

Enzym-katalytische Entschleimung von Sonnenblumenöl zur Steigerung der Ölausbeute

Von der Fakultät für Maschinenbau
der Helmut-Schmidt-Universität / Universität der Bundeswehr Hamburg
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktor-Ingenieurs
genehmigte

DISSERTATION

vorgelegt von

Oliver Wenzel

aus Eberswalde

Hamburg 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2015

Erster Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Bernd Niemeyer
Helmut-Schmidt-Universität / Universität der Bundeswehr Hamburg

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Wierschem
Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg

Für meine Eltern

Danksagung

Diese Arbeit entstand an der Professur für Verfahrenstechnik insbesondere Stofftrennung der Fakultät für Maschinenbau an der Helmut-Schmidt-Universität / Universität der Bundeswehr Hamburg im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Zeit von April 2012 bis März 2015.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr.-Ing. Bernd Niemeyer für die Überlassung dieses spannenden Themas, die gute Zusammenarbeit und den steten fachlichen Rat. Ferner danke ich Prof. Dr. rer. nat. Andreas Wierschem für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Meinen Kollegen Dr.-Ing. José Fernández, Dr.-Ing. Daniela Herbst und Johann Puerta danke ich für die Gespräche und zahlreichen Diskussionen, die stets neue und kritische Perspektiven auf meine Arbeit gewährten und so zum Fortgang der Untersuchungen maßgeblich beitrugen. Für die tatkräftige Unterstützung im Labor danke ich ganz besonders Tatjana Distel, ebenso wie den studentischen Hilfskräften Salim Erdal, Sabrina Förster und Alexandra Hinsch.

Dem Kollegium der Clariant Produkte GmbH Dr. Ulrich Sohling, Dr. Kirstin Suck, Dr. Andrea Stege, Marion Roßbauer und Karin Oberprieler gilt großer Dank für den fachlichen Rat und Gedankenaustausch bei der Methodenentwicklung und praktischen Umsetzung, sowie für die Bereitstellung von Analysekapazitäten im Rahmen des Projektes P38.

Christian Lüder von der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover danke ich für die Durchführung der Versuche mit dem *In-situ*-Videomikroskop.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich zu jedem Zeitpunkt unterstützen und immer an mich glauben.

Aus dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

Beiträge in Monographien:

U. Sohling, K. Suck, P. Jonczyk, F. Sander, S. Beutel, T. Scheper, A. Thiefes, U. Schuldt, C. Aldenhoven, G. Egri, L. Dähne, A. Fiethen, H. Kuhn, O. Wenzel, H. Temme, B. Niemeyer, P. Bubenheim, A. Liese, 2015, Inorganic Adsorbents in Enzymatic Processes: Adsorption of Substrates, Reaction Products, Enzymes, Surface Modification, and Enzyme Immobilization, in: L. Hilterhaus, A. Liese, U. Ketting, G. Antranikian (eds.), Applied Biocatalysis – From Fundamental Science to Industrial Applications, VCH-Wiley, Weinheim, FRG, voraussichtlich 2016.

Beiträge in referierten Zeitschriften:

O. Wenzel, J. Fernández, U. Sohling, B. Niemeyer, 2015, Quantitative Determination of Natural Glycolipids from Oil Seed by High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC), Journal of the American Oil Chemists' Society, 92, 633-644.

Beiträge zu Konferenzen:

O. Wenzel, B. Niemeyer, 2014, Quantitative Determination of Natural Glycolipids in Vegetable Oils by High-Performance Thin-Layer Chromatography (P), 21st International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2014 Prague, 17th Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction PRES 2014, 23.-27. August 2014, Prag, Tschechische Republik, Section: Symposium on Progress in Chemical Technology and Biotechnology, Serial no 151.

U. Sohling, A. Weckbecker, A. Thiefes, S. Beutel, C. Aldenhoven, C. Leggewie, A. Fiethen, J.-C. Antony, K. Suck, H. Kuhn, L. Dähne, A. Liese, L. Herring, B. Niemeyer, O. Wenzel, P. Bubenheim, S. Schreiber, T. Scheper, U. Schuldt, 2015, Biokatalyse 2021: Verbundprojekt – Neue Reaktionskonzepte für enzymatische Reaktionen auf Basis von immobilisierten Enzymen (V), Deutsche Biotechnologietage 2015, 22.-23. April 2015, Köln, Vortrag 22.04.2015.

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung	I
Abkürzungsverzeichnis	I
Formelverzeichnis	III
1 Motivation	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Sonnenblumenöl – Ursprung und Zusammensetzung	3
2.2 Ölgewinnung aus der Saat	8
2.3 Pflanzenölraffination	10
a) <i>Entschleimung</i>	11
b) <i>Neutralisation (chemische Entfernung der FFA)</i>	15
c) <i>Bleichen</i>	16
d) <i>Desodorierung & physikalische Entfernung freier Fettsäuren</i>	17
2.4 Enzymatische Entschleimung	18
2.5 Enzymatische Katalyse an Grenzflächen	21
3 Material und Methoden	25
3.1 Geräte und Chemikalien	25
3.1.1 Handelsübliche Geräte und Chemikalien	25
3.1.2 Versuchsausrüstung „Ölentschleimung“	25
3.1.3 <i>In-situ</i> -Videomikroskop	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Ölentschleimung	27
3.2.2 Externe Analysen	30
a) <i>Optische Atomemissions-Spektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES)</i>	30
b) <i>Bestimmung freier Fettsäuren (FFA)</i>	30
c) <i>Karl Fischer Titration (KF-Titration)</i>	31
3.2.3 <i>In-situ</i> -Videomikroskopie	32
3.2.4 Enzym-Peptid-Modifikationen	33
a) <i>Konjugation von Enzym und Peptid</i>	33
b) <i>Bestimmung der Aktivität</i>	36
3.2.5 Ober- und Grenzflächenspannung	36
a) <i>Ringmethode</i>	37

b)	<i>Plattenmethode</i>	37
c)	<i>Grenzflächenspannungen</i>	38
d)	<i>Dichtebestimmung</i>	38
3.2.6 Glycolipidanalytik (GL-Analytik)		38
a)	<i>Fraktionierung</i>	39
b)	<i>High-Performance Thin-Layer Chromatography</i>	40
4 Ergebnisse und Diskussion		43
4.1 Ölentseimung		43
a)	<i>Systemoptimierung</i>	43
b)	<i>Vergleich unterschiedlicher Ansätze der Ölentseimung</i>	53
4.2 Charakterisierung der Vorgänge während der Entseimung		59
a)	<i>Saure Entseimung</i>	63
b)	<i>Enzymatische Entseimung</i>	65
4.3 Enzym-Peptid-Modifikationen		68
a)	<i>Enzymaktivität</i>	68
b)	<i>Oberflächenspannung</i>	72
c)	<i>Ölentseimung</i>	74
4.4 Glycolipidanalytik (GL-Analytik)		80
a)	<i>Trennmethodik</i>	80
b)	<i>Optimierung der Derivatisierung und Detektion</i>	82
c)	<i>Kalibrierung</i>	86
d)	<i>Analyse von Ölschleimproben</i>	89
e)	<i>Einsatz der HPTLC zum Nachweis von Enzymaktivität</i>	92
5 Zusammenfassung und Ausblick		97
Literaturverzeichnis		V
Abbildungsverzeichnis		X
Tabellenverzeichnis		XIII
Anhang		A

Vorbemerkung

Diese vorliegende Arbeit entstand durch die Förderung des Clusters „BIOKATALYSE2021“ durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung. Die Professur für Verfahrenstechnik, insb. Stofftrennung, der Helmut-Schmidt-Universität / Universität der Bundeswehr Hamburg beteiligte sich hierbei am Konsortium des Projektes P38 „Neue Reaktionskonzepte für enzymatische Reaktionen auf der Basis von immobilisierten Enzymen“. Im Rahmen dieses Projektes entstand durch inhaltliche Parallelen eine enge Zusammenarbeit mit der Clariant Produkte (Deutschland) GmbH in Moosburg. Aufbauend auf jahrelanger Erfahrung im Bereich der Entschleimung pflanzlicher Öle konnte der Autor zum Teil auf hausinterne Analysekapazitäten der Clariant GmbH zurückgreifen. Zur Wahrung des Geschäftsgeheimnisses wird daher an einigen Stellen auf eine allzu detaillierte Darstellung einzelner Methoden verzichtet.

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin	
ADC2	Automatic Developing Chamber 2	
ASG	Acyliertes Sterylglucosid	
Ca	Calcium	
CAC	kritische Aggregatbildungskonzentration (Critical Aggregate Concentration)	
CCD	Charge-coupled Device	
Cer bzw. CerOH	Cerebroside	
D	Asparaginsäure	
DGDG	Digalactosyldiglycerid	
E	Glutaminsäure	
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochlorid	
FFA	freie Fettsäure	
GL	Glycolipide	
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	
HPTLC	High-Performance Thin-Layer Chromatography	
ICP-OES	Atomemissions-Spektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma	
KF	Karl-Fischer	
kDa	Kilo-Dalton	$1 \text{ Da} = 1,66054 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
L	Leucin	
LAT	Lipidacyltransferase	
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Monohydrat	
Mg	Magnesium	
MGDG	Monogalactosyldiglycerid	

MWCO	Molecular Weight Cut-Off	
nd	nicht detektierbar	
NHP	nonhydratable phosphatides (nichthydratisierbare Phospholipide)	
P	Phosphor	
PA	Phosphatidsäure	
PC	Phosphatidylcholin	
PE	Phosphatidylethanolamin	
PI	Phosphatidylinositol	
PL	Phospholipide	
PLA1	Phospholipase A1	
PLA2	Phospholipase A2	
PLC	Phospholipase C	
PLD	Phospholipase D	
pNP	para-Nitrophenol	
pNPP	Palmitinsäure-4-nitrophenylester	
ppm	parts per million	[mg/kg]
ppb	parts per billion	[µg/kg]
R ²	Bestimmtheitsmaß	
SG	Sterylglucosid	
SBO	Sojaöl (soybean oil)	
SFO	Sonnenblumenöl (sunflower oil)	
Sulfo-NHS	Sulfo-N- Hydroxysuccinimid	
TCI	Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibnitz Universität (H)	
TLC	Thin-Layer Chromatography	
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	
U/min	Umdrehungen pro Minute	[Umin ⁻¹]
V	Valin	
V _{Nenn}	Nennvolumen	[m ³]
W	Tryptophan	

Formelverzeichnis

d_R	Rührerdurchmesser	[m]
E	Enzym	
F	Kraft	[kg m/s ²]
F_A	Auftriebskraft	[kg m/s ²]
f_1, f_2	Freiheitsgrade	[-]
g	Erdbeschleunigung	[m/s ²]
K	Korrekturfaktor	[-]
l_b	benetzte Länge	[m]
N	Anzahl der Wertepaar	[-]
n	Drehzahl	[s ⁻¹]
p	Anzahl der abhängigen Variablen	[-]
P	Produkt	
r	Drahtdurchmesser	[m]
R	mittlerer Ringdurchmesser	[m]
R_a	äußerer Ringdurchmesser	[m]
R_i	innerer Ringdurchmesser	[m]
S	Substrat	
t	Quantil	[-]
TL	theoretischer Neutralisationsverlust	[Gew%]
V	Volumen	[m ³]
V_D	Volumen Dichtemesskörper	[m ³]
α	Irrtumswahrscheinlichkeit	[-]
ρ	Dichte	[kg/m ³]
η	dynamische Viskosität	[kg/m s]
σ	Ober- bzw. Grenzflächenspannung	[kg/s ²]
θ	Kontaktwinkel	[°]

1 Motivation

Pflanzliche Öle spielen seit jeher eine wichtige Rolle im häuslichen Alltag und der menschlichen Ernährung. Ein in der Geschichte Europas relevantes Beispiel ist sicherlich das Olivenöl, das bereits im antiken Griechenland zum Verzehr, aber auch als Lampenbrennstoff eingesetzt wurde. Weltweit hat sich der Mensch die verschiedensten lokalen Ölfrüchte und –samen erschlossen und kultiviert (Anhang A1 Abbildung A1). Die globale Bedeutung einzelner Ölpflanzen für Produktion und Handel ist jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. War in der Vergangenheit die regionale Verfügbarkeit einzelner Arten eingeschränkt, so ergab sich eine Abhängigkeit von Spezies, die unter Umständen nur unwirtschaftlich angebaut werden konnten, oder deren Öl lediglich eine geringe Qualität aufwies. Im Laufe der Entwicklung führte die beständig zunehmende Globalisierung zu einem steten Güter- und Technologietransfer, sodass besonders ertragreiche Nutzpflanzen durch Züchtung derart modifiziert werden konnten, um weltweit Eingang in die Landwirtschaft zu finden. Im Falle der Pflanzenöle lässt sich dies beispielhaft belegen. Während 1935 noch eine relativ große Diversität der kultivierten Sorten zu verzeichnen war, ohne einen klaren Favoriten erkennen zu lassen (Abbildung A1a), so stellte sich die Situation bereits 1990 völlig anders dar (Abbildung A1b). Heutzutage eher als „exotische“ bzw. besonders hochwertig betrachtete Öle, wie beispielsweise das Erdnuss- oder Leinsamenöl, haben bereits damals massiv an Bedeutung verloren. Als beherrschende Sorten hatten sich Soja-, Palmfrucht-, Sonnenblumen-, und Rapsöl, mit einem Gesamtmarktanteil von etwa 72 %, durchgesetzt. Diese vier Öle bestimmen auch weiterhin das Marktgeschehen, wobei mittlerweile das Palmfruchtöl den Spitzenplatz einnimmt und das Sonnenblumenöl auf den vierten Platz zurückgefallen ist (Abbildung A2). Insgesamt wächst die weltweite Pflanzenölproduktion seit Jahren kontinuierlich an und die Prognosen der OECD sowie FAO gehen bis 2022 von Größenordnungen im Bereich von annähernd 200 Millionen Tonnen aus [4, S. 274]. Diese Entwicklung korreliert gewiss mit der ebenfalls wachsenden Weltbevölkerung, deren Bedarf an Nahrungsmitteln stetig zunimmt. Daher verwundert es auch nicht, dass die Nutzung von Ölen in der Ernährung im gleichen Maße ansteigt (Abbildung A3). Neben dem Verzehr spielt in zunehmendem Maße auch der Einsatz von Pflanzenölen in technischen Anwendungen eine wichtige Rolle. Insbesondere die Herstellung von Biokraftstoffen aus derartigen Rohstoffen steht seit einiger Zeit aus ökologischen Gesichtspunkten massiv in der Kritik. Ein Blick auf die Abbildung A3b muss diese Sichtweise jedoch wieder relativieren, da der Anteil von Biokraftstoffen im Vergleich zum häuslichen Gebrauch der Öle in etwa konstant bleibt. Vielmehr ergibt sich die wesentliche ökologische und ökonomische Herausforderung der kommenden Jahre aus der stark wachsende Bevölkerung in vielen Teilen der Welt. Vor diesem Hintergrund gilt es Methoden zu identifizieren, die eine nachhaltige Versorgung der Menschheit mit notwendigen Gütern gewährleisten, unter gleichzeitiger Schonung unserer natürlichen Ressourcen.

In Europa und speziell der Europäischen Union spielen vor allem Raps- und Sonnenblumenöl die dominierende Rolle im Hinblick auf Anbau der Saaten und Produktion des Öles. Dieser Umstand ist einerseits kulturell bedingt, andererseits den klimatischen Gegebenheiten der Region geschuldet (Abbildung A4). Hierbei ist Raps mit etwa 70 % Marktanteil insgesamt der wichtigere Vertreter, jedoch

ergibt sich im Detail ein differenzierteres Bild (Anhang A2). Während Deutschland praktisch ausschließlich Raps anbaut und so zu 30 % zum europäischen Ertrag beiträgt, spielt Sonnenblumenöl im Süden und Südosten Europas eine wesentlich wichtigere Rolle. Diese Arbeit konzentriert sich im Wesentlichen auf die Untersuchung von Sonnenblumenöl, da dieses im Allgemeinen aufgrund des geringeren Marktanteiles weniger Beachtung findet als beispielsweise Soja oder Raps. Aus der Sicht des Autors bietet sich aber gerade das Sonnenblumenöl an, um Methodenoptimierungen durchzuführen, denn dieses Öl erzielt auf dem Weltmarkt tendenziell den höchsten Preis, verglichen mit den drei Alternativen (Abbildung A5). Somit besteht in diesem Bereich Spielraum für Investitionen, bei gleichzeitiger Aussicht auf fristgerechte Amortisierung. Wesentliche Verbesserungen beim Anbau der Sonnenblumensaat sind in absehbarer Zeit nicht zu erwarten, denn in den Industrieländern liegen die Erträge seit Jahren auf hohem Niveau und in den Schwellenländern (z.B. Indien, Argentinien und China) sind Fortschritte im Bereich der landwirtschaftlichen Produktion aufgrund der klimatischen Veränderungen eher unwahrscheinlich (Tabelle A1). Berücksichtigt man die verfügbaren Anbauflächen, so stellt man fest, dass diese insgesamt relativ stabil sind. Das mag daher rühren, dass die Sonnenblume nur in gemäßigten Breiten angebaut werden kann und sie in diesen Regionen mit anderen Feldfrüchten konkurriert (Tabelle A2). Im Sinne der Schonung der natürlichen Ressourcen kann es mittel- und langfristig nicht das Ziel sein die landwirtschaftlichen Anbauflächen zu Lasten bestehender Biotop zu erweitern. Daher muss nach Wegen gesucht werden, wie es gelingt das in der Sonnenblumensaat enthaltene Öl bestmöglich, unter Minimierung eines Ölverlustes, zu gewinnen und zu fraktionieren.

Vor diesem facettenreichen Hintergrund beschäftigt sich diese Arbeit mit einem zentralen Prozessschritt bei der Raffination pflanzlicher Öle, der sogenannten Ölentseimung. Während zahlreiche Arbeiten bereits den Nachweis erbracht haben, dass enzymatische Ansätze eine hinreichend gute Ölqualität gewährleisten. Soll im Folgenden das Ziel verfolgt werden, Möglichkeiten aufzuzeigen wie die Ölausbeute durch Verringerung des Ölverlustes im sogenannten Ölschleim gesteigert werden kann. Hierzu werden neben handelsüblichen Enzymen auch Modifikationen selbiger zu Einsatz gebracht, um durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion die molekulare Struktur des Ölschleimes derart zu beeinflussen, dass seine Fähigkeit „Neutralöl“ einzuschließen vermindert wird. Ausgehend von industriell etablierten konventionellen und enzymatischen Verfahren wird die vorliegende Methodik optimiert, insbesondere im Hinblick auf die Quantifizierung der Ölverluste im Verlauf des Prozesses. Unterstützend werden *in situ* videomikroskopische Aufnahmen der Ölentseimung herangezogen, um die im Verlauf der Reaktion ablaufenden Prozesse qualitativ zu beschreiben, mit der Absicht die Wirkmechanismen besser zu verstehen. Darüber hinaus widmet sich ein Teil der Arbeit der Untersuchung der Inhaltsstoffe des Ölschleimes, nämlich den sogenannten Glycolipiden. Diese Verbindungen stellen eine signifikant große Fraktion im Ölschleim dar, ihr Einfluss auf die Entseimung, vor allem in enzymatischen Ansätzen, ist allerdings nicht ausreichend untersucht. Ausgangspunkt dieser Versuche ist die Etablierung einer Analyseverfahren beginnend bei der Isolierung der Glycolipide, mit dem Ziel diese zu detektieren und ihren Anteil zu quantifizieren, um abschließend unterschiedliche Schleimproben auf ihren Glycolipidgehalt hin zu analysieren.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Sonnenblumenöl – Ursprung und Zusammensetzung

Die Sonnenblume (*Helianthus annuus*) gehört zur Gattung der Korbblütengewächse und hat ihren Ursprung in Nord- und Mittelamerika, wo sie bereits lange vor der Ankunft der Europäer kultiviert wurde und einen wesentlichen Bestandteil zur Ernährung beitrug. Die Sonnenblumenkerne wurden zu Mehl verarbeitet und zur Herstellung einer brotähnlichen Mahlzeit genutzt. Ferner wurde auch bereits das Öl aus den Kernen gewonnen und zu medizinischen Zwecken eingesetzt [6, S. 128]. Mit den Spaniern gelangte die Sonnenblume im 16. Jahrhundert nach Europa. Hier verbreitete sie sich rasch vor allem in Russland und entwickelte sich dort zu einem wichtigen Agrarprodukt. Mit der zielgerichteten Zucht der Sonnenblume begann man in Russland zu Beginn des 20. Jahrhunderts, mit der Absicht, den Ölgehalt der Kerne zu erhöhen. Diese Erfolge, verbunden mit der Züchtung von Varianten, die maschinell geerntet werden können, führten zur verstärkten Verbreitung der Sonnenblume als Kulturpflanze für die Ölgewinnung, seit den 1960'er Jahren auch in den USA und Kanada. Seither betreibt man eine intensive Züchtung, vor allem um die Zusammensetzung des Sonnenblumenöls vorteilhaft zu verändern.

Sonnenblumen werden weltweit in gemäßigten Breiten von Argentinien bis nach Nordamerika, von der Europäischen Union über die Ukraine und Russland bis nach China angebaut. Zur Gewährleistung einer optimalen Keimung ist die Aussaat auf die klimatischen Gegebenheiten des Anbaugebietes abzustimmen. Generell werden Temperaturen ab 10 °C empfohlen [6, S. 131]. Optimales Wachstum zeigen die Pflanzen bei Temperaturen zwischen 20 – 25 °C, eine Überschreitung dieser verringert sowohl Ertrag als auch Ölgehalt der Kerne. Trockenheit kann in begrenztem Maße toleriert werden, sie wirkt sich jedoch ebenfalls auf den Ertrag und Ölgehalt aus. Frost wird zu jeder Zeit zum Absterben der Pflanzen führen. Die Ernte erfolgt nach Ausreifung der Blüte bei einem Wassergehalt von 10 – 12 % im Kern. Verzögert sich die Ernte, so verschlechtert sich die Ölqualität durch Bildung freier Fettsäuren, hervorgerufen durch oxidative und enzymatische Prozesse. Liegen in einem Anbaujahr optimale geographische und klimatische Bedingungen vor, so können Erträge von bis zu 3 t/ha an Saatgut erzielt werden [7, S. 8].

Die Sonnenblumenkerne, als Träger des Öls befinden sich in der ausgereiften Blüte und werden durch abernten der gesamten Pflanze erhalten. Pro Blüte kann man von etwa 1.200 – 1.500 Kernen ausgehen. Die Sonnenblumensaat besteht im Wesentlichen aus dem Kern und der ihn umgebenden Schale. Der Ölgehalt der Kerne ist stark von den Witterungsbedingungen im Erntejahr abhängig. Ferner spielt aber auch Züchtung eine wesentliche Rolle beim erzielbaren Ölgehalt. Bis etwa zur Mitte der 1960'er Jahre fiel das Verhältnis von Schale zu Öl deutlich zugunsten der Schale aus (Tabelle 2.1.1). Dieses konnte erst durch Einführung ölreicher Saaten umgekehrt werden. Seither liegt der Ölgehalt in der Saat bei etwa 44 – 51 Gew% ja nach angebauter Variante.

Tabelle 2.1.1: Massenverhältnis von Schale und Ölgehalt sowohl in der historischen Entwicklung als auch unter Berücksichtigung gezüchteter Varianten, angebaut im gleichen Jahr, in der gleichen Region.

Saat / Anbauregion (Jahr)	Gewicht 1000 Kerne [g]	Schalen [%]	Ölgehalt [%]	Quelle
Peredovic, ND, USA (1994)	61,0	20,0	48,7	6, S. 137*
Hybrid 894, ND, USA (1994)	50,0	27,5	43,6	6*
Cargill 187, ND, USA (1994)	54,0	24,2	45,5	6*
Interstate 3137, ND, USA (1994)	51,5	25,3	50,5	6*
Mycogen 658, ND, USA (1994)	52,0	21,8	50,9	6*
Pioneer 6451, ND, USA (1994)	55,0	21,4	49,6	6*
öltreiche Saat (seit 1967)		23	40	13, S. 387
ölarmer Saat (bis 1967)		43	30	13, S. 387
Diverse (1967/1968)			27 – 44 (>50*)	16, S. 449f

* - Angaben bezogen auf die Trockenmasse

Bevor nun im Folgenden auf die genaue Zusammensetzung von Sonnenblumenöl eingegangen wird, soll zunächst kurz dargelegt werden, was in dieser Arbeit unter dem Begriff Pflanzenöl verstanden wird. Pflanzenöl ist ein Gemisch pflanzlichen Ursprungs von etwa 96 – 98 % Triacylglycerolen (mithin auch Triglyceride genannt) in Verbindung mit teilweise oder vollständig fettlöslichen weiteren Bestandteilen, diese sind zum größten Teil unerwünscht. Ferner spricht man in gemäßigten Breiten von einem Öl, wenn es bei Zimmertemperatur, etwa 20 °C, flüssig ist, andernfalls handelt es sich allgemein um Fette [11, S. 3]. Triglyceride entstehen durch eine Veresterungsreaktion von drei Monocarbonsäuren (C_xH_yCOOH , Fettsäuren) an die Hydroxylgruppen des dreiwertigen Alkohols Glycerin ($C_3H_8O_3$). Das Ziel sämtlicher Raffination pflanzlicher Öle ist die Maximierung des Anteils an Triglyceriden (Neutralölen) in diesen Gemischen.

Wesentliche Eigenschaften eines Öles bzw. Fettes, u.a. auch der Aggregatzustand bei Zimmertemperatur, aber auch die Lagerstabilität, werden durch die Kombination der drei veresterten Fettsäuren bestimmt. Die Fettsäurekomposition von „traditionellem“ Sonnenblumenöl setzt sich in absteigender Reihenfolge hauptsächlich aus Linolsäure ($C_{17}H_{31}COOH$, 18:2), Ölsäure ($C_{17}H_{33}COOH$, 18:1), Palmitinsäure ($C_{15}H_{31}COOH$, 16:0) und Stearinsäure ($C_{17}H_{35}COOH$, 18:0) zusammen. Der erste Index bezeichnet hierbei die Länge der Kohlenstoffkette, der zweite die Anzahl der Doppelbindungen im Molekül. Durch Züchtung konnte die Fettsäurekomposition der Öle verändert werden, wodurch man heutzutage in Ergänzung zum traditionellen Sonnenblumenöl noch mid-oleic- und high-oleic-Sonnenblumenöl unterscheidet. Diese zeichnen sich durch einen höheren Anteil an Ölsäure aus, wodurch sich die oxidative Lagerstabilität der Öle, gemessen mit der „active oxygen method“, erhöht [12, S. 63]. Tabelle 2.1.2 gibt einen Überblick über die Fettsäurezusammensetzung zahlreicher Öle aus verschiedenen Jahren und Anbaugebieten. Hieraus ist sehr leicht ersichtlich wie hoch variabel diese Kompositionen sind. Campbell arbeitet vor diesem Hintergrund heraus, dass Sonnenblumenöl eines der wenigen Pflanzenöle ist, dessen Zusammensetzung derart stark von äußeren Einflüssen abhängt. Namentlich benennt er vier wesentliche Faktoren: das Klima, die Temperatur, genetische Faktoren und die Position des Kerns in der Blüte [13, S. 387]. Die Temperatur spielt bei der Bildung

der Linolsäure eine wichtige Rolle. Steigende Temperaturen führen zu einem Absinken dieses Anteils, wohingegen die Bildung von Ölsäure begünstigt wird. Auf diesen Effekt der Temperatur wird auch an anderer Stelle hingewiesen [14, S.127], jedoch kann dies durch gezielte Züchtung ausgeschaltet werden, wodurch derartige Sorten weniger „temperaturfühliger“ sind. Aber auch züchterischerseits bestehen Abhängigkeiten, die die Modifikation der Fettsäurezusammensetzung einschränken. Zwischen der Linolsäure und Ölsäure besteht eine negative Korrelation, weswegen die Steigerung der einen mit der Abnahme der anderen einhergeht. Ferner besteht eine solche negative Korrelation ebenfalls zwischen der Linolsäure und Stearinsäure, jene zwischen Ölsäure und Stearinsäure hingegen ist positiv. Das bedeutet für den Züchter, dass er den Gehalt der Stearinsäure nicht losgelöst vom Gesamtsystem beeinflussen kann. Hiervon ungeachtet scheint zwischen der Palmitinsäure und dem restlichen System keine unmittelbare Korrelation zu bestehen [14, S. 129]. Interessanterweise lässt sich nachweisen, dass die Fettsäureverteilung selbst innerhalb der Blüten nicht homogen sein muss, sondern sich vielmehr in konzentrischen Kreisen von außen nach innen verändert. Dies hängt mit der etwa zehntägigen ringförmigen Ausreifung der Kerne ebenfalls von außen nach innen zusammen. Somit lässt sich selbst innerhalb von Blüten die Veränderung der Umweltverhältnisse und deren Auswirkungen auf das Öl nachweisen [15, S. 274f].

Tabelle 2.1.2: Fettsäurekomposition verschiedener Sonnenblumenöle. [Gew%]

Saat / Anbauregion	Fettsäure				Jahr	Quelle
	Palmitinsäure 16:0	Stearinsäure 18:0	Ölsäure 18:1	Linolsäure 18:2		
Advent, CAN	6,04	5,07	18,30	70,62	1963	14, S. 126
Advent, CAN	6,08	3,76	18,00	72,08	1964	14
Commander, CAN	5,96	4,77	18,17	71,13	1963	14
ZAF	6,2	5,2	17,0	70,0	1967	16
Westafrika	4,9	3,8	34,5	54,7	1967	16
FRA	5,8	5,4	18,9	67,2	1968	16
CM323, USA	6,0	7,6	26,0	60,4	1972	15
Krasnodarets, USA	6,5	5,3	17,1	71,1	1972	15
Southern	5,1	3,9	26,0	64,4	1978	17, S. 451
Northern	5,8	3,9	26,0	64,4	1978	17, S. 451
Northern	6,28	4,24	18,40	70,4	1980	13, S. 388
Northern	6,24	4,14	19,76	69,5	1981	13, S. 388
CAN	6,3	4,2	26,0	64,4	1981	13, S. 388
ARG	5,7	3,0	18,3	69,0	1981	13, S. 388
RUS	6,0	5,6	17,8	68,7	1968	18, S. 384
Traditionell	6,3	3,7	24,3	65,1		19, S. 1139
Traditionell	6,4	5,0	29,3	58,3		20, S. 132
Traditionell	6,4	4,7	21,0	67,7		21, S. 578
High-Oleic	4,7	3,8	80,2	9,5		20, S. 132
High-Oleic	4,0	4,3	72,4	16,8		21, S. 578
CAS-12, ESP	27,8	1,8	57,7	2,3	1999	20, S. 132

Neben der globalen Verteilung der Fettsäuren im Öl wird darüber hinaus auch deren Verteilung im Triglyceridmolekül untersucht. Die Tabelle 2.1.3 stellt hierzu die Verteilung möglicher Permutationen der enthaltenen Fettsäuren in verschiedenen Ölen dar. In der Tabelle sind die enthaltenen Fettsäuren durch einen Großbuchstaben indiziert, und die Reihenfolge der Fettsäuren entspricht deren Bindungsstelle innerhalb des Triglyceridmoleküls. Bemerkenswert in dieser Hinsicht ist die Tatsache, dass sich Linolsäure, die im traditionellen Öl in großem Überschuss vorliegt, relativ gleichmäßig auf etwa vier Permutationen verteilt. Im Gegensatz dazu konzentriert sich die Masse der Ölsäure des high-oleic-Öls vor allem in einer einzelnen Permutation.

Tabelle 2.1.3: Mögliche Permutationen der Fettsäuren im Triglyceridmolekül sowie deren Verteilung in verschiedenen Ölen.

Fettsäurezusammensetzung	Sonnenblumenöl [Gew%]			
	Traditionell 1*	Traditionell 2 [#]	High-Oleic [#]	CAS-12 ^{##}
LLL	27,2	26,4	5,6	
OLL	29,5	25,6	7,5	
PLL	9,6	10,9	2,2	
OLO	11,0	8,1	9,5	1,3
PLO / SLL	10,0	12,9	4,0	3,2
OOO	3,0	1,7	51,1	12,6
OOPo				8,5
POO / SOL	3,5	4,7	8,7	35,5
POPo				11,9
POP	0,5			18,5
Andere	5,7	9,7		9,1

L – Linolsäure, O – Ölsäure, P – Palmitinsäure Po – Palmitoleinsäure, S – Stearinsäure

* - [19, S. 1139]; # - [21, S. 578]; ## - [20, S. 133]

Neben den Triglyceriden enthalten pflanzliche Öle eine Vielzahl weiterer Verbindungen, die die Eigenschaften des Öls, je nach späterer Verwendung, sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen. Durch die hydrolytische Spaltung der Triglyceride kommt es zur Freisetzung von freien Fettsäuren (FFA) und Bildung von Di- bzw. Monoglyceriden. Hervorgerufen werden diese Erscheinungen einerseits durch Lipase katalysierte Reaktionen in der Saat, aber auch während der weiteren Verarbeitung und Lagerung des Rohöls finden oxidative Prozesse statt, die die Triglyceridmoleküle zersetzen. Bedingt durch die ungebundenen funktionellen Gruppen dieser Verbindungen zeigen sie emulsionsstabilisierendes Verhalten und können sich daher negativ auf Ölausbeute und Produktqualität im raffinierten Öl auswirken. Im Sonnenblumenöl wie auch in den meisten Samenölen liegt der Anteil an FFA bei etwa 0,5 – 1,5 Gew%, im Falle von Di- und Monoglyceriden entsprechend < 0,5 Gew% bzw. 0,2 – 0,4 Gew% [11, S. 8].

Eine weitere Gruppe von „Verunreinigungen“ wird unter dem Sammelbegriff der Phospholipide (PL) zusammengefasst. Hierbei handelt es sich ebenfalls um amphiphile Verbindungen mit oberflächenaktiven Eigenschaften. Die emulsionsstabilisierenden Charakteristika wirken sich nachteilig auf die Produkteigenschaften aus und begünstigen die Hydrolyse des Öls, was dessen Lagerstabilität mindert [11, S. 316]. Im Wesentlichen lassen sich im Sonnenblumenöl vier PL unterscheiden:

Theoretische Grundlagen

- Phosphatidylcholin (PC)
- Phosphatidylethanolamin (PE)
- Phosphatidylinositol (PI)
- Phosphatidsäure (PA)

Da die PL der Hauptbestandteil des Ölschleims sind, wird im Abschnitt 2.3a) genauer auf ihre Eigenschaften, Bedeutung und chemische Struktur eingegangen. Zum jetzigen Zeitpunkt soll nur darauf hingewiesen werden, dass hydratisierbare und nichthydratisierbare PL unterschieden werden. Die Erstgenannten lösen sich durch Wasserzugabe bei Temperaturen um 60 °C und können so sehr einfach aus dem Öl abgetrennt werden. Letztere bilden mit bivalenten Metallionen Komplexe, die praktisch nicht hydratisierbar sind. Sie abzutrennen ist eine zentrale Aufgabe der Ölentseimung. In Tabelle 2.1.4 ist der Anteil der PL-Fraktion in verschiedenen Ölen sowie deren Zusammensetzung dargestellt. Es zeigt sich, dass die Methode der Ölgewinnung aus der Saat sich direkt auf die Menge der PL im Öl auswirkt, sodass extrahiertes Öl stets mehr Phospholipide enthält als gepresstes.

Tabelle 2.1.4: Verteilung der vier PL in Rohölen unter Berücksichtigung sowohl verschiedener gezüchteter Saatvarianten als auch unterschieden nach der Methode der Ölgewinnung.

Saat / Öl	Phospholipide [Gew%]					Quelle
	PC	PE	PI	PA	Ges. [Gew%]	
Armavriski 3497	58,8	19,6	20,6	1,1	0,86	22, S. 242
Peredovik	64,2	19,5	15,2	1,2	0,75	22
Salyut	56,1	17,0	22,4	4,5	0,72	22
VNIMK 8931	55,4	18,2	24,0	2,2	0,82	22
Gepresst 1					0,737	23, S. 419
Gepresst 2					0,391	23
Extrahiert 1					1,195	23
Extrahiert 2					0,79	23
Gepresst	19,0-50,1	15,0-23,4	15,8-27,2	14,8-36,7	0,29-0,74	24, S. 1179
Extrahiert	28,9-52,0	17,0-25,6	15,5-30,5	10,7-22,0	0,59-1,20	24
Gepresst	44,4	20,3	20,5	14,8	0,737	25, S. 514
Extrahiert	47,6	20,9	19,7	11,8	1,195	25

Zu den natürlichen Antioxidantien im Sonnenblumenöl zählen die Tocopherole, auch unter dem Begriff Vitamin E bekannt. Aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung begünstigt eine erhöhte Konzentration im raffinierten Öl dessen Lagerstabilität.

Eine Besonderheit des Sonnenblumenöls ist der hohe Anteil an Wachsen im Rohöl. Diese pflanzlichen Wachse resultieren aus der Veresterung langkettiger Fettalkohole mit langkettigen Fettsäuren. Diese sind vollständig im Öl löslich, jedoch neigen sie bei Temperaturen, wie sie im Kühlschrank vorherrschen, zum Ausfallen, bedingt durch ihren hohen Schmelzpunkt von etwa 70 °C [12, S. 231]. Hierdurch trübt sich das Öl ein, was seine Gebrauchsfähigkeit als Salatöl nicht einschränkt, aber aus kosmetischen Gründen unerwünscht ist. Eingesetzt z.B. in Mayonnaisen oder Dressings würde ihre Kristallisation zur Destabilisierung der Emulsion führen. Somit stellt das Entwachsen von Sonnenblumenöl eine Notwendigkeit dar. Ihren Ursprung haben die Wachse als

Bestandteil der Schale der Saat, von der sie im Zuge der Ölgewinnung in das Rohöl gelangen können. Dies ist unter anderem eine Folge der erhöhten Prozesstemperaturen, bei denen die Wachse verflüssigt vorliegen. Eine effektive Maßnahme zur Reduzierung des Wachsanteils im Rohöl ist das Schälen der Saat vor der Pressung und/oder Extraktion. Des Weiteren kann die Saat vor dem Schälen auch mit heißem Hexan gewaschen werden [17, S. 519][48, S. 763]. Der Wachsgehalt kann, je nach Vorbehandlung der Saat, wenige hundert ppm bis zu 2000 ppm betragen [Bredevan, S. 421][49, S. 92].

Im vorliegenden Abschnitt wurden grundlegende Fakten zum Sonnenblumenöl und seinen Inhaltsstoffen vorgestellt. Berücksichtigt man diese hinsichtlich ihres Einflusses auf die Produktqualität, so ergeben sich hieraus unmittelbar die Anforderungen an eine zielführende Aufbereitung pflanzlicher Öle. Der Kunde erwartet ein lagerstabiles, geruchsneutrales und klares Produkt, das sowohl im Haushalt als auch in der Industrie für zahlreiche Anwendungen einsetzbar sein soll. Folglich müssen alle emulsionsstabilisierenden (FFA, PL), oxidationsfördernden Verbindungen (Metalle, Chlorophyll), Farb- und Geruchstoffe sowie Wachse aus dem Öl abgetrennt werden. Die Pflanzenölraffination zielt auf diese Aufgaben ab und soll im Folgenden näher erörtert werden.

2.2 Ölgewinnung aus der Saat

Im Bereich pflanzlicher Öle werden grundsätzlich zwei Hauptklassen bezüglich ihres Ursprunges unterschieden: 1. Bei den Fruchtfleischölen sitzt das Öl im Fruchtfleisch der ausgebildeten Früchte. Das weltweit relevanteste Beispiel ist das Öl der Palmfrucht. 2. Das Öl der Samenöle wird aus den jeweiligen Samen der angebauten Pflanzen gewonnen. Zu diesen zählt auch das untersuchte Sonnenblumenöl. Unter den Samenölen erfolgt eine weitere Untergliederung in Samen mit einem niedrigen Ölgehalt (< 20 Gew%), wie das Sojaöl und solchen mit einem hohen Ölgehalt (> 40 Gew%), beispielhaft sei hier Sonnenblumenöl genannt. Entsprechend ihres Ursprunges und den damit verbundenen Saateigenschaften erfolgt die Gewinnung des Öls aus den Samen individuell abgestimmt auf die jeweilige Saat. Im folgenden Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die Prozessschritte von der geernteten Sonnenblumensaat bis zum Rohöl gegeben werden. Die Abbildung 2.2.1 verdeutlicht die Zusammenhänge graphisch.

Die geerntete Sonnenblumensaat wird gereinigt und von Fremdstoffen befreit, anschließend kann sie bei einem Wassergehalt von etwa 10 Gew% kurzzeitig gelagert werden [6, S. 143]. Soll die eingelagerte Saat verarbeitet werden, so erfolgt zunächst das Schälen der Kerne. Hierdurch kann der Wachsanteil im Rohöl um etwa 80 % gesenkt werden [1, S. 196]. Zur besseren Extrahierbarkeit kann jedoch ein Anteil von bis zu 15 Gew% Schalen bei den geschälten Kernen belassen werden. Im nächsten Schritt werden die Kerne zerkleinert und zwischen Walzenpaaren zu Flocken verarbeitet. Hierdurch werden die Wände der ölenhaltenden Zellen aufgebrochen, was für die Ölgewinnung unumgänglich ist.

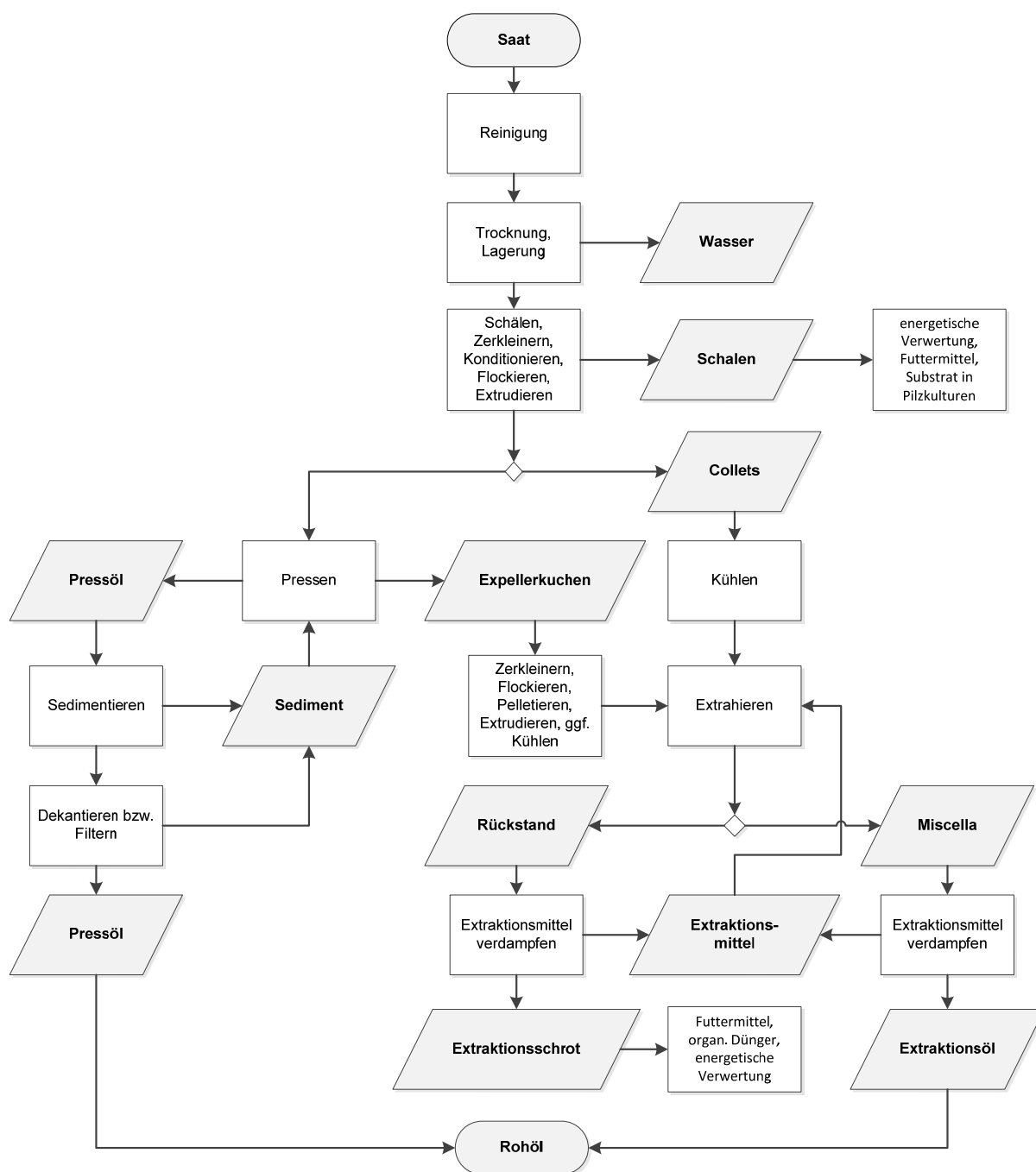


Abbildung 2.2.1: Schematische Darstellung des Prozesses von der Saat zum Rohöl.

Anschließend führt man die Flocken in der Regel einem Schraubenextruder zu. In diesem werden die Temperatur und der Druck im Material in Verbindung mit heißem Wasserdampf erhöht, was zur Inaktivierung der enthaltenen Enzyme führt. Der schlagartige Druckabfall am Ausgang bewirkt in den Collets das Bersten bisher ungeöffneter Ölzellen sowie die Verbesserung der Porosität des Materials. Zu diesem Zeitpunkt eröffnen sich zwei Möglichkeiten des weiteren Vorgehens. Entweder schließt sich direkt die Extraktion der Collets an, oder das Öl wird zunächst durch Pressung in einer Schraubenpresse abgetrennt. Der hierbei entstehende Expellerkuchen enthält jedoch noch einen wesentlichen Anteil Öl von bis zu 20 Gew% [12, S. 164], sodass dieser ebenfalls durch Extraktion ausgebeutet wird. Die Extraktion der ölführenden Feststoffströme ist heutzutage Stand der Technik

und eine Notwendigkeit rationalen, wirtschaftlichen Handelns. Industriell etabliert hat sich Hexan als das Mittel der Wahl. Die bei der Extraktion des Öls ablaufenden Prozesse sind bei weitem noch nicht abschließend untersucht. Wesentliche Einflussparameter sind: die Dicke der Flocken, die Größe der Flocken, die Prozesstemperatur, Extraktionszeit sowie das gewählte Extraktionsmittel. Nach der Extraktion werden sowohl aus den festen Rückständen wie auch aus dem mit Öl versetzten Extraktionsmittel (Miscella) das Lösungsmittel abgetrennt und im Prozess rezirkuliert, während das Extraktionsöl mit dem Pressöl zum Rohöl vereinigt wird und das Extraktionsschrot energetisch, als Futtermittel, oder als Dünger Verwendung finden. Detaillierte Ausführungen zur Thematik der Extraktionsmechanismen finden sich in [12, S 159ff].

2.3 Pflanzenölraffination

Bedingt durch den Prozess der Ölgewinnung aus der Saat und den oben beschriebenen Inhaltsstoffen, besitzen die Öle noch nicht die für die späteren Anwendungen notwendigen Eigenschaften. Ein wesentliches Kriterium zur Beurteilung der Ölqualität ist die Lagerstabilität, die unabhängig von der Verwendung, ob als Lebensmittel oder im technischen Einsatz, möglichst hoch sein soll. Darüber hinaus stellt die Nutzung im Bereich der Lebensmittel hohe Anforderungen an Farbe, Geruch und Geschmack der Öle. Daher durchlaufen sie regelmäßig einen mindestens vierstufigen Raffinationsprozess, an dessen Ende ein voll raffiniertes Pflanzenöl steht, das für alle derzeit relevanten Einsatzgebiete geeignet ist. Beginnend mit der Entschleimung werden die PL aus dem Öl entfernt. Dem folgt die Reduzierung der FFA mittels Neutralisation. Durch den Einsatz verschiedener Adsorbentien werden weitere polare Verbindungen, vor allem aber Farbstoffe eliminiert, bevor im Zuge der Desodorierung flüchtige Geruch- und Geschmackstoffe verdampft werden. In der Abbildung 2.3.1 sind diese Schritte der Pflanzenölraffination inklusive einiger Nebenstränge zusammengestellt. In den folgenden Absätzen erfolgt in Anlehnung daran die schrittweise Darstellung der Prozessgrundlagen. Dies erscheint angeraten, um die vorliegende Arbeit in den Gesamtkontext der Pflanzenölaufbereitung einordnen zu können.

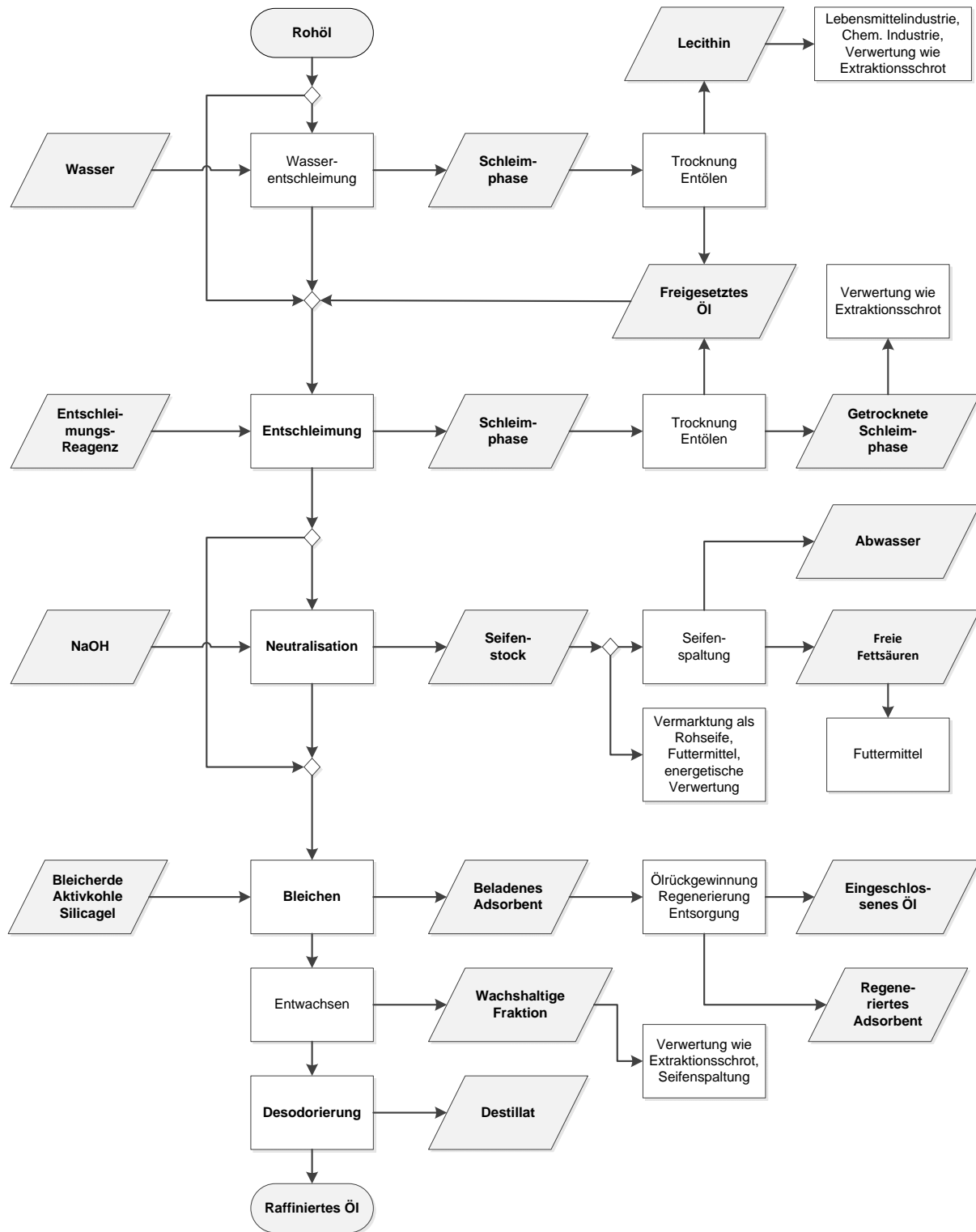


Abbildung 2.3.1: Prozessschema der Pflanzenölraffination.

a) Entschleimung

Die Entschleimung der Pflanzenöle zielt auf die Entfernung wasserlöslicher Komponenten im Öl (Ölschleim/Schleimstoffe) ab, zu denen im Wesentlichen die PL, Glycolipide, Kohlenhydratverbindungen und Proteine gehören. Zur zielgerichteten Entschleimung wird in das Öl eine wässrige Phase eingebracht, in der sich die Schleimstoffe lösen, bzw. sich an der Grenzfläche zwischen Öl und

wässriger Phase anlagern. Untersuchungen zur Ölschleimung beschäftigen sich grundsätzlich mit der Hydratisierbarkeit (dem Lösungsverhalten) der PL, da diese den größten Anteil des Ölschleims repräsentieren und mit ihnen die entscheidenden Herausforderungen verbunden sind. Die Abbildung 2.3.2 veranschaulicht die molekulare Struktur der vier Hauptphospholipide PA, PC, PE und PI.

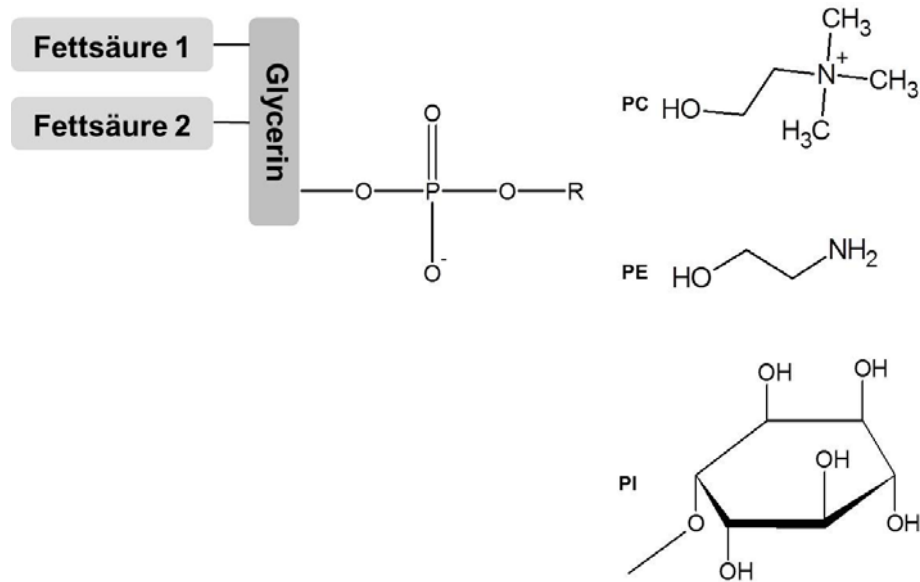


Abbildung 2.3.2: Struktur der Phospholipide. Wenn R = H \rightarrow Phosphatidsäure (PA).

Es lassen sich zwei Formen der PL unterscheiden. Einerseits sind einige PL leicht hydratisierbar und können bereits mit Wasser entfernt werden (Wasserentschleimung). Auf der anderen Seite liegen beispielsweise im Sonnenblumenöl bis zu 40 % der PL in nicht hydratisierbarer Form vor (NHP) [26, S. 1152][27, S. 218]. Diese NHP setzen sich zum Großteil aus PA und seiner Lysoform zusammen. Man spricht von der Lysoform eines PL, wenn lediglich eine Fettsäure, statt der üblichen zwei Fettsäuren, am Glycerinrumpf verestert ist. Zudem können bis zu 15 % PE in der NHP-Fraktion vorliegen [28]. Maßgeblich für die schlechte Hydratisierbarkeit scheint die Ausbildung von Komplexen der PL mit Calcium- und Magnesiumionen zu sein, wodurch sie nach außen keine Ladung präsentieren und hydrophobe Eigenschaften zeigen. Liegen die NHP jedoch nicht im Komplex vor, so sind sie durchaus hydratisierbar, was durch ihren Nachweis im Ölschleim nach einer Wasserentschleimung belegt ist [12, S. 178]. Auch die hydratisierbaren PL können derartige Komplexe ausbilden, sie werden hierdurch jedoch nicht in ihrem Löslichkeitsverhalten beeinflusst. Dijkstra begründet diesen Umstand mit der Struktur von PC und PI [29, S. 1179]. Im Falle von PC trägt die quartäre Aminogruppe zu jedem Zeitpunkt eine positive Ladung, die auch bei Komplexbildung mit Erdalkalimetallen stets isoliert bleibt und die Hydratisierbarkeit gewährleistet. Beim PI stehen an der Inositolgruppe fünf Hydroxylgruppen zur Verfügung, die ebenfalls die uneingeschränkte Wasserlöslichkeit garantieren. Betreffs PE gibt es Hinweise darauf, dass es die Gegenwart hydratisierbarer PL benötigt, um selbst hydratisiert zu werden [30, S. 1051f]. Andererseits scheint PC in der Lage zu sein, weitere PL wie z.B. PA, PE und PI zu „umschließen“, um sie so gewissermaßen zu hydratisieren [31]. Aus diesen Überlegungen folgt, dass PC und PI immer hydratisierbar sind. Wohingegen PE nur in Gegenwart anderer hydratisierbarer PL wasserlöslich ist. PA lässt sich nur hydratisieren, wenn es in ionisierter Form vorliegt [12, S. 178f].

Ein wichtiger Parameter, der die Hydratisierbarkeit der PL beeinflusst, ist der pH-Wert. Hierdurch wird ihre Dissoziation gesteuert und so die Löslichkeit der Moleküle variiert. Dies ist bei der Prozessführung von entscheidender Bedeutung. PC und PE haben beispielsweise bei niedrigem pH-Wert eine positive Ladung und sind somit grundsätzlich hydratisierbar. Während PI und PA in diesem pH-Bereich neutral sind, was im Falle von PA dessen Hydratisierbarkeit einschränkt. Die Steigerung des pH-Wertes bewirkt den Übergang zu einem Zwitterion im Falle von PC und PE und die Ausbildung einer einfach bzw. mehrfach negativen Ladung bei PI und PA. Über alle pH-Bereiche hinweg sind die ausgebildeten Calcium- bzw. Magnesiumkomplexe von PA ungeladen.

Die einfachste Form der Entschleimung ist die sogenannte Wasserentschleimung, also die Zugabe von heißem Wasser/Wasserdampf zum Öl. Dieser Schritt dient in erster Linie der Lecithingewinnung (Summe der wasserlöslichen PL) für die Lebensmittelindustrie, kann aber auch eingesetzt werden, um einen hohen Phosphorgehalt und somit die PL auf ein geringeres Maß einzustellen, bevor die weitere Entschleimung durchgeführt wird [12, S. 180]. In beiden Fällen ist die Wasserentschleimung von wirtschaftlicher Bedeutung, ermöglicht sie einerseits die Bereitstellung eines verkäuflichen Produktes und andererseits hilft sie bei der Einsparung zusätzlicher Chemikalien. Relevante Prozessparameter sind die hinzugefügte Wassermenge, die Reaktionszeit und -temperatur und die Durchmischung. Zentrale Kenngröße zur Festlegung des Wassergehaltes ist der PL-Gehalt im rohen Öl, der ausgehend vom Phosphorgehalt ermittelt wird. Mittels Gleichung 2.1 kann der Anteil der PL im Öl sehr einfach bestimmt werden [11, S. 33].

$$PL[\%] = P[ppm] \cdot 31,7 \cdot 10^{-4} \quad (2.1)$$

In dieser Gleichung taucht der Umrechnungsfaktor 31,7 auf, der sich in der ölverarbeitenden Industrie etabliert hat [49, S. 140]. Dennoch legen Untersuchungen der molaren Masse der PL und deren Fettsäureverteilung nahe (Umrechnungsfaktor ca. 25), dass es sich hierbei in vielen Fällen um einen „Daumenwert“ handelt, mit dem man einen um 20 % zu hohen Wert kalkuliert. Ein wesentliches Motiv bei dieser Überdimensionierung des PL-Anteils liegt sicherlich in der gewonnenen Prozesssicherheit [32, S. 301][24, S. 1179]. Diese Vorgehensweise ist nachvollziehbar, berücksichtigt man, dass aufbauend auf dieser Information der Anteil der wässrigen Phase bestimmt wird, und eine Minderdosierung zu einer unvollständigen Entschleimung führt [11, S. 37]. Diese Prozesssicherheit wird durch einen höheren Ressourceneinsatz erkaufte. Resultierend aus dem PL-Gehalt kann der Umfang der Wasserzugabe bestimmt werden. Je nach Literatur reichen die Werte von $1 \cdot PL$ bis $0,7 \cdot PL$ [11, S. 35][49, S. 140]. Die Reaktionszeiten für die Entschleimung reichen von wenigen Minuten bis zu einer Stunde und Reaktionstemperaturen von etwa 40 °C bis zu 70 °C [12, S. 180f]. Ebenso gilt es eine Temperatur einzustellen, die sowohl die Hydratisierung begünstigt (< 55 °C) und dennoch eine hinreichende Abtrennung des Schleims im Hinblick auf die Ölviskosität ermöglicht (> 60 °C) [11, S. 37]. Der durch Zentrifugation separierte Schleim enthält noch bis zu 70 % Öl, das dem Prozess nach dem Entölen wieder zugeführt wird. Nach der Trocknung steht das Lecithin für eine Vermarktung bereit.

Aufgrund der Komplexbildung der PL mit Calcium- und Magnesiumionen reicht die Wasserentschleimung in der Regel nicht aus, um die PL-Konzentration auf das notwendige Maß zu

reduzieren. Zudem führt Dijkstra an, dass gegebenenfalls inakzeptabel hohe Eisenkonzentrationen, gemessen als elementares Eisen beispielsweise mittels ICP-OES, im wasserentschleimten Öl vorliegen, die wesentlichen Einfluss auf die Lagerstabilität des Öles haben, da das Eisen eine stark oxidative Wirkung besitzt [33, S. 1002ff]. Es wird postuliert, dass Eisen, ebenso wie die Erdalkalimetalle Komplexe mit den PL ausbilden, sodass es in dieser Form gebunden ist. Somit kann durch Einstellung einer geringen PL-Konzentration auch ein niedriger Eisengehalt gewährleistet werden. Zu diesem Zweck müssen die NHP im Rahmen der sauren Entschleimung (acid degumming) in eine Form überführt werden, in der sie hydratisierbar sind. Dies gelingt durch die Zugabe einer Säure, die ausreichend stark ist, die Komplexe zu spalten und die erneute Assoziation der frei werdenden Metallionen mit den PL verhindert. Ferner sollte sie mit keinen weiteren Ölkomponenten reagieren. Sie darf nicht giftig, übermäßig korrosiv oder teuer sein und ihre gebildeten Salze müssen sich in der wässrigen Phase lösen. Vor diesem Hintergrund wurden zahlreiche Säuren untersucht. Phosphorsäure sowie Zitronensäure haben sich als vorteilhaft für die meisten industriellen Prozesse etabliert, wobei Smiles der Zitronensäure wegen der besseren Reduzierung der Eisenwerte den Vorrang einräumt [33, S. 1005][12, S. 182][34, S. 927][26, S. 1152]. Ein wesentlicher industriell etablierter Prozess der sauren Entschleimung ist das von Unilever patentierte *SuperDegumming* [35]. Trotz der angeschlossenen Verdünnung der Zitronensäure mit Wasser, können durch das Verfahren Phosphorgehalte < 30 ppm nicht erreicht werden. Die Ursache hierfür liegt in der ausgeführten pH-abhängigen Hydratisierbarkeit der PL und der nicht ausreichenden Anhebung des pH-Wertes durch die Verdünnung durch das Wasser. Somit kann säureentschleimtes Öl nicht ohne weiteres gebleicht und die FFA physikalisch entfernt werden (physical refining), bevor nicht eine zusätzliche Reduktion des Phosphorgehaltes auf 10 ppm stattgefunden hat [11, S. 49]. Die notwendige Anpassung des pH-Wertes kann durch eine Teilneutralisation der Säure durch eine geeignete Base geschehen (acid refining). Hierbei ist zu beachten, dass die eingesetzte Base keine divalenten Ionen wie beispielsweise Calcium enthält, um die erneute Bildung von NHP zu verhindern [33, S. 1005]. Für das acid refining hat sich Natronlauge bewährt, durch deren Einsatz sich zuverlässig geringe Phosphor- und Eisengehalte einstellen und eine erneute Komplexbildung mit den PL vermieden wird. Patentierte und etablierte Prozesse stellen das *Unidegumming* von Unilever, als Erweiterung des *SuperDegumming*, und das *TOP degumming* von Vandemoortele dar [36][33, S. 1006]. Die mögliche Reaktionstemperatur beim acid refining liegt zwischen 70 und 110 °C. Weitere Untersuchungen zur Entschleimung belegen, dass sich verfahrensunabhängig keine Auswirkungen auf die Zusammensetzung des entschleimten Öles ergeben. Es kommt weder zu einer nennenswerten Veränderung der Fettsäurezusammensetzung im Öl noch im abzentrifugierten Ölschleim [26, S. 1154]. Die oxidative Stabilität nimmt im entschleimten Öl jedoch ab. Dies liegt einerseits an der Reduzierung der antioxidativen Tocopherole um etwa 6 Gew% [34, S. 929], andererseits besitzen auch die abgetrennten PL eine antioxidative Wirkung, da sie die Metallionen, die sich prooxidativ auswirken, an sich binden [23, S. 422][Cabezas, S. 664ff]. Nach der Trocknung und Entölung wird der Ölschleim, falls möglich, dem Extraktionsschrot beigemischt und entsprechend verwertet, andernfalls stellt die thermische Ausbeutung dieses Nebenproduktes eine sinnvolle Nutzung dar.

b) Neutralisation (chemische Entfernung der FFA)

Im Anschluss an die Entschleimung erfolgt in einem weiteren Schritt die Entfernung der FFA aus dem entschleimten Öl. Bereits seit dem 19. Jahrhundert nutzt man hierzu ein als alkali refining bekanntes Verfahren [12, S. 191]. Hierbei wird das Öl mit einer wässrigen Alkalilösung, meist Natronlauge, versetzt, sodass mit den FFA Natriumseifen ausgebildet werden. Anschließend wird dieser Seifenstock, bestehend aus Wasser, Seifen, PL, Hydrolyseprodukten, Pigmenten sowie Mono-, Di- und Triglyceriden abzentrifugiert. Dieser Seifenstock stellt ein hoch komplexes Gemisch aus unterschiedlichsten Substanzen dar. Daher dient die Neutralisation nicht nur der Entfernung von FFA. Es werden ebenso verbliebene PL ausgewaschen, und im Vorgriff auf das Bleichen können bereits erste Pigmente entfernt werden, was den Verbrauch an Bleicherden verringert. Grundsätzlich kann das Öl unabhängig von einer etwaig vorhergehenden Entschleimung neutralisiert werden. Jedoch wirken sich vorhandene PL merklich auf die Eigenschaften des Seifenstockes aus, wodurch sich die Bedingungen für die Zentrifugation verändern können. Aus diesem Grund sollte stets ein Minimum an PL im zu neutralisierenden Öl angestrebt werden, sodass bei unterschiedlichen Chargen stets ähnliche Bedingungen vorherrschen.

Im Prinzip werden weltweit zwei Neutralisationsprozesse unterschieden. In den USA wird im Wesentlichen der „*Long-Mix Process*“ angewandt, während in Europa der „*Short-Mix Process*“ genutzt wird [12, S. 193ff]. Der Long-Mix Process entstand im Zuge der Baumwollsaatölherstellung und beabsichtigt auch gezielt den Abbau von Pigmenten, die mit freier Natronlauge reagieren. Die Zentrifugation der Seifen erfolgt jedoch bei etwa 70 °C in zwei Schritten. In einem ersten Separator wird der eigentliche Seifenstock abgeführt und nach einer erneuten Erwärmung des Reaktionsgemisches und zusätzlichem warmen Wasser findet eine Waschung statt. Nach der nun folgenden Trocknung bei 50 mbar steht ein neutralisiertes Öl zur Verfügung. Im Gegensatz dazu arbeitet man beim Short-Mix Process mit Öl, das eingangsseitig auf bis zu 95 °C erwärmt wird. Die eingesetzte Natronlauge besitzt eine Konzentration von 4,1 – 6,9 N, verglichen mit 2,6 – 3,6 N im Long-Mix Prozess. Der weitere Prozess gleicht prinzipiell dem oben Beschriebenen, ein relativer Laugenüberschuss von 10 Gew% ist üblich.

Der Verluststrom während der Neutralisation setzt sich wesentlich zusammen aus der Abtrennung der unerwünschten Bestandteile wie z.B. den FFA und PL, aber auch aus einem Verlust von Neutralöl. Das Neutralöl geht einerseits als Einschluss im Seifenstock verloren, ähnlich wie bei der Entschleimung. Andererseits kommt es auch zur Verseifung des Neutralöles, das dann als „natürlicher“ Bestandteil des Seifenstockes ausgetragen wird. Eine weitere unerwünschte Nebenwirkung der Neutralisation ist der Verlust von etwa 15 Gew% der antioxidativen Tocopherole, deren Instabilität in Gegenwart von Sauerstoff und starken Basen vermutlich ursächlich hierfür ist [34, S. 929].

c) Bleichen

Die Notwendigkeit zum Bleichen von Pflanzenölen im Verlauf der Raffination liegt in den noch im Öl enthaltenen Verunreinigungen begründet. Ihr Ziel ist die weitere Verbesserung der äußeren Erscheinung, des Geruches, des Duftes und auch der Stabilität des Endproduktes. Landläufig wird der „adsorptiven Reinigung“ stets die Aufgabe zugeschrieben die Entfernung von Farbstoffen aus dem Öl zu gewährleisten. Diese Funktion ist durchaus relevant, doch wird es dem Verfahren nicht gerecht [12, S. 212]. Es handelt sich vielmehr um eine Kombination physikalischer und chemischer Prozesse, durch die es möglich ist auch PL, verbliebene Seifen, prooxidative Spurenelemente (z.B. Calcium und Magnesium) und Oxidationsprodukte abzutrennen. Ferner gelingt während des Bleichens der katalytische Abbau von Peroxiden. Das gebräuchlichste Adsorbens, das in diesem Zusammenhang zum Einsatz kommt sind die sogenannten Bleicherden, die das weiteste Anwendungsgebiet aufweisen. Darüber hinaus wird auch Aktivkohle eingesetzt, deren unpolare Oberfläche als einzige in der Lage ist polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe aus dem Öl abzutrennen. Daher kann den Bleicherden ein Anteil von bis zu 10 Gew% Aktivkohle beigemischt werden [49, S. 173.]. Grundsätzlich verfügt auch Silicagel über Fähigkeiten zur Öbleichung, jedoch ist dessen Anwendung eher der Ausnahmefall.

Bleicherden gehören zur Familie der Tonmineralien bzw. Aluminiumsilikate, von denen einige bereits im natürlichen Zustand „Bleichaktivität“ aufweisen, andere müssen zunächst durch eine Vorbehandlung aktiviert werden [49, S. 158ff]. Die wesentlichen Anforderungen an Bleicherden können in fünf Eigenschaften zusammengefasst werden: adsorptive Kapazität, Säureeigenschaften, katalytische Eigenschaften, Ionenaustauscheigenschaften und Partikeleigenschaft (Oberflächengröße, Porengröße, Partikelgrößenverteilung). Diese Eigenschaften und die daraus resultierenden Wirkmechanismen sind eng miteinander verbunden. Die aus der Aktivierung resultierenden Säureeigenschaften der Bleicherden ermöglichen die Spaltung der noch im Öl verbliebenen Natriumseifen. Die Restfeuchte in der Matrix bewirkt die Spaltung der letzten NHP-Komplexe, da sich die aktivierten Bleicherden in Kombination mit Wasser ebenso verhalten wie beispielsweise Zitronensäure während der Entschleimung. Durch die negative Grundladung des Adsorbens können vor allem kationenhaltige und polare Verbindungen adsorbiert werden. Bei der Entfernung der Spurenelemente kommen insbesondere die Ionenaustauscheigenschaften der Bleicherden zum Tragen, weswegen das Bleichen ein Raffinationsschritt ist, den alle Öle durchlaufen sollten, um ihre oxidative Stabilität zu verbessern. Der Ionenaustausch verbessert zudem die Adsorption der Farbstoffe, hier vor allem Chlorophyll.

Nach dem Bleichen wird das Öl durch Filterung von den Bleicherden abgetrennt. Der zurückbleibende Filterkuchen enthält noch bis zu 50 Gew% Neutralöl. Daher ist die Ölrückgewinnung durch Extraktion aus dem Filterkuchen von wirtschaftlichem Interesse. Ferner ist die energetische Verwertung des ölbeladenen Materials in Biogasanlagen, aber auch die energetische und stoffliche Verwertung bei der Zementherstellung denkbar. Möglich ist ebenfalls die Nutzung des Filterkuchens als Futtermittelzusatz in der Viehmast, der bis zu 3 Gew% betragen kann, ohne negative Folgen zu bewirken [12, S.

223][49, S. 174ff]. Die Regeneration der Bleicherden ist zwar möglich, derzeit jedoch zu teuer, sodass die Entsorgung des beladenen Materials regelmäßig stattfindet.

d) Desodorierung & physikalische Entfernung freier Fettsäuren

Der letzte Raffinationsschritt, den alle Öle durchlaufen, ist die sogenannte Desodorierung. Dem Namen folgend könnte der Eindruck entstehen, es handelte sich bei diesem Verfahren vor allem um die geruchliche Optimierung des Öles. Vielmehr stellt sich die Desodorierung deutlich komplexer dar, und garantiert die abschließende Reduzierung der FFA, die Optimierung der Farbe, den Abbau volatiler geruchs- bzw. geschmacksbeeinträchtigender Verbindung und verbliebener Spurenelemente. Im weitesten Sinne handelt es sich um einen mehrstufigen destillativen Prozess, der in sieben wesentliche Schritte untergliedert werden kann, die vollständig im Vakuum durchlaufen werden. Zunächst muss das Öl bei Temperaturen bis 90 °C entgast werden, sodass der gelöste Sauerstoff abgeschieden werden kann. Dies unterbindet die mögliche Oxidation und oxidative Polymerisation bei weiter erhöhten Temperaturen [11, S. 198f]. Darauf folgend wird das Öl weiter erhitzt auf bis zu 260 °C. Die hohen Temperaturen erhöhen den Dampfdruck der volatilen Bestandteile wie beispielsweise der FFA. Dieser Schritt wird auch als „heat bleaching“ bezeichnet, da in dieser Phase rote und gelbe Farbstoffe verdampfen. Im Gegensatz dazu kann Chlorophyll, das noch im gebleichten Öl zurückgeblieben ist, in diesem Verfahren nicht entfernt werden. Im nächsten Schritt wird im Gegenstrom gesättigter heißer Dampf in das Öl gepumpt. Dies bewirkt einen verbesserten Stoff- und Wärmetransport im Öl. Dieser Effekt wird zusätzlich durch den Umstand unterstützt, dass der Dampf im dem Vakuum weiter expandiert, wodurch sich dessen spezifisches Volumen und auch die spezifische Oberfläche um ein Vielfaches vergrößern. Nun erfolgt eine Zwischenkühlung auf etwa 140 °C, um dem so temperierten Öl Zitronensäure beizumengen. Dies hat zur Folge, dass verbliebene Spurenelemente komplexieren und abgetrennt werden können. Abschließend wird das Öl in zwei Schritten bis auf 40 °C abgekühlt und letztlich unter Schutzatmosphäre gelagert.

Der wichtigste Parameter zur Durchführung einer erfolgreichen Desodorierung ist der einzustellende Druck bzw. das Vakuum. Dieser sollte regelmäßig so gering sein wie möglich [11, S. 196f]. Damit einhergehend sind die höchstmöglichen Temperaturen zu nutzen, ohne die Ölqualität zu beeinträchtigen. Zuletzt sind die Anforderungen an das gebleichte Öl zu nennen:

- Phosphor < 1 ppm
- Chlorophyll < 30 ppb
- Eisen < 0,5 ppm
- Calcium, Magnesium je < 0,2 ppm

Neben der oben beschriebenen Neutralisation zur Abtrennung der FFA aus dem entschleimten Öl, besteht weiterhin die Möglichkeit dasselbe Ziel über Destillation zu erreichen. Im Prinzip erfolgt dies analog zu dem oben Beschriebenen unter Berücksichtigung der veränderten Zusammensetzung im Öl. Ist eine solche Prozessführung geplant, so werden an die Qualität des entschleimten Öles erhöhte Anforderungen gestellt und der Phosphorgehalt darf 10 ppm nicht überschreiten (siehe oben).

2.4 Enzymatische Entschleimung

Im vorhergehenden Abschnitt wurde dargestellt, dass für die Entschleimung die Hydratisierung der vorhandenen PL essentiell ist. Demnach spielt die Molekülstruktur für diese Eigenschaft eine entscheidende Rolle und die Lysoform eines PL zeigt strukturell gesehen stets eine größere Hydrophilie als seine Grundform. Die Lysoform liegt vor, wenn im PL-Molekül die Bindungsstelle der Fettsäure 1 bzw. der Fettsäure 2 unbesetzt ist, siehe hierzu Abbildung 2.4.1. Dijkstra postuliert ferner, dass u.U. sogar die Metallkomplexe der Lysoform hydratisierbar sind, wenn auch nur mit sehr geringer Geschwindigkeit [29, S. 1179]. Darüber hinaus sind dieselben Molekülstrukturen für die Menge des Ölverlustes verantwortlich, der im Ölschleim eingeschlossen werden kann. Dijkstra kalkuliert hierzu eine Verminderung des Ölanteils im Ölschleim um die Hälfte [29, S. 1183]. Somit ist es erstrebenswert die PL möglichst in ihre Lysoform zu überführen und das Öl erst in diesem Zustand zu entschleimen. Enzyme bieten aufgrund ihrer Substratspezifität die Möglichkeit der gezielten Modifikation einzelner Substanzen bzw. Klassen von Substanzen. Im Zusammenhang mit Ölen, respektive Lipiden, spielen Lipasen eine zentrale Rolle, da sie bedingt durch ihre physiologische Funktion prädestiniert sind, Triglyceride und ihre Derivate zu hydrolysieren [39, S. 232ff]. Die Lipasen sind wasserlöslich und können das Substrat per se nur erreichen, indem sie an der Grenzfläche zwischen einer wässrigen Phase und einer organischen Phase wirksam werden. Aus dieser Funktionsweise wird auch die grundsätzliche Eignung für die enzymatische Entschleimung von Pflanzenölen ersichtlich. Der Einsatz einer „Allround-Lipase“, die hinsichtlich ihres Substratspektrums eher unspezifisch ist, wäre nicht ratsam, da so auch die Hydrolyse der Triglyceride, also des eigentlichen Öles, unterstützt würde. Dies würde der Absicht einer Prozessverbesserung zuwiderlaufen, da eine Qualitätsminderung mit dem Einsatz einer solchen Lipase einherginge. Vielmehr müssen Lipasen genutzt werden, die spezifisch PL hydrolysieren und so deren Löslichkeitsverhalten anpassen. Die Phospholipasen bilden eine solche Gruppe von Enzymen [38, S. 659]. Entsprechend der hydrolysierten Bindung im PL-Molekül als Phospholipase A1 (PLA1), Phospholipase A2 (PLA2), Phospholipase C (PLC) und Phospholipase D (PLD) gekennzeichnet (Abbildung 2.4.1).

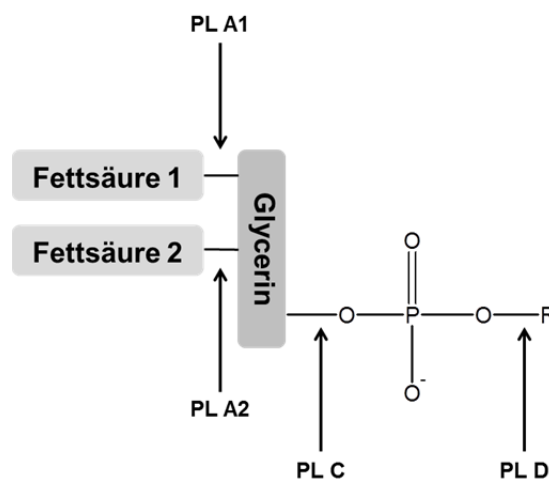


Abbildung 2.4.1: Regiospezifität der unterschiedlichen Phospholipasen.

Das Wissen um diese Enzyme und ihrer Fähigkeiten ist bereits seit den 1980'er Jahren bekannt, stand jedoch nicht im Fokus, in dem enzymatische Prozesse seit etwas mehr als einem Jahrzehnt stehen [40, S. 2ff]. Die seit einiger Zeit hohen Ölpreise sowie der wachsende Markt für Biodiesel führen zu Prozessanpassungen mit dem Ziel der Ausbeutesteigerung, die jedoch mit zusätzlichen Investitionen verbunden sind. Durch die erhöhte Ausbeute amortisieren sich die Investitionskosten schneller. Dies beflügelt auch den Einsatz von Enzymen in der Ölschleimung. Während in der Vergangenheit im Zusammenhang mit der enzymatischen Entschleimung vor allem auf eine verbesserte Ölqualität hingewiesen wurde, so steht derzeit die Ausbeutesteigerung im Mittelpunkt des Interesses [41, S. 1129]. Die Ertragssteigerungen sind direkt proportional zum Phosphorgehalt des Öles und werden als Obergrenze mit etwa 2 Gew% beziffert [40, S. 3][41, S. 130]. In der Literatur wird für gewöhnlich der Enzymax[®] Prozess von Lurgi aus dem Jahr 1992 als erstes Patent in diesem Bereich genannt [42]. Zur Anwendung kommt in diesem Prozess eine PLA2, gewonnen aus der Schweinepankreas. Ihre Gewinnung ist an die Insulinproduktion gekoppelt und somit im Umfang limitiert. Außerdem stehen ihrer Nutzung in Lebensmitteln zahlreiche religiöse und kulturelle Gebräuche im Wege, da das Schwein als Herkunftsorganismus weder koscher noch halal ist. Der Prozess ist gekennzeichnet durch den Einsatz eines Zitratpuffers zur Anpassung des optimalen pH-Wertes von pH 5, einer Reaktionstemperatur von 65 °C und dem Einsatz eines Hochgeschwindigkeitsmixers zur Gewährleistung einer hinreichend großen Grenzfläche mit einem Tropfendurchmesser von etwa 10 µm [43, S. 280][29, S. 1181]. Ein Vorteil des EnzyMax Prozesses ist die Rückgewinnung des Enzyms aus dem Ölschleim und dessen wiederholter Einsatz. Bei der Auswertung des Fließdiagrammes stellt man fest, dass es sich bei der pH-Optimierung im Wesentlichen um das zuvor beschriebene acid refining handelt, das notwendig ist zur Aufspaltung und Hydratisierung der NHP.

Tabelle 2.4.1: Kommerziell verfügbare und industriell eingesetzte Enzyme.

Prozess bzw. Handelsname	Wirkmechanismus	Hersteller / Anwender
EnzyMax [®] mit Lecitase [®] 10L	PLA2	Lurgi (Prozess), Novozymes (Enzym)
Lecitase [®] Novo	PLA1	Novozymes
Lecitase [®] Ultra	PLA1	Novozymes
LysoMax [®]	LAT (PLA2)	Danisco
Purifine [®]	PLC	DSM-Verenium
GumZyme	PLA2	DSM
Rohalase	PLA2	AB Enzymes

Die begrenzte Verfügbarkeit und damit verbunden die hohen Kosten sowie der Herkunftsorganismus der Lecitase[®] 10L führten zur Suche und Identifizierung mikrobieller Phospholipasen. Das erste Enzym dieser Art ist die Lecitase[®] Novo von Novozymes, Kopenhagen, Dänemark, aus *Fusarium oxysporum*. Hierbei handelt es sich um eine PLA1, die bei Temperaturen zwischen 30 und 45 °C optimal arbeitet. Als weiteren Vorteil stellt Clausen heraus, dass das Enzym etwa 90 Gew% weniger wässrige Phase benötigt und dennoch zuverlässig eingesetzt werden kann [44, S. 337f]. Wesentliche Unterschiede zur Lecitase[®] 10L ist die geringere Temperatur- und pH-Stabilität, wodurch auch die Rückgewinnung aus dem Ölschleim unmöglich wird. Interessanterweise unterscheiden sich die beiden Enzyme ferner in ihrem Reaktionsmechanismus auch dahingehend, dass Lecitase[®] 10L eher

hydrophil ist und somit die PL in der wässrigen Phase hydrolysiert, während die Katalyse der Lecitase[®] Novo bevorzugt in der Ölphase stattfindet. Ein weiteres Enzym Lecitase[®] Ultra, ebenfalls eine mikrobielle PLA1 aus *Thermomyces lanuginosa*, verfügt über eine verbessert Temperatur- und pH-Stabilität [29, S. 1181].

Der Einsatz von PLA verbessert zwar die Hydratisierbarkeit der PL und reduziert den Öleinschluss in der Schleimphase, gleichzeitig wird aber auch für jedes Mol PL ein Mol FFA freigesetzt, was anschließend wieder aus dem entschleimten Öl zu entfernen ist. Dies bedeutet für die Fettsäureneutralisation einen erhöhten Ressourceneinsatz bei Wasser und Chemikalien und im Falle der physikalischen Fettsäureabtrennung einen gesteigerten Energiebedarf. Eine wesentlich gewinnbringendere Prozessführung könnte die freiwerdenden FA an einer verfügbaren Ölkomponente verestern, sodass deren Entsorgung überflüssig würde. Ein solches Verfahren, der LysoMax[®] Prozess, hat Danisco mittels einer Lipidacyltransferase (LAT) vorgestellt. Dieses Enzym besitzt grundsätzlich eine PLA2-Aktivität und verestert diese FA an freie Sterole des Öles. Dadurch gehen die veresterten Sterole während der Desodorierung nicht verloren und tragen zur Ausbeutesteigerung bei [45].

Alle bisher beschriebenen enzymatischen Verfahren zur Ölentseimung hydrolysieren prinzipiell alle PL und setzen FFA frei. Ferner erfordern sie die „Anpassung“ des pH-Wertes, sodass das Enzym bei seinem pH-Optimum eingesetzt werden kann. Grundsätzlich handelt es sich somit bei diesen Verfahren um acid refining Schritte, die durch den Einsatz von Enzymen verbessert werden. Man könnte also auch von einer enzymatisch unterstützten sauren Entschleimung sprechen, denn aus den in Abschnitt 2.3 genannten Gründen ist die Zufuhr einer sauren Phase in das System unerlässlich, um Phosphorgehalte < 10 ppm zu erzielen. Daher spielt weniger die Ölqualität, als vielmehr die Reduzierung des Ölverlustes eine zentrale Rolle bei der Anwendung der Enzyme.

Beim Einsatz einer PLC zur Ölentseimung sind theoretisch alle PL in ein Di- bzw. Monoglycerid überführbar, was zu einer immensen Reduktion des Ölschleimes beitragen würde, da nur noch der freigesetzte Phosphatester als wasserlösliches Reaktionsprodukt in die wässrige Phase übergehen müsste. Pro 0,1 Gew% PL könnten etwa 0,086 Gew% als Ertrag in der Ölphase verbleiben [41, S. 1129]. Einer solcher Ansatz wird von DSM-Verenium mit einer PLC vorgestellt [46]. In der Praxis ist es jedoch lediglich möglich PC und PE durch die PLC zu hydrolysieren, wodurch das Enzym gut geeignet ist die Wasserentschleimung zu unterstützen [Dijkstra, S. 1182]. Jedoch bedarf ein so behandeltes Öl einer weiter führenden Entschleimung, um den Anforderungen gerecht zu werden. In welcher Weise welches der vorgestellten Enzyme genutzt wird ist vor allem abhängig von der Zielsetzung des Herstellers. Wenn es um die Produktion von Lecithin zur weiteren Verwendung in industriellen Prozessen geht, dann ist PLC beispielsweise eher ungeeignet und eine PLA würde bevorzugt. Wohingegen ein ertragsorientierter Ansatz auch in der Kombination aus Wasserentschleimung mit PLC und anschließender Entschleimung mit PLA denkbar ist.

Eine Alternative zur enzymatischen Behandlung des Öles während der Entschleimung ist das enzymatische Entölen des Ölschleimes nach dessen Abtrennung. Der wesentliche Vorteil dieses Ansatzes besteht in der Unabhängigkeit beider Prozesse, denn zur Entschleimung müssen keine

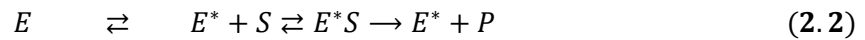
weiteren Investitionen unternommen werden und der Gesamtprozess der Raffination kann unverändert fortlaufen. Der Stoffstrom des Ölschleimes ist etwa um den Faktor 25 kleiner als der Ölstrom, wodurch der apparative Aufwand und der notwendige Chemikalien- respektive Enzymeinsatz deutlich reduziert werden kann [Dijkstra, S. 1184]. Somit bietet sich auch hier die freie Wahl des Enzymes, je nach der Zielsetzung der Produktion. Mit der Absicht der maximalen Ölrückgewinnung und gleichzeitiger Lysolecithinherstellung wäre die PLA das Mittel der Wahl. Die Ölrückgewinnung kann durch einfaches Dekantieren geschehen und beträgt etwa 90 Gew% [41, S. 1130]. Das erhaltene saure Öl (FFA etwa 30 Gew%) kann z.B. einer Biodieselproduktion zugeführt werden, das Lysolecithin bietet Potential für zahlreiche industrielle Anwendungen [47, S. 443][38, S. 662ff].

2.5 Enzymatische Katalyse an Grenzflächen

Die Entschleimung von Pflanzenölen, wie sie konventionell oder enzymatisch durchgeführt wird, beruht in großen Teilen auf dem unterschiedlichen Lösungsverhalten der einzelnen Ölbestandteile in einer der beiden vorliegenden Phasen. Ein wesentliches Element spielt hierbei die Selbstorganisation der PL im Bereich der Grenzfläche zwischen der wässrigen Phase und dem Öl. Bei den PL handelt es sich um amphiphile Verbindungen, deren grenzflächenaktive Eigenschaften zur Ausbildung von Mizellen führen, wenn die kritische Mizellbildungskonzentration überschritten wird. Ergänzend muss hinzugefügt werden, dass es sich bei den im Öl vorliegenden Aggregaten um inverse Mizellen handelt, da sich im unpolaren Öl die hydrophilen Kopfgruppen der PL in das Innere der Strukturen ausrichten. Die kritische Mizellbildungskonzentration wird beispielsweise für rohes Sojaöl bzw. für mit Lecithin gespicktes, raffiniertes Sojaöl mit etwa 1000 bzw. 850 mg/kg beziffert [50, S. 927f]. Dieser Wert ist maßgeblich von der Zusammensetzung der PL-Fraktion sowie deren Grad der Hydratisierung abhängig, wobei ein zunehmender Feuchtegehalt im Öl zur Absenkung der kritischen Mizellbildungskonzentration beiträgt. Dieser Effekt kann auf den Anstieg der hydrophoben Abstoßungskräfte zwischen dem Öl und den hydratisierten PL zurückgeführt werden. Die Größenordnung der Mizellen liegt im Bereich bis zu 5 nm im rohen Öl. Neben den „einfachen“ Mizellen unterscheidet Gupta weiterhin zwei Ausprägungen in der Aggregation amphiphiler Verbindungen sowohl in Ein- als auch Zwei-Phasensystemen [51, S. 81f]. Als Erweiterung der Mizellen gelten die „geschwollenen“ Mizellen, in denen zwischen den eigentlichen Mizellbildnern weitere in dieser Phase unlösliche Stoffe eingelagert werden. Im Falle der Pflanzenöle wird beispielsweise Neutralöl in diese Mizellen eingebunden. Die Steigerung dieser Betrachtungen tritt ein, wenn in das Medium eine weitere Phase, wie z.B. Wasser eingebracht wird. Nun kann es zur Ausbildung einer Mikroemulsion kommen. Am besten lässt sich dieses Modell nach Gupta als mizellare Struktur beschreiben, in deren Innerem ein Wassertropfen als Nukleus vorliegt, und an dessen Grenzfläche sich die grenzflächenaktiven Verbindungen anlagern. In dieser entstehenden Grenzschicht ordnen sich zu einem gewissen Grad ebenfalls Triglyceride ein. Durch diesen Mechanismus gelingt es die Ursache für den Ölverlust während aller in zwei flüssigen Phasen verlaufenden Raffinationsschritte zu verdeutlichen, z.B. die Entschleimung sowie Neutralisation. Erst das Vorliegen derartiger Mikroemulsionen ermöglicht den Einsatz enzymatischer Verfahren in der Ölraffination. Da es sich bei den Enzymen in aller Regel um wasserlösliche Proteine handelt, liegen sie ausschließlich in der wässrigen Phase vor und müssen in Kontakt zu ihren Substraten gebracht werden. Demnach liegen

die Enzyme in gelöster Form im Inneren einer inversen Mikroemulsion vor, sodass sie von Substrat umgeben sind [52, S. 256]. Bei dieser Form der enzymatischen Katalyse spielt die Verteilung des Substrates zwischen der unpolaren Phase, der Grenzschicht und der wässrigen Phase eine wichtige Rolle. Während das Enzym an die Wasserphase gebunden ist und wasserseitig maximal bis an die Grenzschicht gelangen kann, sind die Substrate mobiler und können in der unpolaren Phase, der Grenzschicht und bedingt in der wässrigen Phase vorliegen. Somit ist die Kinetik dieser Reaktion abhängig von der ausreichenden Bereitstellung des Substrates in der Grenzschicht. Hierbei kann die Diffusion beiderseits der Grenzschicht vernachlässigt werden, während der Stofftransport durch die Grenzschicht geschwindigkeitsbestimmend ist [53, S. 67f]. Für den Fall, dass eine hinreichende Substratzufuhr gewährleistet ist, kann die Kinetik in der Mizelle ohne weiteres dem Michaelis-Menten-Modell folgen. Eine weitere Form des Stofftransportes geschieht durch die Kollision der Mizellen miteinander sowie deren Koaleszenz.

Bei der Wahl der in Frage kommenden Enzyme ist zu beachten, dass diese möglichst an der Grenzfläche zwischen dem Öl und der wässrigen Phase aktiv sind. Lipasen sind zu diesem Zweck qua ihrer physiologischen Wirkung besonders gut geeignet, da sie naturgemäß an der Spaltung von Triglyceriden und weiteren Lipiden sowie Estern an der genannten Grenzfläche aktiv sind [39, S. 231ff]. Das breite Substratspektrum von Lipasen macht diese Enzymklasse über den Einsatz an derartigen Grenzflächen hinaus interessant. Von besonderem Interesse für die enzymatische Entschleimung von Pflanzenölen ist die ausgeprägte Regiospezifität der Lipasen, die bei Triglyceriden vor allem die C1- bzw. C3-Position betrifft (Abbildung 2.4.1). Vor dem Hintergrund der Ziele der enzymatischen Entschleimung kann nicht willkürlich jede Lipase eingesetzt werden, wenngleich zahlreiche Enzyme die beabsichtigte Reaktion katalysieren. Jedoch ist es entscheidend, dass die Wahl auf Enzyme fällt, die keine Triglyceride, sondern ausschließlich die PL hydratisieren, da ansonsten die unerwünschte Bildung von Di- bzw. Monoglyceriden gefördert würde. Somit gewährleistet nur der Einsatz der im Abschnitt 2.4 beschriebenen Phospholipasen die gesteckte Zielsetzung, da diese hinreichend substratspezifisch sind. Vielen Phospholipasen gemeinsam ist ihre relativ starre dreidimensionale Struktur, die durch zahlreiche Disulfidbrücken verursacht wird [54, S. 128f]. Ferner ist ihre Aktivität essentiell von der Gegenwart von Calcium abhängig. In ihrem aktiven Zentrum findet sich Histidin und dieses Zentrum ist nach der Enzymausrichtung aus der Wasserphase nicht mehr zugänglich. Das aktive Zentrum befindet sich nahe dem sogenannten i-face, einer ebenen Fläche auf der Enzymhülle, an der die PLA mit der Grenzfläche interagiert. Es besteht also eine funktionale und räumliche Trennung beider Areale. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften im Bereich des aktiven Zentrums ist es sehr wahrscheinlich, dass die Moleküle in wässriger Lösung derart aggregieren, dass das i-face abgeschirmt wird. Somit ist auch die geringe Enzymaktivität zu begründen, die bei der Hydrolyse von Substratlösungen und fehlender Grenzfläche beobachtet wird. Erst die Grenzfläche und die Ausrichtung des Enzyms an dieser legt das aktive Zentrum frei und steigert die Aktivität um den Faktor 10.000 verglichen mit den zuvor beschriebenen Bedingungen. Zwei gebräuchliche Modelle zur Beschreibung der Phospholipaseaktivität sind das Hopping- und das Scooting-Modell [54, S. 131][55, S. 1]. In der Gleichung 2.2 ist das Grundprinzip beider Modelle als Erweiterung der Michaelis-Menten-Kinetik dargestellt.



Das freie in der Lösung bereitgestellte Enzym E bindet in einem ersten Schritt an die Grenzfläche und geht dabei in den Zustand E^* über. Sodann bildet E^* mit einem Substratmolekül S den Enzym-Substrat-Komplex E^*S , aus dem nach der Reaktion ein Produktmolekül P freigesetzt wird. Das wesentliche Unterscheidungsmerkmal der beiden Modelle besteht in dem Mechanismus der Rückführung von E^* in einen Zustand, in dem sich wieder der E^*S Komplex ausbilden kann. Geschieht dies nach dem Hopping-Modell, dann löst sich E^* vollständig von der Grenzfläche und liegt in seiner freien Form E vor, bevor es durch erneute Anlagerung in den Zustand E^* übergeht. Im Falle des Scooting-Modelles verbleibt E^* an die Grenzfläche gebunden und steht nach der Freisetzung von P unmittelbar für die nächste Umsetzung von S bereit. Welcher der beiden Ansätze in welchem Ausmaß zum Tragen kommt ist stark von der Organisation, Stabilität und Dynamik innerhalb der Grenzfläche abhängig. Unbenommen dieser Tatsache verlaufen derartige Katalysen von PLA in der Regel nach den Grundsätzen einer Reaktion 1. Ordnung [54, S. 131f][56, S. 450].

Das vorliegende Kapitel erarbeitet ausgehend von grundlegenden Daten der Sonnenblumenöl-zusammensetzung und -gewinnung das Verständnis für die Notwendigkeit der im Verlauf der Raffination durchzuführenden Prozesse. Die Darstellung eben dieser Raffinationsprozesse und ihrer chemischen und physikalischen Wirkmechanismen sollen den Leser in die Lage versetzen zu einem späteren Zeitpunkt die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zu bewerten. Abschließend liegt ein Abschnitt vor, der schlagwortartig auf die Grenzflächenkatalyse, wie sie bei der enzymatischen Entschleimung postuliert wird, eingeht.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

Im folgenden Abschnitt werden die zum Einsatz gebrachten handelsüblichen technischen Geräte und Chemikalien, modifizierte Versuchsaufbauten sowie die zum Zwecke der Entschleimung von Pflanzenölen entwickelte Versuchsanordnung beschrieben.

3.1.1 Handelsübliche Geräte und Chemikalien

Die der praktischen Arbeit zugrunde liegenden handelsüblichen Geräte sind im Anhang B tabellarisch mit Typenbezeichnung und Herstellerdaten aufgelistet (B1). Ebenso finden sich dort die eingesetzten Chemikalien und weiteres Verbrauchsmaterial (B2).

3.1.2 Versuchsanordnung „Ölentschleimung“

Die Abbildung 3.1 zeigt die für die Ölentschleimung verwendete Apparatur. Es handelt sich hierbei um einen diskontinuierlich betriebenen zweiteiligen 1L-Rührkesselreaktor aus Duranglas[®]. Das Reaktorunterteil bildet das eigentliche Reaktionsgefäß mit dem Nennvolumen, während das Reaktoroberteil den Reaktor nach oben als Deckel abschließt. Im Deckel befinden sich vier Schliffhalse (3x ringförmig verteilt, 1x im Zuge der Rotationsachse), die die Anbringung von Peripheriegeräten erlauben und die Zudosierung und Probennahme ermöglichen. Beide Reaktorteile werden über eine Schelle miteinander verbunden und dichten mittels eines eingepassten O-Ringes ab. Ein Rührmotor in Verbindung mit einem vierschaufligen Rührwerk (\varnothing 10 cm) ermöglicht die Durchmischung des Öles. Die Schnittstelle zum Reaktor bildet der zentrale Hals. Die Abbildung zeigt die für die Ölentschleimung verwendete Apparatur. Es handelt sich hierbei um einen diskontinuierlich betriebenen zweiteiligen 1L-Rührkesselreaktor aus Duranglas[®]. Das Reaktorunterteil bildet das eigentliche Reaktionsgefäß mit dem Nennvolumen, während das Reaktoroberteil den Reaktor nach oben als Deckel abschließt. Im Deckel befinden sich vier Schliffhalse (3x ringförmig verteilt, 1x im Zuge der Rotationsachse), die die Anbringung von Peripheriegeräten erlauben und die Zudosierung und Probennahme ermöglichen. Beide Reaktorteile werden über eine Schelle miteinander verbunden und dichten mittels eines eingepassten O-Ringes ab. Ein Rührmotor in Verbindung mit einem vierschaufligen Rührwerk (\varnothing 10 cm) ermöglicht die Durchmischung des Öles. Die Schnittstelle zum Reaktor bildet der zentrale Hals.

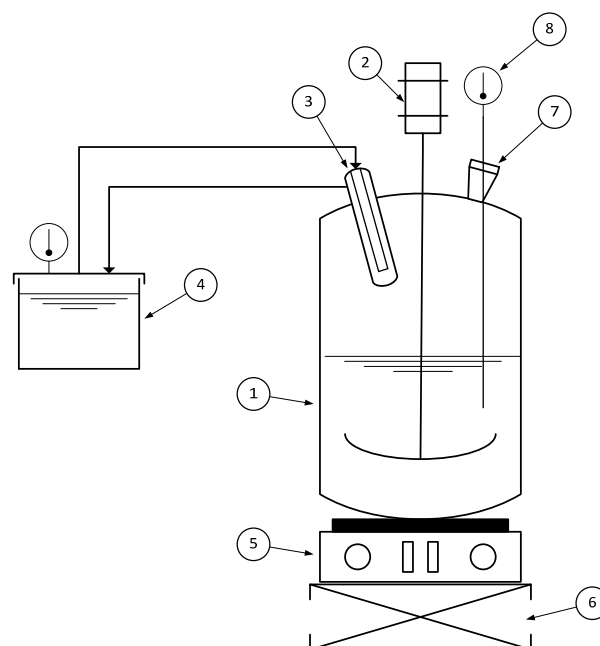


Abbildung 3.1: Versuchsaufbau „Ölentschleimung mit Kühlung“: 1) Reaktorgefäß, 2) Rührmotor mit Rührwerk, 3) Kühlfinger, 4) Thermostat, 5) Heizplatte mit Magnetrührer, 6) mechanische Hebebühne, 7) Schliffhals (3x).

Einer der peripheren Hälse dient der Aufnahme einer wassergespeisten Kühlfalle zur Kondensatrückführung, die mit einem Umwälzthermostat betrieben wird. Ist die Apparatur ohne die erwähnte Kühlfalle in Betrieb, schlägt sich der unter den Betriebsbedingungen bildende Wasserdampf am Deckel nieder und kann nur in unzureichender Weise in das Reaktionsgemisch zurückgeführt werden. Die Notwendigkeit der Kondensatrückführung macht daher einen Kühlmechanismus erforderlich, an dem sich der Dampf niederschlägt und von dort gezielt wieder in das Reaktionsgefäß gelangt. Zur Erprobung kommen zwei Bauformen.

- 1) Ein „Kühlfinger“ bestehend aus einer inneren Zuleitung und einem äußeren Mantel, an dem das Kühlmedium in Richtung der Ableitung entlangströmt (vgl. Abbildung 3.1.1 Nr. 4).
- 2) Eine Kühlwendel.

Es zeigt sich, dass der Kühlfinger zur Regulierung des Kondensatrückflusses besser geeignet ist und somit das Mittel der Wahl darstellt. Begründet werden kann dieser Umstand mit der einfachen Bauweise des Kühlfingers, der lediglich eine kleine zylindrische äußere Oberfläche bietet, die zudem größtenteils senkrecht ausgerichtet ist. Dies ermöglicht dem Kondensat den direkten Rückfluss in das Reaktionsgemisch. An der Kühlwendel hingegen steht dem Kondensat eine weitaus größere Oberfläche zur Verfügung, die ferner an zahlreichen Stellen schräg bis waagrecht gelagert ist, wodurch sich das Kondensat an diesen Flächen ablagern kann und sich dort sammelt. Die Kühlung erfolgt bei 10 °C.

Die Regelung der Reaktionstemperatur geschieht über eine Heizplatte mit integriertem Magnetrührer, die mit einem Thermoelement verbunden ist. Dieses befindet sich über einen der Hälse im Deckel in direktem Kontakt mit dem Reaktionsgemisch. Der vierte nicht genutzte Hals des Deckels ist mit einem Gummistopfen verschlossen und dient der Entnahme von Proben sowie der Zuführung der Reagenzien. Der gesamte Komplex aus Reaktor und Rührmotor wird über Gestänge derart an der Rückwand des Versuchsstandes befestigt, dass das Ganze räumlich fixiert ist und nicht zwangsläufig eine feste Unterlage benötigt. Die auf einer mechanischen Hebebühne beweglich gelagerte Heizplatte, kann im laufenden Betrieb gegen ein Eisbad zum Herunterkühlen des Systems ausgetauscht werden.

3.1.3 *In-situ*-Videomikroskop

Das *In-situ*-Videomikroskop ist eine Entwicklung des Instituts für Technische Chemie (TCI) der Gottfried-Wilhelm-Leibnitz-Universität in Hannover. Es handelt sich hierbei um einen Rührkesselreaktor aus Edelstahl, der nach oben hin durch einen abnehmbaren Deckel verschlossen ist. Im Deckel befinden sich eine Öffnung zur Dosierung von Reagenzien und die Schnittstellen für das riemengetriebene Rührwerk. Das System ist doppelwandig und temperierbar. An einer Stelle ist die Wandung des Reaktors durchbrochen; hier befindet sich ein Flansch, über den das eigentliche Mikroskop aufgenommen wird.

Bildgebendes Element des Mikroskops ist eine Charge-coupled Device-Kamera (CCD), die sich außerhalb des Reaktors befindet (Abbildung 3.1.2).

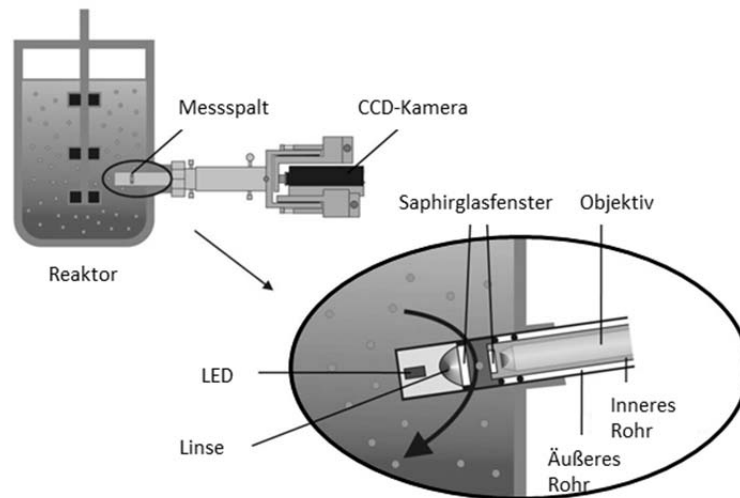


Abbildung 3.1.2: *In-situ*-Videomikroskop Aufbau und Messprinzip [TCI].

Ihr vorgeschaltet befindet sich eine rohrartige Verlängerung, die im Reaktionsmedium mündet. Im Inneren des Rohres ist ein weiteres Rohr aufgenommen, welches zum Messspalt hin mit einem kleinen Saphirglasfenster abschließt. Das mit der Kamera verbundene Objektiv liegt wiederum im inneren Rohr, ist beweglich gelagert und endet vor dem Fenster. Die gegenüberliegende Seite des Messspalts wird ebenfalls durch ein Saphirglasfenster begrenzt, hinter dem eine Linse zur Lichtbündelung sitzt. Als Lichtquelle dient hinter der Linse eine LED, die das benötigte Licht für die Aufnahmen der Kamera gewährleistet. Das Funktionsprinzip des Mikroskops basiert auf der Idee das Reaktionsmedium im Messspalt zwischen den Saphirglasfenstern hindurchzuführen. Während der Passage werden im Gegenlicht der LED Aufnahmen durch die Kamera gemacht, die über angeschlossene Rechentechnik aufgezeichnet und ausgewertet werden kann.

3.2 Methoden

Der sich anschließende Abschnitt beschreibt die Methoden, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit angewandt werden. Hierbei wird ausgehend vom Gesamtansatz der Versuchsdurchführung der Weg der Probennahmen detailliert dargelegt. Ferner erfolgt die Darstellung der einzelnen Analysemethoden und weitergehender Ansätze.

3.2.1 Ölentschleimung

Alle Angaben über Konzentrationen im Zusammenhang mit der Ölentschleimung beziehen sich auf die Masse des eingesetzten Öles. Sollte dies nicht der Fall sein, so wird an entsprechender Stelle darauf hingewiesen.

Die Versuche zur Ölentschleimung werden mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der wässrigen Phase in der beschriebenen Versuchsanordnung im 1L-Maßstab durchgeführt. Der Ablaufplan dieser Versuche mit allen Teilschritten sowie den dazugehörigen Stoffströmen und den sich daraus

ergebenden Analysewegen wird in Abbildung 3.2.1 graphisch dargestellt. Die Versuche beginnen mit der Einwaage des Öls in das Reaktorunterteil. Bei der Füllhöhe des Öls ist zu beachten, dass das Rührwerk sich etwa in mittlerer Position, bezogen auf den Füllstand, befindet. Unter Berücksichtigung sowohl der Geometrie des Reaktors als auch jener des Rührwerks ergibt sich eine notwendige Mindest-Ölmenge von etwa 430 g. Um dem Rechnung zu tragen erfolgen die Versuche mit 450 – 530 g Öl. Es folgt zunächst unter Rühren bei 150 Umin^{-1} die Erwärmung des Öls auf $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach Erreichen dieses Wertes wird die saure Vorkonditionierung des Öls durch Zugabe von 500 ppm Zitronensäure (50 Gew%) eingeleitet. An die 15-minütige Reaktion schließt sich die Teilneutralisation der wässrigen Phase mit Natronlauge (4 M) auf pH 4 an, sodass die Phospholipase A1 (PLA1) bei ihrem pH-Optimum eingesetzt werden kann. Das erforderliche Volumen Natronlauge wurde zuvor in rein wässriger Lösung durch Titration ermittelt. Gleichzeitig wird das Reaktionsgemisch in einem Eisbad auf $48 \text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlt. Dies entspricht dem Temperaturoptimum der applizierten Phospholipase. Nach weiteren zehn Minuten ist dieser Schritt abgeschlossen, und die restliche wässrige Phase kann hinzudosiert werden. Ausgehend von der Überlegung, dass die Entschleimungsversuche bei einem Gesamtwassergehalt von 0,5 Gew% durchgeführt werden, ergibt sich das Restvolumen aus diesem Wert abzüglich der Menge an Zitronensäure und Natronlauge. Für Versuche unter Einsatz von Enzymen ist deren Volumen ebenfalls Teil der beschriebenen wässrigen Phase.

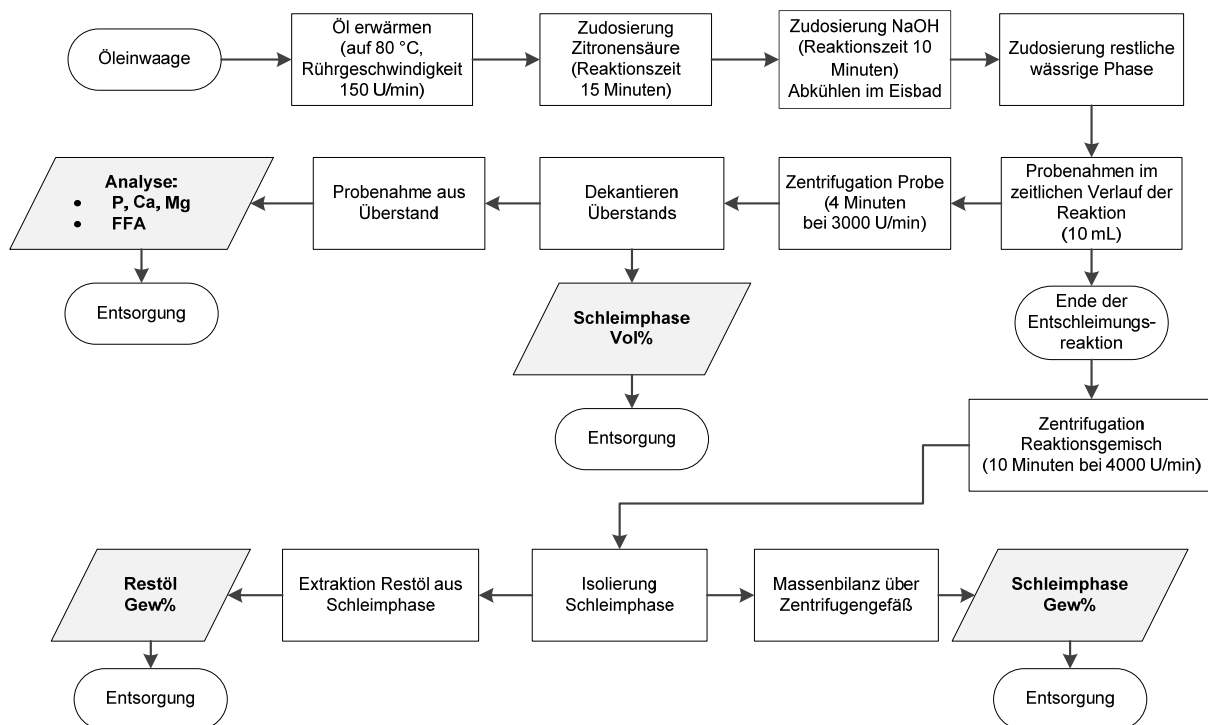


Abbildung 3.2.1: Versuchsdurchführung „Ölentschleimung“.

Unmittelbar nach Zugabe der gesamten wässrigen Phase erfolgt die erste Probenahme aus der laufenden Reaktion (10 mL). Diese Probe wird in normierte und skalierte Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei 3.000 Umin^{-1} für vier Minuten bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Im Anschluss daran kann an der Skala der volumetrische Anteil des Ölschleims in der Probe abgelesen werden. Aus dem Überstand wird

Material und Methoden

wiederum eine Probe des entschleimten Öles genommen, zur Bestimmung deren Phosphor-, Calcium- und Magnesiumgehaltes mittels optischer Atomemissions-Spektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES). Durch die mehrmalige Probennahme während der Reaktion kann die zeitliche Veränderung der genannten Parameter erhoben werden. Nach Ablauf der Reaktion wird letztmalig eine Probe genommen.

Mit Hilfe des restlichen Reaktionsgemisches geschieht die Ermittlung des massenbezogenen Anteiles der Schleimphase nach der erfolgten Entschleimung. Hierzu kommen Zentrifugenbecher aus Kunststoff zum Einsatz (Zubehörteile der genutzten Zentrifuge), deren Gewicht vor dem Befüllen ermittelt wird. Im befüllten Zustand werden sie erneut gewogen und anschließend bei 4.000 Umin^{-1} für zehn Minuten zentrifugiert. Nun erfolgt die Isolierung der Schleimphase. Dazu wird das überständige Öl zunächst dekantiert. An den Wänden des Bechers haftet weiterhin Öl, welches in einem zweistufigen Prozess abgetrennt wird. Im ersten Schritt liegt der Zentrifugenbecher für fünf Minuten auf die Seite, sodass das Öl, das noch am Boden an der Schleimphase haftet, abfließt. Mittels eines Gummispatels wird danach an den Wänden ein erstes Mal das überschüssige Öl abgestreift und dekantiert. In den nun folgenden 20 Minuten steht der Becher auf dem Kopf, um das restliche Öl in Richtung der Deckelöffnung fließen zu lassen. Abschließend werden die Wände erneut mit dem Gummispatel abgestreift und letztendlich mit trockenen Papiertüchern abgewischt. Durch dieses Verfahren ist der Ölschleim vom entschleimten Öl abgetrennt. In diesem Zustand wird der Becher zum dritten Mal gewogen und im Rahmen einer Massenbilanz der Anteil der Schleimphase bestimmt.

Im Ölschleim befindet sich weiterhin ein nennenswerter Anteil an Neutralöl, der mit dem Schleim abgetrennt wird und als Ölverlust zu verbuchen ist. Der Prozess zur Bestimmung dieses Verlustes soll im Folgenden dargestellt werden. Der Ölschleim wird in eine Extraktionshülse eingewogen und über Nacht in einem Umlufttrockenschrank bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet. Unter den gegebenen Bedingungen verdampft die im Schleim enthaltene wässrige Phase. Über erneutes Wiegen nach dem Trocknen kann der Wasseranteil berechnet werden. In einem 100 mL Soxhlet-Aufsatz erfolgt die Extraktion der acetonlöslichen Fraktion aus dem trockenen Schleim. In diesem ersten Schritt kommt kein Hexan zum Einsatz, da möglichst keine Phospholipide in den Extrakt übergehen sollen. Diese Extraktion dauert mindestens fünf Stunden. Ein guter Indikator zur Bewertung des Fortschritts der Extraktion ist der Grad der Trübung des Acetons im Soxhlet-Aufsatz. Nach dem Abschluss wird die Extraktionshülse entfernt und über Nacht zur Trocknung ausgelegt und letztmalig gewogen, dies ermöglicht die Bestimmung des Anteils an Phospholipiden im Schleim. Der Extrakt bleibt ebenfalls über Nacht stehen, sodass etwaige mitgespülte, acetonunlösliche Stoffe sedimentieren können. Der Überstand wird in einen vorher gewogenen neuen Kolben überführt und anschließend das Aceton im Rotationsverdampfer abgetrennt. Für den Kolben inklusive Rückstand erfolgt die Bilanzierung der Masse. Anschließend wird der Rückstand in 50 mL Hexan gelöst und aus dem Kolben in ein 50 mL Probenröhrchen überführt. Die in Hexan unlöslichen Bestandteile wie bspw. Zucker sedimentierten durch Zentrifugation bei 4.000 Umin^{-1} für zehn Minuten. Nach dem Dekantieren des Hexanüberstands in einen dritten leeren Kolben mit bekanntem Gewicht verdampft das Hexan im Rotationsverdampfer. Die Massenbilanz über den neuerlichen Rückstand in diesem Kolben ergibt den Betrag des im Ölschleim enthaltenen Ölverlustes.

3.2.2 Externe Analysen

Der folgende Abschnitt führt die Analysemethoden auf, die durch die Clariant Produkte GmbH bereitgestellt werden.

a) **Optische Atomemissions-Spektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES)**

Die optische Atomemissions-Spektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma wird in der verwendeten Arbeit genutzt, um den Gehalt an Phosphor, Calcium und Magnesium in den Ölproben zu bestimmen. Dieses Verfahren dient zum Nachweis und der quantitativen Analyse von Elementen [57, S. 198ff]. Dabei basiert die Methode darauf, dass Atome beim Übergang aus einem angeregten Zustand auf ein niedrigeres Energieniveau charakteristische Strahlung emittieren. Die sich ergebenden optischen Atomspektren ermöglichen die Identifizierung, die Strahlungsintensität die Quantifizierung der Elemente. Bei der ICP-AES erfolgt die Anregung der Probe in einem Hochfrequenz-Plasma, das durch Ionisierung des Plasma-Gases Argon in einer Hochfrequenz-Induktionsspule erzeugt wird. Die Bildung eines Aerosols aus der flüssigen Probe findet im Zerstäuber mit dem Trägergas, ebenfalls Argon, statt. Dieses Aerosol strömt das Plasma axial an. Die Plasma-Fackel, bestehend aus drei konzentrischen gasführenden Rohren, erzeugt ein toroidal ausgedehntes Plasma, in dem die Analytatomte etwa 1 ms für ihre Anregung verweilen. Die emittierte Strahlung wird anschließend im Spektrometer getrennt und über Photomultiplier detektiert. Die Analyse einer 0,51 g großen Ölprobe erfolgt nach der Vermischung mit 10 mL Kerosin im System bei 10.000 °C.

b) **Bestimmung freier Fettsäuren (FFA)**

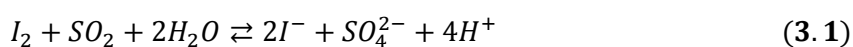
Die Bestimmung der FFA im entschleimten Öl dient v.a. zum Nachweis der Aktivität der Phospholipase.

Für die FFA-Bestimmung kommt das Gerät FOODLABfat der Firma cdR (Florenz, Italien) zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um ein Mikroprozessor-gesteuertes, automatisches Messsystem, das zur quantitativen Analyse charakteristischer Parameter in Ölen und Fetten eingesetzt wird. Wesentliche Baugruppen sind der Inkubationsblock zur Temperierung von bis zu zwölf Proben und ein Spektralphotometer mit den drei dazugehörigen Messzellen. Zum relevanten Zubehör/ Verbrauchsmaterial gehören die Testküvetten. Diese sind werksseitig mit dem Reagenz R1 gebrauchsfertig gefüllt, einer Mischung verschiedener Alkohole, Kaliumhydroxid, Phenolphthaleinderivaten und einmalig nutzbar. Die FFA reagieren mit einem chromogenen Anteil des R1 unter Ausbildung eines Farbkomplexes. Bei einer Wellenlänge 630 nm wird dessen Intensität gemessen und gegen den Gehalt an Ölsäure kalibriert. Die Auflösung des Verfahrens liegt bei 0,01 Vol%. Der Versuchsablauf ist standardisiert. Vor der ersten Messung einer Reihe muss der Inkubationsblock zunächst für etwa eine Stunde vorgeheizt und ggf. eine Kalibrierung durchgeführt werden. Das Reagenz R1 muss für die Messung eine Temperatur von 37 °C aufweisen, weswegen die Testküvetten zu Beginn im Inkubationsblock ca. 15 Minuten temperiert werden. Daran schließt sich die Bestimmung des Blindwertes der Küvette an, bevor die Probe hinzudosiert werden kann. Der Zusammenhang zwischen Farbumschlag und FFA-Gehalt ist nicht vollständig linear. Deshalb bietet der Hersteller verschiedene Testküvetten für die entsprechenden Messbereiche an, denen

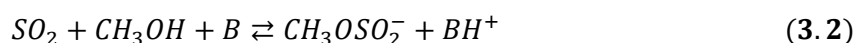
unterschiedliche Probenvolumina zugegeben werden müssen. Im Falle des Sonnenblumenöls sind 2,5 µL Öl erforderlich. Nach Zugabe der Probe wird diese durch leichtes Schütteln im Reagenz verteilt und sofort in der Messzelle vermessen. Der Messwert ist unmittelbar ablesbar und wird in [Vol%] ausgegeben.

c) Karl Fischer Titration (KF-Titration)

Die Karl-Fischer-Titration ist ein angewandtes Standardverfahren zur Bestimmung des Wassergehalts in festen und flüssigen Proben. Hierbei kann sowohl freies Wasser als auch gebundenes Wasser detektiert werden. Zentrales Moment der Methode ist die von R.W. Bunsen formulierte Gleichung, nach der Iod und Schwefeldioxid nur in Gegenwart von Wasser zu Iodid und Sulfat reagieren können (Gleichung 3.1).



Das benötigte Wasser ist Bestandteil der Probe, die i.d.R. in wasserfreiem Methanol gelöst wird. Eine wesentliche Voraussetzung für einen quantitativen Umsatz ist die Neutralisation der entstehenden Säure durch eine geeignete Base (*B*). Ferner wird ein Lösungsmittel benötigt, in dem sich das Schwefeldioxid in ausreichendem Maße lösen kann. Historisch bedingt wurde hierzu lange Zeit Pyridin eingesetzt [58, S. 4ff], da es beide Bedingungen erfüllt. Jedoch sind auch durchaus andere Basen geeignet. Vor dem Hintergrund der Auswirkungen auf Umwelt und Gesundheit wird heute alternativ häufig Imidazol benutzt. Die Substituierung von Pyridin durch Alternativen wirkt sich zudem durch eine beschleunigte Gleichgewichtseinstellung positiv auf die praktische Anwendung aus. In einem ersten Schritt reagieren Methanol und Schwefeldioxid zum Monomethylsulfit-Ion, wobei die Base das Gleichgewicht nach rechts verschiebt (Gleichung 3.2).



In der Gesamtreaktion wird das Monomethylsulfit-Ion nun durch Iod in Gegenwart von Wasser oxidiert, wobei das Iod zum Iodid reduziert. Die Reaktion kann nur solange ablaufen, wie sich Wasser im System befindet (Gleichung 3.3).



Gemäß Gleichung (3.3) reagieren H_2O , I_2 und ein SO_2 -Derivat im Verhältnis 1:1:1, sodass aus der reduzierten Menge des Iods direkte Rückschlüsse auf das enthaltene Wasser möglich sind.

Die coulometrische KF-Titration macht sich zur Bestimmung der Menge an reduziertem Iod die Gesetzmäßigkeiten der Elektrolyse zunutze. Durch Anlegen eines Stromes an die diaphragmalose Generatorelektrode wird in dem iodidhaltigen KF-Reagenz durch Elektrolyse eine stöchiometrische Menge Iod freigesetzt. Unter Beachtung des Faraday'schen Gesetzes und durch die Messung der Titrationszeit kann die Masse des gebildeten Iods errechnet werden. Die hier beschriebene Methodik verwendet als Eduktreagenz *Hydranal® Coulomat AG Oven*, eine Mischung aus Methanol, Imidazol, Diethanolamin und Schwefeldioxid, als Einkomponenten-Reagenz.

Zur Indikation des Endpunktes der Titration kommt die bivalentmetrische Methode zum Einsatz. Bei dieser wird an einer Doppel-Platin-Elektrode ein Stromfluss erzwungen und die zur Aufrechterhaltung notwendige Spannung gemessen. Solange im System ein Wasserüberschuss vorliegt, reduziert das freigesetzte Iod gemäß Gleichung 3.3 unmittelbar zu Iodid und es stellt sich durch die geringe Leitfähigkeit eine hohe Spannung ein. Der Endpunkt der Titration wird durch den plötzlichen Abfall des Potentials bestimmt, da das Iod bei Wassermangel an der Doppel-Platin-Elektrode reduzieren kann und somit den Stromfluss begünstigt.

Alternativ zum oben beschriebenen Lösen der Probe in wasserfreiem Methanol wird das Wasser einer Probe im vorliegenden Fall mit Hilfe eines Ofens verdampft und durch einen Luftstrom der Titrierkammer zugeführt. Dieser Aufbau verhindert einerseits etwaige Nebenreaktionen und andererseits können so auch schwer lösliche bzw. unlösliche Proben vermessen werden.

3.2.3 *In-situ*-Videomikroskopie

Das *In-situ*-Videomikroskop steht ebenfalls im Rahmen von P38 für die Untersuchungen der Ölentstehung zur Verfügung.

Das bildgebende Verfahren der *in situ* Videomikroskopie ermöglicht es während der ablaufenden Reaktion Aufnahmen aus dem Inneren des Reaktors zu erhalten. Somit kann das Verhalten innerhalb der Emulsion und die Aggregation des Ölschleims mit der wässrigen Phase direkt mitverfolgt und qualitativ ausgewertet werden. Die Versuche laufen analog zur im Abschnitt 3.2.1 dargestellten Durchführung ab, jedoch ohne Probennahme. Bauartbedingt weicht die Geometrie des Reaktors von jener des Glasreaktors für die *ex situ* Entschleimungsversuche ab. Dieser Reaktor verfügt über ein Nennvolumen von etwa 500 mL und wird für den Betrieb mit ca. 400 g Öl beladen. Ferner besitzt das System ein zweiflügeliges Propellerrührwerk (\varnothing 10 cm). Trotz dieser Abweichungen sind in beiden Reaktoren ähnliche Strömungsverhältnisse realisierbar. Dies gelingt unter Zuhilfenahme der dimensionslosen Reynoldszahl (Re). Für den Fall eines Rührkesselreaktors ist Re gemäß Gleichung (3.4) definiert [59, S. 242].

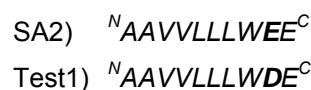
$$Re = \frac{\rho \cdot n \cdot d_R^2}{\eta} \quad (3.4)$$

In dieser Gleichung werden die Rührerdrehzahl (n) und der Rührerdurchmesser (d_R) als charakteristische Systemgrößen genutzt, um die Vergleichbarkeit zwischen zwei unterschiedlichen Rührkesselreaktoren herzustellen. Da die Reaktionstemperatur in beiden Fällen bei 48 °C liegt, müssen die Dichte (ρ) und die dynamische Viskosität (η) gleiche Werte annehmen. Zudem ist der Rührerdurchmesser identisch. Folglich führt eine Rührerdrehzahl von 150 Umin^{-1} zu ähnlichen Strömungsverhältnissen. Für die *in situ* videomikroskopischen Untersuchungen steht eine vierfache Vergrößerung zur Verfügung.

3.2.4 Enzym-Peptid-Modifikationen

Die durch die PLA1 katalysierte Reaktion findet an der Grenzfläche zwischen dem Öl und der wässrigen Phase statt. Hierzu muss sich das Enzym an der Grenzfläche derart ausrichten, dass das Substrat zum aktiven Zentrum gelangen kann. Dabei spielen die hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften des Moleküls eine wesentliche Rolle. Die PLA1 ist wasserlöslich und somit in erster Linie mit einer hydrophilen Oberfläche versehen. Durch die Modifikation mit einem Peptid sollen diese Eigenschaften verbessert werden, indem die resultierenden hydrophoben Anteile des Konjugates zu optimierten Grenzflächeneigenschaften führen. Im Folgenden wird der Mechanismus der Konjugatbildung beschrieben, bevor abschließend die Methode zur Bestimmung der Enzymaktivität vorgestellt wird.

Vorab sollen in Kürze einige Parameter der beiden eingesetzten Peptide (SA2 und Test1) aufgelistet werden, aus denen das Ziel der Modifikation ersichtlich wird. Beide Peptide zählen zu den Oligopeptiden und bestehen aus zehn Monomeren, die zu 80 % hydrophobes Verhalten zeigen. Lediglich am C-terminalen Ende befinden sich je zwei polare Aminosäuren. Dadurch soll es gelingen die Oberfläche der modifizierten PLA1 in Richtung hydrophoben Verhaltens zu verschieben, um so die Ausrichtung an der Grenzfläche zu verbessern. In der Konsequenz wird erwartet hierdurch die Aktivität des Enzyms zu erhöhen. Wie aus der Aminosäuresequenz zu entnehmen ist, unterscheiden sich die beiden Peptide nur durch die Asparaginsäure am C-terminalen Ende:



Das Molekulargewicht beträgt 1142,3 g/mol für SA2 bzw. 1128,3 g/mol im Fall von Test1. Die isoelektrischen Punkte liegen bei pH 3,8 bzw. pH 3,67. Die kritische Aggregatbildungskonzentration (CMC) des SA2 ergibt sich zu 0,49 μM bzw. 0,56 $\mu\text{g/mL}$ [60, S. 2756]. Diese für Test1 unbekanntes Größe wird ausgehend von der strukturellen Ähnlichkeit in einer ähnlichen Größenordnung vermutet. Ein SA2 Monomer verfügt über eine äußere Oberfläche von etwa 400 \AA^2 .

a) Konjugation von Enzym und Peptid

Das Prinzip dieser Biokonjugation basiert auf dem Einsatz sogenannter Zero-Length-Crosslinker. Dabei handelt es sich um Substanzen, die die Konjugatbildung zweier Moleküle fördert, ohne an der Bindungsstelle ein zusätzliches Atom einzufügen [61, S. 259ff]. Somit ist es möglich, zwei Moleküle kovalent zu binden, ohne durch einen Spacer die Konjugateigenschaften zu beeinflussen. Als Crosslinker kommen verschiedene Verbindungen in Betracht, die unterschiedliche Bindungstypen ermöglichen. Das hier verwendete EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochlorid) gehört zur Gruppe der Carbodiimide, die die Bildung von Amidbindungen zwischen Carboxylgruppen und Aminogruppen katalysieren. Für den Zweck der Proteinkonjugation sind Carbodiimide ein gebräuchliches Mittel, da sie die Bildung von Bindungen zwischen Proteinen, zwischen Proteinen und Peptiden sowie die Bindung von Biomolekülen an Oberflächen und Partikel ermöglichen. Die von EDC katalysierte Reaktion läuft relativ langsam ab, sodass durch Hydrolyse des Intermediates und Nebenreaktionen die erwünschte Konjugatbildung mit unzureichender Ausbeute ablaufen kann. Durch

Zugabe von Sulfo-NHS (Sulfo-N-Hydroxysuccinimid) wird die Löslichkeit und Stabilität des Intermediates gesteigert und die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Gemäß der grundlegenden Reaktion (Abbildung 3.2.2) bildet das EDC zunächst mit der Carboxylgruppe einen aktivierten Esterkomplex als erstes Intermediat. Dieses ist für die niedrige Reaktionsgeschwindigkeit und die erwähnten Nebenreaktionen verantwortlich. In Gegenwart von Sulfo-NHS bildet sich zwischen dessen Hydroxylgruppe und dem EDC-Komplex ein neues Sulfo-NHS-Ester Intermediat aus, das die Reaktion zur Ausbildung der Amidbindung signifikant beschleunigt, wodurch sich die Konjugatausbeute um ein Vielfaches erhöht. Dieser Mechanismus kann in einem zweistufigen Verfahren genutzt werden, um Proteine zu modifizieren. Abbildung 3.2.3 verdeutlicht dies. In einem ersten Schritt wird eines der Proteine, im vorliegenden Fall das Peptid, in Gegenwart von EDC und Sulfo-NHS aktiviert. So ist gewährleistet, dass lediglich eines der Proteine aktiv ist, was mehr Kontrolle über die Art der ausgebildeten Konjugate ermöglicht. Im zweiten Schritt erfolgt die Zugabe eines zweiten Proteins, hier die PLA1, welches über freie Aminogruppen verfügt, mit denen die aktivierten Peptide zum Konjugat reagieren können. Durch die Aktivierung des Peptides über die C-terminalen Carboxylgruppen gelingt es das hydrophobe Ende des Moleküls nach außen zu richten, was die spätere Anlagerung im Bereich der Grenzfläche verbessern soll.

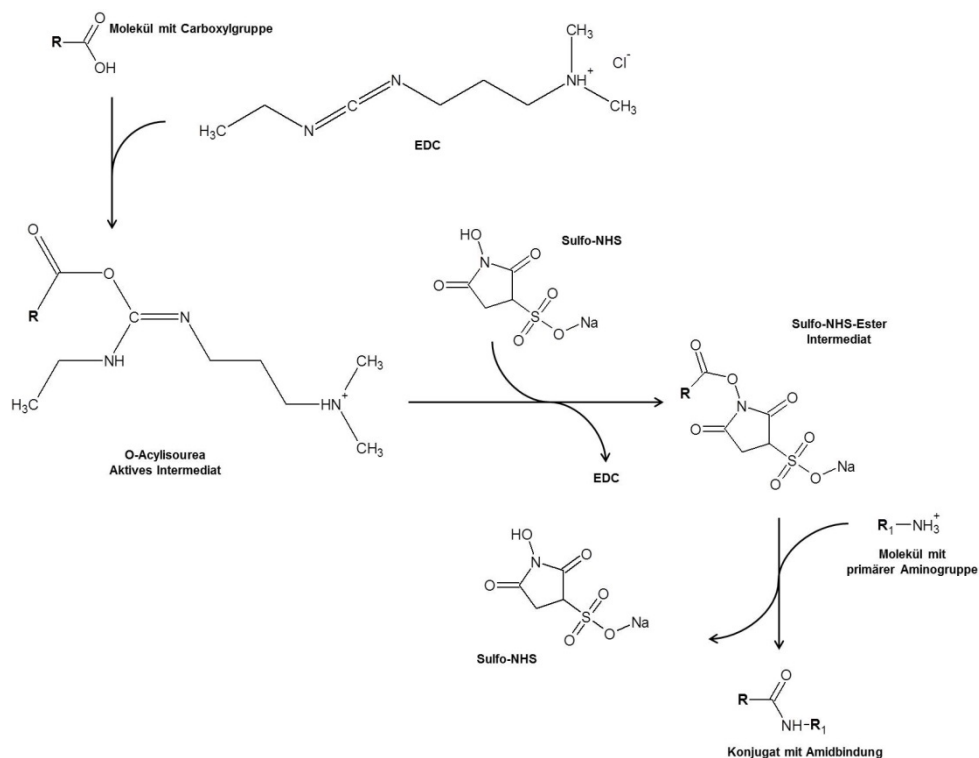


Abbildung 3.2.2: Reaktionsmechanismus zur Konjugatbildung durch Zero-Length-Crosslinker [analog 61, S. 264].

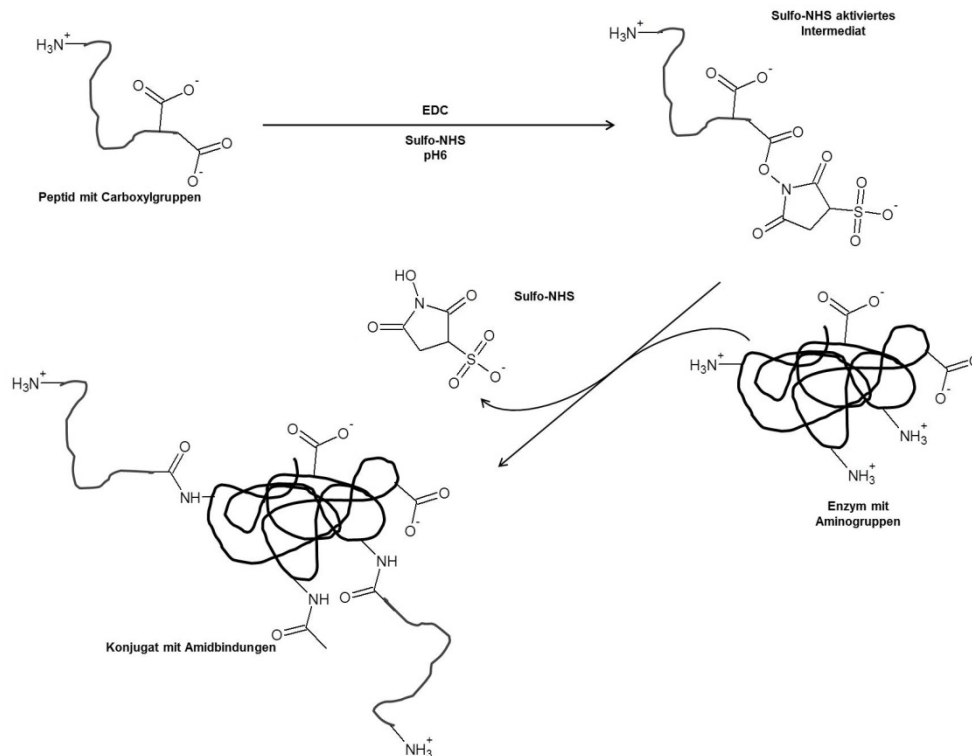


Abbildung 3.2.3: Zweistufiger Mechanismus zur Enzym-Peptid-Konjugation.

In Anlehnung an das von Hermanson empfohlene Protokoll [61, S. 265] erfolgt die Konjugation der PLA1 jeweils mit einem der beiden untersuchten Peptide (Test1 & SA2).

1. Lösen des zu aktivierenden Proteins im Reaktionspuffer, 0,05 M MES, 0,5 M Natriumchlorid bei pH 6, Proteinkonzentration 1 mg/mL.
2. Zugabe von EDC und Sulfo-NHS in den Reaktionspuffer. Zu erreichende Konzentration 2 mM für EDC, 5 mM bei Sulfo-NHS.
3. Reaktion für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
4. Abbruch der Aktivierungsreaktion durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol zum Reaktionsgemisch zu erreichende Konzentration 20 mM. Reaktion für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Alternativ zum Reaktionsabbruch durch Mercaptoethanol kann dies auch durch Gelfiltration geschehen, wenn derart hohe Konzentrationen von Mercaptoethanol das zu aktivierende Protein schädigt.
5. Wird die Aktivierungsreaktion durch Mercaptoethanol unterbrochen, so kann direkt das zweite Protein für die Konjugation hinzugegeben werden. Das zweite Enzym ist in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) zu lösen, sodass der pH-Wert zur Konjugatbildung auf Werte größer pH 7 angehoben wird.
6. Reaktion für zwei Stunden bei Raumtemperatur.
7. Entfernung der überschüssigen Reaktanden durch Gelfiltration oder Dialyse.

Da davon ausgegangen werden muss, dass derart hohe Konzentrationen von Mercaptoethanol die PLA1 schädigt, wird das obige Protokoll dahingehend abgewandelt. Die Zugabe des Mercaptoethanols dient der Zersetzung des überschüssigen EDC im Reaktionsgemisch, um die Aktivierungsreaktion zu beenden. Zur Vermeidung dieses Schrittes wird die Reaktionszeit in 3. auf 90

Minuten verlängert. Die Überlegung beruht auf den Untersuchungen von Gilles zur Halbwertszeit von EDC in Abhängigkeit des pH-Wertes [62, S. 246]. Hiernach ergibt sich bei pH 6 eine Halbwertszeit von etwa 14 Minuten, sodass ausgehend von einer maximalen Konzentration des EDC von 2 mM nach 90 Minuten noch etwa 0,03 mM EDC im Gemisch vorliegt. Nachdem nur noch Spuren des EDC präsent sind, wird die PLA1 im beschriebenen Puffer hinzugefügt. Ferner wird die Gesamtreaktion durch eine abschließende Zugabe von 1 M Tris gestoppt. Der pH-Wert kann so auf etwa pH 8 erhöht werden. Die Konjugate sind zur weiteren Verwendung aufzukonzentrieren und in einem geeigneten Puffer zu lösen. Zunächst wird das Reaktionsgemisch bei 3.000 Umin^{-1} für vier Minuten zentrifugiert, um so etwaige suspendierte Partikel abzutrennen. Das Aufkonzentrieren erfolgt in Zentrifugenröhrchen mit Membran (10 kDA MWCO). Bei 10.000 Umin^{-1} wird die Probe für zehn Minuten zentrifugiert. Die Konjugate liegen anschließend in erhöhter Konzentration vor, sind jedoch noch im Reaktionsgemisch gelöst. Dieses Gemisch kann ebenfalls mittels Membranfiltration unter den gleichen Bedingungen in der Zentrifuge gegen einen 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 8) ausgetauscht werden. Hierzu wird die Probe dreimal mit dem Puffer verdünnt (1:1, v:v) und zentrifugiert. Auf diesem Wege erhält man etwa 2 mL Konjugatlösung.

b) Bestimmung der Aktivität

Durch die Konjugation werden die Eigenschaften der PLA1 verändert. Die neuen Eigenschaften müssen daher quantifiziert werden, um so die Vergleichbarkeit mit dem nicht modifizierten Enzym herzustellen. Die Enzymaktivität dient als Maß für die Enzymeigenschaften. Die Aktivität wird durch eine Modifikation der Methode für Lipaseaktivität von Zhao bestimmt [63, S. 22010]. Als Substrat kommt pNPP (Palmitinsäure-4-nitrophenylester) zum Einsatz, das durch das Enzym hydrolysiert wird. Das dabei freiwerdende para-Nitrophenol (pNP) kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 404 nm vermessen werden. Die Reaktion findet in 1,8 mL 50 mM TrisHCl-Puffer statt, dem zusätzlich Triton-X-100 als Tensid hinzugefügt ist (0,4 Vol%). Die Vorlage des Substrates geschieht in einer 1 mM Lösung in 2-Propanol (0,2 mL). Das Enzym ist ebenfalls in 0,2 mL TrisHCl-Puffer gelöst. Abweichend vom Protokoll findet die Reaktion nicht bei 35 °C im Wasserbad unter Schütteln für 20 Minuten, sondern direkt in der Küvette im Photometer statt. Dadurch kann der Reaktionsfortschritt unmittelbar verfolgt werden. Kalibriert wird das System anhand einer Verdünnungsreihe im Bereich von 0,01 mM bis 2,0 mM mit Standardlösungen pNP in Gegenwart des Puffergemisches.

3.2.5 Ober- und Grenzflächenspannung

Zur Charakterisierung von Ober- und Grenzflächenphänomenen ist im Zusammenhang mit der Ölentschleimung die Bestimmung von Ober- und Grenzflächenspannungen hilfreich, da die wesentlichen Prozesse an und über eine Grenzfläche hinweg stattfinden. Zur Messung dieser Spannungen wird das *Tensiometer K12* der Firma Krüss (Hamburg, Deutschland) eingesetzt, welches in Verbindung mit dem Software-Paket LabDesk 3.1 weitestgehend automatisiert betrieben werden kann. Durch ein angeschlossenes Umwälzthermostat werden die untersuchten Medien temperiert. Neben der Bestimmung von Ober- und Grenzflächenspannungen ist ebenfalls das Ermitteln von Dichten möglich. Das Software-Paket enthält auch eine Datenbank mit den Stoffdaten zahlreicher Reinstoffe, die bei den Messungen teilweise als Parameter angegeben werden müssen. Bedingt

durch die automatisierte Betriebsweise des Systems erscheint es an dieser Stelle nicht zielführend sämtliche Bedienelemente und die Versuchsdurchführung im Detail darzustellen, da die Dialogfenster den Bediener Schritt für Schritt durch das Menu führen. Es sei lediglich darauf hingewiesen, dass gravierende Fehler des Bedieners v.a. bei der Vorbereitung des Probengefäßes und der Probenkörper auftreten können. Ist dieses Zubehör unzureichend gereinigt, wirkt sich dies unmittelbar negativ auf die Qualität der Messergebnisse aus. Wertvolle Hinweise zur Reinigung gibt das Nutzerhandbuch.

Im Folgenden sollen die theoretischen Grundlagen zur Messung der Ober- und Grenzflächenspannung dargestellt werden [64, S. 119ff]. Grundsätzliche werden anhand der eingesetzten Prüfkörper zwei Methoden unterschieden:

- 1) die Ringmethode nach Du Noüy
- 2) die Plattenmethode nach Wilhelmy.

a) Ringmethode

Die Ringmethode ist ein etabliertes Verfahren zur Messung von Ober- und Grenzflächenspannungen auch unter schwierigen Benetzungsverhältnissen. Ihrem Namen folgend kommt bei dieser Methode ein Platinring als Prüfkörper zum Einsatz. Notwendigerweise müssen von dem Ring der mittlere Durchmesser (R) sowie der Durchmesser des Drahtes (r) bekannt sein, sodass hieraus die benetzte Länge (l_b) errechnet werden kann. Gemessen wird die Kraft (F), die erforderlich ist, um den Ring durch die Grenzfläche hindurch zu ziehen. Gleichung (3.5) stellt den mathematischen Zusammenhang zwischen dieser Kraft und der Oberflächenspannung her.

$$\sigma = \sigma^* \cdot K = \frac{F}{2\pi \cdot (R_i + R_a)} \cdot K \quad (3.5)$$

$$\text{mit } R_i + r = R_a \text{ und } R + \frac{r}{2} = R_a$$

Die so errechnete Spannung ist noch nicht exakt, da dieser Wert noch das Gewicht, der unter dem Ring angehobenen Flüssigkeitslamelle beinhaltet. Durch den Korrekturfaktor (K) erfolgt der Ausgleich dieses Fehlers. Der Korrekturfaktor ist eine komplexe nichtlineare Funktion und liegt in Tabellenform vor. Es bestehen Abhängigkeiten vom Verhältnis R/r sowie R^3/V , der Dichtedifferenz $\Delta\rho$ der beteiligten Phasen und σ^* . V bezeichnet hierbei das Volumen der angehobenen Flüssigkeitslamelle. Zuidema und Waters interpolierten aufbauend auf den Tabellen eine Gleichung zur Berechnung des Korrekturfaktors (Gleichung 3.6) [65, S. 312].

$$K = 0,725 + \sqrt{\frac{0,01452 \cdot \sigma^*}{0,25 \cdot l_b \cdot \Delta\rho} + 0,04534 - \frac{1,679}{R/r}} \quad (3.6)$$

b) Plattenmethode

Die Plattenmethode wurde bereits 1863 von Wilhelmy vorgestellt und geht ebenso wie die Ringmethode von der Messung einer Kraft aus. Die Platinplatte wird senkrecht aufgehängt und mit

dem Medium in Kontakt gebracht, sodass dieses die Platte „anspringt“. Dieser Ausdruck mag unpräzise erscheinen, hat sich jedoch aufgrund der treffenden Beschreibung der Verhältnisse in der Fachwelt durchgesetzt. Die Flüssigkeit zieht die Platte abwärts und die gemessene Kraft entspricht jenem Betrag, der aufgewendet werden muss, um die Platte wieder auf das Niveau der Oberfläche zu heben. Die Plattenmethode erfordert keine Korrektur des Messwertes, wodurch sich ein einfacher Zusammenhang zwischen Kraft und Spannung ergibt (Gleichung 3.7).

$$\sigma = \frac{F}{l_b \cdot \cos(\theta)} \quad (3.7)$$

Der Winkel θ bezeichnet den Kontaktwinkel zwischen der Flüssigkeitsoberfläche und der Platte. Eine notwendige Bedingung zur Nutzung der Gleichung (3.7) ist die vollständige Benetzung selbiger. Nur dann kann sich der Kontaktwinkel zu null ergeben, wodurch $\cos(\theta)=1$ wird. Die eingesetzten Platinplatten, die hinreichend gereinigt werden, erfüllen diese Bedingung.

c) Grenzflächenspannungen

Grenzflächenspannungen unterscheiden sich phänomenologisch nicht von Oberflächenspannungen. Während Oberflächenspannungen, als Spezialfall der Grenzflächenspannung, an der Grenzfläche zwischen einer Flüssigkeit und einer Gasphase auftreten, versteht man unter dem Begriff Grenzflächenspannung den Zustand zwischen zwei fluiden Phasen. In der Praxis sind dies meist Flüssigkeiten. Besonderheiten müssen lediglich bei der praktischen Messung von Grenzflächenspannungen mit der Ringmethode beachtet werden. Da die Methode die Kraft misst, die benötigt wird, um die Grenzfläche zu passieren, sind die Oberflächenspannungen der beteiligten Flüssigkeiten zu beachten. Je nachdem ob die schwere Phase die größere oder die kleinere Oberflächenspannung aufweist, ist der Ring entweder zu „ziehen“ bzw. zu „drücken“.

d) Dichtebestimmung

Bei sämtlichen Spannungsmessungen benötigt das Auswertesystem die Information über die Dichte der beteiligten Phasen. Dies kommt beispielsweise in Gleichung (3.6) zum Ausdruck, aber auch Messungen mit der Platte erfordern diese Angabe. Die in LabDesk implementierte Funktion zur Dichtebestimmung gewährleistet die Bereitstellung von zuverlässigen Daten auch für Lösungen und homogene Gemische, die nicht in der Datenbank hinterlegt sind. Als Ausgangspunkt dient auch hier wieder die Messung einer Kraft. Die Gewichtskraft des Dichtemesskörpers wird zunächst in Luft bestimmt. Anschließend taucht man ihn in das Medium und misst die Gewichtskraft erneut. Aus der Kraftdifferenz ergibt sich die Auftriebskraft (F_A). Da das Volumen (V_D) des Dichtemesskörpers bekannt ist, kann die Dichte der Flüssigkeit errechnet werden (3.8).

$$F_A = V \cdot g \cdot \rho \quad (3.8)$$

3.2.6 Glycolipidanalytik (GL-Analytik)

Die folgenden zwei Abschnitte stellen die Verfahren im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur GL-Fraktion des Ölschleims dar [66, S. 3]. Ausgangspunkt ist die Isolierung der GL aus der

Schleimprobe, gefolgt von deren Analyse durch High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). Im Zentrum der Betrachtungen stehen fünf verbreitete Glycolipidklassen, namentlich Monogalactosyldiglyceride (MGDG), Digalactosyldiglyceride (DGDG), Cerebroside (Cer bzw. CerOH), Sterylglucoside (SG) sowie Acylierte Sterylglucoside (ASG)

a) Fraktionierung

Die zuverlässige Analyse der im Ölschleim enthaltenen GL erfordert deren vollständige Separation in einer einzelnen Fraktion, um die Komplexität des Systems zu reduzieren. Die Fraktionierung ergibt für gewöhnlich drei Fraktionen, namentlich die neutralen Lipide, GL und Phospholipide (PL). Ein bewährter Ansatz ist die Festphasenextraktion mit Silicagel in Verbindung mit organischen Lösungsmitteln und entsprechenden Lösungsmittelgemischen. Das Silicagel kann hierbei in kommerziell vorgepackten oder manuell gepackten Säulen eingesetzt werden [67, S. 129][68, S. 47]. Diese säulenchromatographischen Ansätze sind gut untersucht und etabliert. Regelmäßig soll die Probengröße 5 Gew% der Silicamasse nicht überschreiten. Folglich werden vornehmlich kleine Probenmengen mit relativ hohen Konzentrationen der Zielsubstanzen derart fraktioniert, da eine Erhöhung der Probenmasse einhergeht mit einem überproportional stärkeren Verbrauch an Silicagel und Lösungsmittel. Zudem muss eine höhere Druckdifferenz angelegt werden, um einen kontinuierlichen Fluss der mobilen Phase zu gewährleisten. Ein geeigneterer Ansatz ist die mehrstufige diskontinuierliche Fraktionierung im Rührkessel, die bei Maßstabsvergrößerungen einen verhältnismäßigen Mehrverbrauch der Ressourcen bewirkt [69, S. 5598]. Somit zeigt sich diese Methode auch für Proben geeignet, in denen lediglich Spuren der Zielstoffe vorliegen.

Aufgrund der deutlichen Vorteile einer diskontinuierlichen Fraktionierung für den Zweck der GL-Separation wird dieser Ansatz im Weiteren genutzt. Gemäß der beschriebenen Methode von Selmair soll das Verhältnis von Probenmasse zu Silicamasse 1:5 betragen. Vor der Benutzung muss das Silicagel für die Fraktionierung vorbereitet werden. Während der Lagerung unter Umgebungsbedingungen werden mit zunehmender Zeit die freien funktionellen Gruppen auf der Oberfläche durch die Adsorption von Wasser aus der Umgebungsluft belegt, was eine erfolgreiche Fraktionierung behindert. Daher erfolgt zu Beginn eine Trocknung des Materials im Vakuumtrockenschrank durch einen dreistufigen Prozess. Zunächst wird bei 60 °C bzw. 90 °C für jeweils 15 Minuten erwärmt, bevor die eigentliche Trocknung bei 120 °C über Nacht stattfindet. Das so getrocknete Silicagel kann nun mit der in Chloroform gelösten Probe unter Rühren in Kontakt gebracht werden. Die Verweilzeit beträgt 15 Minuten, das Lösungsmittelvolumen 37,5 mL pro Gramm Probe. Anschließend wird das Lösungsmittel mittels Saugflasche und Keramikfritte abfiltriert. Dieser Schritt erfolgt dreimal. Das Filtrat enthält die Fraktion der neutralen Lipide, die keine weitere Verwendung erfährt. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass diese Fraktion zuverlässig frei von GL ist. Nach erfolgter Abtrennung muss das restliche Chloroform aus dem Silicagel im Vakuumtrockenschrank bei 50 °C verdampft werden. Zur Separation der GL dient das zweite Lösungsmittelgemisch Aceton/2-Propanol (75:25, v:v). Jeweils 25 mL pro Gramm Probe werden im Eisbad bei 0 °C mit der Probe in Kontakt gebracht und wiederum für 15 Minuten gerührt (5 Wiederholungen). Nach der Filtration der flüssigen Phase befinden sich die GL in dieser Fraktion, das Silicagel ist nun lediglich mit PL und

weiteren polaren Verbindungen beladen, die nicht weiter verwendet werden. Aufgrund des großen Lösungsmittelvolumens ergibt sich eine äußerst geringe Konzentration der GL, die für die Analyse ungeeignet ist. Daher müssen die GL durch Verdampfen des Lösungsmittels aufkonzentriert werden. Dies geschieht im Rotationsverdampfer bei Temperaturen bis 80 °C und Unterdruck. Die Praxis hat gezeigt, dass der reguläre Betrieb mit rotierendem Kolben für das beabsichtigte Ziel unzweckmäßig ist. Durch die Rotation werden die wenigen GL auf der kompletten Innenseite des Kolbens verteilt, was deren Rückgewinnung maßgeblich behindert. Daher werden stufenweise stets nur wenige Milliliter im ruhenden Kolben verdampft, sodass sich die gesamte Fraktion in einem kleinen Kugelsegment ansammeln kann. Die trockenen GL werden aus dem Kolben mit Spateln entfernt und in ein kleineres Volumen überführt. GL-Reste an der Kolbenwand werden mit Chloroform/Methanol (2:1, v:v) abgelöst und ebenfalls umgefüllt. Da durch Verdunstungseffekte während der Arbeiten das Volumen des neuen Lösungsmittels im Probengefäß ($V_{\text{Nenn}} = 6 \text{ mL}$) unbekannt ist, wird die GL-Fraktion erneut im Vakuumtrockenschrank bei 50 °C getrocknet. Mittels einer Massenbilanz über das Probengefäß kann die Masse der GL bestimmt werden. Abschließend sind die GL in 5 mL des letztgenannten Lösungsmittelgemisches zu lösen und stehen für die Analyse bereit.

b) High-Performance Thin-Layer Chromatography

Nachdem die GL-Fraktion isoliert ist, werden die einzelnen GL-Klassen mittels chromatographischer Verfahren aufgetrennt. Im Falle von GL und PL erfolgt dies üblicherweise durch High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) sowie die Dünnschichtchromatographie (TLC), während gaschromatographische Ansätze eher ungeeignet sind, denn bei diesen muss die Probe in den gasförmigen Zustand überführt werden, ohne dass sie sich zersetzt. Die Literatur bietet zahlreiche Beispiele für HPLC-Methoden zur Analyse von GL [70, S. 763][71, S. 22][72, S. 10409] [73, S. 3064]. Allerdings besitzen die meisten Lipidmoleküle keine Chromophoren oder funktionelle Gruppen mit charakteristischen Absorptionsmaxima, weswegen die Detektion im Eluenten schwierig ist. UV-Detektoren im Wellenlängenbereich um 200 nm können zwar eingesetzt werden, um Doppelbindungen sensitiv zu detektieren, jedoch verhindert die schwankende Anzahl dieser Bindungen die quantitative Analyse [74, S. 195][26, S. 1153]. Brechungsindex-, Flammenionisations- und Lichtstreuendetektoren sowie Massenspektrometer sind weniger sensitiv, weisen einen eingeschränkten Anwendungsbereich auf oder sind mit höheren Kosten verbunden [75, S. 35ff] [76, S. 375].

Die Dünnschichtchromatographie, insbesondere HPTLC, erscheint dahingehend vorteilhafter, da sie eine sensitive und reproduzierbare quantitative Detektion ermöglicht. Sie ist weniger zeitintensiv und wirtschaftlicher, denn durch die Auftragung mehrerer Proben auf einer Platte kann ein hoher Durchsatz erzielt werden. Aufgrund dieser Vorteile hat sich die HPTLC als ein weithin verbreitetes Verfahren sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Analyse von Lipidmischungen etabliert. Als stationäre Phase dient normalerweise auf Glas aufgebracht Silicagel, das in Verbindung mit einer abgestimmten mobilen Phase die Trennwirkung hervorruft. Die eigentliche Detektion der Substanzen erfolgt über optische Verfahren. Hierzu müssen die farblosen GL mittels einer Derivatisierungsreaktion angefärbt werden. Zum Einsatz kommen unterschiedliche Reagenzien, stets

gekoppelt mit einer abschließenden Wärmebehandlung [68, S. 10][76, S. 377] [77, S. 1860]. Die Derivatisierung mit Schwefelsäure ist ein einfach anwendbares Verfahren zur qualitativen Auswertung des Chromatogramms [69, S. 5598]. Unterschiedliche Lipidklassen verfärben sich beim Heizen verschieden und können so mit bloßem Auge identifiziert werden. Besonders wichtig für reproduzierbares Arbeiten ist die gleichmäßige Benetzung des Chromatogramms mit dem Reagenz. Hierzu stehen im Wesentlichen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Entweder es wird manuell bzw. automatisch aufgesprüht, oder die gesamte Platte muss kurzzeitig in das Reagenz eintauchen. Entscheidend ist eine reproduzierbare Abfolge, die bedienerseitig wenig Spielraum für Abweichungen vom Protokoll zulässt. Untersuchungen, die den Einfluss des Derivatisierungsreagenz beleuchten sind relativ rar [78, S. 22][79, S.304]. Man kann jedoch schlussfolgern, dass ein automatisiertes Verfahren, insbesondere durch Eintauchen für die quantitative Bestimmung am besten geeignet ist.

Aufbauend auf diesen Überlegungen wird eine HPTLC-Methode entwickelt, die weitestgehend automatisiert abläuft. Zu diesem Zweck kommen der Probenauftrage-Automat *Linomat V*, die *Automatische Entwicklungskammer ADC2*, eine Tauchvorrichtung sowie der *TLC-Scanner IV* der Firma CAMAG (Muttenz, Schweiz) als Gesamtsystem zum Einsatz. Die HPTLC-Platten (20x10 cm²) werden vor der Benutzung mit Methanol gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei 135 °C im Umlufttrockenschrank getrocknet. Die Probenauftragung erfolgt automatisch 10 mm entfernt von den Plattenrändern in 20 Banden à 6 mm. Das Probenvolumen beträgt jeweils 1 µL. Die Entwicklung des Chromatogramms geschieht in der ADC2 in vier Schritten:

1. Sättigung der Kammeratmosphäre mit dem Dampf der mobilen Phase Aceton/Chloroform/Wasser (6:3:0,4, v:v:v) für 20 Minuten
2. Konditionierung der Platte in der gesättigten Atmosphäre (10 Minuten)
3. Chromatogrammentwicklung (Fließmittelfront 80 mm)
4. Trocknung der Platte nach erfolgter Entwicklung (10 Minuten)

Die anschließende Derivatisierung erfolgt mit der Tauchvorrichtung und abschließendem Heizen bei 135 °C für unterschiedliche Zeitspannen. Es werden zwei Reagenzien untersucht:

1. Schwefelsäure (50 Gew%)
2. Ein Gemisch aus Methanol, Kupfer(II)sulfat, Schwefelsäure (98 %) und Phosphorsäure (85 %), dieses zeigt bei der Derivatisierung von PL gute Ergebnisse und ist somit vielversprechend für den beabsichtigten Zweck [77, S. 1860].

Die derivatisierten Proben können im TLC-Scanner bei unterschiedlichen Wellenlängen vermessen werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen vorgestellt und diskutiert. Beginnend mit grundlegenden Untersuchungen zur Ölentseimung im Abschnitt 4.1 folgt in Abschnitt 4.2 der Charakterisierung der Wasser in Öl Emulsion unter den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen, um so die Erkenntnisse aus Abschnitt 4.1 phänomenologisch zu erklären. Der Abschnitt 4.3 fasst die Untersuchungen zur Enzym-Peptid-Konjugation zusammen, bevor im Abschnitt 4.4 auf die Analyse der Glycolipide (GL) eingegangen wird.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse basieren auf den Arbeiten mit einer Charge des Sonnenblumenöls 1 (SFO1). Dieses Öl wird durch die Clariant GmbH zur Verfügung gestellt. Die relevanten Inhaltsstoffe zur Beschreibung der Ölqualität werden in der Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Inhaltsstoffe Sonnenblumenöl 1.

Eigenschaft	Wert
Freie Fettsäuren [Vol%]	0,54
Wasser [Gew%]	0,07
Phosphor [ppm]	145
Eisen [ppm]	0,1
Calcium [ppm]	18
Magnesium [ppm]	19

Laut Hersteller handelt es sich um ein Rohöl. Es liegen keine Informationen über etwaige Vorbehandlungen wie z.B. Wasserentschleimung vor. Zur Einordnung der Werte können die Qualitätsanforderungen zur Einlagerung von rohem Sonnenblumenöl herangezogen werden [6, S. 147f]. Demnach soll im Öl der Anteil freier Fettsäuren 2 Gew% und der Wassergehalt 0,5 Gew% nicht übersteigen. Mit einer deutlichen Unterschreitung beim Wassergehalt mit nur 0,07 Gew% kann von wasserfreiem Öl gesprochen werden. Die Phosphorkonzentration von 145 ppm liegt ebenfalls unterhalb der Empfehlung von 200 – 400 ppm. Ähnliches gilt für die Spurenelemente im Öl. Bei Calcium und Magnesium sollen die Werte 25 – 50 ppm bzw. 20 – 40 ppm nicht überschreiten und für Eisen wird der Bereich < 5 ppm empfohlen. Insgesamt handelt es sich um ein relativ „sauberes“ Öl.

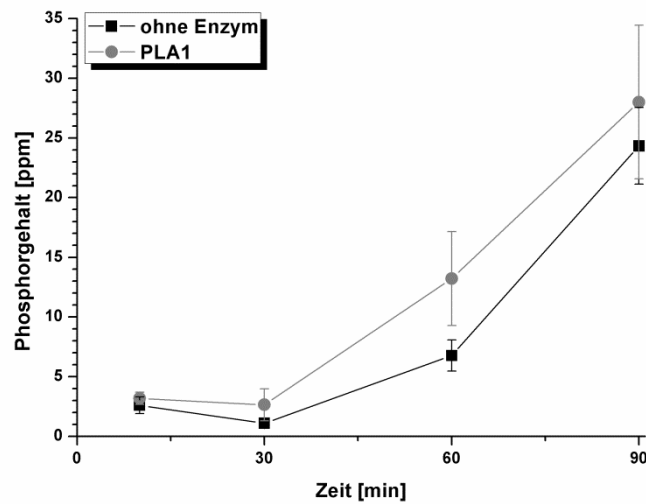
4.1 Ölentseimung

a) Systemoptimierung

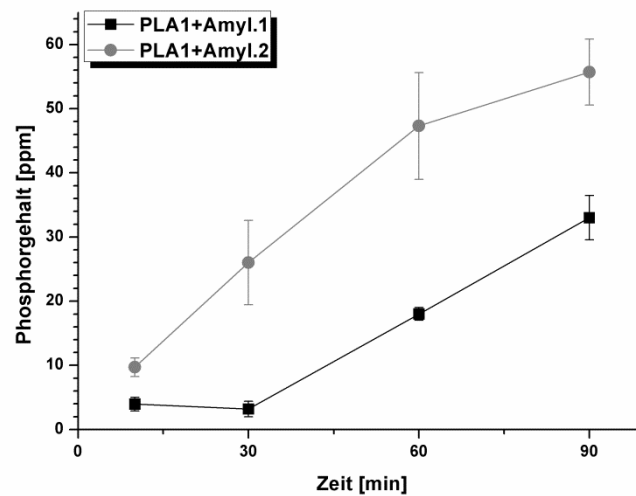
Die ersten Versuche zur Entschleimung des Sonnenblumenöls knüpfen an die Erfahrungen der Clariant GmbH mit Soja- und Rapsöl an. Die Untersuchungen dienen der Abschätzung, inwiefern gewonnene Erkenntnisse zur Prozessführung von Soja- und Rapsöl auf das Sonnenblumenöl übertragbar sind.

Ausgehend vom Phosphorgehalt von 145 ppm kann mit Gleichung 2.1 der Anteil der Phospholipide (PL) zu 0,46 Gew% ermittelt werden. In der Konsequenz wird der Gesamtwassergehalt auf 0,5 Gew%

festgesetzt [11, S. 35]. Der eigentlichen Reaktion geht eine 15 Minuten andauernde Säurekonditionierung mit 500 ppm Zitronensäure und eine zehnmünütige Teilneutralisation mit Natronlauge voraus. Hierbei handelt es sich prinzipiell um eine Form des „acid refining“, wie es in Abschnitt 2.3 beschrieben wird. Die maximale Reaktionszeit beträgt 90 Minuten, ab der Zugabe der restlichen wässrigen Phase nach der Teilneutralisation, mit Probenahmen nach 10, 30, 60 und 90 Minuten. Es werden Versuche ohne Enzymzusatz und enzymatische Entschleimungsversuche mit 0,3 U/g Phospholipase A1 (PLA1) durchgeführt. Die spezifische Aktivität von 0,3 U/g wird gewählt, da sich diese bei Soja- und Rapsöl bewährt hat. Der Gehalt an PL im eingesetzten Öl liegt weit unterhalb jenem in den genannten Alternativölen, weswegen die Enzymmenge für die beabsichtigten Zwecke ausreichend erscheint. In Abbildung 4.1.1a sind die Konzentrations-Zeit-Verläufe des Phosphors beider Versuchsansätze graphisch dargestellt.



a)



b)

Abbildung 4.1.1: Konzentration-Zeit-Verlauf des Phosphorgehalts a) ohne Enzym und mit PLA1, b) PLA1 kombiniert mit Amylase 1 und PLA1 kombiniert mit Amylase 2.

Für beide Versuchsbedingungen kann eine analoge Entwicklung der Phosphorkonzentration beobachtet werden. Der wesentliche Unterschied besteht in den stets erhöhten Werten und größeren Fehlerbalken beim Einsatz der PLA1 gegenüber der enzymlosen Entschleimung. Der Abbildung 4.1.1a ist zu entnehmen, dass bereits nach zehn Minuten der Phosphorgehalt auf weniger als 5 ppm sinkt. Ein Minimum stellt sich nach 30 Minuten ein. Anschließend steigt die Konzentration progressiv an und erreicht bei der Probennahme nach 90 Minuten Werte > 24 ppm. Ein ebensolches Verhalten stellt sich auch für die Konzentrations-Zeit-Verläufe des Calciums und Magnesiums ein, wobei die maximalen Werte nach 90 Minuten lediglich die Grenze von 4 ppm überschreiten. Die Minima nach 30 Minuten sind der Tabelle 4.1.1 zu entnehmen. Für diese Versuche kann ein zeitliches Optimum für eine Reaktionszeit von 30 Minuten ermittelt werden. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Werte bereits deutlich unterhalb der Qualitätsanforderung für zulässige Gehalte in Biodiesel, wie sie durch die DIN EN 14214 vom Juni 2014 vorgegeben sind. Diese schreibt für Phosphor weniger als 4 ppm und für Calcium und Magnesium in Summe weniger als 5 ppm vor. Diese Werte gelten wohlgerne für das Endprodukt Biodiesel, nachdem das Öl die komplette Raffination und Biodieselherstellung durchlaufen hat. Vor diesem Hintergrund können *die ersten Versuche als erfolgreiche Entschleimung bezeichnet werden*. Es stellt sich jedoch die Frage nach den erhöhten Messwerten für den Ansatz mit PLA1, die bei 30 Minuten mehr als das Doppelte betragen (Abbildung 4.1.1a obere Kurve). Ferner überrascht der erneute Anstieg der Werte mit voranschreitender Reaktion. Diese Beobachtungen müssen im Folgenden näher aufgeklärt werden.

Tabelle 4.1.1: Wertetabelle zur Entschleimung mit unterschiedlich zusammengesetzten wässrigen Phasen. Probennahme nach 30 Minuten. Amylasen (3 - 8) je 1 U/g in Kombination mit 0,3 U/g PLA1.

	Enzym	spez. Aktivität	P [ppm]	Ca [ppm]	Mg [ppm]	FFA [Vol%]	Schleimphase [Vol%]	[Gew%]
1	ohne	-	1,10	0,30	0,30	0,53	0,7	3,16
2	PLA1	10 kU/mL	2,64	0,68	0,56	0,63	0,6	1,08
3	AD11P	30 kU/g	3,3	1,0	0,6	0,63	0,60	1,15
4	B	45 kU/mL	2,3	0,7	0,5	0,60	0,57	1,16
5	Delpol 220L	25 kU/g	3,4	1,0	0,8	0,60	0,63	1,49
6	Delpol 680P	10 kU/g	3,4	1,0	0,6	0,57	0,57	1,23
7	M719L	12 kU/g	2,7	0,9	0,7	0,67	0,55	1,27
8	PET	450 U/mL	26	4,4	4,6	0,59	0,68	1,12

Zusätzlich zur PLA1 werden weitere Enzyme in Entschleimungsversuchen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um verschiedene Amylasen, die bereits zuvor in Soja- und Rapsöl getestet wurden. Die Idee ihres Einsatzes liegt vor allem in einer unterstützenden Wirkung der Amylaseaktivität, die es ermöglicht Oligo- und Polysaccharide im Öl in kurzkettige Zuckerverbindungen zu spalten. Als Folge lassen sich erhöhte Ölausbeuten für diese Öle nachweisen. Wie genau die Spaltung langkettiger Zuckerverbindungen die Ölentschleimung begünstigt ist nicht hinreichend aufgeklärt. Eine mögliche Hypothese besteht in der Annahme einer verbesserten Sterik an der Grenzfläche zwischen dem Öl und Wasser durch kleinere Moleküle, was deren Phasenübergang erleichtert und somit die räumliche Organisation an der Grenzfläche positiv beeinflusst [Clariant Produkte GmbH, interne Kommunikation].

Zunächst soll hier ungeachtet des zugrunde liegenden Mechanismus untersucht werden, ob ähnliche Erscheinungen auch für Sonnenblumenöl beobachtbar sind. Hierzu finden Versuche nach den oben geschilderten Bedingungen statt. Die Amylasen werden zu jeweils 1 U/g in Kombination mit der PLA1 eingesetzt. Beispielhaft für diese Versuche sind in Abbildung 4.1.1b die Konzentrations-Zeit-Verläufe des Phosphors für die Amylasen M719L und PET graphisch dargestellt (im Folgenden Amylase 1 bzw. Amylase 2 genannt). Für die übrigen Amylasen finden sich die relevanten Werte ebenfalls in der Tabelle 4.1.1. Der Einsatz aller Zusatzenzyme bewirkt grundsätzlich eine weitere Erhöhung der Phosphor-, Calcium- und Magnesiumkonzentrationen im Vergleich sowohl zur reinen Säurebehandlung als auch zur enzymatischen Entschleimung mit der PLA1. Es lässt sich wiederum der bereits beschriebene Konzentrations-Zeit-Verlauf beobachten. Die Werte fallen zunächst ab und erreichen nach 30 Minuten ihren tiefsten Stand, um danach wieder stetig anzusteigen. Einzig beim Einsatz der Amylase 2 zeigt sich ein abweichendes Verhalten. In dem betrachteten Zeitabschnitt lässt sich kein eindeutiges Minimum ausmachen. Vielmehr ergibt sich nach zehn Minuten der kleinste Wert von 6,56 ppm, um dann scheinbar degressiv anzusteigen. Dies ist qualitativ ein signifikant abweichendes Verhalten und aus den Messwerten nicht ohne weiteres zu erklären.

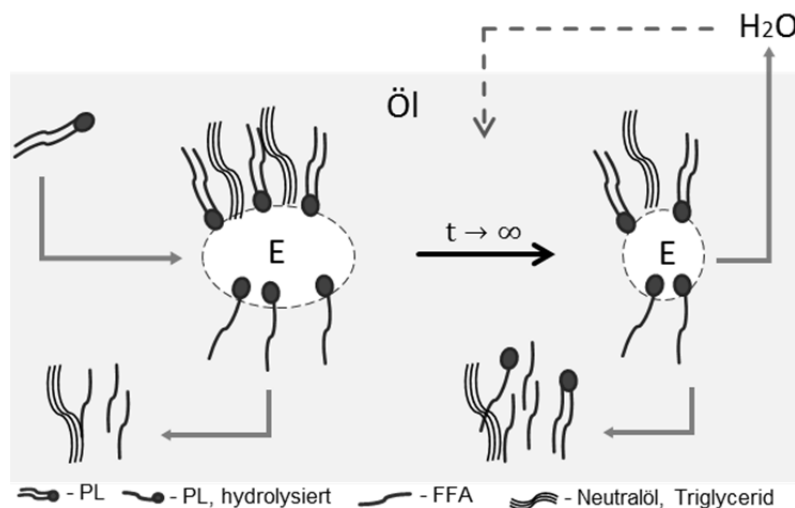


Abbildung 4.1.2: Modellansatz zur Charakterisierung der Vorgänge an Wasser-Öl-Grenzfläche.

Eine mögliche Erklärung der ansteigenden Konzentrationen gegen Reaktionsende kann mit Hilfe einer Modellvorstellung zur Wasser-Öl-Grenzfläche postuliert werden. In der Abbildung 4.1.2 wird der Modellmechanismus abgebildet. Zwischen dem Öl und der wässrigen Phase bildet sich eine Grenzfläche aus, an der die Anlagerung der PL stattfindet. Diese Grenzfläche ist durch das Volumen der wässrigen Phase im Öl bestimmt. Unter der Bedingung, dass sich das gesamte eingesetzte Wasser im Reaktionsgemisch befindet, nimmt die Grenzfläche einen maximalen Wert an und eine maximale Anzahl der PL kann durch das Wasser hydratisiert werden. Im Verlauf der Reaktion wird Kondensatbildung am Reaktordeckel beobachtet und bedingt durch die Geometrie des Deckels kann das Kondensat der Reaktion nicht in ausreichendem Maß wieder zugeführt werden. Durch das teilweise Verdampfen des Wassers und dessen Kondensation reduziert sich das verfügbare Volumen und einhergehend damit die „benetzbare“ Grenzfläche zum Öl, die zur vollständigen Hydratisierung aller PL notwendig ist. Daher werden bereits hydratisierte PL wieder in das Öl freigesetzt und die

gemessenen Konzentrationen steigen an. Die ansteigenden Konzentrationen der Spurenelemente Calcium und Magnesium könnten nach einem ähnlichen Mechanismus erklärt werden. Diese Elemente werden nach dem Aufbrechen der PL-Metallkomplexe durch die Zitronensäure freigesetzt und können anschließend die Grenzfläche zur wässrigen Phase passieren, um sich in dieser zu lösen. Es ist nun vorstellbar, dass durch den Rückgang des Wasservolumens die Löslichkeitsgrenze der Elemente unterschritten wird, wodurch diese ausfallen und zurück in das Öl gelangen. Da die Beobachtungen nun vornehmlich durch den Versuchsaufbau bedingt werden, muss eine Möglichkeit gefunden werden das Kondensat im notwendigen Maß zu rezirkulieren. Bevor die Lösungsansätze für diese Problemstellung näher diskutiert werden, sollen zunächst weitere Ergebnisse der ursprünglichen Konfiguration vorgestellt werden.

Gemäß der im Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Versuchsdurchführung wird im zeitlichen Verlauf anhand der genommenen Proben auch der volumetrische hydrophile Anteil der Schleimphase ermittelt. Für die enzymlose Entschleimung und die Versuche mit der PLA1 sind diese Anteile in Abbildung 4.1.3a über der Zeit aufgetragen.

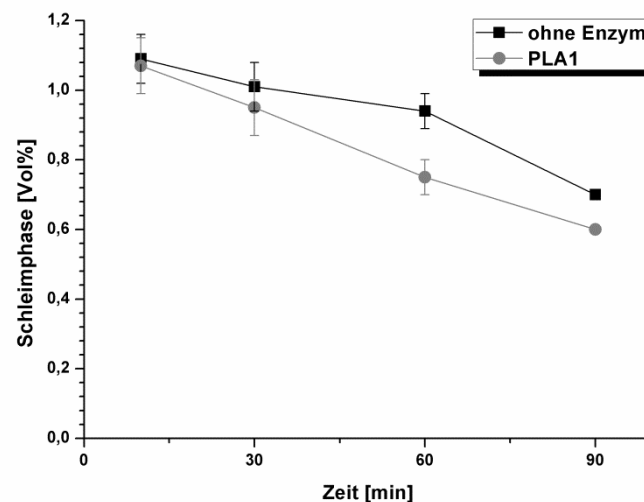


Abbildung 4.1.3a: Volumenanteil der Schleimphase: Zeit-Verlauf ohne Enzym und mit PLA1.

Bei der ersten Probennahmen liegt der Anteil für die beiden Ansätze bei etwa 1,1 Vol% und sinkt dann sukzessive bis zum Reaktionsende ab. Die Abnahme des Schleimanteils geschieht in Verbindung mit der PLA1 schneller als im Falle der enzymlosen Entschleimung, sodass nach 90 Minuten mit 0,6 Vol% etwa 15 % weniger Schleim vorliegt. Ausgehend von der Tatsache, dass die Zusammensetzung des Öls konstant ist, muss sich im Vergleich der Versuche die Qualität bzw. Zusammensetzung der Schleimphase verändert haben. Die PL sind aufgrund ihrer amphiphilen Struktur nur bedingt im Öl löslich und vermutlich in Abwesenheit einer wässrigen Phase gleichmäßig als inverse Mizelle darin verteilt. Die phosphorhaltige hydrophile Kopfgruppe des Moleküls orientiert sich nach deren Zugabe in Richtung der wässrigen Phase und lagert sich an dieser aus. Aufgrund der hydrophoben Fettsäuren können die PL die Grenzfläche jedoch nicht vollständig überschreiten. Der Stofftransport und die Anlagerung der PL sind durch polare Wechselwirkungen getrieben, wohingegen die Triglyceride des

umgebenden Öles aufgrund der Diffusion bestrebt sind sich homogen zu verteilen. Wenngleich das Öl nicht im Wasser löslich ist, so besteht dennoch kein aktives Bestreben sich von der Grenzfläche zu entfernen. Vielmehr müssen die PL bei ihrer Bewegung zum Wasser die dort vorhandenen Triglyceride verdrängen, um sich ihren Weg zur Grenzfläche zu bahnen. In der Folge werden zwischen den PL an der Grenzfläche auch Triglyceride eingeschlossen, die somit als Ölverlust in der Schleimphase dem Prozess verloren gehen. Dieser Zusammenhang wird in der Abbildung 4.1.2 (linke Seite oben) illustriert. Dieser Öleinschluss macht sich bei der Schleimabtrennung durch Zentrifugation dadurch bemerkbar, dass er die mittlere Dichte des Schleims verringert, wodurch dieser wiederum ein erhöhtes Volumen beansprucht. Kommt nun jedoch in der wässrigen Phase die PLA1 zum Einsatz, so katalysiert sie die Abspaltung der ersten Fettsäure vom PL-Molekül. Hierdurch verändert sich die Hydrophil-Hydrophob-Bilanz der PL zugunsten der hydrophilen Molekülanteile, was es ihnen ermöglicht tiefer in das Wasser „einzudringen“. Gleichzeitig nehmen durch eine verringerte Molekülgröße die sterischen Voraussetzungen zum Einschluss von Öl im Bereich der Grenzfläche ab, da die PL die zur Verfügung stehenden Flächen besser ausnutzen können. In der Folge gelingt es beim Zentrifugieren den Schleim besser zu komprimieren, weswegen der Volumenanteil der Schleimphase abnimmt. Daher können die oben dargestellten Ergebnisse dahingehend interpretiert werden, dass der Einsatz der PLA1 zu reduzierten Ölverlusten und somit einer verbesserten Ausbeute führt.

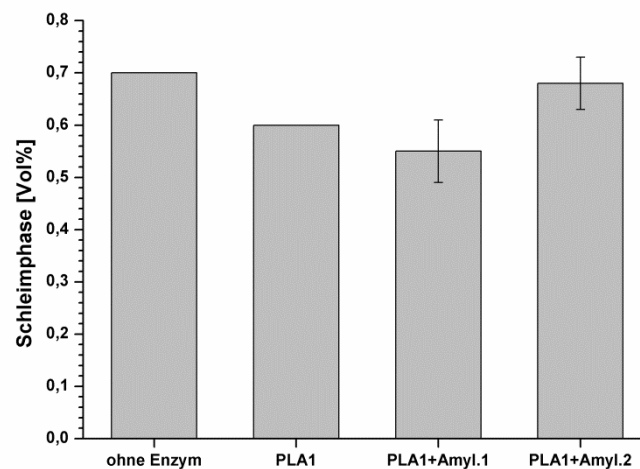
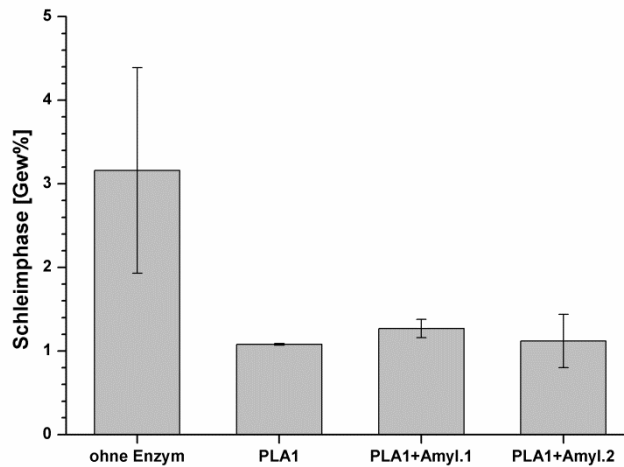


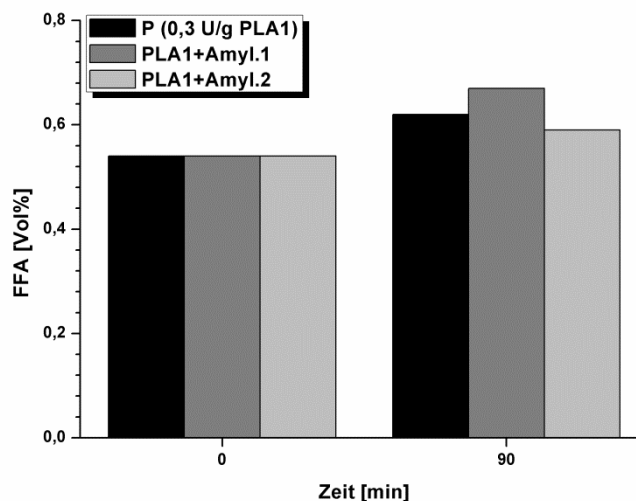
Abbildung 4.1.3b: Volumenanteil der Schleimphase: bei Reaktionsende ($t = 90$ Minuten) ohne Enzym, PLA1, PLA1 mit Amylase 1 und PLA1 mit Amylase 2.

Auch bei Kombination der PLA1 mit den Amylasen werden die volumetrischen Anteile der Schleimphase bestimmt. Exemplarisch sind der Abbildung 4.1.3b die Werte für die Amylasen 1 und 2 zu entnehmen. Unter Berücksichtigung der Streuung ergibt sich für die Amylase 1 in etwa der gleiche bzw. ein leicht reduzierter Schleimanteil, verglichen mit der PLA1. Für die Amylase 2 zeigt sich eine weniger deutliche Reduktion. Jedoch sind diese Daten nicht auf die Wirkung der zugesetzten Amylasen zurückzuführen, sondern vielmehr weiterhin das Ergebnis der PLA1. Dies kann durch

Versuche bestätigt werden, in denen allein die Amylasen ohne die PLA1 eingesetzt werden. Es bilden sich durchweg Schleimphasen mit einem Volumenanteil von 0,7 Vol% aus.



a)



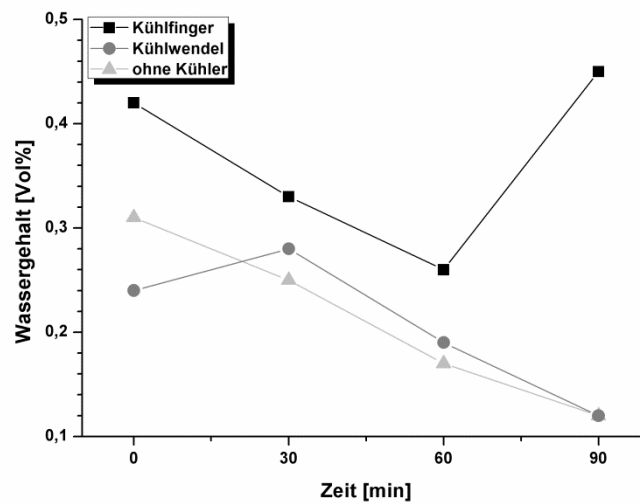
b)

Abbildung 4.1.4: Bedingungen bei Reaktionsende a) Massenanteil der Schleimphase b) Volumenanteil FFA im Vergleich die Zeitpunkt 0 und 90 Minuten.

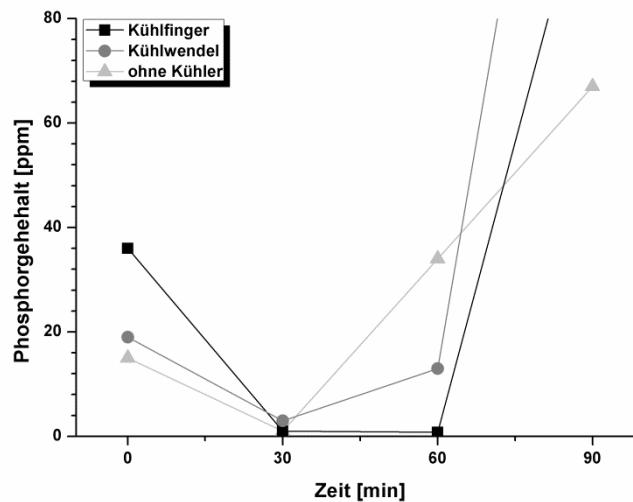
Bei Reaktionsende wird abschließend der Massenanteil der Schleimphase am Reaktionsgemisch ermittelt. In der Abbildung 4.1.4a können die Resultate aller vier Versuchsmodifikationen verglichen werden. Insgesamt weisen die Versuche mit PLA1 die niedrigsten Massenanteile, einhergehend mit der geringsten Streuung auf. In Verbindung mit den Amylasen finden sich stets größere Werte mit erhöhter Streuung und für die enzymlose Entschleimung ergibt sich ein Höchstwert mit beachtlicher maximaler Streuung. Grundsätzlich ist es zu erwarten, dass sich mit der PLA1 ein geringer Masseanteil einstellt, da in der Schleimphase vermutlich weniger Öl eingeschlossen ist und in etwa die gleiche Menge an PL abgeschieden wird wie bei der enzymlosen Entschleimung. Ein wesentliches Ergebnis der Bestimmung der Massenanteile liegt in dem Wert und der Streuung der enzymlosen

Entschleimung. Bei den anfänglichen Versuchen ist noch nicht im Detail bekannt in welcher Weise das restliche Öl optimal aus den Probenbechern entfernt werden kann, um so die Schleimphase zu isolieren. Dadurch ergeben sich anfänglich zu hohe Werte, die erst durch die Einführung des in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Protokolls korrigiert werden.

Ferner erfolgt mit Hilfe der gewonnenen Proben die Bestimmung des Gehaltes freier Fettsäuren (FFA) im Öl, um so ein Maß für die Aktivität der PLA1 zu erhalten. In der Abbildung 4.1.4b werden die Gehalte der FFA zum Zeitpunkt null und nach 90 Minuten dargestellt. Mit einer Steigerung von 19 % liegt ein deutlicher Anstieg der FFA vor, wodurch der Nachweis über die Aktivität der PLA1 erbracht wird. Vor diesem Hintergrund erscheint die oben darlegte These, des Einflusses der PLA1 auf die Schleimqualität und den Ölverlust in der Schleimphase, bestätigt. Auch in den kombinierten Versuchen der PLA1 mit den Amylasen lässt sich eine entsprechende Enzymaktivität belegen. Die FFA-Werte liegen für die meisten Amylasen nach 30 minütiger Reaktionszeit in der Größenordnung von etwa 0,6 Vol% (Tabelle 4.1.1) und sind tendenziell niedriger als bei der freien PLA1. Nur für die Amylase 1 ergibt sich ein größerer Wert von 0,67 Vol%. Bei den Messungen handelt es sich jedoch nur um Einfachbestimmungen, weswegen nicht mit abschließender Sicherheit eine Aussage darüber getroffen werden kann, inwiefern sich die PLA1-Aktivität in Verbindung mit weiteren Enzymen verändert. Grundsätzlich liegt die Vermutung jedoch nahe, dass eine Interaktion zwischen den verschiedenen Enzymen wahrscheinlich ist. Dieser Ansatz begründet sich mit der Wasserlöslichkeit aller Enzyme. Somit müssen sich die PLA1-Moleküle wasserseitig an der Grenzfläche ausrichten, um ihrem Substrat den Zugang zum aktiven Zentrum zu ermöglichen. Die Substrate der Amylasen sind unterschiedliche Zuckerverbindungen, die vollständig wasserlöslich sind. Daher besteht vermutlich nicht die unmittelbare Notwendigkeit, sich an der Grenzfläche aufzuhalten. Dennoch ist dies für einen Teil der Amylasemoleküle aufgrund der Diffusion in der Phase nicht auszuschließen. In der Folge hätten die Enzyme an der Phasengrenze um eine limitierte Fläche zu konkurriert, wodurch eine verringerte Anzahl PLA1 aufgrund konkurrierender Amylase-Grenzflächen-Interaktion für die Katalyse zur Verfügung stünde und so den Umsatz senkt.



a)



b)

Abbildung 4.1.5: Systemanpassung durch Kühlung a) zeitliche Änderung des Wassergehalts, b) Konzentrations-Zeit-Verlauf des Phosphorgehalts.

Um der Notwendigkeit der Kondensatrückführung gerecht zu werden, werden zwei mögliche Kühlfällen erprobt, die durch einen externen Thermostat bei 10 °C betrieben und über einen Schliffhals im Deckel in den Reaktor eingebracht werden.

- 1) Ein Kühlfinger, bestehend aus einer innen liegenden Zuleitung und einem umgebenden Mantel, der im Ablauf mündet. Folglich wird das Kühlmedium derart gelenkt, dass sich an der Spitze des Kühlfingers der kälteste Punkt befindet.
- 2) Eine Kühlwendel.

Zur Untersuchung der Tauglichkeit der Kühlfällen werden diese in enzymlosen Entschleimungsversuchen eingesetzt und mit der Modifikation ohne Kühlung verglichen. Der Versuchsablauf gleicht den zuvor geschilderten Experimenten. In der Abbildung 4.1.5a und b werden der Wassergehalt sowie die Phosphorkonzentration über der Zeit aufgetragen. Die Verläufe der ungekühlten Entschleimung

geben die postulierten Zusammenhänge wieder. Ausgehend von einem Wassergehalt von etwa 0,3 Vol% fällt der Wert linear ab und endet nach 90 Minuten bei 0,12 Vol%. Der erniedrigte Startwert kann auf eine bereits nennenswerte Kondensation bei Zugabe der restlichen wässrigen Phase zurückgeführt werden. Diese Wassergehalte spiegeln sich unmittelbar in der Phosphorkonzentration wieder, die in einem Verlauf resultiert wie er zu Beginn dieses Abschnittes beschrieben wird. Bei Nutzung der Kühlfalle ist ausschließlich an der Kühlfalle Kondensatbildung beobachtbar. Somit erfüllt diese Kühlfalle ihren Zweck und erzwingt die Kondensation an einem vorbestimmten Ort. Die Messreihe startet mit 0,24 Vol% noch unterhalb der ungekühlten Modifikation. Dieses deutet darauf hin, dass sich auf den schrägen und waagerechten Oberflächen zahlreiches Wasser niederschlägt und dort verweilt. Durch zusätzliches Kondensat kann im Laufe der Zeit ein Teil zurück in das Reaktionsgemisch geführt werden. In der Folgezeit liegt der Wassergehalt dann leicht oberhalb dessen der ungekühlten Entscheimung, endet jedoch ebenfalls bei 0,12 Vol%. Für die Phosphorwerte zeichnet sich ein analoger Verlauf ab. Zunächst fällt der Gehalt bis 30 Minuten auf 3 ppm um anschließend ebenso wie im ungekühlten Versuch anzusteigen. Nach 60 Minuten wird mit 13 ppm der Vergleichswert noch unterschritten, was mit einem leicht erhöhten Wassergehalt einhergeht, allerdings liegt er bei Reaktionsende um ein Vielfaches über diesem (187 ppm). Der Kühlfinger scheint nach den vorliegenden Ergebnissen am besten für die beabsichtigte Aufgabe geeignet. Zu Beginn der Probennahmen zeigt sich der höchste Wert aller verglichenen Versuche. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die Zugabe der wässrigen Phase, die sich somit vollständig im Reaktionsgemisch befindet. Erst im Laufe der Zeit verdunstet ein Teil der wässrigen Phase. Mit Voranschreiten der Reaktion sinken die Werte auf das Minimum von 0,26 Vol%, um nach 90 Minuten wieder bei 0,45 Vol% zu liegen. Bei der Betreuung der Versuche kann im Verlauf der Reaktion beobachtet werden, dass die Kondensatrückführung nicht durch permanentes Fließen, sondern tropfenweise geschieht. Hierdurch ist es möglich die zeitliche Änderung des Wassergehalts detaillierter zu beschreiben. Die Regulierung der wässrigen Phase ist kein stationärer Prozess, wodurch sich ein konstanter Wassergehalt ergeben würde. Vielmehr muss er um einen Mittelwert schwanken. Bei vier halbstündlichen Probennahmen kann es daher leicht geschehen zwei aufeinanderfolgende niedrige Konzentrationen zu ermitteln, und so den Eindruck absinkender Werte zu gewinnen. Erst durch Berücksichtigung aller vier Proben lässt sich die Schwankung erkennen. Beim Verlauf der Phosphorkonzentration wirkt sich dieser Wassergehalt am positivsten aus. Nach dem anfänglichen Absinken wird, wie erwartet, das Minimum erreicht und die Werte verharren für weitere 30 Minuten auf diesem Niveau. Erst bei Reaktionsende zeigt sich wieder eine erhöhte Konzentration, die ebenfalls den Vergleichswert um ein Vielfaches übersteigt (112 ppm). Aus dieser Erprobung können als Fazit zwei Schlussfolgerungen gezogen werden.

- 1) Zur Kondensatrückführung sind die erprobten Kühlfallen grundsätzlich geeignet, wobei der Kühlfinger diese Aufgabe besser erfüllt. Dies kann im Wesentlichen auf die Geometrie des Kühlfingers, mit seiner kleinen und senkrechten Oberfläche zurückgeführt werden, von der das Kondensat besser abfließt.

- 2) Für den Anstieg der Phosphor- und Spurenelementkonzentrationen kann nicht nur der Wassergehalt im Reaktionsgemisch verantwortlich sein. Stattdessen muss hier ein weiterer Mechanismus zum Tragen kommen, der noch näher zu bestimmen ist.

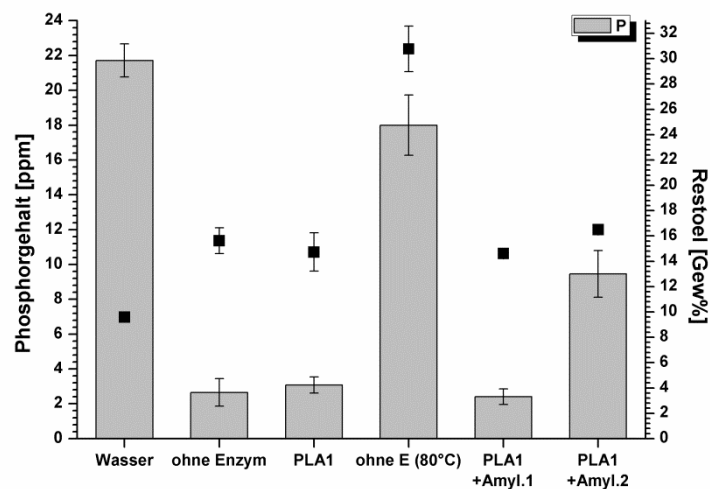
b) Vergleich unterschiedlicher Ansätze der Ölschleimung

Nachdem bis zu diesem Zeitpunkt im Wesentlichen die Maßnahmen zur Optimierung dargestellt wurden, soll im nun folgenden Abschnitt auf unterschiedliche Ansätze der Ölschleimung in vergleichender Weise eingegangen werden. Hierbei werden die Versuche nach dem gleichen Protokoll durchgeführt wie bisher auch. Lediglich das Reaktionsende wird nach 45 Minuten herbeigeführt, da wie oben erarbeitet, diese Zeitspanne ausreicht, um eine qualitativ gute Entschleimung zu erzielen.

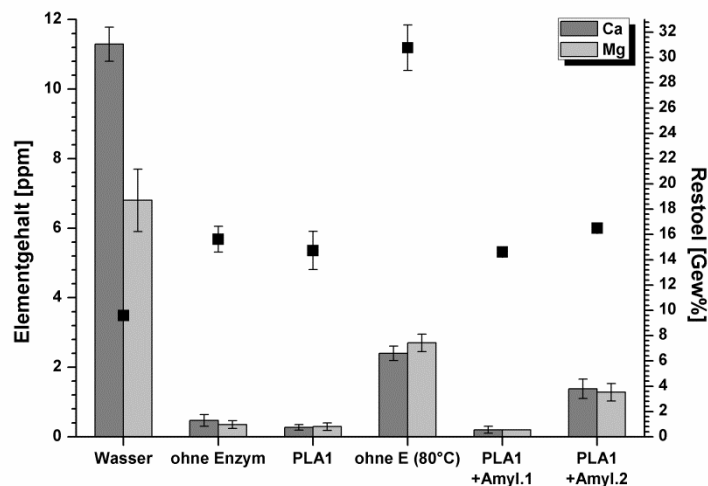
Es werden sechs unterschiedliche Ansätze miteinander verglichen:

- 1) die rein wässrige Entschleimung
- 2) die Entschleimung ohne Enzym (acid refining)
- 3) die enzymatische Entschleimung mit PLA1
- 4) die Entschleimung ohne Enzym (acid refining) bei 80 °C
- 5) die Entschleimung mit PLA1 in Kombination mit der Amylase 1
- 6) die Entschleimung mit PLA1 in Kombination mit der Amylase 2

Zunächst werden die Versuche anhand der bereits oben genutzten Parameter Phosphor- sowie Calcium- und Magnesiumgehalt bewertet. Hierzu sind in Abbildung 4.1.6 die jeweiligen Ergebnisse für alle Versuchsansätze dargestellt. Ein erster Blick auf die Abbildung legt unmittelbar die Heterogenität der Versuchsergebnisse dar. Beim genaueren Studium der Daten entsprechen die meisten Ergebnisse den Erwartungen.



a)



b)

Abbildung 4.1.6: Konzentration der untersuchten Parameter nach Reaktionsende ($t = 45$ Minuten) in Kombination mit den zugehörigen Restölgehalten in der jeweiligen Schleimphase a) Phosphor, b) Calcium und Magnesium.

Mit etwa 22 ppm Phosphor zeigt sich bei der wässrigen Entschleimung das schlechteste Resultat hinsichtlich dessen Abkonzentrierung; selbiges gilt auch für die Spurenelemente. Dies ist ein erwartetes Ergebnis, wenn man sich vor Augen führt, welche Hydratisierbarkeit die einzelnen PL aufweisen. Durch diesen Ansatz kann es ausschließlich gelingen den Großteil der hydratisierbaren PL abzuscheiden, die NHP verbleiben jedoch im Öl, da die von ihnen gebildeten Komplexe mit den Spurenelementen ohne Gegenwart einer hinreichend starken Säure nicht aufgebrochen werden können. Im Falle der Entschleimung ohne Enzym bzw. mit der PLA1 zeigen sich Verhältnisse, wie sie bereits zuvor beschrieben wurden. Beim acid refining ohne Enzym ergibt sich eine Phosphorkonzentration von 2,7 ppm, mit der PLA1 steigt dieser Wert auf 3,1 ppm. Grundsätzlich ergibt sich im enzymatischen Ansatz, ebenso wie in den anfänglichen Untersuchungen, ein höherer Phosphorgehalt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um einen systematischen Zusammenhang handelt. Abweichend zu den bisherigen Daten sind die jetzigen jedoch signifikant größer als zuvor, jedoch darf davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um valide Werte handelt, da sie auf eine größere Stichprobe von bis zu elf Wiederholungen zurückgehen. Die Spurenelemente bewegen sich bei der enzymlosen Entschleimung „acid refining“ in der gleichen Größenordnung wie zuvor, im Zusammenwirken mit der PLA1 zeigen sich nun deutlich reduzierte Werte von lediglich 0,27 (Ca) bzw. 0,29 ppm (Mg). Ein überraschendes Ergebnis wird für die enzymlose Entschleimung bei 80 °C erhalten. Grundsätzlich handelt es sich hierbei auch um eine Form des acid refining, jedoch bei Temperaturen, die bei der sauren Entschleimung durchaus realistisch sind (siehe Abschnitt 2.3). Daher ist es ad hoc nicht nachvollziehbar, warum sich Werte von 18 ppm für Phosphor einstellen bzw. warum sich die Werte bei den Spurenelementen verfünffachen. Die erhöhte Temperatur und den damit einhergehenden Veränderungen im System lässt jedoch eine These zu, die sich aus dem Absinken der Viskosität des Öles, aber auch seiner Oberflächenspannung ergibt. Das Rührwerk arbeitet allerdings weiterhin bei 150 Umin^{-1} . Somit wird weiterhin das gleiche Maß an Energie in das System eingebracht, allerdings dissipiert weniger von dieser bedingt durch die

geringere Viskosität. Zusätzlich bewirkt die abgesunkene Oberflächenspannung und somit auch eine reduzierte Grenzflächenspannung zwischen dem Öl und der wässrigen Phase, dass es leichter wird neue Oberflächen zu bilden. Daher ist die Ausbildung kleinerer Aggregate sehr wahrscheinlich, was dazu führen kann, dass bei unterschreiten eines bestimmten Aggregatdurchmessers, bei der gegebenen Zentrifugendrehzahl, ein Teil der PL nicht abgetrennt wird. Die These könnte durch anpassen der zeitlichen und mechanischen Parameter der Zentrifuge überprüft werden, allerdings soll dies in dieser Arbeit nicht erfolgen, da es vom Kern des Themas wegführt. Zuletzt wird die Aufmerksamkeit auf den kombinierten Einsatz der PLA1 mit jeweils den Amylasen 1 bzw. 2 gerichtet. Anfänglich wurde dargestellt, dass beim Gebrauch der Amylasen ein Qualitätsverlust während der Entschleimung zu verzeichnen ist (vergleiche Abbildung 4.1.1b sowie Tabelle 4.1.1). Die nun vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass durch die Kombination von PLA1 und Amylase 1 ein ebenso gutes Ergebnis erzielt werden kann wie bei der enzymlosen Entschleimung, da die Phosphorkonzentration mit 2,4 ppm leicht unterhalb des obigen Referenzwertes liegt und somit den Minimalwert in dieser Messreihe repräsentiert. Für die Spurenelemente gilt in diesem Fall das gleiche; auch sie bilden das Minimum mit je 0,2 ppm. Die gemeinsame Entschleimung mit PLA1 und der Amylase 2 bestätigt die Resultate wie sie die Stichproben zu Beginn dieses Abschnittes nahe legen. Verglichen mit den ersten Versuchen zeigt sich eine Reduzierung des Phosphorgehaltes von 26 ppm auf nur noch 9,5 ppm, jedoch liegt auch dieser Wert noch weit über den vergleichbaren Ergebnissen der zuvor beschriebenen enzymatischen Ansätze. Eine mögliche Begründung für dieses Verhalten könnte in Analogie zu den Beobachtungen der Entschleimung bei 80 °C zu finden sein. Es ist somit vorstellbar, dass der Aggregatdurchmesser abnimmt und ebenso wie im obigen Fall ein Teil der PL nicht abgetrennt werden kann. Eine mögliche Ursache muss nicht zwangsläufig in einem enzymatischen Mechanismus gesucht werden. Die Amylase 2 wird vom Hersteller in einer Lösung bereitgestellt, deren Zusammensetzung nicht bekannt gegeben wird. Falls in der Lösung jedoch Formen kurzkettiger Alkohole enthalten sind, dann könnte dies in Kombination mit dem Öl und den PL die Ausbildung einer Mikroemulsion begünstigen und so zu den beschriebenen Effekten beitragen [52, S. 253].

In der Abbildung 4.1.6 sind weiterhin die aus der Schleimphase nach Reaktionsende extrahierten Restölgehalte auf der rechten Ordinate dargestellt. Diese streuen für die einzelnen Versuchsansätze in einem Bereich zwischen etwa 10 und 31 Gew%. Im unteren Wertebereich bildet die Wasserentschleimung mit 9,6 Vol% Restölgehalt das Minimum der Messreihe, während die enzymlose Entschleimung bei 80 °C mit 30,8 Vol% das Maximum zeigt. Die übrigen Ergebnisse liegen in aufsteigender Reihenfolge bei Restölgehalten 14,6 Vol% (PLA1 + Amylase 1), 14,7 Vol% (PLA1), 15,6 Vol% (enzymlos) und 16,5 Vol% (PLA1 + Amylase 2). Auffällig in diesem Zusammenhang sind die beiden Extrema, die sich signifikant vom Mittelfeld unterscheiden. Ursächlich hierfür könnte das Phasenverhalten der PL unter bestimmten Umgebungsbedingungen sein [52, S. 252ff]. Nach dem Überschreiten der kritischen Mizellkonzentration durchlaufen die PL unterschiedliche Zustände der räumlichen Organisation, die abhängig von der vorliegenden Konzentration und den Eigenschaften der beteiligten Komponenten sind. Zudem spielt die Temperatur bei der Ausbildung unterschiedlicher Phasenzustände der PL eine wichtige Rolle. Im Falle der Wasserentschleimung unterscheidet sich die

Zusammensetzung der Schleimphase vor allem dadurch, dass diese insbesondere PC und PI enthält, während PA und PE die Fraktion der NHP bilden und in der Ölphase vorliegen. Daher erscheint es nachvollziehbar, dass sich die hydratisierten PL aufgrund ihrer Konzentration und Eigenschaften derart kompakt ausrichten, dass für das Neutralöl nur wenig Möglichkeit besteht, in diesem Verbund eingeschlossen zu werden. Die Zusammenhänge der enzymlosen Entschleimung bei 80 °C scheinen besonders mit der veränderten Reaktionstemperatur, respektive Löslichkeitstemperatur und der veränderten Grenzflächenspannung begründet werden zu können. Für die Zielsetzung der Entschleimung, einer bestmöglichen Trennung der Schleimphase vom Öl, ist die Doppelschicht-Struktur der PL vorteilhaft. Diese Phase liegt eher im unteren Temperaturbereich vor, während die PL mit ansteigender Temperatur in eine kubische Orientierung gelangen, was deren Abtrennung vom Neutralöl erschwert und so einen erhöhten Ölverlust verursacht. Die genauen Phasenmechanismen, die unter Umständen diese Extrema hervorrufen, können an dieser Stelle allerdings nicht näher untersucht werden, da dem Autor die hierzu notwendigen technischen Mittel nicht zur Verfügung stehen. Ungeachtet dieser Umstände bedürfen diese Versuchsansätze keiner weiterführenden Untersuchung, da sie den gesteckten Qualitätsanforderungen an die Ölentschleimung nicht gerecht werden. Die übrigen Messungen liegen deutlich enger beieinander und unterscheiden sich nur marginal voneinander. Der Einsatz der PLA1 bewirkt eine Reduzierung des Neutralölverlustes in der Schleimphase gegenüber der enzymlosen Entschleimung, was in Kombination mit der Amylase 1 noch weiter verbessert werden kann. Hingegen stellt sich die Situation für den kombinierten Ansatz von PLA1 mit Amylase 2, verglichen mit der enzymlosen Entschleimung, im Ergebnis schlechter dar. Wie bereits zuvor kann auch in diesem Fall nicht der Nachweis geführt werden, warum sich die Amylase 2 derart negativ auf die Entschleimung auswirkt.

Neben dem Neutralölverlust in der Schleimphase dient weiterhin der Anteil der Schleimphase als Ganzes, bezogen auf das eingesetzte Rohöl als Maß für die Qualität der Entschleimung. In der Abbildung 2.1.7 ist der Anteil dieser schweren Phase für die sechs untersuchten Ansätze dargestellt. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Schleimphase stets einen Anteil zwischen 0,9 und 1,1 Gew% beträgt. Dieser Wert ermöglicht nur eine fundierte Aussage über die Prozessqualität, wenn gleichzeitig der Phosphorgehalt sowie die Spurenelementkonzentrationen im entschleimten Öl berücksichtigt werden. Denn die Schleimphase setzt sich zusammen aus den hydratisierten PL und dem eingeschlossenen Neutralöl. Somit sind 0,95 Gew% bzw. 0,98 Gew% für die Wasserentschleimung und die Entschleimung bei 80 °C keine Indiz für eine gute Entschleimung, sondern beruhen in beiden Fällen auf einer unzureichenden Abtrennung der PL aus dem Öl.

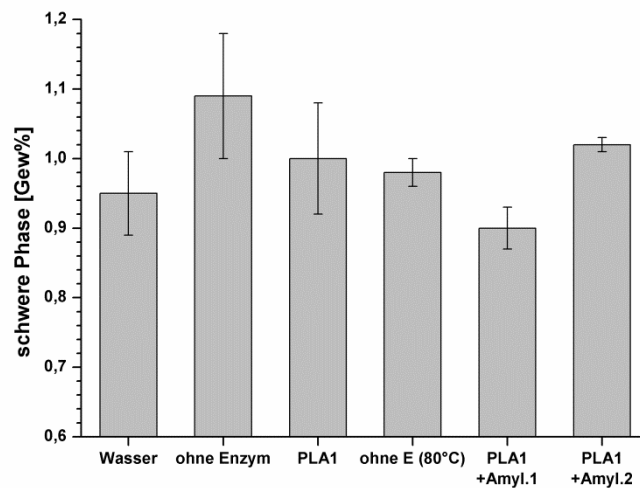


Abbildung 4.1.7: Anteil der Schleimphase nach Reaktionsende.

Die weiteren Ergebnisse ermöglichen hingegen eine qualitative wie auch quantitative Bewertung. Mit 1,09 Gew% ist die schwere Phase im Falle der enzymlosen Entschleimung am größten. Dieser Wert kann durch den Einsatz der Enzyme verringert werden. So ergibt sich nach der Entschleimung mit der PLA1 eine Reduzierung um 9 % auf dann 1,00 Gew%. Durch Kombination mit der Amylase 1 wird unter gleichzeitiger Qualitätssteigerung dieses Ergebnis noch verbessert auf 0,90 Gew%. Die Kombination mit der Amylase 2 (1,02 Gew%) bewirkt hingegen keine weitere Reduzierung im Vergleich zur enzymatischen Entschleimung mit der PLA1.

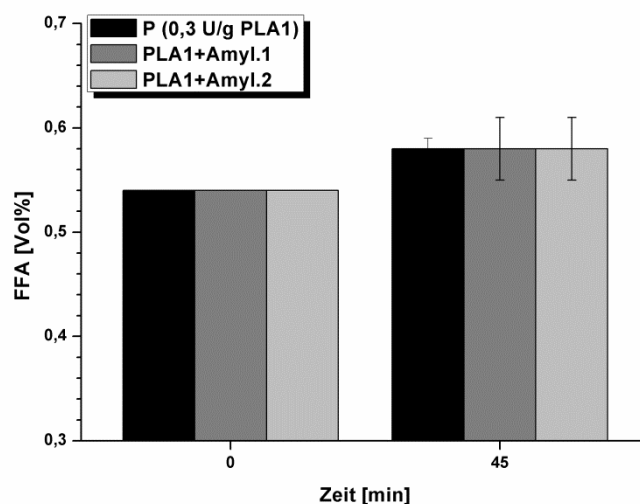


Abbildung 4.1.8: Volumenanteil FFA im Vergleich die Zeitpunkt 0 und 45 Minuten.

Weiterhin wird zur Bewertung der einzelnen Versuche der enzymatischen Entschleimung die Enzymaktivität, repräsentiert durch die freigesetzten FFA, herangezogen. Diese Ergebnisse finden sich in der Abbildung 4.1.8 in graphischer Form wieder. Es geht daraus hervor, dass die PLA1

grundsätzlich unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen aktiv ist, sodass sich die Konzentrationen der FFA signifikant von 0,54 auf 0,58 Vol% erhöhen. Zudem bestätigt sich die anfängliche These nicht, die Gegenwart der Amylasen in der wässrigen Phase würde die Aktivität der PLA1 negativ beeinträchtigen. Vielmehr geht aus den Daten klar hervor, dass die PLA1 unter allen Reaktionsbedingungen gleichermaßen aktiv ist und so ihren Beitrag zur Verfahrensverbesserung leistet.

Resümee:

Die vorliegenden Ergebnisse ermöglichen einige grundsätzliche Aussagen zur Bewertung der unterschiedlichen Versuchsansätze hinsichtlich der Prozessqualität, aber auch bezüglich des mit der Entschleimung einhergehenden Ölverlustes. In diesem Zusammenhang soll nicht weiter auf die Wasserentschleimung sowie die enzymlose Entschleimung bei 80 °C eingegangen werden, da zu diesen Versuchen schon hinlänglich ausgeführt wurde inwiefern die Qualität des entschleimten Öles einen späteren technischen Einsatz ausschließt. Insbesondere die Zusammenhänge zwischen der enzymlosen Entschleimung, dem Einsatz der PLA1 und der kombinierten Entschleimung von PLA1 und Amylase 1 zeigen mögliche Potentiale auf, die eine weitergehende Untersuchung rechtfertigen. Es ist gelungen, durch einen enzymatischen Ansatz mit der PLA1 die Qualität des entschleimten Öles zu bewahren und gleichzeitig sowohl den Anteil der Schleimphase als Ganze zu senken als auch die Masse des im Schleim eingeschlossenen Neutralöles zu reduzieren. Aus der Kombination dieser beiden Effekte kann der reale Ölverlust durch die Entschleimung mit der PLA1 von 0,17 Gew% (ohne Enzym) auf 0,15 Gew% verringert werden. Die oben geschilderten Resultate beim kombinierten Einsatz von PLA1 und der Amylase 1 kulminieren zu einem Gesamtölverlust von lediglich 0,13 Gew%. Für den gleichen Ansatz mit der Amylase 2 liegt der Ölverlust mit 0,16 Gew% oberhalb des Vergleichswertes mit der PLA1 und zur gleichen Zeit verringert sich die Qualität des entschleimten Öles. Auf mögliche Gründe hierfür wurde oben bereits eingegangen.

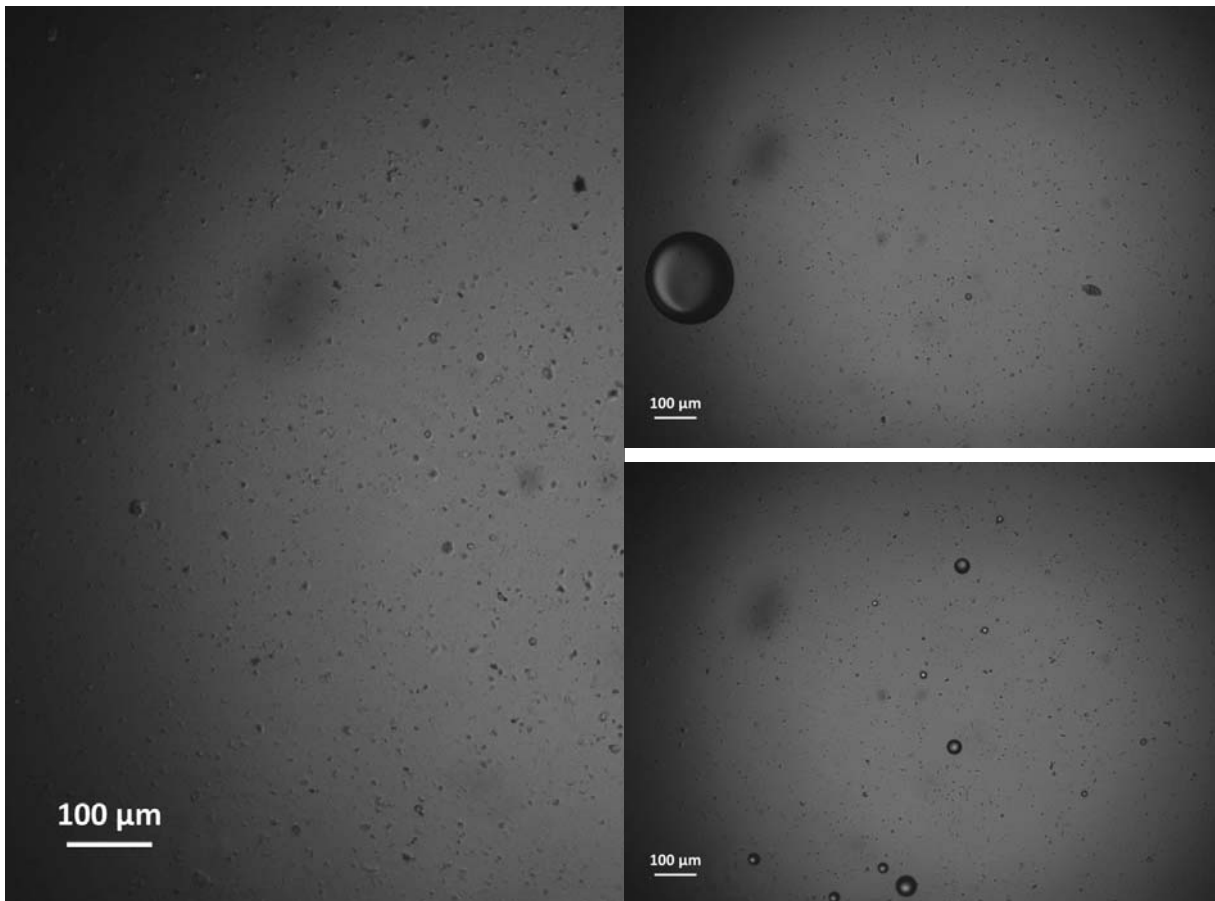
Die Ursachen für die verbesserte Prozessqualität beim Einsatz der Enzyme muss in der ausgebildeten Schleimphase gesucht werden. Wie dargestellt, ist die PLA1 in allen Fällen gleichermaßen aktiv, sodass sie stets einen adäquaten Beitrag leistet. Dieser besteht im Wesentlichen darin, die erste Fettsäure der PL zu hydrolysieren und so die hydrophilen Eigenschaften der PL zu begünstigen. Dadurch gelingt es, die Wasserlöslichkeit dieser Verbindungen zu verbessern. Hierdurch verändern sich die räumlichen Bedingungen an der Grenzschicht zur Ölphase, weswegen weniger Öl in diesem Bereich eingeschlossen wird. Inwiefern es zu einem Phasenwechsel bei den PL kommt, kann mit den gegebenen Möglichkeiten nicht nachvollzogen werden. Der zusätzliche Einsatz der Amylase 1 wirkt sich weiterhin vorteilhaft auf die Entschleimung aus. Amylasen spalten Polysaccharide in kleinere Einheiten. Der Abbau dieser langen Moleküle scheint die Orientierung innerhalb der Schleimphase dahingehend zu verbessern, dass eine kompaktere Aggregation möglich wird, was den Öleinschluss maßgeblich verringert.

4.2 Charakterisierung der Vorgänge während der Entschleimung

Zur Charakterisierung der Abläufe in der Emulsion wird das *In-situ*-Videomikroskop eingesetzt. Unterstützende Untersuchungen erfolgen durch Messung der Grenzflächenspannung zwischen der wässrigen Phase und dem Öl.

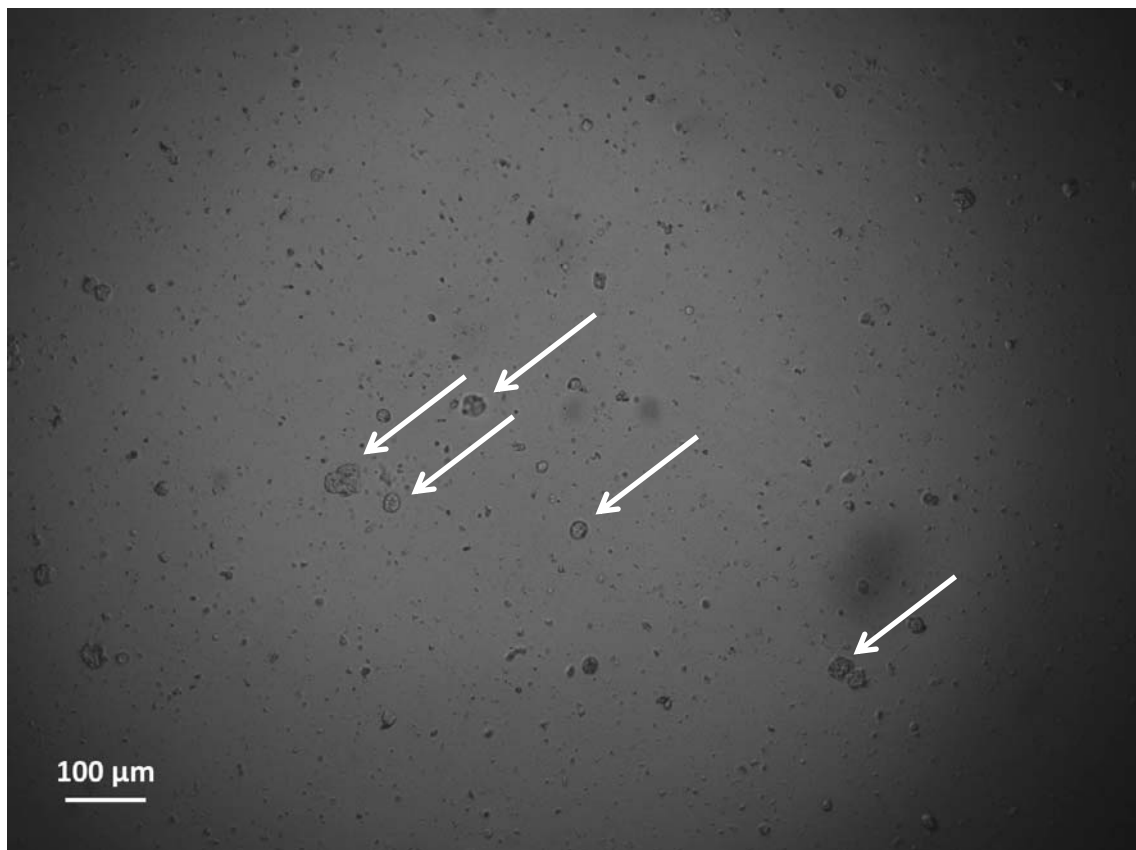
Bereits im unbehandelten Rohöl lassen sich fein dispergierte Formationen identifizieren, die durch die im Öl unlöslichen Bestandteile gebildet werden. Diese Strukturen stellen die Primärstruktur für die später ausgebildete Schleimphase dar. Die Formen der natürlichen Verunreinigungen und Begleitsubstanzen sind vielfältig, orientieren sich jedoch an runden Aggregaten, sodass sich eine minimale Oberfläche zum Öl ergibt. Inwiefern es sich um mizellare oder komplexere Strukturen handelt, ist mit den gegebenen Mitteln nicht aufzuklären. Die Abbildung 4.2.1a gibt einen charakteristischen Eindruck der Verhältnisse im eingesetzten Rohöl wieder. Nach der erfolgten Erwärmung des Öls wird die Zitronensäure hinzudosiert. Deren Tropfen zeichnen sich in den Aufnahmen scharf vor dem Öl ab (Abbildung 4.2.1b). Die Größe der einzelnen Tropfen variiert kurz nach der Zugabe stark, allerdings gleichen sich diese Unterschiede mit voranschreitender Reaktion aus. Die Tropfen bleiben insgesamt aber um Dimensionen größer als die Primärstrukturen des Schleims. Nach wenigen Augenblicken im Reaktionsgemisch wandeln die Tropfen ihr Erscheinungsbild schlagartig (Abbildung 4.2.1c). Sind sie zunächst dunkel abgesetzt und leicht vom Öl zu unterscheiden, so wirken die Ränder nunmehr wesentlich schmäler und die optischen Eigenschaften haben sich insgesamt verändert. Es ist zu erkennen, dass sich an die Tropfen erste Primärelemente anlagern und bei genauerer Betrachtung fallen auch in ihrem Inneren erste Strukturen auf, die dort eingelagert werden. Trotz der Veränderungen sind die Tropfen noch klar als eigenständige Phase identifizierbar und grenzen sich gegen das Öl ab. Dieses Stadium wird im Weiteren als sekundäre Struktur bezeichnet.

Die Sekundärstrukturen liegen nach der Zugabe der Natronlauge parallel zu den neu hinzugekommenen Tropfen vor (Abbildung 4.2.1d Nummer 1 und 2). Es zeigen sich hier wieder die Eigenschaften noch nicht interagierender Grenzflächen. Gleichzeitig durchlaufen erste Sekundärtropfen bereits eine Wachstumsphase (Nr. 3), was einerseits ihr Volumen um mehrere Größenordnungen ansteigen lässt. Andererseits nimmt die Komplexität der inneren Strukturen ebenfalls zu. Die voll ausgebildeten sekundären Tropfen sind zudem bereits in der Lage sich an freie Tropfen sowie an andere Sekundärtropfen anzulagern (Abbildung 4.2.1d Nr. 3 unterer linker Bereich).

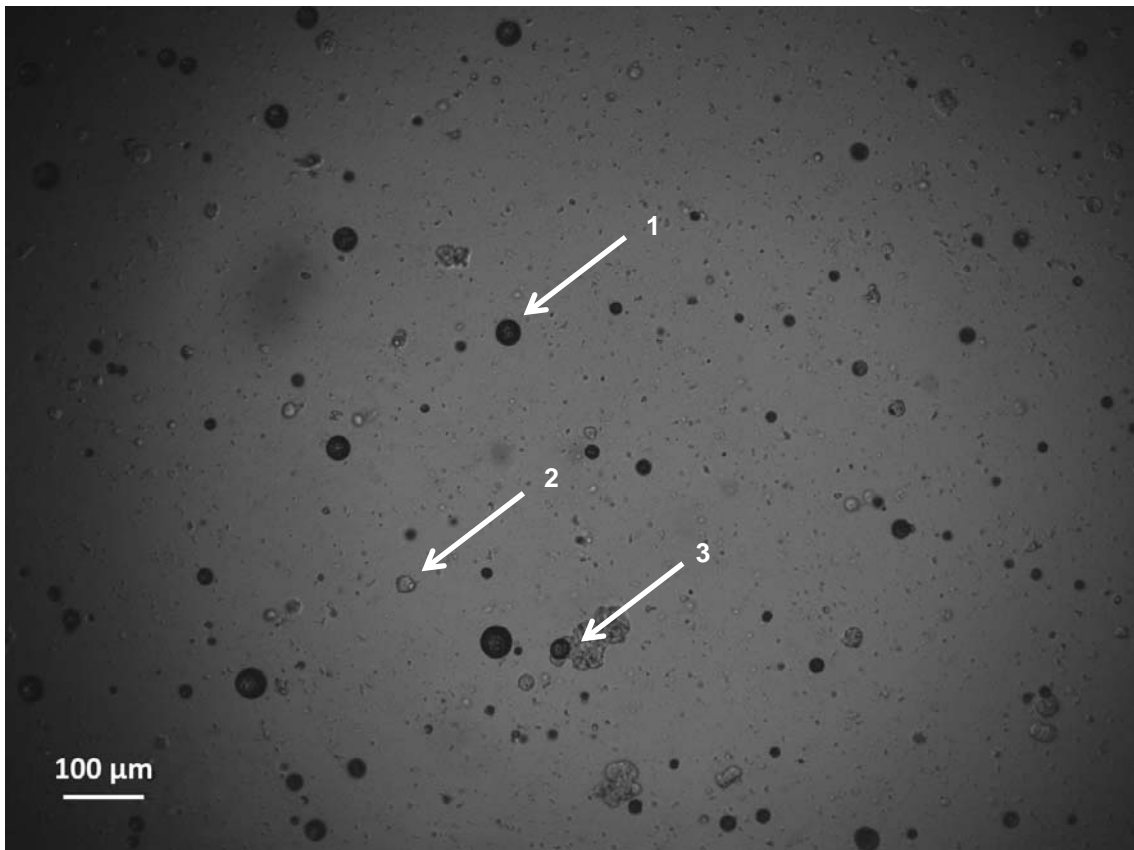


a) Unbehandeltes Rohöl bei 80 °C.

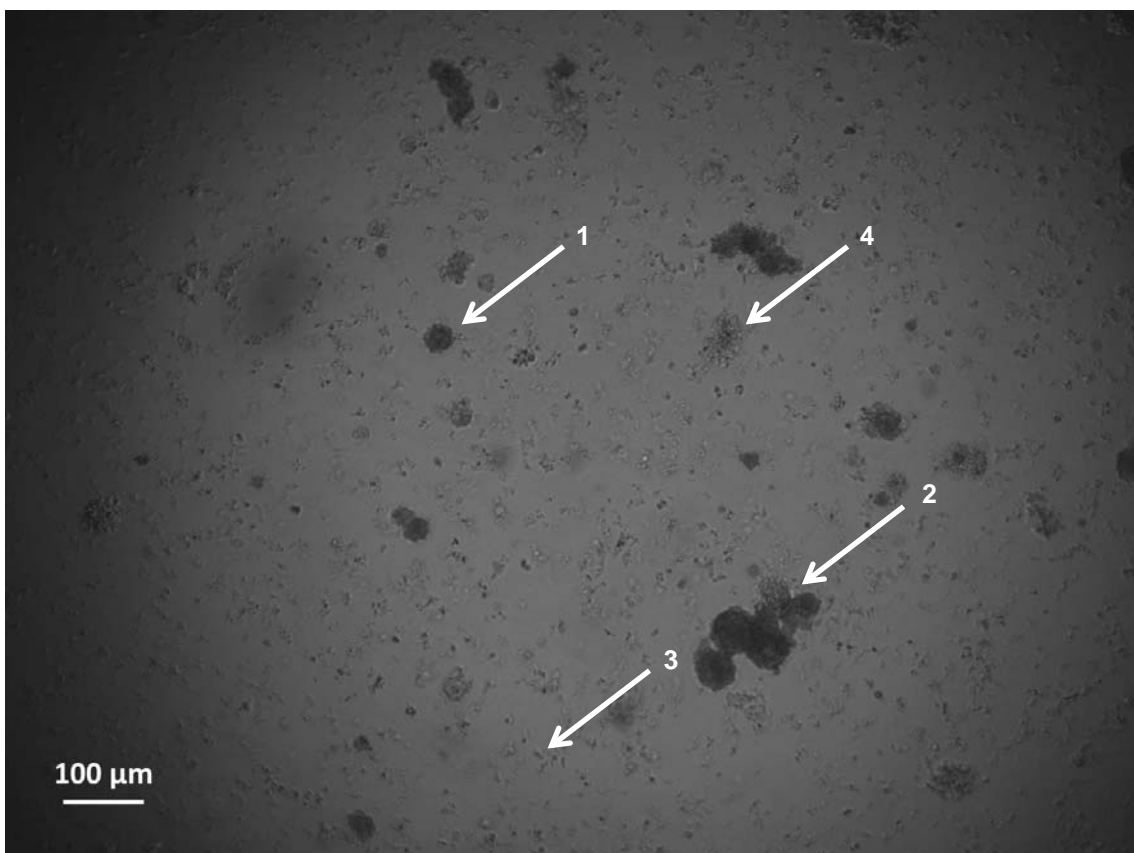
b) Nach der Säuredosierung bei 80 °C.



c) Nach etwa 15 Minuten saurer Konditionierung bei 80 °C.



d) Nach der Zugabe von 4 M Natronlauge, Abkühlung auf 48 °C.



e) Nach etwa 10 Minuten Neutralisation bei 48 °C.

Abbildung 4.2.1: *In-situ*-mikroskopische Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten vom unbehandelten Rohöl bis zur Neutralisation.

Gegen Ende der Neutralisation können im Gemisch lediglich Sekundärstrukturen erkannt werden, freie Tropfen sind nicht mehr vorhanden (Abbildung 4.2.1e). Teilweise ist das Wachstum der Sekundärtropfen bereits abgeschlossen, und sie zeigen eine maximale innere Struktur (Nr. 1). Ferner bauen sich durch Aggregation mehrerer Sekundäreinheiten tertiäre Strukturen auf, die vielgestaltige Formen annehmen (Nr. 2), gemeinsam sind jedoch allen die erkennbaren Umrisse des ursprünglichen Tropfens. In diesem Prozessschritt können zwei weitere Entwicklungen beobachtet werden. Die Primärstrukturen beginnen sich räumlich neu zu orientieren und bilden eher längliche/stäbchenförmige, weniger runde Formen aus (Nr. 3), die die Grundlage für eine weitere Vernetzung zu bilden scheinen. Als Resultat dieser verstärkten Orientierung ergeben sich netzartige Elemente, die mehr oder weniger konzentrisch nach außen zu wachsen scheinen (Nr. 4). Es ist schwer zu beurteilen inwiefern diesem Gebilde im Inneren ein Mikrotropfen zugrunde liegt, jedoch erscheint eine solche Annahme plausibel. Ein Grund für die veränderte Primärstruktur könnte in dem erhöhten pH-Wert liegen, der es ermöglicht auch die bisher nicht hydratisierbaren PL an die wässrige Phase zu binden.

Bevor im Folgenden die weiteren Schritte der Entschleimung vorgestellt werden, erfolgt zunächst die Erörterung der Ergebnisse zur Untersuchung der Grenzflächenspannung zwischen dem Öl und der wässrigen Phase. Durchgeführt werden die Versuche für die rein wässrige Phase aus Zitronensäure und Natronlauge wie sie bei der sauren Entschleimung vorliegt, sowie unter Zugabe von PLA1. Als Temperatur wird in Anlehnung an die realen Versuchsbedingungen 48 °C gewählt. Abbildung 4.2.2 zeigt den Einfluss unterschiedlicher wässriger Phasen auf die Bedingungen an der Grenzfläche.

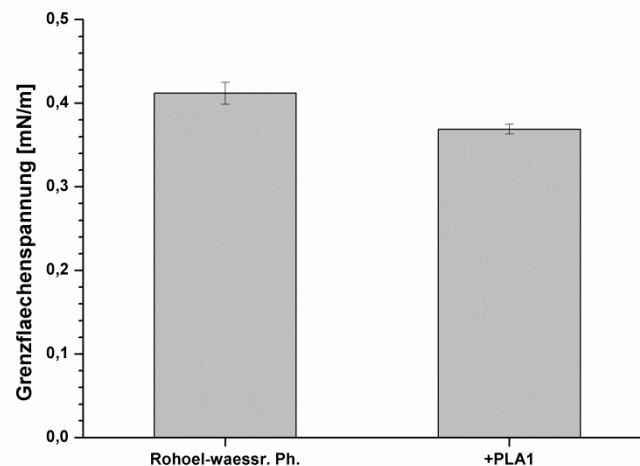


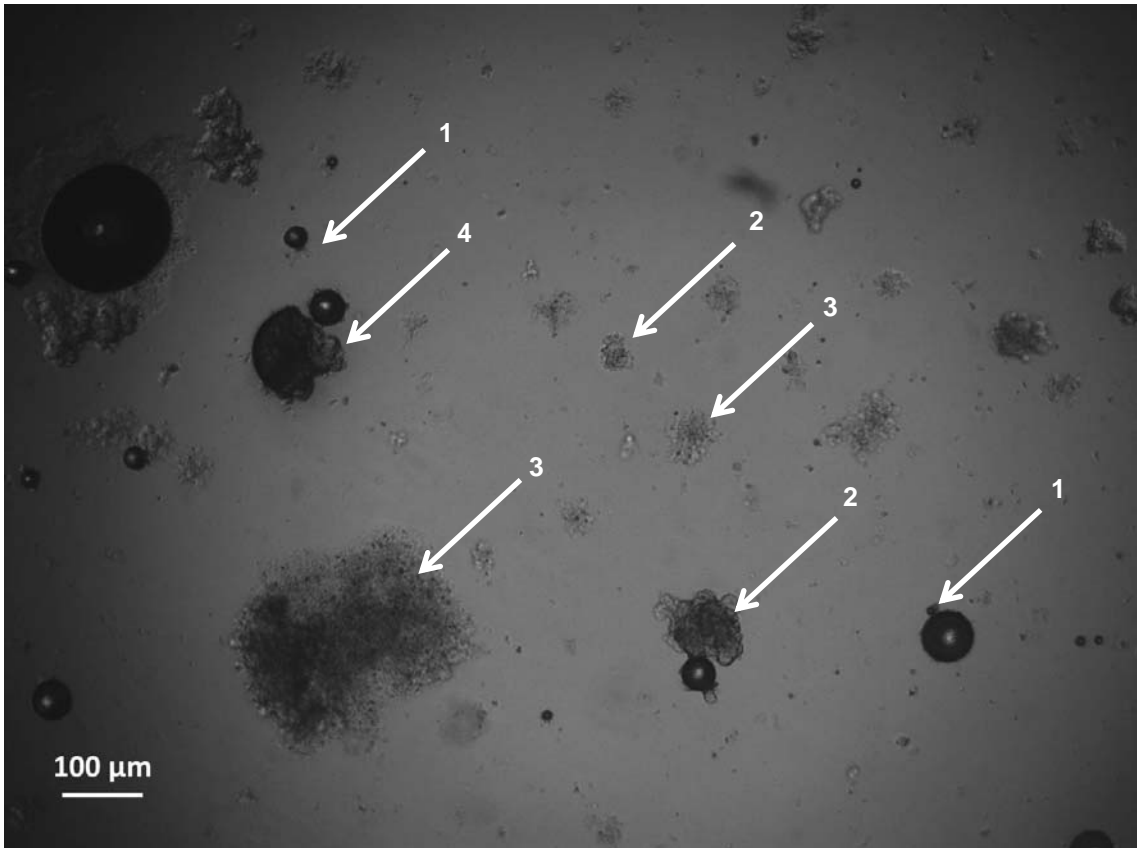
Abbildung 4.2.2: Grenzflächenspannungen Öl/wässrige Phase bei Variation der wässrigen Phase.

Aufgetragen sind in der Abbildung 4.2.2 die Grenzflächenspannungen zwischen dem Rohöl und einerseits der wässrigen Phase, bestehend aus Zitronensäure und Natronlauge entsprechend dem Verhältnis, wie sie realen Versuch zum Einsatz kommen und der wässrigen Phase mit Enzymzusatz. Es zeigt sich, dass durch die Zugabe der PLA1 die Grenzflächenspannung von 0,41 mN/m auf 0,37 mN/m gesenkt wird. Dies entspricht einer Reduktion von etwa 10 %. Legt man den Beobachtungen

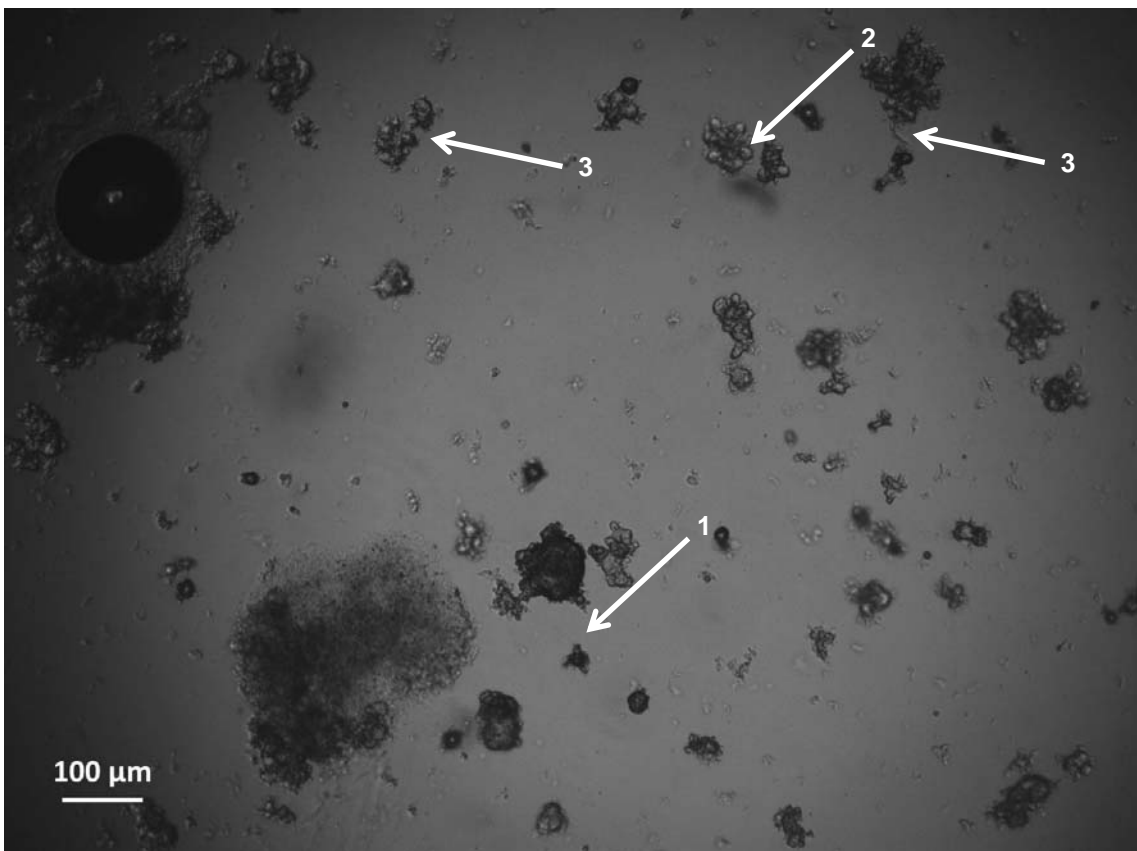
den Wirkmechanismus der PLA1 zugrunde, so ergibt sich eine Erklärung aus der Oberflächenaktivität des Enzyms. Die PLA1 richtet sich mit dem i-face an der Grenzfläche aus und bringt hierdurch neue Komponenten in die Grenzschicht, sodass die Grenzflächenspannung analog zur Zugabe weiterer Tenside abgesenkt wird (vergleiche Abschnitt 2.5).

a) Saure Entschleimung

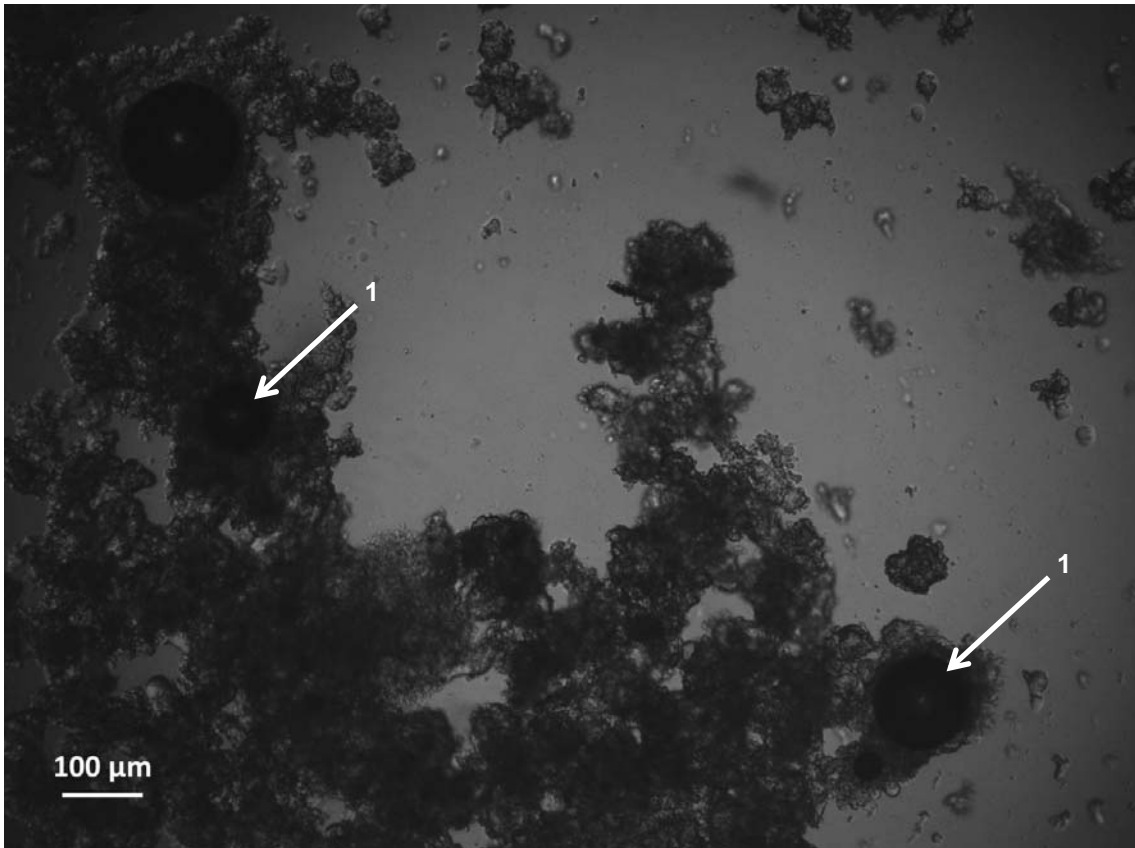
Wird zu dem vorkonditionierten und neutralisierten Öl vollständige wässrige Phase hinzugefügt, lassen sich die gleichen Strukturen wie in den vorhergehenden Prozessschritten nachweisen. Es zeigen sich Wassertropfen unterschiedlicher Größe, an die sich teilweise bereits Primärelemente anlagern (Abbildung 4.2.3a Nr. 1). Ebenso erscheinen sekundäre Tropfen in verschiedenen Stadien (Nr. 2) sowie Vernetzungen in unterschiedlichen Wachstumsphasen (Nr. 3). Nr. 4 zeigt einen Wassertropfen, der durch ähnlich große Sekundärtropfen maßgeblich deformiert wird. Mit zunehmender Reaktionszeit verschwinden die Vernetzungen und wandeln sich zu solideren Aggregaten, die von Sekundärformen nicht länger zu unterscheiden sind (Abbildung 4.2.3.b). Darüber hinaus kann hier der Mechanismus der Aggregation zu größeren tertiären Komplexen beobachtet werden. Dem Wachstum liegen vollausgebildete Sekundärtropfen zugrunde. Um ein zentrales Element ordnen sich weitere kleinere oder gleich große Tropfen an. Handelt es sich um kleinere Tropfen, so führt dies zu Dendriten ähnlichem Wachstum, wie es von der Kristallisation bekannt ist (Nr. 1). Gleich große Tropfen ordnen sich eher unkoordiniert an (Nr. 2). Begünstigt wird diese Aggregation durch eine Vernetzung der Sekundärtropfen über die an ihnen angelagerten primären Strukturen (Nr. 3). Durch diesen Mechanismus sind die Aggregate in ihrer Größe nicht limitiert. Lediglich die durch das Rührwerk eingebrachte Energie kann dieses Wachstum durch Turbulenzen in der Strömung begrenzen. An Stellen abweichender Strömungsverhältnisse, wie z.B. im Messspalt des *In-situ*-Mikroskops, besteht die Möglichkeit für derartige „Megaaggregate“ zu existieren (Abbildung 4.2.3c). Diese großen räumlichen Strukturen mit lokal schwankender Dichte bieten zahlreichen Platz für Einschlüsse und erklären den erhöhten Ölverlust bei der sauren Entschleimung. Erstaunlich an diesem Versuch ist die Erkenntnis, dass nicht sämtliche Wassertropfen an der Entschleimung beteiligt sind, sondern teilweise nur vom Schleim umhüllt werden (Nr. 1). Es ist nicht auszuschließen, dass ihre Größe eine mögliche Ursache hierfür ist.



a) Nach der Zugabe des Restwassers bei 48 °C.



b) Im Verlauf der sauren Entschleimung bei 48 °C.

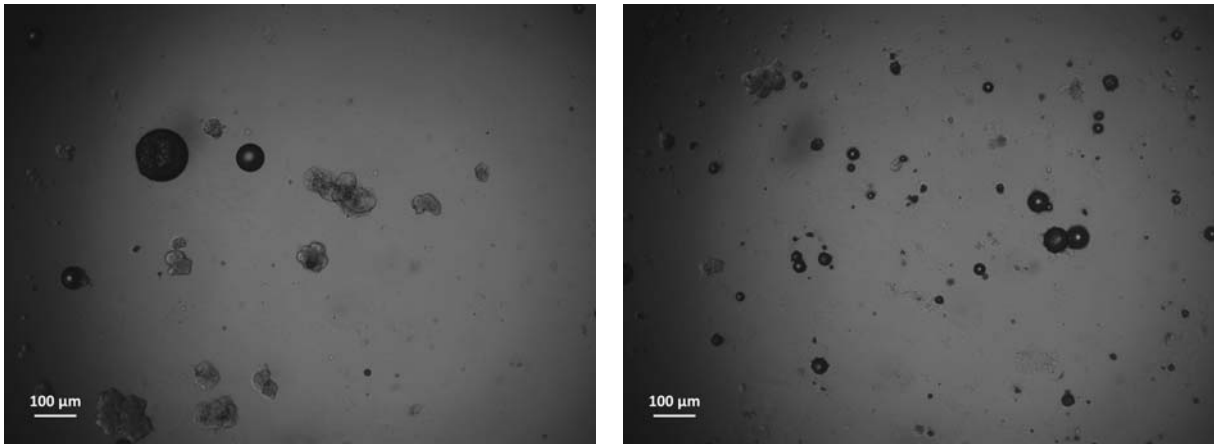


c) Nach 45 Minuten saurer Entschleimung bei 48 °C.

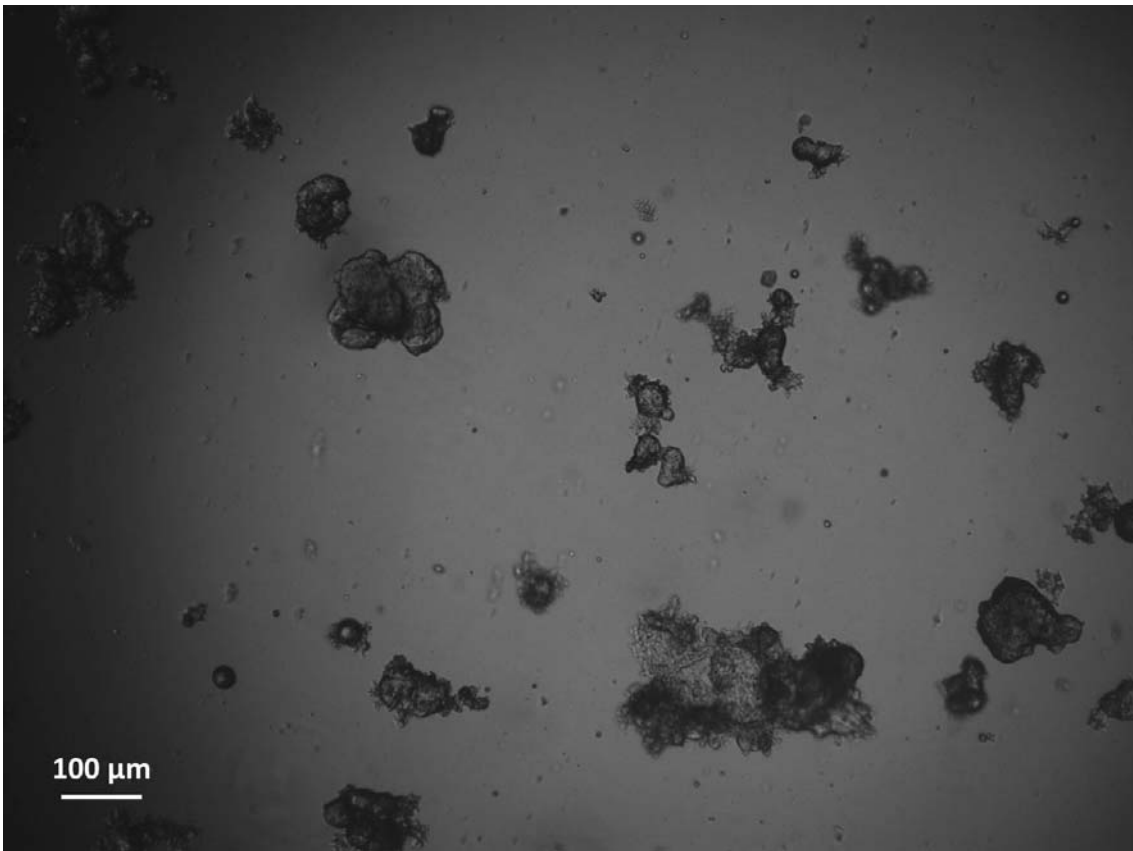
Abbildung 4.2.3: *In-situ*-mikroskopische Aufnahmen der sauren Entschleimung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe des restlichen Wassers.

b) Enzymatische Entschleimung

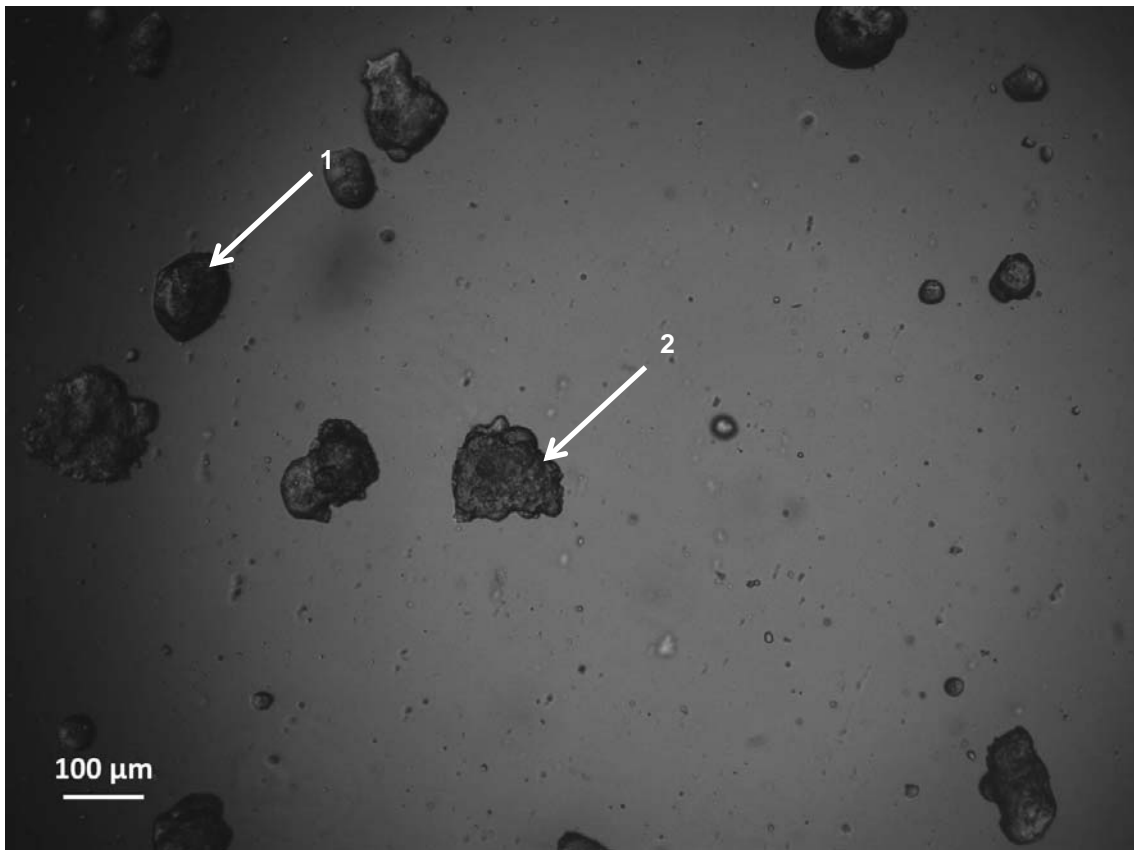
Zu Beginn der enzymatischen Entschleimung treten, wie bereits zuvor gezeigt, die gleichen Strukturen im Gemisch auf. Allerdings verringert sich die Größe der Wassertropfen zügig im Laufe der Reaktionszeit, sodass deutlich mehr und kleinere Tropfen vorliegen, als dies in den vorhergehenden Untersuchungen der Fall ist (Abbildung 4.2.4a). Ebenso wie bei der sauren Entschleimung bilden sich tertiäre Formen nach dem beschriebenen Wachstumsmechanismus aus (Abbildung 4.2.4b). Jedoch verhartet das System nicht bei den tertiären Komplexen, sondern diese vereinigen sich durch Koaleszenz zu klar abgegrenzten großen Tropfen, an deren Oberfläche sich kaum Spuren primärer Schleimpartikel zeigen (Abbildung 4.2.4c). Hinsichtlich der Formen können zwei Grundtypen unterschieden werden. Einerseits lassen sich runde bis eierförmige Partikel identifizieren (Nr. 1), auf der anderen Seite sind auch Aggregate mit unregelmäßiger Kontur vorhanden (Nr. 2). Bei genauerer Betrachtung lassen sich im Inneren weitere runde bzw. tropfenförmige Elemente ausmachen (Nr. 1 und 2). Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei um Mikrotropfen handelt, die bei der Vereinigung passiv eingeschlossen, aber nicht im Gesamtvolumen integriert werden und im Inneren fortbestehen. Somit belegt diese Aufnahme die Ausbildung einer Öl/Wasser/Öl-Emulsion im System.



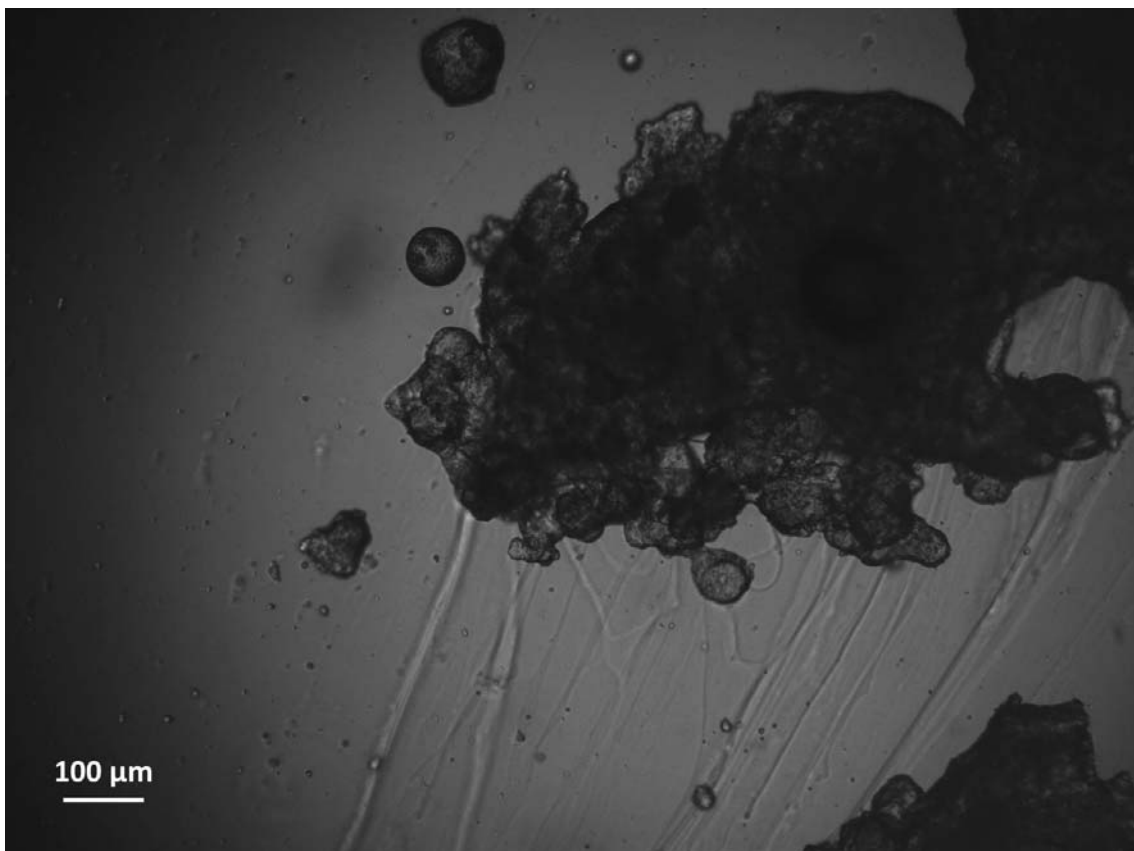
a) Zwei Zeitpunkte unmittelbar nach Zugabe der wässrigen Phase bei 48 °C.



b) Wachstumsphase während der enzymatischen Entschleimung bei 48 °.



c) Im Verlauf der enzymatischen Entschleimung bei 48 °C.



d) Nach 45 Minuten enzymatischer Entschleimung bei 48 °C.

Abbildung 4.2.4: *In-situ*-mikroskopische Aufnahmen der enzymatischen Entschleimung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe der restlichen wässrigen Phase.

In fluiddynamischen „Ruhezonen“ mit geringer Wirkung von Scherkräften, wie dem Messspalt, können sich auch aus diesen Partikeln große und komplexe Strukturen bilden (Abbildung 4.2.4d). Ursache sind sicherlich v.a. die unregelmäßig geformten Partikel, in denen sich dann auch die runden Vertreter verfangen. Dennoch wirken auch diese Strukturen deutlich kompakter als jene bei rein saurer Entschleimung (vergleiche Abbildung 4.2.3c), somit ist ein geringerer Öleinschluss die logische Konsequenz.

Resümee:

In diesem Abschnitt kann mit Hilfe der *In-situ*-Videomikroskopie die schrittweise Ausbildung der Schleimaggregate an der zugeführten wässrigen Phase nachvollzogen werden. Wie sich gezeigt hat, handelt es sich bei der Aggregation um einen kinetisch kontrollierten Vorgang, insbesondere im Hinblick auf die Kompaktheit bzw. Dichte der Partikel. Die qualitative Auswertung der videomikroskopischen Aufnahmen scheinen die erarbeiteten Thesen des Abschnitts 4.1 zur verbesserten enzymatischen Prozessführung zu untermauern. Es zeigt sich, dass der Einsatz der PLA1 im System tatsächlich die Kompaktheit der Schleimphase steigert, sodass der Öleinschluss in dieser signifikant reduziert werden kann. Somit hat die *In-situ*-Videomikroskopie einen wertvollen Beitrag zum besseren Verständnis der Zusammenhänge während der Ölentuschleimung geleistet.

4.3 Enzym-Peptid-Modifikationen

Die Modifikation der PLA1 mit den Peptiden Test1 und SA2 erfolgt mit dem Ziel die Grenzflächeneigenschaften des Enzyms dahingehend zu verändern, dass durch Konjugation mit diesen die Enzymoberfläche einen erhöhten Anteil an hydrophoben Wechselwirkungen zeigt, um so die Ausrichtung der PLA 1 in Richtung der Ölphase zu verbessern. Ziel dieser optimierten Ausrichtung ist die Steigerung der Enzymaktivität durch eine Verbesserung des Zugangs des Substrates (PL) zum aktiven Zentrum des Enzyms. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Beginnend mit der Analyse der Enzymaktivität der Enzym-Peptidkomplexe wird schrittweise die Optimierung des Systems hinsichtlich der Puffer dargelegt und abschließend die Daten der angepassten Ölentuschleimung vorgestellt.

a) Enzymaktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität wird, wie in Kapitel 3 beschrieben, mit Hilfe einer photometrischen Methode in 2-mL-Küvetten durchgeführt. Diese Daten sind notwendig, um die konjugierte PLA1 mit den Ergebnissen des nicht modifizierten Enzyms vergleichen zu können. Zu Beginn erfolgt eine Kalibrierung des Systems mit para-Nitrophenol (pNP) im Reaktionspuffergemisch im relevanten Absorptionsbereich von 0,01 M bis 2,0 M. In Abbildung 4.3.1 wird diese Kalibrierung graphisch dargestellt, indem die ermittelte Extinktion, bereinigt um die Blindwerte, über der Produktkonzentration aufgetragen wird. Es zeigt sich eine Proportionalität und die hohe Qualität der gewählten Methode.

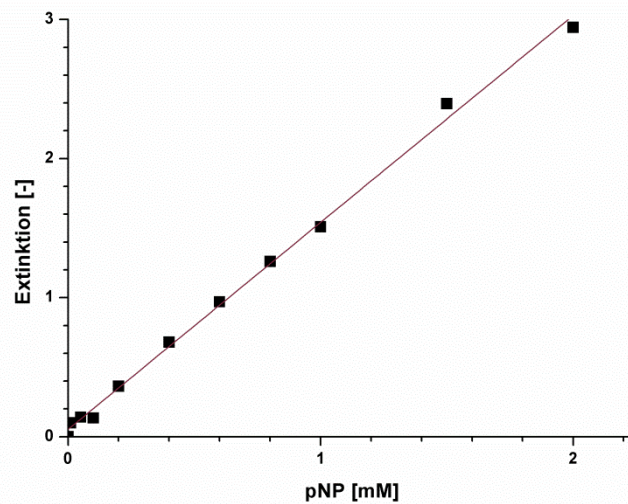
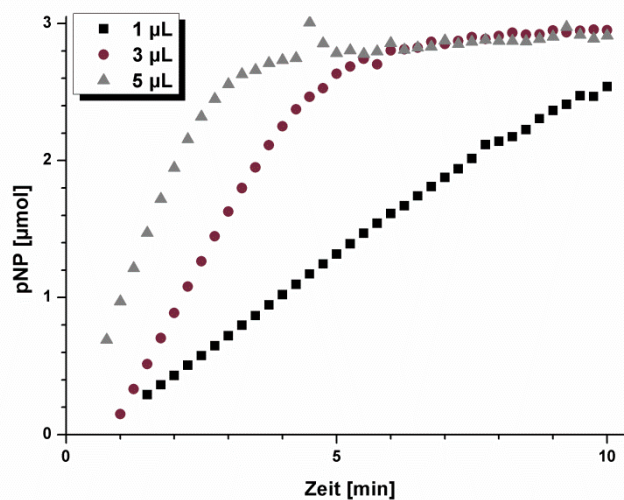


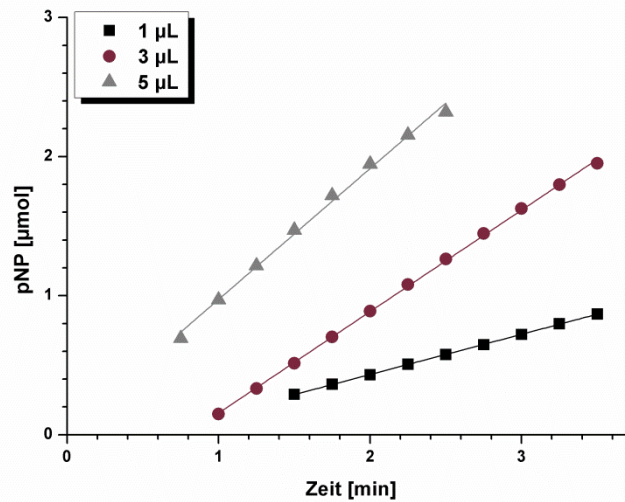
Abbildung 4.3.1: Kalibrierung: Extinktion über die Konzentration von pNP.

Die Größenordnung der Aktivität der unbehandelten PLA1 ist zunächst unbekannt. Die genaue Bestimmung erfordert einen Bereich des linearen Anstiegs der Produktkonzentration. Daher ist es zu vermeiden sowohl Inhomogenitäten nach dem Reaktionsstart als auch den Bereich der Produktsättigung zu berücksichtigen. Durch diesen Ansatz ist das Abweichen vom Protokoll erklärlich, das eigentlich eine Inkubation über 20 Minuten bei 35 °C vorsieht, um dann die gesamte Reaktionsspanne zu untersuchen. Durch die *in situ* Messung in der Küvette kann der Reaktionsfortschritt im zeitlichen Verlauf dokumentiert und folglich zielorientierter ausgewertet werden.

Die Bestimmung der Aktivität der PLA1 erfolgt mit drei unterschiedlichen Enzymmengen (1 μ L, 3 μ L, 5 μ L) jeweils als Doppelbestimmung. Die Abbildung 4.3.2a zeigt die Kinetik der Produktherstellung.



a)



b)

Abbildung 4.3.2: Nicht modifizierte PLA1; a) Konzentrations-Zeit-Verlauf der pNP-Umsetzung für drei Enzymmengen, b) linearer Bereich der Verläufe aus a) mit eingefügter Ausgleichskurve.

Einhergehend mit der steigenden Enzymmenge sieht man einen stärkeren Anstieg der Konzentration, was einer schnelleren Produktbildung entspricht. Dies gibt das erwartete Verhalten wieder. Entscheidend für die weiteren Schritte ist die Erkenntnis, dass für 1 µL Enzym erst nach 90 s ein zuverlässiger Messwert ermittelt werden kann, da zuvor die Produktkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Ferner kann für 3 µL und 5 µL Enzym das Erreichen der Produktsättigung und somit das Ende der Reaktion nach etwa 350s bzw. 200 s abgelesen werden. Zur Ermittlung der Aktivität wird daher für alle Enzymmengen ein linearer Bereich definiert. Eine Vergrößerung dieses Bereiches erkennt man in Abbildung 4.3.2b. Durch lineare Ausgleichskurven bestätigt sich, dass ein geeigneter Bereich für die Aktivitätsbestimmung gewählt ist (R^2 0,999 für 1 bzw. 3 µL). Für 5 µL Enzym zeichnet sich die beginnende Sättigung bereits leicht ab (R^2 0,995). Die volumenspezifische Aktivität ergibt sich unter Beachtung der eingesetzten Enzymmenge. Die Tabelle 4.3.1 stellt diese Daten dar. Alle ermittelten Enzymaktivitäten liegen in der gleichen Größenordnung und sind daher plausibel. Die geringfügigen Unterschiede ergeben sich im Rahmen der Messgenauigkeit. Denkbare Einflussgrößen sind unter anderem etwaige Mischungsercheinungen sowie die Absorptionseigenschaften der Proteinlösung, in der die PLA1 bereitgestellt wird. Ferner kann eine beginnende Proteininhibierung in Form von Enzym-Enzym-Wechselwirkungen die Umsatzgeschwindigkeit verringern (vergleiche Tabelle 4.3.1 a-c).

Tabelle 4.3.1: Aktivitätsdaten PLA1 bei variiertem Enzymvolumen und Enzymmodifikationen.

Enzym	Zeitspanne [s]	Δ pNP [µmol]	Aktivität [U]	Spez. Aktivität [U/mL]
a) 1µL	45 – 150	0,58	0,289	289
b) 3µL	90 – 210	1,44	0,725	242
c) 5µL	90 – 210	1,63	0,941	188
Kontrolle	40 – 180	1,561	0,693	231
PLA1 / SA2	40 – 180	1,325	0,575	191
PLA1 / Test1	40 – 180	1,428	0,638	213

Ergebnisse und Diskussion

Der Aktivitätstest für die Konjugate geschieht nach dem gleichen Protokoll mit einem Volumen von 3 μL der Enzymlösung. Parallel wird eine Kontrollmessung mit 3 μL PLA1 durchgeführt. Die Ergebnisse sind der Abbildung 4.3.3 zu entnehmen, und Tabelle 4.3.1 enthält in der unteren Hälfte die sich ergebenden Werte für die Aktivitäten.

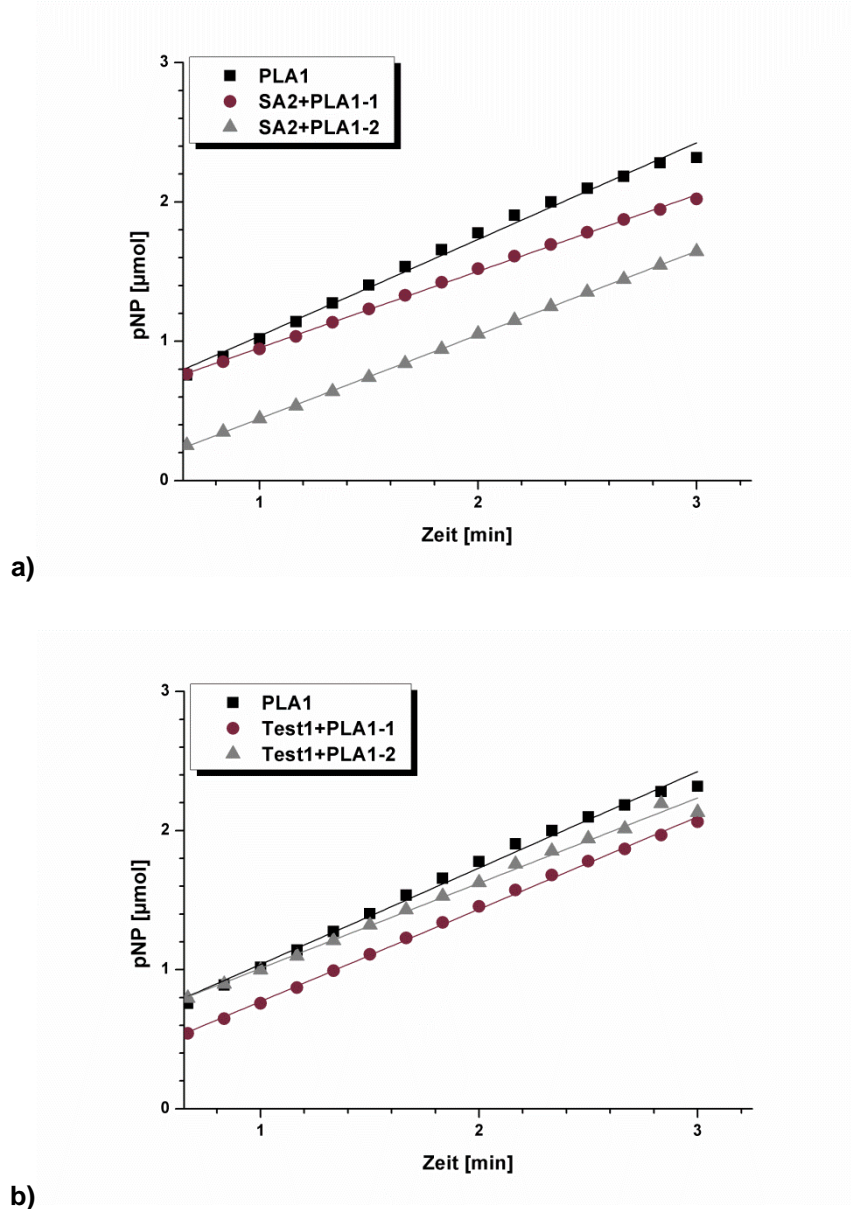


Abbildung 4.3.3: Modifizierte PLA1 (die Indizes -1 bzw. -2 repräsentieren die Messungen 1 und 2): a) linearer Bereich der Konzentrations-Zeit-Verläufe der Modifikationen mit SA2, b) linearer Bereich der Konzentrations-Zeit-Verläufe der Modifikationen mit Test1.

In der graphischen Darstellung des Bereichs zwischen 40 und 180 s ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität der Konjugate bei gleichem Enzymvolumen geringer ausfällt als jene des nicht behandelten Enzyms. Zudem zeigt sich für die SA2-Konjugate eine etwas größere Streuung der Werte, was sich allerdings kaum auf die Aktivitätswerte auswirkt. Im Gegensatz dazu liegen die Messungen bei Test1 näher beieinander, jedoch ergeben sich stärkere Abweichungen zwischen den Aktivitäten. Im Mittel ist die Aktivität der Test1-Konjugate um etwa 8 % und für die SA2-Konjugate um 17 % geringer als jene der nicht modifizierten PLA1. Derartige Abweichungen können sich ergeben, da die

Proteinkonzentration in der kommerziellen PLA1-Enzymlösung (10.000 U/mL) sich von jenen der hergestellten Konjugatlösungen unterscheiden. Zudem unterscheiden sich die Pufferlösungen, in denen die unterschiedlichen Proteine bereitgestellt werden, was zwangsläufig die Absorption im System beeinflusst. Es gilt nun für die weiteren Versuche jene Enzymmengen zu bestimmen, die geeignet sind, Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Ansätzen herzustellen. Ausgangspunkt hierfür ist die bekannte Aktivität der PLA1 bezüglich pNPP (231 U/mL) sowie das Standardvolumen der PLA1 für die tatsächlichen Entschleimungsversuche, das eine Proteininhibierung vermeidet. Es wird ein PLA1-Volumen von 13,5 μ L eingesetzt. Diese Enzymmenge entspricht einer Aktivität von 3,12 U. Um nun für die Entschleimung mit den Konjugaten eine ebenso große Aktivität einzusetzen, ergeben sich Volumina von 16,3 μ L (SA2) bzw. 14,7 μ L (Test1).

b) Oberflächenspannung

Das Ziel der Untersuchungen besteht in der Ermittlung der Oberflächenspannung unterschiedlicher Peptidlösungen bei variierendem pH-Wert und Peptidkonzentrationen. Hierdurch kann im Voraus das Puffersystem, in dem die Enzymkonjugate eingesetzt werden sollen, ermittelt werden. Wesentliche Kriterien bei der Auswahl eines Puffers bestehen in der Notwendigkeit der Lebensmittelkompatibilität. Außerdem darf die Enzymaktivität möglichst nicht reduziert werden und die Aggregation der Peptide ist zu verhindern. Als Richtwert zur Zielerreichung dient die Minimierung der Oberflächenspannung, da sie ein Maß für die aufzuwendende Kraft ist, die benötigt wird, um neue Oberflächen zu bilden. Ein vergrößerte Ober- bzw. Grenzfläche bietet die Gelegenheit für einen verbesserten Stoffübergang und sollte die Entschleimung somit verbessern. Bei den Versuchen sollen neben den Enzym-Peptid-Konjugaten auch Kombinate aus der nicht modifizierten PLA1 mit den freien Peptiden sowie Kombinationen der Konjugate mit den freien Peptiden erprobt werden. Da beide Peptide nicht ohne weiteres in Wasser löslich sind, ergibt sich die Notwendigkeit, die Peptide in einem von der bisherigen wässrigen Phase abweichenden Puffersystem einzusetzen. Im ersten Schritt werden sie daher in einem kleinen Volumen 50 mM TrisHCl-Puffer bei pH 8 gelöst, bevor dieses im untersuchten Puffer verdünnt wird. Als Puffer werden 50 mM MES- (pH 6) und 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 8) eingesetzt. Die gewählten Peptidkonzentrationen liegen sowohl unterhalb (0,4 μ g/mL) als auch oberhalb der kritischen Aggregationskonzentration (CMC) (4, 50, 100 μ g/mL) [60, S. 2756]. Die Ergebnisse der Versuche werden in Abbildung 4.3.4 sowie in Tabelle 4.3.2 aufgeführt. Es erfolgt ein Vergleich dieser Daten mit den Oberflächenspannungen des reinen Puffers.

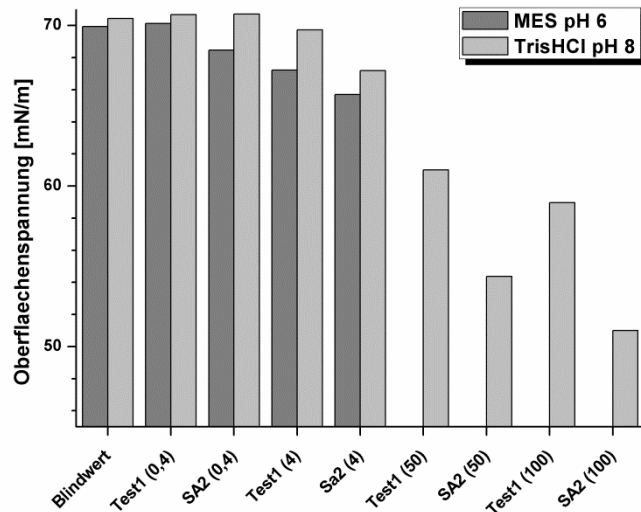


Abbildung 4.3.4: Oberflächenspannungen beim Einsatz des MES-Puffers bei pH 6 sowie des TrisHCl-Puffers bei pH 8, unterschiedlichen Peptidkonzentrationen, bei 25 °C.

Konzentrationen kleiner der CMC führen zu keiner nennenswerten Reduktion der Oberflächenspannung, unabhängig von Puffer und Peptid. Einzig für SA2 in MES ergibt sich eine relevante Absenkung unterhalb des Blindwertes. Inwiefern dieses Verhalten realistisch ist, lässt sich anhand der Natur des Peptides nur schwer erklären, da für pH 6 nicht klar ist in welcher Form es vorliegt (Monomer oder Vesikel). Eine Erhöhung der Konzentration über die CMC hinaus auf 4 µg/mL führt zur signifikanten Reduktion der Oberflächenspannung, wobei diese für SA2 stets größer ausfällt als für Test1. Hinsichtlich des Puffers zeigen sich beim MES-Puffer (pH 6) geringere Oberflächenspannungen, allerdings kann dieser wegen der ungeklärten Phase der Peptide dennoch nicht weiter untersucht werden.

Tabelle 4.3.2: Daten zur Oberflächenspannung bei Variation des Puffersystems und der Peptidkonzentration.

Peptid	Konzentration [µg/mL]	MES pH 6 [mN/m]	TrisHCl pH 8 [mN/m]
Ohne	0	69,942	70,4
	0,4	68,467	70,7
SA2	4	65,696	67,2
	50	-	54,4
	100	-	51,0
Test1	0,4	70,131	70,7
	4	67,227	69,7
	50	-	61,0
	100	-	59,0

Bei deutlicherer Steigerung der Peptidkonzentration auf 50 bzw. 100 µg/mL sinken die Oberflächenspannungen weiter ab und erreichen ihr Minimum für SA2 bei etwa 51,0 mN/m. Dieses Verhalten lässt sich mit einer Analogie zu den Tensiden erklären. Beim Überschreiten von CMC bilden

sich einerseits die genannten Vesikel aus, andererseits ist es sehr wahrscheinlich, dass sich ein Anteil der Peptide als Schicht an der Oberfläche ausrichtet, wie dies auch Tenside tun (Abbildung 4.3.5).

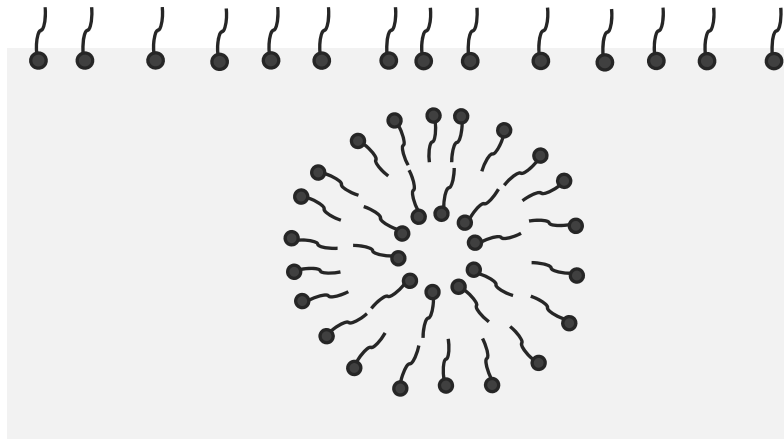


Abbildung 4.3.5: Ausrichtung von oberflächenaktiven Substanzen bei Überschreiten von CMC in Form einer flexiblen Doppelschicht als Vesikel.

Aufbauend auf diesen Vorüberlegungen werden der TrisHCl-Puffer (pH 8) und eine Konzentration der freien Peptide von 100 µg/mL für die folgenden Entschleimungsversuche ausgewählt, da diese unter den gegebenen Bedingungen die größten Erfolgsaussichten für eine Verbesserung bei der Ölentuschleimung versprechen.

c) Ölentuschleimung

Die Versuche zur Entschleimung in Verbindung mit den Enzym-Peptid-Konjugaten erfolgen grundsätzlich nach dem gleichen Protokoll wie alle zuvor beschriebenen Entschleimungsversuche. Als einzige Abwandlung sind die Enzyme bzw. Peptide nicht in Wasser, sondern in einem entsprechenden Volumen TrisHCl-Puffer (pH 8) gelöst. Die Analyse der Proben geschieht unter Berücksichtigung der gleichen Parameter wie zuvor.

Es werden acht unterschiedliche Versuchsansätze eingestellt:

- 1) Einsatz ausschließlich des TrisHCl-Puffers (TrisHCl)
- 2) Nicht modifizierte PLA1 in TrisHCl-Puffer (PLA1)
- 3) Nicht modifizierte PLA1 und 100 µg/mL Test1 in TrisHCl-Puffer (PLA1 Test1)
- 4) Nicht modifizierte PLA1 und 100 µg/mL SA2 in TrisHCl-Puffer (PLA1 SA2)
- 5) PLA1 modifiziert mit Test1 in TrisHCl-Puffer (PLA1 mod Test1)
- 6) PLA1 modifiziert mit SA2 in TrisHCl-Puffer (PLA1 mod SA2)
- 7) PLA1 modifiziert mit Test1 und 100 µg/mL Test1 in TrisHCl-Puffer (PLA1mod + Test1)
- 8) PLA1 modifiziert mit SA2 und 100 µg/mL SA2 in TrisHCl-Puffer (PLA1mod + SA2)

Zunächst fällt das Hauptaugenmerk auf den Einfluss der Modifikationen für die Enzymaktivität, bevor die Auswirkungen auf die eigentliche Entschleimung näher beleuchtet werden. Als Referenz zur Bewertung der Aktivität der Konjugate gilt jene der nicht modifizierten PLA1 in der wässrigen Phase

(Abbildung 4.3.6 Balken 9). Für derartige Versuche steigert sich der Gehalt der FFA von 0,54 Vol% auf 0,58 Vol%. In der Abbildung 4.3.6 sind die Ergebnisse aufgetragen.

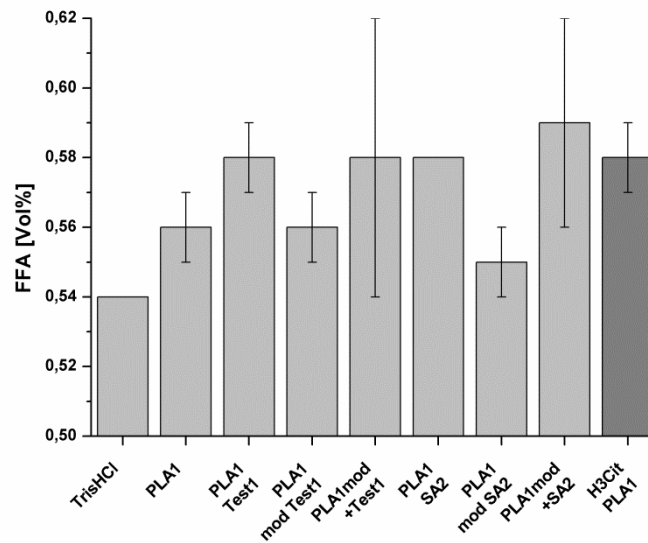


Abbildung 4.3.6: Gehalt der FFA im entschleimten Sonnenblumenöl nach dem Einsatz verschiedener Kombinationen der wässrigen Phase.

Beim Vergleich der FFA-Gehalte ist erkennbar, dass keiner der Ansätze eine signifikante Steigerung der FFA-Konzentration bewirken kann, denn der Referenzwert wird überhaupt nur einmal überschritten (Balken 8) und diese Beobachtung relativiert sich durch die hohe Streuung für diesen Ansatz. Verglichen mit Balken 9 zeigt die nicht modifizierte PLA1 eine auf 0,56 Vol% reduzierte FFA-Ausbeute im eingesetzten Puffer. Eine solche Verringerung kann in diesem Fall nur auf den veränderten pH-Wert (pH 4,2) zurückzuführen sein, da hier keine weitere Änderung der Versuchsbedingungen des Protokolls im Vergleich zur enzymatischen Entschleimung (Balken 9) vorliegt. Unter Berücksichtigung des pH-Optimums der PLA1 von pH 4 erscheint dies plausibel, da sich im Versuch keine Enzyminaktivierung sondern lediglich eine Verringerung FFA-Produktion zeigt. Auch die Enzym-Peptid-Konjugate erweisen sich als weniger aktiv. Die Modifikation mit Test1 (Balken 5) bewegt sich auf dem gleichen Niveau wie die freie PLA1 (Ballken 2). Die Modifikation mit dem zweiten Peptid (Balken 6) scheint darüber hinaus eine noch stärker reduzierte Aktivität zu besitzen, die auch unter Beachtung der gleich großen Streuung für alle drei Fälle signifikant ausfällt. Eine mögliche Erklärung dieser zusätzlichen Reduzierung könnte in der Struktur des Konjugats liegen.

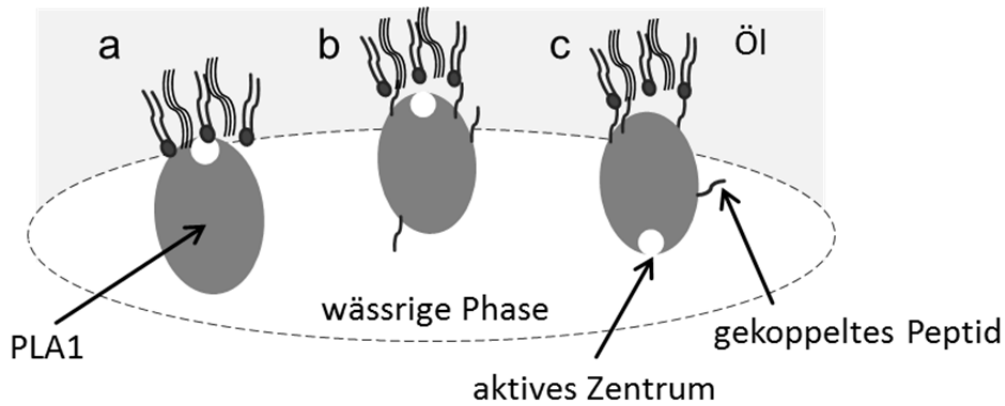


Abbildung 4.3.7: Modellansatz zur Verbesserung der Enzymaktivität mit Hilfe gekoppelter Peptide.

Der einzige Unterschied in der Aminosäureabfolge bei den Peptiden Test1 und SA2 ist die zweite Aminosäure am C-terminalen Ende (vergleiche hierzu Abschnitt 3.2.4). Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um Asparaginsäure (Test1) und Glutaminsäure (SA2), die sich lediglich in ihrer aliphatischen Kohlenwasserstoffkettenlänge um ein Ethylgruppe voneinander unterscheiden. Die Ausbildung der Konjugate erfolgt rein stochastisch durch Anbindung des aktivierten C-terminalen Endes der Peptide an den freien Aminogruppen auf der Enzymoberfläche. Der Belegungsgrad der Peptide sowie deren räumliche Ausrichtung sind daher nicht bekannt. Je nach Anzahl und Verteilung der angebotenen Peptide ist es vorstellbar, dass sich die Ausrichtung des Konjugates an der Grenzfläche verändert. Als Referenz dient hierbei das unmodifizierte PLA1-Molekül in der Abbildung 4.3.7a. Einerseits könnte das Ziel der Konjugation, nämlich die verbesserte Ausrichtung des aktiven Zentrums in Richtung des Substrates, erreicht werden (Abbildung 4.3.7 b). Andererseits gebietet die Wahrscheinlichkeit ebenso die Möglichkeit einer gegenteiligen Ausrichtung des aktiven Zentrums, weg von der Grenzfläche (Abbildung 4.3.7c). Die Ursache liegt in beiden Fällen in der Wirkung der Peptide durch die Verstärkung der hydrophoben Eigenschaften. Diese beiden Extreme sowie alle entsprechenden Zwischenformen liegen höchstwahrscheinlich gleichmäßig verteilt vor. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der Peptide lässt sich daher die sehr unterschiedliche Aktivität zwischen den Peptiden Tes1 (Asparaginsäure) und SA2 (Glutaminsäure) so nur bedingt erklären.

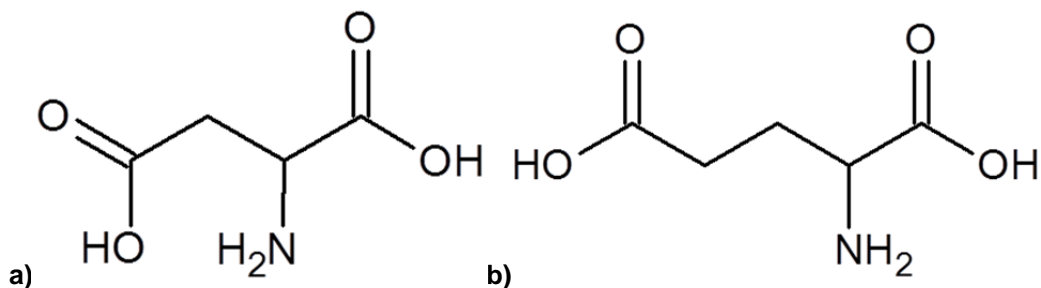


Abbildung 4.3.8: Strukturformeln der relevanten Aminosäuren: a) Asparaginsäure, b) Glutaminsäure.

Ein Ansatz, der die Peptidstruktur besser berücksichtigt, würde sich im Bereich um das aktive Zentrum abspielen. Durch die Anbindung von Peptiden am aktiven Zentrum könnte einerseits die Hydrophobizität dieser Region erhöht und so dessen Ausrichtung an der Grenzfläche verbessert

werden. Andererseits wirken sich derartige Modifikationen auch auf die Sterik im betroffenen Bereich aus. Je nach der Ausrichtung der Peptide kann dies den Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum erschweren, was zu einer Verminderung der Enzymaktivität führen könnte. Für diesen Fall ergibt sich eine Begründung für die Beobachtungen im Falle des SA2-Konjugates. Durch die leicht verlängerte Seitenkette der Glutaminsäure ist es durchaus plausibel, dass dies den Zutritt zum aktiven Zentrum verschlechtert.

Durch die Zugabe der freien Peptide sowohl zur nicht modifizierten PLA1 (Balken 3, 4) als auch zu den Konjugaten (Balken 7, 8) gelingt es die Konzentration der FFA auf das Referenzniveau zu erhöhen. Dieses Ergebnis ist nicht auf eine Erhöhung der Enzymaktivität zurückzuführen, da sich die Bedingungen für die Enzymstruktur nicht verändern. Vielmehr ist dies Ausdruck eines verbesserten Stofftransportes an der Grenzfläche. Die oberflächenaktiven freien Peptiden bewirken eine Absenkung der Grenzflächenspannung und damit einhergehend die Bildung einer größeren Grenzfläche aufgrund kleinerer Partikel. Dies erscheint in Analogie zu den Charakterisierungen der enzymatischen Entschleimung in Abschnitt 4.2 eine plausible Schlussfolgerung.

Zur Bewertung der Güte der Entschleimung werden erneut die Phosphorkonzentration sowie die Menge an Restöl in der Schleimphase als Indikatoren herangezogen. In der Abbildung 4.3.9 erfolgt die graphische Darstellung dieser Ergebnisse.

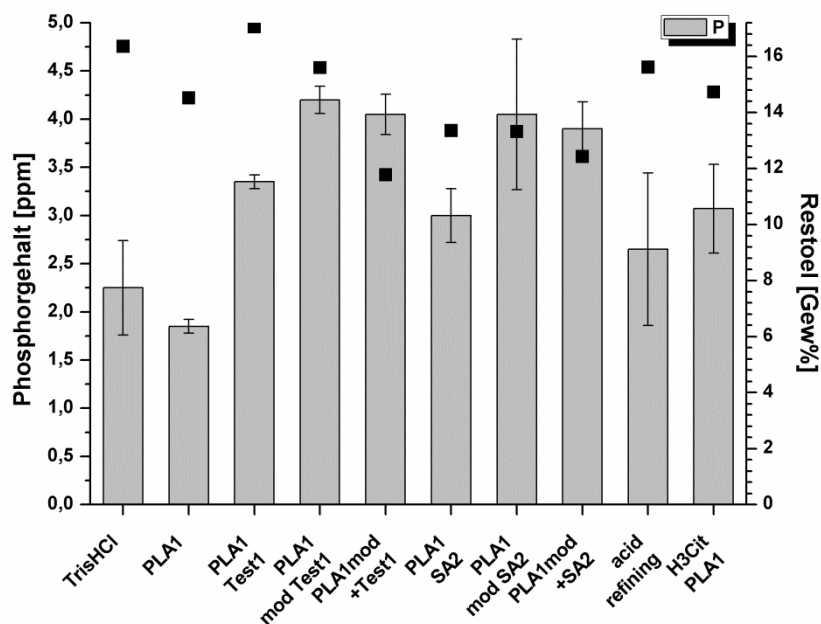


Abbildung 4.3.9: Ergebnisse der Entschleimung in Verbindung mit den Enzym-Peptid-Konjugaten, Phosphorkonzentration und Restöl im Schleim, b) Spurenelemente.

Der Abbildung 4.3.9 sind die Phosphorgehalte auf der linken Ordinate zu entnehmen, die sich für die acht Versuchsansätze ergeben. Zudem werden diese in Bezug gesetzt zum Anteil des verbleibenden Öls in der Schleimphase (rechte Ordinate). Bei der Entschleimung mit dem TrisHCl-Puffer (Spalte 1) liegt die Phosphorkonzentration mit 2,25 ppm leicht unterhalb des Vergleichswertes für das acid refining (Spalte 9 = 2,65 ppm), der Restölgehalt befindet sich hingegen mit 16,36 Gew% leicht über

der Referenz (15,62 Gew%). Berücksichtigt man zudem den Streubereich beider Messergebnisse, so erkennt man, dass sich die Werte nicht signifikant unterscheiden. Hierbei handelt es sich um eine plausible Schlussfolgerung, da die Veränderung der wässrigen Phase durch die Zugabe von 50 mM TrisHCl, im Vergleich zum Gesamtvolumen dieser Phase, verhältnismäßig gering ausfällt. Somit ist es nicht überraschend, dass sich beim Einsatz der nicht modifizierten PLA1 im selben Puffer bereits bekannte Verhältnisse einstellen. Analog zur PLA1 in der wässrigen Phase (Spalte 10) verringert sich der Restölanteil in Gegenwart des TrisHCl-Puffers um etwa 2 Gew% auf 14,52 Gew%. Die Phosphorkonzentration erniedrigt sich hingegen durchschnittlich um 0,40 ppm auf nur noch 1,85 ppm, was im Gegensatz zur Konzentrationssteigerung beim Referenzversuch (Spalte 10) steht. Das Hinzufügen von freien Peptiden bewirkt in beiden Fällen den Anstieg der Phosphorkonzentration um etwa ein Drittel (Spalten 3, 6). Die Beobachtungen hinsichtlich des Ölverlustes unterscheiden sich grundsätzlich voneinander. Während für das Peptid SA2 (Glutaminsäure, Spalte 6) eine Verringerung dieses Verlustes um 1 Gew% gegenüber der PLA1 (Spalte 2) verzeichnet wird, erhöht sich der gleiche Wert beim Test1 (Asparaginsäure, Spalte 3) um etwa ebendiese Differenz. Das ist eine durchweg unerwartete Erscheinung, sollte der Einsatz derart ähnlicher Peptide doch zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Offenbar wirkt die zusätzliche Methylgruppe am Aminosäurerest der Glutaminsäure gegenüber der Asparaginsäure deutlich hydrophobisierend, sodass sich die Schleimphase einfacher abtrennen lässt. Prinzipiell erlaubt der Ansatz die Vermutung, dass sich durch das Einbringen von oberflächenaktiven Substanzen die Grenzflächenspannung reduziert, was die Ausbildung neuer Oberflächen begünstigt. In der Konsequenz wäre eine vermehrte Anzahl kleinerer Partikel im System präsent, sodass durch das Unterschreiten einer bestimmten Aggregatgröße die Zentrifugation dieser Schleimfraktion nicht länger möglich ist. Somit sollte die Phosphorkonzentration ansteigen, der Restölgehalt jedoch, bedingt durch eine dichtere Packung, sinken. Sämtliche Ansätze, in denen das Enzym als Konjugat eingebracht wird (Spalten 4, 5, 7, 8), zeigen hinsichtlich des Phosphors ein sehr ähnliches Verhalten. Verglichen mit den vorhergehenden Applikationen steigt dessen Konzentration im entschleimten Öl an, und erreichte im Durchschnitt 4 ppm. Der Anteil des Restöles nimmt mit zunehmender Anzahl der Peptide im System weiter ab, und erreicht im Falle der PLA1 modifiziert mit dem Test1 sowie freiem Test1 ein Minimum von 11,8 Gew%. Dieses Ergebnis stellt im Vergleich zur Referenz von 14,7 Gew% im Falle der enzymatischen Entschleimung (Spalte 10) eine signifikante Verbesserung der Prozessgüte dar.

Neben dem Restölgehalt als Verlust in der Schleimphase, ermöglicht auch die Gesamtheit der Schleimphase qualitative Aussagen über den Prozess. In der Abbildung 4.3.10a ist der Massenanteil der schweren Phase als Gesamtverlust des Prozesses dargestellt. Verglichen werden die Ergebnisse für alle acht Versuchsansätze.

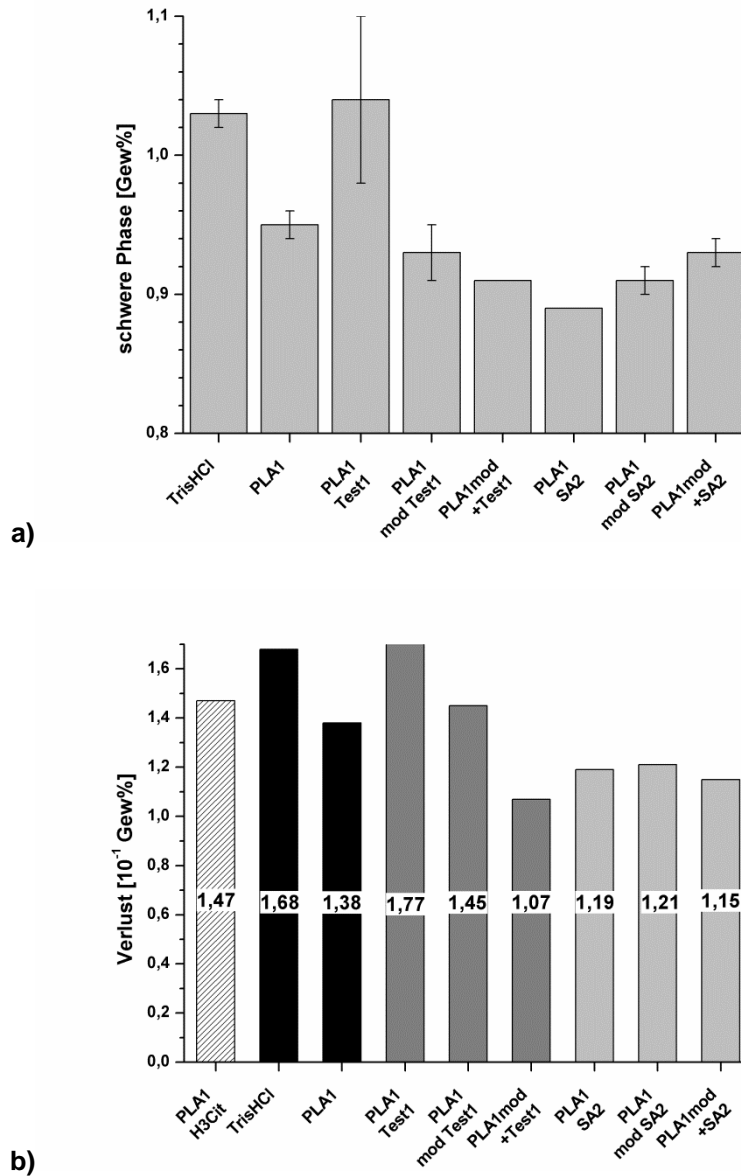


Abbildung 4.3.10: Kategorien ermittelter Verluste der Entschleimung a) Massenteil der Schleimphase, b) Gesamtölverlust.

Der Ansatz ohne Enzym (Balken 1) zeigt in dieser Versuchsreihe mit 1,03 Gew% einen vergleichsweise hohen Wert, verglichen mit den übrigen Ergebnissen, die im Durchschnitt kleiner als 0,95 Gew% ausfallen. Einzig der Wert für den konjugierten Einsatz der PLA1 mit dem Peptid Test1 (Balken 3) schränkt diese Aussage ein. Doch berücksichtigt man dessen große Streuung im Vergleich zu den verhältnismäßig genauen übrigen Messungen, so könnte hier ein Ausreißer vorliegen. Auffällig beim Einsatz der Peptide ist deren unterschiedliche Wirkung auf die Menge der Schleimphase. Während für das Peptid Test1 eine ansteigende Peptidkonzentration im System (Balken 3, 4, 5) zur Abnahme des Massenanteiles der Schleimphase führt, so bewirkt eine Steigerung von SA2 im System (Balken 6, 7, 8) den kontinuierlichen Anstieg der Schleimmenge. Obgleich hier ein systematisches Phänomen vorliegen könnte, kann aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen keine belastbare Hypothese abgeleitet werden. Grundsätzlich wirkt sich die Gegenwart der Peptide jedoch positiv auf die Menge der Schleimphase aus. Verbindet man diese Erkenntnisse nun mit der Information über

den Restölgehalt im Schleim, so lässt sich der reale Ölverlust für die unterschiedlichen Versuche, analog zu den in Abschnitt 4.1 ermittelten Ölverlusten, bestimmen. In der Abbildung 4.3.10b sind diese Ölverluste, zusammen mit jenem der enzymatischen Entschleimung in der gewöhnlichen wässrigen Phase, graphisch dargestellt. Der Referenzwert der ursprünglichen enzymatischen Entschleimung liegt bei 0,147 Gew% (Balken 1). Zwei der Messungen liegen mit 0,177 bzw. 0,168 Gew% oberhalb dieses Wertes (Balken 2, 4), die übrigen unterschreiten ihn, wenngleich die Abweichungen sehr unterschiedlich ausfallen. Insbesondere der Einsatz von SA2 führt zu deutlichen Verbesserungen der Ölausbeute, da der Ölverlust regelmäßig höchstens im Bereich von 0,12 Gew% liegt (Balken 7, 8, 9). Jedoch wird das absolute Minimum für alle untersuchten Versuchsreihen durch den Einsatz der mit Test1 modifizierten PLA1 in Verbindung mit weiterem freiem Test1-Peptid erreicht. In diesem Fall liegt der Ölverlust bei lediglich 0,107 Gew%, und bedeutet daher eine Verbesserung von 27 %, verglichen mit dem Referenzwert.

Resümee:

Ziel der Enzymmodifikation mit den beiden Peptiden ist die Verbesserung der Grenzflächeneigenschaften der PLA1, um so möglicherweise die Enzymaktivität zu verbessern und dadurch eine Prozessoptimierung zu erreichen. Die Umsetzung dieser Absicht kann anhand der dargelegten Ergebnisse nicht nachgewiesen werden. Allerdings hat sich gezeigt, dass sich die Zugabe der Peptide zum Reaktionsgemisch positiv, sowohl im Hinblick auf den Restölgehalt im Schleim als auch bezüglich der Gesamtschleimmenge, auswirkt. Hierdurch ist es gelungen den Ölverlust verglichen mit den Versuchsansätzen im Abschnitt 4.1 weiter zu reduzieren. Hieraus ergibt sich ein Potential für weitergehende detaillierte Untersuchungen zu Grenzflächenphänomenen im Bereich der ÖlentSchleimung, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht vorangetrieben werden können. Vielmehr bietet sich hier ein Ansatzpunkt für zukünftige Forschung.

4.4 Glycolipidanalytik (GL-Analytik)

Die folgenden Abschnitte befassen sich mit der Analyse der im Ölschleim enthaltenen GL. Hierbei werden zunächst die Untersuchungen zur Methodenentwicklung für die High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) dargelegt [66, S. 3ff], bevor abschließend auf den Gehalt der GL-Fraktion, deren Zusammensetzung, sowie die Rolle der Entschleimungs-Enzyme für die GL eingegangen wird.

a) Trennmethodik

Wie im Kapitel 3 beschrieben, spielt bei der quantitativen Dünnschichtchromatographie die Mehrfachauftragung der Proben gemeinsam mit entsprechenden Standardsubstanzen eine wesentliche Rolle für den Erfolg, da so sehr zeitsparend statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden. Ferner sind die mobile Phase und die Position der Fließmittelfront von entscheidender Bedeutung. Das gewählte Gemisch Aceton/Chloroform/Wasser (6:3:0,4, v:v:v) [68, S. 49] erweist sich in Voruntersuchungen für die GL-Trennung als geeignet. Als Migrationsstrecke des Fließmittels resultieren hieraus 80 mm. Die dimensionslosen R_f -Werte beschreiben die individuelle Migrationsstrecke der aufgetrennten GL bezogen auf die Position der Fließmittelfront. Die Tabelle

4.4.1. zeigt die aus allen Untersuchungen mit Standardsubstanzen ermittelten Werte. Wie zu erwarten, sind die Wechselwirkungen der stationären Phase mit den DGDG aufgrund ihrer zwei Galactoseeinheiten am größten, sodass sie die kürzeste Strecke zurücklegen. Wohingegen die ASG als am wenigsten polare GL den weitesten Weg aufweisen.

Tabelle 4.4.1: R_f -Werte der GL-Standards als Mittelwerte aus allen untersuchten Konzentrationen.

GL-Standard	R_f [-]
DGDG	0,070 ± 0,006
CerOH	0,160 ± 0,011
Cer	0,220 ± 0,013
SG	0,260 ± 0,013
MGDG	0,400 ± 0,019
ASG	0,560 ± 0,018

Ein weiterer Parameter, der bei der Entwicklung einer quantitativen HPTLC-Methode Berücksichtigung findet, ist die Konzentration der Analyten, die durch das Probenvolumen bestimmt wird. Für die eigentliche Analyse ist lediglich die Probenmenge in der stationären Phase relevant, da das Lösungsmittel der gelösten Probe, verdampft. Dennoch stellt sich die Frage inwieweit dieses Lösungsmittelvolumen einen Einfluss auf das resultierende Chromatogramm hat. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts werden drei Standardlösungen hergestellt, die sich ausschließlich in ihrer Konzentration unterscheiden. Die Probenauftragung auf die Platte erfolgt derart, dass sich stets 1 µg jedes GL-Standards in der stationären Phase befindet. Somit ergeben sich Volumina von 1, 2 und 4 µL. Für den Fall, dass das Volumen keinen Einfluss auf das Chromatogramm hat, wäre zu erwarten, dass Peakhöhe und -fläche der einzelnen Verdünnungsstufen sich nicht signifikant unterscheiden. Die Abbildung 4.4.1 stellt die Zusammenhänge am Beispiel von ASG graphisch dar.

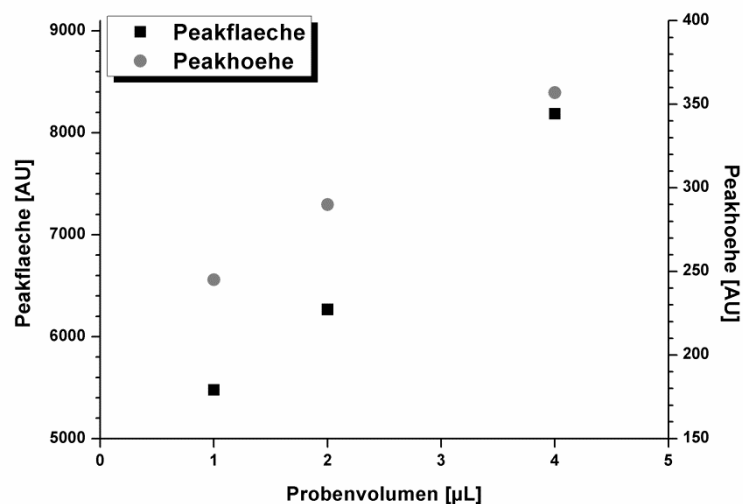


Abbildung 4.4.1: Einfluss des Probenvolumens auf die Trenneigenschaften bei konstanter aufgetragener Probenmasse von 1 µg je GL-Standard.

Entgegen der Erwartungen zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit zwischen dem aufgetragenen Probenvolumen und den Charakteristika des sich ergebenden Chromatogramms. Eine Vergrößerung des Volumens lässt sowohl die Peakfläche als auch dessen Höhe anwachsen, obwohl stets die gleiche Analytmenge vorliegt. Dieses Phänomen lässt sich auf Migrationsvorgänge während der Probenauftragung zurückführen. Ein erhöhtes Volumen benötigt mehr Zeit zum Verdampfen. Dieses reicht bereits aus, um in der stationären Phase zu migrieren und so die Analyten in der Matrix zu verteilen, was zur Deformation des Chromatogramms führt. Inwieweit es sich bei diesem Phänomen um einen linearen Zusammenhang handelt, was sich anhand der Messwerte andeutet, wird in der Folge nicht weiter untersucht. Folglich ist es zur Erlangung reproduzierbarer Ergebnisse erforderlich, stets dasselbe möglichst kleine Volumen aufzutragen. In den weiteren Untersuchungen wird daher 1 μL als Standardvolumen festgelegt.

b) Optimierung der Derivatisierung und Detektion

Die Detektion der GL im Rahmen der HPTLC setzt eine post-chromatographische Derivatisierung voraus, da die GL farblos sind und kein ausgewiesenes Absorptionsmaximum besitzen. Zu diesem Zweck werden zwei Reagenzien im Hinblick auf ihre Eignung untersucht. Zentrale Parameter sind die Heiztemperatur, die Heizdauer und die Wellenlänge für die Detektion. Empfohlene Temperaturen für die Schwefelsäure bzw. das Kupfersulfatreagenz liegen bei 135 bzw. 140 °C [69, S. 5598] [Hanlodser, S. 1860]. Zu hohe Heiztemperaturen können auch zu Verfärbungen nicht beladener Bereiche der HPTLC-Platte führen, was die optische Auflösung des Chromatogramms herabsetzt. Daher wird für sämtliche Versuche die Temperatur auf 135 °C festgesetzt.

Zur Bestimmung möglicher Wellenlängen werden Spektrenscans im Bereich zwischen 200 und 700 nm durchgeführt. Abbildung 4.4.2 gibt exemplarisch die charakteristischen Spektren bei der Benutzung der beiden Derivatisierungsreagenzien am Beispiel von 18 Proben MGDG wieder. Diese sind charakteristisch für alle GL mit dem jeweiligen Derivatisierungsreagenz und verdeutlichen die gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

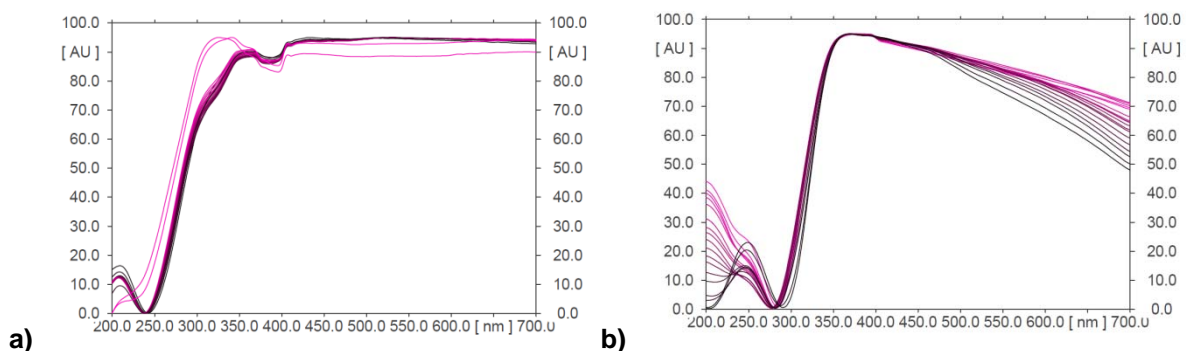


Abbildung 4.4.2: Spektrenscans nach einer Derivatisierung von MGDG a) mit Schwefelsäure, b) mit Kupfersulfatreagenz.

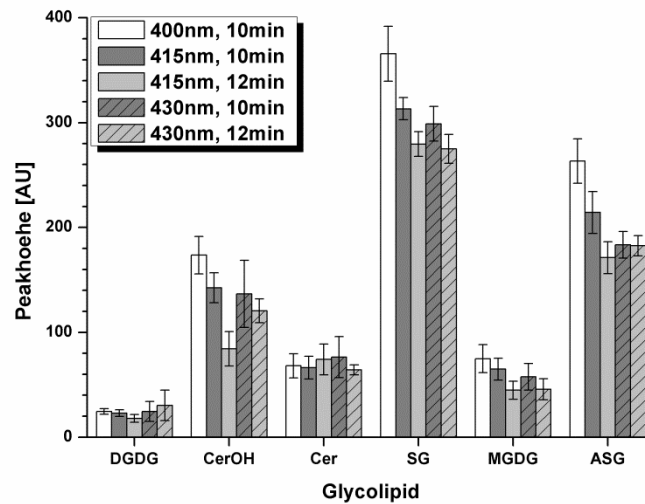
Die sich ergebenden Spektren unterscheiden sich wesentlich. Im Fall der Schwefelsäure ergibt sich im Bereich von Wellenlängen kleiner 250 nm ein sehr schwaches Signal, das zwischen 250 und 400 nm stark ansteigt, um dann auf hohem Niveau zu verbleiben (Abbildung 4.4.2a). Bei der Derivatisierung

mit dem Kupfersulfatreagenz bleibt das Signal bis 300 nm auf niedrigem Niveau, steigt dann steil an, erreicht bei 390 nm ein globales Maximum und fällt für größere Wellenlängen kontinuierlich ab (Abbildung 4.4.2b). Die Tabelle 4.4.2 listet jene Wellenlängen auf, die aus den Spektren für weitere Untersuchungen ausgewählt werden. Voruntersuchungen mit dem Kupfersulfatreagenz erfolgten bei einer Wellenlänge von 500 nm. Diese Wellenlänge soll für das Kupfersulfatreagenz lediglich betrachtet werden, um deren Ergebnisse mit dem ermittelten Optimum von 370 nm zu vergleichen. Die Untersuchung der Wellenlängen erfolgt bei einer Heizdauer von 10 bzw. 12 Minuten.

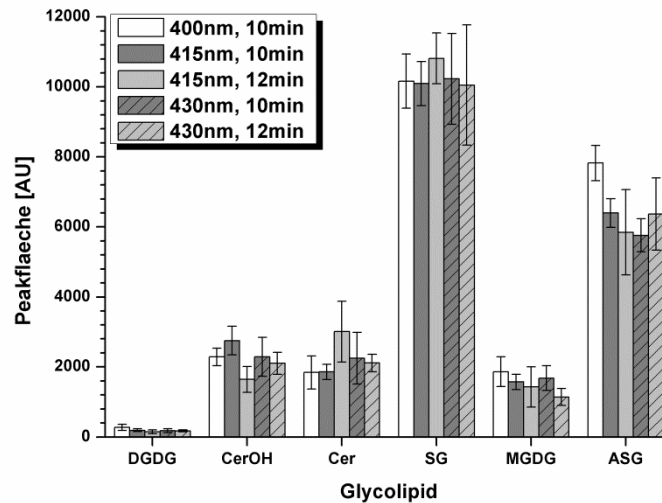
Tabelle 4.4.2: Für die weiteren Untersuchungen ausgewählte Wellenlängen.

Schwefelsäure	Kupfersulfat
400 nm	370 nm
415 nm	500 nm
430 nm	

Grundsätzlich lässt sich der Abbildung 4.4.3 entnehmen, dass sämtliche Reaktionsbedingungen unter Verwendung der Schwefelsäure geeignet sind, um die GL zu detektieren. Im Vergleich fallen die ausgesprochen starken Signale der SG (Faktor 5 bis 6 bezüglich CerOH/Cer, MGDG) auf, gefolgt von ASG. Für CerOH/Cer und MGDG ergeben sich ähnliche Signalstärken, während sowohl die Peakhöhe als auch die Peakfläche für DGDG mit Abstand am geringsten ausfallen. Zudem zeigt sich eine verringerte optische Auflösung des Chromatogramms bei verlängerter Heizdauer. Dies wird daran ersichtlich, dass sich für die meisten GL niedrigere Werte für die Peakhöhe und/oder Peakfläche bei längerer Dauer einstellen. Zudem erweist sich die Handhabung der Schwefelsäure im praktischen Gebrauch als unzuverlässig für das Eintauchen der Platten, denn die erhöhte Viskosität konzentrierter Schwefelsäure lässt diese zu stark an der stationären Phase haften, wodurch sich das Abtropfen überschüssiger Säure verzögert. Folglich verlängerte sich die notwendige Zeit zum Verdampfen, was die zeitliche Kontrolle der Derivatisierungsreaktion beeinträchtigt. Zudem verteilt sich dieser Effekt nicht homogen über die Platte, sodass der Einsatz dieses Reagenz zur quantitativen Analyse infrage zu stellen ist. Dennoch erbringen die Messungen für die Wellenlänge von 400 nm und 10 Minuten Heizdauer die besten Ergebnisse für dieses Reagenz.



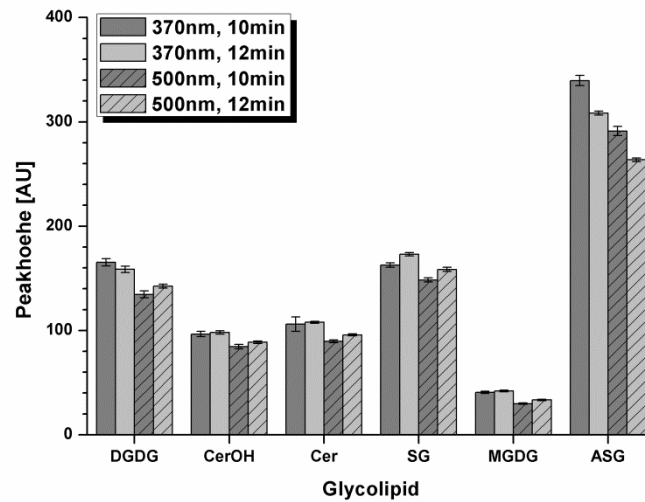
a)



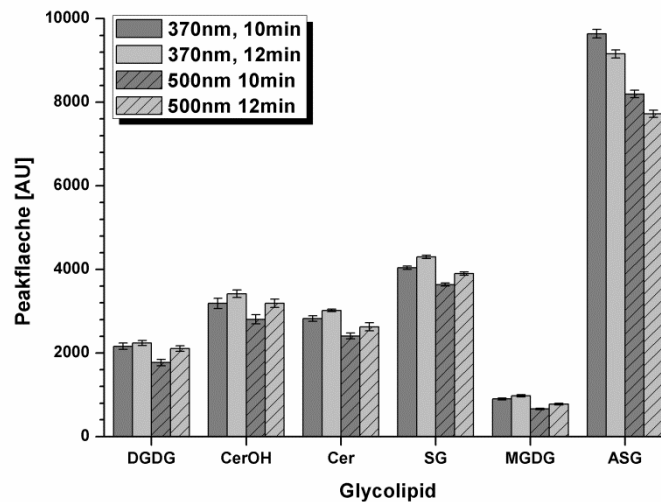
b)

Abbildung 4.4.3: Messergebnisse für die Derivatisierung mit Schwefelsäure a) Peakhöhe, b) Peakfläche.

Die Abbildung 4.4.4 zeigt selbige Ergebnisse für das Kupfersulfatreagenz. Unter den gegebenen Bedingungen besitzt ASG die stärksten Signale sowohl bei der Peakfläche als auch bei der Peakhöhe. Im Gegensatz zum vorhergehenden Reagenz sind die Signale nun über die GL-Klassen hinweg deutlich ausgeglichener. SG verzeichnet eine leichte Abschwächung, die Signale von CerOH/Cer steigen um ein Drittel und jene von DGDG etwa um den Faktor sechs oder mehr an. Somit kann für die meisten GL eine Verbesserung hinsichtlich ihrer Nachweisgrenze erreicht werden. Wie erwartet ergeben sich die besten Ergebnisse bei einer Wellenlänge von 370 nm. Der Einfluss der Heizdauer ist für diese Wellenlänge insbesondere bei der Peakhöhe weniger ausgeprägt als zuvor. Obwohl sich für einzelne GL nach 12 Minuten heizen leicht erhöhte Messwerte zeigen, so ist dieser Anstieg unwesentlich für das Gesamtsystem. Für das Kupfersulfatreagenz wird daher das Parameterpaar 370 nm und 10 Minuten Heizdauer als Optimum identifiziert.



a)



b)

Abbildung 4.4.4: Messergebnisse für die Derivatisierung mit dem Kupfersulfatreagenz a) Peakhöhe, b) Peakfläche.

Für die weiteren Untersuchungen muss nun ein Parametersatz ausgewählt werden, der den gestellten Anforderungen am besten gerecht wird. Wie bereits in den theoretischen Grundlagen beschrieben, stehen in der Literatur vor allem die SG und ASG im Verdacht im Biodiesel Ausflockungen zu verursachen und dadurch die Filtriereigenschaften zu beeinträchtigen. Somit ist es notwendig auch Spuren dieser Substanzen im entschleimten Öl zuverlässig nachzuweisen. Darüber hinaus sollte die Nachweisgrenze der einzelnen GL etwa im gleichen Bereich liegen, da dies die Probenvorbereitung erleichtert. Zuletzt ist eine einfache Handhabung, insbesondere im Hinblick auf eine automatisierte Arbeitsweise, vorzuziehen. Berücksichtigt man diese Bedingungen, so muss die Wahl auf das Kupfersulfatreagenz fallen. Gerade die immense Verbesserung des Messsignals der DGDG unterstreicht diese Aussage.

Es ergeben sich für alle weiteren Analysen die folgenden Parameter:

- heizen bei 135 °C,
- heizen für 10 Minuten,
- Detektion bei einer Wellenlänge von 370 nm.

Ein typisches Chromatogramm unter diesen Bedingungen ist der Abbildung 4.4.5 zu entnehmen.

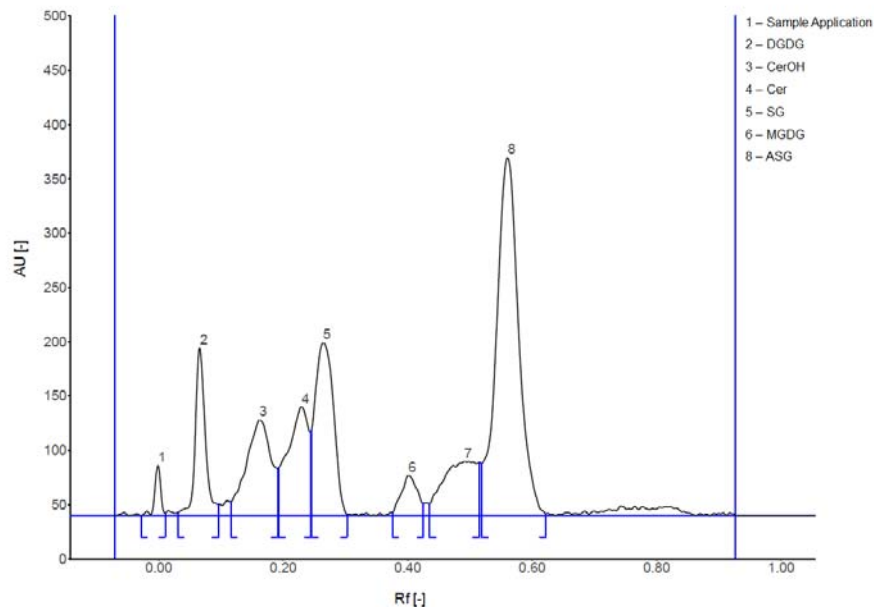


Abbildung 4.4.5: Chromatogramm mit einer GL-Standardmischung; individuelle GL-Konzentration 0,5 µg/mL, Fließmittelfront 80 mm, Derivatisierung mit der Kupfersulfatreagenz, heizen bei 135 °C für 10 Minuten sowie Detektion bei einer Wellenlänge von 370 nm.

Aufgrund seiner starken Polarität bewegt sich DGDG nur sehr langsam durch die Matrix und so repräsentiert der zweite Peak (2) nahe dem Startpunkt (1) dieses GL. Die Peaks (3) und (4) beziehen sich auf CerOH bzw. Cer. Sie sind klar voneinander abgegrenzt, jedoch zeigt sich die Trennung von Cer (4) hin zu SG (5) als nicht optimal, da beide ähnliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen besitzen. Die weniger polaren GL MGDG (6) und ASG (8) legen die weitesten Strecken zurück und bilden isolierte Peaks. Der Bereich (7) ist eine charakteristische Erscheinung im Zusammenhang mit ASG. Sie wird in dieser Arbeit jedoch nicht in die Bewertung von ASG integriert, da sie stofflich nicht näher differenziert wurde.

c) Kalibrierung

Zur Erstellung von Kalibrierkurven für die einzelnen GL wird eine Verdünnungsreihe in Chloroform/Methanol (2:1, v:v) eingesetzt, die sämtliche Standards in einer Lösung enthält. Die Kalibrierung muss im Systemgemisch erfolgen, um auch den Wechselwirkungen zwischen den GL Rechnung zu tragen, die die Bewegung, die Peaktrennung, die Peaksymmetrie und den R_f -Wert beeinflussen. Tabelle 4.4.3 zeigt die Konzentrationen der Verdünnungsreihe sowie die sich ergebenden Probenmassen in der stationären Phase. Hierbei sei zu bemerken, dass der Standard für

Cerebroside eine Mischung aus CerOH/Cer (1:1 w:w) darstellt, sodass deren aufgelistete Werte noch zu halbieren sind, um so die eigentlichen Konzentrationen zu erhalten.

Tabelle 4.4.3: Verdünnungsreihe der GLStandards und sich ergebende Probenmassen bei der Kalibrierung.

Konzentration [mg/mL]	Probenmasse [ng]
1,5	1.500
1,0	1.000
0,75	750
0,5	500
0,25	250
0,125	125
0,0625	62,5

Die Chromatogramme werden hinsichtlich ihrer Peakhöhen und Peakflächen ausgewertet. Die resultierenden Mittelwerte stammen aus 12 bis 30 Wiederholungen auf einem Konfidenzniveau von 0,95. Die Mittelwerte werden mit den Probenmassen korreliert und eine lineare Kalibrierkurve bestimmt. Die Überprüfung der Signifikanz der linearen Korrelation erfolgt mit dem *Studentized Maximum Modulus Test* [80, S. 213] bei einem Signifikanzniveau von 0,99. Dieser statistische Test vergleicht den Betrag des Korrelationskoeffizienten ($|r|$) mit der Testgröße g_0 gemäß Gleichung (4.1). Dieser multivariate Test formuliert ein Quantil t ausgehend von den Freiheitsgraden f_1 und f_2 sowie einer der Irrtumswahrscheinlichkeit α . Die Freiheitsgrade des Systems ergeben sich aus der Anzahl unabhängiger Variablen ($p = 2$, da Analytmasse – Peakhöhe, Analytmasse - Peakfläche) und der Anzahl der wertepaare (N).

$$|r| \geq g_0 = \sqrt{\frac{t_{f_1 f_2 \alpha}^2}{t_{f_1 f_2 \alpha}^2 - f_2}} \quad \text{mit } f_1 = p; f_2 = N - p - 1; \alpha = 0,01 \quad (4.1)$$

Tabelle 4.4.4 enthält die entsprechenden Kalibriergleichungen bezüglich der GL-Massen und Peakflächen (A) bzw. Peakhöhen (h). Die lineare Regression ergibt gute Ergebnisse und die lineare Abhängigkeit ist nachgewiesen, da sich das Testkriterium für alle GL erfüllt. Die beste Korrelation zeigt sich bei MGDG sowohl für die Peakhöhe als auch für die Peakfläche. Die schwächste Korrelation liegt für Cer vor, bezüglich der Peakfläche, und für SG bezüglich der Peakhöhe. Verallgemeinernd lässt sich postulieren, dass die Korrelation zwischen der Masse und der Peakfläche tendenziell etwas besser ausfällt, wenn man die Bestimmtheitsmaße zur Grundlage macht.

Tabelle 4.4.4: Kalibriergleichungen für GL-Standards, Bestimmtheitsmaße, Testkriterien, a) Peakfläche, b) Peakhöhe.

a)

GL	Gleichung Fläche (A) gegen Probenmasse (m)	Bestimmtheitsmaß r^2	Testkriterium $ r \geq g_0$
DGDG	$A = 1,588m + 182,6$	0,9920	erfüllt
CerOH	$A = 5,289m + 230,9$	0,9926	erfüllt
Cer	$A = 5,412m + 512,8$	0,9691	erfüllt
SG	$A = 4,416m + 1017$	0,9822	erfüllt
MGDG	$A = 1,306m + 49,10$	0,9982	erfüllt
ASG	$A = 11,33m + 403,5$	0,9889	erfüllt

b)

GL	Equation	Bestimmtheitsmaß r^2	Testkriterium $ r \geq g_0$
	Höhe (h) gegen Probenmasse (m)		
DGDG	$h = 0,1161m + 12,98$	0,9760	erfüllt
CerOH	$h = 0,1263m + 15,24$	0,9799	erfüllt
Cer	$h = 0,2040m + 18,24$	0,9868	erfüllt
SG	$h = 0,1355m + 60,41$	0,9522	erfüllt
MGDG	$h = 0,0513m + 3,917$	0,9971	erfüllt
ASG	$h = 0,2968m + 24,30$	0,9741	erfüllt

Die Abbildung 4.4.6 veranschaulicht das Maß an Korrelation am Beispiel von DGDG auf einem Konfidenzniveau von 0,95. Im Hinblick auf die experimentellen Daten lässt sich feststellen, dass diese nur unwesentlich um die Regressionskurve schwanken und nur ein geringfügiger Ausreißer bei 500 ng vorliegt, der innerhalb seiner Schwankungsbreite ins Konfidenzniveau reicht.

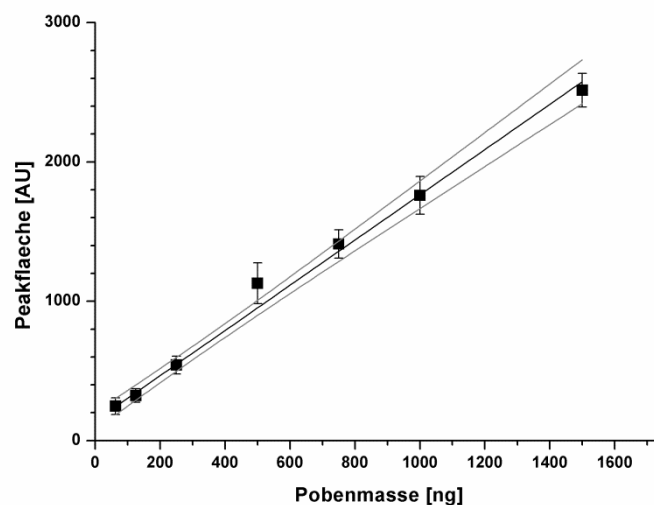


Abbildung 4.4.6: Kalibrierkurve für DGDG mit der Peakfläche auf einem Konfidenzniveau von 0,95 mit den entsprechenden Konfidenzbändern.

Die Analyse der Kalibrierungsdaten demonstriert die zulässige Anwendung der HPTLC mit den gewählten Parametern für die quantitative Bestimmung von GL. Alle untersuchten GL zeigen gute lineare Korrelationen zwischen der Probenmasse und der Peakhöhe bzw. der Peakfläche. Dies ermöglicht nun die Ermittlung von GL in realen Schleimproben unter Nutzung der Peakhöhen-Kalibrierung und der Bestätigung durch die Peakflächen-Kalibrierung. Hinsichtlich der Nachweisgrenzen ergeben sich unterschiedliche Bereiche für die einzelnen GL. Dies liegt in der unterschiedlichen Signalstärke begründet. Bedingt durch die starken Signale können die Kalibrierkurven für SG und ASG zuverlässig im gesamten Wertebereich eingesetzt werden. Für DGDG und CerOH/Cer ist die Empfindlichkeit der Signale für den Bereich < 125 ng bzw. $< 62,5$ ng derart erniedrigt, dass eine quantitative Detektion nur bis zu diesen Grenzen zulässig ist. Das schwache Signal bei MGDG führt zu einer Nachweisgrenze im Bereich > 250 ng.

d) Analyse von Ölschleimproben

Die implementierte Analysenmethode wurde anschließend an realen Proben des Ölschleims getestet. Die Schleimproben von zwei verschiedenen Sonnenblumenölen (SFO1, SFO2) und einem Sojaöl (SBO) durchliefen die beschriebene Fraktionierung und lagen dann gelöst in 5 mL Chloroform/Methanol (2:1, v:v) vor.

Für die weiteren Analysen kann nicht davon ausgegangen werden, dass die individuellen GL in den Proben zu gleichen Teilen vorliegen. Vielmehr sind unterschiedliche Konzentrationen sehr wahrscheinlich [70, S. 762][81, S. 337]. Daher werden Verdünnungsreihen angesetzt, um diesem Umstand Rechnung zu tragen. Dies ermöglicht dann sowohl die Detektion von sehr kleinen, aber auch sehr hohen Konzentrationen, jeweils unter Beachtung der Gültigkeit der Kalibrierkurven. Die Verdünnungsreihen umfassen sechs Stufen, nämlich: 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:9, 1:14 (Probe/Lösungsmittel, v:v). Die Analyse der Chromatogramme erstreckt sich gleichermaßen auf die Peakhöhe wie die Peakfläche. Die Tabelle 4.4.5 listet am Beispiel von SFO2 die Verdünnungsstufen auf, in den die einzelnen GL aufgrund ihrer Konzentration nachweisbar sind. Für die Verdünnung 1:1 sind die Chromatogramme nicht auswertbar, da zu hohe Konzentrationen einzelne Peaks stark deformieren.

Tabelle 4.4.5: Detektierbarkeit der einzelnen GL bei unterschiedlichen Stufen der Verdünnung, am Beispiel von SFO2.

GL	1:2	1:4	1:6	1:9	1:14
DGDG	x	x	x	x	x
CerOH	x	x	x	x	
SG	x	x	x	x	x
MGDG	x				
ASG	x	x	x	x	x

MGDG kann für dieses Öl nur in der Verdünnungsstufe 1:2 ermittelt werden, hierbei ergeben sich Signale im Bereich der unteren Nachweisgrenze, was auf eine geringe Konzentration (1,07 mg/g Schleim) im SFO2 hinweist. Da sich grundsätzlich stärkere Signale für CerOH zeigen, kann dieses bis zur Stufe 1:9 erfasst werden. Dies spricht für Konzentrationen im mittleren Bereich (4,38 mg/g). Lediglich DGDG, SG und ASG lassen sich im gesamten Verdünnungsbereich detektieren. Die Daten erbringen den Beleg, dass DGDG (15,3 g/mg) und SG (13,8 g/mg) in diesem Öl die Hauptvertreter der GL sind, wohingegen ASG (3,32 g/mg), bedingt durch sein starkes Signal, nur in einem mittleren Bereich konzentriert ist (vgl. Abbildung 4.4.4). Cer wird in keiner der Proben gefunden. Somit kann dieses GL höchstens in Größenordnungen unterhalb der Nachweisgrenze vorliegen.

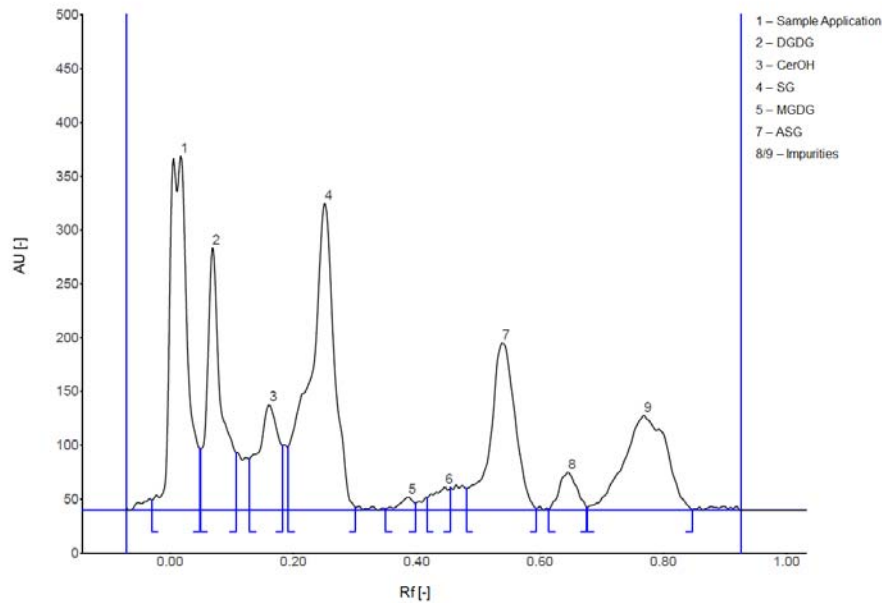


Abbildung 4.4.7: Chromatogramm der Schleimprobe von SFO2, Fließmittelfront 80 mm, Derivatisierung mit dem Kupfersulfatreagenz, heizen bei 135 °C für 10 Minuten sowie Detektion bei einer Wellenlänge von 370 nm. Verdünnungsreihe 1:2.

In der Abbildung 4.4.7 wird ein charakteristisches Chromatogramm für SFO2 dargestellt (Verdünnung 1:2). Auch dieses verdeutlicht den hohen Anteil an DGDG und SG. Der Peak 1 am Ort der Probenauftragung repräsentiert vermutlich stark polare Substanzen wie Sphingo-GL, die sich in der Probe befinden. Aufgrund ihrer starken Wechselwirkungen mit der stationären Phase ist ihre Migration erheblich gebremst. Da es nicht gelingt Cer nachzuweisen, wird die verbesserte Trennung der CerOH (3) und SG (4) beobachtet. MGDG (5) und ASG (7) sind ebenso wie in der Standardmischung deutlich voneinander getrennt. Zu erkennen ist auch hier die charakteristische „Schulter“ vor ASG (6). Die Peaks (8) und (9) könnten für weniger polare Komponenten stehen, die trotz der Behandlung mit Chloroform in der Probe verblieben sind; beispielsweise FFA oder Pigmente. Eine solche Lipidmischung stellt ein komplexes System dar, dessen Wechselwirkungen während der HPTLC schwer vorherzusagen ist. Daher kann es vorkommen, dass einzelne GL ein von der Standardmischung (1:1:1:1:1, w:w:w:w:w) leicht abweichendes Verhalten zeigen. Bedingt durch die realen Verhältnisse zwischen den GL, insbesondere das Fehlen einzelner bzw. ein Überschuss anderer, erhöhen sich in einzelnen Fällen die R_f -Werte minimal, was die Identifikation jedoch nicht beeinflusst.

Tabelle 4.4.6: Wertetabelle zum GL-Gehalt der untersuchten Öle SFO1, SFO2, SBO.

Ölprobe	GL	Verdünnung	Masse aus	Masse aus	Durchschn. Masse
			Peakfläche	Peakhöhe	im Schleim
			[mg]	[mg]	[mg/g Schleim]
SFO001	DGDG	1:1	2,24	2,22	2,23 ± 0,01
	CerOH (LOD)	1:1	0,54	0,47	0,51 ± 0,04
	SG	1:1	4,11	4,17	4,14 ± 0,03
	ASG (LOV)	1:1	0,17	-	0,17
	Total GL				7,04 ± 0,08
SFO002	DGDG	1:6	16,7	13,8	15,3 ± 1,45
	CerOH	1:2	3,67	5,09	4,38 ± 0,71
	SG	1:6	12,5	15,1	13,8 ± 1,30
	MGDG	1:2	0,95	1,19	1,07 ± 0,12
	ASG	1:2	3,02	3,32	3,17 ± 0,15
	Total GL				37,7 ± 3,73
SBO001	DGDG	1:4	39,7	34,7	37,2 ± 3,35
	CerOH	1:2	4,84	7,43	6,13 ± 1,29
	SG	1:1	5,58	5,70	5,64 ± 0,06
	MGDG	1:1	1,94	2,22	2,08 ± 0,14
	ASG	1:4	11,7	13,5	12,6 ± 0,90
Total GL				63,7 ± 5,74	

An dieser Stelle soll am Beispiel der SG-Fraktion von SFO1 kurz die Methodik vorgestellt werden, nach der aus den Chromatogrammen die GL-Massen ermittelt werden, bevor auf die eigentlichen Werte eingegangen wird. Im ersten Schritt gilt es eine Verdünnungsstufe zu identifizieren, für die die Messwerte im Gültigkeitsbereich der Kalibrierung liegen. Im vorliegenden Beispiel ist dies die Verdünnung 1:1. Aus den Durchschnittswerten für die Peakfläche (2831,4) und Peakhöhe (116,9) ergeben sich für die SG-Masse der Probe 0,441 µg und 0,417 µg, die entsprechend in 1 µL Probenvolumen aufgebracht werden. Diese Probe wird aus der Verdünnung der Stammlösung zu gleichen Teilen mit Chloroform/Methanol (2:1, v:v) erzeugt. Von dieser Verdünnung stehen 1000 µL zur Verfügung, sodass dieses Volumen bezüglich der Peakhöhe 411 µg und bezüglich der Peakfläche 417 µg an SG enthält. Durch Zurückrechnen auf das Volumen der Stammlösung (5 mL) kommt man auf durchschnittlich 4,14 mg in der ursprünglichen Schleimprobe von 1 g Masse. In der Tabelle 4.4.6 werden die sich ergebenden Massen für alle untersuchten und alle nachgewiesenen GL aufgeführt. Der Vergleich der Daten für die Peakflächen und den Peakhöhen zeigt eine gute Übereinstimmung der Messwerte und bestätigt nochmals die Anwendbarkeit dieser Analytik für das betrachtete System. Die generierten Werte weisen darauf hin, dass die GL-Fraktion eines Öles sich überaus heterogen darstellen kann. Dies gilt sowohl für den Gesamtgehalt an GL als auch für die Zusammensetzung der GL-Fraktion. Diese Beobachtung ist nicht sonderlich überraschend, bedenkt man doch die große Bandbreite der Inhaltsstoffe für Sonnenblumenöl, wie sie im Abschnitt 2.1 dargestellt sind. Diese Unterschiede können mit zahlreichen Faktoren zusammenhängen. Neben der Art der Ölsaart kann auch das Anbaugesbiet, das Wetter in der Wachstumsperiode, die Lagerbedingungen der Saat sowie die Prozessierung zur Ölgewinnung und die anschließende Behandlung und Lagerung des Öls eine wesentliche Rolle spielen. Zum besseren Vergleich der Öle miteinander erfolgt die Normalisierung der einzelnen GL-Massen auf die jeweilige Gesamtmasse der Probe. Die Ergebnisse dieser Betrachtung werden in der Abbildung 4.4.8 graphisch veranschaulicht.

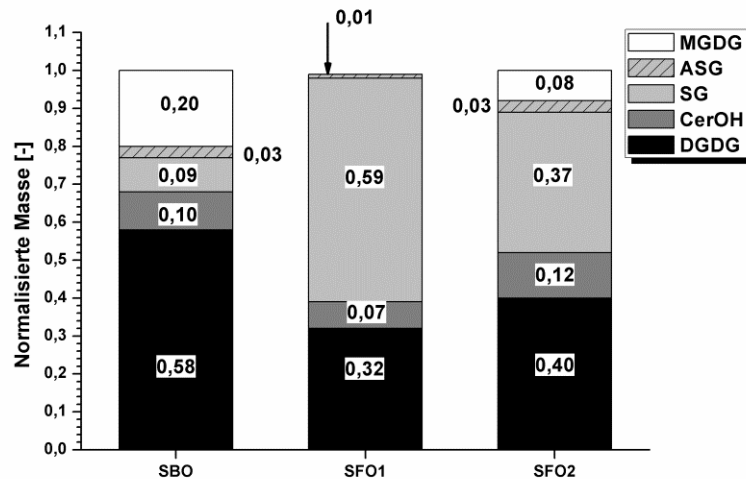


Abbildung 4.4.8: Normalisierte GL-Massen der untersuchten Öle SFO1, SFO2, SBO.

Hierdurch werden einige Zusammenhänge bezüglich der untersuchten Öle deutlicher. In keinem der Öle kann Cer nachgewiesen werden, was zeigt, dass dieses GL in den Ölen keine wesentliche Rolle spielt. Im Gegensatz dazu wird CerOH zuverlässig in allen Proben identifiziert und tritt in moderaten Anteilen von etwa 10 Gew% auf. MGDG kann nur aus zwei der Öle isoliert werden, jeweils SBO und SFO2 mit 3 Gew%. Insgesamt ist also auch dies eine GL-Klasse die eher in Kleinstmengen vorliegt. Bei DGDG handelt es sich um eine GL-Klasse, die einen wesentlichen Beitrag zur GL-Fraktion leistet. Für die Sonnenblumenöle werden Werte zwischen 30 und 40 Gew% ermittelt, beim SBO liegt mit 58 Gew% weit mehr als die Hälfte der Fraktion in Form von DGDG vor. SG und ASG scheinen nicht losgelöst voneinander betrachtet werden zu können. Im Vergleich der Öle ergibt sich keine eindeutige Aussage wie beispielsweise für CerOH. Vielmehr muss stärker differenziert werden. Für die Sonnenblumenöle repräsentiert SG neben DGDG eine weitere Hauptklasse der GL, während ASG für das SFO1 unbedeutend ist und im Falle von SFO2 mit 10 Gew% einen ähnlichen Anteil wie CerOH beiträgt. Für das SBO kehren sich diese Zusammenhänge um. Hier stellt ASG die zweitgrößte Fraktion nach DGDG dar, wenn auch nur mit einem Anteil von 20 Gew%. Die SG hingegen verhalten sich mit etwa 10 Gew% eher wie CerOH. Zusammenfassend lässt sich aufgrund der ermittelten Werte postulieren, dass nicht nur SG und ASG relevante GL-Klassen darstellen, die beispielsweise in Biodiesel zu Ausfällungen und somit zu Schwierigkeiten im Kraftstofffilter führen können. Vielmehr ist dieser Kreis auch um DGDG zu erweitern, da sie einen wesentlichen Anteil an der GL-Fraktion repräsentieren. Darüber hinaus darf die Wichtigkeit von CerOH als eher untergeordnet bewertet werden. MGDG sowie Cer können in Folgebetrachtungen vernachlässigt werden.

e) Einsatz der HPTLC zum Nachweis von Enzymaktivität

Nach dem Nachweis der Anwendbarkeit der HPTLC-Analytik auf reale Schleimproben, wird diese ebenfalls genutzt, um den Einfluss der eingesetzten Enzyme auf die GL-Fraktion zu untersuchen.

Hierzu werden vier Versuchsansätze durchgeführt:

- 1) Saure Entschleimung (ohne Enzym)
- 2) Entschleimung mit PLA1
- 3) Entschleimung mit Amylase 1
- 4) Entschleimung mit Amylase 2

Die genannten Untersuchungen erfolgen mit dem SFO1. Bei der Auswertung der Versuche kann CerOH in der Fraktion ohne Enzym nicht nachgewiesen werden. Dies ist insofern überraschend, als dass CerOH zuvor problemlos in SFO1 bestimmbar war. Ein möglicher Grund ist in den verringerten Signalstärken für alle GL in dieser Probe zu suchen. Trotz dieser Unregelmäßigkeit ist dieser Ansatz nicht zu verwerfen, denn die Verhältnisse zwischen den einzelnen GL sollten davon unberührt bleiben. In den restlichen Proben liegt der Anteil von CerOH konstant bei 10 Gew%. Somit ist es möglich diese Größe für die weiteren Betrachtungen außer Acht zu lassen und sich auf die Entwicklung von DGDG, SG und ASG zu konzentrieren.

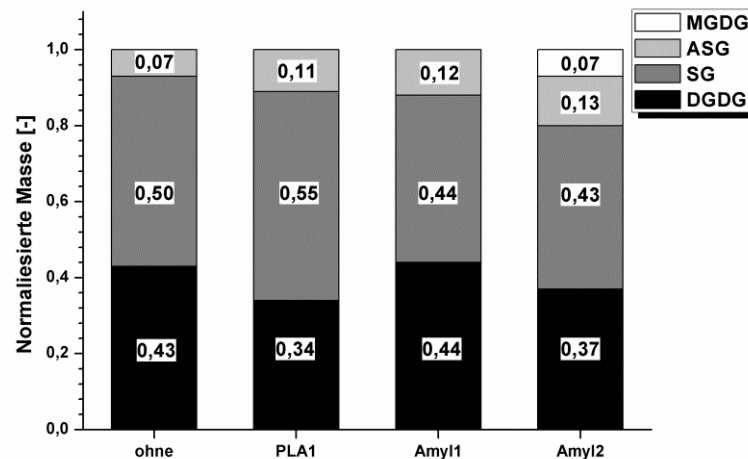


Abbildung 4.4.9: Normalisierte GL-Massen für SFO1 mit und ohne Einsatz von Enzymen.

Wie bereits zuvor gezeigt (Abbildung 4.4.8), besteht auch hier ein Großteil der Fraktionen der sauren Entschleimung aus SG, gefolgt von DGDG an zweiter Stelle, und ASG bildete mit nur 7 Gew% den kleinsten Anteil (Abbildung 4.4.9). Durch den Einsatz der PLA1 zur Entschleimung ändert sich die Zusammensetzung der Fraktion deutlich. Es lässt sich eine Reduktion von DGDG um 9 Gew% nachweisen. Gleichzeitig steigen die beiden übrigen Klassen relativ gleichmäßig um 5 bzw. 4 Gew% an. Wenn man die von der PLA1 katalysierte Reaktion berücksichtigt, kann anhand der Daten vermutet werden, dass das Enzym ebenfalls in der Lage ist die erste Fettsäure im Molekül von DGDG abzuspalten, wodurch dessen Konzentration im Schleim abnimmt. Durch die Abnahme eines der GL sollten die Anteile der restlichen im gleichen Maße ansteigen, wie es auch beobachtet wird. Legt man vergleichender Weise die Substratvielfalt der PLA1 zugrunde, so wird diese Vermutung noch weiter gefestigt, denn für das Enzym erscheint die Kopfgruppe eines polaren Lipides weniger wichtig zu sein als die Gegenwart einer Diglyceridgrundstruktur. Die strukturellen Unterschiede der PL, wie sie in den theoretischen Grundlagen (Abschnitt 2.3) dargestellt werden, belegen diese These. Die entstandene

Lyso-Form von DGDG würde sich im Chromatogramm links von DGDG, also in Richtung der Probenauftragung wiederfinden, da durch die Freisetzung der FFA die Hydrophil-Hydrophob-Bilanz zugunsten der hydrophilen bzw. polaren Moleküleigenschaften verändert wird. Der Nachweis für das Vorliegen dieser Verbindung kann nicht erbracht werden, da kein geeigneter Standard für den Zweck zur Verfügung steht.

Die Beurteilung der Auswirkungen beim Einsatz der Amylase 1 erweist sich als weniger eindeutig, da die Möglichkeit besteht, dass die Amylase sämtliche GL katalysieren kann. Bei den Amylasen handelt es sich um Enzyme die zur Gruppe der Hydrolasen gehören und in der Lage sind glycosidische Bindungen, in der Regel in Oligo- und Polysacchariden, zu spalten. Derartige Bindungen finden sich in allen GL, jedoch liegen sie hier maximal in einem Disaccharid (DGDG) vor. Grundsätzlich ergibt sich für die Amylase 1 ein nahezu konstanter Wert für DGDG, verglichen mit der sauren Entschleimung. Der Anteil für SG nimmt hingegen um 6 Gew% ab, ferner nimmt jener von ASG um 5 Gew% zu. Strukturelle Betrachtungen der GL zeigen, dass eine Reaktion der Amylase 1 mit ASG eher unwahrscheinlich ist. Es ist davon auszugehen, dass die Fettsäure des GL-Moleküls den freien Zugang zum aktiven Zentrum stark beeinträchtigt. Wenn die Amylase DGDG als Substrat akzeptiert, so ist auch anzunehmen, dass entweder MGDG als (Zwischen)-Produkt im Chromatogramm auftauchen bzw. die Konzentration von DGDG aufgrund der kompletten Abspaltung des Disaccharides global abnehmen wird. Ein Nachweis von MGDG kann in dieser Probe nicht erbracht werden, sodass die erste Annahme nicht bestätigt wird. Die Möglichkeit der Freisetzung des kompletten Disaccharides kann jedoch nicht verworfen werden. Aufgrund der Messwerte erscheint eine Hydrolyse von SG wahrscheinlich, was jedoch wegen der nicht verfügbaren Standardlösungen der Reaktionsprodukte nicht nachgewiesen werden kann. Die Ergebnisse könnten auf eine enzymatische Umsetzung von SG und DGDG mit höherer SG-Selektivität hindeuten. In diesem Fall würde die Konzentration beider GL sinken. Jedoch entstünde für die SG aufgrund der höheren Reaktionsgeschwindigkeit eine größere Abnahme. Dies könnte letztlich dazu führen, dass der Anteil von DGDG scheinbar als konstante Größe wiedergegeben wird, trotz der stattfindenden Hydrolyse der Verbindung.

Beim Einsatz der Amylase 2 müssen die gleichen Prämissen wie für die Amylase 1 gelten. Auch in diesem Fall verringert sich der Anteil von SG deutlich um 7 Gew% und jener von ASG nimmt um 6 Gew% zu. Darüber hinaus ist jedoch eine stärkere Abnahme von DGDG um 6 Gew% zu verzeichnen, die einhergeht mit dem Nachweis von 7 Gew% MGDG. Für diese Amylase scheint demnach zu gelten, dass sie DGDG als Substrat akzeptiert und als (Zwischen)-Produkt MGDG bildet. Da die Abnahme an DGDG ziemlich genau der Zunahme von MGDG entspricht, darf postuliert werden, dass MGDG das Endprodukt dieser Reaktion ist. Der Anteil von SG liegt in der gleichen Größenordnung wie zuvor bei der Amylase 1, ebenso wie die Summe der übrigen Anteile von DGDG, MGDG und ASG erneut 57 Gew% ergeben, sodass auch hier postuliert werden darf, dass die Amylase 2 SG hydrolysiert.

Resümee:

Im vorliegenden Abschnitt wurde schrittweise die Methodenentwicklung einer HPTLC-Analysenmethode zum quantitativen Nachweis von GL dargestellt und deren Zuverlässigkeit anhand von Standardmessungen nachgewiesen. Die Anwendung der Methode zur Bestimmung ausgewählter GL in realen Proben von Ölschleim belegt ihre vielseitige Anwendbarkeit und ermöglicht qualitative und quantitative Aussagen über die Zusammensetzung der GL-Fraktion pflanzlicher Öle. Demnach spielen DGDG und SG bzw. ASG eine zentrale Rolle in diesen Ölen, während Cer nicht detektiert werden kann und somit zu vernachlässigen ist. Weitere niedrig bis mittel konzentrierte Komponenten sind CerOH sowie MGDG. Ferner zeigt sich die für Naturstoffe übliche Heterogenität in der Zusammensetzung der GL, die sich je nach Ölsaart, aber auch innerhalb der gleichen Ölsaart je nach Charge stark unterscheiden können. Abschließend erfolgt die Nutzung der GL-Analytik zur Ermittlung von Enzymaktivitäten der zur Entschleimung eingesetzten Enzyme. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann nachgewiesen werden, dass die PLA1 auch geeignet ist DGDG in seine Lyso-Form zu überführen, sodass die zuvor beschriebenen Effekte der enzymatischen Entschleimung nicht alleinig auf die Modifikation von PL zurückzuführen sind, sondern auch die GL einen Beitrag zum Gesamtsystem leisten. Auch wenn es anhand der vorliegenden Daten nicht mit Bestimmtheit ermittelt werden kann, so liegt doch die Vermutung nahe, dass nicht nur DGDG sondern auch MGDG ein mögliches Substrat für die PLA1 ist. Ferner belegen die vorliegenden Ergebnisse, dass einzelne Amylasen mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Lage sind bestimmte GL zu hydrolysieren, und so die Verhältnisse an der Wasser-Öl-Grenzfläche zu beeinflussen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zahlreiche Daten im Bereich der Entschleimung pflanzlicher Öle ermittelt werden, die einen maßgeblichen Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkmechanismen dieses Verfahrens leisten. Ausgangspunkt der Untersuchungen waren Versuche zu industriell etablierten Entschleimungsverfahren. Es konnte gezeigt werden, dass sich ein enzymatischer Ansatz für die Entschleimung nicht wesentlich auf die Ölqualität auswirkt. Leichte Steigerungen beim Phosphorgehalt konnten zwar nachgewiesen werden, von 2,7 ppm ohne Enzym auf 3,1 ppm bei Einsatz der PLA1, jedoch ergibt sich hieraus keine signifikante Verschlechterung in Bezug auf den Referenzwert von 10 ppm. Ferner fand sich ein Nachweis, dass durch den Einsatz von Enzymen die Ölausbeute gesteigert werden kann. Insbesondere die Kombination der PLA1 mit weiteren Amylasen trug wesentlich zur Reduktion der Ölverluste bei. Diese Verluste konnten bei der Kombination der PLA1 mit der Amylase 1 um 23,5 %, verglichen mit der enzymlosen Entschleimung, verringert werden. Eine Kombination verschiedener Enzyme in einem Versuchsansatz hatte in keinem Fall einen Einfluss auf die Phospholipaseaktivität der PLA1. Stets zeigte sich eine Steigerung der FFA-Konzentration von 0,54 auf 0,58 Vol%. Einen Anknüpfungspunkt für weitere Untersuchungen stellen die Wirkzusammenhänge zwischen den kombiniert eingesetzten Enzymen dar. Diese sind bisher nicht bekannt, werden jedoch zur weiteren Optimierung des Verfahrens benötigt. Hierzu sollten einerseits die Substrate der Amylasen innerhalb des Ölschleimes identifiziert werden, andererseits werden sicherlich auch Experimente zu den Grenzflächeneigenschaften der enzymhaltigen wässrigen Phase zur Klärung beitragen. Weiterhin besteht Bedarf bei der Festlegung der optimalen Enzymmenge für die Entschleimung. Dies erscheint angeraten, um die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens zu verbessern, da eine Überdosierung die Kosten in die Höhe treibt ohne zu einer wesentlichen Verbesserung zu führen. Ziel sollte es sein, möglichst einen mathematischen Zusammenhang zwischen der Phosphorkonzentration bzw. einem anderen charakteristischen Parameter und der einzusetzenden Enzymmenge zu ermitteln.

Im zweiten Schritt wurde ein *in situ* videomikroskopischer Ansatz gewählt, um die Vorgänge während der Entschleimung qualitativ zu beschreiben. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse ermöglichten die Bestätigung der eingangs postulierten Auswirkungen der enzymatischen Katalyse auf die Schleimstruktur. Die enzymatische Hydrolyse der PL führt zur Verbesserung ihrer Wasserlöslichkeit, wodurch die resultierende Schleimphase insgesamt kompakter wird und weniger Neutralöl aufnehmen kann. Dieses Analyseverfahren bot entscheidende Vorteile, um die sukzessive Ausbildung der Schleimphase durch Aggregation der Schleimstoffe zu dokumentieren. In folgenden Untersuchungen könnte dieser Ansatz weiter verfolgt werden, insbesondere die Vergrößerung des *In-situ*-Videomikroskopes sollte von 4-fach auf 10-fach erweitert werden. Darüber hinaus erscheint eine genauere Analyse der Partikelgröße und -form zielführend, um profunde Aussagen zur Ölentschleimung auf quantitativer Basis zu gewinnen. Ein Verfahren der automatisierten Bildanalyse erscheint hier als das Mittel der Wahl. Neben diesen optischen Ansätzen bietet unter Umständen auch die Röntgenstrukturanalyse eine Möglichkeit Informationen über die Struktur bzw. die Phasenzusammensetzung des Ölschleimes zu erhalten.

Die enzymatische Entschleimung in Verbindung mit dem Einsatz von Peptiden, sowohl in ihrer ungebundenen freien Form, aber auch kovalent gebunden an das Enzym, haben zu einer signifikanten Ausbeutesteigerung geführt. Insbesondere für das Peptid *Test1* zeigte sich eine signifikante Reduktion des Ölverlustes von bis zu 27 %, verglichen mit dem Referenzwert von 0,147 Gew% für die konventionelle enzymatische Entschleimung. Im Gegensatz dazu konnte eine Steigerung der Phospholipaseaktivität durch die Konjugation der Peptide nicht nachgewiesen werden. Der enorme zeitliche Aufwand bei der Herstellung derartiger Konjugate ebenso wie die hohen Kosten für die Peptide lassen jedoch nicht vermuten, dass sich dieser Ansatz in der industriellen Praxis durchsetzen kann. Vielmehr erscheint es geboten Verbindungen zu identifizieren, die sich ebenfalls positiv auf die Grenzflächeneigenschaften innerhalb der Emulsion auswirken. Mögliche Kandidaten sollten strukturelle Ähnlichkeiten mit den eingesetzten Peptiden aufweisen. Insbesondere die Kettenlänge sowie die funktionellen Gruppen sollten dabei einer genauen Analyse unterzogen werden.

Abschließend konnten mit Hilfe einer neu entwickelten HPTLC-Analysemethode wertvolle Daten zum Einfluss von Glycolipiden bei der enzymatischen Entschleimung gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle der eingesetzten Enzyme sich auf die Glycolipidfraktion im Ölschleim auswirken. In weiterführenden Versuchen sollte diese Analyse auch auf die Zwischen- und möglichen Endprodukte einer solchen enzymatischen Katalyse ausgeweitet werden, um so die gefundenen Ergebnisse nochmals zu verifizieren.

Die bisherigen hier dargestellten, aber auch andernorts veröffentlichten Daten, ermöglichen insbesondere die Erklärung beobachteter Phänomene. Jedoch existiert derzeit keine Systematik, die es ermöglicht Vorhersagen bei Versuchen zur Verfahrensoptimierung zu treffen. Gerade die Heterogenität des Systems „Pflanzenöl“ stellt hierbei die größte Herausforderung dar. Weitere Analysen, die das Systemverständnis vervollständigen helfen, müssen mit der Bestimmung der Reaktionskinetik der enzymatisch katalysierten Umsetzungen beginnen. Hierzu muss im ersten Schritt eine Methodik identifiziert werden, die es ermöglicht die Hydrolyse individueller PL und GL zu dokumentieren. Dies umfasst neben der quantitativen Detektion sowohl der Edukte (PL, GL, Polysaccharide) als auch der Produkte (FFA, Oligosaccharide), vor allem einen Versuchsaufbau in dem lediglich ein Substrat mit dem Enzym in einem Zweiphasensystem in Kontakt gebracht wird. Ein Ansatzpunkt hierzu kann einerseits in der Optimierung der vorgestellten HPTLC-Analytik, andererseits in der im Abschnitt 3.2.4b beschriebenen Bestimmung der Aktivität liegen. Das eingesetzte Pflanzenöl sollte zu Beginn vollständig raffiniert sein, um es mit dem Substrat zu versetzen. Mit validen Daten im Einkomponentensystem kann der Versuchsaufbau komplexer und durch weitere Substrate bzw. Ölbestandteile erweitert werden. Dies ermöglicht im zweiten Schritt eine gezielte Analyse der Kinetik im nicht entschleimten Öl. Analog zur Enzymkinetik sollte auch der Einfluss einzelner PL und GL, aber auch Polysaccharide, auf die Grenzflächenspannung während der Entschleimung ermittelt werden. Begleitet werden diese tensiometrischen Versuche von qualitativen und quantitativen Bildanalysen, sodass die gewonnene Datenbasis auf ein breites Fundament gestellt wird. Ziel all dieser Untersuchungen muss es sein, aus den Ergebnissen Gesetzmäßigkeiten abzuleiten, die zuverlässige Vorhersagen über das Systemverhalten bei Parameteranpassungen ermöglichen. Um die

Zusammenfassung und Ausblick

Kostenoptimierung der enzymatischen Entschleimung voranzutreiben und so die Akzeptanz des Verfahrens in der industriellen Anwendung zu fördern.

Insgesamt konnte ein facettenreicher Einblick in die Mechanismen der Ölentfleimung gewonnen werden, der zahlreiche Ansatzpunkte für zukünftige Analysen bietet. Somit ist es mit dieser Arbeit gelungen einen Beitrag zur wissenschaftlichen Praxis zu leisten.

Literaturverzeichnis

- [1] Bockisch, M., 1993, Nahrungsfette und -öle, Handbuch der Lebensmitteltechnologie, Ulmer Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- [2] United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service – Production, Supply, and Distribution Online, <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>, Letzter Abruf 14.10.2014.
- [3] United Nations –Department of Economic and Social Affairs, 2013, World Population Prospects: The 2012 Revision, http://esa.un.org/unpd/wpp/unpp/panel_population.htm, Letzter Abruf 23.10.2014.
- [4] OECD/ Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013, OECD-FAO Agricultural Outlook 2013, OECD Publishing, DOI: 10.1787/agr_outlook-2013-en
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations, Trade and Markets – International Commodity Prices, <http://www.fao.org/economic/est/statistical-data/est-cpd/en/>, Letzter Abruf 15.10.2014.
- [6] Gunstone, F.D. (Edt.), 2002, Vegetable Oils in Food and Technology: Composition, Properties and Uses, Blackwell Publishing, Oxford, Großbritannien.
- [7] Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2010, Agribusiness Handbook – Sunflower Crude and Refined Oils, FAO Investment Center Division, Rom, Italien.
- [8] Statistisches Bundesamt, GENESIS Onlinedatenbank – Land- und Forstwirtschaft, Fischerei, <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online>, Letzter Abruf 15.10.2014.
- [9] Statistisches Bundesamt, 2013/2014, Fachserie 3 Reihe 3.2.1 – Land- und Forstwirtschaft, Fischerei – Wachstum und Ernte: Feldfrüchte, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Germany.
- [10] eurostat, Haupttabellen – Landwirtschaftliche Erzeugnisse, http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/agriculture/agricultural_production/main_tables, Letzter Abruf 15.10.2014.
- [11] Gupta, M.K., 2008, Practical Guide to Vegetable Oil Processing, AOCS Press, Urbana, IL, USA.
- [12] Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.J., 2007, Lipid Handbook, 3. Auflage, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- [13] Campbell, E.J., 1983, Sunflower Oil, Journal of the American Oil Chemists' Society, 60, 387-392.
- [14] Putt, E.D., 1967, Variation in Composition of Sunflower Oil from Composite Samples and Single Seeds of Varieties and Inbred Lines, Beitrag Jahrestreffen der American Oil Chemists' Society, Chicago, IL, USA, Oktober 1967, 126-129.
- [15] Zimmermann, D.C., Fick, G.N., 1973, Fatty Acid Composition of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Oil as Influenced by Seed Position, Journal of the American Oil Chemists' Society, 50, 273-275.
- [16] Sietz, F.G., 1969, Die Fettsäure-Zusammensetzung von Rüböl, Sojaöl, Sonnenblumenöl und Erdnußöl, Fette. Seifen. Anstrichmittel., 71, 446-451.
- [17] Morrison, W.H., Robertson, J.A., 1978, Hydrogenated Sunflowerseed Oil: Polymer Formation on Heating, Journal of the American Oil Chemists' Society, 55, 451-453.
- [18] Swern, D. (Herausgeber), 1982, Bailey's Industrial Oil and Fat Products – Volume 2, J. Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- [19] Noor Lida, H.M.D., Sundram, K., Siew, W.L., Aminah, A., Mamot, S., 2002, TAG Composition and Solid Fat Content of Palm Oil, Sunflower Oil, and Palm Kernel Olein Belends before and after Chemical Interesterification, Journal of the American Oil Chemists' Society, 79, 1137-1144.

- [20] Guinda, A., Dobarganes, M.C., Ruiz-Mendez, M.V., Mancha, M., 2003, Chemical and Physical Properties of a Sunflower Oil with High Levels of Oleic and Palmitic Acids, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, 130-137.
- [21] Martin-Polvillo, M., Márquez-Ruiz, G., Dobarganes, M.C., 2004, Oxidative Stability of Sunflower Oils Differing in Unsaturation Degree During Long-Term Storage at Room Temperature, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 577-583.
- [22] Bordoulina, A.A., Popov, P.S., 1974, Biochemical Characteristics of the Present Sunflower Varieties and Hybrids, *Beitrag 6th International Sunflower Conference*, Bukarest, Rumänien, 22-24.07.1974, 239-245.
- [23] Brevedan, M.I.V., Carelli, A.A., Crapiste, G.H., 2000, Changes in Composition and Quality of Sunflower Oils during Extraction and Degumming, *Grasas y Aceites*, 51, 417-423.
- [24] Carelli, A.A., Ceci, L.N., Crapiste, G.H., 2002, Phosphorus-to-Phospholipid Conversion Factors for Crude and Degummed Sunflower Oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 1177-1180.
- [25] Carelli, A.A., Brevedan, M.I.V., Crapiste, G.H., 1997, Quantitative Determination of Phospholipids in Sunflower Oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 511-514.
- [26] Smiles, A., Kakuda, Y., MacDonald, B.E., 1988, Effect of Degumming Reagents on the Recovery and Nature of Lecithins from Crude Canola, Soybean and Sunflower Oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 1151-1155.
- [27] Nielsen, K., 1960, The Composition of Difficulty Extractable Soybean Phosphatides, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 37, 217-219.
- [28] Dijkstra, A.J., 1993, Degumming, Refining, Washing, and Drying Fats and Oils, in *Proceedings of the World Conference on Oilseed Technology and Utilization*, Applewithe, T.H. (Herausgeber), American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, 138-151.
- [29] Dijkstra, A.J., 2010, Enzymatic Degumming, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 1178-1189.
- [30] Kanamoto, R, et al., 1981, Phospholipid-Phospholipid Interaction in Soybean Oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58, 1050-1053.
- [31] Segers, J.C., 1990, Degumming – Theory and Practice, in *Edible Fats and Oils Processing: Basic Principles and Modern Practices*, Erickson, D.R. (Herausgeber), American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, 88-93.
- [32] Chapman, G.W., 1980, A Conversion Factor to Determine Phospholipid Content in Soybean and Sunflower Crude Oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57, 299-302.
- [33] Dijkstra, A.J., van Opstal, M., 1989, The Total Degumming Process, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66, 1002-1009.
- [34] Ghazani, S.M., Marangoni, A.G., 2013, Minor Components in Canola Oil and Effects of Refining on These Constituents: A Review, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90, 923-932.
- [35] Ringers, H.J., Segers, J.C., 1977, Degumming Process for Triglyceride Oils, US Patent US 4049686.
- [36] van de Sande, R.L.K., Segers, J.C., 1989, Method of Refining Glyceride Oils, Europäisches Patent EP0348004.
- [37] Tasan, M., Demirci, M., 2003, Trans FA in Sunflower Oil at Different Steps of Refining, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 825-828.
- [38] Cabezas, D.M., Diehl, B.W.K., Tomás, M.C., 2013, Emulsifier and Antioxidant Properties of By-Products Obtained by Enzymatic Degumming of Soybean Oil, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 659-667.

- [39] Adlercreutz, P., 1994, Enzyme-Catalysed Lipid Modification, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 12, 231-254.
- [40] Galhardo, F., Hitchman, T., 2012, Has Degumming with Enzymes Come of Age?, *Oil Mill Gazetteer*, 117, 2-5.
- [41] de Greyt, W.F.J., 2012, Current and Future Technologies for the Sustainable and Cost-Efficient Production of High Quality Food Oils, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 1126-1139.
- [42] Aalrust, E., Beyer, W., Ottofrickestein, H., Penk, G., Plainer, H., Reiner, R., 1992, Enzymatisches Verfahren zur Verminderung des Gehaltes an phosphorhaltigen Bestandteilen in pflanzl. u. tierischen Ölen, *Europäisches Patent EP0513709*.
- [43] Dahlke, K., 1998, An Enzymatic Process for the Physical Refining of Seed Oils, *Chemical Engineering and Technology*, 21, 278-281.
- [44] Clausen, K., 2001, Enzymatic Oil-Degumming by a Novel Microbial Phospholipase, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103, 333-340.
- [45] Soe, J., Turner, M., 2007, Enzymatic oil-degumming method, *US Patent US 20070298157*.
- [46] Gramatikova, S., Hazelwood, G., Lam, G., Barton, N.R., 2007, Phospholipases, nucleic acids encoding them and methods for making and using them, *US Patent US 7226771*.
- [47] Cabezas, D.M., Madoery, R., Diehl, B.W.K., Tomás, M.C., 2011, Application of Enzymatic Hydrolysis on Sunflower Lecithin Using a Pancreatic PLA2, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 443-446.
- [48] Carelli, A.A., Frizzera, L.M., Forbito, P.R., Crapiste, G.H., 2002, Wax Composition of Sunflower Seed Oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 763-768.
- [49] O'Brien, R.D., Farr, W.E., Wan, P.J., 2000, *Introduction to Fats and Oils Technology*, 2. Auflage, AOCS Press, Champaign, IL, USA.
- [50] Manjula, S., Kobayashi, I., Subramanian, R., 2011, Characterization of Phospholipid Micelles in Nonaqueous Systems in Relation to Their Rejection during Membrane Processing, *Food Research International*, 44, 925-930.
- [51] Gupta, A.K., Rau, W., 1986, Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der Raffination der Speiseöle, *Fette. Seifen. Anstrichmittel.*, 88, 79-86.
- [52] Gupta, A.K., Rau, W., 1988, Micellar Structures and their Implication in the Chemistry and Technology of Fats and Other Lipids, *Fat Science and Technology*, 90, 251-256.
- [53] Verhaert, R.M.D., Hilhorst, R., Vermue, M., Schaafsma, T., Veeger, C., 1990, Description of Enzyme Kinetics in Reversed Micelles, *European Journal of Biochemistry.*, 187, 59-72.
- [54] Jain, M.K., Berg, O.G., 1989, The Kinetics of Interfacial Catalysis by Phospholipase A2 and Regulation of Interfacial Activation: Hopping versus Scooting, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1002, 127-156.
- [55] Stahelin, R.V., 2013, A New Model of Interfacial Kinetics for Phospholipase, *Biophysical Journal*, 105, 1-2.
- [56] Cai, L., Cao, A., Lai, L., 2002, Monitoring the Kinetics and Thermodynamics of Interfacial Enzymatic Catalysis by Differential Scanning Calorimetry, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297, 446-451.
- [57] Schwedt, G., 1995, *Analytische Chemie – Grundlagen, Methoden und Praxis*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- [58] Bruttel, P., Schlink, R., 2006, *Wasserbestimmung durch Karl-Fischer-Titration*, Metrohm AG, Herisau, Schweiz.

- [59] Baerns, M., Falbe, J., Fetting, F., Hofmann, H., Keim, W., Onken, U., 1999, *Chemische Reaktionstechnik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- [60] van Hell, A.J., Costa, C.I.C.A., Flesch, F.M., Sutter, M., Jiskoot, W., Crommelin, D.J.A., Hennink, W.E., Mastrobattista, E., 2007, Self-Assembly of Recombinant Amphiphilic Oligopeptides into Vesicles, *Biomacromolecules*, 8, 2753-2761.
- [61] Hermanson, G.T., 2013, *Bioconjugate Techniques*, 3. Auflage, Academic Press, London, Großbritannien.
- [62] Gilles, M.A., Hudson, A.Q., Borders, C.L., 1990, Stability of Water-Soluble Carbodiimides in Aqueous Solution, *Analytical Biochemistry*, 184, 244-248.
- [63] Zhao, Z.Y., Liu, J., Hahn, M., Qiao, S., Middelberg, A.P.J., He, L., 2013, Encapsulation of Lipase in Mesoporous Silica Yolk-Shell spheres with enhanced enzyme stability, *RSC Advances*, 3, 22008-22013.
- [64] Krüss GmbH, 2014, *Nutzerhandbuch*, Hamburg.
- [65] Zuidema, H.H., Waters, G.W., 1941, Ring Method for the Determination of Interfacial Tension, *Industrial and Engineering Chemistry*, 13, 312-313.
- [66] Wenzel, O., Fernández, J., Sohling, U., Niemeyer, B., 2015, Quantitative Determination of Natural Glycolipids from Oil Seed by Automated High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC), *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 92, 633-644.
- [67] Pernet, F., Pelletier, C.J., Milley, J., 2006, Comparison of Three Solid-Phase Extraction Methods for Fatty Acid Analysis of Lipid Fractions in Tissues of Marine Bivalves, *Journal of Chromatography A*, 1137, 127-137.
- [68] Heift, C., 2007, *Zusammensetzung und Funktionalität des Lecithins aus Rapssaaten für erweiterte Anwendungen im Lebensmittelbereich*, Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland.
- [69] Selmair, P.L., Koehler, P., 2009, Molecular Structure and Baking Performance of Individual Glycolipid Classes from Lecithins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5597-5609.
- [70] Moreau, R.A., Scott, K.M., Haas, M.J., 2008, The Identification and Quantification of Steryl Glucoside in Precipitates from Commercial Biodiesel, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 85: 761-770.
- [71] Homan, R., Anderson, M.K., 1998, Rapid Separation and Quantitation of Combined Neutral and Polar Lipid Classes by High-Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light-Scattering Mass Detection, *Journal of Chromatography B*, 708, 21-26.
- [72] Le, T.T., Miciovic, J., Nguyen, T.M., Rombaut, R., van Camp, J., Dewettinck, K., 2011, Improved Solvent Extraction Procedure and High-Performance Liquid Chromatography Evaporative Light-Scattering Detector Method for Analysis of Polar Lipids from Dairy Materials, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10407-10413.
- [73] Rodríguez-Alcalá, L.M., Fontecha, J., 2010, Major Lipid Classes Separation of Buttermilk, and Cows, Goats and Ewes Milk by High Performance Liquid Chromatography with an Evaporative Light Scattering Detector Focused on the Phospholipid Fraction, *Journal of Chromatography A*, 1217, 3063-3066.
- [74] Abidi, S.L., 2001, Chromatographic Analysis of Plant Sterols in Foods and Vegetable Oils, *Journal of Chromatography A*, 935, 173-201.
- [75] Christie, W.W., Xianlin, H., 2010, *Lipid Analysis – Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*, 4. Auflage, The Oily Press, Bridgwater, Großbritannien.
- [76] Nguyen, T.K.T., Stevenson, G., Obatomi, D., Bach, P., 2000, Determination of Lipids in Animal Tissues by High-Performance Thin-Layer Chromatography with Densitometry, *Journal of Planar Chromatography*, 13, 375-381.

Literaturverzeichnis

- [77] Handloser, D., Widmer, V., Reich, E., 2008, Separation of Phospholipids by HPTLC – An Investigation of Important Parameters, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31, 1857–1870.
- [78] Vasta, J.D., Sherma, J., 2008, Comparison of Spraying, Dipping, and the Derivapress for Postchromatic Derivatization with Phosphomolybdic Acid in the Detection and Quantification of Neutral Lipids by High- Performance Thin-Layer Chromatography, *Acta Chromatographica*, 20, 15-23.
- [79] Hahn-Deinstrop, E., Koch, A., Müller, M., 2000, HPTLC Measured Values of Primula Saponins in Extracts of *Primulae radix*. A Comparison after Derivatization between Handspraying, Dipping and Autospraying, *Chromatographia Supplement*, 51, 302-304.
- [80] Bechhofer, R.E., Dunnett, C.W., 1982, Multiple Comparisons for Orthogonal Contrasts: Examples and Tables, *Technometrics* 24: 213-222.
- [81] Tang, H., Guzman, R.D., Salley, S., Simon Ng, K.Y., 2010, Comparing Process Efficiency in Reducing Steryl Glucosides in Biodiesel, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 87, 337-345.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.2.1: Schematische Darstellung des Prozesses von der Saat zum Rohöl	9
Abbildung 2.3.1: Prozessschema der Pflanzenölraffination	11
Abbildung 2.3.2: Struktur der Phospholipide. Wenn R = H → Phosphatidsäure (PA)	12
Abbildung 2.4.1: Regiospezifität der unterschiedlichen Phospholipasen	18
Abbildung 3.1: Versuchsaufbau „Ölentschleimung mit Kühlung“: 1) Reaktorgefäß, 2) Rührmotor mit Rührwerk, 3) Kühlfinger, 4) Thermostat, 5) Heizplatte mit Magnetrührer, 6) mechanische Hebebühne, 7) Schliffhals (3x)	25
Abbildung 3.1.2: <i>In-situ</i> -Videomikroskop Aufbau und Messprinzip	27
Abbildung 3.2.1: Versuchsdurchführung „Ölentschleimung“	28
Abbildung 3.2.2: Reaktionsmechanismus zur Konjugatbildung durch Zero-Length-Crosslinker	34
Abbildung 3.2.3: Zweistufiger Mechanismus zur Enzym-Peptid-Konjugation	35
Abbildung 4.1.1: Konzentration-Zeit-Verlauf des Phosphorgehalts a) ohne Enzym und mit PLA1, b) PLA1 kombiniert mit Amylase 1 und PLA1 kombiniert mit Amylase 2	44
Abbildung 4.1.2: Modellansatz zur Charakterisierung der Vorgänge an Wasser-Öl-Grenzfläche	46
Abbildung 4.1.3a: Volumenanteil der Schleimphase: Zeit-Verlauf ohne Enzym und mit PLA1	47
Abbildung 4.1.3b: Volumenanteil der Schleimphase: bei Reaktionsende (t = 90 Minuten) ohne Enzym, PLA1, PLA1 mit Amylase 1 und PLA1 mit Amylase 2	48
Abbildung 4.1.4: Bedingungen bei Reaktionsende a) Massenanteil der Schleimphase b) Volumenanteil FFA im Vergleich die Zeitpunkt 0 und 90 Minuten	49
Abbildung 4.1.5: Systemanpassung durch Kühlung a) zeitliche Änderung des Wassergehalts, b) Konzentrations-Zeit-Verlauf des Phosphorgehalts	51
Abbildung 4.1.6: Konzentration der untersuchten Parameter nach Reaktionsende (t = 45 Minuten) in Kombination mit den zugehörigen Restölgehalten in der jeweiligen Schleimphase a) Phosphor, b) Calcium und Magnesium	54
Abbildung 4.1.7: Anteil der Schleimphase nach Reaktionsende	57
Abbildung 4.1.8: Volumenanteil FFA im Vergleich die Zeitpunkt 0 und 45 Minuten	57
Abbildung 4.2.1: <i>In-situ</i> -mikroskopische Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten vom unbehandelten Rohöl bis zur Neutralisation.	
a) Unbehandeltes Rohöl bei 80 °C	60
b) Nach der Säuredosierung bei 80 °C	60
c) Nach etwa 15 Minuten saurer Konditionierung bei 80 °C	60
d) Nach der Zugabe von 4 M Natronlauge, Abkühlung auf 48 °C	61
e) Nach etwa 10 Minuten Neutralisation bei 48 °C	61
Abbildung 4.2.2: Grenzflächenspannungen Öl/wässrige Phase bei Variation der wässrigen Phase	62

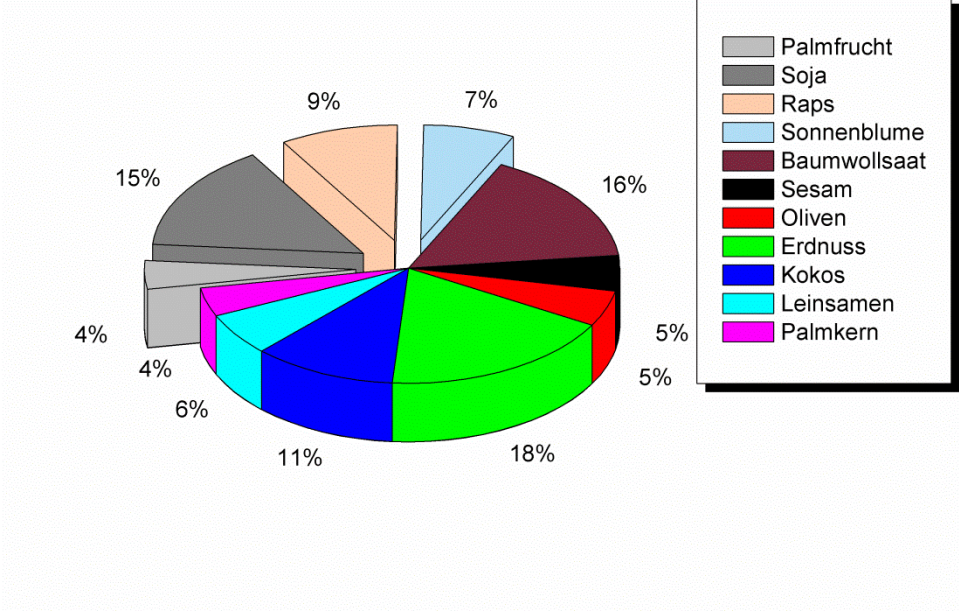
Abbildung 4.2.3: <i>In-situ</i> -mikroskopische Aufnahmen der sauren Entschleimung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe des restlichen Wassers.	
a) Nach der Zugabe des Restwassers bei 48 °C	64
b) Im Verlauf der sauren Entschleimung bei 48 °C	64
c) Nach 45 Minuten saurer Entschleimung bei 48 °C	65
Abbildung 4.2.4: <i>In-situ</i> -mikroskopische Aufnahmen der enzymatischen Entschleimung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe der restlichen wässrigen Phase.	
a) Zwei Zeitpunkte unmittelbar nach Zugabe der wässrigen Phase bei 48 °C	66
b) Wachstumsphase während der enzymatischen Entschleimung bei 48 °C	66
c) Im Verlauf der enzymatischen Entschleimung bei 48 °C	67
d) Nach 45 Minuten enzymatischer Entschleimung bei 48 °C	67
Abbildung 4.3.1: Kalibrierung: Extinktion über die Konzentration von pNP	69
Abbildung 4.3.2: Nicht modifizierte PLA1; a) Konzentrations-Zeit-Verlauf der pNP-Umsetzung für drei Enzymmengen, b) linearer Bereich der Verläufe aus a) mit eingefügter Ausgleichskurve	70
Abbildung 4.3.3: Modifizierte PLA1 (die Indizes -1 bzw. -2 repräsentieren die Messungen 1 und 2): a) linearer Bereich der Konzentrations-Zeit-Verläufe der Modifikationen mit SA2, b) linearer Bereich der Konzentrations-Zeit-Verläufe der Modifikationen mit Test1	71
Abbildung 4.3.4: Oberflächenspannungen beim Einsatz des MES-Puffers bei pH 6 sowie des TrisHCl-Puffers bei pH 8, unterschiedlichen Peptidkonzentrationen, bei 25 °C	73
Abbildung 4.3.5: Ausrichtung von oberflächenaktiven Substanzen bei Überschreiten von CMC in Form einer flexiblen Doppelschicht als Vesikel	74
Abbildung 4.3.6: Gehalt der FFA im entschleimten Sonnenblumenöl nach dem Einsatz verschiedener Kombinationen der wässrigen Phase	75
Abbildung 4.3.7: Modellansatz zur Verbesserung der Enzymaktivität mit Hilfe gekoppelter Peptide	76
Abbildung 4.3.8: Strukturformeln der relevanten Aminosäuren: a) Asparaginsäure, b) Glutaminsäure	76
Abbildung 4.3.9: Ergebnisse der Entschleimung in Verbindung mit den Enzym-Peptid-Konjugaten, Phosphorkonzentration und Restöl im Schleim, b) Spurenelemente	77
Abbildung 4.3.10: Kategorien ermittelter Verluste der Entschleimung a) Massenteil der Schleimphase, b) Gesamtölverlust	79
Abbildung 4.4.1: Einfluss des Probenvolumens auf die Trenneigenschaften bei konstanter aufgetragener Probenmasse von 1 µg je GL-Standard	81
Abbildung 4.4.2: Spektrenscans nach einer Derivatisierung von MGDG a) mit Schwefelsäure, b) mit Kupfersulfatreagenz	82
Abbildung 4.4.3: Messergebnisse für die Derivatisierung mit Schwefelsäure a) Peakhöhe, b) Peakfläche	84
Abbildung 4.4.4: Messergebnisse für die Derivatisierung mit dem Kupfersulfatreagenz a) Peakhöhe, b) Peakfläche	85
Abbildung 4.4.5: Chromatogramm mit einer GL-Standard-Mischung; individuelle GL-Konzentration 0,5 µg/mL, Fließmittelfront 80 mm, Derivatisierung mit der Kupfersulfatreagenz, heizen bei 135 °C für 10 Minuten sowie Detektion bei einer Wellenlänge von 370 nm	86
Abbildung 4.4.6: Kalibrierkurve für DGDG mit der Peakfläche auf einem Konfidenzniveau von 0,95 mit den entsprechenden Konfidenzbändern	88

Abbildung 4.4.7: Chromatogramm der Schleimprobe von SFO2, Fließmittelfront 80 mm, Derivatisierung mit dem Kupfersulfatreagenz, heizen bei 135 °C für 10 Minuten sowie Detektion bei einer Wellenlänge von 370 nm. Verdünnungsreihe 1:2	90
Abbildung 4.4.8: Normalisierte GL-Massen der untersuchten Öle SFO1, SFO2, SBO	92
Abbildung 4.4.9: Normalisierte GL-Massen für SFO1 mit und ohne Einsatz von Enzymen	93
Abbildung A1: Anteil unterschiedlicher Ölfrüchte an der weltweiten Ölproduktion im zeitlichen Vergleich: a) 1935; b) 1990	A
Abbildung A2: Produktionsmengen pflanzlicher Öle weltweit [Mio. t/a], seit dem Jahr 1910 sowie Prognose ab 2015 bis 2022, im Verhältnis zur weltweiten Bevölkerungsentwicklung	B
Abbildung A3a: Nutzung der weltweit produzierten pflanzlichen Öle [Mio. t/a] im Vergleich der Einsatzgebiete: a) Entwicklung Nahrungsmittel – Industrielle Nutzung seit 2001	B
Abbildung A3b: Nutzung der weltweit produzierten pflanzlichen Öle [Mio. t/a] im Vergleich der Einsatzgebiete: Prognose Nahrungsmittel – Biokraftstoffe bis 2022	C
Abbildung A4a: Produktionsmengen pflanzlicher Öle weltweit [Mio. t/a], im Vergleich Haupterzeuger-länder mit der EU für das Erntejahr 2014/2015: Sonnenblumenöl	C
Abbildung A4b: Produktionsmengen pflanzlicher Öle weltweit [Mio. t/a], im Vergleich Haupterzeuger-länder mit der EU für das Erntejahr 2014/2015: a) Rapsöl; b) Sojaöl	D
Abbildung A5: Preisentwicklung [US\$/t] pflanzlicher Öle und Ölsaaten weltweit im Zeitraum von Januar 2009 bis August 2014: a) Vergleich der Hauptölsorten Palm-*, Soja-**,Raps-** und Sonnenblumenöl***	E
Abbildung A6: Produktionsmengen (Mio t/a), der in der EU produzierten Ölsaaten für das Erntejahr 2014/2015	G
Abbildung A7: Produktionsmengen (Mio t/a), der in Deutschland produzierten Ölsaaten für das Erntejahr 2014	G
Abbildung A8: Produktionsmengen (Mio t/a) Sonnenblumensaaten in den Haupterzeugerländer der EU im Vergleich mit Deutschland für das Erntejahr 2014/2015	H
Abbildung A9: Produktionsmengen (Mio t/a) Rapssaaten in den Haupterzeugerländer der EU im Vergleich mit Deutschland für das Erntejahr 2014/2015	H

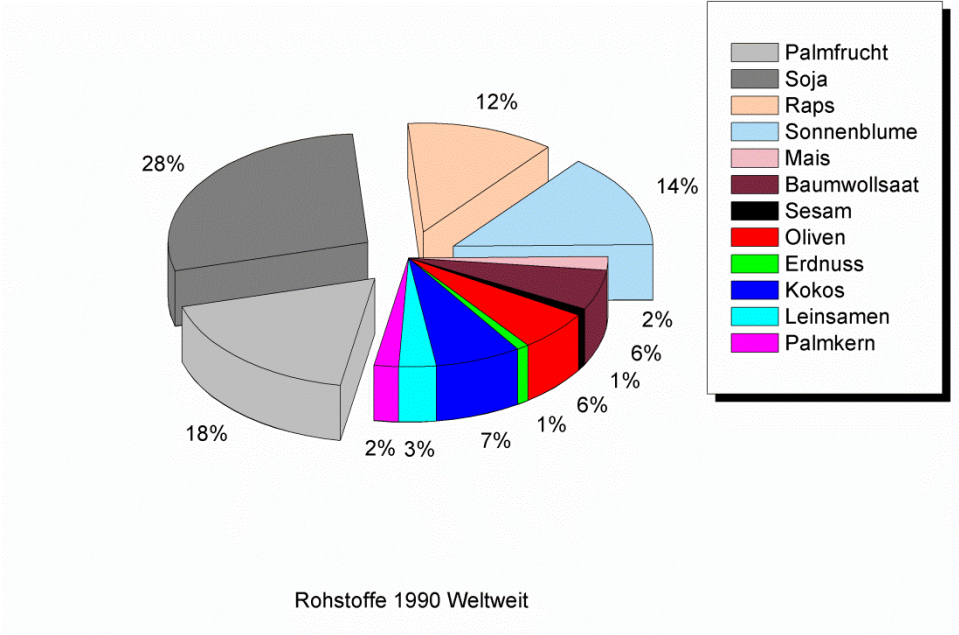
Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1: Massenverhältnis von Schale und Ölgehalt sowohl in der historischen Entwicklung als auch unter Berücksichtigung gezüchteter Varianten, angebaut im gleichen Jahr, in der gleichen Region	4
Tabelle 2.1.2: Fettsäurekomposition verschiedener Sonnenblumenöle	5
Tabelle 2.1.3: Mögliche Permutationen der Fettsäuren im Triglyceridmolekül sowie deren Verteilung in verschiedenen Ölen	6
Tabelle 2.1.4: Verteilung der vier PL in Rohölen unter Berücksichtigung sowohl verschiedener gezüchteter Saatvarianten als auch unterschieden nach der Methode der Ölgewinnung	7
Tabelle 2.4.1: Kommerziell verfügbare und industriell eingesetzte Enzyme	19
Tabelle 4: Inhaltsstoffe Sonnenblumenöl 1	43
Tabelle 4.1.1: Wertetabelle zur Entschleimung mit unterschiedlich zusammengesetzten wässrigen Phasen. Probennahme nach 30 Minuten. Amylasen (3 - 8) je 1 U/g in Kombination mit 0,3 U/g PLA1	45
Tabelle 4.3.1: Aktivitätsdaten PLA1 bei variiertes Enzymmenge und Enzymmodifikationen	70
Tabelle 4.3.2: Daten zur Oberflächenspannung bei Variation des Puffersystems und der Peptidkonzentration	73
Tabelle 4.4.1: R_f –Werte der GL-Standards als Mittelwerte aus allen untersuchten Konzentrationen	81
Tabelle 4.4.2: Für die weiteren Untersuchungen ausgewählte Wellenlängen	83
Tabelle 4.4.3: Verdünnungsreihe der GLStandards und sich ergebende Probenmassen bei der Kalibrierung	87
Tabelle 4.4.4: Kalibriergleichungen für GL-Standards, Bestimmtheitsmaße, Testkriterien, a) Peakfläche, b) Peakhöhe	87
Tabelle 4.4.5: Detektierbarkeit der einzelnen GL bei unterschiedlichen Stufen der Verdünnung, am Beispiel von SFO2	89
Tabelle 4.4.6: Wertetabelle zum GL-Gehalt der untersuchten Öle SFO1, SFO2, SBO	91

Anhang A1 – Pflanzenöle weltweit



a)



b)

Abbildung A1: Anteil unterschiedlicher Ölfrüchte an der weltweiten Ölproduktion im zeitlichen Vergleich: a) 1935; b) 1990 [1, S. 23].

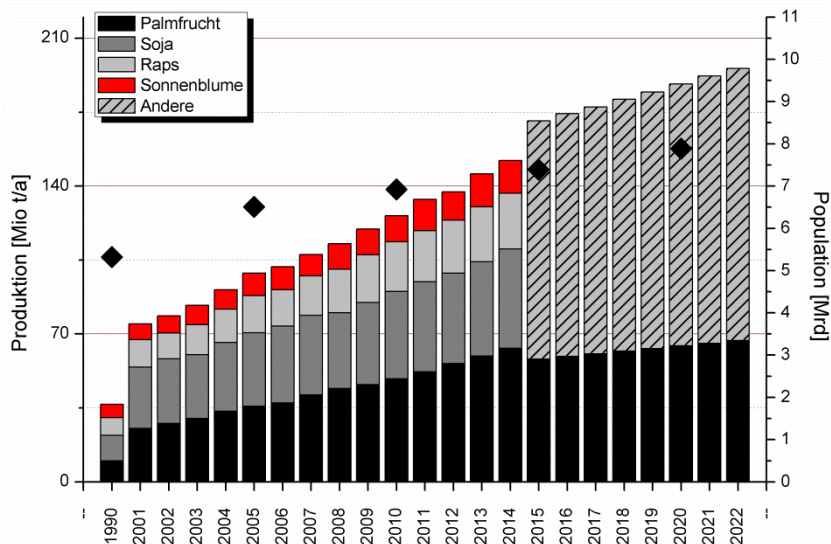


Abbildung A2: Produktionsmengen pflanzlicher Öle weltweit [Mio. t/a], seit dem Jahr 1910 sowie Prognose ab 2015 bis 2022, im Verhältnis zur weltweiten Bevölkerungsentwicklung. 1910 – 1990 [1, S. 24], 2001 – 2014 [2], 2015 – 2022 [4, S. 274], Bevölkerung [3].

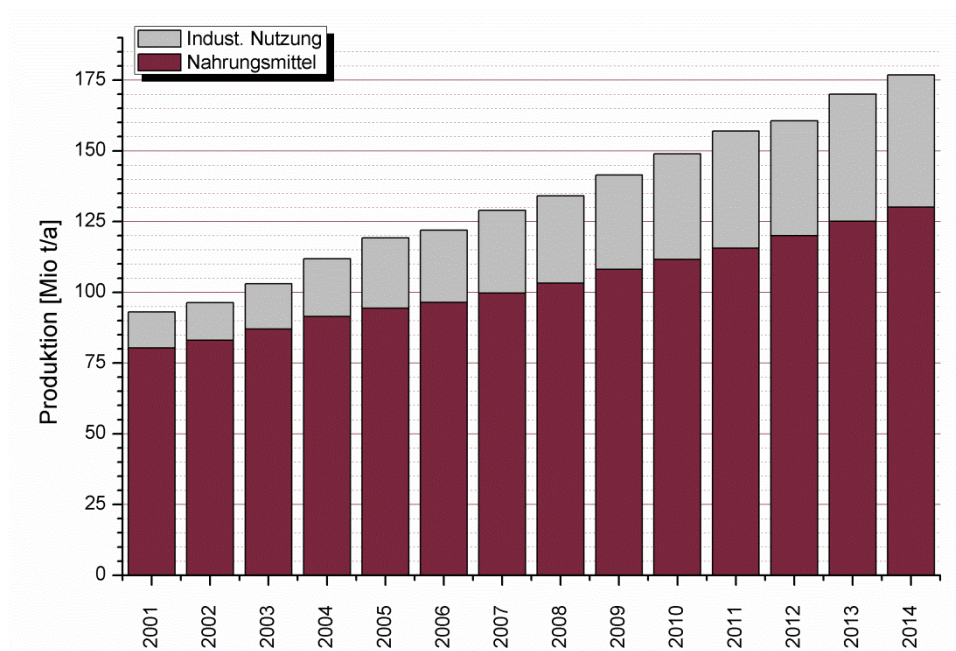


Abbildung A3a: Nutzung der weltweit produzierten pflanzlichen Öle [Mio. t/a] im Vergleich der Einsatzgebiete: a) Entwicklung Nahrungsmittel – Industrielle Nutzung seit 2001 [2].

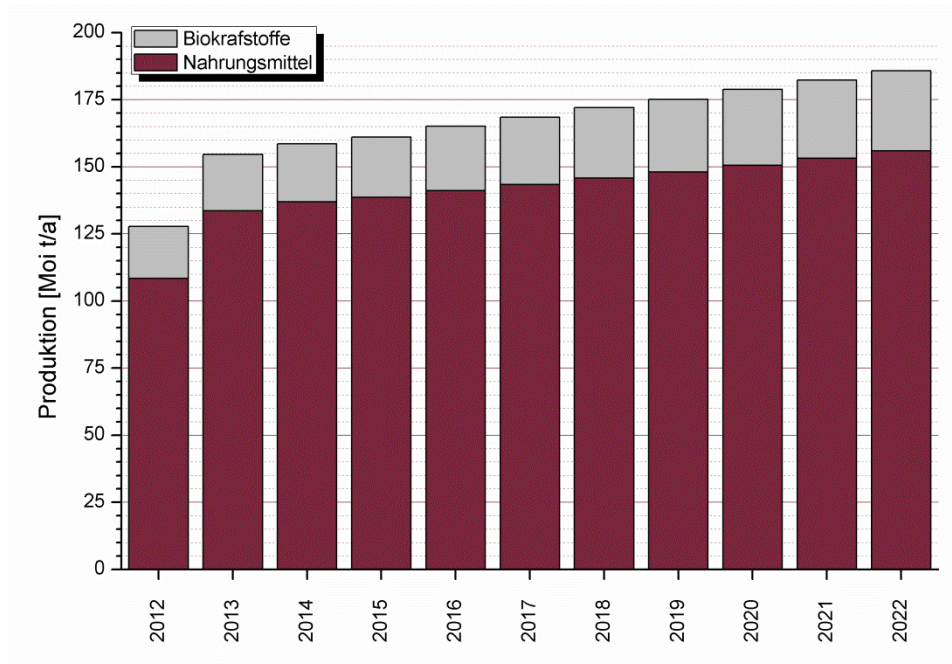


Abbildung A3b: Nutzung der weltweit produzierten pflanzlichen Öle [Mio. t/a] im Vergleich der Einsatzgebiete: Prognose Nahrungsmittel – Biokraftstoffe bis 2022 [4, S. 274].

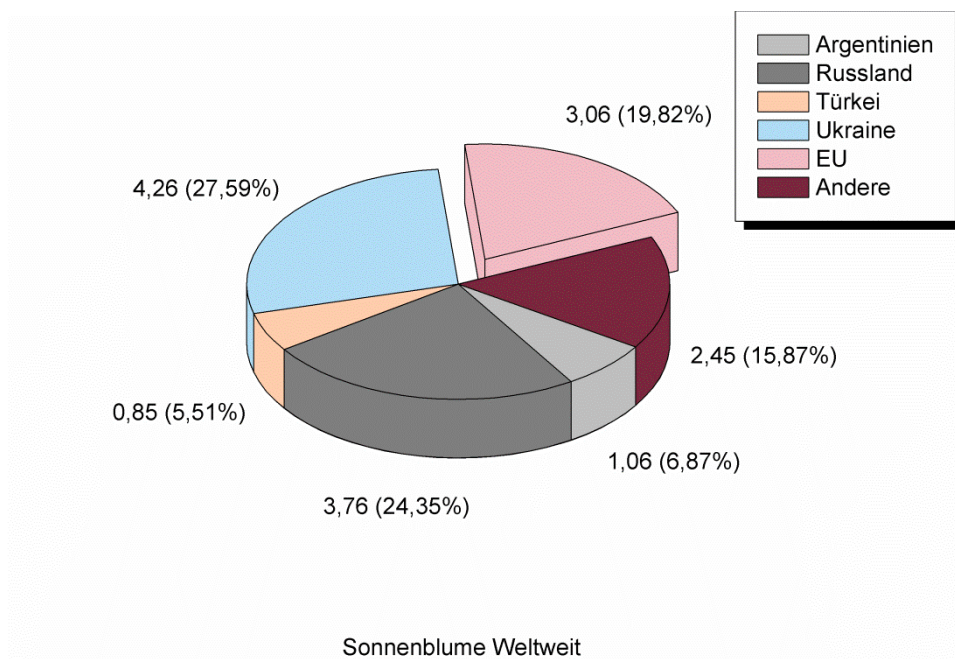
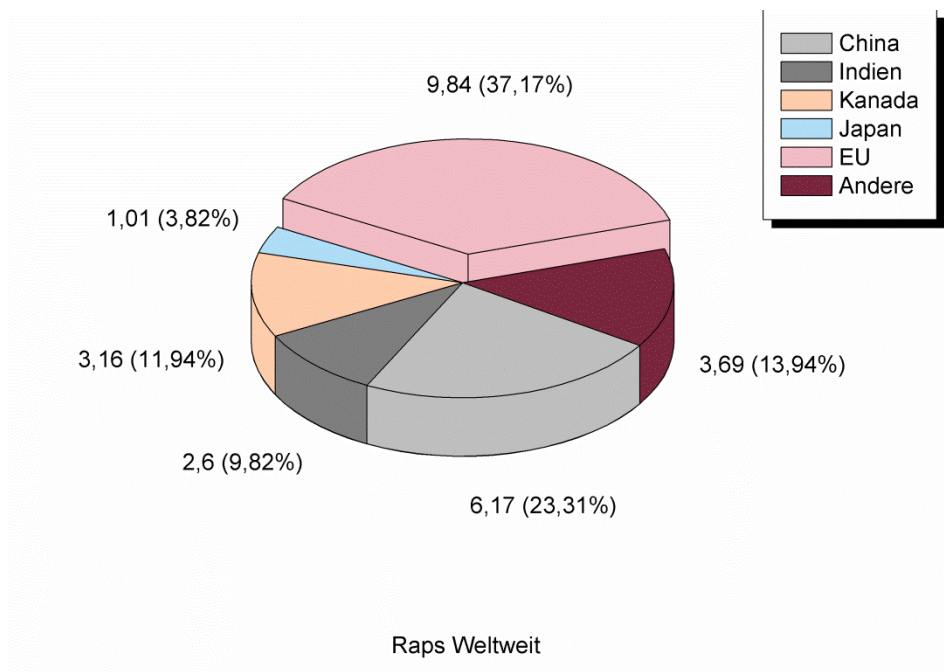
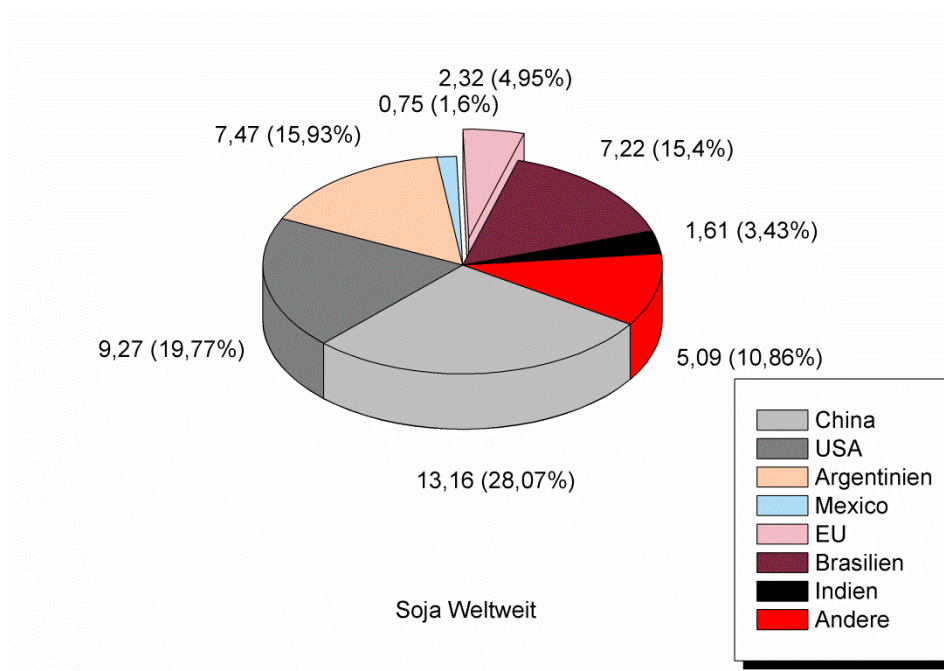


Abbildung A4a: Produktionsmengen pflanzlicher Öle weltweit [Mio. t/a], im Vergleich Haupterzeugerländer mit der EU für das Erntejahr 2014/2015: Sonnenblumenöl [2].



a)



b)

Abbildung A4b: Produktionsmengen pflanzlicher Öle weltweit [Mio. t/a], im Vergleich Haupterzeugerländer mit der EU für das Erntejahr 2014/2015: a) Rapsöl; b) Sojaöl [2].

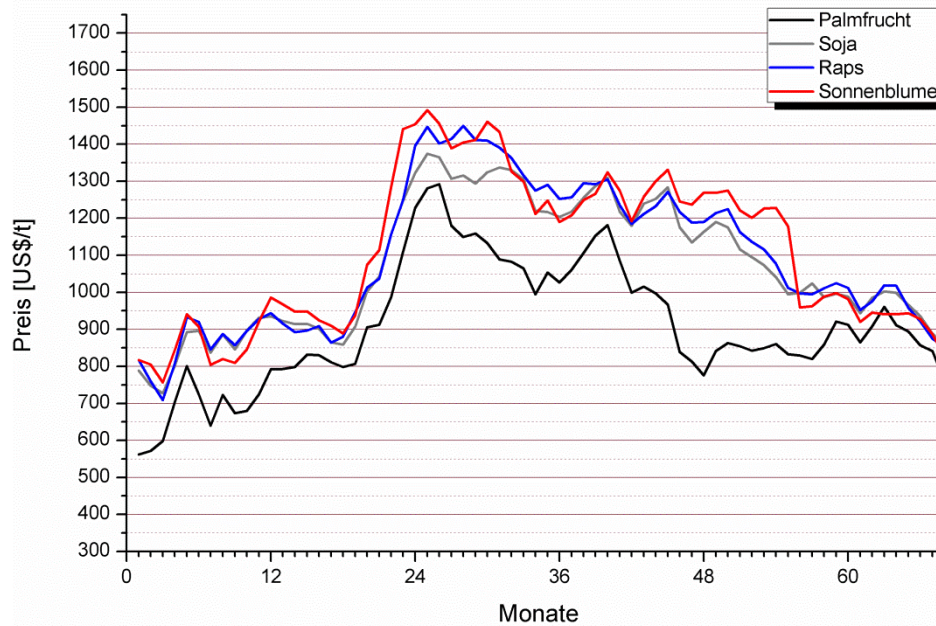


Abbildung A5: Preisentwicklung [US\$/t] pflanzlicher Öle und Ölsaaten weltweit im Zeitraum von Januar 2009 bis August 2014: a) Vergleich der Hauptölsaaten Palm-*, Soja-**,Raps-** und Sonnenblumenöl***; [5]. * Preis cif North West Europe, Crude ** Preis fob Exmill, Dutch *** Preis fob North West European Ports

Tabelle A1: Entwicklung der jährlichen Erträge an Sonnenblumensaat [t/(ha a)] in Deutschland sowie den wichtigsten innereuropäischen und weltweiten Anbauregionen seit 1935 bis 2014.

Region	Erntejahr																	
	35	50	60	70	80	89	96	99	00	03	04	05	06	07	11	12	13	14
EU							1,66	1,55	1,74	1,76	2,15	2,01	2,14	2,50	1,98	1,68	2,00	1,76
ROU	0,89		0,97	1,30	1,64	2,39				1,27	1,59	1,38	1,54		1,89	1,37	2,00	2,12
BGR	0,85		1,45	1,59	1,72	1,87									1,93	1,78	2,25	2,38
FRA		0,93	1,18	1,61	2,35	2,31				2,18	2,37	2,34	2,23	2,52	2,54	2,32	2,05	2,50
HUN	0,97	0,98	1,32	1,41	1,79	2,06				1,94	2,47	2,17	2,21	2,07	2,37	2,14	2,49	2,24*
DEU							2,36	2,51	2,48	1,97	2,21	2,48	2,11	2,19	1,98	2,38	2,10	2,39
SU	0,59		0,94	1,28	1,14	1,63	0,89	0,87	0,99									
RUS										1,00	1,02	1,19	1,14	1,13				
UKR										1,12	0,89	1,28	1,36	1,22				
USA	0,88			0,93	1,32	1,10	1,54	1,41	1,53									
ARG	0,88	0,76	0,65	0,85	0,93	1,59	1,72	1,65	1,59	1,60	1,72	1,90	1,74	1,49				
IND							0,58	0,61	0,62	0,46	0,55	0,62	0,58	0,78				
CHN			1,20	1,27	1,10	1,21	1,72	1,73	1,68	1,49	1,66	1,89	1,80	1,77				
TUR		0,83	0,90	1,09	1,26	1,51	1,26	1,33	1,12									
YUG	1,55	0,90	1,32	1,41	1,79	2,06												
ZAF							1,24	1,34	1,22									
Andere							0,90	0,93	0,92									

1935 – 1998 [1, S. 193]

1996 – 2000, außer DEU [6, S. 132]

2003 – 2007, außer EU-Länder [7, S. 9]

DEU 1996 – 2005 [8], 2006 – 2013 [9]

2003 – 2014 EU-Länder, nur 2014 inkl. DEU [10]

* Schätzung basierend auf den durchschnittlichen Erntemengen der Jahre 2011, 2012, 2013

Tabelle A2: Entwicklung der jährlichen Anbauflächen für Sonnenblumensaat [Mio. ha] in Deutschland sowie den wichtigsten innereuropäischen und weltweiten Anbauregionen seit 1935 bis 2014.

Region	Anbaufläche											
	96	99	00	03	04	05	06	07	11	12	13	14
EU	2,16	2,00	1,92	3,65	3,20	3,03	3,22	1,95	4,34	4,24	4,56	4,25
ROU				1,19	0,98	0,97	0,99		0,99	1,02	1,07	1,02
BGR									0,75	0,78	0,86	0,80
FRA				0,69	0,62	0,65	0,64	0,52	0,74	0,68	0,77	0,66
HUN				0,51	0,48	0,51	0,53	0,51	0,59	0,62	0,60	0,62
DEU	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02
SU	7,13	8,52	7,99									
RUS				4,88	4,71	5,41	5,94	5,00				
UKR				3,81	3,43	3,69	3,91	3,41				
USA	1,20	1,39	1,06									
ARG	3,16	3,48	1,94	2,33	1,84	1,92	2,17	2,35				
IND	1,65	1,43	1,30	2,00	2,16	2,34	2,12	1,88				
CHN	0,88	1,02	1,07	1,17	0,94	1,02	1,03	1,02				
TUR	0,57	0,60	0,52									
ZAF	0,55	0,40	0,52									
Andere	1,41	1,53	1,51									

1996 – 2000, außer DEU [6 S. 132], 2003 – 2007, außer EU-Länder [7, S. 9]

DEU 1996 – 2005 [8], 2006 – 2013 [9], 2003 – 2014 EU-Länder, nur 2014 inkl. DEU [10]

Anhang A2 – Pflanzenöle in der Europäischen Union

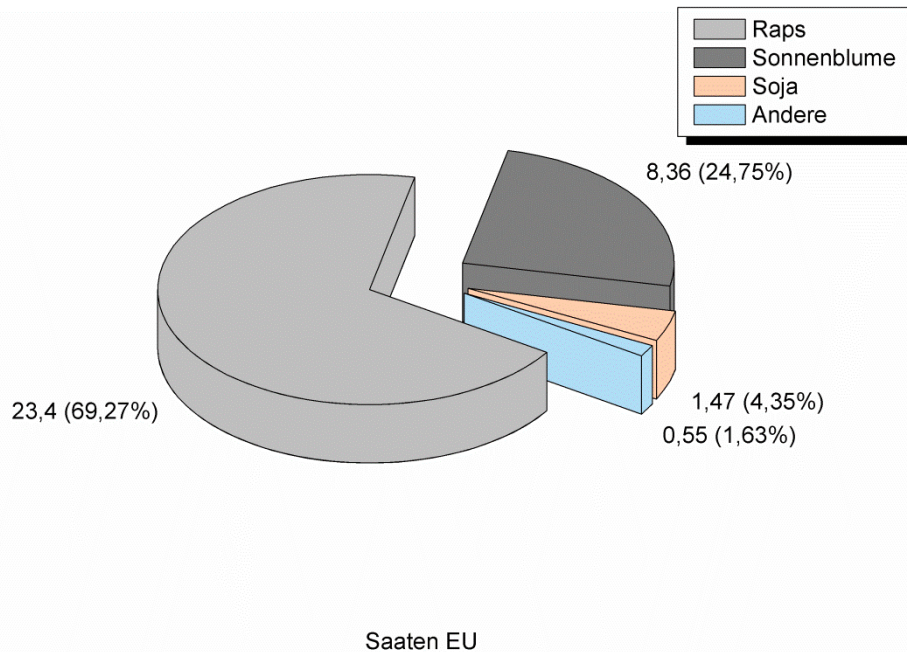


Abbildung A6: Produktionsmengen (Mio t/a), der in der EU produzierten Ölsaaten für das Erntejahr 2014/2015 [2].

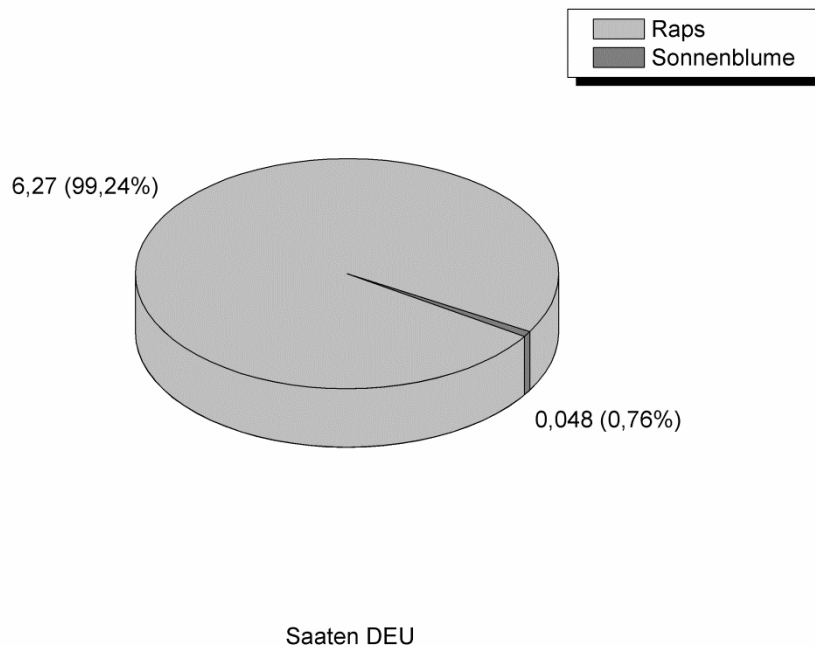


Abbildung A7: Produktionsmengen (Mio t/a), der in Deutschland produzierten Ölsaaten für das Erntejahr 2014 [10].

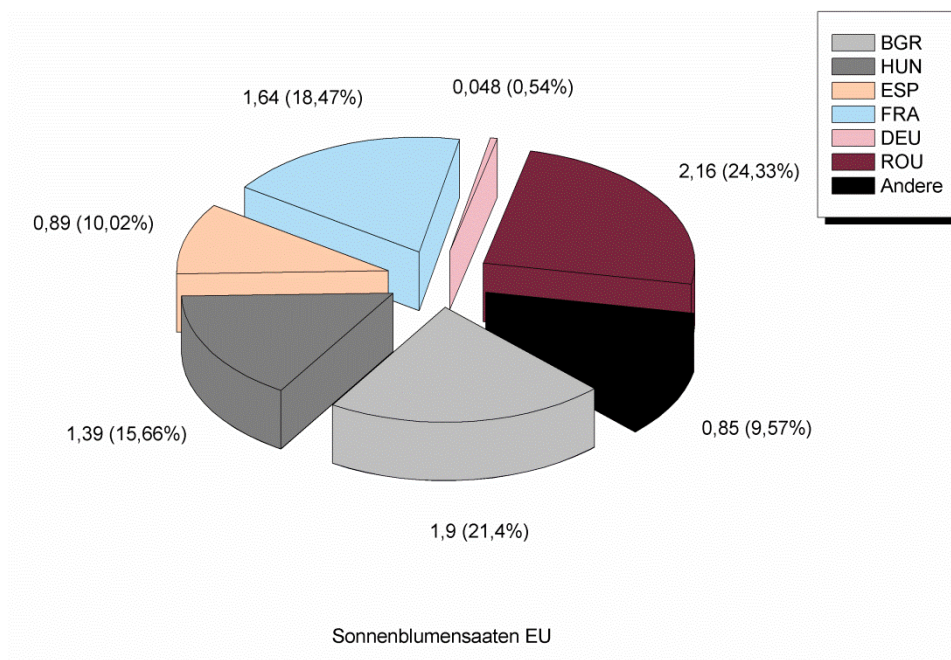


Abbildung A8: Produktionsmengen (Mio t/a) Sonnenblumensaat in den Haupterzeugerländer der EU im Vergleich mit Deutschland für das Erntejahr 2014/2015 [10].

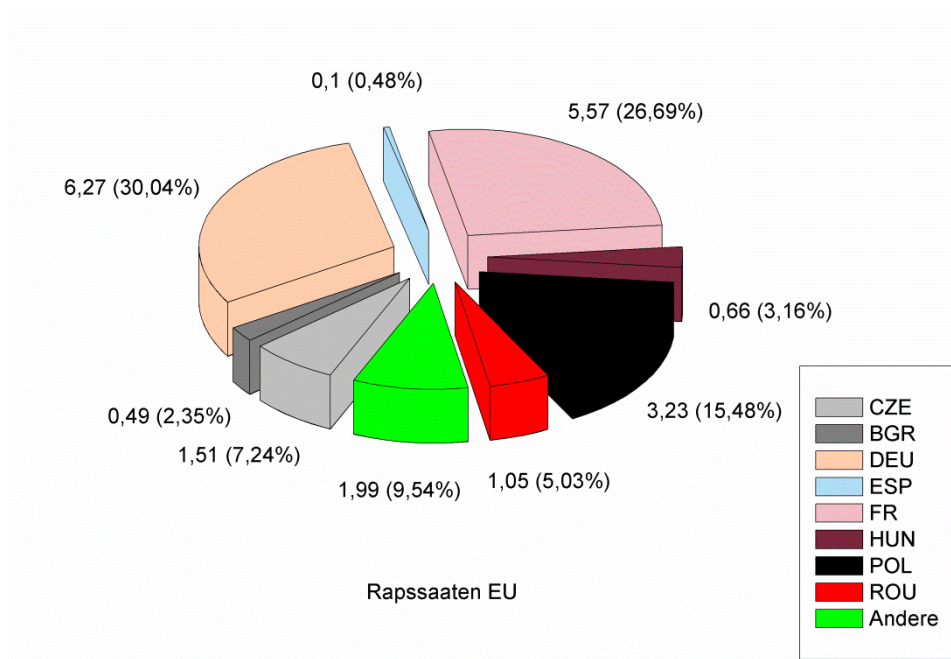


Abbildung A9: Produktionsmengen (Mio t/a) Rapssaat in den Haupterzeugerländer der EU im Vergleich mit Deutschland für das Erntejahr 2014/2015 [10].

Anhang B1 – Geräteverzeichnis

Gerätebezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Mechanischer Rührer	RZR 2021	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DEU
Rotationsverdampfer	Laborota 4002	
Kühleinheit für Rotationsverdampfer	ROTACOOOL	
Magnetrührer mit Heizung	MR Hei-Standard	
Kälte-Umwälzthermostat	F25	Julabo GmbH, Seelbach, DEU
Reinstwasseranlage	UltraClear	Siemens AG, München, DEU
Eismaschine	ZBE 30-10	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen, DEU
Mikroprozessor pH-Meter	pH211	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, DEU
Laborwaage	PM4800 Deltarange	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DEU
Bildanalysator für Suspensionen	PartAn SI	Microtrac Inc., Montgomeryville, PA, USA
Probenauftrageautomat	LINOMAT5	CAMAGA, Muttenz, CHE
Scanner für Dünnschichtchromatographie	TLC Scanner 4	
Entwicklungskammer für Dünnschichtchromatographie	ADC2	
Tauchvorrichtung für Dünnschichtchromatographie	Chromatogram Immersion Device 3	
Laborzentrifuge	4K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, DEU
Vakuumtrockenschrank	Heraeus Vacutherm VT 6060 P-BL	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Analysenwaage	BP160P	Satorius AG, Göttingen, DEU
Tensiometer	K12	Krüß GmbH, Hamburg, DEU
UV-Spektrometer	UV1800	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, DEU
Umlufttrockenschrank	UFE600	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, DEU
Karl-Fischer Coulometer	Metrohm 831	Deutsche METROHM GmbH & Co. KG, Filderstadt, DEU
ICP-OES	Optima Elmer 8300	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Fettanalyse	FOODLab fat	cdR, Florenz, ITA

Anhang B2 – Chemikalienverzeichnis

Bezeichnung	Summenformel	Hersteller
2-Propanol	C ₃ H ₈ O	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Aceton	C ₃ H ₆ O	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Chloroform	CHCl ₃	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
HPTLC LiChrosphere Platten		Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Kieselgel 40 (0,2-0,5 mm)		Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Methanol	CH ₃ OH	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Natriumchlorid	NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Natriumhydroxid	NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Phosphorsäure	H ₃ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Salzsäure	HCl	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Schwefelsäure	H ₄ SO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Zitronensäure-Monohydrat	C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid	C ₈ H ₁₈ N ₃ Cl	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Monohydrat	C ₆ H ₁₃ NO ₄ S x H ₂ O	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
2-Mercaptoethanol	C ₂ H ₆ OS	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
4-Nitrophenol	C ₆ H ₅ NO ₃	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
4-Nitrophenyl palmitat	C ₂₂ H ₃₅ NO ₄	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
Dinatriumphosphat	Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
Mononatriumphosphat	NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
Triton X-100	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n mit n = 9–10	Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
n-Hexan	C ₆ H ₁₄	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DEU
Glycolipidstandards		
Acylierte Sterylglucoside		Pleasant Gap, PA, USA
Cerebroside		Pleasant Gap, PA, USA
cholesterol beta-D-glucoside		Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
Digalactosyldiglyceride		Pleasant Gap, PA, USA
Monogalactosyldiglyceride		Pleasant Gap, PA, USA
Enzyme		
Amyl. AD11P aus <i>Aspergillus oryzae</i>		Biocatalysts, Cardiff, Großbritannien
Amyl. B Organismus unbekannt		Clariant Produkte GmbH, Moosburg, DEU
Amyl. Delpol 220L aus <i>Aspergillus oryzae</i>		Biocatalysts, Cardiff, Großbritannien
Amyl. Delpol 680P div. Organismen		Biocatalysts, Cardiff, Großbritannien

Amyl. M719L aus <i>Aspergillus oryzae</i> & <i>Bacillus licheniformis</i>		Biocatalysts, Cardiff, Großbritannien
Amylase PET aus <i>Bacillus subtilis</i>		ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel, DEU
Phospholipase A1 aus <i>Thermomces lanuginosus</i>		Sigma-Aldrich Chem. GmbH, München, DEU
Peptide		
Peptid SA2	^N AAVVLLWEE ^C	GenScript Inc. Piscataway, NJ, USA
Peptid Test1	^N AAVVLLWDE ^C	GenScript Inc. Piscataway, NJ, USA

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Oliver Wenzel
Geburtsdatum: 22.09.1982
Geburtsort: Eberswalde
Familienstand: ledig
Nationalität: Deutsch

Beruflicher Werdegang:

04/2015 - **2. Kompanie Aufklärungsbataillon 6 „Holstein“, Eutin**
Kompanieeinsatzoffizier

04/2012 - 03/2015 **Helmut-Schmidt-Universität / Universität der Bundeswehr Hamburg**
Professur für Verfahrenstechnik, insbesondere Stofftrennung
Wissenschaftlicher Mitarbeiter

06/2010 - 04/2012 **Aufklärungslehrkompanie 90, Munster**
Zugführeroffizier

07/2003 - 09/2006 **Deutsches Heer, diverse Dienststellen**
Ausbildung zum Offizier

04/2003 - 06/2003 **Panzergranadierbataillon 182, Bad Segeberg**
Freiwillig Wehrdienstleistender

07/2002 - 03/2003 **Panzergranadierbataillon 182, Bad Segeberg**
Grundwehrdienstleistender

Ausbildung:

09/2006 - 06/2010 **Helmut-Schmidt-Universität / Universität der Bundeswehr Hamburg**
Grund- und Hauptstudium im Studiengang Maschinenbaus,
Vertiefungsstudium in der Fachrichtung Energie- und Umwelttechnik
Abschluss: Diplom-Ingenieur

06/2002 **Alexander-von-Humboldt-Gymnasium, Eberswalde**
Abschluss: Abitur