

Verhalten von Enzymen und Farbstoffen in Lösungen kationischer und nichtionischer Tenside

Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber und Safranin

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg

von
Christine Schirmer
Regensburg 2001

Promotionsgesuch eingereicht am: 06. Juli 2001

Tag des Kolloquiums: 31. Juli 2001

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. W. Kunz

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. H. Krienke
Prof. Dr. W. Kunz
PD Dr. R. Buchner
Prof. Dr. B. König

meinen Eltern

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1998 bis Juni 2001 am Lehrstuhl für Chemie VI - Physikalische und Theoretische Chemie - der naturwissenschaftlichen Fakultät IV - Chemie und Pharmazie - der Universität Regensburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Werner Kunz danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für die Betreuung, sein stetes Interesse und den gewährten wissenschaftlichen Freiraum während der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gebührt ebenfalls Herrn PD Dr. Richard Buchner, dessen Korrekturvorschläge und Anregungen sehr hilfreich bei der schriftlichen Darstellung der Arbeit waren.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Schmeer für die Erlaubnis, das UV/Vis-Spektrophotometer CARY 3E von VARIAN für die notwendigen UV/Vis-Messungen verwenden zu dürfen.

Frau M. Sc. Yan Liu danke ich besonders für die Durchführung der enzymatischen Messungen in den ternären Systemen $C_{12}E_{23}$ /Alkohol/Glycin-Puffer und die gute Zusammenarbeit.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Harald Preu für die angeregten Diskussionen sowie seine Unterstützung bei Problemen mit L^AT_EX bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Roland Neueder – ebenso allen weiteren nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Lehrstuhls – sowie Herrn Dr. Hans-Joachim Wittmann für ihre humorvolle und kollegiale Art .

Den Mitarbeitern der Werkstätten der Universität, die mehrfach die Thermostatisiereinheit des UV/Vis-Spektrophotometers reparierten sowie Thermostaten wieder gangbar machten, danke ich für die prompte Erledigung der Aufträge.

Lumpi, Flo, Leo (†), Niki (†) und Tipsy möchte ich für die Erhaltung meiner geistigen Gesundheit danken.

Schließlich gebührt noch meinen Eltern herzlicher Dank, denn durch ihre Unterstützung ermöglichten sie mir das Studium und die Promotion.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	i
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Tenside	3
2.1.1 Definition und Einteilung der Tenside	3
2.1.2 Herstellung von Tensiden	5
2.1.3 Assoziatbildung der Tenside	6
2.2 Enzyme	18
2.2.1 Proteinstruktur	19
2.2.2 Stabilität der Proteinstruktur	19
2.2.3 Wechselwirkungen von Tensiden mit Proteinen	21
2.2.4 Enzymkinetik	24
2.3 UV/Vis-Spektroskopie	33
2.3.1 Das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz	33
2.3.2 Komplexe zwischen zwei Komponenten	35
2.3.3 Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit ...	41
2.4 Leitfähigkeitsmessungen	42
3 Experimenteller Teil	45
3.1 Apparatives	45
3.1.1 Thermostatisierung	45
3.1.2 UV/Vis-Spektroskopie	45
3.1.3 pH-Wert und Leitfähigkeit	47
3.2 Experimentelles	48
3.2.1 Verwendete Chemikalien	48
3.2.2 Herstellung der verwendeten Lösungen	50
3.2.3 Durchgeführte Experimente	51
4 Darstellung und Auswertung der Meßergebnisse	61
4.1 Phasendiagramme der ternären Systeme C_x TAB/1-Hexanol/Wasser	61
4.2 Bestimmung der CMC ... aus Leitfähigkeitsmessungen	65
4.2.1 Lineare Auftragungen von κ und κ/c	65
4.2.2 Logarithmische Auftragungen κ und κ/c	68
4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Auftragungen von κ und κ/c	71
4.3 UV/Vis-Spektren von Safranin T in unterschiedlichen Lösungen	72

4.3.1	ST in wäßrigen C_x TAB-Lösungen – Bestimmung der CMC ...	72
4.3.2	ST in (pseudo-) binären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer	82
4.3.3	ST in ternären Lösungen C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlverhältnissen ...	89
4.3.4	UV/Vis-Spektren von ST in reinem Wasser	91
4.3.5	UV/Vis-Spektren von ST in verschiedenen Lösungsmitteln	93
4.3.6	ST in ternären Lösungen C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer mit C_{12} TAB/1-Hexanol = 1:1	96
4.3.7	Bestimmung von Komplexbildungskonstanten und Aggregationszahlen mittels ST ...	98
4.4	Aktivität von HLADH in C_x TAB-haltigen und -freien Lösungen	111
4.4.1	Aktivität von HLADH in 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösungen	111
4.4.2	Aktivität von HLADH in 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösungen varierender Ionenstärke	112
4.4.3	Aktivität von HLADH in 1-Hexanol-Lösungen verschiedener Konzentration	113
4.4.4	Aktivität von HLADH in pseudobinären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer	114
4.4.5	Aktivität von HLADH in ternären Lösungen mit C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlenverhältnissen C_{12} TAB/1-Hexanol	118
4.4.6	Aktivität von HLADH in Mischungen mit hoher 1-Hexanol- und mittlerer C_{12} TAB-Konzentration	121
4.5	Ergebnisse der Wiederholung ... der Enzymtests aus der Diplomarbeit	127
4.5.1	Aktivität von HLADH in binären Systemen Alkohol/Glycin-Puffer ohne Tensid	128
4.5.2	Aktivität von HLADH in ternären Systemen C_{12} E ₂₃ /Alkohol/Glycin-Puffer	131
4.5.3	Aktivität von HLADH im Bereich der CMC von C_{12} E ₂₃ in Ethanol- bzw. 1-Pentanol-haltigen Lösungen	141
5	Diskussion der Ergebnisse	143
5.1	Vergleich der gemessenen CMC-Werte mit Literaturdaten	143
5.2	UV/Vis-Spektren von ST in verschiedenen Medien	145
5.2.1	Begründung für die Verwendung von ST ...	145
5.2.2	Klärung der Frage, warum sich die CMC von C_{14} TAB ...	146
5.2.3	UV/Vis-Spektren von ST in reinem Wasser	149
5.2.4	Versuch der Klärung der Frage, um welchen Farbstoff ...	149
5.2.5	Bestimmung von Komplexbildungskonstanten und Aggregationszahlen mittels ST	152
5.3	HLADH in C_x TAB-haltigen und -freien Lösungen	153
5.3.1	Auswahl des Puffers für die Untersuchungen von HLADH in Lösungen mit und ohne C_x TAB	153
5.3.2	Einfluß der Ionenstärke auf die Aktivität von HLADH	154
5.3.3	HLADH in 1-Hexanol-Lösungen verschiedener Konzentration	154
5.3.4	HLADH in pseudobinären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer	155
5.3.5	HLADH in ternären Lösungen C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlenverhältnissen C_{12} TAB/1-Hexanol	161

5.3.6	HLADH in Mischungen mit hoher 1-Hexanol-Konzentration und mittlerer C _x TAB-Konzentration	163
5.4	HLADH in C ₁₂ E ₂₃ -haltigen und -freien Lösungen	165
5.4.1	HLADH in binären Systemen Alkohol/Glycin-Puffer ohne Tensid	165
5.4.2	HLADH in ternären Systemen mit C ₁₂ E ₂₃ /Alkohol/Glycin-Puffer	166
5.4.3	HLADH im Bereich der CMC von C ₁₂ E ₂₃ in Ethanol- bzw. 1-Pentanol-haltigen Lösungen	168
6	Zusammenfassung und Ausblick	169
A	Ergänzungen zu den Untersuchungen an ST-haltigen Lösungen	171
A.1	Korrekturverfahren für die ST-haltigen und tensidfreien Lösungen	171
A.2	Fehlerabschätzung bei der Berechnung ...	173

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung ionischer und nichtionischer Tenside	3
2.2	Beispiele für ionische und nichtionische Tenside	4
2.3	Phasendiagramm eines binären Tensid/Wasser-Systems (nach [7])	7
2.4	Allgemeine Form eines ternären Phasendiagramms (nach [8])	7
2.5	Phasendiagramm des ternären Systems Lecithin-Wasser-Cyclohexan (aus [9])	8
2.6	Normale Mizellen ionischer bzw. nichtionischer Tenside (nach [7])	9
2.7	CMC im System C ₁₂ TAB/1-Hexanol/Wasser als Funktion des Verhältnisses $c(1\text{-Hexanol})/c(\text{C}_{12}\text{TAB})$ [10]	12
2.8	Tensidassoziate in direkten und inversen Mikroemulsionen (nach [7])	14
2.9	Änderungen verschiedener physikalischer Meßgrößen (ΔY) als Funktion der Tensidkonzentration	15
2.10	Chemische Struktur von NAD ⁺ und NADH (nach [11] und [12])	18
2.11	Die räumliche Struktur von Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH), mit NAD ⁺ und Dimethylsulfoxid (DMSO) komplexiert	20
2.12	Denaturierung eines Proteins in zwei Schritten durch die Wechselwirkung mit SDS (nach [13] und [12])	22
2.13	Die wichtigsten reversiblen Hemm-Mechanismen	27
2.14	Zeitlicher Verlauf der aus der Michaelis-Menten-Gleichung berechneten Produktkonzentration für verschiedene Substratkonzentrationen	31
2.15	Absorption von Licht	33
3.1	Schematischer Aufbau eines Zweistrahlspektrophotometers	46
3.2	UV/Vis-Spektrum und Lage der Maxima von NAD ⁺ und NADH	46
3.3	Chemische Struktur der Pufferbestandteile	48
3.4	Struktur des Farbstoffes Safranin T [14]	50
3.5	Struktur des Farbstoffes Safranin O [14]	50
3.6	Beseitigung des „Umschaltknicks“ im UV/Vis-Spektrum durch Subtraktion von Probe- und Referenzspektrum	53
3.7	Bestimmung der Anfangsextinktionsänderung aus Meßdaten	56
3.8	Anfangsextinktionsänderung von Standard- und Probelösungen	57
3.9	Gemittelte Enzymaktivität	57
4.1	Phasendiagramm des Systems C ₆ TAB/1-Hexanol/Wasser	61
4.2	Phasendiagramm des Systems C ₈ TAB/1-Hexanol/Wasser	62
4.3	Phasendiagramm des Systems C ₁₀ TAB/1-Hexanol/Wasser	62
4.4	Phasendiagramm des Systems C ₁₂ TAB/1-Hexanol/Wasser	63
4.5	Phasendiagramm des Systems C ₁₄ TAB/1-Hexanol/Wasser	63
4.6	Phasendiagramm des Systems C ₁₆ TAB/1-Hexanol/Wasser	64

4.7 Auftragung von κ und κ/c als Funktion der C ₆ TAB-Konzentration	65
4.8 Auftragung von κ und κ/c als Funktion der C ₈ TAB-Konzentration	66
4.9 Auftragung von κ und κ/c als Funktion der C ₁₀ TAB-Konzentration	66
4.10 Auftragung von κ und κ/c als Funktion der C ₁₂ TAB-Konzentration	67
4.11 Auftragung von κ und κ/c als Funktion der C ₁₄ TAB-Konzentration	67
4.12 Auftragung von κ und κ/c als Funktion der logarithmierten C ₆ TAB-Konzentration	69
4.13 Auftragung von κ und κ/c als Funktion der logarithmierten C ₈ TAB-Konzentration	69
4.14 Auftragung von κ und κ/c als Funktion der logarithmierten C ₁₀ TAB-Konzentration	70
4.15 Auftragung von κ und κ/c als Funktion der logarithmierten C ₁₂ TAB-Konzentration	70
4.16 Auftragung von κ und κ/c als Funktion der logarithmierten C ₁₄ TAB-Konzentration	71
4.17 Extinktion in wäßrigen Lösungen konstanter ST-Konzentration (10 ⁻⁵ mol/l) und steigender C ₁₀ TAB-Konzentration (0 - 0.14 mol/l) im Bereich von 200 - 800 nm	72
4.18 Extinktion in wäßrigen Lösungen konstanter ST-Konzentration (10 ⁻⁵ mol/l) und steigender C ₁₀ TAB-Konzentration (0 - 0.14 mol/l) im Bereich von 400 - 600 nm	73
4.19 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der C ₆ TAB-Konzentration	74
4.20 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der C ₈ TAB-Konzentration	75
4.21 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der C ₁₀ TAB-Konzentration	75
4.22 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der C ₁₂ TAB-Konzentration	76
4.23 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der C ₁₄ TAB-Konzentration	76
4.24 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₆ TAB-Konzentration	78
4.25 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₈ TAB-Konzentration	79
4.26 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₁₀ TAB-Konzentration	79
4.27 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₁₂ TAB-Konzentration	80
4.28 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₁₄ TAB-Konzentration	80
4.29 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₆ TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen	82
4.30 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₈ TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen	83
4.31 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₁₀ TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen	83
4.32 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₁₂ TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen	84
4.33 Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₁₄ TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen	84

4.34 Auftragung von λ_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₆ TAB-Konzentration in (pseudo-) binären bzw. wäßrigen Lösungen	86
4.35 Auftragung von λ_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₈ TAB-Konzentration in (pseudo-) binären bzw. wäßrigen Lösungen	87
4.36 Auftragung von λ_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₁₀ TAB-Konzentration in (pseudo-) binären bzw. wäßrigen Lösungen	87
4.37 Auftragung von λ_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₁₂ TAB-Konzentration in (pseudo-) binären bzw. wäßrigen Lösungen	88
4.38 Auftragung von λ_{\max} als Funktion der logarithmierten C ₁₄ TAB-Konzentration in (pseudo-) binären bzw. wäßrigen Lösungen	88
4.39 Auftragung von λ_{\max} als Funktion der C ₁₂ TAB-Konzentration in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlverhältnissen C ₁₂ TAB/1-Hexanol	89
4.40 Auftragung von A_{\max} als Funktion der C ₁₂ TAB-Konzentration in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlverhältnissen C ₁₂ TAB/1-Hexanol	90
4.41 UV/Vis-Spektren von ST in reinem Wasser – „niedrige“ ST-Konzentrationen	91
4.42 UV/Vis-Spektren von ST in reinem Wasser – „hohe“ ST-Konzentrationen	92
4.43 Verschiebung von λ_{\max} und ϵ_{\max} in Abhängigkeit von der ST-Konzentration	92
4.44 UV/Vis-Spektren (200 - 800 nm) von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in verschiedenen Lösungsmitteln	93
4.45 UV/Vis-Spektren (400 - 600 nm) von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in verschiedenen Lösungsmitteln	94
4.46 UV/Vis-Spektren (400 - 400 nm) von $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in verschiedenen Lösungsmitteln	94
4.47 λ_{\max} und ϵ_{\max} von ST in verschiedenen Lösungsmitteln	95
4.48 UV/Vis-Spektrum von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei einem Molzahlverhältnis C ₁₂ TAB/1-Hexanol von 1:1	96
4.49 Auftragung von λ_{\max} als Funktion der C ₁₂ TAB-Konzentration in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei einem Molzahlverhältnis C ₁₂ TAB/1-Hexanol von 1:1	97
4.50 Auftragung von ϵ_{\max} als Funktion der C ₁₂ TAB-Konzentration in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei einem Molzahlverhältnis C ₁₂ TAB/1-Hexanol von 1:1	97
4.51 Differenz-UV/Vis-Spektrum von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer und in reinem TES-Puffer bei einem Molzahlverhältnis C ₁₂ TAB/1-Hexanol von 8:1	98
4.52 Auftragung von $\Delta\epsilon$ aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. i ($i = 1, 2, 4$) mit Fitgleichung (1) als Funktion der Wellenlänge am Beispiel C ₁₂ TAB/C ₆ OH = 8:1	100
4.53 Auftragung von K_k aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. i mit $i = 1, 2$ und 4 sowie mit Fitgleichung (1) als Funktion der Wellenlänge am Beispiel C ₁₂ TAB/C ₆ OH = 8:1	101
4.54 Auftragung von $\Delta\epsilon$ aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. 4 mit Fitgleichung (1) bzw. (2) als Funktion der Wellenlänge am Beispiel C ₁₂ TAB/C ₆ OH = 8:1	102

4.55 Auftragung von K_k aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. 4 mit Fitgleichung (1) bzw. (2) als Funktion der Wellenlänge am Beispiel C ₁₂ TAB/C ₆ OH = 8:1	102
4.56 Vergleich der Fits nach Gleichung (1) und (2) für C ₁₂ TAB/C ₆ OH = 1:1 und 8:1	103
4.57 Auftragung von $\Delta\epsilon$ aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. 4 mit Fitgleichung (1) als Funktion der Wellenlänge für C ₁₂ TAB/C ₆ OH = 1:1, 2:1, 4:1 und 8:1	104
4.58 Auftragung von K_k aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. 4 mit Fitgleichung (1) als Funktion der Wellenlänge für C ₁₂ TAB/C ₆ OH = 1:1, 2:1, 4:1 und 8:1	104
4.59 Auftragung der mit Gleichung (c) bestimmten Aggregationszahl für C ₁₂ TAB/1-Hexanol = 1:1 als Funktion der Wellenlänge	105
4.60 Auftragung der mit Gleichung (b) bestimmten Aggregationszahl für C ₁₂ TAB/1-Hexanol = 1:1 als Funktion der Wellenlänge	106
4.61 Auftragung der mit verschiedenen Gleichungen bestimmten Extinktionskoeffizientendifferenz für C ₁₂ TAB/1-Hexanol = 1:1 als Funktion der ST-Konzentration (mit allen Datenpunkten)	107
4.62 Auftragung der mit verschiedenen Gleichungen bestimmten Gleichgewichtskonstanten für C ₁₂ TAB/1-Hexanol = 1:1 als Funktion der ST-Konzentration (mit allen Datenpunkten)	108
4.63 Auftragung der mit verschiedenen Gleichungen bestimmten Extinktionskoeffizientendifferenz für C ₁₂ TAB/1-Hexanol = 1:1 als Funktion der ST-Konzentration (ohne die ersten beiden Datenpunkten)	109
4.64 Auftragung der mit verschiedenen Gleichungen bestimmten Gleichgewichtskonstanten für C ₁₂ TAB/1-Hexanol = 1:1 als Funktion der ST-Konzentration (ohne die ersten beiden Datenpunkten)	110
4.65 Auftragung der Anfangsextinktionsänderung bzw. Aktivität von HLADH in 10 ⁻² mol/l Ethanol-Lösungen als Funktion der Meßzeit	111
4.66 Auftragung der Aktivität von HLADH in 10 ⁻² mol/l Ethanol-Lösungen als Funktion der Natriumchloridkonzentration	112
4.67 Auftragung der Aktivität von HLADH in 1-Hexanol-Lösungen als Funktion der 1-Hexanol-Konzentration	113
4.68 Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der C ₆ TAB-Konzentration in pseudobinären Lösungen	114
4.69 Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der C ₈ TAB-Konzentration in pseudobinären Lösungen	115
4.70 Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der C ₁₀ TAB-Konzentration in pseudobinären Lösungen	116
4.71 Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der C ₁₂ TAB-Konzentration in pseudobinären Lösungen	117
4.72 Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der C ₁₄ TAB-Konzentration in pseudobinären Lösungen	117
4.73 Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der C ₁₂ TAB-Konzentration in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer	118
4.74 Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der 1-Hexanol-Konzentration in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer	119

4.75 Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der 1-Hexanol-Konzentration in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer	120
4.76 UV/Vis-Spektren der Reaktionsmischung (d) mit C ₆ TAB	121
4.77 UV/Vis-Spektren der Reaktionsmischung (1) mit Ethanol	122
4.78 Extinktion bei 340 nm als Funktion der Meßzeit für verschiedene Reaktionsmischungen mit C ₆ TAB	123
4.79 Extinktion bei 340 nm als Funktion der Meßzeit für verschiedene Reaktionsmischungen mit C ₈ TAB	123
4.80 Extinktion bei 340 nm als Funktion der Meßzeit für verschiedene Reaktionsmischungen mit C ₁₀ TAB	125
4.81 Extinktion bei 340 nm als Funktion der Meßzeit für verschiedene Reaktionsmischungen mit C ₁₂ TAB	125
4.82 Extinktion bei 340 nm als Funktion der Meßzeit für verschiedene Reaktionsmischungen mit C ₁₄ TAB	126
4.83 Phasendiagramme ausgewählter ternärer Systeme C ₁₂ E ₂₃ /Alkohol/Wasser	127
4.84 Phasendiagramme ausgewählter ternärer Systeme C ₁₂ E ₂₃ /Alkohol/Wasser	128
4.85 Aktivität von HLADH in binären Systemen ohne Tensid	129
4.86 Aktivität von HLADH in binären Systemen ohne Tensid (fortgesetzt)	129
4.87 Aktivität von HLADH in binären Systemen ohne Tensid (fortgesetzt)	130
4.88 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /Ethanol/Wasser-Systemen	135
4.89 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /Ethanol/Wasser-Systemen (Fortsetzung)	135
4.90 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /1-Propanol/Wasser-Systemen	136
4.91 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /1-Butanol/Wasser-Systemen	136
4.92 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /1-Pentanol/Wasser-Systemen	137
4.93 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /1-Pentanol/Wasser-Systemen (Fortsetzung)	137
4.94 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /1-Hexanol/Wasser-Systemen	138
4.95 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /1-Heptanol/Wasser-Systemen	138
4.96 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /1-Oktanol/Wasser-Systemen	139
4.97 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /Alkohol/Wasser-Systemen mit 1-Nonanol bzw. 1-Dekanol	139
4.98 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /1-Pentandiol/Wasser-Systemen	140
4.99 Enzymaktivität in ternären C ₁₂ E ₂₃ /1-Heptandiol/Wasser-Systemen	140
4.100 Aktivität von HLADH im Bereich der CMC von C ₁₂ E ₂₃ in Ethanol-haltigen Lösungen	142
4.101 Aktivität von HLADH im Bereich der CMC von C ₁₂ E ₂₃ in 1-Pentanol-haltigen Lösungen	142
5.1 Auftragung von A_{\max} als Funktion des Faktors f_{mic} für verschiedene C _x TABs	148
5.2 Auftragung von A_{\max} als Funktion des logarithmierten Faktors f_{mic} für verschiedene C _x TABs	148
5.3 Auftragung von λ_{\max} von ST in Abhängigkeit vom Lösungsmittel	150
5.4 Auftragung von ϵ_{\max} von ST in Abhängigkeit vom Lösungsmittel	151
5.5 Vergleich der Aktivität von HLADH 1-Hexanol-Lösungen verschiedener Konzentration mit unkompetitiver Hemmung	155
5.6 Vergleich von λ_{\max} von ST und r von HLADH in Abhängigkeit von der C ₆ TAB-Konzentration	156

5.7 Vergleich von λ_{\max} von ST und r von HLADH in Abhängigkeit von der C ₈ TAB-Konzentration	157
5.8 Vergleich von λ_{\max} von ST und r von HLADH in Abhängigkeit von der C ₁₀ TAB-Konzentration	157
5.9 Vergleich von λ_{\max} von ST und r von HLADH in Abhängigkeit von der C ₁₂ TAB-Konzentration	158
5.10 Vergleich von λ_{\max} von ST und r von HLADH in Abhängigkeit von der C ₁₄ TAB-Konzentration	158
5.11 Aktivität von HLADH in Abhängigkeit von der Ionenstärke der Lösung	159
5.12 Aktivität von HLADH in Abhängigkeit von der Ionenstärke der Lösung	160
5.13 Auftragung von r von HLADH und λ_{\max} von ST als Funktion der C ₁₂ TAB-Konzentration in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer	161
5.14 Auftragung von r von HLADH und λ_{\max} von ST als Funktion der C ₁₂ TAB-Konzentration in ternären Lösungen C ₁₂ TAB/1-Hexanol/TES-Puffer (Forts.)	162
5.15 Abhängigkeit der zeitlichen Extinktionsänderung von Tensidkettenlänge und Wassergehalt in Lösungen mit hoher 1-Hexanol- und mittlerer C _x TAB-Konzentration	163
A.1 Auftragung der Ergebnisse der Extrapolation auf $c(C_x\text{TAB}) = 0$	172
A.2 Einflusse von Fehlern der Tensidkonzentration auf die Aggregationszahl	174
A.3 Einflusse von Fehlern der ST-Konzentration auf die Aggregationszahl	175
A.4 Einflusse von Fehlern der CMC auf die Aggregationszahl	175
A.5 Einflusse von Fehlern der Tensidkonzentration auf $\Delta\epsilon$ und K_k	176

Tabellenverzeichnis

3.1	Pufferlösung mit Glycin (pH 8.7 - 8.75)	48
3.2	Pufferlösung mit TES (pH 7.45-7.55)	48
3.3	Verwendete Tenside	49
3.4	Verwendete Alkohole	49
3.5	Zusätzlich verwendete Chemikalien	49
3.6	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen 1 und 2	58
3.7	Zusammensetzung der verwendeten Reaktionsmischungen	58
4.1	Ergebnisse der Auftragung von κ als Funktion der C_x TAB-Konzentration	68
4.2	Werte für die CMC von C_x TABs aus verschiedenen Arten der Auswertung der Leitfähigkeitsmessungen	71
4.3	Werte für die CMC von C_x TABs aus verschiedenen Arten der Auswertung der UV/Vis-Spektren von ST	81
4.4	Beginn des Anstiegs von λ_{\max} für (pseudo-) binäre Lösungen C_x TAB/TES-Puffer	85
4.5	Beginn des Anstiegs bzw. Abfalls von A_{\max} für (pseudo-) binäre Lösungen C_x TAB/TES-Puffer	85
4.6	λ_{\max} und ϵ_{\max} von ST in verschiedenen Lösungsmitteln	95
4.7	Für die Anpassung der Daten zur Bestimmung von Komplexbildungsparametern zwischen Mizelle und Farbstoff verwendete Gleichungen	99
4.8	Änderung der Extinktion verschiedener Reaktionsmischungen mit C_x TAB zwischen Meßbeginn und -ende	124
4.9	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für Ethanol	133
4.10	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Pentanol	133
4.11	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Propanol	133
4.12	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Butanol	133
4.13	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Hexanol	133
4.14	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Heptanol	133
4.15	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Oktanol	134
4.16	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Nonanol	134
4.17	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Dekanol	134
4.18	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1,5-Pentandiol	134
4.19	Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1,7-Heptandiol	134
5.1	CMC von C_x TAB-Tensiden bei 25°C	144
5.2	Bestimmung von f_{mic} und c_{MD} für die verschiedenen Tenside vom C_x TAB-Typ	147
5.3	λ_{\max} von ST in verschiedenen Lösungsmitteln	150

5.4	ϵ_{\max} von ST in verschiedenen Lösungsmitteln	151
5.5	Vergleich der Verteilungskoeffizient verschiedener Alkohole aus Experimenten mit HLADH und aus Neutronenstreuexperimenten [15]	167
A.1	Ergebnisse der Extrapolation auf $c(C_x\text{TAB}) = 0$ und $x = 0$	171
A.2	Einflüsse der verschiedenen Fehler auf die aus der Anpassung erhaltenen Größen bei der Komplexbildung zwischen Mizelle und ST	174

Naturkonstanten

Elementarladung	$e_0 = 1.60217739 \cdot 10^{-19} \text{ C}$
Elektrische Feldkonstante	$\epsilon_0 = 8.854187816 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2(\text{J m})^{-1}$
Avogadro-Konstante	$N_A = 6.0221367 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
Lichtgeschwindigkeit	$c = 2.99792458 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$
Boltzmann-Konstante	$k_B = 1.380658 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
Permeabilität des Vakuums	$\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} (\text{J s})^2(\text{C}^2 \text{ m})^{-1}$
Planck'sche Konstante	$h = 6.6260755 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$

Wichtige Symbole

T	Temperatur [K] oder [$^{\circ}\text{C}$]	k	Geschwindigkeitskonstante
t	Zeit [s]	v	Reaktionsgeschwindigkeit [s^{-1}]
M	Molmasse [kg mol^{-1}]	r	normierte Enzymaktivität
$c, [\text{X}]$	Molarität [mol m^{-3}]	λ	Wellenlänge [m]
	Konzentration [mol kg^{-1}]	$\bar{\mu}$	Wellenzahl [m^{-1}]
	Konzentration [Gew%]	I_0	Primärintensität
x	Molenbruch	I	Intensität
c_{CMC}	kritische Mizellare	d	Schichtdicke [m]
	Konzentration [mol m^{-3}]	ϵ	molarer dekadischer
N_{AG}, N	Aggregationszahl		Extinktionskoeffizient
α	Dissoziationsgrad der Mizelle		$[\text{m}^2 \text{ mol}^{-1}]$
K	Gleichgewichtskonstante	ϵ	Dielektrizitätszahl
p	Verteilungskoeffizient	κ	spezifische Leitfähigkeit
ΔG	Differenz der Gibbs'schen		$[\text{S m}^{-1}]$
	Energie [J mol^{-1}]		

Kapitel 1

Einleitung

Enzymkatalyse in organischen Lösungsmitteln, inversen mikellaren Lösungen oder mehrphasigen Systemen entwickelte sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten zu gängigen Synthesewegen für organische Substanzen. Zahlreiche Beispiele hierfür sind im Handbuch von Drauz und Waldmann [12, 16], in den Übersichtsartikeln von Carrea und Riva [17], Luisi [18], Khmel'niksii et al. [19], Carvalho und Cabral [20], Stamatis et al. [21] und Miya-ke [22] sowie in den Artikeln [23–33] u. v. a. m. zu finden.

Bedeutend weniger Literaturstellen entdeckt man hingegen, wenn man nach Studien über Enzymaktivitäten in direkten Mizellen sucht. Man stößt beispielsweise auf die Artikel von Meziani et al. [34], Stradner et al. [35], Marcozzi et al. [36] und Viparelli et al. [37].

Diese Arbeit beschäftigt sich im wesentlichen mit der Abhängigkeit der Aktivität von Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber von der Strukturierung einphasiger Lösungen, bestehend aus Tensid, Alkohol und Puffer. Die Ergebnisse sollen mit Strukturinformationen, die aus anderen Methoden und aus der Literatur erhalten wurden, verglichen werden, um mögliche Erklärungen für die Änderungen der Enzymaktivität zu finden. Darüberhinaus soll festgestellt werden, ob mit HLADH als Sonde die CMC von Tensiden oder Verteilungskoeffizienten von Substraten zwischen mikellarer und wässriger Pseudophase bestimmt werden können, falls die Aktivität von HLADH tatsächlich von der Strukturierung der Lösungen abhängt. Zwei Tensidtypen wurden für die Untersuchungen ausgewählt: kationische Tenside vom C_xTAB -Typ und nichtionische Tenside vom Polyethylenoxid-Typ. Untersuchungen mit HLADH wurden in den ternären Systemen $C_xTAB/1\text{-Hexanol/Wasser}$ (mit $x = 6, 8, 10, 12, 14$) sowie $C_{12}E_{23}/\text{Alkohol/Wasser}$ (Alkohol = n-Alkanol mit $n = 2, 3, \dots, 10$, oder α,ω -n-Alkandiol mit $n = 5, 7$) durchgeführt. Grundlage der Untersuchungen bildeten verschiedene Literaturstellen [34, 38, 39] sowie verschiedene „neu“ entwickelte Methoden.

Zur Untersuchung der Strukturierung der Tensidlösungen der kationischen Tenside wurden Phasendiagramme bestimmt sowie Leitfähigkeitsmessungen durchgeführt und UV/Vis-Spektroskopie mit dem Farbstoff Safranin T (oder Safranin O) als Sonde betrieben. Als interessantes „Nebenprodukt“ bei der UV/Vis-Spektroskopie mit Safranin T konnte die Aggregationszahl von Mizellen bestimmt werden. Bisher übliche Verfahren zur Bestimmung der Aggregationszahl sind ja nicht UV/Vis-Spektroskopie sondern verschiedene Streumethoden, wie z. B. Lichtstreuung oder Neutronenstreuung [7, 40, 41], oder Fluoreszenzspektroskopie mit Hilfe von Farbstoffen [7, 40–42].

Im folgenden sollen zunächst die für die Untersuchungen notwendigen Grundlagen gelegt werden. Danach werden die experimentellen Ergebnisse und ihre Auswertung dargestellt, diskutiert und schließlich zusammengefaßt.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Tenside

2.1.1 Definition und Einteilung der Tenside

Tenside sind meist niedermolekulare Verbindungen, die sich durch ihr amphiphiles Verhalten auszeichnen. Dieses wird durch die Kombination hydrophiler (polarer) und hydrophober (unpolärer) Bereiche im Molekül bestimmt. Als Kopfgruppe bezeichnet man den hydrophilen Teil, der von geladenen oder neutralen polaren Gruppen gebildet wird. Der hydrophobe oder lipophile Teil, die sogenannte Schwanzgruppe, besteht in der Regel aus längeren, meist unverzweigten Alkyl- oder Arylalkylketten mit ca. 8 bis 18 Kohlenstoffatomen in der Alkylkette. [7, 41]

Abbildung 2.1 zeigt zwei gängige Arten der symbolischen Darstellung einfacher Tensidmoleküle sowie eine etwas andere Art der Darstellung nichtionischer Tenside vom Polyethertyp.

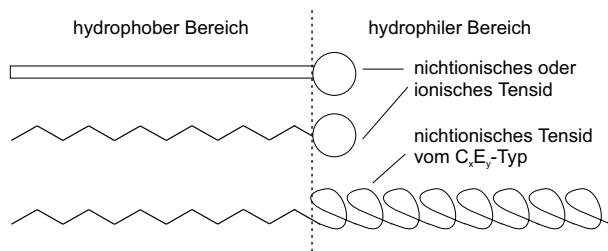


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung ionischer und nichtionischer Tenside

Für die Löslichkeit und das Aggregationsverhalten eines Tensides in einem bestimmten Lösungsmittel(system) sind die Art, die Anzahl und die Größenverhältnisse hydrophiler und hydrophober Gruppen im Tensidmolekül entscheidend. Häufig findet man Tenside mit einer Kopfgruppe und ein bis zwei Kohlenwasserstoffketten. Es gibt aber auch Verbindungen mit mehreren Kopfgruppen oder bis zu vier hydrophoben Ketten oder polymere Tenside. [7]

Tenside kann man beispielsweise anhand der hydrophilen Gruppe in unterschiedliche Klassen einteilen [7,41]:

- anionische Tenside:
 - Carboxylate ($-\text{COO}^-$)
 - Sulfonate ($-\text{SO}_3^-$)
 - Sulfate ($-\text{OSO}_3^-$): z. B. $\text{NaC}_{12}\text{OSO}_3$ (SDS, vgl. Abbildung 2.2)
- kationische Tenside:
 - quartäre Ammoniumsalze ($-\text{N}^+ \text{R}_3$): z. B. C_{12}TAB (vgl. Abbildung 2.2)
- zwitterionische (amphotere) Tenside:
 - Betaine ($-\text{N}^+-(\text{CH}_2)_n\text{COO}^-$)
 - Sulfobetaine ($-\text{N}^+-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3^-$)
 - Aminoxide ($-\text{N}^+-\text{O}^-$)
 - Phospholipide
- nichtionische Tenside:
 - Polyethertenside, u.a. Polyethylenoxidtenside ($-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}$):
z. B. $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ (Brij 35, vgl. Abbildung 2.2)
 - Zuckertenside

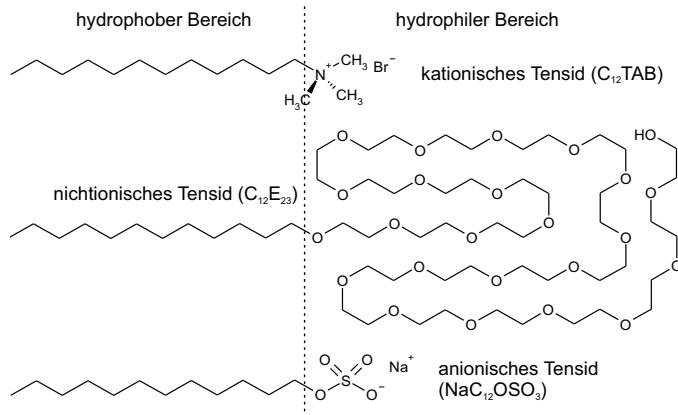


Abbildung 2.2: Beispiele für ionische und nichtionische Tenside

Jeder dieser vier Tensidgruppen kann man weitere, sich zum Teil überschneidende Tensidgruppen zuordnen:

- Kohlenwasserstofftenside
- perfluorierte Tenside
- Silikontenside
- funktionalisierte Tenside
- polymere Tenside
- natürliche Tenside

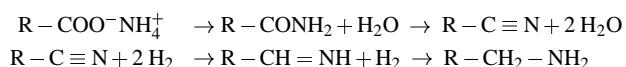
Tenside reichern sich wegen ihres amphiphilen Charakters an Phasengrenzen (flüssig-gasförmig, flüssig-flüssig, fest-flüssig) an und bilden dort dichtgepackte monomolekulare Filme, wobei die hydrophile Gruppe zur polaren Phase und die hydrophobe Gruppe zur unpolaren Phase hin gerichtet ist. [7, 41]

2.1.2 Herstellung von Tensiden

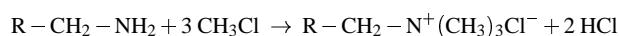
Die industrielle Synthese der in dieser Arbeit verwendeten Tenside, d. h. Alkyltrimethylammoniumbromide ($\text{CH}_3\text{-}(\text{CH}_2)_{x-1}\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$, C_xTABs , mit $x = 6, 8, 10, 12, 14, 16$) und Brij 35 ($\text{CH}_3\text{-}(\text{CH}_2)_{11}\text{-}(\text{O-CH}_2\text{-CH}_2)_{23}\text{-OH}$, $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$), soll anhand der entsprechenden Reaktionsgleichungen etwas näher erklärt werden. Die Hauptquelle der Alkylketten in der Tensidindustrie bilden natürlich vorkommende Fette, die durch Verseifung (z. B. mit Natronlauge) in die entsprechenden Fettsäuresalze (Carbonsäuresalze) und Glycerin aufgespalten werden. Bei der Herstellung der kationischen Tenside vom C_xTAB -Typ sind folgende Synthesewege denkbar:

1. Synthese ausgehend von den Carbonsäuren [43, 44]:

- Herstellung der entsprechenden Alkylamine aus den Ammoniumsalzen der Carbonsäuren:

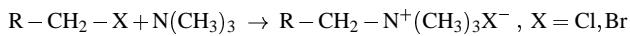


- Quaternierung mit Chlormethan:

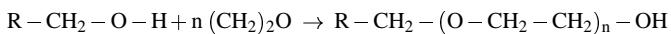


- Austausch von Cl^- durch Br^- mittels Ionenaustauscher (Alternative: im vorhergehenden Reaktionschritt statt CH_3Cl CH_3Br einsetzen).

2. Quaternierung von Trimethylamin mit den entsprechenden Alkylhalogeniden [45]:



Will man hingegen nichtionische Tenside vom Polyethylenoxidtyp herstellen, geht man vom entsprechenden langkettigen Alkohol aus und setzt diesen mit Ethylenoxid um [46]:



Dabei erhält man allerdings ein Gemisch von Tensiden mit unterschiedlicher Anzahl an Ethylenoxidgruppen, d. h. ein Homologengemisch.

2.1.3 Assoziatbildung der Tenside

2.1.3.1 Phasendiagramme

Versucht man, sich über Tensidassoziate oder allgemein über das Phasenverhalten in einem speziellen System, z. B. in binären Tensid/Lösungsmittel-Gemischen oder ternären Tensid/Kotensid/Lösungsmittel-Systemen, einen Überblick zu verschaffen, so ist es am besten, das zugehörige Phasendiagramm zu betrachten. Die unterschiedlichen Assoziattypen (direkte und inverse Mizellen, Flüssigkristalle, ...) lassen sich z. B. anhand ihrer optischen, viskosimetrischen oder rheologischen Eigenschaften differenzieren. Ob eine, zwei oder mehrere Phasen vorliegen, kann man meist relativ einfach feststellen: durch das Betrachten der entsprechenden Mischung.

Die Grundlage aller Phasendiagramme bildet die Gibbs'sche Phasenregel [8, 47, 48]:

$$f = 2 + n_c - n_r - n_p \quad (2.1)$$

Sie stellt den Zusammenhang her zwischen der Anzahl der Freiheitsgrade im System (der Varianz), f , der Anzahl der im System enthaltenen Komponenten, n_c , der Zahl der chemischen Reaktionen zwischen den Komponenten, n_r , sowie der Zahl der Phasen im System, n_p . Der minimal mögliche Wert für f ist 0, d. h. das System besitzt keinen Freiheitsgrad mehr. Sind in einem Einkomponentensystem z. B. der Druck p und die Temperatur T festgelegt, so ist im Fall $f = 0$ auch das molare Volumen v der Komponente fest.

Betrachten wir den Fall eines ternären Systems, bestehend aus Tensid, Kotensid und Lösungsmittel. Geht man davon aus, daß keine chemischen Reaktionen in diesem System stattfinden, so erhält man aus Gleichung 2.1 mit $n_r = 0$ und $n_c = 3$

$$f = 5 - n_p \quad (2.2)$$

Ein solches aus drei Komponenten aufgebautes System kann maximal vier Freiheitsgrade haben, und zwar genau dann, wenn nur eine Phase vorliegt. Diese Freiheitsgrade können z. B. Druck, Temperatur und die Konzentrationen (Molenbrüche) zweier Komponenten sein. Arbeitet man hingegen bei konstantem Druck und konstanter Temperatur, so reduziert sich Gleichung 2.2 zu

$$f = 3 - n_p \quad (2.3)$$

Dies bedeutet, daß in einem Drei-Komponenten-System bei $p, T = \text{konst.}$ maximal drei Phasen möglich sind.

Wie stellt man aber nun ein Mehr-Komponenten-System dar?

Im Fall einer aus zwei Komponenten bestehenden Mischung ist dies relativ einfach. Man wählt ein rechtwinkliges x-y-Koordinatensystem, bei dem man auf der x-Achse die Zusammensetzung der Mischung aufträgt und auf der y-Achse z. B. die Temperatur. Phasenübergänge werden dann als Linien eingezeichnet. Als Beispiel dient das theoretische Phasendiagramm einer Tensid-Wasser-Mischung in Abbildung 2.3, wobei es sich um ein ionisches Tensid handelt [7].

Betrachtet den in Abbildung 2.3 dargestellten Ausschnitt des Phasendiagramms für dieses System, so findet man verschiedene Bereiche: molekulare Tensidlösung, Mizellare Phase, flüssigkristalline Bereiche (hexagonale und lamellare Phase) und unterhalb von T_c , der

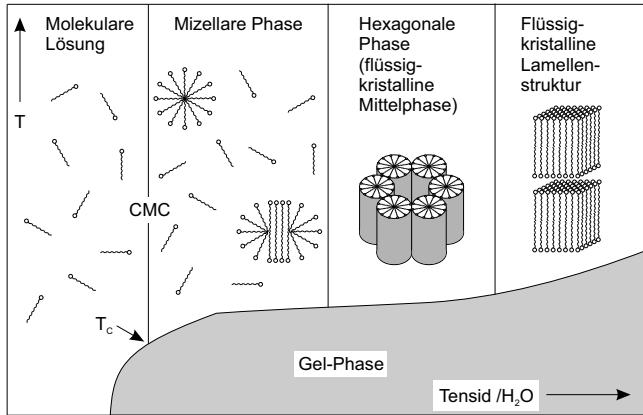


Abbildung 2.3: Phasendiagramm eines binären Tensid/Wasser-Systems (nach [7])

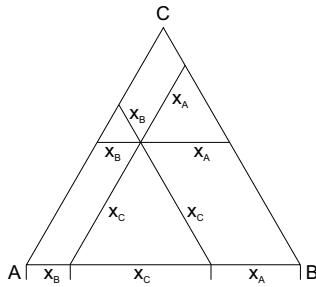


Abbildung 2.4: Allgemeine Form eines ternären Phasendiagramms (nach [8])

Krafttemperatur, eine Gel-Phase. Im Falle von Tensiden in wässrigen oder polaren Lösungsmitteln spricht man von „normalen“ oder „direkten“ Assoziaten, was bedeutet, daß die polaren Kopfgruppen zum Lösungsmittel hin gerichtet sind, während die hydrophoben Reste ins Innere der Aggregate zeigen, wie man z. B. in Fall der mizellaren Phase erkennen kann. Liegt eine Tensidlösung in unpolaren Lösungsmitteln vor, so kehrt sich die Situation um: die hydrophoben Reste befinden sich im Lösungsmittel, die hydrophilen Gruppen im Inneren der Aggregate. Man spricht dann von „inversen“ Assoziaten, z. B. von inversen Mizellen. Hat man hingegen eine Mischung aus drei Substanzen vorliegen, d. h. ein ternäres System, so wird das ganze schon etwas schwieriger. Am zweckmäßigsten ist es, die verschiedenen Phasen bei einer bestimmten Temperatur und einem bestimmten Druck in ein gleichseitiges Dreieck einzuziehen (vgl. Abbildungen 2.4 und 2.5). Die Zusammensetzung an einem beliebigen Punkt in diesem Dreieck erhält man, wenn man drei zu den Dreiecksseiten parallele Geraden durch diesen Punkt legt und die Abstände zwischen den Geraden und den zugehörigen Dreiecksseiten bestimmt, wie dies in Abbildung 2.4 dargestellt ist. Die Konzentration der Komponente A (z. B. im Konzentrationsmaß Molenbruch) erhält man aus dem Abstand

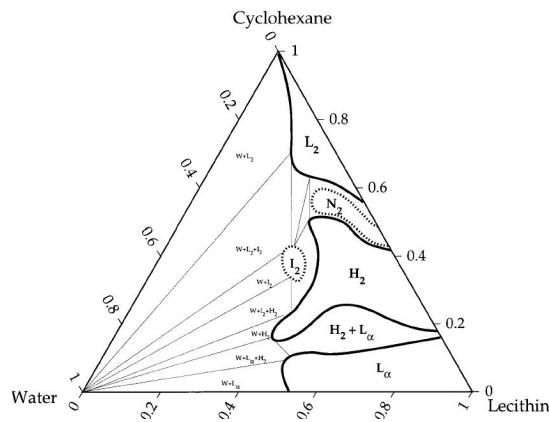


Abbildung 2.5: Phasendiagramm des ternären Systems Lecithin-Wasser-Cyclohexan (aus [9])

zwischen dem entsprechenden Eckpunkt gegenüberliegenden Dreiecksseite und der dazu parallelen Gerade. Analoges gilt für die Komponenten B und C [8].

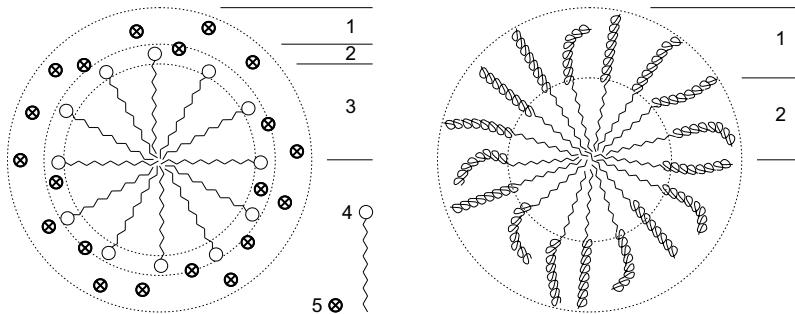
In Abbildung 2.5 ist ein Beispiel für ein solches Phasendiagramm, für das ternäre System Lecithin-Wasser-Cyclohexan bei 25°C [9], zu finden. Die dort aufgeführten Bezeichnungen für die einzelnen Phasengebiete sollen hier bis auf wenige Ausnahmen nicht näher erläutert werden. L ist die allgemein übliche Abkürzung für klare, flüssige und isotrope Phasen, wobei L_1 der direkten Mizellaren Phase bzw. Mikroemulsion (und zugehöriger molekularer Tensidlösung) entspricht und L_2 der inversen Mizellaren Phase bzw. Mikroemulsion (und zugehöriger molekularer Tensidlösung) entspricht. L_α wird hingegen zur Kennzeichnung der lamellaren Phase, d. h. einer flüssigkristallinen Phase, verwendet. Man sieht in diesem Phasendiagramm, daß maximal drei Phasen miteinander im Gleichgewicht stehen können, was ja auf Grund der Gibbs'schen Phasenregel zu erwarten war.

Noch schwieriger wird das Ganze, wenn man vier oder mehr Komponenten im System hat. Hier ist das einfachste, mehrere „pseudoternäre“ Phasendiagramme aufzustellen, wobei eine oder mehrere der Ecken jeweils einer „Pseudokomponente“ entspricht, die aus zwei oder mehreren in konstantem Verhältnis zueinander stehenden Komponenten zusammengesetzt ist.

2.1.3.2 Mizellen und Mikroemulsionen

2.1.3.2.1 Mizellen

Betrachten wir noch einmal Abbildung 2.3. Bei einer Temperatur oberhalb der Kraffttemperatur T_c liegt in Tensid-Wasser-Mischungen mit sehr geringer Tensidkonzentration eine molekulare Lösung vor. Allerdings kann die Lösung je nach Tensidtyp bereits dimere, trimere oder oligomere Tensidassoziate enthalten. Wenn die Tensidkonzentration einen bestimmten Wert erreicht, die sogenannte kritische Mizellkonzentration (CMC), ändern sich mehr oder weniger abrupt die physikalischen Eigenschaften der Tensidlösung. Man geht davon aus, daß



(a) Mizelle eines ionischen Tensids. 1 = Gouy-Chapman-Bereich, 2 = Stern-Schicht (ionische Kopfgruppen und ein Teil der Gegenionen), 3 = Kern (hydrophobe Reste), 4 = Tensid, 5 = Gegenion.

(b) Mizelle eines nichtionischen Tensids vom Polyethylenoxidtyp. 1 = Schale (hydratisierte Polyethylenoxidketten), 2 = Kern (hydrophobe Reste).

Abbildung 2.6: Normale Mizellen ionischer bzw. nichtionischer Tenside (nach [7])

fast schlagartig etwa 50-160 Tensidmonomere zu den sog. Mizellen aggregieren. Es handelt sich dabei um in der Regel kugelförmige oder fast kugelförmige ellipsoide Gebilde. Steigt die Tensidkonzentration weiter, so erhöht sich die Anzahl der Mizellen, wobei sich die Mizellgröße und -form verändern kann. Z. B. können scheiben- oder zigarrenförmige Ellipsoide oder stabförmige Gebilde entstehen. Kommt es dabei zu einer erneuten mehr oder weniger ausgeprägten Änderung der physikalischen Eigenschaften der Tensidlösung, so bezeichnet man die Konzentration, bei der diese Änderung auftritt, als zweite CMC. [7,41,49]

Die oben erwähnte Krafft-Temperatur gibt die Temperatur an, bei der die Löslichkeit des Tensids gleich der CMC ist. Der Punkt, bei dem dies zutrifft, der sog. Krafftpunkt, ist ein Tripelpunkt, bei dem sich drei Kurven schneiden: die Löslichkeitskurve des Tensids, der Phasenübergang Molekül-Mizelle und der Phasenübergang molekulare Lösung-Mizelle.

In Abbildung 2.6 sind kugelförmige normale Mizellen eines ionischen und eines nichtionischen Tensides dargestellt. Man kann allgemein mindestens zwei Zonen bei Mizellen unterscheiden: den unpolaren Innenraum und die polare Grenzzone. Der unpolare Bereich der Mizellen wird von den hydrophoben Resten der Tenside gebildet, wobei diese nicht so streng geordnet im Mizellinnern vorliegen, wie in der Abbildung dargestellt ist, sondern in einer Form, die mit flüssigem Kohlenwasserstoff verglichen werden kann. Die polare Grenzzone besteht im Fall ionischer Tenside aus der Stern-Schicht und der Gouy-Chapman-Schicht, d. h. aus den ionischen Kopfgruppen und einem Teil der Gegenionen sowie assoziierten Lösungsmittelmolekülen. Im Fall nichtionischer Tenside vom Polyethylenoxidtyp bilden mehr oder weniger stark hydratisierte Polyethylenoxidketten die polare Grenzzone. [7] Wie man sich vorstellen kann, ist die treibende Kraft der Mizellbildung auf die Minimierung der Wasserkontakte (oder allgemeiner der Kontakte mit einem polaren Lösungsmittel) der hydrophoben Tensidteile zurückzuführen [7,41].

Im Fall inverser Mizellen muß man sich die Situation in etwa umgekehrt vorstellen. Der Innenbereich der inversen Mizelle, der die Kopfgruppen des Tensides und ggf. auch Wasser enthält, ist polar, der Außenbereich unpolar. Inverse Mizellen weisen häufig kleinere Aggregationszahlen und eine breitere Verteilung der Aggregatsgröße als normale Mizellen auf [49].

2.1.3.2.2 Modelle der Mizellbildung

Wie hat man sich nun aber die Mizellbildung vorzustellen? Es gibt zwei thermodynamische Ansätze, wie man die Entstehung von Mizellen beschreiben kann, nämlich das Pseudophasenmodell und das Massenwirkungsmodell [41, 50, 51].

Das einfachste thermodynamische Modell der Mizellbildung ist das Pseudophasen- oder Phasensepurationsmodell. Hierbei werden die Mizellen als getrennte Phase betrachtet, ähnlich einer Ölphase, wenn die Öl moleküle nur beschränkt im polaren Lösungsmittel löslich sind. Die zweite, mit den Mizellen im Gleichgewicht stehende Phase ist die umgebende Lösung mit molekular gelösten Tensidmonomeren. Wenn die Tensidkonzentration die CMC übersteigt, kommt es also zur Separation einer Mizellaren Phase mit einheitlichen, für ein gegebenes Tensid typischen Eigenschaften. Die Gibbs'sche Standardbildungsenergie der Mizellen erhält man für das Phasensepurationsmodell und ein nichtionisches Tensid aus

$$\Delta G_M^0 = RT \ln(x_{CMC}) \quad (2.4)$$

wobei R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur und x_{CMC} der Molenbruch von Tensidmonomeren an der CMC bzw. die CMC im Konzentrationsmaß Molenbruch ist. [41]

Im Falle eines ionischen 1-1-Tensids erhält man unter Berücksichtigung des Beitrags der Gegenionen und der Tensidmoleküle folgende Gleichung für die Gibbs'sche Standardbildungenergie:

$$\Delta G_M^0 = (2 - \alpha)RT \ln(x_{CMC}) \quad (2.5)$$

α entspricht dem Mizellaren Ionisationsgrad bzw. $(1 - \alpha)$ dem Anteil der durch die Gegenionen neutralisierten Ladungen auf den Mizellen. [41]

Das Massenwirkungsmodell beschreibt die Mizellbildung als einen Gleichgewichtsprozeß, der zu Mizellen mit bestimmten Aggregationszahlen und chemischen Potentialen führt. Für ein nichtionisches Tensid kann man folgendes Aggregationsgleichgewicht aufstellen:

$$N \cdot S \rightleftharpoons M \quad (2.6)$$

wobei N die Aggregationszahl, S das Tensid und M die Mizelle ist. Die Aggregationszahl N ist an sich variabel. Außerdem können Mizellen unterschiedlicher Aggregationszahlen koexistieren. Am einfachsten ist es allerdings, wenn man davon ausgeht, daß eine Aggregationszahl dominiert. Für die Gleichgewichtskonstante unter idealen Bedingungen, d. h. wenn die Aktivität gleich dem Molenbruch ist, gilt

$$K_M = \frac{x_M}{(x_S)^N} \quad (2.7)$$

wobei x_M und x_S den Molenbrüchen der Mizellen und der freien Tensidmonomere entsprechen. Die Gibbs'sche Standardmizellbildungenergie für ein Tensidmonomer ist gegeben als

$$\Delta G_M^0 = -RT \frac{1}{N} \ln(K_M) \quad (2.8)$$

Hieraus erhält man

$$\Delta G_M^0 = RT \left[\left(1 - \frac{1}{N} \right) \ln(x_{CMC}) + f(N) \right] \quad (2.9)$$

mit

$$f(N) = \frac{1}{N} \left[\ln \left(N^2 \left(\frac{2N-1}{N-2} \right) \right) + (N-1) \ln \left(\frac{N(2N-1)}{2(N^2-1)} \right) \right] \quad (2.10)$$

Wird die Aggregationszahl N sehr groß, vereinfacht sich Gleichung 2.9 zu

$$\Delta G_M^0 = RT \ln(x_{CMC}) \quad (2.11)$$

Wie man sieht, ist diese Gleichung identisch mit Gleichung 2.4 für den Fall des Pseudophasenmodells. [41]

Gehen wir von einem kationischen Tensid vom 1-1-Typ aus. Das Aggregationsgleichgewicht zwischen N freien Tensidkationen S^+ , p zugehörigen Gegenionen X^- und einer einzelnen Mizellspezies $M^{+(N-p)}$ lässt sich folgendermaßen darstellen:



Der mizellare Ionisationsgrad ist dabei

$$\alpha = \frac{N-p}{N} \quad (2.13)$$

Die Gibbs'sche Mizellbildungsergie für das Massenwirkungsmodell ergibt sich im Falle großer Aggregationszahlen und Bedingungen nahe der CMC aus den Gleichungen 2.8 und 2.12 zu

$$\Delta G_M^0 = RT(2 - \alpha) \ln(x_{CMC}) \quad (2.14)$$

Dieses Ergebnis ist identisch mit der für das Phasenseparationsmodell erhaltenen Gleichung (vgl. Gleichung 2.5). [41]

Mizellen sind keine starren, sondern dynamische Gebilde, wie man bereits anhand der beiden Mizellbildungsmodelle erkennen kann. Es findet zum einen ein ständiger Austausch zwischen den Tensidmolekülen in der Mizelle und den freien Monomeren statt, zum anderen werden Mizellen andauernd auf- und auch wieder abgebaut. Der Austausch von Tensidmolekülen passiert relativ schnell, im μs -Bereich, der Mizellauf- und -abbau ist hingegen langsamer, im ms -Bereich [49].

2.1.3.2.3 Einflüsse auf die Mizellbildung

Physikalische und chemische Faktoren haben einen wesentlichen Einfluss auf die Mizellbildung. Entscheidend für Form, Größe und Stabilität von Mizellen sind die molekulare Tensidstruktur, die Temperatur sowie das Vorhandensein weiterer Substanzen (Elektrolyte und Nichtelektrolyte) in der Tensidlösung, da sie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Tensidresten, van-der-Waals'sche Anziehungskräfte und Abstoßungskräfte zwischen den gleichgeladenen Kopfgruppen ionischer Tenside beeinflussen können. [7, 41] Kurzkettige Alkohole (Methanol, Ethanol, Propanol) und andere polare Lösungsmittel wirken häufig destabilisierend auf mizellare Systeme, während längerkettige Alkohole wie etwa

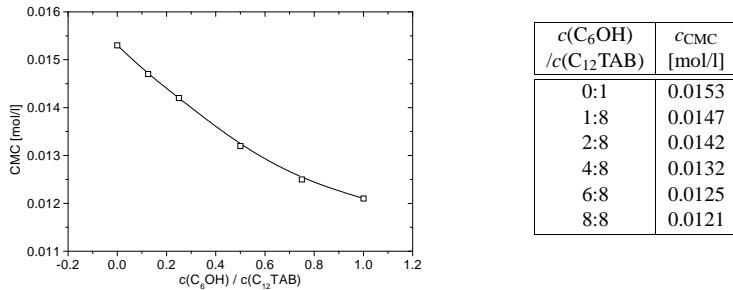


Abbildung 2.7: CMC im System $C_{12}TAB/1\text{-Hexanol/Wasser}$ als Funktion des Verhältnisses $c(1\text{-Hexanol})/c(C_{12}TAB)$ [10]

1-Butanol, 1-Pentanol etc. die Mizellbildung fördern können [52–54]. Beispielsweise sinkt die CMC, wenn im System $C_{12}TAB/1\text{-Hexanol/Wasser}$ das Verhältnis der Konzentrationen von 1-Hexanol und $C_{12}TAB$ ($c(1\text{-Hexanol})/c(C_{12}TAB)$) zunimmt, wie man in Abbildung 2.7 sieht [10].

Aber auch Zusatz von Salzen hat einen deutlichen Einfluß auf die Mizellen. Mit steigender Natriumbromidkonzentration sinkt die CMC von $C_{12}TAB$ deutlich: von 1.48 mmol/kg in wässriger Lösung auf 0.465 mmol/kg in einer Lösung mit 0.1 mol/kg NaBr (bei $25^\circ C$) [55]. Außerdem werden die Mizellen größer, d. h. die Aggregationszahl erhöht sich, wenn der Natriumbromidgehalt in Mizellaren $C_{12}TAB$ -Lösungen steigt [51]. Ähnliches beobachtet man auch für die Lösungen anderer ionischer Tenside [40, 41]. Die Ursache hierfür ist in der Debye-Hückel-Theorie zu suchen. Der Radius der Ionenwolke (bzw. die Debye-Länge) ist folgendermaßen definiert [8]:

$$\beta = \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon k_B T}{2 N_A e_o^2 I} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.15)$$

mit

$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum_{i=1}^n z_i^2 c_i \quad (2.16)$$

e_o ist die Elementarladung, z_i die Ladungszahl der Ionen der Sorte i und c_i ihre molare Konzentration.

Steigt die Salzkonzentration einer Lösung, so hat dies eine Erhöhung der Ionenstärke I und damit eine Abnahme des Radius der Ionenwolke β zur Folge. Daraus resultiert eine stärkere Abschirmung der Kopfgruppen ionischer Tenside wie $C_{12}TAB$.

2.1.3.2.4 Kosolventien, Koaggregate und Kotenside

Kehren wir zu den Alkoholen und zu anderen organischen Verbindungen vergleichbarer Polarität und Amphiphilie zurück. Man kann diese Verbindungen hinsichtlich ihrer Beteiligung an direkten Mizellen Strukturen, d. h. an Mizellen in wäßrigen Lösungen, in drei Klassen unterteilen: in Kosolventien, Koaggregate und Kotenside [54].

Unter Kosolventien versteht man polare Lösungsmittel, die zwar die Eigenschaften des wäßrigen Lösungsmittels etwas verändern, aber nicht in die Mizellen Palisadenschicht eindringen. Als Palisadenschicht bezeichnet man einen mit der wäßrigen Umgebung in Kontakt stehenden polaren Teilbereich der Mizelle, zusammengesetzt aus den (ionischen) Kopfgruppen und den ersten „Teilstücken“ des hydrophoben Tensidrests. Gerade wegen Modifikationen des wäßrigen Lösungsmittels können natürlich auch Kosolventien Auswirkungen auf die Mizellbildung, -struktur und -stabilität haben.

Koaggregate sind polare Verbindungen, deren polare Gruppen an der Mizelloberfläche bleibt und deren hydrophober Teil in der Palisadenschicht der Mizelle eingebaut wird. Diese thermodynamisch bevorzugte Anordnung reduziert die Oberflächenladung und führt somit zu einer dichten „Packung“ der Tensid- und Koaggregatmoleküle.

Bei den Kotensiden handelt es sich ebenfalls um polare Verbindungen, die den Tensiden schon relativ ähnlich sind, was den hydrophoben Rest betrifft, und die deshalb zwischen Tensidmonomere in der Mizelle eindringen oder diese sogar ersetzen können. Auch im Fall der Kotenside kommt es zu einer Verringerung der Oberflächenladung. Außerdem ist das Eindringen von Wasser in die Mizelle im Vergleich zu Koaggregat-haltigen Mizellen geringer.

Ob eine Verbindung als Kotensid, Koaggregat oder Kosolvans wirkt, hängt unter anderem vom Tensid ab. Teilweise werden Koaggregate und Kotenside auch nicht unterschieden, sondern beide Typen als Kotensid bezeichnet (z. B. in [7]). Im folgenden soll daher, wenn nichts anderes angegeben ist, der Einfachheit halber als Kotensid eine Verbindung bezeichnet werden, die entweder vom Typ Koaggregat oder vom Typ Kotensid ist.

2.1.3.2.5 Mikroemulsionen

Von Mizellen Systemen mit Kosolventien, Koaggregaten oder Kotensiden ist der Schritt nicht mehr weit zu den Mikroemulsionen. Optisch isotope, klare (oder transluzente) und thermodynamisch stabile flüssige Systeme, die Wasser, „Öl“, Tenside und eventuell weitere Komponenten enthalten, bezeichnet man als Mikroemulsionen [7, 49]. Unter „Öl“ ist dabei eine unpolare, mit Wasser nicht mischbare Verbindung zu verstehen. Typische Mikroemulsionen enthalten vier Komponenten: Wasser, Öl, Tensid und Kotensid. Es gibt aber auch kotensid- oder tensidfreie Mikroemulsionen.

Man unterscheidet zwischen Öl-in-Wasser- und Wasser-in-Öl- Mikroemulsionen (O/W- und W/O-Mikroemulsionen) - analog zu den O/W- und W/O-Emulsionen. Emulsionen sind jedoch im Gegensatz zu Mikroemulsionen thermodynamisch nicht stabil, d. h. nach gewisser Zeit entmischen sich Wasser- und Öl-Phase. O/W-Mikroemulsionen werden in Analogie zu den Mizellen auch als direkte oder normale, W/O-Mikroemulsionen als inverse Mikroemulsionen bezeichnet.

In Abbildung 2.8 sind typische Assoziatstrukturen von Tensiden und Kotensiden in direkten und inversen Mikroemulsionen dargestellt. Die Ähnlichkeit mit normalen und inversen Mizellen (vgl. Abbildung 2.6) ist relativ groß, was unter anderem darin begründet ist, daß der Übergang zwischen Mizellen Strukturen und Mikroemulsionen fließend ist. Außerdem

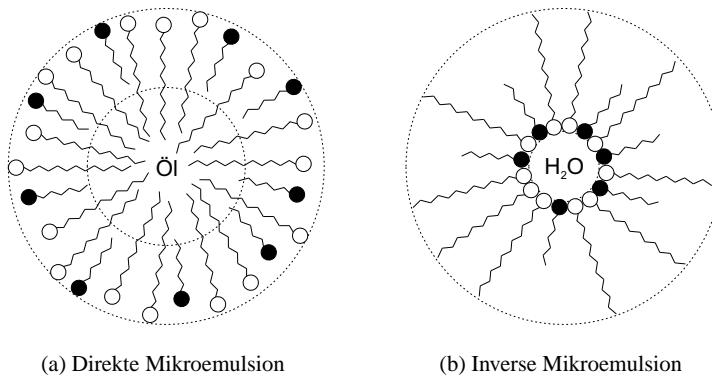


Abbildung 2.8: Tensidassoziate in direkten und inversen Mikroemulsionen (nach [7]). Mit weiß gefüllter „Kopfgruppe“ sind die Tensidmoleküle gekennzeichnet, mit schwarz gefüllter „Kopfgruppe“ die Kotenside.

gibt es keine experimentelle Methode, die eine Unterscheidung von mizellaren Lösungen und Mikroemulsionen möglich macht.

Der Begriff Mikroemulsion ist zudem nicht ganz unumstritten. Manchmal werden Mikroemulsionen auch als „Lösungen aufgequollener Mizellen“ oder als „Lösungen solubilisierter Mizellen“ bezeichnet. Gelegentlich kommt es auch vor, daß die einen Autoren ein identisches System als Mikroemulsion, die anderen aber als mizellare Lösung beschreiben. [49] Im folgenden soll daher ein optisch isotropes, klares (oder transluzentes) und thermodynamisch stabiles flüssiges System, das z. B. aus Tensid, Alkohol und Wasser oder Elektrolytlösung besteht und in dem „mizellartige“ Aggregate vorhanden sind, als mizellare Lösung bezeichnet werden, auch wenn es sich eventuell um eine Mikroemulsion handelt.

2.1.3.3 Charakterisierung von Tensidassoziaten

2.1.3.3.1 Kritische Mizellkonzentration

Wie bereits erwähnt (2.1.3.2), ändern sich bei einer bestimmten Konzentration, der kritischen Mizellkonzentration (auch als kritische Mizellbildungskonzentration, kritische mizellare Konzentration oder einfach als CMC bezeichnet) die physikalischen Eigenschaften der Tensidlösung drastisch, weil Tensidmonomere assoziieren. In Abbildung 2.9 sind die Änderungen verschiedener Meßgrößen mit der Konzentration an Tensid aufgetragen.

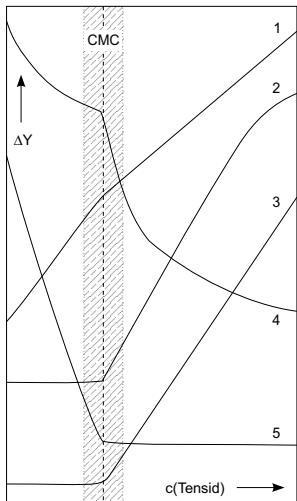


Abbildung 2.9: Änderungen verschiedener physikalischer Meßgrößen (ΔY) als Funktion der Tensidkonzentration (nach [7], [41] und [56]). Aufgetragen sind folgende Meßgrößenänderungen: (1) die elektrische Leitfähigkeit, (2) die Intensität des Streulichts bei einem Streuwinkel von 90° , (3) die Solubilisation, (4) die elektrische Äquivalentleitfähigkeit und (5) die Oberflächenspannung.

Zur Bestimmung der CMC kann man beispielsweise die Konzentrationsabhängigkeit folgender Meßgrößen heranziehen [7, 40]:

- Leitfähigkeit (im Fall ionischer Tenside),
- Oberflächenspannung,
- Lichtstreuung,
- Lichtbrechung (Brechungsindex),
- Dichte,
- Viskosität,
- Lichtabsorption in verschiedenen Spektralbereichen

Neben diesen „direkten“ Methoden lassen sich aber auch verschiedene „indirekte“ Methoden zur CMC-Bestimmung verwenden. Eigenschaftsänderungen einer als „Sonde“ zugesetzten Verbindung bei ihrem Übergang aus der Lösung in die mizellare Phase bilden die Grundlage

der „indirekten“ Methoden. Z. B. kann man Veränderungen der Löslichkeit oder des spektralen Verhaltens (UV/Vis-Spektrum, Fluoreszenz, ...) einer Substanz relativ einfach messen. [7, 40]

Wie man in Abbildung 2.9 sieht, tritt also an der CMC ein mehr oder weniger stark ausgeprägter Knick auf. Wie bestimmt man nun aber die CMC? Dies erfolgt am einfachsten durch Anpassung zweier Geraden (oder Polynome niedrigen Grades) an die beiden Kurvenäste unter- und oberhalb des Knicks und Bestimmung des Schnittpunktes [57].

Der für ein bestimmtes Lösungsmittel und unter identischen experimentellen Bedingungen bestimmte CMC-Wert kann als Stoffkonstante betrachtet werden. Je nach verwendeter Bestimmungsmethode ergeben sich allerdings etwas unterschiedliche Werte für die CMC. Beispielsweise erhalten A. Domínguez et al. [58] für die CMC von SDS aus Leitfähigkeitsmessungen einen Wert von $8 \cdot 10^{-3}$ mol/l, aus Messungen der Absorption von 1-Phenyl-1,3-butadien $7.8 \cdot 10^{-3}$ mol/l und aus Fluoreszenzmessungen mit Pyren $7.4 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Neben dieser „ersten CMC“ findet man im Bereich höherer Tensidkonzentrationen für manche Tenside eine sog. „zweite CMC“. Hierbei handelt es sich um die Konzentration, bei der in der Kurve einer konzentrationsabhängig dargestellten Tensideigenschaft ein mehr oder weniger deutlich erkennbarer zweiter Knick auftritt. Man nimmt an, daß an der „zweiten CMC“ eine gravierende Änderung der Mizellgestalt und/oder -größe stattfindet, beispielsweise der Übergang von kugelförmigen zu ellipsoiden oder zylinderförmigen Mizellen. [7, 59]

2.1.3.3.2 Bestimmung von Mizellmasse, -größe und -form

Die Molmasse, Größe und Form von Mizellen hängen im wesentlichen von der Tensidstruktur, von den experimentellen Bedingungen und im Falle ionischer Tenside von den Gegenionen ab. Die Molmasse der Mizelle ist der Aggregationszahl proportional. In erster Näherung gilt folgender Zusammenhang [60]:

$$M_W = N_{AG} \cdot M_0 \quad (2.17)$$

wobei M_W die Molmasse der Mizelle, N_{AG} die Aggregationszahl und M_0 die Molmasse eines Tensidmonomeren ist.

Mittels statischer Lichtstreuung oder anderen Streumethoden (Neutronen- und Röntgenkleinwinkelstreuung) läßt sich die Molmasse bzw. die Aggregationszahl der Mizelle bestimmen. Auch über Fluoreszenzspektroskopie mit geeigneten „Sonden“ erhält man die Aggregationszahl. [7, 40, 41]

Aussagen über die Form und Größe mizellarer Aggregate lassen sich ebenfalls über Streumessungen (dynamische Lichtstreuung, Neutronen- und Röntgenkleinwinkelstreuung) treffen. [40, 49, 61, 62]

2.1.3.4 Solubilisation in Tensidassoziaten

Als Solubilisation bezeichnet man die Auflösung eines Stoffes, des Solubilisats, in einem Lösungsmittel, in dem er normalerweise wenig oder nicht löslich ist, wobei der gelöste Stoff und das Lösungsmittel (chemisch) nicht verändert werden. Die Auflösung einer wenig löslichen Substanz in einem Lösungsmittel erreicht man durch den Zusatz geeigneter Verbindungen, den sog. Solubilisationsmitteln oder Lösungsvermittlern. Man kann zwischen mizellarer und nichtmizellarer Solubilisation unterscheiden, je nachdem, welcher Typ von Lösungsvermittler verwendet wird. [7]

Mizellare Solubilisation ist die Solubilisation einer Verbindung in Lösungen, die Tensidassoziate (Mizellen, Mikroemulsionen, ...) enthalten. Bis auf wenige Ausnahmen können Tenside nur in assoziierter Form als Solubilisationsmittel verwendet werden. Dies bedeutet, daß im allgemeinen die Löslichkeit eines schwer löslichen Stoffes unterhalb der CMC eines Tensids konstant niedrig ist und erst oberhalb davon mehr oder weniger stark zunimmt. Daher kann, wie bereits erwähnt wurde, die veränderte Löslichkeit einer Substanz zur Bestimmung der CMC herangezogen werden. Einflüsse auf die Solubilisation eines Stoffes haben die Struktur des Tensids und des Stoffes, zusätzlich gelöste Substanzen und die experimentellen Bedingungen (Temperatur, Druck, Konzentration, Ionenstärke, pH-Wert). [7, 63]

In normalen Mizellen können Solubilisate in verschiedene Bereiche aufgenommen werden. Stark polare Verbindungen werden an die Mizelloberfläche gebunden. In die Palisadenschicht werden semipolare Solubilisate eingebaut, unpolare Substanzen hingegen in das unpolare Mizellinnere [7]. Wie man sich vorstellen kann, ist der Übergang zwischen polaren bzw. semipolaren Solubilisaten und Kotensiden fließend. Beispielsweise gibt es Untersuchungen zur Solubilisation von Alkoholen wie 1-Pentanol oder 1-Hexanol in Mizellen [64], die ja typische Kotenside sind.

Eine charakteristische Größe für das Solubilisationsvermögen eines Tensides erhält man aus dem Pseudophasenmodell: den Verteilungskoeffizienten p . Er ist folgendermaßen definiert:

$$p = \frac{c_{\text{mic}}}{c_{\text{bulk}}} \quad (2.18)$$

c_{mic} entspricht der Konzentration des mizellar gebundenen Solubilisats, c_{bulk} der Konzentration des Solubilisats in der extramizellaren Phase [63]. Bei bekannter Gesamtkonzentration c_{tot} des Solubilisats lässt sich mit der Massenbilanz

$$c_{\text{tot}} = c_{\text{mic}} + c_{\text{bulk}} \quad (2.19)$$

Gleichung 2.18 umformen zu

$$p = \frac{c_{\text{tot}} - c_{\text{bulk}}}{c_{\text{bulk}}} \quad (2.20)$$

Verteilungskoeffizienten für ein Solubilisat lassen sich mit verschiedenen Methoden bestimmen. Dazu gehören unter anderem NMR-Spektroskopie, UV/Vis-Spektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie, Dampfdruck- und Leitfähigkeitsmessungen [50]. Wie sich später zeigen wird, kann man auch aus Messungen der Enzymaktivität Verteilungskoeffizienten bestimmen, wenn das Solubilisat ein Substrat des Enzyms ist.

2.2 Enzyme

Biologische Reaktionen werden meist durch spezialisierte Proteine, die Enzyme, katalysiert. Enzyme sind also Biokatalysatoren, die sich durch ihre außerordentliche Spezifität und katalytische Aktivität, die deutlich größer als die künstlicher Katalysatoren ist, auszeichnen. Manche Enzyme enthalten nur eine Polypeptidkette, d. h. eine große Anzahl L- α -Aminosäuren, die durch Peptidbindungen verknüpft sind, andere hingegen zwei oder mehr. Enzyme, die mehrere Polypeptidketten, die sogenannten Untereinheiten, enthalten, werden auch als oligomere Proteine bezeichnet.

Enzyme können aus einfachen oder zusammengesetzten Proteinen bestehen. Einfache Proteine sind Proteine, die nur aus Aminosäuren aufgebaut sind. Die zusammengesetzten Proteine enthalten zusätzlich zu den Aminosäuren weitere organische oder anorganische Verbindungen, die sogenannten Kofaktoren. Handelt es sich beim Kofaktor um ein Metall(ion), wie z.B. Zink im Fall der Alkoholdehydrogenase, so spricht man von Metallproteinen oder Metallenzymen. Als Koenzyme bezeichnet man Kofaktoren, die organische Moleküle sind. Ist das Koenzym sehr fest, z.B. kovalent, an das Enzym gebunden, so wird es auch als prosthetische Gruppe bezeichnet. Unter Kosubstrat versteht man ein Koenzym, das nur locker an das Enzym gebunden ist und auch wieder abdissoziieren kann.

Die Kofaktoren sind wesentlich am katalytischen Prozeß beteiligt. Als Beispiel ist in Abbildung 2.10 das Koenzym Nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+), das bei Redoxreaktionen bei der Wasserstoff-Elektronenübertragung vom oder zum Substrat eine Rolle spielt, in der oxidierten und der reduzierten Form (NAD^+ und NADH) dargestellt. [11, 12, 65]

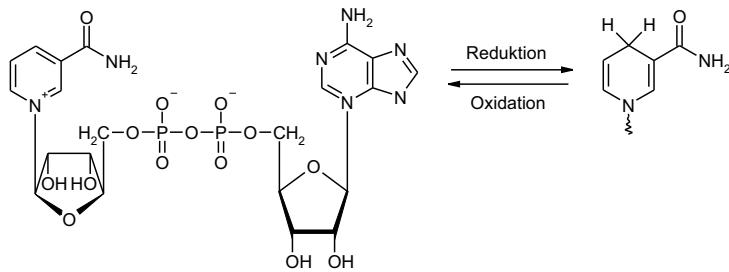


Abbildung 2.10: Chemische Struktur von NAD^+ und NADH (nach [11] und [12])

2.2.1 Proteinstruktur

Man kann vier verschiedene Elemente der Proteinstruktur unterscheiden, nämlich Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur [11, 13, 66].

1. Die Primärstruktur beschreibt das kovalente Grundgerüst (einschließlich der Disulfidbrücken) und die Reihenfolge der Aminosäuren im Protein.
2. Als Sekundärstruktur bezeichnet man die regelmäßige, sich wiederholende räumliche Anordnung der Polypeptidkette in einer Dimension, die durch die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen wird. Dazu zählen unter anderem α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen.
3. Unter Tertiärstruktur versteht man die durch nichtkovalente Wechselwirkungen, Ionenbindungen oder Wasserstoffbrückenbindungen der Aminosäurereste bestimmte dreidimensionale Faltung der Proteinkette. Beispiele hierfür sind Faserproteine und globuläre Proteine.
4. Die Quartärstruktur beschreibt die Anordnung der im allgemeinen nicht kovalent verbundenen einzelnen Polypeptidketten für oligomere Proteine. Hämoglobin ist ein Beispiel für ein oligomeres Protein.

In seinem nativen Zustand besitzt jedes Protein eine charakteristische Gestalt, die als Konformation bezeichnet wird. Die Konformation beinhaltet Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. In Abbildung 2.11 ist die dreidimensionale Struktur eines Komplexes von Alkoholdehydogenase aus Pferdeleber (HLADH) mit NAD^+ und Dimethylsulfoxid dargestellt.

2.2.2 Stabilität der Proteinstruktur

Proteine in Lösung enthalten eine Mischung verschiedener Typen von chemischer Gruppen, nämlich unpolär, polar und ionisierbar bzw. elektrisch geladen. In der Regel enthalten Proteine Aminosäuren, von denen ca. 40% unpolare, ca. 40 % polare, ungeladene und ca. 20 % geladene Seitenketten tragen. Man kann Proteine daher auch als amphoterer Polyelektrolyte mit einigen hydrophoben Gruppen bezeichnen. Die Konformation und damit die Löslichkeit und die biologische Aktivität von Proteinen hängen von pH-Wert, Ionenstärke, dielektrischen Eigenschaften des Lösungsmittels und Temperatur sowie Druck ab. Verlieren Proteine ihre charakteristische native Gestalt und damit ihre biologische Aktivität, so spricht man von Denaturierung. Die Denaturierung kann reversibel oder irreversibel sein. [11, 13, 66, 68]

Da die ionisierbaren Gruppen eines Proteins eine breite pK_a -Wert-Verteilung haben, sind die Ladungsverteilung und damit die Proteinstruktur vom pH-Wert abhängig. Die meisten Proteine zeigen an ihrem isoelektrischen Punkt, d. h. an dem pH-Wert, an dem ihre Nettoladung null und daher die elektrostatischen Wechselwirkungen minimal sind, ein Minimum in der Löslichkeit. [13]

Elektrolytzugabe zu einem gelösten Protein verringert die Stärke intra- und intermolekularer elektrostatischer Wechselwirkungen. Dies lässt sich analog zu den mizellaren Systemen (vgl. Abschnitt 2.1.3.2.3) aus der Debye-Hückel-Theorie der Elektrolytlösungen ableiten. Bei niedrigen Ionenstärken im Lösungsmittel ist das elektrostatische Potential einer Ladung relativ weitreichend, bei hohen Ionenstärken hingegen relativ kurzreichweitig. Ladungen werden also bei hohen Ionenstärken abgeschirmt. [13, 66]

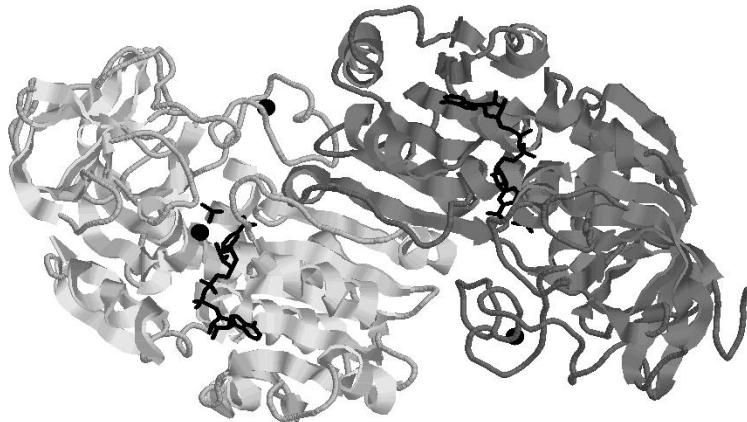


Abbildung 2.11: Die räumliche Struktur von Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HADH), mit NAD^+ und Dimethylsulfoxid (DMSO) komplexiert. Die Polypeptidketten der beiden Enzymuntereinheiten sind in unterschiedlichen Grautönen dargestellt. Schwarz gefärbt sind die Zink-Atome sowie die NAD^+ - und DMSO-Moleküle. Erzeugt wurde die Graphik mit dem Programm Rasmol aus PDB-Daten (PDB = Protein Data Base, [67]).

Der Zusatz organischer Lösungsmittel kann unterschiedliche Wirkung auf Proteine haben. Beispielsweise denaturieren hohe Konzentrationen an Ethanol (ca. 30 %) Proteine. Geringe Ethanolkonzentrationen können ebenfalls zu Veränderungen der Proteinstruktur führen – und in manchen Fällen Proteine stabilisieren! Diese Phänomene kann man damit erklären, daß Ethanol und vergleichbare kurzkettige Alkohole wie 1-Propanol oder 1-Butanol Wasserstoffbrückenbindungen und auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten beeinflussen, da sie selbst zur Ausbildung von H-Brücken befähigt sind und zudem einen unpolaren Molekülteil besitzen. [69, 70]

Man kann die Instabilität von Proteinen unter Druck darauf zurückführen, daß unpolare Aminosäurereste und geladene Gruppen im Proteininneren stärker solvatisiert werden. Monomere Proteine werden durch Druck nicht so schnell denaturiert wie oligomere Proteine. [69]

Die Erhöhung der Temperatur führt zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, die sich aus der Arrhenius-Gleichung ableiten läßt:

$$k = A \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T}\right) \quad (2.21)$$

A ist eine empirisch bestimmbare Konstante, E_a die Aktivierungsenergie des Übergangszustands der Enzymreaktion, die in erster Näherung als nahezu temperaturunabhängig angenommen wird, R die Gaskonstante und T die Temperatur. Als Faustregel gilt: nimmt man eine Aktivierungsenergie in der Größenordnung 40-50 kJ/mol an, so verdoppelt sich die Reaktionsgeschwindigkeit nahezu, wenn die Temperatur um 10 K erhöht wird.

Zusätzlich kann es durch Temperaturerhöhung zu einer Aufwindung nativ gefalteter Strukturen der Polypeptidketten im Protein und zur Ausbildung einer zufälligen Anordnung kommen. Das Protein verliert damit seine biologische Aktivität, es wird denaturiert.

Beide Prozesse, die Denaturierung und die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit, überlappen sich und führen zu einem scheinbaren Temperaturoptimum der katalytischen Aktivität. Durch Temperaturen oberhalb 40 °C werden die meisten Proteine aus mesophilen Organismen inaktiviert. Proteine aus thermophilen Organismen verlieren teilweise ihre Aktivität erst oberhalb von 100 °C. [11, 69, 71]

2.2.3 Wechselwirkungen von Tensiden mit Proteinen

Die biologische Funktion von Proteinen hängt stark von ihrer direkten Wechselwirkung mit anderen Molekülen – beispielsweise Nukleinsäuren, Polysaccharide, Lipide und andere Proteine – ab. Deshalb ist es nicht überraschend, daß die meisten wasserlöslichen Tenside stark mit Proteinen wechselwirken.

Daß Tensid-Protein-Wechselwirkungen existieren, wurde durch verschiedene experimentelle Methoden belegt. Dazu gehören unter anderem die Bestimmung der Oberflächenspannung, Viskositätsmessungen, Messungen von Circulardichroismus (CD) und optischer Rotationsdispersion (ORD) sowie Solubilisierung von Farbstoffen und Fluoreszenzmessungen.

Die treibende Kraft für die Assoziation von Tensidmolekülen zu Mizellen ist die Verminderung des Kontakts zwischen Wasser und hydrophobem Tensidrest. Dieselbe treibende Kraft fördert die Assoziation der Tensidreste mit hydrophoben Teilen der Proteinmoleküle. Die Kopfgruppen ionischer Tenside tendieren hingegen dazu, mit geladenen Gruppen der Proteine zu wechselwirken. [13, 68]

Von Biochemikern werden Tenside zur Solubilisation, Reinigung und Charakterisierung von Proteinen und anderen biochemisch relevanten Stoffen verwendet. Beispiele für die Anwendung von Tensiden sind die SDS- bzw. CTAB-Polyacrylamidgelektrophorese, die zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen verwendet werden, sowie die Extraktion von Proteinen aus biologischen Membranen [7, 13, 68]

2.2.3.1 Thermodynamische Aspekte

Die Bindung eines Liganden (L), beispielsweise eines Tensidmoleküls, an eine bestimmte Stelle eines Proteins (P) kann durch folgendes Gleichgewicht dargestellt werden:



Die zugehörige Assoziationskonstante K ist definiert als

$$K = \frac{c_{PL}}{c_P \cdot c_L} \quad (2.23)$$

wobei davon ausgegangen wird, daß alle beteiligten Substanzen in so geringer Konzentration vorliegen, daß thermodynamische Idealität angenommen werden kann. Im Hinblick auf Protein-Tensid-Wechselwirkungen ist es realistischer, einen Satz multipler Gleichgewichte zu verwenden:



Wenn die Gleichgewichtskonstante K für jeden Bindungsschritt identisch ist, folgt

$$K^n = \frac{c_{PL_n}}{c_P \cdot c_L^n} \quad (2.25)$$

Die mittlere Anzahl der pro Protein gebundenen Liganden erhält man aus

$$\bar{n} = n \frac{(K \cdot c_L)^n}{1 + (K \cdot c_L)^n} \quad (2.26)$$

Gleichung 2.26 beschreibt die Situation, in der die n Bindungsstellen identisch und unabhängig sind. Realistischer ist es, wenn man annimmt, daß die Bindung eines Liganden an eine Stelle eine Erhöhung oder Reduzierung der Affinitäten anderer Bindungsstellen, d.h. positive oder negative Kooperativität, bewirkt. Durch die Einführung eines Kooperativitätskoeffizienten ξ ergibt sich für \bar{n} der folgende Ausdruck:

$$\bar{n} = n \frac{(K \cdot c_L)^\xi}{1 + (K \cdot c_L)^\xi} \quad (2.27)$$

Im Falle positiver Kooperativität gilt $\xi > 1$, im Falle negativer Kooperativität $\xi < 1$. [13]

2.2.3.2 Molekulare Wechselwirkungen

Bei den Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Tensiden müssen zwei Fälle unterschieden werden: ionische und nichtionische Tenside.

Die Bindung ionischer Tenside an Proteine findet in zwei Schritten statt (vgl. Abbildung 2.12). Zunächst wird das Tensid, d.h. der Ligand, an spezifische Stellen an der Proteinoberfläche gebunden. Für SDS kommt es beispielsweise – so wird angenommen – zu elektrostatischen Wechselwirkungen des Sulfatanions mit den positiv geladenen Seitenketten von Lysin, Histidin und Arginin. Außerdem gibt es hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Dodecylrest des Tensids und unpolaren Gebieten auf der Proteinoberfläche, die den positiv geladenen Seitenketten benachbart sind. [13]

In einem zweiten Schritt entfaltet sich das Protein, „öffnet“ sein hydrophobes Inneres und

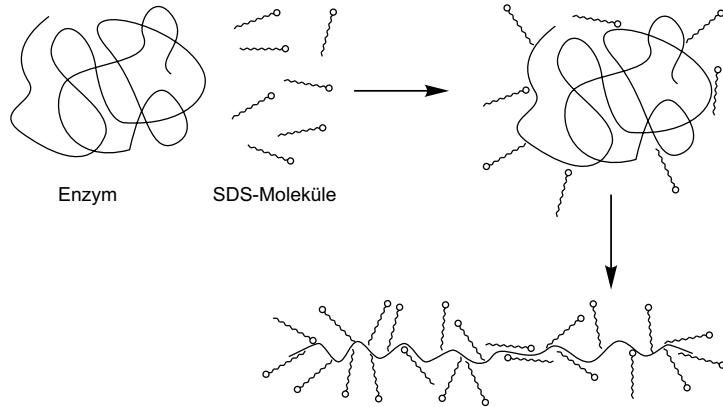


Abbildung 2.12: Denaturierung eines Proteins in zwei Schritte durch die Wechselwirkung mit SDS (nach [13] und [12])

ermöglicht so den Zugang zu weiteren potentiellen Bindungsstellen. Das Protein wird somit denaturiert. In diesem unspezifischen kooperativen Bindungsbereich ist die treibende Kraft die hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Tensidschwänzen und den unpolaren Resten des aufgefalteten Proteins. Wenn die mittlere Zahl der Tensidliganden 50 oder mehr erreicht und die Tensidkonzentration sich der CMC annähert, ähnelt die Struktur des Protein-Tensid-Komplexes immer mehr einer (stäbchenförmigen) Mizelle, die solubilisiertes Protein enthält. Wird, wie im Fall der SDS-Gelelektrophorese, ein deutlicher Überschuß an SDS zur Proteinlösung zugegeben, so bildet sich ein stark negativ geladener Protein-SDS-Komplex, dessen Ladung ungefähr der Proteinmasse proportional ist. [12, 13, 66]

Nichtionische Tenside zeigen im Bereich der CMC unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen mit Proteinen. Spezifische Bindungen gibt es hingegen nur in wenigen Ausnahmefällen, wie im Fall von Rinderserumalbumin und C₁₂E₆. Darüberhinaus führen nichtionische Tenside nicht zu einer Auffaltung oder Denaturierung von Proteinen. Eine mögliche Ursache mag darin begründet liegen, daß viele nichtionische Tenside eine relativ niedrige CMC besitzen und daher die Bildung von Mizellen günstiger ist als die Bildung eines Protein-Tensid-Komplexes. [13, 68]

Einfüsse auf die Bindung von Tensiden an Proteine haben neben der Natur der Tensid-Kopfgruppe noch eine Reihe weiterer Faktoren: die Kettenlänge des Tensids, die Ionenstärke der Lösung, der pH-Wert, die Temperatur, weitere (organische) Zusatzstoffe. Allgemein lässt sich z. B. feststellen, daß Zusätze, die die CMC eines ionischen Tensids herabsetzen, aber keine Elektrolyte sind, die Tendenz des Tensids, sich an Proteine anzulagern, reduzieren. [68]

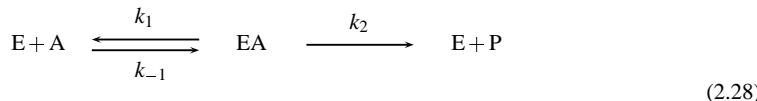
2.2.4 Enzymkinetik

Wie bereits erwähnt wurde, handelt es sich bei den Enzymen um Biokatalysatoren, die eine außerordentliche Spezifität und Aktivität besitzen. So beschleunigt das Enzym Urease den Abbau von Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid um den Faktor 10^{14} [66]. Um die Wirkungsweise von Enzymen – auch im Bezug auf die untersuchten Systeme – besser zu verstehen, soll im folgenden auf wesentliche Grundlagen der Enzymkinetik eingegangen werden. Als Quelle wurden im wesentlichen [71], [11] sowie [12] und [16] verwendet.

2.2.4.1 Ein-Substrat-Reaktionen

2.2.4.1.1 Michaelis-Menten-Gleichung

Betrachten wir zunächst einmal den einfachsten Fall einer enzymkatalysierten Reaktion:



Das Substrat A bildet mit dem Enzym E den Enzym-Substrat-Komplex EA. Dieser wiederum zerfällt entweder wieder zum Substrat und zum Enzym oder zum Produkt P und zum Enzym. Die Reaktionsgeschwindigkeit v für diese Reaktion ergibt sich aus

$$\frac{d[\text{A}]}{dt} = -k_1[\text{A}][\text{E}] + k_{-1}[\text{EA}] \quad (2.29)$$

$$\frac{d[\text{E}]}{dt} = -k_1[\text{A}][\text{E}] + (k_{-1} + k_2)[\text{EA}] \quad (2.30)$$

$$\frac{d[\text{EA}]}{dt} = k_1[\text{A}][\text{E}] - (k_{-1} + k_2)[\text{EA}] \quad (2.31)$$

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2[\text{EA}] = v \quad (2.32)$$

$[\text{X}]$ entspricht dabei der Konzentration der Komponente X und k_i der Geschwindigkeitskonstanten der i -ten Teilreaktion.

Gilt $k_1 \approx k_{-1} \gg k_2$, so kommt es zu einem gleichgewichtsähnlichen Zustand, dem sog. „Steady state“, und es folgt

$$\frac{d[\text{E}]}{dt} = \frac{d[\text{EA}]}{dt} = 0 \quad (2.33)$$

und damit und mit der Enzymgesamtkonzentration $[\text{E}]_o$

$$[\text{E}]_o = [\text{E}] + [\text{EA}] \quad (2.34)$$

ergibt sich

$$[\text{EA}] = \frac{k_1[\text{A}][\text{E}]_o}{k_1[\text{A}] + k_{-1} + k_2} \quad (2.35)$$

$$(2.36)$$

Setzt man diesen Ausdruck in Gleichung 2.32 ein, so erhält man eine Beziehung zwischen Umsatzgeschwindigkeit und Substratmenge:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] = \frac{k_2[A][E]_o}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [A]} \quad (2.37)$$

Mit

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.38)$$

sowie mit der Maximalgeschwindigkeit der Reaktion, V_{\max} ,

$$V_{\max} = k_2[E]_o \quad (2.39)$$

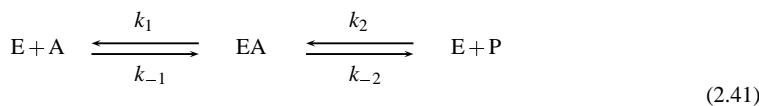
folgt

$$v = \frac{V_{\max}[A]}{K_m + [A]} \quad (2.40)$$

die sogenannte Michaelis-Menten-Gleichung.

2.2.4.1.2 Reversible Enzymreaktionen

Folgende Reaktionsgleichung ergibt sich für den Fall einer reversiblen Enzymreaktion:



Die Geschwindigkeit dieser Reaktion erhält man aus folgender Gleichung:

$$v = v_1 - v_2 = \frac{K_{mP}V_1[A] - K_{mA}V_2[P]}{K_{mA}K_{mP} + [A]K_{mP} + [P]K_{mA}} \quad (2.42)$$

mit

$$K_{mA} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} ; \quad K_{mP} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} ;$$

$$V_1 = k_2[E]_o ; \quad V_2 = k_{-1}[E]_o$$

Wie man sieht, setzt sich Gleichung 2.42 aus Anteilen der Michaelis-Menten-Gleichungen für die Hin- und Rückreaktion zusammen. Für $[P] = 0$ erhält man aus Gleichung 2.42 die Gleichungen der getrennten Reaktionen:

$$v_1 = \frac{V_1[A]}{K_{mA} + [A]} ; \quad v_2 = -\frac{V_2[P]}{K_{mP} + [P]} \quad (2.43)$$

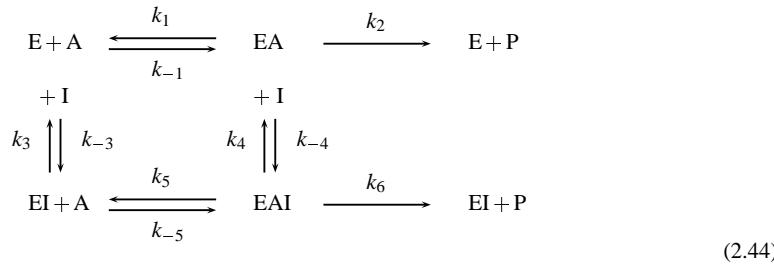
Man kann daraus folgern, daß man selbst bei Vorliegen einer Rückreaktion die einfache Michaelis-Menten-Gleichung als gültig ansehen kann, solange man das Produkt vernachlässigen kann, d.h. nur im Anfangsbereich der Zeit-Umsatz-Kurve.

2.2.4.2 Reversible Enzymhemmung

Als Enzymhemmung wird die „negative Beeinflussung der Enzymaktivität durch spezifisch an definierte Zentren (katalytische oder regulatorische) bindene Liganden - Hemmstoffe oder Inhibitoren“ [71] bezeichnet. Manche Hemmstoffe werden so fest an das Enzym gebunden, daß sie nicht mehr entfernt werden können. Man spricht dann von irreversibler Hemmung. Andere Inhibitoren können dagegen wieder vom Enzym abgelöst oder verdrängt werden. Diese Art der Hemmung bezeichnet man als reversible Enzymhemmung.

2.2.4.2.1 Allgemeine Geschwindigkeitsgleichung

Ein Hemmstoff I bindet reversibel an ein Enzym und beeinflußt dessen Reaktionsgeschwindigkeit v_1 :



Für das Substrat A und den Hemmstoff I ergeben sich aus diesem Reaktionsmechanismus je zwei Dissoziationskonstanten:

$$\begin{aligned}
 K_A &= \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][A]}{[EA]} & ; \quad K_{Ai} &= \frac{k_{-5}}{k_5} = \frac{[EI][A]}{[EAI]} & ; \\
 K_{ic} &= \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]} & ; \quad K_{iu} &= \frac{k_{-4}}{k_4} = \frac{[EA][I]}{[EAI]}
 \end{aligned}$$

Setzt man diese Ausdrücke ineinander ein, erhält man eine Gleichung für den Zusammenhang aller vier Konstanten:

$$\frac{K_A}{K_{Ai}} = \frac{K_{ic}}{K_{iu}} \tag{2.45}$$

Berücksichtigt man Steady-State-Bedingung und Massenbilanz, sowie die anderen Zusammenhänge, so erhält man für die Reaktionsgeschwindigkeit v :

$$v = \frac{(V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}})[A]}{K_m(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}) + (1 + \frac{[I]}{K_{iu}})[A]} \tag{2.46}$$

Der hier dargestellte Mechanismus entspricht einer partiell nicht-kompetitiven Hemmung. Hieraus lassen sich die wichtigsten Formen der reversiblen Hemmungen, die in Abbildung 2.13 als Übersicht dargestellt sind, ableiten.

Etwas näher soll im folgenden Text auf kompetitive, unkompetitive und nicht-kompetitive Hemmung eingegangen werden.

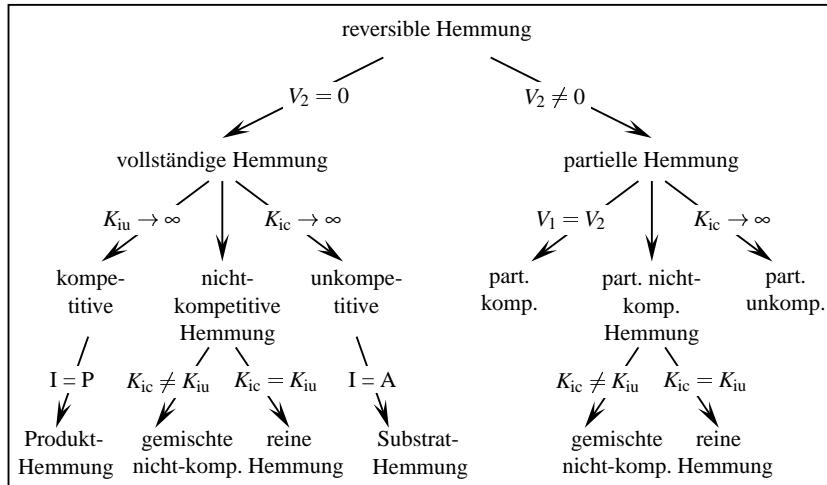
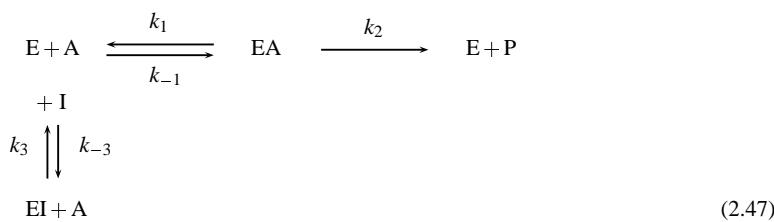


Abbildung 2.13: Die wichtigsten reversiblen Hemm-Mechanismen

2.2.4.2.2 Kompetitive Hemmung

Kompetitive Hemmung bedeutet, daß der Hemmstoff mit dem Substrat um dessen Bindungsstelle am aktiven Zentrum des Enzyms konkurriert. Es kann entweder das Substrat oder der Hemmstoff gebunden werden, aber nicht beide gleichzeitig. Für den Fall der kompetitiven Hemmung vereinfacht sich die allgemeine Reaktionsgleichung, Gleichung 2.44, zu



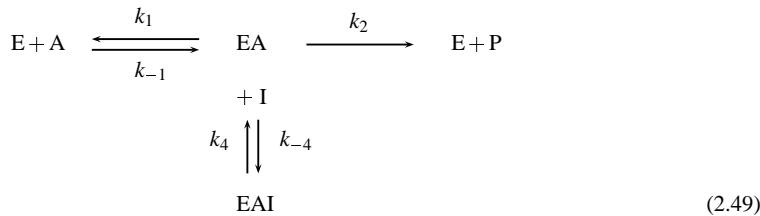
Als Geschwindigkeitsgleichung für die kompetitive Hemmung erhält man

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [\text{A}]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{ic}}\right) + [\text{A}]} \tag{2.48}$$

2.2.4.2.3 Unkompetitive Hemmung

Bei der unkompetitiven Hemmung bindet der Hemmstoff nur an den Enzym-Substrat-Komplex. Dies kann dann geschehen, wenn die Bindungsstelle für den Hemmstoff erst durch die Wechselwirkung Substrat-Enzym entsteht. Dieser Hemmtyp kommt allerdings relativ selten vor.

Nimmt man als Hemmmechanismus unkompetitiven Hemmung an, so wird aus Gleichung 2.44



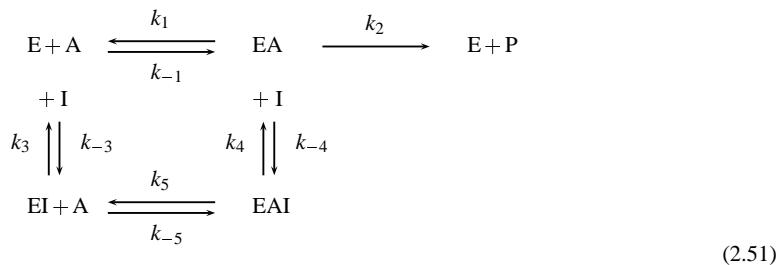
Die Reaktionsgeschwindigkeit im Fall einer unkompetitiven Hemmung erhält man aus nachfolgender Gleichung:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [A]}{K_m + \left(1 + \frac{[I]}{K_{Iu}}\right) \cdot [A]} \quad (2.50)$$

Ein Beispiel für die unkompetitive Hemmung ist die Substrathemmung, die auch als Substratüberschußhemmung bezeichnet wird. Liegt das Substrat im Überschuß vor, so bindet ein erstes Substratmolekül an das Enzym und nimmt an der Katalyse bei, während das zweite Substratmolekül formal als unkompetitiver Hemmstoff wirkt, der nur mit dem Enzym-Substrat-Komplex wechselwirken kann.

2.2.4.2.4 Nicht-kompetitive Hemmung

Die nicht-kompetitive Hemmung ist eine Mischung aus kompetitiver und unkompetitiver Hemmung. Man bezeichnet sie auch als gemischte Hemmung. Es ergibt sich folgende Reaktionsgleichung:



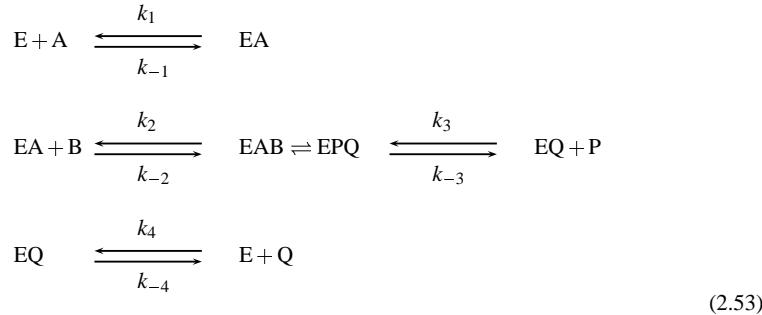
Die Reaktionsgeschwindigkeit ist für den Fall nicht-kompetitiver Enzymhemmung gegeben als

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [A]}{K_m \cdot (1 + \frac{[I]}{K_{ic}}) + (1 + \frac{[I]}{K_{iu}}) \cdot [A]} \quad (2.52)$$

Gilt $K_{ic} = K_{iu}$, so spricht man von einer reinen nicht-kompetitiven Hemmung.

2.2.4.3 Mehr-Substrat-Reaktionen

Im Fall der Dehydrogenasen, zu denen HLADH zählt, liegt eine Mehr-Substrat-Reaktion vor, da durch HLADH z.B. ein Alkohol oxidiert wird, während das Koenzym bzw. -substrat NAD^+ reduziert wird. Deshalb soll noch kurz auf einen speziellen Fall einer Mehr-Substrat-Reaktion eingegangen werden, nämlich den „Ordered Bi-Bi-Mechanismus“, der z. B. für HLADH angenommen wird. Folgendes Reaktionsschema lässt sich aufstellen:



Für diesen Mechanismus ergibt sich ein sehr komplexer Ausdruck für die Geschwindigkeitsgleichung, der nur der Vollständigkeit halber hier dargestellt werden soll:

$$v = \frac{V_1 V_2 \left([A][B] - \frac{[P][Q]}{K_g} \right)}{K_{iA} K_{mB} V_2 + K_{mB} V_2 [A] + K_{mA} V_2 [B] + \frac{K_{mQ} V_1 [P]}{K_g} + \frac{K_{mP} V_1 [Q]}{K_g}} \\ + \frac{V_2 [A][B] + \frac{K_{mQ} V_1 [A][P]}{K_{iA} K_g} + \frac{K_{mA} V_2 [B][Q]}{K_{iQ}} + \frac{V_1 [P][Q]}{K_g}}{K_{iP}} \\ + \frac{V_2 [A][B][P]}{K_{iP}} + \frac{V_1 [B][P][Q]}{K_{iB} K_g} \quad (2.54)$$

Für den Fall von unter Steady-State-Bedingungen gemessener Anfangsgeschwindigkeit lässt sich diese Gleichung für die Hinreaktion mit $[P] = [Q] = 0$ vereinfachen zu

$$v = \frac{V_1 [A][B]}{K_{iA} K_{mB} + K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + [A][B]} \quad (2.55)$$

Geht man davon aus, daß die Konzentration des Substrats B konstant bleibt, z. B. indem B in sehr großem Überschuß vorliegt, dann kann man Gleichung 2.55 in eine der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2.40) äquivalente Form bringen:

$$v = \frac{V'_{\max}[A]}{K'_m + [A]} \quad (2.56)$$

Hierbei wurden folgende Ersetzungen durchgeführt:

$$\begin{aligned} V'_{\max} &= \frac{[B]}{[B] + K_{mB}} ; \\ K'_m &= \frac{K_{mA}[B] + K_{iA}K_{mB}}{[B] + K_{mB}} \end{aligned}$$

2.2.4.4 Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit

Es gilt nun noch die Frage zu beantworten, wie die (Anfangs-) Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion bestimmt werden kann.

Am sinnvollsten ist es, eine Methode zu wählen, bei die Konzentration eines der Edukte oder Produkte der gemessenen Größe proportional ist. Aus der zeitlichen Änderung der Meßgröße während der Reaktion läßt sich dann die zeitliche Änderung des Edukts oder Produkts bestimmen und damit die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion. Im Fall von HLADH ist die UV/Vis-Spektroskopie die Methode der Wahl, da die Koenzyme NAD⁺ und NADH im UV/Vis-Bereich absorbieren.

Betrachten wir beispielsweise eine Reaktion, die sich mit der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2.40) beschreiben läßt. Durch Integration der Michaelis-Menten-Gleichung erhält man für das Edukt A

$$K_m \ln \left(\frac{[A]}{[A]_o} \right) + [A]_o - [A] = V_{\max} t \quad (2.57)$$

eine Gleichung, die sich nur numerisch nach [A] auflösen läßt. Unter Annahme einer irreversiblen Reaktion und damit $[P] = [A]_o - [A]$ erhält man für das Produkt P einen ebenfalls nur numerisch lösbar Ausdruck:

$$K_m \ln \left(\frac{[A]_o - [P]}{[A]_o} \right) + [P] = V_{\max} t \quad (2.58)$$

In Abbildung 2.14 ist der numerisch berechnete zeitliche Verlauf der Produktkonzentration dargestellt. Wie man sieht, liegt zu Beginn der Reaktion eine mehr oder minder lineare Abhängigkeit der Produktkonzentration von der Reaktionszeit vor. Paßt man in diesem Bereich ($t \rightarrow 0$) den Kurvenverlauf durch eine lineare Regression an, so ergibt sich die Anfangsgeschwindigkeit aus der Steigung der erhaltenen Geraden. Diese Methode wird auch als Tangenten-Verfahren bezeichnet. Es ist zwar nicht das beste Verfahren, um genaue Werte für die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zu erhalten, aber doch das rechnerisch einfachste. Um Einflüsse schwankender Enzymkonzentrationen auszugleichen, wird eine Normierung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten durchgeführt. Zunächst wird die Enzymaktivität definiert als

$$r = \frac{v_{\text{Prb},o}}{v_{\text{Std},o}} \quad (2.59)$$

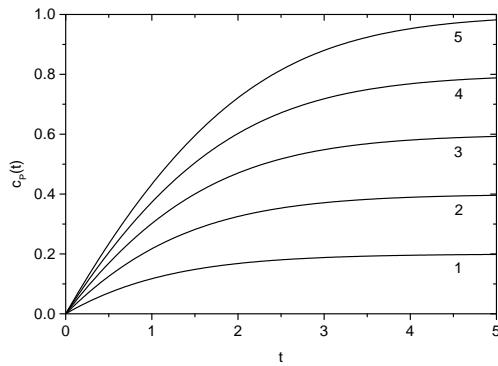


Abbildung 2.14: Zeitlicher Verlauf der aus der Michaelis-Menten-Gleichung numerisch berechneten Produktkonzentration für verschiedene Anfangskonzentrationen an Substrat. Folgende Werte wurden verwendet: $i = 1 - 5$ (Indizes der Kurven), $[A]_0 = i * 0.2$, $K_m = 1$, $V_{\max} = 1$. (Anmerkung: $c_P(t) = [P]$.)

wobei $v_{o,Prb}$ die gemessene Anfangsreaktionsgeschwindigkeit für eine Probelösung und $v_{o,Std}$ für eine Standardlösung bei jeweils identischer Enzymkonzentration ist. Im Fall von HLADH wird beispielsweise eine 10^{-2} mol/l Ethanollösung verwendet. Daß die Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration abhängig ist, erkennt man bei der Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung 2.40: die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} ist laut Gleichung 2.39 definiert als

$$V_{\max} = k_2 [E]_0$$

Setzt man diese Gleichung in Gleichung 2.40 ein, so erhält man

$$v_i = \frac{k_{2,i} \cdot [E]_0 \cdot [A]_i}{K_{m,i} + [A]_i} \quad (2.60)$$

i entspricht dabei Std oder Prb. Ersetzt man in Gleichung 2.59 $v_{o,Prb}$ und $v_{o,Std}$ durch einen Gleichung 2.60 entsprechenden Ausdruck, so ergibt sich folgende Gleichung:

$$r = \frac{k_{2,Prb} \cdot [A]_{Prb} \cdot (K_{m,Std} + [A]_{Std})}{(K_{m,Prb} + [A]_{Prb}) \cdot k_{2,Std} \cdot [A]_{Std}} \quad (2.61)$$

Verwendet man als Standard immer die gleiche Lösung, so sind $k_{2,Std}$, $[A]_{Std}$ und $K_{m,Std}$ konstant und können zu einer neuen Konstanten k_{Std} zusammengefaßt werden:

$$k_{Std} = \frac{K_{m,Std} + [A]_{Std}}{k_{2,Std} \cdot [A]_{Std}} \quad (2.62)$$

Damit vereinfacht sich Gleichung 2.61 zu

$$r = \frac{k_{2,Prb} \cdot [A]_{Prb} \cdot k_{Std}}{K_{m,Prb} + [A]_{Prb}} = \frac{V'_{\max} \cdot [A]_{Prb}}{K_{m,Prb} + [A]_{Prb}} \quad (2.63)$$

mit $V'_{\max} = k_{2,\text{Prb}} \cdot k_{\text{Std}}$ als scheinbarer Maximalgeschwindigkeit. Das Substrat A für Probenmessung und Standard kann dieselbe Substanz sein, es können aber auch verschiedene Substanzen verwendet werden.

2.3 UV/Vis-Spektroskopie

2.3.1 Das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz

Die Grundlage von Absorptionsmessungen von ultraviolettem, sichtbarem und infrarotem Licht (UV, Vis und IR) bildet das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz. Es beschreibt die Tatsache, daß die Intensität von Licht, das durch eine mit einer Probe befüllten Küvette fällt, durch Absorption abnimmt. In Abbildung 2.15 ist dies schematisch dargestellt. [8,47,48,72]

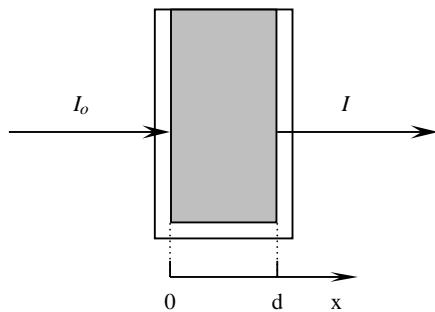


Abbildung 2.15: Absorption von Licht

I_o sei die Intensität des in eine verdünnte Lösung, die sich in einer Küvette befindet, einfallenden Lichtes, I die Intensität des austretenden Lichtes. Unter der Annahme, daß Reflexion oder Streuung an der Küvette und der Lösung nicht berücksichtigt werden müssen, kann man für die Intensitätsabnahme durch Absorption folgende Gleichung aufstellen:

$$-dI = k \cdot I \cdot dx \quad (2.64)$$

Hierbei ist dx die durchstrahlte Schichtdicke und k die Proportionalitätskonstante. Integriert man nun nach Variablen trennung zwischen I_o und I bzw. entsprechend zwischen 0 und d , so erhält man

$$\ln \frac{I_o}{I} = k \cdot d \quad (2.65)$$

Häufig wird Gleichung 2.65 statt im natürlichen Logarithmus im dekadischen Logarithmus geschrieben, was dem Bouguer-Lambertschen Gesetz entspricht:

$$\log \frac{I_o}{I} = a \cdot d \quad (2.66)$$

a ist der lineare dekadische Extinktions- bzw. Absorptionskoeffizient. Für eine Lösung, deren Lösungsmittel völlig durchlässig ist ($a_{LM} = 0$), gilt

$$a = \epsilon \cdot c \quad (2.67)$$

wobei ϵ als molarer dekadischer Extinktions- oder Absorptionskoeffizient bezeichnet wird und c die molare Konzentration ist. Faßt man Gleichung 2.67, die von Beer aufgestellt wurde, und Gleichung 2.66 zusammen, so ergibt sich das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz:

$$A = \log \frac{I_o}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (2.68)$$

A ist das (dekadische) Absorptionsvermögen bzw. die Extinktion. Eine weitere gängige Größe, die bei Absorptionsmessungen bestimmt wird, ist die Transmission bzw. die Durchlässigkeit T , die in % angegeben wird:

$$T = \frac{I}{I_o} \cdot 100 \quad (2.69)$$

Die Extinktion kann man damit auch folgendermaßen darstellen:

$$A = \log \frac{I_o}{I} = \log \frac{100}{T} \quad (2.70)$$

Aus Gleichung 2.68 läßt sich der molare dekadische Extinktionskoeffizient ϵ bestimmen:

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot d} \quad (2.71)$$

Man sollte beachten, daß ϵ und damit auch A von der Wellenlänge λ bzw. wegen $\bar{\nu} = 1/\lambda$ von der Wellenzahl abhängt.

Für eine verdünnte Lösung, die mehrere Komponenten enthält, gilt auch das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz. Die gemessene Extinktion A dieser Lösung ist die Summe der Extinktionen, die erhalten würde, wenn jede einzelne Komponente getrennt in Lösung vermessen würde:

$$A = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n \epsilon_i \cdot c_i \cdot d \quad (2.72)$$

A_i ist die Extinktion der Lösung der i -ten Komponenten, ϵ_i ist ihr molarer dekadischer Extinktionskoeffizient, c_i ihre Konzentration und d die Schichtdicke der Küvette.

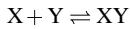
2.3.2 Komplexe zwischen zwei Komponenten

Treten Abweichungen vom Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz auf, kann man diese manchmal durch Komplexbildungs- bzw. Assoziationsgleichgewichte erklären [72].

Im folgenden sollen zunächst die Grundlagen zur Untersuchung eines 1:1-Komplexes zwischen zwei Substanzen mittels UV/Vis-Spektroskopie gelegt werden, bevor dann der Fall eines Tensid-Farbstoff-Komplexes behandelt wird.

2.3.2.1 Grundlagen [72]

Betrachtet man allgemein die Bildung eines 1:1-Komplexes XY aus zwei Verbindungen X und Y,



so lässt sich die zugehörige Komplexbildungskonstante wie folgt darstellen:

$$K = \frac{c_{XY}}{c_X \cdot c_Y} \quad (2.73)$$

wobei c_X , c_Y und c_{XY} die Konzentrationen der Substanzen X, Y und des Komplexes XY darstellen und die Aktivitätskoeffizienten unter der Annahme einer nahezu idealen Lösung vernachlässigt wurden.

Mit Hilfe der Massenbilanz für die Substanzen X und Y

$$c_{X,o} = c_{XY} + c_X \quad ; \quad c_{Y,o} = c_{XY} + c_Y \quad (2.74)$$

erhält man aus Gleichung 2.73

$$K = \frac{c_{XY}}{(c_{X,o} - c_{XY})(c_{Y,o} - c_{XY})} \quad (2.75)$$

$c_{X,o}$ bzw. $c_{Y,o}$ sind hierbei die Gesamtkonzentrationen der Komponente X bzw. Y in der betrachteten Lösung.

Betrachten wir nun die Extinktion einer Lösung, die die Komponenten X und Y sowie den Komplex XY enthält. Die gesamte Extinktion A ist - setzt man die Gültigkeit des Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz (Gleichung 2.68 bzw. 2.72) voraus - die Summe der Extinktionen der einzelnen absorbierenden Substanzen:

$$A = \sum_{i=1}^n A_i = (\varepsilon_X \cdot c_X + \varepsilon_Y \cdot c_Y + \varepsilon_{XY} \cdot c_{XY}) \cdot d \quad (2.76)$$

Formt man Gleichung 2.74 entsprechend um und setzt sie in Gleichung 2.76 ein, erhält man folgende Gleichung:

$$\begin{aligned} A &= (\varepsilon_X \cdot (c_{X,o} - c_{XY}) + \varepsilon_Y \cdot (c_{Y,o} - c_{XY}) + \varepsilon_{XY} \cdot c_{XY}) \cdot d \\ &= ((\varepsilon_{XY} - \varepsilon_X - \varepsilon_Y) \cdot c_{XY} + \varepsilon_X \cdot c_{X,o} + \varepsilon_Y \cdot c_{Y,o}) \cdot d \end{aligned} \quad (2.77)$$

Aus dieser Gleichung bekommt man durch entsprechendes Umformen einen Ausdruck für die Konzentration des Komplexes, c_{XY} :

$$c_{XY} = \frac{A - \varepsilon_X \cdot c_{X,o} - \varepsilon_Y \cdot c_{Y,o}}{d \cdot (\varepsilon_{XY} - \varepsilon_X - \varepsilon_Y)} \quad (2.78)$$

Nun führt man zwei neue Größen ein, die Extinktionsdifferenz ΔA und die Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta \epsilon$:

$$\Delta A = A - \epsilon_X \cdot c_{X,o} - \epsilon_Y \cdot c_{Y,o} = A - A_{X,o} - A_{Y,o} \quad (2.79)$$

$$\Delta \epsilon = \epsilon_{XY} - \epsilon_X - \epsilon_Y \quad (2.80)$$

Damit vereinfacht sich Gleichung 2.78 zu

$$c_{XY} = \frac{\Delta A}{d \cdot \Delta \epsilon} \quad (2.81)$$

Wie kommt man aber nun zu einer Gleichung, mit deren Hilfe sich die Komplexbildungskonstante graphisch bzw. durch einen Fit bestimmen lässt? Man formt zunächst einmal Gleichung 2.73 wie folgt um:

$$\frac{1}{K} = \frac{(c_{X,o} - c_{XY})(c_{X,o} - c_{XY})}{c_{XY}} = \frac{c_{X,o} \cdot c_{Y,o}}{c_{XY}} - (c_{X,o} + c_{Y,o}) + c_{XY} \quad (2.82)$$

Nun gibt es zwei Möglichkeiten, wie man weiterverfahren kann. Man kann entweder davon ausgehen, daß $(c_{X,o} + c_{Y,o}) \gg c_{XY}$ und daß somit c_{XY} vernachlässigt werden kann, oder daß dies nicht gilt und deshalb c_{XY} nicht vernachlässigt werden kann. Diese beiden Möglichkeiten sollen aus Gründen der Übersichtlichkeit in zwei getrennten Unterpunkten behandelt werden.

2.3.2.1.1 Vernachlässigung von c_{XY}

Gilt $(c_{X,o} + c_{Y,o}) \gg c_{XY}$, so erhält man aus Gleichung 2.82

$$\frac{1}{K} = \frac{c_{X,o} \cdot c_{Y,o}}{c_{XY}} - (c_{X,o} + c_{Y,o}) \quad (2.83)$$

Setzt man hierin Gleichung 2.81 ein und formt entsprechend um, so ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{d \cdot c_{X,o} \cdot c_{Y,o}}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K} + \frac{c_{X,o} + c_{Y,o}}{\Delta \epsilon} \quad (2.84)$$

Die Größen $c_{X,o}$ und $c_{Y,o}$ sind bekannt, ΔA lässt sich aus den gemessenen Spektren berechnen, und $\Delta \epsilon$ sowie K kann man aus der Auftragung von $d \cdot c_{X,o} \cdot c_{Y,o} / \Delta A$ gegen $(c_{X,o} + c_{Y,o})$ bestimmen.

Aus Gleichung 2.84 lassen sich drei weitere Möglichkeiten der graphischen Bestimmung von $\Delta \epsilon$ und K herleiten:

1. Mit $c_{X,o} \gg c_{Y,o}$ folgt aus Gleichung 2.84:

$$\frac{d \cdot c_{X,o} \cdot c_{Y,o}}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K} + \frac{c_{X,o}}{\Delta \epsilon} \quad (2.85)$$

2. Teilt man Gleichung 2.84 durch $(c_{X,o} + c_{Y,o})$, so erhält man

$$\frac{d \cdot c_{X,o} \cdot c_{Y,o}}{\Delta A \cdot (c_{X,o} + c_{Y,o})} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K \cdot (c_{X,o} + c_{Y,o})} + \frac{1}{\Delta \epsilon} \quad (2.86)$$

3. Aus Gleichung 2.86 ergibt sich für $c_{X,o} \gg c_{Y,o}$

$$\frac{d \cdot c_{Y,o}}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K \cdot c_{X,o}} + \frac{1}{\Delta \epsilon} \quad (2.87)$$

2.3.2.1.2 Berücksichtigung von c_{XY}

Vernachlässigt man c_{XY} nicht, so erhält man durch Einsetzen von Gleichung 2.81 in Gleichung 2.82

$$\frac{d \cdot c_{X,o} \cdot c_{Y,o}}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K} + \frac{c_{X,o} + c_{Y,o}}{\Delta \epsilon} - \frac{\Delta A}{\Delta \epsilon^2 \cdot d} \quad (2.88)$$

und durch Division durch $(c_{X,o} + c_{Y,o})$

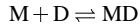
$$\frac{d \cdot c_{X,o} \cdot c_{Y,o}}{\Delta A \cdot (c_{X,o} + c_{Y,o})} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K \cdot (c_{X,o} + c_{Y,o})} + \frac{1}{\Delta \epsilon} - \frac{\Delta A}{\Delta \epsilon^2 \cdot d \cdot (c_{X,o} + c_{Y,o})} \quad (2.89)$$

2.3.2.2 Komplex zwischen Mizelle und Farbstoff

2.3.2.2.1 Bestimmung der Aggregationszahl

Üblicherweise wird die Aggregationszahl von Mizellen mittels Streumethoden oder Fluoreszenzmessungen bestimmt. In der Literatur finden sich allerdings keine Angaben zur Bestimmung aus Absorptionsmessungen im UV/Vis-Bereich. Theoretisch lässt sich aber, wie im folgenden gezeigt werden soll, die Aggregationszahl durchaus UV/Vis-spektroskopisch bestimmen.

Gehen wir wieder von einem 1:1-Komplex, diesmal zwischen Mizelle M und Farbstoff D, aus:



Die zugehörige Komplexbildungskonstante ergibt sich analog zu 2.73:

$$K = \frac{c_{MD}}{c_M \cdot c_D} \quad (2.90)$$

Die Gesamtkonzentration an Mizellen $c_{M,o}$ ist, wenn man von der Gültigkeit des Massenwirkungsmodell der Mizellbildung (vgl. Abschnitt 2.1.3.2.2) ausgeht und davon, daß die Konzentration an freien Tensidmonomeren oberhalb der CMC konstant bleibt, definiert als

$$c_{M,o} = \frac{c_{T,o} - c_{CMC}}{N_{AG}} = \frac{\Delta c_{T,o}}{N_{AG}} \quad (2.91)$$

Hierbei ist N_{AG} die Aggregationszahl der Mizellen, $c_{T,o}$ die Gesamtkonzentration an Tensid in der Lösung, c_{CMC} die kritische Mizellkonzentration des Tensids und $\Delta c_{T,o}$ die Tensidkonzentrationsdifferenz, definiert als

$$\Delta c_{T,o} = c_{T,o} - c_{CMC} \quad (2.92)$$

Für alle nun verwendeten Gleichungen ist der erste Schritt identisch: $c_{X,o}$ wird durch $c_{M,o}$ und $c_{Y,o}$ durch $c_{D,o}$ ersetzt und außerdem wird noch Gleichung 2.91 verwendet.

1. Aus Gleichung 2.84 erhalten wir

$$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{\Delta A \cdot N_{AG}} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K} + \frac{\Delta c_{T,o} + c_{D,o} \cdot N_{AG}}{\Delta \epsilon \cdot N_{AG}} \quad (2.93)$$

Multipliziert man jetzt noch mit N_{AG} , ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{\Delta A} = \frac{N_{AG}}{\Delta \epsilon \cdot K} + \frac{\Delta c_{T,o}}{\Delta \epsilon} + \frac{c_{D,o} \cdot N_{AG}}{\Delta \epsilon} \quad (2.94)$$

Durch eine Auftragung von $d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o} / \Delta A$ als Funktion von $\Delta c_{T,o}$ und $c_{D,o}$ und einen entsprechenden Fit lassen sich also die Aggregationszahl N_{AG} einer Mizelle sowie K und $\Delta \epsilon$ bestimmen.

2. Aus Gleichung 2.85 erhält man

$$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{N_{AG} \cdot \Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K} + \frac{\Delta c_{T,o}}{N_{AG} \cdot \Delta \epsilon} \quad (2.95)$$

Nach Multiplikation mit N_{AG} ergibt sich

$$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{\Delta A} = \frac{N_{AG}}{\Delta \epsilon \cdot K} + \frac{\Delta c_{T,o}}{\Delta \epsilon} \quad (2.96)$$

Man erkennt, daß sich mit dieser Gleichung keine Aggregationszahlen bestimmen lassen.

3. Gleichung 2.86 wird zu

$$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{N_{AG} \cdot \Delta A \cdot \left(\frac{\Delta c_{T,o}}{N_{AG}} + c_{D,o} \right)} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K \cdot \left(\frac{\Delta c_{T,o}}{N_{AG}} + c_{D,o} \right)} + \frac{1}{\Delta \epsilon} \quad (2.97)$$

Auch durch Umformen läßt sich diese Gleichung nicht weiter vereinfachen - außer zu Gleichung 2.94, was aber nicht der Sinn des Ganzen ist -, so daß mit ihr eine Bestimmung der Aggregationszahl nicht möglich ist.

4. Aus Gleichung 2.87 ergibt sich

$$\frac{d \cdot c_{D,o}}{\Delta A} = \frac{N_{AG}}{\Delta \epsilon \cdot K \cdot \Delta c_{T,o}} + \frac{1}{\Delta \epsilon} \quad (2.98)$$

Aus dieser Gleichung läßt sich, wie man sofort sieht, N_{AG} ebenfalls nicht bestimmen.

5. Gleichung 2.88 wird zu

$$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{\Delta A \cdot N_{AG}} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K} + \frac{\Delta c_{T,o} + N_{AG} \cdot c_{D,o}}{N_{AG} \cdot \Delta \epsilon} - \frac{\Delta A}{\Delta \epsilon^2 \cdot d} \quad (2.99)$$

Durch Multiplikation mit N_{AG} erhält man

$$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{\Delta A} = \frac{N_{AG}}{\Delta \epsilon \cdot K} + \frac{\Delta c_{T,o}}{\Delta \epsilon} + \frac{N_{AG} \cdot c_{D,o}}{\Delta \epsilon} - \frac{N_{AG} \cdot \Delta A}{\Delta \epsilon^2 \cdot d} \quad (2.100)$$

Betrachtet man $d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o} / \Delta A$ als Funktion von $\Delta c_{T,o}$, $c_{D,o}$ und ΔA und fitted entsprechend, so kann man N_{AG} , K und $\Delta \epsilon$ bestimmen.

6. Führt man die Ersetzungen in Gleichung 2.89 durch, so ergibt sich

$$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{N_{AG} \cdot \Delta A \cdot \left(\frac{\Delta c_{T,o}}{N_{AG}} + c_{D,o} \right)} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K \cdot \left(\frac{\Delta c_{T,o}}{N_{AG}} + c_{D,o} \right)} + \frac{1}{\Delta \epsilon} - \frac{\Delta A}{\Delta \epsilon^2 \cdot d \cdot \left(\frac{\Delta c_{T,o}}{N_{AG}} + c_{D,o} \right)} \quad (2.101)$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich, ähnlich wie bei Gleichung 2.97, durch Umformen keine Gleichung, die die Bestimmung der Aggregationszahl erlaubt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, daß nur die Gleichungen 2.84 und 2.88 sowie die daraus abgeleiteten Gleichungen 2.94 und 2.100 dazu geeignet sind, Aggregationszahlen sowie die Komplexbildungskonstanten K für einen 1:1-Komplex zwischen Mizelle und Farbstoff und die Differenz der molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\Delta \epsilon$ von Komplex, Farbstoff und Mizelle zu bestimmen. Man kann aber auch sagen, daß mit den Gleichungen 2.96, 2.97, 2.98 und 2.101 K und $\Delta \epsilon$ nur dann bestimmt werden können, wenn N_{AG} bekannt ist.

2.3.2.2.2 Bestimmung von Komplexbildungskonstante und Extinktionskoeffizientendifferenz bei unbekannter Aggregationszahl

Ein Problem besteht darin, ob sich die Komplexbildungskonstante K und die Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta \epsilon$ für den Komplex zwischen Mizelle und Farbstoff auch dann bestimmen lassen, wenn die Aggregationszahl N_{AG} der Mizelle nicht bekannt ist.

Betrachten wir zunächst einmal Gleichung 2.96:

$$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{\Delta A} = \frac{N_{AG}}{\Delta \epsilon \cdot K} + \frac{\Delta c_{T,o}}{\Delta \epsilon}$$

Führt man eine neue Komplexbildungskonstante K' ein, für die gilt:

$$K' = \frac{K}{N_{AG}} \quad (2.102)$$

so erhält man aus Gleichung 2.96:

$$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K'} + \frac{\Delta c_{T,o}}{\Delta \epsilon} \quad (2.103)$$

D.h. mit dieser Gleichung lässt sich eine Komplexbildungskonstante K' sowie eine Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta \epsilon$ bestimmen, wobei aber in der Komplexbildungskonstante die Aggregationszahl der Mizelle steckt.

Analoges ergibt sich, wenn man Gleichung 2.102 in Gleichung 2.98 einsetzt:

$$\frac{d \cdot c_{D,o}}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K' \cdot \Delta c_{T,o}} + \frac{1}{\Delta \epsilon} \quad (2.104)$$

Im Fall der Gleichungen 2.94, 2.97, 2.100 und 2.101 ist die Einführung von K' hingegen nicht sinnvoll.

2.3.2.2.3 Bestimmung der kritischen Mizellkonzentration

Man geht davon aus, daß – wie oben dargestellt – eine Wechselwirkung bzw. Assoziation nur zwischen Farbstoff und Mizelle, aber nicht zwischen Farbstoff und freiem Tensidmonomer stattfindet. Die Folge davon ist, daß Veränderungen des Spektrums des Farbstoffes erst ab der CMC auftreten. Beispielsweise kann sich im Farbstoffspektrum ein Maximum sowohl in der Wellenlänge als auch in der Extinktion verschieben, wenn die Tensidkonzentration die CMC überschreitet. Die CMC erhält man, indem man die Wellenlänge λ_{\max} oder die Extinktion E_{\max} des Maximums oder die Extinktion E bei einer Wellenlänge im Bereich des Maximums als Funktion der Tensidkonzentration aufträgt und die Lage des Knicks bestimmt (vgl. Abschnitt 2.1.3.3.1).

2.3.3 Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit einer Enzymreaktion aus UV/Vis-Messungen

Man geht von einer Enzymreaktion aus, für die die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2.40) gültig ist. Nimmt man an, daß das Produkt P der Reaktion bei der Beobachtungswellenlänge absorbiert, die anderen an der Reaktion beteiligten Substanzen aber nicht, so hängt die Extinktion zur Zeit t , $A(t)$, nur von der Konzentration an Produkt P ab:

$$A(t) = \epsilon_P \cdot c_P(t) \cdot d \quad (2.105)$$

v läßt sich damit darstellen als

$$v = \frac{dc_P(t)}{dt} = \frac{dA(t)}{\epsilon_P \cdot d \cdot dt} \quad (2.106)$$

v ist somit der zeitlichen Änderung der Extinktion $\frac{dA(t)}{dt}$ proportional.

Man kann natürlich auch die in Gleichung 2.59 definierte Enzymaktivität anstelle der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit verwenden. Unter der Voraussetzung, daß sowohl bei der Probemessung als auch bei der Standardmessung das gleiche Produkt spektroskopisch beobachtet wird, erhält man mit Gleichung 2.106 folgenden Ausdruck für die Enzymaktivität r :

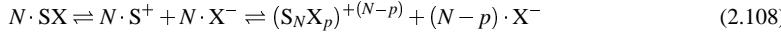
$$r = \frac{\left(\frac{dc_{P,Prb}(t)}{dt} \right)}{\left(\frac{dc_{P,Std}(t)}{dt} \right)} = \frac{\left(\frac{dA_{Prb}(t)}{dt} \right)}{\left(\frac{dA_{Std}(t)}{dt} \right)} \quad (2.107)$$

Wie man sieht, muß zur Bestimmung der Enzymaktivität die Extinktion nicht unbedingt in die Probenkonzentration umgerechnet werden.

2.4 Leitfähigkeitsmessungen

Da zur Bestimmung der CMC neben UV/Vis-spektroskopischen Messungen auch Leitfähigkeitsmessungen verwendet wurden, sollen im folgenden die wichtigsten Gesichtspunkte dieser Meßmethode dargestellt werden.

Für den Fall einfacher kationischer Tenside kann man – in Abwandlung des Gleichgewichts 2.12 nach dem Massenwirkungsmodell – annehmen, daß in wäßrigen Mizellaren Lösungen folgendes Gleichgewicht vorliegt [73]:



$(S_N X_p)^{+(N-p)}$ ist identisch mit der Mizellspezies $M^{+(N-p)}$ (vgl. Gleichgewicht 2.12). Beiträge zur Leitfähigkeit liefern die dissoziierten Tensidmonomere und die teilweise dissoziierten Mizellen. Nimmt man an, daß es sich bei der CMC um eine einzige, diskrete Konzentration handelt, läßt sich die spezifische Leitfähigkeit einer Lösung eines kationischen Tensids darstellen als

$$\kappa = c_{CMC} \cdot (\lambda_{X^-} + \lambda_{S^+}) + \frac{c_T - c_{CMC}}{N} \cdot \Lambda_M + \frac{c_T - c_{CMC}}{N} \cdot \lambda_{X^-} \quad (2.109)$$

c_T entspricht der Tensidkonzentration, λ der Einzelionenleitfähigkeit der entsprechenden Komponente und Λ_M der Äquivalentleitfähigkeit der Mizelle. An der CMC gilt:

$$\kappa_{CMC} = c_{CMC} \cdot (\lambda_{X^-} + \lambda_{S^+}) \quad (2.110)$$

Trägt man κ als Funktion der Tensidkonzentration c_T auf, so ergibt sich an der CMC ein Knick in der Kurve (vgl. Abschnitt 2.1.3.3.1). Die beiden Kurvenäste ober- und unterhalb des Knickpunktes werden durch Geraden angepaßt. Die Steigungen s_1 und s_2 dieser Geraden (1 entspricht unterhalb, 2 oberhalb der CMC) sind definiert als

$$s_1 = \frac{\kappa_{CMC}}{c_{CMC}} = \lambda_{X^-} + \lambda_{S^+} \quad (2.111)$$

$$s_2 = \frac{\kappa - \kappa_{CMC}}{c_T - c_{CMC}} = \frac{1}{N} \cdot \Lambda_M + \frac{(N-p)}{N} \cdot \lambda_{X^-} \quad (2.112)$$

Der Stokes'sche Ansatz besagt, daß die Leitfähigkeit proportional dem Quadrat der Ladung und umgekehrt proportional zum Radius der jeweiligen Spezies ist. Unter Annahme des Stokes'schen Ansatzes und kugelförmiger Teilchen erhält man folgende Gleichung:

$$\frac{\Lambda_M}{\lambda_{S^+}} = \frac{(N-p)^2}{N^{1/3}} \quad (2.113)$$

Es werden zwei Näherungen gemacht. Die erste Näherung beruht darauf, daß der Radius einer Mizelle durch folgende Gleichung beschrieben wird:

$$R_M = \sqrt[3]{n \cdot 3V_{S^+} / (4\pi)} \quad (2.114)$$

Als zweite Näherung wird angenommen, daß der Radius eines Rumpfteilchens S^+ aus folgender Gleichung bestimmt werden kann:

$$R_{S^+} = \sqrt[3]{3V_{S^+} / (4\pi)} \quad (2.115)$$

Der mizellare Ionisationsgrad bzw. Dissoziationsgrad ist laut Gleichung 2.13 definiert als

$$\alpha = \frac{N - p}{N}$$

Damit ergibt sich folgende quadratische Gleichung:

$$0 = \left(N^{2/3} (s_1 - \lambda_{X^-}) \right) \cdot \alpha^2 + \lambda_{X^-} \cdot \alpha - s_2 \quad (2.116)$$

aus der sich der Dissoziations- bzw. Ionisationsgrad an der CMC bestimmen lässt [74].

Alternativ lässt sich α auch mit einer etwas vereinfachten Formel aus [58] bestimmen:

$$\alpha = \frac{s_2}{s_1} \quad (2.117)$$

Kapitel 3

Experimenteller Teil

3.1 Apparatives

3.1.1 Thermostatisierung

Um eine ausreichende Temperaturkonstanz zu gewährleisten, wurden Probenpräparation und alle Messungen in einem Thermokonstantraum bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Zur Thermostatisierung des Zellenblocks des UV/Vis-Spektralphotometers auf $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ wurde ein Hauptthermostat des Typs Lauda C6 eingesetzt, dessen Kühlwasserkreislauf von einem Vorthermostaten, einem Kryostaten des Typs Haake FK 2 oder Haake KT 33, gespeist wurde. Die Temperatur des Hauptthermostaten wurde mit einem Quecksilberthermometer mit 0.1°C -Skalierung regelmäßig überprüft.

Die pH-Messungen und Leitfähigkeitsmessungen wurden im Thermostatenbad eines Hauptthermostaten des Typs Haake NB 22, der mit einem Kryostaten des Typs Haake KT 33 gekoppelt war, bei $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ durchgeführt.

3.1.2 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-spektroskopischen Messungen, genauer gesagt die Bestimmung der Extinktion verschiedener Lösungen als Funktion der Wellenlänge bzw. bei konstanter Wellenlänge als Funktion der Zeit, wurden mit einem Spektrophotometer vom Typ Cary 3E der Firma Varian durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Zweistrahlspektrophotometer. In Abbildung 3.1 ist der Aufbau eines solchen Zweistrahlgerätes schematisch dargestellt. Die benutzten Küvetten aus Quarzglas Suprasil von der Firma HELLMA hatten Schichtdicken von 1, 2, 5 oder 10 mm. Als Meß- und Referenzküvette wurden Küvettenpaare gleicher Schichtdicke verwendet. Für die Messungen der Enzymkinetik wurden nur 10-mm-Küvetten verwendet, für die Messung der UV/Vis-Spektren hingegen – je nach Bedarf – Küvetten verschiedener Schichtdicken.

Als Referenz diente im Fall der Kinetikmessungen reines Wasser (Millipore-Qualität). Bei der Bestimmung der UV/Vis-Spektren wurde ebenfalls reines Wasser als Referenz verwendet, wenn die Lösungen im wesentlichen wässrige Systeme waren, ansonsten wurde das entsprechende organische Lösungsmittel eingesetzt.

Enzymkinetiken wurden bei einer Wellenlänge von 340 nm aufgezeichnet. Als Begründung kann auf das Spektrum der oxidierten und reduzierten Form des Koenzyms von HLADH,

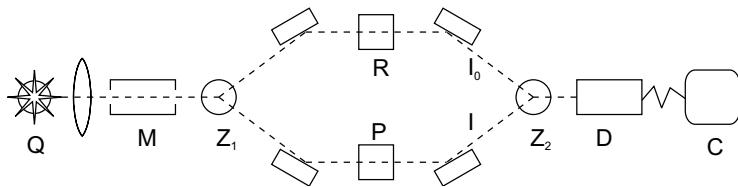
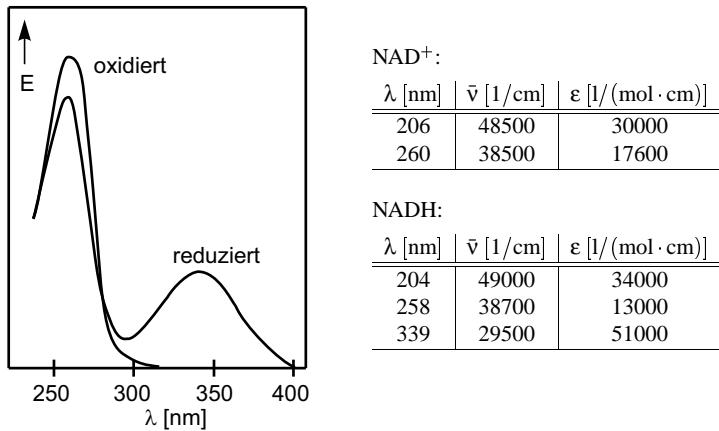


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines Zweistrahlspektrophotometers (nach [72] und [75]). Q: Lichtquelle (UV: Wasserstoff- oder Deuteriumlampe, VIS: Wolfram-Halogenlampe), M: (Doppel-) Monochromator (Prisma und/oder Gitter), Z_1 : rotierender Spiegel zur Zerlegung in zwei Strahlengänge, R: Referenzküvette (z. B. reines Lösungsmittel), P: Meßküvette (Probelösung), Z_2 : mit Z_1 gekoppelter rotierender Spiegel, D: Detektor (Photomultiplier), C: Meßrechner.



(a) UV/Vis-Spektrum von NAD^+ und NADH (aus [11], nachbearbeitet)

(b) Lage der Maxima von NAD^+ und NADH (aus [72])

Abbildung 3.2: UV/Vis-Spektrum und Lage der Maxima von NAD^+ und NADH

NAD^+ und NADH, verwiesen werden, das in Abbildung 3.2 dargestellt ist. Wie man sieht, absorbiert bei 340 nm die oxidierte Form, NAD^+ , nicht, die reduzierte Form, NADH hingegen schon.

3.1.3 pH-Wert und Leitfähigkeit

Ein Meßgerät der Firma Consort, Typ „Ion/EC Meter C733“, wurde zur Bestimmung von pH-Werten und Leitfähigkeiten verwendet.

Zur pH-Messung diente eine mittels zwei Pufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte geeichte pH-Elektrode. Da die pH-Werte der für die Enzymkinetikmessungen und spektroskopischen Messungen verwendeten Pufferlösungen im Bereich zwischen 7.5 und 9 lagen, wurden zur Eichung ein Phosphatpuffer (pH 7, Merck) und ein Borsäure/Kaliumchlorid-Natronlauge-Puffer (pH 9, Merck) verwendet.

Die mit vier Platinelektroden und einem PT-100-Temperaturfühler ausgestattete Tauchsonde wurde für die Leitfähigkeitsmessungen mit 0.01 M wäßriger KCl-Lösung kalibriert. Als Zellkonstante ergab sich hierbei ein Wert von $C = 0.762 \text{ cm}^{-1}$. Auf die Verwendung einer „präzisen“ Meßanordnung, die am Lehrstuhl vorhanden gewesen wäre, wurde verzichtet, da Baar [76] gezeigt hatte, daß das Consort-Meßgerät vergleichbare Ergebnisse liefert.

3.2 Experimentelles

3.2.1 Verwendete Chemikalien

Das verwendete reine Wasser wurde mit einer Milli-Q-Anlage der Firma Millipore produziert und besaß eine Leitfähigkeit von unter 10^{-6} Sm^{-1} .

Alle Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung oder Trocknung eingesetzt.

Für enzymatische Untersuchungen wurden das Enzym Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) und das Koenzym Nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+) eingesetzt. Von Fluka wurde HLADH (Lot-Nr. 394514/1 42199 und 71014/1 42500, im weiteren als Lot A bzw. B bezeichnet) bezogen, von Merck NAD^+ (Lot-Nr. 24343542 750, Reinheit $\geq 95\%$). Es wurden zwei Arten von wässrigen Pufferlösungen für die Messungen verwendet: ein Puffer mit Glycin, Semicarbazidhydrochlorid (SC-HCl) und Natriumhydroxid (NaOH) und ein Puffer mit N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure (TES) und Natriumhydroxidlösung. Genaueres ist in den Tabellen 3.1 und 3.2 dargestellt. Abbildung 3.3 zeigt die Strukturformeln der organischen Komponenten dieser beiden Pufferlösungen.

Tabelle 3.1: Pufferlösung mit Glycin (pH 8.7 - 8.75)

Komponente	Bezugsquelle	Reinheit	$M [\text{g/mol}]$	$c [\text{mol/l}]$
Glycin	Aldrich	99 %	75.07	0.100
SC-HCl	Aldrich	$\geq 99\%$	113.53	0.075
NaOH	Merck	99 %	40.00	≈ 0.086

Tabelle 3.2: Pufferlösung mit TES (pH 7.45-7.55)

Komponente	Bezugsquelle	Reinheit	$M [\text{g/mol}]$	$c [\text{mol/l}]$
TES	Fluka	$\geq 99\%$	229.25	0.050
NaOH-Lösung	Merck	1 mol/l	40.00	≈ 0.024

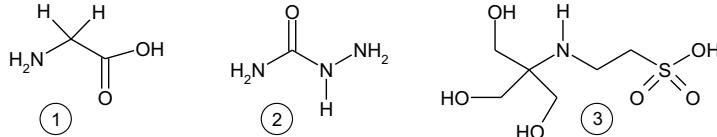


Abbildung 3.3: Chemische Struktur der Pufferbestandteile Glycin (1), Semicarbazid (2) und N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure (3)

Es wurde ein nichtionisches Tensid, Polyoxyethylen(23)-laurylether (Brij 35TM), und sechs kationische Tenside vom Alkyltrimethylammoniumbromidtyp (C_xTAB) verwendet. Genaueres ist in Tabelle 3.3 zu finden. An Alkoholen wurden n-Alkanole ($n = 2-10$) und α,ω -n-Alkandiole ($n = 5, 7$) eingesetzt (vgl. Tabelle 3.4). Weitere verwendete Chemikalien sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Dazu zählen zusätzlich verwendeten Salze, Lösungsmittel sowie der Farbstoff Safranin T.

Tabelle 3.3: Verwendete Tenside

Tensid	Abkürzung	Bezugsquelle	Reinheit	M [g/mol]
Polyoxyethylen(23)-laurylether	$C_{12}E_{23}$	Fluka	k. A.	1199.8
Hexyl-TAB	C_6TAB	Fluka	$\geq 98\%$	224.18
Oktyl-TAB	C_8TAB	Fluka	$\geq 98\%$	252.24
Decyl-TAB	$C_{10}TAB$	Fluka	$\geq 98\%$	280.29
Dodecyl-TAB	$C_{12}TAB$	Fluka	$\geq 98\%$	308.35
Tetradecyl-TAB	$C_{14}TAB$	Aldrich	99%	336.41
Hexadecyl-TAB	$C_{16}TAB$	Fluka	$\geq 99\%$	364.46

Tabelle 3.4: Verwendete Alkohole

Alkohole	Abkürzung	Bezugsquelle	Reinheit	M [g/mol]
Ethanol	C_2OH	ROTH	99.8	46.05
1-Propanol	C_3OH	MERCK	99	60.10
1-Butanol	C_4OH	MERCK	99.7	74.12
1-Pentanol	C_5OH	FLUKA	99	88.15
1-Hexanol	C_6OH	ALDRICH	98	102.18
1-Heptanol	C_7OH	ALDRICH	98	116.18
1-Oktanol	C_8OH	ALDRICH	99	130.23
1-Nonanol	C_9OH	ALDRICH	98	144.26
1-Dekanol	$C_{10}OH$	ALDRICH	99	158.29
1,5-Pentandiol	$C_5(OH)_2$	MERCK	> 98	104.15
1,7-Heptandiol	$C_7(OH)_2$	ALDRICH	95	132.20

Tabelle 3.5: Zusätzlich verwendete Chemikalien

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle	Reinheit	M [g/mol]
Natriumchlorid	NaCl	Merck	$\geq 99.5\%$	58.44
Kaliumchlorid	KCl	Merck	$\geq 99.5\%$	74.56
Methanol	C_1OH	Merck	$\geq 99.8\%$	32.04
Acetonitril	ACN	Baker	$\geq 99.8\%$	41.05
Toluol	–	Merck	$\geq 99.5\%$	92.14
Safranin T	ST	Aldrich	$\approx 95\%$	350.85

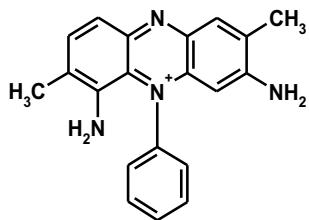


Abbildung 3.4: Struktur des Farbstoffes
Safranin T [14]

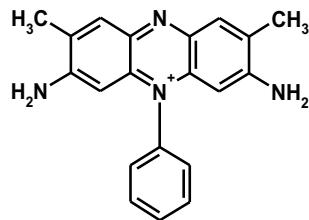


Abbildung 3.5: Struktur des Farbstoffes
Safranin O [14]

Zum verwendeten Farbstoff sind noch einige Fragen zu klären. Im Chemikalienkatalog von Aldrich wird der Farbstoff als Safranin T bezeichnet, im Merck-Katalog werden hingegen die Bezeichnungen Safranin T und Safranin O synonym verwendet. Dutta und Bhat [14] stellen Safranin T und O als zwei Verbindungen vor, die sich nur in der Position einer NH_2 - und einer CH_3 -Gruppe unterscheiden, wie in den Abbildung 3.4 und 3.5 zu sehen ist.

Es kommt noch hinzu, daß man auf eine ganze Reihe weitere ähnliche Strukturformeln stößt, wenn man in der Beilstein-Datenbank nach Safranin T oder O sucht. Um welchen Farbstoff handelt es sich nun bei dem hier verwendeten? Es soll zumindest der Versuch unternommen werden, die Maxima der UV/Vis-Spektren von „unserem“ Safranin in verschiedenen Lösungsmitteln mit den Literaturdaten zu vergleichen, um vielleicht einen Aufschluß darüber zu erhalten, um welchen Farbstoff es sich handelt. Hierzu aber später. Der hier verwendete Farbstoff soll im weiteren – unabhängig davon, ob das ganz korrekt ist oder nicht – als Safranin T, kurz ST, bezeichnet werden.

3.2.2 Herstellung der verwendeten Lösungen

Zunächst wurden Stammlösungen hergestellt, indem die entsprechenden Substanz(en) (z. B. Tensid und/oder Alkohol) in einen Meßkolben eingewogen wurde(n) und dann mit dem jeweiligen Lösungsmittel (z. B. reines Wasser oder Puffer) aufgefüllt wurde. Zur Einwaage wurden Analysenwaagen der Firma Mettler (H20T und AB204, Ablesbarkeit 0.01 mg bzw. 0.1 mg) verwendet. Auf eine „Luftauftriebskorrektur“ der einzelnen Einwaagen wurde verzichtet. Als Probelösungen wurden die Stammlösungen entweder direkt oder nach Verdünnung verwendet. Da es zum Teil relativ lang dauerte, bis alles Tensid vollständig aufgelöst und der z. T. gebildete Schaum wieder verschwunden war, wurden die tensidhaltigen Stammlösungen teilweise erst nach 12 Stunden fertiggestellt und weiterverarbeitet.

Der überwiegende Anteil der Lösungen wurde im Konzentrationsmaß Molarität ([mol/l Lösung]) hergestellt. Ausnahmen bilden dabei die Lösungen bzw. Mischungen für die Phasendiagramme sowie ein Großteil der Lösungen der Brij 35/Alkohol/Wasser-Systeme. Für sie gilt das Konzentrationsmaß Gewichtsbruch bzw. Gewichtsprozent ([Gew%]) oder/und [mol/g Lösungsmittel].

3.2.3 Durchgeführte Experimente

3.2.3.1 Bestimmung der Phasendiagramme für die ternären Systeme 1-Hexanol/Alkyltrimethylammoniumbromid/Wasser

Um eine Vorstellung zu bekommen, in welchen Bereichen der ternären Systeme 1-Hexanol/C_xTAB/Wasser (mit $x = 6, 8, 10, 12, 14, 16$) „mizellare“ oder andere Phasen vorliegen, wurden zunächst die ternären Phasendiagramme aufgestellt. Es wurde so vorgegangen, daß mehrere binäre Mischungen bekannter Zusammensetzung aus dem Tensid und einem der beiden Lösungsmittel (Hexanol oder Wasser) hergestellt wurden und dann jeweils mit dem anderen Lösungsmittel titriert wurden.

Den genauen Ablauf zur Behandlung einer Probe kann man sich folgendermaßen vorstellen:

1. genaue Einwaage von Tensid und Lösungsmittel 1 in ein mit Schraubdeckel versehenes Reagenzglas
2. gründliches Mischen der Komponenten im verschlossenen Reagenzglas mittels eines Schüttelgerätes der Firma Heidolph, Typ Reax 2000, und eines selbstgebauten Aufsatzes (ca. 3 min)
3. Equilibrierung des Systems über einen Zeitraum von etwa 5 min
4. optische Prüfung des Reagenzglas-Inhaltes
5. Bestimmung der Masse und Notierung des Aussehens und/oder des Fließverhaltens, falls eine Veränderung des Aussehen und/oder des Fließverhaltens festgestellt wird
6. Zugabe eines Tropfens des Lösungsmittels 2 in das Reagenzglas
7. Fortfahren mit Punkt 2 der Auflistung

Die Untersuchung einer Probe wird sinnvollerweise spätestens dann abgebrochen, wenn die räumliche Ausdehnung des Reagenzglases eine weitere Lösungsmittelzugabe nicht mehr zuläßt. Man nennt dieses Verfahren auch „Phasengrenzentrifration“ [77].

Als ungefähre Ausgangskonzentrationen binärer Tensid/Lösungsmittelmischungen wurden 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 und 90 Gew% Tensid gewählt, d. h. 12 Proben. Insgesamt wurden für jedes ternäre System mindestens $2 \cdot 12 = 24$ binäre Mischungen hergestellt und titriert.

3.2.3.2 Leitfähigkeitsmessungen

Für die verschiedenen kationischen Tenside vom C_x TAB-Typ ($x = 6, 8, 10, 12, 14$) wurden die kritische Mizellkonzentration (CMC) und der Ionisationsgrad α der Mizellen in wäßriger Lösung mittels Leitfähigkeitsmessungen bestimmt. Für jedes Tensid wurden daher mindestens 30 Lösungen, davon 15 bei Konzentrationen unterhalb der in der Literatur angegebenen CMC, der Rest der Lösungen oberhalb, vermessen. Meist wurden 25 ml Lösung pro Konzentration – durch Verdünnung eines entsprechenden Volumens der jeweiligen Stammlösung – hergestellt. Knapp 25 ml Probelösung wurden für eine Messung benötigt.

Folgende Lösungen wurden – wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben – hergestellt und vermessen:

- C_6 TAB: 30 Proben im Bereich zwischen 0 und 1.2 mol/l sowie 4 Proben im Bereich zwischen 1.2 und 2.0 mol/l
- C_8 TAB: 30 Proben im Bereich zwischen 0 und 0.3 mol/l sowie 10 Proben im Bereich zwischen 0.3 und 0.5 mol/l
- C_{10} TAB: 30 Proben im Bereich zwischen 0 und 0.15 mol/l sowie 4 Proben im Bereich zwischen 1.2 und 2.0 mol/l
- C_{12} TAB: 30 Proben im Bereich zwischen 0 und 0.03 mol/l (Anmerkung: von Preu [10] übernommen)
- C_{14} TAB: 30 Proben im Bereich zwischen 0 und 0.0075 mol/l

Die Auswertung (Kurvenanpassung durch Geraden oder Polynome niedrigen Grades und Schnittpunktsbestimmung) erfolgte mit den Programmen Origin 5.0TM und Maple V.3TM.

3.2.3.3 UV/Vis-Spektren von Safranin T in unterschiedlichen Lösungen

Generell wurden von jeder Probe drei UV/Vis-Spektren (Extinktion A in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ) aufgezeichnet. Zusätzlich wurden drei Messungen mit der jeweiligen Referenz (z. B. dem Lösungsmittel) durchgeführt. Dann wurden drei zusammengehörende Probenspektren bzw. Referenzspektren rechnerisch (mit Origin 5.0TM oder einem selbstgeschriebenen C-Programm) gemittelt. Schließlich wurde das Referenzspektrum mittels Origin 5.0TM oder eines selbstgeschriebenen C-Programmes von den Probenspektren subtrahiert, um Effekte wie einen Knick an der Stelle, wo vom Spektrophotometer zwischen UV- und Vis-Lampe umgeschaltet wurde, zu beseitigen. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 3.6 gegeben.

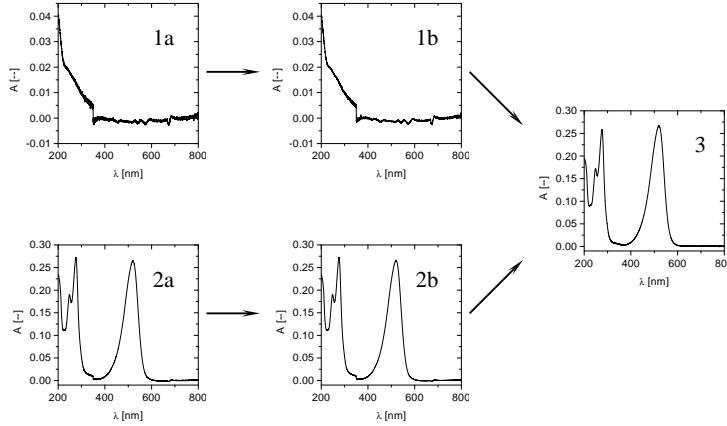


Abbildung 3.6: Beseitigung des „Umschaltknicks“ im UV/Vis-Spektrum: Aus drei gemessenen Spektren für Referenz (1a) und Probe (2a) ergeben sich die gemittelten Spektren für Referenz (1b) und Probe (2b). Durch Subtraktion von 2b und 2a erhält man ein „schwankungssarmes“ Spektrum der Probe (3) ohne den Knick, der durch den Lampenwechsel des Photometers bei 350 nm entsteht.

Um die Bestimmung der Maxima zu erleichtern, mußten die Spektren teilweise noch geglättet werden. Dies erfolgte mit einem selbstgeschriebenen C-Programm auf der Basis der Savitzky-Golay-Filterung unter Verwendung von abgewandelten Routinen aus [78]. Die Maxima der UV/Vis-Spektren wurden ebenfalls mit Origin 5.0TM bzw. einem selbstgeschriebenen C-Programm bestimmt.

Für weitere Auswertungen wurden die Computerprogramme Origin 5.0TM und Maple V.3TM verwendet.

UV/Vis-Spektren von 10^{-5} mol/l Safranin T (ST) in folgenden Lösungen wurden aufgezeichnet

- in „reinen“ Lösungsmitteln: Wasser, TES-Puffer, TES-Puffer mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol
- in binären Mischungen C_x TAB/Wasser ($x = 6, 8, 10, 12, 14$): im wesentlichen gleiche Tensidkonzentrationen wie für die Leitfähigkeitsmessungen
- in (pseudo-) binären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer ($x = 6, 8, 10, 12, 14$) ohne bzw. mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol: ungefährre C_x TAB-Konzentration $1 \cdot 10^{-1-i}$ und $5 \cdot 10^{-1-i}$ mol/l, z. T. auch $2 \cdot 10^{-1-i}$, mit $i = 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0$ (je nach Tensid)
- in ternären Lösungen C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer: bei konstanten Molzahlenverhältnissen C_{12} TAB/1-Hexanol (1:1, 2:1, 4:1 und 8:1) und C_{12} TAB-Konzentrationen zwischen 0 und 0.2 mol/l

Dabei wurden als Stammlösungen Lösungen in den jeweiligen Lösungsmitteln (Wasser oder Puffer) verwendet. Als Referenz diente reines Wasser. Zusätzlich wurden Spektren der reinen Lösungsmittel (Wasser, TES-Puffer, TES-Puffer mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol) aufgezeichnet. Es wurden Küvetten der Schichtdicke 10 mm für die Messungen verwendet. Außerdem wurden weitere UV/Vis-Spektren von ST bestimmt:

- ST in reinem Wasser: ST-Konzentrationen zwischen $1 \cdot 10^{-5}$ und $8 \cdot 10^{-4}$ mol/l (Referenz: reines Wasser; Küvetten: 10, 5 und 1 mm)
- ST in verschiedenen Lösungsmitteln (Wasser, Methanol, Ethanol, 1-Butanol, 1-Hexanol, Acetonitril, Toluol): ST-Konzentrationen $i \cdot 10^{-5}$ mol/l mit $i = 1, 2$ (Referenz: das jeweilige Lösungsmittel; Küvetten: 10 mm)
- ST in in ternären Lösungen C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer: bei konstantem Molzahlenverhältnis C_{12} TAB/1-Hexanol (1:1) und C_{12} TAB-Konzentrationen zwischen 0 und 0.2 mol/l: ST-Konzentrationen $i \cdot 10^{-5}$ mol/l mit $i = 1, 2, 4, 8$ (Referenz: reines Wasser; Küvetten: 10 mm für $i = 1, 2$ und 5 mm für $i = 4, 8$)

Zusätzlich wurden auch hier UV/Vis-Spektren der reinen Lösungsmittel (Wasser, ...) aufgezeichnet.

Als Stammlösung diente eine ST-Lösung in Methanol. Das angewendete Verfahren zur Lösungsherstellung war dabei etwas anders als in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Entsprechende Volumina der Stammlösung wurden in die Meßkolben einpipettiert. Dann wurde im Wasserstrahlvakuum das Methanol verdampft, während ST im Meßkolben zurückblieb. Und schließlich wurde ggf. noch eine entsprechende Menge der tensid- und/oder alkoholhaltigen Stammlösung zugegeben und mit dem jeweiligen Lösungsmittel aufgefüllt.

Es wurde festgestellt, daß ST in Toluol nicht nennenswert löslich ist.

3.2.3.4 Bestimmung der Aktivität von HLADH in C_x TAB-haltigen und -freien Lösungen

Für alle Messungen wurde Lot A von HLADH sowie Puffer auf TES-Basis als Pufferlösung eingesetzt. Als Standard wurde eine 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösung verwendet. Folgende Systeme wurden untersucht:

- 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösungen zur Bestimmung einer möglichen zeitabhängigen Denaturierung von HLADH bei der Meßtemperatur 25°C
- 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösungen mit variierender Ionenstärke: Natriumchloridkonzentrationen zwischen 0 und 2 mol/l NaCl
- 1-Hexanol-Lösungen mit 1-Hexanol-Konzentrationen im Bereich zwischen $1 \cdot 10^{-4}$ und $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der HLADH-Aktivität
- pseudobinäre Lösungen C_x TAB/TES-Puffer ($x = 6, 8, 10, 12, 14$) mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol: ungefähre C_x TAB-Konzentration $1 \cdot 10^{-1-i}$ und $5 \cdot 10^{-1-i}$ mol/l, mit $i = 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0$ (je nach Tensid)
- ternäre Lösungen C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer: bei konstanten Molzahlenverhältnissen Tensid/Alkohol (1:1, 2:1, 4:1 und 8:1) und Tensidkonzentrationen zwischen 0 und 0.2 mol/l

Die verwendete HLADH-Lösung hatte eine Konzentration von 1 g/l, die NAD⁺-Lösung eine Konzentration von 20 g/l.

Der Meßablauf war der folgende:

1. Herstellung der NAD⁺- und der HLADH-Lösung (jeweils in einem 4-ml-Probenglas mit Schraubverschluß)
 - Zugabe der entsprechenden Menge Pufferlösung zur eingewogenen Menge an NAD⁺, um eine Lösung der Konzentration 20 g/l zu erhalten
 - Zugabe der entsprechenden Menge Pufferlösung zur eingewogenen Menge an HLADH, um eine Lösung der Konzentration 1 g/l zu erhalten, und Start der Stoppuhr ($t = 0$)
 - Platzierung der Reagenzgläser mit NAD⁺- und HLADH-Lösung in ein Eis-Wasser-Bad, um eine zeitabhängige Denaturierung der HLADH zu minimieren
2. Durchführung von ca. 3 Einzelmessungen mit Standardlösung
3. Durchführung von ca. 3 Einzelmessungen mit Probelösung
4. Durchführung von ca. 3 Einzelmessungen mit Standardlösung
5. Durchführung von ca. 3 Einzelmessungen mit Probelösung
6. ...

Eine Meßreihe wurde stets mit Messungen der Aktivität von HLADH/NAD⁺ in Standardlösung begonnen und abgeschlossen. Als Referenz diente eine mit reinem Wasser gefüllte 10-mm-Küvette.

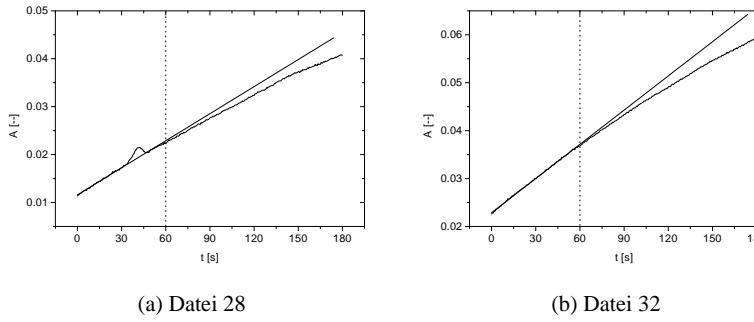


Abbildung 3.7: Bestimmung der Anfangsextinktionsänderung aus Meßdaten. Die etwas „zitterigen“, leicht gekrümmten Kurven sind die Meßdaten und die Geraden die linearen Fits. Der in Teilbild 3.7(a) auftretende Peak wird vermutlich durch aufsteigende Luftblasen in der Küvette verursacht. Die Grenze des Fitbereiches, 60 s, ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Die Durchführung einer Einzelmessung wird nachfolgend beschrieben:

- Befüllen einer Küvette (10 mm) mit 3 ml Probe oder Standard (i), Verschließen und Platzierung der Küvette zur Thermostatisierung im Küvettenhalter
- frühestens nach 5 min Thermostatisierung Entnahme der Küvette aus dem Küvettenhalter, Zugabe von 25 μ l NAD⁺-Lösung sowie von 25 μ l HLADH-Lösung ($t = t_{i,1}$)
- gründliches Mischen der Lösungen in der Küvette, Platzierung der Küvette im Küvettenhalter, Starten der Messung der Extinktion bei 340 nm über einen Zeitraum von 3 min ($t = t_{i,2} \approx t_{i,1} + 20$ s)
- Notierung der Zeiten ($t_{i,1}, t_{i,2}$) und des der Probe entsprechenden Dateinamens

Die Bestimmung der „Anfangsgeschwindigkeit“ (besser: der Anfangsextinktionsänderung) aus den Meßdaten erfolgte durch einen robusten linearen Fit der Daten innerhalb der ersten 60 s der Meßzeit (d. h. zwischen $t_{i,2}$ und $t_{i,2} + 60$ s). Die Anpassungen wurde am Computer entweder mit Origin 5.0 oder mit einem selbstgeschriebenen C-Programm unter Verwendung abgewandelter Routinen aus [78] durchgeführt. Zwei Beispiele für auf diese Art und Weise behandelte „Rohdaten“ sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Wie man in Abbildung 3.7(a) sieht, gehen stärkere Schwankungen in der Extinktion, die beispielsweise durch aufsteigende Luftblasen entstehen können, beim Anpassen der Meßdaten durch eine Gerade wegen der verwendeten Fitmethode nicht in den Fit mit ein.

Die Enzymaktivitäten r wurde so bestimmt, daß zunächst die Anfangsextinktionsänderungen der Standardmessungen als Funktion der Meßzeit $t_{i,1}$ aufgetragen und die sich ergebene Kurve durch einen linearen Fit angepaßt wurde. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Dann wurden die Anfangsextinktionsänderungen der Proben noch durch

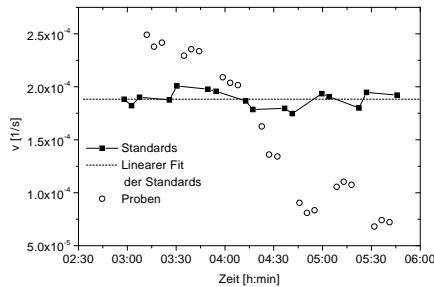


Abbildung 3.8: Anfangsextinktionsänderung (v) von Standard- und Probelösungen, aufgetragen als Funktion der Meßzeit t . Probelösungen waren Lösungen mit konstanter Ethanolkonzentration (10^{-2} mol/l) und variierender Natriumchloridkonzentration.

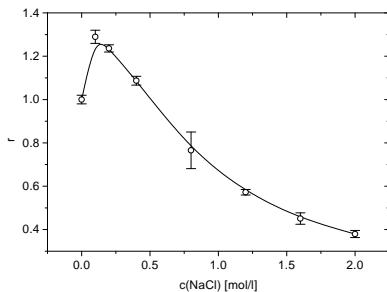


Abbildung 3.9: Gemittelte Enzymaktivität sowie zugehörige Standardabweichung in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration $c(\text{NaCl})$. Die Standardabweichungen der einzelnen, durch Splines verbundenen Punkte sind als Fehlerbalken eingezeichnet.

den der jeweiligen Meßzeit $t_{j,1}$ entsprechenden aus dem Fit erhaltenen Wert der Standard-Anfangsextinktionsänderung dividiert. Die drei Enzymaktivitäten, die aus den drei Messungen pro Probe erhalten wurden, wurden schließlich noch gemittelt. Außerdem wird die Standardabweichung des Mittelwerts bestimmt. Als Beispiel für das Ergebnis aus dieser Mitteilung ist in Abbildung 3.9 die Enzymaktivität r als Funktion der Natriumchloridkonzentration aufgetragen. Die Computerprogramme Origin 5.0TM und Maple V.3TM wurden für weitere Auswertungen eingesetzt.

Es wurde außerdem untersucht, ob im Bereich hoher 1-Hexanolkonzentration und mittlerer $C_x\text{TAB}$ -Konzentration das Enzym HLADH 1-Hexanol oxidiert und NAD^+ reduziert. Vermutlich liegen in diesem Bereich inverse Mizellen vor. Da eine zeitabhängige Messung der Extinktion bei 340 nm nicht möglich war, weil z. T. zu Beginn der Messung die Reaktionsmischungen trüb waren, wurden statt dessen im 10 min Abstand sieben Spektren pro Probe aufgezeichnet.

Die Reaktionsmischungen wurden folgendermaßen hergestellt:

- Vorlage von V_1 Lösung 1 in die Küvette
- Zugabe von V_A Lösung A und V_B Lösung B und Vermischen
- Zugabe von V_2 Lösung 2 und Vermischen

Unter Lösung 1 ist eine 1-Hexanol-freie C_x TAB/TES-Puffer-Lösung zu verstehen, unter Lösung A und B die HLADH- bzw. NAD^+ -Lösung und unter Lösung 2 eine ternäre 1-Hexanol/ C_x TAB/TES-Puffer-Lösung. Als Referenz diente eine mit Wasser befüllte Küvette. In Tabelle 3.6 sind die verwendeten Lösungen 1 und 2, in Tabelle 3.7 die entsprechenden Mischungen dargestellt.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen 1 und 2 (jeweils in Gew% der Komponenten C_x TAB, 1-Hexanol und TES-Puffer)

x	Lösung 1 C_x TAB / C_6 OH / TES	Lösung 2 C_x TAB / C_6 OH / TES
6	20.00 / 0.00 / 80.00	19.84 / 76.48 / 3.68
8	20.08 / 0.00 / 79.92	20.11 / 75.73 / 4.26
10	20.00 / 0.00 / 80.00	19.89 / 76.22 / 3.89
12	20.41 / 0.00 / 79.59	20.11 / 75.86 / 4.03
14	19.68 / 0.00 / 80.32	19.99 / 75.66 / 4.35

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der verwendeten Reaktionsmischungen (V_1 und V_2 in [ml], V_A und V_B in [μ l])

Index	a	b	c	d
V_1	0.1	0.2	0.3	0.4
V_A	15	15	15	15
V_B	15	15	15	15
V_2	1.7	1.6	1.5	1.4

Die Mischungen a, b, c und d einer Meßreihe (d. h. Mischungen mit demselben Tensid) konnten gleichzeitig vermessen werden, da im Küvettenhalter des UV/Vis-Spektrometers bis zu sechs Probeküvetten und entsprechend sechs Referenzküvetten Platz finden. Dies bedeutet, daß vom Herstellen der Mischungen bis zum Start der Messung ungefähr 2 min vergingen. Zum Vergleich wurden parallel zur jeweiligen Meßserie Messungen mit 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösungen in TES-Puffer durchgeführt, wobei 1.8 ml der Ethanol-Lösung mit 15 μ l NAD^+ - und 15 μ l HLADH-Lösung versetzt wurden, also die gleichen Volumina wie bei den anderen Reaktionsmischungen.

Zusätzlich wurden Spektren von Mischungen, die bis auf Lösung A und B mit den in Tabelle 3.7 aufgeführten Reaktionsmischungen identisch waren, aufgezeichnet. Sowohl für Lösung A als auch B wurde TES-Puffer verwendet. Diese Mischungen dienten – soweit möglich – als Referenz für die in Abschnitt 3.2.3.3 beschriebene Auswerteprozedur, wobei aber pro Reaktions- und Referenzmischung nur eine Messung durchgeführt wurde und daher eine Mittelung nicht möglich war.

3.2.3.5 Wiederholung und Erweiterung der Enzymtests aus der Diplomarbeit

In Zusammenarbeit mit Yan Liu wurden die in der Diplomarbeit [39] untersuchten Systeme ($C_{12}E_{23}$ /Alkohol/Wasser) noch einmal untersucht und auch erweitert. Für die Messungen wurden Lot A und B von HLADH sowie als Pufferlösung Puffer auf Glycin-Basis (vgl. Abschnitt 3.2.1) eingesetzt. Die verwendeten Alkohole sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Es wurden – in Abhängigkeit vom jeweiligen System – bei Konzentrationen von 0, 1, 8 und 22 Gew% des Tensids $C_{12}E_{23}$ Lösungen mit Alkoholkonzentrationen zwischen 0 mol/g LM und der maximalen Löslichkeit des jeweiligen Alkohols (bei der noch homogene, klare, einphasige Lösungen erhalten wurden) hergestellt und enzymatisch untersucht.

Im Fall von Ethanol und 1-Pentanol wurden außerdem Untersuchungen um die CMC von $C_{12}E_{23}$ herum durchgeführt, und zwar in Lösungen mit $1 \cdot 10^{-3}$ oder $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l Ethanol bzw. $1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $7.5 \cdot 10^{-3}$ oder $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l 1-Pentanol.

Die Messungen wurden analog zu den in Abschnitt 3.2.3.4 dargestellten durchgeführt. Die Bestimmung der „Anfangsgeschwindigkeiten“ erfolgte mittels der zum UV/Vis-Spektrometer gehörenden Software. Die weitere Auswertung wurde mit den Computerprogrammen Origin 5.0TM und Maple V.3TM durchgeführt.

Kapitel 4

Darstellung und Auswertung der Meßergebnisse

4.1 Phasendiagramme der ternären Systeme C_x TAB/1-Hexanol/Wasser

In den Graphiken 4.1 bis 4.6 sind die Phasendiagramme der ternären Systeme C_x TAB/1-Hexanol/Wasser mit $x = 6, 8, 10, 12, 14$ und 16 dargestellt. Die Konzentrationen der Einzelkomponenten sind als Gewichtsbruch ([Gew%/100%]) angegeben.

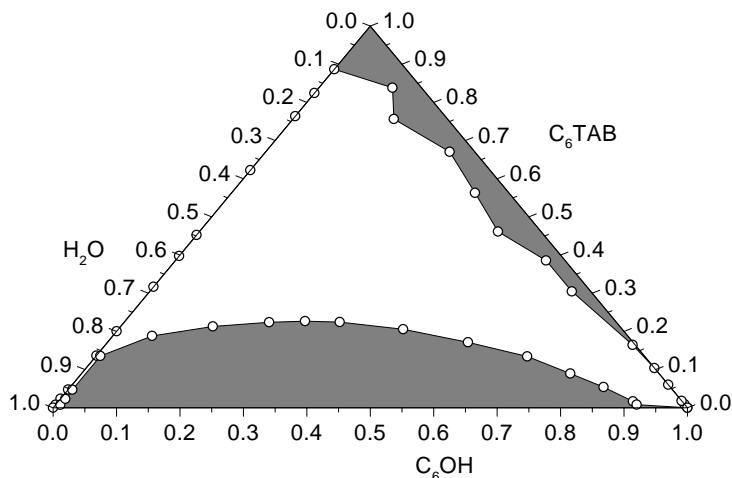


Abbildung 4.1: Phasendiagramm des Systems C₆TAB/1-Hexanol/Wasser

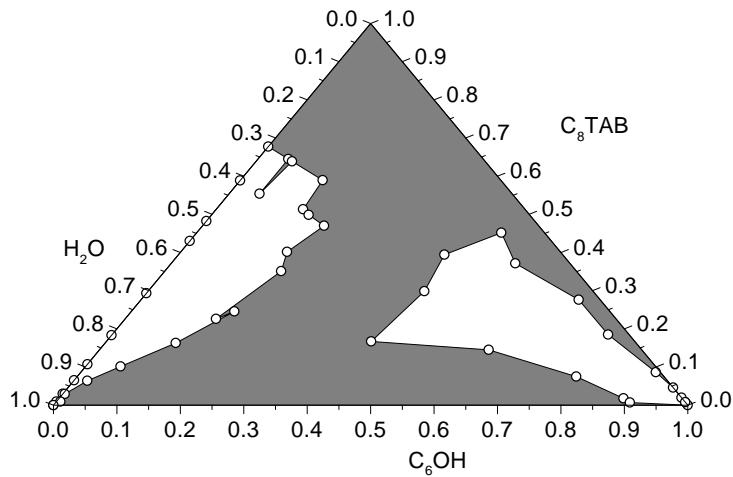


Abbildung 4.2: Phasendiagramm des Systems C_8 TAB/1-Hexanol/Wasser

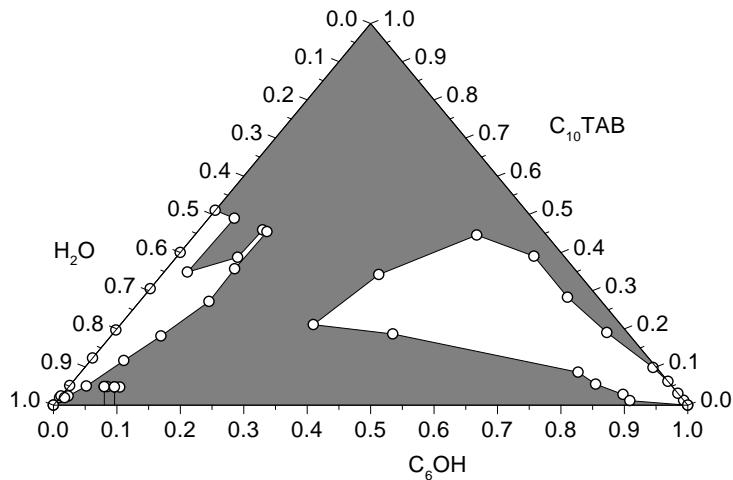
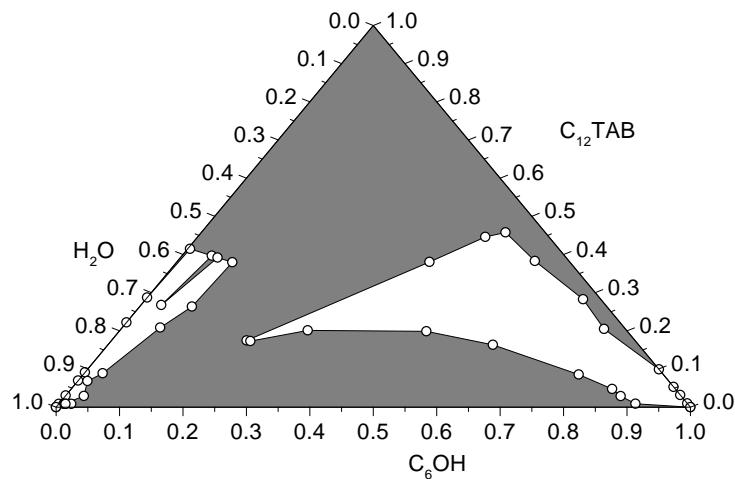
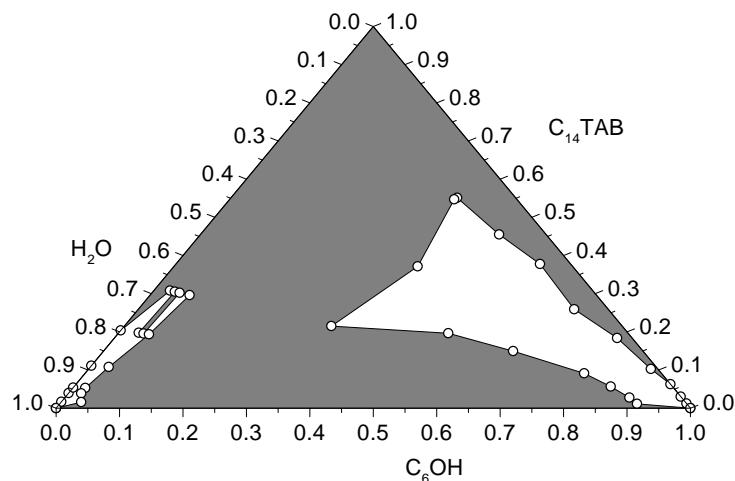


Abbildung 4.3: Phasendiagramm des Systems C_{10} TAB/1-Hexanol/Wasser

Abbildung 4.4: Phasendiagramm des Systems C_{12}TAB /1-Hexanol/WasserAbbildung 4.5: Phasendiagramm des Systems C_{14}TAB /1-Hexanol/Wasser

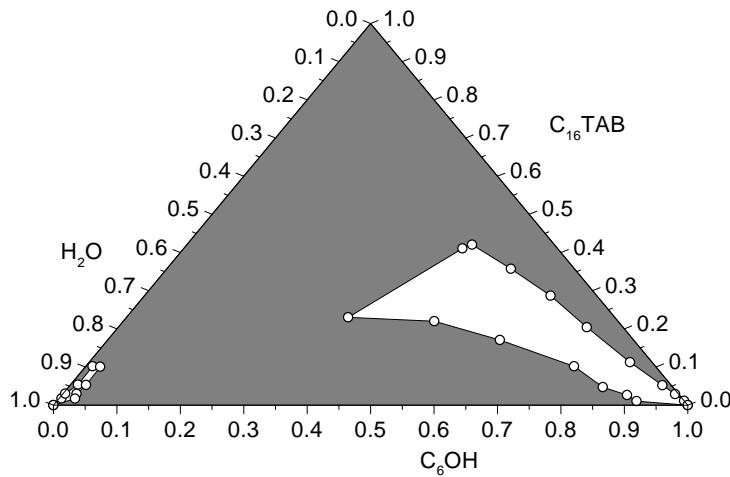


Abbildung 4.6: Phasendiagramm des Systems C_{16} TAB/1-Hexanol/Wasser

Der Bereich, in dem eine homogene, klare, wenig viskose Lösung vorliegt, ist in den Abbildungen 4.1 bis 4.6 weiß dargestellt, der Bereich, in dem andere Phasentypen zu finden sind, grau. Die durch die Phasengrenzkonzentration bestimmten Phasenübergänge zwischen diesen beiden Gebieten sind durch offene Kreise gekennzeichnet.

Wie man sieht, liegt im Fall von C_6 TAB noch ein geschlossenes, relativ großes Einphasen-Gebiet vor, das von der Wasser-Ecke bis zur 1-Hexanol-Ecke reicht. Im ternären System C_8 TAB/1-Hexanol-Wasser gibt es hingegen bereits zwei getrennte Einphasen-Gebiete. Den Bereich auf der wasserreichen Seite kann man als L_1 , das auf der 1-Hexanol-reichen Seite als L_2 bezeichnen. Bei allen weiteren ternären Systemen der untersuchten Tensid-Serie findet man ebenfalls nur noch zwei Gebiete, die mit steigender Kettenlänge des Tensidkohlenwasserstoffrestes immer kleiner werden.

Im Fall von C_{16} TAB ist der L_1 -Bereich bereits relativ klein, wie man im Vergleich der Abbildung 4.6 mit den anderen Abbildungen (4.2 bis 4.4) sieht. Deshalb wurde bei den weiteren Untersuchungen (Leitfähigkeit, Spektren von ST, Enzymaktivität) darauf verzichtet, Messungen mit C_{16} TAB-haltigen Lösungen durchzuführen.

4.2 Bestimmung der CMC und des Dissoziationsgrades von C_x TAB-Tensiden aus Leitfähigkeitsmessungen

4.2.1 Lineare Auftragungen von κ und κ/c

Die Leitfähigkeiten von C_x TAB-Lösungen in reinem Wasser wurden gemessen, um die CMC der Tenside sowie den Dissoziationsgrad α der Mizellen bestimmen zu können. Zunächst sollen die Meßergebnisse graphisch dargestellt werden. Die Leitfähigkeit κ sowie κ/c als Funktion der Tensidkonzentration c sind in den Abbildungen 4.7 bis 4.11 für die verschiedenen C_x TAB-Lösungen ($x = 6, 8, 10, 12, 14$) dargestellt.

Wie man in den Abbildungen 4.7 und 4.8 erkennen kann, ist für C_6 TAB und C_8 TAB eine Bestimmung der CMC aus der Auftragung von κ oder κ/c als Funktion der Konzentration nicht möglich, da sich beide mehr oder weniger kontinuierlich verändern und kein ausgeprägter Knick auftritt.

Hingegen können aus den Auftragungen von κ als Funktion der Tensidkonzentration für C_{10} TAB, C_{12} TAB und C_{14} TAB die CMC und der Dissoziationsgrad α bestimmt werden, da deutliche Knicke vorhanden sind. Die beiden Kurvenäste links und rechts des Knicks wurden durch eine Gerade angepaßt. In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse für die Auftragung von κ als Funktion der Tensidkonzentration, genauer gesagt die Fitparameter für die beiden Geraden, c_{CMC} und α , dargestellt. α wurde nach Gleichung 2.116 sowie nach Gleichung 2.117 bestimmt (vgl. Abschnitt 2.4). Die Werte für α aus beiden Methoden weichen zwar voneinander ab, zeigen aber dieselbe Tendenz: mit zunehmender Kettenlänge sinkt der Dissoziationsgrad der Mizellen.

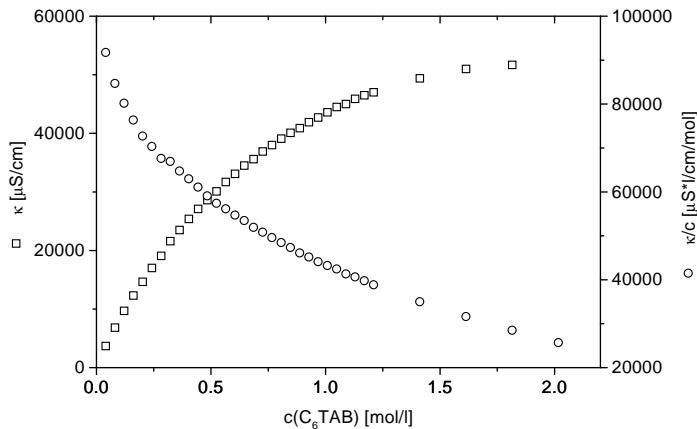


Abbildung 4.7: Auftragung von κ und κ/c als Funktion der C_6 TAB-Konzentration

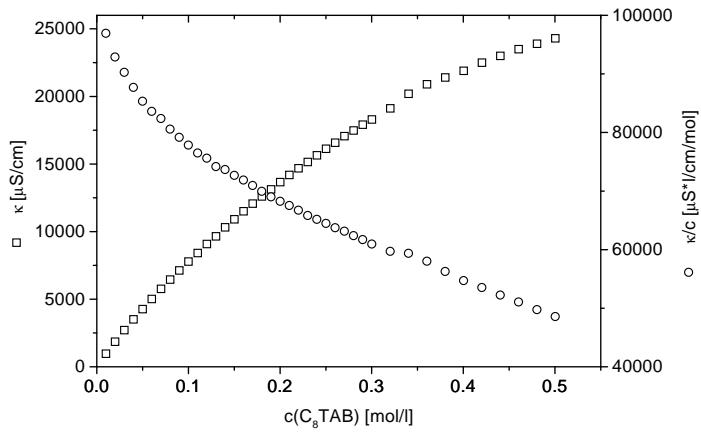


Abbildung 4.8: Auftragung von κ und κ/c als Funktion der C_8TAB -Konzentration

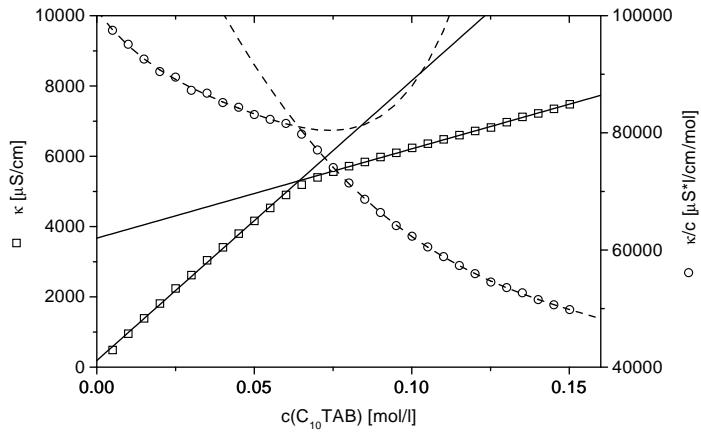


Abbildung 4.9: Auftragung von κ und κ/c als Funktion der C_{10}TAB -Konzentration

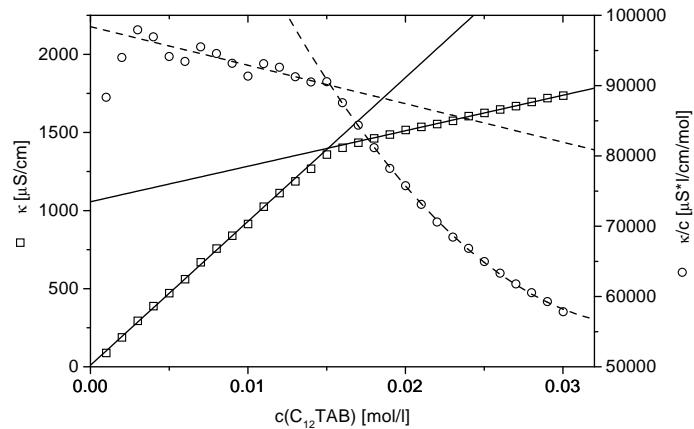
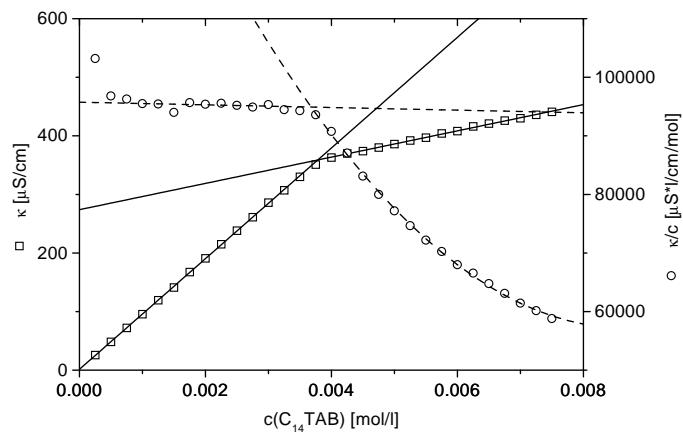
Abbildung 4.10: Auftragung von κ und κ/c als Funktion der $C_{12}\text{TAB}$ -KonzentrationAbbildung 4.11: Auftragung von κ und κ/c als Funktion der $C_{14}\text{TAB}$ -Konzentration

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Auftragung von κ als Funktion der C_x TAB-Konzentration.

α wurde aus den Gleichungen 2.116 und 2.117 in Abschnitt 2.4 bestimmt. Für die Einzelionenleitfähigkeit der Bromid-Ionen wurde ein Wert von $78.14 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ [79] verwendet. Als Aggregationszahlen N wurden die gerundeten Werte 40, 50 und 60 für $x = 10, 12$ und 14 verwendet [60, 80–82]. a_i ($i = 1, 2$) hat die Einheit $[\mu\text{S}/\text{cm}]$, s_i ($i = 1, 2$) die Einheit $[\mu\text{S} \cdot \text{l}/\text{cm} \cdot \text{mol}]$ und die kritische Mizellkonzentration c_{CMC} die Einheit $[\text{mol/l}]$.

x	$c < c_{\text{CMC}}$		$c > c_{\text{CMC}}$		c_{CMC}	α	
	$\kappa = a_1 + s_1 \cdot c$	a_1	$\kappa = a_2 + s_2 \cdot c$	a_2		Gl. 2.116	Gl. 2.117
10	187.5303	79635.36761	3670.2451	25409.40457	0.0642	0.319	0.304
12	9.95	92077.8532	1056.50117	22732.33911	0.0151	0.247	0.197
14	1.37308	94479.53567	273.96905	22427.10478	0.00378	0.237	0.181

Bei den Auftragung von κ/c als Funktion der Konzentration an $C_{10}\text{TAB}$, $C_{12}\text{TAB}$ bzw. $C_{14}\text{TAB}$ wurden die Kurvenäste durch Polynome angepaßt. Die erhaltenen Werte für die CMC der drei Tenside sind in Tabelle 4.2 im übernächsten Abschnitt zu finden.

4.2.2 Logarithmische Auftragungen κ und κ/c

Um eine Vergleichsmöglichkeit mit später dargestellten UV/Vis-spektroskopischen Ergebnissen zu haben, sind in den Abbildungen 4.7 bis 4.11 κ sowie κ/c als Funktion der logarithmierten Tensidkonzentration für die verschiedenen $C_x\text{TAB}$ -Lösungen ($x = 6, 8, 10, 12, 14$) aufgetragen. Es zeigt sich, daß im Fall von $C_6\text{TAB}$ und $C_8\text{TAB}$ kein deutlicher Knick in der Kurve für κ oder κ/c auftritt. Eine Bestimmung der CMC ist für diese beiden Tenside also auch an Hand dieser beiden Arten der Meßwertedarstellung nicht möglich. Für die drei verbleibenden Tenside konnte hingegen durch Anpassung entsprechender Polynome an die Kurvenäste ober- und unterhalb der CMC dieselbe bestimmt werden. Im Fall von $C_{14}\text{TAB}$ wurden für die Anpassung der Auftragung $\kappa = f(\log(c))$ zwei verschiedene Polynome für den Kurventeil unterhalb der CMC verwendet. Die Ergebnisse sind gemeinsam mit den Ergebnissen aus Abschnitt 4.2.1 (lineare Auftragung) in Tabelle 4.2 dargestellt.

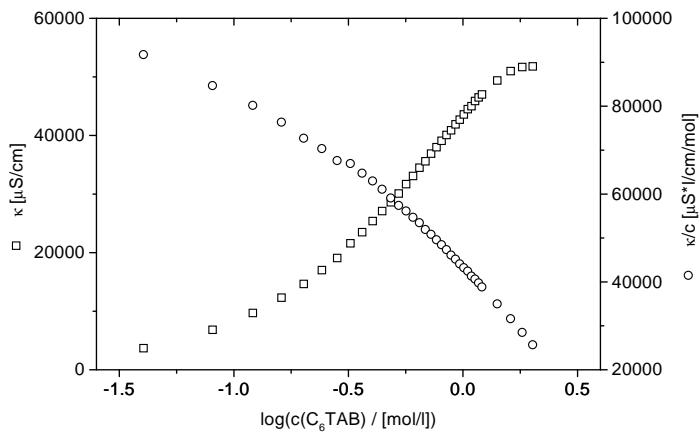


Abbildung 4.12: Auftragung von κ und κ/c als Funktion der logarithmierten C₆TAB-Konzentration

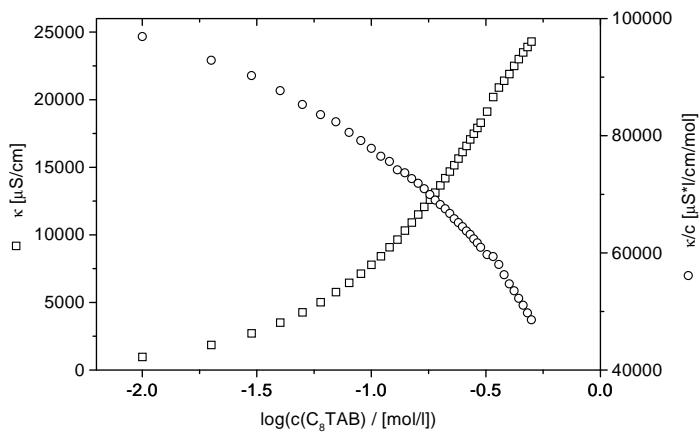


Abbildung 4.13: Auftragung von κ und κ/c als Funktion der logarithmierten C₈TAB-Konzentration

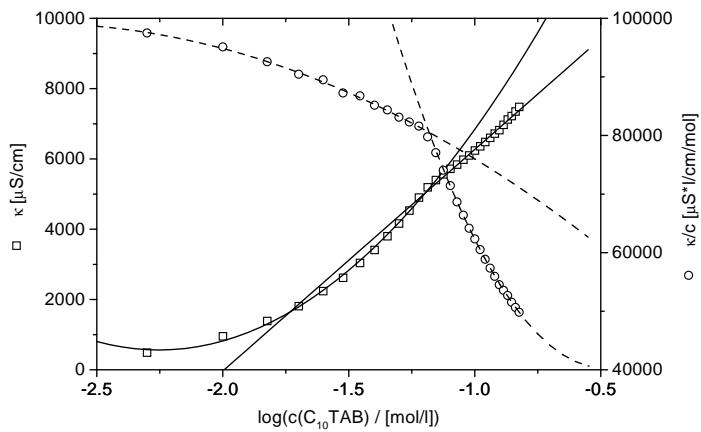


Abbildung 4.14: Auftragung von κ und κ/c als Funktion der logarithmierten $C_{10}\text{TAB}$ -Konzentration

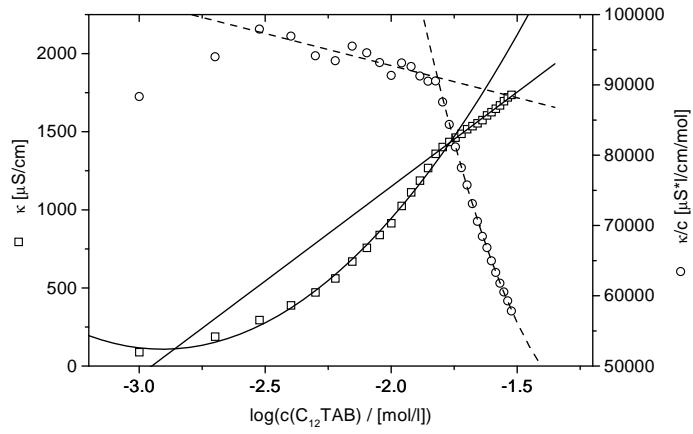


Abbildung 4.15: Auftragung von κ und κ/c als Funktion der logarithmierten $C_{12}\text{TAB}$ -Konzentration

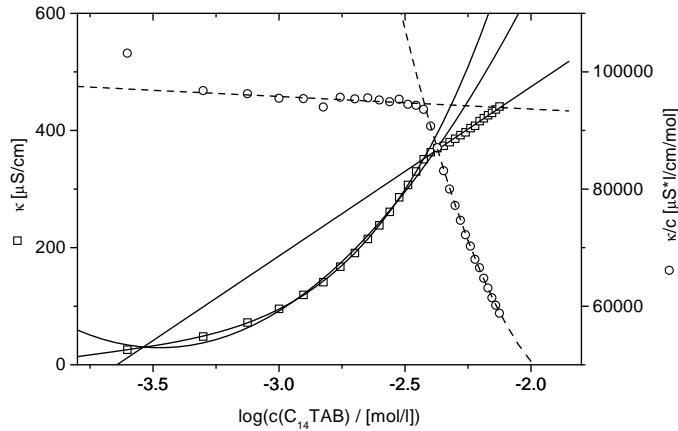


Abbildung 4.16: Auftragung von κ und κ/c als Funktion der logarithmierten $C_{14}\text{TAB}$ -Konzentration

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus linearen und logarithmischen Auftragungen von κ und κ/c

Die aus Auftragungen von κ und κ/c gegen die (logarithmierte) Tensidkonzentration erhaltenen Werte für die CMC von $C_{10}\text{TAB}$, $C_{12}\text{TAB}$ bzw. $C_{14}\text{TAB}$ stimmen relativ gut überein, wie man in Tabelle 4.2 erkennen kann.

Tabelle 4.2: Werte für die CMC von $C_x\text{TABs}$ aus verschiedenen Arten der Auswertung der Leitfähigkeitsmessungen

x	$c_{\text{CMC}} \text{ [mol/l]}$ aus der Auftragung				Mittelwert
	$\kappa = f(c)$	$\kappa/c = f(c)$	$\kappa = f(\log(c))$	$\kappa/c = f(\log(c))$	
10	0.0642	0.0640	0.0639	0.0658	0.0645
12	0.0151	0.0152	0.0172	0.0152	0.0157
14	0.00378	0.00368	0.00375 (0.00416)	0.00377	0.00375

4.3 UV/Vis-Spektren von Safranin T in unterschiedlichen Lösungen

4.3.1 UV/Vis-Spektren von ST in wäßrigen C_x TAB-Lösungen – Bestimmung der CMC von C_x TAB-Tensiden

In der Literatur wird die Verwendung von Safranin T zur Bestimmung von CMC und Aggregationszahlen verschiedener Tenside über UV/Vis- bzw. Fluoreszenzspektroskopie in direkten und inversen Mizellen beschrieben [83–87]. Offenbar bildet sich ein Komplex zwischen Farbstoff und Mizelle. Beispielsweise ist ST geeignet für Triton X-100 und andere nichtionische Tenside in Chloroform oder Wasser. Auch im Fall von Natriumdodecylsulfat in Wasser kommt es zu einer Wechselwirkung mit ST, die sich in Änderungen im UV/Vis-Spektrum widerspiegelt [14].

Hingegen konnten Dutta und Bhat [14] keine Veränderungen im Spektrum von ST und anderen vergleichbaren Phenaziniumfarbstoffen feststellen, wenn Cetylpyridiniumchlorid, ein kationisches Tensid, in den Farbstofflösungen vorlag. Sie begründeten dies mit elektrostatischer Abstoßung zwischen dem kationischen Farbstoff und dem kationischen Tensid.

Es zeigte sich jedoch bei ersten Vorversuchen, daß sich die UV/Vis-Spektren von ST in C_x TAB-Lösungen oberhalb der CMC teilweise deutlich von ST-Spektren unterhalb der CMC oder in tensidfreier Lösung unterscheiden. Deshalb soll überprüft werden, ob ST als Sonde zur CMC-Bestimmung kationischer Tenside geeignet ist.

Beispielhaft ist eine Reihe von UV/Vis-Spektren von ST bei steigender C_{10} TAB-Konzentration in Abbildung 4.17 und ein Ausschnitt daraus in Abbildung 4.18 dargestellt. Wie man

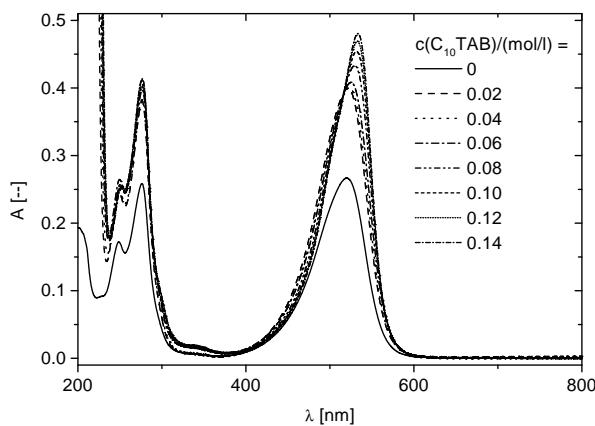


Abbildung 4.17: Extinktion in wäßrigen Lösungen konstanter ST-Konzentration (10^{-5} mol/l) und steigender C_{10} TAB-Konzentration (0 - 0.14 mol/l) im Bereich von 200 - 800 nm

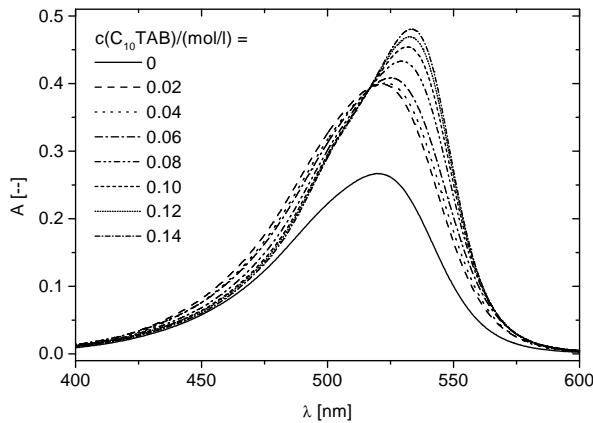


Abbildung 4.18: Extinktion in wäßrigen Lösungen konstanter ST-Konzentration (10^{-5} mol/l) und steigender C_{10} TAB-Konzentration (0 - 0.14 mol/l) im Bereich von 400 - 600 nm

sieht, ändert sich das Spektrum unterhalb der CMC, die bei ca. 0.0645 mol/l liegt (vgl. Tabelle 4.2), kaum.

Eine Ausnahme bildet die tensidfreie ST-Lösung, deren Extinktionskurve deutlich niedriger liegt als die der Lösung mit 0.02 mol/l C_{10} TAB. Ein vergleichbarer Effekt tritt auch in den Lösungen mit den anderen C_x TABs auf.

Die Begründung für dieses Phänomen liefern Beobachtungen beim Herstellen der Proben. Bei den ST-Lösungen handelt es sich je nach ST- und Tensidkonzentration um rosa bis blutrot bzw. rosaviolett gefärbte Lösungen. Die Meßkolben, in denen die tensidfreie ST-Lösungen hergestellt wurden, zeigten nach der Entnahme der Lösungen eine deutliche Rotfärbung des Glases, die auch nach mehrmaligem Waschen mit reinem Wasser nicht verschwand. Erst nach Behandlung mit einer Kaliumhydroxid-Isopropanol-Wasser-Mischung ließ sich die Rotfärbung des Glases entfernen. Ein Teil des Farbstoffes adsorbierte offensichtlich an der Glaswand des Meßkolbens. Bei den Meßkolben, in denen sich tensidhaltige ST-Lösungen befunden hatten, war hingegen keine derartige Rotfärbung zu erkennen.

In der Literatur beschreiben Atun et al. [88] Untersuchungen zur Adsorption von Safranin-O an hydrophilen und -phoben Glasoberflächen. In anderen Literaturstellen [14, 83–87, 89–91] wird auf dieses Phänomen dagegen nicht hingewiesen.

Aber zurück zu den UV/Vis-Spektren. Oberhalb der CMC verschiebt sich das Maximum, das in tensidfreier Lösung bei ca. 520 nm liegt, hin zu höheren Wellenlängen und etwas höherer Extinktion. Zudem scheint bei ca. 520 nm ein isosbestischer Punkt aufzutreten, was auf die Bildung eines Komplexes zwischen Mizellen und Farbstoff hindeutet (vgl. [72] und [14]).

Die Maxima im UV/Vis-Spektrum von ST, die unterhalb von 300 nm liegen, verändern sich bei weitem nicht so stark wie das Maximum bei ca. 520 nm – bzw. überhaupt nicht

–, wenn die Tensidkonzentration zunimmt. Deshalb beschränkt sich die weitere Auswertung der Spektren nur noch auf das Maximum bei ca. 520 nm.

Die Verschiebung des Maximums bei ca. 520 nm mit steigender C_x TAB-Konzentration wird am deutlichsten, wenn man die Lage des Maximums, genauer gesagt die Wellenlänge λ_{\max} , und die Extinktion am Maximum, A_{\max} , als Funktion der (logarithmierten) Tensidkonzentration aufträgt.

4.3.1.1 Lineare Auftragung von λ_{\max} und A_{\max}

In den Abbildungen 4.19 bis 4.23 sind Wellenlänge λ_{\max} und Extinktion A_{\max} am Maximum in Abhängigkeit von der C_x TAB-Konzentration für $x = 6, 8, 10, 12$ und 14 dargestellt. Daraus soll – soweit möglich – die CMC der verschiedenen homologen Tenside gewonnen werden.

Im Fall von ST in C_6 -TAB-haltigen wässrigen Lösungen werden die Wellenlänge und die Extinktion des Maximums mit steigender Tensidkonzentration größer. Je höher die Tensidkonzentration ist, desto weniger stark nehmen λ_{\max} und A_{\max} zu. Es tritt kein ausgeprägter Knick in den beiden Kurven in Abbildung 4.19 auf, so daß eine Bestimmung der CMC nicht möglich ist. Immerhin verschiebt sich λ_{\max} von 522 ± 1 nm im Falle der niedrigsten C_6 TAB-Konzentration (0.12 mol/l) bis zu 537 ± 1 nm in einer Lösung mit 1.98 mol/l C_6 TAB, d. h. um rund 17 nm, und A_{\max} von 0.394 zu 0.497.

Betrachten wir als nächstes die Veränderungen in λ_{\max} und A_{\max} bei steigender C_8 TAB-Konzentration (vgl. Abbildung 4.20). Die Kurve für λ_{\max} zeigt einen ähnlichen Verlauf wie für C_6 TAB, d. h. es ist kein deutlicher Knick zu erkennen. Dagegen ist ein schwacher Knick in

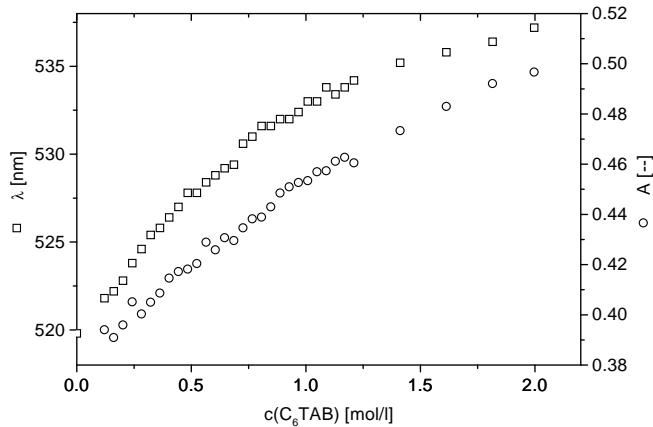


Abbildung 4.19: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der C_6 TAB-Konzentration

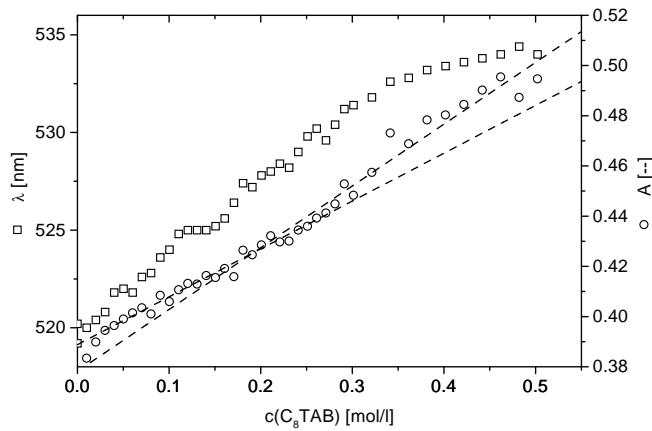


Abbildung 4.20: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der $C_8\text{TAB}$ -Konzentration

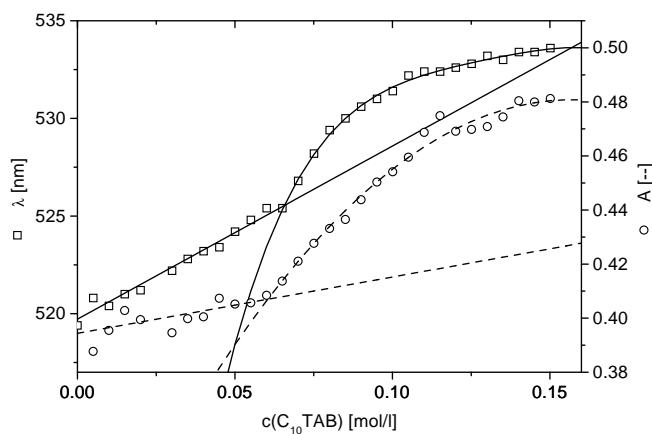


Abbildung 4.21: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der $C_{10}\text{TAB}$ -Konzentration

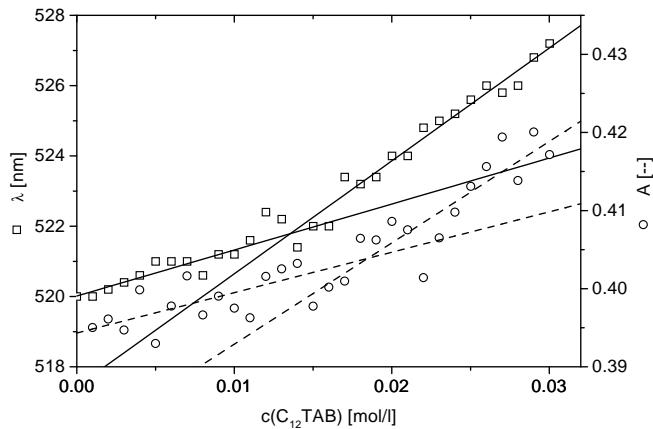


Abbildung 4.22: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der $C_{12}\text{TAB}$ -Konzentration

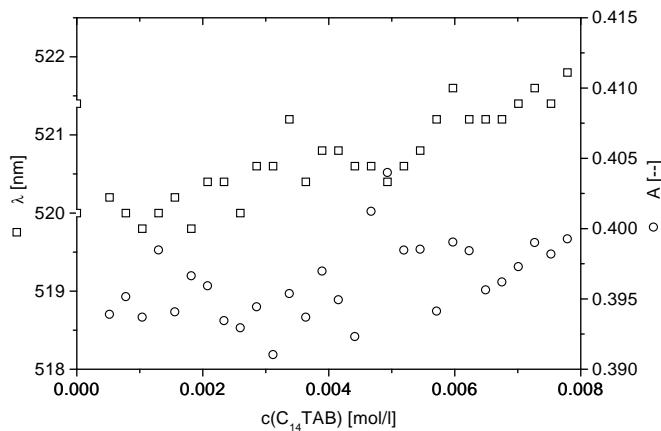


Abbildung 4.23: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der $C_{14}\text{TAB}$ -Konzentration

der Auftragung der Extinktion als Funktion der C₈TAB-Konzentration zu erkennen. Die beiden Kurvenäste ober- und unterhalb des Knicks wurden durch Geraden angepaßt. Die Wellenlänge des Maximums verschiebt sich im Fall von C₈TAB von 520 ± 1 nm in der Lösung mit der niedrigsten Tensidkonzentration (0.01 mol/l) um etwa 14 nm bis zu 534 ± 1 nm in 0.5 mol/l Lösung. A_{\max} verändert sich in den gleichen Lösungen von 0.383 hin zu 0.495.

Im Fall von C₁₀TAB (Abbildung 4.21) kann man sowohl in der Auftragung von λ_{\max} als auch A_{\max} als Funktion der Tensidkonzentration einen deutlichen Knick erkennen. Der Kurventeil unterhalb des Knicks wurde durch eine Gerade, der oberhalb des Knicks durch ein Polynom niedrigen Grades angepaßt. Auch hier verändern sich λ_{\max} und A_{\max} relativ stark: von 521 ± 1 nm bzw. 0.388 in 0.005 mol/l C₁₀TAB-Lösung hin zu 534 ± 1 nm bzw. 0.481 in 0.15 mol/l Lösung.

Studiert man die Auftragung von λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der C₁₂TAB-Konzentration in Abbildung 4.22, so stellt man fest, daß auch hier ein Knick in den beiden Kurven vorhanden ist. Die Kurvenäste unter- und oberhalb des Knicks konnten durch Geraden beschrieben werden. Allerdings ändern sich die Wellenlänge und die Extinktion bei weitem nicht mehr so stark im betrachteten Konzentrationsbereich wie bei C₁₀TAB. Für λ_{\max} und A_{\max} erhält man in 0.001 mol/l C₁₂TAB-Lösung 520 ± 1 nm bzw. 0.395, in 0.03 mol/l Lösung 527 ± 1 nm bzw. 0.417.

Wie man in Abbildung 4.23 erkennen kann, ändern sich im Falle steigender C₁₄TAB-Konzentration λ_{\max} und A_{\max} nicht besonders deutlich: von 520 ± 1 nm bzw. 0.394 in $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l C₁₄TAB-Lösung zu 524 ± 1 nm bzw. 0.400 in 0.017 mol/l Lösung. Ein Knick in den Kurven ist nicht festzustellen. Auch hier ist also eine Bestimmung der CMC nicht möglich.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Kurvenschnittpunkte, d. h. der CMC, aus den linearen Auftragungen sind gemeinsam mit den Ergebnissen aus den logarithmischen Auftragungen in Tabelle 4.3 in der Zusammenfassung im übernächsten Abschnitt zu finden.

4.3.1.2 Logarithmische Auftragung von λ_{\max} und A_{\max}

Die Wellenlänge und die Extinktion des Maximums im Spektrum von ST bei 520 nm wird in den Abbildungen 4.24 bis 4.28 als Funktion der logarithmierten C_x TAB-Konzentration ($x = 6, 8, 10, 12, 14$) aufgetragen. Es soll versucht werden, aus dieser Form der Auftragung vielleicht doch noch die CMC der Tenside, die sich aus den linearen Auftragungen nicht bestimmen ließ, zu erhalten.

Betrachtet man sich Abbildung 4.24, so stellt man fest, daß nur in der Auftragung von A_{\max} als Funktion steigender logarithmierter C_6 TAB-Konzentration ein mehr oder minder deutlicher Knick zu erkennen ist, aber nicht in der in der Auftragung von λ_{\max} . Die beiden Kurvenäste unter- und oberhalb des Knicks für die Auftragung von A_{\max} wurden jeweils durch eine Gerade gefitett.

Sowohl in der Auftragung von λ_{\max} als auch von A_{\max} in Abhängigkeit von der logarithmierten C_8 TAB-Konzentration kann man einen Knick erkennen (vgl. Abbildung 4.25). Die Kurventeile unterhalb und oberhalb des Knicks wurden entweder linear oder durch ein Polynom niedrigen Grades angepaßt.

Auch im Fall von C_{10} TAB sowie C_{12} TAB tritt in der Kurve von λ_{\max} und A_{\max} ein deutlich sichtbarer Knick auf, wie man in den Abbildungen 4.26 bzw. 4.27 sehen kann. Geraden oder Polynome niedrigen Grades wurden für den Fit der beiden Kurvenäste ober- und unterhalb des Knicks verwendet.

In Abbildung 4.28 wird hingegen deutlich, daß nur die Auftragung von λ_{\max} als Funktion der logarithmierten C_{14} TAB-Konzentration einen mehr oder minder ausgeprägten Knick zeigt, die Auftragung von A_{\max} hingegen nicht. Die beiden Kurventeile unter- und oberhalb des

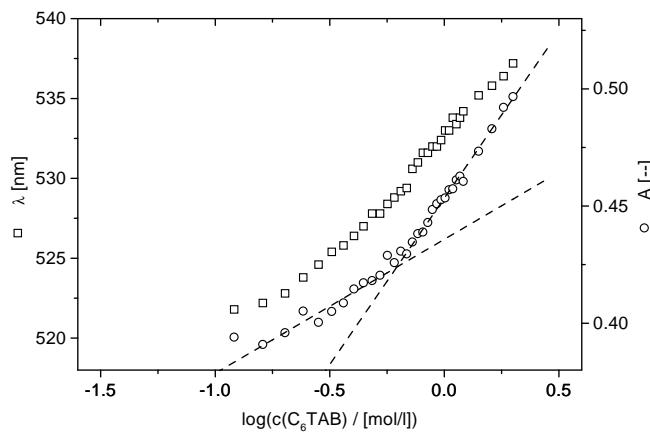


Abbildung 4.24: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C_6 TAB-Konzentration

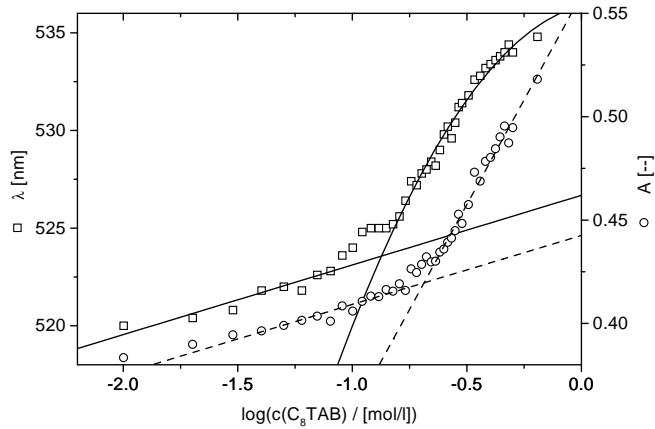


Abbildung 4.25: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C_8 TAB-Konzentration

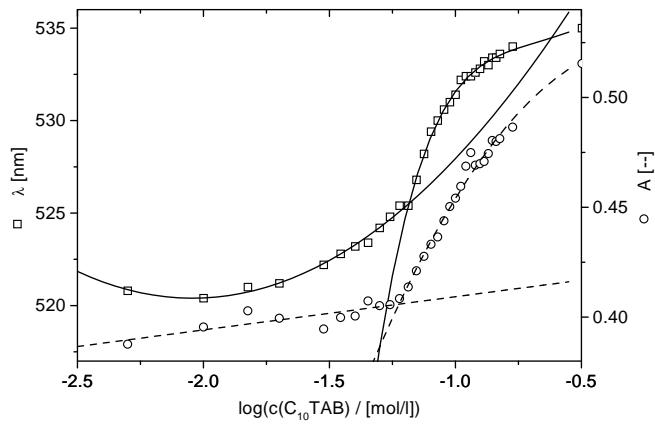


Abbildung 4.26: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C_{10} TAB-Konzentration

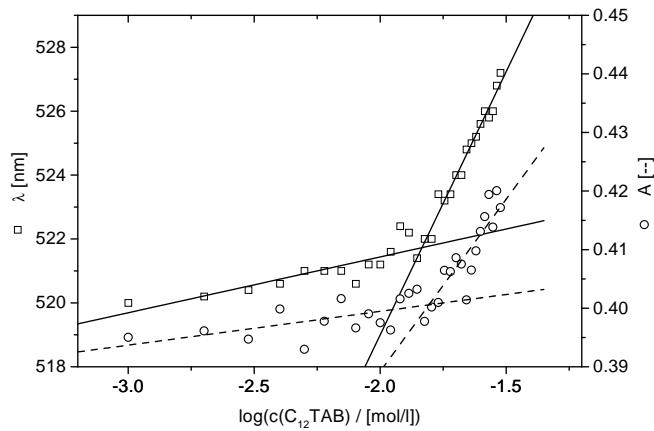


Abbildung 4.27: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C₁₂TAB-Konzentration

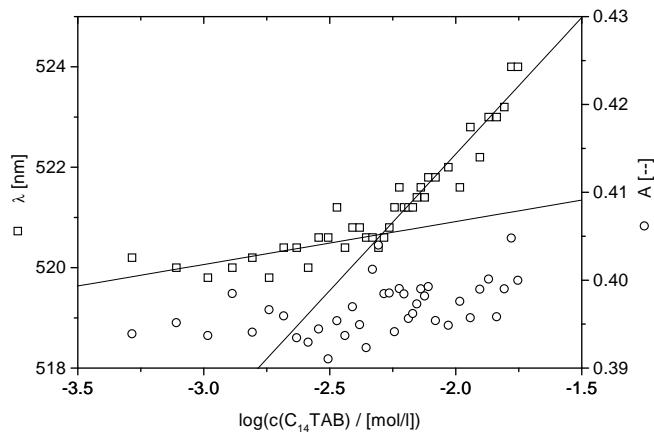


Abbildung 4.28: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C₁₄TAB-Konzentration

Knicks der λ_{\max} -Auftragung wurden durch Geraden angepaßt.

In Tabelle 4.3 im nächsten Abschnitt sind die CMCs, die aus den Kurvenschnittpunkten der logarithmischen Auftragungen erhalten wurden, dargestellt.

4.3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus linearen und logarithmischen Auftragungen von λ_{\max} und A_{\max}

Die aus der linearen und logarithmischen Auftragungen von λ_{\max} und A_{\max} erhaltenen Werte für die Fitkurvenschnittpunkte und damit die CMC-Werte der verschiedenen C_x -TAB-Tenside sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3: Werte für die CMC von C_x TABs aus verschiedenen Arten der Auswertung der UV/Vis-Spektren von ST

x	c _{CMC} [mol/l] aus der Auftragung				Mittelwert c _{CMC} [mol/l]
	λ_{\max} $f(c)$	A_{\max} $f(c)$	λ_{\max} $f(\log(c))$	A_{\max} $f(\log(c))$	
6	–	–	–	0.621	0.621
8	–	0.191	0.134	0.206	0.177
10	0.0657	0.0604	0.0653	0.0597	0.0628
12	0.0136	0.0185	0.0146	0.0156	0.0156
14	–	–	0.00508	–	0.00508

4.3.2 UV/Vis-Spektren von ST in (pseudo-) binären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer

Zur Ergänzung der späteren enzymatischen Messungen wurden UV/Vis-Spektren von ST in C_x TAB-Lösungen ($x = 6, 8, 10, 12, 14$) in TES-Puffer ohne bzw. mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol aufgezeichnet. Da die UV/Vis-Spektren denen der zur CMC-Bestimmung erstellten relativ ähnlich waren, wird darauf verzichtet, explizite Beispiele darzustellen. Stattdessen sollen nur die Ergebnisse – die Wellenlänge und die Extinktion am Maximum bei ca. 520 nm in Abhängigkeit von der logarithmierten C_x TAB-Konzentration – dargestellt werden. Die logarithmische Auftragung ist deshalb notwendig, weil der relativ große Konzentrationsbereich sonst nicht darstellbar wäre.

4.3.2.1 λ_{\max} und A_{\max} als Funktion der logarithmisch aufgetragenen C_x TAB-Konzentration

In den Abbildungen 4.29 bis 4.33 sind die Veränderungen von λ_{\max} und A_{\max} in Abhängigkeit von der logarithmierten Tensidkonzentration für die Tenside C_6 TAB, C_8 TAB, C_{10} TAB, C_{12} TAB und C_{14} TAB dargestellt. Dabei wurden dieselben Symbole zur Kennzeichnung verwendet: ■ und □ entsprechen der Wellenlänge des Maximums in 1-Hexanol-freier bzw. -haltiger Lösung, ● und ○ der Extinktion des Maximums in 1-Hexanol-freier bzw. -haltiger Lösung. Die Zugehörigkeit der jeweiligen Kurven zur entsprechenden y-Achse ist zusätzlich durch Pfeile in den Abbildungen angegeben. Die gestrichelt bzw. gepunktet eingezeichneten Geraden entsprechen den jeweiligen Werten von λ_{\max} bzw. A_{\max} in tensidfreier Lösung, die auf Grund der logarithmischen Skalierung sonst nicht dargestellt werden könnten.

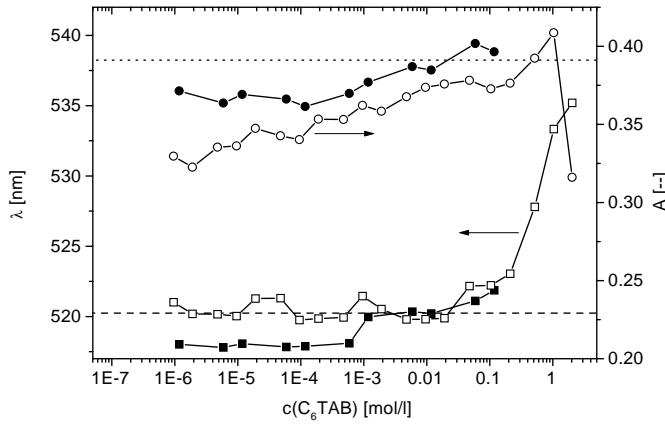


Abbildung 4.29: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C_6 TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen.

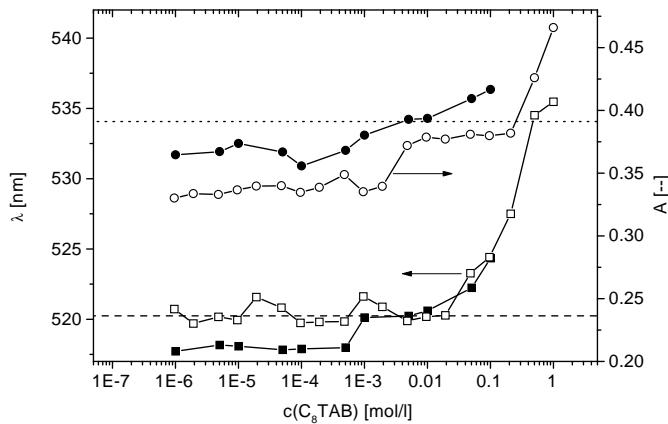


Abbildung 4.30: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C_8 TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen.

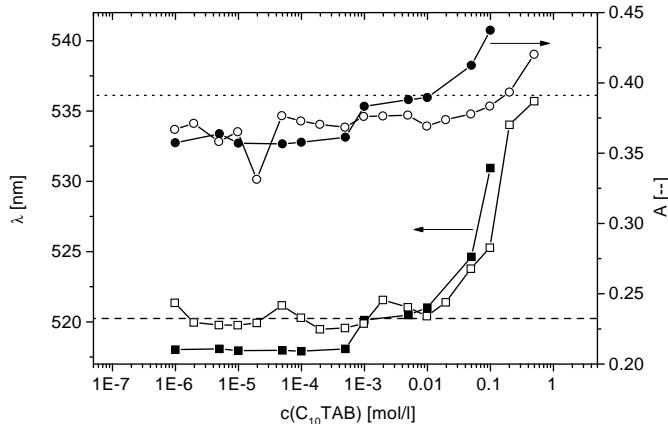


Abbildung 4.31: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C_{10} TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen.

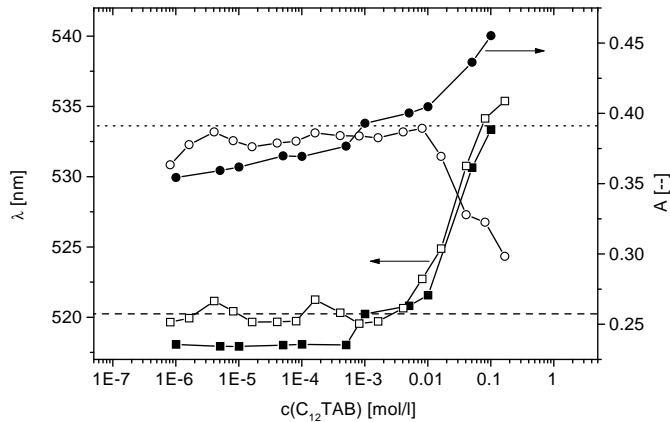


Abbildung 4.32: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten $C_{12}\text{TAB}$ -Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen.

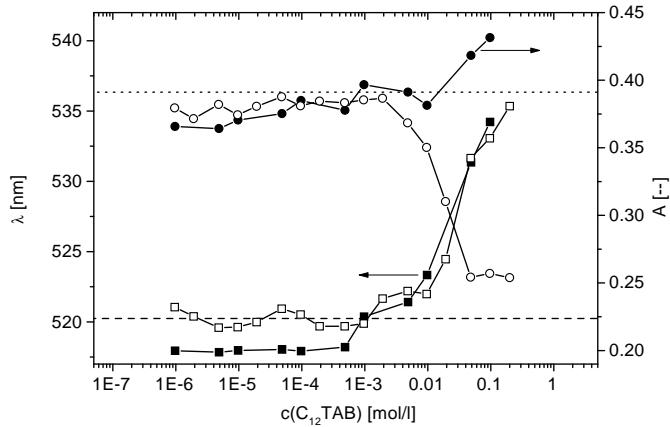


Abbildung 4.33: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} und der Extinktion A_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten $C_{14}\text{TAB}$ -Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen.

Es scheint, daß ST in TES-Puffer-haltiger Lösung bedeutend schwächer als in wäßriger Lösung an Glas adsorbiert, da weder die Glasgefäße der TES-haltigen, tensidfreien Lösungen rosa gefärbt waren noch die Extinktion von ST am Maximum bei ca. 520 nm geringer als in tensidhaltiger Lösung ist.

Wie man sieht, bleibt λ_{\max} für niedrige Tensidkonzentrationen relativ konstant und steigt erst ab einer bestimmten C_x TAB-Konzentration deutlich an. Der ungefähre Beginn des Anstiegs ist in Tabelle 4.4 angegeben.

Tabelle 4.4: Beginn des Anstiegs von λ_{\max} für (pseudo-) binäre Lösungen C_x TAB/TES-Puffer

x	$c(C_x \text{ TAB}) [\text{mol/l}]$
6	> 0.1
8	> 0.05
10	> 0.01
12	> 0.01
14	> 0.005
$c(C_6\text{OH}) [\text{mol/l}]$	0
	$5 \cdot 10^{-3}$

Tabelle 4.5: Beginn des Anstiegs (\uparrow) bzw. Abfalls (\downarrow) von A_{\max} für (pseudo-) binäre Lösungen C_x TAB/TES-Puffer

x	$c(C_x \text{ TAB}) [\text{mol/l}]$
6	—
8	—
10	> 0.01 \uparrow
12	> 0.01 \uparrow
14	> 0.01 \uparrow
$c(C_6\text{OH}) [\text{mol/l}]$	0
	$5 \cdot 10^{-3}$

Betrachtet man hingegen den Verlauf von A_{\max} , so ergibt sich ein etwas anderes Bild.

Für C_6 TAB steigt A_{\max} im Bereich niedriger Tensidkonzentrationen leicht an, wie man in Abbildung 4.29 erkennen kann. Oberhalb einer bestimmten Tensidkonzentration (1 mol/l) sinkt in den 1-Hexanol-haltigen C_6 TAB-Lösungen A_{\max} plötzlich wieder ab. Es wurde festgestellt, daß die Probelösung mit $c(C_6\text{TAB}) \approx 2 \text{ mol/l}$ deutlich schwächer gefärbt war als die Lösung mit 1 mol/l. Die Farbintensität nahm wieder zu, wenn die Lösung mit $c(C_6\text{TAB}) \approx 2 \text{ mol/l}$ geschüttelt wurde. Wenn diese Lösung aber einige Zeit unbewegt stehengelassen wurde, entfärbte sie sich wieder. Es konnte keine Phasentrennung festgestellt werden, was eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen gewesen wäre.

Für niedrige Tensidkonzentrationen stieg A_{\max} auch in den (pseudo-) binären C_8 TAB- und C_{10} TAB-Lösungen minimal an (vgl. Abbildungen 4.30 und 4.30). Sowohl in den 1-Hexanol-haltigen als auch -freien C_8 TAB- und C_{10} TAB-Lösungen gab es oberhalb einer bestimmten Konzentration einen deutlichen Anstieg von A_{\max} .

Im Falle der (pseudo-) binären C_{12} TAB- und C_{14} TAB-Lösungen stieg A_{\max} ebenfalls im Bereich niedriger Tensidkonzentrationen an. Für 1-Hexanol-haltige C_{12} TAB-Lösungen und C_{14} TAB-Lösungen mit einer Tensidkonzentration oberhalb von 0.02 bzw. 0.002 mol/l wurde dieselbe Beobachtung gemacht wie für die entsprechenden C_6 TAB-Lösungen mit 1-Hexanol, d. h. es wurde ein geringeres A_{\max} sowie eine geringere Farbintensität als die Lösungen mit niedrigerer Tensidkonzentration gefunden. Die Zunahme der Farbintensität konnte ebenfalls durch Schütteln der Proben erreicht werden. Hingegen trat bei den 1-Hexanol-freien Lösungen von C_{12} TAB und C_{14} TAB ein deutlicher Anstieg von A_{\max} auf.

Die Konzentrationen, oberhalb derer es zur starken Zu- oder Abnahme der Extinktion am Maximum von ST kam, sind der Übersicht halber in Tabelle 4.5 dargestellt.

4.3.2.2 Vergleich von ST in (pseudo-) binären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer und in wäßrigen C_x TAB-Lösungen

Um eine Vergleichsmöglichkeit zu haben, sind in den Abbildungen 4.34 bis 4.38 die Veränderungen der Wellenlänge des Maximums von ST bei ca. 520 nm in (pseudo-) binären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer und in wäßrigen C_x TAB-Lösungen bei steigender C_x TAB-Konzentration gegenübergestellt. Um die Abbildungen etwas übersichtlicher zu halten, sind die Kurven für die 1-Hexanol-freien (■) und -haltigen (□) bzw. die wäßrigen (○) C_x TAB-Lösungen mit getrennten y-Achsen dargestellt. Die Pfeile in den Abbildungen dienen der Zuordnung zur jeweiligen y-Achse. Die gestrichelt bzw. gepunktet dargestellten Geraden entsprechen den λ_{\max} -Werten von ST in tensidfreier 1-Hexanol-haltiger und -freier Pufferlösung bzw. tensidfreier wäßriger Lösung.

Wie man sieht, treten die Veränderungen in λ_{\max} bei den (pseudo-) binären C_x TAB-Lösungen (mit $x = 6, 8, 10, 12$ und 14) ungefähr im gleichen Bereich auf wie in den entsprechenden wäßrigen Lösungen.

In den Kurven für λ_{\max} in wäßrigen C_{10} TAB-, C_{12} TAB- und C_{14} TAB-Lösungen (vgl. Abbildungen 4.36 bis 4.38) sind einige zusätzliche Meßpunkte eingezeichnet, die aus Platzgründen in den Abbildungen 4.21 bis 4.23 sowie 4.26 bis 4.28 im Abschnitt 4.3.1 nicht dargestellt wurden.

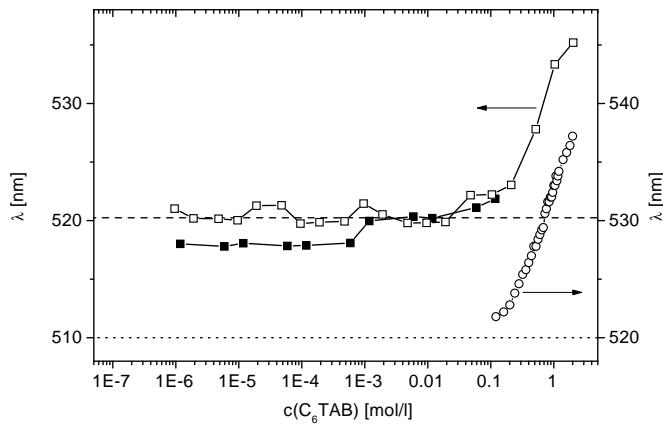


Abbildung 4.34: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C_6 TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen in TES-Puffer und in Wasser.

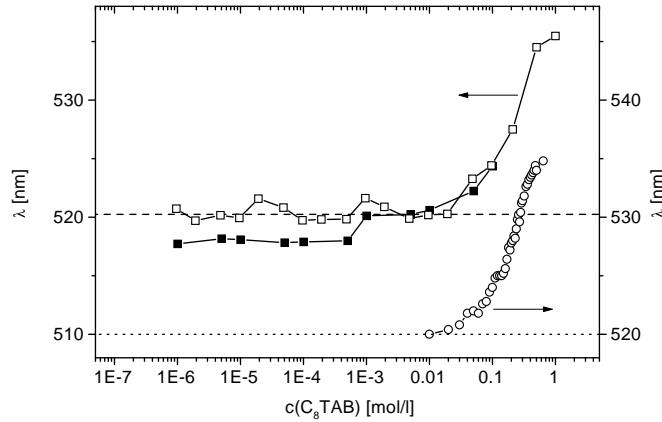


Abbildung 4.35: Auftragung der Wellenlänge λ_{max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C₈TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen in TES-Puffer und in Wasser.

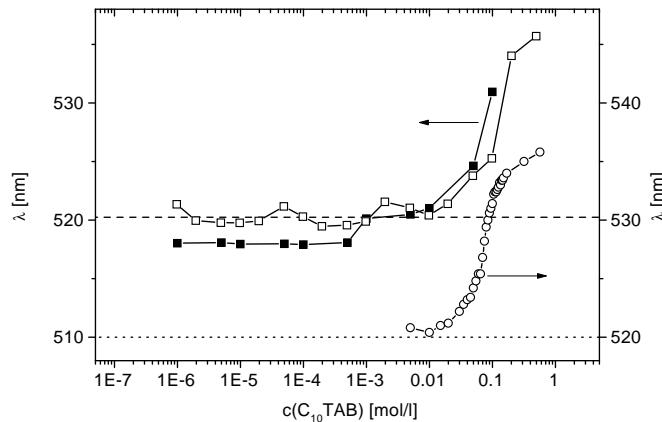


Abbildung 4.36: Auftragung der Wellenlänge λ_{max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten C₁₀TAB-Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen in TES-Puffer und in Wasser.

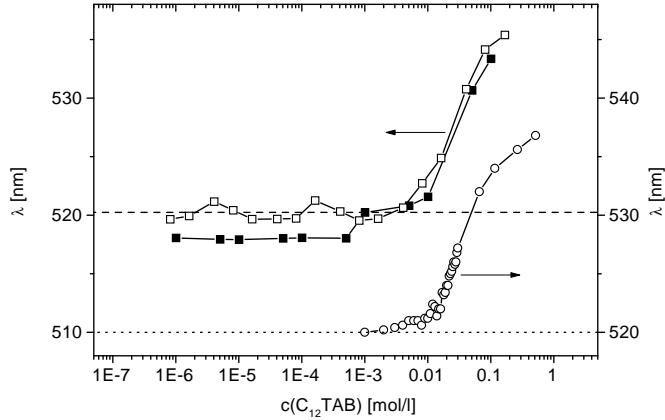


Abbildung 4.37: Auftragung der Wellenlänge λ_{max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten $C_{12}\text{TAB}$ -Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen in TES-Puffer und in Wasser.

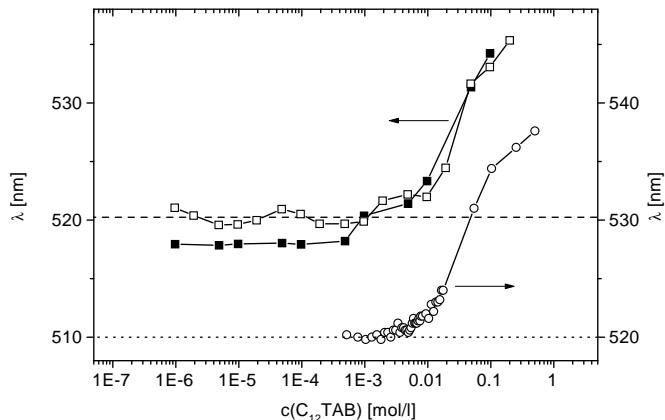


Abbildung 4.38: Auftragung der Wellenlänge λ_{max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der logarithmierten $C_{14}\text{TAB}$ -Konzentration in (pseudo-) binären Lösungen in TES-Puffer und in Wasser.

4.3.3 UV/Vis-Spektren von ST in ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol/TES-Puffer}$ bei konstanten Molzahlverhältnissen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$

Zum Vergleich mit Messungen der Aktivität von HLADH wurden in verschiedenen ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol/TES-Puffer}$ bei konstanten Molzahlverhältnissen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ die UV/Vis-Spektren von ST aufgezeichnet. Auf eine Darstellung der einzelnen Spektren wird verzichtet. In den Abbildungen 4.39 und 4.40 sind die Wellenlänge und die Extinktion des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der Tensidkonzentration für $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ -Verhältnisse von 1:1, 2:1, 4:1 und 8:1 aufgetragen.

Die Kurvenverläufe sind in allen vier Fällen relativ ähnlich: λ_{\max} und A_{\max} steigen mit zunehmender $C_{12}\text{TAB}$ -Konzentration an, allerdings wird der Anstieg immer schwächer, je höher die Tensidkonzentration ist. Die vier Kurven für λ_{\max} sind zudem fast deckungsgleich. Die Extinktion des Maximums schwankt hingegen etwas stärker, was durch Konzentrationsfehler bedingt sein dürfte.

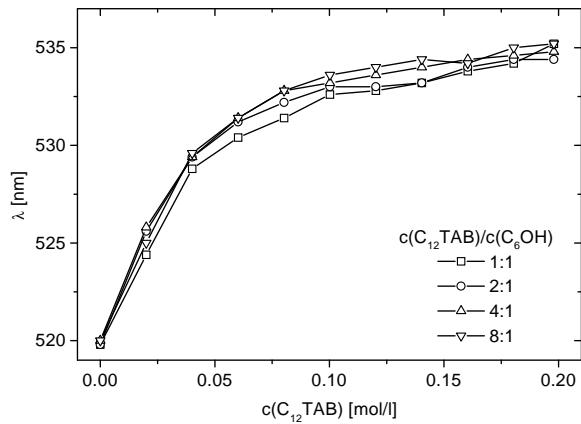
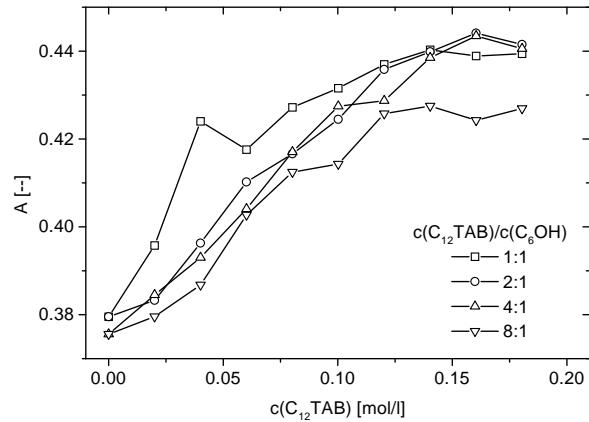


Abbildung 4.39: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der als Funktion der $C_{12}\text{TAB}$ -Konzentration in ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol/TES-Puffer}$ bei konstanten Molzahlverhältnissen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$



4.3.4 UV/Vis-Spektren von ST in reinem Wasser

In den Abbildungen 4.41 und 4.42 sind UV/Vis-Spektren von ST bei niedrigen ($1 \cdot 10^{-5}$ bis $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l) bzw. hohen ($8 \cdot 10^{-5}$ bis $4 \cdot 10^{-4}$ mol/l) ST-Konzentrationen dargestellt. Die angegebene ST-Konzentration berücksichtigt nicht (!) die bereits erwähnte Adsorption von ST an Glasgefäßen, was bedeutet, daß die tatsächliche ST-Konzentration vermutlich etwas geringer ist. Es wurde nicht die Extinktion als Funktion der Wellenlänge aufgetragen, sondern – der besseren Vergleichbarkeit wegen – der Extinktionskoeffizient ϵ . Wie man sieht, verändern sich die Spektren deutlich, wenn die ST-Konzentration zunimmt.

Gut zu sehen ist dies auch, wenn man die Veränderung von Wellenlänge und Extinktionskoeffizient des Maximums, λ_{\max} und ϵ_{\max} , als Funktion der ST-Konzentration aufträgt, wie dies in Abbildung 4.43 der Fall ist. Die Änderung des Extinktionskoeffizienten ist nicht so gravierend, wenn man seinen Fehler mit berücksichtigt, der sich auf Grund von Konzentrationsfehlern und Meßfehlern ergibt und ungefähr einen Wert von ± 1000 l/mol/cm besitzt. Hingegen ändert sich λ_{\max} verhältnismäßig stark von 520 ± 1 nm in $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST-Lösung bis hin zu 501 ± 1 nm in $4 \cdot 10^{-4}$ mol/l Lösung, d. h. um knapp 20 nm. Ein deutliches Absinken von λ_{\max} beginnt etwa ab $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in Wasser.

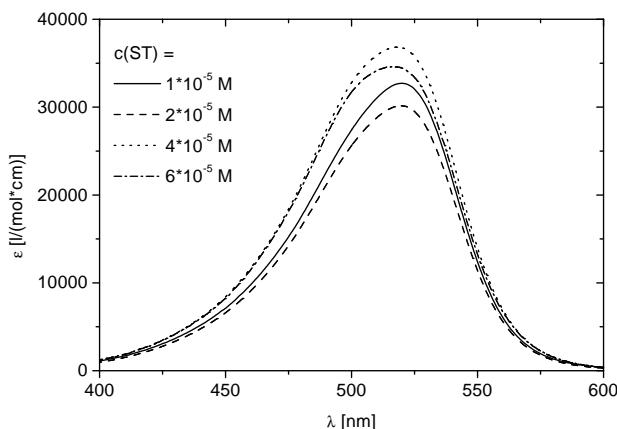


Abbildung 4.41: UV/Vis-Spektren von ST in reinem Wasser – „niedrige“ ST-Konzentrationen

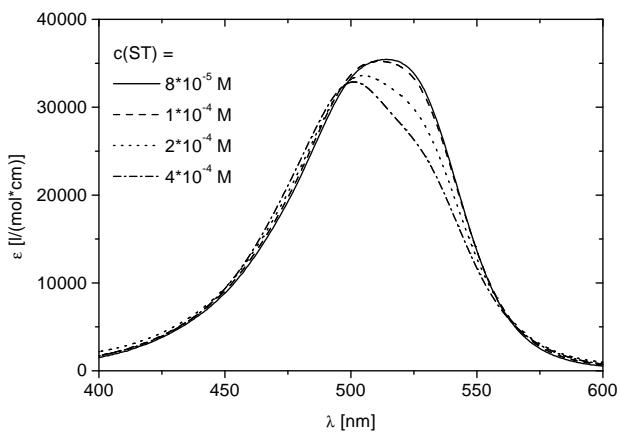


Abbildung 4.42: UV/Vis-Spektren von ST in reinem Wasser – „hohe“ ST-Konzentrationen

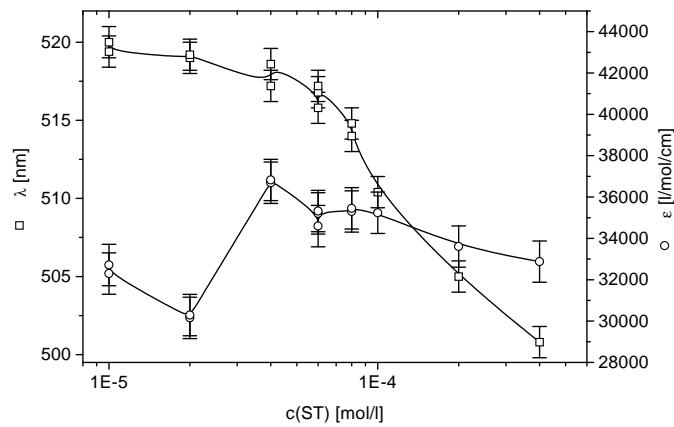


Abbildung 4.43: Verschiebung von λ_{\max} und ϵ_{\max} in Abhängigkeit von der ST-Konzentration

4.3.5 UV/Vis-Spektren von ST in verschiedenen Lösungsmitteln

In den Abbildungen 4.44 bis 4.46 sind die UV/Vis-Spektren – und insbesondere der Bereich um 520 nm – von $1 \cdot 10^{-5}$ bzw. $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in reinem Wasser, Methanol, Ethanol, 1-Butanol, 1-Hexanol und Acetonitril dargestellt.

Zur Ergänzung sind in Abbildung 4.47 und in Tabelle 4.6 die Wellenlänge und der Extinktionskoeffizient des Maximums von ST bei ca. 520 nm in Abhängigkeit vom Lösungsmittel dargestellt. λ_{\max} für $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST-Lösungen wird durch ■ und für $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST-Lösungen durch □, ϵ_{\max} für $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST durch ● und für $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST durch ○ dargestellt. Es wurden Größtfehler von ± 1 nm in λ_{\max} und ± 1000 l/mol/cm in ϵ_{\max} angenommen und als Fehlerbalken eingezeichnet. (Anmerkung: Der aus der Fehlerfortpflanzung bestimmte Fehler von ϵ_{\max} ist etwas kleiner, er liegt zum Beispiel im Fall von $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in Wasser bei ca. ± 210 l/mol/cm, in 1-Hexanol bei ± 360 l/mol/cm.)

Wie man in den Abbildungen und in der Tabelle sieht, steigt die Wellenlänge und der Extinktionskoeffizient des Maximums, wenn in der $H(CH_2)_nOH$ -homologen Lösungsmittelreihe n von 0 (Wasser) bis 6 (1-Hexanol) zunimmt. Im Fall von reinem Wasser muß allerdings wieder die Adsorption an den Glasgefäßen berücksichtigt werden, die zu einer Verringerung der Farbstoffkonzentration in der wäßrigen Lösung führt. Im Fall von Acetonitril ergibt sich ein niedrigerer Wert für λ_{\max} als für Wasser und die Alkohole. ϵ_{\max} ist ebenfalls niedriger als für die Alkohole.

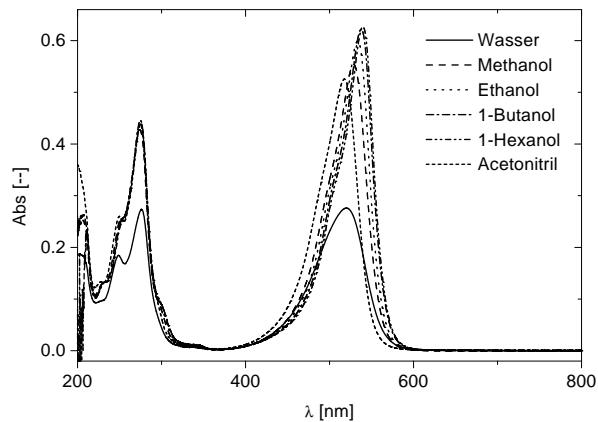


Abbildung 4.44: UV/Vis-Spektren (200 - 800 nm) von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in verschiedenen Lösungsmitteln

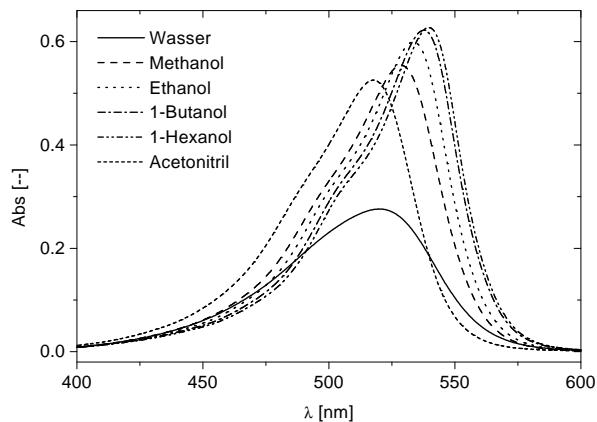


Abbildung 4.45: UV/Vis-Spektren (400 - 600 nm) von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in verschiedenen Lösungsmitteln

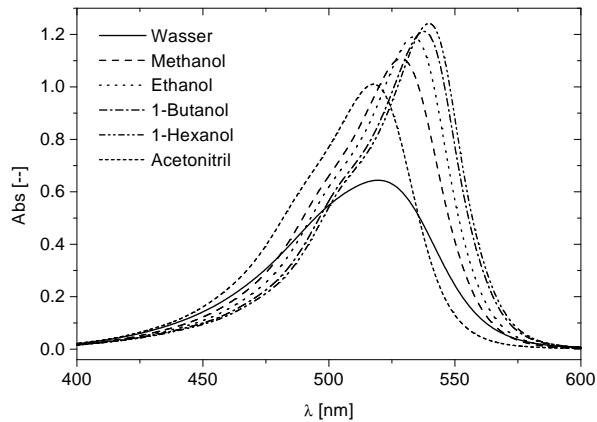
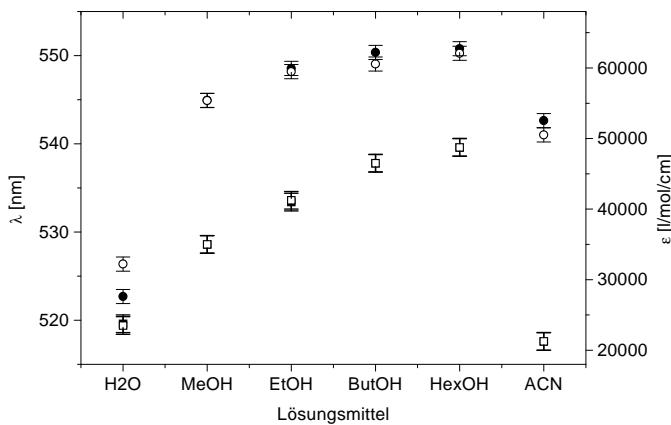


Abbildung 4.46: UV/Vis-Spektren (400 - 600 nm) von $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in verschiedenen Lösungsmitteln

Abbildung 4.47: λ_{\max} und ϵ_{\max} von ST in verschiedenen LösungsmittelnTabelle 4.6: λ_{\max} und ϵ_{\max} von ST in verschiedenen Lösungsmitteln

LM	λ_{\max} [nm]	A_{\max}	$c(ST)$ [mol/l]	d [cm]	ϵ_{\max} [l/mol/cm]	$H(CH_2)_nOH$ n
H ₂ O	520	0.27616	$1 \cdot 10^{-5}$	1	27616	0
C ₁ OH	529	0.55413	$1 \cdot 10^{-5}$	1	55413	1
C ₂ OH	533	0.59938	$1 \cdot 10^{-5}$	1	59938	2
C ₄ OH	538	0.62209	$1 \cdot 10^{-5}$	1	62209	4
C ₆ OH	540	0.62727	$1 \cdot 10^{-5}$	1	62727	6
ACN	518	0.52539	$1 \cdot 10^{-5}$	1	52539	—

LM	λ_{\max} [nm]	A_{\max}	$c(ST)$ [mol/l]	d [cm]	ϵ_{\max} [l/mol/cm]	$H(CH_2)_nOH$ n
H ₂ O	519	0.64414	$2 \cdot 10^{-5}$	1	32207	0
C ₁ OH	529	1.10771	$2 \cdot 10^{-5}$	1	55386	1
C ₂ OH	534	1.18962	$2 \cdot 10^{-5}$	1	59481	2
C ₄ OH	538	1.21114	$2 \cdot 10^{-5}$	1	60557	4
C ₆ OH	540	1.24168	$2 \cdot 10^{-5}$	1	62084	6
ACN	518	1.0101	$2 \cdot 10^{-5}$	1	50505	—

4.3.6 UV/Vis-Spektren von ST in ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}/\text{TES-Puffer}$ bei einem Molzahlverhältnis $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ von 1:1

Als Beispiele für die bestimmten Spektren sind die UV/Vis-Spektren von $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l ST in ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}/\text{TES-Puffer}$ bei einem Molzahlverhältnis $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ von 1:1 und steigender $C_{12}\text{TAB}$ -TAB-Konzentration in der Abbildung 4.48 dargestellt.

Es zeigt sich – analog zu den Lösungen mit steigenden $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ -Verhältnissen (vgl. Abschnitt 4.3.3) –, daß sich mit steigender Tensidkonzentration das Maximum bei ca. 520 nm zu höheren Wellenlängen und Extinktionen bzw. Extinktionskoeffizienten verschiebt. Dies ist in den Abbildung 4.49 und 4.50 deutlich erkennbar. Die Kurven von λ_{\max} und ϵ_{\max} als Funktion der Tensidkonzentration liegen für alle vier verwendeten Farbstoffkonzentrationen mehr oder weniger aufeinander. Allerdings zeigt ϵ_{\max} für $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST einen etwas „zappeligen“ Kurvenverlauf, was möglicherweise durch Fehler in der ST-Konzentration (bedingt durch Volumenfehler der Meßkolben und Pipetten bei der Herstellung) verursacht wurde. Außerdem scheint es in den tensidfreien Lösungen wieder – wie in den wäßrigen Lösungen – zu einer durch Adsorption an Glasgefäßen bedingten Verringerung der ST-Konzentration gekommen zu sein.

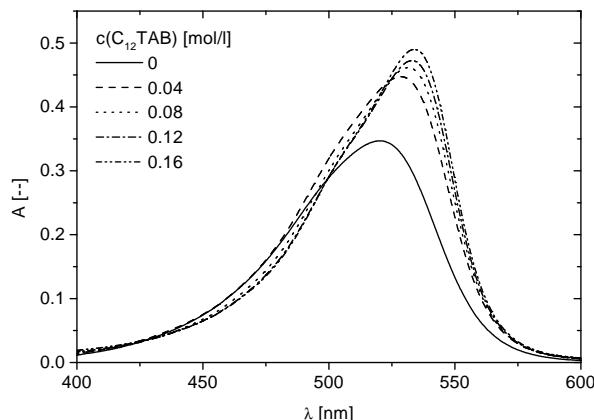


Abbildung 4.48: UV/Vis-Spektrum von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}/\text{TES-Puffer}$ bei einem Molzahlverhältnis $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ von 1:1

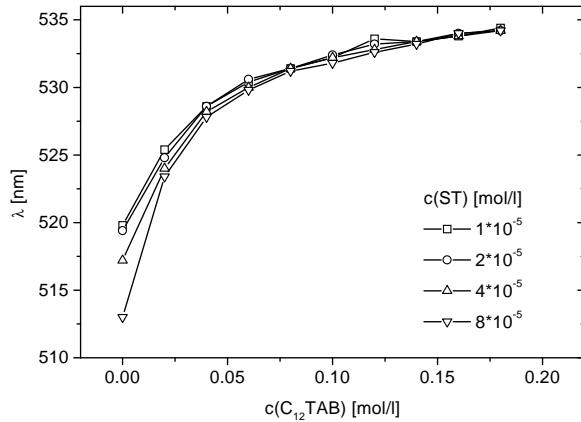


Abbildung 4.49: Auftragung der Wellenlänge λ_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der C₁₂TAB-Konzentration in ternären Lösungen C₁₂TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei einem Molzahlverhältnissen C₁₂TAB/1-Hexanol von 1:1

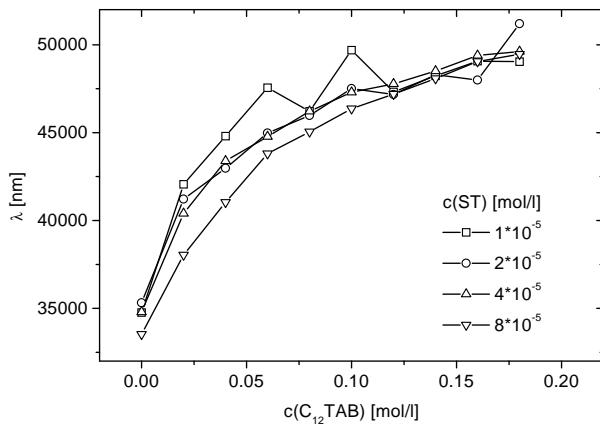


Abbildung 4.50: Auftragung der Wellenlänge ϵ_{\max} des Maximums von ST bei ca. 520 nm als Funktion der C₁₂TAB-Konzentration in ternären Lösungen C₁₂TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei einem Molzahlverhältnissen C₁₂TAB/1-Hexanol von 1:1

4.3.7 Bestimmung von Komplexbildungskonstanten und Aggregationszahlen mittels ST in ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}/\text{TES-Puffer}$ bei konstanten Molzahlverhältnissen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$

Zunächst stellt sich die Frage, welcher Wellenlängenbereich um das Maximum von ST bei 520 nm herum am besten geeignet zu einer Bestimmung der Komplexbildungskonstante des ST-Mizellkomplexes und der Aggregationszahl der Mizellen ist. Am einfachsten lässt sich dies klären, wenn man die UV/Vis-Spektren (oder besser gesagt die Extinktionen als Funktion der Wellenlänge) von ST in TES-Puffer und in einer Lösung mit großer Tensidkonzentration voneinander abzieht. In Abbildung 4.51 ist dies am Beispiel zweier Lösungen mit einem Molzahlverhältnis $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ von 8:1 dargestellt.

Es soll darauf hingewiesen werden, daß das Spektrum von ST in TES-Puffer wegen der Adsorption von ST an Glasgefäßen bei der Herstellung der Lösung und der dadurch verursachten Konzentrationsverringerung mittels einer im Anhang (Abschnitt A.1) beschriebenen Prozedur korrigiert worden ist, um Werte der Extinktion für gleiche Konzentration wie in den tensidhaltigen Lösungen zu erhalten. Diese Korrektur wurde auch bei allen weiteren Rechnungen, bei denen die Extinktion tensidfreier Lösungen verwendet wurde, angewendet, d. h. bei der Bestimmung von Komplexbildungskonstanten und Aggregationszahlen.

Am besten geeignet sind die Bereiche um das Maximum bei ca. 490 nm bzw. das Minimum bei ca. 540 nm. Mit $|\Delta A| \approx -0.158$ weißt das Minimum einen deutlich größeren Extinktionsunterschied auf als das Maximum mit $|\Delta A| \approx 0.069$ und sollte daher bevorzugt werden. Der Bereich um 520 nm herum sollte hingegen nicht verwendet werden. Die Extinktionen von ST in Puffer und $C_{12}\text{TAB}$ -haltiger Lösung unterscheiden sich bei 520 nm nur minimal, weil

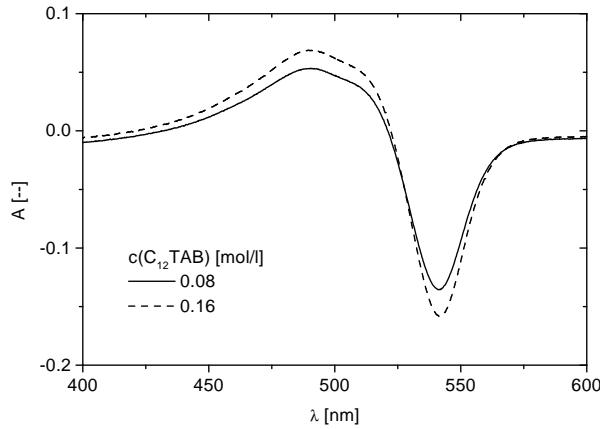


Abbildung 4.51: Differenz-UV/Vis-Spektrum von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST in ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}/\text{TES-Puffer}$ und in reinem TES-Puffer bei einem Molzahlverhältnis $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ von 8:1

hier ein isosbestischer Punkt ist, wie beispielsweise Abbildung 4.48 (vgl. Abschnitt 4.3.6) zeigt.

Zum selben Ergebnis kommt man auch, wenn man die Fitqualität, die durch den Korrelationskoeffizienten r_R repräsentiert wird, verschiedener Fits betrachtet. Der Korrelationskoeffizient ist folgendermaßen definiert [92]:

$$r_R = \frac{\sum_{i=1}^n ((y_{i,M} - \bar{y}_M)(y_{i,F} - \bar{y}_F))}{\sqrt{\sum_{i=1}^n ((y_{i,M} - \bar{y}_M)^2) \sum_{i=1}^n ((y_{i,F} - \bar{y}_F)^2)}} \quad (4.1)$$

wobei $y_{i,M}$ und $y_{i,F}$ die y-Werte der Meßdaten bzw. die entsprechenden y-Werte aus der Anpassung (Fit) sind und \bar{y}_M bzw. \bar{y}_F die Mittelwerte der jeweiligen y-Werte.

Beispiele für unterschiedliche Fitqualitäten sind unter anderem in den Abbildungen 4.52 bis 4.58 zu finden. Die Fitqualität ist gut für $r_R > 0.9$ und sehr gut für $r_R > 0.99$. Im Bereich um 520 nm ist folglich die Fitqualität eher schlecht, da r_R deutlich unter 0.8 liegt. Zudem treten negative Gleichgewichtskonstanten auf, die physikalisch nicht sinnvoll sind.

Die für die verschiedenen Fits benötigten Größen ΔA und $\Delta c_{T,o}$, die in den Gleichungen 2.79 und 2.92 in Abschnitt 2.3.2 definiert sind, lassen sich relativ einfach bestimmen. Versuche, die hier nicht dargestellt werden sollen, haben gezeigt, daß C₁₂TAB-Lösungen sich hinsichtlich ihrer Extinktion im hier betrachteten Spektralbereich nicht wesentlich von der Extinktion von Wasser oder Pufferlösung unterscheiden. Daher vereinfacht sich Gleichung 2.79 zu

$$\Delta A = A - A_{D,o} \quad (4.2)$$

$A_{D,o}$ ist die Extinktion einer Lösung von ST im entsprechenden Lösungsmittel (hier: TES-Puffer) bei gleicher Schichtdicke und ST-Konzentration wie im Fall der tensidhaltigen Lösungen. Die Werte für die CMC, die zur Bestimmung von $\Delta c_{T,o}$ benötigt werden, wurden von Preu [10] übernommen, der sie – allerdings in wäßriger Lösung und nicht in Puffer – mit Leitfähigkeitsmessungen bestimmt hatte. Die Werte für die CMC in Abhängigkeit vom Molzahlverhältnis C₁₂TAB/1-Hexanol sind in Abbildung 2.7 im Abschnitt 2.1.3.2.3 dargestellt.

Es wurden für die Anpassung mehrere Gleichungen, die in Abschnitt 2.3.2 hergeleitet wurden, verwendet. Die Gleichungsnummern, die zu fittenden Größen und die Abkürzungen, die im folgenden verwendet werden sollen, sind in Tabelle 4.7 dargestellt.

Tabelle 4.7: Für die Anpassung der Daten zur Bestimmung von Komplexbildungsparametern zwischen Mizelle und Farbstoff verwendete Gleichungen und die einzusetzenden Größen (vgl. Abschnitt 2.3.2)

Nummer	y	x_1	x_2	x_3	Kürzel
2.103	$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{\Delta A}$	$\Delta c_{T,o}$	–	–	(1), (a)
2.104	$\frac{d \cdot c_{D,o}}{\Delta A}$	$\frac{1}{\Delta c_{T,o}}$	–	–	(2), (d)
2.94	$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{\Delta A}$	$\Delta c_{T,o}$	$c_{D,o}$	–	(b)
2.100	$\frac{d \cdot \Delta c_{T,o} \cdot c_{D,o}}{\Delta A}$	$\Delta c_{T,o}$	$c_{D,o}$	ΔA	(c)

Eine Frage, die es zu beantworten gilt, ist die Auswahl der „Meßpunkte“, die noch in den Fit mit einbezogen werden dürfen. Hierzu ist auf die Abbildungen 4.52 und 4.53 zu verweisen, die Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta\epsilon$ und Korrelationskoeffizienten r als Funktion der Wellenlänge für drei verschiedene Auswahlbereiche der zu fittenden Punkte, nämlich ab der ersten, zweiten oder vierten $C_{12}\text{TAB}$ -Konzentration, darstellt. Zur Anpassung wurde Gleichung (1) (vgl. Tabelle 4.7) verwendet.

Der Fit ab der ersten Konzentration ist deutlich schlechter als der Fit ab der zweiten oder vierten Konzentration, da der Korrelationskoeffizient r im Mittel unter 0.8 liegt. Die Fits ab dem zweiten bzw. vierten „Meßpunkt“ unterscheiden sich – wenn der Wellenlängenbereich um 520 nm aus den oben erwähnten Gründen nicht berücksichtigt wird – mit $r_R > 0.9$ kaum hinsichtlich ihrer Fitqualität. Diese beiden letztgenannten Fits liefern allerdings etwas unterschiedliche Werte für $\Delta\epsilon$. Als nächstes soll untersucht werden, ob eine Anpassung nach Gleichung (1) oder nach Gleichung (2) besser ist. Deshalb sind in den Abbildungen 4.54 und 4.55 die Ergebnisse aus Fits mit Gleichung (1) und Gleichung (2) und in Abbildung 4.56 die Fitkurven im Vergleich mit den „Meßdaten“ dargestellt. In beiden Fällen wurden für die Anpassung die Tensidkonzentrationen ab „Meßpunkt“ Nr. 4 verwendet.

Die Fitqualität ist – wenn man den Wellenlängenbereich um 520 nm herum außer Acht lässt – für Fitgleichung (1) und (2) relativ gut. Beide Gleichungen liefern fast identische Werte für die Extinktionskoeffizientendifferenz, wie in Abbildung 4.54 zu sehen ist. Auch die Gleichgewichtskonstanten, die in Abbildung 4.55 als Funktion der Wellenlänge dargestellt sind, sind für beide Fitgleichungen nahezu gleich.

Ein kleines Problem zeigt sich in Abbildung 4.56. Die aus den Meßpunkten berechneten

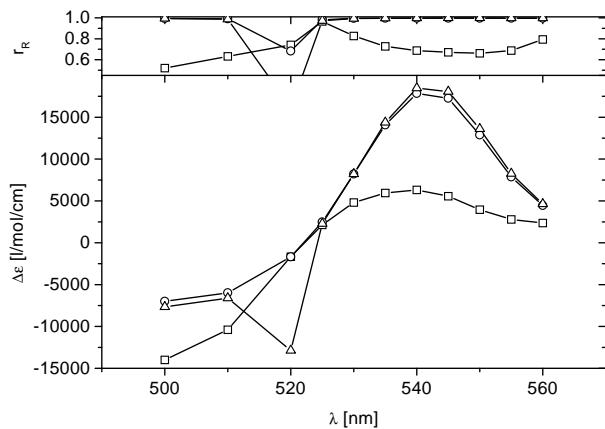


Abbildung 4.52: Auftragung der Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta\epsilon$ und des Korrelationskoeffizienten r_R aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. i mit $i = 1$ (□), 2 (○) und 4 (△) sowie mit Fitgleichung (1) als Funktion der Wellenlänge am Beispiel $C_{12}\text{TAB}/C_6\text{OH} = 8:1$

Punkte für den Fit sind zwar für Gleichung (1) äquidistant, aber im Fall von Gleichung (2) liegen sie immer dichter, je größer die Tensidkonzentration ist. Dies könnte eventuell Einflüsse auf die Fitqualität haben.

Die Abbildungen 4.57 und 4.58 zeigen die Ergebnisse für die Anpassung der „Meßwerte“ für die Molzahlenverhältnisse $C_{12}\text{TAB}/C_6\text{OH} = 1:1, 2:1, 4:1$ und $8:1$ mit Gleichung (1). Wird der Bereich um 520 nm nicht berücksichtigt, so ist die Qualität der Fits mit $r_R > 0.9$ für alle vier Molzahlenverhältnisse relativ gut. Für die Auftragung der Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta\epsilon$ als Funktion der Wellenlänge erhält man, wie in Abbildung 4.57 zu sehen ist, einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf für $C_{12}\text{TAB}/C_6\text{OH} = 1:1, 2:1, 4:1$ und $8:1$. Hingegen ergeben sich Unterschiede im Verlauf der Komplexbildungskonstanten $K_k (= K')$ (vgl. Abbildung 4.58).

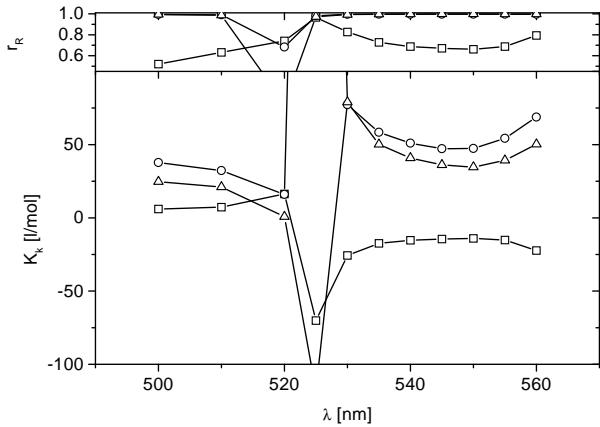


Abbildung 4.53: Auftragung der Komplexbildungskonstanten $K_k (= K')$ und des Korrelationskoeffizienten r_R aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. i mit $i = 1$ (\square), 2 (\circ) und 4 (\triangle) sowie mit Fitgleichung (1) als Funktion der Wellenlänge am Beispiel $C_{12}\text{TAB}/C_6\text{OH} = 8:1$

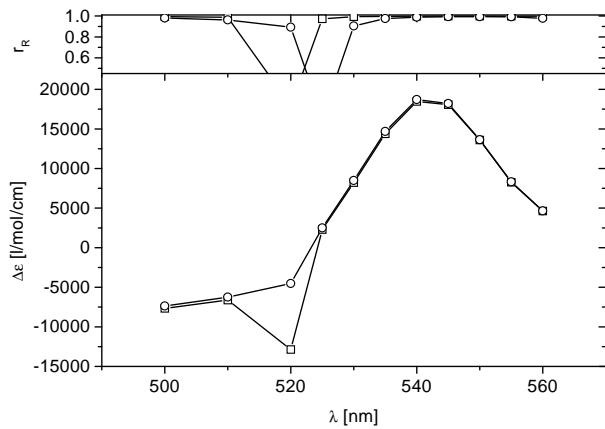


Abbildung 4.54: Auftragung der Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta\epsilon$ und des Korrelationskoeffizienten r_R aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. 4 mit Fitgleichung (1) (□) bzw. (2) (○) als Funktion der Wellenlänge am Beispiel $C_{12}\text{TAB}/C_6\text{OH} = 8:1$

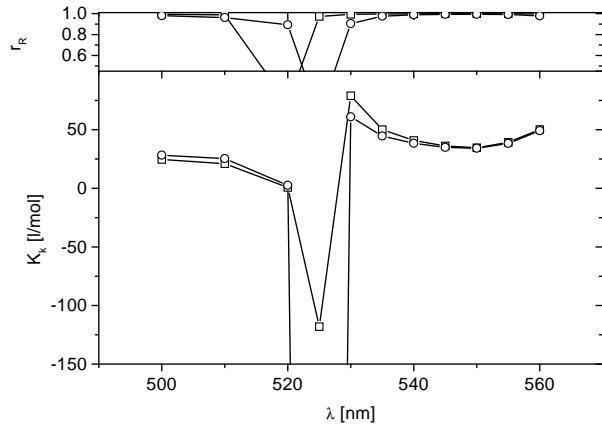


Abbildung 4.55: Auftragung der Komplexbildungskonstanten K_k ($= K'$) und des Korrelationskoeffizienten r_R aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. 4 mit Fitgleichung (1) (□) bzw. (2) (○) als Funktion der Wellenlänge am Beispiel $C_{12}\text{TAB}/C_6\text{OH} = 8:1$

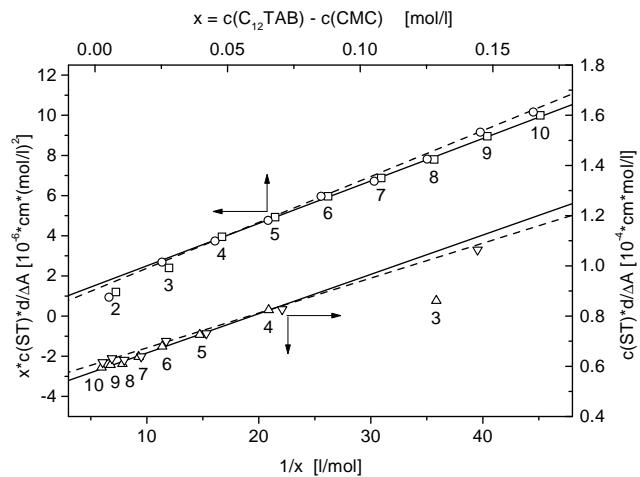


Abbildung 4.56: Vergleich der Fits ab „Meßpunkt“ 4 nach Gleichung (1) und (2) mit den „Meßpunkten“ für $\text{C}_{12}\text{TAB}/\text{C}_6\text{OH} = 1:1$ und $8:1$.

Hierbei entsprechen \square bzw. \circ den „Meßpunkten“ zu $\text{C}_{12}\text{TAB}/\text{C}_6\text{OH} = 1:1$ bzw. $8:1$ für die Anpassung mit Gleichung (1) und \triangle bzw. ∇ für die Anpassung mit Gleichung (2). Die Fitgeraden für $\text{C}_{12}\text{TAB}/\text{C}_6\text{OH} = 1:1$ und $8:1$ werden in beiden Fällen durch — und --- dargestellt. Die Nummern in der Graphik geben die Nummern der Meßpunkte an und die Pfeile die Zugehörigkeiten zu den Achsen.

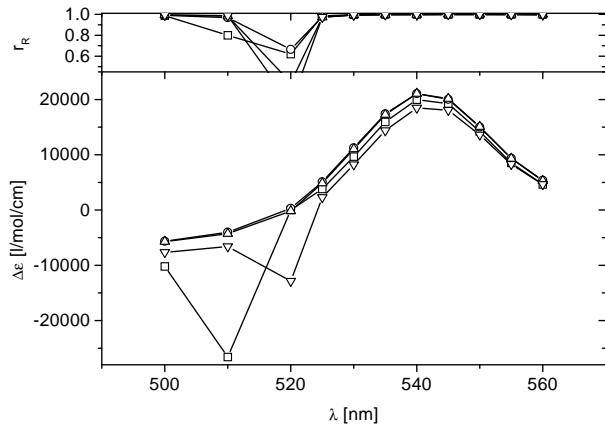


Abbildung 4.57: Auftragung der Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta\epsilon$ und des Korrelationskoeffizienten r_R aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. 4 mit Fitgleichung (1) als Funktion der Wellenlänge für $C_{12}TAB/C_6OH = 1:1$ (□), 2:1 (○), 4:1 (△) und 8:1 (▽).

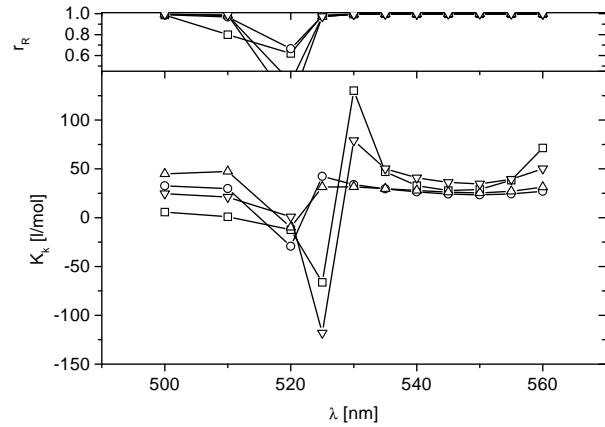


Abbildung 4.58: Auftragung der Komplexbildungskonstante K_k und des Korrelationskoeffizienten r_R aus einem Fit ab Tensidkonzentration No. 4 mit Fitgleichung (1) als Funktion der Wellenlänge für $C_{12}TAB/C_6OH = 1:1$ (□), 2:1 (○), 4:1 (△) und 8:1 (▽).

Aus den UV/Vis-Spektren lassen sich, wie bereits erklärt, neben Extinktionskoeffizientendifferenzen und Komplexbildungskonstanten auch die Aggregationszahlen von Mizellen bestimmen. Hierzu sind die Gleichungen 2.94 und 2.100 (hier als (b) und (c) bezeichnet – vgl. Tabelle 4.7) geeignet, die in Abschnitt 2.3.2 hergeleitet wurden. Allerdings ist eine Voraussetzung für die sinnvolle Anwendung dieser Gleichungen die Messung von UV/Vis-Spektren bei verschiedenen Farbstoff- und Tensidkonzentrationen und die Zusammenfassung der Meßergebnisse zu einer „Datenreihe“ für die Anpassung. Deshalb wird zur Auswertung auf die bereits in Abschnitt 4.3.6 dargestellten UV/Vis-Spektren von ST in ternären Lösungen C₁₂TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei einem Molzahlverhältnis C₁₂TAB/1-Hexanol von 1:1 und einer Tensidkonzentration zwischen 0 und 0.2 mol/l zurückgegriffen.

In Abbildung 4.59 ist die Aggregationszahl N_{AG} der Mizellen in o. g. ternären Lösungen als Funktion der Wellenlänge dargestellt, wobei als Fitgleichung die Gleichung (c) diente. Wie man sieht, ist zwar die Fitqualität mit $r_R > 0.98$ für Wellenlängen oberhalb von 520 nm sehr gut, die Übereinstimmung mit dem aus der Lichtstreuung erhaltenen Wert für die Aggregationszahl ($N_{AG} = 63$ [10]) dagegen eher schlecht. Es ergeben sich Aggregationszahlen zwischen ca. -200 – physikalisch unsinnig – und etwa +2600 – ungefähr das vierzigfache des Werts aus der Lichtstreuung. Die letztgenannte Aggregationszahl wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 4.59 nicht mehr dargestellt.

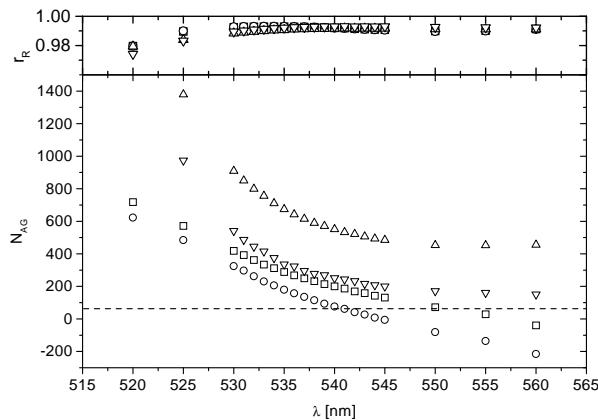


Abbildung 4.59: Auftragung der mit Gleichung (c) bestimmten Aggregationszahl N_{AG} und des Korrelationskoeffizienten r_R für C₁₂TAB/1-Hexanol = 1:1 als Funktion der Wellenlänge. Folgende Symbole wurden verwendet: □ für die Anpassung aller Datenpunkte, ○ für die Anpassung ohne die erste ST-Konzentrationsreihe, △ für die Anpassung ohne die ersten beiden C₁₂-TAB-Konzentrationen in allen ST-Konzentrationsreihen und ▽ für die Anpassung ohne die erste ST-Konzentrationsreihe und ohne die ersten beiden C₁₂-TAB-Konzentrationen. Die eingeziehnte Gerade (- - - -) entspricht dem Wert für N_{AG} , der aus Lichtstreuungsmessungen [10] erhalten wurde.

Die aus der Anpassung der Meßdaten mit Gleichung (b) erhaltenen Werte für die Aggregationszahl der Mizellen in ternären Lösungen mit dem Molzahlenverhältnis C₁₂TAB/1-Hexanol = 1:1 sind in Abbildung 4.60 dargestellt. Auch hier besitzen die Fits – wenn man von dem Wellenlängenbereich um 520 nm absieht – eine gute Qualität mit einem Korrelationskoeffizienten von über 0.98.

Darüberhinaus zeigt sich, daß die für verschiedene Wellenlängen bestimmten Werte für die Aggregationszahl fast gleich sind, wenn die ersten beiden C₁₂TAB-Konzentrationen nicht für den Fit verwendet werden. Die Werte sind fast identisch, wenn in diesem Fall die erste ST-Konzentrationsreihe ($c(ST) = 1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) berücksichtigt oder vernachlässigt wird. Wird die erste ST-Konzentrationsreihe für den Fit verwendet, ergeben sich Aggregationszahlen zwischen 93 bei 525 nm und 73 bei 560 nm sowie eine mittleren Aggregationszahl von 87 ± 5 , wenn man über alle Aggregationszahlen in diesem Wellenlängenbereich mittelt. Vernachlässigt man die erste ST-Konzentrationsreihe hingegen, erhält man Werte zwischen 100 und 59 bei 525 bzw. 560 nm und eine mittlere Aggregationszahl von 83 ± 9 . Die Werte für die Aggregationszahl weichen bei weitem nicht mehr so stark von dem Wert aus der Lichtstreuung ab: 87 ist z. B. ungefähr das 1.4fache von 63.

Wenn die ersten beiden Tensidkonzentrationen dagegen in den Fit mit eingehen, zeigt sich eine deutliche Wellenlängenabhängigkeit der Aggregationszahl, wie in Abbildung 4.60 zu sehen ist. Auch hier sind die Kurvenverläufe für die Anpassung mit oder ohne den ersten beiden C₁₂TAB-Konzentrationen fast identisch. Es ergeben sich Aggregationszahlen zwischen 168 bei 525 nm und 69 bei 560 nm und eine mittlere Aggregationszahl von 121 ± 23 , wenn man für den Fit alle Datenpunkte verwendet. Wird nur die erste ST-Konzentrationsreihe nicht für die Anpassung verwendet, so erhält man Aggregationszahlen zwischen 181 und 55 für

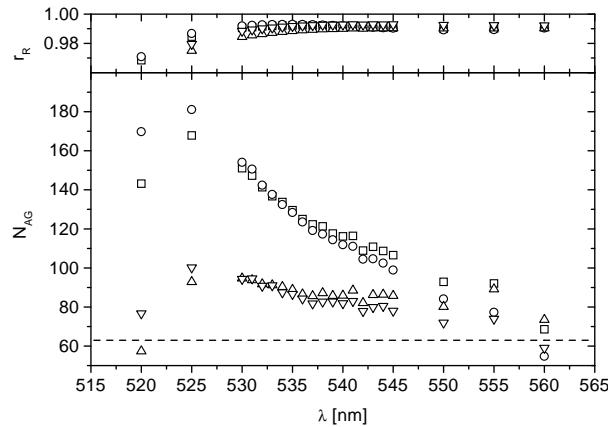


Abbildung 4.60: Auftragung der mit Gleichung (b) bestimmten Aggregationszahl N_{AG} und des Korrelationskoeffizienten r_R für C₁₂TAB/1-Hexanol = 1:1 als Funktion der Wellenlänge. Die Symbole und Linien haben dieselbe Bedeutung wie in Abbildung 4.59.

525 und 560 nm sowie einen Mittelwert von 118 ± 29 nm. Die Abweichung von der Aggregationszahl aus Lichtstreumessungen ist damit deutlich größer als für die Anpassungen, die die ersten beiden Tensidkonzentrationen vernachlässigen.

Anhand der Abbildungen 4.61 bis 4.64 sollen verschiedene Fitgleichungen, nämlich die Gleichungen (a), (b), (c) und (d) aus Tabelle 4.7, sowie die Resultate bei Berücksichtigung oder Vernachlässigung der niedrigsten beiden Tensidkonzentrationen für die Anpassung verglichen werden. In allen Abbildungen zeigt sich, daß die Korrelationskoeffizienten meist deutlich über 0.9 liegen und daher die Fitqualität relativ gut ist.

Werden die Anpassungen mit allen Datenpunkten durchgeführt, so ergeben sich für Gleichung (b) und (c) fast identische Werte für die Extinktionskoeffizientendifferenz sowie die Gleichgewichtskonstante, wie in den Abbildung 4.61 und 4.62 zu sehen ist. Die Werte für die verschiedenen ST-Konzentrationen sind deshalb identisch, weil zur Anpassung mit den Gleichungen (b) und (c) alle Meßwerte zu einer Datenserie zusammengefaßt werden mußten, um den Fit erst zu ermöglichen.

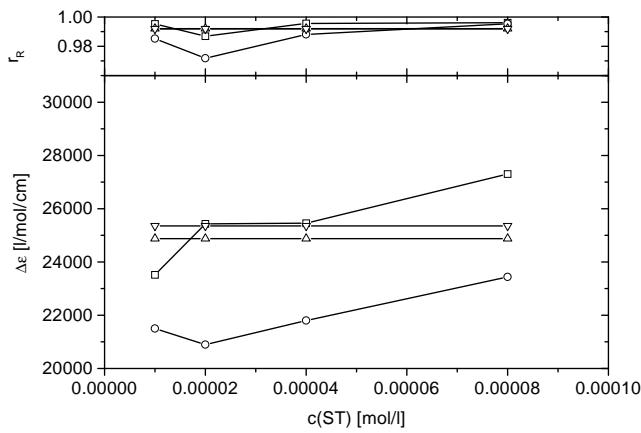


Abbildung 4.61: Auftragung der mit verschiedenen Gleichungen bestimmten Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta\epsilon$ und des Korrelationskoeffizienten r_R für $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol} = 1:1$ als Funktion der ST-Konzentration bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die Anpassungen wurden mit allen Datenpunkten durchgeführt. Als Symbole wurden verwendet: \square für die Anpassung nach Gleichung (a), \triangle für die Anpassung nach Gleichung (b), ∇ für die Anpassung nach Gleichung (c) und \circ für die Anpassung nach Gleichung (d).

Werden hingegen die Gleichungen (a) und (d) verwendet, so wird jede der vier Meßreihen konstanter ST-Konzentration einzeln angepaßt. Es ergeben sich deutliche Abhängigkeiten zwischen $\Delta\epsilon$ bzw. K_k und der ST-Konzentration. Die Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta\epsilon$ scheint mit steigender Farbstoffkonzentration zuzunehmen, während die Gleichgewichtskonstante K_k abnimmt. Die Ergebnisse für $2 \cdot 10^{-5}$ und $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ST, die man bei der Anpassung mit Gleichung (a) erhält, sind den Ergebnissen mit Gleichung (b) und (c) relativ ähnlich.

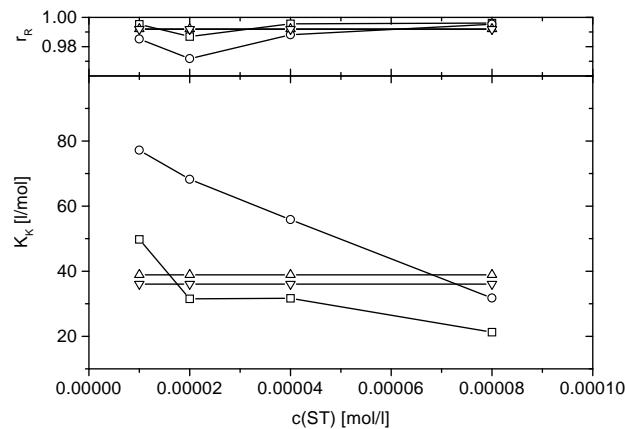


Abbildung 4.62: Auftragung der mit verschiedenen Gleichungen bestimmten Gleichgewichtskonstanten K_k und des Korrelationskoeffizienten r_R für $C_{12}TAB/1\text{-Hexanol} = 1:1$ als Funktion der ST-Konzentration bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die Anpassungen wurden mit allen Datenpunkten durchgeführt. Es wurden dieselben Symbole verwendet wie in Abbildung 4.61.

Ein etwas anderes Bild ergibt sich, wenn bei den Anpassungen die ersten beiden C₁₂-TAB-Konzentrationen vernachlässigt wurden. Betrachtet man die Abbildungen 4.63 und 4.64, so stellt man fest, daß die Extinktionskoeffizientendifferenzen und Gleichgewichtskonstanten, die man aus den Anpassungen der Meßdaten mit den Gleichungen (b) und (c) erhält, stärker voneinander abweichen als im Fall der Anpassung aller Meßpunkte. Auch hier gilt wieder, wie bereits weiter oben erwähnt wurde, daß für die Anpassungen mit den Gleichungen (b) und (c) alle Daten zu einer „Meßreihe“ zusammengefaßt wurden.

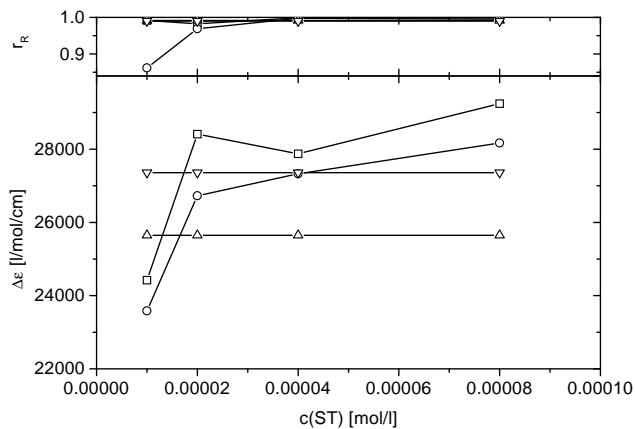


Abbildung 4.63: Auftragung der mit verschiedenen Gleichungen bestimmten Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta\epsilon$ und des Korrelationskoeffizienten r_R für C₁₂TAB/1-Hexanol = 1:1 als Funktion der ST-Konzentration bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die Anpassungen wurden ohne die ersten beiden Datenpunkte (Tensidkonzentrationen) durchgeführt. Es wurden dieselben Symbole verwendet wie in Abbildung 4.61.

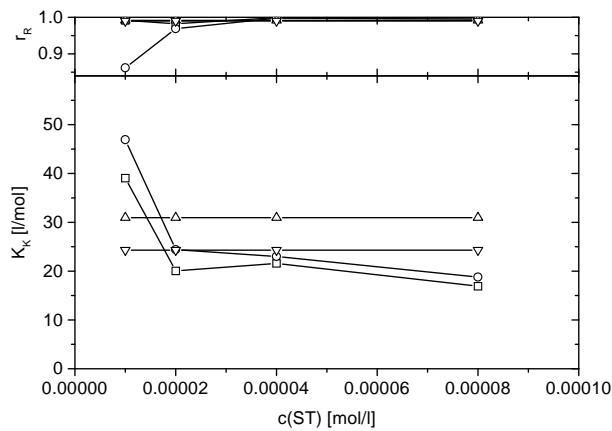


Abbildung 4.64: Auftragung der mit verschiedenen Gleichungen bestimmten Gleichgewichtskonstanten K_k und des Korrelationskoeffizienten r_R für C₁₂TAB/1-Hexanol = 1:1 als Funktion der ST-Konzentration bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die Anpassungen wurden ohne die ersten beiden Datenpunkte (Tensidkonzentrationen) durchgeführt. Es wurden dieselben Symbole verwendet wie in Abbildung 4.61.

4.4 Aktivität von HLADH in C_x TAB-haltigen und -freien Lösungen

4.4.1 Aktivität von HLADH in 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösungen

Zunächst soll geklärt werden, ob die Aktivität von HLADH in der Zeit nach der Herstellung der HLADH-Lösung abnimmt, was einer Denaturierung von HLADH entsprechen würde. In Abbildung 4.65 sind daher die Anfangsextinktionsänderung v sowie die Aktivität r von HLADH in Abhängigkeit von der Zeit, die von der Herstellung der HLADH-Lösung bis zum Beginn der Messung der Aktivität in 10^{-2} mol/l Ethanol/TES-Puffer-Lösungen verging, dargestellt. Wie man sieht, bewegt sich die Anfangsextinktionsänderung immer um den Mittelwert aller gemessenen Anfangsextinktionsänderungen, der als v_0 zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet wurde, herum. Gleiches gilt folglich auch für die Aktivität von HLADH. Im betrachteten Zeitraum von knapp vier Stunden nach der Herstellung der HLADH-Stammlösung kann deshalb nicht von einem (detektierbaren) Verlust der Enzymaktivität die Rede sein. Dies könnte sich vielleicht ändern, wenn man über längere Meßintervalle (z. B. einen Bereich von mehreren Tagen) hinweg die Enzymaktivität beobachten würde. In dieser Arbeit wurden Enzymlösungen nie länger als vier oder fünf Stunden verwendet.

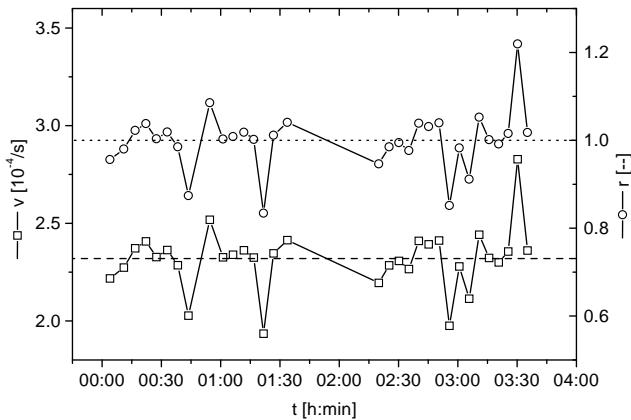


Abbildung 4.65: Auftragung der Anfangsextinktionsänderung v (□) bzw. der Aktivität r (○) von HLADH in 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösungen als Funktion der Zeit, die von der Herstellung der HLADH-Stammlösung bis zum Beginn der Messung der jeweiligen Ethanol-haltigen Probe verging. Die jeweiligen Mittelwerte sind als gestrichelte bzw. gepunktete Gerade eingezeichnet.

4.4.2 Aktivität von HLADH in 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösungen variieren der Ionenstärke

Die Ionenstärke kann, wie bereits in Abschnitt 2.2.2 erwähnt, einen deutlichen Einfluß auf die Enzymkonformation und damit die Aktivität haben. Daher wurden Messungen der Enzymaktivität in Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke durchgeführt. Die Ionenstärke wurde dadurch variiert, daß Lösungen in TES-Puffer mit 10^{-2} mol/l Ethanol und mit unterschiedlicher Natriumchloridkonzentration hergestellt wurden. Die Ionenstärke ist in Gleichung 2.16 (vgl. Abschnitt 2.1.3.2.3) definiert als $I = 1/2 \cdot \sum_{i=1}^n z_i^2 c_i$. Somit setzt sich die Ionenstärke zusammen aus der Ionenstärke des Puffers und der der reinen Salzlösung mit derselben Konzentration an Salz wie in der gepufferten Lösung. Die Ionenstärke des Puffers lässt sich mit Hilfe der Dissoziationskonstante von TES ($pK_a = 7.54$ laut Merck-Katalog), des Ionenprodukts von Wasser ($K_W = 10^{-14}$ (mol/l) 2), der Massen- und Ladungsbilanz bestimmen. Die Berechnung soll hier nicht explizit durchgeführt werden, sondern nur das Ergebnis angegeben werden. Für den hier verwendeten TES-Puffer mit $\text{pH} = 7.5$ und $c(\text{TES}) = 0.05 \text{ mol/l}$ ergibt sich eine Ionenstärke von 0.024 mol/l .

In Abbildung 4.66 ist die Aktivität von HLADH in 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösungen als Funktion der Natriumchloridkonzentration aufgetragen. Würde man die NaCl-Konzentration durch die Ionenstärke ersetzen, so würde das nur zu einer Verschiebung der Kurve auf der x-Achse führen, aber keine weiteren Veränderungen zur Folge haben. Deshalb wurde auf die Auftragung als Funktion der Ionenstärke verzichtet.

Wie man sieht, zeigt die Aktivität von HLADH zunächst einen kleinen Anstieg von 1 in NaCl-freier Lösung auf einen Wert von ca. 1.29 bei 0.1 mol/l NaCl. Mit steigender Salzkonzentration sinkt dann allmählich die HLADH-Aktivität bis auf 0.38 bei 2 mol/l NaCl.

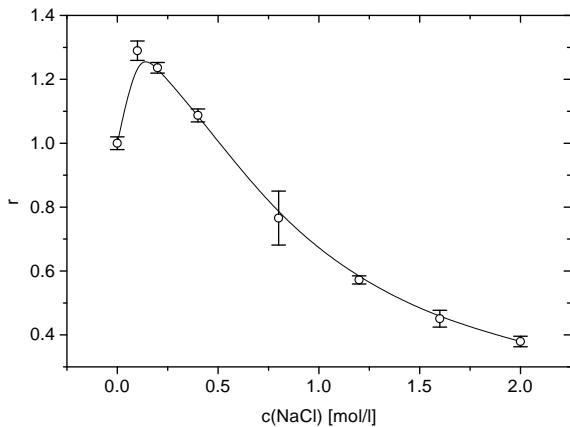


Abbildung 4.66: Auftragung der Aktivität r von HLADH in 10^{-2} mol/l Ethanol-Lösungen als Funktion der Natriumchloridkonzentration $c(\text{NaCl})$

4.4.3 Aktivität von HLADH in 1-Hexanol-Lösungen verschiedener Konzentration

In Abbildung 4.67 ist die Aktivität von HLADH in Abhängigkeit der 1-Hexanol-Konzentration von 1-Hexanol/TES-Puffer-Lösungen dargestellt.

Wie man sieht, steigt die Aktivität r von 0.49 bei $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l mit steigender 1-Hexanol-Konzentration an. Bei ca. $5 \cdot 10^{-4}$ bis $2.4 \cdot 10^{-3}$ mol/l erreicht die Aktivität von HLADH ein Maximum bzw. Plateau mit Werten um 0.76 bis 0.84. Bis zur Löslichkeitsgrenze bei etwa $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l, wo ein Wert von 0.69 erreicht wird, sinkt die Aktivität allmählich wieder ab.

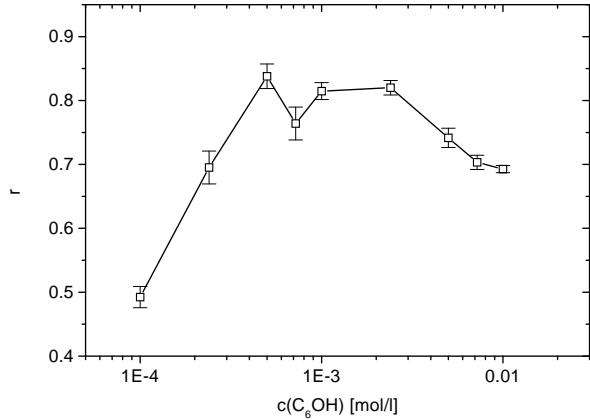


Abbildung 4.67: Auftragung der Aktivität r von HLADH in 1-Hexanol/TES-Puffer-Lösungen als Funktion der 1-Hexanol-Konzentration $c(C_6OH)$

4.4.4 Aktivität von HLADH in pseudobinären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer

Um Informationen über den Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen der Tenside vom C_x TAB-Typ auf HLADH zu erhalten, wurden Messungen der Enzymaktivität in C_x TAB-Lösungen ($x = 6, 8, 10, 12, 14$) in TES-Puffer mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol und steigender C_x TAB-Konzentration durchgeführt. Die Resultate der Auswertung sind in den Abbildungen 4.68 bis 4.72 dargestellt. Die Messungen wurden ungefähr bis in den Grenzbereich der Tensidkonzentration durchgeführt, wo gerade noch klare, einphasige, flüssige Lösungen vorliegen.

Es zeigt sich für alle fünf verwendeten Tenside, daß die Aktivität von HLADH bei niedriger Tensidkonzentration, deutlich unterhalb der jeweiligen CMC, in etwa der Aktivität in tensidfreier Lösung mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol, die bei etwa 0.81 liegt, entspricht.

Im Fall der C_6 TAB-haltigen Lösungen kommt es nach anfänglich konstanter Aktivität ab einer Tensidkonzentration von ungefähr 0.01 mol/l zunächst zu einem kleinen Anstieg der Aktivität bis zu einem Wert von 1.04 bei 0.06 mol/l (vgl. Abbildung 4.68). Danach fällt die Enzymaktivität ziemlich stark bis auf ungefähr 0.03 – also fast 0 – in 2.41 mol/l C_6 TAB-Lösung ab.

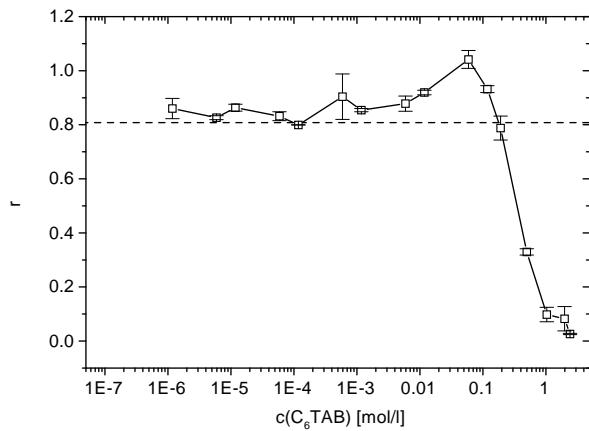


Abbildung 4.68: Auftragung der Aktivität r von HLADH als Funktion der C_6 TAB-Konzentration in pseudobinären Lösungen.

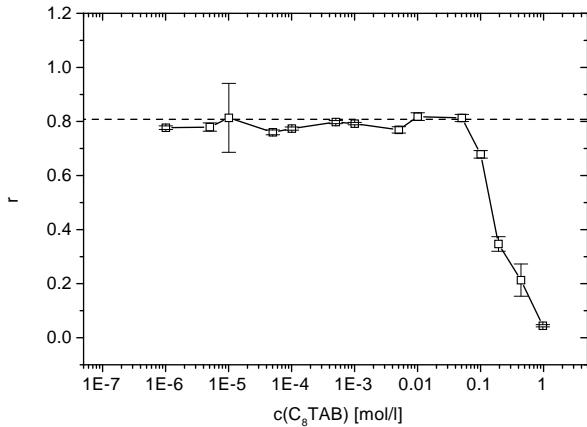


Abbildung 4.69: Auftragung der Aktivität r von HLADH als Funktion der $C_8\text{TAB}$ -Konzentration in pseudobinären Lösungen.

Betrachtet man hingegen die Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der $C_8\text{TAB}$ -Konzentration in Abbildung 4.69, so verläuft die Kurve etwas anders. Die Aktivität bleibt bis zu einer Tensidkonzentration von 0.05 mol/l in etwa auf dem Niveau tensidfreier Lösung mit $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ 1-Hexanol. Dann beginnt ein ziemlich starker Abfall bis auf eine Aktivität von $0.04 (\approx 0)$ in einer Lösung mit 0.98 mol/l $C_8\text{TAB}$.

Abbildung 4.70 zeigt die Abhängigkeit der Aktivität von HLADH in Lösungen mit einer 1-Hexanol-Konzentration von $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ und steigender $C_{10}\text{TAB}$ -Konzentration. Auch hier bleibt, wie bereits erwähnt, die Aktivität von HLADH zunächst die gleiche wie in tensidfreier 1-Hexanol-Lösung. Ab 0.01 mol/l $C_{10}\text{TAB}$ beginnt ein etwas flacheres Absinken der Aktivität als im Fall der $C_6\text{TAB}$ - oder $C_8\text{TAB}$ -haltigen Lösungen. Der Endwert liegt bei einer Aktivität von rund 0.18 in 0.84 mol/l $C_{10}\text{TAB}$.

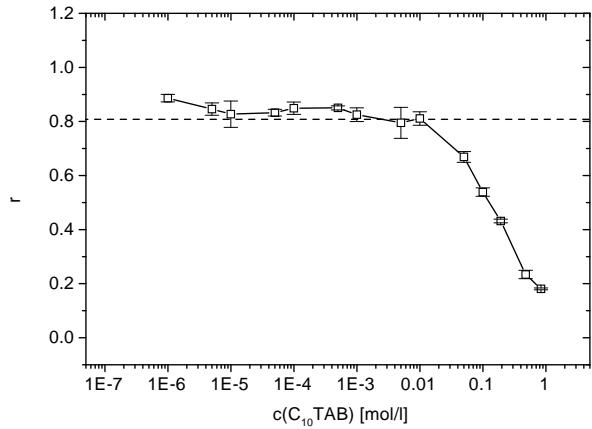


Abbildung 4.70: Auftragung der Aktivität r von HLADH als Funktion der C_{10} TAB-Konzentration in pseudobinären Lösungen.

Als nächstes gilt es, den Verlauf der HLADH-Aktivität mit steigender C_{12} TAB-Konzentration, der in Abbildung 4.71 dargestellt ist, zu erläutern. Es ergibt sich eine leichte Einbuchtung der Kurve der Enzymaktivität ab einem Wert von $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l C_{12} TAB bis zu etwa 0.05 mol/l. Die Aktivität ist mit ungefähr 0.67 - 0.64 deutlich geringer als die Aktivität von rund 0.81 in der tensidfreien bzw. -armen Lösung. Bei 0.05 mol/l C_{12} TAB wird mit 0.79 noch einmal ungefähr der Wert der tensidfreien Lösung erreicht. Danach kommt es wieder zu einem Absinken der HLADH-Aktivität bis auf 0.35 in 0.49 mol/l C_{12} TAB-Lösung. Im Fall der C_{14} TAB-haltigen Lösungen mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol kommt es ebenfalls zu einer Art Einbuchtung, die aber bereits ab ca. $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l C_{14} TAB beginnt. Das Minimum dieser Einbuchtung liegt mit einer Aktivität von 0.47 ungefähr bei einer Tensidkonzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$. Danach kommt es zu einem Anstieg bis auf etwa 0.76, also in etwa die Aktivität in tensidfreier Lösung, bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l C_{14} TAB. Anschließend fällt die Enzymaktivität bis auf einen Wert von 0.5 in 0.45 mol/l C_{14} TAB-Lösung.

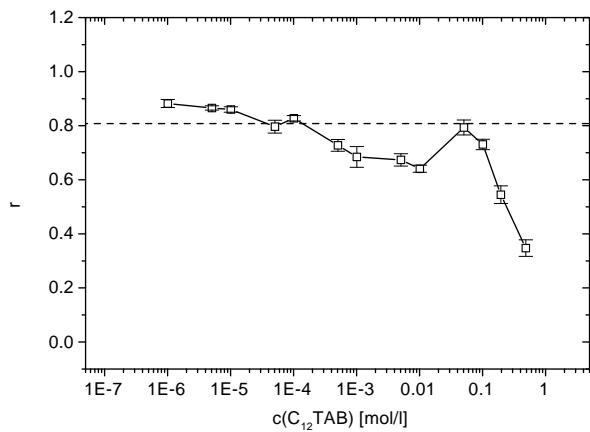


Abbildung 4.71: Auftragung der Aktivität r von HLADH als Funktion der $C_{12}\text{TAB}$ -Konzentration in pseudobinären Lösungen.

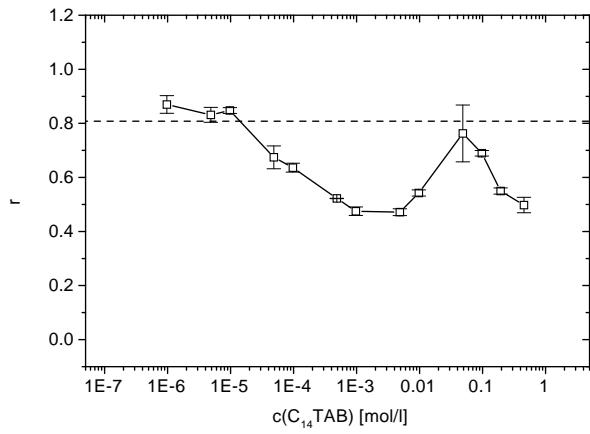


Abbildung 4.72: Auftragung der Aktivität r von HLADH als Funktion der $C_{14}\text{TAB}$ -Konzentration in pseudobinären Lösungen.

4.4.5 Aktivität von HLADH in ternären Lösungen mit C_{12} TAB/1-Heanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlenverhältnissen C_{12} TAB/1-Hexanol

In ternären Lösungen C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlenverhältnissen C_{12} TAB/1-Hexanol von 8:1, 4:1 2:1 und 1:1 wurde die Aktivität von HLADH bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.73 bis 4.75 – auch im Vergleich mit tensidfreien Lösungen 1-Hexanol/TES-Puffer – dargestellt.

Zunächst zu Abbildung 4.73. Sie zeigt die Aktivität von HLADH als Funktion der C_{12} TAB-Konzentration für die Molzahlenverhältnisse 8:1 bis 1:1. Es zeigt sich, daß die Kurvenverläufe für alle vier verschiedenen Molzahlenverhältnisse relativ ähnlich sind. Zunächst kommt es zu einem Anstieg der Enzymaktivität, dann ergibt sich ein Maximum – oder besser ein Plateau – und schließlich fällt die Aktivität wieder ab.

Die Anfangsaktivität für 0.02 mol/l C_{12} TAB steigt von C_{12} TAB/1-Hexanol = 8:1 bis 1:1 leicht an: für ein Molzahlenverhältnis von 8:1 beträgt sie 0.49, für 4:1 0.54, für 2:1 0.60 und für 1:1 0.66. Das Plateau liegt im Falle von C_{12} TAB/1-Hexanol = 8:1 bei 0.08 bis 0.18 mol/l C_{12} TAB mit Aktivitätswerten zwischen 0.70 und 0.76. Für C_{12} TAB/1-Hexanol = 4:1 findet man ein Maximum bei Tensidkonzentrationen um 0.06 bis 0.16 mol/l sowie Aktivitäten r von 0.72 bis 0.80. Die Lage des Plateaus kann man für ein Molzahlenverhältnis C_{12} TAB/1-Hexanol von 2:1 zwischen 0.06 und 0.16 mol/l C_{12} TAB sowie HLADH-Aktivitäten zwi-

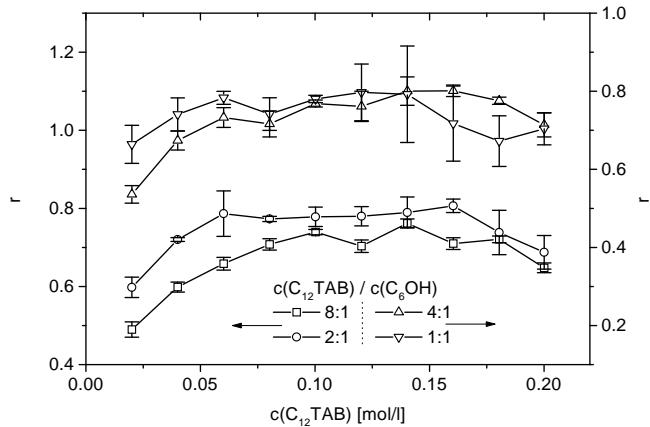


Abbildung 4.73: Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der C_{12} TAB-Konzentration in ternären Lösungen C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlenverhältnissen C_{12} TAB/1-Hexanol. Die Kurven für C_{12} TAB/1-Hexanol = 8:1 und 2:1 bzw. 4:1 und 1:1 wurden jeweils mit verschiedenen y-Achsen aufgetragen, um die Grafik etwas übersichtlicher zu gestalten. Die Zuweisungen zur jeweiligen Achse sind in der Legende angegeben.

schen 0.77 und 0.81 angeben.

Beträgt $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol} = 1:1$, so erhält man für den Plateaubereich Tensidkonzentrationen zwischen 0.06 und 0.14 mol/l und Enzymaktivitäten zwischen 0.74 und 0.80. Am „oberen“ Ende des Plateaus kommt es zu einem leichten Minimum der Aktivität bei 0.18 mol/l $C_{12}\text{TAB}$ mit einem Wert von 0.67, bevor die Aktivität wieder auf 0.70 bei 0.20 mol/l $C_{12}\text{TAB}$ ansteigt. Im Rahmen der in Abbildung 4.73 angegebenen Meßfehler kann dieses Minimum auch nur durch die natürliche Schwankung der Enzymaktivität bedingt sein.

Abbildung 4.74 zeigt die Aktivität von HLADH in Abhängigkeit der 1-Hexanol-Konzentration in den ternären Lösungen mit Molzahlenverhältnissen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ von 8:1, 4:1 2:1 und 1:1. Der Kurvenverlauf bleibt der gleiche wie bereits für Abbildung 4.73 erläutert. Jedoch verschieben sich die Kurven zueinander auf der x-Achse, was dadurch zu erklären ist, daß ja die 1-Hexanol-Konzentration bei verschiedenen Molzahlenverhältnissen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ und gleicher Tensidkonzentration nicht identisch sein kann. Beispielsweise enthält eine Lösung mit 0.10 mol/l $C_{12}\text{TAB}$ für $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol} = 8:1$ 0.0125 mol/l 1-Hexanol, für 4:1 0.025 mol/l, für 2:1 0.05 mol/l und für 1:1 0.10 mol/l.

In Abbildung 4.75 sind die Aktivitäten von HLADH für tensidfreie Lösungen mit 1-Hexanol/TES-Puffer sowie Molzahlenverhältnisse $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ von 8:1 und 1:1 dargestellt. Wie man sieht, ist der Kurvenverlauf für tensidfreie und tensidhaltige Lösungen ähnlich, allerdings liegen Anstieg, Plateau und Abfall der Aktivität im Fall reiner 1-Hexanol-Lösungen bei deutlich niedrigen 1-Hexanol-Konzentrationen als im Fall der tensidhaltigen Lösungen.

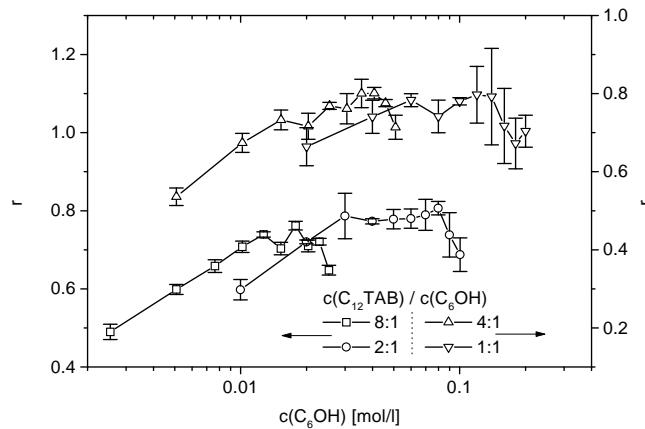


Abbildung 4.74: Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der 1-Hexanol-Konzentration in ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}/\text{TES-Puffer}$ bei konstanten Molzahlenverhältnissen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$. Die Kurven für $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol} = 8:1$ und 2:1 bzw. 4:1 und 1:1 wurden jeweils – analog zu Abbildung 4.73 mit verschiedenen y-Achsen aufgetragen.

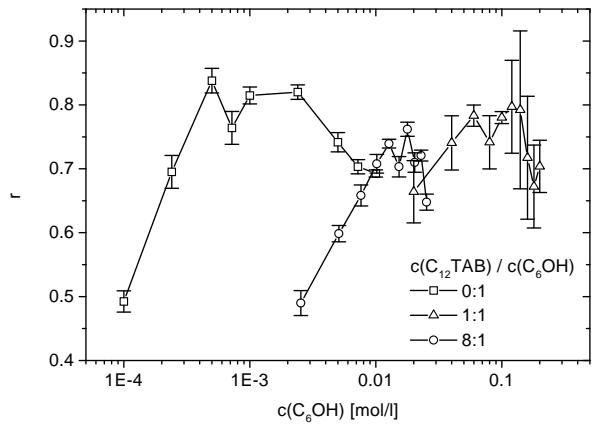


Abbildung 4.75: Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der 1-Hexanol-Konzentration in ternären Lösungen C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlenverhältnissen C_{12} TAB/1-Hexanol. Es wurden die Kurven für tensidfreie Lösungen mit 1-Hexanol/TES-Puffer (0:1) sowie C_{12} TAB/1-Hexanol = 8:1 und 1:1 eingezeichnet.

4.4.6 Aktivität von HLADH in Mischungen mit hoher 1-Hexanol- und mittlerer C₁₂TAB-Konzentration

Um feststellen zu können, ob HLADH auch in Mischungen mit hoher 1-Hexanol- und mittlerer C₁₂TAB-Konzentration aktiv ist, wurden Messungen an den in Abschnitt 3.2.3.4 erläuterten Reaktionsmischungen durchgeführt.

Als Beispiel für die Änderung der Spektren im Bereich um 340 nm sind in Abbildung 4.76 die Spektren der Reaktionsmischung (d) mit C₆TAB nach $(i-1)*10$ min mit $i = 1, 3, 5$ und 7 dargestellt. Wie man sieht, steigt die Extinktion des Maximums mit steigender Zeit an, während die Kurven ab ca. 380 nm und höher bzw. unterhalb von 300 nm mehr oder weniger deckungsgleich sind. Dies bedeutet, daß aus NAD⁺ merklich NADH entsteht, das ja Licht bei rund 340 nm absorbiert, wie in Abbildung 3.2 in Abschnitt 3.1.2 zu sehen ist, während NAD⁺ bei dieser Wellenlänge nicht absorbiert.

Bei Betrachtung von Abbildung 4.77, in dem zwei UV/Vis-Spektren der Reaktionsmischung (1) mit Ethanol nach $(i-1)*10$ min mit $i = 1$ und 7 zu finden sind, so stellt man fest, daß die beiden Spektren deckungsgleich sind. Dies gilt auch für die restlichen fünf Spektren mit $i = 2$ bis 4 , die nicht mit abgebildet sind. Daraus läßt sich schließen, daß im Beobachtungszeitraum kein neues NADH mehr gebildet wurde, weil ja sonst eine Zunahme der Extinktion im Bereich von 340 nm zu sehen sein müßte.

In den Abbildungen 4.78 bis 4.82 ist die Extinktion der unterschiedlichen Reaktionsmischungen für die verschiedenen C_xTAB-Tenside ($x = 6, 8, 10, 12$, und 14) in Abhängigkeit von der Meßzeit aufgetragen.

Sinkt die Extinktion im Bereich kleiner Meßzeiten, so bedeutet dies nicht etwa, daß bereits

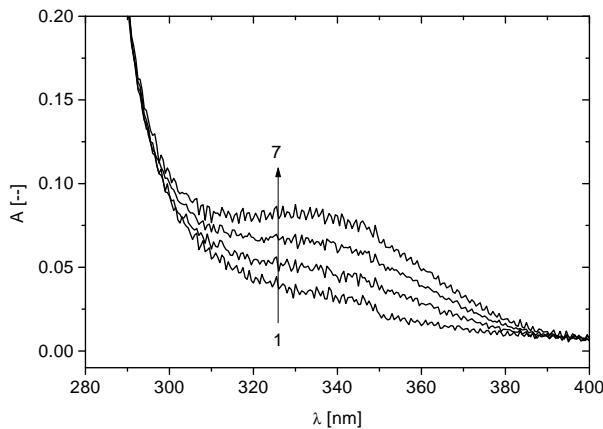


Abbildung 4.76: UV/Vis-Spektren der Reaktionsmischung (d) mit C₆TAB nach $(i-1)*10$ min mit $i = 1, 3, 5$ und 7 . Die Reihenfolge ist durch den in die Graphik eingezeichneten Pfeil angegeben.

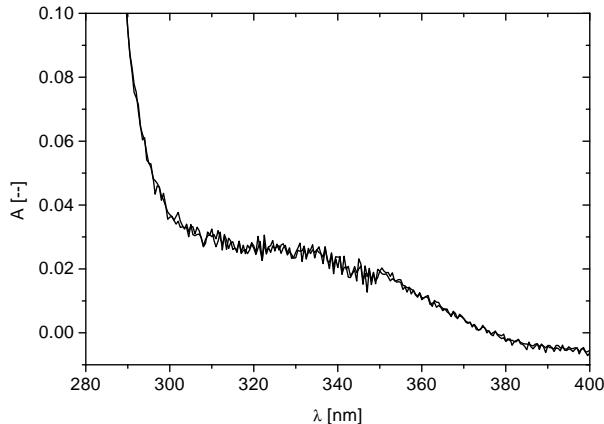


Abbildung 4.77: UV/Vis-Spektren der Reaktionsmischung (1) mit Ethanol nach $(i-1)*10$ min mit $i = 1$ und 7. Eine Kennzeichnung der Spektren ist nicht nötig, da sie im Rahmen des Grundrauschens der Messung deckungsgleich sind.

gebildetes NADH wieder zu NAD^+ oxidiert wird, sondern daß die Reaktionsmischung zum Zeitpunkt des Starts der Messung trüb war und erst im Laufe der Zeit wieder klar wurde. Dies war der Fall für folgende Reaktionsmischungen: (a) mit C_6TAB , (a) mit C_8TAB , (a) mit C_{10}TAB , (a) und (d) mit C_{12}TAB sowie (a), (c) und (d) mit C_{14}TAB . Da die Trübung der Reaktionsmischung (d) mit C_{14}TAB nach Ende der Messung immer noch bestand, wurde auf eine Auftragung der zugehörigen Kurve in Abbildung 4.82 verzichtet.

Daß die Anfangsextinktionen der unterschiedlichen Reaktionsmischungen einer Meßreihe unterschiedlich sind, liegt zum einen an dem bereits genannten Phänomen der Trübung, zum anderen aber auch daran, daß die verwendeten 10-mm-Küvetten für Probe und Referenz nicht immer identisch waren. Entscheidend ist folglich nicht der absolute Wert der Extinktion, sondern die Änderung der Extinktion im Laufe der Zeit. Aus diesem Grund sind in Tabelle 4.8 als Ergänzung die Extinktionsänderungen für die verschiedenen Reaktionsmischungen angegeben. Bei der Beurteilung der Werte sollte aber beachtet werden, daß das „Rauschen“ der Extinktion bei 340 nm bereits in der Größenordnung ± 0.002 liegt.

In Abbildung 4.78 zeigt sich, daß für die C_6TAB -haltigen Reaktionsmischungen (a) die Extinktion nicht oder nur ganz minimal ansteigt. Für die Mischung (b) ist der Anstieg der Extinktion im Laufe der Zeit mit 0.009 (vgl. Tabelle 4.8) nur minimal, aber doch erkennbar. Die Reaktionsmischungen (c) und (d) zeigen hingegen einen deutlichen Anstieg der Extinktion von 0.034 bzw. 0.049 vom Zeitpunkt 0 min bis zum Zeitpunkt 60 min.

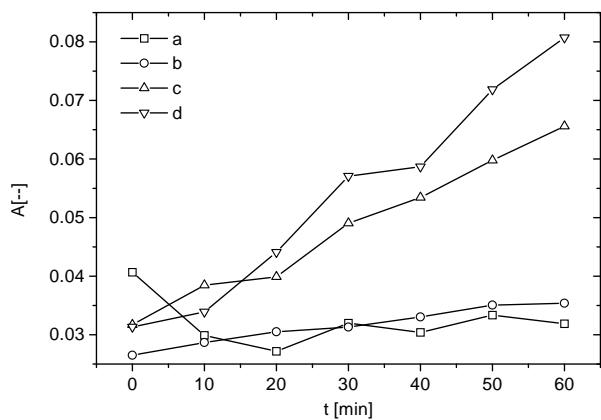


Abbildung 4.78: Extinktion bei 340 nm als Funktion der Meßzeit für verschiedene Reaktionsmischungen mit C_6TAB

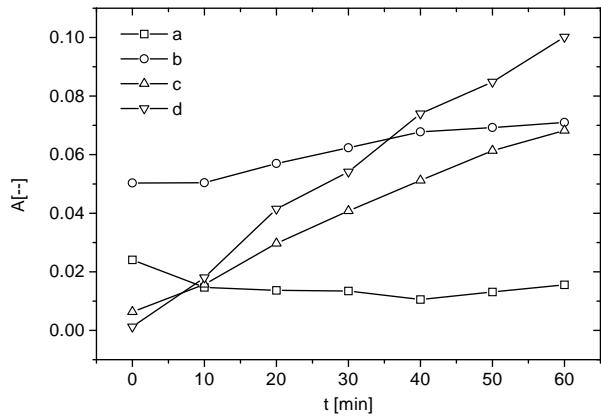


Abbildung 4.79: Extinktion bei 340 nm als Funktion der Meßzeit für verschiedene Reaktionsmischungen mit C_8TAB

Tabelle 4.8: Änderung der Extinktion verschiedener Reaktionsmischungen mit C_x TAB zwischen Meßbeginn und -ende. Die Zahlen in Klammern geben an, welche Extinktionswerte voneinander abgezogen wurden. (2) bedeutet $A(60 \text{ min}) - A(10 \text{ min})$, (3) $A(60 \text{ min}) - A(20 \text{ min})$. Wenn keine Zahl in Klammern angegeben ist, wurde $A(60 \text{ min}) - A(0 \text{ min})$ verwendet.

x	a	b	c	d
6	0.002 (3)	0.009	0.034	0.049
8	0.001 (2)	0.021	0.062	0.082
10	0.003 (2)	0.045	0.158	0.219
12	0.008 (2)	0.105	0.222	0.142 (2)
14	0.012 (2)	0.093	0.120 (2)	—

Die C_8 TAB-haltigen Reaktionsmischungen, deren Extinktionen als Funktion der Meßzeit in Abbildung 4.79 dargestellt sind, zeigen ein ähnliches Verhalten wie die C_6 TAB-haltigen Reaktionsmischungen. Für die Reaktionsmischung (a) erkennt man keinen deutlichen Anstieg der Extinktion im Laufe der Meßzeit. Die Extinktion steigt für die Mischung (b) leicht an. Es ergibt sich ein Extinktionsunterschied von 0.021, wie in Tabelle 4.8 angegeben, zwischen der Extinktion zu Beginn und am Ende der Meßzeit. Die Extinktionskurven der Reaktionsmischungen (c) und (d) steigen deutlich an, wobei sich für Mischung (c) ein Extinktionsunterschied von 0.062, für Mischung (d) von 0.082 ergibt.

In Abbildung 4.80 findet man die Extinktionen der C_{10} TAB-haltigen Reaktionsmischungen als Funktion der Meßzeit aufgetragen. Es zeigt sich erneut, daß die Extinktion der Reaktionsmischung (a) mehr oder weniger konstant bleibt, während die der Mischung (b) leicht ansteigt und sich ein Extinktionsunterschied von 0.045 ergibt. Die Extinktionen der Mischungen (c) und (d) steigen hingegen relativ stark an: zwischen 0 min und 60 min ändert sich die Extinktion um 0.158 bzw. 0.219.

Die Änderung der Extinktion für C_{12} TAB-haltige Reaktionsmischungen ist in Abbildung 4.81 dargestellt. Wie man sieht, bleibt die Extinktion für Mischung (a) relativ konstant, es kommt nur zu einem leichten Anstieg von 0.008. Dagegen ändert sich die Extinktion von Mischung (b) während des Meßzeitraums deutlich, nämlich um 0.105. Die Reaktionsmischungen (c) und (d) zeigen ebenfalls eine deutliche Extinktionsänderung. Für Mischung (c) beträgt die Extinktionsänderung zwischen 0 und 60 min 0.222, für Mischung (d) zwischen 10 und 60 min 0.142.

Die Extinktionsänderung der C_{14} TAB-haltigen Reaktionsmischung (a) ist nur ganz minimal, sie beträgt 0.0012 im Bereich von 10 bis 60 min, wie in Abbildung 4.81 und in Tabelle 4.8 zu sehen ist. Hingegen gibt es einen deutlichen Anstieg der Extinktion für die Mischungen (b) und (c), nämlich 0.093 bzw. 0.120 zwischen 0 bzw. 10 und 60 min.

Auf eine Auftragung der Extinktionsänderungen in Ethanol-haltigen Lösungen wurde verzichtet, da bereits anhand von Abbildung 4.77 gezeigt wurde, daß es kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Kurven gab.

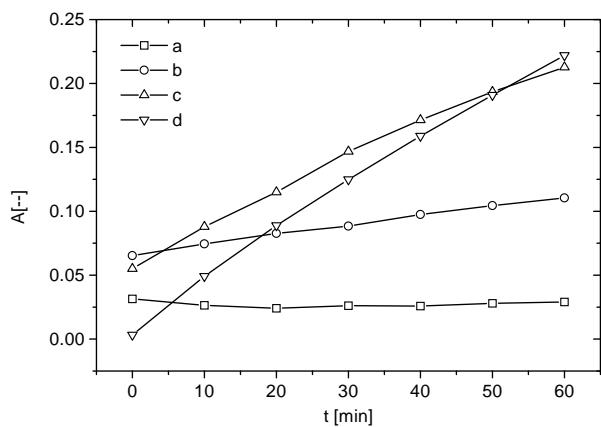


Abbildung 4.80: Extinktion bei 340 nm als Funktion der Meßzeit für verschiedene Reaktionsmischungen mit C_{10} TAB

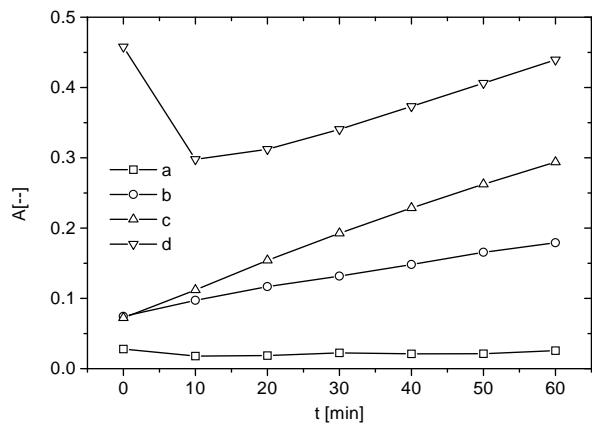


Abbildung 4.81: Extinktion bei 340 nm als Funktion der Meßzeit für verschiedene Reaktionsmischungen mit C_{12} TAB

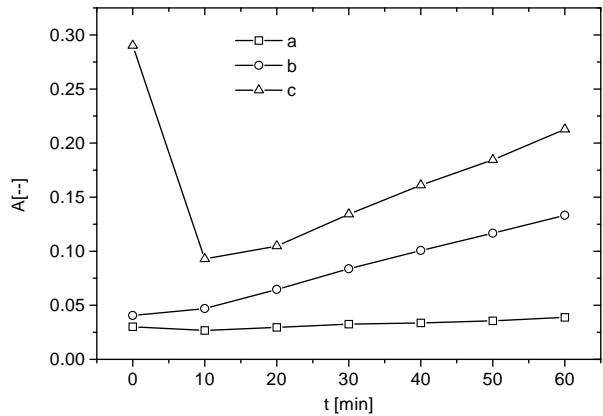


Abbildung 4.82: Extinktion bei 340 nm als Funktion der Meßzeit für verschiedene Reaktionsmischungen mit C_{14} TAB

4.5 Ergebnisse der Wiederholung und Erweiterung der Enzymtests aus der Diplomarbeit – Aktivität von HLADH in verschiedenen ternären Lösungen mit $C_{12}E_{23}$ /Alkohol/Glycin-Puffer

Zunächst sollen, um eine Idee des Phasenverhaltens der ternären Systeme $C_{12}E_{23}$ /Alkohol/Wasser zu gewinnen, in den Abbildung 4.83 und 4.84 vier ausgewählte Phasendiagramme dargestellt werden. Die schwarzen Gebiete entsprechen Bereichen mit einphasigen, isotypen, niedrigviskosen und thermodynamisch stabilen Lösungen. Da die Experimente mit Lösungen in diesen einphasigen Bereichen stattfanden, werden die weißen Flächen, die anderen Phasen entsprechen, nicht näher beschrieben.

Es wurden die Phasendiagramme mit Ethanol, 1-Butanol, 1-Hexanol und 1-Nonanol ausgewählt, da Ethanol und 1-Propanol sich relativ ähnlich verhalten, ebenso 1-Pentanol, 1-Hexanol und 1-Heptanol sowie 1-Oktanol, 1-Nonanol und 1-Dekanol (vgl. [93] und [38]).

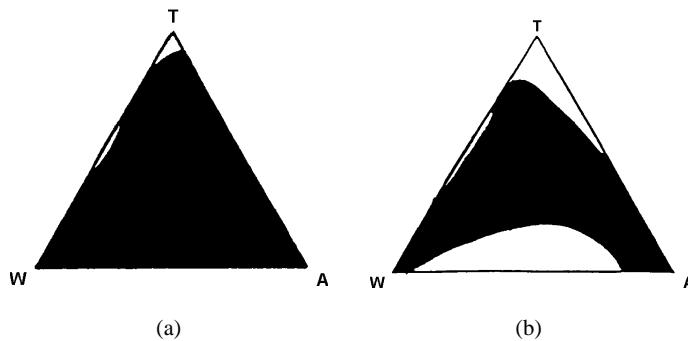


Abbildung 4.83: Phasendiagramme ausgewählter ternärer Systeme $C_{12}E_{23}$ /Alkohol/Wasser aus [93] bzw. [38]. Teilbild 4.83(a) zeigt das Phasendiagramm für das System mit Ethanol, 4.83(b) für das System mit 1-Butanol. A bedeutet Alkohol, T Tensid und W Wasser.

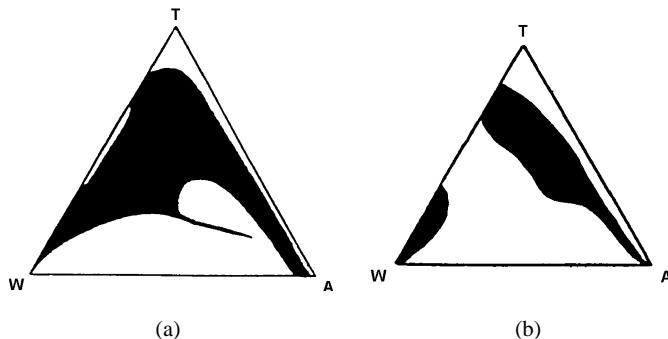


Abbildung 4.84: Phasendiagramme ausgewählter ternärer Systeme $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /Alkohol/Wasser aus [93] bzw. [38]. Teilbild 4.84(a) zeigt das Phasendiagramm für das System mit 1-Heptanol und 4.84(b) für das System mit 1-Nonanol. A bedeutet Alkohol, T Tensid und W Wasser.

4.5.1 Aktivität von HLADH in binären Systemen Alkohol/Glycin-Puffer ohne Tensid

In verschiedenen binären Lösungen mit Alkohol/Glycin-Puffer wurde die Aktivität r von HLADH bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.85 bis 4.87 dargestellt. Da 1-Nonanol und 1-Dekanol kaum wasserlöslich sind, wurde auf die Untersuchung tensidfreier Systeme verzichtet.

Es zeigte sich, daß die Aktivitäten für HLADH aus Lot A und B für dieselben Systeme sich deutlich unterscheiden, wie z. B. in Abbildung 4.85 für Ethanol und in Abbildung 4.86 für 1-Pentanol zu sehen ist. Die Form der Kurven und die Lage des Maximums blieben jedoch ungefähr gleich.

Für die Alkohole von Ethanol bis 1-Heptanol lagen die maximalen Enzymaktivitäten r_{\max} in binären Lösungen zwischen 1.2 und 1.6 – ohne erkennbaren Trend. Die Alkoholkonzentration c_{\max} am Maximum sanken jedoch von ungefähr $1 \cdot 10^{-4}$ mol/g für Ethanol bis ungefähr $1 \cdot 10^{-6}$ mol/g für 1-Heptanol. Genauere Angaben sind in Abschnitt 4.5.2 in den Tabellen 4.9 bis 4.19 zu finden.

Die höchsten Aktivitäten wurden für die Diol-Systeme gefunden. Bei 1,5-Pentandiol lag das Aktivitätsmaximum bei $c_{\max} \approx 2 \cdot 10^{-4}$ mol/g und $r_{\max} \approx 1.85$ (vgl. Tabelle 4.18), bei 1,7-Heptandiol bei $c_{\max} \approx 3 \cdot 10^{-6}$ mol/g und $r_{\max} \approx 1.54$ (vgl. Tabelle 4.19).

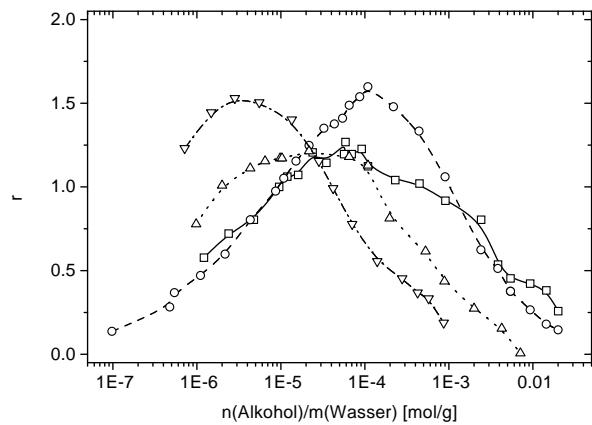


Abbildung 4.85: Aktivität von HLADH in binären Systemen ohne Tensid: Systeme mit Ethanol (\square , HLADH Lot A, und \circ , Lot B), 1-Propanol (\triangle , Lot B) und 1-Butanol (∇ , Lot B). Die Punkte sind zur besseren Orientierung durch Splines verbunden.

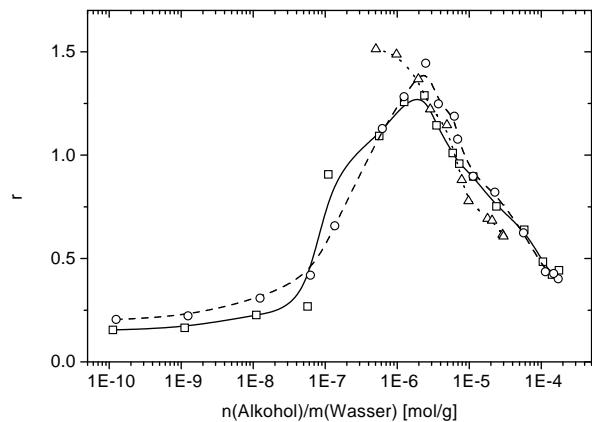


Abbildung 4.86: Aktivität von HLADH in binären Systemen ohne Tensol: Systeme mit 1-Pentanol (\square , Lot A von HLADH, und \circ , Lot B) und 1-Hexanol (\triangle , Lot B).

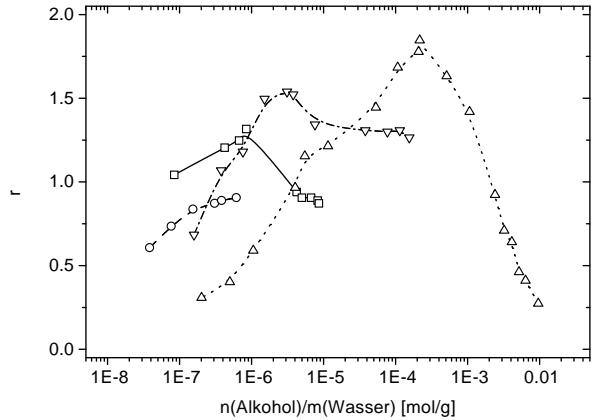


Abbildung 4.87: Aktivität von HLADH in binären Systemen ohne Tensid: Systeme mit 1-Heptanol (□), 1-Oktanol (○), 1,5-Pentandiol(△) und 1,7-Heptandiol (▽). In allen vier Fällen wurde Lot B von HLADH eingesetzt.

4.5.2 Aktivität von HLADH in ternären Systemen $C_{12}E_{23}$ /Alkohol/Glycin-Puffer

In den Tabellen 4.9 bis 4.19 sowie den Abbildungen 4.88 bis 4.99 sind die Ergebnisse für die verschiedenen ternären $C_{12}E_{23}$ /Alkohol/Wasser-Systeme dargestellt. Die Maxima wurden graphisch, die Verteilungskoeffizienten aus der Lage der Maxima bestimmt. Dazu wurde Gleichung 2.18 aus Abschnitt 2.1.3.4 unter der Annahme umgeformt, daß gilt:

$$c_{\text{mic}} = c_{\text{max}} - c_{\text{eff}} = c_{\text{max}} - c_{\text{max},o} \quad (4.3)$$

wobei c_{max} die Alkoholkonzentration am Maximum der HLADH-Aktivität bei einer bestimmten Tensidkonzentration ist, c_{eff} die tatsächliche Alkoholkonzentration in der wäßrigen Pseudophase und $c_{\text{max},o}$ die Alkoholkonzentration am Maximum der HLADH-Aktivität in tensidfreier Lösung.

Damit ergibt sich für den Verteilungskoeffizienten

$$p = \frac{c_{\text{max}} - c_{\text{max},o}}{c_{\text{max}}} \quad (4.4)$$

Für Ethanol bleibt die Lage der Maxima im Rahmen der Schwankungen der Aktivität von HLADH für die Lösungen mit 0, 1, 8 und 22 Gew% $C_{12}E_{23}$ in etwa gleich, wie in Tabelle 4.9 und in den Abbildungen 4.88 und 4.89 zu sehen ist. Dies führt zu einem Verteilungskoeffizienten von 0 in den tensidhaltigen Lösungen. Man erkennt wieder, daß HLADH aus unterschiedlichen Lots etwas unterschiedliche Kurvenverläufe zur Folge hat, was die Höhe der Enzymaktivität betrifft. Die Lage der Maxima bleibt aber ungefähr gleich.

Für 1-Propanol ergibt sich ein ähnliches Bild. In Tabelle 4.11 und Abbildung 4.90 zeigt sich, daß c_{max} für 0, 1 und 22 Gew% Tensid gleich bleibt und damit p ebenfalls 0 ist.

Deutliche Unterschiede zeigen sich für die ternären Systeme mit 1-Butanol, die in Tabelle 4.11 und Abbildung 4.90 dargestellt sind. Die Lage des Maximums verschiebt sich mit steigendem Tensidgehalt von $2 \cdot 10^{-6}$ zu $2 \cdot 10^{-5}$ mol/g 1-Butanol, d. h. zu höheren Alkoholgehalten. Eine Ausnahme bildet das System mit 8 Gew% $C_{12}E_{23}$, das mit $4 \cdot 10^{-6}$ mol/g einen niedrigeren Wert für c_{max} besitzt als das System mit 8 Gew% $C_{12}E_{23}$ und $c_{\text{max}} = 7 \cdot 10^{-6}$. Dies mag aber in der Schwankung der Aktivität von HLADH begründet liegen. Die Verteilungskoeffizienten zeigen dasselbe Verhalten: 0.71, 0.5 und 0.9 in den Systemen mit 1, 8 und 22 Gew% Tensid.

Im Fall von 1-Pentanol erhöht sich c_{max} mit steigendem $C_{12}E_{23}$ -Gehalt, wie in Tabelle 4.10 und den Abbildungen 4.92 und 4.92 zu erkennen ist. Es ergibt sich ein Wert von $2 \cdot 10^{-6}$ mol/g für 0 Gew% und ein Wert von $7 \cdot 10^{-6}$ für 22 Gew% $C_{12}E_{23}$ für die 1-Pentanol-Konzentration am Maximum der HLADH-Aktivität. Das Maximum im System mit 1 Gew% $C_{12}E_{23}$ stellt mit $c_{\text{max}} = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/g, d. h. niedriger als im System mit 0 Gew% $C_{12}E_{23}$ mit $2 \cdot 10^{-6}$ mol/g, eine Ausnahme dar, die vermutlich in Aktivitätsschwankungen begründet liegt. Für 8 Gew% $C_{12}E_{23}$ ergibt sich ein Verteilungskoeffizient von 0.5, für 22 Gew% 0.71, d. h. eine ähnliche Tendenz wie in den ternären Systemen mit 1-Butanol.

In den Systemen mit 1-Hexanol steigt sich c_{max} um fast zwei Zehnerpotenzen: in tensidfreien Lösungen findet sich ein Wert von $5 \cdot 10^{-7}$ mol/g, in Systemen mit 22 Gew% Tensid ein Wert von $3 \cdot 10^{-5}$. Man erhält für 1-Hexanol Verteilungskoeffizienten von 0.75, 0.9 und 0.98 in Mischungen mit 1, 8 und 22 Gew% $C_{12}E_{23}$. Die Ergebnisse für die ternären Systeme mit 1-Hexanol sind in Tabelle 4.13 und Abbildung 4.94 dargestellt.

1-Heptanol-haltige ternäre Systeme zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Systeme mit 1-Butanol, 1-Pentanol oder 1-Hexanol: das Maximum der HLADH-Aktivität verschiebt sich von $8 \cdot 10^{-7}$ mol/g bei 0 Gew% Tensid zu $3 \cdot 10^{-5}$ mol/g bei 22 Gew%, wie in Tabelle 4.14 und Abbildung 4.95 zu sehen ist. Daß c_{\max} für Systeme mit 0 und 1 Gew% C₁₂E₂₃ fast identisch ist, mag an den Schwankungen der Enzymaktivität liegen. Es finden sich Verteilungskoeffizienten von 0.2, 0.8 und 0.97 für 1, 8 und 22 Gew% C₁₂E₂₃.

Für 1-Oktanol läßt sich c_{\max} in tensidfreien Systemen mehr schlecht als recht bestimmen, da das Maximum sehr nahe an der Löslichkeitsgrenze des Alkohols liegt. Man erhält einen Wert von ca. $6 \cdot 10^{-7}$ mol/g. c_{\max} erhöht sich mit steigendem Tensidgehalt und erreicht in Lösungen mit 22 Gew% C₁₂E₂₃ mit $1 \cdot 10^{-4}$ mol/g mehr als das Hundertfache des Werts in tensidfreien Systemen. Für 8 Gew% C₁₂E₂₃ erhält man einen Verteilungskoeffizienten von 0.93, für 22 Gew% von 0.99. Die Ergebnisse für 1-Oktanol-haltige Systeme sind in Tabelle 4.15 und Abbildung 4.96 dargestellt.

Für 1-Nonanol und 1-Dekanol wurden, wie bereits erwähnt, keine Messungen in tensidfreier Lösung durchgeführt. Deshalb können für diese beiden Alkohole keine Verteilungskoeffizienten bestimmt werden. Es läßt sich aber in den Tabellen 4.16 und 4.17 sowie in Abbildung 4.97 feststellen, daß für beide Alkohole die Maxima bei 8 Gew% C₁₂E₂₃ bei einer niedrigeren Konzentration liegen als bei 22 Gew% C₁₂E₂₃. Es zeigt sich also die gleiche Tendenz wie für die anderen Alkohole ab 1-Butanol.

Jetzt bleiben nur noch die beiden diolhaltigen Systeme zur Erläuterung übrig.

Die Ergebnisse der Messungen an ternären Systemen mit 1,5-Pentandiol sind in Tabelle 4.18 sowie in Abbildung 4.98 zu finden. Es zeigt sich, daß c_{\max} mit $2 \cdot 10^{-4}$ mol/g und damit $p = 0$ für die Systeme mit 0, 1 und 8 Gew% Tensid identisch ist. Mit $3 \cdot 10^{-4}$ mol/g und einem daraus resultierenden Verteilungskoeffizienten von 0.33 weichen die Lösungen mit 22 Gew% C₁₂E₂₃ etwas von den anderen Lösungen ab, was aber möglicherweise nur durch Schwankungen der Enzymaktivität hervorgerufen wird.

In Tabelle 4.19 und in Abbildung 4.99 sind die Resultate für 1,7-Heptandiol dargestellt. Hier findet man eine deutliche Steigerung von c_{\max} mit steigendem C₁₂E₂₃-Gehalt: in Lösungen mit 0 Gew% erhält man $c_{\max} = 3 \cdot 10^{-6}$ mol/g, in Lösungen mit 22 Gew% $5 \cdot 10^{-4}$ mol/g. Es ergeben sich für 1,7-Heptandiol Verteilungskoeffizienten von 0.25, 0.67 und 0.99 in Systemen mit 1, 8 und 22 Gew% C₁₂E₂₃.

Tabelle 4.9: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für Ethanol

$c(C_{12}E_{23})$ [Gew%]	c_{\max} [mol/g]	r_{\max}	p
0	$8 \cdot 10^{-5}$	1.21	0
1	$1 \cdot 10^{-4}$	1.09	0.2
8	—	—	—
22	$1 \cdot 10^{-4}$	0.86	0.2
(HLADH Lot A)			
0	$1 \cdot 10^{-4}$	1.6	0
1	$1 \cdot 10^{-4}$	1.49	0
8	$1 \cdot 10^{-4}$	1.28	0
22	$1 \cdot 10^{-4}$	0.61	0
(HLADH Lot B)			

Tabelle 4.10: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Pentanol

$c(C_{12}E_{23})$ [Gew%]	c_{\max} [mol/g]	r_{\max}	p
0	$2 \cdot 10^{-6}$	1.29	0
1	$1 \cdot 10^{-6}$	1.15	(-1)
8	$4 \cdot 10^{-6}$	1.57	0.5
22	$7 \cdot 10^{-6}$	0.84	0.71
(HLADH Lot A)			
0	$2 \cdot 10^{-6}$	1.44	0
1	—	—	—
8	—	—	—
22	$7 \cdot 10^{-6}$	1.32	0.71
(HLADH Lot B)			

Tabelle 4.11: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Propanol

$c(C_{12}E_{23})$ [Gew%]	c_{\max} [mol/g]	r_{\max}	p
0	$2 \cdot 10^{-5}$	1.21	0
1	$2 \cdot 10^{-5}$	1.44	0
8	—	—	—
22	$2 \cdot 10^{-5}$	1.21	0

Tabelle 4.12: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Butanol

$c(C_{12}E_{23})$ [Gew%]	c_{\max} [mol/g]	r_{\max}	p
0	$2 \cdot 10^{-6}$	1.53	0
1	$7 \cdot 10^{-6}$	1.57	0.71
8	$4 \cdot 10^{-6}$	1.24	0.5
22	$2 \cdot 10^{-5}$	1.34	0.9

Tabelle 4.13: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Hexanol

$c(C_{12}E_{23})$ [Gew%]	c_{\max} [mol/g]	r_{\max}	p
0	$5 \cdot 10^{-7}$	1.51	0
1	$2 \cdot 10^{-6}$	1.34	0.75
8	$5 \cdot 10^{-6}$	1.51	0.9
22	$3 \cdot 10^{-5}$	1.26	0.98

Tabelle 4.14: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Heptanol

$c(C_{12}E_{23})$ [Gew%]	c_{\max} [mol/g]	r_{\max}	p
0	$8 \cdot 10^{-7}$	1.32	0
1	$1 \cdot 10^{-6}$	1.25	0.2
8	$5 \cdot 10^{-6}$	1.32	0.84
22	$3 \cdot 10^{-5}$	1.15	0.97

Tabelle 4.15: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Oktanol

$c(C_{12}E_{23})$ [Gew%]	c_{\max} [mol/g]	r_{\max}	p
0	$6 \cdot 10^{-7}$	0.91	0
1	—	—	—
8	$8 \cdot 10^{-6}$	1.02	0.93
22	$1 \cdot 10^{-4}$	0.93	0.99

Tabelle 4.16: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Nonanol

Tabelle 4.17: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1-Dekanol

$c(C_{12}E_{23})$ [Gew%]	c_{\max} [mol/g]	r_{\max}	p
8	$2 \cdot 10^{-5}$	0.92	—
22	$4 \cdot 10^{-5}$	0.84	—

Tabelle 4.18: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1,5-Pentandiol

Tabelle 4.19: Lage der Maxima und Verteilungskoeffizienten für 1,7-Heptandiol

$c(C_{12}E_{23})$ [Gew%]	c_{\max} [mol/g]	r_{\max}	p
0	$2 \cdot 10^{-4}$	1.85	0
1	$2 \cdot 10^{-4}$	1.8	0
8	$2 \cdot 10^{-4}$	1.82	0
22	$3 \cdot 10^{-4}$	1.74	0.33

$c(C_{12}E_{23})$ [Gew%]	c_{\max} [mol/g]	r_{\max}	p
0	$3 \cdot 10^{-6}$	1.54	0
1	$4 \cdot 10^{-6}$	1.67	0.25
8	$9 \cdot 10^{-6}$	1.57	0.67
22	$5 \cdot 10^{-4}$	1.39	0.99

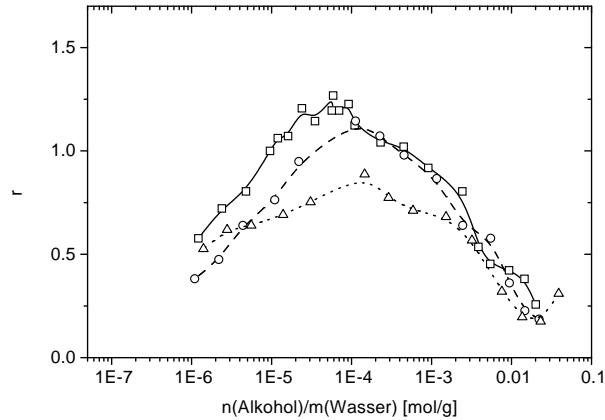


Abbildung 4.88: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /Ethanol/Wasser-Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (\square 0 %, \circ 1 % und \triangle 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde Lot A von HLADH in allen drei Fällen verwendet.

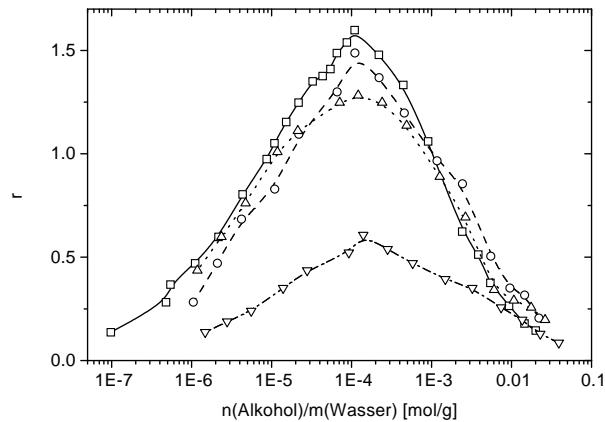


Abbildung 4.89: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /Ethanol/Wasser-Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (\square 0 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$, \circ , \triangle 8 % und ∇ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde in allen vier Fällen Lot B von HLADH verwendet.

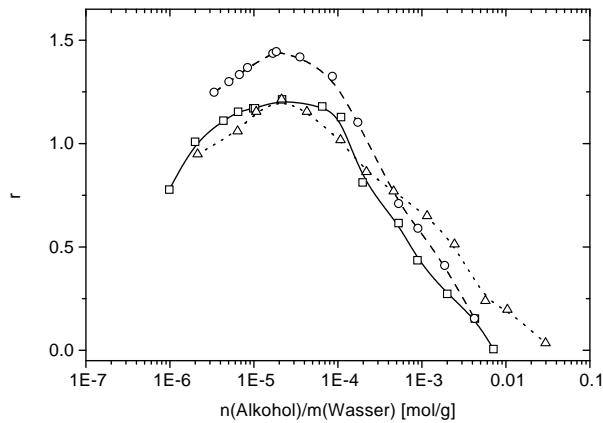


Abbildung 4.90: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /1-Propanol/Wasser-Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (\square 0 %, \circ 1 % und 22 % \triangle 8 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde Lot B von HLADH in allen drei Fällen verwendet.

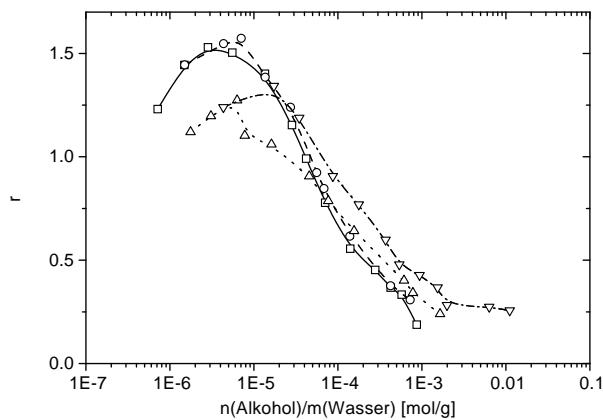


Abbildung 4.91: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /1-Butanol/Wasser-Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (\square 0 %, \circ 1 %, \triangle 8 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ und ∇ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde in allen vier Fällen Lot B von HLADH verwendet.

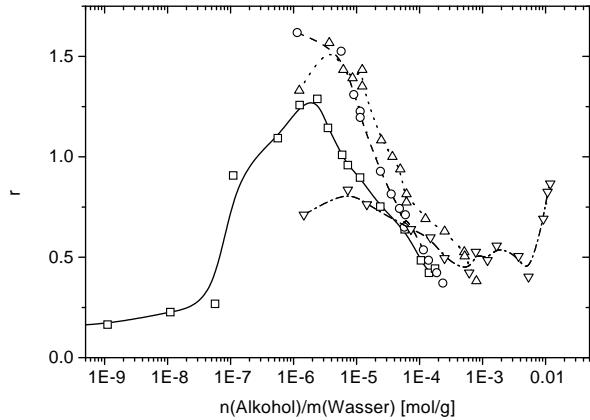


Abbildung 4.92: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /1-Pentanol/Wasser-Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (\square 0 %, \circ 1 %, \triangle 8 % und ∇ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde Lot A von HLADH in allen vier Fällen verwendet.

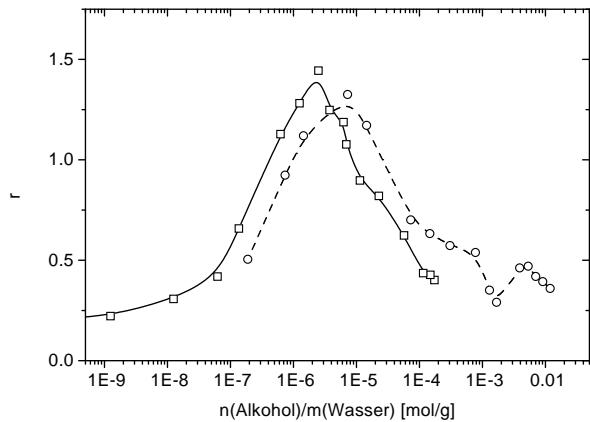


Abbildung 4.93: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /1-Pentanol/Wasser-Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (\square 0 % und \circ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde in beiden Fällen Lot B von HLADH verwendet.

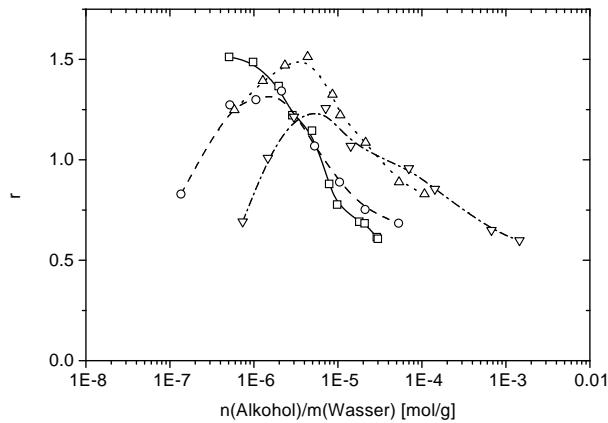


Abbildung 4.94: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /1-Hexanol/Wasser-Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (\square 0 %, \circ 1 %, \triangle 8 % und ∇ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde Lot B von HLADH in allen vier Fällen verwendet.

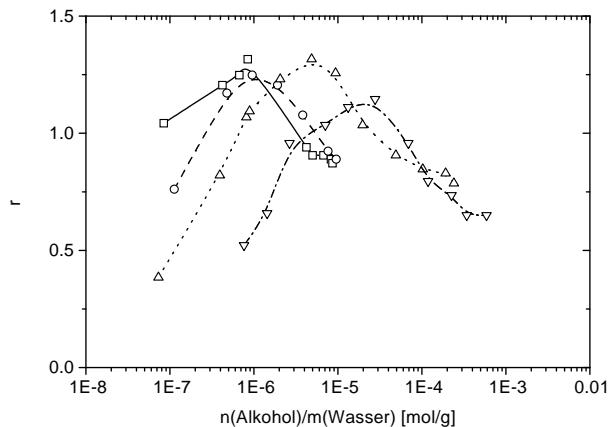


Abbildung 4.95: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /1-Heptanol/Wasser-Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (\square 0 %, \circ 1 %, \triangle 8 % und ∇ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde in allen vier Fällen Lot B von HLADH verwendet.

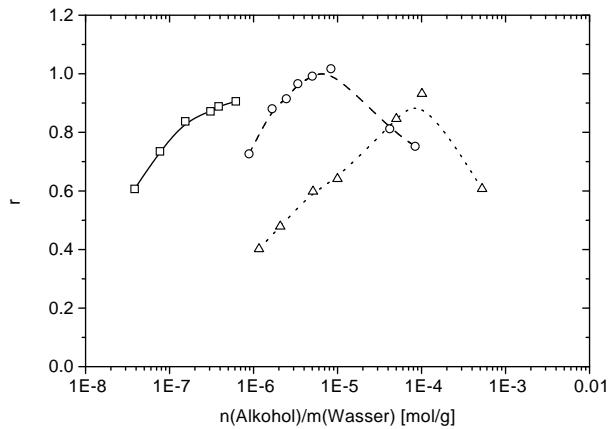


Abbildung 4.96: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /1-Oktanol/Wasser-Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (□ 0 %, ○ 8 % und △ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde Lot B von HLADH in allen drei Fällen verwendet.

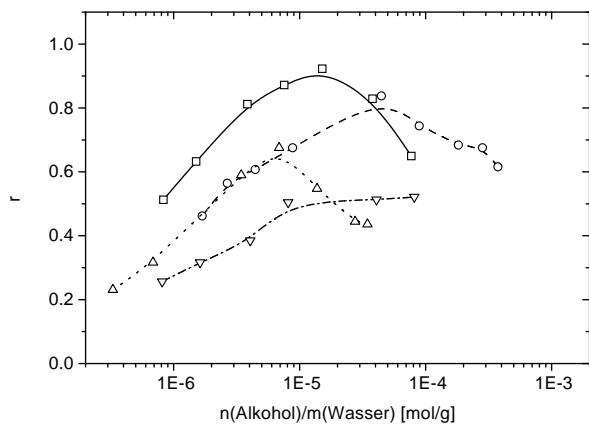


Abbildung 4.97: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ /Alkohol/Wasser-Systemen mit 1-Nonanol (□ 8% und ○ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$) bzw. 1-Dekanol (△ 8% und ▽ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde Lot B von HLADH in allen vier Fällen verwendet.

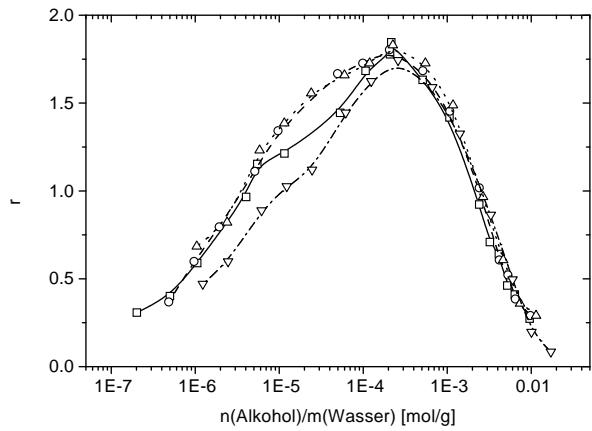


Abbildung 4.98: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}/1\text{-Pentandiol/Wasser}$ -Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (\square 0 %, \circ 1 %, \triangle 8 % und ∇ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). In allen vier Fällen wurde Lot B von HLADH verwendet.

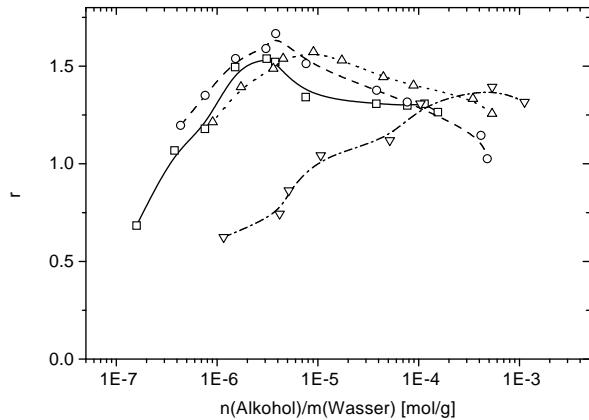


Abbildung 4.99: Enzymaktivität in ternären $\text{C}_{12}\text{E}_{23}/1\text{-Heptandiol/Wasser}$ -Systemen mit verschiedenen $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ -Gehalten (\square 0 %, \circ 1 %, \triangle 8 % und ∇ 22 % $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$). Es wurde Lot B von HLADH in allen vier Fällen verwendet.

4.5.3 Aktivität von HLADH im Bereich der CMC von C₁₂E₂₃ in Ethanol- bzw. 1-Pentanol-haltigen Lösungen

Um eine Idee des Einflusses von C₁₂E₂₃ auf HLADH zu erhalten, wurden Messungen der Enzymaktivität im Bereich der CMC des Tensids in Ethanol- bzw. 1-Pentanol-haltigen Lösungen durchgeführt. Die CMC von C₁₂E₂₃ liegt bei ungefähr $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l [15]. Es wurden Lösungen mit $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l oder $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l Ethanol bzw. mit $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $7.5 \cdot 10^{-3}$ mol/l bzw. $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l 1-Pentanol verwendet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.100 sowie 4.101 dargestellt.

Man stellt fest, daß für alle Konzentrationsreihen der beiden Alkohole ein Knick, der mit einer Aktivitätsabnahme einhergeht, bei einer Tensidkonzentration von rund $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l auftritt. Außerdem sinkt die Aktivität oberhalb von ca. 0.1 mol/l C₁₂E₂₃ in allen Systemen um die CMC mit Ethanol und 1-Pentanol deutlich ab.

Im Fall der Lösung mit 10^{-3} mol/l Ethanol bleibt nach dem Absinken der HLADH-Aktivität bei $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Tensid die Aktivität bis ungefähr $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l C₁₂E₂₃ relativ konstant, dann tritt ein kleines Minimum auf, ehe die HLADH-Aktivität wieder den Wert des konstanten Teilbereichs erreicht. An der CMC des Tensids, die bei etwa $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l liegt, kommt es zu keiner Änderung der Aktivität von HLADH. Oberhalb von ca. 0.1 mol/l C₁₂E₂₃ kommt es, wie bereits erwähnt, zu einem relativ deutlichen Abfall der Enzymaktivität, wie in Abbildung 4.100 zu sehen ist.

Die Lösungen mit einer Ethanol-Konzentration von $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l zeigen ein etwas anderes Verhalten. Nach dem Absinken bei rund $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l C₁₂E₂₃ steigt die Enzymaktivität wieder auf den Wert vor dem Absinken und bleibt bis ungefähr 0.1 mol/l Tensid konstant. Auch hier tritt keine Änderung der Enzymaktivität an der CMC von C₁₂E₂₃ auf, ähnlich wie in den Lösungen mit 10^{-3} mol/l Ethanol.

Die Kurve für die Aktivität als Funktion der Tensidkonzentration zeigt für $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Pentanol einen deutlich anderen Verlauf als für die Ethanol-haltigen Lösungen, was man in Abbildung 4.101 erkennen kann. Die HLADH-Aktivität steigt nach dem Absinken der bei $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l C₁₂E₂₃ wieder deutlich an, erreicht ein Maximum bei etwa $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l Tensid, bevor sie langsam wieder abfällt. Ab 0.1 mol/l C₁₂E₂₃ sinkt die Enzymaktivität, wie bereits erwähnt, ziemlich deutlich.

Vergleicht man die Kurven für $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l und $7.5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Pentanol, so zeigen beide einen sehr ähnlichen Verlauf. Nach dem Abfall bei $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Tensid steigt die Enzymaktivität wieder ungefähr auf den Wert vor dem Absinken und bleibt bis 0.01 mol/l C₁₂E₂₃ mehr oder weniger konstant. Dann steigt die Aktivität sehr deutlich bis zu 0.1 mol/l Tensid, ehe sie wieder abfällt.

Im Fall der 1-Pentanol-Lösungen mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l Alkohol ist der Verlauf der Aktivität erneut etwas anders als bei den drei bisher beschriebenen 1-Pentanol-Konzentrationen, was auch in Abbildung 4.101 zu sehen ist. Die Aktivität von HLADH erreicht nach dem Absinken bei $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l C₁₂E₂₃ wieder den Wert vor dem Absinken. Sie beginnt dann ab ca. 10^{-4} mol/l Tensid langsam anzusteigen. Zwischen 0.05 und 0.1 mol/l C₁₂E₂₃ kommt es zu einem etwas stärkeren Anstieg der Enzymaktivität, bevor sie oberhalb von 0.1 mol/l Tensid abfällt.

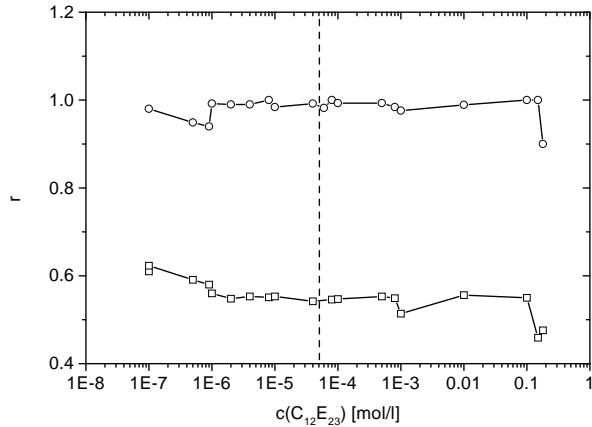


Abbildung 4.100: Aktivität von HLADH im Bereich der CMC von $C_{12}E_{23}$ in Ethanol-haltigen Lösungen (□ entspricht 10^{-3} mol/l Ethanol, ○ 10^{-2} mol/l). Verwendet wurde in beiden Fällen Lot A von HLADH.

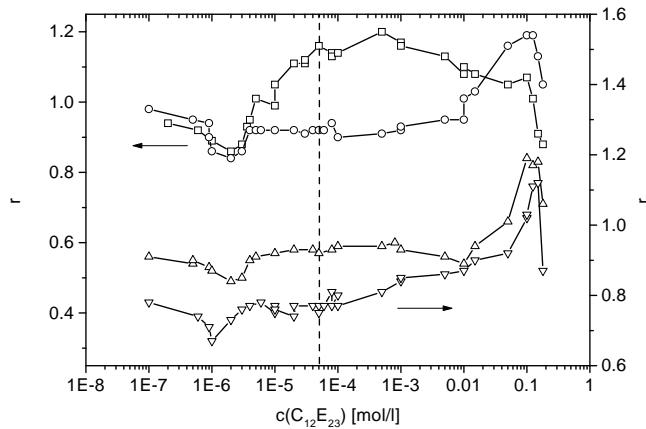


Abbildung 4.101: Aktivität von HLADH im Bereich der CMC von $C_{12}E_{23}$ in 1-Pentanol-haltigen Lösungen (□ entspricht 10^{-3} mol/l 1-Pentanol, ○ $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l, △ $7.5 \cdot 10^{-3}$ mol/l und ▽ 10^{-2} mol/l). Es wurde Lot A von HLADH in allen vier Fällen verwendet.

Kapitel 5

Diskussion der Ergebnisse

5.1 Vergleich der aus Messungen der Leitfähigkeit und der UV/Vis-Spektren bestimmten Werte für die CMC der Tenside vom C_x TAB-Typ mit Literaturdaten

In Tabelle 5.1 sind die CMC-Werte der verschiedenen C_x TAB ($x = 6, 8, 10, 12, 14$), die aus Messungen der Leitfähigkeit (vgl. Tabelle 4.2 in Abschnitt 4.2) und aus den UV/Vis-Spektren mit ST (vgl. Tabelle 4.3 in Abschnitt 4.3.1) bestimmt wurden, Literaturdaten gegenübergestellt.

Betrachten wir zunächst die Daten aus der Literatur. Es fällt auf, daß teilweise doch eine deutliche Streuung der CMC-Werte auftritt. Die Ergebnisse hängen natürlich auch von der verwendeten Methode und von der Reinheit des eingesetzten Tensids ab. Beispielsweise ergibt sich, wenn alle CMC-Werte für C_{12} TAB aus der Literatur gemittelt werden, ein Wert von 0.0154 mol/l für die CMC und ± 0.0025 mol/l für den Fehler, was ca. $\pm 16\%$ entspricht. Die in dieser Arbeit aus Leitfähigkeitsmessungen erhaltenen Werte für die CMC der Tenside C_{10} TAB, C_{12} TAB und C_{14} TAB stimmen sehr gut mit den Literaturwerten überein, wie man in Tabelle 5.1 sehen kann. Warum in der Auftragung von κ als Funktion der C_8 TAB-Konzentration kein Knick auftrat, obwohl dies bei Baar [76] der Fall war, der somit die CMC von C_8 TAB bestimmen konnte, konnte nicht geklärt werden.

Für die aus UV/Vis-Spektren mit ST bestimmten CMC-Werte findet man nur im Fall von C_{10} TAB sowie C_{12} TAB eine sehr gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Literatur.

Für C_{14} TAB weicht die spektroskopisch bestimmte CMC mit 0.00508 mol/l doch deutlich vom aus Leitfähigkeitsmessungen erhaltenen Wert von 0.00375 mol/l ab, und zwar um rund 35%. Das Ergebnis liegt aber immerhin in der gleichen Größenordnung. Die Ursache für diese deutliche Abweichung liegt darin begründet, daß die Änderungen der UV/Vis-Spektren von ST mit steigender C_{14} TAB-Konzentration im Vergleich zu den anderen C_x TABs relativ gering sind und daher die Bestimmung der CMC relativ ungenau wird. Was die Ursache für diese geringeren Änderungen sind, soll aber erst später erläutert werden.

Für C_8 TAB erhält man nur aus der Auswertung der UV/Vis-Spektren einen Wert für die CMC. Der Mittelwert von 0.177 mol/l der drei erhaltenen CMC-Werte (vgl. Tabelle 4.3 in Abschnitt 4.3.1) weicht deutlich – um rund 30 bis 50% – von der Literatur ab, wo Werte zwischen 0.25 und 0.34 mol/l für die CMC von C_8 TAB angegeben werden. Vernachlässigt man hingegen den aus der Auftragung von λ_{\max} als Funktion der logarithmierten Tensidkon-

zentration erhaltenen Wert, so ergibt sich ein gemittelter Wert von $0.199 \pm 0.008 \text{ mol/l}$ und damit nur noch eine Abweichung von etwa 20 bis 40 % von den Literaturdaten. Beispielsweise weicht aber der Wert von 0.25 mol/l von 0.34 mol/l ebenfalls bereits um rund 26 % ab. Dadurch relativiert sich die Abweichung der spektroskopisch bestimmten CMC-Werte von den Literaturwerten ein wenig.

Die Bestimmung der CMC war für C_6TAB nur aus der Auftragung von A_{\max} als Funktion der logarithmierten C_6TAB -Konzentration einigermaßen möglich, aber nicht mit den anderen Auftragungen der UV/Vis-spektroskopischen Ergebnisse und auch nicht aus den Leitfähigkeitsmessungen. Man gewinnt eher den Eindruck, wenn man die entsprechenden Abbildungen für C_6TAB in den Abschnitten 4.2 und 4.3.1 betrachtet, daß dieses Tensid keine richtige CMC besitzt. Statt dessen scheint ein fließender Übergang von Monomeren zu oligomeren Aggregaten stattzufinden. In der Literatur [94, 95] werden zwar Werte für die CMC von C_6TAB , die ungefähr mit dem spektroskopisch bestimmten Wert übereinstimmen, angegeben – ob diese aber sinnvoll sind, ist schwer zu beurteilen.

Tabelle 5.1: CMC von C_xTAB -Tensiden bei 25°C in [mol/l]. In der Tabelle werden folgende Abkürzungen verwendet: LF = Leitfähigkeit, UV/Vis = UV/Vis-Spektrophotometrie, LS = Lichtstreuung, OS = Oberflächenspannung, Kal = Kalorimetrie, US = Ultraschall, Di = Dichtemessung

x	6	8	10	12	14
in dieser Arbeit bestimmt (Mittelwerte)					
LF	–	–	0.0645	0.0157	0.00375
UV/Vis	0.621	0.177	0.0628	0.0156	0.00508
aus der Literatur					
[76] LF	–	0.284	–	0.0155	–
[94] LF	0.578	0.325	0.0655	0.0156	0.00374
[96] LS	–	0.32	–	–	–
[97] LS	–	0.34	–	–	–
[82] LF	–	–	–	0.0158	0.0036
OS				0.01445	0.00234
Kal				0.01785	0.00331
[98] LF	–	–	–	0.0144	0.0033
[81] US	–	0.28	0.0663	–	–
[99] LF	–	–	–	0.0155	0.00389
[100] Di	–	0.250	0.067	0.0148	0.0037
[95] LF	0.509	0.290	0.0661	0.0146	0.00354
[80] LF (20°C)	0.250	–	0.0667	–	0.0035

5.2 UV/Vis-Spektren von ST in verschiedenen Medien

5.2.1 Begründung für die Verwendung von ST zur Untersuchung mikellarer Medien mit Tensiden vom C_x TAB-Typ

In der Literatur wird die Verwendung von Farbstoffen zur UV/Vis-spektrophotometrischen Bestimmung der CMC als gängige Methode beschrieben [7, 101, 102]. Gegenüber der Messung der Oberflächenspannung hat die Bestimmung der CMC über UV/Vis-Spektren den Vorteil, daß sie bei weitem nicht so sensibel auf Verunreinigungen reagiert [103]. Darüberhinaus kann sie – im Falle ionischer Tenside – anstelle von Leitfähigkeitsmessungen eingesetzt werden, wenn man die CMC in Lösungen mit Alkoholen bestimmen will [101]. Höhere Alkoholgehalte in Lösungen ionischer Tenside können die Leitfähigkeit so beeinflussen, daß es schwierig wird, die CMC genau zu bestimmen [101, 104].

Die Auswahl eines geeigneten Farbstoffes zur Bestimmung der CMC ist nicht ganz trivial. Wenn der Farbstoff geladen ist, so kann es zur Bildung von Ionenpaaren oder „Cluster“ mit entgegengesetzt geladenen Tensidmolekülen bei Tensidkonzentrationen unterhalb der CMC kommen. Dies ist der Fall für Methylenblau bzw. Acridinorange, beides kationische Farbstoffe, und das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat [105, 106]. Die anionischen Farbstoffe Methylorange und Paramethylrot bilden mit kationischen Tensiden vom C_x TAB-Typ (mit $x = 10, \dots, 18$) Ionenpaare oder „Cluster“, die sogar als Niederschlag ausfallen können [107, 108]. Auch zwischen Indigocarmine, einem anionischen Farbstoff, und C_{16} TAB findet eine Niederschlagsbildung bei $c(C_{16}\text{TAB}) \ll c_{\text{CMC}}$ statt [109].

Man sollte also zur CMC-Bestimmung eines ionischen Tensids nach Möglichkeit einen Farbstoff auswählen, der keine Ionenpaare mit dem Tensid bilden kann. Es ist darum sinnvoll, einen Farbstoff auszuwählen, der die gleiche Ladung wie das Tensid trägt, so daß es nicht zu elektrostatischer Anziehung zwischen Farbstoff und Tensid kommen kann.

Wählt man aber einen kationischen Farbstoff für ein kationisches Tensid oder einen anionischen für ein anionisches Tensid, so kann ein weiteres Problem auftreten. Überwiegt die Abstoßung der gleichgeladenen ionischen Gruppen von Farbstoff und Tensid, so kann dies dazu führen, daß es zwischen Farbstoff und Mizelle nicht zur Bildung eines Komplexes kommt. Dies hat zur Folge, daß keine nennenswerten Veränderungen im UV/Vis-Spektrum des Farbstoffes mit steigender Tensidkonzentration auftreten und somit eine Bestimmung der CMC mittels dieses Farbstoffes nicht möglich ist. Roberts et al. [109] berichten beispielsweise, daß sie Indigocarmine, einen anionischen Farbstoff, und das anionische Tensid SDS verwendeten und keine Veränderungen des Farbstoffspektrums mit steigender Tensidkonzentration auftraten. Ähnliches beobachteten Sarkar und Poddar [110, 111] bei der Untersuchung der UV/Vis-Spektren von Methylviolett, einem kationischen Farbstoff, ober- und unterhalb der CMC von C_{16} TAB. Für die kationischen Farbstoffe Phenosafranin, Safranin T und Safranin O fanden Dutta und Bhat [14] keine Veränderungen der UV/Vis-Spektren bei Zugabe von Cetylpyridiniumchlorid, einem kationischen Tensid. Ebensowenig entdeckten sie Veränderungen der Spektren von Methylorange bei Zusatz von SDS.

Zu etwas anderen Ergebnissen kamen Pal et al. [112] bei spektroskopischen Untersuchungen der Wechselwirkungen dreier kationischer Rhodamin-Farbstoffe, nämlich Rhodamin 123, 4,5-Dibromrhodaminmethylester und 4,5-Dibromrhodamin-n-butylester, mit C_{16} TAB. Rhodamin 123 zeigte in C_{16} TAB-Lösung nur minimale Unterschiede der spektroskopischen Eigenschaften gegenüber der tensidfreien wäßrigen Lösung, während bei den beiden anderen Farbstoffen doch etwas größere Veränderungen zu finden waren. Sie führen dies darauf

zurück, daß 4,5-Dibromrhodaminmethylester und 4,5-Dibromrhodamin-n-butylester hydrophober sind als Rhodamin 123 und deshalb die hydrophoben Wechselwirkungen über die elektrostatische Abstoßung dominiert, was die Einlagerung in C₁₆TAB-Mizellen ermöglicht. Daß es zwischen ST, einem kationischen Farbstoff, und kationischen Tensiden entgegen der Beobachtungen von Dutta und Bhat [14] zur Bildung von Komplexen kommen kann, wurde bereits gezeigt. Dies ist vermutlich ebenfalls darauf zurückzuführen, daß es zwischen Mizellen aus Tensiden vom C_xTAB-Typ und ST zu hydrophoben Wechselwirkungen kommt, die über die Abstoßung der kationischen Gruppen von Farbstoff und Tensid dominieren. Daß dies nicht die einzige Ursache ist, wird im nun folgenden Abschnitt näher erläutert.

5.2.2 Klärung der Frage, warum sich die CMC von C₁₄TAB nur sehr schlecht aus den UV/Vis-Spektren von ST bestimmen läßt

Der Vergleich der CMC-Bestimmung aus Leitfähigkeitsmessungen und UV/Vis-Spektren wurde bereits durchgeführt. Nun soll eine mögliche Ursache aufgedeckt werden, warum sich die CMC der anderen Tenside vom C_xTAB-Typ spektroskopisch einigermaßen ($x = 6, 8$) bzw. gut ($x = 10, 12$) bestimmen läßt, aber nicht die CMC von C₁₄TAB.

Man überlege sich zunächst folgendes: wieviele Mizellen treffen bei einer Tensid-Lösung, deren Konzentration doppelt so groß ist wie die CMC, auf ein Farbstoffmolekül, d. h. wie groß ist der Wert des Faktors f_{mic} ? f_{mic} sei definiert als

$$f_{\text{mic}} = \frac{c_{\text{M},o}}{c_{\text{D},o}} \quad (5.1)$$

wobei $c_{\text{M},o}$ die Gesamtkonzentration an Mizellen in der Lösung und $c_{\text{D},o}$ die Gesamtkonzentration an Farbstoff ist. Die Gesamtkonzentration an Mizellen ist durch Gleichung 2.91 in Abschnitt definiert als

$$c_{\text{M},o} = \frac{c_{\text{T},o} - c_{\text{CMC}}}{N_{\text{AG}}} = \frac{\Delta c_{\text{T},o}}{N_{\text{AG}}} \quad (5.2)$$

Mit diesen beiden Gleichungen läßt sich also der Faktor f_{mic} bestimmen, wenn man die Gesamtkonzentration des Tensids, seine CMC und seine Aggregationszahl kennt.

Für die verschiedenen C_xTABs wurde f_{mic} für $c_{\text{T},o} = 2 \cdot c_{\text{CMC}}$ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 dargestellt. Für die CMC wurden die Werte aus Leitfähigkeitsmessungen bzw. UV/Vis-Spektroskopie verwendet. Die Aggregationszahlen der Mizellen wurden der Literatur entnommen. Für die Farbstoffkonzentration wurde die Konzentration von ST für die CMC-Bestimmung der Tenside, die bei $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l lag, verwendet.

Wie man sieht, besteht im Fall von C₆TAB die größte Wahrscheinlichkeit, daß ein ST-Molekül auf eine Mizelle trifft und sich mit ihr zu einem Komplex verbindet, wenn man eine Lösung vorliegen hat, deren Gesamtensidkonzentration doppelt so hoch ist wie die CMC. Ein Farbstoffmolekül steht rund 3100 Mizellen gegenüber. Mit steigender Kettenlänge x der C_xTABs sinkt die CMC und damit auch f_{mic} . Für C₁₄TAB ist das Verhältnis Mizelle/Farbstoff gerade noch 6.25 – also nicht mehr besonders groß. Damit ist auch die Wahrscheinlichkeit deutlich kleiner, daß ein ST-Molekül auf eine Mizelle trifft.

Die Veränderungen im UV/Vis-Spektrum hängen im wesentlichen von der Zahl der freien und der komplexierten Farbstoffmoleküle ab und diese wiederum von der Mizellkonzentra-

Tabelle 5.2: Bestimmung von f_{mic} und c_{MD} für die verschiedenen Tenside vom $C_x\text{TAB}$ -Typ.
Es wurde folgendes angenommen: $c_{\text{T},o} = 2 \cdot c_{\text{CMC}}$, $c_{\text{D},o} = c(\text{ST}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ sowie $K = 2000 \text{ l/mol}$ für alle $C_x\text{TABs}$.

x	c_{CMC} [mol/l]	N_{AG}	$c_{\text{T},o}$ [mol/l]	$c_{\text{M},o}$ [mol/l]	f_{mic}	c_{MD} [mol/l]	$\frac{c_{\text{MD}}}{c_{\text{D},o}}$
6	0.621	20 ^a	1.242	0.03105	3105	9.84147E-6	0.98415
8	0.177	30 ^b	0.354	0.0059	590	9.21762E-6	0.92176
10	0.0645	40 ^c	0.129	0.00161	161.25	7.62456E-6	0.76246
12	0.0157	50 ^d	0.0314	3.14E-4	31.4	3.82847E-6	0.38285
14	0.00375	60 ^e	0.0075	6.25E-5	6.25	1.09379E-6	0.10938

^aaus [80], gerundet

^baus [96], gerundet

^caus [81], gerundet, und [80]

^daus [82], gerundet, und [60]

^eaus [82], gerundet

tion, was sich aus den Gleichungen 2.90 und 2.74 in Abschnitt 2.3.2 herleiten läßt:

$$\begin{aligned}
 K &= \frac{c_{\text{MD}}}{c_{\text{M}} \cdot c_{\text{D}}} \\
 c_{\text{D},o} &= c_{\text{MD}} + c_{\text{D}} \\
 \Rightarrow c_{\text{MD}} &= \frac{K \cdot c_{\text{M}} \cdot c_{\text{D},o}}{K \cdot c_{\text{M}} + 1}
 \end{aligned} \tag{5.3}$$

Diese Gleichungen wurden verwendet, um aus der Mizellkonzentration unter Annahme einer identischen Komplexbildungskonstante K von 2000 l/mol (vgl. K für $C_{12}\text{TAB}$ in Tabelle A.2 in Abschnitt A.2 im Anhang) für alle Tenside vom $C_x\text{TAB}$ -Typ die Anzahl der Farbstoff-Mizell-Komplexe sowie das Verhältnis der Konzentration an komplexiertem Farbstoff zu freiem Farbstoff zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 für die verschiedenen $C_x\text{TABs}$ dargestellt.

Man sieht, daß mit steigendem x , d. h. Zunahme der Kettenlänge des Tensidrests und der Aggregationszahl der Mizelle, nicht nur die Mizellzahl abnimmt, sondern auch die Konzentration des Mizell-Farbstoff-Komplexes. Bei einer Konzentration an $C_6\text{TAB}$, die doppelt so groß wie seine CMC ist, liegen rund 98 % der Farbstoffmoleküle in komplexierter Form vor – bei $C_{12}\text{TAB}$ dagegen nur noch rund 11 %.

Im Umkehrschluß sollte man aber dann auch davon ausgehen können, daß die Extinktion des Maximums von ST bei rund 520 nm bei gleichem f_{mic} die gleiche sein müßte. Aus diesem Grund wurde in den Abbildung 5.1 bzw. 5.2 eine Auftragung von A_{max} als Funktion des (logarithmierten) Faktors f_{mic} für die verschiedenen $C_x\text{TABs}$ dargestellt. Zur Berechnung von f_{mic} wurden die Werte aus Tabelle 5.2 verwendet. Die zugehörigen Meßdaten sind dieselben, die für die CMC-Bestimmungen verwendet wurden.

Die Kurven für $C_6\text{TAB}$ und $C_8\text{TAB}$ weichen hingegen deutlich von den Kurven der anderen drei Tenside ab. Die Ursache hierfür sind wohl unter anderem die nicht genau bestimmbarer Werte für die CMC und die Aggregationszahl dieser beiden Tenside.

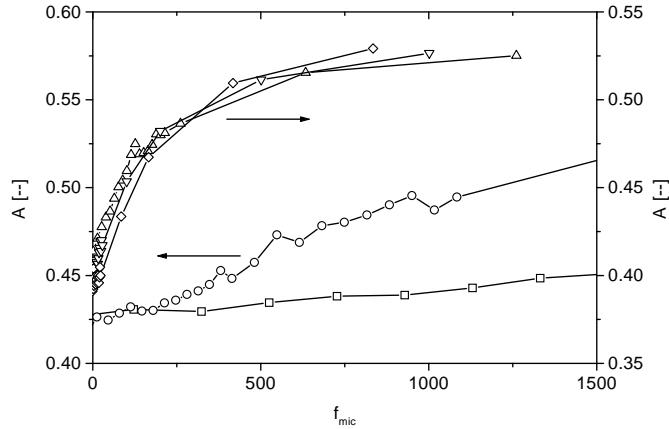


Abbildung 5.1: Auftragung der Extinktion am Maximum, A_{\max} , als Funktion des Faktors f_{mic} für die verschiedenen C_x TABs. Der Übersichtlichkeit wegen wurden die Ergebnisse für C_6 TAB (□) und C_8 TAB (○) bzw. C_{10} TAB (△) und C_{12} TAB (▽) auf getrennten y-Achsen dargestellt. Zur Orientierung sind in der Graphik Pfeile angegeben.

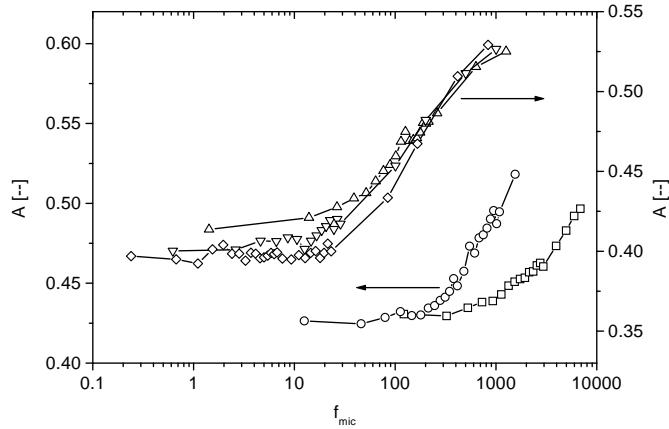


Abbildung 5.2: Auftragung der Extinktion am Maximum, A_{\max} , als Funktion des logarithmiert dargestellten Faktors f_{mic} für die verschiedenen C_x TABs. Die Symbole haben dieselbe Bedeutung wie in Abbildung 5.1

5.2.3 UV/Vis-Spektren von ST in reinem Wasser

Betrachtet man den Verlauf der Wellenlänge am Maximum von ST bei ca. 520 nm, der in Abbildung 4.43 dargestellt ist, so findet man, wie bereits in Abschnitt 4.3.4 erläutert wurde, eine deutliche Abnahme von λ_{\max} ab einer Farbstoffkonzentration von $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Die UV/Vis-Spektren zeigen ebenfalls deutliche Unterschiede.

Es stellt sich die Frage, worauf diese spektralen Veränderungen zurückzuführen sind. Die Erklärung findet sich in der Literatur. Atun et al. [88] bestimmten einen Wert für die kritische Mizellkonzentration von Safranin O bei 25°C von $1.26 \cdot 10^{-4}$ mol/l, was ungefähr mit dem Bereich übereinstimmt, in dem, wie in Abbildung 4.43 dargestellt, sich deutliche Veränderungen im UV/Vis-Spektrum von ST ergeben.

Wenn man sich die Struktur von Safranin T und Safranin O in den Abbildungen 3.4 und 3.5 im Abschnitt 3.2.1 ansieht, so besitzen diese beiden Farbstoffe kationischen Tensiden vergleichbare Eigenschaften: eine positiv geladene polare „Kopfgruppe“ (um den positiv geladenen Stickstoff herum, zusätzlich mit zwei polaren NH₂-Gruppen versehen) und ein hydrophober Kohlenwasserstoffrest, die Phenylgruppe.

Casero et al. [113] erläutern, daß Farbstoffe Amphiphile sind, die aus großen nichtionischen Molekülteilen und ionischen Gruppen bestehen. Farbstoffe zeigen aber nur geringe Oberflächenaktivität, da sie keine langkettigen Kohlenwasserstoffketten besitzen. Eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration kann zu einer schrittweisen Aggregation führen. Diese Aussage trifft offenbar auf Safranin O bzw. den in dieser Arbeit verwendeten Farbstoff ST zu.

5.2.4 Versuch der Klärung der Frage, um welchen Farbstoff es sich bei dem verwendeten handelt – UV/Vis-Spektren von ST in verschiedenen Lösungsmitteln

In den Tabellen 5.3 und 5.4 sowie den Abbildungen 5.3 und 5.4 werden die hier erhaltenen Ergebnisse für Wellenlänge und Extinktion des Maximums von ST bei etwa 520 nm den Literaturwerten für Safranin O und Safranin T gegenübergestellt.

Es zeigt sich, daß die gemessenen Werte und die Literaturdaten für die Wellenlänge des Maximums in verschiedenen Lösungsmitteln z. T. sehr ähnlich sind. Problematisch ist allerdings, daß die Daten aus [87] eher zweifelhaft sind und daß Dutta und Bhat [14] für Safranin O und Safranin T die gleichen Werte für λ_{\max} angeben. Anhand der Wellenlänge allein läßt sich folglich nicht klären, um welchen der beiden Farbstoffe es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten ST handelt.

Die Extinktionskoeffizienten des Maximums von Safranin T und Safranin O in Wasser unterscheiden sich mit 29000 bzw. 37000 l/mol doch sehr deutlich [14]. Der aus der Extrapolation der Meßdaten erhaltene Wert von 37000 ± 1000 l/mol/cm stimmt mit dem Wert für Safranin O überein.

Dafür zeigen die Extinktionskoeffizienten von ST in den anderen Lösungsmitteln mehr oder weniger große Unterschiede gegenüber den Werten, die Aaron et al. [90] und Islam et al. [89] angeben. Allerdings ist hier wieder zu beachten, daß die Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt wurden. Am ähnlichsten sind sich noch die Werte für ST und für Safranin O aus [90], wie man in Abbildung 5.4 sehen kann.

Folglich ist es weder anhand der Wellenlänge des Maximums noch anhand des Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Farbstoffe in unterschiedlichen Lösungsmitteln möglich,

den in dieser Arbeit verwendeten Farbstoff eindeutig als Safranin T oder Safranin O zu klassifizieren. Möglicherweise handelt es sich auch um ein Farbstoffgemisch. Deshalb wird weiterhin die Bezeichnung „ST“ beibehalten, wenn von diesem Farbstoff gesprochen wird.

Tabelle 5.3: Die Wellenlänge des Maximums, λ_{\max} , von ST bei rund 520 nm in verschiedenen Lösungsmitteln – Vergleich mit Literaturdaten. In der Tabelle wurden folgende Abkürzungen verwendet: LM = Lösungsmittel, SX = der in dieser Arbeit verwendete Farbstoff ST, ST = Safranin T, SO = Safranin O, T = Temperatur. Zusätzlich werden die in Abbildung 5.3 verwendeten Symbole angegeben.

LM	λ_{\max} [nm]					
	SX	SO [90]	SO [89] ^a	ST [87]	ST [14]	SO
H ₂ O	520	—	519	522	520	520
C ₁ OH	529	534	527	—	—	—
C ₂ OH	533	534	533	533	—	—
C ₄ OH	538	537	—	—	—	—
C ₆ OH	540	—	—	—	—	—
ACN	518	518	517	525	—	—
Fehler \pm	1	1	—	—	1	1
T [°C]	25	20	23	25	25	25
Symbol	□	○	△	▽	◊	+

^agraphisch bestimmt

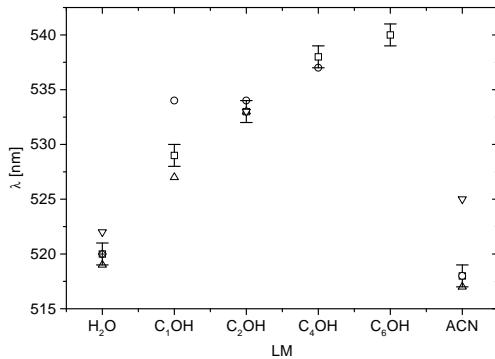


Abbildung 5.3: Auftragung der Wellenlänge am Maximum, λ_{\max} , von ST in Abhängigkeit vom Lösungsmittel – Vergleich mit Literaturdaten. Es werden die in Tabelle 5.3 angegebenen Symbole verwendet.

Tabelle 5.4: Der Extinktionskoeffizient des Maximums, ϵ_{\max} , von ST bei rund 520 nm in verschiedenen Lösungsmitteln – Vergleich mit Literaturdaten. In der Tabelle wurden dieselben Abkürzungen verwendet wie in Tabelle 5.3. Zusätzlich werden die in Abbildung 5.4 verwendeten Symbole angegeben.

LM	SX	ϵ_{\max} [l/mol/cm]				
		S0 [90]	SO [89] ^a	ST [87]	ST [14]	SO
H ₂ O	29900 ^b	–	24237	–	29000	37000
C ₁ OH	55400	63096	48399	–	–	–
C ₂ OH	59700	56234	58253	–	–	–
C ₄ OH	61400	58884	–	–	–	–
C ₆ OH	62400	–	–	–	–	–
ACN	51500	60256	38450	–	–	–
Fehler \pm	1000	–	–	–	50	50
T [°C]	25	20	23	25	25	25
Symbol	□	○	△	▽	◊	+

^agraphisch bestimmt

^baus Extrapolation (vgl. Abschnitt A.1 im Anhang): 37000 l/mol/cm

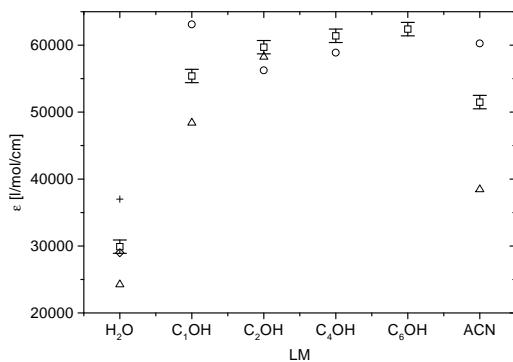


Abbildung 5.4: Auftragung des Extinktionskoeffizienten am Maximum, ϵ_{\max} , von ST in Abhängigkeit vom Lösungsmittel – Vergleich mit Literaturdaten. Es werden die in Tabelle 5.4 angegebenen Symbole verwendet.

5.2.5 Bestimmung von Komplexbildungskonstanten und Aggregationszahlen mittels ST

Wie in Abschnitt 4.3.7 dargestellt wurde, lassen sich durch entsprechende Auswertung der UV/Vis-Spektren mit ST in verschiedenen ternären Lösungen C₁₂TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlenverhältnissen C₁₂TAB/1-Hexanol von 1:1, 2:1, 4:1 und 8:1 und fester ST-Konzentration relativ einfach Bildungskonstanten des Komplexes zwischen Farbstoff ST und Mizellen bestimmen.

Wird die Konzentration des Farbstoffs in Lösungen mit einem C₁₂TAB/1-Hexanol-Verhältnis von 1:1 variiert, so ermöglicht dies außerdem die Bestimmung der Aggregationszahl der in diesen Lösungen enthaltenen Mizellen. Die Mittelwerte, die bei Vernachlässigung unterschiedlicher Teile der Meßdaten aus der Anpassung mit Gleichung 2.94 bei verschiedenen Wellenlängen – in Abschnitt 4.3.7 auch als Fitgleichung (b) bezeichnet – liegen mit 87 ± 5 bzw. 83 ± 9 relativ nahe an dem Wert der Aggregationszahl aus der Lichtstreuung an wäßrigen Lösungen mit einem C₁₂TAB/1-Hexanol-Verhältnis von 1:1, der 63 beträgt [10].

Mögliche Einflüsse von Fehlern in der Tensidkonzentration, der Farbstoffkonzentration und der CMC auf die Berechnung von Aggregationszahlen etc. werden im Anhang in Abschnitt A.2 dargestellt. Als Ergebnis ergibt sich, daß Fehler in der Tensidkonzentration den größten Einfluß auf die Aggregationszahl und auf die Komplexbildungskonstante K_k haben. Hingegen wirken sich Fehler in der CMC nicht so stark aus.

Wesentlich verbessern ließen sich die Ergebnisse vermutlich, wenn noch mehr UV/Vis-Spektren in Lösungen unterschiedlicher Konzentration aufgezeichnet würden. Dann könnten nämlich Streuungen in der Konzentration der einzelnen Komponenten, die ja immer auftreten können, besser abgefangen werden.

Die Durchführung einer Bandenanalyse für die verschiedenen Spektren wäre ebenfalls ein nützliches Mittel, weitere Informationen über die an der Komplexbildung beteiligten Spezies zu gewinnen. Es wurden Versuche unternommen, die verschiedenen Spektren der ternären Mischungen (mit C₁₂TAB/1-Hexanol = 1:1, 2:1, 4:1 und 8:1 bei konstanter ST-Konzentration sowie mit variabler ST-Konzentration bei C₁₂TAB/1-Hexanol = 1:1) mittels des Programmes Origin 5.0 einer solchen Bandenanalyse zu unterziehen. Sie scheiterten aber daran, daß nicht bekannt ist, wie viele Spezies tatsächlich in der Lösung vorliegen, da ST selbst aggregiert und – wie bereits erwähnt – eine CMC besitzt [88].

Auf eine Berechnung der Komplexbildungskonstanten zwischen ST und Mizellen für die wäßrigen C_xTAB-Lösungen mit $x = 6, 8, 10, 12$ und 14 wurde verzichtet. Zum einen ist für C₆TAB und C₈TAB die CMC nur ungenau bestimmt und zum anderen wurden für alle fünf Tenside nicht genügend UV/Vis-Spektren bei Tensidkonzentrationen deutlich oberhalb der CMC gemessen.

5.3 HLADH in C_xTAB-haltigen und -freien Lösungen

5.3.1 Auswahl des Puffers für die Untersuchungen von HLADH in Lösungen mit und ohne C_xTAB

In der Literatur findet man eine ganze Reihe an Puffern, die für Untersuchungen mit Alkoholdehydrogenasen eingesetzt werden:

- 0.1 mol/l Natriumphosphat mit 0.5 mmol/l EDTA, pH 6.0-8.1 [114]
- 83 mmol/l Kaliumphosphat, 40 mmol/l Kaliumchlorid und 0.25 mmol/l EDTA, pH 7.3 [115]
- 0.1 mol/l TES/Kaliumhydroxid, pH 7 [116]
- 0.1 mol/l TAPS/Kaliumhydroxid, pH 8.5 [116]
- 0.1 mol/l BisTrisPropan/Salzsäure, pH 10 [116]
- 50 mmol/l TES, pH 7.5 [26]
- 50 mmol/l Phosphat, pH 6.0, 7.0 und 7.5 [26]
- 50 mmol/l Tris, pH 8.5 [26]
- 50 mmol/l Borat, pH 8.5 und 9.0 [26]
- 0.1 mol/l Glycin, 0.075 mol/l Semicarbazidhydrochlorid und Natriumhydroxid, pH 8.7 [34]
- ...

Man sieht bereits an dieser Auswahl, daß das pH-Optimum von HLADH zwischen pH-Werten von 6 und 10 liegt.

Samama et al. [26] führten Untersuchungen in Mikroemulsionen durch, die entweder SDS oder C₁₆TAB sowie Alkohol (1-Butanol, 1-Pentanol, 1-Hexanol oder t-Butanol), Wasser und Cyclohexan enthielten. Für den Großteil der Untersuchungen verwendeten sie einen TES-Puffer mit 0.050 mol/l TES und pH 7.5. Die Aktivität von HLADH blieb in den kationischen Mikroemulsionen – anders als bei den anionischen Mikroemulsionen – relativ lange erhalten.

Da auch in dieser Arbeit kationische Tenside eingesetzt wurden, wurde der in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Puffer mit TES und Natriumhydroxid sowie pH 7.5 verwendet. Im Gegensatz zu Semicarbazidhydrochlorid, das für den zweiten Puffer für die Messungen mit C₁₂E₂₃ verwendet wurde, ist TES nicht toxisch, was ein großer Vorteil ist.

5.3.2 Einfluß der Ionenstärke auf die Aktivität von HLADH

Es wurde festgestellt, daß die Aktivität von HLADH in 10^{-2} mol/l Ethanol/TES-Puffer-Lösungen bei kleinen Natriumchloridkonzentrationen (≤ 0.4 mol/l) deutlich höher war als in salzfreier Lösung, wie in Abbildung 4.66 in Abschnitt 4.4.2 zu sehen ist. Ab 0.2 mol/l NaCl beginnt die Aktivität allmählich abzusinken.

Wie kann man dies erklären? Drauz und Waldmann [12, 16] erwähnen, daß HLADH durch eine Reihe von Anionen inhibiert wird: Halogenide, Cyanide, Oxalate, ... Das Chlorid-Anion in NaCl ist ja ein Halogenid. Die Erhöhung der Enzymaktivität für niedrige NaCl-Konzentrationen läßt sich damit aber nicht erklären.

In Abschnitt 2.2.2 wurde bereits erläutert, daß die Ionenstärke Auswirkungen auf die Proteinstruktur hat, weil die Ionenstärke die Stärke intra- und intermolekularer elektrostatischer Wechselwirkungen des Proteins beeinflußt. Studien hierzu finden sich auch in der Literatur. Beispielsweise studierten Ana Ruggia et al. [117] die Auswirkungen verschiedener Salze (Natriumacetat, Natriumbromid, Natriumchlorid, Natriumnitrat, Natriumperchlorat, Natriumsulfat, Natriumcyanat, Mononatriumphosphat und Dinatriumphosphat) und Ionenstärken auf die Aktivität von mitochondrieller Malatdehydrogenase (mMDH) aus Schweineherz. Sie stellten Ähnliches fest wie für HLADH gefunden wurde, daß nämlich alle Salze auf zweifache Art wirken: bei niedrigen Konzentrationen erhöhen sie die Aktivität von mMDH, bei hohen Konzentrationen, die von Salz zu Salz verschieden sind, inhibieren sie das Enzym. Sie führten diese Ergebnisse darauf zurück, daß mMDH, das als Dimer vorliegt, bei niedriger Ionenstärke stabilisiert wird und somit eine höhere Aktivität zeigt. Eine weitere Erhöhung der Ionenstärke führt zu einem Aktivitätsverlust, der offenbar eine Folge struktureller Veränderungen des Enzyms ist. Dieselben Schlußfolgerungen kann man wohl auch aus den Veränderungen der HLADH-Aktivität ziehen.

5.3.3 HLADH in 1-Hexanol-Lösungen verschiedener Konzentration

In Abbildung 5.5 ist zum Vergleich die gemessene Aktivität von HLADH in 1-Hexanol-Lösungen verschiedener Konzentration und die Aktivität für unkompetitive Hemmung (aus dem Fit der Meßdaten) sowie ungehemmte Michaelis-Menten-Kinetik dargestellt. Als unkompetitiver Inhibitor wurde das Substrat betrachtet. Für die Anpassung wurde die reziproke Gleichung von Gleichung 2.50 in Abschnitt 2.2.4 verwendet [71]:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [A]} + \frac{[I]}{V_{\max} \cdot K_{iu}} \quad (5.4)$$

Dabei wurde die Inhibitorkonzentration $[I]$ durch die Substratkonzentration $[A]$ ersetzt. Es zeigt sich eine relativ gute Übereinstimmung zwischen gemessenen und angepaßten Werten. Man erhält für V_{\max} einen Wert von 0.9330, für K_m einen Wert von $8.740 \cdot 10^{-5}$ mol/l und für K_{iu} einen Wert von $2.467 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Der Korrelationskoeffizient des Fits ist mit 0.9815 relativ gut. HLADH scheint in der Tat durch hohe 1-Hexanolkonzentrationen auf unkompetitive Art und Weise gehemmt zu werden.

Um genauere Aussagen machen zu können, wären mehr Messungen bei niedriger 1-Hexanol-Konzentration notwendig. Zu höheren Konzentrationen hin ist eine Erweiterung auf Grund der begrenzten Wasserlöslichkeit von 1-Hexanol leider nicht mehr möglich.

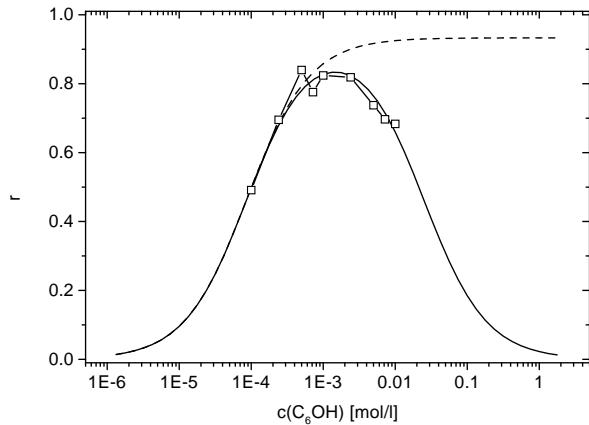


Abbildung 5.5: Vergleich der Aktivität von HLADH in 1-Hexanol-Lösungen verschiedener Konzentration (□) mit durch Anpassung erhaltenen Werten für unkompetitive Hemmung (—). Mit den aus der Anpassung erhaltenen Werten für K_M und V_{max} wurden Werte für eine ungehemmte Michaelis-Menten-Kinetik (----) berechnet.

5.3.4 HLADH in pseudobinären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer

Die Aktivität von HLADH in pseudobinären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer verhält sich für die verschiedenen C_x TABs doch sehr unterschiedlich, wenn die Tensidkonzentration steigt, wie in Abschnitt 4.4.4 gezeigt wurde. Es soll nun der Versuch unternommen werden, zu klären, welcher Art die Ursachen für diese unterschiedlichen Kurvenverläufe sind.

5.3.4.1 Vergleich von ST und HLADH in (pseudo-) binären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer

In den Abbildungen 5.6 bis 5.10 sind die Ergebnisse für ST und HLADH in (pseudo-) binären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer ($x = 6, 8, 10, 12, 14$) aus den Abschnitten 4.3.2 und 4.4.4 einander gegenübergestellt.

Wie man sieht, fällt der Anstieg der Wellenlänge des Maximums mit steigender C_x TAB-Konzentration in etwa mit dem Absinken der Aktivität von HLADH zusammen. Beides findet im Bereich der CMC der verschiedenen Tenside statt, wobei die CMC im Fall von C_6 TAB und C_8 TAB eher schlecht bestimmbar ist, wie bereits erwähnt wurde. Daß der Anstieg der Kurve von λ_{max} und der Abfall der Kurve von r mit steigender Tensidkonzentration nicht genau an der CMC beginnt, liegt wohl unter anderem darin begründet, daß die angegebenen CMC-Werte in wäßriger Lösung bestimmt wurden, während die in den Abbildungen dargestellten Daten von Messungen in TES-Puffer stammen.

Warum im Fall der Lösungen mit C_{12} TAB und C_{14} TAB ein Minimum der Aktivität von HLADH vor der CMC auftritt, könnte an einer anderen Art der Wechselwirkung dieser bei-

den Tenside mit HLADH oder 1-Hexanol liegen. Möglicherweise treten auch vor der CMC prämicellare Aggregate von Tensid- und Alkoholmolekülen auf, die einen Einfluß auf die Konzentration des freien 1-Hexanol in der Lösung haben. Dies könnte zu einer Reduktion der Enzymaktivität vor der CMC führen. Daß die Aktivität aber ab einer bestimmten Konzentration wieder ansteigt, läßt sich damit nicht erklären.

Das Vorhandensein prämicellarer Aggregate wird beispielsweise von Brinchi et al. [118,119] zur Erklärung erhöhter Geschwindigkeitskonstanten von Decarboxylierungs- oder Hydrolysereaktionen in Tensidlösungen unterhalb der CMC herangezogen, ist aber in der Literatur nicht unumstritten [41].

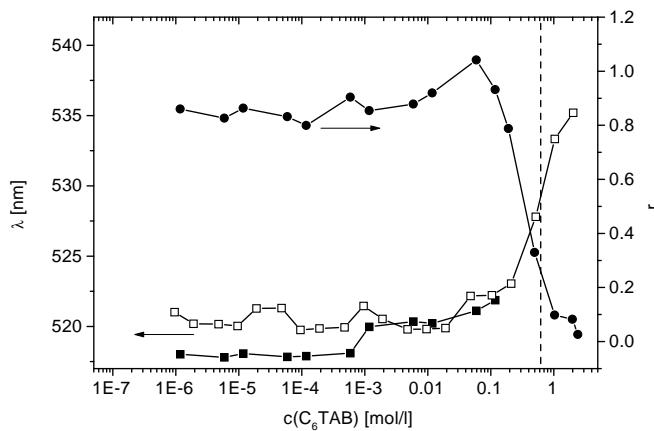


Abbildung 5.6: Vergleich der Wellenlänge des Maximums von ST, λ_{\max} , und der Aktivität von HLADH, r , in Abhängigkeit von der C_6 TAB-Konzentration. ■ und □ entsprechen der Wellenlänge des Maximums in 1-Hexanol-freier bzw. -haltiger Lösung, ● der Aktivität von HLADH in 1-Hexanol-haltiger Lösung. Die Zugehörigkeit der jeweiligen Kurven zur entsprechenden y -Achse ist zusätzlich durch Pfeile angegeben. Die CMC ist durch die gestrichelt eingezeichnete Gerade dargestellt.

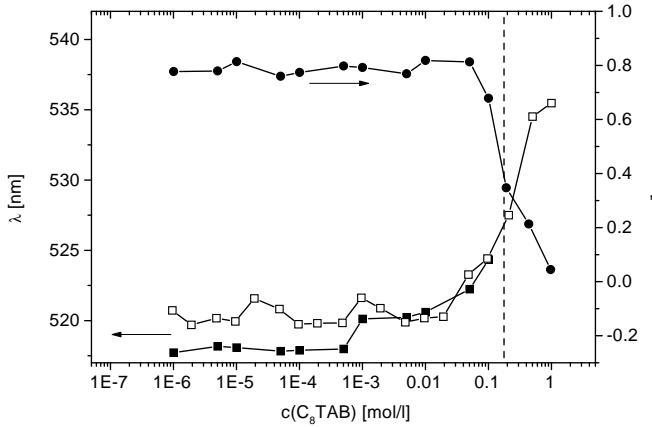


Abbildung 5.7: Vergleich der Wellenlänge des Maximums von ST, λ_{\max} , und der Aktivität von HLADH, r , in Abhängigkeit von der C₈TAB-Konzentration. Es gelten dieselben Symbole wie in Abbildung 5.6.

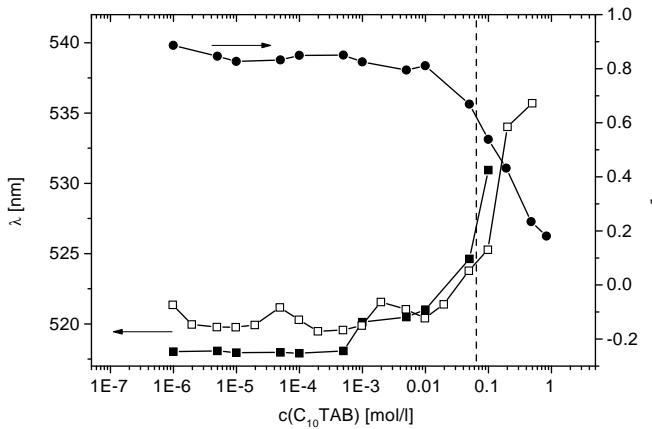


Abbildung 5.8: Vergleich der Wellenlänge des Maximums von ST, λ_{\max} , und der Aktivität von HLADH, r , in Abhängigkeit von der C₁₀TAB-Konzentration. Es gelten dieselben Symbole wie in Abbildung 5.6.

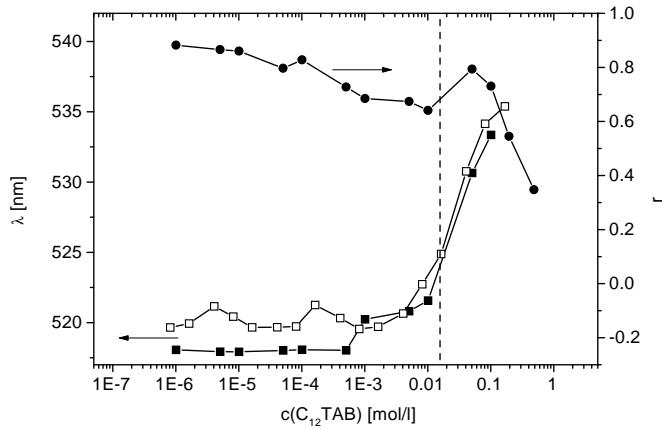


Abbildung 5.9: Vergleich der Wellenlänge des Maximums von ST, λ_{\max} , und der Aktivität von HLADH, r , in Abhängigkeit von der C_{12} TAB-Konzentration. Es gelten dieselben Symbole wie in Abbildung 5.6.

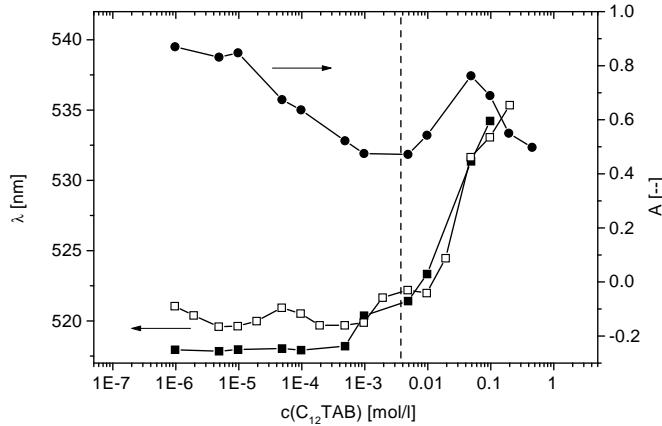


Abbildung 5.10: Vergleich der Wellenlänge des Maximums von ST, λ_{\max} , und der Aktivität von HLADH, r , in Abhängigkeit von der C_{14} TAB-Konzentration. Es gelten dieselben Symbole wie in Abbildung 5.6.

5.3.4.2 Einfluß der Ionenstärke der pseudobinären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der Aktivität von HLADH in pseudobinären Lösungen C_x TAB/TES-Puffer besteht darin, den Einfluß der Ionenstärke der Tensidlösungen abzuschätzen.

In den Abbildungen 5.11 und 5.12 ist die Aktivität von HLADH in pseudobinären Lösungen mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol und den verwendeten C_x TABs und – zum Vergleich – in 10⁻² mol/l Ethanol-Lösungen mit steigender Natriumchlorid-Konzentration dargestellt. Die Ionenstärke wurde unter Verwendung der Werte für c_{CMC} und N_{AG} aus Tabelle 5.2 berechnet. Für den Ionisationsgrad α der Mizellen der verschiedenen C_x TAB-Tenside wurde als Näherung der Mittelwert von α für C_{10} TAB, C_{12} TAB und C_{14} TAB, der bei 0.27 liegt, verwendet.

Die Ionenstärke einer Tensidlösung der Gesamtkonzentration $c_{T,o}$ vor oder nach der CMC läßt sich aus Gleichung 2.16 in Abschnitt 2.1.3.2.3 herleiten, wenn man annimmt, daß oberhalb der CMC die Monomerenkonzentration konstant bleibt und es sich bei dem Tensid um ein 1-1-Tensid handelt.

Man erhält folgenden Ausdruck für die Ionenstärke:

$$I = \begin{cases} c_{CMC} + \frac{1}{2} \cdot (c_{T,o} - c_{CMC}) \cdot \alpha \cdot (N_{AG} \cdot \alpha + 1) & , \quad c_{T,o} \geq c_{CMC} \\ c_{T,o} & , \quad c_{T,o} < c_{CMC} \end{cases} \quad (5.5)$$

Zusätzlich wird noch die Näherung gemacht, daß die Ionenstärke des Puffers keinen Einfluß auf die CMC und den Dissoziationsgrad der Mizellen hat und daß man deshalb die Gesamt-

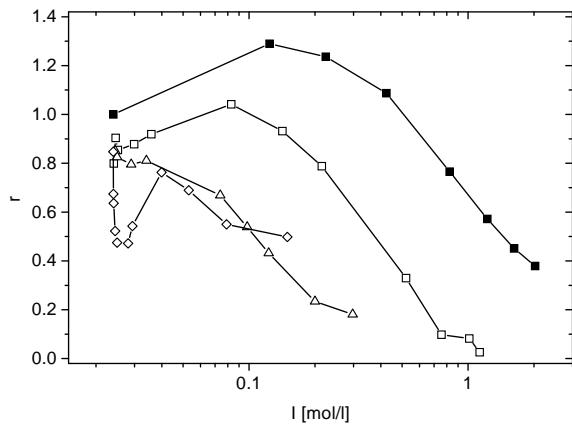


Abbildung 5.11: Aktivität r von HLADH in Abhängigkeit von der Ionenstärke I der Lösung.
 ■ entspricht den Lösungen mit 10⁻² mol/l Ethanol und NaCl. Außerdem sind die Ergebnisse für Lösungen mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol und C₆TAB (□), C₁₀TAB (△) und C₁₄TAB (◊) abgebildet.

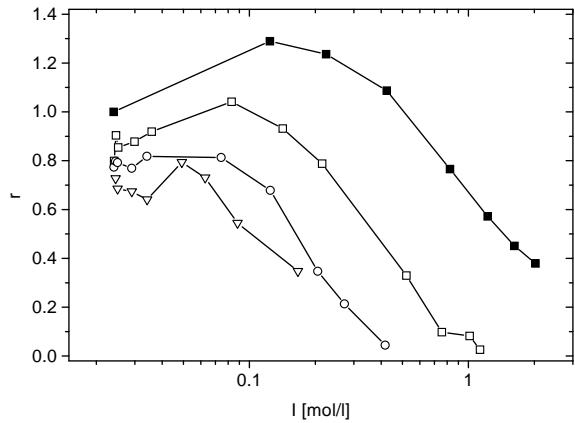


Abbildung 5.12: Aktivität r von HLADH in Abhängigkeit von der Ionenstärke I der Lösung.

■ entspricht den Lösungen mit 10^{-2} mol/l Ethanol und NaCl. Außerdem sind die Ergebnisse für Lösungen mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Hexanol und C₆TAB (□), C₈TAB (○) und C₁₂TAB (▽) abgebildet.

ionenstärke der Lösung durch Addition der Ionenstärke der reinen Tensidlösung und des reinen Puffers berechnen kann.

Die Kurven der Aktivität von HLADH für die pseudotären Lösungen mit C₆TAB, C₈TAB und C₁₀TAB ähneln der Kurve, die für Ethanol/NaCl erhalten wurde, verblüffend, wie man in den Abbildungen 5.11 und 5.12 sehen kann. Besonders groß ist die Ähnlichkeit für die Kurve von C₆TAB. Man könnte dies möglicherweise so deuten, daß die Wechselwirkungen zwischen diesen drei Tensiden und HLADH mehr oder weniger dieselben sind wie zwischen HLADH und Natriumchlorid und im wesentlichen elektrostatischer Natur sind.

Hingegen besitzen die Kurven für C₁₂TAB und C₁₄TAB für kleine Ionenstärken ein deutlich anderes Aussehen als die Kurven der anderen drei Tenside und Ethanol/NaCl. Dies mag vielleicht darauf beruhen, daß C₁₂TAB und C₁₄TAB mit HLADH nicht nur elektrostatische sondern auch hydrophobe Wechselwirkungen zeigen.

5.3.5 HLADH in ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol/TES-Puffer}$ bei konstanten Molzahlenverhältnissen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$

Im Falle der ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol/TES-Puffer}$ bei konstanten Molzahlenverhältnissen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ würde eine Auftragung der Aktivität von HLADH als Funktion der Ionenstärke im wesentlichen keine neuen Informationen im Vergleich zu Abbildung 4.73 in Abschnitt 4.4.5 liefern. Die Situation ist für die ternären Lösungen eine andere als für die pseudobinären, da ja die 1-Hexanolkonzentration mit steigender Tensidkonzentration zunimmt – mit dem Verhältnis $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$ als Proportionalitätsfaktor –, während sie im Fall der pseudobinären Lösungen konstant gehalten wird. Effekte der Ionenstärke bzw. der Wechselwirkungen zwischen HLADH und $C_{12}\text{TAB}$ werden mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit von Einflüssen von 1-Hexanol auf Enzym und Tensid überlagert.

Betrachtet man die Kurven für die Aktivität von HLADH in $C_{12}\text{TAB}$ -freien 1-Hexanol-Lösungen und ternären Lösungen konstanten Tensid/Alkohol-Verhältnisses in den Abbildungen 4.75 und 4.75 in Abschnitt 4.4.5, so sind sie gegeneinander verschoben, zeigen aber eine ähnliche Form, wie bereits erläutert wurde. Das „Maximum“ für tensidfreie Lösungen liegt bei bedeutend niedrigeren 1-Hexanol-Konzentrationen als die Maxima von ternären Lösungen mit $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol} = 8:1, 4:1, 2:1$ und $1:1$. Die Maxima dieser vier Lösungssysteme verschieben sich in der genannten Reihenfolge hin zu höheren Alkoholkonzentrationen.

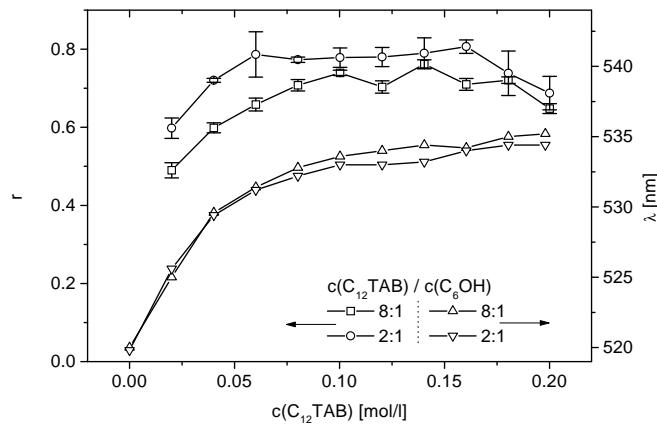


Abbildung 5.13: Auftragung der Aktivität r von HLADH und der Wellenlänge des Maximums, λ_{max} , von ST als Funktion der $C_{12}\text{TAB}$ -Konzentration in ternären Lösungen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol/TES-Puffer}$ bei konstanten Molzahlenverhältnissen $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol}$. Die Kurven für r und λ_{max} für $C_{12}\text{TAB}/1\text{-Hexanol} = 8:1$ und $2:1$ wurden jeweils mit verschiedenen y-Achsen aufgetragen. Die Zuweisungen zur jeweiligen Achse sind in der Legende angegeben.

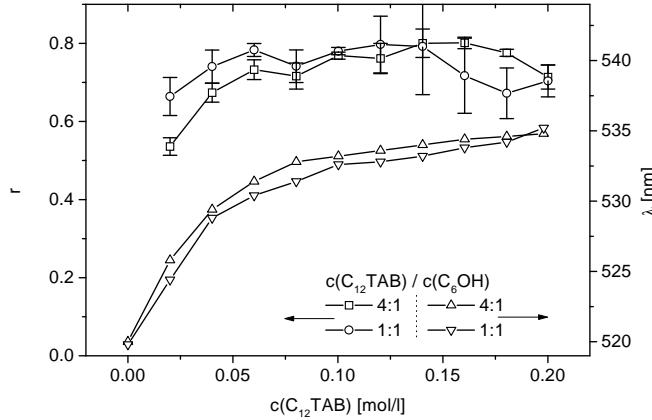


Abbildung 5.14: Auftragung der Aktivität r von HLADH und der Wellenlänge des Maximums, λ_{\max} , von ST als Funktion der C_{12} TAB-Konzentration in ternären Lösungen C_{12} TAB/1-Hexanol/TES-Puffer bei konstanten Molzahlenverhältnissen C_{12} TAB/1-Hexanol. Die Kurven für r und λ_{\max} für C_{12} TAB/1-Hexanol = 4:1 und 1:1 wurden jeweils mit verschiedenen y-Achsen aufgetragen. Die Zuweisungen zur jeweiligen Achse sind in der Legende angegeben.

Da eine Anpassung analog zum Fit der Aktivität von HLADH als Funktion der 1-Hexanol-Konzentration in Abschnitt 5.3.3 mit Gleichung 5.4 bedeutend schlechtere Korrelationskoeffizienten für die Lösungen mit C_{12} TAB/1-Hexanol = 8:1, 4:1, 2:1 und 1:1 lieferte als für die tensidfreie Lösung, wird auf die Darstellung und Diskussion der Resultate verzichtet.

Zur Ergänzung sollen die Veränderungen der Aktivität von HLADH mit den Veränderungen des Maximums von ST verglichen werden.

Betrachtet man die Kurven der Aktivität r von HLADH und der Wellenlänge des Maximums, λ_{\max} , von ST, die in den Abbildungen 5.13 und 5.14 dargestellt sind, so fällt die große Ähnlichkeit bei niedrigen und mittleren Tensidkonzentrationen auf. Daß Mizellen in den betrachteten Konzentrationsbereichen vorliegen, zeigen der Verlauf der Kurven für λ_{\max} von ST und von Preu [10] durchgeführte Streumessungen. Mit steigender Tensidkonzentration kann offenbar mehr 1-Hexanol bzw. ST in die Mizellen, deren Konzentration und/oder Größe zunimmt, eingebaut werden.

Die Ursache für die Verschiebung der Maxima der Aktivitätskurven bei der Auftragung als Funktion der 1-Hexanolkonzentration (vgl. Abbildungen 4.75 und 4.75 in Abschnitt 4.4.5) könnte sein, daß immer mehr 1-Hexanol in die Mizellen eingelagert wird, je kleiner das C_{12} TAB/1-Hexanol-Verhältnis ist. Daß bei sehr hohen Tensidkonzentrationen und damit auch hohen Alkoholkonzentrationen die Aktivität von HLADH allmählich wieder sinkt, könnte verschiedene Ursachen haben. Entweder kommt es durch zu hohe 1-Hexanol-Konzentrationen in der wäßrigen Pseudophase zur Inhibition des Enzyms oder durch die

hohen Tensidkonzentrationen und damit hohen Ionenstärken. Denkbar ist auch, daß beide Arten der Inhibition von HLADH gleichzeitig auftreten. Vergleichbare Ideen stellen Viparelli et al. [37] in ihrem Artikel dar.

5.3.6 HLADH in Mischungen mit hoher 1-Hexanol-Konzentration und mittlerer C_x TAB-Konzentration

In Abschnitt 4.4.6 konnte gezeigt werden, daß HLADH auch in Mischungen mit hoher 1-Hexanol- und mittlerer C_x TAB-Konzentration, d. h. im Bereich inverser Mizellen, aktiv ist. Betrachtet man die Abbildungen 4.78 bis 4.82 sowie die Tabelle 4.8, so stellt man fest, daß für steigende Wassergehalte bei gleichem Tensidgehalt die Extinktionsänderung vom Anfang bis zum Ende einer Messung immer größer wird. Dies gilt für alle C_x TABs. Zur Verdeutlichung dieses Phänomens ist in Abbildung 5.15 die zeitliche Änderung der Extinktion ($\Delta A/\Delta t$), die aus den Werten in Tabelle 4.8 berechnet wurde, als Funktion der Tensidkettenlänge x der C_x TABs für steigende Wassergehalte dargestellt.

In der Literatur stößt man bei Enzymen in inversen Mikroemulsionen bzw. Mizellen ebenfalls auf dieses Phänomen. Mit steigendem w_o -Wert, d. h. zunehmendem Wasser/Tensid-Verhältnis steigt in vielen Fällen die Aktivität der in inverse Mizellen eingelagerten Enzyme, bevor ein Maximum erreicht wird und dann die Enzymaktivität wieder zu sinken beginnt. Beispielsweise zeigen Freeman et al. [120], daß die Reaktionsgeschwindigkeit von Chymotrypsin bei der Hydrolyse von N-Glutaryl-L-phenylalanin-p-nitroanilid in inversen Mizellen von AOT/Natriumtaurocholat in Heptan zu- und wieder abnimmt, wenn der Wassergehalt steigt. Stamatis et al. [21] präsentieren ein vergleichbares Bild für die Aktivität

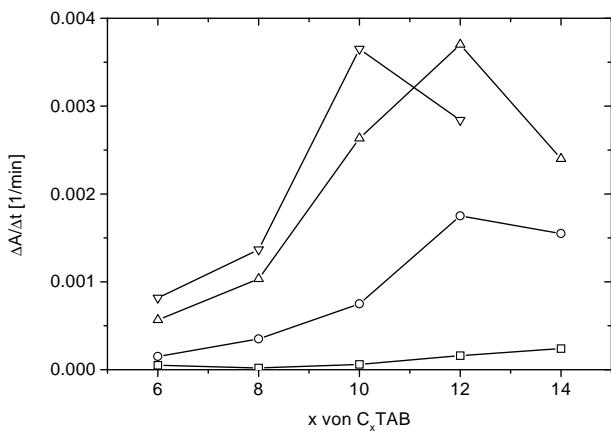


Abbildung 5.15: Abhängigkeit der zeitlichen Extinktionsänderung $\Delta A/\Delta t$ von Tensidkettenlänge x und Wassergehalt in Lösungen mit hoher 1-Hexanol- und mittlerer C_x TAB-Konzentration. Der Wassergehalt steigt in der Reihenfolge $\square < \circ < \triangle < \nabla$.

verschiedener Lipasen bei der Veresterung von Hexanol und Ölsäure in inversen Mizellen im System AOT/Isooctan/Wasser.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die Tatsache, daß mit steigendem Wasser-gehalt die Größe der inversen Mizellen zunimmt [21, 26]. Man findet bei manchen Enzymen das Aktivitätsoptimum eines Enzyms in dem w_o -Bereich, in dem die Größe der inversen Mi-zellen ungefähr der Größe des Enzyms entspricht. Zusätzlichen Einfluß auf die Aktivität hat die Lage des Enzyms in der inversen Mizelle [19, 21].

5.4 HLADH in C₁₂E₂₃-haltigen und -freien Lösungen

5.4.1 HLADH in binären Systemen Alkohol/Glycin-Puffer ohne Tensid

Die Aktivität von HLADH zeigt für fast alle n-Alkanole sowie für 1,5-Pentandiol eine vergleichbare Abhängigkeit von der Alkoholkonzentration wie in Abbildung 5.5 für 1-Hexanol in TES-Puffer dargestellt wurde. Dies bedeutet, daß HLADH offenbar auch im Glycin-Puffer durch das Substrat Alkohol kompetitiv gehemmt wird, was nicht überrascht. Eine Anpassung mit Hilfe der Gleichung 5.4 für unkompetitive Hemmung (vgl. Abschnitt 5.3.3) wurde zwar versucht, lieferte aber keine überzeugenden Ergebnisse, was die Korrelationskoeffizienten betraf, und vor allem andere Werte für die Maxima der Kurven als die graphisch bestimmten. Auf eine Darstellung der Fitergebnisse wurde daher verzichtet.

Wie bereits erwähnt wurde, sinkt die Konzentration, an der das Maximum der Enzymaktivität auftritt, mit steigender Kettenlänge des Alkohols, d. h. von Ethanol zu 1-Heptanol. Man kann dies so deuten, daß HLADH eine höhere Affinität zu längerkettigen Alkoholen besitzt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Martinek et al. [25] aus Messungen in wäßriger Pufferlösung.

Nur bei 1-Heptanol und 1,7-Heptandiol treten für hohe Alkoholkonzentrationen Abweichungen vom erwarteten Verhalten auf: die Enzymaktivität bleibt mehr oder weniger konstant. Für 1-Heptanol trifft dies auf den Konzentrationsbereich zwischen $4.2 \cdot 10^{-6}$ mol/g $\approx 4.2 \cdot 10^{-3}$ mol/l und der Löslichkeitsgrenze oberhalb von $8.6 \cdot 10^{-6}$ mol/g $\approx 8.6 \cdot 10^{-3}$ mol/g mit Aktivitätswerten zwischen 0.87 und 0.94 zu. Nahezu konstante HLADH-Aktivitäten zwischen 1.26 und 1.34 findet man für 1,7-Heptandiol im Konzentrationsbereich zwischen $7.6 \cdot 10^{-6}$ mol/g $\approx 7.6 \cdot 10^{-3}$ mol/l und der Mischbarkeitsgrenze oberhalb von $1.6 \cdot 10^{-4}$ mol/l ≈ 0.16 mol/l.

In den Artikeln von D'Arrigo et al. [121] und Gliński et al. [122] ist eine mögliche Erklärung zu finden. D'Arrigo et al. stellen die Ergebnisse von SANS-Experimenten an wäßrigen Lösungen verschiedener Diole und Triole dar und geben an, daß sie am Spektrum einer Lösung mit 0.7 mol/l 1,7-Heptandiol typische Anzeichen für ein System mit Aggregaten und Konzentrationsfluktuationen erkannten. Darüberhinaus geben sie CMC-Werte für 1,6-Hexandiol und 1,7-Heptandiol an, nämlich 0.15 bis 0.20 mol/l bzw. 0.12 mol/l. Gliński et al. schließen aus ungewöhnlichem Verhalten von wäßrigen 1,5-Pentandiol-Lösungen bei der Messung der Oberflächenspannung, daß möglicherweise Mizellartige Gebilde an der Oberfläche vorliegen. Zana [52] stellt in einem Übersichtsartikel ebenfalls dar, daß in wäßrigen Lösungen von Alkoholen diese Assoziate bilden können. Die Assoziate bestehen aber wahrscheinlich nur aus wenigen Molekülen und haben keine lange „Lebenszeit“.

Es ist also durchaus denkbar, daß im oben genannten Konzentrationsbereich für 1,7-Heptandiol bzw. 1-Heptanol (mizellartige) Aggregate, bestehend aus Alkoholmolekülen, auftreten, was dazu führt, daß die Konzentration an freiem Alkohol in etwa konstant bleibt. Die Folge davon ist eine ungefähr gleichbleibende Aktivität von HLADH.

Für die Lösungen zur Aktivitätsbestimmung von HLADH konnte eine Konzentration von ≈ 0.16 mol/l an 1,7-Heptandiol nicht überschritten werden, ohne trübe Lösungen zu erhalten, obwohl D'Arrigo et al. [121] ihre Messungen in Lösungen mit 0.7 mol/l 1,7-Heptandiol bei 20°C durchführen konnten. Dies mag am Einfluß des Glycin-Puffers liegen.

Ob mit 1-Oktanol vergleichbare Effekte wie bei 1-Heptanol und 1,7-Heptandiol auftreten, ist nicht feststellbar, da die Löslichkeit von 1-Oktanol in Wasser zu gering ist.

5.4.2 HLADH in ternären Systemen mit $C_{12}E_{23}$ /Alkohol/Glycin-Puffer

In Abschnitt 4.5.2 wurde die Lage der Maxima der Aktivität von HLADH für die verschiedenen ternären $C_{12}E_{23}$ /Alkohol/Wasser-Systemen bereits dargestellt.

Die Aktivitätskurven für Ethanol bzw. 1-Propanol und steigende $C_{12}E_{23}$ -Konzentrationen als Funktion der Alkoholkonzentration bleiben im Prinzip gleich, was die Konzentration am Maximum und die Kurvenform betrifft. Man kann dies der Tatsache zuschreiben, daß Ethanol und 1-Propanol als relativ kurzkettige Alkohole nicht in die Mizellen eingebaut werden und somit ihre Konzentration in der wäßrigen Pseudophase auch bei höherer Tensidkonzentration konstant bleibt. Damit deckt sich auch, daß die Verteilungskoeffizienten zwischen wäßriger und Mizellarer Pseudophase für beide Alkohole ungefähr 0 sind. Allerdings sinkt die Aktivität am Maximum im Fall von Ethanol mit steigender Tensidkonzentration, was sich nur schlecht erklären läßt. Ethanol und 1-Propanol sind somit Kosolventien. Karukstis et al. [54] kamen für Ethanol bzw. 1-Propanol in Lösungen mit $C_{12}TAB$, $C_{14}TAB$ oder $C_{16}TAB$ ebenfalls zu diesem Ergebnis.

Für die ternären Systeme mit 1-Butanol bis 1-Dekanol zeigt sich, daß die Maxima mit steigender Tensidkonzentration immer mehr zu höheren Alkoholkonzentrationen verschoben werden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß immer mehr Alkohol in die Mizellen eingebaut wird, was auch durch die Werte des Verteilungskoeffizienten p für die verschiedenen „längerkettigen“ Alkohole und Tensidkonzentrationen belegt wird. Mit steigender Tensidkonzentration steigt ja auch die Anzahl der Mizellen in der Lösung. Die Alkohole ab 1-Butanol bis 1-Dekanol können als Koaggregate oder Kotenside betrachtet werden, wobei eine Unterscheidung ähnlich der, die Karukstis et al. [54] treffen, anhand der Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen nicht möglich ist.

Man sieht zudem, daß für die Alkohole mit den größten Kettenlängen, nämlich 1-Oktanol, 1-Nonanol und 1-Dekanol, die Werte für A_{\max} deutlich geringer als für die anderen Alkohole sind. Man kann als Begründung anführen, daß die langkettigen Alkohole zwar eine größere Affinität zu HLADH aufweisen, daß sie aber bei weitem nicht so gut umgesetzt werden wie Alkohole mit geringerer Kettenlänge.

Darüberhinaus läßt sich feststellen, daß im Falle der Systeme mit 1-Pentanol und 22 Gew% $C_{12}E_{23}$ die Aktivität von HLADH für große 1-Pentanol-Konzentrationen auf verhältnismäßig hohem Niveau erhalten bleibt und bei einer weiteren Erhöhung der Alkoholkonzentration nicht abfällt, sondern im Gegenteil wieder ansteigt. Zu ähnlichen Ergebnissen waren bereits Meziani et al. [34] gekommen. Vielleicht ändert sich mit steigender 1-Pentanol-Konzentration der Verteilungskoeffizient zwischen mizellarer und wäßriger Pseudophase, was dazu führen könnte, daß die tatsächliche Alkoholkonzentration in der wäßrigen Pseudophase sinkt und somit das Enzym wieder eine höhere Aktivität zeigt.

Preu et al. [15] konnten die Verteilungskoeffizienten verschiedener Alkohole in den ternären Systemen $C_{12}E_{23}$ /Alkohol/ D_2O bei einer $C_{12}E_{23}$ -Konzentration von 8 Gew% aus Neutronenstreuexperimenten bestimmen. Die in dieser Arbeit bestimmten Werte sind in Tabelle 5.5 den Werten aus [15] gegenübergestellt.

Es zeigt sich, daß die Werte für die Verteilungskoeffizienten zwar nicht identisch sind, aber doch die Tendenz für steigende Kettenlänge n der Alkohole ähnlich ist.

Betrachtet man die Ergebnisse für die beiden verwendeten Diole, so zeigen sich doch deutliche Unterschiede. 1,5-Pentandiol verhält sich eher wie die kurzkettigen Alkohole Ethanol und 1-Propanol. Die Form der Aktivitätskurven verändert sich mit steigendem $C_{12}E_{23}$ -Gehalt kaum, nur für 22 Gew% Tensid ist das Maximum etwas zu höheren Diol-Konzen-

Tabelle 5.5: Vergleich der Verteilungskoeffizient verschiedener Alkohole (C_nOH) in Lösungen mit 8 Gew% $C_{12}E_{23}$ aus Experimenten mit HLADH und aus Neutronenstreuexperimenten (SANS) [15]

n	4	5	6	7
HLADH	0.5	0.5	0.9	0.84
SANS	0.15	0.38	0.9	0.99

trationen hin verschoben, was zu einem Verteilungskoeffizienten von 0.33 führt. Dies kann durch einen stärkeren Einbau des Diols in die Mizellen, aber auch durch Schwankungen der Enzymaktivität verursacht sein. Bei 1,5-Pentandiol handelt es sich also ebenfalls um ein Kosolvens. Dieselbe Feststellung trafen Karukstis et al. [54].

Für niedrige Tensidkonzentrationen zeigt sich, daß die Form der Aktivitätskurve des Enzyms HLADH in den ternären Systemen mit 1,7-Heptandiol ungefähr gleich bleibt. Nur das Maximum verschiebt sich allmählich zu höheren Alkoholkonzentrationen, wenn die Tensidkonzentration ansteigt. Besonders deutlich ist die Verschiebung des Maximums zu höheren Alkoholkonzentrationen für die ternären Systeme mit 22 Gew% $C_{12}E_{23}$, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß besonders viel 1,7-Heptandiol in die Mizellen eingebaut werden kann.

An sich steht dies im Widerspruch zu den Ergebnissen von Karukstis et al. [54], daß sich auch 1,7-Heptandiol als Kosolvens verhält. Cañadas et al. [123] trafen ebenfalls die Aussage, daß α,ω -Alkandiole sich wie kurzkettige Alkohole verhalten, da sie an der Mizelloberfläche solubilisiert werden. Allerdings sollte man berücksichtigen, daß diese Autoren Diole in Lösungen mit kationischen Tensiden untersuchten, es sich aber bei $C_{12}E_{23}$ um ein nichtionisches Tensid handelt. Nichtionische Tenside verhalten sich, was die Wechselwirkung mit Alkoholen betrifft, etwas anders als ionische Tenside. Beispielsweise setzen Alkohole die CMC nichtionischer Tenside bei weitem nicht so stark herab als die ionischer Tenside [124]. Darüber hinaus kann es auch zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen nichtionischen Tensiden und Alkoholen kommen [49]. Was ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden sollte, ist die deutlich größere polare Kopfgruppe von $C_{12}E_{23}$ im Vergleich zu ionischen Tensiden wie C_xTABS oder SDS, wie in Abbildung 2.2 in Abschnitt 2.1.1 zu sehen ist.

Man kann sich also durchaus vorstellen, daß 1,7-Heptandiol in Lösungen ionischer Tenside als Kosolvens wirkt, in Lösungen nichtionischer Tenside wie $C_{12}E_{23}$ als Kotensid oder Koaggregat.

5.4.3 HLADH im Bereich der CMC von $C_{12}E_{23}$ in Ethanol- bzw. 1-Pentanol-haltigen Lösungen

Die in den Abbildungen 4.100 und 4.101 in Abschnitt 4.5.3 dargestellten Kurven für die Aktivität von HLADH in Lösungen verschiedener Ethanol- bzw. 1-Pentanol-Konzentration weisen im Bereich von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l $C_{12}E_{23}$ einen Knick, z. T. auch ein Minimum in der Aktivität auf. Man könnte dies einer Inhibition des Enzyms HLADH durch die Tensidmoleküle zuschreiben.

Der Anstieg nach diesem Knick ist möglicherweise dadurch bedingt, daß es zu prämizellärer Aggregation des nichtionischen Tensids kommen könnte. Die Bildung von Aggregaten hätte zur Folge, daß die Inhibition des Enzyms durch die Tensidmoleküle reduziert würde. Außerdem würden sich im Fall der 1-Pentanol-haltigen Lösungen die Wechselwirkungen zwischen Tensid und Alkohol ändern. Man könnte sich vorstellen, daß 1-Pentanol – in Abhängigkeit von seiner Konzentration – bereits in die prämizellaren Aggregate eingebaut wird.

Der deutliche Anstieg der Aktivität von HLADH in Lösungen mit $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Pentanol bis zu 0.1 mol/l Tensid könnte dadurch bedingt sein, daß 1-Pentanol hauptsächlich in der wäßrigen Pseudophase vorliegt, daß aber durch die vermehrte Bildung von Tensidassoziaten mit steigender $C_{12}E_{23}$ -Konzentration das Volumen der wäßrigen Pseudophase allmählich reduziert wird. Dies hätte zur Folge, daß die Konzentration von 1-Pentanol in der wäßrigen Pseudophase zunimmt.

Da eine Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Pentanol niedriger als die Konzentration c_{\max} in binärer Lösung mit 1-Pentanol/Glycin-Puffer ($c_{\max} = 2 \cdot 10^{-6}$ mol/g $\approx 2 \cdot 10^{-3}$ mol/l) ist, steigt mit zunehmender 1-Pentanol-Konzentration die Enzymaktivität bis zum Maximum und fällt dann wieder ab – analog zum Verlauf der Aktivität in binärer Lösung. Für sehr hohe Tensidkonzentrationen könnte die Inhibition von HLADH durch das Tensid wieder dominierend werden oder aber es wird vielleicht deutlich mehr 1-Pentanol in die Mizellen eingebaut, was Erklärungen für den starken Abfall der Enzymaktivität oberhalb von 0.1 mol/l $C_{12}E_{23}$ wären.

Die Lösungen mit $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l, $7.5 \cdot 10^{-3}$ mol/l und $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l 1-Pentanol liegen bereits bei höheren Konzentrationen als c_{\max} in binärer Lösung mit 1-Pentanol/Glycin-Puffer. Hier scheint bis zu einer $C_{12}E_{23}$ -Konzentration von 0.01 mol/l die Konzentration von 1-Pentanol in der wäßrigen Pseudophase nahezu konstant zu bleiben, was die relativ konstante Enzymaktivität erklären könnte. Oberhalb von 0.01 mol/l $C_{12}E_{23}$ kommt es zu einem Anstieg der HLADH-Aktivität, was dadurch bedingt sein dürfte, daß allmählich immer mehr 1-Pentanol in die Mizellen eingebaut wird, so daß die nominelle Konzentration in der wäßrigen Pseudophase abnimmt und man sich dem Maximum der Aktivität in binärer Lösung nähert. Oberhalb von 0.1 mol/l $C_{12}E_{23}$ sinkt die Aktivität von HLADH wieder, was ähnliche Ursachen haben dürfte wie im Fall der Lösungen mit $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l 1-Pentanol.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Die Auswirkungen der Strukturierung von Tensidlösungen auf das Enzym Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) und den Farbstoff Safranin T (oder Safranin O; kurz ST) wurden in dieser Arbeit untersucht. HLADH wurde in den ternären Systemen C_x TAB/1-Hexanol/Wasser (mit $x = 6, 8, 10, 12, 14$) sowie $C_{12}E_{23}$ /Alkohol/Wasser (Alkohol = n-Alkanol mit $n = 2, 3, \dots, 10$, oder α,ω -n-Alkandiol mit $n = 5, 7$) eingesetzt, ST nur in den ternären Systemen mit C_x TAB. Zur Ergänzung der C_x TAB-Untersuchungen wurden Leitfähigkeitsmessungen durchgeführt und Phasendiagramme bestimmt. Alle Messungen fanden bei 25°C statt.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- ST ist dazu geeignet, die CMC kationischer Tenside vom C_x TAB-Typ zu bestimmen, vorausgesetzt die CMC ist nicht zu niedrig oder zu wenig ausgeprägt.
- ST kann offensichtlich dazu verwendet werden, Aggregationszahlen von Mizellen kationischer Tenside aus UV/Vis-Spektren zu bestimmen.
- HLADH reagiert sensibel auf steigende Ionenstärken und Tensidkonzentrationen im Bereich der CMC der Tenside vom C_x TAB-Typ.
- HLADH ist in Lösungen mit konstantem C_{12} TAB/1-Hexanol-Verhältnissen bei deutlich höheren Alkoholkonzentrationen aktiv als in tensidfreier Lösung.
- HLADH läßt sich auch ohne zusätzliche organische Lösungsmittelzusätze in Systemen mit „inversen“ Mizellen von C_x TAB-Tensiden, 1-Hexanol und Puffer einsetzen.
- Das Verhalten von verschiedenen Alkoholen in Lösungen mit $C_{12}E_{23}$ kann mit Hilfe von HLADH im Hinblick auf den Kotensid- oder Kosolvenscharakter der Alkohole untersucht werden.
- HLADH reagiert in Abhängigkeit vom verwendeten Alkohol mehr oder weniger empfindlich auf die Zunahme der Tensidkonzentrationen im Bereich der CMC von $C_{12}E_{23}$.

Die Nanostrukturierung der mizellaren Systeme wurde z. T. durch UV/VIS-spektroskopische Messungen mit ST sowie durch Leitfähigkeitsmessungen in dieser Arbeit bestätigt – und bzw. oder durch verschiedene Streumessungen [10, 15, 34]. Es handelt sich bei der UV/Vis-spektroskopischen Bestimmung der CMC um eine weitere, relativ leicht anwendbare Methode zur Bestimmung der CMC. Um zu verifizieren, daß auch aus UV/Vis-Spektren von

Farbstoff-Mizell-Komplexen Aggregationszahlen bestimmbar sind und nicht nur aus Fluoreszenzmessungen an diesen Komplexen oder aus Streumessungen, sollten jedoch in weiteren Studien andere Farbstoff-Tensid-Paare untersucht werden als die hier eingesetzten.

Es konnte festgestellt werden, daß Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber ein teilweise sehr empfindlicher Sensor für die Nanostrukturierung des sie umgebenden flüssigen Mediums ist. Das Verhalten von verschiedenen Alkoholen in Lösungen mit $C_{12}E_{23}$ konnte mit Hilfe von HLADH im Hinblick auf den Kotensid- oder Kosolvenscharakter der Alkohole aufgeschlüsselt werden. HLADH ist hierfür relativ gut geeignet, da die Aktivität dieses Enzyms mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie bestimmt werden kann und keinen großen apparativen Aufwand erfordert.

Erfreulich ist die Möglichkeit, HLADH auch in direkten und inversen Mizellen kationischer Tenside einsetzen zu können, wie am Beispiel der ternären Systeme $C_xTAB/1\text{-Hexanol/TES}$ -Puffer gezeigt werden konnte. Weitere Untersuchungen dieser ternären Systeme, z. B. im Hinblick auf den Einfluß des Puffers, sind noch notwendig, um das Bild abzurunden, da ja in dieser Arbeit zunächst nur erste Versuche unternommen werden konnten.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse könnten durchaus im Hinblick auf eine spätere biotechnologische Anwendung von HLADH interessant sein.

Anhang A

Ergänzungen zu den Untersuchungen an ST-haltigen Lösungen

A.1 Korrekturverfahren für die ST-haltigen und tensidfreien Lösungen

Da es zu einer Adsorption von ST in tensidfreier Lösung an Glasgefäßen kommt, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben wurde, müssen die Extinktionswerte dieser Lösungen korrigiert werden. Diese Korrektur wird nachfolgend beschrieben.

Extrapoliert man die in Abschnitt 4.3.1 in den Abbildungen 4.19 bis 4.23 dargestellten Kurven für Wellenlänge und Extinktion am Maximum bei rund 520 nm für C_x TAB-haltige Lösungen ($x = 6, 8, 10, 12$ und 14) mit 10^{-5} mol/l ST auf $c(C_x\text{TAB}) = 0$, d. h. tensidfreie Lösung, so erhält man die in Abbildung A.1 und Tabelle A.1 dargestellten Kurven. Durch eine weitere Extrapolation auf $x = 0$ ergibt sich für die Wellenlänge des Maximums in tensidfreier Lösung und eine ST-Konzentration von 10^{-5} mol/l ein Wert von 520 ± 1 nm und für die Extinktion ein Wert von 0.37 ± 0.01 .

Tabelle A.1: Ergebnisse der Extrapolation auf $c(C_x\text{TAB}) = 0$ und $x = 0$

x	λ	A
6	519.63514	0.38211
8	519.77269	0.38883
10	519.72139	0.3944
12	520.01455	0.39432
14	519.77269	0.3946
0	520 ± 1	0.37 ± 0.01

Die Herleitung der korrigierten Extinktion in tensidfreier Lösung wird nun beschrieben. Seien λ_1 und λ_2 zwei Wellenlängen im UV/Vis-Spektrum und $A(\lambda_i)_r$, $i = 1, 2$, die Extinktion einer Referenz r der Konzentration c_r und der Schichtdicke d_r sowie $A(\lambda_i)_u$, $i = 1, 2$, die Extinktion einer unkorrigierten Probe u der unbekannten Konzentration c_u und der Schichtdicke d_u bei diesen beiden Wellenlängen. Die korrigierte Extinktion $A(\lambda_1)_k$ der Probe bei einer korrigierten Konzentration c_k und der Schichtdicke $d_k = d_u$ lässt sich wie folgt herleiten:

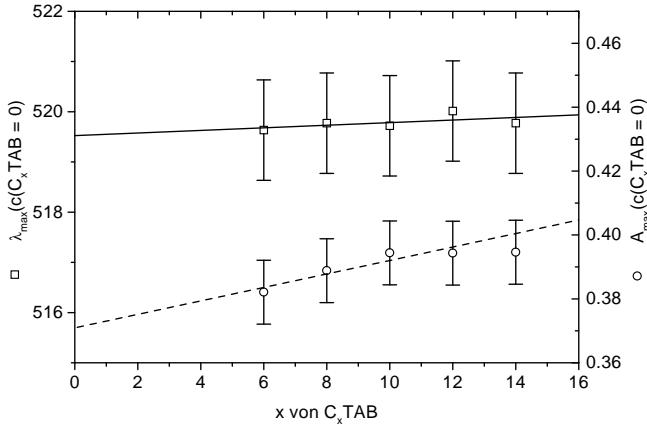


Abbildung A.1: Auftragung der Ergebnisse der Extrapolation auf $c(C_x\text{TAB}) = 0$: Wellenlänge und Extinktion als Funktion von x für Lösungen mit 10^{-5} mol/l.

ten:

$$A(\lambda_2)_r = \varepsilon(\lambda_2) \cdot c_r \cdot d_r \quad (\text{A.1})$$

$$\Rightarrow \varepsilon(\lambda_2) = \frac{A(\lambda_2)_r}{c_r \cdot d_r} \quad (\text{A.2})$$

$$A(\lambda_2)_u = \varepsilon(\lambda_2) \cdot c_u \cdot d_u \quad (\text{A.3})$$

$$\Rightarrow c_u = \frac{A(\lambda_2)_u}{\varepsilon(\lambda_2) \cdot d_u} = \frac{A(\lambda_2)_u \cdot c_r \cdot d_r}{A(\lambda_2)_r \cdot d_u} \quad (\text{A.4})$$

$$A(\lambda_1)_k = \varepsilon(\lambda_1) \cdot c_k \cdot d_k \quad (\text{A.5})$$

$$A(\lambda_1)_u = \varepsilon(\lambda_1) \cdot c_u \cdot d_u \quad (\text{A.6})$$

$$\Rightarrow \varepsilon(\lambda_1) = \frac{A(\lambda_1)_u}{c_u \cdot d_u} = \frac{A(\lambda_1)_u \cdot A(\lambda_2)_r \cdot d_u}{A(\lambda_2)_u \cdot c_r \cdot d_r \cdot d_u} \quad (\text{A.7})$$

$$\Rightarrow A(\lambda_1)_k = \frac{A(\lambda_1)_u \cdot A(\lambda_2)_r}{A(\lambda_2)_u \cdot c_r \cdot d_r} \cdot c_k \cdot d_k \quad (\text{A.8})$$

Sinnvollerweise ist für λ_2 die extrapolierte Wellenlänge des Maximums in tensidfreier Lösung mit einem Wert von 520 ± 1 nm zu wählen, für die ST-Konzentration der Referenz $c_r = 10^{-5}$ mol/l und für die Extinktion $A(\lambda_2)_r$ der extrapolierte Wert von 0.37 ± 0.01 . c_k sollte genauso groß sein wie die ST-Konzentration in den entsprechenden tensidhaltigen Lösungen, in deren Auswertung A_k einfließt.

Da die UV/Vis-Spektren von ST in Wasser und in Puffer sich nicht nennenswert unterscheiden, kann in beiden Fällen diese Korrektur eingesetzt werden.

A.2 Fehlerabschätzung bei der Berechnung der Eigenschaften von Mizelle-ST-Komplexen

Es wurde die in Abschnitt 4.3.7 definierte Gleichung (c) für die Anpassung der Daten verwendet. Für die Fehlerbetrachtung wurden die Daten herangezogen, die auch für die Bestimmung der Aggregationszahl verwendet wurden, d. h. Lösungen mit einem Molzahlenverhältnis $C_{12}\text{TAB}/C_6\text{OH} = 1:1$, Tensidkonzentrationen zwischen 0 und 0.2 mol/l sowie ST-Konzentrationen von $i \cdot 10^{-5}$ mol/l ($i = 1, 2, 4, 8$). Die anzupassenden Daten bestanden aus einem aus allen ST-Konzentrationsreihen ohne die ersten beiden Tensidkonzentration zusammengefügten Datensatz – die Begründung hierfür ist ebenfalls in Abschnitt 4.3.7 zu finden. Es wurden zur Fehlerabschätzung drei verschiedenen Annahmen untersucht:

- die Tensidkonzentration, $c(C_{12}\text{TAB})$, oder
- die Farbstoffkonzentration, $c(\text{ST})$, oder
- die CMC des $C_{12}\text{TAB}/C_6\text{OH}$ -Gemisches

besitzt einen Fehler von $\pm 10\%$. Die Ergebnisse sind in Tabelle A.2 sowie in den Abbildungen A.2 bis A.5 dargestellt.

Folgende Feststellungen können gemacht werden:

- Die größten Auswirkungen auf $\Delta\epsilon$ hat der Fehler in der ST-Konzentration, die geringsten der Fehler in der CMC.
- Am deutlichsten wirkt sich der Fehler der Tensidkonzentration auf die Aggregationszahl aus, am schwächsten der Fehler der ST-Konzentration.
- Der Fehler der $C_{12}\text{TAB}$ -Konzentration hat den größten Einfluß auf die Komplexbildungskonstante K_k ($= K'$), der Fehler der ST-Konzentration den kleinsten.

Tabelle A.2: Einflüsse der verschiedenen Fehler auf die aus der Anpassung erhaltenen Größen bei der Komplexbildung zwischen Mizelle und ST

Fehlertyp	$\Delta\epsilon$ [l/mol/cm]	N_{AG} [-]	K [l/mol]	K_k [l/mol]	r_R [-]
—	27357	86	2087	24	0.99004
+10 % in $c(C_{12}TAB)$	27504	97	2069	21	0.9898
-10 % in $c(C_{12}TAB)$	27180	75	2110	28	0.99031
$\Rightarrow \pm$	177	11	23	4	—
+10 % in $c(ST)$	24870	78	1897	24	0.99004
-10 % in $c(ST)$	30397	95	2319	24	0.99004
$\Rightarrow \pm$	3040	9	232	0	—
+10 % in $c(CMC)$	27198	84	2107	25	0.99029
-10 % in $c(CMC)$	27519	88	2067	23	0.98977
$\Rightarrow \pm$	162	2	20	1	—

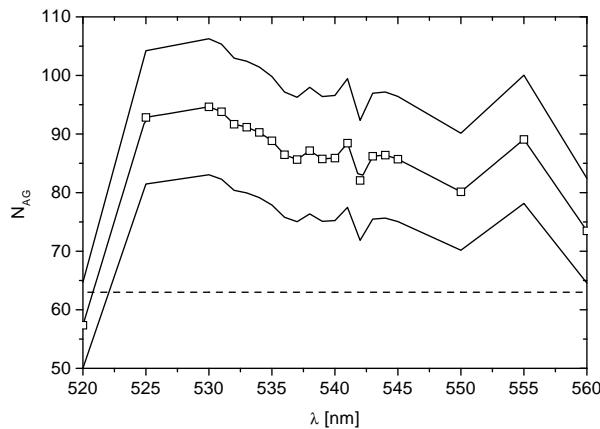


Abbildung A.2: Einflüsse von Fehlern der Tensidkonzentration auf die Aggregationszahl. Es wurde angenommen, daß die Tensidkonzentrationen einen Fehler von $\pm 10\%$ besitzen. Die Kurve ohne Fehler ist durch \square gekennzeichnet, die fehlerbehafteten Kurven entsprechen —— . Der Wert für die Aggregationszahl aus der Lichtstreuung ist als ----- dargestellt.

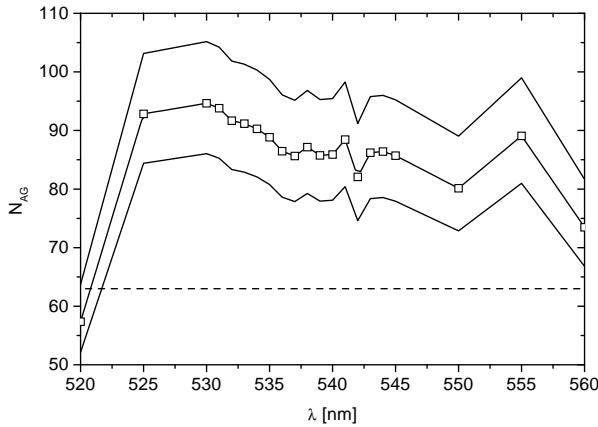


Abbildung A.3: Einflüsse von Fehlern der ST-Konzentration auf die Aggregationszahl. Es wurde angenommen, daß die ST-Konzentrationen einen Fehler von $\pm 10\%$ besitzen. Die Symbole und Linien haben dieselbe Bedeutung wie in Abbildung A.2.

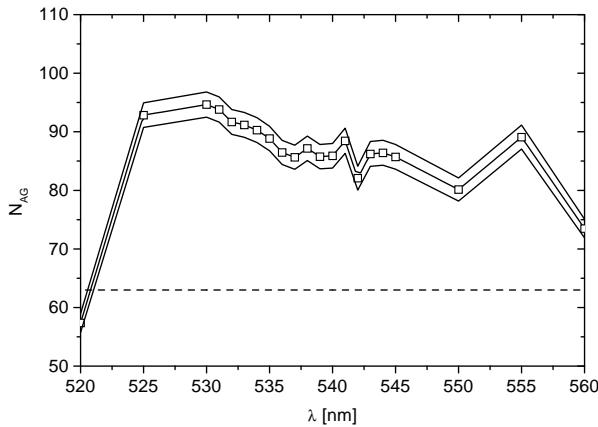


Abbildung A.4: Einflüsse von Fehlern der kritischen Mizellkonzentration auf die Aggregationszahl. Es wurde angenommen, daß die CMC einen Fehler von $\pm 10\%$ besitzt. Die Symbole und Linien haben dieselbe Bedeutung wie in Abbildung A.2.

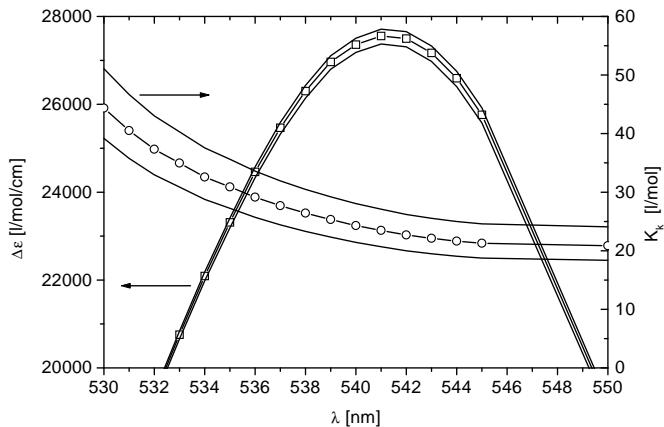


Abbildung A.5: Einflüsse von Fehlern der Tensidkonzentration auf die Extinktionskoeffizientendifferenz $\Delta\epsilon$ und die Komplexbildungskonstante K_k ($= K'$). Es wurde angenommen, daß die Tensidkonzentrationen einen Fehler von $\pm 10\%$ besitzen. $\Delta\epsilon$ ohne Fehler ist durch \square gekennzeichnet, K_k ohne Fehler durch \circ . Die fehlerbehafteten Kurven entsprechen —— . Die Zuordnung der jeweiligen Kurve zur entsprechenden y-Achse ist durch einen Pfeil angegeben.

Literaturverzeichnis

- [1] D. M. Bloor und W. Wyn-Jones, Eds. "The Structure, Dynamics and Equilibrium Properties of Colloidal Systems" , *NATO ASI Series C: Mathematical and Physical Sciences*, Vol. 324. Kluwer, Dordrecht, 1990.
- [2] D. N. Rubingh und P. M. Holland, Eds. "Cationic Surfactants. Physical Chemistry" , *Surfactant Science Series*, Vol. 37. Marcel Dekker, New York, 1991.
- [3] J. Cross und E. J. Singer, Eds. "Cationic Surfactants. Analytical and biological Evaluation" , *Surfactant Science Series*, Vol. 53. Marcel Dekker, New York, 1994.
- [4] E. D. Goddard und K. P. Ananthapadmanabhan, Eds. "Interactions of surfactants with polymers and proteins". CRC Press, 1993.
- [5] S. D. Christian und J. F. Scamehorn, Eds. "Solubilization in Surfactant Aggregates" , *Surfactant Science Series*, Vol. 55. Marcel Dekker, New York, 1995.
- [6] T. Dorfmüller, Ed. "Reactive and flexible molecules in liquids" , *NATO ASI Series C: Mathematical and Physical Sciences*, Vol. 291. Kluwer, Dordrecht, 1989.
- [7] U. Pfüller. "Mizellen - Vesikel - Mikroemulsionen. Tensidassoziate und ihre Anwendungen in Analytik und Biochemie" , *Anleitung für die chemische Laboratoriumspraxis*, Vol. 22. Springer-Verlag, Berlin, 1986.
- [8] G. Wedler. "Lehrbuch der Physikalischen Chemie". VCH, Weinheim, 1987. 3., durchgesehene Aufl.
- [9] R. Angelico, A. Ceglie, U. Olsson und G. Palazzo. Phase Diagram and Phase Properties of the System Lecithin-Water-Cyclohexane. *Langmuir*, Vol. 16:2124–2132, 2000.
- [10] H. Preu. "Licht- und Neutronenstreuexperimente an kationischen Tensiden. Dodecyltrimethylammoniumbromid". Dissertation, Universität Regensburg, 2001.
- [11] A. L. Lehninger. "Biochemie". VCH, Weinheim, 1987. 2., neubearbeitete u. erweiterte Aufl.
- [12] K. Drauz und H. Waldmann, Eds. "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook", Vol. 1. VCH, 1995.
- [13] E. Dickinson. Proteins in Solution and at Interfaces. In Goddard und Ananthapadmanabhan [4], pp. 295–318.

- [14] R. K. Dutta und S. N. Bhat. Interaction of phenazinium dyes and methyl orange with micelles of various charge types. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 106:127–134, 1996.
- [15] H. Preu, A. Zradba, S. Rast, W. Kunz, E. H. Hardy und M. D. Zeidler. Small angle neutron scattering of D₂O-Brij 35 and D₂O-alcohol-Brij 35 solutions and their modelling using the Percus-Yevick integral equation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol. 1:3321–3329, 1999.
- [16] K. Drauz und H. Waldmann, Eds. “Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook”, Vol. 2. VCH, 1995.
- [17] G. Carrea und S. Riva. Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese. *Angew. Chem.*, Vol. 112:2312–2341, 2000.
- [18] P. L. Luisi. Enzyme als Gastmoleküle in inversen Micellen. *Angew. Chem.*, Vol. 97:449–460, 1985.
- [19] Y. L. Khmel'nitskii, A. V. Levashov, N. L. Klyachko und K. Martinek. A Microheterogeneous medium for Chemical (Enzymic) Reactions Based on a Colloidal Solution of Water in an Organic Solvent. *Russ. Chem. Rev.*, Vol. 53:319–331, 1984.
- [20] C. M. L. Carvalho und J. M. S. Cabral. Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie*, Vol. 82:1063–1085, 2000.
- [21] H. Stamatis, A. Xenakis und F. N. Kolisis. Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases. *Biotechnology Advances*, Vol. 17:293–318, 1999.
- [22] Y. Miyake. Enzymatic reaction in water-in-oil microemulsions. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 109:255–262, 1996.
- [23] A. Lif und K. Holmberg. Chemical and enzymatic ester hydrolysis in a Winsor I system. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 129-130:273–277, 1997.
- [24] A. V. Levashov, Y. L. Khmelnitsky, K. L. Klyachko, V. Y. Chernyak und K. Martinek. Enzymes Entrapped into Reversed Micelles in Organic Solvents. *J. Colloid Sci.*, Vol. 88:444–457, 1982.
- [25] K. Martinek, A. V. Levashov, Y. L. Khmelnitsky, N. L. Klyachko und I. V. Berezin. Colloidal Solution of Water in Organic Solvents: A Microheterogeneous Medium for Enzymatic Reactions. *Science*, Vol. 218:889–891, 1982.
- [26] J.-P. Samama, K. M. Lee und J.-F. Biellmann. Enzymes and microemulsions. Activity and kinetic properties of liver alcohol dehydrogenase in ionic water-in-oil microemulsions. *Eur. J. Biochem.*, Vol. 163:609–617, 1987.
- [27] S. S. Lee, D. J. Kiserow und L. B. McGown. Enzyme Solubilization in a Reversed Micellar Microreactor with a Bile Salt Cosurfactant. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 193:32–40, 1997.

- [28] C. M. L. Carvalho, M. R. Aires-Barros und J. M. S. Cabral. An Integrated Model for Enzymatic Reactions in Reverse Micellar Systems: Nominal and Effective Substrate Concentrations. *Langmuir*, Vol. 16:3082–3092, 2000.
- [29] P. Lüthi und P. L. Luisi. Enzymatic Synthesis of Hydrocarbon-Soluble Peptides with Reverse Micelles. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 106:7285–7286, 1984.
- [30] E. A. Lissi und E. B. Abuin. A General Treatment for Meaningful Comparison of Rate Parameters of Enzyme-Catalyzed Reactions in Aqueous and Reverse Micellar Solutions. *Langmuir*, Vol. 16:10084–10086, 2000.
- [31] B. Orlich und R. Schomaecker. Enzymatic Reduction of a Less Water-Soluble Ketone in Reverse Micelles with NADH Regeneration. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 65:357–362, 1999.
- [32] B. Orlich, H. Berger, M. Lade und R. Schomäcker. Stability and Activity of Alcohol Dehydrogenases in W/O-Microemulsions: Enantioselective Reduction Including Cofactor Regeneration. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 70:638–646, 2000.
- [33] B. Orlich und R. Schomäcker. Candida Rugosa lipase reactions in nonionic w/o-microemulsion with a technical surfactant. *Enzyme Microbial Technol.*, Vol. 28:42–48, 2001.
- [34] A. Meziani, D. Touraud, A. Zradba, S. Pulvin, I. Pezron, M. Clausse und W. Kunz. Comparison of Enzymatic Activity and Nanostructures in Water/Ethanol/Brij 35 and Water/1-Pentanol/Brij 35 Systems. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 101 (18):3620–3625, 1997.
- [35] A. Stradner, B. Mayer, T. Sottmann, A. Hermetter und O. Glatter. Sugar Surfactant-Based Solutions as Host Systems for Enzyme Activity Measurements. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 103:6680–6689, 1999.
- [36] G. Marcozzi, C. Di Domenico und N. Spreti. Effects of Surfactants on the Stabilization of the Bovine Lactoperoxidase Activity. *Biotechnol. Prog.*, Vol. 14:653–656, 1998.
- [37] P. Viparelli, F. Alfani und M. Cantarella. Models for enzyme superactivity in aqueous solutions of surfactants. *Biochem. J.*, Vol. 344:765–773, 1999.
- [38] A. Meziani. “Formulation et caractérisation de microemulsions utilisables comme hôtes de réactions enzymatiques”. Dissertation, Université de Compiègne, 1992.
- [39] C. Schirmer. “Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Nanostrukturierung des Mediums”. Diplomarbeit, Universität Regensburg, 1998.
- [40] Y. Chevalier und T. Zemb. The structure of micelles and microemulsions. *Rep. Prog. Phys.*, Vol. 53:279–371, 1990.
- [41] K. P. Ananthapadmanabhan. Surfactant solutions: Adsorption and Aggregation Properties. In Goddard und Ananthapadmanabhan [4], pp. 5–58.

- [42] G. B. Behera, B. K. Mishra, P. K. Behera und M. Panda. Fluorescent probes for structural and distance effect studies in micelles, reversed micelles and microemulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, Vol. 82:1–42, 1999.
- [43] J. Cross. Introduction to Cationic Surfactants. In Cross und Singer [3], pp. 3–28.
- [44] R. G. Laughlin. Fabric Softening. In Rubingh und Holland [2], pp. 449–468.
- [45] D. Heinl. “Neue Fluoreszenzsonden vom 6-p-Toluidino-2-naphthyl-Typus. Studien zur Untersuchung von Tensid-Luminophor-Interaktionen bei CMC-Bestimmungen”. Dissertation, Universität Regensburg, 1995.
- [46] K. P. C. Vollhardt. “Organische Chemie”. VCH, Weinheim, 1990. 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage 1988.
- [47] P. W. Atkins. “Physikalische Chemie”. VCH, Weinheim, 1990. 2. korrigierter Nachdruck der 1. Aufl. 1987.
- [48] W. J. Moore und D. O. Hummel. “Physikalische Chemie”. de Gruyter, 4. Aufl., 1986.
- [49] M. Bourrel und R. S. Schechter, Eds. “Microemulsions and related systems: formulation, solvency, and physical properties”. Marcel Dekker, New York, 1988.
- [50] D. G. Marangoni und J. C. T. Kwak. Comparison of Experimental Methods for the Determination of the Partition Coefficients of n-Alcohols in SDS and DTAB Micelles. In Christian und Scamehorn [5], pp. 455–492.
- [51] R. Zana. Micellization of Cationic Surfactants. In Rubingh und Holland [2], pp. 41–85.
- [52] R. Zana. Aqueous surfactant-alcohol systems: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, Vol. 57:1–64, 1995.
- [53] H. Høiland und A. M. Blokhus. Solubilization of alcohols and alkanediols in aqueous surfactant solutions. In Bloor und Wyn-Jones [1], pp. 39–48.
- [54] K. K. Karukstis, N. D. D’Angelo und C. T. Loftus. Using the Optical Probe Methyl Orange To Determine the Role of Surfactant and Alcohol Chain Length in the Association of 1-Alkanols with Alkytrimethylammonium Bromide Micelles. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 101:1968–1973, 1997.
- [55] M. N. Jones und J. Piercy. Light Scattering Studies on n-Dodecyltrimethylammonium Bromide and n-Dodecylpyridinium Iodide. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, Vol. 68:1839–1848, 1972.
- [56] D. Attwood, A. Terreros, E. Lopez-Cabarcos und P. A. Galera-Gomez. Light Scattering Study of the Effect of n-Butanol on the Micellar Properties of Undecylammonium Chloride in Aqueous Electrolyte Solutions. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 225:25–31, 2000.
- [57] M. Pérez-Rodríguez, G. Prieto, L. M. Varela, F. Sarmiento und V. Mosquera. A Comparative Study of the Determination of the Critical Micelle Concentration by Conductivity and Dielectric Constant Measurements. *Langmuir*, Vol. 14:4422–4426, 1998.

- [58] A. Domínguez, A. Fernández, N. González, E. Iglesias und L. Montenegro. Determination of Critical Micelle Concentration by Three Techniques. *J. Chem. Educ.*, Vol. 10:1227–1231, 1997.
- [59] S. May und A. Ben-Shaul. Molecular Theory of the Sphere-to-Rod Transition and the Second CMC in Aqueous Micellar Solutions. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 105:630–640, 2001.
- [60] M. Pisářík, F. Devínsky und I. Lacko. Aggregation number of alkanediyl- α,ω -bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactants determined by static light scattering. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 172:138–144, 2000.
- [61] J. Sjöblom, R. Lindberg und S. E. Friberg. Microemulsions – phase equilibria characterization, structures, applications and chemical reactions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, Vol. 96:125–287, 1996.
- [62] M. D. Lechner, K. Gehrke und E. H. Nordmeier. “Makromolekulare Chemie. Ein Lehrbuch für Chemiker, Physiker, Materialwissenschaftler und Verfahrenstechniker”. Birkhäuser Verlag, Basel, 1993.
- [63] C. S. Dunaway, S. D. Christian und J. F. Scamehorn. Overview and History of the Study of Solubilization. In Christian und Scamehorn [5], pp. 3–34.
- [64] R. de Lisi und S. Milioto. Thermodynamics of Solubilization of Polar Additives in Micellar Solutions. In Christian und Scamehorn [5], pp. 59–114.
- [65] D. Schlee und H.-P. Kleber, Eds. “Biotechnologie”. No. 1 in Wörterbücher der Biologie, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1991.
- [66] R. Winter und F. Noll. “Methoden der Biophysikalischen Chemie”. B. G. Teubner, Stuttgart, 1998.
- [67] H. Eklund, J.-P. Samama, L. Wallen, C.-I. Branden, A. Akeson und T. A. Jones. Structure of triclinic ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.9 Angstroms resolution. *J. Mol. Biol.*, Vol. 146:561–..., 1981. PDB ID: 6ADH.
- [68] K. P. Ananthapadmanabhan. Protein-Surfactant Interactions. In Goddard und Ananthapadmanabhan [4], pp. 319–366.
- [69] C. H. Suelter. “Experimentelle Enzymologie. Grundlagen für die Laborpraxis”. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1990.
- [70] D. S. Dwyer und R. J. Bradley. Review - Chemical properties of alcohols and their protein binding sites. *Cell. Mol. Life Sci.*, Vol. 57:265–275, 2000.
- [71] H. Bisswanger. “Enzymkinetik. Theorie und Methoden”. VCH, Weinheim, 2. Aufl., 1994.
- [72] H.-H. Perkampus. “UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen”, *Anleitung für die chemische Laboratoriumspraxis*, Vol. 21. Springer-Verlag, 1986.

- [73] H. C. Evans. Alkyl Sulphates. Part I: Critical Micelle Concentration of the Sodium Salts. *J. Chem. Soc.*, Vol. 1:579–586, 1956.
- [74] L. Sepúlveda und J. Cortés. Ionization Degrees and Critical Micelle Concentrations of Hexadecyltrimethylammonium and Tetradecyltrimethylammonium Micelles with Different Counterions. *J. Phys. Chem.*, Vol. 89:5322–5324, 1985.
- [75] M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh. “Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie”. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Aufl., 1991.
- [76] C. Baar. “Dielektrische Relaxation kationischer Tenside. Alkyltrimethylammoniumhalogenide in wässriger Lösung”. Dissertation, Universität Regensburg, 2000.
- [77] R. Rodríguez, S. Vargas und D. A. Fernández-Velasco. Reverse Micelle Systems Composed of Water, Triton X-100 and Phospholipids in Organic Solvents. 1. Phase Boundary Titrations and Dynamic Light Scattering Analysis. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 197:21–28, 1998.
- [78] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling und B. P. Flannery. “Numerical Recipes in C. The Art of Scientific Computing”. Cambridge University Press, 2. Aufl., 1999.
- [79] G. Kortüm. “Lehrbuch der Elektrochemie”. VCH, Weinheim, 5. Aufl., 1972.
- [80] E. A. S. Cavell. Electrical Properties of Aqueous Solutions of Hexyl- and Decyltrimethylammonium Bromides. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, Vol. 80:447–454, 1984.
- [81] H. Nomura, S. Koda, T. Matsuoka, T. Hiyama, R. Shibata und S. Kato. Study of Salt Effects on the Micelle-Monomer Exchange Process of Octyl-, Decyl-, and Dodecyltrimethylammonium Bromide in Aqueous Solutions by Means of Ultrasonic Relaxation Spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 230:22–28, 2000.
- [82] S. P. Moulik, M. E. Haque, P. K. Jani und A. T. Das. Micellar Properties of Cationic Surfactants in Pure and Mixed States. *J. Phys. Chem.*, Vol. 100:701–708, 1996.
- [83] P. Ray, S. C. Bhattacharya und S. P. Moulik. Spectroscopic studies of the interaction of the dye safranine T with Brij micelles in aqueous medium. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, Vol. 108:267–272, 1997.
- [84] K. R. Acharya, S. C. Bhattacharya und S. P. Moulik. The surfactant -dependent behaviour of safranine T in Tween (20, 40, 60, 80) and Triton X-100 micellar media. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, Vol. 109:29–34, 1997.
- [85] S. C. Bhattacharya, S. Nandi und S. P. Moulik. Visible and fluorescence spectral studies on the interaction of Saframine T with reverse micelles of Triton X-100 and Tweens in chloroform. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, Vol. 97:57–63, 1996.
- [86] I. A. Pastre und M. G. Neumann. Protonation of the triplet state of safranine in the presence of cationic micelles and polyelectrolytes. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, Vol. 79:115–119, 1994.

- [87] S. C. Bhattacharya, H. Das und S. P. Moulik. Effects of solvent and micellar environment on the spectroscopic behaviour of the dye safranine T. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, Vol. 79:109–114, 1994.
- [88] G. Atun, G. Hisarlı und M. Tunçay. Adsorption of safranine-O on hydrophilic and hydrophobic glass surfaces. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 143:27–33, 1998.
- [89] S. D.-M. Islam, M. Fujitsuka und O. Ito. Photochemical reactions of triplet state of safranine-T studied by transient absorption spectroscopy in visible /near-IR regions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol. 1:3737–3742, 1999.
- [90] J. J. Aaron, M. Maafi, C. Párkányi und C. Boniface. Quantitative treatment of the solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra of acridines and phenazines. The ground and first excited singlet-state dipole moments. *Spectrochimica Acta*, Vol. 51:603–615, 1995.
- [91] C. Z. Huang, Y. F. Li und X. D. Liu. Determination of nucleic acids at nanogram levels with safranine T by a resonance light-scattering technique. *Anal. Chim. Acta*, Vol. 375:89–97, 1998.
- [92] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew, G. Musiol und H. Mühlig. “Taschenbuch der Mathematik”. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt, 2. Aufl., 1995.
- [93] D. Touraud. “Contribution a l'étude de microemulsions utilisables comme milieux réactionnels”. Dissertation, Université de Compiègne, 1991.
- [94] J. L. López-Fontán, M. J. Suárez, V. Mosquera und F. Sarmiento. Mixed micelles of n-alkyltrimethylammonium bromides: influence of alkyl chain length. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol. 15:3583–3587, 1999.
- [95] V. Mosquera, J. M. del Río, D. Attwood, M. García, M. N. Jones, G. Prieto, M. J. Suárez und F. Sarmiento. A Study of the Aggregation Behavior of Hexyltrimethylammonium Bromide in Aqueous Solution. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 206:66–76, 1998.
- [96] M. Drifford, P. J. Derian und L. Belloni. Electrostatic interactions in surfactant solutions. In Dorfmüller [6], pp. 309–325.
- [97] M. Drifford, L. Belloni und M. Dubois. Light Scattering on Concentrated Micellar Systems: Influence of Monomers. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 118:50–67, 1987.
- [98] J. E. Brady, D. F. Evans, G. G. Warr, F. Grieser und B. W. Ninham. Counterion Specificity as the Determinant of Surfactant Aggregation. *J. Phys. Chem.*, Vol. 90:1853–1859, 1986.
- [99] R. Sabaté und J. Estelrich. Interaction of α -amylase with n-alkylammonium bromides. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 28:151–156, 2001.
- [100] E. Kudryashov, T. Kapustina, S. Morrissey, V. Buckin und K. Dawson. The Compressibility of Alkyltrimethylammonium Bromide Micelles. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 203:59–68, 1998.

- [101] I. Benito, M. A. Garcia, C. Monge, J. M. Saz und M. L. Marina. Spectrophotometric and conductimetric determination of the critical micellar concentration of sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide micellar systems modified by alcohols and salts. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 125:221–224, 1997.
- [102] L. T. Okano, F. H. Quina und O. A. E. Seoud. Fluorescence and Light-Scattering Studies of the Aggregation of Cationic Surfactants in Aqueous Solution: Effects of Headgroup Structure. *Langmuir*, Vol. 16:3119–3123, 2000.
- [103] A. Patist, S. S. Baghwat, K. W. Penfield, P. Aikens und D. O. Shah. On the Measurement of Critical Micelle Concentrations of Pure and Technical-Grade Nonionic Surfactants. *J. Surf. Deterg.*, Vol. 3:53–58, 2000.
- [104] A. Castedo, J. Castillo, M. J. Suárez-Filloy und J. R. Rodríguez. Effect of Temperature on the Mixed Micellar Tetradecyltrimethylammonium Bromide-Butanol System. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 196:148–156, 1997.
- [105] J. W. Park und H. Chung. Aggregation of Cationic Dyes with an Anionic Surfactant. *Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. 7:113–116, 1986.
- [106] M. K. Carroll, M. A. Unger, A. M. Leach, M. J. Morris, C. M. Ingersoll und F. V. Bright. Interactions between Methylene Blue and Sodium Dodecyl Sulfate in Aqueous Solution Studied by Molecular Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, Vol. 53:780–784, 1998.
- [107] R. T. Buwalda, J. M. Jonker und J. B. F. N. Engberts. Aggregation of Azo Dyes with Cationic Amphiphiles at Low Concentrations in Aqueous Solutions. *Langmuir*, Vol. 15:1083–1089, 1999.
- [108] M. H. Gehlen, M. Ferreira und M. G. Neumann. Interaction of methyl orange with cationic micelles and its effect on dye photochemistry. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, Vol. 87:55–60, 1995.
- [109] E. L. Roberts, S. Burguieres und I. M. Warner. Spectroscopic Studies of Indigo Carmine Dye in Organized Media. *Appl. Spectrosc.*, Vol. 52:1305–1313, 1998.
- [110] M. Sarkar und S. Poddar. Spectral studies of methyl violet in aqueous solutions of different surfactants in supermicellar concentration region. *Spectrochimica Acta Part A*, Vol. 55:1737–1742, 1999.
- [111] M. Sarkar und S. Poddar. Studies on the Interaction of Surfactants with Cationic Dye by Absorption Spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 221:181–185, 2000.
- [112] P. Pal, H. Zeng, G. Durocher, D. Girard, R. Giasson, L. Blanchard, L. Gaboury und L. Villeneuve. Spectroscopic and photophysical properties of some new rhodamine derivatives in cationic, anionic and neutral micelles. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, Vol. 98:65–72, 1996.
- [113] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio und D. Péres-Bendito. Study of the formation of dye-induced premicellar aggregates and its application to the determination of quaternary ammonium surfactants. *Talanta*, Vol. 45:167–180, 1997.

- [114] V. Leskovac, S. Trivić und B. M. Anderson. Comparison of the chemical mechanisms of action of yeast and equine liver alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, Vol. 264:840–847, 1999.
- [115] F. Fan und B. V. Plapp. Probing the Affinity and Specificity of Yeast Alcohol Dehydrogenase I for Coenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 367:240–249, 1999.
- [116] H. W. Adolph, M. Kiefer und E. Cedergren-Zeppezauer. Electrostatic Effects in the Kinetics of Coenzyme Binding to Isozymes of Alcohol Dehydrogenase from Horse Liver. *Biochemistry*, Vol. 36:8743–8754, 1997.
- [117] A. Ruggia, J. L. Gelpí, M. Busquets, M. Cascante und A. Cortés. Effect of several anions on the activity of mitochondrial malate dehydrogenase from pig heart. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 11:743–745, 2001.
- [118] L. Brinchi, P. Di Profio, R. Germani, V. Giacomini, G. Savelli und C. A. Bunton. Surfactant Effects on Decarboxylation of Alkoxybenzisoxazole-3-carboxylate Ions. Acceleration by Premicelles. *Langmuir*, Vol. 16:222–226, 2000.
- [119] L. Brinchi, P. Di Profio, R. Germani, G. Savelli, M. Tuglianì und C. A. Bunton. Hydrolyses of Dinitroalkoxyphenyl Phosphates in Aqueous Cationic Micelles. Acceleration by Premicelles. *Langmuir*, Vol. 16:10101–10105, 2000.
- [120] K. S. Freeman, S. S. Lee, D. J. Kiserow und L. B. McGown. Increased Chymotrypsin Activity in AOT/Bile Salt Reversed Micelles. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 207:344–348, 1998.
- [121] G. D. Arrigo, R. Giordano und J. Teixeira. Small-Angle Neutron Scattering Studies of Aqueous Solutions of Linear Alkanediols and Triols. *Langmuir*, Vol. 16:1553–1556, 2000.
- [122] J. Gliński, G. Chavepeyer und J.-K. Platten. Unusual surface properties of aqueous solutions of 1,5-pentanediol. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Vol. 162:233–238, 1999.
- [123] O. Cañas, M. Valiente und E. Rodenas. Study of the Cetyltrimethylammonium Bromide/1,6-Hexanediol/Water System. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 203:294–298, 1998.
- [124] I. V. Rao und E. Ruckenstein. Micellization Behavior in the Presence of Alcohols. *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 113:375–387, 1986.