den durchgeführten Experimenten zu einer Verdopplung der Partialglyceridbildungsrate. Umgekehrt gilt dies für die Verdopplung der Biokatalysatorbeladung bei gleicher Zulaufzeit an LS. Allerdings werden die Partialglyceride nicht in den gleichen Verhältnissen gebildet.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden Umsatz, Ausbeute, Selektivität und molarer Produktanteil an ML wie folgt berechnet:

$$\text{Umsatz} = X = \frac{\text{umgesetzte Menge Substrat}}{\text{eingesetzte Menge Substrat}} = \frac{n_{\text{ML}} + 2n_{\text{DL}} + 3n_{\text{TL}}}{n_{\text{LS,feeded}}} \quad (41)$$

$$\text{Ausbeute} = Y_{\text{ML}} = \frac{\text{gebildete Menge Produkt}}{\text{eingesetzte Menge Substrat}} = \frac{n_{\text{ML},i}}{n_{\text{LS,feeded}}} \quad (42)$$

$$\text{Selektivität} = S_{\text{ML}} = \frac{\text{gebildete Menge Produkt}}{\text{umgesetzte Menge Substrat}} = \frac{n_{\text{ML},i}}{n_{\text{ML}} + 2n_{\text{DL}} + 3n_{\text{TL}}} \quad (43)$$

$$\text{Produktanteil} = \frac{\text{gebildete Menge Produkt}}{\text{gebildete Menge Produkt} + \text{Nebenprodukt}} = \frac{n_{\text{ML}}}{n_{\text{ML}} + n_{\text{DL}} + n_{\text{TL}}} \quad (44)$$

In Abbildung 4.29 ist die Selektivität (links) und die Ausbeute (rechts) an ML für unterschiedliche Laurinsäurezulaufzeiten und Biokatalysatorbeladungen dargestellt. Aus der folgenden Abbildung ist ein Trend zu erkennen. Die Experimente unter Substratlimitierung an LS, also mit niedriger Zulaufzeit an LS und entsprechend hoher Biokatalysatorbeladung (siehe 0,25 mL/min mit 10 Gew.-% NVZ435 und 0,1 mL/min mit 6 Gew.-% NVZ435), verlaufen flacher. Die Experimente mit einem kleineren Verhältnis zwischen der Zulaufzeit an LS und der Biokatalysatorbeladung (siehe 0,25 mL/min mit 6 Gew.-% NVZ435 und 0,5 mL/min mit 10

Gew.-% NVZ435) verlaufen horizontal versetzt mit einer etwas höheren Selektivität und Ausbeute an ML.

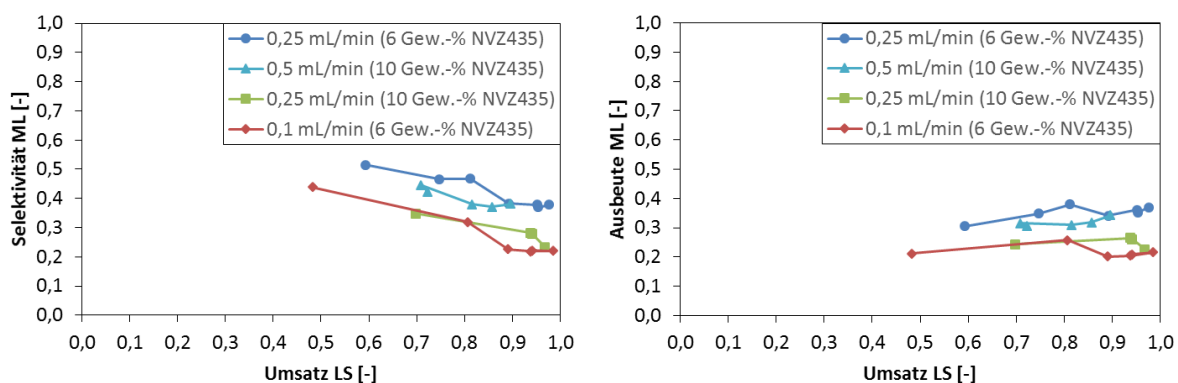


Abbildung 4.29: Selektivität (links) und Ausbeute (rechts) von ML in Abhängigkeit des Umsatzes von LS für drei unterschiedliche Laurinsäurezulaufzeiten von 0,25 und zwei verschiedenen Biokatalysatorbeladungen von 6 Gew.-% und 10 Gew.-%.

In der Tabelle 4.4 sind die Produktbildungsrate bei den Fed-Batch-Experimenten in Abhängigkeit von der Laurinsäurezulaufzeit und der Biokatalysatorbeladung dargestellt. Zusätzlich ist der molare Produktanteil an ML in der unpolaren Lipidphase aufgelistet. Wird bei gleicher Zulaufzeit die Biokatalysatorbeladung erniedrigt oder bei gleicher Biokatalysatorbeladung die Zulaufzeit an LS erhöht, steigt jeweils die Bildungsrate an ML an. Anhand des Phasenverhaltens (siehe Abbildung 4.28) und des Produktanteils in der Lipidphase ist zu erkennen, dass die Fed-Batch-Experimente in ein ähnliches thermodynamisches Reaktionsgleichgewicht wie die Batch-Experimente laufen. Eine vergleichende Betrachtung beider Reaktionsführungen (Batch und Fed-Batch) wird folgend diskutiert.

Tabelle 4.4: Produktbildungsrate bei den Fed-Batch Experimenten in Abhängigkeit von der Laurinsäurezulaufzeit und der Biokatalysatorbeladung. (* Die Anteile ML zum Ende der Reaktion sind keine Gleichgewichtswerte).

Zulaufzeit Laurinsäure [mL/min]	Menge <i>Novozym</i> <i>435</i> [®] [Gew.-%]	Bildungsrate			Anteil ML am Ende der Reaktion [%]*
		ML [mmol/min]	DL [mmol/min]	TL [mmol/min]	
0,100	6	0,091	0,109	0,006	51,5%
0,250	6	0,381	0,256	0,020	59,7%
0,250	10	0,233	0,368	0,023	44,2%
0,500	10	0,745	0,559	0,039	56,1%

Vergleichende Diskussion Batch und Fed-Batch Experimente:

Für einen Vergleich beider Reaktionsführungsstrategien werden die Zusammensetzungen der Reaktionsmischungen betrachtet. Dabei wird das Batch-Experiment im Gleichgewicht betrachtet und das Fed-Batch-Experiment an dem Zeitpunkt, zu dem das Verhältnis der Stoffmenge von Glycerol zur insgesamt zugeführten Stoffmenge von Laurinsäure 2:1 beträgt. Dieses entspricht der Startzusammensetzung des Batch-Experimentes, welcher zum Vergleich herangezogen wird.

In Tabelle 4.5 werden die Zusammensetzung der Reaktionsmischung für ein Batch und für ein Fed-Batch-Experiment aufgelistet. Zu erkennen ist, dass im Fed-Batch-Experiment geringe Glyceridanteile (ML, DL und TL) gebildet werden trotz größerer Biokatalysatorbeladung. Der molare Produktanteil an ML liegt beim Batch-Experiment bei 58 % und beim Fed-Batch Experiment bei 56 %. Im Fed-Batch-Experiment ist bis 184 min LS akkumuliert. Die Reaktion befindet sich demnach noch nicht im Reaktionsgleichgewicht. Wird der Zulauf abgestellt und die Reaktion weitergeführt (nachgeschalteter Batch), stellt sich das gleiche thermodynamische Reaktionsgleichgewicht mit dem gleichen molaren Produktanteil wie im Batch-Experiment ein. Die Fed-Batch-Reaktionsführung kann als zeitlich verlängertes Batch-Experiment interpretiert werden.

Tabelle 4.5: Zusammensetzung der Reaktionsmischung bis... **a) Batch:** zur Gleichgewichtseinstellung **b) Fed-Batch:** zum Zeitpunkt zu dem das Verhältnis der Stoffmenge an Glycerol zur insgesamt zugeführten Stoffmenge an Laurinsäure 2:1 beträgt. (*Bezogen auf das Startgewicht im Reaktor; ** Zeit bis Einstellung des Gleichgewichtes)

	Batch		Fed-Batch	
	Zusammensetzung der Reaktionsmischung [Mol.-%]	Lipidanteil [mol/mol _{LS,ML,DL,TL}]	Zusammensetzung der Reaktionsmischung [Mol.-%]	Lipidanteil [mol/mol _{LS,ML,DL,TL}]
Zeit	Substratverhältnis Gly:LS = 2:1 Biokatalysatorbeladung: 3 Gew.-% 180 min** (Umsatz 96 %)		Laurinsäurezulauftrate: 0,5 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ Biokatalysatorbeladung: 10 Gew.-%* 184 min (Umsatz 98 %)	
Gly	66,73 ±0,44		65,03 ±0,47	
LS	0,83 ±0,01	0,0249 ±0,0006	5,92 ±0,12	0,1694 ±0,0011
ML	18,83 ±0,18	0,5659 ±0,0023	16,28 ±0,13	0,4657 ±0,0026
DL	12,00 ±0,26	0,3605 ±0,0030	11,89 ±0,21	0,3400 ±0,0014
TL	1,62 ±0,02	0,0486 ±0,0001	0,87 ±0,02	0,0249 ±0,0001

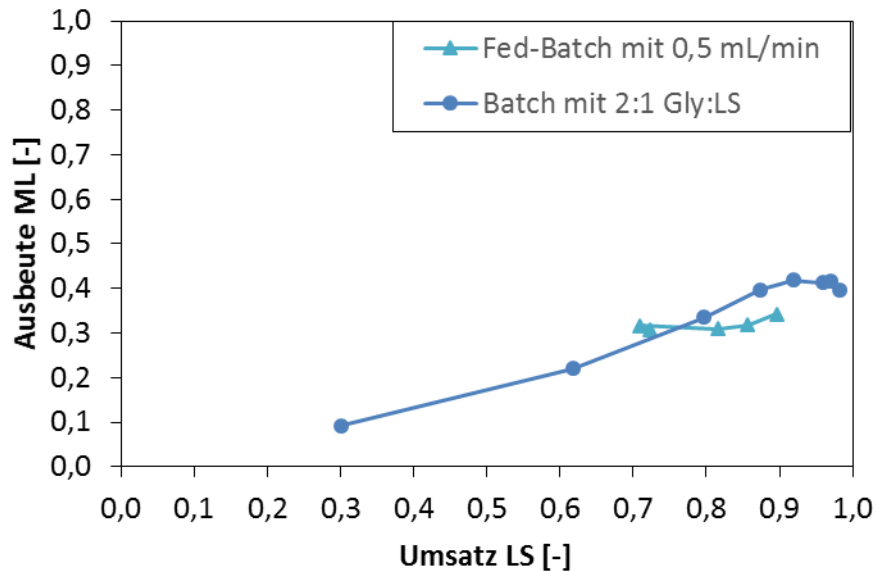


Abbildung 4.30: Ausbeute an ML in Abhängigkeit des Umsatzes von LS für ein Batch Experiment (Kreise) und ein Fed-Batch Experiment (Dreiecke).

Eine Auftragung der Ausbeute als Funktion des Umsatzes der Laurinsäure beider Reaktionsführungen (siehe Abbildung 4.30) zeigt einen ähnlichen Trend der Verläufe.

Bei einem Vergleich des Phasenverhaltens beider Reaktionsführungen (vgl. Abbildung 4.19 & Abbildung 4.28) zeigt sich, dass unabhängig von der Reaktionsführung das gleiche Reaktionsgleichgewicht erreicht wird. Beide Experimente haben im Reaktionsgleichgewicht die gleiche Phasenzusammensetzung. Beim Batch-Experiment löst sich mit Zunahme von ML vermehrt Glycerol in der Lipidphase bis zum Erreichen des Gleichgewichtes. Beim Fed-Batch-Experiment ist die Zusammensetzung der Lipidphase über die gesamte Reaktionszeit konstant.

Weder die Reaktionsführung als Fed-Batch, noch als Batch erhöht den molaren Produktanteil an Glycerolmonolaurat. Beide Strategien ergeben im Reaktionsgleichgewicht einen gleichen molaren Produktanteil von ca. 58-60 %. Die Veresterung von Glycerol mit Laurinsäure führt ab einem Substratverhältnis von 2:1 in dasselbe Reaktionsgleichgewicht. Überschüssiges Glycerol nimmt nicht mehr an der Reaktion teil, da die Reaktion durch das Phasenverhalten limitiert ist. Der konstante Anteil an ML in der Produktmischung resultiert aus dem Phasenverhalten der Reaktanden.

Die unpolare disperse Phase stellt in der Emulsion kleine Lipidtröpfchen mit lokalen Konzentrationsmaxima mit einem konstanten Komponentenverhältnis von Gly:LS:ML:DL:TL dar (siehe Abbildung 4.31). In einem Fed-Batch-Experiment entsprechen die Lipidtröpfchen kleinem lokalem Batch-Experiment. Aus der polaren kontinuierlichen Phase diffundiert Glycerol entsprechend seinem Verteilungskoeffizienten in die Lipidtröpfchen und gemäß des Massenwirkungsgesetzes ergeben sich entsprechend der Verteilungskoeffizienten konstante Anteile von ML im Reaktionsgleichgewicht.

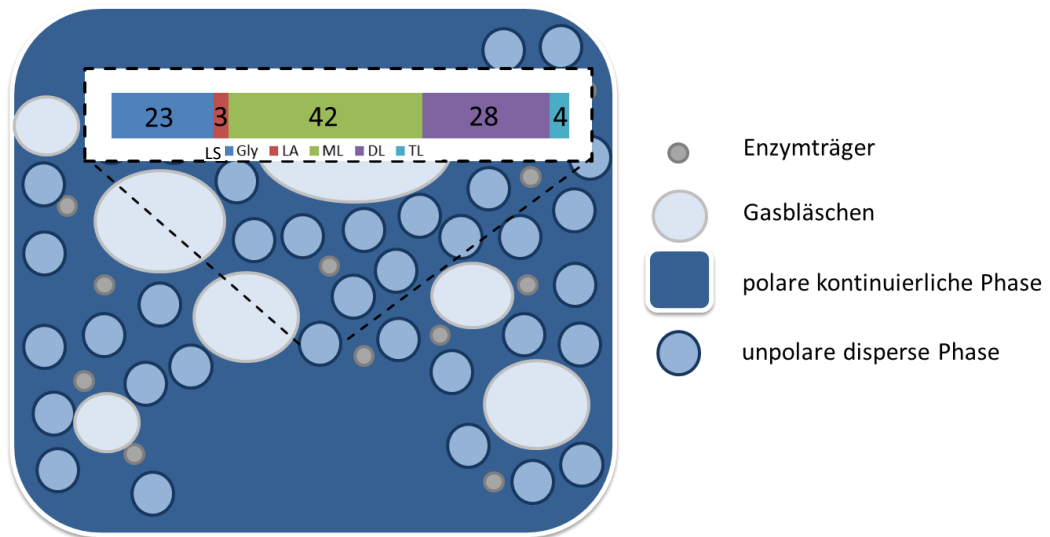


Abbildung 4.31: Phasenverhalten und Zusammensetzung der Phasen in Mol.-% bei der enzymatischen Veresterung von Glycerol mit Laurinsäure (T=65°C) mit Glycerol in Überschuss.

4.5.2 Glycerolyse von Glyceroltrilaurat^e

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Glycerolyse von Glyceroltrilaurat dargestellt. Das Substrat Glyceroltrilaurat wurde im Laufe der experimentellen Arbeiten im 2 kg-Maßstab hergestellt (siehe folgendes Unterkapitel). Bei der Glycerolyse wurde der Einfluss des Substratverhältnisses auf die Reaktionsselektivität bezüglich Glycerolmonolaurat untersucht. Dabei wurden die Reaktionen als Batch Reaktion in einem Blasensäulenreaktor bei 65 °C durchgeführt mit Novozym 345[®] als Biokatalysator. Die Probenanalyse wurde in der unpolaren Lipidphase nach Phasentrennung durchgeführt.

Synthese von Glyceroltrilaurat im 2 kg Maßstab:

Die notwendige Menge am Substrat Glyceroltrilaurat wurde für die Reaktionsuntersuchung im 2 kg Maßstab hergestellt. Dafür wurde eine Veresterung von Glycerol und Laurinsäure mit einem molaren Substratverhältnis von 1:3 in einem 2 L-Blasensäulenreaktor durchgeführt (siehe Abbildung 4.32 A-C). Abbildung 4.32 A zeigt den 2 L Blasensäulenreaktor im Abzug. Die Reaktion wurde 6 Tage lang durchgeführt, wobei nach 96 h schon das Reaktionsgleichgewicht erreicht wurde. In Abbildung 4.32 B ist der Umsatz der Laurinsäure dargestellt. Dieser wurde mittels Säurezahltitration ermittelt. Im Reaktionsgleichgewicht, also im Endprodukt, wird ein Umsatz von ca. 96 % erreicht. In Abbildung 4.32 C ist der Reaktionsverlauf der einzelnen Reaktionskomponenten dargestellt. Zum Ende der Reaktion nach 6 Tagen wurden 2 kg Glyceroltrilaurat mit einer Reinheit von 84 Mol.-% (91 Gew.-%) hergestellt.

In Tabelle 4.6 ist die Produktzusammensetzung des eigenständig hergestellten Glyceroltrilaurat dargestellt. Im Glyceroltrilaurat befinden sich am Ende der Reaktion noch 8,52 Mol.-% Laurinsäure, 7,35 Mol.-% Glyceroldilaurat und 0,11 Mol.-% Glycerolmonolaurat. Die Synthese von Glyceroltrilaurat ergab keinen hundertprozentigen Umsatz und somit sind im Startmaterial für die folgenden Versuche Anteile an ML, DL und LS enthalten. Bei der Untersuchung der folgenden Reaktionen müssen diese Startwerte bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Tabelle 4.6: Zusammensetzung des eigenständig synthetisierten Glyceroltrilaurates (TL) und die enthaltenen Nebenprodukte Glycerolmonolaurat (ML) und Glyceroldilaurat (DL) und das Edukt LS.

	TL	LS	DL	ML
Mol.-%	84,03	8,52	7,35	0,11
Gew.-%	91,34	2,90	5,71	0,05

^e Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Elena Eßer erzeugt: Etablierung einer in situ Analytik für die enzymatische Glycerolyse von Trilaurin mittels FT-IR-Spektroskopie, *Masterarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2015

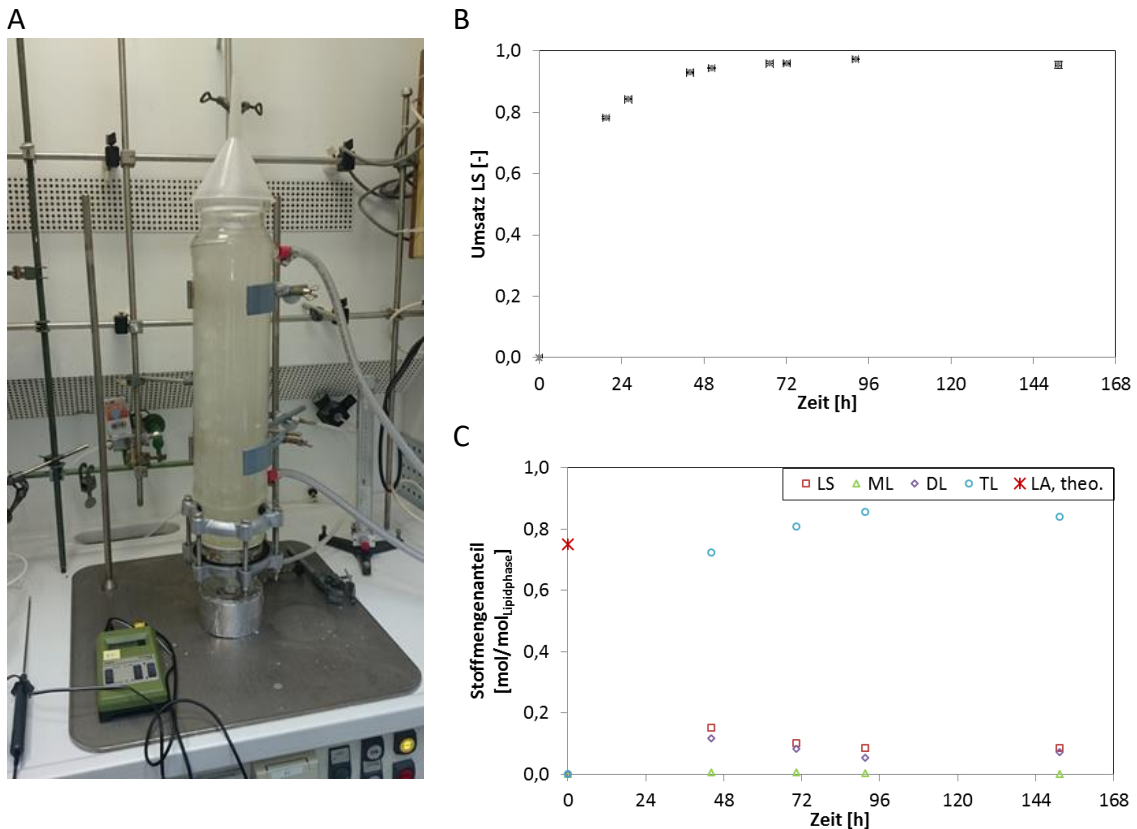


Abbildung 4.32: (A) Synthese von Glyceroltrilaurat im 2L Blasensäulenreaktor. (B) Zeitlicher Verlauf des Laurinsäureumsatzes, (C) Reaktionsverlauf der Synthese von Glyceroltrilaurat. **Reaktionsbedingungen:** Substratverhältnis Gly:LS = 1:3; 1 Gew.-% Novozym 435®; T = 80 °C, Ansatzgröße: 2193 g, Luftbegasung mit 8,92 L/min., 2 L Blasensäulenreaktor.

Untersuchung der Glycerolyse – Einfluss des Substratverhältnisses:

Die Durchführung der Batch-Experimente erfolgte in einem Blasensäulenreaktor. Die Substrate Glycerol und Glyceroltrilaurat (TL) wurden je nach Substratverhältnis in den vorgewärmten Reaktor gegeben. Nach dem Schmelzvorgang, die Equilibrierung der Reaktionstemperatur und die Durchmischung der Substrate, wurde die Reaktion durch die Zugabe des Biokatalysators Novozym 435® gestartet. Da zu Beginn der Reaktion im Substrat TL noch Verunreinigungen an LS vorhanden waren, wurde auch die Glycerolyse mit trockener Luft am Reaktorboden des Blasensäulenreaktors begast. Dieses ermöglichte eine Durchmischung der Reaktionsmischung und den Austrag des Nebenproduktes Wasser, welches bei der Nebenreaktion der weiteren Veresterung, bedingt durch die Verunreinigung an LS, entsteht. Exemplarisch wird der Reaktionsverläufe eines Experimentes gezeigt (siehe Abbildung 4.33). Die Reaktionsverläufe bei allen Substratverhältnissen mit Überschuss an Glycerol (ab Gly/TL von 2:1) ähneln sich. Ausschließlich bei einem Substratverhältnis von Gly/TL von 1:1 weicht der Verlauf etwas ab und es werden geringfügig niedrigere Werte an Umsatz TL, Anteil ML, Selektivität und Ausbeute an ML erreicht (vgl. Tabelle 4.7).

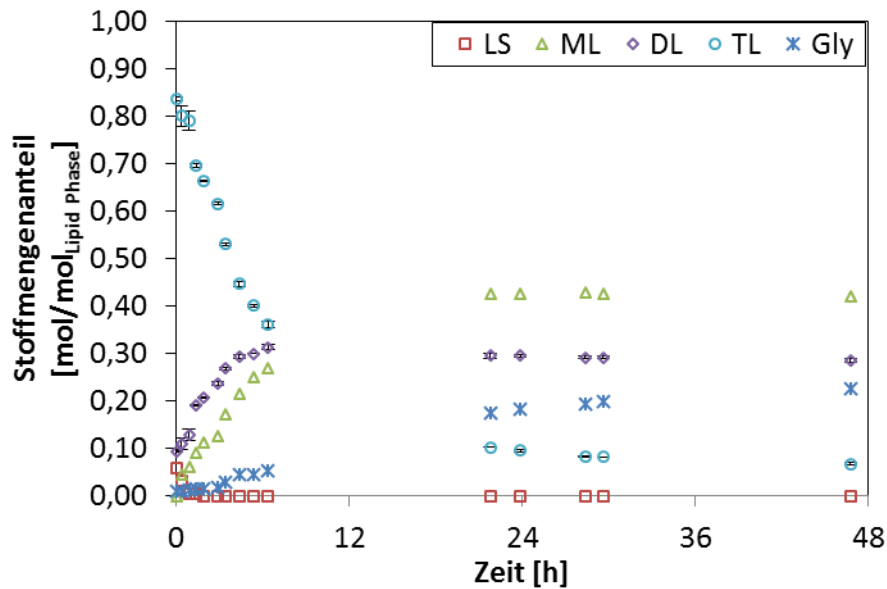


Abbildung 4.33: Reaktionsverlauf einer Glycerolyse mit Glycerol im Überschuss. Es wurde jeweils nur in der Lipidphase analysiert. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:TL von 2:1, Gesamtansatzgröße: 153 g, 3 Gew.-% Novozym 435[®], T = 65 °C; Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

Zu Beginn der Reaktion setzt sich die unpolare Lipidphase neben TL zusätzlich aus Verunreinigungen an LS, DL und geringen Mengen ML zusammen (vgl. Tabelle 4.6). Das TL wird in den ersten 8 Stunden kontinuierlich mit Glycerol umgesetzt zu DL und ML (vgl. Abbildung 4.9 und Gleichungen (21)). Parallel wird die Verunreinigung LS ebenfalls zu den Glyceriden umgesetzt. Nach ca. 2 h ist die LS komplett umgesetzt. Im Reaktionsgleichgewicht nach 48 h wird TL zu ca. 92 % umgesetzt. Es wird im Gleichgewicht eine Selektivität an ML von 55 % und eine Ausbeute an ML von ca. 50 % erreicht. Der molare Produktanteil an ML beträgt ca. 55 % (vgl. Gleichungen (45)-(48)).

$$\text{Umsatz} = X = \frac{\text{umgesetzte Menge Substrat}}{\text{eingesetzte Menge Substrat}} = \frac{n_{\text{TL},0} - n_{\text{TL},i}}{n_{\text{TL},0}} \quad (45)$$

$$\text{Ausbeute} = Y_{\text{ML}} = \frac{\text{gebildete Menge Produkt}}{\text{eingesetzte Menge Substrat}} = \frac{n_{\text{ML},i} - n_{\text{ML},0}}{n_{\text{TL},0}} \quad (46)$$

$$\text{Selektivität} = S_{\text{ML}} = \frac{\text{gebildete Menge Produkt}}{\text{umgesetzte Menge Substrat}} = \frac{n_{\text{ML},i} - n_{\text{ML},0}}{n_{\text{TL},0} - n_{\text{TL},i}} = \frac{\text{Ausbeute}}{\text{Umsatz}} \quad (47)$$

$$\text{Produktanteil} = \frac{\text{gebildete Menge Produkt}}{\text{gebildete Menge Produkt} + \text{Nebenprodukt}} = \frac{n_{\text{ML}}}{n_{\text{ML}} + n_{\text{DL}} + n_{\text{TL}}} \quad (48)$$

In Abbildung 4.34 ist der Effekt des Substratverhältnisses auf die Selektivität und Ausbeute bezüglich Glycerolmonolaurat dargestellt. Wie schon angedeutet, besitzen alle Substratverhältnisse einen ähnlichen Trend bei den Verläufen der Selektivität und Ausbeute an ML als Funktion des Umsatzes an TL. Ab einem Substratverhältnis von GLY/TL von 2:1

verlaufen alle Reaktionen in einen ähnlichen Gleichgewichtspunkt mit einem Umsatz an TL von ca. 92 %, einer Selektivität an ML von ca. 55-57 % und einer Ausbeute an ML von ca. 50 %.

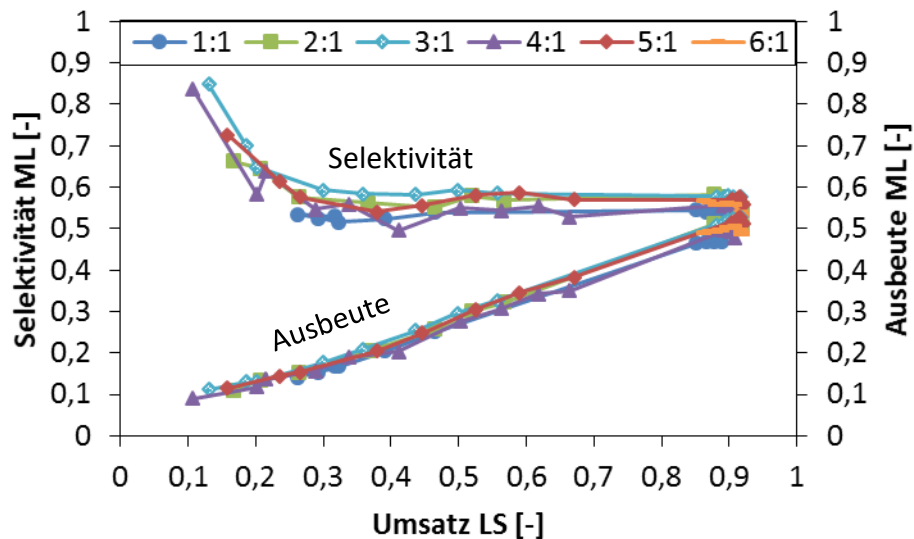


Abbildung 4.34: Selektivität und Ausbeute von ML in Abhängigkeit des Umsatzes von TL für 6 unterschiedliche Substratverhältnisse von Glycerol zu TL von 1:1 bis 6:1.

Tabelle 4.7: Einfluss des Substratverhältnisses bei der enzymatischen Glycerolyse von Glycerol mit Glycoltrilaurat im Batchreaktor. Die dargestellten Werte sind jeweils die Endwerte der Experimente in der unpolaren Phase. Katalysator: Novozym 435®.

Substrat- verhältnis Gly/TL	Zusammensetzung im Gleichgewicht in der unpolaren Phase [Mol.-%]				$X_{TL,GGW}$ [%]	Anteil ML_{GGW} [%]	Selektivität ML [%]	Ausbeute ML [%]
	Gly	ML	DL	TL				
1:1	13,61 ±0,05	40,65 ±0,20	35,94 ±0,27	9,80 ±0,12	88,70 ±0,02	47,06 ±0,21	53,41 ±0,50	47,39 ±0,45
2:1	22,56 ±1,50	42,22 ±0,79	28,51 ±0,45	6,71 ±0,25	91,94 ±0,30	54,50 ±0,03	54,87 ±1,21	50,44 ±0,94
3:1	20,17 ±0,34	44,00 ±0,44	28,93 ±0,12	6,90 ±0,02	91,70 ±0,02	55,12 ±0,32	57,67 ±0,56	52,88 ±0,50
4:1	20,24 ±0,10	41,62 ±0,18	30,75 ±0,19	7,39 ±0,11	91,44 ±0,13	52,38 ±0,16	54,54 ±0,32	50,56 ±0,53
5:1	20,83 ±0,17	43,66 ±0,35	28,73 ±0,33	6,78 ±0,15	91,52 ±0,08	55,15 ±0,33	57,57 ±0,19	49,87 ±0,22
6:1	23,53 ±0,10	40,57 ±0,08	29,11 ±0,04	6,79 ±0,02	91,72 ±0,01	53,05 ±0,04	54,11 ±0,62	49,63 ±0,57

In Tabelle 4.7 sind zusätzlich alle Zahlenwerte im Reaktionsgleichgewicht für die unterschiedlichen Substratverhältnisse dargestellt.

4.5.3 Vergleichende Diskussion Veresterung und Glycerolyse

Für einen Vergleich der beiden Reaktionen Veresterung und Glycerolyse werden die Stoffmengenzusammensetzungen in der Lipidphase im Reaktionsgleichgewicht für dieselben Gly:LS-Verhältnisse verglichen (siehe Abbildung 4.35 A). Dabei wurde die Batch, sowie die Fed-Batch Veresterung mit einem Gly:LS-Verhältnis von 2:1 mit der Batch- Glycerolyse mit einem Gly/TL-Verhältnis von 6:1 verglichen, was bei der Betrachtung des Laurinsäuremoleküls einen Gly/LS-Verhältnis von 2:1 entspricht. Die zwei Veresterungen (Batch und Fed-Batch) und die Glycerolyse zeigen identische Zusammensetzungen in der Lipidphase im Reaktionsgleichgewicht.

In Abbildung 4.35 B sind die Verläufe der jeweiligen Ausbeuten an ML als Funktion des Umsatzes des jeweiligen Substrates aufgetragen. Bei der Veresterung stellt Laurinsäure das Substrat und bei der Glycerolyse stellt Glyceroltrilaurat das Substrat da. Die Trendverläufe bei allen Reaktion gleich, da diese alle in ein ähnliches Reaktionsgleichgewicht verlaufen. Bei der Glycerolyse ist der Verlauf der Ausbeute an ML als Funktion des Umsatzes bei hohen Umsatz des Substrates zu höheren ML Ausbeuten versetzt im Vergleich zu den Veresterungen. Das heißt bei gleichen Substratumsätzen wird eine höhere Ausbeute erzielt. Diese Aussage ist mit Vorsicht zu betrachten, da hier zwei Umsätze unterschiedlicher Substrate miteinander verglichen werden.

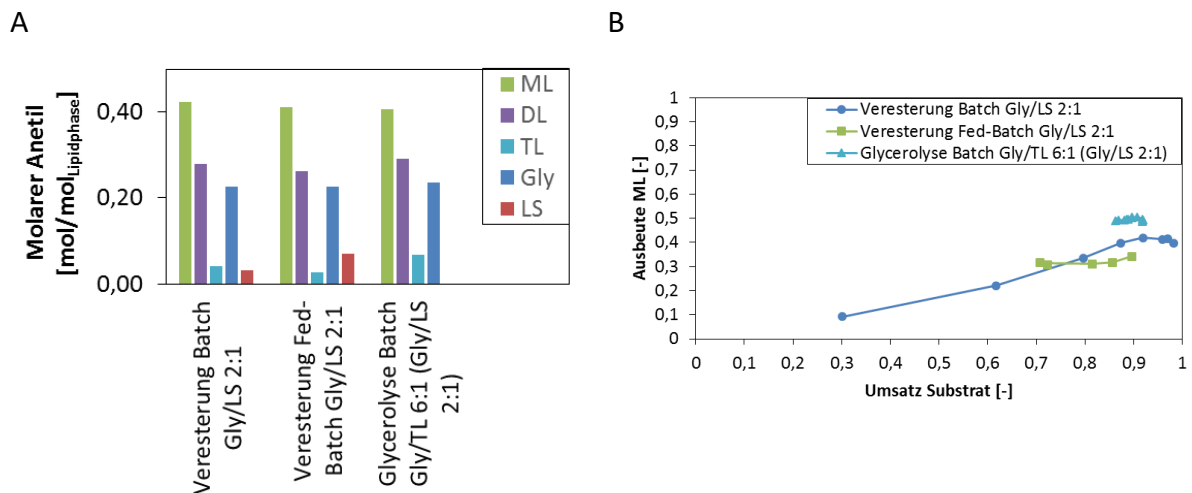


Abbildung 4.35: Vergleichende Darstellung der Produktzusammensetzung in der unpolaren Phase (A) und der Ausbeute an ML als Funktion des Umsatzes des jeweiligen Substrates (B).

5 Optimierung der Reaktionen bezüglich Glycerolmonolaurat^f

Monoacylglyceride (MAG) sind wichtige funktionale Inhaltsstoffe mit einem breiten Anwendungsfeld in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie. Glycerolmonolaurat (ML) ist ein ionisches MAG mit emulgierenden Eigenschaften und findet als Verdickungsmittel Einsatz in kosmetischen, pharmazeutischen und Lebensmittelprodukten. Eine Synthese von hochreinen ML ist kommerziell nicht realisierbar aufgrund der niedrigen Reaktionsselektivität bezüglich MAG und der geringen Mischbarkeit der Substrate Glycerol (GLY) und Laurinsäure (LS) / Glyceroltrilaurat (TL). Ein Ansatzpunkt ist der Einsatz von Löslichkeitsvermittlern um die Löslichkeit von Glycerol in der unpolaren Glycerid-Phase zu erhöhen (siehe Abbildung 5.1). Als Löslichkeitsvermittler wurden das amphotere Tensid Cocoamidopropyl Betain (CAPB) und das organische Lösungsmittel *tert*-Butanol eingesetzt. CAPB ist ein Zwitterion, dessen molekulare Struktur ein quaternäres Ammonium-Kation und ein Carboxylat-Anion besitzt (siehe Abbildung 5.1) Es ist ein weit verbreitetes Tensid in Kosmetikprodukten, speziell als mildes Tensid in Shampoos. Verglichen mit *tert*-Butanol hat der Einsatz von CAPB in der biokatalytischen Synthese von kosmetischen Inhaltsstoffen einige Vorteile. Erstens kann es nach der Synthese in der Produktmischung aufgrund seiner Anwendung als Tensid in kosmetischen Produkten verbleiben. Der kostspielige Aufreinigungsschritt von *tert*-Butanol entfällt. Zweitens sind geringer apparative und sicherheitsbedingte Limitierungen während des Prozesses zu etablieren. Im Gegensatz zum flüchtigen *tert*-Butanol kann das nicht flüchtige CAPB auch in der Veresterung bei gleichzeitiger Entfernung des Reaktionswassers eingesetzt werden.

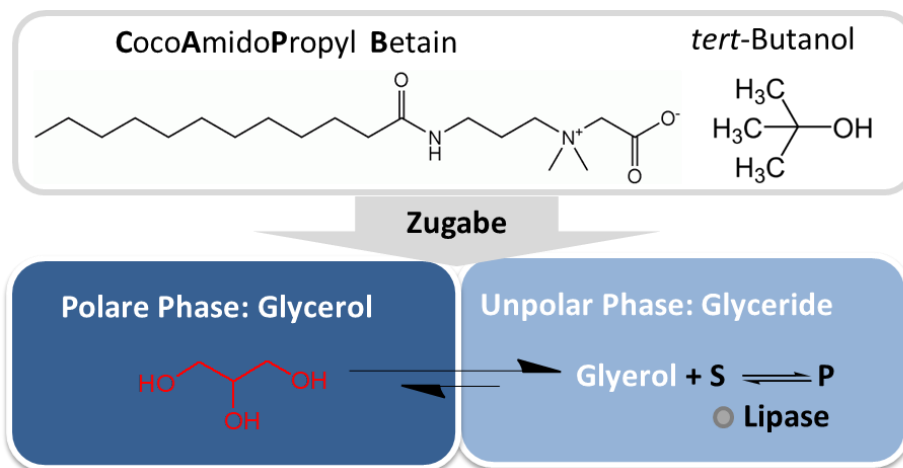


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung zur Erhöhung der Löslichkeit von Glycerol in der unpolaren Phase durch Einsatz von Additiven (CAPB und *tert*-Butanol). Die Löslichkeit von Glycerol in der unpolaren Glycerid-Phase ist die limitierende Größe des Reaktionssystems.

Der Focus in diesem Kapitel ist der Einfluss dieser Löslichkeitsvermittler auf die Bildungsrate von Glycerolmonolaurat anstatt Glyceroldilaurat um die Selektivität bezüglich ML zu erhöhen.

^f Teile der Ergebnisse wurden veröffentlicht: Baum, Sören, Eric Ritter, Irina Smirnova, Martin Schilling, Andreas Liese "The role of phase behavior in the enzyme catalyzed synthesis of glycerol monolaurate." RSC Advances 6.38 (2016): 32422-32429.

Kenntnisse über das Phasenverhalten dieses mehrphasigen Systems sind essentiell, um den Effekt der Additive auf das Phasenverhalten, sowie auf die Reaktionsselektivität systematisch zu untersuchen. Daher wurden für die mehrphasigen System Gly/ML/DL, Gly/ML/TL und Gly/DL/TL experimentelle Dreiecksdiagramme erstellt, die einen Vergleich von CAPB zu den Additiv-freien Systemen zeigen (siehe Abbildung 5.2). Es wurden jeweils 4 Konoden der Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte vermessen. Dafür wurden definierte Mischungen von Glycerol und deren Partialglyceriden ML, DL und TL angesetzt und die Analyten beider Phasen, der polaren Glycerol-Phase und der unpolaren Glycerid-Phase, mit einem Gaschromatograph vermessen. Für einen Vergleich wurden die Mischungen jeweils ohne Additivzugabe (Quadrate in Abbildung 5.2) und mit Zugabe von 5 Gew.-% CAPB analysiert (Kreise in Abbildung 5.2).

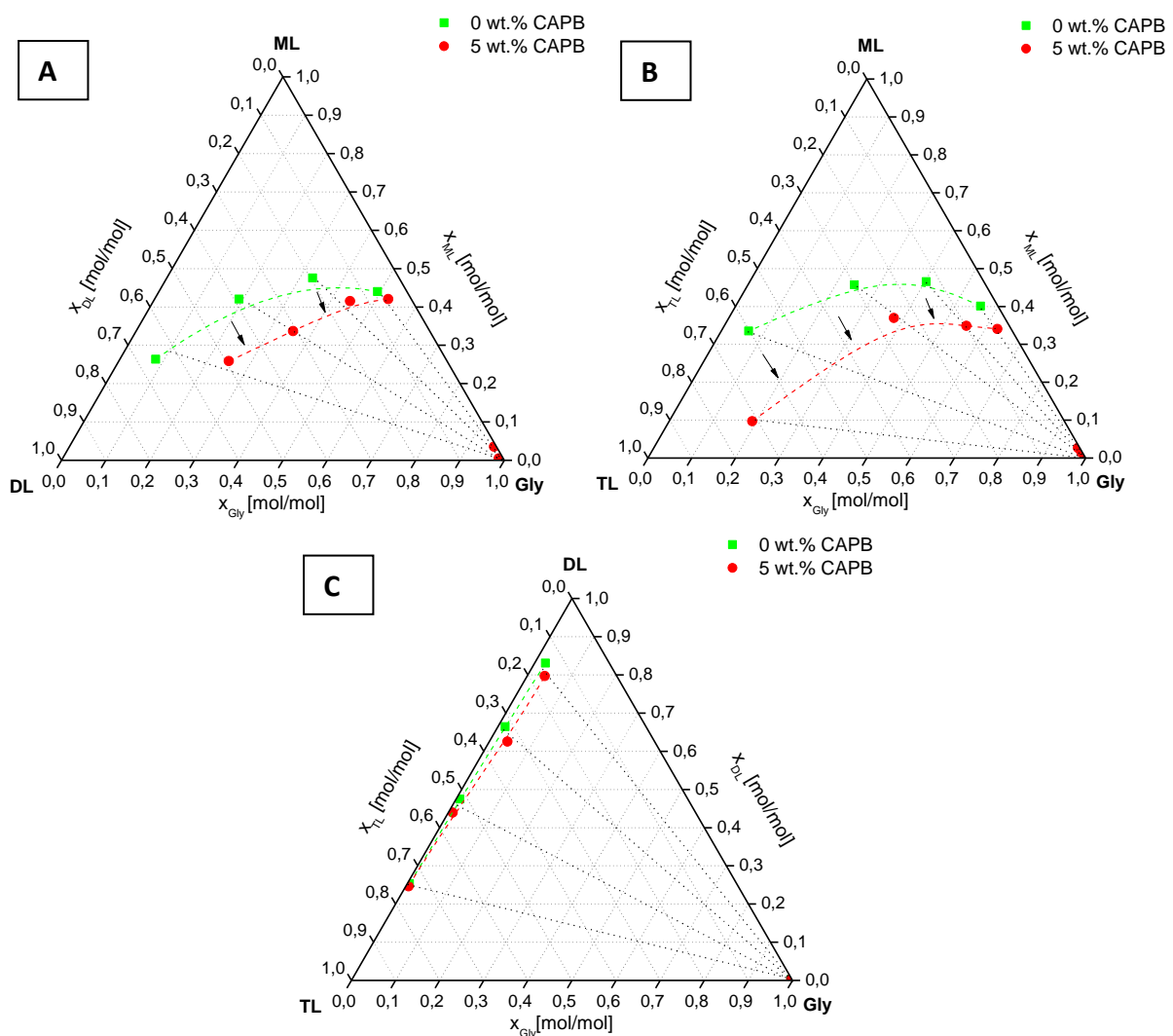


Abbildung 5.2: Experimentelle Dreiecksdiagramme bei 65 °C von Glycerol und allen Partialglyceriden des Reaktionssystems (Glycerolmonolaurat: ML; Glyceroldilaurat: DL; Glyceroltrilaurat: TL), die den Einfluss von 5 Gew.-% CAPB auf das Phasenverhalten zeigen (rote Kreise). Konoden sind als schwarze gepunktete Linien dargestellt. Die grünen / roten gepunkteten Linien stellen visuelle Hilfslinien da. [A] Dreiecksdiagramm von Gly/ML/DL; [B] Dreiecksdiagramm von Gly/DL/TL; [C] Dreiecksdiagramm von Gly/DL/TL..

Aus Abbildung 5.2 ersichtlich ist die Ausbildung von zwei Phasen, einer polaren Glycerol-Phase und einer unpolaren Glycerid-Phase bestehend aus allen Partialglyceriden ML, DL, TL und gelöstem Glycerol. Außerdem bilden Mehrphasensysteme, die Glycerolmonolaurat enthalten, kleinere Mischungslücke aus als Mischungen ohne ML (vergleiche Abbildung 5.2A/B mit C). Der Grund dafür ist das Glycerolmonolaurat an sich. Es ist polarer als DL und TL und besitzt eine höhere Oberflächenaktivität aufgrund seiner molekularen Struktur mit zwei Hydroxylfunktionen. ML besitzt eine höhere Wasserstoffbrückenbindungskapazität verglichen mit DL und TL. In der unpolaren Glycerid-Phase wächst die Wasserstoffbrückenbindungskapazität bei der Anwesenheit von ML und führt zu einem Anstieg der Löslichkeit von Glycerol in der Glycerid-Phase. Der Einfluss von CAPB auf das Phasenverhalten ist deutlich ersichtlich in Abbildung 5.2A und B. Die Mischungslücke verkleinert sich und die Löslichkeit von Glycerol in der unpolaren Glycerid-Phase erhöht sich. CAPB zeigt hingegen keinen Einfluss auf das Phasenverhalten, sobald Glycerolmonolaurat nicht in der Mischung vorhanden ist (siehe Abbildung 5.2C).

Zusätzlich wurde für das System Gly/ML/DL der Einfluss von *tert*-Butanol und CAPB experimentell untersucht (siehe Abbildung 5.3A) und eine *a priori* Vorhersage mit COSMO-RS modelliert (siehe Abbildung 5.3B). Die Zugabe von 5 Gew.-% *tert*-Butanol erhöht ebenfalls die Löslichkeit von Glycerol in der unpolaren Glycerid-Phase. Dennoch zeigt CAPB einen geringfügig stärkeren Einfluss auf das Löslichkeitsverhalten von Glycerol in der unpolaren Phase. Der Einfluss von *tert*-Butanol auf das Phasenverhalten der ternären Mischung Gly/ML/DL wurde ebenfalls mit COSMO-RS modelliert. Abbildung 5.3B zeigt das Flüssig-Flüssig-Gleichgewicht von Gly/ML/DL mit und ohne 5 Gew.-% *tert*-Butanol (Anzahl an Konformeren: 10 für Gly, ML und DL und 1 für *tert*-Butanol).

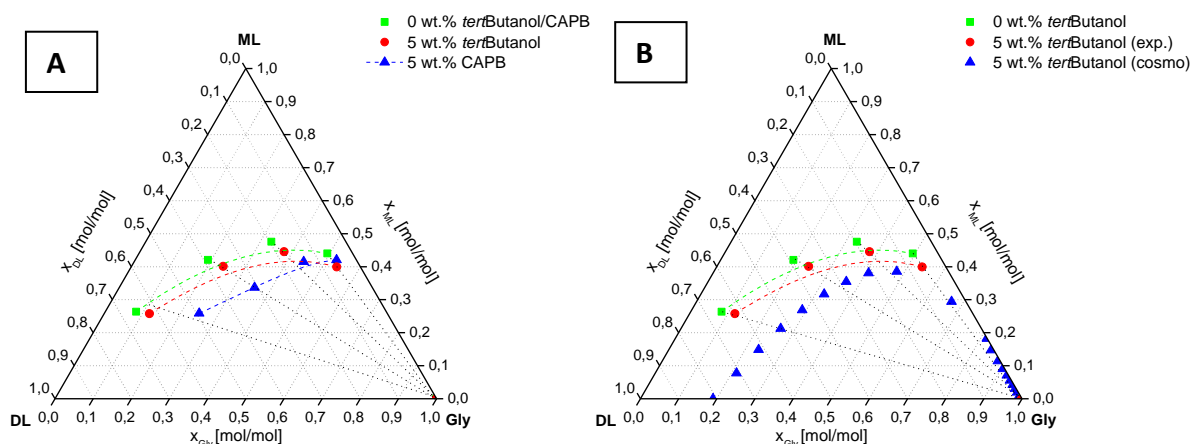


Abbildung 5.3: Dreiecksdiagramme von Glycerol, Glycerol Monolaurat (ML) und Glycerol Dilaurat (DL). [A] Einfluss von 5 Gew.-% Additiv (rote Kreise: *tert*-Butanol; blaue Dreiecke: CAPB) auf das Phasenverhalten im Vergleich zum Additiv-freien System (grüne Quadrate); [B] Einfluss von 5 Gew.-% *tert*-Butanol (grüne Quadrate: additiv-frei, rote Kreise: Experiment, blaue Dreiecke: mit Cosmo RS modellierte Daten) auf das Phasenverhalten.

Die Ergebnisse zeigen qualitativ den gleichen Trend wie die experimentellen Daten in Bezug auf die Glycerid-reiche Phase. In der polaren Phase wird die Löslichkeit von ML durch das

Modell überbestimmt. Aus der Literatur bekannt ist, dass die Anzahl der gewählten Konformere einen großen Einfluss auf die Güte der Vorhersage des COSMO-RS Modells haben, speziell gilt dies für große Moleküle wie ML, DL und CAPB [Buggert et al. 2009]. Eine *a priori* Vorhersage für den Einfluss von CAPB war mit COSMO-RS daher nicht möglich. Die guten Ergebnisse für das Flüssig-Flüssig-Gleichgewicht von Gly/ML/DL und der richtige Trend der Vorhersage für den Einfluss von *tert*-Butanol auf das Phasenverhalten zeigen, dass COSMO-RS in der Lage ist Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte für komplexe Mischungen mit großen Molekülen wie ML und DL vorherzusagen. Zusammen mit den genannten Vorteilen wurde CAPB als das bevorzugte Additiv in der biokatalytische Synthese gegenüber von *tert*-Butanol verwendet. Beide Additive können die Mischungslücke in Richtung Glycerol verschieben. Als Konsequenz löst sich mehr Glycerol in der unpolaren Glycerid-Phase. Somit steht mehr Glycerol für die biokatalytische Reaktion in der unpolaren Phase zur Verfügung.

Beiden Additive CAPB und *tert*-Butanol wurden in der biokatalytischen Glycerolyse, sowie CAPB in der Veresterung getestet und mit einer lösungsmittelfreien Reaktion verglichen (siehe Abbildung 5.4 und Tabelle 5.1). Dafür wurden alle Reaktionen bis zum Reaktionsgleichgewicht, welches nach 96 h erreicht ist, durchgeführt und Proben aus der Mischung entnommen. Abbildung 5.4 zeigt die Zusammensetzung in Gewichtsanteile ($\text{g/g}_{\text{Total}}$) im Gesamtsystem der jeweiligen Reaktionssequenz.

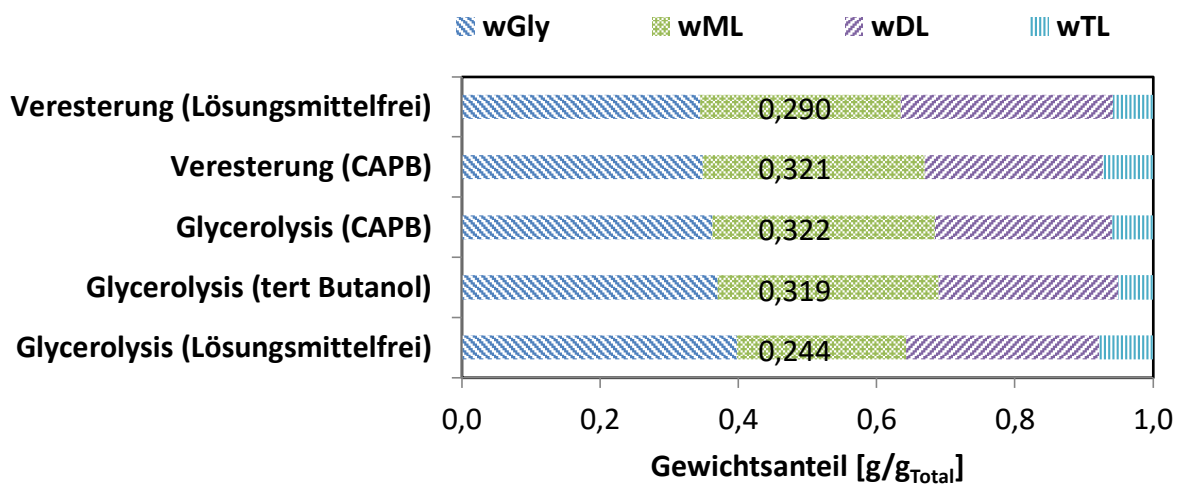


Abbildung 5.4: Vergleich der Reaktionssysteme im Reaktionsgleichgewicht im Gesamtsystem. **Reaktionsbedingungen:** *Glycerolyse Reaktion:* 65°C, 800 rpm im 50 mL (lösungsmittelfrei und *tert*-Butanol) oder 100 mL (CAPB) Rührkesselreaktor, molares Substratverhältnis (Glycerol/Glyceroltrilaurat) von 5 und 5 Gew.-% Novozym 435®, Zugabe von 5 Gew.-% CAPB oder *tert*-Butanol. *Veresterungsreaktion:* molares Substratverhältnis (Glycerol/Laurinsäure) von 2 und 10 Gew.-% Novozym 435® mit Zugabe von 5 Gew.-% CAPB, T = 65 °C, Luftbegasung mit 1 L/min Luft, Blasensäulenreaktor.

In der Veresterung mit Zusatz von 5 Gew.-% CAPB steigt der Anteil an Glycerolmonolaurat von 29,0 Gew.-% auf 32,1 Gew.-% im Gesamtsystem. Dadurch wird eine Steigerung der Selektivität bezüglich ML von 9 % von 0,580 auf 0,633 erreicht (siehe Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Ergebnissübersicht im Gesamtreaktionssystem im Reaktionsgleichgewicht.

Gesamtsystem	w_{Gly}	w_{ML}	w_{DL}	w_{TL}	S_{ML}
	[g/g _{total}]	[g/g _{total}]	[g/g _{total}]	[g/g _{total}]	[-]
Glycerolyse (Lösungsmittelfrei)	0.398±0.004	0.244±0.002	0.280±0.002	0.078±0.004	0.548
Glycerolyse (<i>tert</i> -Butanol)	0.370±0.003	0.319±0.002	0.261±0.002	0.050±0.002	0.642
Glycerolyse (CAPB)	0.362±0.015	0.322±0.008	0.257±0.006	0.059±0.001	0.642
Veresterung (CAPB)	0.348±0.002	0.321±0.003	0.258±0.002	0.072±0.001	0.633
Veresterung (Lösungsmittelfrei)	0.345±0.010	0.290±0.009	0.307±0.008	0.058±0.001	0.580

Tabelle 5.2 zeigt die berechneten Gleichgewichtskonstanten für die Veresterung in Gegenwart von CAPB verglichen mit einer lösungsmittelfreien Veresterung (siehe Kapitel 4: Reaktionsgleichungen 9-12 und Gleichungen der Gleichgewichtskonstante für die Veresterung von Glycerol mit Laurinsäure 16-19). Beim Vergleich der Gleichgewichtskonstanten wird deutlich, dass die Zugabe von CAPB das Gleichgewicht der Veresterung in Richtung Glycerolmonolaurat verschiebt.

Tabelle 5.2: Gleichgewichtskonstanten für die Veresterungsreaktion.

	$K_{1,Veresterung}$	$K_{2,Veresterung}$	$K_{3,Veresterung}$	$K_{4,Veresterung}$
CAPB	0.309	0.483	0.201	0.030
Lösungsmittelfrei	0.282	0.637	0.135	0.024

Aus den Ergebnissen von Tabelle 5.2 können folgende Schlussfolgerungen abgeleitet werden:

- $K_{1,CAPB,Veresterung} > K_{1,Lösungsmittelfrei,Veresterung}$
Im ersten Reaktionsschritt der Veresterung (siehe Reaktionsgleichungen 9) ist die Bildungsrate von ML mit Zugabe von 5 Gew.-% CAPB geringfügig höher als bei der lösungsmittelfreien Reaktion.
- $K_{2,CAPB,Veresterung} < K_{2,Lösungsmittelfrei,Veresterung}$
Im zweiten Reaktionsschritt der Veresterung (siehe Reaktionsgleichungen 10) ist die Umsetzung von ML zu DL mit Zugabe von 5 Gew.-% CAPB geringer als bei der lösungsmittelfreien Reaktion.

- $K_{3, \text{CAPB, Veresterung}} > K_{3, \text{Lösungsmittelfrei, Veresterung}}$

Im dritten Reaktionsschritt der Veresterung (siehe Reaktionsgleichungen 11) ist die Umsetzung von DL zu TL mit Zugabe von 5 Gew.-% CAPB geringfügig höher als bei der lösungsmittelfreien Reaktion.

Bei der biokatalytischen Glycerolyse wurden zwei Additive (*tert*-Butanol und CAPB) bezüglich einer Steigerung zu Glycerolmonolaurat mit einer lösungsmittelfreien Glycerolyse verglichen. Die Zugabe beider Additive zeigt den gleichen Effekt auf die Reaktion (siehe Abbildung 5.4 und Tabelle 5.1). Der Anteil an ML im Gesamtsystem steigt verglichen mit der lösungsmittelfreien Glycerolyse. Dadurch wird eine Steigerung der Selektivität bezüglich ML um 17 % von 0,548 auf 0,642 erreicht. Auch bei dieser Reaktionssequenz ist die Verschiebung der Gleichgewichtes auf die Seite von ML durch die Zugabe beider Additive ersichtlich (siehe Tabelle 5.3). Zusätzlich ist der Umsatz von Glycerol verglichen zur lösungsmittelfreien Reaktion gestiegen, da im Reaktionsgleichgewicht weniger Glycerol im Gesamtsystem vorliegt (siehe Tabelle 5.1).

Tabelle 5.3: Gleichgewichtskonstanten für die Glycerolyse-Reaktion.

	$K_{1, \text{Glycerolyse}}$	$K_{2, \text{Glycerolyse}}$	$K_{3, \text{Glycerolyse}}$
CAPB	1.806	0.623	1.125
<i>tert</i> -Butanol	2.108	0.590	1.243
Lösungsmittelfrei	1.040	0.299	0.311

Aus den Ergebnissen von Tabelle 5.3 können folgende Schlussfolgerungen abgeleitet werden:

- $K_{1, \text{tert-Butanol, Glycerolyse}} > K_{1, \text{CAPB, Glycerolyse}} > K_{1, \text{Lösungsmittelfrei, Glycerolyse}}$

Im ersten Reaktionsschritt der Glycerolyse (siehe Reaktionsgleichungen 20) ist die Bildungsrate von ML und DL mit Zugabe von 5 Gew.-% *tert*-Butanol oder CAPB höher als bei der lösungsmittelfreien Reaktion.

- $K_{2, \text{CAPB, Glycerolyse}} > K_{2, \text{tert-Butanol, Glycerolyse}} > K_{2, \text{Lösungsmittelfrei, Glycerolyse}}$

Im zweiten Reaktionsschritt der Glycerolyse (siehe Reaktionsgleichungen 21) sind die Umsetzung von DL zu ML mit Zugabe 5 Gew.-% *tert*-Butanol oder CAPB höher als bei der lösungsmittelfreien Reaktion. Die Umsetzung ist geringfügig höher bei CAPB Zugabe verglichen mit *tert*-Butanol.

- $K_{3, \text{tert-Butanol, Glycerolyse}} > K_{3, \text{CAPB, Glycerolyse}} > K_{3, \text{Lösungsmittelfrei, Glycerolyse}}$

Bei der Gesamtbetrachtung des gesamten Systems (siehe Reaktionsgleichungen 22) ist die Umsetzung von Gly und TL zu ML mit Zugabe von 5 Gew.-% *tert*-Butanol oder CAPB höher als bei der lösungsmittelfreien Reaktion.

Das amphotere Tensid Cocoamidopropyl Betain (CAPB) zeigt in beiden Reaktionsmechanismen als Additiv großes Potential zur Erhöhung der Selektivität von Glycerolmonolaurat und kann anstatt dem organischen Lösungsmittel *tert*-Butanol eingesetzt werden. Es wird ebenfalls die Löslichkeit von Glycerol in der Glycerid-Phase erhöht (siehe Abbildung 5.4). In der Abbildung 5.5 sind die Ergebnisse im Reaktionsgleichgewicht nach 96 h in Gewichtsanteilen $\text{g/g}_{\text{Lipid}}$ angegeben.

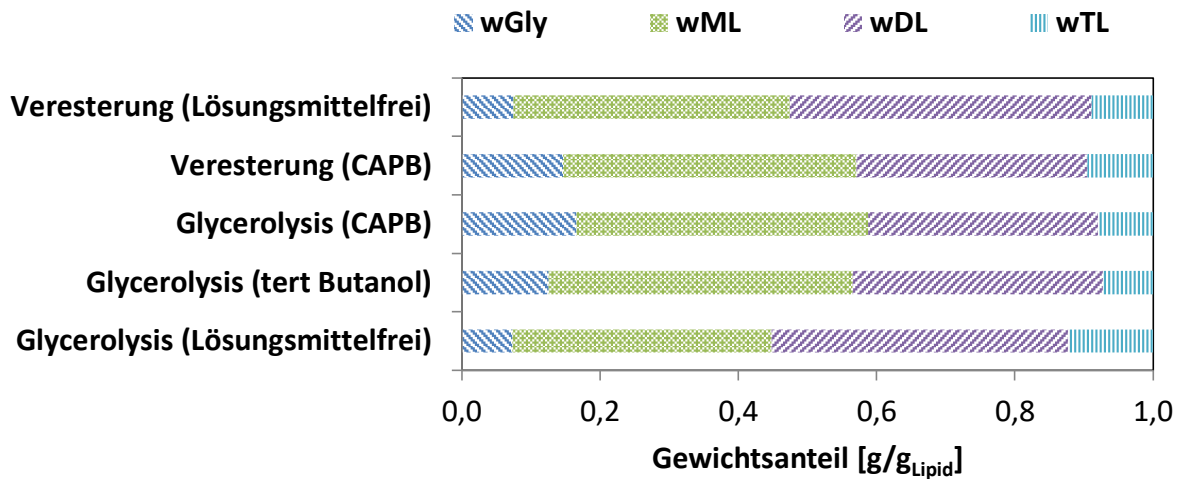


Abbildung 5.5: Vergleich der Reaktionssysteme im Reaktionsgleichgewicht in der Lipidphase. **Reaktionsbedingungen:** *Glycerolyse Reaktion:* 65°C, 800 rpm im 50 mL (lösungsmittelfrei und *tert*-Butanol) oder 100 mL (CAPB) Rührkesselreaktor, molares Substratverhältnis (Glycerol/Glycerol Trilaurat) von 5 und 5 Gew.-% Novozym 435®, Zugabe von 5 Gew.-% CAPB oder *tert*-Butanol. *Veresterungsreaktion:* molares Substratverhältnis (Glycerol/Laurinsäure) von 2 und 10 Gew.-% Novozym 435® mit Zugabe von 5 Gew.-% CAPB, 65 °C, Luftbegasung mit 1 L/min, Blasensäulenreaktor.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von CAPB auf das Phasenverhalten einer Produktmischung nach einer lösungsmittelfreien Synthese untersucht. Hierbei stand im Focus, ab welcher Zugabe an CAPB eine Produktmischung einphasig wird. Die Handhabung einphasiger Produktmischungen sind deutlich einfacher im Prozess als Mehrphasen-Mischungen bezüglich Strömungsprofile, Sedimentationen und Ablagerungen. Dafür wurde ein Experiment bei 65 °C mit schrittweiser Zugabe von 5 Gew.-% CAPB zu der Produktmischung durchgeführt (siehe Abbildung 5.6). Als Referenz- und Ausgangsmischung wurde die Produktmischung der lösungsmittelfreien Glycerolyse nach Abfiltrieren der Enzympartikel verwendet (siehe Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5 unterster Balken im Diagramm und Tabelle 5.1 oberste Zeile). Nach Zugabe von CAPB wurde die Produktmischung eine Stunde durchmischt. Nach einer Stunde Absetzzeit wurden aus beiden Phasen Proben per Gaschromatograph vermessen. Dabei zeigte die untere polare Glycerol-Phase keine Verunreinigungen durch Glyceride. Die Ergebnisse der Produktmischung in der Abbildung 5.6 sind in Stoffmengenanteile Mol.-% in der Glycerid-Phase dargestellt. Mit Zugabe von CAPB verschiebt sich die Phasengrenze nach unten. Die polare Glycerol-Phase wird kleiner und die unpolare Glycerid-Phase wächst durch das Lösen von Glycerol in dieser Phase. Die Produktmischung der lösungsmittelfreien Glycerolyse wird ab einer Zugabe von 15 Gew.-% CAPB einphasig (siehe

Abbildung 5.6 ganz rechts). Die Zusammensetzung dieser einphasigen Produktmischung entspricht der Gesamtzusammensetzung der zweiphasigen Referenz- / Ausgangsmischung (vergleiche Tabelle 5.1 oberste Zeile). In der einphasigen Produktmischung ist das gesamte Glycerol gelöst.

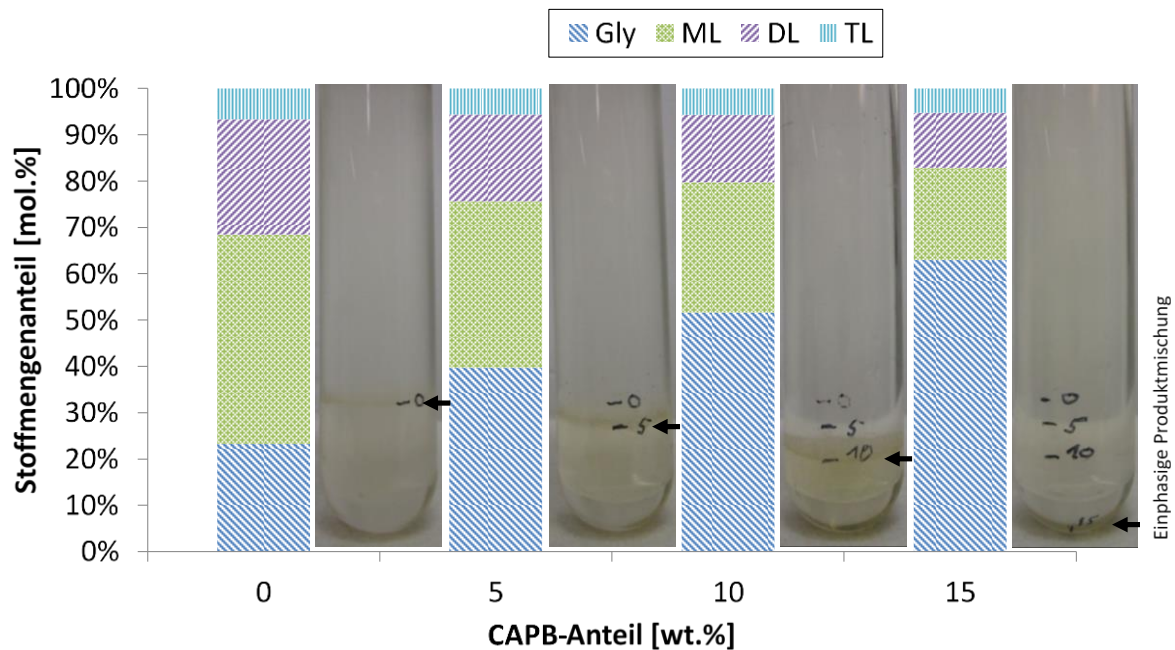


Abbildung 5.6: Einfluss von CAPB auf das Phasenverhalten einer Produktmischung im thermodynamischen Gleichgewicht. **Versuchsbedingungen:** 65 °C, Schrittweise Zugabe von 5 Gew.-% CAPB (ca. 0,5 g CAPB), 1 h Durchmischung und 1 h Absetzzeit zur Phasentrennung. Datenpunkt 0 Gew.-% CAPB entspricht einer Produktmischung im Reaktionsgleichgewicht einer lösungsmittelfreien Synthese. Die Y-Achse zeigt die Stoffmengenanteile in der Lipidphase.

Es stellt sich nun die Frage, wo genau das thermodynamische Reaktionsgleichgewicht der enzymatischen Glycerolyse liegt. Dafür soll untersucht werden, wohin das Reaktionsgleichgewicht unter Verwendung von NVZ 435 läuft, sobald das Lösungsmittel *tert*-Butanol abgezogen wird. Als Ausgangsreaktionsmischung diente eine einphasige Glycerolyse-Reaktion mit *tert*-Butanol als organisches Lösungsmittel. Für die einphasige Reaktion wurden 200 Vol.-% *tert*-Butanol verwendet (die Ergebnisse sind hier nicht dargestellt). Daraus wurde die theoretische Zusammensetzung der Reaktionsmischung nach komplettem Abzug von *tert*-Butanol berechnet (dieses ist in der Abbildung 5.7 die Startzusammensetzung beim Zeitpunkt 0 Stunden). Deutlich aus der Abbildung 5.7 zu erkennen ist, dass Glycerol, Glyceroldilaurat und Glyceroltrilaurat gebildet werden, im Gegensatz dazu Glycerolmonolaurat verbraucht wird. Am Ende der Reaktion stellt sich das gleiche thermodynamische Reaktionsgleichgewicht wie bei der lösungsmittelfreien Glycerolyse ein (vergleiche Tabelle 5.1 oberste Zeile). Das thermodynamische Gleichgewicht einer Reaktion ist fest definiert. Es würde dann jeweils nur sehr viel länger dauern ohne Katalysator.

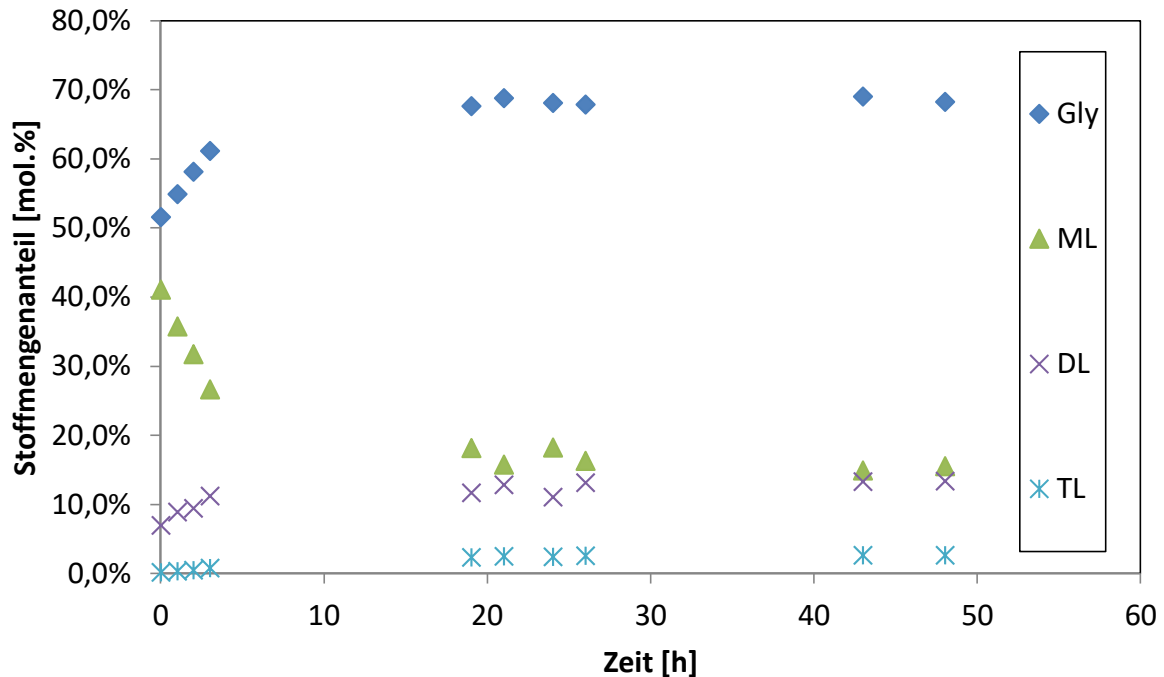


Abbildung 5.7: Ermittlung des Reaktionsgleichgewichts unter Vernachlässigung von *tert*-Butanol. **Reaktionsbedingungen:** 51,5 Mol.-% Gly, 40,8 Mol.-% ML, 7,35 Mol.-% DL, 0,35 Mol.-% TL (Komponenten wurden abgewogen), T = 65 °C; 500 rpm, 1 g Novozym 435®, Rührkesselreaktor. Zeitpunkt 0 h entspricht einer Produktzusammensetzung einer einphasigen Synthese mit *tert*-Butanol als Lösungsmittel unter Vernachlässigung des *tert*-Butanols.

Zusammenfassung Kapitel 5:

- Die Mischungslücke wird durch den Einsatz der Additive *tert*-Butanol und Cocoamidopropyl Betain (CAPB) kleiner. Die Löslichkeit des polaren Glycerols erhöht sich in der unpolaren Glycerid-Phase.
- Durch die Steigerung der Löslichkeit in der unpolaren Reaktionsphase, steht mehr Glycerol der biokatalytischen Reaktion in der unpolaren Phase zur Verfügung.
- Beide Additive verschieben das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite von Glycerolmonolaurat.
- Das amphotere Tensid Cocoamidopropyl Betain (CAPB) zeigt in beiden Reaktionsmechanismen als Additiv großes Potential und kann anstatt dem organischen Lösungsmittel *tert*-Butanol eingesetzt werden.
- Durch den Einsatz von CAPB wird eine Steigerung der Selektivität bezüglich Glycerolmonolaurat von 9 % auf 0,633 in der Veresterung und 17 % auf 0,642 in der Glycerolyse erreicht.
- Die Produktmischung der lösungsmittelfreien Glycerolyse wird ab einer Zugabe von 15 Gew.-% CAPB einphasig.
- Das thermodynamische Gleichgewicht der Glycerolyse ist klar definiert.

6 Online-Analyse der Reaktionssysteme mittels FTIR-Spektroskopie

In den vorangegangenen beiden Kapiteln wurden bereits die wesentlichen Reaktionsparameter (wie. z.B. Selektivitäten, Ausbeuten und Umsätze) für die Partialglycerid-Synthesen umfassend dargestellt. Zusätzlich wurde in Kapitel 5 die Optimierung der MAG-Synthese mittels des Amphotensids CAPB dargestellt. Der Fokus in diesem Kapitel ist die Online-Analyse, der zuvor offline analysierten Reaktionssysteme mit Glycerol als polarem Reaktionsteilnehmer (siehe Kapitel 4 & 5) mittels FTIR-Spektroskopie. Zur Messung wurde das FTIR-Spektroskop Bruker Vertex 70 und Bruker Matrix MF (Bruker Corporation, Billerica, MA USA) verwendet. Die Spektrometer wurden mit einer Diamant-ATR-Sonde IN350-T (Bruker Corporation, Billerica, MA USA) betrieben. Diese Online-Messtechnik ermöglicht eine Prozesssteuerung während der Reaktion, beispielsweise kann so die Reaktion an einem charakteristischen Punkt gestoppt werden, an dem die Ausbeute an MAG bei einem bestimmten Umsatz an Laurinsäure den höchsten Wert erreicht. Dies ist nur ein Beispiel wie die FTIR-Spektroskopie als Tool der Prozesssteuerung für diese Reaktionssysteme eingesetzt werden kann. Zunächst müssen diese Reaktionssysteme, neben der Offline-Analytik, ebenfalls mittels FTIR-Spektroskopie analysiert und ausgewertet werden. Denn die Grundlage für eine Prozesssteuerung sind die chemometrischen Modelle (siehe Kapitel 1.8). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche mathematische Modelle zur Auswertung der spektroskopischen Daten herangezogen, das Softmodel, der Partial Least Squares-Algorithmus (PLS) und das Hardmodel, der Indirect Hard Model-Algorithmus (IHM). Zur Auswertung wurde ausschließlich die Software PEAXACT (S-PACT GmbH, 52064 Aachen, Deutschland) verwendet. Diese beiden Auswertemodelle sollen im vorliegenden Kapitel angewendet und schlussendlich bezüglich ihrer Stärken und Schwächen verglichen werden.

6.1 Einführung in die FTIR-Spektroskopie und Chemometrie für die Reaktionssysteme

Für die Etablierung von chemometrischen Modellen und die damit folgende quantitative Auswertung von FTIR-Spektren sind das Verständnis und die Interpretation des Schwingungsverhaltens von Molekülen, also den Reinstoffen dieser Reaktionssysteme, notwendig. Die Moleküle dieser Reaktionssysteme besitzen charakteristische funktionelle Gruppen, deren korrespondierende Absorptionsbanden bei unterschiedlichen Wellenzahlen erscheinen. Die funktionellen Gruppen besitzen mehrere Freiheitsgrade im Raum und somit die Möglichkeit in unterschiedlichen Mustern zu schwingen und an mehreren Wellenzahlbereichen zu absorbieren. Die sogenannten lokalisierten Schwingungen, die monokausal einer funktionellen charakteristischen Gruppe zugeordnet werden können, sind daher von großem Interesse für die Strukturaufklärung. In Abbildung 6.1 werden am Beispiel der Methylengruppe grundlegende lokalisierte Schwingungsarten unterschieden.

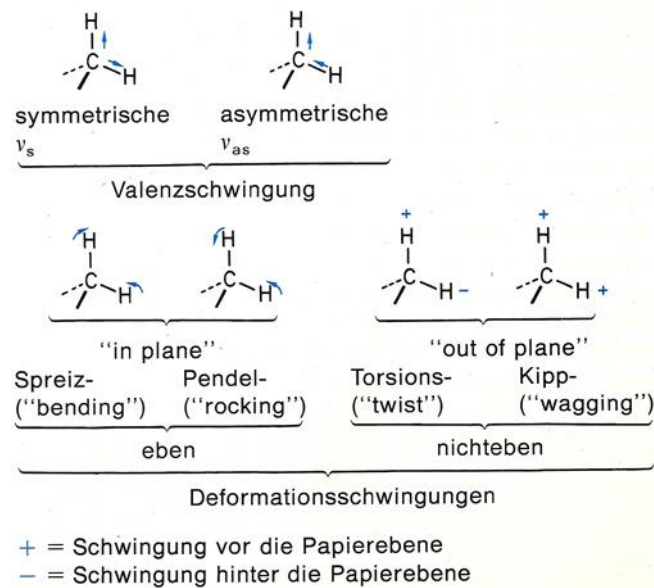


Abbildung 6.1: lokalisierte Schwingungsarten der Methylengruppe [Hesse et al. 2005].

Die Banden häufiger funktioneller Gruppen der Reinstoffe dieser Reaktionssysteme im Wellenzahlenbereich $1800 - 800 \text{ cm}^{-1}$ sind in Tabelle 6.1 bis Tabelle 6.4 zusammengefasst und in Abbildung 6.2 grafisch dargestellt.

Tabelle 6.1: Absorptionsbanden der Kohlenwasserstoffgruppen [Hesse et al. 2005].

Gruppe	Bande [cm^{-1}]	Bemerkungen
	1470-1430	(C-H)-Deformationsschwingungen
-CH ₃	1390-1370	symmetrische Deformationsschwingungen

Tabelle 6.2: Absorptionsbanden der Hydroxylgruppen [Hesse et al. 2005].

Gruppe	Bande [cm^{-1}]	Bemerkungen
-O-H	1410-1260	(O-H)-Deformationsschwingung

Tabelle 6.3: Absorptionsbanden der Carbonylgruppen [Hesse et al. 2005].

Gruppe	Bande [cm^{-1}]	Bemerkungen
	1725-1700	Gesättigte Carbonsäuren (R-C(=O)OH)
	1750-1735	Gesättigte Ester ($\text{R}_1\text{-COO-R}_2$)

Tabelle 6.4: Absorptionsbanden der C-O Einfachbindungen [Hesse et al. 2005; Gremlich und Günzler 2003].

Gruppe	Bande [cm^{-1}]	Bemerkungen
$\begin{array}{c} \text{C}-\text{O}-\text{C} \\ \\ \text{O} \end{array}$	1330-1050	2 Banden; Antisymmetrische Deformations-schwingung, stärker bei tieferer Wellenzahl
C-OH	1075-1000 1120-1090	primäre Alkohole sekundäre Alkohole

Für ein besseres Verständnis und für eine bessere Übersicht sind in Abbildung 6.2 alle Reinstoffmoleküle und deren charakteristische funktionelle Gruppen im Wellenzahlenbereich $1800 - 800 \text{ cm}^{-1}$ dargestellt.

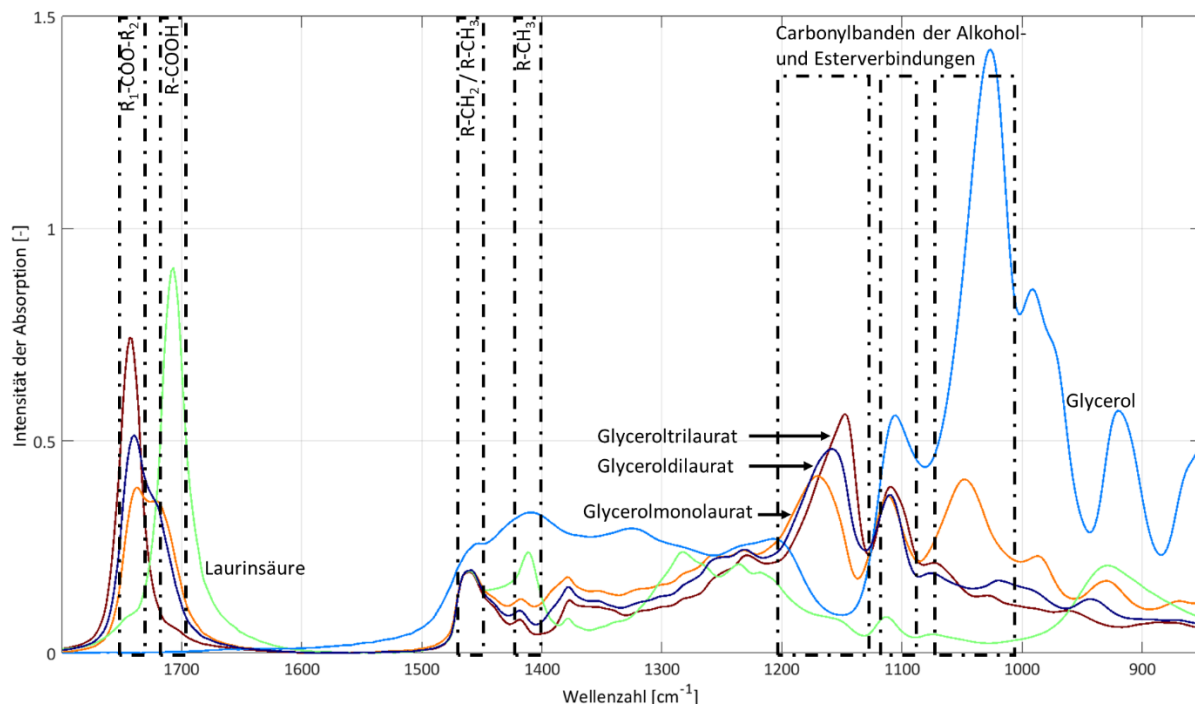


Abbildung 6.2: Reinstoffspektren und deren charakteristische funktionelle Gruppen im Wellenzahlenbereich $1800 - 800 \text{ cm}^{-1}$; Laurinsäure (grün), Glycerol (hellblau), Glycerolmonolaurat (orange), Glyceroldilaurat (dunkelblau) und Glyceroltrilaurat (dunkelrot).

In Abbildung 6.2 sind deutlich die spektralen Unterschiede der Reinstoffmoleküle zu erkennen, die sich hervorragend zur Erstellung der chemometrischen Modelle anbieten. Somit wird eine eindeutige Differenzierung zwischen den Reinstoffen ermöglicht. Im Wellenzahlenbereich $1750-1700 \text{ cm}^{-1}$ kann deutlich zwischen der Carbonsäure (hier die Laurinsäure) und den Carbonsäureestern (hier Glycerolmono-, di- und trilaurat) unterschieden werden. Zudem lässt die Peakverschiebung eine Differenzierung zwischen den einzelnen Glycerolestern zu. Ein weiterer wichtiger Wellenzahlenbereich für die Erstellung der chemometrischen Modelle liegt bei $1200-1000 \text{ cm}^{-1}$. Im ersten gekennzeichneten gestrichelten Bereich von links bei $1200-1125 \text{ cm}^{-1}$ liegen die Absorptionsbanden der C-O Einfachbindungen der Glycerolester. Zu erkennen ist hier ebenfalls eine Peakverschiebung zu

kleineren Wellenzahlen bei Glyceroldi- und trilaurat. Im dritten gekennzeichneten gestrichelten Bereich von links bei $1075\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ liegt die Absorptionsbande der primären Alkohole (C-OH). Hier besitzt nur das Glycerolmonolaurat von den Glycerolestern eine Absorptionsbande und lässt sich eindeutig von Glyceroldi- und trilaurat differenzieren.

Nichtdestotrotz wird aber auch eine Herausforderung ersichtlich, die bei der FTIR-Spektroskopie mittels ATR-Elementen in mehrphasigen Lösungen auftreten kann. Denn am ATR-Kristall liegt immer die kontinuierliche Phase des Mehrphasensystems an und dispergierte Tröpfchen können sich am Kristall anlagern. Zusätzlich spielen die Oberflächeneigenschaften des ATR-Kristalls (hier Diamant) eine Rolle, denn diese bestimmt, welche Phase sich bevorzugt anlagert. In diesem Kapitel werden zwei enzymatische Mehrphasenreaktionen untersucht: Die Veresterung von Laurinsäure und Glycerol, sowie die Umesterung von Glycerol und Glyceroltrilaurat. Je nach Überschuss einer Komponente stellen entweder die Laurinsäure und die darin löslichen Produkte die kontinuierliche Phase dar oder das polare Glycerol. Der zweite Fall bietet die Herausforderung. Denn hier liegt Glycerol am ATR-Kristall an und wie in Abbildung 6.2 zu erkennen ist, überlagert das Spektrum von Glycerol einen großen Bereich im Fingerprint-Bereich und ebenso auch den Wellenzahlenbereich bei $1075\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, in dem Glycerolmonolaurat seine eindeutige charakteristische Absorptionsbande aufweist.

6.2 Auswertung mittels Partial Least Squares-Algorithmus (PLS)

In diesem Kapitel wird der Partial Least Squares-Algorithmus (PLS) zur Auswertung der FTIR-Spektren und zur Modellierung der chemometrischen Modelle verwendet. Wie in Kapitel 1.8.1 bereits erwähnt, ist der PLS-Algorithmus ein Softmodel, bei dem die Kenntnisse der inneren Beschaffenheit des Systems nicht notwendig sind und bei der Modellbildung nicht berücksichtigt werden. Es ist somit ein sogenannter „Black-Box“-Ansatz. Grundlegend für die chemometrische Modellerstellung ist, dass neben Offline-Messungen (hier: GC-Daten) ebenfalls spektrale Daten mittels FTIR-Spektroskopie gemessen werden und diese beiden Datensätze miteinander korreliert werden (siehe Kapitel 1.8.1 Abbildung 1.19). In den nächsten vier Unterkapiteln werden folgende Reaktionssysteme betrachtet:

- Veresterung von Glycerol und Laurinsäure (Laurinsäure im Überschuss).
- Veresterung von Glycerol und Laurinsäure (Glycerol im Überschuss).
- Veresterung von Glycerol und Laurinsäure (Fed-Batch Reaktion mit Laurinsäurezufuhr).
- Glycerolyse von Glyceroltrilaurat.

Die Reaktionssysteme sind bereits detailliert bezüglich Reaktionsmechanismen, Phasenverhalten und charakteristischer Reaktionsparameter wie Umsatz, Ausbeute und Selektivität in Kapitel 4 beschrieben. In den folgenden Unterkapiteln liegt der Fokus auf

chemometrischer Modellierung und der dadurch resultierenden Anwendbarkeit des Partial Least Squares-Algorithmus (PLS) zur Online-Überwachung der Reaktionssysteme.

6.2.1 Veresterung von Glycerol und Laurinsäure im Überschuss[§]

Wie bereits detailliert in Kapitel 4 beschrieben, ist die Veresterung von Glycerol und Laurinsäure ein Mehrphasensystem. Mit Laurinsäure im Überschuss stellt diese mit den gebildeten Glycerolestern die kontinuierliche Phase dar, in der mittels ATR-FTIR Spektroskopie kontinuierlich *in situ* im Blasensäulenreaktor gemessen wird (siehe Abbildung 6.3 & Abbildung 6.4). Die spektralen Daten müssen vor der Erstellung eines chemometrischen Modells auf Plausibilität untersucht werden und gegebenenfalls bearbeitet werden.

Plausibilitätstest und Datenvorbehandlung

Der globale Bereich der Spektren wurde zunächst auf den Wellenzahlenbereich von 1850-800 cm^{-1} eingegrenzt, da hier die aussagekräftigen Informationen dieses Reaktionssystems liegen. Zudem wurden die Spektren im Bereich 1580-1510 cm^{-1} beschnitten, um das Wasserdampfrauschen zu eliminieren. Eine Basislinienkorrektur mit der Methode *Straight-Line-Subtraction* wurde auf alle Spektren angewendet. Diese Methode legt eine gerade Linie in die Spektren und diese wird dann von den Spektren zur Korrektur der Basislinie subtrahiert. Zusätzlich wurden die Spektren durch den Savitzky-Golay-Filter zur Minimierung des Rauschens geglättet.

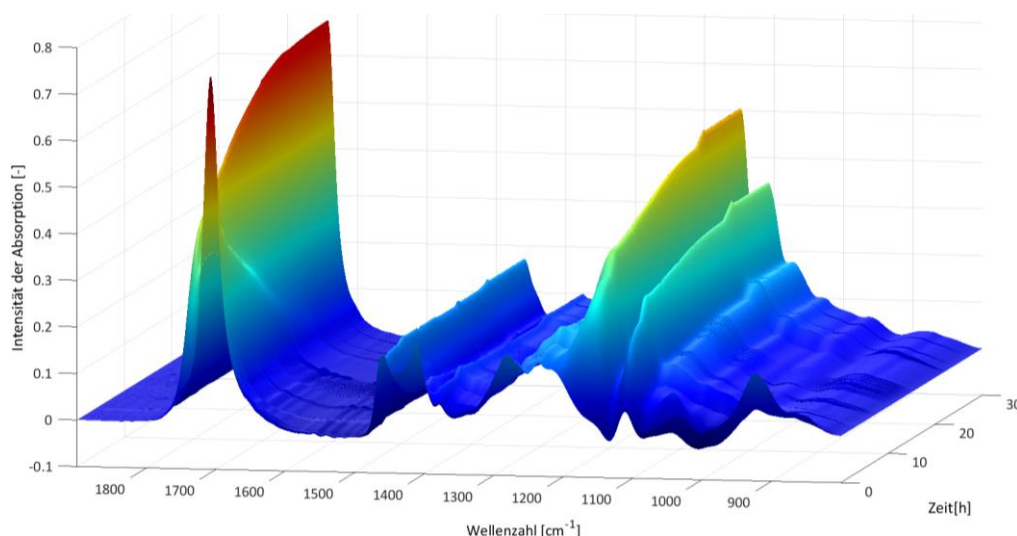


Abbildung 6.3: Zeitliche Auflösung der FTIR-Spektren einer Veresterung von Laurinsäure und Glycerol. Die dargestellten Spektren sind die bearbeiteten Daten. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 1:3, Gesamtansatzgröße: 94 g, 2 Gew.-% Novozym 435®, T = 70 °C; Luftbegasung mit 0,75 L/min, Blasensäulenreaktor.

[§] Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von B.Sc. Yasmin Goes erzeugt: Multivariate Datenanalyse enzymatischer Veresterungen durch Indirect Hard Modeling, *Bachelorarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2013

In beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass zu Beginn der Reaktion die Absorptionsbande der Laurinsäure (R-COOH) bei 1700 cm^{-1} abnimmt und die Absorptionsbande der Glycerolester (R₁-COO-R₂) bei 1735 cm^{-1} zunimmt. Zusätzlich nehmen im Fingerprint-Bereich die charakteristischen Absorptionsbanden der CO-Einfachbindungen zu. Bei einer genauen Betrachtung der Abbildung 6.3 ist ebenfalls die charakteristische Absorptionsbande des Glycerolmonolaurats bei $1075\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen, wodurch die eindeutige Differenzierung von Glyceroldi- und trilaurat möglich ist.

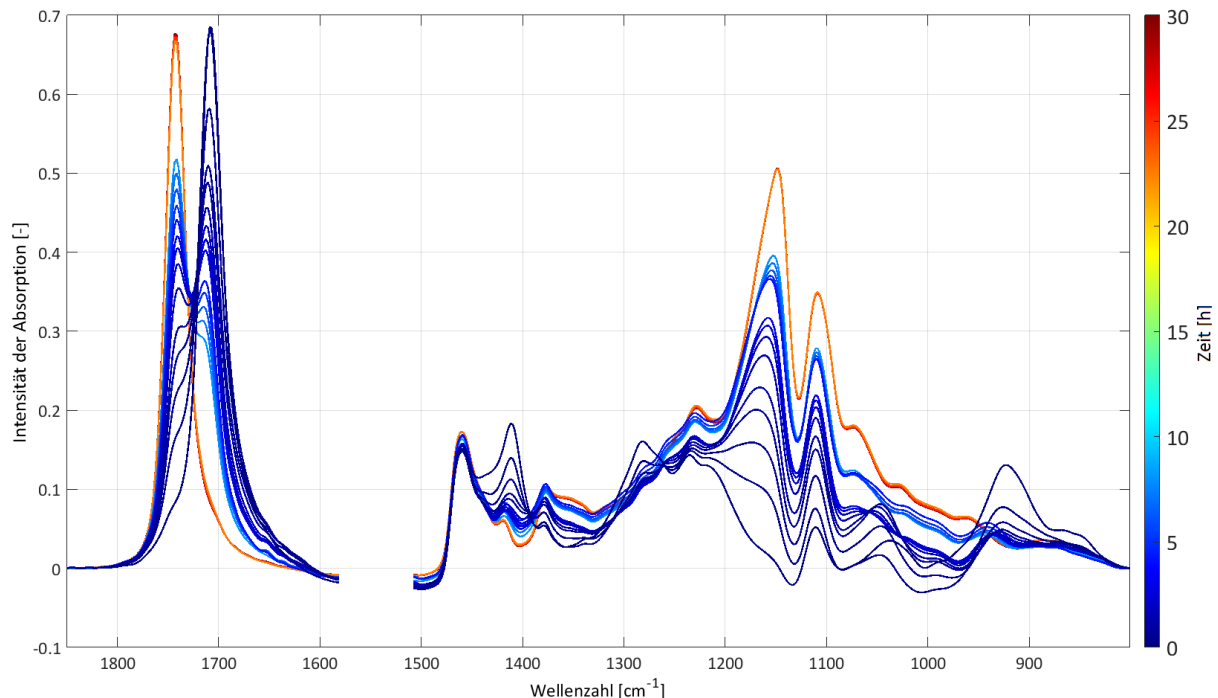


Abbildung 6.4: 2D Darstellung der Veresterung von Glycerol und Laurinsäure. Farbskala kennzeichnet den zeitlichen Verlauf. Die dargestellten Spektren sind die bearbeiteten Daten. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 1:3, Gesamtansatzgröße: 94 g, 2 Gew.-% Novozym 435®, T = 70 °C; Luftbegasung mit 0,75 L/min, Blasensäulenreaktor.

Kalibrierung des chemometrischen Modells

Nach dem Plausibilitätstest und der Datenvorbehandlung der FTIR-Spektren folgt die Kalibrierung des chemometrischen Modells. Dazu werden ausgewählte spektrale Daten mit offline gemessenen Analysewerten (hier GC-Analyse) korreliert (Theorie siehe Kapitel 1.8.1). Hier wurde Glycerol als polares Substrat in der chemometrischen Modellierung nicht berücksichtigt, da es bei Überschuss an Laurinsäure nicht an der Oberfläche des ATR-Kristalls detektiert wird. Aus den GC-Daten wurde der Glycerolanteil bestimmt und der Stoffmengenanteil auf das System ohne Glycerol berechnet. In Tabelle 6.5 sind die Modellparameter des chemometrischen Modells aufgelistet. Zur Kalibrierung des Modells wurden 101 FTIR-Spektren und deren Offline-Daten verwendet. Der Datensatz beinhaltet dabei Veresterungsreaktionen, die bei 60 °C und 80 °C und mit einem Glycerol/Laurinsäure-Verhältnis von 1:2 durchgeführt worden sind. Zur Kalibrierung wurde eine Testset-Validierung durchgeführt, wobei der Datensatz der zu analysierenden Reaktion (Veresterung von Glycerol

und Laurinsäure bei 70 °C mit einem Glycerol/Laurinsäure-Verhältnis von 3:1; siehe Validierung des Modells, Abbildung 6.6) als Testset mit 18 Spektren gewählt wurde. Das chemometrische Modell kann mit einem Rang kleiner gleich 5 die Stoffmengenanteile aller Komponenten mit einem Fehler kleiner gleich 5,3 Mol.-% aus dem unbekanntem spektralen Datensatz bestimmen. Dabei ist der Regressionskoeffizient R^2 der Kalibriergeraden aller Komponenten (siehe Abbildung 6.5) größer 85%. Zum Verständnis des Rangs, welcher hier zur Beschreibung des Modells verwendet wird, soll an dieser Stelle kurz darauf eingegangen werden. Der Rang 5 bedeutet in diesem Fall, dass aus dem n-dimensionalen Raum der Spektrenmatrix mit n Wellenzahlen und m Absorptionswerten ein transformierter Rechenraum mit 5 Variablen (Hauptkomponenten) (Rang 5) gebildet wurde, in dem die spektralen Informationen mit reduzierter Datenmenge dargestellt werden können. Dabei enthält die erste Hauptkomponente die meisten Information des spektralen Datensatzes und die fünfte nur noch sehr geringe Information. Werden beispielsweise zu viele Hauptkomponenten zur Modellbildung verwendet, kann es zu einem sogenannten „Overfitting“ kommen und gegebenenfalls wird dann auch das Grundrauschen der Spektren modelliert (siehe Kapitel 1 Abbildung 1.20). Das Modell transformiert die spektralen Daten in den neuen Rechenraum und führt dort die Rechenoptionen zur Bestimmung des Referenzwertes durch (hier Stoffmengenanteil) und transformiert diese dann wieder zurück in die Ausgangsdimension. Auf die detaillierte mathematische Erklärung wird im Weiteren nicht näher eingegangen und auf die entsprechende Literatur verwiesen [Kessler 2007].

Tabelle 6.5: Modellparameter des chemometrischen Modells. *Rang*: Dimension des Rechenraumes; R^2 : Regressionskoeffizient; *RMSECV*: Fehler der Modellvalidierung (engl.: *Root mean square error of cross-validation*); *RMSEP*: Fehler der Modellvorhersage (engl.: *Root mean square error of prediction*).

Eigenschaft	Laurinsäure	Glycerol-monolaurat	Glycerol-dilaurat	Glycerol-trilaurat
	[mol _L /mol]	[mol _{ML} /mol]	[mol _{DL} /mol]	[mol _{TL} /mol]
Rank	5	4	4	4
R^2	0,9832	0,8522	0,9290	0,9864
RMSECV	0,0434	0,0287	0,0533	0,0351
RMSEP	0,0428	0,0243	0,0586	0,0381
Kalibrationsdatensatz			101	
Validierungsdatensatz			18	

In Abbildung 6.5 sind die Kalibriergeraden aller Komponenten dargestellt in einem Vorhersage/Wahrheits-Diagramm. Hier werden auf der Y-Achse die aus dem Modell

bestimmten Werte gegen die Referenzwerte auf der X-Achse aufgetragen. Die „*Identity Line*“ stellt dabei die ideale Kalibriergerade mit $R^2 = 1$ dar. Die „*Recovery Function*“ stellt die reale Kalibriergerade dar. Im unteren Teil jeder Einzelabbildung ist zusätzlich die Differenz auf der Y-Achse gegen den Referenzwert auf der X-Achse aufgetragen, somit wird die Differenz des Vorhersagewerts gegenüber dem Referenzwert klar. Die beiden Komponenten Laurinsäure (A) und Glycerotrilaurat (D) werden in einem Stoffmengenbereich von 0-1 mol/mol kalibriert, wohingegen Glycerolmonolaurat (B) im Bereich 0-0,25 mol/mol und Glyceroldilaurat im Bereich von 0-0,75 mol/mol kalibriert werden. Der Grund hierfür ist, dass diese beiden Komponenten auch nur in diesen beiden gewählten Stoffmengenbereichen im realen Reaktionssystem vorliegen. Der Partial Least Squares-Algorithmus (PLS) ist in diesem Fall streng genommen nur in einem Temperaturbereich von 60-80 °C und in den unten gelisteten Stoffmengenbereichen der einzelnen Komponenten gültig. Werte außerhalb dieser Bereiche werden durch den Partial Least Squares-Algorithmus (PLS) nur mit einem sehr hohen Fehler vorhergesagt und sind strenggenommen auch nicht durch den PLS-Algorithmus zu bestimmen.

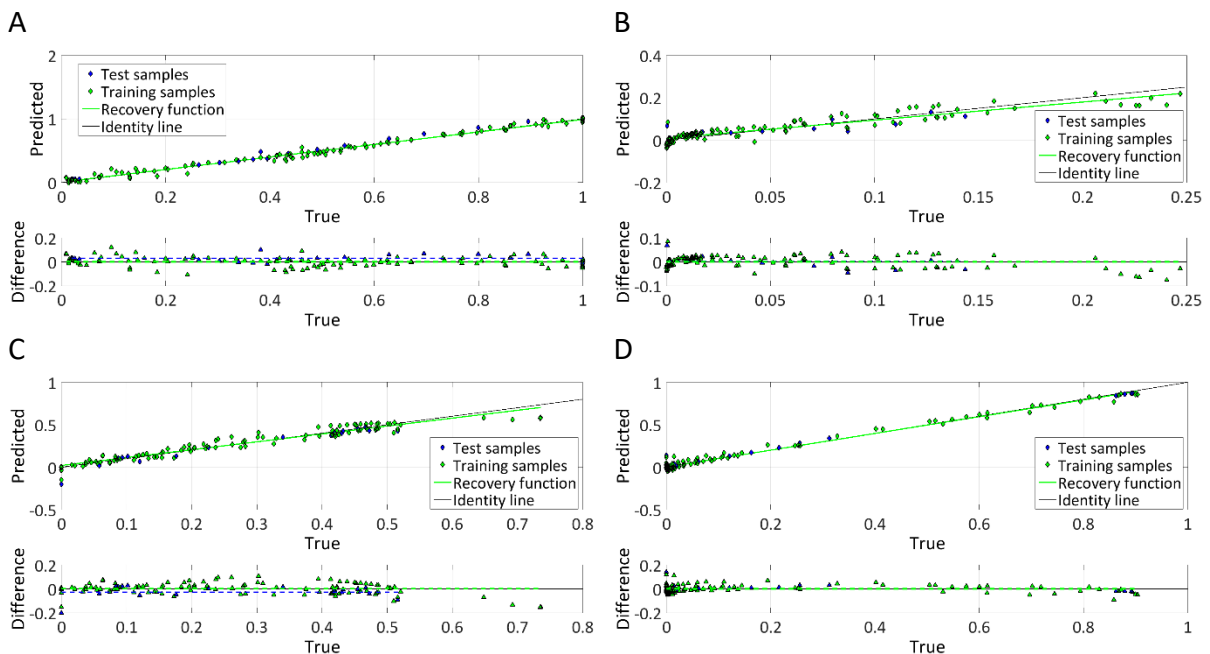


Abbildung 6.5: Kalibriergeraden, A: Laurinsäure, B: Glycerolmonolaurat, C: Glyceroldilaurat, D: Glycerotrilaurat. *Predicted:* Vorhergesagter Wert des Modells, *True:* Referenzwert; *Test samples:* Proben aus dem Testset; *Training samples:* Kalibrierproben; *Recovery function:* reale Kalibriergerade; *Identity line:* ideale Kalibriergerade; *Difference:* Abweichung vom Vorhersagewert zum Referenzwert.

Validierung des chemometrischen Modells

Der letzte Schritt der Modellerstellung ist die externe Validierung des Modells auf einen unbekanntem spektralen Datensatz. In diesem Fall wurde das erstellte chemometrische Modell extern auf einen FTIR-Datensatz einer Veresterung von Glycerol und Laurinsäure bei 70 °C mit einem Substratverhältnis von 3:1 angewendet, der nicht Teil der chemometrischen Modellierung war. Somit besteht die Möglichkeit einen kontinuierlichen Prozessverlauf der Stoffmengenanteile der Reaktion aufzuzeichnen (siehe Abbildung 6.6). Alle Komponenten

werden mit den oben genannten Fehlern sehr gut vom Modell wiedergegeben. Zu Beginn der Reaktion werden durch das Modell negative Stoffmengenanteile bestimmt. Diese Abweichungen sind ebenfalls in Abbildung 6.5 B, C und D sichtbar und können durch eine leichte Abnahme der Reproduzierbarkeit der FTIR-Signale für ML, DL und TL bei niedrigen Konzentrationsbereichen von ML, DL und TL begründet sein. Dies könnte z. B. durch eine leichte Veränderung des Hintergrund-Signals begründet sein, was durch verscheide Gerätefaktoren hervorgerufen werden kann. Auch in den Bereichen, wo keine Offline-Proben entnommen worden sind (in der Zeit von 8 bis 22 h), ist nun die Prozessverfolgung durch die Online-FTIR-Spektroskopie möglich.

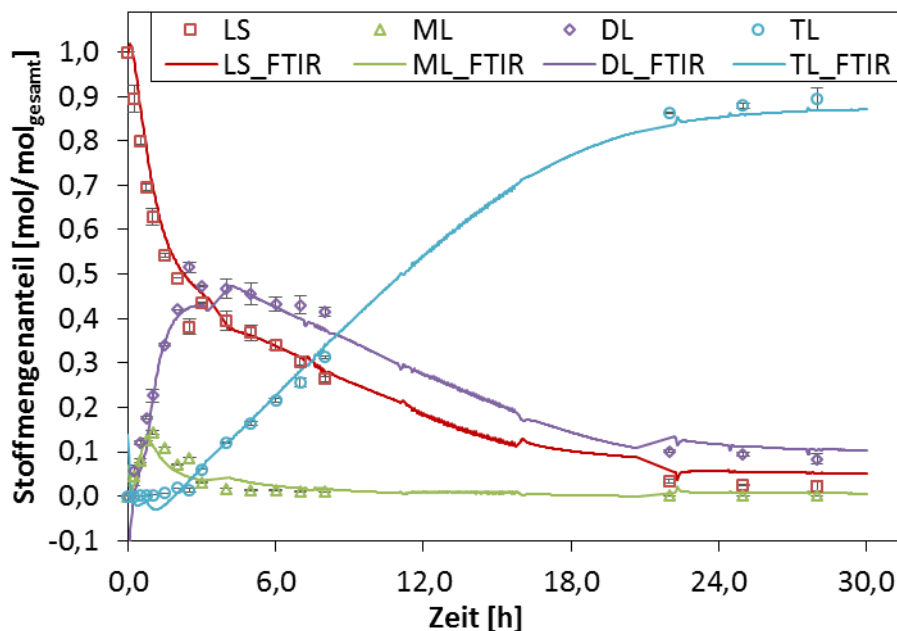


Abbildung 6.6: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie vermessen (kontinuierlicher Verlauf). *LS*: Laurinsäure; *ML*: Glycerolmonolaurat; *DL*: Glyceroldilaurat; *TL*: Glyceroltrilaurat. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 1:3, Gesamtansatzgröße: 94 g, 2 Gew.-% Novozym 435®, T = 70 °C, Luftbegasung mit 0,75 L/min, Blasensäulenreaktor.

6.2.2 Veresterung von Glycerol im Überschuss und Laurinsäure^h

Die Veresterung von Laurinsäure und Glycerol als Überschusskomponente stellt ebenfalls ein Mehrphasenreaktionssystem dar, in der das polare Glycerol die kontinuierliche Phase bildet (siehe Kapitel 4 Abbildung 4.8). Die Laurinsäure und die gebildeten Glycerolester liegen zunächst als Tröpfchen dispergiert in der kontinuierlichen Glycerolphase vor. Die Schwierigkeit bei diesem Reaktionssystem eine Online-Messtechnik mittels FTIR-

^h Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Helge Berger erzeugt: FTIR basierte Online-Prozesssteuerung einer Biotransformation in mehrphasigen Reaktionssystemen, *Masterarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2014

Spektroskopie zu etablieren liegen auf der Hand. Die Phasenzusammensetzung hat ein erhebliches Ausmaß auf die Messgenauigkeit der FTIR-Spektroskopie. Je nach Startkonzentration beider Substrate verändert sich das Phasenverhalten und hat daher auch Auswirkungen auf das Messsignal des FTIR-Spektrometers. Je höher der Glycerolanteil zu Beginn der Reaktion ist, umso schwieriger bis unmöglich ist die spektroskopische Messung der Bildung der Glycerolester zu detektieren. Daher wurden hier nur Reaktionen mit einem Glycerol/Laurinsäure-Verhältnis von 2:1 und 1:1 betrachtet.

Plausibilitätstest und Datenvorbehandlung

Der globale Bereich der Spektren wurde zunächst auf den Wellenzahlenbereich von 1850-800 cm^{-1} eingegrenzt, da hier die aussagekräftigen Informationen dieses Reaktionssystems liegen. Zudem wurden die Spektren im Bereich 1580-1510 cm^{-1} geschnitten, um das „Wasserdampfrauschen“ (es handelt sich um Rotations-Schwingungsbanden) zu eliminieren. Um Hintergrund oder Signalverschiebungen, welche bei dieser Veresterung zu nicht über den gesamten auszuwertenden Spektralbereich gleichmäßigen Intensitätsänderungen geführt hat, auszugleichen wurde als Basislinienkorrektur hier die Methode „*Rubber Band Subtraction*“ angewendet. Diese Methode fittet an die Enden des Spektrums und an die Minima aller Absorptionspeaks eine „Gummiband“-ähnliche Funktion, die vom Ursprungsspektrum subtrahiert wird, um die Basislinie zu korrigieren. Zusätzlich wurden die Spektren durch den Savitzky-Golay-Filter zur Minimierung des Rauschens geglättet.

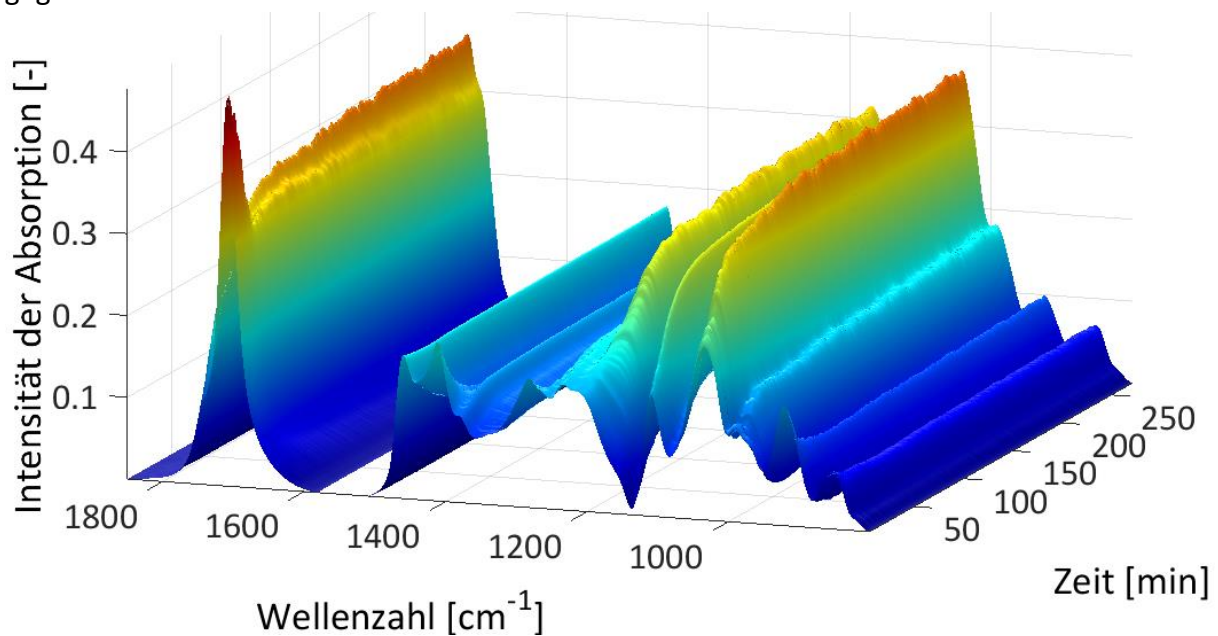


Abbildung 6.7: Zeitliche Auflösung der FTIR-Spektren einer Veresterung von Laurinsäure und Glycerol als Überschusskomponente. Die dargestellten Spektren sind die bearbeiteten Daten. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 2:1, Gesamtansatzgröße: 144,65 g, 2 Gew.-% Novozym, 435®, T = 65 °C, Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

In der Abbildung 6.7 ist der zeitlichen Verlauf der Reaktion dargestellt und in Abbildung 6.8 ist der 2D-Plot dargestellt. In beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass zu Beginn der Reaktion

die Absorptionsbande der Laurinsäure (R-COOH) bei 1700 cm^{-1} abnimmt und die Absorptionsbande der Glycerolester (R₁-COO-R₂) bei 1735 cm^{-1} zunimmt. Zusätzlich nehmen im Fingerprint-Bereich die charakteristischen Absorptionsbanden der CO-Einfachbindungen zu. Bei einer genauen Betrachtung der Abbildung 6.8 ist die Überlagerung der charakteristischen Absorptionsbande des Glycerolmonolaurats und des Glycerols bei $1075\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen, wodurch die eindeutige Differenzierung zu Glyceroldi- und trilaurat erheblich erschwert wird. Es ist nun nicht mehr möglich das Glycerol eindeutig von den Glycerolestern zu differenzieren.

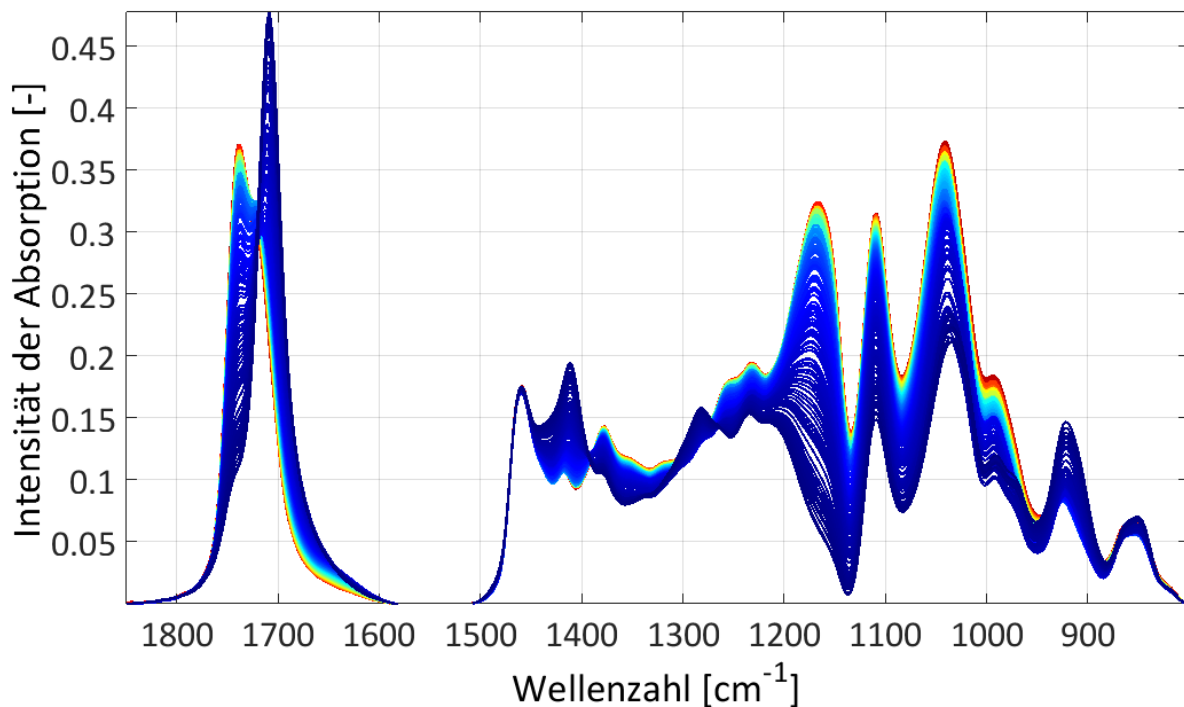


Abbildung 6.8: 2D Darstellung der Veresterung von Glycerol als Überschusskomponente und Laurinsäure. Farbskala kennzeichnet den zeitlichen Verlauf. Die dargestellten Spektren sind die bearbeiteten Daten. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 2:1, Gesamtansatzgröße: 144,65 g, 2 Gew.-% Novozym, 435®, T = 65 °C, Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

Kalibrierung des chemometrischen Modells

In Tabelle 6.6 sind die Modellparameter des chemometrischen Modells aufgelistet. Zur Kalibrierung des Modells wurden 18 FTIR-Spektren und deren Offline-Daten verwendet. Der Datensatz beinhaltet dabei Veresterungsreaktionen die bei 60 °C mit einem Glycerol/Laurinsäure-Verhältnis von 2:1 und 1:1 durchgeführt worden sind. Zur Kalibrierung wurde eine Testset-Validierung durchgeführt, wobei der Datensatz der zu analysierenden Reaktion (Veresterung Glycerol und Laurinsäure bei 60 °C mit einem Glycerol/Laurinsäure-Verhältnis von 2:1 und einer anderen Biokatalysatorbeladung; siehe Validierung des Modells Abbildung 6.10) als Testset mit 7 Spektren gewählt wurde. In diesem Modell ist der Datensatz der Kalibrierung so klein, da die spektroskopische Messung ab einem Glycerin/Laurinsäure-

Verhältnis größer 2:1 nicht mehr reproduzierbar durchführbar war und nicht verwendet werden konnte. Das Phasenverhalten des Systems und die Benetzung an der Oberfläche des ATR-Kristalls waren die Hauptursachen. Das chemometrische Modell kann mit einem Rang kleiner gleich 4 die Stoffmengenanteile aller unpolaren Komponenten des Systems (Laurinsäure und die Glycerolester) mit einem Fehler kleiner gleich 7,1 Mol.-% aus dem unbekanntem spektralen Datensatz bestimmen. Dabei sind die Regressionskoeffizienten R^2 der Kalibriergeraden dieser Komponenten (siehe Abbildung 6.9) größer 70 %. Hier ist ein kausaler Zusammenhang aus den Spektren erkennbar. Die polare Komponente Glycerol kann mit diesem chemometrischen Modell nur sehr schlecht bestimmt werden mit einem Fehler von 16,5 Mol.-% und einem Regressionskoeffizienten R^2 von 15,5 % (siehe Abbildung 6.9 A). Hier besteht kein kausaler Zusammenhang zwischen den spektralen Informationen und dem Stoffmengenanteil von Glycerol am Gesamtsystem.

Tabelle 6.6: Modellparameter des chemometrischen Modells. *Rank*: Dimension des Rechenraumes; R^2 : Regressionskoeffizient; *RMSECV*: Fehler der Modellvalidierung (engl.: Root mean square error of cross-validation); *RMSEP*: Fehler der Modellvorhersage (engl.: Root mean square error of prediction).

Eigenschaft	Glycerol	Laurinsäure	Glycerol- monolaurat	Glycerol- dilaurat	Glycerol- trilaurat
	[mol _{Gly} /mol]	[mol _{LS} /mol]	[mol _{ML} /mol]	[mol _{DL} /mol]	[mol _{TL} /mol]
Rank	1	1	2	1	4
R^2	0,1557	0,7082	0,6698	0,6152	0,8393
RMSECV	0,1681	0,1078	0,0912	0,0574	0,0035
RMSEP	0,1654	0,0710	0,0586	0,0423	0,0034
Kalibrations- datensatz			18		
Validierungs- datensatz			7		

Wie bereits im Plausibilitätstest dieses Reaktionssystems beschrieben, kommt es im „Finger-Print“-Bereich bei 1075-1000 cm^{-1} zur Überlagerung der charakteristischen Absorptionsbande des Glycerolmonolaurats und des Glycerols, wodurch die eindeutige Differenzierung von Glyceroldi- und trilaurat erheblich erschwert wird und damit die eindeutige Bestimmung des Glycerols. Dies zeigt sich auch in der Kalibriergeraden des Glycerols (siehe Abbildung 6.9 A) und in der Validierung des chemometrischen Modells. In Abbildung 6.9 sind die Kalibriergeraden aller Komponenten in einem Vorhersage/Wahrheits-Diagramm dargestellt. Die polare Komponente Glycerol (A) wird in einem Bereich 0,2-0,8 mol/mol kalibriert. Die unpolaren Komponenten werden jeweils im Bereich 0-0,5 mol/mol für Laurinsäure (B), 0-0,45 mol/mol für Glycerolmonolaurat (C), 0-0,25 mol/mol für Glyceroldilaurat (D) und

0-0,025 mol/mol für Glyceroltrilaurat (E) kalibriert. Einige Faktoren führen dazu, dass dieses chemometrische Modell keine reproduzierbaren Werte wiedergibt und nicht für eine Prozessüberwachung geeignet ist. Zunächst weist dieses chemometrische Modell einen zu kleinen Datensatz zur Kalibrierung auf. Außerdem ist das Phasenverhalten bedingt durch den Überschuss an Glycerol eine Herausforderung für die *in situ* Messung mittels FTIR-ATR Sonde. Über einen größeren Datensatz können gegebenenfalls durch das Phasenverhalten bedingte Schwankungen bei der spektroskopischen Messung mittels ATR-Sonde kompensiert werden.

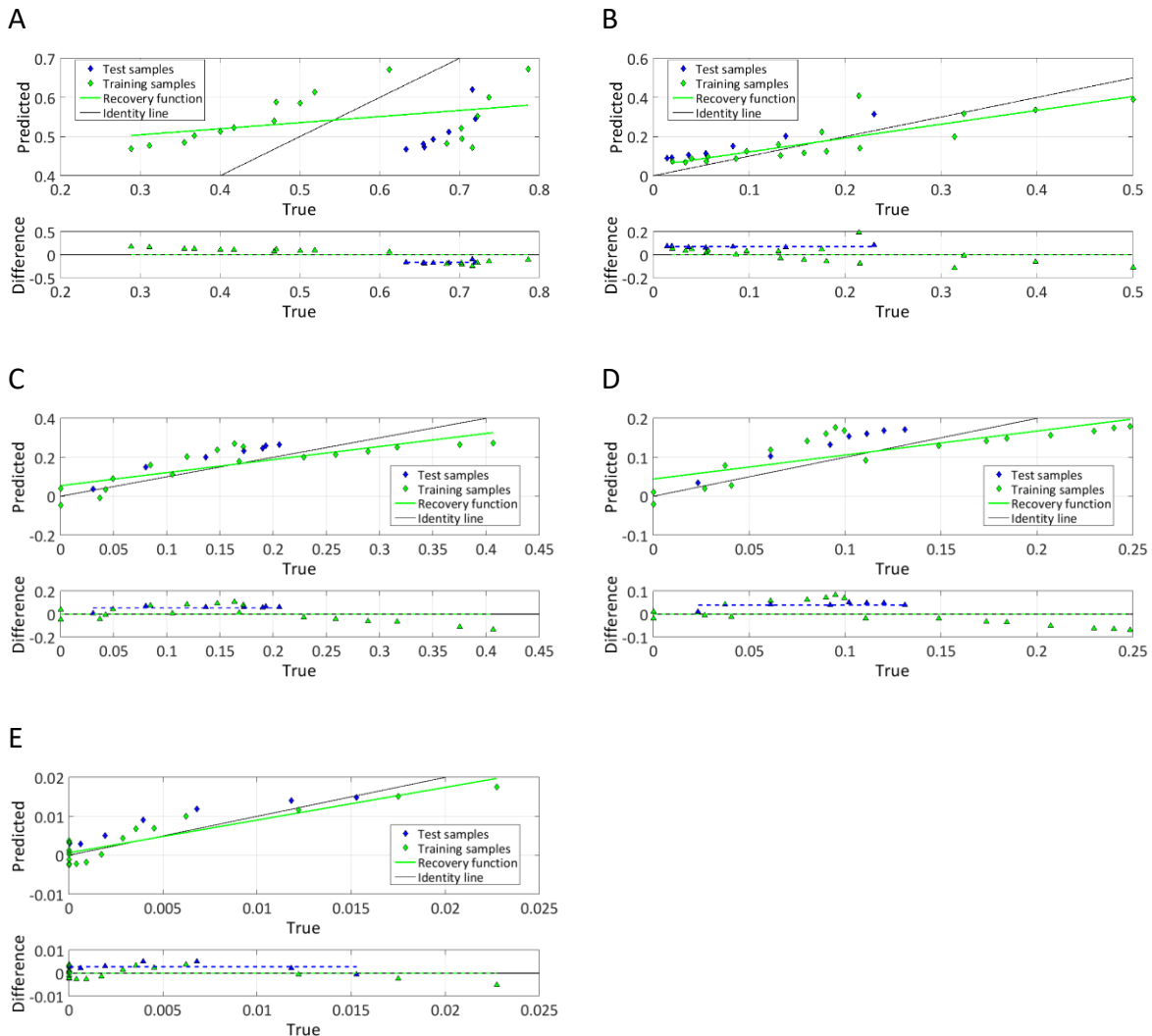


Abbildung 6.9: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Laurinsäure, C: Glycerolmonolaurat, D: Glyceroldilaurat, E: Glyceroltrilaurat. *Predicted*: Vorhergesagter Wert des Modells, *True*: Referenzwert; *Test samples*: Proben aus dem Testset; *Trainings samples*: Kalibrierproben; *Recovery function*: reale Kalibriergerade; *Identity line*: ideale Kalibriergerade; *Difference*: Abweichung vom Vorhergesagewert zum Referenzwert.

Validierung des chemometrischen Modells

Das erstellte chemometrische Modell wurde extern auf einen FTIR-Datensatz einer Veresterung von Glycerol und Laurinsäure bei 60 °C mit einem Substratverhältnis von 2:1 und einer Biokatalysatorbeladung von 2 Gew.-% angewendet. Wie bereits erwähnt, besteht mit diesem chemometrischen Modell keine Möglichkeit einer kontinuierlichen Überwachung des

Prozessverlaufs der Stoffmengenanteile der Reaktion (siehe Abbildung 6.10). Die Trends aller Komponenten werden zwar wiedergegeben, jedoch mit einer zu großen Abweichung. Auffällig ist hierbei, dass die polare Komponente Glycerol über den gesamten Reaktionsverlauf zu niedrig und die unpolaren Komponenten (Laurinsäure und Glycerolester) zu hoch durch das chemometrische Modell bestimmt werden. Dieses Modell erkennt die Trends der Komponenten, aber nicht die genauen Stoffmengenanteile. Durch die Erhöhung des Kalibrierdatensatzes könnte eine Verbesserung des Modells erreicht werden, womit eventuell mit einem niedrigeren Fehler die Stoffmengenanteile bestimmt werden können.

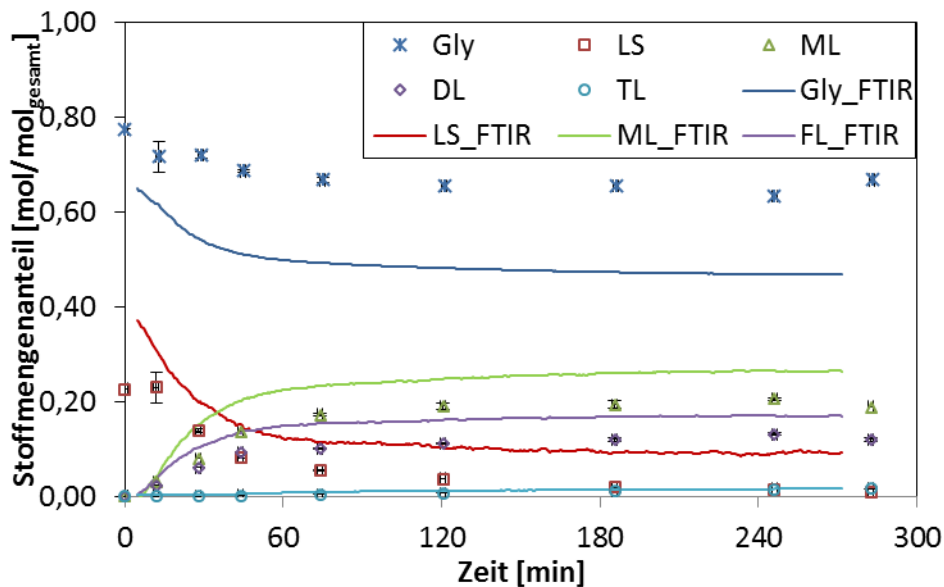


Abbildung 6.10: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf, gemessen mittels FTIR-Spektroskopie (kontinuierlicher Verlauf). *Gly*: Glycerol; *LS*: Laurinsäure; *ML*: Glycerolmonolaurat; *DL*: Glyceroldilaurat; *TL*: Glyceroltrilaurat. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 2:1, Gesamtansatzgröße: 144,65 g, 2 Gew.-% Novozym, 435[®], T = 65 °C, Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

6.2.3 Veresterung von Glycerol und Laurinsäure als Fed-Batch Reaktion mit Laurinsäurezufuhrⁱ

In diesem Unterkapitel wird das Reaktionssystem in Fed-Batch-Verfahrensweise mittels FTIR-Spektroskopie ausgewertet. Dabei wurde die Laurinsäure kontinuierlich mit einer Zulauftrate von 0,25 mL/min dem Reaktor zugeführt. Das polare Glycerol liegt zunächst einphasig im Blasensäulenreaktor vor, in der der Biokatalysator als Feststoff suspendiert ist. Die ATR-Sonde misst somit zu Beginn nur das Glycerol. Sobald die Laurinsäure in den Reaktor gefördert wird, beginnt die Umsetzung zu den Glycerolestern (hier in erster Linie zu Glycerolmono- und dilaurat) und das Phasenverhalten ändert sich. Es liegt dann ein Mehrphasensystem vor, in

ⁱ Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Helge Berger erzeugt: FTIR basierte Online-Prozesssteuerung einer Biotransformation in mehrphasigen Reaktionssystemen, *Masterarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2014

der die akkumulierte und nicht umgesetzte Laurinsäure und die Glycerolester, vorrangig Glycerolmonolaurat, die unpolare disperse Phase bilden. Dadurch, dass bei einer Fed-Batch Verfahrensweise jedoch über den Reaktionsverlauf nur sehr wenig Laurinsäure akkumuliert wird, existiert das System hauptsächlich aus Glycerol und den Partialglyceriden Glycerolmono- und dilaurat. In diesem ternären System (vergleiche Kapitel 4.3.2 Abbildung 4.13) existieren zwei koexistierende Phasen, eine polare Glycerolphase und eine Mischphase aus den Partialglyceriden und Glycerol, in der verglichen zu ternären Systemen mit Laurinsäure viel Glycerol gelöst sein kann. Die FTIR-Messung mittels ATR-Sonde ist durch dieses Phasenverhalten positiv begünstigt (siehe Abbildung 6.11 und Abbildung 6.12). Die spektroskopische Messung aller Komponenten ist reproduzierbar möglich und somit ist eine Differenzierung von Glycerol und den Glycerolestern gewährleistet.

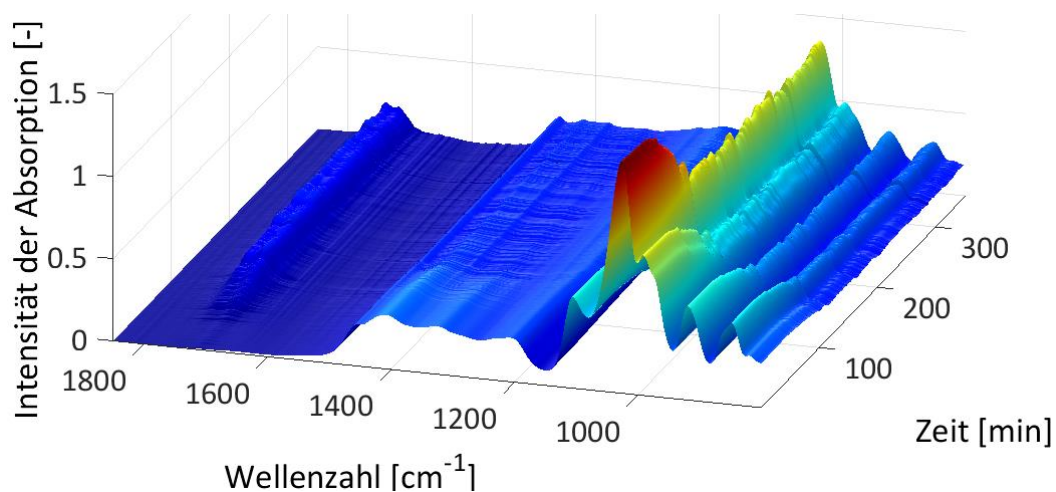


Abbildung 6.11: Zeitliche Auflösung der FTIR-Spektren einer Veresterung von Laurinsäure und Glycerol als Fed-Batch Reaktion mit Laurinsäurezulauf von 0,25 mL/min. Die dargestellten Spektren sind die bearbeiteten Daten. **Reaktionsbedingungen:** Zulauftrate LS: 0,25 mL/min (LS gesamt zugeführt: 387,9 mmol); T=65°C; 6 Gew.-% Enzym bezogen auf das Anfangsgewicht im Reaktor $m_{0,Glycerol} = 75,3g$ ($n_{0,Glycerol} = 817,4$ mmol); Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

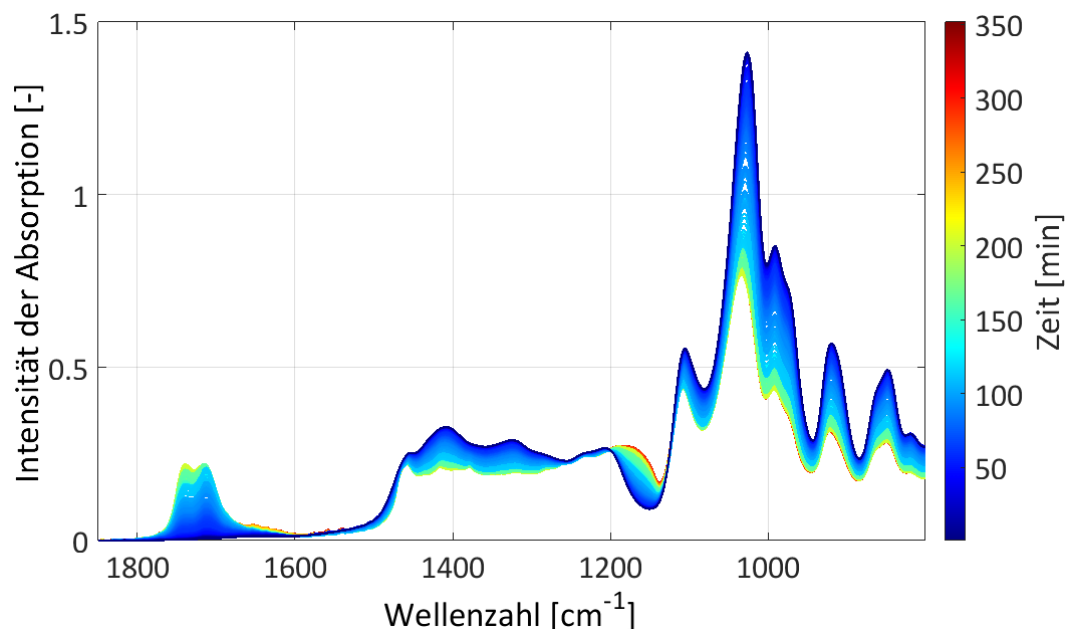


Abbildung 6.12: 2D Darstellung der Veresterung von Glycerol und Laurinsäure als Fed-Batch Verfahrensweise mit Laurinsäurezufuhr. Farbskala kennzeichnet den zeitlichen Verlauf. Die dargestellten Spektren sind die bearbeiteten Daten.

Plausibilitätstest und Datenvorbehandlung

Für dieses Reaktionssystem wurden die gleichen Schritte der Datenvorbehandlung verwendet wie im vorigen Unterkapitel (siehe Kapitel 6.2.2). In der Abbildung 6.12 ist zu erkennen, dass zu Beginn der Reaktion die Absorptionsbande der Laurinsäure (R-COOH) bei 1700 cm^{-1} abnimmt und die Absorptionsbande der Glycerolester (R₁-COO-R₂) bei 1735 cm^{-1} zunimmt. Zusätzlich nehmen im Fingerprint-Bereich die charakteristischen Absorptionsbanden der CO-Einfachbindungen zu. Eindeutig zu erkennen ist die Verschiebung der charakteristischen Absorptionsbanden der Glycerolester im Wellenzahlenbereich $1200\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$.

Kalibrierung des chemometrischen Modells

In Tabelle 6.7 sind die Modellparameter des chemometrischen Modells aufgelistet. Zur Kalibrierung des Modells wurden 40 FTIR-Spektren und deren Offline-Daten verwendet. Der Datensatz beinhaltet dabei Veresterungsreaktionen mit der Fed-Batch Verfahrensweise mit unterschiedlichen Zufuhrraten an Laurinsäure von 100, 250 und 500 mL/min und unterschiedlichen Biokatalysatorbeladungen. Zur Kalibrierung wurde eine Testset-Validierung durchgeführt, wobei der Datensatz der zu analysierenden Reaktion (Veresterung Glycerol und Laurinsäure als Fed-Batch Verfahrensweise mit einer Zufuhr rate an Laurinsäure von 250 mL/min und einer anderen Biokatalysatorbeladung; siehe Validierung des Modells Abbildung 4.27) als Testset mit 13 Spektren gewählt wurde. Das chemometrische Modell kann mit einem Rank kleiner gleich 4 die Stoffmengenanteile aller Komponenten des Systems mit einem Fehler kleiner gleich 2,0 Mol.-% aus dem unbekanntem spektralen Datensatz bestimmen. Dabei sind die Regressionskoeffizienten R^2 der Kalibriergeraden dieser Komponenten (siehe Abbildung 1.5) größer 65,5 %.

Tabelle 6.7: Modellparameter des chemometrischen Modells. *Rank*: Dimension des Rechenraumes; R^2 : Regressionskoeffizient; *RMSECV*: Fehler der Modellvalidierung (engl.: *Root mean square error of cross-validation*); *RMSEP*: Fehler der Modellvorhersage (engl.: *Root mean square error of prediction*).

Eigenschaft	Glycerol	Laurinsäure	Glycerol-monolaurat	Glycerol-dilaurat	Glycerol-trilaurat
	[mol _{Gly} /mol]	[mol _{LS} /mol]	[mol _{ML} /mol]	[mol _{DL} /mol]	[mol _{TL} /mol]
Rank	3	3	4	3	3
R^2	0,8935	0,6556	0,8795	0,8523	0,8136
RMSECV	0,0389	0,0120	0,0216	0,0201	0,0018
RMSEP	0,0151	0,0083	0,0096	0,0117	0,0010

Kalibrationsdatensatz	40
Validierungsdatensatz	13

In Abbildung 6.13 sind die Kalibriergeraden aller Komponenten dargestellt in einem Vorhersage/Wahrheits-Diagramm. Die polare Komponente Glycerol (A) wurde in einem Bereich 0,6-1,0 mol/mol kalibriert. Die unpolaren Komponenten wurden jeweils im Bereich 0-0,07 mol/mol für Laurinsäure (B), 0-0,2 mol/mol für Glycerolmonolaurat (C) und Glyceroldilaurat (D) und 0-0,014 mol/mol für Glycerotrilaurat (E) kalibriert. Das bereits beschriebene Phasenverhalten, begründet durch die Zusammensetzung mit wenig Laurinsäure im System, wirkt sich vorteilhaft auf die FTIR-Spektroskopie mittels ATR-Sonde aus. Als Vergleich zum vorigen Unterkapitel 6.2.2 wurde hier der Datensatz der Kalibrierung erhöht, was zu einem robusteren Modell führt, welches Schwankungen bei der Messung besser kompensieren kann.

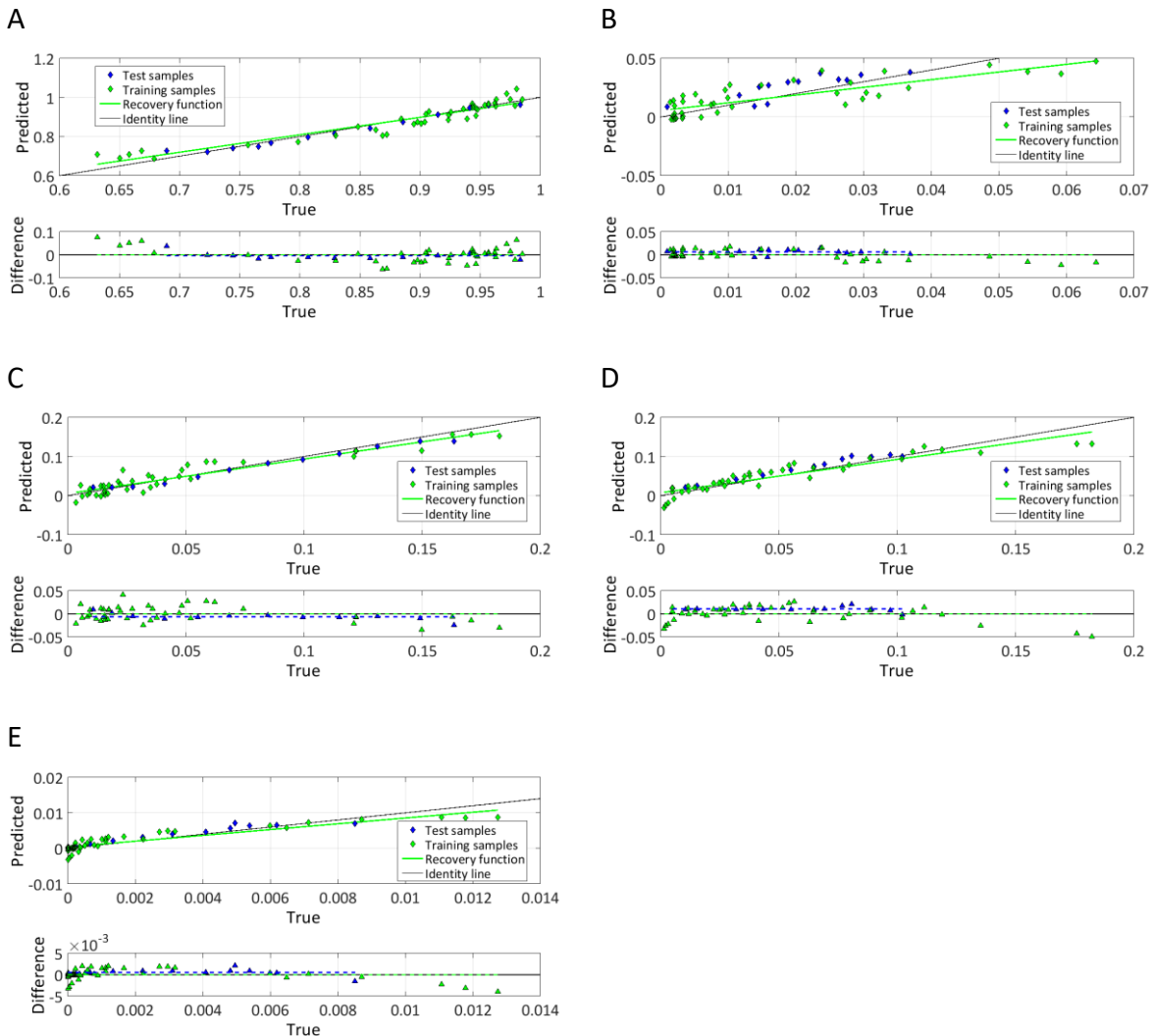


Abbildung 6.13: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Laurinsäure, C: Glycerolmonolaurat, D: Glyceroldilaurat, E: Glyceroltrilaurat. *Predicted*: Vorhergesagter Wert des Modells, *True*: Referenzwert; *Test samples*: Proben aus dem Testset; *Trainings samples*: Kalibrierproben; *Recovery function*: reale Kalibriergerade; *Identity line*: ideale Kalibriergerade; *Difference*: Abweichung vom Vorhersagewert zum Referenzwert.

Validierung des chemometrischen Modells

Die externe Validierung des Modells wurde auf einen unbekanntem spektralen Datensatz angewendet. In diesem Fall wurde das erstellte chemometrische Modell extern auf einen FTIR-Datensatz einer Veresterung von Glycerol und Laurinsäure bei 65 °C mit einer Zufuhr rate an Laurinsäure von 250 mL/min und einer Biokatalysatorbeladung von 6 Gew.-% Enzym angewendet. Somit besteht die Möglichkeit einen kontinuierlichen Prozessverlauf der Stoffmengenanteile der Reaktion aufzuzeichnen (Abbildung 4.27). Alle Komponenten werden mit den oben genannten Fehlern sehr gut vom Modell wiedergegeben. Auch in den Bereichen, in denen keine Offline-Proben entnommen worden sind, ist nun die Prozessverfolgung durch die Online-FTIR-Spektroskopie möglich.

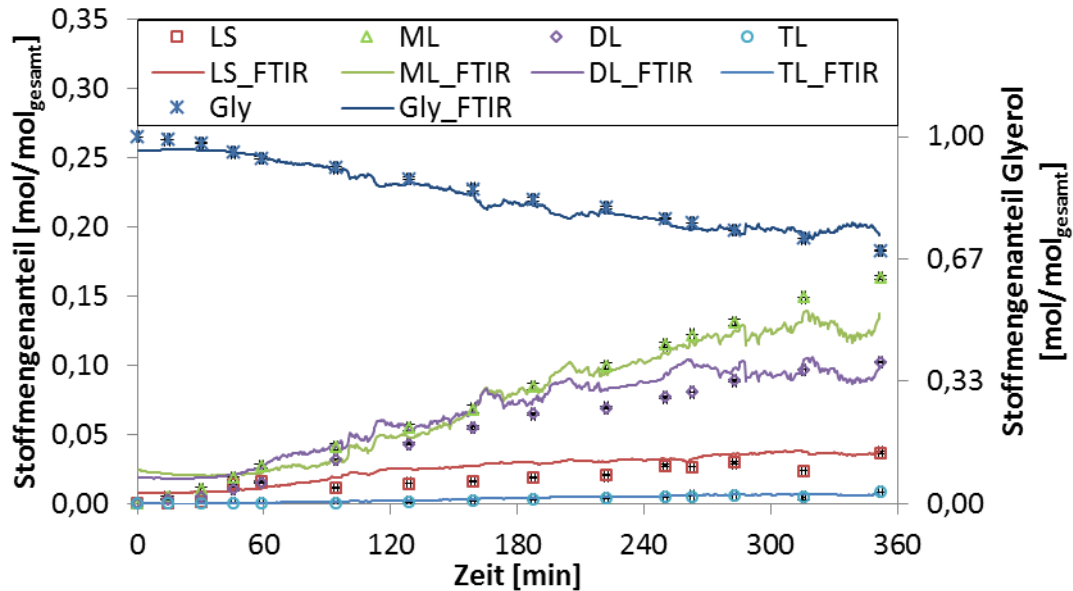


Abbildung 6.14: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie vermessen (kontinuierlicher Verlauf) einer Fed-Batch Reaktion mit Laurinsäurezulauf von 0,25 mL/min. *Gly*: Glycerol; *LS*: Laurinsäure; *ML*: Glycerolmonolaurat; *DL*: Glyceroldilaurat; *TL*: Glyceroltrilaurat. **Reaktionsbedingungen:** Zulaufrate LS: 0,25 mL/min (LS gesamt zugeführt: 387,9 mmol); T = 65 °C; 6 Gew.-% Enzym bezogen auf das Anfangsgewicht im Reaktor $m_{0,Glycerol} = 75,3$ g ($n_{0,Glycerol} = 817,4$ mmol); Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

6.2.4 Glycerolyse von Glyceroltrilaurat^j

Das vierte Reaktionssystem, welches in diesem Unterkapitel mittels FTIR-Spektroskopie untersucht und mittels Chemometrie ausgewertet wurde, ist die Glycerolyse von Glyceroltrilaurat. Hierbei handelt es sich um eine Umesterung, deren charakteristische Reaktionsparameter bereits in Kapitel 4.5.2 beschrieben sind. Die Reaktionen sind Mehrphasensysteme, die mit einem Überschuss an Glycerol betrieben wurden. Das Glyceroltrilaurat wurde eigenständig im Labor mit einer Reinheit von 84 Mol.-% (siehe Kapitel 4 Tabelle 4.6) synthetisiert. Zu Beginn der Reaktion sind demnach bereits Glycerolpartialglyceride in der Reaktionsmischung vorhanden (größtenteils Glyceroldilaurat). Voruntersuchungen haben bereits ergeben, dass die Messung in der Mischphase mittels ATR-Sonde keine plausiblen reproduzierbaren Messwerte liefert (siehe Abbildung 6.15).

^j Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Elena Eßer erzeugt: Etablierung einer in situ Analytik für die enzymatische Glycerolyse von Trilaurin mittels FT-IR-Spektroskopie, Masterarbeit, TU-Hamburg-Harburg, 2015



Abbildung 6.15: Anlagerung von Glycerintröpfchen in der Lipidphase.

In der Abbildung 6.15 ist die Anlagerung von Glycerol an der ATR-Sonde in der unpolaren Lipidphase zu sehen (Vorversuche zur Machbarkeit der FTIR-Messung mittels ATR-Sonde in der Mischphase). Eine Phasentrennung nach der Probeentnahme war notwendig um reproduzierbare offline (GC) und online (FTIR-Spektroskopie) Messwerte zu erhalten, welche die Basis eines chemometrischen Modells darstellen. Das chemometrische Modell wurde nur in der Lipidphase des Reaktionssystems, welche nach Phasentrennung erhalten wurde, kalibriert. Eine kontinuierliche Prozessüberwachung in der Reaktionsmischung ist somit nicht gegeben. Jedoch ist eine semi-kontinuierliche Prozessüberwachung möglich. Eine Probe aus der Reaktionsmischung nach Phasentrennung kann schnell und reproduzierbar mittels FTIR-Spektroskopie analysiert werden.

Plausibilitätstest und Datenvorbehandlung

Der globale Bereich der Spektren wurden ebenfalls im Wellenzahlenbereich von $1850-800\text{ cm}^{-1}$ eingegrenzt, da hier die aussagekräftigen Informationen dieses Reaktionssystems liegen. Zudem wurden die Spektren im Bereich $1580-1510\text{ cm}^{-1}$ geschnitten, um das Wasserdampfrauschen zu eliminieren. Eine Basislinienkorrektur mit der Methode „*Linear Fit Subtraction*“ wurde auf alle Spektren angewendet. Diese Methode fittet eine lineare Funktion in das Spektrum, die vom Ursprungsspektrum subtrahiert wird, um die Basislinie zu korrigieren. Die Spektren wurden mit dem Savitzky-Golay-Filter zur Minimierung des Rauschens geglättet. Im Wellenzahlenbereich $1480-1450\text{ cm}^{-1}$ wurde eine Peak-Normierung angewendet, die alle Spektren auf das Maximum und Minimum aller Spektren in diesem Wellenzahlenbereich normiert.

In der Abbildung 6.16 ist der zeitliche Verlauf der Reaktion dargestellt und in Abbildung 6.17 ist der 2D-Plot dargestellt. In beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass zu Beginn der Reaktion die Absorptionsbande der Glycerolester ($R_1\text{-COO-R}_2$) bei 1735 cm^{-1} abnimmt und die charakteristische Peak-Verschiebung der Glycerolester zu erkennen ist. Diese charakteristische Peak-Verschiebung ist ebenfalls im Fingerprint-Bereich zu sehen. Dort absorbieren die charakteristischen Banden der CO-Einfachbindungen. Bei einer genauen Betrachtung der Abbildung 6.17 ist die Überlagerung der charakteristischen Absorptionsbande des Glycerolmonlaurats und des Glycerols bei $1075\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen.

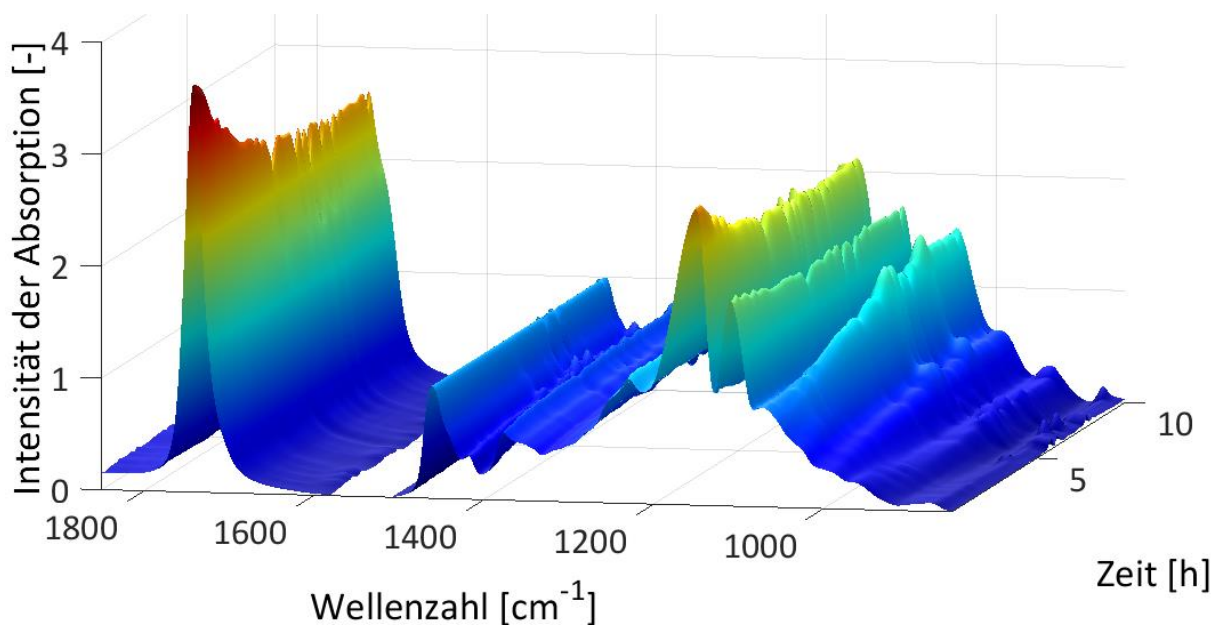


Abbildung 6.16: Zeitliche Auflösung der FTIR-Spektren einer Glycerolyse von Glyceroltrilaurat. Die dargestellten Spektren sind die bearbeiteten Daten. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly/TL=2,5:1; Ansatzgröße: 173,45 g, T = 65 °C; 10 Gew.-% Enzym;; Luftbegasung mit 1 L/min.

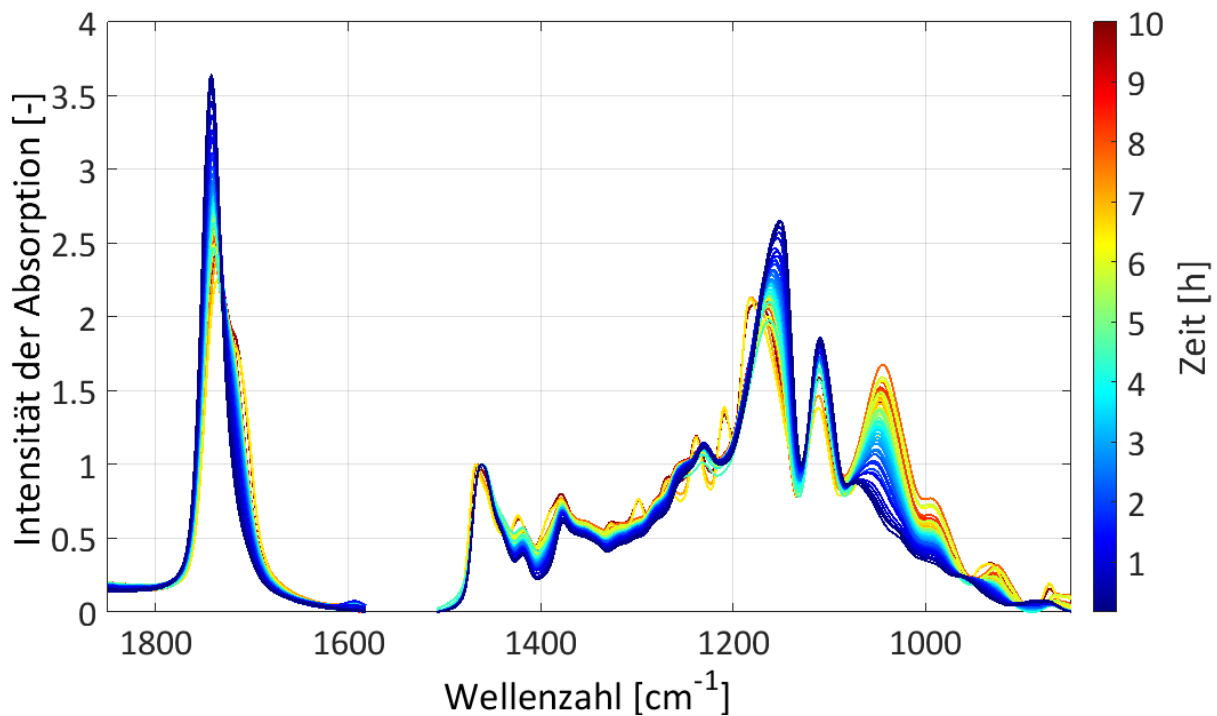


Abbildung 6.17: 2D Darstellung Glycerolyse von Glyceroltrilaurat. Farbskala kennzeichnet den zeitlichen Verlauf. Die dargestellten Spektren sind die bearbeiteten Daten.

Kalibrierung des chemometrischen Modells

In Tabelle 6.8 sind die Modellparameter des chemometrischen Modells aufgelistet. Zur Kalibrierung des Modells wurden 106 FTIR-Spektren und deren Offline-Daten aus der unpolaren Lipidphase verwendet. Der Datensatz beinhaltet dabei Glycerolysereaktionen mit unterschiedlichen molaren Substratverhältnissen. Zur Kalibrierung wurde eine Testset-Validierung durchgeführt, wobei der Datensatz der zu analysierenden Reaktion (Glycerolyse von Glyceroltrilaurat mit dem unbekanntem Glycerol/Glyceroltrilaurat Verhältnis von 2,5:1; siehe Validierung des Modells Abbildung 6.19) als Testset mit 13 Spektren gewählt wurde. Das chemometrische Modell kann mit einem Rank kleiner gleich 5 die Stoffmengenanteile aller Komponenten in der Lipidphase des Systems mit einem Fehler kleiner gleich 2,5 Mol.-% aus dem unbekanntem spektralen Datensatz bestimmen. Dabei sind die Regressionskoeffizienten R^2 der Kalibriergeraden dieser Komponenten (siehe Abbildung 6.18) größer 92,5 %. Wie bereits zu Beginn des Unterkapitels erläutert, hat eine Kalibrierung in der Mischphase des Reaktionssystems nicht funktioniert, da der spektrale Datensatz aufgrund des Phasenverhaltens keine Korrelation zu den Offline-Daten zeigte. In Abbildung 6.18 sind die Kalibriergeraden aller Komponenten dargestellt in einem Vorhersage/Wahrheits-Diagramm. Die polare Komponente Glycerol (A) wurde in einem Bereich von 0,0-0,25 mol/mol kalibriert. Die unpolaren Komponenten wurden jeweils im Bereich 0-0,45 mol/mol für Glycerolmonolaurat (B), 0-0,4 mol/mol für Glyceroldilaurat (C) und 0-0,9 mol/mol für Glycerotrilaurat (D) kalibriert. Die Bereiche stellen den Kalibrierbereich in der unpolaren Phase

des Reaktionssystems dar. Auffällig ist der niedrige Kalibrierbereich für Glycerol. Hier stellt sich das gelöste Glycerol in der unpolaren Lipidphase dar.

Tabelle 6.8: Modellparameter des chemometrischen Modells. *Rank*: Dimension des Rechenraumes; R^2 : Regressionskoeffizient; *RMSECV*: Fehler der Modellvalidierung (engl.: Root mean square error of cross-validation); *RMSEP*: Fehler der Modellvorhersage (engl.: Root mean square error of prediction).

Eigenschaft	Glycerol	Glycerol-monolaurat	Glycerol-dilaurat	Glycerol-trilaurat
	[mol _{LS} /mol]	[mol _{ML} /mol]	[mol _{DL} /mol]	[mol _{TL} /mol]
Rank	5	3	4	3
R ²	0,9850	0,9901	0,9282	0,9955
RMSECV	0,0119	0,0162	0,0220	0,0205
RMSEP	0,0223	0,0085	0,0180	0,0206
Kalibrationsdatensatz			106	
Validierungsdatensatz			13	

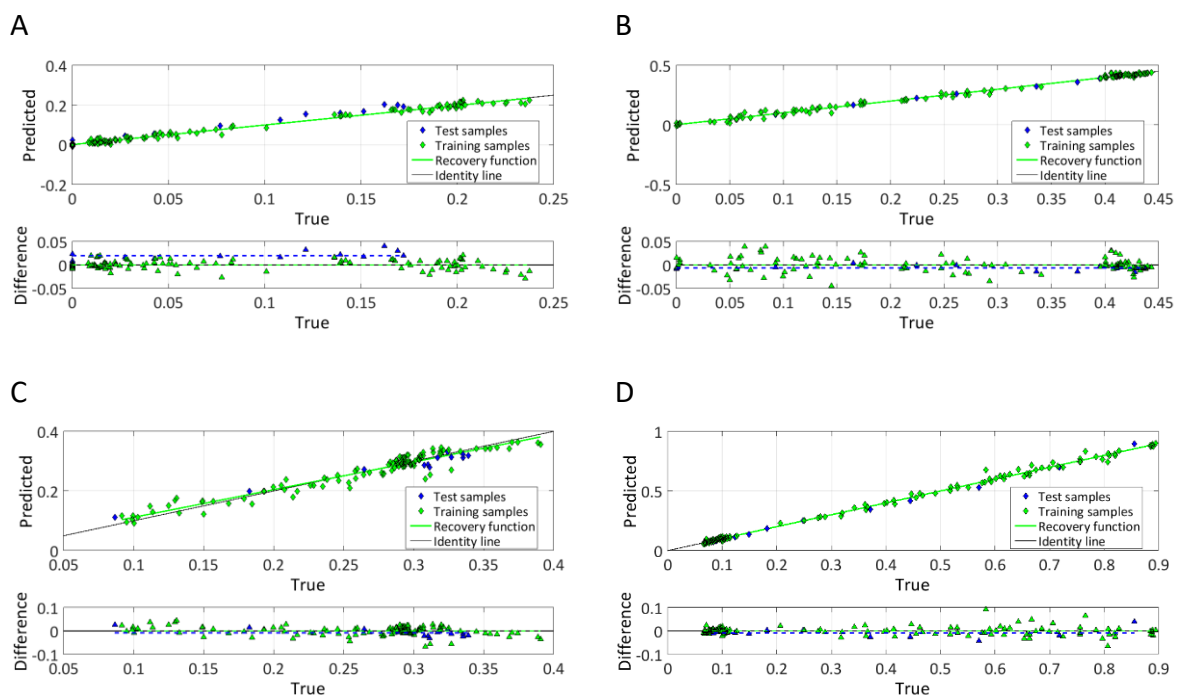


Abbildung 6.18: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Glycerolmonolaurat, C: Glyceroldilaurat, D Glyceroltrilaurat. *Predicted*: Vorhergesagter Wert des Modells, *True*: Referenzwert; *Test samples*: Proben aus dem Testset; *Trainings samples*: Kalibrierproben; *Recovery function*: reale Kalibriergerade; *Identity line*: ideale Kalibriergerade; *Difference*: Abweichung vom Vorhersagewert zum Referenzwert.

Validierung des chemometrischen Modells

Das erstellte chemometrische Modell wurde extern auf einen FTIR-Datensatz einer Glycerolyse von Glyceroltrilaurat bei 65 °C mit einem Substratverhältnis von 2,5:1 und einer Biokatalysatorbeladung von 10 Gew.-% angewendet. Wie bereits erwähnt, besteht mit diesem chemometrischen Modell keine Möglichkeit einer kontinuierlichen Überwachung des Prozessverlaufs der Stoffmengenanteile der Reaktion in der Mischungsphase. Jedoch kann diese Reaktion semi-kontinuierlich in der Lipidphase des Reaktionssystems überwacht werden (siehe Abbildung 6.19). Dafür muss aber eine Phasentrennung vor der FTIR-Messung vollzogen werden. Dies wurde hier manuell stimuliert, indem jede 10 Minuten eine Probe aus dem Reaktionsgefäß zur Messung entnommen wurde. Dieses Problem kann später auch über kontinuierlich arbeitende Phasentrennapparate gelöst werden, jedoch nur im Pilotmaßstab, der hier nicht angewendet wurde, da im kleinen Labormaßstab gearbeitet wurde. Dennoch kann das Reaktionssystem durch die Etablierung des chemometrischen Modells auf Basis der FTIR-Spektroskopie viel schneller analysiert werden als mit der herkömmlichen Offline-Analytik (z. B. Gaschromatographie).

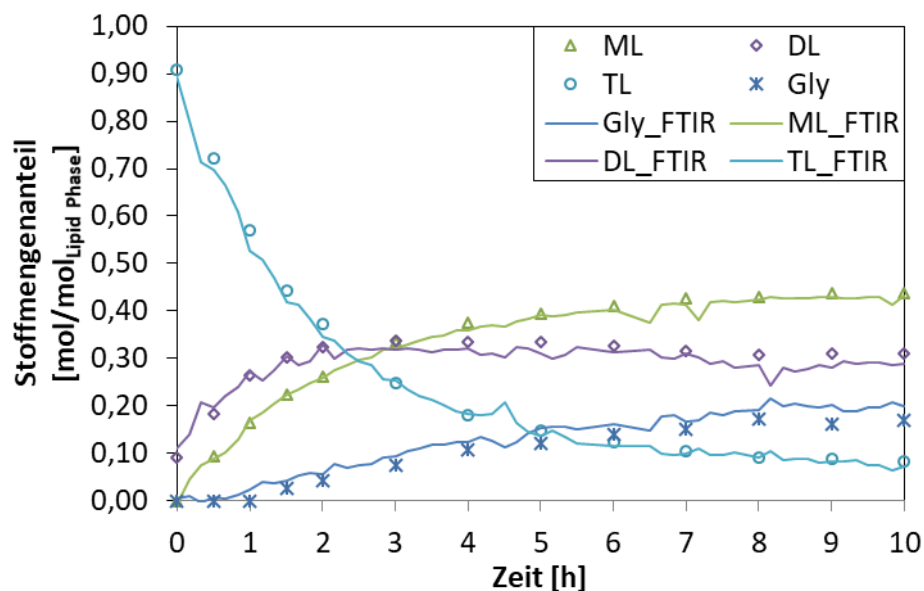


Abbildung 6.19: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher semi-kontinuierlicher Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie vermessen (kontinuierlicher Verlauf) einer Glycerolyse von Glyceroltrilaurat. *Gly*: Glycerol; *LS*: Laurinsäure; *ML*: Glycerolmonolaurat; *DL*: Glyceroldilaurat; *TL*: Glyceroltrilaurat. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:TL = 2,5:1; Ansatzgröße: 173,45 g, T = 65 °C; 10 Gew.-% Enzym,; Luftbegasung mit 1 L/min.

6.3 Auswertung mittels Indirect Hard Modeling - IHM

In diesem Kapitel wird der *Indirect Hard Modeling*-Algorithmus (IHM) zur Auswertung der FTIR-Spektren und zur Modellierung der chemometrischen Modelle angewendet. Wie in Kapitel 1.8.1 bereits erwähnt, führt der IHM-Algorithmus zu sog. Hard Models. Es wird statt linearer Regressionsmethoden aus der Statistik ein nichtlineares, phänomenologisches Modell verwendet, welches die wesentlichen spektralen Eigenschaften nachbildet. Grundlegend für den IHM-Algorithmus ist, dass das IHM-Modell aus zwei Teilmodellen besteht, dem Spektralmodell und dem Kalibriermodell (siehe Kapitel 1 Abbildung 1.18). Für die chemometrische Modellerstellung werden zunächst Modelle der am Reaktionssystem beteiligten Reinstoffe (Spektralmodelle) erstellt (s. Kapitel 1.8). Im zweiten Schritt werden dann wieder Referenzanalysen (hier GC-Daten) mit spektralen Daten korreliert. Das Hauptaugenmerk liegt jedoch bei der Erstellung der Spektralmodelle. In den nächsten 4 Unterkapiteln werden die gleichen Reaktionssysteme betrachtet wie in Kapitel 6.2:

- Veresterung von Glycerol und Laurinsäure (Laurinsäure im Überschuss).
- Veresterung von Glycerol und Laurinsäure (Glycerol im Überschuss).
- Veresterung von Glycerol und Laurinsäure (Fed-Batch Reaktion mit Laurinsäurezufuhr).
- Glycerolyse von Glyceroltrilaurat.

Die Reaktionssysteme sind bereits detailliert bezüglich Reaktionsmechanismen, Phasenverhalten und charakteristischer Reaktionsparameter wie Umsatz, Ausbeute und Selektivität in Kapitel 4 beschrieben worden. In den folgenden Unterkapiteln liegt der Fokus auf der chemometrischen Modellierung und die dadurch resultierende Anwendbarkeit des *Indirect Hard Modeling*-Algorithmus (IHM) zur Online-Überwachung der Reaktionssysteme.

Die Einführungen aller Reaktionssysteme sind jeweils in den Unterkapiteln der einzelnen Reaktionssysteme erläutert (siehe Kapitel 6.2.1-6.2.4) und werden in den folgenden Unterkapiteln nicht erneut dargestellt. Die Datenvorbehandlung der spektralen Datensätze und die Kalibrierdatensätze sind identisch zu den Unterkapiteln der Auswertung mit PLS-Algorithmus des jeweiligen Reaktionssystems (siehe Kapitel 6.2.1-6.2.4). Daher wird in den folgenden Unterkapiteln nicht mehr darauf eingegangen. Es werden nur spezifische Neuheiten durch die Anwendung des IHM-Algorithmus erwähnt. Außerdem werden für die folgenden Unterkapitel jeweils erneut Spektralmodelle für die Reinstoffe modelliert, da die Messung mittels FTIR-Spektroskopie in unterschiedlichen Studienarbeiten zeitlich versetzt auf zwei unterschiedlichen Geräten (Bruker Vertex 70 und Bruker Matrix MX) durchgeführt worden sind. Zudem unterscheidet sich auch die Datenvorbehandlung der Reinstoffspektren der einzelnen Reaktionssysteme.

6.3.1 Veresterung von Glycerol und Laurinsäure im Überschuss^k

Erstellung der Spektralmodelle

Der erste zu begehende Schritt des *Indirect Hard Modeling*-Algorithmus ist die Modellierung der Reinstoffspektren. Dazu werden diese in der Software PEAXACT (Version 4.5, SPACT GmbH, Aachen, Deutschland) mittels parametrisierter Peak-Funktionen modelliert. Am Beispiel der Laurinsäure wird das Spektralmodell in Abbildung 6.20 grafisch dargestellt. Das Spektrum der Laurinsäure wurde mit 9 Peaks modelliert. Dabei wurden die Fitting-Optionen in der Software auf „Hohe Interaktion“ gestellt. Die Fitting Option steuert das Ausmaß der Modellflexibilität während der Modellierung. Eine hohe Interaktion bedeutet, dass die Gewichtungsfaktoren ω , die Verschiebung des gesamten Spektrums, die Basislinie und die Peakparameter wie Position, Breite und Peakform (Anteil Gauß & Voigt-Funktionen) flexibel einstellbar sind. Die grafischen Darstellungen der anderen Spektralmodelle der Reinstoffe werden nicht gezeigt.

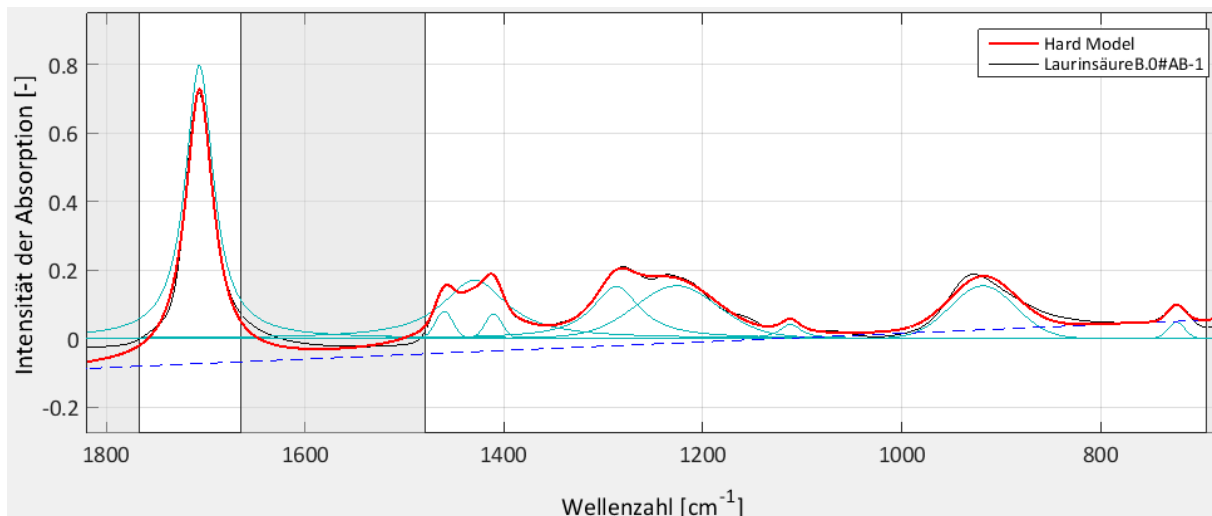


Abbildung 6.20: Spektralmodell von Laurinsäure. Mit 9 Peaks modelliert.

Tabelle 6.9: Modellparameter der Spektralmodelle.

Komponente	Laurinsäure	Glycerol-monolaurat	Glycerol-dilaurat	Glycerol-trilaurat
Peaks pro Komponente	9	14	14	15
Modellflexibilität	High Interaction			

^k Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von B.Sc. Yasmin Goes erzeugt: Multivariate Datenanalyse enzymatischer Veresterungen durch Indirect Hard Modeling, *Bachelorarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2013

Alle Modellparameter der Spektralmodelle sind in Tabelle 6.9 dargestellt. Die weiteren Spektralmodelle wurden ebenfalls mit der Fitting-Option „Hohe Interaktion“ erstellt. Die Reinstoffspektren des Glycerolmono- und dilaurats wurden mit jeweils 14 Peaks modelliert und das Reinstoffspektrum von Glyceroltrilaurat mit 15 Peaks. Im nächsten Schritt wurden die Spektralmodelle auf Plausibilität überprüft. Hierbei wurden die Gewichtsfaktoren ω aller Komponenten aus den Reinstoffspektren durch die bereits erstellten Spektralmodelle ermittelt (siehe Abbildung 6.21). Dabei sollten idealerweise bei dem jeweiligen Reinstoff nur der Gewichtsfaktor dieser Komponente größer null sein und die der anderen Komponenten gleich null. In diesem Fall wird im Reinstoffspektrum des Glycerolmonolaurats (Spektren-Nr. 3 & 4) ein minimaler Anteil an Glyceroldilaurat ermittelt. Im Reinstoffspektrum des Glyceroldilaurats (Spektren-Nr. 5 & 6) werden minimale Anteile aller anderen Komponenten ermittelt. Im Reinstoffspektrum des Glyceroltrilaurats (Spektren-Nr. 7 & 8) werden minimale Anteile an Laurinsäure ermittelt. Die Anteile sind alle im akzeptablen Bereich.

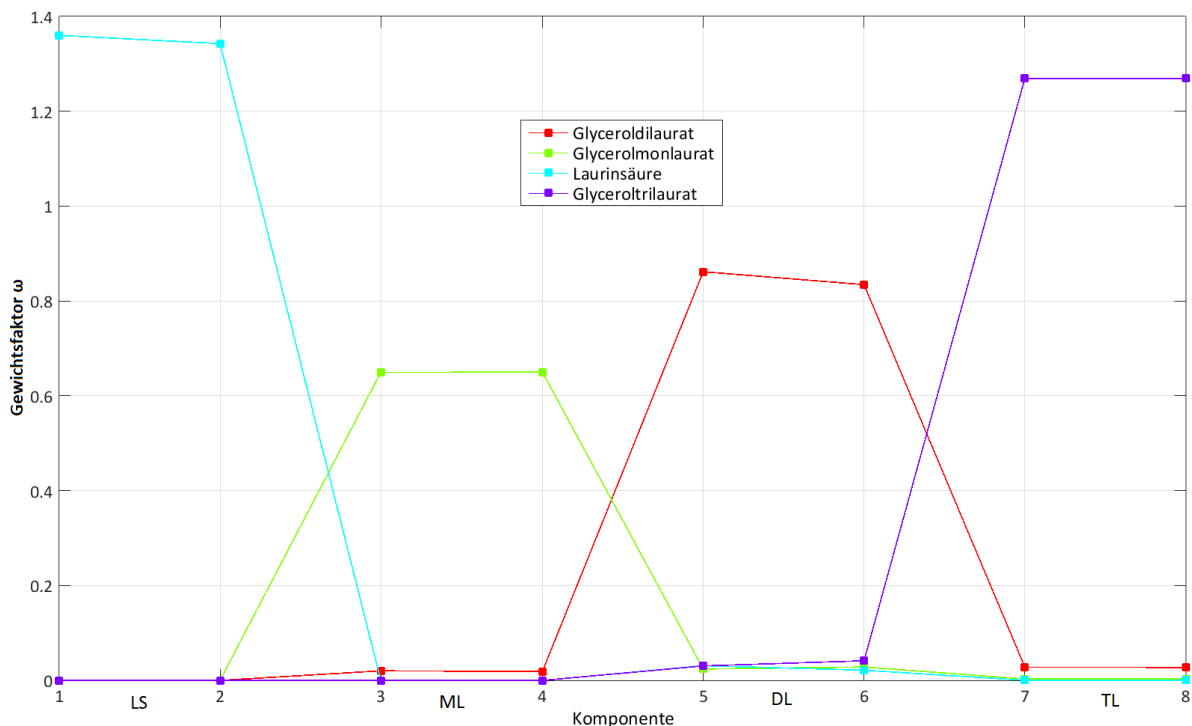


Abbildung 6.21: Plausibilitätstest der Spektralmodelle auf die Reinstoffspektren. Reinstoffspektren Laurinsäure: Nr. 1 & 2; Reinstoffspektren Glycerolmonolaurat: Nr. 3 & 4; Reinstoffspektren Glyceroldilaurat: Nr. 5 & 6; Reinstoffspektren Glyceroltrilaurat: Nr. 7 & 8.

Ein großer Vorteil des Indirect Hard Modeling-Algorithmus ist, dass bereits ohne Kalibrierung des chemometrischen Modells die Gewichtsfaktoren ω_i aller Komponenten anhand der Spektralmodelle aus den unbekanntem Spektren der Reaktion von Laurinsäure und Glycerol ermittelt werden können (siehe Abbildung 6.22). Der zeitliche Verlauf der Gewichtsfaktoren ist für den spektralen Datensatz der Veresterung von Glycerol und Laurinsäure plausibel. Der spektrale Anteil der Laurinsäure nimmt über den Reaktionsverlauf ab und der Anteil an Glyceroltrilaurat nimmt zu. Die spektralen Anteile der Partialglyceride Glycerolmono- und

dilaurat haben jeweils zeitlich versetzte Maxima. Durch diesen zeitaufgelösten Verlauf der Gewichtsfaktoren ist bereits vor der Kalibrierung ein qualitativer Trend aller Komponenten bekannt.

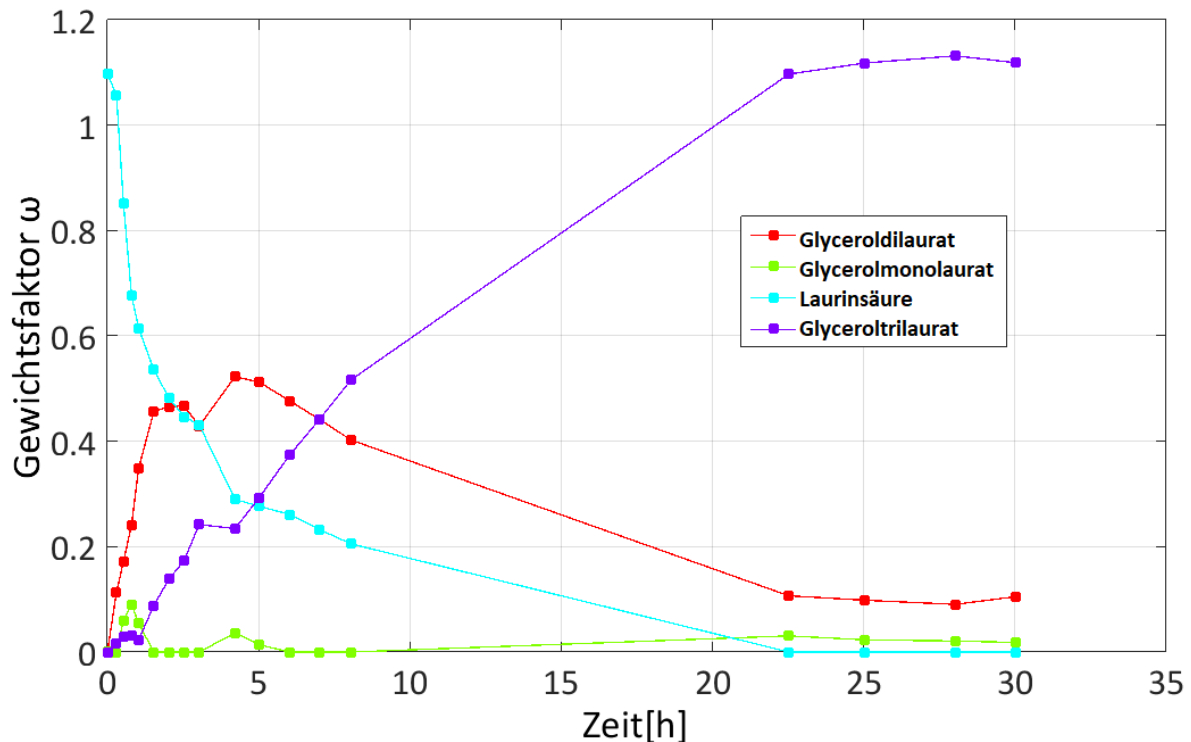


Abbildung 6.22: Zeitlicher Verlauf der Gewichtsfaktoren der Veresterung von Glycerol und Laurinsäure. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 1:3, Gesamtansatzgröße: 94 g, 2 Gew.-% Novozym 435®, T = 70 °C; Luftbegasung mit 0,75 L/min, Blasensäulenreaktor.

Kalibrierung des chemometrischen Modells

Die Kalibrierung des chemometrischen Modells wurde mit demselben Datensatz wie bei der Anwendung des PLS-Algorithmus durchgeführt (siehe Kapitel Kapitel 6.2.1). So ist auch ein direkter Vergleich beider Modellierungsmethoden möglich. In Tabelle 6.10 sind die Modellparameter des IHM-Modells aufgelistet. Die Stoffmengenanteile aller Komponenten können mit einer Regressionsfunktion „simple“ (linearer Fit, Polynom ersten Grades) und einem Fehler kleiner gleich 5,1 Mol.-% aus dem unbekanntem spektralen Datensatz bestimmt werden. Dabei ist der Regressionskoeffizient R^2 der Kalibriergeraden aller Komponenten (siehe Abbildung 6.23) größer 79%. Die Regressionsfunktion wird beim IHM-Algorithmus verwendet, um die funktionale Beziehung zwischen Gewichtsfaktoren der Komponenten und den prädiktiven Merkmalen (hier Stoffmengenanteile) zu ermitteln. Die Funktion „simple“ bedeutet, dass in diesem Fall ein linearer Zusammenhang besteht ohne Y-Achsenabschnitt. Außerdem wurde bei der Kalibrierung die Regressionseinstellung „ratio“ gewählt. Diese Regressionseinstellung bedeutet, dass die Regression des Kalibrierungsmodells paarweise für die Verhältnisse von Merkmalen und durch Einbeziehung einer Schließbedingung erfolgt. In diesem Fall, dass die Summe aller Stoffmengenanteile gleich 1 ist. Durch diese Regression

können im Gegensatz zum PLS-Algorithmus keine negativen Stoffmengenanteile aus den unbekanntem spektralen Datensätzen berechnet werden.

Tabelle 6.10: Modellparameter des chemometrischen Modells.

Eigenschaft	Laurinsäure	Glycerolmonolaurat	Glyceroldilaurat	Glyceroltrilaurat
	[mol _{LS} /mol]	[mol _{ML} /mol]	[mol _{DL} /mol]	[mol _{TL} /mol]
Funktion	simple	simple	simple	simple
R ²	0,9620	0,7910	0,8652	0,9879
RMSECV	0,0606	0,0308	0,0698	0,0313
RMSEP	0,0381	0,0501	0,0448	0,0338
Kalibrationsdatensatz			101	
Validierungsdatensatz			18	

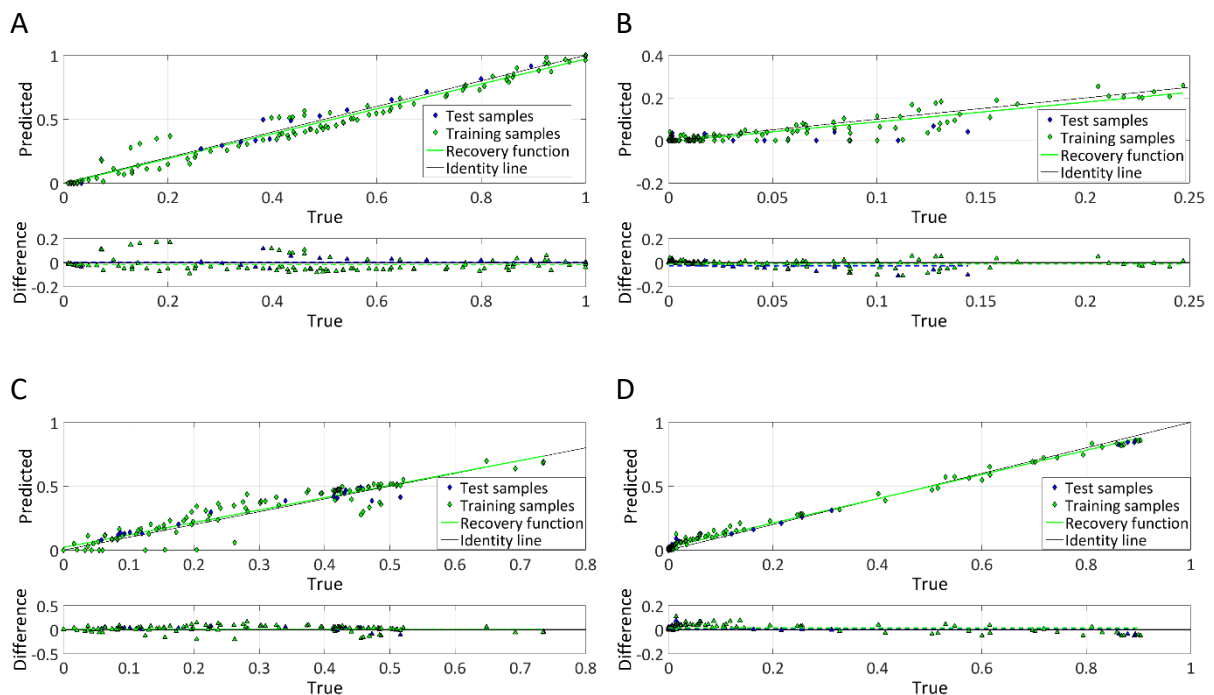


Abbildung 6.23: Kalibriergeraden, A: Laurinsäure, B: Glycerolmonolaurat, C: Glyceroldilaurat, D: Glyceroltrilaurat. *Predicted*: Vorhergesagter Wert des Modells, *True*: Referenzwert; *Test samples*: Proben aus dem Testset; *Trainings samples*: Kalibrierproben; *Recovery function*: reale Kalibriergerade; *Identity line*: ideale Kalibriergerade; *Difference*: Abweichung vom Vorhersagewert zum Referenzwert.

In Abbildung 6.23 sind die Kalibriergeraden aller Komponenten in einem Vorhersage/Wahrheits-Diagramm dargestellt. Der Indirect Hard Modeling-Algorithmus (IHM)

ist durch die Modellflexibilität der Spektralmodelle nicht nur in einem Temperaturbereich von 60-80 °C und in den unten gelisteten Stoffmengenbereichen der einzelnen Komponenten gültig, sondern auch in Bereichen außerhalb des Kalibrierbereichs.

Validierung des chemometrischen Modells

Im letzten Schritt der Modellerstellung wird das IHM-Modell extern auf einen unbekanntem spektralen Datensatz validiert. Das erstellte chemometrische Modell wurde ebenfalls extern auf einen FTIR-Datensatz einer Veresterung von Glycerol und Laurinsäure bei 70 °C mit einem Substratverhältnis von 3:1 angewendet. Es kann ebenfalls ein kontinuierlicher Prozessverlauf der Stoffmengenanteile der Reaktion aufgezeichnet werden (siehe Abbildung 6.24). Alle Komponenten werden mit den oben genannten Fehlern sehr gut vom IHM-Modell wiedergegeben. Auch in den Bereichen, in denen keine Offline-Proben entnommen worden sind (in der Zeit von 8 bis 22 h), ist nun die Prozessverfolgung durch die Online-FTIR-Spektroskopie gewährleistet. Auffällig ist nur der Fehler des Online-Prozessverlaufes zwischen 3-4 Stunden. In den Kalibriergeraden in Abbildung 6.23 sind in den jeweiligen Konzentrationsbereichen der Komponenten, welche diese zwischen 3-4 Stunden haben, ebenfalls Abweichungen von der Kalibriergeraden zu erkennen. Gegebenenfalls müsste der Kalibrierdatensatz erhöht werden, um eine Verbesserung in der Modellanwendung zu erhalten.

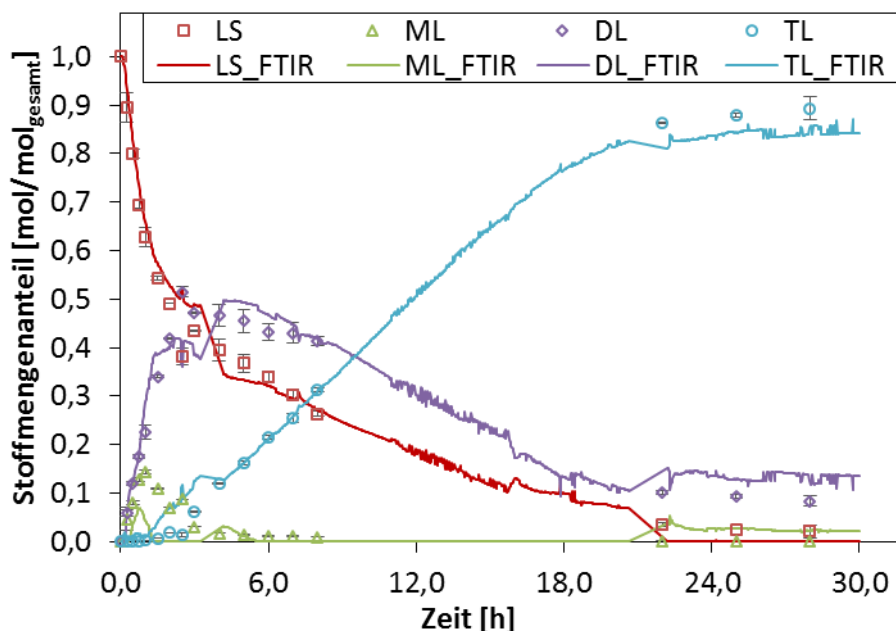


Abbildung 6.24: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (GC-Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie vermessen (kontinuierlicher Verlauf). *LS:* Laurinsäure; *ML:* Glycerolmonolaurat; *DL:* Glyceroldilaurat; *TL:* Glyceroltrilaurat. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 1:3, Gesamtansatzgröße: 94 g, 2 Gew.-% Novozym 435®, T = 70 °C, Luftbegasung mit 0,75 L/min, Blasensäulenreaktor.

6.3.2 Veresterung von Glycerol im Überschuss und Laurinsäure¹

Erstellung der Spektralmodelle

Für dieses Reaktionssystem wurden erneut Spektralmodelle aller Reinstoffe außer Glyceroltrilaurat erstellt. Der Stoffmengenanteil dieser Komponente ist über den gesamten Reaktionsverlauf kleiner als 2,5 Mol.-% und ist in dieser Reaktionsmischung daher durch das IHM-Modell nur schwer von Glyceroldilaurat zu differenzieren. Es werden die Reinstoffspektren in der Software PEAXACT mittels parametrisierter Peak-Funktionen modelliert. Am Beispiel von Glycerol wird das Spektralmodell in Abbildung 6.25 grafisch dargestellt. Das Spektrum von Glycerol wurde mit 24 Peaks modelliert. Dabei wurden die Fitting Optionen in der Software auf „Mittlere Interaktion“ gestellt. Bei der Modellierung der Reinstoffspektren mit mittlerer Interaktion sind die Gewichtungsfaktoren ω , die Verschiebung des gesamten Spektrums, die Basislinie und ausgewählte Peak-Positionen flexibel einstellbar. Die grafischen Darstellungen der anderen Spektralmodelle der Reinstoffe werden nicht gezeigt.

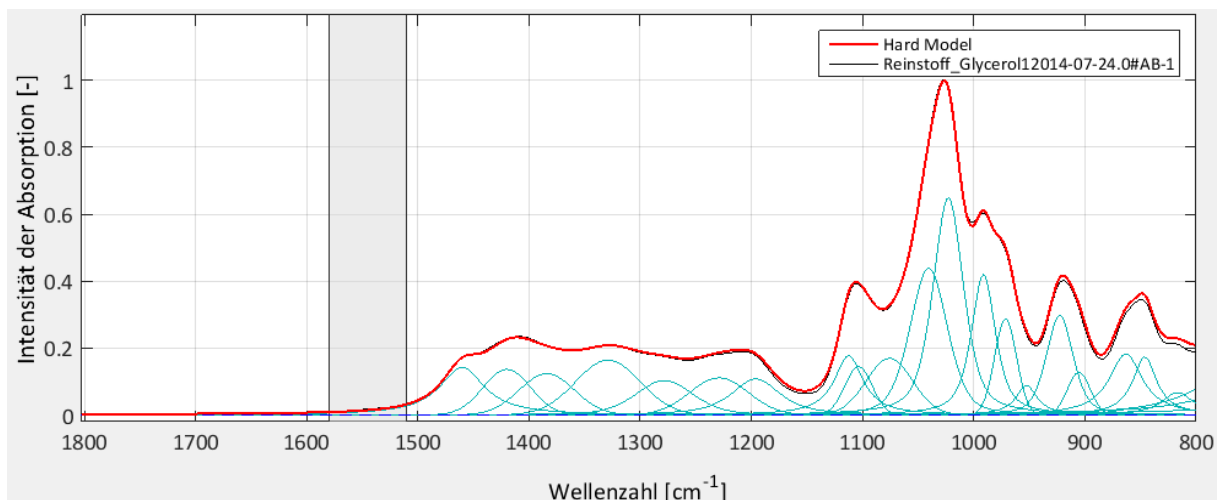


Abbildung 6.25: Spektralmodell von Glycerol. Mit 24 Peaks modelliert.

Tabelle 6.11: Modellparameter der Spektralmodelle.

Komponente	Glycerol	Laurinsäure	Glycerol-monolaurat	Glycerol-dilaurat
Peaks pro Komponente	24	28	31	30
Modell-flexibilität	Medium Interaction			

¹ Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Helge Berger erzeugt: FTIR basierte Online-Prozesssteuerung einer Biotransformation in mehrphasigen Reaktionssystemen, *Masterarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2014

Alle Modellparameter der Spektralmodelle sind in Tabelle 6.11 dargestellt. Die weiteren Spektralmodelle wurden ebenfalls mit der Fitting Option „Mittlere Wechselwirkung“ erstellt. Das Reinstoffspektrum von Laurinsäure wurde mit 28 Peaks modelliert und die des Glycerolmono.- und dilaurats wurden mit 30, bzw. 31 Peaks modelliert. Im nächsten Schritt wurden die Spektralmodelle auf Plausibilität überprüft. Hierbei wurden die Gewichtsfaktoren ω aller modellierten Komponenten aus den Reinstoffspektren durch die bereits erstellten Spektralmodelle ermittelt (siehe Abbildung 6.26). Dabei sollten idealerweise bei dem jeweiligen Reinstoff nur der Gewichtsfaktor dieser Komponente größer null sein und die der anderen Komponenten gleich null. In diesem Fall wird im Reinstoffspektrum des Glycerolmonolaurats ein minimaler Anteil an Glycerol ermittelt. Im Reinstoffspektrum des Glyceroldilaurats wird ein etwas größerer Anteil an Glycerolmonolaurat ermittelt. Hier wird auch die Herausforderung bei der Erstellung der Spektralmodelle der Reinstoffe deutlich. Wie bereits erwähnt, ähneln sich die Glycerolester im FTIR-Spektrum. Das Glycerolmonolaurat besitzt eine charakteristische Absorptionsbande im Wellenzahlenbereich von $1075\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ und lässt sich auch bei der Modellierung der Reinstoffe gut von den anderen beiden Glycerolestern differenzieren. Glyceroldi- und trilaurat unterscheiden sich jedoch nur durch minimale Unterschiede im FTIR-Spektrum, den beiden Verschiebungen der Absorptionsbanden bei 1730 cm^{-1} und bei $1200\text{-}1125\text{ cm}^{-1}$.

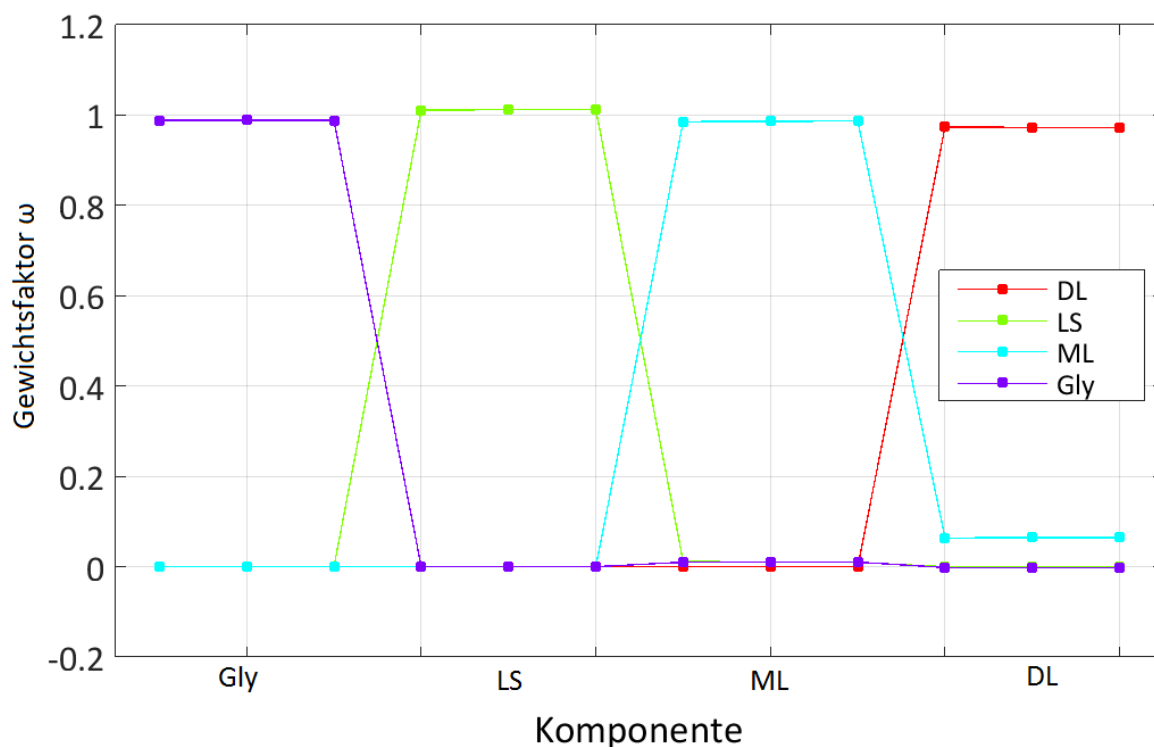


Abbildung 6.26: Plausibilitätstest der Spektralmodelle der Reinstoffspektren.

Bereits ohne Kalibrierung des chemometrischen Modells können die Gewichtsfaktoren ω_i aller Komponenten anhand der Reinstoffmodelle aus den unbekanntem Spektren der Reaktion von Laurinsäure und Glycerol im Überschuss ermittelt werden (siehe Abbildung 6.27). Der zeitliche

Verlauf der Gewichtsfaktoren ist für den spektralen Datensatz der Veresterung von Glycerol im Überschuss und Laurinsäure nicht ganz plausibel. Der spektrale Anteil der Laurinsäure nimmt über den Reaktionsverlauf ab, jedoch ist der Verlauf des Substrates Glycerol nicht ganz plausibel. Der Spektrale Anteil des Glycerols nimmt zunächst ab und dann wieder zu. Die Anteile der beiden Produkte, also der Partialglyceride Glycerolmono- und dilaurat, nehmen zu. Es scheint so, dass die Verläufe der Gewichtsfaktoren des Glycerols und des Glyceroldilaurats korrelieren. Nichtsdestotrotz ist durch diesen zeitaufgelösten Verlauf der Gewichtsfaktoren bereits vor der Kalibrierung ein qualitativer Trend aller Komponenten erkennbar, der bei diesem Reaktionssystem mit Glycerol im Überschuss nicht ganz plausibel erscheint.

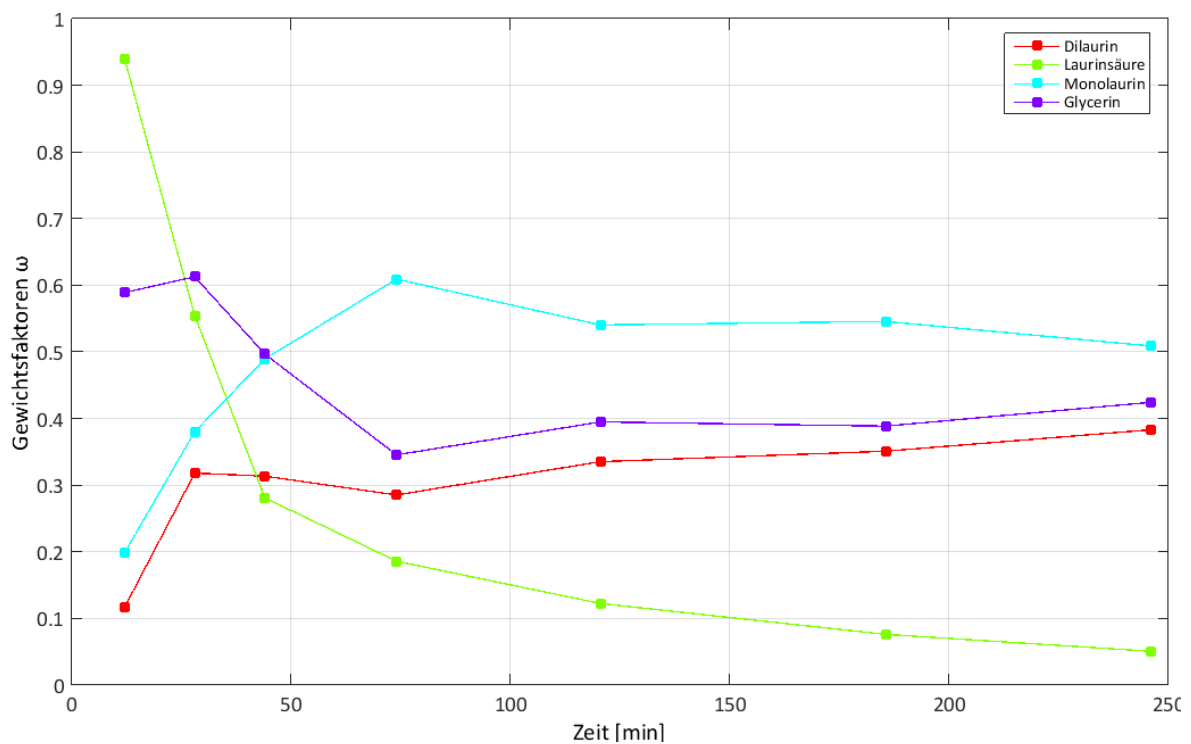


Abbildung 6.27: Zeitlicher Verlauf der Gewichtsfaktoren der Veresterung von Glycerol im Überschuss und Laurinsäure. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 2:1, Gesamtansatzgröße: 144,65 g, 2 Gew.-% Novozym, 435®, T = 65 °C, Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

Kalibrierung der chemometrischen Modelle

Die Kalibrierung des chemometrischen Modells wurde mit demselben Datensatz durchgeführt, der auch bei dem PLS-Algorithmus angewendet wurde (siehe Kapitel Kapitel 6.2.2). In Tabelle 6.12 sind die Modellparameter des IHM-Modells aufgelistet. Die Stoffmengenanteile aller Komponenten wurden mit einer Regressionsfunktion „linear“ und einem Fehler kleiner gleich 4,5 Mol.-% für die unpolaren Komponenten und 13,5 Mol.-% für Glycerol aus dem unbekanntem spektralen Datensatz bestimmt. Dabei ist der Regressionskoeffizient R^2 der Kalibriergeraden aller unpolaren Komponenten größer 54% und

vom Glycerol nur 0,3% (siehe Abbildung 6.28). Die Funktion „linear“ bedeutet, dass in diesem Fall ein linearer Zusammenhang besteht (gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz).

Tabelle 6.12: Modellparameter des chemometrischen Modells.

Eigenschaft	Glycerol	Laurinsäure	Glycerolmonolaurat	Glyceroldi- und trilaurat
	[mol _L /mol]	[mol _M /mol]	[mol _{DL} /mol]	[mol _{TL} /mol]
Funktion	linear	linear	linear	linear
R ²	0,0028	0,5405	0,6072	0,5651
RMSECV	0,1760	0,1008	0,0826	0,0623
RMSEP	0,1320	0,0450	0,0342	0,0316
Kalibrationsdatensatz			18	
Validierungsdatensatz			7	

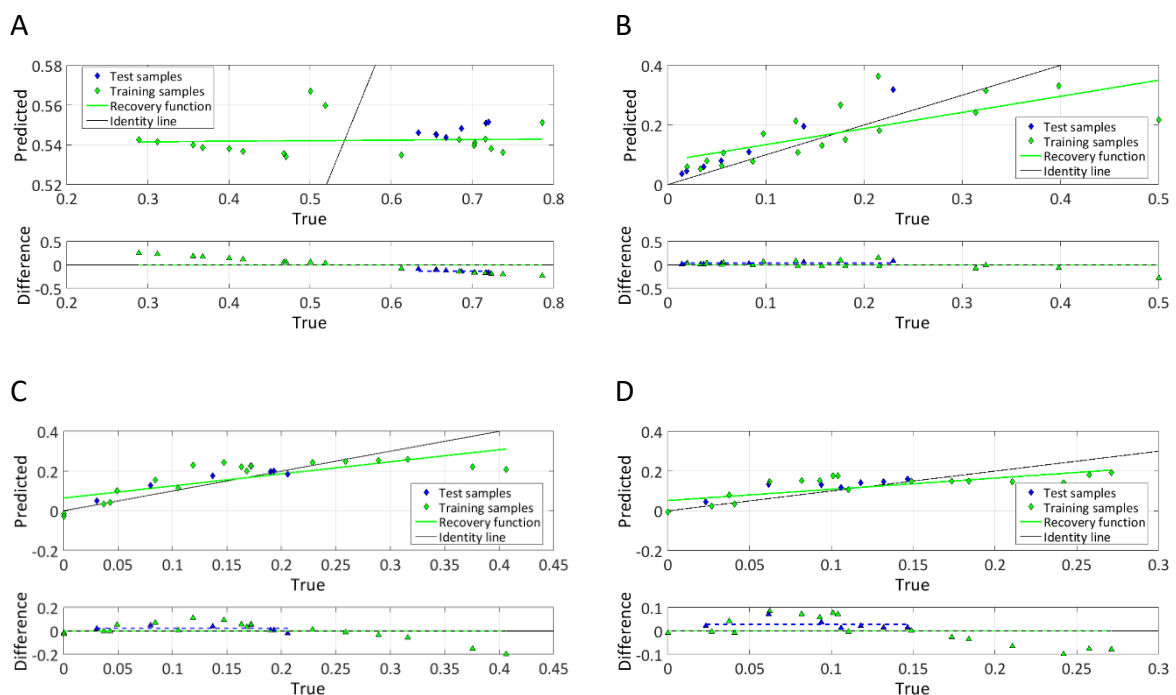


Abbildung 6.28: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Laurinsäure, C: Glycerolmonolaurat, D: Glyceroldilaurat.

Dieser lineare Zusammenhang besteht jedoch nicht bei der polaren Komponente Glycerol, nur bei den unpolaren Komponenten. Bei der polaren Komponente Glycerol nimmt die Signalintensität aufgrund der Emulsion (Benetzung am ATR-Kristall) nicht linear mit dem Stoffmengenanteil zu. Die Linearität bei den unpolaren Komponenten ist aber mit einem

Regressionskoeffizienten bei nur knapp 55% ebenfalls nicht ausreichend. Die Kalibrierung wurde mit der Schließbedingung „ratio“ (Summe aller Stoffmengenanteile ist gleich eins) durchgeführt.

Validierung

Das IHM-Modell wurde extern auf einen FTIR-Datensatz einer Veresterung von Glycerol und Laurinsäure bei 60 °C mit einem Substratverhältnis von 2:1 und einer Biokatalysatorbeladung von 2 Gew.-% angewendet. Es besteht wie auch beim PLS-Modell (siehe Kapitel 6.2.2) keine Möglichkeit die Stoffmengenanteile der Reaktion kontinuierlich zu überwachen (siehe Abbildung 6.29). Die Trends aller Komponenten werden zwar wiedergegeben, jedoch mit einem zu großen Fehler. Auffällig ist hierbei, dass die polare Komponente Glycerol über den gesamten Reaktionsverlauf nahezu konstant mit 55 Mol.-% wiedergegeben wird und die unpolaren Komponenten (Laurinsäure und Glycerolester) zu hoch durch das chemometrische Modell bestimmt werden. Dieses Modell erkennt die Trends der Komponenten, jedoch nicht die genauen Stoffmengenanteile. Wie bereits bei der Erstellung der Spektralmodelle genannt, ist es für diese Reaktion mit Glycerol im Überschuss eine große Herausforderung die Reinstoffmodelle zu modellieren, da sich die Spektren der Moleküle zu sehr ähneln. Zudem könnte der Kalibrierdatensatz zu klein sein für eine genaue Bestimmung der Stoffmengenanteile aus dem spektralen Datensatz. Durch die Erhöhung des Kalibrierdatensatzes könnte eine Verbesserung des Modells erreicht werden, womit gegebenenfalls mit einem niedrigeren Fehler die Stoffmengenanteile bestimmt werden können. Es ist aber wahrscheinlicher, dass eine Optimierung des IHM-Modells in erster Linie nur durch eine Verbesserung der Reinstoffmodelle zustande kommen kann. Durch dieses Ergebnis wird ebenfalls deutlich, dass Mehrphasensysteme nur sehr schwer zu modellieren sind, sei es mittels PLS- oder IHM-Algorithmus. Das Phasenverhalten während der Reaktion hat einen sehr entscheidenden Einfluss auf die Anwendbarkeit der chemometrischen Modelle.

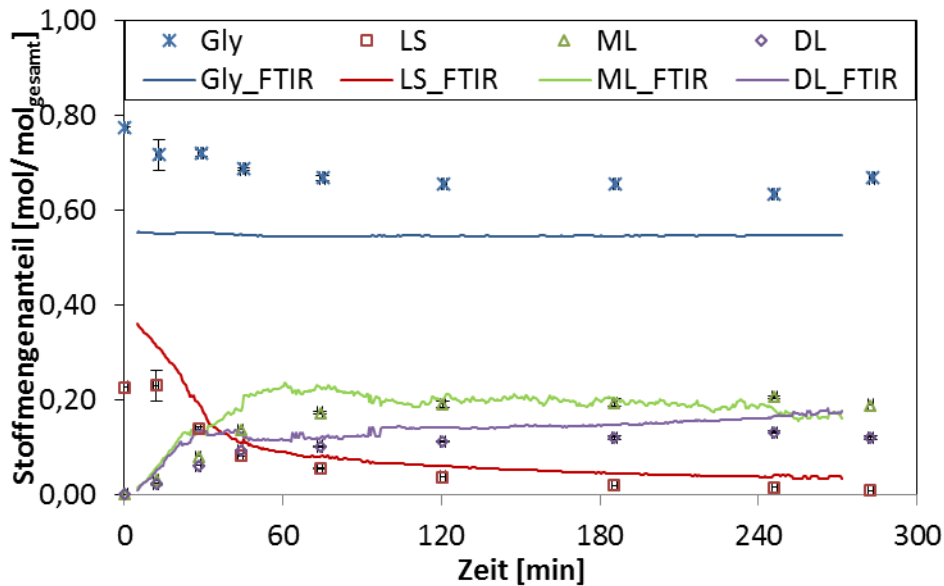


Abbildung 6.29: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie vermessen (kontinuierlicher Verlauf). *LS*: Laurinsäure; *ML*: Glycerolmonolaurat; *DL*: Glyceroldilaurat; *TL*: Glyceroltrilaurat. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 2:1, Gesamtansatzgröße: 144,65 g, 2 Gew.-% Novozym, 435[®], T = 65 °C, Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

6.3.3 Veresterung von Glycerol und Laurinsäure als Fed-Batch Reaktion mit Laurinsäurezufuhr^m

Erstellung der Spektralmodelle

Für dieses Reaktionssystem wurden die gleichen Spektralmodelle wie in Kapitel 6.3.2 mit der gleichen Datenvorbehandlung der FTIR-Spektren verwendet. Es wird hier nur kurz der zeitliche Verlauf der Gewichtsfaktoren ω_i aller Komponenten für die Fed-Batch Verfahrensweise der Veresterung mit Glycerol als Überschusskomponente diskutiert (siehe Abbildung 6.30). Die Gewichtsfaktoren ω_i aller Komponenten können bereits ohne Kalibrierung des IHM-Modells anhand der Spektralmodelle aus den unbekanntem Spektren der Reaktion von Laurinsäure und Glycerol als Fed-Batch Verfahrensweise ermittelt werden (siehe Abbildung 6.30). Der zeitliche Verlauf der Gewichtsfaktoren ist für den spektralen Datensatz der Fed-Batch Veresterung von Glycerol und Laurinsäure plausibel. Der spektrale Anteil des Glycerols nimmt über den Reaktionsverlauf ab und die spektralen Anteile der beiden Produkte, den Partialglyceriden Glycerolmono.- und dilaurat, nehmen zu.

^m Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Helge Berger erzeugt: FTIR basierte Online-Prozesssteuerung einer Biotransformation in mehrphasigen Reaktionssystemen, *Masterarbeit*, TU-Hamburg-Harburg, 2014

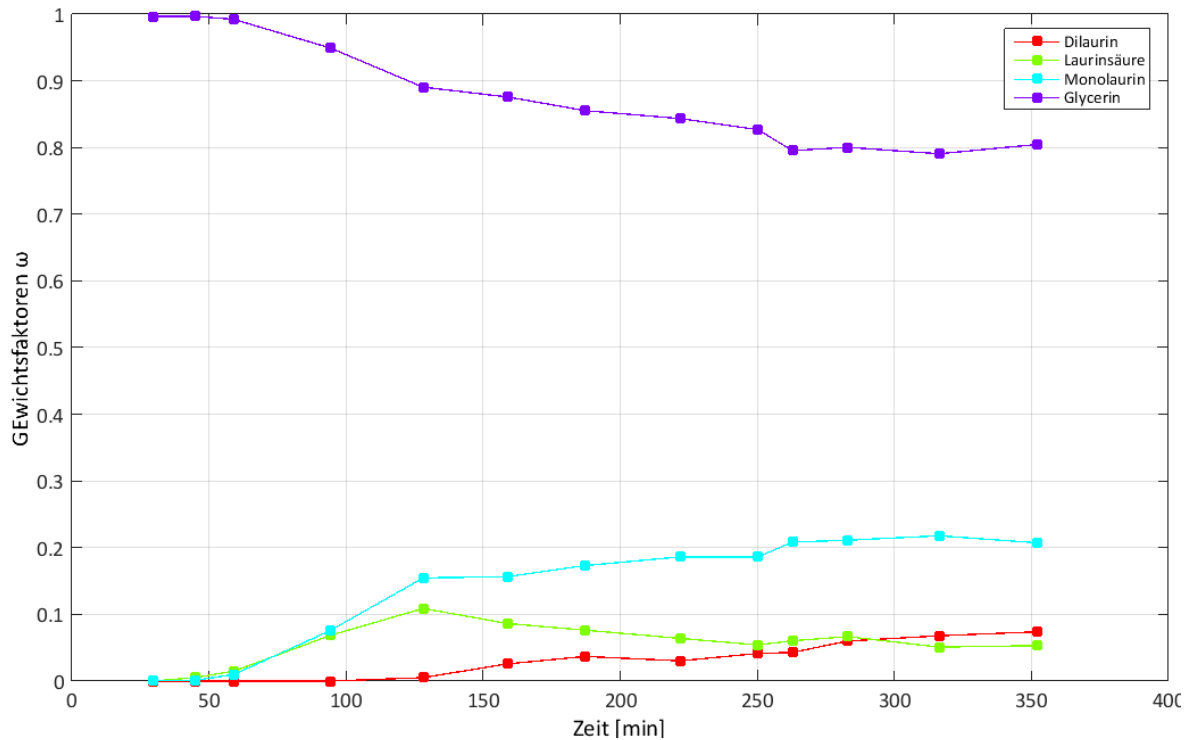


Abbildung 6.30: Zeitlicher Verlauf der Gewichtsfaktoren der Veresterung von Glycerol und Laurinsäure auf Fed-Batch Verfahrensweise mit Laurinsäurezufuhr. **Reaktionsbedingungen:** Zulauftrate LS: 0,25 mL/min (LS gesamt zugeführt: 387,9 mmol); $T = 65\text{ °C}$; 6 Gew.-% Enzym bezogen auf das Anfangsgewicht im Reaktor $m_{0,\text{Glycerol}} = 75,3\text{ g}$ ($n_{0,\text{Glycerol}} = 817,4\text{ mmol}$); Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

Da die Laurinsäure kontinuierlich zugeführt wird und gleichzeitig umgesetzt wird, steigt der spektrale Anteil zunächst an und bleibt auf einem Niveau bis zum Ende der Reaktion. Die Gewichtsfaktoren können zeitaufgelöst durch die Anwendung der Spektralmodelle bereits vor der Kalibrierung der chemometrischen Modelle dargestellt werden. Somit ist ein qualitativer Trend aller Komponenten bekannt. Im Gegensatz zu Kapitel 6.3.2 besteht hier der wesentliche Unterschied in der Phasenzusammensetzung des Reaktionssystems, welches hauptsächlich aus Glycerol und Glycerolmono- und dilaurat besteht. Wie bereits in Kapitel 6.2.3 beschrieben, wirkt sich diese Phasenzusammensetzung vorteilhaft auf die spektroskopische Messung mittels ATR-Sonde aus.

Kalibrierung des chemometrischen Modells

In Tabelle 6.13 sind die Modellparameter des IHM-Modells aufgelistet. Die Stoffmengenanteile der Komponenten Glycerol, Glycerolmono- und dilaurat werden mit einer Regressionsfunktion „linear“ modelliert, die Laurinsäure mit einer Regressionsfunktion „simple“. Alle Komponenten werden mit einem Fehler kleiner gleich 4,0 Mol.-% aus dem unbekanntem spektralen Datensatz bestimmt. Dabei ist das Bestimmtheitsmaß R^2 der Kalibriergeraden von Glycerol und Glycerolmonolaurat größer 50%. Laurinsäure hat nur einen Determinationskoeffizienten von 10%. Hier ist nur eine sehr schlechte Linearität gegeben (vergleiche Abbildung 6.31 B). Die Laurinsäure ist nur in geringen Stoffmengenanteilen in der

Reaktionsmischung enthalten, welches der Grund für den niedrigen Determinationskoeffizienten sein könnte. Glyceroldi- und trilaurat wurden ebenfalls als Summenparameter erfasst und weisen ein R^2 von 26% auf. Die Kalibrierung wurde mit der Regressionseinstellung „ratio“ durchgeführt.

Tabelle 6.13: Modellparameter des chemometrischen Modells.

Eigenschaft	Glycerol	Laurinsäure	Glycerolmonolaurat	Glyceroldi- und trilaurat
	[mol _{LS} /mol]	[mol _{ML} /mol]	[mol _{DL} /mol]	[mol _{TL} /mol]
Funktion	simple	linear	simple	simple
R^2	0,5821	0,1081	0,5037	0,2608
RMSECV	0,0656	0,0173	0,0357	0,0574
RMSEP	0,0379	0,0096	0,0393	0,0180
Kalibrationsdatensatz			40	
Validierungsdatensatz			13	

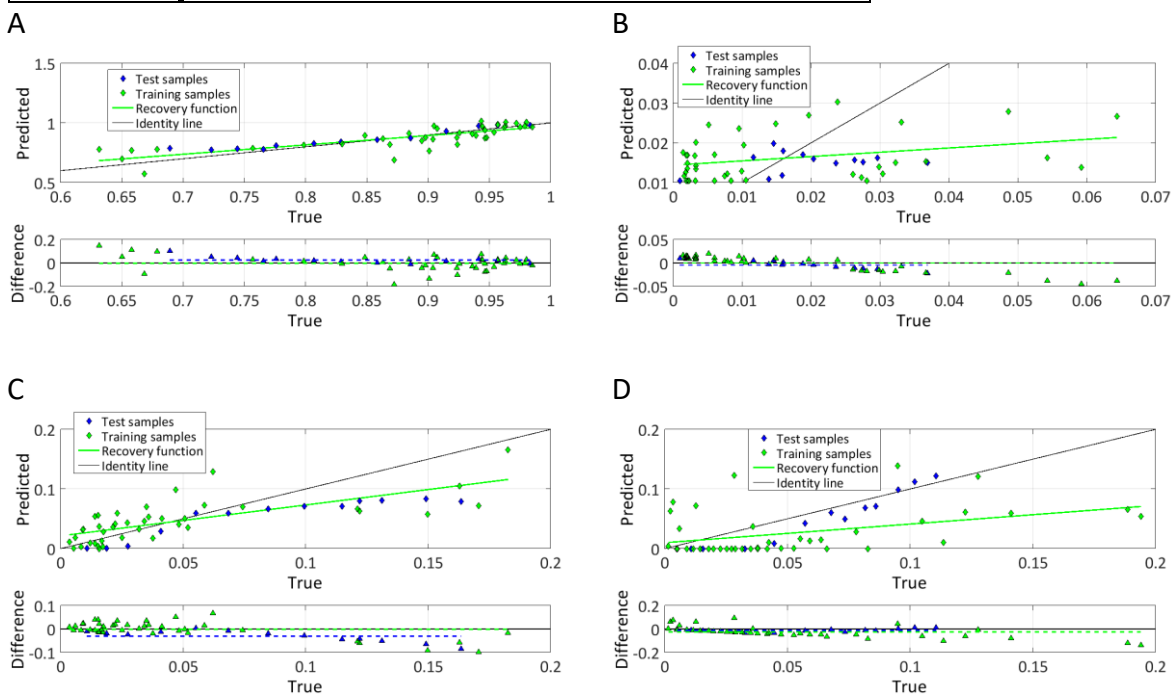


Abbildung 6.31: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Laurinsäure, C: Glycerolmonolaurat, D: Glyceroldilaurat.

Validierung des chemometrischen Modells

Die externe Validierung des IHM-Modells wurde auf einen unbekanntem spektralen Datensatz einer Veresterung von Glycerol und Laurinsäure als Fed-Batch-Verfahrensweise angewendet. In diesem Fall wurde das erstellte chemometrische Modell extern auf einen FTIR-Datensatz einer Veresterung von Glycerol und Laurinsäure bei 65 °C mit einer Zufuhrrate an Laurinsäure von 250 mL/min und einer Biokatalysatorbeladung von 6 Gew.-% Enzym angewendet. Somit besteht die Möglichkeit, einen kontinuierlichen Prozessverlauf der Stoffmengenanteile der Reaktion aufzuzeichnen (Abbildung 6.32). Die Komponente Glycerol wird bis zu einer Reaktionszeit von 300 min sehr gut durch das IHM-Modell wiedergegeben. Danach wird das Glycerol zu hoch bestimmt. Die Laurinsäure wird über den gesamten Reaktionsverlauf nahezu konstant wiedergegeben. Glycerolmonolaurat wird bis zu einer Reaktionszeit von 60 min gar nicht aus dem spektralen Datensatz bestimmt. Danach, bis ca. 200 min., kann diese Komponente gut verfolgt werden. Bis zum Ende der Reaktion hin wird dann das Glycerolmonolaurat in zu geringen Mengen bestimmt. Der Trend der Stoffmengenverläufe stimmt ebenfalls nicht am Ende der Reaktionszeit. Der Summenparameter für Glyceroldi- und trilaurat wird bis ca. 120 min nicht aus dem spektralen Datensatz bestimmt. Von dort an bis zum Ende der Reaktion kann dieser Summenparameter mit großem Rauschen wiedergegeben werden. Zusammenfassend ist eine kontinuierliche Online-Prozessverfolgung nur mit Abstrichen möglich. Durch die Erhöhung des Kalibrierdatensatzes und der Optimierung der einzelnen Spektralmodelle könnte eine bessere Prozessverfolgung möglich sein.

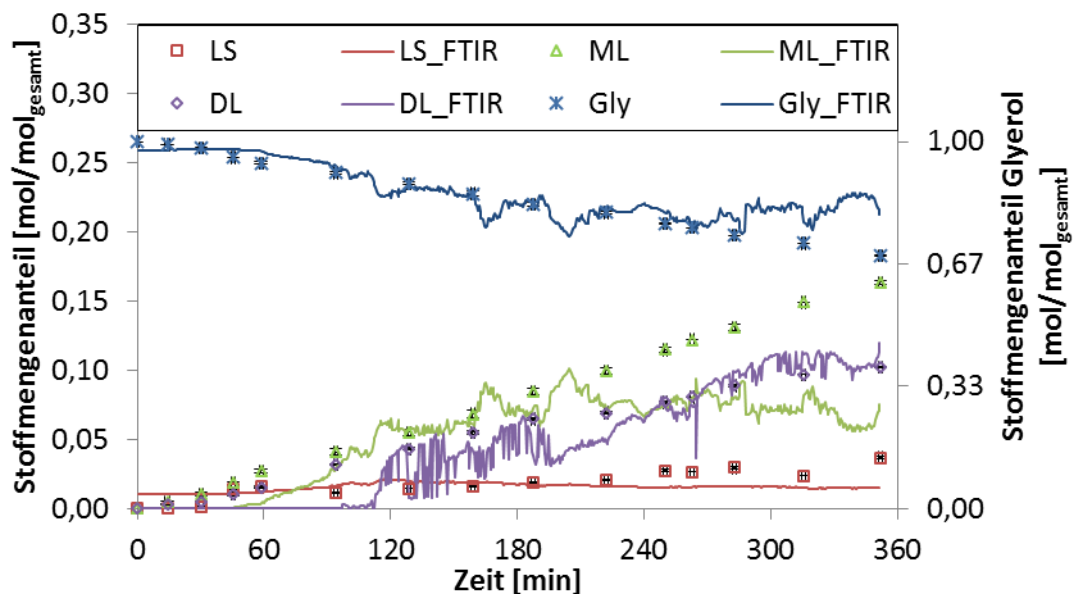


Abbildung 6.32: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie (kontinuierlicher Verlauf). *LS*: Laurinsäure; *ML*: Glycerolmonolaurat; *DL*: Glyceroldilaurat; *TL*: Glyceroltrilaurat. **Reaktionsbedingungen:** Zulauftrate LS: 0,25 mL/min (LS gesamt zugeführt: 387,9 mmol); T = 65 °C; 6 Gew.-% Enzym bezogen auf das Anfangsgewicht im Reaktor $m_{0,Glycerol} = 75,3$ g ($n_{0,Glycerol} = 817,4$ mmol); Luftbegasung mit 1,0 L/min, Blasensäulenreaktor.

6.3.4 Glycerolyse von Glyceroltrilauratⁿ

Erstellung der Spektralmodelle

Wie bereits in Kapitel 6.2.4 erwähnt, werden die chemometrischen Modelle nur für die unpolare Phase des Reaktionssystems erstellt, da das Phasenverhalten mit Überschuss an Glycerol zu keinem plausiblen, reproduzierbaren Messwerten mittels FTIR-Spektroskopie führen. Es wurden daher ebenfalls erneut Spektralmodelle aller Reinstoffe erstellt. Am Beispiel von Glycerolmonolaurat wird dieses in Abbildung 6.33 grafisch dargestellt. Das Spektrum von Glycerolmonolaurat wurde mit 24 Peaks modelliert. Dabei wurden die Fitting Optionen in der Software auf „Geringe Interaktion“ gestellt. Bei der Modellierung der Reinstoffspektren mit leichter Interaktion sind die Gewichtungsfaktoren ω , die Verschiebung des gesamten Spektrums und die Basislinie flexibel einstellbar. Die grafischen Darstellungen der anderen Spektralmodelle der Reinstoffe werden an dieser Stelle nicht gezeigt.

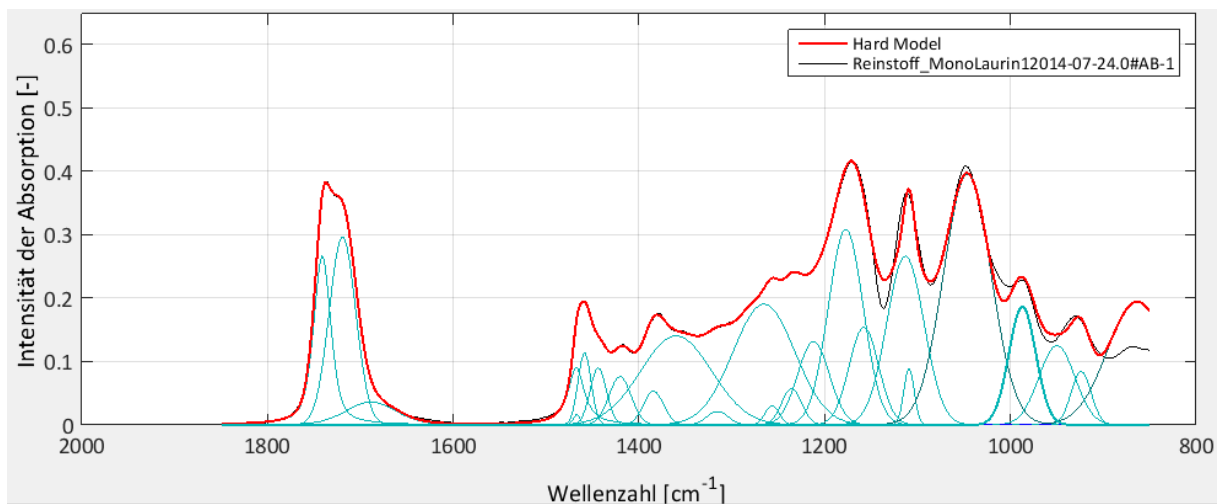


Abbildung 6.33: Spektralmodell von Glycerolmonolaurat. Mit 25 Peaks modelliert.

Tabelle 6.14: Modellparameter der Spektralmodelle.

Komponente	Glycerol	Glycerol-monolaurat	Glycerol-dilaurat	Glycerol-trilaurat
Peaks pro Komponente	20	25	25	23
Modell-flexibilität	Low Interaction			

ⁿ Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Elena Eßer erzeugt: Etablierung einer in situ Analytik für die enzymatische Glycerolyse von Trilaurin mittels FT-IR-Spektroskopie, Masterarbeit, TU-Hamburg-Harburg, 2015

Alle Modellparameter der Spektralmodelle sind in Tabelle 6.14 dargestellt. Die weiteren Modelle wurden ebenfalls mit der Fitting Option „Geringe Interaktion“ erstellt. Das Reinstoffspektrum von Glycerol wurde mit 20 Peaks modelliert und die des Glyceroldi- und tirilaurats wurden mit 25, bzw. 23 Peaks modelliert. Im nächsten Schritt wurden die Spektralmodelle auf ihre Plausibilität überprüft. Hierbei wurden die Gewichtungsfaktoren ω aller modellierten Komponenten aus den Reinstoffspektren durch die bereits erstellten Modelle ermittelt (siehe Abbildung 6.34). Dabei sollten idealerweise bei dem jeweiligen Reinstoff nur der Gewichtungsfaktor dieser Komponente größer null sein und die der anderen Komponenten gleich null. Bei dem Reinstoffspektrum des Glycerolmonolaurats werden minimale Anteile an Glycerol und Glyceroldilaurat ermittelt. Im Reinstoffspektrum des Glyceroldilaurats wurde ein etwas größerer Anteil an Glycerolmonolaurat ermittelt und ein minimaler Anteil an Glyceroltrilaurat. Die unterschiedlichen Intensitäten der Gewichtungsfaktoren sind bei diesem Plausibilitätstest nicht von Bedeutung. Hierbei geht es lediglich darum, ob das Spektralmodell das passende Reinstoffspektrum reproduzierbar darstellen kann.

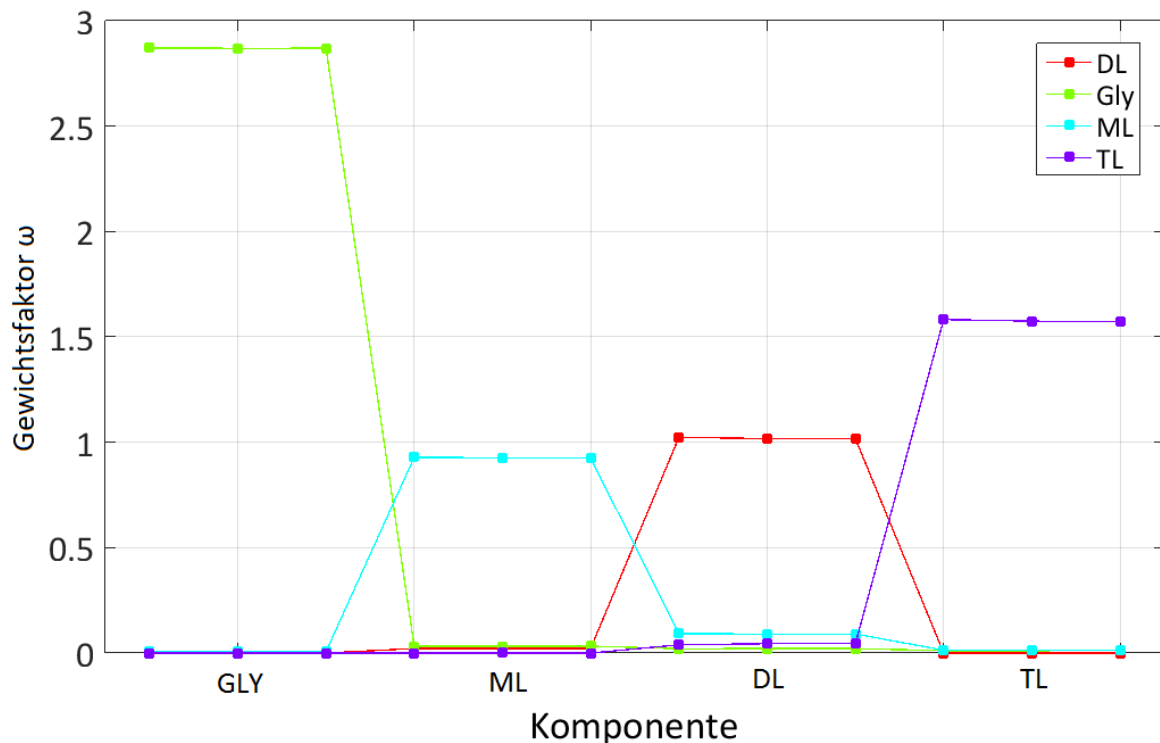


Abbildung 6.34: Plausibilitätstest der Spektralmodelle auf die Reinstoffspektren.

Aus den unbekanntem Spektren der Glycerolyse von Glyceroltrilaurat können bereits vor der Kalibrierung des chemometrischen Modells die Gewichtungsfaktoren ω_i aller Komponenten anhand der Spektralmodelle in der unpolaren Phase sehr gut ermittelt werden (siehe Abbildung 6.35). Der zeitliche Verlauf der Gewichtungsfaktoren ist für den spektralen Datensatz der Glycerolyse plausibel. Der spektrale Anteil des Substrates Glyceroltrilaurat nimmt über den Reaktionsverlauf ab und wird mit Glycerol umgesetzt zu den Partialglyceriden Glycerolmono.- und dilaurat. Deren spektrale Anteile nehmen über den Reaktionsverlauf

beide zu. Der spektrale Anteil des anderen Substrates Glycerol ist zunächst null zur Reaktionszeit bis 3h und nimmt dann zu, was den Löslichkeitseffekt des Glycerols in die unpolare Phase widerspiegelt. Durch den zeitaufgelösten Verlauf der Gewichtsfaktoren ist bereits vor der Kalibrierung ein qualitativer Trend aller Komponenten bekannt und lässt erste Ausblicke auf den quantitativen Reaktionsverlauf zu. Durch die Korrelation zu den Offline-Analysewerten (hier GC) kann dann eine quantitative Analyse mittels FTIR-Spektroskopie erfolgen (siehe die nächsten beiden Unterkapitel).

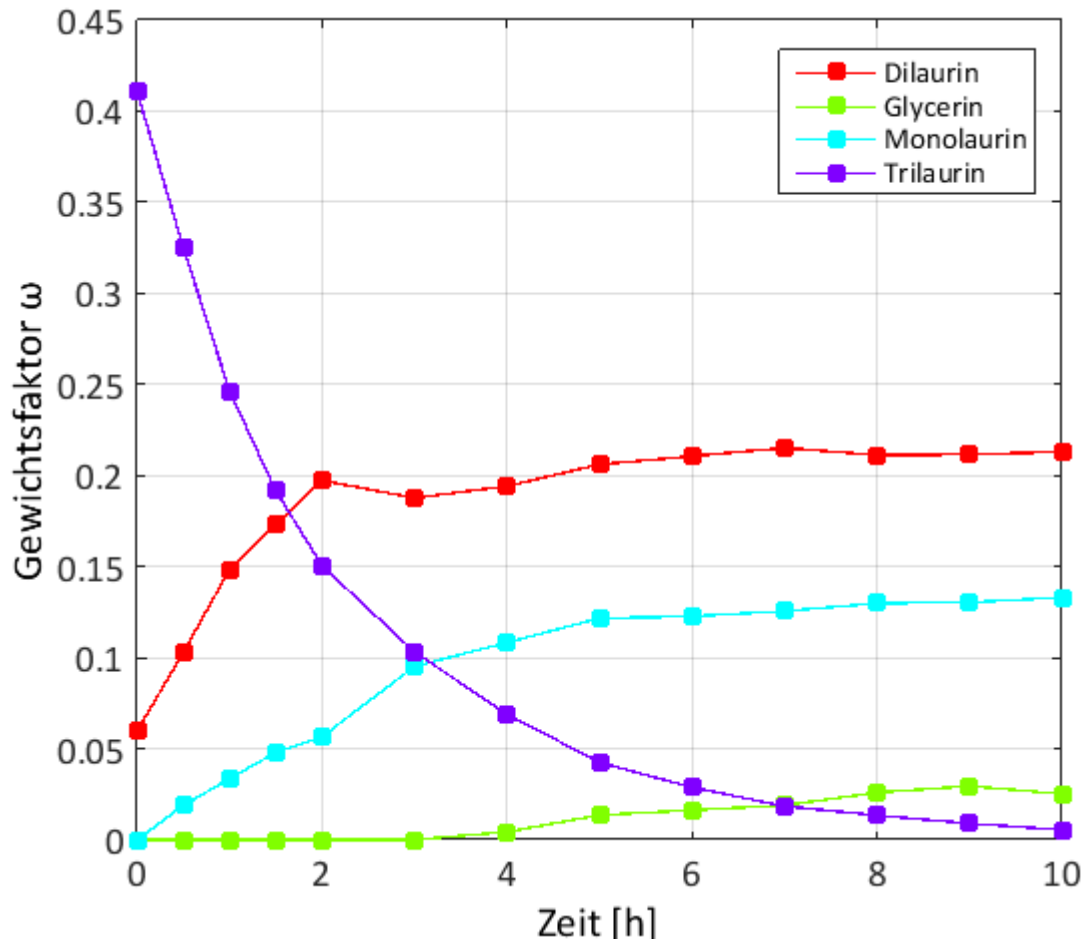


Abbildung 6.35: Zeitlicher Verlauf der Gewichtsfaktoren der Glycerolyse von Glyceroltrilaurat. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:LS von 1:3, Gesamtansatzgröße: 94 g, 2 Gew.-% Novozym 435®, T = 70 °C, Luftbegasung mit 0,75 L/min, Blasensäulenreaktor.

Kalibrierung der chemometrischen Modelle

Die Modellparameter des IHM-Modells sind in Tabelle 6.15 aufgelistet. Die Stoffmengenanteile aller Komponenten werden mit einer Regressionsfunktion „linear“ modelliert und mit einem Fehler kleiner gleich 3,3 Mol.-% aus dem unbekanntem spektralen Datensatz bestimmt. Dabei hat der Regressionskoeffizient R^2 der Kalibriergerade (siehe Abbildung 6.36) des Glycerols 62,5% den kleinsten Wert. Die unpolaren Komponenten haben ein R^2 größer 79%. Die Linearität aller Komponenten ist dadurch gegeben und das IHM-Modell

erscheint plausibel. Die Kalibrierung wurde mit der Regressionseinstellung „ratio“ durchgeführt.

Tabelle 6.15: Modellparameter des chemometrischen Modells.

Eigenschaft	Glycerol	Glycerol-monolaurat	Glycerol-dilaurat	Glycerol-trilaurat
	[mol _{LS} /mol]	[mol _{ML} /mol]	[mol _{DL} /mol]	[mol _{TL} /mol]
Funktion	Linear	Linear	Linear	Linear
R ²	0,6250	0,9072	0,7923	0,9947
RMSECV	0,0513	0,0483	0,0339	0,0215
RMSEP	0,0326	0,0248	0,0330	0,0136
Kalibrationsdatensatz			106	
Validierungsdatensatz			13	

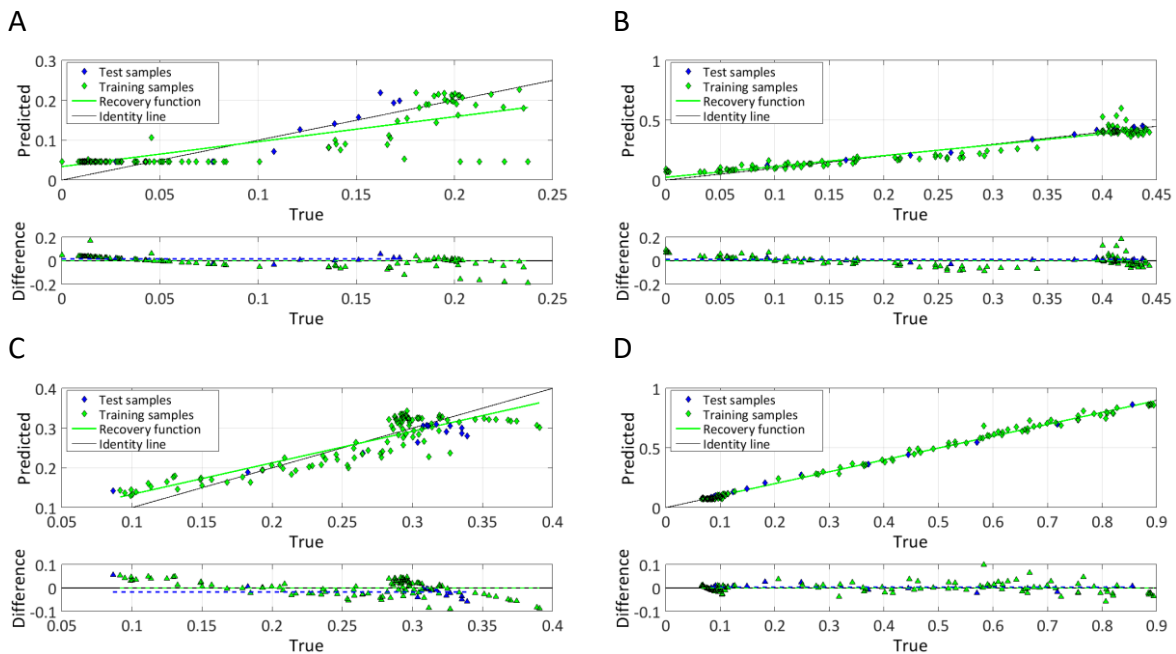


Abbildung 6.36: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Laurinsäure, C: Glycerolmonolaurat, D: Glyceroldilaurat.

Validierung des chemometrischen Modells

Im letzten Schritt der Modellerstellung wurde das IHM-Modell extern auf einen unbekanntem spektralen Datensatz validiert. Das erstellte chemometrische Modell wurde extern auf einen

FTIR-Datensatz einer Glycerolyse von Glyceroltrilaurat bei 65 °C mit einem Substratverhältnis von 2,5:1 angewendet (vergleiche Kapitel 6.2.4). Wie bereits in Kapitel 6.2.4 erwähnt, besteht auch mit dem IHM Modell keine Möglichkeit einer kontinuierlichen Überwachung des Prozessverlaufs der Stoffmengenanteile der Reaktion in der Mischungsphase. Die Glycerolyse kann ebenfalls nur semi-kontinuierlich in der Lipidphase des Reaktionssystems überwacht werden (siehe Abbildung 6.37). Für eine kontinuierliche Online-Überwachung der Reaktion müsste wie bereits erwähnt, eine kontinuierliche Phasentrennung vor der spektroskopischen Messung mittels ATR-Sonde stattfinden. Jedoch kann das Reaktionssystem durch die Etablierung des IHM Modells auf Basis der FTIR-Spektroskopie viel schneller analysiert werden als mit der herkömmlichen Offline-Analytik (z. B. Gaschromatographie). Alle Komponenten werden mit dem oben genannten Fehler sehr gut vom IHM-Modell wiedergegeben.

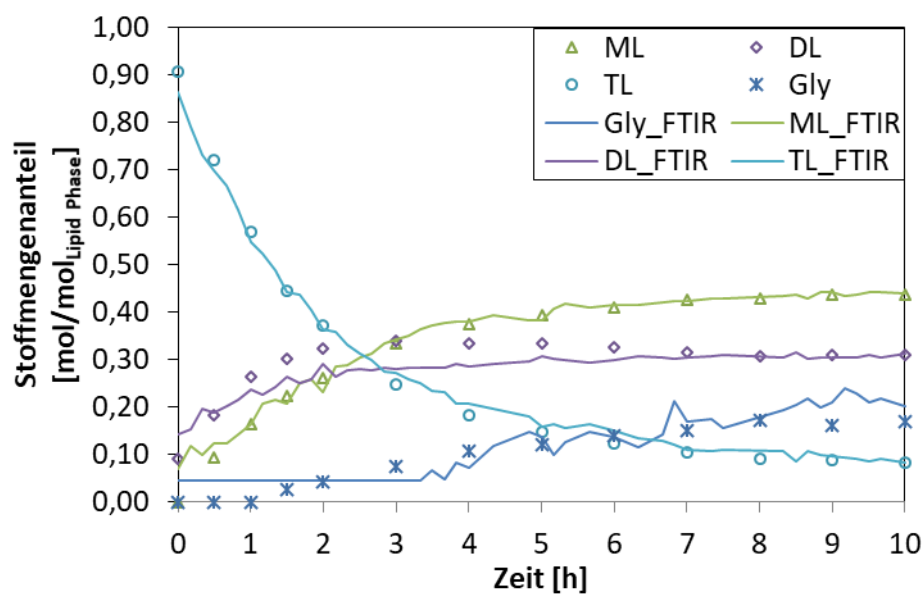


Abbildung 6.37: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher semi-kontinuierlicher Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie gemessen (kontinuierlicher Verlauf) einer Glycerolyse von Glyceroltrilaurat. *Gly*: Glycerol; *LS*: Laurinsäure; *ML*: Glycerolmonolaurat; *DL*: Glyceroldilaurat; *TL*: Glyceroltrilaurat. **Reaktionsbedingungen:** Molares Substratverhältnis Gly:TL=2,5:1; Ansatzgröße: 173,45 g, T = 65 °C; 10 Gew.-% Enzym; Luftbegasung mit 1 L/min.

6.4 Vergleich PLS – IHM

Im Folgenden werden die beiden Algorithmen anhand ihrer Vorhersagefehler RMSEP der einzelnen Komponenten, der hier als Kenngröße dienen soll, verglichen werden. In Tabelle 6.16 sind dafür die Vorhersagefehler in Mol.-% aller Komponenten für alle Reaktionen gegenübergestellt.

Tabelle 6.16: Vergleich der RMSEP-Werte der IHM/PLS-Modelle für alle Reaktionsmechanismen. **A:** Veresterung von Glycerol und Laurinsäure im Überschuss; **B:** Veresterung von Glycerol im Überschuss und Laurinsäure; **C:** Veresterung von Glycerol und Laurinsäure auf Fed-Batch Verfahrensweise mit Laurinsäurezufuhr; **D:** Glycerolyse von Glyceroltrilaurat. RMSEP: Vorhersagefehler in Mol.-% (engl.: root mean square error of prediction). *¹ Die Kalibrierung wurde ohne Glycerol durchgeführt. Dafür wurde der Stoffmengenanteil bei den Offline-Analysewerten abgezogen. *² Die beiden Glycerolester Glyceroldi- und trilaurat wurden als Summenparameter in der Reaktionsmischung betrachtet, da Glyceroltrilaurat nur in sehr geringen Stoffmengenanteilen enthalten ist. *³ Laurinsäure ist nur als Spurenelement zu Beginn der Reaktion in der Mischung vorhanden. Beide Modelle wurden jeweils nur in der unpolaren Phase der Reaktionsmischung modelliert.

Reaktionsmechanismus	Glycerol		Laurinsäure		Glycerolmonolaurat		Glyceroldilaurat		Glyceroltrilaurat	
	IHM RMSEP [Mol.-%]	PLS RMSEP [Mol.-%]	IHM RMSEP [Mol.-%]	PLS RMSEP [Mol.-%]	IHM RMSEP [Mol.-%]	PLS RMSEP [Mol.-%]	IHM RMSEP [Mol.-%]	PLS RMSEP [Mol.-%]	IHM RMSEP [Mol.-%]	PLS RMSEP [Mol.-%]
A	/ ^{*1}	/ ^{*1}	3,8	4,3	5,0	2,4	4,5	5,9	3,4	3,8
B	13,2	16,5	4,5	7,1	3,4	5,9	3,2	4,2	/ ^{*2}	0,3
C	3,8	1,5	1,0	0,8	3,9	1,0	1,8	1,2	/ ^{*2}	1,0
D	3,3	2,3	/ ^{*3}	/ ^{*3}	2,5	0,9	3,3	1,8	1,4	2,1

Aus der Tabelle sind keine signifikanten Unterschiede im Vorhersagefehler RMSEP der jeweiligen Komponenten zu erkennen. Beide Algorithmen können zur Modellierung der chemometrischen Modelle mit folgenden Erkenntnissen verwendet werden:

1. Mehrphasige Reaktionsmechanismen sind mittels FTIR-ATR-Spektroskopie nur schwer reproduzierbar messbar, wodurch die chemometrische Modellierung erheblichen Einschränkungen unterliegt.
2. Sobald eine stark unpolare Reaktionskomponente im Überschuss in der Reaktionsmischung vorliegt (hier Laurinsäure z. B. bei Reaktionsmechanismus A), beschränkt sich das chemometrische Modell nur auf die unpolare Phase.
3. Sobald eine stark polare Reaktionskomponente im Überschuss in der Reaktionsmischung vorliegt (hier Glycerol), ist diese Komponente mittels der chemometrischen Modelle nur mit einem großen Fehler aus der Mischung bestimmbar.
 - a. Wird dabei die unpolare Komponente nur in geringen Anteilen in der Reaktionsmischung gehalten, wird durch das veränderte Phasenverhalten,

welches sich positiv auf die FTIR-Spektroskopie mittels ATR-Sonde auswirkt, eine Optimierung der Modelle bezüglich des Vorhersagefehlers RMSEP erreicht.

- b. Wird dann nur in der unpolaren Lipid-Phase gemessen, wird die Güte beider Modelle und somit die Anwendbarkeit ebenfalls optimiert.

Vergleichend kann jedoch gesagt werden, dass der Aufwand des Kalibrierens beim IHM-Modell geringer als beim Partial Least Squares-Algorithmus (PLS) ist und der Modellierungsaufwand größer beim IHM-Algorithmus ist. Mit dem IHM-Modell lassen sich bereits vor der Kalibrierung der chemometrischen Modelle qualitative Aussagen über den Verlauf der Reaktion ableiten. Dieses ist beim PLS-Algorithmus nicht möglich. Ein weiterer Vorteil des IHM-Modells ist, dass es in Bereichen außerhalb des Kalibrierbereiches gültig und anwendbar ist, wohingegen das PLS-Modell streng genommen nur in Bereichen angewendet werden darf, welche auch in der Kalibrierung berücksichtigt wurden.

7 Prozesssteuerung einer Fed-Batch Veresterung^o

In industriellen Herstellungsprozessen werden viele Parameter wie z. B. Reaktionsselektivität, Nebenproduktbildung, Energieverbrauch, etc. kontrolliert, um den Gesamtprozess zu optimieren und Kosten zu senken. Infolgedessen müssen während der Synthese eine große Anzahl an Offline-Analysen durchgeführt werden. Hierbei kommen herkömmliche Analysemethoden wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Gaschromatographie (GC) und Karl-Fischer-Titration zum Einsatz, um einen permanenten Informationsfluss zu gewährleisten und eine stabile Prozesskontrolle zu garantieren [Schügerl 2001]. Jedoch können sich die Reaktionsbedingungen minutenweise ändern und die stundenweise ermittelten Offline-Reaktionsparameter korrelieren nicht mehr zum aktuellen Status des Prozesses. Daher sind Online-Messmethoden zur Überwachung und Steuerung des Prozesses in Echtzeit von großem Interesse. Der Fokus in diesem Kapitel ist die Online-Prozesssteuerung einer Biotransformation durch den Einsatz eines Fourier-Transform-Infrarotspektrometers (FTIR-Spektrometer) ausgestattet mit einer ATR-Sonde (Abgeschwächte Totalreflexion). Die Anwendungsmöglichkeit für die Prozessanalysen-Technologie (PAT) am Beispiel der enzymatischen Veresterung von Laurinsäure und 1-Decanol im Fed-Batch Reaktor ist im Folgenden dargestellt (siehe Abbildung 7.1).

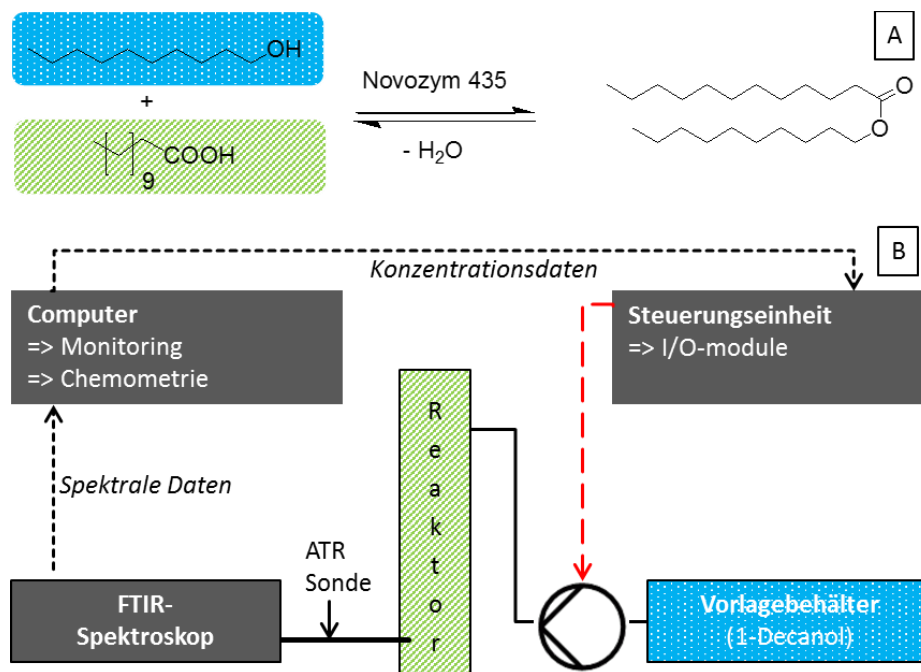


Abbildung 7.1: Reaktionssequenz der Veresterung von 1-Decanol und Laurinsäure zur Synthese von Decylaurat [A]. Fließschema der Prozesssteuerung der Fed-Batch Biotransformation [B].

Als Modellreaktion wurde die einphasige enzymatische Veresterung von Laurinsäure und 1-Decanol untersucht (siehe Abbildung 7.1A) für die Etablierung einer diskontinuierlichen und

^o Teile der Ergebnisse dieses Kapitels wurden im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Elena Eßer erzeugt: Etablierung einer in situ Analytik für die enzymatische Glycerolyse von Trilaurin mittels FT-IR-Spektroskopie, Masterarbeit, TU-Hamburg-Harburg, 2015

kontinuierlichen Fed-Batch-Prozesssteuerung (siehe Abbildung 7.1B). Das Produkt Decyllaurat ist ein nicht-ionisches Tensid, welches als Weichmacher in der kosmetischen Industrie eingesetzt wird [Goldenberg 1971]. Eine verlässliche Prozesssteuerung basierend auf Offline-Analysenmethoden zu implementieren ist sehr schwierig aufgrund von einigen Nachteilen. Offline-Analysen sind invasiv, fehleranfällig, zeitaufwendig und diskontinuierlich. Allerdings ist für einen reproduzierenden Prozess mit hoher Produktqualität und Ausbeute eine automatisierte Prozesssteuerung erforderlich [Haake et al. 2009]. Ein potentiell Analysegerät für eine Online-Prozesssteuerung ist das FTIR-Spektroskop mit einer ATR-Sonde [Kessler 2012, 2013]. Die lösungsmittelfreie enzymatische Veresterung von Laurinsäure und 1-Decanol, katalysiert durch Novozym 435[®], wurde in einem Blasensäulenreaktor durchgeführt. Dabei wurde jeweils Laurinsäure im Reaktor vorgelegt und 1-Decanol mittels einer Mikrozahnpumpe zu dosiert (siehe Abbildung 7.1 A/B). Der Blasensäulenreaktor wurde mit einer ATR-Sonde ausgestattet. Dadurch wird eine *in-line* Analytik unter Prozessbedingungen in Echtzeit ermöglicht. Die online im Reaktor erfassten spektralen Daten werden an den Computer weitergeleitet. Durch chemometrische Modelle mittels PLS-Regression können die spektralen Daten in Stoffmengenanteile umgewandelt und am PC verfolgt werden. Die Stoffmengen-Daten wurden der Prozesssteuerungseinheit übermittelt. Mittels eines Stromsignals im Bereich von 4-20 mA kann die Pumpe analog angesteuert werden und 1-Decanol dem Reaktionssystem zugeführt werden. Im Folgenden werden verschiedene Prozesssteuerungsmöglichkeiten für dieses Reaktionssystem dargestellt. Zunächst wurde die diskontinuierliche Prozesssteuerung erfolgreich etabliert. Eine diskontinuierliche Prozesssteuerung meint in diesem Zusammenhang eine diskontinuierliche Steuerung der Feed-Pumpe. Eine kontinuierliche Steuerung hingegen passt jederzeit die Förderleistung der Feed-Pumpe an.

7.1 Kalibrierung und Validierung des chemometrischen Modells

Als FTIR-Spektrometer wurde das Bruker Matrix-MF verwendet. Dieses war mit einer Silberhalogenid Diamant ATR Sonde IN350-T ausgestattet [Minnich et al. 2007]. Das Spektrometer wurde mit 40 L/h trockenem gasförmigen Stickstoff gespült, um einen konstanten Feuchtegehalt und Kohlenstoffdioxidgehalt im Messbereich zu gewährleisten. Die spektralen Daten wurden im Wellenlängenbereich von 4000-650 cm^{-1} mit 32 Scans per Spektrum durch einen Stickstoff gekühlten MCT-Detector (Quecksilber-Cadmium-Tellurid) aufgenommen und mit der Software OPUS 7.0 aufgezeichnet. Die multivariate Datenanalyse wurde mit der Auswertesoftware Quant 2.0 (Zusatzpaket bei OPUS 7.0; Bruker Corporation, MA, USA) durchgeführt. Damit wurden die Kalibrationsspektren vorbehandelt:

- Beschneiden der Spektren im Wellenlängenbereich zwischen 1800 – 972 cm^{-1} .
 - In diesem spektralen Bereich ist die Carboxylschwingung der Laurinsäure bei 1700 cm^{-1} , die Carbonylschwingung von Decyllaurat bei 1730 cm^{-1} und Teile des

Fingerprint Bereiches, der Information über die Gerüstschiwingung der einzelnen Moleküle gibt.

- Basislinienkorrektur durch „Straight Line Subtraction“.
 - Diese Korrektur subtrahiert eine gerade Linie vom Spektrum und korrigiert dadurch die Basislinie des Spektrums.

- „MinMax-Normalisierung“ im Wellenlängenbereich 1520 – 1435 cm^{-1} .
 - Durch diese Vorbehandlung wird das Spektrum im gewählten Bereich 1520 – 1435 cm^{-1} auf der Y-Achse (Absorption) auf ein Minimum (Absorption = 0) und auf ein Maximum (Absorption = 2) normiert. Dies ist nur sinnvoll anzuwenden, wenn in diesem Wellenbereich des Spektrums keine Änderung auftreten. In diesem Fall traten hier über den Reaktionsverlauf keine Änderungen auf.

Basis des Modells waren vier Experimente:

- Molares Verhältnis 1:1
- Molares Verhältnis 0,67:1
- Molares Verhältnis 1,5:1
- Manueller Fed-Batch Versuch mit LS Vorlage und manueller Zugabe von 3,2 g 1-Decanol

Tabelle 7.1: Modellparameter des chemometrischen Modells. Fehler der Kreuzvalidierung (RMSECV: Root Mean Square Error of Cross Validation). Anzahl an Kalibrationsspektren: 53.

Substanz	PLS Komponenten	RMSECV [mol.%]	R ²
Laurinsäure	4	2,34	98,92
1-Decanol	4	0,95	99,53
Decyllaurat	4	2,77	99,08

7.2 Diskontinuierliche Prozesssteuerung

Differenzial $dx_{1\text{-Decanol}}/dt$ als Prozesssteuerungsparameter

Die diskontinuierliche Prozesssteuerung wurde zunächst mit der zeitlichen Änderung des Stoffmengenanteils von 1-Decanol $dx_{1\text{-Decanol}}/dt$ als Prozesssteuerungsparameter durchgeführt. Ziel war es hier die Pumpe für eine gewisse Pumpzeit t_{Pump} zu starten, sobald der Prozessparameter $dx_{1\text{-Decanol}}/dt$ den Grenzwert mit Toleranzbereich erreicht. Die Pumpzeit t_{Pump} der Mikrozahnrادpumpe wurde auf 5 s eingestellt. Hierfür wurden in der Software ProfiSignal (Delphin Technologies AG, Bergisch Gladbach, Deutschland) folgende Kanäle erstellt:

- Differenziator (Δ Stoffmengenanteil_{1-Decanol} / Δ Zeitstempel)
 - Dieser Kanal ist das Differenzial $dx_{1\text{-Decanol}}/dt$ und ist der Prozesssteuerungsparameter.
- Mittelwertkanal (Minimiert das Signalrauschen)
 - Bildet den Mittelwert aus 5 Werten des Differenziators.
- Grenzkanal (legt den Sollwert des Prozesssteuerungsparameters $dx_{1\text{-Decanol}}/dt = 0$ fest, sowie den Toleranzbereich von ± 0.001144 1/min und eine Verzögerungszeit von 30 s)
 - Mit diesem Kanal wird der Sollwert des Prozesssteuerungsparameters festgelegt, sowie deren Toleranzbereich. Sobald der Mittelwert des Differenziators für 30 s im Toleranzbereich des Grenzwertes liegt, wird der Delay-Timer aktiviert.
- Delay-Timer (legt die Pumpzeit t_{Pump} fest)
 - Die Mikrozahnrادpumpe fördert für 5 s 1-Decanol mit einer Pumprate von 11,4 mL/min in den Blasensäulenreaktor und wird dann wieder abgeschaltet.

Der Grundgedanke bei dieser diskontinuierlichen Prozesssteuerung ist in der Abbildung 7.2 A/B dargestellt – es ist jeweils der zeitliche Verlauf des Verbrauchsterms $dx_{1\text{-Decanol}}/dt$ dargestellt. Sobald der Prozesssteuerungsparameter $dx_{1\text{-Decanol}}/dt$ für 30 s im Toleranzbereich des Sollwertes liegt, soll die Pumpe jeweils für 5 s 1-Decanol aus dem Vorlagebehälter mit einer Pumprate 11,4 mL/min. in den Blasensäulenreaktor fördern. Das zweite Substrat Laurinsäure wurde dabei im Blasensäulenreaktor vorgelegt. In beiden Abbildungen ist die Pumpenförderung jeweils zu erkennen durch einen Anstieg des Differenziators $dx_{1\text{-Decanol}}/dt$. Nach Beendigung des Pumpvorgangs fällt der Wert des Differenziators in den negativen Bereich und nähert sich zeitlich an den Wert null an, was einen kompletten Abbau von 1-Decanol zu Decyllaurat entspricht, da 1-Decanol ein Substrat ist und zu dem Produkt Decyllaurat umgesetzt wird.

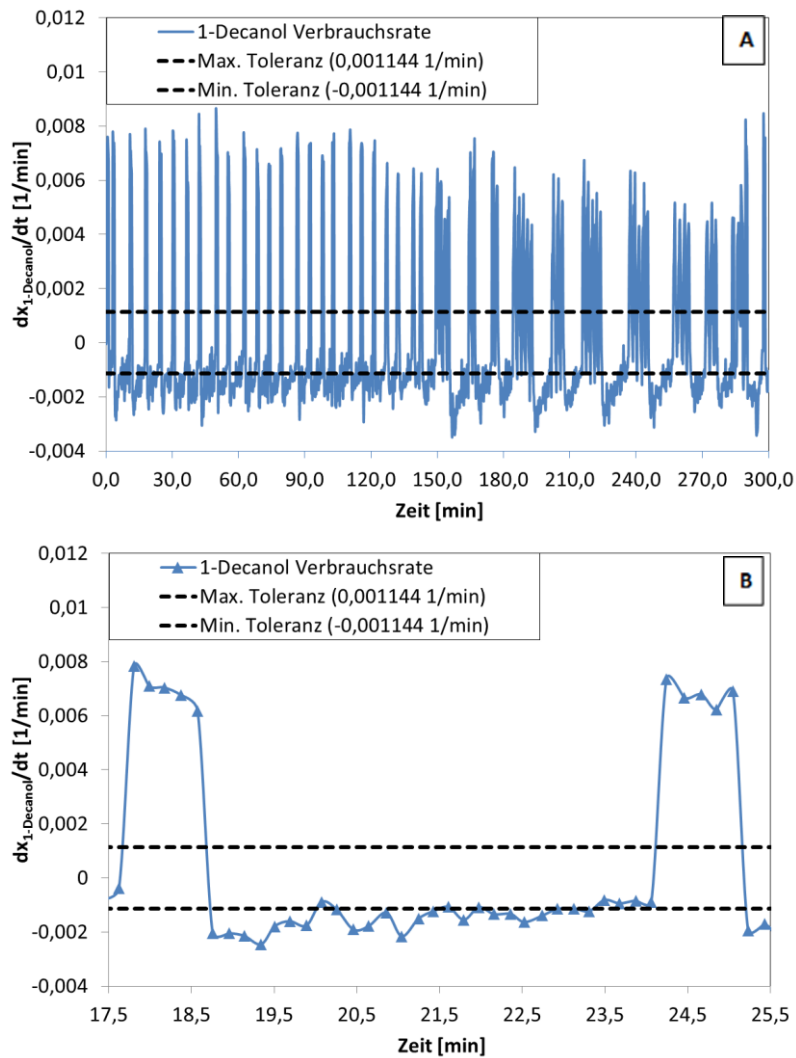


Abbildung 7.2: Verbrauchsrate von 1-Decanol ($dx_{1-\text{Decanol}}/dt$) in $1/\text{min}$ und die Maximum/Minimum Toleranz von $\pm 0,001144$ $1/\text{min}$ für die diskontinuierliche Prozesssteuerung im Zeitfenster von 300 min: [A] und im Zeitfenster von 17,5 bis 25,5 min. [B]. **Reaktionsbedingungen:** $T = 55,6$ °C, 1 atm. Luftbegasung mit 0,75 L/min., 1 Gew.-% Novozym 435®, 200 mmol Laurinsäure im Reaktor; 200 mmol 1-Decanol im Vorlagebehälter; 1-Decanol Pumprate: 11,4 ml/min., Blasensäulenreaktor.

In Abbildung 7.3 sind die Stoffmengenverläufe dargestellt. Laurinsäure wurde jeweils in den Blasensäulenreaktor vorgelegt ($x_{\text{LS},0} = 1$) und 1-Decanol diskontinuierlich zudosiert. Zum Ende der Reaktion wird ein Vollumsatz erreicht ($x_{\text{Decyllaurat},\text{final}} = 1$). Eine diskontinuierliche Prozesssteuerung wurde erfolgreich etabliert, wobei die Pumpzeit für 1-Decanol flexibel einstellbar ist.

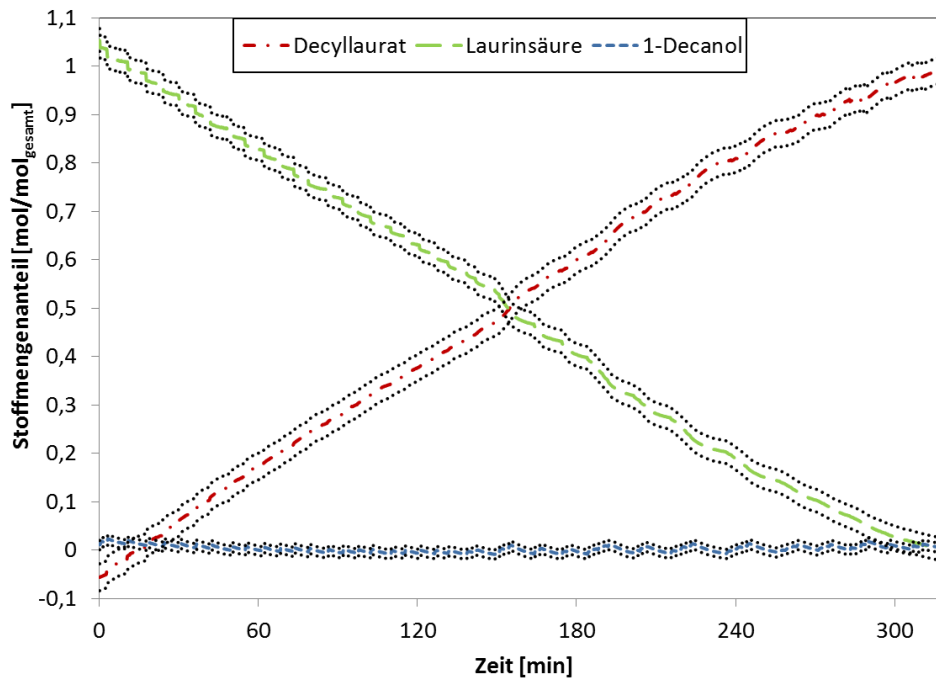


Abbildung 7.3: Modellierter Stoffmengenverlauf der enzymatischen Veresterung von Laurinsäure (grün) und 1-Decanol (blau) zu Decyllaurat (rot) in einem Blasensäulenreaktor als Fed-Batch Modus mit dem Differenzial $dx_{1\text{-Decanol}}/dt$ als Prozesssteuerungsparameter. Gepunktete Linien um die Stoffmengenverläufe stellen jeweils das Unsicherheitsintervall des chemometrischen Modells dar. **Reaktionsbedingungen:** $T = 55,6 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm. Luftbegasung mit $0,75 \text{ L/min.}$, 1 Gew.-% Novozym 435®, 200 mmol Laurinsäure im Reaktor; 200 mmol 1-Decanol im Vorlagebehälter; 1-Decanol Pumprate: $11,4 \text{ ml/min}$, 1-Decanol Pumpzeit $t_{\text{pump}} = 5 \text{ s}$, Blasensäulenreaktor.

Stoffmengenanteil $x_{1\text{-Decanol}}$ als Prozesssteuerungsparameter

Eine weitere Ausführung der diskontinuierlichen Prozesssteuerung zeigt dieses Beispiel. Hier wurde der absolute Stoffmengenanteil von 1-Decanol $x_{1\text{-Decanol}}$ als Prozesssteuerungsparameter verwendet. Die Idee ist es, den Stoffmengenanteil von 1-Decanol in einem begrenzten Bereich des Stoffmengenanteils zu halten. Hierfür wurden maximale und minimale Grenzen für den Stoffmengenanteil von 1-Decanol definiert (siehe Abbildung 7.4). Der maximale Grenzwert des Stoffmengenanteils für 1-Decanol wurde auf $x_{1\text{-Decanol,max}} = 0,0220 \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}}$ (2,20 mol.%) festgelegt. Der minimale Grenzwert des Stoffmengenanteils für 1-Decanol wurde variiert von $x_{1\text{-Decanol,min}} = 0,0076 \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}} - 0,0170 \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}}$ (0,76 – 1,70 mol.%). Somit wurde sich einer kontinuierlichen Prozesssteuerung angenähert. Die Pumpe wurde bei diesem Versuch weiterhin diskontinuierlich angesteuert. Ziel war es hier die Mikrozahnradschleuse beim Erreichen des minimalen Grenzwertes $x_{1\text{-Decanol,min}}$ mit einer Pumprate von $11,4 \text{ ml/min}$ zu starten. Die Pumpe wurde automatisch beim Erreichen des maximalen Grenzwertes $x_{1\text{-Decanol,max}}$ gestoppt. So wurde es ermöglicht, den Stoffmengenanteil an 1-Decanol im System in einem definierten Bereich zu halten.

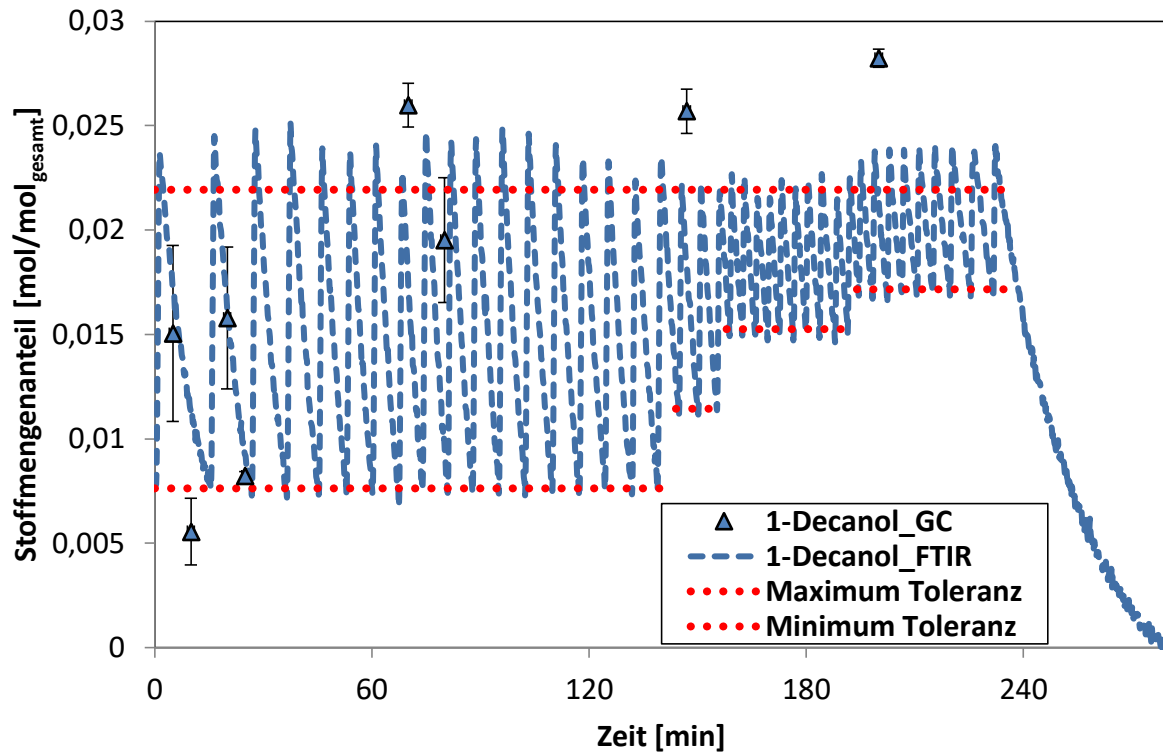


Abbildung 7.4: Stoffmengenanteilverlauf von 1-Decanol $x_{1\text{-Decanol}}$ als Prozesssteuerungsparameter für eine diskontinuierliche Pumpensteuerung mit einem maximalen Grenzwert von $x_{1\text{-Decanol,max}} = 0,022 \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}}$ und einem minimalen Grenzwert im Bereich von $x_{1\text{-Decanol,min}} = 0,0076 \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}} - 0,017 \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}}$. **Reaktionsbedingungen:** $T = 55,6 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm. Luftbegasung mit $0,75 \text{ L/min.}$, 1 Gew.-% Novozym 435®, 200 mmol Laurinsäure im Reaktor; 200 mmol 1-Decanol im Vorlagebehälter; 1-Decanol Pumprate: $11,4 \text{ ml/min.}$, Blasensäulenreaktor.

In Abbildung 7.5 sind die Stoffmengenanteile aller Komponenten dargestellt. Auch hier wurde Laurinsäure im Blasensäulenreaktor vorgelegt und 1-Decanol im Vorlagebehälter vorgelegt. Zum Ende der Reaktion wurde ein Vollumsatz erreicht.

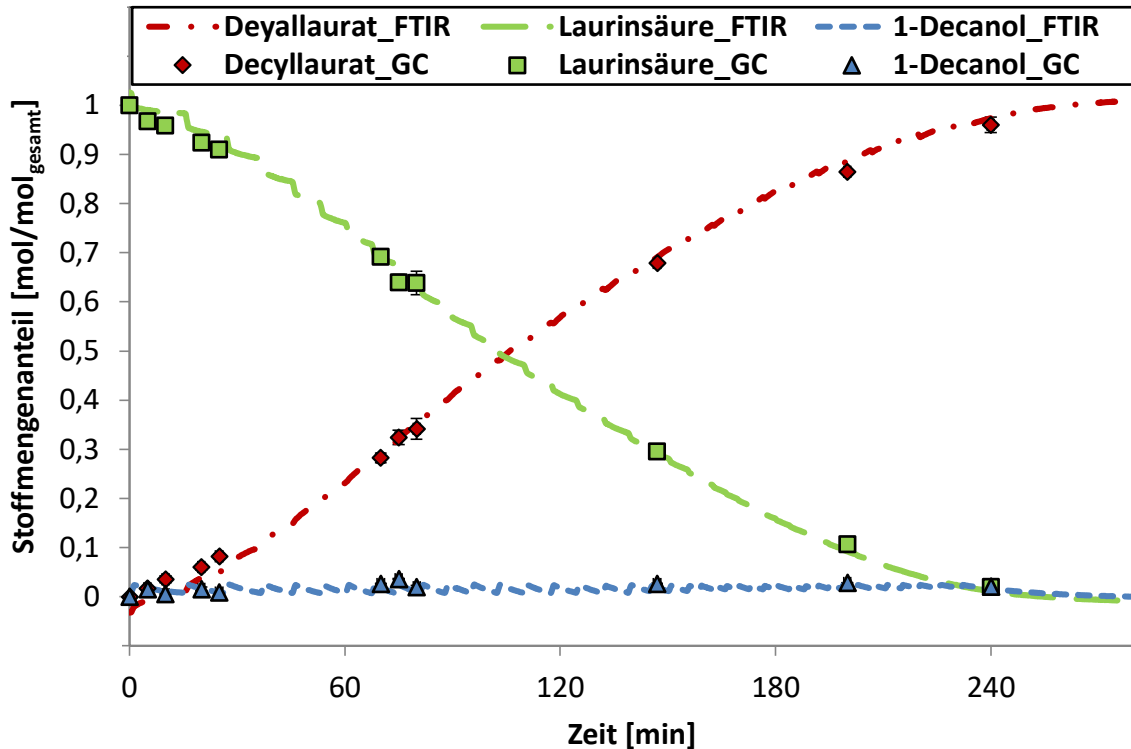


Abbildung 7.5: Verlauf der Stoffmengenanteile der enzymatischen Veresterung von Laurinsäure (grün) und 1-Decanol (blau) zu Decyllaurat (rot) in einem Blasensäulenreaktor als Fed-Batch Modus mit dem absoluten Stoffmengenanteil $x_{1\text{-Decanol}}$ als Prozesssteuerungsparameter. **Reaktionsbedingungen:** $T = 55,6 \text{ } ^\circ\text{C}$, 1 atm, Luftbegasung mit 0,75 L/min., 1 Gew.-% Novozym 435®, 200 mmol Laurinsäure im Reaktor; 200 mmol 1-Decanol im Vorlagebehälter; 1-Decanol Pumprate: 11,4 ml/min., Blasensäulenreaktor.

7.3 Kontinuierliche Prozesssteuerung

In diesem Unterkapitel wird die Etablierung einer kontinuierlichen Prozesssteuerung einer Biotransformation am Beispiel der Veresterung von Laurinsäure und 1-Decanol zu Decyllaurat dargestellt. Hierfür wurde ein PI-Regler (Proportional-Integral-Regler) in der Steuerungssoftware erstellt. Als Prozesssteuerungsparameter für diesen Regler diene der Verbrauchsterm des Stoffmengenanteils an Laurinsäure $dx_{\text{Laurinsäure}}/dt$. In der Abbildung 7.6 A/B sind die theoretischen Grundlagen eines PI-Reglers dargestellt, dabei zeigt die Abbildung 7.6 A das Fließbild und Abbildung 7.6 B die Sprungantwort des Reglers. Die gemessene Prozessvariable (PV) wird mit einem definierten Sollwert (SP) verglichen und eine Regelabweichung ($e(t)$) wird gebildet. Die Regelabweichung wird dem PI-Regler übermittelt und mittels den Verstärkungskonstanten des proportionalen Anteils K_P , sowie des integralen Anteils T_N manipuliert (MV). Dieser manipulierte Wert (MV) agiert kontinuierlich auf die Pumprate von 1-Decanol. Die Pumprate wird somit kontinuierlich angepasst. In diesem Beispiel wurden folgende Werte definiert:

- gemessene Prozessvariable PV ? $dx_{\text{Laurinsäure}}/dt$ (Differenziator)
- Sollwert SP ? $SP = -0.0058 \text{ 1/min}$
- Proportionale Konstante K_P ? $K_P = 0.05$
- Integrale Konstante T_N ? $T_N = 1 \text{ s}$

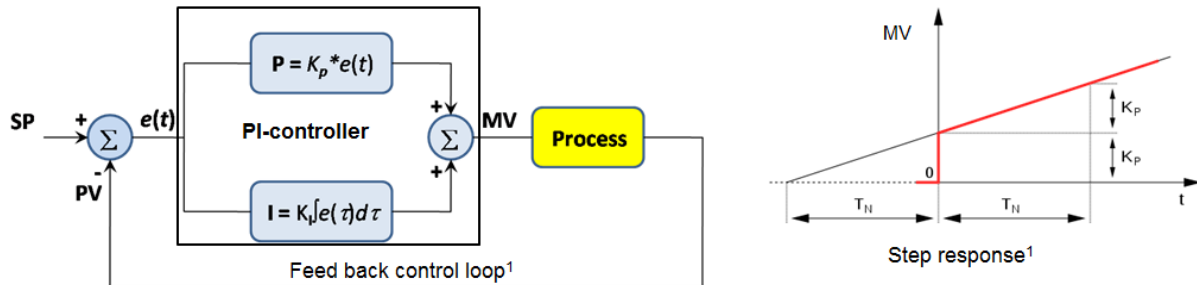


Abbildung 7.6: Darstellung eines Feed back control loops und der Sprungantwort eines PI-Reglers.

Die Abbildung 7.7 stellt den zeitlichen Verlauf des Stoffmengenanteils an Laurinsäure dar und soll den Grundgedanken zur Festlegung des Sollwertes SP verdeutlichen. Die Laurinsäure soll innerhalb von 150 min von 1 mol/mol_{gesamt} auf 0,15 mol/mol_{gesamt} abgebaut werden (siehe Gleichung unter der Abbildung 7.7). Es ergibt sich somit ein linearer Verlauf des Stoffmengenanteils der Laurinsäure mit einem konstanten Verbrauchsterm von $dx_{\text{Laurinsäure}}/dt = -0,0058 \text{ 1/min}$, welcher als Sollwert festgelegt wurde.

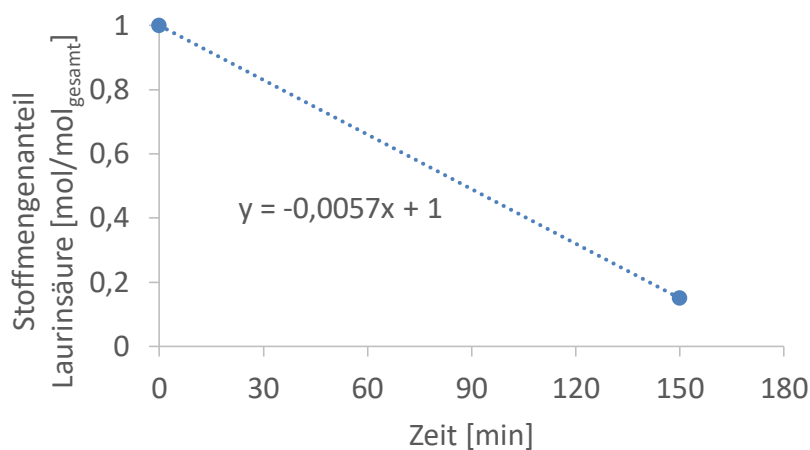


Abbildung 7.7: Darstellung des Grundgedankens zur Festlegung des Sollwertes SP, der auf den Verbrauchsterm der Laurinsäure basiert.

$$\frac{\Delta x_{\text{Laurinsäure}}}{\Delta t} = \frac{(0,15-1) \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}}}{(150-0) \text{ min}} = -0,0058 \left[\frac{1}{\text{min}} \right]$$

Im Folgenden ist das Ergebnis der kontinuierlichen Prozesssteuerung mittels eines PI-Reglers mit dem Verbrauchsterm des Stoffmengenanteils an Laurinsäure $dx_{\text{Laurinsäure}}/dt$ als Prozesssteuerungsparameter dargestellt. In Abbildung 7.8 sind die zeitlichen Verläufe der Stoffmengenanteile auf der Primärachse, sowie die Pumprate von 1-Decanol auf der

Sekundärachse aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die Prozesssteuerung erfolgreich durchgeführt werden konnte. Zu Beginn der Reaktion wird zunächst kurz mit einer Pumprate von 1,5 mL/min 1-Decanol ins System gefördert. Nach kurzer Zeit wird der Sollwert geregelt und die Pumprate kontinuierlich angepasst. Ab 120 min fängt die Pumprate exponentiell zu steigen an. Dies wird wahrscheinlich durch die niedrige Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund einer niedrigen Stoffmenge der Laurinsäure verursacht. Die Pumprate von 1-Decanol muss erhöht werden, um den Verbrauchsterm von Laurinsäure auf dem Sollwert zu halten. Der Verbrauchsterm der Laurinsäure setzt sich hierbei aus einem Reaktionsterm und einem Verdünnungsterm, verursacht durch die 1-Decanol Förderung ins System, zusammen.

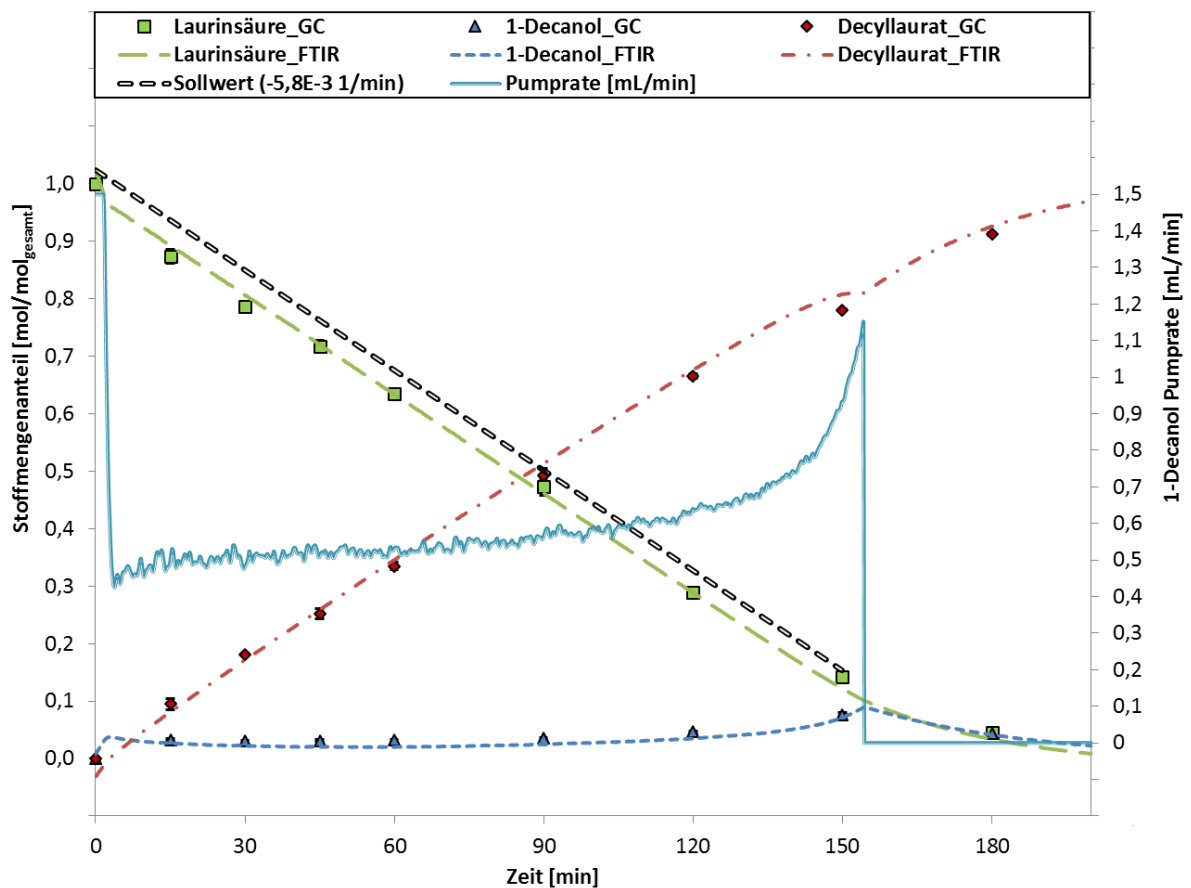


Abbildung 7.8: Verlauf der Stoffmengenanteile der enzymatischen Veresterung von Laurinsäure (grün) und 1-Decanol (blau) zu Decyllaurat (rot) in einem Blasensäulenreaktor als Fed-Batch Modus mit dem Verbrauchsterm des Stoffmengenanteils an Laurinsäure $dx_{\text{Laurinsäure}}/dt$ als Prozesssteuerungsparameter für eine kontinuierliche Pumpensteuerung. **Reaktionsbedingungen:** $T = 55,6 \text{ } ^\circ\text{C}$, 1 atm. Luftbegasung mit 0,75 L/min., 1 Gew.-% Novozym 435®, 200 mmol Laurinsäure im Reaktor; 200 mmol 1-Decanol im Vorlagebehälter; Blasensäulenreaktor.

Zusammenfassung Kapitel 7:

- Diese Untersuchungen zur Etablierung einer Prozesssteuerung für die Fed-Batch-Veresterung von einfachen Alkoholen legt die Grundlagen, um zukünftig auch

Prozesssteuerungen von Fed-Batch-Prozessen mit Polyolen, wie z.B. Glycerol und Polyglycerol durchzuführen

- Die Zulauftrate einer einphasigen Biotransformation kann erfolgreich diskontinuierlich, sowie kontinuierlich mittels ATR-FTIR-Spektroskopie online gesteuert werden.
- Dabei kann diskontinuierlich der Bereich des Stoffmengenanteils an 1-Decanol in einem Stoffmengenanteilsbereich von 0,0076 – 0,022 mol/mol gehalten werden.
- Ebenso war es möglich die Verbrauchsrate an 1-Decanol diskontinuierlich so zu steuern, dass ein Minimalwert an Verbrauch nicht unterschritten wird.
- Bei der kontinuierlichen Prozesssteuerung wurde erfolgreich die Verbrauchsrate an Laurinsäure durch das Steuern der Zulauftrate an 1-Decanol konstant gehalten.

8 Übergreifende Diskussion & Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die enzymatischen Reaktionen von Glycerol und Laurinsäure, sowie Glycerol und Glyceroltrilaurat detailliert hinsichtlich der Glycerolmonolaurat-Reaktionsselektivität und des Einflusses des Phasenverhaltens untersucht sowie die Grenzen des Reaktionssystems aufgezeigt. Basierend darauf konnte durch den Zusatz des amphoteren Tensides Cocoamidpropyl Betain die Selektivität der Reaktion bezüglich Glycerolmonolaurat optimiert werden. Zusätzlich wurde erfolgreich eine Online-ATR-FTIR-Analytik etabliert, diese wurde zur Online-Prozessüberwachung genutzt und die Grenzen dieser Analytik in einer Mehrphasenreaktionen aufgezeigt. Abschließend wurde in einer einphasigen enzymatischen Fed-Batch-Reaktion von 1-Decanol und Laurinsäure der Grundstein für die Prozesssteuerung mittels ARR-FTIR-Spektroskopie gelegt. Hierbei wurde die Laurinsäurezufuhr mit einer Online-Prozesssteuerung mittels ATR-FTIR-Spektroskopie gesteuert. Die einzelnen Ergebnisse wurden bereits am Ende der jeweiligen Unterkapitel diskutiert, sodass im Folgenden eine kapitelübergreifende Diskussion eingegangen wird und die sich daraus ergebenden Perspektiven für weitere Untersuchungsansätze im Ausblick aufgezeigt werden.

Wie bereits in der Einleitung und im Kapitel Stand der Technik (vergleiche Kapitel 1 & 2) erwähnt sind Glycerolmono- und dilaurat, Partialglyceride des Glycerols, wirtschaftlich bedeutende Emulgatoren, die in Multi-Tonnen-Maßstab produziert werden und ein großes Einsatzgebiet in der Kosmetik- und Lebensmittelbranche haben. Daher ist es produktionstechnisch auch von großen Interesse Syntheserouten mit hohen Reaktionsselektivitäten bezüglich dieser Partialglyceride zu entwickeln, um die Ausbeuten zu erhöhen und die Herstellungskosten zu erniedrigen. Aus der Literatur bekannt [Zhong et al. 2014] und in dieser Arbeit detailliert dargestellt, sind die Grenzen dieser Mehrphasenreaktionen hauptsächlich bedingt durch das thermodynamische Phasenverhalten und Reaktionsgleichgewicht. Dabei hat sich gezeigt, dass ein Überschuss an Glycerol zu einer Erhöhung der Selektivität und Ausbeute an Glyceromonolaurat führt, was aus Sicht der Reaktionsgleichungen (siehe Kapitel 4) und aus der Literatur [McNeill et al. 1990; Hasenhuettl 2008] deutlich wird. Dennoch enden alle Reaktionen ohne Zusatz von Additiven und anderen Modifikation, wie z. B. des Katalysators, unabhängig vom Reaktionsmechanismus - Veresterung oder Glycerolyse - im gleichen thermodynamischen Reaktionsgleichgewicht mit der gleichen Produktzusammensetzung. Die Selektivität von Glycerolmonolaurat beträgt hierbei immer $S_{ML} < 60\%$. Bei den Reaktionen mit Glycerol im Überschuss liegt auch am Ende der Reaktion eine Zweiphasenmischung vor, die aus einer reinen polaren Glycerolphase und einer unpolaren Produktphase entsteht. Die Produktphase besteht dabei zu größten Teilen aus Glycerolmonolaurat. Jedoch sind hier auch Anteile an Glyceroldilaurat und -trilaurat, sowie gelöstes Glycerol und nicht reagierte Laurinsäure enthalten. Der Einsatz von Löslichkeitsvermittlern führt durch den Solvationseffekt zur Erhöhung der Reaktionsselektivität von Glycerolmonolaurat (vergleiche Kapitel 3). Beispiele aus der Literatur sind der Einsatz des organischen Lösungsmittel *tert*-Pentanol [Damstrup et al. 2006] und der Einsatz von ionischen Flüssigkeiten [Guo und Xu 2005], die zu einer

Steigerung der Selektivität von Glycerolmonolaurat bis $S_{ML} > 80\%$ geführt haben. In dieser Arbeit wurde der Einsatz des amphoteren Tensids Cocoamidpropyl Betain zur Erhöhung von S_{ML} erfolgreich umgesetzt und führt bei gleichen Additivmengen zu ähnlicher Steigerung der Selektivität auf $S_{ML} = 65\%$ wie *tert*-Butanol (siehe Tabelle 8.1).

Tabelle 8.1: Ergebnisübersicht im Gesamtreaktionssystem im Reaktionsgleichgewicht für die Glycerolyse mit CAPB und *tert*-Butanol.

Gesamtssystem	W _{Gly} [g/g _{total}]	W _{ML} [g/g _{total}]	W _{DL} [g/g _{total}]	W _{TL} [g/g _{total}]	S _{ML} [-]
Glycerolyse (<i>tert</i> -Butanol)	0.370±0.003	0.319±0.002	0.261±0.002	0.050±0.002	0.642
Glycerolyse (CAPB)	0.362±0.015	0.322±0.008	0.257±0.006	0.059±0.001	0.642

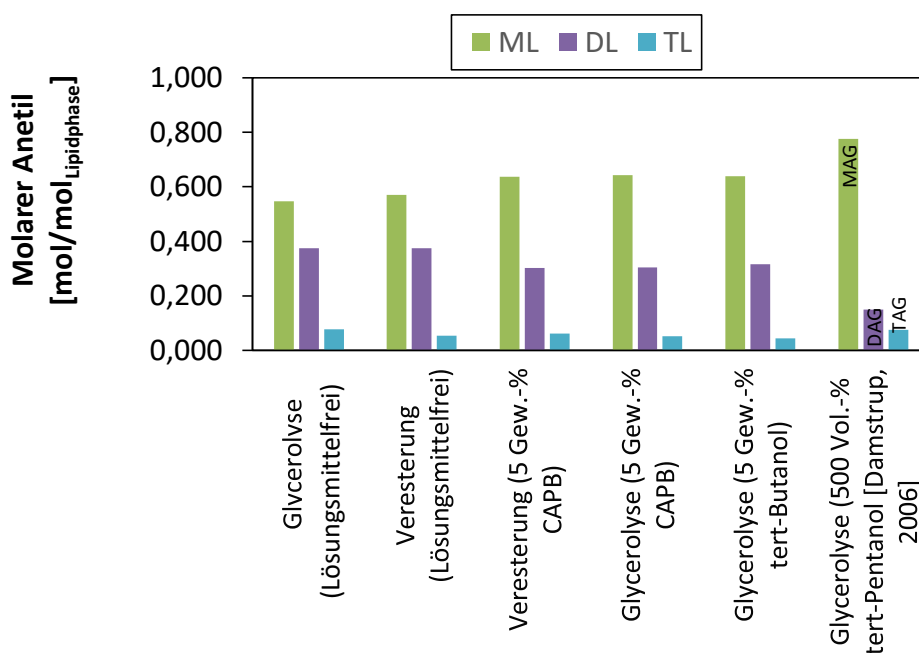


Abbildung 8.1: Vergleichende Darstellung der Produktzusammensetzung in der unpolaren Phase (ML + DL + TL).

Verglichen zu den Literaturwerten von $S_{ML} > 80\%$ ist der hier erreichte Wert mit $S_{ML} = 65\%$ zwar kleiner, jedoch wurden hier auch nur 5 Gew.-% Additive eingesetzt (siehe Abbildung 8.1). Wird die Menge des Löslichkeitsvermittlers erhöht, steigt auch die Selektivität von Glycermonolaurat an, da durch die weitere Erhöhung der Löslichkeit von Glycerol in der Lipidphase das thermodynamische Gleichgewicht weiter in Richtung Glycerolmonolaurat verschoben wird (siehe Kap. 5 Abbildung 5.6). Es wurde gezeigt, dass die Mischung am Ende der Reaktion im Gleichgewicht durch Zusatz von 15 Gew.-% CAPB einphasig wird. Somit sollte die Selektivität S_{ML} weiter steigen, wenn die Reaktion mit einem Zusatz von 15 Gew.-% CAPB

von Beginn an durchgeführt worden wäre, da für die Umsetzung zu Glycerolmonolaurat stoffmengentechnisch mehr Glycerol zur Verfügung steht (siehe Abbildung 8.2 A/B) und sich demnach das thermodynamische Reaktionsgleichgewicht weiter in Richtung Glycerolmonolaurat verschiebt.

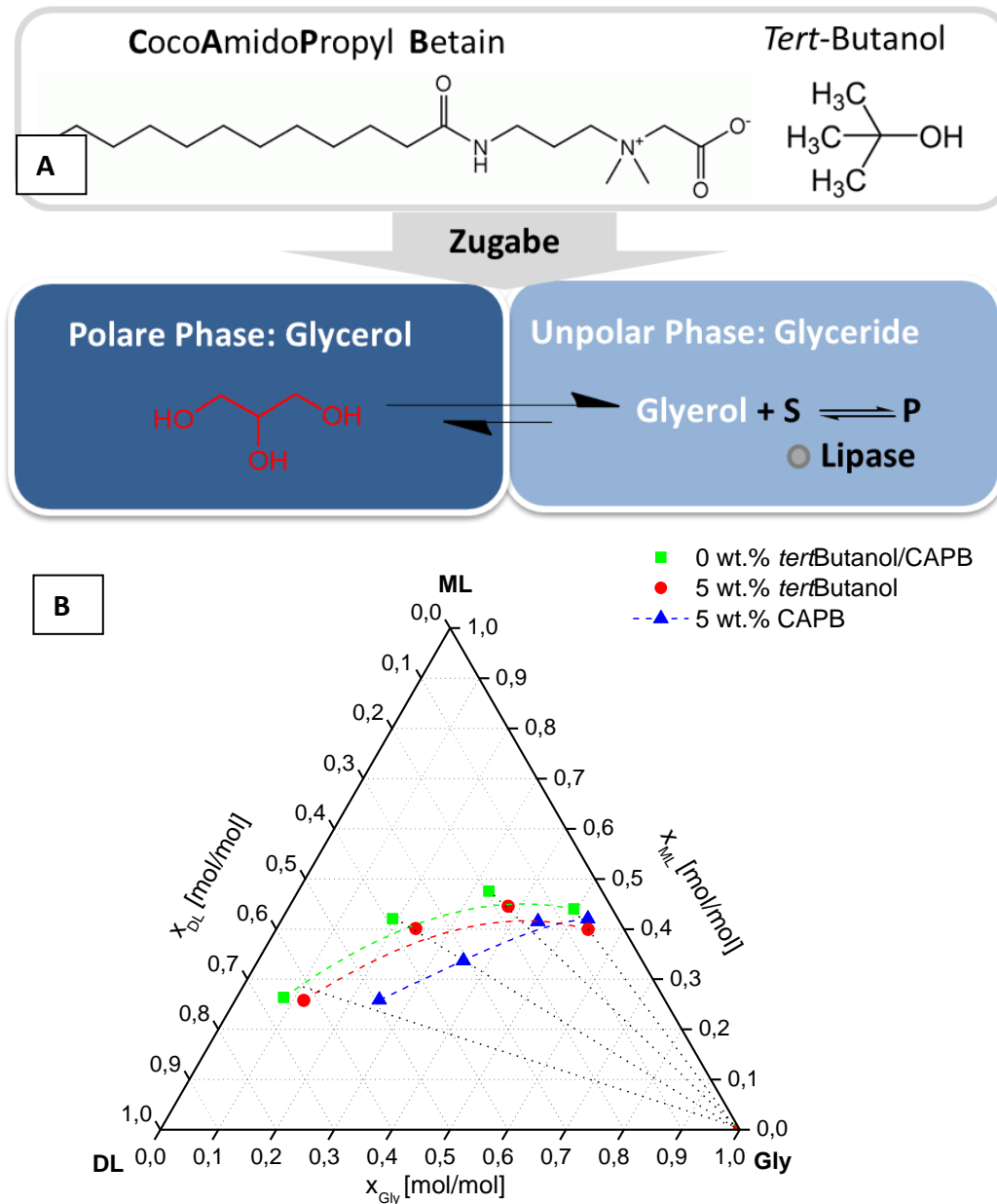


Abbildung 8.2: A: Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips von CAPB auf das Phasenverhalten; B: Dreiecksdiagramme von Glycerol, Glycerolmonolaurat (ML) und Glyceroldilaurat (DL). Einfluss von 5 Gew.-% Additiv (rote Kreise: *tert*-Butanol; blaue Dreiecke: CAPB) auf das Phasenverhalten im Vergleich zum Additiv-freien System (grüne Quadrate).

Der Hintergrund dieses Forschungsansatzes zum Einsatz von CAPB ist, dass das CAPB im Gegensatz zu *tert*-Butanol oder anderen organischen Lösungsmitteln oder ionischen Flüssigkeiten in der Produktmischung als zusätzlicher Emulgator verbleiben kann. Zudem ist die Produktabtrennung von *tert*-Butanol mit erheblichen Aufwand und Kosten verbunden und für den Einsatz von ionischen Flüssigkeiten gibt es bis dato keine Produktaufbereitung. CAPB

ist großtechnisch im Care Bereich ein vielseitig eingesetztes Tensid mit zusätzlichen hervorragenden Eigenschaften [Leidreiter et al. 1997]. Das CAPB bewirkt eine Änderung des thermodynamischen Phasenverhaltens der Reaktionsmischung, wobei das Glycerol als polare Komponente besser in der unpolaren lipiden Phase löslich ist. Dadurch verkleinert sich die Mischungslücke und es steht stoffmengentechnisch mehr Glycerol in der unpolaren Phase, in der die Umsetzung zu Glycerolmonolaurat stattfindet, zur Verfügung (siehe Abb 8.2 B). Somit verschiebt sich das thermodynamische Reaktionsgleichgewicht weiter auf die Seite von Glycerolmonolaurat. Dieser Effekt ist durch die in dieser Arbeit bestimmte Gleichgewichtskonstanten in Kapitel 5 belegt (vergleiche Kap. 5).

Werden diese gewonnenen Erkenntnisse in den Produktionsmaßstab übertragen, ergäbe sich eine kostengünstigere Herstellungsmethode für das Tensid-Gemisch mit hoher Selektivität von Glycerolmonolaurat durch den Einsatz von CAPB anstelle von *tert*-Butanol. Das Tensid-Gemisch besteht hauptsächlich aus Glycerolmonolaurat und Glyceroldiaurat, sowie anteilig gelöstes Glycerol und CAPB, welches in der Reaktion als inerte Löslichkeitsvermittler dient und zusätzlich im Produkt als Tensid. Bei einem Vergleich zu einer Syntheseroute mit *tert*-Butanol als Löslichkeitsvermittler, wird ersichtlich, dass durch Einsparung zweier Prozessschritte erheblich Kosten eingespart werden können (Annahme: bei gleichen Rohstoffmengen und Kosten, sowie Reaktionsbedingungen). Zudem wird angenommen, dass CAPB und *tert*-Butanol gleich teuer sind.

Tabelle 8.2: Vergleich der benötigten Prozessschritte zur Herstellung des Tensid-Gemisches aus Partialglyceride ML und DL mit CAPB.

Herstellung mit <i>tert</i> -Butanol	Herstellung mit CAPB
1. Batch Reaktion im Reaktor	1. Batch Reaktion im Reaktor
2. Abtrennung Katalysator NVZ 435 [®]	2. Abtrennung Katalysator NVZ 435 [®]
3. Entfernung <i>tert</i> -Butanol mittels Destillation.	-
4. Zugabe CAPB zur Einstellung der Produktmischung	-
5. Abtrennung überschüssiges Glycerol mittel Phasentrennung	3. Abtrennung überschüssiges Glycerol mittel Phasentrennung

Kostentechnisch wird sich die Abtrennung von *tert*-Butanol wohl am stärksten auf die Herstellungskosten auswirken. Bei diesem vereinfachten Vergleich stehen 5 Prozessschritte gegenüber 3 Prozessschritten bei der Herstellung unter Anwendung von CAPB als inerten Löslichkeitsvermittler.

Bei einem Vergleich der Reaktionen Glycerolyse und Veresterung würde bei einer Übertragung in den Produktionsmaßstab eine Glycerolyse im großen Maßstab durchgeführt werden, da ein Triglycerid kommerziell günstiger ist als eine Fettsäure. Denn die Fettsäuren werden durch vorgeschaltete Prozesse aus Triglyceriden gewonnen.

Des Weiteren sollte sich der Einsatz von inerten Löslichkeitsvermittlern auch positiv auf die Online-Messung mittels ATR-FTIR-Spektroskopie auswirken. Wie bereits in Kapitel 6 dargestellt, ist die Online-Messung dieser Mehrphasensysteme in der Gesamtmischung nur schwer reproduzierbar durchzuführen aufgrund des Phasenverhaltens durch die Reaktionsteilnehmer. Gerade zu Beginn der Reaktion bei hohen Konzentrationsunterschieden wirkt sich das negativ auf die Messung aus, da zu diesem Zeitpunkt die Signalintensitäten am ATR-Kristall bedingt durch die Emulsion stark schwanken zwischen polarer und unpolarer Phase. Sobald eine gewisse Menge Glycerolmonolaurat gebildet wurde, stabilisiert sich das Messsignal, da Glycerolmonolaurat in der Mischung als Emulgator wirkt. Nichtsdestotrotz ist die Reaktion mit Überschuss an Glycerol nur in der unpolaren Reaktionsphase reproduzierbar mittels Online-FTIR Analytik zu verfolgen (vergleiche Kapitel 6) unabhängig von den zugrunde gelegten mathematischen Modell (Hardmodell IHM oder Softmodell PLS). So konnten mit beiden Auswertemodellen die mehrphasigen Reaktionen nur mit erheblichen Einschränkungen verfolgt werden. Die ausschlaggebendste Einschränkung ist durch das Phasenverhalten der Reaktionsteilnehmer begründet und lässt, sobald eine polare Komponente im Überschuss vorliegt, eine reproduzierbare Online-Analytik nur in der unpolaren Phase zu. Und wie aus Kapitel 4 herausgearbeitet, führt ein Überschuss an Glycerol zur Optimierung der Selektivität von Glycerolmonolaurat, weshalb eine Reaktionsverfolgung mittels Online-FTIR-Analytik für diese Reaktionssysteme im Glycerol-Überschuss ein wichtiger zukünftiger Schritt wäre. Lösbar ist dieses Problem entweder über das Reaktordesign (Mixer-Settler), einer *in-situ* Phasentrennung, Beschichtung des ATR-Kristalls oder der frontale Einsatz einer Ultraschallsonde gegenüber des ATR Kristalls. Diese verschiedenen Ansätze sind jedoch mit einem größeren Entwicklungsaufwand verbunden und es muss sich des Weiteren durch erst Versuche mit dem in dieser Arbeit untersuchten Reaktionssystem herausstellen wie zielführend diese Ansätze sind.

Außerdem könnte durch Anpassung der Modelle das Problem gelöst werden, indem eine Software-Klassifizierung der Spektren stattfindet. Durch spezifischen Banden oder Signalen oder Signalverschiebungen die Umgebungsabhängig sind, wird dieses Spektrum in die Klasse der jeweiligen Phase und nach der Spektren Güte eingeordnet. Die einzelnen Spektren der verschiedenen Klassen sind dann mit dem für die Phasen entwickelten chemometrischen Modelle zu analysieren. Im Beispiel des Glycerol-Überschuss müssten die Spektren der polare Phase, welche nur Glycerol als Komponente besitzt aufgrund des Phasenverhaltens des Reaktionssystems ebenfalls nur mit der FTIR-Analytik zu erfassen sein. Das würde bedeuten, dass in diesem Fall keine Überwachung in der polaren Phase der Produktkomponenten möglich wäre. Somit müssten die viel seltener gemessenen Spektren der dispersen unpolaren Phase ebenfalls durch die Klassifizierung herausgefiltert werden und nur diese für den Konzentrationsverlauf der Produktkomponenten chemometrisch ausgewertet werden.

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung, wäre die Verknüpfung mit dem Einsatz eines inerten Löslichkeitsvermittlers, beispielsweise CAPB. Wie bereits beschrieben, bewirkt CAPB eine Verkleinerung der Mischungslücke (siehe Kapitel 4), also eine bessere Löslichkeit von Glycerol in der lipiden Reaktionsphase. Hierbei ist aber bestimmend wie viel CAPB eingesetzt wird. In

den Versuchen dieser Arbeit wurden 5 Gew-% von CAPB eingesetzt. Wird der Anteil auf 15 Gew.-% erhöht, wird die Gesamtreaktionsmischung einphasig und damit ist eine Online-FTIR-Analytik im Gesamtsystem möglich, da der Anteil der lipiden Reaktionsmischung größer wird oder das Gesamtsystem ab einer Menge von ungefähr 15 Gew.-% CAPB einphasig wird. In diesem Fall könnte eine Prozesssteuerung für das Mehrphasensystem etabliert werden.

In Kapitel 7 dieser Arbeit wurden für eine einphasige Biotransformation eine erfolgreiche Umsetzung eine diskontinuierliche und eine kontinuierliche Prozesssteuerung mittels Online-FTIR-Analytik beschrieben. Dabei wurde über die chemometrische Auswertung der FTIR-Spektren und bestimmten definierten Soll-Werten die Zulauftrate von 1-Decanol mittels einer Mikrozahnpumpe gesteuert. Denkbare Einsatzmöglichkeiten sind die Umsetzung von Fed-Batch-Reaktionsführungen oder die Definition von kinetischen Stopp-Kriterien bei maximaler Ausbeute eines Produktes. Zudem wird es bei den gestiegenen Prozessanforderungen der Industrie 4.0 vermehrt wichtig industrielle Produktionsprozesse online zu überwachen, um Prozessparameter zu digitalisieren und somit die Möglichkeit zu schaffen, Prozesse zu steuern und zu automatisieren.

Es lässt sich abschließend festhalten, dass eine Zusammenführung der zuvor diskutierten Forschungsthemen, den Einsatz von CAPB als inerten Löslichkeitsvermittler sowie die Etablieren einer Online-FTIR-Analytik, weiteres Potenzial für die weitere Forschungsarbeiten besitzt. So könne eine Online-Analytik zur Etablierung einer Prozesssteuerung auf die industriell wichtige Mehrphasenreaktion zur Herstellung von Partialglyceriden MAG und DAG übertragen werden. Mögliche Anwendungsgebiete wären mittels einer Definition von kinetischen Parametern (z. B. die Bildungsrate an MAG) eine Prozessführungsstrategie zu entwickeln, die zu einer weiteren Optimierung der Reaktion führt.

9 Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit wurde die Reaktionsselektivität der biokatalytischen Synthese von Partialglyceriden, speziell Glycerolmonolaurat, untersucht und darüber hinaus die Etablierung einer Online-FTIR-Analytik an diesen Reaktionensystemen umgesetzt.

Dafür wurden in Kapitel 4 für zwei unterschiedliche Reaktionssysteme, der Veresterung von Glycerol und Laurinsäure, sowie der Glycerolyse von Glyceroltrilaurat, die möglichen Einflussfaktoren auf die Selektivität S_{ML} im Detail untersucht. Es stellte sich heraus, dass das Substratverhältnisse einen übergeordneten Einfluss auf die Selektivität hat. Somit führt ein molarer Überschuss an Glycerol von mindestens zwei zu eins zur Säure oder Glyceroltrilaurat in der lösungsmittelfreien Reaktion zu einer Selektivität S_{ML} von maximal 60%, unabhängig vom Reaktionsmechanismus. Die Temperatur hat einen geringeren Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Den größten Einfluss auf die Selektivität hat das thermodynamische Phasenverhalten des Reaktionssystems. Dieses wurde detailliert in binären, sowie ternären Phasendiagrammen experimentell sowie mit Hilfe von theoretischen Modellierungen beschrieben. Die Reaktionsteilnehmer liegen in zwei flüssigen Phasen vor, wobei der Biokatalysator Novozym 435[®] in der unpolaren Phase, in der die Reaktion stattfindet, dispergiert vorliegt. Das Glycerol kann sich mit dem Fortschritt der Reaktion durch die Bildung von Glycerolmonolaurat und dessen Vermittlung über höhere Wasserstoffbrückbindungs-fähigkeiten vermehrt in der unpolaren Phase lösen. Es enden jedoch alle lösungsmittelfreien Reaktionen im gleichen thermodynamischen Reaktionsgleichgewicht und die Selektivität S_{ML} ist somit limitiert bei $< 60\%$.

Zusätzlich wurde die einphasige Reaktion von Laurinsäure und 1-Decanol zur Etablierung einer Online-Prozesssteuerung mittels inline ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht. Die Offline-Versuche, sprich die Batch-Versuche mit unterschiedlichen Substratverhältnissen und die Fed-Batch-Versuche mit unterschiedlichen Zulaufmengen an 1-Decanol, dienen als Datenbasis für die Kalibrierung des chemometrischen Modells in Kapitel 7.

In Kapitel 5 wurde durch den Einsatz an 5 Gew.-% CAPB erfolgreich gezeigt, dass die Selektivität S_{ML} auf ca. 65% ansteigt, bedingt durch die bessere Löslichkeit von Glycerol in der lipiden Phase (ca. 15 Mol.-% mehr). Das thermodynamische Reaktionsgleichgewicht verschiebt sich somit in Richtung Glycerolmonolaurat. Dieses Ergebnis ist vergleichbar zum Einsatz von 5 Gew.-% *tert*-Butanol, welches auch zur Steigerung der Selektivität S_{ML} auf 65% führt. Außerdem wird das Reaktionsgemisch im thermodynamischen Gleichgewichtspunkt bei Umsatz von $>95\%$ LS und einer Zusammensetzung von 23 Mol.-% Glycerol, 45 Mol.-% ML, 25 Mol.-% DL und 7 Mol.-% TL in der lipiden Produkphase am Ende der Reaktion durch Zugabe von 15 Gew.-% CAPB einphasig.

Die Möglichkeit der Online-Überwachung der Mehrphasenreaktionen wurde in Kapitel 6 aufgezeigt. Alle Reaktionen wurden neben der GC- und Säurezahl-Titration-Offline-Analytik ebenfalls mittels ATR-FTIR-Spektroskopie vermessen. Durch die Korrelation der Offline-Datenbasis und der spektralen Daten im Bereich von 1800 bis 800 cm^{-1} wurden mittels des

Softmodells Partial-Least-Squares-Regression (PLS) und des Hardmodells IHM (Indirect Hard Modellierung) jeweils chemometrische Modelle erstellt und auf unbekannte Datensätze angewendet. Beide Modell-Ansätze waren in der Lage die Reaktionsteilnehmer in der lipiden Reaktionsphase mit einem Vorhersagefehler RMSEP < 6 Mol.-% vorherzusagen. Eine Online-Überwachung im Gesamtsystem war nur mit Einschränkungen und einem Fehler RMSEP > 15 Mol.-% für die Komponente Glycerol möglich. Dieses ist bedingt durch die Kombination der ATR-Messtechnik und dem Phasenverhalten der Reaktionssysteme. Es hat sich gezeigt, dass der IHM-Algorithmus aufwändiger in der Datenvorbehandlung für das Erstellen der Spektralmodelle ist, hierdurch wird jedoch die Kalibrierung kürzer im Vergleich zum PLS-Algorithmus. Der bedeutendste Vorteil des IHM-Algorithmus ist, dass bereits vor der Kalibrierung der chemometrischen Modelle qualitative Aussagen über den Verlauf der Reaktion durch die Spektralmodelle möglich ist.

In Kapitel 7 wurde erfolgreich eine Online-Prozesssteuerung mittels der etablierten inline ATR-FTIR-Spektroskopie für die einphasige Biotransformation von 1-Decanol und Laurinsäure durchgeführt. Die Zulauftrate von 1-Decanol wurde dabei diskontinuierlich und kontinuierlich gesteuert. Bei der diskontinuierlichen Prozesssteuerung wurde als Prozesssteuerungsparameter die zeitliche Änderung des Stoffmengenanteils von 1-Decanol $dx_{1\text{-Decanol}}/dt$ und die Änderung des absoluten Stoffmengenanteils an 1-Decanol $x_{1\text{-Decanol}}$ verwendet. Bei der kontinuierlichen Prozesssteuerung wurde der zeitliche Verbrauch an Laurinsäure $dx_{\text{Laurinsäure}}/dt$ als Prozesssteuerungsparameter verwendet. Dadurch konnte der Parameter $dx_{\text{Laurinsäure}}/dt$ durch die kontinuierliche Anpassung der Mikrozahnradpumpe mittels eines PI-Reglers konstant gehalten wurde. Dieses ermöglicht nun die Prozesskontrolle für Veresterungsreaktionen mit Polyolen, wie z. B. Glycerol.

Im Kapitel 8 wurden alle Ergebnisse übergreifend diskutiert und daraus mögliche weitere Arbeiten entwickelt und im Ausblicke erörtert. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass eine lösungsmittelfreie Synthese unter Zuhilfenahme des inerten Tensides Cocoamidpropyl Betain zur Steigerung der Selektivität von Glycerolmonoaurat führt und im Vergleich zur Verwendung des organischen Lösungsmittel *tert*-Butanol erhebliche Einsparungen im Produktionsprozess möglich sind. Des Weiteren kann durch den Einsatz von CAPB die Möglichkeit erbracht werden, die Reaktionen im Gesamtsystem mittels ATR-FTIR-Spektroskopie online zu überwachen, da nur noch eine Phase vorliegt.

Anhang

A Material & Methoden

A.1 Materialien

A.1.1 Chemikalien

Tabelle A.1: Verwendete Chemikalien und Hersteller/Vertreiber.

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
1-Decanol, >98%	VWR International GmbH; Darmstadt, D
1,3-Glyceroldilaurat, 99,8 %	TCI Germany GmbH, Eschborn, D
Chloroform, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, D
Chloroform-d, 99.8 atom % D	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Cocoamidpropyl Betain	Bereitgestellt durch Evonik Industries AG
Ethanol, vergällt	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycerin, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycerolmonolaurat, 99,6%	TCI Germany GmbH, Eschborn, D
Glyceroltrilaurat, 98,5 %	TCI Germany GmbH, Eschborn, D
Laurinsäure, >98%	Carl Roth, Karlsruhe, D
MSTFA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
Novozym 435	Novozymes, Bagsverd, DK
Phenolphthalein	Riedel de Haen, Seelze, D
Pyridin, wasserfrei, 99,8%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
tert-Butanol, >99%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Tricaprin, p.a.	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

A.1.2 Geräte

Tabelle A.2: Verwendete Geräte und Hersteller.

Gerät	Hersteller
ATR Fasersonde, IN350-T	Bruker Optik GmbH, Ettlingen, D
ATR Sonde, MIRacle	Pike Technologies, Madison WI, USA
1H-NMR AVANCE I 400 MHz Spektrometer (AV4001)	Bruker Optik GmbH, Ettlingen, D
Feinwaage, CP224S	Sartorius GmbH, Göttingen, D
Flaschenaufsatzbürette, Titrette	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D
FT-IR, Matrix MF	Bruker Optik GmbH, Ettlingen, D
FT-IR, Vertex 70	Bruker Optik GmbH, Ettlingen, D
GC, Agilent 7890A	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
GC, HP Agilent 5890	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D

GC-Säule VF5-ht Ultimetel	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
Karl Fischer Titrator, TR152	Schott-Geräte GmbH, Ludwigshafen, D
Mikrozahnpumpe mZR-2905	HNP Mikro-systeme GmbH
Steuerungseinheit, I/O-Modul AAST	Delphin Technology AG; Bergisch-Gladbach, D
Tischzentrifuge Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttingen, D

A.2 Methoden

A.2.1 Analytikmethoden

Säurezahltitration & Berechnung der theoretischen Säurezahl

Der Säuregehalt der Reaktionsmischungen wurde in dieser Arbeit über die Säurezahltitration ermittelt. Über die Säurekonzentration kann der Umsatz der Fettsäure direkt bestimmt und aufgetragen werden. Für die Titration der Säurezahl wird eine entsprechende Menge Probe in einem Glaskolben eingewogen und anschließend in einem geeigneten Lösungsmittel vollständig gelöst (z.B. Ethanol). Als Indikator wird 1%ige ethanolische Phenolphthaleinlösung zugegeben und mit 0,1 M ethanolischer Kaliumhydroxidlösung bis zum Umschlagspunkt mit einer Flaschenaufsatzbürette (Titrette, Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D) titriert.

Die Säurezahl ist definiert als die Menge KOH in mg, die benötigt wird, um die in 1 g zu untersuchende Probe enthaltenen freien Säuren zu neutralisieren. Mit der bekannten Einwaage der Probe, der Konzentration und dem Volumen der zugegebenen Lauge und dem Molekulargewicht von KOH (56,1 g/mol), kann die Säurezahl wie berechnet werden (siehe Gleichung 50). Mit Zuhilfenahme der Berechnung der theoretischen Säurezahl (siehe Gleichung 51) kann der Umsatz der Fettsäure (siehe Gleichung 52) berechnet werden.

$$\text{Säurezahl}(SZ) = \frac{m_{\text{KOH}}[\text{mg}]}{m_{\text{Probe}}[\text{g}]} = \frac{V_{\text{KOH,Lsg}}[\text{mL}] \cdot M_{\text{KOH}} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \cdot c_{\text{KOH,Lsg}} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]}{m_{\text{Probe}}[\text{g}]} \quad (49)$$

$$\text{Theor. Säurezahl}(SZ_{\text{theor.}}) = \frac{m_{\text{KOH}}[\text{mg}]}{m_{\text{Probe}}[\text{g}]} = \frac{m_{\text{Säure}}[\text{g}]}{m_{\text{Gesamt}}[\text{g}]} \cdot \frac{M_{\text{KOH}} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]}{M_{\text{Säure}} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]} \cdot \frac{1000[\text{mg}]}{1[\text{g}]} \quad (50)$$

$$X_{\text{LS}} = \frac{SZ_{\text{theor.}} - SZ(t)}{SZ_{\text{theor.}}} \quad (51)$$

Masse KOH m_{KOH} [g]

Masse der Probe m_{Probe} [g]

Masse Säure	$m_{\text{Säure}}$	[g]
Volumen der KOH-Lösung	$V_{\text{KOH,Lsg}}$	[mL]
Molekulargewicht KOH	M_{KOH}	[g mol ⁻¹]
Molekulargewicht Säue	$M_{\text{Säure}}$	[g mol ⁻¹]
Konzentration der KOH-Lösung	$c_{\text{KOH,Lsg}}$	[mol L ⁻¹]

Karl-Fischer-Titration

Die volumetrische Karl-Fischer-Titration wurde für die Bestimmung des Wassergehalts bei der enzymatischen Veresterung von 1-Decanol und Laurinsäure verwendet. Bei der Methode wird unter Anwesenheit von Methanol, Schwefeldioxid und Imidazol, das in der Probe vorhandene Wasser bei der Umsetzung von Iod zu Iodid und Methylsulfid zu Methylsulfat verbraucht. Sobald das gesamte Wasser reagiert hat, stoppt die Umsetzung der Titrationskomponenten. Über den Verbrauch der Iod-Maßlösung kann auf den Wassergehalt geschlossen werden. Über eine Leitfähigkeitselektrode wird der Endpunkt der Titration detektiert. Für die Wasserbestimmung kam ein System mit einem Autotitrator zum Einsatz (TR152, Schott-Geräte GmbH, Ludwigshafen, D). In die Probenkammer des Autotitrator wurde vor Zugabe der Probesubstanz eine methanolische Stammlösung vorgelegt (die Stammlösung enthält Imidazol, Iod und Schwefeldioxid). Die Probesubstanz kann gegebenenfalls vor Zugabe mit Chloroform komplett gelöst werden. Nach Zugabe wurde bis zum Umschlagspunkt titriert, um die im Lösungsmittel enthaltene Wassermenge zu verbrauchen. Zusätzlich muss die Neutralisationskapazität ($K_{\text{Iod,Lsg.}}$) der Iodstammlösung durch Zugabe definierter Wassermengen bestimmt werden. Über die verbrauchte Iodmaßlösung kann der Wassergehalt berechnet werden (siehe Gleichung 53).

$$\xi_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{m_{\text{H}_2\text{O}}}{m_{\text{Gesamt}}} \left[\frac{\text{mg}_{\text{H}_2\text{O}}}{\text{g}} \right] = \frac{V_{\text{Iod,Lsg}} [\text{mL}]}{m_{\text{Probe}} [\text{g}]} \cdot K_{\text{Iod,Lsg.}} \left[\frac{\text{mg}_{\text{H}_2\text{O}}}{\text{mL}} \right] \quad (52)$$

Massenanteil Wasser	$\xi_{\text{H}_2\text{O}}$	[mg _{H2O} g ⁻¹]
Masse Wasser	$m_{\text{H}_2\text{O}}$	[g]
Masse Gesamt	m_{Gesamt}	[g]
Masse der Probe	m_{Probe}	[g]
Volumen der Iodlösung	$V_{\text{Iod,Lsg}}$	[mL]
Neutralisationskapazität der Iodlösung	$K_{\text{Iod,Lsg}}$	[mg _{H2O} mL ⁻¹]

Teilweise wurden die Proben in Lösungsmitteln (z. B. Chloroform) vorgelöst. Hierfür musste die Feuchte von Chloroform separat bestimmt werden und von der Messung der gelösten Probensubstanz abgezogen werden.

GC-Analytik

Für die Analyse der Reaktionskomponenten Glycerol, Laurinsäure, Glycerolmono-, -di und -trilaurat wurde ein Agilent 7890-Gaschromatograph (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D) mit FID-Detektor verwendet. Die Analyten wurden mit MSFTA derivatisiert und als Trimethylsilyl-Derivate gaschromatographisch analysiert. Die Kalibrierung wird mittels internem Standard durchgeführt, um systematische Fehler wie Verluste, Anreicherungen, Wäge- und Volumenfehler zu kompensieren [Thiele, Salzer, Zuern 2014]. Als interner Standard wird das Glyceroltriglycerid Tricaprin (1,2,3-Tridecanoyl-glycerol) eingesetzt.

Probenaufbereitung

Die Proben wurden vor dem Abpipettieren auf 80°C erhitzt und geschüttelt, um während des Überführens flüssig zu bleiben.

Protokoll zur GC-Probenaufbereitung

1. 10-20 mg Probe abwiegen
 - GC-Vial schütteln
 - Mittels Pipette 10-20 µL abnehmen und in ein leere GC-Vial zur Verdünnung überführen
 - Einwaage notieren
2. Einwaage verdünnen
 - Einwaage mit 60-facher^p Menge an Pyridin-Chloroform-Lösung^q verdünnen
 - GC-Vial mit der Verdünnung verschließen und schütteln
 - Warten, bis sich die Probe gelöst hat
3. GC-Insert vorbereiten
 - In 250µL GC-Einsatz vorlegen:
 - 20 µL Tricaprin^r
 - 20 µL MSTFA^s
 - 60 µL Probe aus dem GC-Vial mit der Verdünnung
4. Derivatisieren
 - 45 min Schütteln bei 80°C
 - Proben abkühlen lassen

^p 60-fache Menge bezogen auf das Volumen. D.h. bei 10 mg Einwaage wird mit 600 µL Pyridin-Chloroform-Lösung verdünnt.

^q 50 Vol.-% Pyridin-Chloroform-Mischung

^r 8001 µg/mL ± 5 %

^s N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid; Reinheit ≥ 97 %

Das Schütteln stellt sicher, dass eine homogene Probe eingewogen wird. Ein genaues Pipettieren der Probevolumen war aufgrund der Zähflüssigkeit der Proben nicht möglich. Daher wurde die Masse der pipettierten Flüssigkeit bestimmt, wobei der Fehler der Waage $\pm 0,1$ mg beträgt. Die eingewogene Probe wurde mit dem 60-fachen an einer 50 Vol.-% Pyridin-Chloroform-Lösung verdünnt, d.h. bei 11 mg Einwaage wird mit 660 μ L Pyridin-Chloroform-Lösung verdünnt. Wenn 60 μ L dieser verdünnten Lösung in den GC-Einsatz überführt werden, liegt in jedem GC-Einsatz 1 mg Probe vor.

Die der Temperaturgang der GC-Methode des Gaschromatographen, welcher zur Untersuchung der Proben verwendet wurde, ist in Tabelle A.3 dargestellt.

Tabelle A.3: Temperaturgang der verwendeten GC-Methode GLYC.M

Time [min]	T [°C]	Hold time [min]	Run time [min]
Initial	50	3,5	3,5
15	180	0	12,2
7	280	0	26,5
10	380	10	46,5

Tabelle A.4: Responsefaktoren, Retentionszeiten und R^2 aus Kalibrierungsreihe

Bezeichnung	Retentionszeit [min]	Responsefaktor	R^2
Glycerol	5,7	5.319.759	0,9988
Laurinsäure	9,2	7.517.057	0,9970
Monolaurin	12,8	9.035.516	0,9989
Dilaurin	21,0	12.798.864	0,9989
Tricaprin [†]	23,8	-	-
Trilaurin	28,0	14.334.880	0,9993

Auswertung

Zur Auswertung der GC-Analytik mittels internen Standards wird zunächst der Mittelwert \bar{A}_{IS} der peak-Flächen $A_{IS,i}$ des internen Standards über alle n Proben gebildet:

$$\bar{A}_{IS} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} A_{IS,i}}{n} \quad (53)$$

Die von dem Fehler der GC-Injektion korrigierte Fläche $A_{x,i,\text{korrigiert}}$ für die Komponente x ist somit:

$$A_{x,i,\text{korrigiert}} = \frac{\bar{A}_{IS}}{A_{IS,i}} \cdot A_{x,i} \quad (54)$$

[†] Interner Standard

Die Responsefaktoren RF haben bedingt durch die Kalibrierung die Einheit:

$$\frac{\text{peakfläche}}{\text{Konzentration im Insert}} \left[\frac{\text{L}}{\text{mmol}} \right]$$

Die Stoffmenge n_{insert} im 250 μL GC-Insert berechnet sich über die Konzentration c_{insert} im GC-Insert wie folgt:

$$c_{\text{insert}} = \frac{A_{x,i,\text{korrigiert}}}{\text{RF}} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right] \quad (55)$$

$$n_{\text{insert}} [\text{mmol}] = c_{\text{insert}} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right] \cdot 100 \cdot 10^{-6} [\text{L}] \quad (56)$$

Der Molanteil $n\%_x$ der Komponente x berechnet sich dann über:

$$n\%_x = \frac{n_{\text{insert},x}}{\sum_{x=1}^{x=5} n_{\text{insert},x}} \quad (57)$$

Zur Bestimmung der absoluten Stoffmengen $n_x = \frac{c_x}{V_{\text{Reaktor}}(t)}$ der Komponente x im Reaktor ist die volumenbezogene Konzentration c_x notwendig. Die Konzentration im lösungsmittelfreien System berechnet sich wie folgt:

$$V_{\text{insert},x} [\mu\text{L}] = \frac{n_{\text{insert},x} [\text{mol}] \cdot M_x \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]}{\rho_x \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right] \cdot 1000} \quad (58)$$

$$c_i = \frac{n_{\text{insert},x} [\text{mmol}]}{V_{\text{insert},x} [\mu\text{L}]} \quad (59)$$

1H-NMR Analytik

Für die Analyse der Acylmigration von Glycerol-2-monolaurat zu Glycerol-1-monolaurat wurde eine ^1H -NMR Analyse am H-NMR AVANCE I 400 MHz Spektrometer (AV4001) von Bruker Optik (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, D) an der Uni Hamburg in der NMR-Abteilung im Fachbereich Chemie durchgeführt. Dazu wurden 10 mg Probe in 10 mL deuterierten Chloroform (Chloroform-d) gelöst und bei 400 MHz vermessen. Eine Spektren Auswertung und Zuordnung der Peaks wurde direkt vorort an der UNI Hamburg zusammen mit dem Fachmitarbeiter der NMR-Abteilung unternommen.

FT-IR-Analytik

Für die FT-IR Analytik wurden zwei verschiedene Geräte verwendet, zum einen das Vertex 70 und das Matrix MX (beide von Bruker Optik GmbH, Ettlingen, D). Beide Spektrometer waren mit der externen ATR-Fasersonde „IN350-T“ ausgestattet. Die Sonde hat eine Länge von 1,5 m und einen Durchmesser von 6 mm mit einer Diamantspitze. Zusätzlich wurden für Feststoffproben und schnelle Analysen die externe Sonde MIRacle-ATR (Pike Technologies, Madison WI, USA) verwendet. Über den in eine Fläche eingebauten Kristall kann die zu untersuchende Substanz aufgegeben und über einen Aluminiumfinger bei konstantem

Anpressdruck vermessen werden. Für die Auswertung der Spektren wurde die Software OPUS (Version 6.0 und 6.5) verwendet. Hierbei wurde das Quant2-Modul zur multivariaten Auswertung verwendet.

A.2.2 Chemometrie

Die chemometrischen Modelle wurden mit der Software PEAXACT (SPACT GmbH, Aachen, D) in der Version 3.6.2 erstellt. Dabei wurde ein deterministisches nichtlineares Modell nach der Methode des Indirect Hard Modeling sowie ein statistisches Modell nach der Regressionsmethode Partial Least Squares zur Modellbildung eingesetzt.

Partial Least Squares - PLS

Grundlage für die Modellierung mittels PLS-Algorithmus ist eine ausreichend große und repräsentative Datenbasis zum Kalibrieren („Trainieren“) des Modells. Diese wurde während der *Batch*- und *Fedbatch*-Versuche in Form von *online* (FTIR-Absorptionsspektren) und *Offline*-Daten (GC-Analytik der Zusammensetzung) erstellt.

In der Software *PEAXACT* wurde für jede Komponente das Modell mit dem kleinst möglichen Rang ausgesucht, welches das System hinreichend gut beschreibt. Als Auswahlkriterium wird das Modell n gewählt, welches für die jeweilige Komponente den minimalen *RMSEP* (siehe Kap. 1.8) aufweist. Dabei wird der Rang $n = 5$ nicht überschritten.

Das PLS Modell wurde durch die Datenvorbehandlung (*data pretreatment settings*) und insbesondere durch die Wahl des Spektralbereiches optimiert (*spectral range selection*). Es gilt dabei besonders die Spektralbereiche, welche starkes Rauschen enthalten oder keine signifikanten Änderungen über den Reaktionsverlauf aufweisen auszulassen, um den Anteil des Schätzfehlers am Vorhersagefehler zu minimieren.

Indirect Hard Modeling - IHM

Die Modellierung erfolgt in folgenden Schritten (vergleiche Abbildung 1.21) :

1. Reinstoffmodelle erstellen (*pure component modeling*)
 - a) Aufnahme der Reinstoffspektren
 - b) Erstellen der „*hard models*“ der Reinstoffe (*model fitting*)
 - c) Überprüfen der Plausibilität der Reinstoffspektren (*component fitting*^u)
⇒ ggf. Korrektur der Reinstoffmodelle

2. Mischungsmodell erstellen (*mixture modeling*)
 - a) Import der Reinstoffmodelle

^u Beim *component fitting* werden die spektralen Anteile einer jeden Komponente am Gesamtspektrum auf Basis der Reinstoffspektren bestimmt.

- b) Anwenden des unkalibrierten Modells auf die Mischungsspektren
(*component fitting*)
 - ⇒ ggf. Anpassen der Modellflexibilität
 - ⇒ ggf. Nachbessern der Reinstoffmodelle
3. Kalibrieren und Validieren
- Intern, extern, ggf. Datenvorbehandlung

Erstellen der Reinstoffmodelle

Zum Erstellen der *hard models* der Reinstoffe werden parametrisierte *peak*-Funktionen an die Reinstoffspektren angepasst, sodass die Residuen (Abweichungen vom zu modellierenden Reinstoffspektrum) minimal werden (vergleiche Abbildung 1.21) Hierbei ist darauf zu achten, dass so wenige *peaks* wie möglich aber so viele wie nötig verwendet werden, um das Absorptionsspektrum des Reinstoffes nachzubilden. Werden zu viele *peaks* verwendet, kann es analog zur PLS Methode zu „*overfitting*“ kommen. D.h. das Modell liefert gute Vorhersagen für die Kalibrierung, aber schlechte Werte für die Vorhersage unbekannter Daten (externe Validierung). Werden zu wenig *peaks* angepasst, kann es zum „*underfitting*“ kommen und das Modell bildet nicht wesentliche Komponenten ab. Als Faustregel gilt: es müssen so viele *peaks* angepasst werden, dass die Residuen kleiner als 1% der Gesamtamplitude sind. Es sollte beim Anpassen der *peaks* darauf geachtet werden, dass die *peaks* nicht überlagern, d.h. auf der gleichen Position (Wellenzahl) liegen. Relativ große *peaks* sollten durch mehrere kleine ersetzt werden. Dies ermöglicht ein genaueres *component fitting* bei geringer Modellflexibilität (siehe S. 155 „Anpassen der Modellflexibilität“).

Überprüfen der Plausibilität der Reinstoffspektren

Zum Überprüfen, ob die Reinstoffmodelle hinreichend genau modelliert wurden, wird zunächst ein „*component fitting*“ der Reinstoffmodelle auf alle Absorptionsspektren der Reinstoffe durchgeführt. Dabei werden die spektralen Anteile einer jeden Komponente am Gesamtspektrum auf Basis der Absorptionsspektren der Reinstoffe bestimmt. Im Idealfall hat z. B. das *hard model* „Laurinsäure“ im Absorptionsspektrum des Reinstoffes Laurinsäure ein „Gewicht“ (*weight*) von 1, während die Gewichtung bei allen anderen Absorptionsspektren der Reinstoffspektren 0 beträgt. Hat Laurinsäure im Absorptionsspektrum des Reinstoffes einer anderen Komponente ein *weight* > 0 heißt dies, dass das Modell zwischen den beiden Komponenten nicht genau differenzieren kann. In diesem Fall müssen die beiden Modelle in jenen Bereichen präzisiert werden (Residuen der Reinstoff *hard models* minimieren), in denen sie sich unterscheiden. Es wurden jeweils 3 Reinstoffspektren (3-fache Aufnahme derselben Probe) angepasst. Die absoluten Werte der Gewichtungen der Komponenten (*component weights*) sind hierbei irrelevant.

Erstellung des Mischmodells

Das Mischungsmodell modelliert das Reaktionsspektrum^y durch Einpassen aller Reinstoffmodelle in das Reaktionsspektrum. Das Einpassen erfolgt durch die Software PEAXACT so, dass die Residuen minimal werden. Zum Erstellen des Mischungsmodells wird ein neues Modell erstellt und alle Reinstoffmodelle in das neue Mischungsmodell importiert. Im nächsten Schritt werden die spektralen Anteile einer jeden Komponente an den Reaktionsspektren auf Basis der Reinstoffspektren ermittelt (*component fittings*). Die Verläufe dieser Anteile (Gewichtung/*weights*) über die Zeit werden qualitativ mit den Verläufen den *offline* ermittelten Reaktorkonzentrationen verglichen und auf Plausibilität untersucht. Hierbei ist zu beachten dass die Skalierung der gewichteten Komponenten (*weight components*) erst durch die Kalibrierung erfolgt. Kommt es bei einer Komponente zu unplausiblen Verläufen, muss das entsprechende Reinstoffmodell nachgebessert werden. Dies geschieht durch Minimierung der Residuen oder durch Einschränkungen der Modellflexibilität.

Anpassen der Modellflexibilität

Die Modellflexibilität bestimmt, wie variabel die *peaks* in die zu modellierenden Reaktionsspektren eingepasst werden dürfen. Dies kann u.a. durch Variation der *peak*-Parameter, Basislinienverschiebungen und Komponentenverschiebungen erfolgen. Dabei führt ein hoher Freiheitsgrad des Modells zu geringeren Residuen, weil das Modell mehr Möglichkeiten hat, die *peaks* anzupassen. Dies erschwert allerdings das Unterscheiden von Komponenten, die Absorptionsbanden im gleichen Wellenzahlbereich aufweisen. Ein zu starres Modell bezieht nichtlineare Effekte wie Basislinieneffekte, Peakverschiebungen oder –formänderungen nicht ein.

Kalibrierung

Die Kalibrierung des Modells erfolgt durch Regression der spektralen Anteile gegen die Massenkonzentration bzw. die Molanteile. Zur Kalibrierung wurden Reaktionsspektren repräsentativer Versuche verwendet. Im Vergleich zur PLS-Methode sind weniger Kalibrierspektren notwendig.

Validierung

Nach Abschluss der Modellbildung, wird das erzeugte Modell validiert. Die Validierung ermöglicht eine Aussage über die Güte der Vorhersage des Modells. Dabei gibt es zwei Arten der Validierung: die interne und die externe Validierung.

Interne Validierung

Zur internen Validierung wird das Verfahren der Kreuzvalidierung angewandt (*cross validation*). Hierbei werden alle Daten, die zu Kalibrierung eingesetzt werden auch zur Validierung eingesetzt. Dies geschieht indem einige Datenpunkte weggelassen und vom zuvor

^y FTIR-Absorptionsspektren, die während der Reaktion aufgenommen wurden

erstellten Modell vorhergesagt werden. Die Abweichung der Vorhersage vom weggelassenen Datenpunkt ergibt den *root mean square error of cross validation (RMSECV)*. Er wird nach folgender Gleichung berechnet [Kessler 2007]:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i^n (x_{\text{predicted CV},i} - x_{\text{true},i})^2} \quad (60)$$

$x_{\text{predicted CV},i}$	durch interne Kreuzvalidierung vorhergesagtes Wert eines Merkmals (<i>feature value</i> z. B. mol/mol)
$x_{\text{true},i}$	Wert der zur Kalibrierung verwendeten <i>training sample</i>
N	Anzahl der <i>training samples</i>

Externe Validierung

Die externe Validierung verwendet zwei getrennte Datensets zur Kalibrierung und Validierung. Unter der Voraussetzung, dass das Testdatenset genauso repräsentativ für den untersuchten Datentraum ist wie das Kalibrierdatenset, ist die externe Validierung am zuverlässigsten, um den zu erwartenden Vorhersagefehler zu bestimmen. „Ein Validierdatenset muss genauso sorgfältig gewählt werden wie die Kalibrierdaten und die Folge davon ist, dass mehr Proben benötigt werden als für die Kreuzvalidierung.“ [Kessler 2007]. Die Abweichung der Vorhersage vom externen Datenpunkt ergibt den *root mean square error of prediction*. Der *RMSEP* berechnet sich nach folgender Gleichung [Kessler 2007]:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{N'} \sum_i^{N'} (x'_{\text{predicted},i} - x'_{\text{true},i})^2} \quad (61)$$

$x'_{\text{predicted},i}$	Vom Modell vorhergesagter Wert eines Merkmals (<i>feature value</i> z. B. mol/mol)
$x'_{\text{true},i}$	Wert eines Merkmals einer unabhängigen (externen) <i>test sample</i>
N'	Anzahl unabhängiger (externer) <i>test samples</i>

Der *RMSEP (root mean square error of prediction)* gibt den Vorhersagefehler in der jeweiligen Einheit der Kalibrierung an^w. Der Fehler muss relativ zur Konzentration der Komponente in der Reaktionsmischung betrachtet werden. Bei der Interpretation des *RMSEP* muss außerdem beachtet werden, dass *offline*-Messwerte vom Modell als „wahre Werte“ betrachtet werden, obwohl diese ebenfalls fehlerbehaftet sind. Komponenten deren *offline*-Analytik stärker fehlerbehaftet ist, werden entsprechend schlechter vom Modell vorhergesagt.

^w (d.h. ein *RMSEP* von 0,1706 entspricht einem Vorhersagefehler von 17 Molprozent)

A.2.3 Synthesen

Synthese von Decyllaurat

Für die Synthese von Decyllaurat wurde ein 0,25 L doppelwandiger Blasensäulenreaktor verwendet. Die Reaktion wurde bei 55,6 °C mit einer Luftbegasung von 0,75 L/min. durchgeführt. Die Batch-Versuche wurden äquimolar (jeweils 200 mmol -> 40 g LS & 31,7 g 1-DeOH), mit LS-Überschuss (300 mmol (60 g) LS & 200 mmol (31,7 g) 1-DeOH), sowie mit 1-DeOH-Überschuss (134 mmol (26,8 g) LS & 200 mmol (31,7 g) 1-DeOH) durchgeführt. Dabei wurde die Laurinsäure jeweils im Reaktor vorgelegt bis diese geschmolzen war. Die Fed-Batch-Versuche wurden ebenfalls äquimolar (200 mmol LS (40 g) im Reaktor und 200 mmol 1-DeOH (31,7 g) im Vorlagebehälter) durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 1 Gew.-% Novozym 435® gestartet. Das Substrat 1-DeOH wurde bei den Fed-Batch-Versuchen mittels einer Mikrozahnradschleuse dem Blasensäulenreaktor zugeführt. Über den Reaktionsverlauf wurden Proben entnommen und mittels Säurezahl-Titration und Gaschromatographie vermessen. Zusätzlich wurde die Reaktion online mittels der FTIR-Spektroskopie vermessen.

Umsetzung von Glycerol und Laurinsäure zu einem Partialglycerid-Gemisch

Für die Umsetzung der Substrate wurde ebenfalls ein 0,25 L Blasensäulenreaktor verwendet. Die Reaktion wurde mit unterschiedlichen Temperaturen und molaren Substratverhältnissen durchgeführt. Die Batch-Versuche wurden jeweils mit Überschuss Glycerol und Überschuss Laurinsäure durchgeführt (genaue molare Substratverhältnisse siehe Kapitel 4.5.1). Die Fed-Batch-Versuche wurden mit Überschuss Glycerol und einer Zulauftrate von 0,25 mL/min Laurinsäure durchgeführt. Das Substrat Laurinsäure wurde bei den Batch-Versuchen jeweils vorgelegt und nach dem Schmelzvorgang wurde Glycerol dosiert. Mit der Zugabe von 2 Gew.-% (Batch-Versuche) und 6 Gew.-% (Fed-Batch-Versuche) wurden die Reaktionen gestartet. Über den Reaktionsverlauf wurden Proben entnommen und mittels Säurezahl-Titration und Gaschromatographie vermessen. Zusätzlich wurde die Reaktion online mittels der FTIR-Spektroskopie vermessen. Bei den Versuchen unter Einsatz eines interten Löslichkeitsvermittlers wurden zusätzlich jeweils 5 Gew.-% Cocoamidpropyl Betain oder *tert*-Butanol zu Beginn der Reaktion dosiert.

Synthese von Glyceroltrilaurat

Die Synthese von Glyceroltrilaurat wurde in einem 2 L Blasensäulenreaktor mit einer Luftbegasung von 8,92 L/min bei einer Temperatur von 80 °C durchgeführt. Dabei wurde ein dreifacher molarer Überschuss an Laurinsäure im Reaktor zum Schmelzen gebracht. Danach wurde die entsprechende Menge Glycerol dosiert. Die gesamte Ansatzgröße betrug 2196 g. Durch die Zugabe von 1 Gew.-% Novozym 435® wurde die Reaktion gestartet und bis zum thermodynamischen Reaktionsgleichgewichtspunkt durchgeführt. Über den Reaktionsverlauf wurden Proben entnommen und mittels Säurezahl-Titration und Gaschromatographie

vermessen. Am Ende wurde das Enzym abgetrennt und das Produkt in 100 g Chargen portioniert und eingefroren. Diese Chargen dienen dann bei der Umsetzung von Glycerol und Glyceroltrilaurat als Substrat.

Umsetzung von Glycerol und Glyceroltrilaurat zu einem Partialglycerid-Gemisch

Für die Glycerolysereaktion wurde ein 0,25 L Blasensäulenreaktor verwendet. Die Reaktion wurde mit unterschiedlichen Temperaturen und molaren Substratverhältnissen durchgeführt. Die Batch-Versuche wurden jeweils mit Überschuss an Glycerol durchgeführt (genaue molare Substratverhältnisse siehe Kapitel 4.5.2). Das Substrat Glyceroltrilaurat wurde bei den Batch-Versuchen jeweils vorgelegt und nach dem Schmelzvorgang wurde Glycerol dosiert. Mit der Zugabe von 3 Gew.-% wurden die Reaktionen gestartet. Über den Reaktionsverlauf wurden Proben entnommen und mittels Säurezahl-Titration und Gaschromatographie vermessen. Zusätzlich wurde die Reaktion online mittels der FTIR-Spektroskopie vermessen. Bei den Versuchen unter Einsatz eines inerten Löslichkeitsvermittlers wurden zusätzlich jeweils 5 Gew.-% Cocoamidpropyl Betain oder *tert*-Butanol zu Beginn der Reaktion dosiert.

B Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Tabelle B.1: Symbolverzeichnis lateinische Schriftzeichen

Symbol	Einheit	Bezeichnung
A_i	-	Ausbeute der Komponente i
c_i	mol L^{-1}	Konzentration der Komponente i
D	m	Durchmesser
d_p	μm	Eindringtiefe der evaneszenten Welle
E_A	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Aktivierungsenergie
H	m	Höhe
k_i	$\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	Geschwindigkeitskoeffizient der Komponente i
K_i	-	Thermodynamisches Reaktionsgleichgewicht der Komponente i
n_1	-	Brechungsindex des ATR-Kristalls
n_2	-	Brechungsindex des Mediums
n_i	mol	Stoffmenge der Komponente i
P_i^y	-	Phasenverteilungskoeffizient der Komponente i in der Phase y
R^2	-	Regressionskoeffizient
r_i	$\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i
S_i	-	Reaktionsselektivität der Komponente i
T	$^{\circ}\text{C} / \text{K}$	Temperatur
$V_{i,M}$	L mol^{-1}	Molares Volumen der Komponente i
w_i	g g^{-1}	Massenanteil der Komponente i
x_i	mol mol^{-1}	Stoffmengenanteil der Komponente i
X_i	-	Umsatz der Komponente i

Tabelle B.2: Symbolverzeichnis griechische Schriftzeichen

Symbol	Einheit	Bezeichnung
Δ_{RH}	$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$	Reaktionsenthalpie
α_i	mol mol^{-1}	Aktivität der Komponente i
γ_i	-	Aktivitätskoeffizient der Komponente i
λ_1	μm	Wellenlänge der einfallenden Strahlung

Tabelle B.3: Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
1,2-DL	Glycerol-1,2-dilaurat
1,3-DL	Glycerol-1,3-dilaurat
1-DeOH	1-Decanol
1-ML	Glycerol-1-monolaurat
2-ML	Glycerol-2-monolaurat
A_i	Reaktionsteilnehmer i
ATR	Attenuated total reflectance
CAPB	Cocoamidpropyl Betain
COSMO-RS	Conductor-like screening model“ für „real solvents“
DAG	Diacylglyceride
DL	Glyceroldilaurat
DSMO	Dimethylsulfoxid
FTIR	Fourier-Transformations Infrarot
GC	Gaschromatographie
Gly	Glycerol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IHM	Indirect Hard Modeling
LS	Laurinsäure
MAG	Monoacylglyceride
MIR	Mittlerer Infrarot
ML	Glycerolmonolaurat
NVZ 435[®]	Novozym 435 [®]
∅	Porendurchmesser
O/W	Öl in Wasser Emulsion
Emulsion	
PAT	Prozessanalysetechnik
PCA	Principal Component Analysis
PI-Regler	Proportional Integral Regler
PLS	Partial Least Squares
RMSEC	Root mean square error of calibration
RMSEP	Root mean square error of prediction
S	Substrat
SZ	Säurezahl
TAG	Triacylglyceride
TL	Glyceroltrilaurat
W/O	Wasser in Öl Emulsion
Emulsion	

C Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

C.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Einteilung der Enzymklassen	3
Tabelle 2.1: Übersicht zu den Strategien zur Erhöhung der Selektivität bezüglich MAG	23
Tabelle 4.1: Durchgeführte Versuche mit unterschiedlichen Molverhältnissen als Batch-Reaktion und Fed-Batch-Reaktion.	29
Tabelle 4.2: Ergebnisse der Verteilungskoeffizienten der Glyceride in einer binären Mischung aus Glycerol (Gly) und Laurinsäure (LS) bei 65 °C.	45
Tabelle 4.3: Einfluss der Temperatur und des Substratverhältnisses bei der enzymatischen Veresterung von Glycerol mit Laurinsäure im Batchreaktor.	57
Tabelle 4.4: Produktbildungsraten bei den Fed-Batch Experimenten in Abhängigkeit von der Laurinsäurezulauftrate und der Biokatalysatorbelastung.....	64
Tabelle 4.5: Zusammensetzung der Reaktionsmischung bis... a) Batch: zur Gleichgewichtseinstellung b) Fed-Batch	65
Tabelle 4.6: Zusammensetzung des eigenständig synthetisierten Glyceroltrilaurates (TL) und die enthaltenen Nebenprodukte Glycerolmonolaurat (ML) und Glyceroldilaurat (DL) und das Edukt LS.	68
Tabelle 4.7: Einfluss des Substratverhältnisses bei der enzymatischen Glycerolyse von Glycerol mit Glyceroltrilaurat im Batchreaktor.....	71
Tabelle 5.1: Ergebnissübersicht im Gesamtreaktionssystem im Reaktionsgleichgewicht.	77
Tabelle 5.2: Gleichgewichtskonstanten für die Veresterungsreaktion.....	77
Tabelle 5.3: Gleichgewichtskonstanten für die Glycerolyse-Reaktion.....	78
Tabelle 6.1: Absorptionsbanden der Kohlenwasserstoffgruppen	83
Tabelle 6.2: Absorptionsbanden der Hydroxylgruppen	83
Tabelle 6.3: Absorptionsbanden der Carbonylgruppen	83
Tabelle 6.4: Absorptionsbanden der C-O Einfachbindungen	84
Tabelle 6.5: Modellparameter des chemometrischen Modells.....	88
Tabelle 6.6: Modellparameter des chemometrischen Modells.....	93
Tabelle 6.7: Modellparameter des chemometrischen Modells.....	97
Tabelle 6.8: Modellparameter des chemometrischen Modells.....	104
Tabelle 6.9: Modellparameter der Spektralmodelle.....	107
Tabelle 6.10: Modellparameter des chemometrischen Modells.....	110
Tabelle 6.11: Modellparameter der Spektralmodelle.....	112
Tabelle 6.12: Modellparameter des chemometrischen Modells.....	115
Tabelle 6.13: Modellparameter des chemometrischen Modells.....	119
Tabelle 6.14: Modellparameter der Spektralmodelle.....	121
Tabelle 6.15: Modellparameter des chemometrischen Modells.....	124
Tabelle 6.16: Vergleich der RMSEP-Werte der IHM/PLS-Modelle für alle Reaktionsmechanismen.	126
Tabelle 7.1: Modellparameter des chemometrischen Modells.....	130

Tabelle 8.1: Ergebnisübersicht im Gesamtreaktionssystem im Reaktionsgleichgewicht für die Glycerolyse mit CAPB und <i>tert</i> -Butanol.	140
Tabelle 8.2: Vergleich der benötigten Prozessschritte zur Herstellung des Tensid-Gemisches aus Partialglyceride ML und DL mit CAPB.	142
Tabelle A.1: Verwendete Chemikalien und Hersteller/Vertreiber.	147
Tabelle A.2: Verwendete Geräte und Hersteller.	147
Tabelle A.3: Temperaturgang der verwendeten GC-Methode GLYC.M	151
Tabelle A.4: Responsefaktoren, Retentionszeiten und R ² aus Kalibrierungsreihe	151
Tabelle B.1: Symbolverzeichnis lateinische Schriftzeichen	159
Tabelle B.2: Symbolverzeichnis griechische Schriftzeichen	159
Tabelle B.3: Abkürzungen.	160

C.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Themendarstellung in der Einleitung.	1
Abbildung 1.2: Energiediagramm einer nicht katalysierten und einer katalysierten Reaktion.	2
Abbildung 1.3: Reaktionsmechanismus einer enzymatischen Veresterung durch eine Lipase/Esterase.	4
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines Emulgators anhand Glycerol-1-monolaurat.	6
Abbildung 1.5: T,x-Diagramm für ein binäres System aus den Komponenten A, B.	7
Abbildung 1.6: Dreiecksdiagramm für ein ternäres System aus den Komponenten A, B, C bei konstanter Temperatur und Druck.	8
Abbildung 1.7: Entstehung des Sigma-Profiles von Wasser aus der Molekülstruktur.	8
Abbildung 1.8: Vereinfachtes Reaktionsschema einer Veresterung.	9
Abbildung 1.9: Reaktionsschema der enzymatischen Veresterung von 1-Decanol und Laurinsäure zu Decyllaurat.	10
Abbildung 1.10: Vereinfachtes Reaktionsschema der enzymatischen Veresterung von Laurinsäure und Glycerol zu Glycerol-1-monolaurat (1-ML).	11
Abbildung 1.11: Unterschiedliche Reaktionsführung bei konkurrierenden Folgereaktionen.	12
Abbildung 1.12: Konzentrationsverläufe entsprechend der Zugabe Strategien.	12
Abbildung 1.13: Reaktionsschema der enzymatischen Glycerolyse von Glyceroltrilaurat (TL) zu Glycerol-1-monolaurat (1-ML).	13
Abbildung 1.14: Schematische Darstellung eines Blasensäulenreaktors.	14
Abbildung 1.15: Schematische Darstellung des Mehrphasen-Reaktionssystems.	15
Abbildung 1.16: Das elektromagnetische Spektrum [Chmiel 2011].	16
Abbildung 1.17: Prinzip eines ATR (attenuated total reflection)-Kristalls.	17
Abbildung 1.18: Mathematische Zusammenhänge für die Verknüpfung der Messgrößeninformationen X (Absorptionsspektren) mit den Zielgrößeninformationen Y (Konzentrationsdaten).	19
Abbildung 1.19: Erstellen eines multivariaten Modells über die Verknüpfung von Konzentrationsdaten mit den Infrarotspektren und Validierung bzw. Anwendung des Modells zur Auswertung von unbekanntem Spektren.	19

Abbildung 1.20: Prinzipielle Zusammensetzung des Validierfehlers bei der multivariaten Kalibrierung in Abhängigkeit von der Modellkomplexizität.	20
Abbildung 1.21: Schritte des <i>Indirect Hard Modeling</i> von Mischungsspektren zur Bestimmung der Konzentrationen einzelner Komponenten.	21
Abbildung 4.1: Reaktionsschema des 4-Phasensystems der enzymatischen Synthese von Decyllaurat.	28
Abbildung 4.2: Versuchsaufbau für die Batch-Reaktion (links) und die Fed-Batch-Reaktion (rechts).	29
Abbildung 4.3: Umsatzverlauf (oben) und Stoffmengenverläufe der einzelnen Komponenten (unten) einer Batch-Reaktion von Laurinsäure und 1-Decanol im Blasensäulenreaktor.	30
Abbildung 4.4: Stoffmengenverläufe der einzelnen Komponenten einer Batch-Reaktion mit Überschuss Laurinsäure (links) und Überschuss 1-Decanol (rechts) im Blasensäulenreaktor.	31
Abbildung 4.5: Stoffmengenverläufe der einzelnen Komponenten der Fed-Batch-Reaktion im Blasensäulenreaktor mit manueller Dosierung von 1-Decanol.	32
Abbildung 4.6: Stoffmengenverläufe der einzelnen Komponenten der Fed-Batch-Reaktion im Blasensäulenreaktor mit konstanter Dosierung von 1-Decanol.	33
Abbildung 4.7: Reaktionsschema der Veresterung von Glycerol als Triol mit Laurinsäure im Überschuss.	34
Abbildung 4.8: Reaktionsschema der Veresterung von Glycerol (Gly) als Triol mit Laurinsäure (LS).	35
Abbildung 4.9: Reaktionsschema der Glycerolyse von Glyceroltrilaurat (TL).	37
Abbildung 4.10: Binäre Gemische (jeweils $x = 0,5$) aus LS/ML, LS /DL und LS /TL bei 65 °C (von links nach rechts).....	39
Abbildung 4.11: Binäre Gemische aus Gly + LS, Gly + DL und Gly + TL bei 65 °C (von links nach rechts), sowie Gly + ML bei 70 °C (ganz rechts).	40
Abbildung 4.12: : T,x-Diagramm zum Vergleich von experimentell bestimmten Daten (geschlossene Symbole) sowie mittels COSMO-RS berechneter Daten (offene Symbole) aller untersuchten binären Systeme.	41
Abbildung 4.13: Dreiecksdiagramme (Experiment: grüne Kreise; COSMOS-RS: schwarze Quadrate) der Systeme aus Gly, LS und den Glyceriden ML, DL und TL bei 65 °C.	43
Abbildung 4.14: Reaktionsschema der Acylmigration am Beispiel der Reaktion von Glycerol-2-monolaurat (2-ML) zu Glycerol-1-monolaurat (1-ML).	47
Abbildung 4.15: ¹ H-NMR-Spektren (CDCl ₃ , 400 MHz) der 11 zeitlichen Versuchsproben.	48
Abbildung 4.16: Experimenteller (Symbole) und modellierter (gestrichelte Linien) Reaktionsverlauf der Acylmigration von Glycerol-2-monolaurat (2-ML, blau) zu Glycerol-1-monolaurat (1-ML, rot).	49
Abbildung 4.17: Reaktionsverlauf einer Batch-Reaktion im Blasensäulenreaktor mit Laurinsäure im Überschuss.	51
Abbildung 4.18: Reaktionsverlauf einer Batch-Reaktion mit Glycerol im Überschuss.	52
Abbildung 4.19: Zusammensetzung der dispersen unpolaren Phase (Links) und der polaren Phase (Rechts) über den Reaktionsverlauf in einem Blasensäulenreaktor.	52

Abbildung 4.20: Produktzusammensetzung in der unpolaren Phase im Reaktionsgleichgewicht.....	54
Abbildung 4.21: Selektivität von ML in Abhängigkeit des Umsatzes von LS für die Temperaturen von 60 °C bis 80 °C und einem Substratverhältnis von Glycerol zu Laurinsäure von 1:3 und 1:2.....	55
Abbildung 4.22: Selektivität von ML in Abhängigkeit des Umsatzes von LS für fünf unterschiedliche Substratverhältnisse von Glycerol zu Laurinsäure von 2:1 bis 10:1.....	56
Abbildung 4.23: Ausbeute von ML in Abhängigkeit des Umsatzes von LS für 7 unterschiedliche Substratverhältnisse von Glycerol zu Laurinsäure.	56
Abbildung 4.24: Versuchsaufbau für einen Fed-Batch-Versuch.	59
Abbildung 4.25: links: Heizschrank mit Plexiglas Frontscheibe. rechts: Ausgang Doppelmantelheizschlauch.	60
Abbildung 4.26: Reaktionsverlauf einer Fed-Batch-Reaktion mit Laurinsäurezulauf von 0,1 mL/min.	61
Abbildung 4.27: Reaktionsverlauf einer Fed-Batch-Reaktion mit Laurinsäurezulauf von 0,25 mL/min.	62
Abbildung 4.28: Zusammensetzung der dispersen unpolaren Phase über den Reaktionsverlauf & Zusammensetzung der polaren Phase über den Reaktionsverlauf.	62
Abbildung 4.29: Selektivität (links) und Ausbeute (rechts) von ML in Abhängigkeit des Umsatzes von LS für drei unterschiedliche Laurinsäurezulaufzeiten.	64
Abbildung 4.30: Ausbeute an ML in Abhängigkeit des Umsatzes von LS für ein Batch Experiment (Kreise) und ein Fed-Batch Experiment (Dreiecke).	66
Abbildung 4.31: Phasenverhalten und Zusammensetzung der Phasen in Mol.-% bei der enzymatischen Veresterung von Glycerol mit Laurinsäure (T=65°C) mit Glycerol in Überschuss.	67
Abbildung 4.32: (A) Synthese von Glyceroltrilaurat im 2L Blasensäulenreaktor. (B) Zeitlicher Verlauf des Laurinsäureumsatzes, (C) Reaktionsverlauf der Synthese von Glyceroltrilaurat.	69
Abbildung 4.33: Reaktionsverlauf einer Glycerolyse mit Glycerol im Überschuss.	70
Abbildung 4.34: Selektivität und Ausbeute von ML in Abhängigkeit des Umsatzes von TL für 6 unterschiedliche Substratverhältnisse von Glycerol zu TL von 1:1 bis 6:1.	71
Abbildung 4.35: Vergleichende Darstellung der Produktzusammensetzung in der unpolaren Phase und der Ausbeute an ML als Funktion des Umsatzes des jeweiligen Substrates (B). ...	72
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung zur Erhöhung der Löslichkeit von Glycerol in der unpolaren Phase durch Einsatz von Additiven (CABP und <i>tert</i> -Butanol).....	73
Abbildung 5.2: Experimentelle Dreiecksdiagramme bei 65 °C von Glycerol und allen Partialglyceriden des Reaktionssystems.	74
Abbildung 5.3: Dreiecksdiagramme von Glycerol, Glycerol Monolaurat (ML) und Glycerol Dilaurat (DL).	75
Abbildung 5.4: Vergleich der Reaktionssysteme im Reaktionsgleichgewicht im Gesamtsystem.	76
Abbildung 5.5: Vergleich der Reaktionssysteme im Reaktionsgleichgewicht in der Lipidphase.	79

Abbildung 5.6: Einfluss von CAPB auf das Phasenverhalten einer Produktmischung im thermodynamischen Gleichgewicht.	80
Abbildung 5.7: Ermittlung des Reaktionsgleichgewichts unter Vernachlässigung von <i>tert</i> -Butanol.	81
Abbildung 6.1: lokalisierte Schwingungsarten der Methylengruppe [Hesse et al. 2005].	83
Abbildung 6.2: Reinstoffspektren und deren charakteristische funktionelle Gruppen im Wellenzahlenbereich 1800 – 800 cm ⁻¹	84
Abbildung 6.3: Zeitliche Auflösung der FTIR-Spektren einer Veresterung von Laurinsäure und Glycerol.	86
Abbildung 6.4: 2D Darstellung der Veresterung von Glycerol und Laurinsäure.	87
Abbildung 6.5: Kalibriergeraden, A: Laurinsäure, B: Glycerolmonolaurat, C: Glyceroldilaurat, D: Glyceroltrilaurat.	89
Abbildung 6.6: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie vermessen.	90
Abbildung 6.7: Zeitliche Auflösung der FTIR-Spektren einer Veresterung von Laurinsäure und Glycerol als Überschuskomponente.	91
Abbildung 6.8: 2D Darstellung der Veresterung von Glycerol als Überschuskomponente und Laurinsäure.	92
Abbildung 6.9: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Laurinsäure, C: Glycerolmonolaurat, D: Glyceroldilaurat, E: Glyceroltrilaurat.	94
Abbildung 6.10: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf.	95
Abbildung 6.11: Zeitliche Auflösung der FTIR-Spektren einer Veresterung von Laurinsäure und Glycerol als Fed-Batch Reaktion mit Laurinsäurezufuhr von 0,25 mL/min.	96
Abbildung 6.12: 2D Darstellung der Veresterung von Glycerol und Laurinsäure als Fed-Batch Verfahrensweise mit Laurinsäurezufuhr.	97
Abbildung 6.13: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Laurinsäure, C: Glycerolmonolaurat, D: Glyceroldilaurat, E: Glyceroltrilaurat.	99
Abbildung 6.14: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie vermessen.	100
Abbildung 6.15: Anlagerung von Glycerintröpfchen in der Lipidphase.	101
Abbildung 6.16: Zeitliche Auflösung der FTIR-Spektren einer Glycerolyse von Glyceroltrilaurat.	102
Abbildung 6.17: 2D Darstellung Glycerolyse von Glyceroltrilaurat.	103
Abbildung 6.18: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Glycerolmonolaurat, C: Glyceroldilaurat, D: Glyceroltrilaurat.	104
Abbildung 6.19: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher semi-kontinuierlicher Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie vermessen. ...	105
Abbildung 6.20: Spektralmodell von Laurinsäure.	107
Abbildung 6.21: Plausibilitätstest der Spektralmodelle auf die Reinstoffspektren.	108
Abbildung 6.22: Zeitlicher Verlauf der Gewichtsfaktoren der Veresterung von Glycerol und Laurinsäure.	109

Abbildung 6.23: Kalibriergeraden, A: Laurinsäure, B: Glycerolmonolaurat, C: Glyceroldilaurat, D: Glyceroltrilaurat.	110
Abbildung 6.24: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie vermessen.	111
Abbildung 6.25: Spektralmodell von Glycerol. Mit 24 Peaks modelliert.	112
Abbildung 6.26: Plausibilitätstest der Spektralmodelle der Reinstoffspektren.	113
Abbildung 6.27: Zeitlicher Verlauf der Gewichtsfaktoren der Veresterung von Glycerol im Überschuss und Laurinsäure.	114
Abbildung 6.28: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Laurinsäure, C: Glycerolmonolaurat, D: Glyceroldilaurat.	115
Abbildung 6.29: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie vermessen.	117
Abbildung 6.30: Zeitlicher Verlauf der Gewichtsfaktoren der Veresterung von Glycerol und Laurinsäure auf Fed-Batch Verfahrensweise mit Laurinsäurezufuhr.	118
Abbildung 6.31: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Laurinsäure, C: Glycerolmonolaurat, D: Glyceroldilaurat.	119
Abbildung 6.32: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher Online-Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie.	120
Abbildung 6.33: Spektralmodell von Glycerolmonolaurat.	121
Abbildung 6.34: Plausibilitätstest der Spektralmodelle auf die Reinstoffspektren.	122
Abbildung 6.35: Zeitlicher Verlauf der Gewichtsfaktoren der Glycerolyse von Glyceroltrilaurat.	123
Abbildung 6.36: Kalibriergeraden, A: Glycerol, B: Laurinsäure, C: Glycerolmonolaurat, D: Glyceroldilaurat.	124
Abbildung 6.37: Zeitlicher Reaktionsverlauf der Stoffmengenanteile (Messpunkte) und zeitlicher semi-kontinuierlicher Prozessverlauf mittels FTIR-Spektroskopie gemessen.	125
Abbildung 7.1: Reaktionssequenz der Veresterung von 1-Decanol und Laurinsäure zur Synthese von Decyllaurat [A]. Fließschema der Prozesssteuerung der Fed-Batch Biotransformation [B].	128
Abbildung 7.2: Verbrauchsrate von 1-Decanol ($dx_{1\text{-Decanol}}/dt$) in [1/min] und die Maximum/Minimum Toleranz von +/- 0,001144 1/min für die diskontinuierliche Prozesssteuerung im Zeitfenster von 300 min: [A] und im Zeitfenster von 17,5 bis 25,5 min. [B].	132
Abbildung 7.3: Modellierter Stoffmengenverlauf der enzymatischen Veresterung von Laurinsäure (grün) und 1-Decanol (blau) zu Decyllaurat (rot) in einem Blasensäulenreaktor als Fed-Batch Modus mit dem Differenzial $dx_{1\text{-Decanol}}/dt$ als Prozesssteuerungsparameter.	133
Abbildung 7.4: Stoffmengenanteilverlauf von 1-Decanol $x_{1\text{-Decanol}}$ als Prozesssteuerungsparameter für eine diskontinuierliche Pumpensteuerung mit einem maximalen Grenzwert von $x_{1\text{-Decanol,max}} = 0,022 \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}}$ und einem minimalen Grenzwert im Bereich von $x_{1\text{-Decanol,min}} = 0,0076 \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}} - 0,017 \text{ mol/mol}_{\text{gesamt}}$	134

Abbildung 7.5: Verlauf der Stoffmengenanteile der enzymatischen Veresterung von Laurinsäure (grün) und 1-Decanol (blau) zu Decyllaurat (rot) in einem Blasensäulenreaktor als Fed-Batch Modus mit dem absoluten Stoffmengenanteil $x_{1\text{-Decanol}}$ als Prozesssteuerungsparameter. 135

Abbildung 7.6: Darstellung eines Feed back control loops und der Sprungantwort eines PI-Reglers. 136

Abbildung 7.7: Darstellung des Grundgedankens zur Festlegung des Sollwertes SP , der auf den Verbrauchsterm der Laurinsäure basiert. 136

Abbildung 7.8: Verlauf der Stoffmengenanteile der enzymatischen Veresterung von Laurinsäure (grün) und 1-Decanol (blau) zu Decyllaurat (rot) in einem Blasensäulenreaktor als Fed-Batch Modus mit dem Verbrauchsterm des Stoffmengenanteils an Laurinsäure $dx_{\text{Laurinsäure}}/dt$ als Prozesssteuerungsparameter für eine kontinuierliche Pumpensteuerung. 137

Abbildung 8.1: Vergleichende Darstellung der Produktzusammensetzung in der unpolaren Phase (ML + DL + TL). 140

Abbildung 8.2: A: Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips von CAPB auf das Phasenverhalten; B: Dreiecksdiagramme von Glycerol, Glycerolmonolaurat (ML) und Glyceroldilaurat (DL). 141

D Literaturverzeichnis

Abele, Th; Kaiser, Ulrich; Laube, Th; Drathen, H.; Westerkamp, Dieter (2005): "Technologie-Roadmap Sensorik-Technologie-Roadmap" Prozess-Sensoren 2005--2015", Teil 1: Welche Anforderungen bestehen an die Prozesssensoren der Zukunft? Im ersten Teil werden aus dieser Studie. In: *Automatisierungstechnische Praxis* 47 (8), S. 36–41.

Babel, Wolfgang; Gerlach, Martin; Steckenreiter, Thomas (2013): Fortschritte in der Sensortechnik entlang der Technologie-Roadmap. In: *atp edition* 51 (01-02), S. 100–107.

Baehr, Hans D.; Kabelac, Stephan (2012): Thermodynamik: Grundlagen und technische Anwendungen. 15. Aufl. In: *Berlin, Heidelberg: Springer*. Online verfügbar unter <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-642-24161-1>, zuletzt geprüft am 21. S. 2016.

Bährle-Rapp, Marina (2013): Springer Lexikon Kosmetik und Körperpflege: Springer-Verlag.

Baum, Edward (2018): Chemical property estimation: theory and application: CRC Press.

Baum, Sören; Mueller, Jakob J.; Hilterhaus, Lutz; Eckstein, Marrit; Thum, Oliver; Liese, Andreas (2016): The Bubble Column Reactor: A Novel Reactor Type for Cosmetic Esters. In: *Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications*.

Biermann, Ursula; Bornscheuer, Uwe; Meier, Michael A. R.; Metzger, Jürgen O.; Schäfer, Hans J. (2011): Fette und Öle als nachwachsende Rohstoffe in der Chemie. In: *Angewandte Chemie* 123 (17), S. 3938–3956.

Bisswanger, Hans (2000): Enzymkinetik: Theorie und Methoden, 3. Auflage.

Bornscheuer, Uwe Theo (2000): Enzymes in lipid modification: Wiley-VCH Weinheim.

Bornscheuer, Uwe Theo; Kazlauskas, Romas Joseph (2006): Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations: John Wiley & Sons.

Buchholz, Klaus; Kasche, Volker; Bornscheuer, Uwe Theo (2012): Biocatalysts and enzyme technology: John Wiley & Sons.

Buggert, Matthias (2008): Modellierung von Verteilungskoeffizienten pharmazeutischer Wirkstoffe in kolloidalen Systemen.

Buggert, Matthias; Cadena, Cesar; Mokrushina, Liudmila; Smirnova, Irina; Maginn, Edward J.; Arlt, WOLFGANG (2009): COSMO-RS calculations of partition coefficients: different tools for conformation search. In: *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology* 32 (6), S. 977–986.

Chmiel, Horst (2011): Bioreaktoren. In: *Bioprozesstechnik*: Springer, S. 197–236.

Compton, David L.; Vermillion, Karl E.; Laszlo, Joseph A. (2007): Acyl migration kinetics of 2-monoacylglycerols from soybean oil via ¹H NMR. In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84 (4), S. 343–348.

- Corma, A.; Iborra, S.; Miquel, S.; Primo, J. (1998): Catalysts for the production of fine chemicals: production of food emulsifiers, monoglycerides, by glycerolysis of fats with solid base catalysts. In: *Journal of catalysis* 173 (2), S. 315–321.
- da S Machado, M.; Pérez-Pariente, J.; Sastre, E.; Cardoso, D.; de Am Guerenu (2000): Selective synthesis of glycerol monolaurate with zeolitic molecular sieves. In: *Applied Catalysis A: General* 203 (2), S. 321–328.
- Damstrup, Marianne L.; Jensen, Tine; Sparsø, Flemming V.; Kiil, Søren Z.; Jensen, Anker D.; Xu, Xuebing (2006): Production of heat-sensitive monoacylglycerols by enzymatic glycerolysis in tert-pentanol: Process optimization by response surface methodology. In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83 (1), S. 27–33.
- Deckwer, Wolf-Dieter; Field, Robert W. (1992): Bubble column reactors: Wiley New York.
- Díaz, Isabel; Mohino, Federico; Pérez-Pariente, Joaquín; Sastre, Enrique (2001): Synthesis, characterization and catalytic activity of MCM-41-type mesoporous silicas functionalized with sulfonic acid. In: *Applied Catalysis A: General* 205 (1-2), S. 19–30.
- Engel, Dirk; Marquardt, Wolfgang; Alsmeyer, Frank (2009): Analytik und Datenanalyse. In: *Nachrichten aus der Chemie* 57 (5), S. 559.
- Févotte, Gilles (2002): New perspectives for the on-line monitoring of pharmaceutical crystallization processes using in situ infrared spectroscopy. In: *international journal of pharmaceutics* 241 (2), S. 263–278.
- Fujiwara, Mitsuko; Nagy, Zoltan K.; Chew, Jie W.; Braatz, Richard D. (2005): First-principles and direct design approaches for the control of pharmaceutical crystallization. In: *Journal of Process Control* 15 (5), S. 493–504.
- Geörg, Daniel; Schalk, Robert; Methner, Frank-Jürgen; Beuermann, Thomas (2015): MIR-ATR sensor for process monitoring. In: *Measurement Science and Technology* 26 (6), S. 65501.
- Gerlach, Martin; Gross, Reinhard; Steckenreiter, Thomas; Traenkle, Jens; Tulke, Albert (2016): Entwicklungen und Trends in der industriellen Prozessanalytik für Life-Science-Anwendungen. In: *Chemie Ingenieur Technik* 6 (88), S. 722–734.
- Gerlach, Robert W.; Kowalski, Bruce R.; Wold, Herman O. A. (1979): Partial least-squares path modelling with latent variables. In: *Analytica Chimica Acta* 112 (4), S. 417–421.
- Goldenberg, R. L. (1971): Correlation of skin feel of emollients to their chemical structure. In: *J. Soc. Cosmet. Chem* 22, S. 635–654.
- Gremlich, H. U.; Günzler, H. (2003): IR-Spektroskopie: Eine Einführung: Wiley-VCH, Weinheim.
- Grön, Heidi; Borissova, Antonia; Roberts, Kevin J. (2003): In-process ATR-FTIR spectroscopy for closed-loop supersaturation control of a batch crystallizer producing monosodium glutamate crystals of defined size. In: *Industrial & engineering chemistry research* 42 (1), S. 198–206.

Guo, Zheng; Xu, Xuebing (2005): New opportunity for enzymatic modification of fats and oils with industrial potentials. In: *Organic & biomolecular chemistry* 3 (14), S. 2615–2619.

Haake, Claas; Landgrebe, Daniel; Scheper, Thomas; Rhiel, Martin; Rhiel, M. (2009): Online-Infrarotspektroskopie in der Bioprozessanalytik. In: *Chemie Ingenieur Technik* 81 (9), S. 1385–1396.

Haas, Thomas; Skerra, Arne (2008): Weiße Biotechnologie–Innovation für die Chemieindustrie. In: *Nachrichten aus der Chemie* 56 (10), S. 1028–1031.

Hasenhuettl, Gerard L. (2008): Synthesis and commercial preparation of food emulsifiers. In: *Food emulsifiers and their applications*: Springer, S. 11–37.

Hesse, Manfred; Meier, Herbert; Zeeh, Bernd (2005): *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*: Georg Thieme Verlag.

Hilterhaus, Lutz (2007): Entwicklung eines Reaktorkonzepts zur enzymatischen Herstellung neuartiger Esteröle. Dissertation. Technische Universität Hamburg-Harburg, Hamburg. Technische Biokatalyse.

Hilterhaus, Lutz; Thum, Oliver; Liese, Andreas (2008): Reactor concept for lipase-catalyzed solvent-free conversion of highly viscous reactants forming two-phase systems. In: *Organic Process Research & Development* 12 (4), S. 618–625.

Hofmann, H.; Baerns, M.; Renken, A. (1992): *Chemische Reaktionstechnik*: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Hopp, Vollrath (2000): *Grundlagen der Life Sciences: Chemie-Biologie-Energetik*: Wiley Online Library.

Jakobtorweihen, Sven; Ingram, Thomas; Smirnova, Irina (2013): Combination of COSMOmic and molecular dynamics simulations for the calculation of membrane–water partition coefficients. In: *Journal of computational chemistry* 34 (15), S. 1332–1340.

Jerome, Francois; Kharchafi, Ghizlane; Adam, Isabelle; Barrault, Joël (2004): “One pot” and selective synthesis of monoglycerides over homogeneous and heterogeneous guanidine catalysts. In: *Green Chemistry* 6 (2), S. 72–74.

K. Goldberg (2005): Reaktionstechnische Untersuchungen enzymatisch katalysierter Transferhydrierungen. Diplomarbeit. Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster.

Kessler, Rudolf W. (2012): *Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis*: John Wiley & Sons.

Kessler, Rudolf W. (2013): Perspectives in process analysis. In: *Journal of Chemometrics* 27 (11), S. 369–378.

Kessler, Waltraud (2007): *Multivariate datenanalyse: für die pharma, bio-und Prozessanalytik*: John Wiley & Sons.

Klamt, Andreas (1995): Conductor-like screening model for real solvents: a new approach to the quantitative calculation of solvation phenomena. In: *The Journal of Physical Chemistry* 99 (7), S. 2224–2235.

Klamt, Andreas (2018): The COSMO and COSMO-RS solvation models. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 8 (1), S. e1338.

Klamt, Andreas; Eckert, Frank (2000): COSMO-RS: a novel and efficient method for the a priori prediction of thermophysical data of liquids. In: *Fluid Phase Equilibria* 172 (1), S. 43–72.

Klamt, Andreas; Eckert, Frank; Diedenhofen, Michael (2009): Prediction of partition coefficients and activity coefficients of two branched compounds using COSMOtherm. In: *Fluid Phase Equilibria* 285 (1-2), S. 15–18.

Klamt, Andreas; Jonas, Volker; Bürger, Thorsten; Lohrenz, John C. W. (1998): Refinement and parametrization of COSMO-RS. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 102 (26), S. 5074–5085.

Kraut, Joseph (1977): Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. In: *Annual review of biochemistry* 46 (1), S. 331–358.

Kriesten, E.; Mayer, D.; Alsmeyer, F.; Minnich, C. B.; Greiner, L.; Marquardt, W. (2008): Identification of unknown pure component spectra by indirect hard modeling. In: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 93 (2), S. 108–119.

Le Chatelier, Henri (1887): De l'action de la chaleur sur les argiles. In: *Bulletin de la Société Française de Minéralogie* 10, S. 204–207.

Leidreiter, H. I.; Gruning, B.; Kaseborn, D. (1997): Amphoteric surfactants: processing, product composition and properties. In: *International journal of cosmetic science* 19 (5), S. 239–253.

Liese, Andreas; Hilterhaus, Lutz; Kettling, Ulrich; Antranikian, Garabed (2016): Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications: John Wiley & Sons.

Liese, Andreas; Seelbach, Karsten; Wandrey, Christian (2006): Industrial biotransformations: John Wiley & Sons.

Liotta, Vincenzo; Sabesan, Vijay (2004): Monitoring and feedback control of supersaturation using ATR-FTIR to produce an active pharmaceutical ingredient of a desired crystal size. In: *Organic Process Research & Development* 8 (3), S. 488–494.

Löffler, Georg; Petrides, Petro E. (2013): Biochemie und pathobiochemie: Springer-Verlag.

Lüdecke, Dorothea; Lüdecke, Christa (2013): Thermodynamik: physikalisch-chemische Grundlagen der thermischen Verfahrenstechnik: Springer-Verlag.

Maiwald, Michael (2010): Technologie-Roadmap Prozess-Sensoren 2015+. In: *atp edition* 52 (01-02), S. 40–45.

McNeill, Gerald P.; Shimizu, Shoichi; Yamane, Tsuneo (1990): Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride. In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67 (11), S. 779–783.

McNeill, Gerald P.; Yamane, Tsuneo (1991): Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68 (1), S. 6–10.

Minnich, Clemens B.; Buskens, Pascal; Steffens, H. Christian; Bäuerlein, Patrick S.; Butvina, Leonid N.; Küpper, Lukas et al. (2007): Highly flexible fibre-optic ATR-IR probe for inline reaction monitoring. In: *Organic Process Research & Development* 11 (1), S. 94–97.

Möbius, Dietmar; Miller, Reinhard; Fainerman, Valentin B. (2001): Surfactants: chemistry, interfacial properties, applications: Elsevier.

Mokrushina, Liudmila; Yamin, Peyman; Sponsel, Elke; Arlt, WOLFGANG (2012): Prediction of phase equilibria in systems containing large flexible molecules using COSMO-RS: State-of-the-problem. In: *Fluid Phase Equilibria* 334, S. 37–42.

Müller, Jakob J. (2012): Enzymatische Veresterungen in Blasensäulenreaktoren: Kinetik, Stofftransport und Online Analytik: mbv, Mensch-und-Buch-Verlag.

Müller, Jakob J.; Neumann, Markus; Scholl, Paul; Hilterhaus, Lutz; Eckstein, Marrit; Thum, Oliver; Liese, Andreas (2010): Online monitoring of biotransformations in high viscous multiphase systems by means of FT-IR and chemometrics. In: *Analytical chemistry* 82 (14), S. 6008–6014.

Nagy, Zoltan K.; Braatz, Richard D. (2012): Advances and new directions in crystallization control. In: *Annual review of chemical and biomolecular engineering* 3, S. 55–75.

Natalello, Antonino; Sasso, Francesco; Secundo, Francesco (2013): Enzymatic transesterification monitored by an easy-to-use Fourier transform infrared spectroscopy method. In: *Biotechnology journal* 8 (1), S. 133–138.

Negi, Devender (2006): Base Catalyzed Glycerolysis of Fatty Acid Methyl Esters: Investigations Towards the Development of a Continuous Process.

Otto, Matthias (2011): Analytische chemie: John Wiley & Sons.

Pollard, D. J.; Buccino, R.; Connors, N.; Kirschner, T.; Olewinski, R.; Saini, K.; Salmon, P. (2001): Real-time analyte monitoring of a fungal fermentation, at pilot scale, using in situ mid-infrared spectroscopy. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24 (1), S. 13–24.

Schramm, Laurier L. (2006): Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications: John Wiley & Sons.

Schügerl, Karl (2001): Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years. In: *Journal of Biotechnology* 85 (2), S. 149–173.

Spuhl, OLIVER; Arlt, WOLFGANG; del Río Hernández, A. (2003): Vorhersage von thermodynamischen Stoffeigenschaften mit dem Kontinuumsmodell COSMO-RS. In: *Chemie Ingenieur Technik* 75 (1-2), S. 58–62.

Stephan, Karl; Mayinger, Franz (2013): *Thermodynamik. Grundlagen und technische Anwendungen: Band 2: Mehrstoffsysteme und Chemische Reaktionen*: Springer-Verlag.

Thiele, Salzer, Zuern (2014): *Quantitative Analyse: Kalibrierung*. Hg. v. Wiley Information Services GmbH. ChemgaPedia. Online verfügbar unter <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/kalibrierung.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/datenauswertung/quantitativ/innererstandard/innerstandardm80ht0801.vscml.html>, zuletzt geprüft am 12.10.2014.

Thum, Oliver (2004): Enzymatic production of care specialties based on fatty acid esters. In: *Tenside Surfactants Detergents* 41 (6), S. 287–290.

Wold, Herman (1974): Causal flows with latent variables: partings of the ways in the light of NIPALS modelling. In: *European Economic Review* 5 (1), S. 67–86.

Zhang, Feng; Adachi, Daisuke; Tamalampudi, Sriappareddy; Kondo, Akihiko; Tominaga, Keisuke (2013): Real-time monitoring of the transesterification of soybean oil and methanol by Fourier-transform infrared spectroscopy. In: *Energy & Fuels* 27 (10), S. 5957–5961.

Zhong, Nanjing; Cheong, Ling-Zhi; Xu, Xuebing (2014): Strategies to obtain high content of monoacylglycerols. In: *European journal of lipid science and technology* 116 (2), S. 97–107.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sören Baum
Geburtsdatum: 24.10.1984
Geburtsort: Henstedt-Ulzburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Ausbildungsdaten:

06/1995– 06/2004 Allgemeine Hochschulreife, Anne-Frank Gesamtschule, Bargteheide
08/2004 – 07/2005 Freiwilliges Soziales Jahr, Arbeiter Wohlfahrt, Ahrensburg
10/2005 – 09/2011 Studium der Verfahrenstechnik und Abschluss zum Diplom-Ingenieur an der TU Hamburg-Harburg
10/2011 – 03/2012 Assoc. Improvment Ingenieur, Dow Chemicals, Stade
04/2012 – 12/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Biokatalyse, TU Hamburg-Harburg betreut durch Prof. Dr. Andreas Liese
01/2016 – 12/2016 Projektingenieur bei IRPC Infrared - Process Control GmbH, Hamburg
seit 01/2017 Technischer Produktionsleiter Proteinschaumlöschmittel bei Fabrik chemischer Präparate von Dr.Richard Sthamer GmbH & Co. KG, Hamburg