

# Entwicklung einer Methode zur Integration von Zellaufschluss und Produkt-Aufreinigung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Ingenieurwissenschaften  
(Dr.-Ing.)

vorgelegt von  
Dipl.-Ing. Holger Fröhlich  
aus Ottrau-Schorbach

genehmigt von der Fakultät für Mathematik / Informatik und Maschinenbau  
der Technischen Universität Clausthal

Tag der mündlichen Prüfung  
11. Juli 2014

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Prof. Dr.-Ing. Gunther Brenner

Institut für Technische Mechanik, Lehrstuhl für Strömungsmechanik

Technische Universität Clausthal

Hauptberichtersteller:

Prof. Dr.-Ing. Jochen Strube

Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik

Technische Universität Clausthal

Mitberichtersteller:

Prof. Dr.-Ing. Marcus Grünewald

Institut für Thermo- und Fluidodynamik, Lehrstuhl für Fluidverfahrenstechnik

Ruhr-Universität Bochum

Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik

**Holger Fröhlich**

**Entwicklung einer Methode  
zur Integration von Zellaufschluss  
und Produkt-Aufreinigung**

D 104 (Diss. TU Clausthal)

Shaker Verlag  
Aachen 2014

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Clausthal, Techn. Univ., Diss., 2014

Copyright Shaker Verlag 2014

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-2981-9

ISSN 2193-6560

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • E-Mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen,  
den Glauben zum Handeln.

Max Planck



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Thermische Verfahrens- und Prozesstechnik (ITVP) der Technischen Universität Clausthal entstanden. Nach Abschluss meiner Dissertation möchte ich allen Personen recht herzlich danken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing. Jochen Strube, der mich jederzeit sowohl fachlich als auch menschlich unterstützt hat und damit maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat. Er stand mir mit wegweisenden Anregungen und Ratschlägen zur Seite, war jederzeit präsent und hat durch seine großzügige Förderung und Anleitung zum Fokussieren auf die essentiellen Dinge maßgeblich zu meiner persönlichen Weiterentwicklung beigetragen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Gunther Brenner für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission sowie Herrn Prof. Dr.-Ing. Marcus Grünewald für die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Alfons Vogelpohl danke ich für seine Bereitschaft, jederzeit fachliche als auch persönliche Angelegenheiten im Detail zu diskutieren.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Herren Kurt Gasser, Dr. Simon Gaul, Dr. Thomas Grützner, Dr. Peter Quast sowie Dr. Jürgen Riegler für die zahlreichen und ergebnisreichen Diskussionen. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Schmidt danke ich für die Durchführung der MS- und NMR-Analysen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Reinhard Ditz, der mir mit seiner fachlichen Leidenschaft und Kompetenz kritische Impulse gegeben hat und zudem fachlich und persönlich, zuletzt auch als Bürokollege, immer für mich Zeit gefunden hat.

Einen herzlichen Dank für die schöne Zeit in Clausthal sowie die vielen effizienten wissenschaftlichen als auch aufheiternden privaten Gespräche an die wissenschaftlichen Mitarbeiter des Institutes: Den Kollegen der ersten Doktoranden-Generation Dr. Christian Borrmann, Dr. Florian Grote, Dr. Markus Kaßing sowie Dr. Jab Pablo Josch danke ich für ihre grundlegenden Arbeiten am Institut. Die dadurch geschaffene, solide Basis ermöglichte

mir und meinen Kollegen eine effiziente und erfolgreiche Weiterentwicklung der Arbeitsgruppe.

Bei meinen Kollegen und Freunden Simon Both, Dr. Jan Kristof Eggersgluß und Christoph Helling möchte ich mich zudem besonders für die kritischen Ratschläge sowie die manchmal notwendige Ablenkung bedanken. Des Weiteren danke ich Petra Gronemeyer, Iraj Koudous, Martin Lucke, Holger Thiess und Steffen Zobel. Hervorheben möchte ich die Kollegen Benjamin Stanisch und Tim Wellsandt, die zudem mit ihren von mir betreuten Studien- und Diplomarbeiten einen wertvollen Beitrag zur vorliegenden Arbeit geleistet haben.

Den in der Werkstatt und Laboren hart arbeitenden Mitarbeitern Uwe Halling, Martina Ketterer, Roland Mecke, Wolfgang Otto, Frank Steinhäuser und Volker Strohmeyer danke ich sehr für ihre Einsatzbereitschaft und ihr Engagement. Für die gute Zusammenarbeit hinsichtlich administrativer und organisatorischer Arbeiten am Institut möchte den Damen Karin Müller und Claudia Lacheta herzlich danken. Darüber hinaus danke ich Karin Müller für das Pflegen der familiären Arbeitsatmosphäre, den einfühlsamen Ratschlägen und ihrem für mich jederzeit offenen Ohr.

Danken möchte ich auch meinen zahlreichen Studien- und Diplomarbeitern sowie studentischen Hilfskräften, die sowohl zur vorliegenden Arbeit ihren Beitrag geleistet haben, als auch mit mir zusammen neue Themengebiete angearbeitet und damit maßgeblich zum wissenschaftlichen Fortschritt der Arbeitsgruppe beigetragen haben.

Mein Dank gilt meinen Eltern Rudi und Bettina sowie meiner Schwester Melanie für Ihre Unterstützung auf meinem Weg zum und durch das Studium. Ohne diese könnte ich heute nicht in einer solchen glücklichen Lage sein.

Besonders hervorheben möchte ich meine Freundin Katharina, die mir während der Zeit am Institut stets mit außerordentlichem Einfühlungsvermögen und mit bewundernswerter Geduld sowie voller Kraft zur Seite gestanden hat.

Groß-Umstadt, im Juli 2014

Holger Fröhlich

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Motivation .....	1
1.2. Lösungsweg .....	3
<b>2. Zellaufschluss in der Biotechnologie</b> .....	<b>6</b>
2.1. Mikroalgen – Aufbau und Morphologie .....	7
2.1.1. <i>Eukaryoten</i> .....	7
2.1.2. <i>Systematik der Eukaryoten nach Adl</i> .....	8
2.1.3. <i>Morphologie der Thraustochtriaceae (Ulkenia sp.)</i> .....	9
2.2. Mechanische Zellaufschlussmethoden .....	10
2.2.1. <i>Beanspruchungsarten im mechanischen Zellaufschluss</i> .....	11
2.2.2. <i>Hochdruckhomogenisation</i> .....	13
2.2.3. <i>Rührwerkskugelmühle</i> .....	15
2.2.4. <i>Ultraschallhomogenisator</i> .....	17
2.3. Einflussfaktoren auf das Aufschlussergebnis .....	18
2.3.1. <i>Stabilität der Zellwand</i> .....	18
2.3.2. <i>Biomassekonzentration</i> .....	18
2.3.3. <i>Temperatur</i> .....	18
2.3.4. <i>pH-Wert</i> .....	19
2.3.5. <i>Energieeintrag</i> .....	19
2.3.6. <i>Verweilzeit</i> .....	20
2.3.7. <i>Verfahrensspezifische Faktoren</i> .....	20
<b>3. Bioanalytik</b> .....	<b>22</b>
3.1. Grundlagen und Stand des Wissens .....	22
3.1.1. <i>Emulsionen</i> .....	22
3.1.2. <i>Emulsions-Stabilität</i> .....	23
3.1.2.1. <i>Kolloid-Wechselwirkungen</i> .....	23
3.1.2.2. <i>Stabilität und Spaltung elektrostatisch stabilisierter Emulsionen</i> .....	26

3.1.2.3.	Stabilität und Spaltung polymerstabilisierter Emulsionen .....	27
3.1.3.	<i>Messbare Oberflächeneffekte</i> .....	28
3.1.3.1.	Oberflächenspannung .....	28
3.1.3.2.	Oberflächenladung – Zeta-Potential .....	29
3.1.4.	<i>Chromatographie</i> .....	30
3.1.4.1.	HPLC-RP und -NP .....	33
3.1.4.2.	GC .....	34
3.1.5.	<i>Spektroskopische Analyseverfahren</i> .....	34
3.1.5.1.	Massenspektroskopie (MS) .....	34
3.1.5.2.	Kernresonanzspektroskopie (NMR) .....	36
3.2.	Emulsionscharakterisierung .....	37
3.2.1.	<i>Stabilitäts-Test</i> .....	37
3.2.2.	<i>Oberflächenspannung und -ladung</i> .....	39
3.2.3.	<i>Lipid-Analyse und -Trennung mit Hilfe der Chromatographie</i> .....	45
3.2.3.1.	HPLC-RP .....	45
3.2.3.2.	HPLC-NP .....	46
3.2.3.3.	HPLC-MS .....	47
3.2.3.4.	NMR .....	48
3.3.	Quantitäts- und Qualitätsanalysen .....	49
3.3.1.	<i>Bestimmung der Biotrockenmasse</i> .....	49
3.3.2.	<i>Öl-Analytik</i> .....	50
3.3.2.1.	Gesamt-Öl-Gehalt .....	50
3.3.2.2.	Fettsäurespektrum (GC) .....	50
3.3.3.	<i>Qualitäts-Standards</i> .....	52
3.3.3.1.	Peroxidzahl .....	52
3.3.3.2.	p-Anisidin .....	53
3.3.3.3.	Säurezahl .....	53
3.3.3.4.	Verseifungszahl .....	54
<b>4.</b>	<b>Aufreinigungsverfahren in der Algen-Biotechnologie</b> .....	<b>56</b>
4.1.	Grundlagen und Stand des Wissens .....	56

---

4.1.1.	<i>Downstream von Biomolekülen</i> .....	56
4.1.2.	<i>Extraktion mehrfach ungesättigter Fettsäuren</i> .....	58
4.1.2.1.	Press-Verfahren .....	59
4.1.2.2.	Lösemittelverfahren .....	59
4.1.3.	<i>Refining</i> .....	61
4.1.3.1.	Degumming (Entschleimung) .....	62
4.1.3.2.	Neutralisation (Entsäuerung) .....	65
4.1.3.3.	Bleichung (Entfärbung) .....	66
4.1.3.4.	Desodorierung (Dämpfung) .....	67
4.1.3.5.	Physikalisches Refining .....	67
4.1.4.	<i>Innovative Verfahrenskonzepte</i> .....	67
4.1.4.1.	Kristallisation .....	68
4.1.4.2.	„Schaltbare Lösemittel“ und Überkritische Extraktion .....	68
4.1.4.3.	Membrantechnologie .....	69
4.2.	Entwurf lösemittelfreie Aufreinigung .....	72
4.2.1.	Szenarienanalyse .....	72
4.2.2.	Spezifikationen der Ölqualität .....	74
4.2.3.	Konzept und Verfahrensentwurf .....	76
4.2.3.1.	Integriertes Refining (Degumming) .....	76
4.2.3.2.	Membranbasierte Alternativverfahren .....	76
4.2.3.3.	Salzzugabe .....	77
4.2.3.4.	Ionentauscher .....	77
4.2.3.5.	Elektrokoagulation .....	78
4.2.3.6.	Phaseninversion .....	78
<b>5.</b>	<b>Machbarkeitsstudien</b> .....	<b>80</b>
5.1.	Zellaufschluss .....	80
5.1.1.	<i>Hochdruckhomogenisator</i> .....	81
5.1.2.	<i>Rührwerkskugelmühle</i> .....	82
5.1.3.	<i>Ultraschallhomogenisator</i> .....	85
5.1.4.	<i>Fazit</i> .....	91

5.2. Emulsionscharakterisierung.....	91
5.2.1. HPLC-RP.....	92
5.2.2. HPLC-NP.....	95
5.2.3. NMR / MS.....	97
5.2.4. Methodenabgleich.....	100
5.2.5. Einfluss der Zellaufschlussmethode auf stabilisierende Komponenten.....	104
5.3. Zusammensetzung des Fermentationsgemisches.....	105
5.4. Lösemittelfreie Aufreinigung.....	107
5.4.1. Integriertes Refining.....	108
5.4.2. Salzzugabe.....	108
5.4.3. Ionentauscher.....	109
5.4.4. Elektrokoagulation.....	110
5.4.5. Phaseninversion.....	110
5.4.6. Membranbasierte Verfahren.....	116
5.4.6.1. Hydrophile Membrane.....	116
5.4.6.2. Hydrophobe Membrane.....	122
5.5. Ölanalysen.....	122
5.5.1. PUFA-Gehalt.....	123
5.5.1.1. Phaseninversion.....	123
5.5.1.2. Membranbasierte Verfahren.....	125
5.5.2. Qualität.....	127
5.6. Fazit.....	128
<b>6. Wirtschaftlichkeitsbetrachtung.....</b>	<b>130</b>
6.1. Referenzprozess.....	130
6.2. Lösemittelfreier Aufreinigungsprozess.....	133
6.3. Fazit.....	136
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>139</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>143</b>

---

<b>9. Symbolverzeichnis .....</b>	<b>163</b>
9.1. Formelzeichen .....	163
9.2. Griechische Symbole.....	164
9.3. Indizes .....	165
9.4. Abkürzungen .....	165
<b>10. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>168</b>
<b>11. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>171</b>
<b>12. Anhang.....</b>	<b>172</b>
12.1. m/z-Chromatogramme der MS-Analysen.....	172
12.2. Systematische Namen der stabilisierenden Substanzen .....	177
12.3. Chromatogramme der $^1\text{H}$ -NMR-Analysen .....	178