

„Integrierte Bioproduktion“

Integrierte chemisch-biotechnologische Herstellung von
Synthesebausteinen auf Basis nachwachsender Rohstoffe in einer
Bioraffinerie

**Gemeinsamer Abschlussbericht
zu den wissenschaftlich-technischen Ergebnissen
aller Teilvorhaben**

(FKZ: 22027407, 22001109, 22001209, 22027612, 22001309, 22001409,
22001509, 22001609, 22001709, 22001809, 22001909, 22002009,
22039111, 22039211, 22010112)

der Partner:



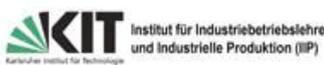
DRACOSA AG



INFRALEUNA®



MARTIN-LUTHER
UNIVERSITÄT
HALLE-WITTENBERG



Projektzeitraum: 01.05.2009 bis 31.10.2014

Berichtszeitraum: 01.05.2009 bis 31.10.2014

Datum der Veröffentlichung: 01.07.2015

Zusammengestellt von: Dr.-Ing. Susanne Zibek, Fraunhofer IGB

Forschungsverbund: »Integrierte chemisch-biotechnologische Herstellung von Synthesebausteinen auf Basis nachwachsender Rohstoffe in einer Bioraffinerie - Integrierte Bioproduktion«

Projektleitung:

Dr.-Ing. Susanne Zibek und Prof. Dr. Thomas Hirth
Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik
Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart
E-Mail: susanne.zibek@igb.fraunhofer.de
Tel.: +49 711-970-4167

Laufzeit:

01.05.2009 bis 31.10.2014

Datum der Veröffentlichung:

01.07.2015

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Zuwendungsempfänger und Bezeichnung der Teilvorhaben

Teilvorhaben	Bezeichnung	Zuwendungsempfänger	FKZ
1	Projektmanagement sowie Rohstoffaufbereitung, Entwicklung von Biokatalysatoren, Herstellung von Synthesebausteinen, Prozess- und Produktbewertung.	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik	22027407
2	Rohstoffaufbereitung sowie Herstellung, Charakterisierung und Prozessintegration der Syntheseprodukte.	DHW Deutsche Hydrierwerke GmbH Rodleben	22001109
3.1	Rohstoffaufbereitung, Gewinnung der Synthesebausteine, Prozessintegration, Prozess- und Produktbewertung.	Dracosa AG	22001209
3.2	Gewinnung der Synthesebausteine, Prozessintegration	Hobum Oleochemicals GmbH	22027612
4	Rohstoffaufbereitung, Entwicklung und Produktion von Katalysatoren sowie Gewinnung der Synthesebausteine.	Eucodis Bioscience GmbH Deutschland	22001309
5	Prozesse und Verfahren zur Nutzung pflanzlicher Öle.	Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie	22001409
6	Projektkoordination, Rohstoffmanagement sowie Prozess- und Produktbewertung.	InfraLeuna GmbH	22001509
7	Katalysatorentwicklung und Gewinnung von Synthesebausteinen.	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie	22001609
8	Prozessintegration für die Herstellung von Produkten.	Taminco Germany GmbH	22001709
9	Katalysatorentwicklung sowie Gewinnung von Synthesebausteinen.	Umicore AG&Co KG	22001809
10	Prozess- und Produktbewertung.	Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Industriebetriebslehre und Industrielle Produktion	22001909
11	Herstellung, Charakterisierung und Prozessintegration der Produkte.	ADDINOL Lube Oil GmbH	22002009
12	Rohstoffmanagement der Anbau- und Reststofföle inklusive ökonomische und ökologische Betrachtung des Anbaus und der Herstellung der Öle einschließlich der Nebenproduktverwertung.	Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft	22039111
13	Erzeugung und Nutzung von Synthesegasen aus Glycerin.	Linde Engineering Dresden GmbH	22039211
14	Scale up von Prozessen in Pilotanlagen	Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse	22010112

Autoren des Schlussberichtes

Name	Partner	Kürzel
Dr.-Ing. Susanne Zibek Prof. Dr. Thomas Hirth Dr. Nicole Werner Fabian Haitz	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart	Fraunhofer IGB
Dr. Jörg Andreas Schröter Dr. Vera Haack	DHW Deutsche Hydrierwerke GmbH Rodleben Brambacher Weg 1, 06861 Dessau-Rosslau	DHW
Dr. Jochen Gottfriedsen	Dracosa AG	Dracosa
Dr. Michael Blumenstein Renate Polster	Hobum Oleochemicals GmbH Seehafenstraße 20, 21079 Hamburg	Hobum
Dr. Jan Modregger Dr. Nicoel Wehofsky	Eucodis Bioscience GmbH Deutschland Heinrich-Damerow-Str. 4, 06120 Halle (Saale).	Eucodis
Kristian Kowollik Rainer Schewpe	Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie Joseph-von-Fraunhofer-Str. 7, 76327 Pfinztal	Fraunhofer ICT
Dr. Martin Naundorf Dr. Ekkehard Küstermann Dr. Markus Wolperdinger	InfraLeuna GmbH Am Haupttor, 06237 Leuna	InfraLeuna
Prof. Dr. Markus Pietzsch Martin Wolfram	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Pharmazie, Bereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie Weinbergweg 22, 06120 Halle (Saale)	Uni Halle
Kristof Moonen	Taminco Germany GmbH Am Haupttor, Bau 8314, 06237 Leuna	Taminco
Dr. Andreas Rivas-Nass	Umicore AG&Co KG Rodenbacher Chaussee 4, 63457 Hanau-Wolfgang	Umicore
PD Dr. Magnus Fröhling Sophia Radloff Jörn Christian Meyer Frederik Trippe	Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Industriebetriebslehre und Industrielle Produktion Hertzstraße 16, 76187 Karlsruhe	KIT
Hans-Jürgen Scholz	Addinol Lube Oil GmbH Am Haupttor, 06234 Leuna	Addinol
Christina Warsitzka Torsten Graf	Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft Naumburger Str.98, 07743 Jena	TLL
Dr.-Ing. Katja Patzsch Sandra Torkler	Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse Am Haupttor, Bau 1251, 06237 Leuna	Fraunhofer CBP

Inhalt

1	Ziele	1
1.1	Beitrag zu den förderpolitischen Zielen	1
1.2	Beitrag zu den wissenschaftlichen Zielen	2
1.3	Aufgabenstellung	3
1.3.1	Rohstoffbeschaffung, Charakterisierung und Aufarbeitung (TLL, Dracosa, InfraLeuna)	3
1.3.2	Entwicklung von chemischen und biologischen Katalysatoren und ihre Herstellung (Umicore, ICT, Eucodis, Uni Halle, IGB)	3
1.3.3	Entwicklung von chemischen und biokatalytischen Prozessen zur Herstellung von Synthesebausteine (Eucodis, Uni Halle, IGB, CBP, Dracosa, Umicore, ICT, Taminco, DHW)	4
1.3.4	Herstellung von Produkten aus den hergestellten Synthesebausteinen (Addinol, DHW, Taminco, ICT, Hobum, Dracosa)	5
1.3.5	Bewertung und Integration von Prozessen und Produkten (KIT, TLL, InfraLeuna)	5
1.4	Zusammenarbeit innerhalb des Verbundvorhabens	6
2	Stand der Technik	8
2.1	Auswahl und Charakterisierung geeigneter pflanzlicher Öle (InfraLeuna, TLL)	8
2.2	Chemische Umesterung (InfraLeuna).....	11
2.3	Hydrierung (InfraLeuna)	12
2.4	Metathese (InfraLeuna)	13
2.5	Reduktive Aminierung (InfraLeuna)	13
2.6	Chemische Epoxidierung (InfraLeuna)	14
2.7	Enzymatische Hydrolyse und Umesterung (InfraLeuna)	15
2.8	Biochemische Epoxidierung (InfraLeuna, Fraunhofer IGB).....	15
2.9	Biochemische ω -Funktionalisierung (Fraunhofer IGB).....	18
3	Erzielte Ergebnisse	20
3.1	Rohstoffbeschaffung, Charakterisierung und Aufarbeitung (Dracosa, InfraLeuna, TLL)	20
3.1.1	Auswahl alternativer heimischer Ölpflanzen und Öle (InfraLeuna)	20
3.1.2	Rohstoffbeschaffung (Dracosa, InfraLeuna, TLL)	21
3.1.2.1	<i>Anbau von Drachenkopf durch Dracosa</i>	<i>21</i>
3.1.2.2	<i>Anbau von Iberischer Drachenkopf, Krambe, Eruca- Raps und Koriander durch TLL.....</i>	<i>22</i>
3.1.2.3	<i>Beschaffung weiterer Öle (InfraLeuna, TLL)</i>	<i>23</i>
3.1.3	Pressen der Saat und weitere Aufarbeitung der Öle (TLL, InfraLeuna)	24
3.1.4	Beprobung und Analyse der Ölsaaten, der Öle aus dem Anbau, der Reststofföle und der Presskuchen (TLL)	27
3.1.5	Charakterisierung der Inhaltsstoffe der pflanzlichen Öle sowie deren Eignung für die im Projekt verfolgten industriellen Anwendungen (Hobum)	31

3.2	Bewertung der Rohstoffbereitstellung (KIT, TLL).....	33
3.2.1	Betrachtete Rohstoffe (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)	33
3.2.1.1	<i>Iberischer Drachenkopf</i>	33
3.2.1.2	<i>Krambe</i>	33
3.2.1.3	<i>Senfkernöl</i>	34
3.2.1.4	<i>Holunderkernöl</i>	34
3.2.1.5	<i>Tallöl</i>	35
3.2.1.6	<i>Weitere Öle</i>	35
3.2.2	Rahmenbedingungen der Pflanzenölbereitstellung (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)	36
3.2.2.1	<i>Agrar- und Handelspolitik</i>	36
3.2.2.2	<i>Struktur der Landwirtschaft in Ostdeutschland</i>	37
3.2.3	Anbau- und Beschaffungspotenziale, Nutzungskonkurrenzen (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)	41
3.2.4	Beschaffungsvarianten für die ökonomische und ökologische Bewertung (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)	44
3.2.5	Ökonomische Bewertung der Wertschöpfungsketten zur Pflanzenölbereitstellung (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)	46
3.2.5.1	<i>Schätzung der Herstellkosten für Ölsaaten</i>	47
3.2.5.2	<i>Schätzung der Herstellkosten für die betrachteten Öle</i>	52
3.2.6	Betriebswirtschaftliche Richtwerte der Saatproduktion (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)	54
3.3	Bewertung der Rohstoffbereitstellung in Zusammenhang mit der Nebenproduktverwertung (TLL, Projektphase 2, 2012-2014).....	56
3.3.1	Betriebswirtschaftliche Richtwerte der Ölkaltpressung in Zusammenhang mit der Presskuchenverwertung (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)	56
3.3.2	Betriebswirtschaftliche Richtwerte der Nebenproduktverwertung (TLL)	58
3.3.2.1	<i>Presskuchen als Futtermittel</i>	59
3.3.2.2	<i>Presskuchen als Gärsubstrat in Biogasanlagen</i>	64
3.3.2.3	<i>Presskuchen als Düngemittel</i>	68
3.3.2.4	<i>Presskuchen als Brennstoff in Feuerungsanlagen</i>	71
3.3.2.5	<i>Zusammenfassung der Mindestpreise der verschiedenen Presskuchen-Verwertungen</i>	73
3.3.3	Ökologische Bewertung der Wertschöpfungsketten zur Pflanzenölbereitstellung (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)	74
3.3.4	Ökologische Bewertung des Anbaus (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)	75
3.3.4.1	<i>Züchtungsarbeiten und -fortschritt</i>	76
3.3.4.2	<i>Anbauumfang und -erfahrung</i>	77
3.3.4.3	<i>Fruchtfolgewirkung</i>	78
3.3.4.4	<i>Anbaukonzentration</i>	79
3.3.4.5	<i>Agrobiodiversität</i>	80
3.3.4.6	<i>THG-Emissionen</i>	81
3.3.4.7	<i>Flächeneffizienz und Ertragsstabilität</i>	82
3.3.4.8	<i>Pflanzenschutzintensität</i>	85
3.3.4.9	<i>Auskreuzung</i>	85
3.3.4.10	<i>Insektenweide</i>	86
3.3.4.11	<i>Trockentoleranz</i>	87
3.3.4.12	<i>Diskussion der Flächenkonkurrenz zur Food- und Non-Foodproduktion</i>	88

3.3.5	Ökologische und ökonomische Betrachtung der Reststofföle (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)	89
3.3.5.1	Senföl.....	89
3.3.5.2	Gegenüberstellung mit vergleichbaren Ölen aus dem Anbau.....	90
3.3.6	Zusatzinformation: Weitere Rapssorten mit veränderten Fettsäuremusters (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)	90
3.4	Chemokatalyse (Umicore, Fraunhofer ICT, Taminco, DHW).....	91
3.4.1	Herstellung chemischer Katalysatoren (Umicore, Taminco, Fraunhofer ICT)	91
3.4.1.1	Screening und Entwicklung von chemischen Katalysatoren zur Metathese von Fettsäuren und -estern (Umicore, Fraunhofer ICT).....	91
3.4.1.2	Screening von Katalysatoren zur Optimierung der Hydroaminierung zur Herstellung von Diaminen aus α,ω -Hydroxycarbonsäuren und -estern (Umicore, Taminco, Fraunhofer ICT).....	94
3.4.2	Chemische Epoxidierung (Dracosa, Hobum, Fraunhofer ICT)	96
3.4.2.1	Chemische Epoxidierung von Metathese-Produkten (Fraunhofer ICT).....	96
3.4.2.2	Chemische Epoxidierung von Leinöl- und Drachenkopfmethylester (Dracosa).	97
3.4.2.3	Chemische Epoxidierung von Drachenkopf-, Senf-, Holunderkern-, Krambe-, Tall- und Leinöl (Dracosa).....	99
3.4.2.4	Chemische Epoxidierung von Pflanzenölen (Hobum).....	102
3.4.3	Chemische Fettspaltung und Umesterung (DHW)	105
3.4.3.1	Chemische Fettspaltung (DHW).....	105
3.4.3.2	Chemische Umesterung (DHW).....	106
3.4.4	Hydrierung von Fettsäurederivaten zum Fettalkohol (DHW, Fraunhofer ICT)	106
3.4.5	Metathese und Herstellung längerkettiger stickstoffhaltiger Verbindungen (Fraunhofer ICT)	108
3.4.5.1	Scale-Up der Metathese Reaktion.....	114
3.4.5.2	Untersuchung zur Aufreinigung der Metathese-Reaktionslösung.....	118
3.4.6	Herstellung stickstoffhaltiger Verbindungen (Fraunhofer ICT; Taminco, Umicore)	124
3.4.6.1	Herstellung von Aminen über das Amid (Fraunhofer ICT).....	124
3.4.6.2	Reduktive Aminierung von Aldehyden (Fraunhofer ICT).....	126
3.4.7	Aminierung von Glycerin (Taminco)	129
3.4.7.1	Aminierung von Glycerin in der Flüssigphase an heterogenen reduzierten Metalkatalysatoren.....	130
3.4.7.2	Aminierung von Glycerin in der Flüssigphase mit homogenen Metalkatalysatoren	131
3.4.7.3	Aminierung von Glycerin in der Flüssigphase mit Photokatalyse.....	136
3.4.7.4	Aminierung von Glycerin in der Gasphase unter Verwendung heterogener reduzierter Metalkatalysatoren.....	136
3.4.7.5	Aminierung von Glycerin in der Gasphase unter Verwendung heterogener fester Säuren.....	137
3.5	Biokatalyse (Eucodis, Universität Halle-Wittenberg, Fraunhofer IGB).....	138
3.5.1	Untersuchung und Auswahl geeigneter Lipasen (Eucodis)	138
3.5.1.1	Fettsäurespezifität der Lipasen.....	140
3.5.1.2	Regioselektive enzymatische Hydrolyse.....	144
3.5.1.3	Enzymatische Hydrolyse.....	147
3.5.1.4	Enzymatische Veresterung.....	152
3.5.1.5	Umesterung der Pflanzenöle in klassisch organischen Lösungsmitteln.....	154
3.5.1.6	Umesterung der Pflanzenöle in ionischen Flüssigkeiten.....	158
3.5.1.7	Umesterung der Pflanzenöle ohne Lösungsmittelzusatz.....	161

3.5.2	Screening nach epoxidierenden Lipasen (Fraunhofer IGB)	163
3.5.3	Biochemische Epoxidierung (Fraunhofer IGB)	168
3.5.3.1	<i>Optimierung der chemo-enzymatischen Epoxidierung unterschiedlicher Substrate</i> 169	
3.5.3.2	<i>Mustermengen-Herstellung mittels chemo-enzymatischer Epoxidierung</i> <i>verschiedener Substrate im Batch-Ansatz</i>	171
3.5.3.3	<i>Epoxidierung verschiedener Fettsäure-Fractionen aus der Tallölaufarbeitung</i> ..	173
3.5.3.4	<i>Stabilität unterschiedlicher Varianten der immobilisierten Lipase B aus C.</i> <i>antarctica</i>	175
3.5.3.5	<i>Prozessoptimierung der chemo-enzymatischen Epoxidierung</i>	177
3.5.3.6	<i>Epoxidierung von 9-Octadecen</i>	182
3.5.3.7	<i>Epoxidierung von DHW Ölsäuremethylester (84 %)</i>	183
3.5.3.8	<i>Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle und Charakterisierung der Pflanzenöl-</i> <i>Epoxide</i>	185
3.5.3.9	<i>Scale-Up der chemo-enzymatischen Epoxidierung</i>	190
3.5.3.10	<i>Epoxidierung in einem Festbettreaktor mit Novozym® 435</i>	197
3.5.4	Heterologe Expression der Lipasen (Universität Halle-Wittenberg)	198
3.5.5	Immobilisierungsuntersuchungen der Lipase EL012 im Labormaßstab (Universität Halle-Wittenberg)	203
3.5.6	Fermentative Herstellung der Lipase EL012 (Fraunhofer CBP)	213
3.5.6.1	<i>Modellierung der Fermentation der Lipase EL012</i>	216
3.5.6.2	<i>Aufarbeitung der Lipase EL012</i>	218
3.5.6.3	<i>Immobilisierung der Lipase EL012</i>	223
3.5.7	Fermentative Herstellung der Lipase EL070 (Fraunhofer CBP)	224
3.5.8	Ver- und Umesterung vermittelt durch die fermentativ hergestellten Lipasen und Scale-Up (Fraunhofer CBP)	226
3.5.8.1	<i>Scale-Up Veresterung</i>	227
3.5.8.2	<i>Scale-Up Umesterung</i>	229
3.5.9	Entwicklung von Produktionsstämmen für die ω -Funktionalisierung (Fraunhofer IGB)	231
3.5.9.1	<i>Identifizierung von S1-Stämmen zur DCA-Produktion</i>	231
3.5.9.2	<i>Optimierung der DCA-Produktion durch Blockierung der β-Oxidation</i>	233
3.5.9.3	<i>Re-Klassifizierung des S2-Stammes C. tropicalis H5343</i>	235
3.5.10	ω -Funktionalisierung mittels <i>C. tropicalis</i> (Fraunhofer IGB)	236
3.5.10.1	<i>Vergleich von Komplexmedium und Mineralsalzmedium</i>	236
3.5.10.2	<i>Zufütterungsstrategien</i>	237
3.5.10.3	<i>Einfluss der Stickstoffquelle auf die DCA-Produktion</i>	238
3.5.10.4	<i>Produktionsoptimierung</i>	239
3.5.10.5	<i>Aufreinigung der DCA</i>	239
3.5.10.6	<i>Substratscreening: Verwendung unterschiedlicher Fettsäurequellen</i>	240
3.6	Prozessbewertung (KIT, InfraLeuna).....	241
3.6.1	Ökonomische Bewertung der Prozesse	243
3.6.1.1	<i>Enzymatische Epoxidierung</i>	243
3.6.1.2	<i>Enzymherstellung für die Epoxidierung</i>	247
3.6.1.3	<i>Fermentierung zu Dicarbonsäuren</i>	249
3.6.1.4	<i>Chemokatalytische Metathese</i>	251
3.6.1.5	<i>Aminierung von Glycerin</i>	253
3.6.1.6	<i>Umesterung</i>	255
3.6.1.7	<i>Rohstoffalternativen und Sensitivitätsbetrachtung</i>	256
3.6.1.8	<i>Zusammenfassung</i>	258

3.6.2	Ökologische Bewertung der Prozesse	259
3.6.3	Soziale Prozessbewertung	262
3.6.4	Diskussion und Ausblick der Prozessbewertung	262
3.7	Produktherstellung und Charakterisierung (Taminco, Dracosa, Hobum, Addinol)	263
3.7.1	Harze auf Basis von Pflanzenölepoxyd-Derivaten (Dracosa)	263
3.7.1.1	Härter auf Basis von Fettsäuremethylesterepoxyden	263
3.7.1.2	Vergleich unterschiedlicher Harze auf Basis epoxidierter Pflanzenölderivate	267
3.7.2	Hydrophobierungsmittel (Dracosa)	273
3.7.3	Polymere auf Basis Pflanzenöl-basierter Polyole aus Epoxidölen (Hobum)	277
3.7.4	Schmierstoffe (Addinol)	283
3.7.4.1	Schmierstoffester aus Senföl - Vorstufen von DHW	283
3.7.4.2	Schmierstoffe – Anwendung und Herstellung	284
3.7.5	Grenzflächenaktive Substanzen (Taminco, DHW)	291
3.7.5.1	Tenside (Taminco)	291
3.7.5.2	Grenzflächenaktive Substanzen aus Epoxiden (DHW)	291
3.7.6	Flockungshilfsmittel (Taminco)	293
3.8	Produktbewertung (KIT)	294
3.8.1	Anwendungsgebiete und Auswahl von Referenzsystemen (KIT)	294
3.8.2	Ökonomische Produktbewertung (KIT)	295
3.8.3	Ökologische Produktbewertung (KIT)	296
3.8.4	Soziale Produktbewertung (KIT)	298
3.8.5	Fazit Produktbewertung (KIT)	298
3.8.6	Anwendungen und Marktpotential (InfraLeuna)	299
3.8.6.1	9-Octadecen	299
3.8.6.2	9-Octadecen-1,18-diacarbonsäure (DCA) und deren Ester	300
3.8.6.3	Epoxidierte Pflanzenöle	302
3.8.6.4	Diamine und Propanolamine	302
3.8.6.5	Erucasäure und Erucamid	303
3.8.7	Regulatorische Beschränkungen (InfraLeuna)	303
3.9	Prozessintegration (KIT)	304
3.10	Prozessintegration (InfraLeuna)	304
3.11	Stoffliche Integration (InfraLeuna)	308
4	Verwertung	311
4.1	Wirtschaftliche, wissenschaftliche und technische Erfolgsaussichten nach Projektende	311
4.2	Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit	320
4.3	Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte	324
4.4	Erkenntnisse von Dritten	324
4.5	Veröffentlichungen	325
5	Anhang	328

1 Ziele

1.1 Beitrag zu den förderpolitischen Zielen

Das Verbundvorhaben orientierte sich am Förderprogramm „Nachwachsende Rohstoffe“ des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), der Bekanntmachung über die Förderung der kooperativen Forschung und technologischen Entwicklung zur stofflichen Nutzung von Biomasse in innovativen Verbundprojekten vom 31. August 2007, der High-Tech-Strategie der Bundesregierung und der nationalen Umsetzung der ETP SusChem Strategie.

Das Vorhaben legte seinen Schwerpunkt auf die Steigerung des Einsatzes nachwachsender Rohstoffe und die langfristige sowie weitgehende Umstellung chemischer Produktionsprozesse auf nachwachsende Rohstoffe durch neue, durchgängige sowie inter- und transdisziplinäre Ansätze in Forschung, Entwicklung und Produktion in Zusammenarbeit mit einem integrierten Chemieverbund-Standort. Dies stellt ein Beitrag zur Ressourcenschonung dar und würde damit langfristig die Entwicklung nachhaltiger Wirtschaftsformen im Sinne des auf der Konferenz von Rio beschlossenen Agenda-21-Prozesses fördern. Die Verwendung nachwachsender Rohstoffe zur Herstellung technischer Produkte trägt wesentlich bei zur:

- Reduzierung des Treibhauseffekts aufgrund der CO₂-Neutralität
- Schonung endlicher fossiler Ressourcen wie Erdöl oder Erdgas
- Umweltverträglichen Abfall- und Kreislaufwirtschaft
- Verbesserung der Erwerbstätigkeit in der Landwirtschaft
- Reduzierung der Abhängigkeit von fossilen Ressourcen
- Bereitstellung funktioneller Rohstoffe (Syntheseleistung der Natur)
- Etablierung von Bioraffinerien

Die technischen Arbeitsziele dieses Projektes waren hierbei:

- Die Bereitstellung von Ölen aus dem landwirtschaftlichen Anbau und von Reststoffölen aus anderen Industriezweigen in ausreichenden Mengen und benötigter Qualität
- Die Herstellung und anwendungstechnische Charakterisierung der biobasierten Produkte.
- Die Integration der entsprechenden Prozesse über den Technikumsmaßstab hinaus.

Neben den technischen Zielen verfolgte das Vorhaben der kooperativen Forschung folgende organisatorischen Ziele:

- Aufbau eines interdisziplinären und transdisziplinären Forschungsverbundes und Einbettung in die FuE-Arbeiten der beteiligten Partner.
- Verzahnung mit einer Arbeitsgruppe zur Ökobilanzierung und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung.
- Weiterer Ausbau von Industriekooperationen mit dem Ziel der schnelleren Überführung der FuE-Ergebnisse im Bereich der stofflichen Nutzung nachwachsender Rohstoffe in die industrielle Anwendung.

Der Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen zur Herstellung von fettsäurebasierten Folgeprodukten stellt dabei einen Beitrag zur nachhaltigen Substitution petrochemischer Rohstoffe dar. Gleichzeitig wird dadurch ein Weg aufgezeigt, wie auf der Basis von nachwachsenden Rohstoffen qualitativ und technologisch hochwertige Produkte hergestellt werden können.

1.2 Beitrag zu den wissenschaftlichen Zielen

Neben den bereits beschriebenen technischen und organisatorischen Zielsetzungen verfolgte das Verbundvorhaben folgende **wissenschaftliche Ziele**, die durch eine entsprechende kooperative Forschung erreicht werden sollten:

- Produkt- und prozessgerechte Auswahl von heimischen pflanzlichen Rohstoffen (Ölpflanzen), die nicht im Nahrungs- und Futtermittelbereich eingesetzt werden, sowie die ökonomische Bewertung des Anbaus und der Herstellung der Öle einschließlich der Verwendung der anfallenden Nebenprodukte und Betrachtung ökologischer Aspekte wie Biodiversität, Fruchtfolgegestaltung oder Treibhausgasminimierung (Öko-Effizienz)
- Weiterentwicklung, Optimierung und Bewertung (Öko-Effizienz) von Verfahren zur Aufbereitung und Bereitstellung von pflanzlichen Ölen für die Gewinnung von Synthesebausteinen und Aufarbeitung bis zum Technikumsmaßstab.
- Weiterentwicklung, Optimierung und Bewertung (Öko-Effizienz) hochselektiver chemischer und biologischer Katalysatoren.
- Weiterentwicklung, Optimierung und Bewertung (Öko-Effizienz) hochselektiver Verfahren zur chemisch-biotechnologisch katalysierten Konversion von pflanzlichen Ölen für die Gewinnung von Synthesebausteinen und Aufarbeitung einschließlich *scale up* bis zum Technikumsmaßstab.
- Weiterentwicklung, Optimierung und Bewertung (Öko-Effizienz) von Verfahren zur Weiterverarbeitung der erhaltenen Synthesebausteine zu Polymeren, wie Harzen auf Basis epoxidierter Pflanzenölderivate, grenzflächenaktiven Substanzen, wie Hydrophobierungsmittel, Emulgatoren und Tenside, Flockungshilfsmittel (Amine, Diamine und Polyamine) und Schmierstoffen sowie deren anwendungstechnische Charakterisierung.
- Untersuchung der Nutzungsmöglichkeiten von Nebenstoffströmen (Glycerin) für die Erzeugung von gasförmigen Stoffen (insbesondere Kohlenstoffmonoxid und Wasserstoff) und deren Nutzung für chemische Folgereaktionen im Projekt.
- Integration von Aufbereitung, Konversion und Aufarbeitung in einen bestehenden Produktionsverbund zur Steigerung der Wertschöpfung bei der stofflichen Nutzung nachwachsender Rohstoffe und Bewertung der Öko-Effizienz.

Für die Herstellung der o.g. Produkte auf der Basis von pflanzlichen Ölen gibt es bis heute keine großtechnischen Prozesse bei den beteiligten Unternehmen und kein integriertes Anlagenkonzept, das die Vision der „Integrierten Verbundproduktion auf Basis

nachwachsender Rohstoffe“ verfolgt. Der mit den o.g. wissenschaftlichen Zielen verfolgte Ansatz ist neuartig und wurde erstmals im Rahmen dieses Verbundvorhabens realisiert.

1.3 Aufgabenstellung

Eine Übersicht der im Projekt geplanten und durchgeführten Arbeiten ist nachfolgend dargestellt.

1.3.1 Rohstoffbeschaffung, Charakterisierung und Aufarbeitung (TLL, Dracosa, InfraLeuna)

Ein Ziel des Verbundprojektes war es, nachwachsende Rohstoffe im Bereich pflanzliche Fette/Öle mit technologisch wichtigen funktionellen Inhaltsstoffen (Fettsäuren) anzubauen, zu beschaffen und zu charakterisieren, die in den Klimaverhältnissen von Deutschland (oder Mitteleuropa) kultivierbar sind und ihren Einsatz nicht in der Nahrungsmittelindustrie finden.

Im Rahmen des Projektes sollten folgende Schwerpunkte bearbeitet werden:

- Auswahl alternativer heimischer Ölpflanzen und Öle mit technologisch wichtigen funktionellen Inhaltsstoffen
- Anbau und Ernte der Ölpflanzen Iberischer Drachenkopf, Krambe, Eruca- Raps und Koriander.
- Pressung und Aufbereitung der angebauten Öle
- Beschaffung weiterer Öle wie Tallöl, Senföl und Holunderkernöl.
- Charakterisierung der Inhaltsstoffe der pflanzlichen Öle sowie deren Eignung für die im Projekt verfolgten industriellen Anwendungen.

1.3.2 Entwicklung von chemischen und biologischen Katalysatoren und ihre Herstellung (Umicore, ICT, Eucodis, Uni Halle, IGB)

Im Bereich der Chemokatalyse sollen effizientere Katalysatorsysteme für die reduktive Aminierung sowie Metathese entwickelt und getestet werden. Ziel ist es Katalysatorsysteme mit höherer Selektivität, Stabilität (turn-over-number) und Raum-Zeit-Ausbeute zu entwickeln. Für die Metathese erfolgt weiterhin ein Katalysatorscreening und die Optimierung identifizierter Katalysatorsysteme. Im Anschluss wird ein Scale-up der Katalysatorherstellung durchgeführt werden.

Des Weiteren werden Biokatalysatoren für die Umesterung, Hydrolyse, Epoxidierung und ω -Funktionalisierung entwickelt. Ein Schwerpunkt wird auf die Identifizierung von Lipasen für die Umesterung und Epoxidierung gelegt. Neue Produktionsstämme zur Lipaseherstellung werden entwickelt. Weiterhin werden die Biokatalysatoren aufgearbeitet und verschiedene Immobilisierungsmethoden untersucht. Für die Bereitstellung ausreichender Mengen an Biokatalysatoren wird ein Scale-up der Enzymproduktion vorgenommen.

Die Herstellung von ω -Diaminen kann aus ω -Dicarbonsäuren erfolgen, die durch biochemische Konversion (ω -Oxidation) z.B. aus Ölsäure (Monocarbonsäuren) gewonnen werden können. Dazu sollen neue Produktionsstämme für die Herstellung von α,ω -Dicarbonsäuren (DCA) identifiziert werden.

Diese sollen als Alternative zu dem bisher eingesetzten und als humanpathogen eingestuften Produktionsstammes *C. tropicalis* (S2-Stamm) eingesetzt werden.

In Phase 2 werden die am Fraunhofer IGB in der Phase 1 identifizierten potentiellen Stämme der Sicherheitsstufen S1 weiterhin gentechnisch modifiziert, um einen Produktionsstamm mit hohen Raum-Zeit-Ausbeuten der Dicarbonsäuren zu erhalten. Dafür müssen die entsprechenden Stoffwechselwege und die beteiligten Gene identifiziert und Methoden zur genetischen Manipulation des ausgewählten Kandidaten etabliert werden. Es müssen bis zu drei Gene im Stoffwechselweg ausgeschaltet werden.

1.3.3 Entwicklung von chemischen und biokatalytischen Prozessen zur Herstellung von Synthesebausteine (Eucodis, Uni Halle, IGB, CBP, Dracosa, Umicore, ICT, Taminco, DHW)

Die entwickelten Enzyme sollen in Reaktionen zur enzymatischen Umesterung und regioselektiven Hydrolyse eingesetzt werden. Es sollen die Hydrolyse in wässrigen Systemen und organischen Lösemitteln, die Veresterung von Tallöl, die selektive Fettsäureanreicherung als Fettsäuremethylester, die Herstellung von Fettsäuresterolester, Zuckerestern und Trimethylolpropanestern charakterisiert und etabliert werden. Zusätzlich soll ein Scale-up für ausgewählte Reaktionen erfolgen.

Augenmerk wird bei der enzymatischen Epoxidierung auf die Reaktionsführung gesetzt. Hier sollen im Satzbetrieb durchgeführte Prozesse optimiert werden und zusätzlich ein kontinuierlicher Prozess auf generelle Eignung geprüft werden. Zudem wird die Recyclingfähigkeit der Enzyme untersucht.

Für Metathesereaktionen werden unterschiedliche Katalysatoren eingesetzt. Ziel ist ein Scale-up in den 100-200 L einschließlich der Aufreinigung und Bemusterung der Projektpartner. Dabei werden unterschiedliche Katalysatoren der Firma Umicore zum Einsatz kommen.

Die biochemischen Dicarbonsäurenherstellung soll über Fermentation erfolgen. Bevor neue S1-Produktionsstämme entwickelt werden, wird *Candida tropicalis* als Produktionsstamm eingesetzt. Es wird eine Prozessoptimierung durchgeführt und das Produktspektrum des Stammes charakterisiert. Die fermentative Herstellung kann bis zu einem Maßstab von 30 L durchgeführt werden.

Für die Synthese stickstoffhaltiger Verbindungen wird der Einfluss der Katalysator-Charakteristik ermittelt und die Aminierung weiterentwickelt. Für die Herstellung von Oktadecan-1,18-diol aus Dimethylester soll der Hydrierprozess bewertet und die Stoffeigenschaften vom 1,18-Diol als Baustein für Pomyere bestimmt werden.

Mit den Daten der Verfahrensentwicklung erfolgt eine Wirtschaftlichkeitsbetrachtung.

1.3.4 Herstellung von Produkten aus den hergestellten Synthesebausteinen (Addinol, DHW, Taminco, ICT, Hobum, Dracosa)

Die erzeugten Synthesebausteine werden zur Herstellung von Polymeren, Schmierstoffen, Flockungsmitteln, Tensiden und Aminen eingesetzt und anwendungstechnisch untersucht.

Für die Herstellung von Polymeren sollen neue Harz- und Härtersysteme untersucht und optimiert werden. Die neuen Systeme werden in Bezug auf Aushärtegeschwindigkeit, Stabilität, Verarbeitung und Haftfähigkeit an unterschiedlichen Materialien untersucht.

Es werden außerdem Bioschmierstoffe mit optimierten Funktionen auf Pflanzenölbasis entwickelt. Ausgewählte Epoxide sollen als Basis für grenzflächenaktive Substanzen geprüft werden. Hydrophobierungsmittel sollen dabei auf Basis von Methylester-epoxide für Steine und Beton untersucht werden. Tertiäre Aminen sollen als Tenside verwendet werden. Für die hergestellten Fettalkohole sollen die Eignung als Tenside und Emulgatoren für Kühlschmiermittel untersucht werden. Zudem soll untersucht werden, ob die chemische Umsetzung der Epoxide (Ringöffnung, Ethoxylierung, Hydrierung) zu Produkten mit Emulgatoreigenschaft führt. Amine (z.B. 3-Dimethylaminopropanol) werden für den Einsatz als Flockungsmittel für die Wasserbehandlung untersucht.

1.3.5 Bewertung und Integration von Prozessen und Produkten (KIT, TLL, InfraLeuna)

Ökonomische, ökologische und soziale Prozessbewertung

Im Zuge des Projektes wird eine ökonomische, ökologische und soziale Prozessbewertung der chemokatalytischen Prozesse durchgeführt (Metathese, Reduktive Aminierung, Synthesegasherstellung und Tallölderivatisierung, ggf. auch Chemische Epoxidierung und Fettalkoholherstellung, biochemische Epoxidierung, enzymatische Umesterung und regioselektive Hydrolyse, biochemische ω -Funktionalisierung sowie Enzymherstellung). Des Weiteren erfolgt die kontinuierliche Anpassung und Verifizierung der Annahmen und Parameter zu den einzelnen Bewertungsmodellen, so dass Fortschritte und neue Erkenntnisse der Projektpartner zu den Prozessen berücksichtigt werden können.

Produktbewertung

Die Marktpotenziale der neu entwickelten Produkte werden für das Projekt ermittelt und bewertet. Zudem werden technisch-qualitative Produkteigenschaften der Biomasse-basierten Produkte im Vergleich zu konventionell hergestellten Substitutionsprodukten abgeschätzt. In einem weiteren Schritt werden die durchgeführten Prozessbewertungen um eine Betrachtung des jeweiligen gesamten Lebenszyklus erweitert. Zusätzlich werden die Produkte im Hinblick auf eine umweltverträgliche Abfall- und Kreislaufwirtschaft bewertet. Zur Generierung der Lebenszyklusanalyse werden über die Systemgrenzen der Prozessbewertung hinaus Emissionsdaten zur Abschätzung der Umweltwirkungen gesammelt beziehungsweise geschätzt.

Prozessintegration

Die technische Integration der entwickelten neuen Produkte und Verfahren in den Stoff- und Standortverbund wird abschließend untersucht. Es werden zukünftig benötigte Rohstoff- und Produktmengen auf der Basis der Hochrechnungen der Projektpartner sowie Ergebnisse der Untersuchungen zur Nutzbarkeit der Monomere und Syntheserohstoffe für andere Firmen am Standort für eine Skalierung der Anlagen auf Industriemaßstabsgröße verwendet. Die Einbindung dieser Industrieanlagen in den Standort Leuna und die dafür evtl. benötigte Anpassung der Infrastruktur- und Medienanbindung wird betrachtet. Zudem erfolgt eine Bewertung des integrierten Produktionsnetzwerkes.

1.4 Zusammenarbeit innerhalb des Verbundvorhabens

Zum Erreichen der zuvor beschriebenen Ziele und Umsetzung der aufgeführten Aufgabenstellung zur Entwicklung und Herstellung von Produkten auf der Basis pflanzlicher Öle wurden Projektpartner mit spezifischen Kenntnissen in den Bereichen Rohstoffaufbereitung, Chemo- und Biokatalyse, Fermentation, Katalyse, Aufarbeitung, Polymerisation sowie Prozessentwicklung innerhalb des Verbundvorhabens zusammengeführt

- Aufgaben mit grundlegendem Charakter und wissenschaftlicher Bedeutung im Bereich des Rohstoffmanagements wurden durch Dracosa und anschließend TLL bearbeitet.
- Aufgaben mit grundlegendem Charakter und wissenschaftlicher Bedeutung im Bereich der Katalysatorweiterentwicklung wurden durch Fraunhofer IGB, Uni Halle und Eucodis (Biologische Katalysatoren) sowie Fraunhofer ICT und Umicore (Chemische Katalysatoren) bearbeitet.
- Aufgaben mit grundlegendem Charakter und wissenschaftlicher Bedeutung im Bereich der Chemokatalyse zur Herstellung der Synthesebausteine wurden durch Umicore, Dracosa, Hobum, DHW, Linde, Fraunhofer CBP und Fraunhofer ICT bearbeitet. Die Aufgaben im Bereich Biokatalyse zur Herstellung der Synthesebausteine wurden durch Uni Halle, Fraunhofer IGB, Fraunhofer CBP und Eucodis durchgeführt.
- Die Herstellung und anwendungstechnische Charakterisierung der erhaltenen biobasierten Produkte wurden von Addinol, Taminco, DHW, Dracosa und Hobum durchgeführt.
- Für die Integration der Prozesse zur Herstellung der biobasierten Produkte am Standort Leuna waren das Fraunhofer CBP und alle Industriepartner verantwortlich.
- Die Rohstoff-, Prozess- und Produktbewertung wurde durch das KIT und TLL (Rohstoffbewertung) durchgeführt.
- Die Gesamt-Projektleitung und die wissenschaftliche Koordination übernimmt das Fraunhofer IGB.

Die von den Partnern in das Projekt eingebrachten Kompetenzen und die stofflichen und verfahrenstechnischen Verzahnungen für die „Integrierte Verbundproduktion auf Basis nachwachsender Rohstoffe“ sind in Abbildung 1 dargestellt.



Abbildung 1: Darstellung der Wertschöpfungskette und der stofflichen und verfahrenstechnischen Verzahnungen des Stoffstromes von nachwachsenden Rohstoffen zu Wertstoffen zwischen den Partnern.

2 Stand der Technik

2.1 Auswahl und Charakterisierung geeigneter pflanzlicher Öle (InfraLeuna, TLL)

Die Weltproduktion pflanzlicher Öle belief sich durchschnittlich in den Jahren 1996 bis 2000 auf $105,0 \times 10^6$ t und wird für die Jahre 2016 bis 2020 auf $184,7 \times 10^6$ t ansteigen¹. 80 % davon sind pflanzliche Öle, wovon 14 % industriell genutzt werden. Der größte Teil geht in die Nahrungs- und Futtermittelproduktion. Die wichtigsten pflanzlichen Öle sind Sojaöl, Palmöl, Raps- und Sonnenblumenöl. Wichtige Fettsäuren für die chemische Konversion sind Ölsäure aus dem Sonnenblumenöl, Erucasäure aus Raps und Ricinolsäure aus Rizinusöl. Der Gehalt an individuellen Fettsäuren in den Ölen einzelner Ölpflanzen kann zum Beispiel durch Züchtung oder gentechnische Modifikationen erhöht werden.

In den letzten Jahren sind neue Ölpflanzen zu dem technisch nutzbaren Spektrum hinzugekommen, die Fettsäuren mit Doppelbindungen an ungewöhnlichen Stellen enthalten. Beispiele sind Petroselinsäure aus Koriander (*C. sativum*, C₁₈ Doppelbindung an C₆), C₂₀-Fettsäuren aus Wiesenschaumkraut-Öl (*Limnanthes alba*) mit einer Doppelbindung an C₅, Calendulasäure (Doppelbindungen an C₈, C₁₀ und C₁₂) aus der Ringelblume (*Calendula officinalis*) und Eleostearinsäure aus chinesischem Holzöl (Doppelbindungen an C₉, C₁₀ und C₁₃), die Santalbinsäure aus dem Sandel-Baum (enyen-System), die Vernolsäure aus Eisenkraut (*V. galamensis*) (ungesättigte Epoxysäure), die Abietinsäure aus Kolophonium sowie die Palustrinsäure aus Kiefern- und Koniferenharzen².

Neben den o. g. Vertretern gibt es eine Reihe anderer Ölpflanzen, die sich als zukünftige Industrierohstoffe anbieten. Von der Dracosa AG wurde eine Studie zur Auswahl dieser Kandidaten erarbeitet (siehe Tabelle 1). Basierend auf bisher bekannten Applikationsfällen kommen Drachenkopf-, Krambe- und Safloröl sowie Tallöl wegen seiner Verfügbarkeit als potentielle Rohstoffe in Betracht. Speziell Tallöl als ein Abfallprodukt der Zellstoffindustrie steht nicht in Konkurrenz zur Nutzung innerhalb der Nahrungskette.

Aufgrund des vergleichbaren Fettsäuremusters können für die betrachteten Prozesse alternativ auch Raps-, Sonnenblumen- und Leinöl eingesetzt werden. Speziell das HO-(high oleic)-Sonnenblumenöl mit einem hohen Anteil an Ölsäure (> 85 % an C18:1 (ω -9)-Fettsäure), HOLLi-Raps mit einem hohen Anteil an Ölsäure im Öl (> 75 % an C18:1 (ω -9)) und Erucarapsöl mit einem erhöhten Anteil an Erucasäure (> 55 % an C22:1 (ω -9)-Fettsäure) wären potentielle Ausgangsstoffe für weitere chemische und biotechnologische Umsetzungen zu geeigneten Synthesebausteinen. Eine mögliche Verwendung als Nahrungs- bzw. Futtermittel schließt deren Verwendung in diesem Projekt aus.

¹ ISTA Mielke GmbH, Hamburg 2002

² Metzger & Bornscheuer (2006), Appl Microbiol Biotechnol 71: 13-22

Tabelle 1: Übersicht technisch nutzbarer Ölpflanzen basierend auf eigenen Untersuchungen der Dracosa AG. Insbesondere Drachenkopf, Saflor, Krambe und das sogenannte Tallöl sind im Rahmen des Vorhabens von Interesse (oberer Teil der Tabelle). Der untere Teil der Tabelle beschreibt herkömmliche Pflanzenöle, die bei Projektstart für erste Versuche verfügbar wären. Δ bezeichnet die mittlere Anzahl der Doppelbindungen pro Fettsäuremolekül.

	Anteile in %			
Fettsäure	Drachenkopf	Tallöl	Saflor h. L	Krambe
16 : 0			7	
18 : 0			2	17
18 : 1	10	46	15	8
18 : 2	18	43	75	7
18 : 3	61	3		
20 : 1				
22 : 1				56
24 : 1				24
Δ	2,39	1,37	1,6	1,25
Ölgehalt (%TM)	20	4-20	25	38
Fettsäure	Leinöl	Sonnenblumenöl	Raps Erucasäurearm	Raps Erucasäurereich
16 : 0	5	6	5	3
18 : 0	2	5	2	1
18 : 1	16	26	60	11
18 : 2	15	60	24	12
18 : 3	63		10	9
20 : 1				8
22 : 1				52
24 : 1				
Δ	2,35	1,46	1,38	1,22
Ölgehalt (%TM)	40	50	35	35

Die alternativen Ölpflanzen Iberischer Drachenkopf (*Lallemantia iberica*), Krambe (*Crambe abyssinica*) und Koriander (*Coriandrum sativum*) weisen aktuell in Deutschland keine bekannten Anbauumfänge auf.

Bezüglich der botanischen Einordnung handelt es sich beim Drachenkopf um einen Lippenblütler und beim Koriander um einen Doldenblütler. Die Krambe und der Erucaraps gehören zur Pflanzenfamilie der Kreuzblütler.

Zum Ertragsniveau der einzelnen Arten gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Je nach Witterungs- und Standortbedingungen sowie den noch wenig oder gar nicht züchterisch bearbeiteten Pflanzen sind die Erträge Schwankungen unterworfen.

Für den Drachenkopf sind Erträge zwischen 10 und 20 dt/ha mit ca. 38 % fettem Öl angeführt. Im Fettsäurespektrum des Öls dominiert die Linolensäure mit bis zu fast 70 %³. Der von der TLL ermittelte Ertragsdurchschnitt des 17-jährigen Versuchsanbaus in Thüringen beträgt 17 dt/ha und 34 % fettes Öl.

Erträge von 9 bis 40 dt/ha und Ölgehalte zwischen 30 und 40% sind für die Krambe genannt⁴. Der Ölgehalt des Samens ohne Samenhülle beträgt zwischen 40 und 50 %. Die Erucasäure weist im Öl einen Anteil von 55 bis 62 % auf⁵. Der Durchschnittsertrag ist im 6-jährigen Thüringer Versuchsanbau der TLL auf 21 dt/ha und 37 % fettes Öl beziffert.

Bei Koriander sind Kornerträge zwischen 2 und 24 dt/ha, Ölgehalte zwischen 18 und 25 % sowie Petroselinensäureanteile im fetten Öl zwischen 50 und 80 % dargestellt. Im Thüringer Versuchsanbau der TLL wurden bei Frühjahrssaat 17 dt/ha (8 Anbaujahre) und bei Herbstaussaat 26 dt/ha (4 Anbaujahre) bei 18 % Ölgehalt erreicht.

Der Erucaraps wächst in Deutschland auf ca. 25.000 ha, vorwiegend im Raum Brandenburg. Die Erträge liegen leicht unter denen des Winterrapses der 00-Qualität, während die Ölgehalte leicht darüber rangieren. Der von der TLL ermittelte Durchschnittsertrag im 4-jährigen Anbau beträgt 46 dt/ha, der Ölgehalt 44 %.

Die agronomischen Eigenschaften des Erucarapses entsprechen denen des 00-Winterrapses. Eine überjährige Standzeit von 11 Monaten resultiert aus dem Saatzeitpunkt im August und der Ernte im Juli/August des darauffolgenden Jahres.

Die alternativen Ölpflanzen Drachenkopf und Krambe werden als Sommerungen behandelt. Die Saat sollte Mitte März bis Mitte April, die Ernte in der Regel Anfang August desselben Jahres erfolgen^{6,7}.

Koriander kann sowohl überjährig stehen mit Saatzeitpunkt August bis September als auch als Sommerung mit Saatzeitpunkt März bis April. Letztgenanntes Verfahren ist das gebräuchlichere. Die Ernte erfolgt, wenn 60 % der Früchte ausgereift sind, in der Regel im August, Herbstaussaaten sind mitunter bereits im Juli druschreif⁸. Die Saat und Ernte der alternativen Ölpflanzen und des Erucarapses erfolgt mit üblicher Drill- und Mähdruschtechnik.

Bezüglich der Krankheiten und Schädlinge ist für den Drachenkopf die Botrytis-Stängelfäule in feuchten Jahren zu nennen.

³ BIERTÜMPFEL ET AL., 2005: Biertümpfel, Graf, Reinhold, Schmatz, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Leitlinie zur effizienten und umweltverträglichen Erzeugung von Iberischem Drachenkopf <http://www.tll.de/ainfo/pdf/idra0805.pdf> Zugriff: 22.09.2014

⁴ MAKOWSKI UND TROEGEL 2001: N. Makowski, T. Troegel, Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“, Krambe – eine alternative Sommerölfrucht, Landwirtschaftsverlag Münster 2001

⁵ HEYLAND ET AL., 2006: K.-U. Heyland, H. Hanus, E. R. Keller, Handbuch des Pflanzenbaues 4, Ölfrüchte, Faserpflanzen, Arzneipflanzen und Sonderkulturen, Eugen Ullmer KG, Stuttgart, 2006

⁶ BIERTÜMPFEL ET AL., 2005: Biertümpfel, Graf, Reinhold, Schmatz, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Leitlinie zur effizienten und umweltverträglichen Erzeugung von Iberischem Drachenkopf <http://www.tll.de/ainfo/pdf/idra0805.pdf> Zugriff: 22.09.2014

⁷ BIERTÜMPFEL 2009: Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Anbautelegramm Krambe <http://www.tll.de/ainfo/pdf/kram0809.pdf> Zugriff: 28.10.2014

⁸ TLL 2008: Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Anbautelegramm Koriander <http://www.tll.de/ainfo/pdf/kori0208.pdf> Zugriff: 22.09.2014

Der Koriander kann von dem Pilz *Ramularia coriandri* (Gelbwelke) sowie dem Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* (Bakterieller Doldenbrand) befallen werden. Beide Erreger können Totalausfälle verursachen.

Bei der Krambe können *Botrytis* (Grauschimmelfäule) und *Alternaria* (Schwärzepilze) als pilzliche Schaderreger bedeutsam sein. Rapsglanzkäfer und Rapserrdfloh sind im Anbau bekannt, der Befall ist jedoch meist nicht bekämpfungswürdig

Zu den tierischen Schädlingen im Winterraps zählen der Rapserrdfloh (*Psylloides chrysocephala*), der Große Rapsstängelrüssler (*Ceutorrhynchus napi*), der Gefleckte Kohltriebrüssler (*Ceutorrhynchus quadridens*), der Rapsglanzkäfer (*Meligethes aeneus*), der Kohlschotenrüssler (*Ceutorrhynchus assimilis*) und die Kohlschotenmücke (*Dasineura brassicae*). Pilzliche Schaderreger können die Wurzelhals- und Stängelfäule (*Phoma lingam*), die Weißstängeligkeit (*Sclerotinia sclerotiorum*), der Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) und die Rapschwärze (*Alternaria brassicaceae*) sein. Im Gegensatz zu den alternativen Ölpflanzen sind im Raps ausreichend Pflanzenschutzmittel zugelassen, die zur Ertragssicherung zum Einsatz kommen können.

2.2 Chemische Umesterung (InfraLeuna)

Die chemische Umesterung von Triglyzeriden mit Alkohol, z. B. Methanol wird zumeist kontinuierlich durchgeführt. Die Druckumesterung bei 90 bar und 240 °C stellt an den Rohstoff nur geringe Anforderungen. Es können unraffinierte Öle eingesetzt werden, da die freien Fettsäuren direkt verestert werden. Die Niederdruckumesterung bei 60 bis 90 °C und 2 bis 4 bar benötigt dagegen entsäuerte Öle, weist aber bezüglich der Investitions- und Energiekosten große Vorteile auf. Die Reaktion wird alkalisch katalysiert, wobei Alkalihydroxide, -carbonate und -alkoholate zum Einsatz kommen. Die Umesterung ist eine Gleichgewichtsreaktion. Sie besteht jedoch in Wirklichkeit aus einem System von drei Folgereaktionen, da die am Glycerinkörper befindlichen Fettsäuren nacheinander ausgetauscht werden. Außerdem besteht das Reaktionsgemisch zu Beginn und zum Ende der Reaktion aus zwei flüssigen Phasen. Die Reaktionsführung muss so erfolgen, dass mit einem minimalen Einsatz an Katalysator und möglichst geringem Methanolüberschuss ein hoher Umsatz erreicht wird. Zur Minimierung des Methanolüberschusses bietet sich ein mehrstufiges Verfahren an. Üblicherweise wird die Umesterung in der ersten Reaktionsstufe so weit getrieben, dass das gebildete Glycerin, welches im Ester schlecht löslich ist, als Phase abgetrennt wird. Es extrahiert dabei allerdings den alkalischen Katalysator und einen Teil des Methanols aus dem Reaktionsgemisch. In der zweiten Reaktionsstufe wird dem Rohester, der noch große Anteile an Mono-, Di- und Triglyzeriden enthält, nochmals Methanol und Katalysator zugesetzt und anschließend wieder eine Glycerinphase abgetrennt. Mit Hilfe dieser Reaktionsführung ist es möglich, den Überschuss an Methanol gering zu halten und trotzdem hohe Umsätze zu gewährleisten⁹.

⁹ Broschüre: Pflanzenöle und Pflanzenfette – Stoff der 1.000 Möglichkeiten; Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe

Man unterscheidet die Einphasenumesterung, bei der die Acylreste statistisch über alle Glyceride verteilt werden, von der gelenkten Umesterung, bei der die Reaktionstemperatur soweit gesenkt wird, dass höherschmelzende und schwerlösliche Triacylglyceride auskristallisieren. Das Fett wird auf diese Weise in höher- und niedriger schmelzende Fraktionen zerlegt. Als Katalysator dient in erster Linie Natriummethylat. Das getrocknete und entsäuerte Fett wird mit dem Alkoholat (0,1 - 0,3 % bezogen auf die Fettmasse) bei 80 – 100 °C gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wird der Katalysator durch Zugabe von Wasser inaktiviert und gemeinsam mit den gebildeten Seifen herausgewaschen¹⁰.

2.3 Hydrierung (InfraLeuna)

Im Jahre 1897 wurde an der Universität Toulouse von den Franzosen P. Sabatier und J. B. Senderens die Möglichkeit entdeckt, C-C-Doppelbindungen in organischen Verbindungen durch Anlagerung von Wasserstoff mit Hilfe eines Katalysators abzusättigen. Diese Entdeckung wurde von dem Deutschen W. Normann aufgegriffen und er entwickelte das Verfahren weiter, um insbesondere pflanzliche Öle und Fette wirtschaftlich härten zu können. Diese Erfindung wurde von ihm 1902 als Patent angemeldet. In den Jahren bis 1920 etablierte sich das neue Verfahren in der Oleochemie, nachdem sich gezeigt hatte, dass es unbedenklich zur industriellen Herstellung von essbaren Fetten und Ölen eingesetzt werden konnte und dadurch bisher nur schwer verwendbare Öle in nunmehr guter Qualität als Fett neue Märkte erschloss. Neben der Lebensmittelindustrie etablierte auch die Seifen- und Waschmittelindustrie das Verfahren. Es wurde zur Härtung industrieller Fette und Öle angewandt und ermöglichte die großtechnische Herstellung bestimmter Fettsäuren und ihrer Seifen.

Für die Selektivität der Hydrierung sind Art und Aktivität des Katalysators von entscheidender Bedeutung. Neben den gängigen Nickelkatalysatoren (Raney-Nickel) werden häufig Nickelsulfid (Ni_3S_2) und Oxide des Chroms, Kupfers oder Mangans eingesetzt¹¹. Neuere Arbeiten nutzen Ruthenium als selektiven Hydrierkatalysator im kontinuierlichen Betrieb und vermeiden den Einsatz pyrophoren Raney-Nickels¹². Die Hydrierung erfolgt zumeist in Rührwerksautoklaven bei einem Wasserstoffdruck von 1 - 5 bar und Temperaturen zwischen 150 und 220 °C. Neuere Untersuchungen zeigen auch die Eignung kontinuierlich betriebener Rohrreaktoren¹³. Die Hydrierungsbedingungen sind von erheblichem Einfluss auf die Zusammensetzung der Produkte und damit auf die Konsistenz des Produkts. So wird eine selektive Hydrierung der Doppelbindungen durch eine hohe Katalysatorkonzentration, die je nach Aktivität des Nickelkontaktes bei 200 - 800 g Nickel/t Fett liegt, eine hohe Temperatur und einen geringen Wasserstoffdruck begünstigt.

Über die katalytische Hochdruckhydrierung von Fettsäureestern gelang es Mitte der Dreißiger Jahre des letzten Jahrhunderts in Rodleben, eine breite Palette verschiedenster

¹⁰ Winnacker, Küchler; Chemische Technologie, Band 5, Organische Technologie 1, 4. Auflage.

¹¹ K. Noweck, The Symbiosis of Oleochemistry – Catalysis – Technology; 8th Symposium „Nachwachsende Rohstoffe für die Chemie“, März 2003, Tübingen

¹² Th. Hirth, R. Schweppe, J. Graf, R. Busch, M. Pursch; Herstellung von Zuckeralkoholen, WO 2006061196 (DE 102004058811); 2006

¹³ R. Schweppe, Th. Hirth, J. Graf: Mikrowellen- und ultraschall-assistierte hydrothermolytische Spaltung nachwachsender Rohstoffe zur Herstellung von organischen Zwischenprodukten und Feinchemikalien, Deutsche Bundesstiftung Umwelt, DBU-AZ 22447, 2004

Fettalkohole als Waschmittelrohstoff großtechnisch herzustellen. Aus den Fettalkoholen erhielt man durch Umsetzung mit Schwefelsäure die ersten synthetischen Tenside. Die Forschungsarbeiten von W. Schrauth führten dazu, dass – bedingt durch die hervorragenden anwendungstechnischen Eigenschaften – die aus den Fettalkoholen hergestellten Alkylsulfate sich im Markt schnell verbreiteten. In den folgenden Jahren gelang es durch Variation der Reaktionsparameter, vor allem der Temperatur, des Drucks und der Art und Beschaffenheit des Katalysators, die Zusammensetzung und das Verhalten der Endprodukte gezielt zu beeinflussen. So wurde es auch industriell möglich, eine Hydrierung von ungesättigten Methylestern mit Hilfe selektiv wirkender Katalysatoren nur an der funktionellen Gruppe unter Erhaltung der Doppelbindungen in die Praxis auszuführen.

Derivate gesättigter und ungesättigter Fettalkohole umfassen wegen der vielen Variationsmöglichkeiten ein besonders breites Anwendungsgebiet. Eine große Bedeutung besitzen die Nonionics auf Basis der Fettalkohole. Die Umsetzung der Alkohole mit Ethylenoxid ergibt flüssige bis pastös-feste Produkte mit einerseits hervorragenden Emulgatoreigenschaften, andererseits vorzüglicher Reinigungswirkung. Neben einer Vielzahl technischer Applikationen haben sich die Fettalkohole und davon abgeleitete Ester in der Kosmetik bewährt und gehören inzwischen zur Standardpalette kosmetischer Inhaltsstoffe. Die Verwendung von gesättigten als auch ungesättigten Fettalkoholen wird einerseits gefördert durch die steigenden Preise petrochemischer Produkte und andererseits durch die stetig wachsende Bevorzugung von Substanzen, die aus natürlichen Rohstoffen hergestellt werden.

2.4 Metathese (InfraLeuna)

Die Umsetzung von Fettsäuren bzw. deren Methylester in Metathese-Reaktionen ist mehrfach untersucht worden^{14, 15, 16}. Von besonderem Interesse ist die Umsetzung von Ölsäuremethylester im Sinne einer Selbstmetathese. Hierbei kommen heterogene und homogene Katalysatoren zum Einsatz. Bisher existiert jedoch keine großtechnische Umsetzung dieser Reaktion. Da die Selektivität und der Umsatz zu gering sind, müssen große Katalysatormengen eingesetzt werden, um eine ausreichende Ausbeute zu erzielen. Im Rahmen des Vorhabens standen deshalb die Entwicklung verbesserter Katalysatoren und die verbesserte Reaktionsführung für die Realisierung eines technisch und wirtschaftlich attraktiven Prozesses im Vordergrund.

2.5 Reduktive Aminierung (InfraLeuna)

Bei der reduktiven Aminierung ist die Synthese terminaler Amine das Ziel. Hierbei werden Carbonsäuren (z. B. Fettsäuren) unter reduktiven Bedingungen (in Anwesenheit von z. B. Wasserstoff oder Hydriden) zu Carbonylverbindungen reduziert und anschließend in Anwesenheit von Ammoniak umgesetzt. Durch Überschuss an Ammoniak kann die Weiterreaktion zu sekundären und tertiären Aminen vermieden werden. Bei vergleichbaren Substraten sind Löslichkeiten in flüssigem und überkritischem Ammoniak von ca. 10 – 30 % erreicht worden^{17, 18}, so dass technisch verwertbare Raum-Zeit-Ausbeuten erwartet werden

¹⁴ Newman, T. H. et al. WO 02/076920

¹⁵ Millis, J. R. et al. WO 2004062763

¹⁶ Ngo, H. L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2006, 83 (7), 629-634.

¹⁷ A. Fischer, T. Mallat, A. Baiker, *Angew. Chem.* 111, 362 (1999).

können. Als Katalysatoren können sowohl heterogene als auch homogene Katalysatorsysteme Anwendung finden. Im Bereich der homogenen Katalyse wurden bereits Komplexe des Typus Iridium, Rhodium oder Palladium getestet, aber auch Kobalt und Nickel-Katalysatoren, wie sie bei der Reduktion von Fettsäurenitrilen zu primären Fettaminen eingesetzt werden¹⁹, könnten eine katalytische Aktivität zeigen.

2.6 Chemische Epoxidierung (InfraLeuna)

Epoxide werden bereits aus Industriepflanzen, insbesondere aus nativen Ölen, wegen deren biologischer Abbaubarkeit sowie ihrer nicht toxischen und nicht mutagenen Eigenschaften hergestellt. So werden beispielsweise epoxydierende Pflanzenöle zunehmend als Crosslinker für Coatingmaterialien eingesetzt²⁰. Es ist bekannt, wie ungesättigte Fettsäuren nativer Öle und Fette unter Einsatz von Persäure zu Epoxiden umgesetzt werden können²¹. Hierzu werden u. a. Rührkesselkaskaden im kontinuierlichen Betrieb eingesetzt. Die hierbei ablaufenden Epoxidierungsreaktionen sind durch Folge- und Parallelreaktionen begleitet. Eine dieser Folgereaktionen ist bei der Verwendung von Peressigsäure die Bildung von Polyethern über die Zwischenstufe der Hydroxyacetate²². Aus Sicherheitsgründen ist man bemüht, diese durch Verwendung von Rührkesseln und durch Wahl der Reaktionsbedingungen, z. B. bei einer Epoxidierungstemperatur < 70 °C, zu unterdrücken²³. Denn bei der stark exotherm verlaufenden Epoxidierung ist eine Spontanzerersetzung von Persäuren bei Überschreitung einer Temperaturschwelle in großvolumigen Reaktoren infolge eines eventuellen Wärmestaus nicht völlig auszuschließen²⁴. Die Absenkung der Epoxidierungstemperatur ist allerdings mit einer geringeren Raum-Zeit-Ausbeute verbunden. Bekannt ist ferner, dass Produkte aus unerwünschten Folgereaktionen des oben genannten Epoxidierungsprozesses, insbesondere Polymerisate, die Abtrennung der eigentlichen Wertprodukte, nämlich der Epoxide, vom Sauerwasser erschweren und deshalb durch den Einsatz von speziellen Inhibitoren diese Folgereaktion technisch unterdrückt wird²⁵. Bekannt ist auch, dass für die Startreaktion zur Bildung von Polyurethan- und Polyesterepoxiden auf Basis von epoxidierten Leinöl-Hydroxylgruppen in Form von α,β -Dihydroxy-Strukturen, die in geringen Mengen durch die Addition von Wasser an die Epoxide immer bei der Epoxidierung auftreten, notwendig sind²⁶. Auch die Bildung älterer Epoxidharztypen aus Glyzidylethern und Dicarbonsäuren als Vernetzer geht von der gleichen Initialreaktion, nämlich der Umsetzung von Hydroxylgruppen des Glyzidylethers mit Dicarbonsäureanhydriden, aus²⁷.

¹⁸ P. Barton, R. H. McCormick, M. R. Fenske, I&EC Process Design Develop., 7, 366 (1968).

¹⁹ J. Barrault, Y. Poilloux, Catal. Today, 37, 137 (1997).

²⁰ Buismaan et al. (1998) 89 th AOCS Annual Meeting & Expo Abstracts Chicago

²¹ DE 33 20 219

²² Schneider (1967) Fette Seifen Anstrichmittel 573

²³ Schneider (1967) Fette Seifen Anstrichmittel 421/ Kovacs (1961) Fette Seifen Anstrichmittel 257

²⁴ Eckwert (1986) Dissertation TU Hannover

²⁵ DE 195 19 887 C1

²⁶ Motawie et al. (1995) J. Appl. Pol. Sci 1725

²⁷ Fisch et al. (1954) J. Pol. Sci. 497-502

2.7 Enzymatische Hydrolyse und Umesterung (InfraLeuna)

Zur Modifikation von Lipiden durch Hydrolyse und Umesterung werden Lipasen (organische Phase) und Esterasen (wässrige Phase) eingesetzt. Angriffspunkt der Enzyme ist die Esterbindung der Fettsäuren zum Glycerin. Die am häufigsten verwendeten Enzyme sind Lipasen. Sie sind vielfach kommerziell erhältlich und zeigen hohe Aktivitäten und Stabilitäten, sogar in nicht-wässrigen Systemen. Die enzymatischen Prozesse zur Gewinnung spezieller Produkte können damit kostengünstiger, einfacher und umweltfreundlicher als vergleichbare chemische Verfahren sein:

Die Hydrolyse von Glyceriden erfolgt aus wirtschaftlichen Gründen nur in Ausnahmefällen durch enzymatische Prozesse, z. B. die Seifenherstellung bei Miyoshi Yushi durch *Candida rugosa* Lipase. Mit der gleichen Lipase stellt Nippon Oil&Fats hochreine ungesättigte Fettsäuren aus Triglyceriden her. Gebräuchlicher ist der Einsatz von hydrolytisch wirkenden Lipasen in Formulierungen wie Waschmitteln oder in der Lebensmittelindustrie zur Aromaentwicklung²⁸.

Bei der Spaltung der Fette und Öle unterscheidet man auch die Spezifität der Enzyme. Diese bezieht sich dabei auf die Position der Esterbindung im Triglycerid. Grundsätzlich wird unterschieden in

- unspezifische Hydrolasen, die jede der drei Fettsäuren vom Glycerin abspalten, und
- regiospezifische Hydrolasen, die jeweils einzelne der Esterbindungen spalten können, so dass neben Fettsäuren auch Partialglyceride (Mono-/Diglyceride) erzeugt werden, die als Emulgatoren Verwendung finden.

Durch den Einsatz von Enzymen in mechanisch teilaufgeschlossenen Pflanzenbestandteilen kann auch eine deutliche Verbesserung bei der Extraktionsausbeute der Öle erreicht werden. So können neben dem Einsatz von Cellulasen und Glucosidasen zur Destabilisierung der Zellwände auch Amylasen zur Auflösung der Stärkematrix innerhalb eines Saatkorns und somit einer Steigerung des extrahierbaren Öls verwendet werden^{29, 30}.

2.8 Biochemische Epoxidierung (InfraLeuna, Fraunhofer IGB)

Aus den Klassen der Hydrolasen und Oxidoreduktasen sind Enzyme bekannt, die die Herstellung von Peroxyfettsäuren mit einer nachfolgenden Epoxidierung der Doppelbindungen katalysieren. Dieser enzymatische Schritt vermeidet die beim chemischen Verfahren aufgrund des stark sauren Reaktionsmilieus mögliche Öffnung des Epoxidringes. Von Novozymes ist ein entsprechendes Enzym (eine Hydrolase) aus *Candida antarctica* in immobilisierter Form verfügbar, das den Schritt der Persäurebildung katalysiert^{31,32}. Die Reaktion verläuft in Gegenwart von 30% wässrigem H₂O₂ als sogenannte chemoenzymatische Epoxidierung. Epoxidierungen an Fettsäuren können auch mit

²⁸ Jaeger & Reetz (1998) *Tibtech* 16: 396-403

²⁹ Pinelo M, Arnous A, Meyer AS, Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release, *Trends In Food Science & Technology* 2006 17(11), 579-590

³⁰ Sharma A, Khare SK, Gupta MN, Enzyme-assisted aqueous extraction of rice bran oil, *Journal Of The American Oil Chemists Society* 2001, 78(9), 949-951

³¹ Rüscher & Warwel (1999), *Industrial Crops and Products*, 9: pp. 125-132

³² Biermann et al. (2000), *Angewandte Chemie International Edition*, 39: pp. 2206-2224

Ganzzellkatalysatoren (z.B. *Nocardia corallina*, *Mycobacterium*, *Xanthobacter*) durchgeführt werden^{33,34}. Mit der Vernolsäure (12-(R), 13-(S)-Epoxy-9-cis-Octadecensäure), die zu 80% im Samenöl von *Vernonia galamensis* sowie in geringeren Mengen in *Euphorbia* sp. vorkommt, sind auch natürliche, epoxidierte Fettsäuren bekannt. Die entsprechenden Enzyme, die zur Biosynthese dieser epoxidierten Fettsäuren notwendig sind, wurden noch nicht beschrieben.

Warwel und Rüschen gen. Klaas beschreiben die chemo-enzymatische „Selbst“-Epoxidierung von Molekülen, welche gleichzeitig eine Carboxylgruppe und eine Kohlenstoffdoppelbindung enthalten, was beispielsweise bei ungesättigten Fettsäuren der Fall ist. Somit kann aus einer Fettsäure Lipase-katalysiert eine Persäure gebildet werden, welche ein Sauerstoffatom in einem überwiegend intermolekularen Prozess auf die Doppelbindung eines weiteren ungesättigten Moleküls überträgt^{35,36,37}. Dieser Vorgang ist in Abbildung 2 dargestellt.

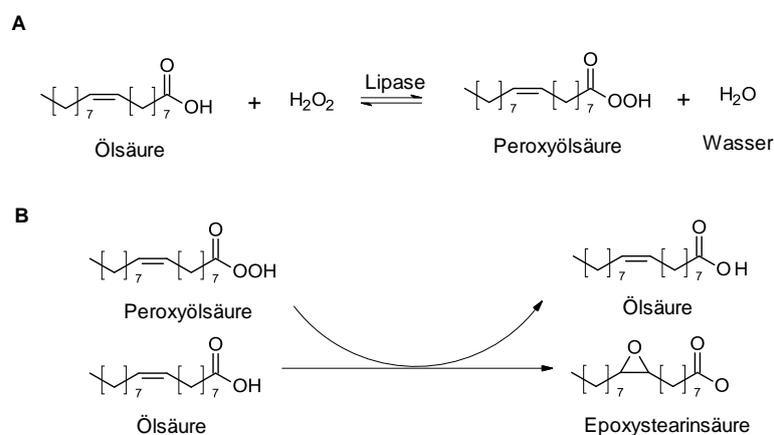


Abbildung 2: Mechanismus der chemo-enzymatischen „Selbst“-Epoxidierung am Beispiel von Ölsäure. (A) zeigt die Lipase-katalysierte Persäurebildung, (B) die Prileschajew-Epoxidierung durch Peroxyölsäure^{38,39}.

Neben den Carbonsäuren (Fettsäuren) können verschiedene Carbonsäureester^{40,41} wie auch Triglyzeride^{42,43} enzymatisch ohne den Einsatz von mineralischen Säuren zu Peroxysäuren umgewandelt werden. Dabei werden die Ester durch die Lipase zu einer Peroxysäure und einem Alkohol perhydrolysiert⁴⁴ (siehe Abbildung 3 A). Im Falle der Triglyzeride resultiert aus der Perhydrolyse die unerwünschte Bildung von Mono- und Diglyzeriden, wie in Abbildung 3 A dargestellt. Rüschen gen. Klaas und Warwel beschreiben, dass diese Bildung von Mono- und Diglyzeriden durch die Zugabe von geringen Mengen an freien Fettsäuren (5 Molprozent

³³ Gallagher et. al. (1999), Biochemical Journal, 339: pp. 79-85

³⁴ Habets-Cruetzen & De Bont (1985), Applied Microbiology and Biotechnology 22: pp. 428-433

³⁵ Warwel & Rüschen gen. Klaas (1995), Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1, pp. 29-35

³⁶ Rüschen gen. Klaas & Warwel (1996), Journal of the American Oil Chemists' Society, 73, pp. 1453-1457

³⁷ Orellana-Coca et al. (2005), European Journal of Lipid Science and Technology, 107, pp. 864-870

³⁸ Warwel & Rüschen gen. Klaas (1995), Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1, pp. 29-35

³⁹ Törnvall et al. (2007), Enzyme and Microbial Technology, 40, pp. 447-451

⁴⁰ Rüschen gen. Klaas & Warwel (1996), Journal of the American Oil Chemists' Society, 73, pp. 1453-1457

⁴¹ Rüschen gen. Klaas & Warwel. (1997), Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 117, pp. 311-319

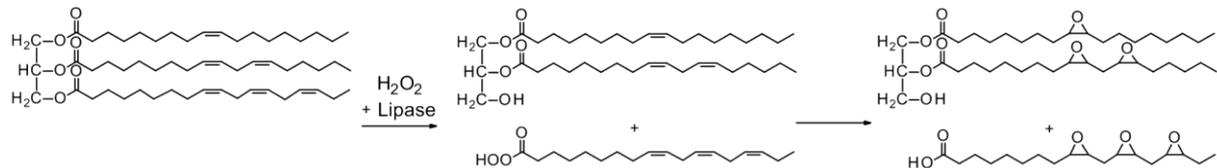
⁴² Rüschen gen. Klaas & Warwel (1996), Journal of the American Oil Chemists' Society, 73, pp. 1453-1457

⁴³ Rüschen gen. Klaas & Warwel (1999), Industrial Crops and Products, 9, pp. 125-132.

⁴⁴ Rüschen gen. Klaas & Warwel (1996), Journal of the American Oil Chemists' Society, 73, pp. 1453-1457

bezogen auf die Kohlenstoffdoppelbindungen) verhindert werden kann⁴⁵. Die freiwerdende Position am Glycerinrückgrat wird wieder durch die Lipase mit der im Reaktionsmedium vorhandenen freien Fettsäuren verestert, man spricht in diesem Zusammenhang von einer Interesterifizierung (siehe Abbildung 3 B). Mit dieser Methode können Selektivitäten und Umsätze bis zu 90 % oder mehr hinsichtlich der Epoxidbildung erreicht werden^{46,47}.

A



B

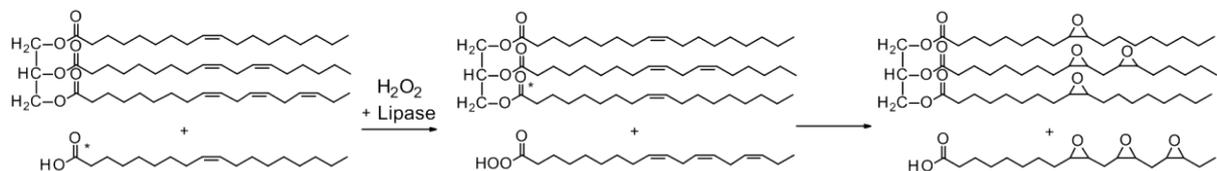


Abbildung 3: Perhydrolyse und anschließende Prileschajew-Epoxidierung von ungesättigten Triglyceriden (A) ohne die Zugabe von freien Fettsäuren, (B) unter Zugabe von freien Fettsäuren, wie von Rüschen gen. Klaas und Warwel 1999 beschrieben. Durch die Zugabe der freien Fettsäuren wird die Entstehung von Mono- und Diglyceriden verhindert^{48,49}.

Versuche die Eigenschaften natürlich vorkommender epoxidierten Öle, wie sie in den Pflanzen *Vernonia galamensis* und *Euphorbia lagascae* vorkommen, synthetisch durch chemo-enzymatische Epoxidierung nachzuahmen, wurden 1999 von Rüschen gen. Klaas und Warwel unternommen. Die in den natürlichen Epoxiden vorkommende Regio- bzw. Enantio-selektivität kann durch die Prileschajew-Epoxidierung jedoch nicht entstehen. Es können nur bestimmte Eigenschaften, wie die Viskosität und die Iodzahl, dieser natürlichen Epoxide durch chemo-enzymatische Epoxidation nachgestellt werden. Dazu werden Gemische von verschiedenen Pflanzenölen teilweise epoxidiert. Es entsteht ein Gemisch aus verschiedenen stark und an unterschiedlichen Stellen epoxidierten Triglyceriden, welches die erwünschten Eigenschaften aufweist⁵⁰.

Des Weiteren beschreiben Rüschen gen. Klaas und Warwel eine Methode zur Epoxidierung von Alkenen allgemein und von säureempfindlichen Substraten im Speziellen, wie beispielsweise β -Pinen und weiterer Terpene. Dabei wird Dimethylcarbonat mit Wasserstoffperoxid durch Perhydrolyse zu einem Peroxycarbonsäuremonomethylester (Peroxysäure) und Methanol umgewandelt. Nach Übertragung des aktiven Sauerstoffs der Peroxysäure auf ein Alken entsteht, neben dem Epoxid, ein Carbonsäuremonomethylester.

⁴⁵ Rüschen gen. Klaas & Warwel (1996), Journal of the American Oil Chemists' Society, 73, pp. 1453-1457

⁴⁶ Rüschen gen. Klaas & Warwel (1999), Industrial Crops and Products, 9, pp. 125-132.

⁴⁷ Biermann et al. (2000), Angewandte Chemie International Edition, 39: pp. 2206-2224

⁴⁸ Rüschen gen. Klaas & Warwel (1996), Journal of the American Oil Chemists' Society, 73, pp. 1453-1457

⁴⁹ Rüschen gen. Klaas & Warwel (1999), Industrial Crops and Products, 9, pp. 125-132

⁵⁰ Rüschen gen. Klaas & Warwel (1999), Industrial Crops and Products, 9, pp. 125-132

Diese Verbindung zersetzt sich unter den gegebenen Bedingungen zu Methanol und Kohlenstoffdioxid. Die Säure wird dadurch direkt aus dem Reaktionsgemisch entfernt, wodurch es möglich wird säureempfindliche Alkene zu epoxidieren⁵¹. Das beschriebene Reaktionsschema ist in Abbildung 4 dargestellt. Eine weitere Methode zur chemo-enzymatischen Epoxidierung von Alkenen wurde ebenfalls von Rüschen, Klaas und Warwel beschrieben. Dabei wird Ethylacetat als Co-Substrat zur Enzym-katalysierten Peressigsäure-Herstellung genutzt, wobei als Nebenprodukt Ethanol freigesetzt wird⁵².

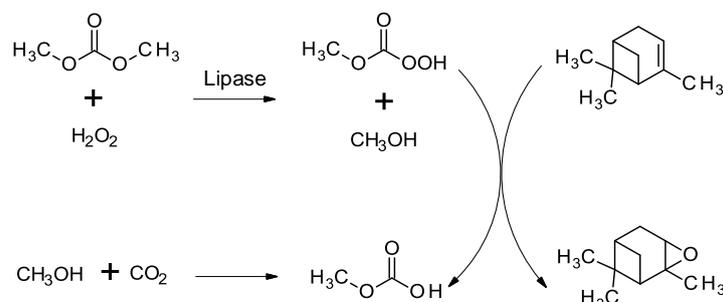


Abbildung 4: Die chemo-enzymatische Epoxidierung von säureempfindlichen Substraten am Beispiel von Pinen. Dimethylcarbonat wird mit Wasserstoffperoxid zu Peroxycarbonsäuremonomethylester und Methanol umgesetzt. Das aktive Sauerstoffatom wird auf die Kohlenstoffdoppelbindung des Alkens übertragen. Der dabei entstehende Carbonsäuremonomethylester zerfällt spontan zu Methanol und Kohlenstoffdioxid⁵³.

2.9 Biochemische ω -Funktionalisierung (Fraunhofer IGB)

Dicarbonsäuren (DCA) können sowohl durch chemische Synthese als auch durch Biotransformation in Mikroorganismen hergestellt werden. Mit Mikroorganismen wie Hefen der Gattung *Candida* können langkettige, gesättigte und ungesättigte Alkane oder Fettsäuren endständig oxidiert und selektiv zu α,ω -Dicarbonsäuren umgesetzt werden^{54,55}. Der am besten untersuchte Organismus zur DCA-Produktion ist die Hefe *Candida tropicalis*. In der *C. tropicalis* Mutante H5343 wurde die β -Oxidation durch Gendeletion der Gene *pox4* und *pox5* unterdrückt⁵⁶. Diese Gene codieren für zwei Isoenzyme der Acyl-CoA-Oxidase, und initiieren den ersten Schritt der β -Oxidation. Durch gezielte Deletion dieser Gene in der Mutante konnte somit die β -Oxidation und der Abbau der DCA in der Fermentation unterbunden werden. Die fermentative Herstellung langkettiger DCA mit *Candida tropicalis* ausgehend von Alkanen (C11-C17)^{57,58}, Alkenen, Alkanolen sowie Alkenolen⁵⁹, Fettsäuren und Fettsäureester (C14-C22)^{60,61} wurden bereits experimentell beschrieben. Als DCA-Bildner sind ebenfalls weitere *Candida*-Spezies, z. B. *Candida bombicola* und *Candida*

⁵¹ Rüschen, Klaas & Warwel (1999), Organic Letters, 1, pp. 1025-1026

⁵² Rüschen, Klaas & Warwel (1998), DGMK-Conference „Selective Oxidations in Petrochemistry“

⁵³ Rüschen, Klaas & Warwel (1999), Organic Letters, 1, pp. 1025-1026

⁵⁴ Fukui *et al.* (1981), React. React., 19, 217

⁵⁵ Rehm *et al.* (1981), React. React., 19, 175.

⁵⁶ Picataggio *et al.* (1992), Nature Biotechnology, 10 (8), 894.

⁵⁷ Schindler *et al.* (1990), Forum Mikrobiologie, 13 (5), 274

⁵⁸ Chen *et al.* (1994)

⁵⁹ Schindler *et al.* (1990), Forum Mikrobiologie, 13 (5), 274

⁶⁰ Schindler *et al.* (1990), Forum Mikrobiologie, 13 (5), 274

⁶¹ Fabritius *et al.* (1996), Applied Microbiology and Biotechnology, 45 (3), 342.

cloacae^{62,63} und die Hefe *Yarrowia lipolytica*⁶⁴ bekannt. Mit unterschiedlich gentechnisch modifizierten *Candida tropicalis*-Stämmen konnte eine Ausbeute von bis zu 200 g/L gesättigter C14-Dicarbonsäuren⁶⁵ erhalten werden. Für Elaidinsäure (trans C18:1) wurde eine Produktbildungsrate von bis zu 0,28 g/(Lh) DCA gezeigt⁶⁶. Ein industrieller Prozess für die Herstellung von langkettigen DCA ist bislang noch mit keinem der oben genannten Mikroorganismen in der Literatur bekannt. Hinzu kommt, dass der am besten adaptierte DCA-Produktionsstamm *C. tropicalis* in Deutschland mit der Sicherheitsstufe S2 eingestuft und daher für einen großtechnischen Maßstab zur Herstellung von langkettigen, ungesättigten DCA nicht interessant, da hohe sicherheitstechnische Vorkehrungen zu treffen sind, die kostenintensiv sind.

In Abbildung 5 ist der schematische Weg der Biotransformation vom Alkan zur DCA über die α - und ω -Oxidation dargestellt.

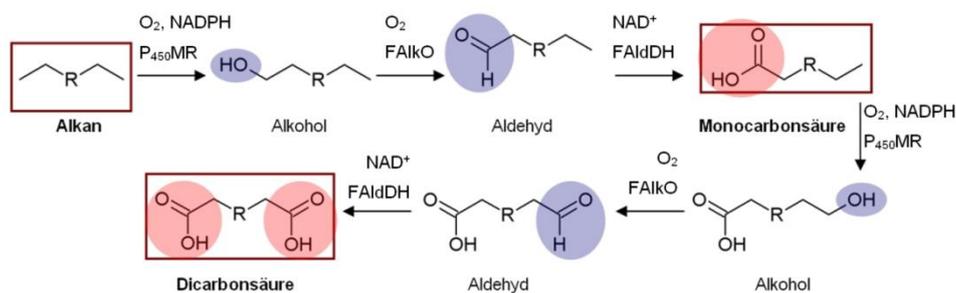


Abbildung 5: Schema der Oxidation vom Alkan zur Mono- und Dicarbonsäure^{67,68,69}. Die beteiligten Enzyme sind: Enzymkomplex ($P_{450}MR$) aus Cytochrom-P450-Monooxygenase und NADPH-haltige Cytochrom-P450-Reduktase, eine Fettsäure-Oxidase (FAIKO) und eine Fettsäure-Dehydrogenase (FAIDH).

Das Alkan wird zunächst durch den Enzymkomplex CytochromP450-Hydroxylase ($P_{450}MR$) unter Sauerstoffverbrauch zum Alkohol oxidiert, welcher durch eine Fettsäure-Oxidase (FAIKO) weiter zum Aldehyd oxidiert wird^{70,71,72}. Monocarbonsäuren entstehen im nächsten Schritt durch Oxidation des Aldehyds durch eine Fettsäure-Dehydrogenase (FAIDH). Erfolgen diese Katalyseschritte zusätzlich am anderen Ende der Kohlenstoffkette, entsteht aus der Monocarbonsäure eine α - ω -Dicarbonsäure. In der in den Peroxisomen stattfindenden β -Oxidation werden die entstandenen Mono- bzw. Dicarbonsäuren abgebaut, wodurch sie vom Mikroorganismus als Kohlenstoffquellen für den Energiehaushalt und das Wachstum genutzt werden können. Um die DCA als Fermentationsprodukt zu erhalten, ist somit eine Blockierung der β -Oxidation im Mikroorganismus notwendig⁷³.

⁶² Casey *et al.* (1989), US Patent 4 965 201

⁶³ Hitzman, D. (1975), US Patent 3 975 234

⁶⁴ Nicaud *et al.* (2004), WO Patent 2 006 064 131

⁶⁵ Picataggio *et al.* (1992), Nature Biotechnology, 10 (8), 894.

⁶⁶ Yi *et al.* (1988), Applied Microbiology and Biotechnology, 28 (6), 520

⁶⁷ Eschenfeldt *et al.* (2003), Applied and Environmental Microbiology, 69 (10), 5992

⁶⁸ Cao *et al.* (2006), Biotechnology Journal, 1 (1), 68

⁶⁹ Craft *et al.* (2003), Applied and Environmental Microbiology, (10), 5983.

⁷⁰ Eschenfeldt *et al.* (2003), Applied and Environmental Microbiology, 69 (10), 5992

⁷¹ Cao *et al.* (2006), Biotechnology Journal, 1 (1), 68

⁷² Craft *et al.* (2003), Applied and Environmental Microbiology, (10), 5983.

⁷³ Eschenfeldt *et al.* (2003), Applied and Environmental Microbiology, 69 (10), 5992

3 Erzielte Ergebnisse

3.1 Rohstoffbeschaffung, Charakterisierung und Aufarbeitung (Dracosa, InfraLeuna, TLL)

Im Rahmen des Projektes wurden alternative heimische Ölpflanzen, die nicht in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion stehen, betrachtet. Folgende Schwerpunkte wurden dabei untersucht:

- Auswahl alternativer heimischer Ölpflanzen und Öle mit technologisch wichtigen funktionellen Inhaltsstoffen (3.1.1)
- Beschaffung der pflanzlichen Rohstoffe und Öle (3.1.2)
- Pressen der Saat und weitere Aufarbeitung der Öle (3.1.3)
- Charakterisierung der Inhaltsstoffe der pflanzlichen Öle sowie deren Eignung für die im Projekt verfolgten industriellen Anwendungen (3.1.4 und 0)
- Ökonomische und ökologische Bewertung (3.1.6 bis 3.3.5)

3.1.1 Auswahl alternativer heimischer Ölpflanzen und Öle (InfraLeuna)

In enger Zusammenarbeit aller Projektpartner wurden verschiedene pflanzliche Öle mit wichtigen funktionellen Inhaltsstoffen betrachtet und in dem Sinne final ausgewählt, dass sie für dieses Projekt verwendet werden konnten. Kriterien für die Auswahl waren unter anderem:

- Ölgehalt der entsprechenden Ölpflanzen,
- Fettsäureverteilung und der Gehalt der für das Projekt besonders wertvollen Fettsäuren wie Linol-/Linolensäure (mehrfach ungesättigte Fettsäuren) und Erucasäure (langkettige C22-Fettsäure, einfach ungesättigt),
- Verfügbarkeit und technische Kultivierbarkeit der entsprechenden Ölpflanzen in Deutschland bzw. Europa, vorzugsweise auf marginalen Böden ohne wirtschaftliche Bedeutung bzw. Ruderalflächen,
- keine Verwendung als Futter- oder Ernährungspflanzen.

Auf Basis der oben aufgeführten Kriterien wurden folgende Öle ausgewählt:

a. **Drachenkopföl** (Iberischer Drachenkopf, *Lallemantia iberica*)

Hohe Jodzahl; kein Nahrungsmittel; kann auf schlechten Böden angebaut werden; in Voruntersuchungen wurden bei der Produktion von Epoxiden im Vergleich zu Leinöl hellere Produkte erhalten

b. **Senfkernöl** (Gelbsenf oder Weisser Senf, *Sinapis alba L.*, Syn: *Brassica alba*)

Hoher Anteil an Erucasäure, damit waren bessere Eigenschaften für die Nutzung als Hydrophobierungsmittel und Schmiermittel zu erwarten; weiterhin genügend hohe Jodzahl für den Einsatz in der Epoxidierung und Metathese

c. **Krambeöl** (Krambe oder Abessinischer Meerkohl, *Crambe abyssinica*)

Hoher Anteil an Erucasäure, damit waren bessere Eigenschaften für die Nutzung als Hydrophobierungsmittel und Schmiermittel zu erwarten; weiterhin genügend hohe Jodzahl für den Einsatz in der Epoxidierung und Metathese

d. **Holunderkernöl** (Schwarzer Holunder, *Sambucus nigra*)

Abfallprodukt, jedoch mit hoher Jodzahl; hoher Anteil an Linol- und Linolensäuren; keine Konflikte als Nahrungs- oder Futtermittel

e. **Tallöl** (Nebenprodukt aus der Zellstoffindustrie)

Abfallprodukt; neben den Fettsäureölen enthält Tallöl auch einen hohen Anteil an Abietinsäure, die bei sorgfältiger Aufarbeitung eventuell gewonnen und als Baustein für die chemische Synthese verwendet werden kann; als Ölquelle ist in erster Linie der kostengünstige Beschaffungspreis ausschlaggebend

Des Weiteren wurde Sonnenblumenöl (evtl. auch HO- Sonnenblumenöl), Olivenöl und Erucarapsöl vom Projektverbund mit in die Untersuchungen hinsichtlich Verfügbarkeit und Eignung einbezogen.

3.1.2 Rohstoffbeschaffung (Dracosa, InfraLeuna, TLL)

Die Beschaffung der pflanzlichen Öle erfolgte in Zusammenarbeit von TLL, Dracosa AG und InfraLeuna GmbH. Neben dem Anbau von Ölpflanzen durch TLL und Dracosa AG wurden zusätzlich Öle kommerziell erworben.

3.1.2.1 Anbau von Drachenkopf durch Dracosa

Durch die Dracosa AG wurden an drei verschiedenen Stellen Anbauversuche mit Drachenkopfsamen initiiert (Linthe, Deetz, Rumänien; siehe Tabelle 2), um daraus Saatgut zu erzeugen und durch Verpressung das entsprechende Drachenkopföl zu erhalten. Die Verteilung auf drei unterschiedliche Anbauorte war notwendig, um einen repräsentativen Überblick über die Anbaumöglichkeiten und Ergebnisse an verschiedenen Standorten mit jeweils differenzierten Bedingungen zu erhalten (Ausschluss von Pilzbefall und fehlender Keimfähigkeit) und um den Anbau dieser Spezialkultur länderübergreifend propagieren zu können. Durch Gespräche der InfraLeuna GmbH mit der Universität Halle-Wittenberg wurde des Weiteren eine Option für den Anbau von Iberischen Drachenkopf in Nordafrika im Rahmen eines Entwicklungshilfe-Projekts eröffnet, das den kostengünstigen Anbau dort ermöglichen würde.

Tabelle 2: Anbauversuche mit Drachenkopfsamen.

Ort	Fläche	Ertrag	Keimfähigkeit/ Lagerfähigkeit	Ölertrag
Linthe	5,4 ha	1 t	Negativ / Negativ	0 t (Entsorgung)
Deetz	5,5 ha	3,5 t	35 - 45%	1 t
Rumänien	17 ha	3,5 t	80 – 85 %	(als Saatgut)

Der Anbau erfolgte entsprechend den Empfehlungen der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL), die in der Vergangenheit intensive Versuche durchgeführt haben, um Drachenkopf als Kulturpflanze zu etablieren^{74,75}.

3.1.2.2 Anbau von Iberischer Drachenkopf, Krambe, Eruca- Raps und Koriander durch TLL

In den Jahren 2012 und 2013 erfolgte der Anbau und die Ernte der Ölpflanzen Iberischer Drachenkopf, Krambe, Eruca-Raps und Koriander auf den Versuchsfeldern der TLL sowie aufgrund der Nachfrage seitens der Projektpartner weiterer Ölpflanzen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Anbau und Ernte der Ölpflanzen 2012 und 2013.

	Anbau m ²	Kornertrag dt/ha, 9 % Feuchte	TS Ernte ¹ %	Ölgehalt TM ² %
Ernte 2012				
Drachenkopf	247,5	11,8	92,3	27,7
Krambe	247,5	16,0	94,3	36,5
Koriander	742,5	19,0	92,3	23,3
Ernte 2013				
Drachenkopf	1.093,5	10,0	93,6	34,6
Krambe	1.147,5	22,8	93,6	35,9
Koriander	1.000	9,9	88,3	16,7
Erucaraps	540	53,1	95,6	52,6
Senf	1.000	6,0		
Lein	1.000	15,0		
HO-Sonnenblume	500	40,4	81,7	47

¹Trockensubstanz ²Trockenmasse

Die Witterung in den beiden Anbaujahren war für die meisten Sommerkulturen wenig vorteilhaft, was sich in Erträgen am unteren Rand mehrjähriger Durchschnittserträge äußert. 2012 litten der Drachenkopf und die Krambe unter dem trockenen Frühjahr und den nachfolgenden feuchten Verhältnissen in den Sommermonaten. Das frühzeitige Auftreten von Pilzkrankheiten beeinträchtigte die Kornfüllung und der Drachenkopf erlangte einen geringen Ölgehalt. Hingegen erreichte der Koriander etwa den Durchschnittsertrag und einen überdurchschnittlichen Ölgehalt. 2013 erfolgte die Aussaat der Sommerkulturen aufgrund des sehr langen Winters verspätet am 17. April. Dreifach höhere Niederschlagsmengen im Mai im Vergleich zum langjährigen Mittel führten zu Verschlammungen und einer schlechten Entwicklung der Kulturen. Letztlich resultierten daraus Erträge unter dem vieljährigen Durchschnitt. Nur Krambe und Sonnenblume kamen mit der darauffolgenden trockenen Hitze in Juli und August gut zurecht und erreichten einen hohen Ertrag. Der Erucaraps als Winterung erzielte einen sehr guten Ertrag.

⁷⁴ Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Anbautelegramm Iberischer Drachenkopf (www.tll.de/ainfo/pdf/idra0708.pdf)

⁷⁵ G. Wurl, T. Graf, A. Biertümpfel, A. Vetter: Ergebnisse mehrjähriger Anbauversuche mit Iberischem Drachenkopf als Linolensäurelieferant (www.tll.de/ainfo/pdf/aidr0403.pdf)

Aufgrund fehlender züchterischer Bearbeitung muss bei den alternativen Ölpflanzen generell mit Ertragsschwankungen im Anbau gerechnet werden. Die Durchschnittserträge und deren Streuung von Drachenkopf, Krambe, Koriander und Erucaraps im mehrjährigen Dornburger Anbau werden ausführlich im Kapitel Ökologische Bewertung des Anbaus, Flächeneffizienz und Ertragsstabilität dargestellt.

3.1.2.3 Beschaffung weiterer Öle (InfraLeuna, TLL)

Senfkernöl

Senfkernöl ist ein Handelsprodukt. Es wurde für das Projekt direkt eingekauft. Aus Gründen der Nachhaltigkeit und Ökologie erfolgte der Zukauf aus einer Ölmühle aus der Region (Kroppenstedter Ölmühle Walter Döpelheuer GmbH). Die Verfügbarkeit ist auch weiterhin gegeben. Aufgrund der hohen Nachfrage nach Senföl wurden zusätzlich zu dem aus Dornburger Anbau gepressten Senföl 50 Liter vom ABW Apoldaer Biomassewerk UG beschafft.

Krambeöl

Krambe gehört in Deutschland und der EU nicht zu den als Spezialkulturen regelmäßig angebaute Ölpflanzen. Im Rahmen von Projekten innerhalb Deutschlands und der Europäischen Union wurde der begrenzte Anbau für eine industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe öffentlich gefördert, wobei sich ein wirtschaftlich bedeutender Anbau nicht durchsetzen konnte. Krambe muss weiterhin durch Einzelverträge mit Spezialpflanzen-Landwirten angebaut werden. Durch die InfraLeuna GmbH initiierte Anbauversuche scheiterten durch Unkenntnis des entsprechenden Anbauzeitpunkts. Hier gibt es für zukünftige weitere Projekte Verbesserungspotential durch Einbeziehung kompetenter Partner. Durch Kontakte mit der TLL war es möglich, insgesamt 15 kg Krambeöl kurzfristig den Partnern kostenfrei zur Verfügung stellen zu können. Des Weiteren erklärte sich die TLL bereit, in der Saison 2012 unentgeltlich einen Anbauversuch mit Krambe durchzuführen.

Holunderkernöl

Holunderkerne sind ein Abfallprodukt aus der Kultivierung des Schwarzen Holunders und der Pressung der Holunderbeeren („Hollerbeeren“) zu Saft vor allem in Österreich in der Steiermark. Die Anbaufläche betrug 2013 in Deutschland ca. 550 ha, in Österreich in der Steiermark als größtes Anbaugebiet in Europa ca. 1200 bis 1500 ha^{76,77}. Es werden nur geringe Mengen der anfallenden Kerne zu Öl gepresst, so dass das Holunderkernöl ein Spezialprodukt speziell für Bio-Kosmetikformulierungen mit entsprechendem Preis darstellt. Entsprechende Angebote zur Lieferung an die InfraLeuna GmbH beliefen sich in 2009/2010 auf 1190 bis 1290 €/1000 ltr. frei Haus Lieferung. Die Gesamtmenge an frei handelbarem Holunderkernöl übersteigt schätzungsweise nicht mehr als 1000 t/a⁷⁸.

⁷⁶ <http://www.kleinezeitung.at/freizeit/lokalerezepte/3333144/industrie-reisst-sich-um-den-holunder.story> (08.03.2015; 18:10)

⁷⁷ http://de.wikipedia.org/wiki/Schwarzer_Holunder (08.03.2015; 18:15)

⁷⁸ vgl. dazu: <http://www.vulcolor.com/de/produkte/holundertrester-holunderkerne-holundermehl-holundersamenoel.html> (08.03.2015; 18:23)

Tallöl

Tallöl fällt als Abfallprodukt bei der Zellstoffherstellung an. Durch die Dracosa AG und das ICT wurde eine ausreichende Menge für den gesamten Projektverlauf von der Zellstoff Stendal GmbH erhalten.

3.1.3 Pressen der Saat und weitere Aufarbeitung der Öle (TLL, InfraLeuna)

Das Pressen der Saat aus der Ernte erfolgte auf den Laborpressanlagen der TLL vom Typ KOMET DD85-G, Durchsatz je nach Saat ca. 25 kg/h und KOMET CA/59G, Durchsatz je nach Saat ca. 10 kg/h. Es wurden die Pressparameter ermittelt und eine quantitative Erfassung nach den jeweiligen Verfahrensschritten sowohl hinsichtlich der Ölausbeute als auch der Nebenproduktausbeute vorgenommen (siehe Tabelle 5). Die kalt abgepressten Öle wurden im Technikum der TLL gefiltert und gereinigt (Säureentschleimung, Laugenentsäuerung). Die Reinigung oder Veredelung des Öls durch Entschleimung und Entsäuerung orientierte sich dabei an MATTHÄUS UND MÜNCH (2009). Beide Veredelungsstufen fanden in einem Verfahrensschritt statt. Dabei werden für Stabilität und Lagerfähigkeit Phospholipide, Kohlenhydrate, Proteine, Metallionen, Seifen, Farb- und Schmutzstoffe sowie freie Fettsäuren abgetrennt.

Das Rohöl wurde im Wasserbad auf 70 °C erhitzt, pro kg Rohöl 1 g 85 %ige Phosphorsäure zugesetzt und intensiv vermischt. Zur Säureneutralisation wurden nach 10 Minuten pro kg Rohöl 50 ml 32%ige Natronlauge und 2% entmineralisiertes Wasser zugegeben. Die Reagenzien wurden intensiv vermischt und unter leichtem Rühren hat man sie 60 Minuten reagieren lassen. Während der letzten 10 Minuten wurde die Temperatur auf 85°C erhöht. Die ausgefällten Inhaltsstoffe setzten sich innerhalb von 24 Stunden ab. Das gereinigte Öl wurde erneut gefiltert.

Insgesamt wurden 351 Liter (L) aufbereitetes Öl an die Projektpartner versendet (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Mengen aufbereiteter und versendeter Pflanzenöle.

Pflanzenöl	Menge, L	Projektpartner
Iberischer Drachenkopf	58	32 L IGB, 14 L CBP, 12 L Hobum
Krambe	66	60 L CBP, 6 L Hobum
Koriander	22,5	15 L IGB, 7,5 L Hobum
Erucaraps	77	1 L IGB, 70 L CBP, 6 L Hobum
Senf	35,5	29 L IGB, 21 L DHW, 0,5 L Eucodis, 5 L Addinol, 1 L Hobum
Lein	20	20 L IGB, 44 L CBP
Schwarzkümmel	5	2 L IGB, 3 L Hobum
Saflor	6	5 L IGB, 1 L Hobum
Leindotter	4	4 L Hobum
HighOleic-Sonnenblumen	30	30 L CBP

Tabelle 5: Ölausbeuten nach Pressung (Rohöl) und nach Entschleimung/Entsäuerung (Gereinigtes Öl) dezentrale Pressung im Technikum der TLL.

Pflanzenöl	Rohöl, % der Saat	Gereinigtes Öl, % der Saat
Iberischer Drachenkopf	27	18
Krambe	20	15
Krambe, geschält	34	21
Koriander	16	12
Erucaraps	34	26
Senf	15	13
Lein	35	29
Schwarzkümmel	21	15
Saflor	17	12
Leindotter	33	25
HighOleic-Sonnenblumen	38	34

In industriellen Herstellungsprozessen ist die Ölausbeute nach der Reinigung höher als in den hier dargestellten Technikumsversuchen.

Die kommerziell erworbenen Pflanzenöle wurden in der Regel als Rohöle beschafft. Die Zusammensetzung ist chemisch gesehen nicht einheitlich; es können Trübstoffe, Lecithine, Diglyceride, freie Fettsäuren und ähnliche Stoffe vorhanden sein. Für chemische und biotechnologische Umsetzungen sind sie schlichtweg nicht rein und einheitlich genug. Eine Reinigung, d. h. Raffination entsprechend dem folgenden Schema war deshalb zwingend notwendig (siehe Abbildung 6).

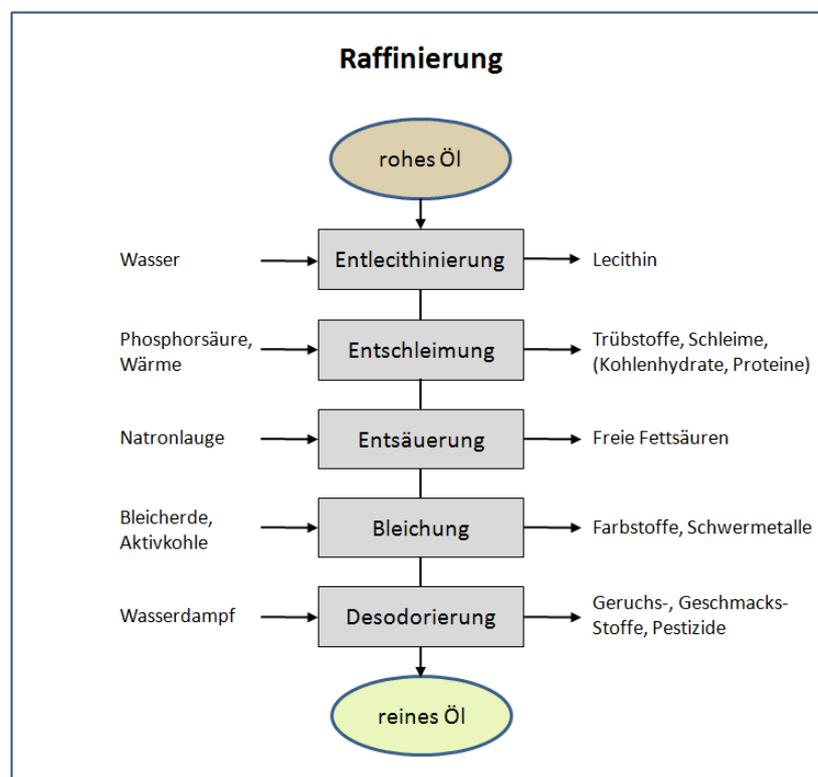


Abbildung 6: Raffinationsprozess pflanzlicher Öle.

Da dieser Prozess in der Phase 1 des Projekts von den Projektpartnern nicht selbst durchgeführt werden konnte, wurde mit der Pilot Pflanzenöltechnologie Magdeburg e. V. (PPM) ein externes Unternehmen gefunden, das die vollständige Raffination für drei Öle (Drachenkopföl, Holunderkernöl, Senföl) für jeweils 50 kg durchführte. Die genauen Verfahrensbedingungen sind am Beispiel von Senföl in Tabelle 6 aufgeführt.

Verfahrens-Kurzbeschreibung – Verarbeitung von Senföl (InfraLeuna)

Material: Senföl, 1 x filtriert
 Charge 3737 vom 16.12.2009 (Herkunft: Kroppenstedter Ölmühle)
 46,85 kg Brutto / 44,45 kg zur Raffination
 PPM-Eingangs-Nr. **13/2010**

Tabelle 6: Prozessschritte und Prozessbedingungen bei der Raffination von Senföl.

Prozessschritt	Prozessbedingungen	Probenahme
Hydratisierung	10 % Wasser ca. 85°C 45 min 350 rpm	200 g
Entschleimung	0,15 % Phosphorsäure (85 %-ig 1:1 verdünnt) ca. 85 °C 45 min 350 rpm 10% Wasser	200 g
Neutralisation und Wäschen	4 %-ige Natronlauge (70% Überschuss) 90 - 92°C 20 min 350 rpm 10% Wasser 5 Wäschen bei ca. 90°C mit je 10% Wasser (20 min)	nach 1. Wäsche 200 g nach letzter Wäsche 200 g
Trocknung	82 - 96 °C 40 min 500 rpm bis 30 mbar	200 g
Bleichung	1% Tonsil Supreme 114 FF 90-95 °C 20 min + 5 min einrühren 500 rpm bis 20 mbar	200 g
Filtration	Vakuumfiltration über Filternutsche & 5 L Saugflasche / Filterplatte P400	200 g
Desodorierung	220°C 120 min 1 - 2 mbar 1 – 2 kg/h Wasserdampf	200 g

Als Ergebnis der Raffination konnte eine Verringerung der freien Fettsäuren (Säurezahl), eine Erhöhung des Doppelbindungsgehalts pro Gewichtseinheit (Jodzahl) sowie eine Reduzierung der Farbe erzielt werden (siehe Tabelle 7):

Tabelle 7: Vergleich der Eigenschaften der Pflanzenöle vor und nach der Raffination (PPM).

Pflanzenöl	Eigenschaft	Rohöl	Raffinat
Drachenkopföl	Säurezahl [mg KOH/ g Öl]	8,29	0,11
	Peroxidzahl [meq O ₂ / kg Öl]	4,38	0,28
	Farbe AOCS 1"	0,8 R 70 Y	0,0 R 5,4 Y
Holunderkernöl	Säurezahl [mg KOH/ g Öl]	1,68	0,09
	Peroxidzahl [meq O ₂ / kg Öl]	20,96	1,88
	Farbe AOCS 1"	1,9 R 18 Y	0,6R 7,2 Y
Senföl	Säurezahl [mg KOH/ g Öl]	0,56	0,26
	Peroxidzahl [meq O ₂ / kg Öl]	6,44	0,14
	Farbe AOCS 1"	2,0 R 70 Y	0,1 R 1,4 Y

Der Raffinationsverlust betrug beim Holunderkernöl 18,4 %, beim Drachenkopföl durch eine schlechtere Qualität des Rohöls jedoch 57,2 %. Dieser Verlust muss bei der Planung einer zukünftigen Großanlage in die Massenbilanz mit eingerechnet werden.

3.1.4 Beprobung und Analyse der Ölsaaten, der Öle aus dem Anbau, der Reststofföle und der Presskuchen (TLL)

Die Beprobung und Analyse der angebauten Ölsaaten erfolgte auf den Ölgehalt, bezogen auf die Trockenmasse (siehe Tabelle 3) sowie auf freie Fettsäuren bei ausgewählten Ölen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Säurezahl und freie Fettsäuren, Senf- und Erucarapsöl.

	Säurezahl (mg KOH/g)	Freie Fettsäuren (%)
Senföl (Apoldaer Biomassewerk), gereinigt	0,011	0,006
Senföl (Dornburg), gereinigt	0,009	0,004
Erucarapsöl, gereinigt	0,198	0,099

Für die Bewertung der wirtschaftlichen Nutzung der Presskuchen von Drachenkopf, Krambe, Koriander und Erucaraps wurden diese auf Inhaltsstoffe und relevante Parameter für die einzelnen Verwertungsrichtungen untersucht. Dazu zählen Nährstoffanalysen, der Hohenheimer Biogastest, die Weender Futtermittelanalyse und die Heizwertbestimmung (siehe Tabelle 9). Die Fettsäurespektren der Presskuchen, welche den Fettsäurespektren der Öle entsprechen, wurden analysiert (siehe Tabelle 10).

Tabelle 9: Laboranalyse Presskuchen*.

	ME ¹	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Erucaraps	Verfahren
Trockensubstanz	% FM	91,8	91,2	93,9	92,0	Trockenschrank
Rohfett	% TM	8,17	20,8	13,6	17,5	Petroletherextraktion nach HCL-Hydrolyse
Rohasche	% TM	8,41	5,43	7,31	6,48	Trockenveraschung Muffelofen
Rohprotein	% TM	22,1	19,5	18,8	36,7	Kjeldahldestillation
Rohfaser	% TM	26,9	34,4	31,8	14,8	Fibertec
ADF	% TM	36,3	39,4	18,4	35,7	Fibertec
Lignin	% TM	13,4	17,5	8,87	13,8	Fibertec
NDF	% TM	48,6	46,0	12,0	66,6	Fibertec
Gesamtzucker	% TM	1,99	4,76	1,59	7,03	Luff-Schoorl nach ethanolischer Extraktion
Stärke	% TM	<3,00	4,22	<3,00	<3,00	Polarimetrie
Lysin	% FM	1,24	1,11	1,00	2,15	Ionenaustauschchromatographie
Methionin	% FM	0,46	0,32	0,34	0,70	Ionenaustauschchromatographie
Threonin	% FM	0,92	0,88	0,65	1,48	Ionenaustauschchromatographie
Glucosinolate	µmol/g	0,57	2,69	0,61	25,49	HPLC
PRO	µmol/g	0,04	1,05	0,10	12,92	HPLC
GNL	µmol/g	0,05	0,04	0,03	0,66	HPLC
GNA	µmol/g	0,05	0,30	0,06	6,04	HPLC
4OH	µmol/g	0	0,02	0,02	1,34	HPLC
GBN	µmol/g	0	0,05	0,02	1,99	HPLC
GBC	µmol/g	0	0,03	0,01	0,69	HPLC
NAS	µmol/g	0,04	0,47	0,03	1,07	HPLC
4-methoxy	µmol/g	0,38	0,74	0,35	0,55	HPLC
N-GBC	µmol/g	0	0	0	0,23	HPLC
Phosphor	g/kg TM	12,4	8,11	9,36	12,5	ICP-OES
Kalium	g/kg TM	23,3	7,93	17,6	13,2	ICP-OES
Magnesium	g/kg TM	4,86	2,72	4,84	4,75	ICP-OES
Calcium	g/kg TM	6,42	12,5	14,8	8,35	ICP-OES
Schwefel	g/kg TM	3,43	8,18	2,82	7,70	ICP-OES
Natrium	g/kg TM	0,031	0,024	0,090	0,025	ICP-OES
Chlorid (w.Extrakt)	% TM	<0,05	0,14	0,1	0,07	Potentiometr. Titration
Kohlenstofforg. = min.	% TM	47,4	53,0	49,1	51,0	Trockene Verbrennung (Elementaranalyse)
Kupfer	mg/kg TM	11,8	3,62	17,9	7,83	ICP-OES
Mangan	mg/kg TM	50,9	23,3	26,6	68,5	ICP-OES
Zink	mg/kg TM	63,4	35,3	52,9	71,9	ICP-OES

	ME ¹	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Erucaraps	Verfahren
Cadmium	mg/kg TM	0,033	0,21	0,14	0,12	ICP-MS
Chrom	mg/kg TM	1,69	0,25	0,27	0,016	ICP-MS
Blei	mg/kg TM	0,28	0,086	0,069	0,0076	ICP-MS
Nickel	mg/kg TM	0,95	0,47	1,05	0,64	Graphitrohr-AAS
Eisen	g/kg TM	0,31	0,30	0,094	0,13	ICP-OES
Nitrat	mg/kg TM	<50,0	<50,0	<50,0	<50,0	Fotometrie
pH-Wert	---	6,9	5,5	6,8	6,1	Potentiometrie
HBT (Biogas)	NI/kg OTS	495	548	522	676	Hohenheimer Biogastest (HBT)
HBT (Methan)	NI/kg OTS	305	353	330	428	Hohenheimer Biogastest (HBT)
HBT (Methan %)	%	61,7	64,6	63,3	63,4	Hohenheimer Biogastest (HBT)
Heizwert, oberer	J/g TM	18.975	22.483	20.040	21.515	Bombenkalorimeter
Heizwert, unterer	J/g TM	17.638	20.969	18.581	19.987	Bombenkalorimeter
Berechnungen						
Stickstoff	% TM	3,54	3,12	3,01	5,87	Rohprotein/6,25
Stickstoff	g/kg TM	35,4	31,2	30,1	58,7	
C:N Verhältnis	---	13,4	17,0	16,3	8,7	
Org. Trockensubstanz (OTS)	% TM	91,6	94,6	92,7	93,5	100 (entspricht TM) – Rohasche

* Presskuchen Erntejahre: Drachenkopf 2010, Krambe 2012, Koriander 2013, Erucaraps (Zukauf)

Tabelle 10 Laboranalyse Fettsäurespektren Presskuchen*, % Fettsäure im Öl.

Fettsäuren	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Erucaraps	Verfahren
c4:0	0	0	0	0	GC
c6:0	0	0	0	0	GC
c8:0	0	0	0	0	GC
c10:0	0,01	0	0	0	GC
c11:0	0	0	0	0	GC
c12:0	0,01	0,01	0,02	0,02	GC
c13:0	0	0	0	0	GC
c14:0	0,06	0,07	0,04	0,06	GC
c14:1	0	0	0	0	GC
c15:0	0,03	0,02	0,04	0,03	GC
c15:1	0	0	0	0	GC
c16:0	7,82	2,4	3,18	3,45	GC
c16:1	0,19	0,38	0,46	0,35	GC
c17:0	0,08	0,03	0,03	0,03	GC
c17:1	0,04	0,02	0,06	0,02	GC
c18:0	2,28	0,99	0,69	0,95	GC
c18:1	10,9	17,05	79,77	13,65	GC
c18:2	14,01	9,62	15,11	13,02	GC
c18:3g	0	0	0,08	0	GC
c18:3a	62,2	6,31	0,19	7,66	GC
c20:0	0,07	1,08	0,08	0,81	GC
c20:1	1,23	3,03	0,06	4,81	GC
c20:2	0,16	0,26	0,02	0,39	GC
c20:3	0,36	0,04	0	0,05	GC
c21:0	0	0,03	0,01	0	GC
c20:4	0	0	0	0	GC
c20:5	0,17	0	0,02	0	GC
c22:0	0,04	1,94	0,05	0	GC
c22:1	0,17	54,17	0,02	52,53	GC
c22:2	0,03	0,36	0,02	0,43	GC
c23:0	0,03	0,36	0,02	0,43	GC
c24:0	0,02	0,66	0,03	0,27	GC
c24:1	0,11	1,15	0	1,05	GC
c22:6	0	0	0	0	GC

* Presskuchen Erntejahre: Drachenkopf 2010, Krambe 2012, Koriander 2013, Erucaraps (Zukauf)

3.1.5 Charakterisierung der Inhaltsstoffe der pflanzlichen Öle sowie deren Eignung für die im Projekt verfolgten industriellen Anwendungen (Hobum)

Alle vom Projektpartner TLL zur Verfügung gestellten Pflanzenöle wurden hinsichtlich ihrer Zusammensetzung (siehe Abbildung 7) und wichtiger Kennzahlen (siehe Tabelle 11 und Tabelle 12) charakterisiert.

Tabelle 11: Wichtige Kennzahlen der verwendeten Pflanzenöle..

Öl	SZ	JZ _{nass}	JZ(GC)
Senföl	0,09	101	-
Schwarzkümmelöl	0,40	133	133
Safloröl	0,06	145	156
Erucarapsöl	0,20	97	-
Krambeöl	0,06	93	-
Drachenkopföl	0,03	199	200
Korianderöl	0,11	116	94
Leindotteröl	0,08	158	162

Die erucasäurehaltigen Öle wurden nicht per GC hinsichtlich der JZ ausgewertet, da Säule und Säulenprogramm nicht auf solche Produkte ausgelegt waren.

Ein Vergleich mit handelsüblichen derzeit eingesetzten Pflanzenölen (siehe Tabelle 12) zeigt keine besonderen Auffälligkeiten. Allerdings sticht das Drachenkopföl hinsichtlich seiner sehr hohen Jodzahl deutlich hervor.

Tabelle 12: Kennzahlen handelsüblicher Pflanzenöle.

Öl	SZ	JZ(GC)
Rapsöl	0,1	110
Sojaöl	0,1	130
Sonnenblumenöl	0,1	135
Sonnenblumenöl-HO	0,1	90
Leinöl	0,2	185

Von wesentlich größerer Bedeutung für die moderne Oleochemie ist die Zusammensetzung, das sogenannte Fettsäuremuster der Pflanzenöle (siehe Abbildung 7).

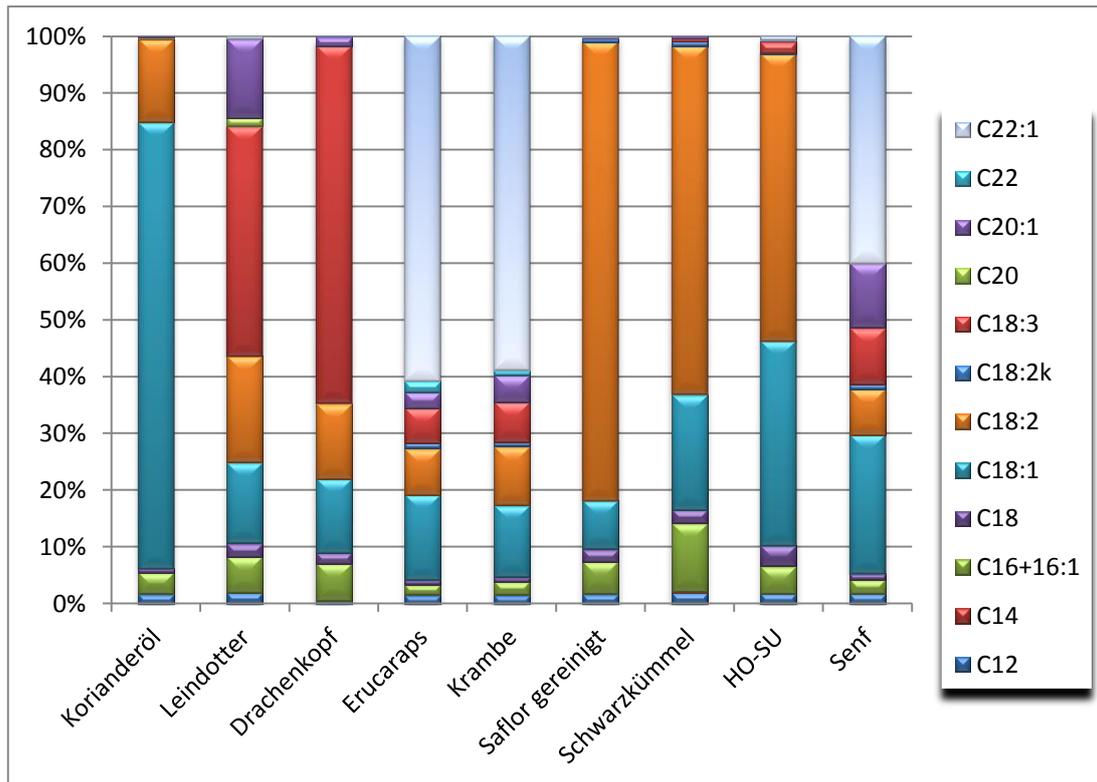


Abbildung 7: Fettsäurezusammensetzung (per GC) der im Projekt eingesetzten Pflanzenöle.

Oft besteht Bedarf an Pflanzenölen mit einem möglichst hohen Anteil an einer Fettsäure oder einer bestimmten Doppelbindungsfunktionalität. Hiervon ausgehend erscheinen die folgenden Öle interessant:

- Koriander (hoher Anteil an 18:1; Petroselinensäure plus Ölsäure)
- Drachenkopf (hoher Anteil an 18:3; Linolensäure)
- Erucaraps (hoher Anteil an 22:1; Erucasäure)
- Saflor (hoher Anteil an 18:2; Linolsäure)

Die Pflanzenöle aus der Senfpflanze und vom Leindotter waren für die von HOBUM angedachten Anwendungen uninteressant, wurden aber für die Projektpartner weiter untersucht. Auch Schwarzkümmel war hinsichtlich der Zusammensetzung eher nachteilig. Das Öl besitzt einen recht hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren.

Die zur Verfügung gestellte Ware an High oleic Sonnenblumenöl war massiv mit normaler Sonnenblumenölsaart vermischt, so dass dieses Öl keinen Wert besaß und für weitere Untersuchungen nicht verwendet wurde.

3.2 Bewertung der Rohstoffbereitstellung (KIT, TLL)

Ziel dieses Kapitels ist die Beurteilung ausgewählter Rohstoffalternativen hinsichtlich ihrer Verfügbarkeit und Kosten sowie die Erfassung sozio-ökonomischer und ökologischer Kenngrößen der Rohstoffbereitstellung. Es werden die ökonomischen und ökologischen Bewertungen der Projektphase 1 (durchgeführt vom KIT, nicht aktualisiert) und 2 (durchgeführt vom TLL) aufgeführt. Die Rohstoffbewertungsmodelle des KIT wurden für die Bewertungen der Prozesse und Produkte in Phase 2 auf Basis der Ergänzungen und Aktualisierungen des TLL erweitert.

3.2.1 Betrachtete Rohstoffe (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)

Im Verbundprojekt werden Pflanzenöle als Rohstoffe untersucht. Dabei lassen sich anhand der jeweiligen Bereitstellung zwei verschiedene Arten von Rohstoffen unterscheiden. Einerseits werden Öle betrachtet, die auf den gezielten Anbau von Industriepflanzen zurückgehen. Hierzu zählen Drachenkopföl und Krambeöl. Andererseits sind Pflanzenöle aus Reststoffen Gegenstand des Projektes, die in der Ernährungs- bzw. Zellstoffindustrie anfallen. Hierzu zählen Senföl, Holunderkernöl und Tallöl. Für die Bereitstellung von Ölen aus Industriepflanzen wird die gesamte Wertschöpfungskette vom landwirtschaftlichen Anbau der Ölpflanzen über die Saataufbereitung bis hin zur Ölgewinnung und -aufbereitung, einschließlich der notwendigen logistischen Prozesse analysiert. Die Bilanzierung der Bereitstellung von Pflanzenölen aus Reststoffen beginnt hingegen mit der Reststoffbeschaffung und umfasst die anschließend notwendigen Aufbereitungsschritte. Diese Unterscheidung ist bei der folgenden Darstellung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

3.2.1.1 Iberischer Drachenkopf

Der Iberische Drachenkopf (*Lallemantia iberica*), engl. *Iberian dragonhead* ist ein Lippenblütler (wie z.B. Melisse, Minze, Thymian). Die weißblühende, sommerannuelle Pflanze stammt vermutlich aus dem westlichen Asien und ist heute vor allem in trockenen Regionen Klein- und Vorderasiens verbreitet. Die Länge des vierkantigen Stängels beträgt 0,5 - 0,7 m, die Früchte sind dreikantige, ovale, braune bis schwarze Samen. Die Samen enthalten bis zu 38% Öl, die häufigste Fettsäure ist Linolensäure (18:3) mit fast 70%.

In Europa wird Iberischer Drachenkopf seit Ende des 19. Jahrhunderts vereinzelt angebaut, bis Mitte des 20. Jahrhunderts in der Sowjetunion sogar auf mehr als 20.000 Hektar. Iberischer Drachenkopf konnte sich jedoch nicht gegen andere Ölpflanzen wie Raps, Sonnenblume oder Öllein durchsetzen und wurde in den letzten Jahrzehnteicht in vergleichbarer Weise züchterisch verbessert. Erst in den letzten Jahren ist er aufgrund seines hohen Linolensäuregehaltes zunehmend interessant geworden.

3.2.1.2 Krambe

Krambe (*Crambe abyssinica*), engl. *Crambe*, gehört wie z.B. Raps, Blumenkohl, Senf zu den Kreuzblütlern und ist eine sommerannuelle Pflanze mit einer Vegetationsdauer 90 - 110 Tagen. Ursprungsgebiete sind Äthiopien und die Mittelmeerküste. Die Stängellänge beträgt 0,8 - 1,5 m und es werden kleine weiße Blüten ausgebildet. Die Fortpflanzung erfolgt primär durch Fremdbefruchtung. Von den Früchten werden Schoten und Samen geerntet, der Schalenanteil ist mit 20 - 35% relativ hoch. Das Samenkorn weist ein Tausendkorngewicht (TKG) von 5 - 8 g auf. Krambefrüchte enthalten 30 - 40% Öl und 15 - 20% Proteine.

Krambesamen enthalten 40 - 50% Öl. Das Fettsäurespektrum setzt sich wie folgt zusammen: 55 - 62% Erucasäure, 15 - 18% Ölsäure, 8 - 10% Linolsäure, 6 - 7% Linolensäure. 20 - 25% der Früchte bestehen aus Proteinen. Bei Krambe spielen die in den Früchten enthaltenen Begleitstoffe eine wichtige Rolle. Sie enthalten 60 - 90 µmol / g Glucosinolate, davon 95 % epi-Progoitrin. Weitere antinutritive Inhaltsstoffe in geringen Anteilen sind Sinapin, Tannine und Inositolphosphate. Diese Begleistoße schränken die Verwendung der Pressrückstände als Futtermittel ein (max. 15% in Kraftfutter, max. 5% bei Schweinemast).

Krambe ist eine domestizierte Ölpflanze, deren Anbau als Nutzpflanze erst im 20. Jh. begann. In Deutschland fand bisher nur Versuchs-anbau statt, in den USA (North Dakota) gibt es seit den 1990er Jahren kommerziellen Anbau auf mehreren Tausend Hektar.

3.2.1.3 Senfkernöl

Gelbsenf bzw. Weißer Senf (*Sinapis alba* ssp. *alba*), engl. (*white*) *mustard* ist ein Kreuzblütler (wie z.B. Raps, Blumenkohl, Krambe). Die Pflanze stammt ursprünglich aus mediterranen Regionen, von wo aus sie sich nach Europa, Asien, Amerika ausbreitete. Die Sprosslänge beträgt 0,6 - 1,5 m, die Blätter sind behaart und es werden gelbe Blüten ausgebildet. Die Fortpflanzung erfolgt überwiegend durch Fremdbefruchtung. 2 - 3 cm lange Schoten enthalten bis zu 8 gelbe Samen, deren Korn ein Tausendkorngewicht (TKG) von 4 - 8 g aufweist. Gelbsenf ist eine sommerannuelle Pflanze (einjährig) mit einer Vegetationsdauer von 90 - 120 Tagen. Eine Kreuzung mit Brassica-Arten (z.B. Raps) erzeugt i.R. sterile Hybriden. Es handelt sich um eine sekundäre Kulturpflanze, die aus Unkrautpopulationen selektiert und bereits bei Ägyptern und Chinesen erwähnt wurde. Senf dient spätestens seit der Antike als Gewürzpflanze und gelangte wahrscheinlich durch die Römer nach Deutschland, wo der Anbau seit dem 16. Jh. dokumentiert ist. Der Anbau für die Speisesenf- und Gewürzherstellung findet sich heute hauptsächlich in Ungarn, Polen, Marokko und Kanada. Desweiteren gibt es Anwendungen zur Färbung, Geschmacksverbesserung und als Emulgator. In Süd- und Ostasien wird Senf auch als Salat und als Arzneipflanze genutzt. Als nachwachsender Rohstoff ist er wegen des hohen Erucasäureanteils interessant, etwa zur Schmier- und Motorenölherstellung, wo langkettige Fettsäuren aufgrund der Unpolarität zum Einsatz kommen. In Deutschland erfolgt der Anbau von Gelbsenf primär als Gründüngungspflanze (Zwischenfruchtbau, Bodenbedeckung), zusätzlich auch als Grünfütterpflanze. Im Rahmen des Projektes wird das aus der Senfsaat gewonnene Senfkernöl als Rohstoff untersucht, bei dem es sich um ein Kuppelprodukt aus der Nahrungsmittelverarbeitung handelt. Im Herstellprozess einiger Speisesenfsorten werden die Senfkörner ganz oder teilweise entölt. Die Erzeugung von Senfsaat wird dennoch im Folgenden der Erzeugung von Drachekopf und Krambe gegenübergestellt.

3.2.1.4 Holunderkernöl

Holunderkernöl erhält man durch Auspressen der Kerne von Holunderbeeren. Die Kerne müssen dazu aus den Rückständen der Saftabpressung („Trester“) separiert werden.

3.2.1.5 Tallöl

Tallöl (schwedisch *talloolja*, englisch *tall oil*) ist ein Abfallprodukt aus der Zellstoffindustrie. „Tall“ ist schwedisch für Kiefer und deutet auf die Herkunft aus dem Rohstoff Holz hin. Kiefernholz enthält 3% Extraktstoffe, im Wesentlichen bestehend aus Fettsäuren, Harzsäuren und nicht-sauren Verbindungen. Tallöl entsteht als Reststoff bei der Zellstoffherstellung mit Sulfataufschluss (Kraft-Prozess) und enthält diese Extraktstoffe. Es ist eine dunkelbraune, übelriechende (wegen der Schwefel-Verbindungen), zähflüssige Masse mit einer Dichte von 0,95 - 1,02 kg/l. Im Kraft-Prozess fallen ca. 35 kg Tallöl pro Tonne Zellstoff an. Die Zusammensetzung des Extrakts ist von mehreren Faktoren abhängig, z.B. von Holzart, Jahreszeit, Holzaufschlussverfahren. Unfraktioniertes Tallöl (Rohtallöl, *Crude Tall Oil*, CTO) enthält 15 - 55 % Fettsäuren, 20 - 65 % Harzsäuren, 1 - 8 % Oxyssäuren und 6 - 30 % andere unverseifbare Komponenten. Die Tallölfettsäuren (*Tall Oil Fatty Acids*, TOFA) bestehen zu mindestens 97 % (1. Qualität) bzw. 67 % (bei einem Harzsäure-Anteil von 25 - 30 %) aus Fettsäuren. Linolsäure und konjugierte C18-Fettsäuren haben dabei einen Anteil von 45 - 65 %, weitere ungesättigte Fettsäuren sind Ölsäure (25 - 45 %) und Octadeca-5,9,12-triensäure (5 - 12 %). Gesättigte Fettsäuren sind mit 1 - 3 % enthalten.

Beim Kraft-Prozess der Zellstoffherstellung entsteht die sogenannte Schwarzlauge (*black liquor*). Dampft man diese ein, so entsteht Tallölseife (engl. *tall-oil soap*). Durch Waschen und Filtrieren (Dekantieren und Separieren) trennt man sie vom Zellstoff. In Verdampfern ist eine Aufkonzentration zu >65% TM möglich. Die Gewinnung von CTO erfolgt durch Ansäuern (mit verdünnter Schwefelsäure) der Tallölseife bei 98 °C. Fraktionierung von CTO mittels Vakuum-Destillation liefert Sulfatpech (Tallpech, auch Tallölpech), TOFA und Tallharz (*Tall Oil Resins*, TOR). TOR dient zur Herstellung von Harzestern und harzmodifizierten Phenolharzen für Beschichtungsmittel und hauptsächlich Papierleimen, Sulfatpech kommt in der Dachpappen-, Kernbindemittel-, Fußbodenplatten-, Bautenschutz- und Farbenindustrie zum Einsatz.

3.2.1.6 Weitere Öle

Weitere im Laufe des Projekts diskutierte Öle sind Erucarapsöl, High-Oleic-Sonnenblumenöl, Leinöl, Safloröl (Distelöl), Tomatenkernöl und Korianderöl. Erucaraps, High-Oleic-Sonnenblumen und Öllein werden im Vergleich zu Winterraps zwar nur in sehr geringem Maße in Deutschland angebaut. Im Industriepflanzenbau, der fast ausschließlich auf Vertragsbasis erfolgen dürfte, dienen sie jedoch zur Bereitstellung von Erucasäure, Ölsäure bzw. Linolen- und Linolsäure. Im Folgenden wird Erucarapsöl daher zum Vergleich mit Krambe herangezogen, während Leinöl dem Drachenkopfföl gegenübergestellt wird. Leinöl ist zudem der aktuell eingesetzte Rohstoff der Dracosa AG zur Epoxidharzherstellung. Der Anbau von Öllein ist in den letzten Jahren deutlich zurückgegangen, was zumindest teilweise auf die Absenkung der vormals relativ hohen EU Prämien für Öllein auf das einheitliche, ergebnisunabhängige Niveau zu erklären ist. Der Bedarf der Industrie für technisches Leinöl sowie die Nachfrage aus dem Nahrungs- und Futtermittelbereich wird größtenteils durch Importe, vor allem aus Kanada, gedeckt⁷⁹. High-Oleic-Sonnenblumenöl ist das Referenzöl

⁷⁹ GRAF ET AL., 2005: Graf, Degner, Zorn, Pittorf, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Leitlinie zur effizienten und umweltverträglichen Erzeugung von Öllein <http://www.tll.de/ainfo/pdf/oell0805.pdf> Zugriff: 22.09.2014

zur Bereitstellung von Ölsäure. Safloröl ist reich an Öl- und Linolsäure. Es wird sowohl für Nahrungsmittel- als auch für Industrieanwendungen eingesetzt und war ursprünglich als Rohstoff im Projekt geplant. Aus mangelnder Saatverfügbarkeit wurde Saflor zurück gestellt, dennoch ist zumindest die Saatgutherstellung im Folgenden ökonomisch bewertet.

Tomaten- und Kirschkernöl sind zwei weitere Reststoffe aus der Nahrungsmittelindustrie, die prinzipiell ebenfalls die im Projekt relevanten Fettsäuren liefern können. Die Fettsäurezusammensetzung von Tomatenkernöl weist etwa 50-60% Linolsäure und 16-25% Ölsäure auf. Es wird in geringem Umfang als Speiseöl und in der Kosmetik verwendet. Aus industrieller Sicht interessant ist die Gewinnung aus Tomatenkernen, die bei der Verarbeitung von Tomaten zur Lebensmittelerzeugung als Reststoff anfallen. Kirschkernöl enthält ebenfalls hohe Anteile von Linolsäure (40-50%) und Ölsäure (23%-39%) im Fettsäuremuster. Anwendungen sind aus dem Kosmetikbereich bekannt.

Zudem werden die etablierten Pflanzenöle aus Raps (Ölsäure 52–66%, Linolsäure 17–25%, Linolensäure 8–11%) und Soja (Linolsäure 49–57%, Linolensäure 6–11%) vor dem Hintergrund der Versorgungssicherheit der Anlage diskutiert. Die Projektpartner sind angehalten, bei der Prozessentwicklung auf eine entsprechende Rohstoffflexibilität hinzuwirken. Darüber hinaus sind langfristig auch internationale Wertschöpfungsketten zur Rohstoffversorgung denkbar, z.B. der Bezug von Jatropha aus subtropischen Regionen und von Krambe aus Osteuropa oder der Anbau von Drachenkopf in Burkina Faso (persönliche Information, InfraLeuna).

3.2.2 Rahmenbedingungen der Pflanzenölbereitstellung (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)

3.2.2.1 Agrar- und Handelspolitik

Wichtige politische Entscheidungen zum Anbau nachwachsender Rohstoffe waren die endgültige Aufhebung der Stilllegungspflicht eines bestimmten Teils der Ackerfläche (bisher 10 %) ab dem Jahr 2009 sowie das Auslaufen der Energiepflanzenprämie Ende 2009. Somit besteht nun nicht mehr die Möglichkeit, Industriepflanzen auf einem Flächenanteil anzubauen, der verpflichtend von der Nahrungsmittelproduktion ausgenommen ist und der Vertragsanbau für energetische Verwertungen wird nicht mehr staatlich gefördert. Die derzeit in der Umsetzung befindliche Reform der gemeinsamen Agrarpolitik (GAP) der EU zielt auf Direktzahlungen pro Hektar Ackerland an die Landwirte („Betriebsprämie“, „1. Säule“ der GAP) ab (Stand 2012, nicht aktualisiert). Dadurch sollen mittelfristig keine speziellen Agrargüter mehr gefördert werden, sondern die Landwirtschaft unabhängig von der Produktion gefördert werden. Agrarexportsubventionen sind weiterhin zulässig und praktiziert (z.B. für Milch), der vereinbarte Abbau der Exporterstattungen bis 2013 ist vorerst nicht verbindlich für die Mitgliedsstaaten. Weiter zunehmende Bedeutung in der Agrargesetzgebung hat der Umweltschutz erhalten. So ist die Zahlung der EU-Agrarsubventionen nun an die Einhaltung bestimmter Umweltauflagen gebunden („Cross Compliance“) und ein wesentlicher Teil an Geldern aus dem EU-Agrarfonds ist für die Finanzierung sogenannter Agrarumweltmaßnahmen vorgesehen („2. Säule“ der GAP, z.B. Investitionen in umweltfreundlichere Produktionsweisen). Des Weiteren gibt es auf Bundes- und Landesebene Umweltmaßnahmen, so etwa die finanzielle Förderung mehrjähriger Stilllegung (Länder haben Auflagen zu spezifizieren, z.B. keine Dünge- und Pflanzenschutzmittel zulässig, Energie- und Futtermittelanbau ausgeschlossen, Max. 5 ha

(Betriebe mit LF ≤ 100 ha) bzw. max. 10 ha (Betriebe mit LF > 100 ha), Förderungsdauer bis 10 Jahre, aus Umweltschutzgründen und zur Marktentlastung), die finanzielle Förderung (max. 5 Jahre) extensiver Produktionsverfahren im Ackerbau oder bei Dauerkulturen, extensiver Grünlandnutzung und ökologischer Anbauverfahren für 5 Jahre. Weitere Förderprogramme umfassen die Agrardieselvergütung (fossil, 214,80 EUR je 1.000 Liter ohne Selbstbehalt und Obergrenze) und regionale Investitionsförderungen und Ausgleichszulagen für benachteiligte Gebiete.

Die Handelspolitik der EU für Ölsaaten und Pflanzenöle ist durch niedrige Importzölle charakterisiert und ermöglicht somit einen relativ freien Zugang zum europäischen Markt. Die Doha-Runde, d.h. Verhandlungen zum weiteren Abbau von Handelsbeschränkungen im Rahmen der Welthandelsorganisation (WTO), sind bisher zu keinem erfolgreichen Abschluss gekommen, insbesondere da man sich bisher nicht im Bereich des Agrarhandels und der Agrarsubventionen einigen konnte. Jedoch könnten in Zukunft auch andere Handelsbarrieren weiter ausgebaut werden bzw. an Bedeutung gewinnen, die außereuropäische Produzenten benachteiligen. Zu nennen sind hier insbesondere Importverbote für genetisch modifizierte Agrarprodukte und die Pflicht zur Einhaltung von Nachhaltigkeitskriterien. Ab Juli 2010 besteht in der EU eine Zertifizierungspflicht für Biokraftstoffketten. In Deutschland sind bisher zwei Zertifizierungssysteme zugelassen, welche die Kriterien Treibhausgasemissionen, Rückverfolgbarkeit der Rohstoffe sowie sechs Prinzipien zum nachhaltigen Pflanzenanbau berücksichtigen (REDcert und ISCC). Eine Ausweitung der Zertifizierungspflicht auf alle biobasierten Produkte wird aktuell diskutiert. (BMELV, Pressemitteilung Nr. 013 vom 20.01.10, 2010).

3.2.2.2 Struktur der Landwirtschaft in Ostdeutschland

Die Struktur der deutschen Landwirtschaft weist einige Unterschiede zwischen Ost- und Westdeutschland auf (siehe Tabelle 13, Tabelle 14). Diese Rahmenbedingungen spielen vor dem Hintergrund eine Rolle, dass die Rohstoffe für die am Standort Leuna geplante integrierte Bioproduktion voraussichtlich zunächst aus dieser Region bezogen werden. Resultierend aus der Agrarstruktur der DDR weisen die landwirtschaftlichen Betriebe in Ostdeutschland eine große Flächenausstattung auf. Im Jahr 2007 bewirtschaftete ein Betrieb in Sachsen-Anhalt durchschnittlich 242 Hektar Landfläche, verglichen mit einem Bundesdurchschnitt von 43 Hektar pro Betrieb.

Tabelle 13: Wertschöpfung und Erwerbstätige in der Landwirtschaft. (Quelle: Agrarberichte der jeweiligen Bundesländer 2008, MLU Schleswig-Holstein, Statistisches Bundesamt).

Anteil Land-, Forst- und Fischereiwirtschaft Bruttowertschöpfung (D: 0,9%, MV: 2,6)	
Sachsen-Anhalt	1,8 %
Sachsen	1,1 %
Brandenburg	1,9%
Anzahl und Anteil Erwerbstätige (D: 850.000; 2,1% MV: 3,9%. SL: 0,4%)	
Sachsen-Anhalt	28.700 (2,9 %)
Sachsen	41.400 (2,1 %)
Brandenburg	37.600 (3.6 %)

Zudem finden sich unter den ostdeutschen landwirtschaftlichen Betrieben mit zusammen ca. 15-30 % deutlich mehr Personengesellschaften und juristische Personen als im bundesweiten Mittel, in dem Einzelunternehmungen mit fast 95 % eine größere Bedeutung aufweisen.

Tabelle 14: Flächenausstattung und Rechtsformen (Quelle: Agrarberichte BMELV und der Bundesländer 2007 bzw. 2008).

Durchschnittliche Flächenausstattung je Betrieb	
Sachsen-Anhalt	242 ha LF
Sachsen	128 ha LF
Brandenburg	198 ha LF
Deutschland	43 ha LF
Rechtsformen und deren Flächenanteile	
Sachsen-Anhalt	4.842 Betriebe, 71% EinzelU (28% LF), 18% PersonenG (29% LF), 11% Juristische P (43% LF)
Sachsen	7.021 Betriebe, 86% EinzelU (29% LF), 5% PersonenG (11% LF), 9% Juristische P (60% LF)
Brandenburg	6.704 Betriebe, 75% EinzelU (24% LF), 10% PersonenG (18% LF), 15% Juristische P (58% LF)
Deutschlan	374.500 Betriebe, 94% EinzelU (68% LF), 5% PersonenG (14% LF), 1% Juristische P (18% LF)

Im Jahr 2008 wurde auf fast 60 % (7,039 Millionen Hektar) der Ackerfläche Deutschlands Getreide angebaut, während der Anteil von Ölpflanzen bei ca. 12 % (1,405 Millionen Hektar) lag (siehe Tabelle 15). Unter letzteren nimmt Winterraps mit ca. 98 % eine stark dominierende Stellung ein. Weiterhin ist festzuhalten, dass Drachenkopf und Krambe in Deutschland bisher nur im Versuchsanbau eingesetzt wurden. Schwierige Beschaffung geeigneten Saatguts und verhältnismäßig wenig Erfahrungen im Pflanzenbau (z.B. bzgl. Düngung und Pflanzenschutz) können den Einstieg in die Produktion daher erschweren.

Tabelle 15: Flächen und Sorten in Deutschland (Quelle: Statistisches Bundesamt).

	Deutschland 2008		Sachsen-Anhalt 2008		Brandenburg 2008		Sachsen 2008	
Landwirtsch. Fläche	16.925,7	-	1.170,4	-	1.323,6	-	914,1	-
Dauergrün- land	4.788,7	28,3%	169,5	14,5%	282,2	21,3%	187,7	20,5%
Ackerfläche	11.932,5	70,5%	998,3	85,3%	1.035,9	78,3%	720,6	78,8%
Getreide	7.038,5	59,0%	598,9	60,0%	550,6	53,2%	426,6	59,2%
Ölsaaten	1.404,7	11,8%	164,7	16,5%	142,7	13,8%	131,4	18,2%
Hackfrüchte	636,4	5,3%	58,5	5,9%	16,8	1,6%	20,5	2,8%
Futterpflanzen	2.261,2	18,9%	113,8	11,4%	233,0	22,5%	115,6	16,0%
Sonstige	282,2	2,4%	21,9	2,2%	35,5	3,4%	21,6	3,0%
Flächenstill- legung ¹	309,5	2,6%	40,5	4,1%	57,3	5,5%	4,9	0,7%

¹ohne nachwachsende Rohstoffe

Beim Anbau nachwachsender Rohstoffe nimmt Sachsen-Anhalt eine führende Rolle ein. Die Zahlen in Tabelle 16 spiegeln jedoch die Situation vor dem Wegfall von Stilllegungspflicht und Energiepflanzenprämie wider.

Tabelle 16: Nawaro auf Stilllegungsflächen (Quelle: MLU Sachsen-Anhalt 2007).

Anbau nachwachsender Rohstoffe auf Stilllegungsflächen (ha) 1998 - 2007										
Quelle: Ministerium für Landwirtschaft und Umwelt des Landes Sachsen-Anhalt; Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)										
Rohstoff	Erntefläche (ha)									
	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Raps	21.247	51.798	47.962	46.561	45.394	39.304	29.367	41.401	40.355	41.552
Raps-GP ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17
Sonnenblume	417	1.677	984	1.211	624	527	86	142	101	20
Sonnenblumen-GP ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Öllein	130	269	335	147	95	114	-	33	-	-
Weizen	-	-	-	-	-	-	-	342	1.082	520
Roggen	55	50	-	-	35	-	-	-	12	183
Roggen-GP ¹	-	-	-	-	-	18	16	-	-	-
Mutterkorn (CMS)	-	-	-	-	-	-	102	207	199	201
Gerste	-	-	-	-	-	-	-	2	2	20
Gerste-GP ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
Hafer-Gerste-Weidelgras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Triticale	-	-	-	-	-	-	3,5	-	-	70
Hanf	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hirse	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56
Hirse-GP ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
Silomais	-	-	12	-	8	101	-	407	802	1.468
Körnermais	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	7
Lieschkolbenschrot	-	-	-	-	-	-	-	18	4	1
Zuckerrüben	-	-	-	-	-	-	-	-	-	186

¹GP = Ganzpflanzen

Stand: November 2007

3.2.3 Anbau- und Beschaffungspotenziale, Nutzungskonkurrenzen (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)

Für die Öle aus Industriepflanzen ist das theoretische Anbaupotenzial durch Standortanforderungen und Fruchtfolgebeschränkungen gegeben. Feldversuche haben gezeigt, dass der Anbau von Iberischem Drachenkopf als Quelle für Drachenkopfföl und von Krambe als Quelle für erucasäurereiches Krambeöl in Deutschland grundsätzlich möglich ist. Drachenkopfanbau ist auf trockenen, kalkhaltigen Böden gut möglich, die Pflanze bevorzugt warmes Klima. Krambe ist ebenfalls trocken tolerant und auch auf sandigen Böden ist mit relativ guten Erträgen zu rechnen. Beide Pflanzen eignen sich damit insbesondere auch für die Boden- und Klimabedingungen in Ostdeutschland, wo geringere Niederschläge als in Westdeutschland herrschen und wo vor allem in Brandenburg sowie im östlichen Sachsen-Anhalt sandige Böden mit geringen Ackerzahlen zu finden sind (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9).

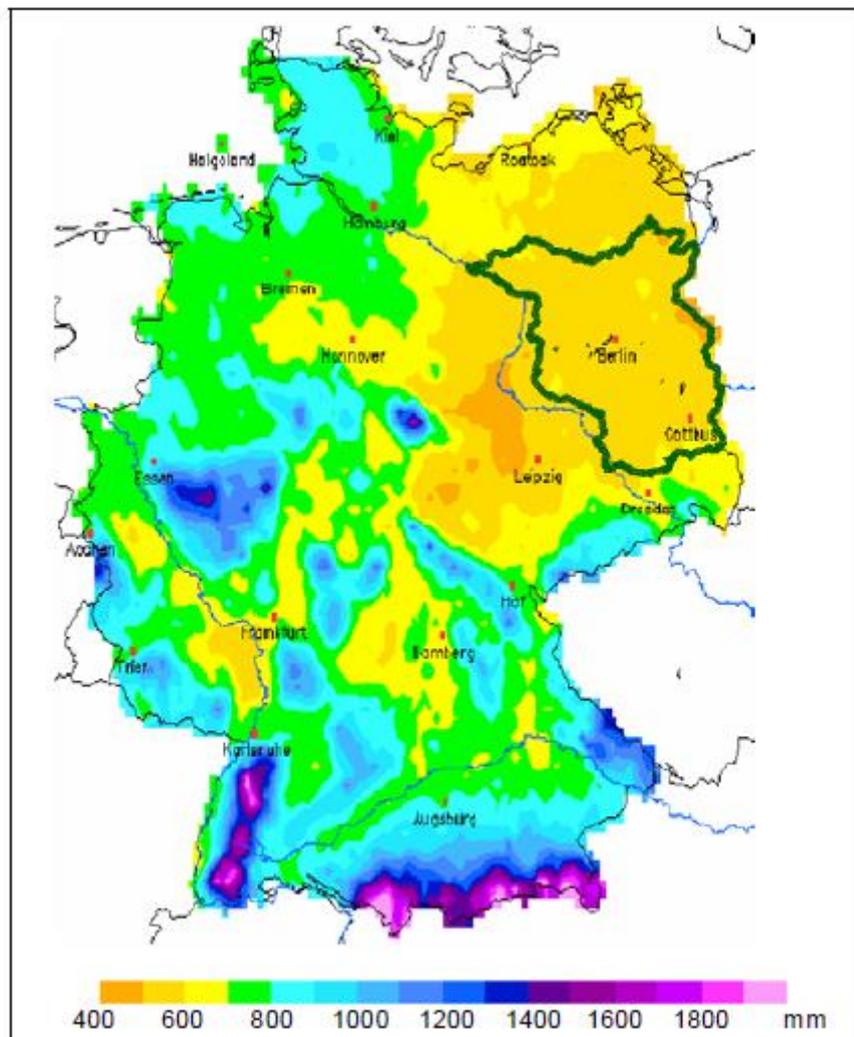


Abbildung 8: Niederschlagsverteilung in Deutschland (Quelle: Deutscher Wetterdienst, Offenbach).

Sowohl Drachenkopf als auch Krambe sind Sommerfrüchte, das heißt sie werden im Frühjahr ausgesät und im Sommer geerntet. Drachenkopf erlaubt eine flexible Fruchtfolgegestaltung und stellt keine Restriktionen hinsichtlich Vor- und Nachfrucht, als Vorfrucht eignet sich beispielsweise Getreide. Dracosa überprüfte sogar den zweimaligen Anbau pro Jahr, denn die Pflanze räumt bereits im August das Feld. Sollte dies gelingen, so wäre es ein Vorteil gegenüber Öllein, der nicht selbstverträglich ist und Anbaupausen von vier bis fünf Jahren benötigt. Krambe ist ebenfalls relativ trocken tolerant, der Anbau auf lehmigen Standorten ist möglich. Die Anforderungen an die Lufttemperatur sind etwas höher als bei Raps (Keimtemperaturminimum 8 - 10 °C, -optimum 15 - 25 °C, Frosttoleranz -5 °C), die Anforderungen an Sorptionsfähigkeit des Bodens sind geringer. Als Kreuzblütler ist Krambe mit Raps nahe verwandt und ließe sich auf ähnliche Weise in eine Fruchtfolge integrieren, konkurriert dabei jedoch mit anderen Kreuzblütler-Sommerölrüchten wie Sommerraps, Senf und Leindotter. Geeignete Vorfrüchte sind Kartoffeln und verschiedene Getreidearten, Stilllegungsflächen als Vorfrüchte führten in Experimenten hingegen zu Mindererträgen (Verunkrautung). Krambe ist als Vorfrucht für Wintergetreide gut geeignet. Theoretisch könnten Kreuzblütler zusammen genommen auf etwa 25% der Ackerfläche angebaut werden. Weiterhin ist ein Mindestabstand zwischen Krambe- und Rapsfeldern zu beachten, um eine Auskreuzung und damit eine Verunreinigung des Nahrungsmittlrapses mit Erucasäure auszuschließen.

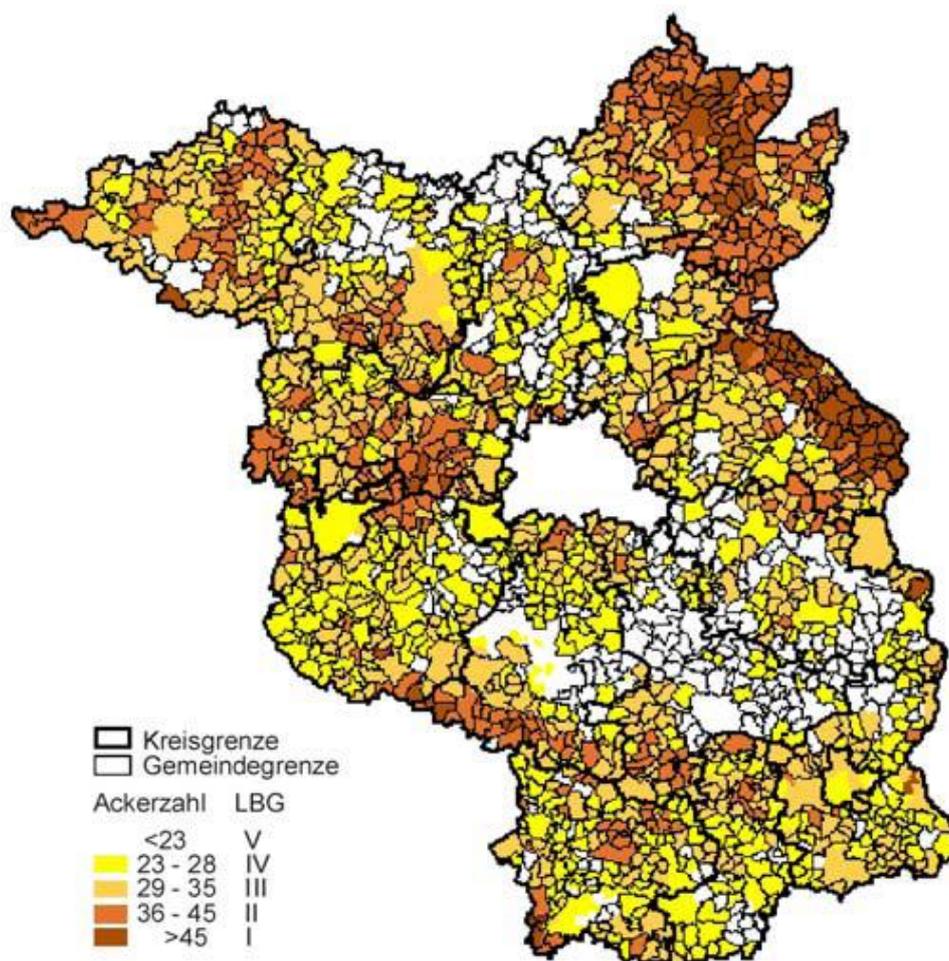


Abbildung 9: Ackerzahlen in den Gemeinden des Landes Brandenburg (Quelle: GEMDAT).

Von diesen pflanzenbaulichen Vorgaben ausgehend kann das wirtschaftliche Potenzial abgeleitet werden, d.h. dasjenige Potenzial, welches unter Berücksichtigung der Marktbedingungen wirtschaftlich realisierbar wäre. Da Drachenkopf und Krambe bisher keine kommerzielle Bedeutung haben, würde die landwirtschaftliche Bereitstellung der Saaten durch Vertragsanbau erfolgen, bei dem der integrierte Bioproduktionsverbund einziger Abnehmer wäre. Grundsätzlich sollte eine solche Kooperation insbesondere für Betriebe attraktiv sein, die aufgrund geringer Erträge oder schlechter Marktpreise für etablierte Kulturen nach alternativen Einkommensquellen suchen. Ersten Erfahrungen bei der Rohstoffbeschaffung im Projekt zufolge (Dracosa AG) ist dies beispielsweise bei Betrieben der Fall, die unter ihren Standortbedingungen hauptsächlich Roggen als Getreide anbauen müssen, wofür jedoch zurzeit ungünstige Marktbedingungen vorliegen: Roggenanbau liefert einen Verlust bei Preisen um 120 EUR/t.

Das theoretische Potenzial für die Pflanzenöle aus Reststoffen ergibt sich aus den Kuppelproduktverhältnissen der zugehörigen lebensmitteltechnischen bzw. zellstofftechnischen Prozesse. Senfkernöl fällt beim Entölen von Senfkörnern in der Speisesenfherstellung an. Die zurzeit 16 deutschen Verarbeitungsbetriebe beziehen Senfsaat fast ausschließlich aus dem Ausland, vor allem aus Kanada und Osteuropa. Im Jahr 2008 wurden 35.000 Tonnen importiert, was bei einem Ölgehalt von 35% 12.250 Tonnen Öl entspricht. Diese Größenordnung kann als erster Schätzwert für das aus deutscher Produktion anfallende Senföl angenommen werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass nicht für alle Senfsorten die Senfkörner entölt werden (z.B. Dijonsenf). Außerdem findet dieser Reststoff bereits Verwertung vor allem als Brenn- und Schmierstoff sowie für Spezialanwendungen in Kosmetik und Pharmazie. Die am Markt verfügbare Menge dürfte damit deutlich geringer sein. Gezielter Anbau von Senfsaat oder Import von Senfkörnern für die industrielle Senfölverwertung sind ebenfalls denkbar, wenn auch bislang nicht praktiziert oder zumindest kommerziell unbedeutend.

Holunderkernöl erhält man durch Auspressen der Kerne von Holunderbeeren. Die Kerne müssen dazu aus den Rückständen der Saftabpressung („Trestler“) separiert werden. Obwohl in Deutschland heimisch wird Holunder hierzulande kaum kultiviert. In Nordhessen wird er auf ca. 80 Hektar für die Farbstoffgewinnung angebaut, in der Rhön im Ökolandbau auf ca. 75 Hektar für einen Getränkehersteller. Am Niederrhein kultiviert ein Obstbaubetrieb Holunder auf 17 Hektar für Lebensmittelverwendungen. Eine größere Bedeutung hat der Holunderanbau in Österreich, wo auf 1000 Hektar Plantagen bestehen und 2009 ca. 9500 Tonnen Holunderbeeren geerntet wurden. Getrocknete Holunderkerne enthalten ca. 29% Öl. Mögliche Nutzungskonkurrenzen für Holundertrester insgesamt ergeben sich zu Futter-, Düngemittel- und Kosmetikanwendungen, eine großtechnische Verwertung des Holunderkernöls konnte jedoch nicht identifiziert werden.

Das Kuppelproduktverhältnis von Rohtallöl zu Zellstoff beträgt etwa 35 Kilogramm pro Tonne. In Deutschland wurden im Jahr 2009 1.481.000 Tonnen Zellstoff produziert, woraus sich ein theoretisches Potenzial von etwa 52.000 Tonnen Rohtallöl aus der inländischen Zellstoffindustrie ergibt. Im Rahmen des Projektes wurde bisher zu Zellstoff Stendal Kontakt aufgenommen. Dort werden 648.000 t Zellstoff pro Jahr (2009) produziert, woraus sich eine theoretische Kapazität von 22.680 t Rohtallöl pro Jahr ableiten ließe. Weitere kommerzielle Anbieter von Tallöl-Produkten sind z.B. StoraEnso (Fabrik Skoghall in Schweden) und Arizona Chemical. Die Weltjahresproduktion von Rohtallöl wurde Anfang der 1990er Jahre mit 1,5 Millionen Tonnen pro Jahr abgeschätzt.

Das wirtschaftliche Potenzial hängt von den am Markt verfügbaren Mengen ab, wobei sich über eine energetische Verwertung hinaus bislang keine Nutzungsformen mit hoher Wertschöpfung etablieren konnten. Verschiedene Raffinerieprodukte aus Tallöl sind jedoch am Markt erhältlich. Tallölfettsäuren (TOFA) dienen laut Unternehmens- und Literaturangaben zur Herstellung nicht vergilbender Lacke, kurz-, mittel- und langöliger Alkydharze für Einbrenn-, Autoreparatur- und Malerlacke, dimerisierter Fettsäuren, waschaktiver Substanzen, von Sammlern bei der Flotation von Mineralien und weiterer chemischer Zwischenprodukte. In geringer Reinheit ist Tallöl als flüssiger Kraftstoff verwendbar. Tallöl-Biodiesel wird durch die schwedische Firma Sunpine entwickelt („crude tall diesel“, Solander Science Park).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die betrachteten Öle prinzipiell für einen Verbundstandort in Deutschland zur Verfügung gestellt werden können. Sofern ein erfolgreicher Einstieg in den Vertragsanbau von Drachenkopf und Krambe gelingt, sollte auch die Bereitstellung größerer Mengen im Maßstab von über 1000 Tonnen jährlich möglich sein, insbesondere vor dem Hintergrund der oben skizzierten Rahmenbedingungen der Landwirtschaft in Ostdeutschland. Unter den Reststoffölen weist Holunderkernöl, auch unter Einbeziehung des österreichischen Marktes, das geringste Potenzial auf. Es dürfte kaum über 1000 Tonnen pro Jahr liegen. Senföl ist in größeren Mengen verfügbar, jedoch konkurriert man hier mit Abnehmern aus anderen Industrien. Tallöl hat unter den analysierten Reststoffen das mit Abstand größte Potenzial. Allerdings bezieht sich dieses auf Rohtallöl, dessen Verwendbarkeit als Rohstoff noch im Rahmen des Projektes untersucht werden wird.

3.2.4 Beschaffungsvarianten für die ökonomische und ökologische Bewertung (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)

Für die Beschaffung der Pflanzenöle aus Industriepflanzen (Drachenkopföl und Krambeöl) werden verschiedene Varianten untersucht, denn für die Verarbeitungsschritte von der Saaterfassung bis zum aufbereiteten Öl sind grundsätzlich zwei Alternativen denkbar: Zum einen die Ölextraktion bzw. -pressung und Aufbereitung durch einen externen Auftragnehmer, zum anderen die Durchführung dieser Prozesse am Verbundstandort selbst. In Variante A (siehe Abbildung 10) erfolgt die Aufbereitung und Verarbeitung der Ölsaaten außerhalb des Produktionsverbundes in Leuna. Diese externe Ölsaatenverarbeitung umfasst die Reinigung und Trocknung des Erntegutes durch einen Primärerfasser (z.B. Raiffeisen) sowie die Ölextraktion und -raffination unter Lösungsmiteleinsetz durch eine Ölmühle (z.B. PPM Magdeburg). Es wird davon ausgegangen, dass die getrocknete Ölsaate entweder am Ort der Trocknung oder bei der Ölmühle gelagert werden kann, bis die Ölgewinnung beginnt.

In diesem Fall müssen Mengen- und Zeitkapazitäten der externen Ölsaatenverarbeitung mit den Anforderungen der Integrierten Bioproduktion abgestimmt werden. Dies betrifft u.a. die Koordination des Zeitpunktes der Ölpressung mit der Weiterverarbeitung der Öle überwiegend in Batch-Produktion. Aus Qualitäts- und Kostengründen sollte die dafür erforderliche Pufferung durch Lagerung der Saaten erfolgen.

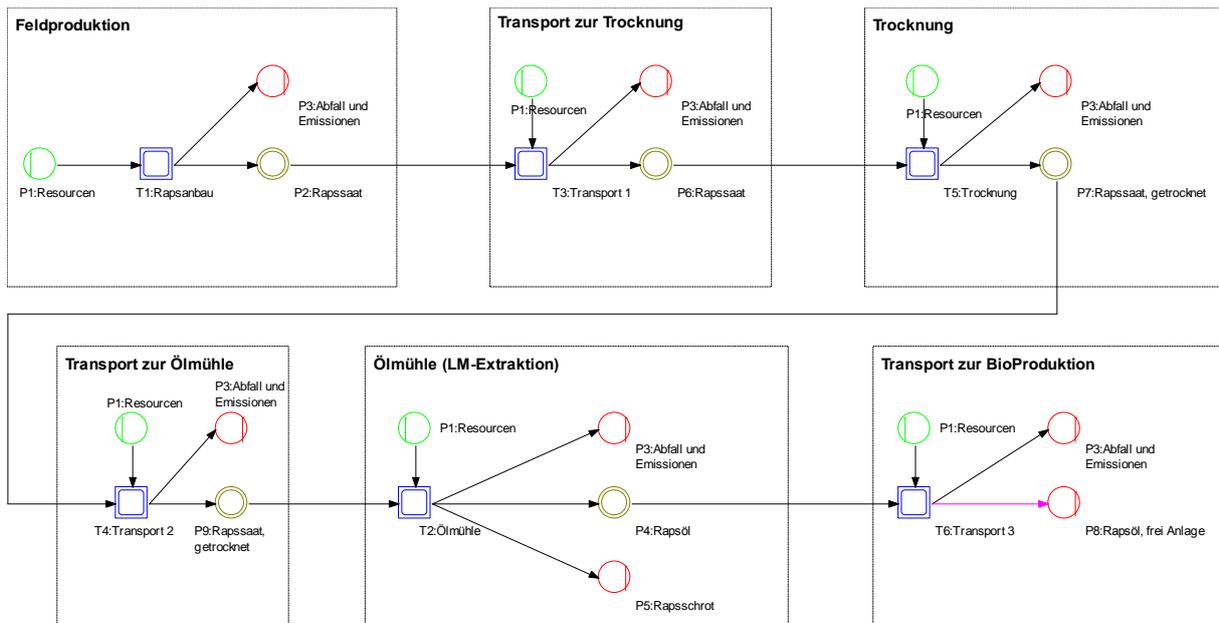


Abbildung 10: Variante A - Externe Ölsaatenverarbeitung.

In Variante B (siehe Abbildung 11) erfolgt die Ölsaatenaufbereitung und -verarbeitung intern am Standort Leuna mit eigens für die Saatenverarbeitung beschafften Anlagen. Die Saat wird mit einer Reinigungsanlage vom Schwarzbesatz gereinigt und mit einer Trocknungsanlage getrocknet. Die Ölgewinnung wird im Kaltpressverfahren durchgeführt.

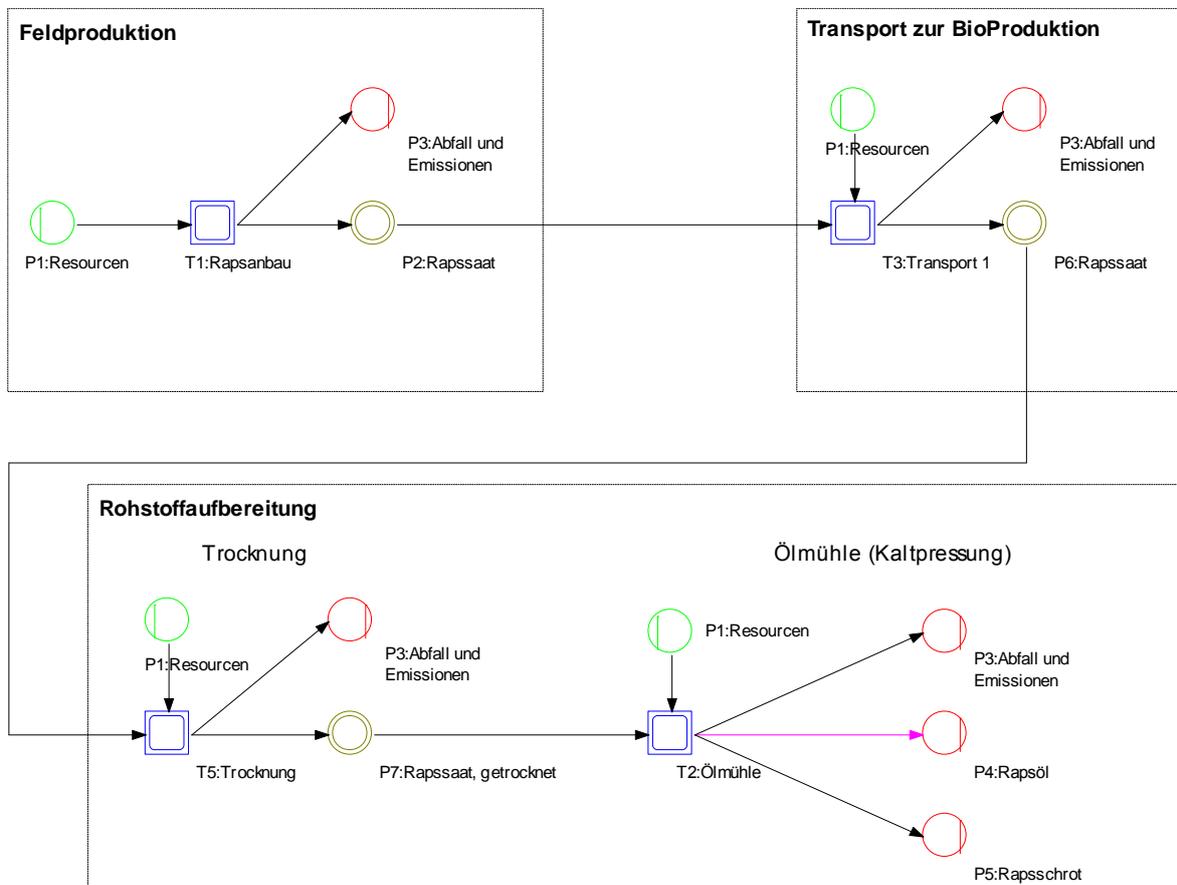


Abbildung 11: Variante B – Interne Ölsaatenverarbeitung.

Wichtig ist festzuhalten, dass kaltgepresstes Öl und Presskuchen andere Produkteigenschaften aufweisen als Extraktionsöl und -schrot. Für einige chemische Umsetzungen wäre es zwar geeignet (Dracosa AG), ggf. ist jedoch eine Raffination erforderlich. Außerdem ist die Kaltpressung für eine Verarbeitungskapazität bis ca. 1000 t Saat pro Jahr skaliert, während die externe Ölsaatenverarbeitung eher auf größere Mengen ausgelegt ist (Ölmühle Thywissen in Neuss wäre z.B. erst mit 4000 t Krambesaat pro Jahr ausgelastet⁸⁰).

Im Rahmen der Analyse der Rohstoffbereitstellung wird für die drei pflanzenöhlhaltigen Reststoffe (Senföl, Holunderkernöl, Rohtallöl) nur der Transport zur Anlage erfasst (siehe Abbildung 12). Alle notwendigen Aufbereitungsschritte erfolgen in der Anlage in Leuna und werden als Teil der Rohstoffaufbereitung unter die Prozessbewertung gefasst.

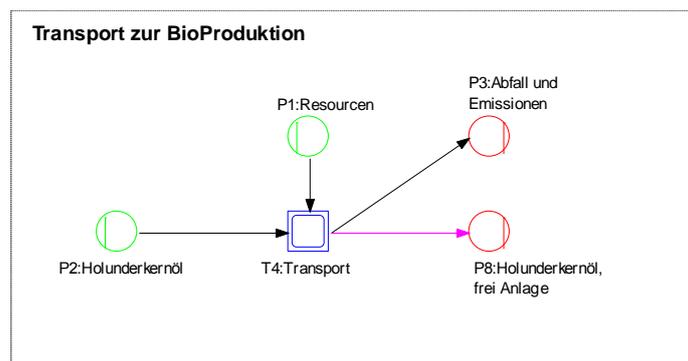


Abbildung 12: Beschaffung der Reststoffe.

3.2.5 Ökonomische Bewertung der Wertschöpfungsketten zur Pflanzenölbereitstellung (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)

Für die ökonomische Bewertung werden zunächst Herstellkosten der Saaterzeugung geschätzt. Schätzungen werden neben Drachenkopf und Krambe auch für Senf, Saflor, Erucaraps und High-Oleic Sonnenblumen durchgeführt, um einen Vergleich mit anderen Ölpflanzen zu ermöglichen. Dies ist vor dem Hintergrund sehr volatiler Weltmarktpreise für Agrargüter zu sehen. So betrug Mitte 2005 der Großhandelspreis für Rapssaat 175 Euro pro Tonne. Im Jahr 2008 wurden Höchststände von deutlich über 400 Euro pro Tonne erreicht, im Februar 2010 lagen die Preise für Rapssaat noch bei ca. 290 Euro pro Tonne. Ähnlich starke Bewegungen weisen die Düngemittelpreise auf, die direkt die Herstellkosten beeinflussen. Noch größeren Einfluss auf die Herstellkosten haben die letztlich erzielten Erträge. Gerade bei Drachenkopf und Krambe ist mit höheren Schwankungen zu rechnen, wodurch die Kosten von Jahr zu Jahr stark unterschiedlich ausfallen können.

Um von den Herstellkosten für Ölsaaten zu Preisen und Kosten für die Pflanzenöle zu gelangen, gibt das historische Preisverhältnis von Rapssaat und Rapsöl erste Hinweise. Im Mittel der letzten fünf Jahre entsprach der Großhandelspreis pro Tonne Rapsöl etwa dem 2,5 fachen des Erzeugerpreises pro Tonne Rapssaat. Während für Variante A Marktpreise der Wirtschaftlichkeitsrechnung zugrunde gelegt werden, ist in Variante B eine Investitions- und Kostenschätzung für die Saatverarbeitung notwendig. Letztere wurde für ein Kaltpressverfahren in der Größenordnung von 1000 Tonnen Saatverarbeitungskapazität

⁸⁰ Makowski, Norbert, und Thomas Troegel. Krambe - eine alternative Sommerölfrucht. Münster: Landwirtschaftsverlag Münster, 2001

erstellt. Desweiteren spielen Verwendungs- und Absatzmöglichkeiten der Ölschrote bzw. -presskuchen eine wichtige Rolle für die Wirtschaftlichkeit. Bei Krambe sind jene nicht als Futtermittel für Schweine und Geflügel geeignet, eine Verfütterung an Rinder wurde in den USA erfolgreich praktiziert. Die Gutschrift aus diesem Kuppelprodukt wird daher nicht mit Null angesetzt, sondern mit einem Preisabschlag gegenüber Rapsschrot.

3.2.5.1 Schätzung der Herstellkosten für Ölsaaten

Wie bereits erwähnt werden die meisten betrachteten Ölsaaten nicht kommerziell angebaut. Die folgenden Schätzungen beruhen daher auf veröffentlichten Feldversuchsdaten und übertragbaren Daten anderer Pflanzen. Ergebnisse zu pflanzenbaulichen Parametern [z.B. Leitlinien der TLL] bilden die Grundlage für die folgende ökonomische Bewertung der Erzeugung von Ölsaaten. Die Kosten für die Produktion der Ölsaaten gliedern sich in Kosten für Saatgut, für Düngemittel, für Pflanzenschutzmittel, für Kraft- und Schmierstoffe, investitionsabhängige Kosten, Personalkosten und sonstige Kosten. Als Subventionen werden Direktzahlungen berücksichtigt.

Der **Saatgutbedarf** und der Saatgutpreis wird für die jeweilige Pflanze auf Basis von Literaturdaten geschätzt. Beispielsweise wird für Drachenkopfsaat ein Saatgutbedarf 15 kg/ha. Saatgut angenommen und ist in Deutschland nicht kommerziell erhältlich, im Projekt erfolge der Bezug aus Rumänien (Dracosa AG). Die Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft hat für Feldversuche Samen aus Genbanken und botanischen Gärten verwendet und einen Saatgutpreis von 1 EUR/kg angesetzt.

Die **Nährstoffbedarfe** wurden ebenfalls aus Literaturdaten entnommen. Als N-Dünger wird Kalkammonsalpeter (KAS) mit 27% Stickstoff verwendet, als P-Dünger Triple-Superphosphat mit 46% Phosphat und als kombinierter K- und Mg-Dünger 40er Kali mit 40% K_2O und 6% MgO. Aus Vereinfachungsgründen wird kein weiterer Magnesium-Dünger betrachtet, MgO also ausschließlich über 40er Kali zugeführt, ggf. wird deshalb die empfohlene Düngermenge nicht vollständig gedeckt. Der Ermittlung der Düngerkosten liegen die durchschnittlichen Düngerpreise des Jahres 2009 zugrunde, die von der (LWK-NRW, 2010) veröffentlicht wurden (siehe Abbildung 13, Abbildung 14 und Abbildung 15). Über die Nährstoffanteile lassen sich die entsprechenden Preise pro kg Nährstoff berechnen, die in die Kalkulation eingehen. Im Falle von Triple-Superphosphat erfolgt die Berechnung über den Preis von Di-Ammonphosphat, aus dem mithilfe des KAS Preises der N-Anteil abgezogen wurde. Es wird davon ausgegangen, dass ausschließlich Mineraldünger eingesetzt werden und keine organische Düngung erfolgt.

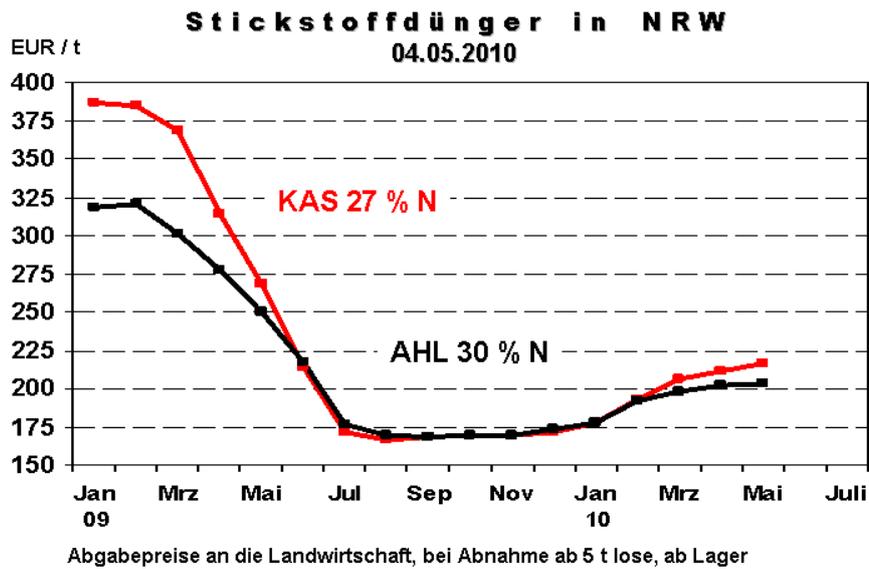


Abbildung 13: Preise für Stickstoffdünger (Quelle: LWK NRW 2010).

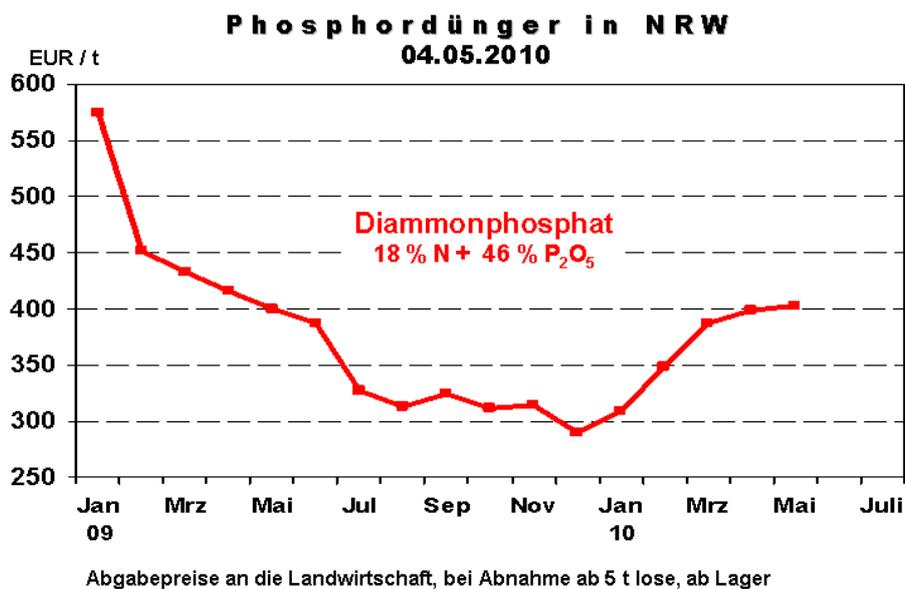


Abbildung 14: Preise für Phosphordünger (Quelle: LWK NRW 2010).

Kali-Dünger in NRW 04.05.2010

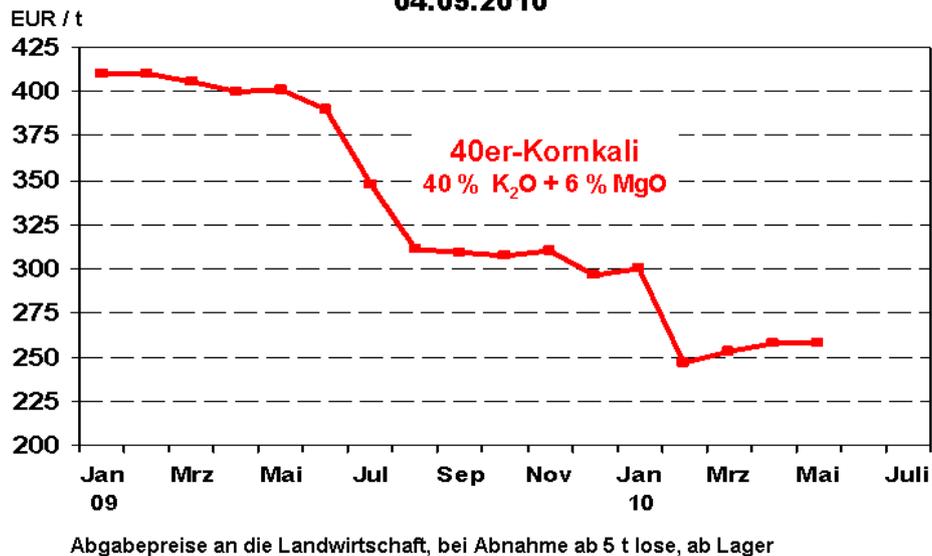


Abbildung 15: Preise für Kali-Dünger (Quelle: LWK NRW 2010).

Art und Menge für **Pflanzenschutzmittel** sind aus Literaturempfehlungen entnommen. Beispielsweise werden für Drachenkopofölsaaten die Herbizide *Bandur* und *Basagran*, das Graminizid *Fusilade Max* sowie das Fungizid *Folicur* empfohlen. Im Basisfall (mittlere Böden, AZ 45) wird *Basagran* nicht eingesetzt und daher mit dem Behandlungsfaktor 0 versehen, von *Folicur* wird gemäß TLL nur ein Zehntel der vom Hersteller empfohlenen Maximalmenge eingesetzt. Als Preise für Pflanzenschutzmittel werden aktuelle Angaben aus dem Landhandel verwendet, jeweils zu den größten erhältlichen Verpackungsmengen⁸¹. Für die einzelnen Arbeitsgänge der Feld- und Erntearbeit (z.B. Grunddüngung, Pflügen, Feldspritzen) werden Maschinen (insbesondere Schlepper) und Personal benötigt. Die zugehörigen Aufwendungen verteilen sich entsprechend auf Betriebsmittelkosten, investitionsabhängige Kosten und Personalkosten. Die für Daten für Bedarfe und Kostensätze der Feld- und Erntearbeit für das Beispiel Iberischer Drachenkopf wurden von der TLL übernommen und soweit möglich aktualisiert. Es wird wie auch bei der Düngerkalkulation angenommen, dass beim Ernteverfahren sämtliche Pflanzenreste auf dem Feld verbleiben und nur die Saat geerntet wird.

Einzig relevanter **Betriebsstoff** ist Diesel, der von den Maschinen zur Verrichtung der notwendigen Arbeitsgänge benötigt wird. Bei der Schätzung des Dieselpreises ist zu berücksichtigen, dass Landwirte zurzeit zwar den Verbraucherpreis zahlen, einen Teil der Mineralölsteuer zurückerstattet bekommen (ca. 21 cent pro Liter). Auf diese Weise wurde ein durchschnittlicher Agrardieselpreis von 0,87 EUR pro Liter berechnet (siehe Tabelle 17).

⁸¹ Raab. „Landhandel Raab - Preise für Pflanzenschutzmittel.“ 2010.

Tabelle 17: Durchschnittliche Dieselpreise 2009 (vgl. Mineralölwirtschaftsverband⁸²).

Diesel 2009	Nettopreis Ct/L	Verbraucher- preis Ct/L	davon: Produkten- preis Ct/L	Mineralöl- steuer Ct/L	Mehrwert- steuer Ct/L	Deckungs- beitrag Ct/L
Jan	44,8	109,3	29,8	47,0	17,4	15,0
Feb	42,7	106,8	27,4	47,0	17,1	15,3
Mrz	38,3	101,5	27,2	47,0	16,2	11,1
Apr	42,2	106,2	28,7	47,0	17,0	13,5
Mai	41,9	105,8	29,7	47,0	16,9	12,2
Jun	44,8	109,3	34,3	47,0	17,5	10,5
Jul	42,5	106,5	32,1	47,0	17,0	10,4
Aug	46,7	111,5	35,4	47,0	17,8	11,3
Sep	44,4	108,8	32,5	47,0	17,4	11,9
Okt	46,8	111,6	34,9	47,0	17,8	11,9
Nov	48,0	113,0	35,4	47,0	18,0	12,6
Dez	47,1	112,0	35,5	47,0	17,9	11,6
AVG 2009	44,2	108,5	31,9	47,0	17,3	12,3
		-21,4				
		87,1				

Zu den **investitionsabhängigen Kosten** zählt einerseits Pacht, welche unabhängig von den tatsächlichen Besitzverhältnissen als Wert für das durch den Flächenbedarf gebundene Kapital angesetzt wird. Der Kostensatz von 3 EUR pro Hektar und Bodenpunkt wurde von übernommen⁸³. Die Opportunitätskosten der Kapitalbindung durch die Maschinen werden über kalkulatorische Zinsen mit einem Zinssatz von 4% abgebildet. Die Kostenansätze für Abschreibungen sowie Reparatur- und Instandhaltung wurden für alle Arbeitsgänge einschließlich der Ernte, jedoch ohne Transporte zum Erfasser und Lagerung, aus der Literatur übernommen.

Der **Personalbedarf** für die Feld- und Erntearbeiten werden die Arbeitskraftstunden pro Hektar aufsummiert. Darin enthalten sind termingebundene Arbeiten (Eigen- und Fremdleistungen), Regiestundenzuschläge (20% auf die termingebundenen Arbeiten) sowie nicht-termingebundene Arbeiten. Der zusätzliche Personalbedarf für Leitung und Verwaltung wird mit 40% der Arbeitskraftstunden abgeschätzt. Die Kosten für eine Arbeitskraftstunde in der Landwirtschaft belaufen sich laut Farack et al. auf 13,56 EUR (inkl. 50% Lohnnebenkosten).

⁸² <http://www.mwv.de/index.php/daten/statistikenpreise/?loc=2&jahr=2009>

⁸³ Farack, Martin, et al. *Leitlinie zur effizienten und umweltverträglichen Erzeugung von Winterroggen*. Jena: Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, 2009.

Weitere Kosten der Saaterzeugung fallen für Versicherung, Berufsgenossenschaft und sonstige Posten an. Die Versicherungskosten bestehen aus der Prämie für die Hagelversicherung, welche wie bei anderen Früchten auch vom Marktwert der angebauten Sorte abhängt. In Anlehnung an Biertümpfel (2008)⁸⁴. Und Achilles (2008)⁸⁵ (S. 195 mit 12,42 EUR pro 1000 EUR Versicherungssumme für Raps und Sonnenblume in Sachsen-Anhalt, Marktwert 32 EUR/dt) sind sie mit 6 EUR pro Hektar angesetzt. Der Beitrag zur Berufsgenossenschaft ist mit 20 EUR pro Hektar angesetzt, sonstige Betriebsausgaben mit 60 EUR pro Hektar (Achilles, 2008), S. 720 für einen Ackerbaubetrieb, S. 721 Betrieb mit 200 Hektar Landfläche).

Insgesamt ergeben sich die Herstellkosten für den Erzeuger pro Hektar für die Saaten ungereinigt und ungetrocknet ab Hof. Von diesen Kosten ist die ergebnisunabhängige Betriebsprämie (1. Säule der GAP, siehe Abschnitt 3.2.2) abzuziehen, die dem Landwirt für jede in der Produktion befindliche Ackerfläche gezahlt wird. Sie wurde von der Bundesregierung für Sachsen-Anhalt auf 354,97 EUR/ha festgelegt. Durch den Ansatz kalkulatorischer Zinsen und den Zuschlag von (Verwaltungs-) Gemeinkosten (entspricht hier den sonstigen Betriebsausgaben) wird das Prinzip der Vollkostenrechnung angewendet. Weitere Kosten für Vermarktung sind für den Erzeuger im Vertragsanbau nicht zu erwarten. Die geschätzten Herstellkosten sind also bereits Selbstkosten und können im Folgenden mit denen anderer Ölsaaten verglichen werden. In Abbildung 16 werden die Herstellkosten der betrachteten Ölsaaten dargestellt und zum Vergleich die Marktpreise von Winterraps und Sonnenblumensaaten angegeben (Stand 2011, nicht aktualisiert).

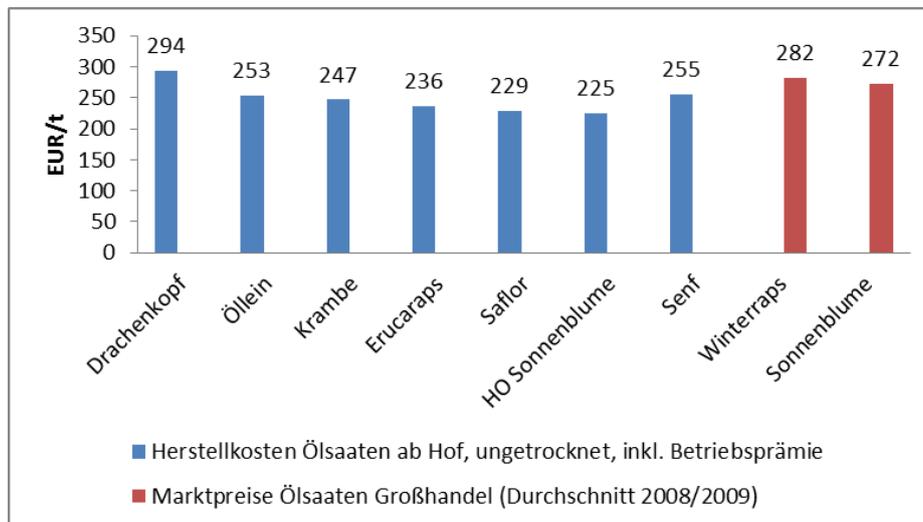


Abbildung 16: Herstellkosten für Ölsaaten und Vergleich mit Marktpreisen für konventionelle Ölsaaten, Stand Ende Projektphase 1, nicht aktualisiert.

⁸⁴ Biertümpfel, Andrea, Torsten Graf, Gerd Reinhold, und Rüdiger Schmatz. *Leitlinie zur effizienten und umweltverträglichen Erzeugung von Iberischem Drachenkopf*. Jena: Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, 2005.

⁸⁵ Achilles, Werner. *Betriebsplanung Landwirtschaft 2008/09*. Darmstadt: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft, 2008.

3.2.5.2 Schätzung der Herstellkosten für die betrachteten Öle

Im vorigen Abschnitt wurden die Vollkosten für die Ölsaaten (ungereinigt und ungetrocknet) geschätzt. Um von hier aus zu einem Preis „ab Hof“ zu gelangen, welchen die Integrierte BioProduktion an den Landwirt zu zahlen hat, ist noch eine Marge für den Primärerzeuger zu berücksichtigen. Diese würde im Vorfeld zwischen Abnehmer und Landwirt in einem Vertrag festgelegt und könnte beispielsweise mit einer Klausel das aktuelle Agrarpreisniveau berücksichtigen. Die genaue Ausgestaltung der Zahlung und die Höhe der Marge werden von den Verhandlungen beider Parteien abhängen. Dem Landwirt wird dabei aber sicherlich die Chance auf einen angemessenen Gewinn verglichen mit zu erwartenden Gewinnen aus dem Anbau alternativer Marktfrüchte und eine Kompensation für oder eine Verteilung von speziellen Risiken (Ertragsausfallrisiko, Ausfallrisiko des einzigen Abnehmers) zugestanden werden müssen. Für die Bewertungen wird eine Marge von 20 % auf die Herstellkosten der Ölsaaten angenommen.

Für die weiteren Schritte der Ölsaatenverarbeitung bis zur Bereitstellung des Öls „frei Anlage“ wird zwischen den beiden Beschaffungsvarianten A und B unterschieden. In der Variante A (siehe Abbildung 17) werden die Ölsaaten zu einem Erfrasser transportiert (150 km, Transportkosten nach FNR 2010 S. 122), wo sie aufbereitet (z.B. Schwarzbesatz entfernt) und getrocknet werden. Anschließend werden sie weiter zur Ölmühle transportiert (150 km) und eine Lösemittlextraktion mit Raffination der Öle durchgeführt (Kosten durch Crush-Margin Vergleich mit Rapsöl). Schließlich wird das Öl zur Anlage transportiert (100 km). In der Variante B (siehe Abbildung 17) werden die Ölsaaten direkt zur Anlage transportiert (150 km), wo die Aufbereitung und Trocknung und anschließende Kaltpressung stattfindet. Die Kosten für die Kaltpressung basieren auf Daten der KTBL 2008/09 und wurden für die betrachteten Ölsaaten angepasst, z.B. Ölgehalt.

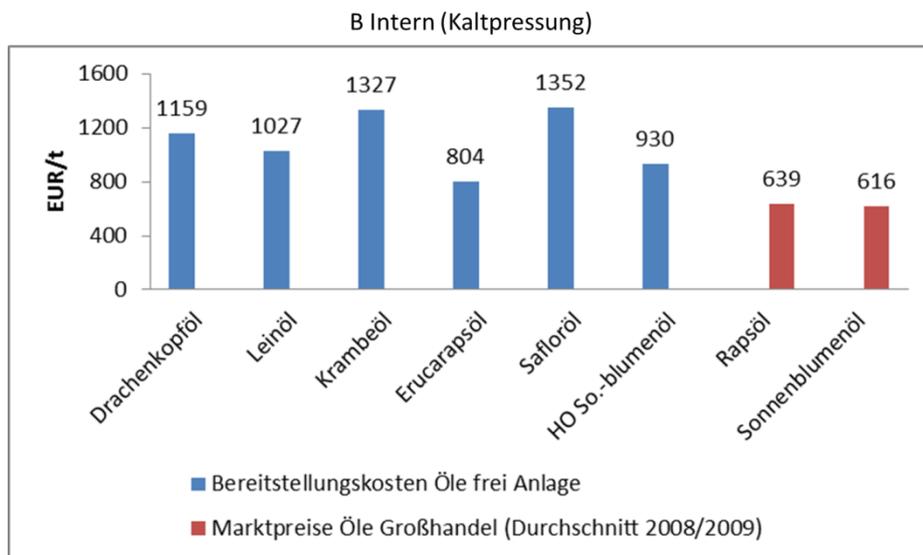
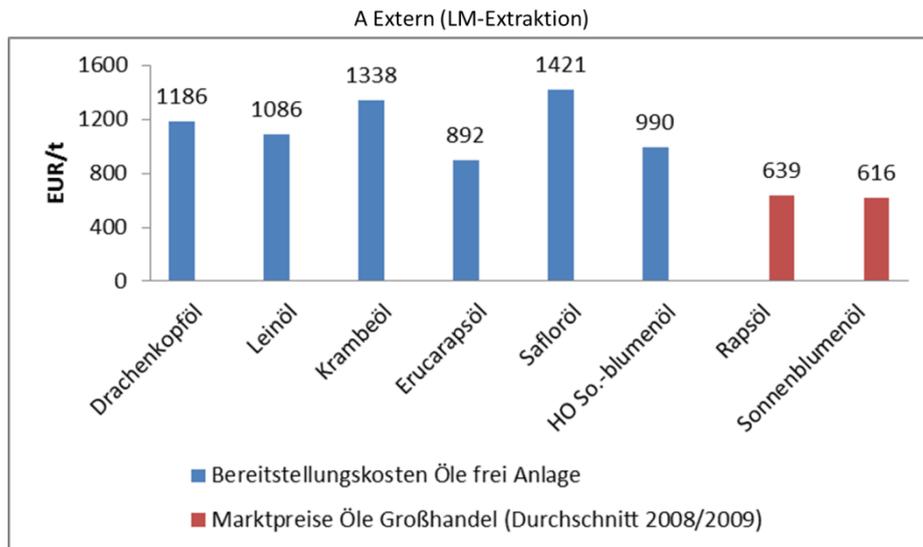


Abbildung 17: Herstellkosten für Öle und Vergleich mit Marktpreisen für konventionelle Öle, Variante A LM-Extraktion extern, Variante B Kaltpressung intern, Stand Projektende Phase 1.

In den Ergebnissen schlägt sich die Tatsache nieder, dass zur Erzeugung der Ölsaaten keine grundsätzlich anderen Kultivierungs- und Erntetechniken als bei etablierten Feldfrüchten erforderlich sind. Unterschiedlich sind vor allem das Ertragsniveau sowie einige Aufarbeitungsschritte. Auf Grundlage verfügbarer Daten zu Dünge- und Pflanzenschutzmitteleinsatz, Feld- und Erntearbeit sowie Aufarbeitungsschritten ergeben sich Werte, die über den Herstellkosten für Raps liegen. Erlöse für Nebenprodukte (z.B. Presskuchen) sind in der Berechnung nicht enthalten, fließen aber in die Ölpreise der Prozessbewertungen ein.

Ökonomische Schlüsselgrößen der Rohstoffbereitstellung sind vor allem die Flächenerträge sowie das aktuelle Preisniveau der Agrarmärkte.

3.2.6 Betriebswirtschaftliche Richtwerte der Saatproduktion (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)

Wird der kalkulierte Erzeugermindestpreis am Markt garantiert, der die im Produktionsverfahren entstehenden Vollkosten und einen Beitrag zum Betriebsergebnis (Gewinn) abdeckt, können die Alternativen zum Winterraps im Anbau wirtschaftlich konkurrenzfähig etabliert und eine nennenswerte Produktion aufgebaut werden.

Die Vollkostenrechnung umfasst den Anbau, die Ernte, Reinigung, Trocknung sowie den Transport zum Erzeuger mit Preisen für Betriebsmittel, Arbeitserledigung, Fläche und sonstigen Kosten aus dem Jahr 2013 (siehe Anhang 1 bis Anhang 4).

Da aufgrund des zu vernachlässigenden Anbauumfangs von Drachenkopf und Krambe nicht alle eingesetzten chemischen Pflanzenschutzmittel zugelassen sind, kann eine Genehmigung für Mittelanwendungen mit geringfügigem Umfang nach §22, Absatz 2 Pflanzenschutzgesetz beantragt werden (siehe Anhang 7 und Anhang 8).

Den Direktkosten (siehe Anhang 11 bis Anhang 14) wurden die aktuellen ortsüblichen Preise für Dünge- und Pflanzenschutzmittel, Trocknung, Reinigung und Hagelschutzversicherung zugrunde gelegt.

Bei den Maschinenkosten und dem Arbeitszeitbedarf (siehe Anhang 15 bis Anhang 19) kamen die in den Versuchen bzw. der Praxis bewährten agrotechnischen Maßnahmen sowie Richtwerte des Kuratoriums für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft KTBL zur Anwendung.

Für die Kulturen Drachenkopf und Krambe gibt es keinen Saatgutpreis, weshalb die Kalkulation selbiger auf dem Mittelwert der Marktpreise für Öllein- und Senfsaatgut basiert.

Der im Erzeugermindestpreis enthaltene Beitrag zum Betriebsergebnis entspricht dem durchschnittlichen Gewinn aller Feldfrüchte in Thüringen.

Im Falle einer zeitnahen Markteinführung müssen die Ertragsschwankungen von Drachenkopf, Krambe und Koriander berücksichtigt werden.

Für den Drachenkopf ist ein Erzeugermindestpreis zwischen den Ertragsniveaus 10 und 15 dt/ha, monetär zwischen 72,8 und 55,3 €/dt zu veranschlagen.

Die Durchschnittserträge der Krambe liegen höher als beim Drachenkopf, weshalb bei der Krambe mit einem Erzeugermindestpreis zwischen den Ertragsniveaus 15 und 20 dt/ha, monetär zwischen 76 und 57 €/dt zu kalkulieren ist. Die Produktion von Krambesaat weist aufgrund des niedrigen Schüttgewichtes hohe Arbeitserledigungskosten auf, weshalb ihr Erzeugermindestpreis, trotz höherer Erträge, generell über dem des Drachenkopfes liegt.

Bei Koriander ist in Frühjahrssaat von einem Ertragsniveau zwischen 10 und 15 dt/ha, bei der Herbstsaat zwischen 15 und 20 dt/ha auszugehen, was Erzeugermindestpreisen zwischen 85,3 und 68 €/dt (Frühjahrssaat) bzw. zwischen 68 und 54,4 €/dt (Herbstsaat) entspricht.

Ein Sicherheitszuschlag von 20 % auf den Erzeugermindestpreis würde auftretende Ertragsschwankungen auffangen.

Bezüglich des aktuell realisierbaren durchschnittlichen Ertragsniveaus von Drachenkopf, Krambe und Koriander wurde sich an den mehrjährigen Anbauversuchen im thüringischen Dornburg orientiert. Aufgrund der guten Bodenqualität in Dornburg und den vorteilhaften Bedingungen im Versuchsanbau, ist unter Praxisbedingungen von leicht niedrigeren Erträgen auszugehen, die in zuvor genannten Empfehlungen für den Erzeugermindestpreis bei sofortigem Markteintritt der Kulturen berücksichtigt wurden.

Die Durchschnittserträge und deren Streuung von Iberischem Drachenkopf, Krambe, Koriander und Erucaraps im mehrjährigen Dornburger Anbau werden ausführlich im Kapitel Ökologische Bewertung des Anbaus, Flächeneffizienz und Ertragsstabilität dargestellt.

Der Winterraps weist ein stabiles Ertragsniveau auf. Im Mittel wurden 2013 in Deutschland 39,5 dt/ha geerntet⁸⁶, auf guten Standorten sind Erträge über 50 dt/ha realistisch. Der für den Erucaraps veranschlagte Mindesterzeugerpreis entspricht demzufolge einem Ertragsniveau zwischen 35 und 40 dt/ha, monetär zwischen 33,9 und 32 €/dt (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Erzeugermindestpreise in €/dt für den Anbau von Iberischem Drachenkopf, Krambe, Koriander und Erucaraps unter Berücksichtigung verschiedener Ertragsniveaus.

Ertragsniveau Sommerungen	10 dt/ha	15 dt/ha	20 dt/ha	25 dt/ha*	30 dt/ha*
Drachenkopf	72,8	55,3	46,1	38,5	33,5
Krambe	76,0	57,0	47,5	40,4	35,7
Koriander	85,3	68,0	54,4	45,0	38,8
Ertragsniveau Winterraps	30 dt/ha	35 dt/ha	40 dt/ha	45 dt/ha	50 dt/ha
Erucaraps	36,5	33,9	32,0	30,6	29,5

* Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Bei Anhebung bzw. Stabilisierung der Ertragsniveaus von Drachenkopf, Krambe und Koriander auf 20 bzw. 25 dt/ha reduzieren sich die Mindestpreise für den Erzeuger.

⁸⁶ DESTATIS 2013: Statistisches Bundesamt, Anbaustatistiken 2013, Winterraps
https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/07/PD13_252_412.html Zugriff
 26.02.2014

3.3 Bewertung der Rohstoffbereitstellung in Zusammenhang mit der Nebenproduktverwertung (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)

3.3.1 Betriebswirtschaftliche Richtwerte der Ölkaltpressung in Zusammenhang mit der Presskuchenverwertung (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)

Ziel der vorliegenden Kalkulation ist ein Ölmindestpreis, zu dem die Ölmühle, bei Verkauf des Öls, kostendeckend produziert und ab dem sie einen Gewinn einfährt. Die Wertschöpfung über den Presskuchen ist an dieser Stelle von enormer Bedeutung, da sein Verkauf den Ölpreis maßgeblich mitbestimmt bzw. zur Wirtschaftlichkeit der Ölproduktion beiträgt. Folgende Parameter wurden der Vollkostenrechnung zugrunde gelegt:

- Investitionskosten für die Technik in Höhe von 180 T€
- das Gebäude befindet sich bereits im Bestand, es wurde hier kein Betrag bemessen
- Erzeugermindestpreise für den Anbau der Ölsaaten wurden in Vollkostenrechnung kalkuliert
- Presskuchenmindestpreise aus den Verwertungsrichtungen Futtermittel, Gärsubstrat in Biogasanlagen, Brennstoff und Düngemittel
- Abpressgrade bzw. Ölausbeuten entsprechen einer Kaltpressung, Ermittlung auf Ölmühle KOMET DD85-G der TLL in Dornburg, nach Filterung der Rohöle
- Einsatzzeit der Mühle 5.000 Stunden/Jahr
- Anlagenverfügbarkeit 22 Stunden/Tag
- 227 Produktionstage/Jahr
- Verarbeitungskapazität 0,15 t je Stunde
- Verarbeitungsmenge 750 t Ölsaaten/Jahr
- für Presskuchenverkauf wurden verschiedene Schatten- oder Gleichgewichtspreise der Verwertungen Futtermittel, Biogassubstrat mit Gärrestnutzung, Düngemittel und Brennstoff eingesetzt
- einheitliche Dichte von 0,917 kg/L für alle vier Ölsorten
- Abschreibungen 18 T€/Jahr
- Kapitalverzinsung 3,2 T€/Jahr
- Versicherung 1,4 T€/Jahr
- Instandhaltung/Wartung 10,5 T€/Jahr
- Energie- und Betriebsstoffe 42 T€/Jahr
- Lohn- und Verwaltung 11,7 T€/Jahr
- für Ölaufbereitung (Entschleimung und Entsäuerung) wurden Kosten von 20 €/t angesetzt
- dargestellter Ölmindestpreis enthält keinen Gewinn für die Ölmühle sowie keine Transportkosten zur Mühle und gegebenenfalls zur Ölaufbereitung

Die Höhe des Kornertrages und des Presskuchenmindestpreises der verschiedenen Verwertungsrichtungen beeinflussen den Ölmindestpreis. Je höher das stabile Ertragsniveau und die ökonomische Wertschöpfung der Presskuchen ist, desto niedriger ist der Ölmindestpreis (siehe Abbildung 18 und Tabelle 19 bis Tabelle 22).

Bei einer Presskuchenverwertung als Futtermittel stellt sich der Ölmindestpreis am günstigsten dar. Für die Kulturen Drachenkopf, Krambe und Koriander, deren Nebenprodukte aktuell keinen Zugang in den Futtermittelmarkt finden, ist der Einsatz als Brennstoff und in der Biogasanlage die wirtschaftlichste Option. Die Presskuchenverwendung als Düngemittel führt zum höchsten Mindestpreis für das Öl.

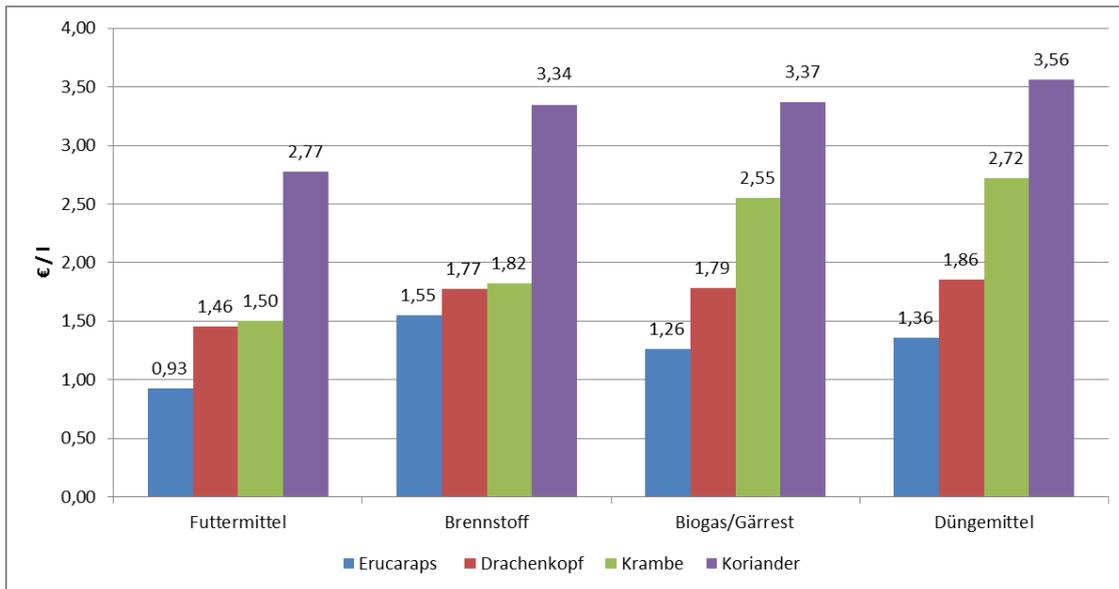


Abbildung 18: Ölmindestpreise einer Kaltpressung in Abhängigkeit von der Verwertungsrichtung des Presskuchens, Ertragsniveau der Sommerungen: 20 dt/ha und Erucaraps: 40 dt/ha.

20 dt/ha sind von den Sommerungen in guten Jahren erreichbar, stellen augenblicklich aber keine zuverlässige Größe dar.

Wie in Kapitel 3.2.6 ausgeführt, liegen die aktuell realisierbaren Durchschnittserträge unter Berücksichtigung von Ertragsschwankungen für den Drachenkopf zwischen 10 und 15 dt/ha, für die Krambe zwischen 15 und 20 dt/ha und für Koriander je nach Aussaatzeitpunkt zwischen 10 und 15 dt/ha (Frühjahrsaat) oder 15 und 20 dt/ha (Herbstaat). Entsprechend gestaltet sich der Ölmindestpreis, der aus dem aktuellen Ertragsniveau resultiert (siehe Tabelle 19 bis Tabelle 22).

Eine züchterische Anhebung bzw. Stabilisierung der Ertragsniveaus der Sommerungen auf 20 bzw. 25 dt/ha würde den Ölmindestpreis aktiv senken und der Oleochemie attraktivere Preiskonditionen bieten.

Tabelle 19: Ölmindestpreis Iberischer Drachenkopf in Abhängigkeit des Ertragsniveaus der Saat und der Verwertungsschienen des Presskuchens, €/L.

Ertragsniveau	Futtermittel	Biogassubstrat ¹	Düngemittel	Brennstoff
10 dt/ha	2,38	2,71	2,78	2,70
15 dt/ha	1,77	2,10	2,18	2,09
20 dt/ha	1,46	1,79	1,86	1,77
25 dt/ha*	1,19	1,52	1,59	1,51

¹ inkl. Gärrestnutzung * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)
Kursiv hervorgehoben ist das aktuell realisierbare durchschnittliche Ertragsniveau.

Tabelle 20: Ölmindestpreis Krambe in Abhängigkeit des Ertragsniveaus der Saat und der Verwertungsschienen des Presskuchens, €/L.

Ertragsniveau	Futtermittel	Biogassubstrat ¹	Düngemittel	Brennstoff
10 dt/ha	2,49	3,93	4,10	2,18
<i>15 dt/ha</i>	<i>1,83</i>	<i>3,01</i>	<i>3,18</i>	<i>2,15</i>
<i>20 dt/ha</i>	<i>1,50</i>	<i>2,55</i>	<i>2,72</i>	<i>1,82</i>
25 dt/ha*	1,26	2,21	2,38	1,58

¹ inkl. Gärrestnutzung * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)
Kursiv hervorgehoben ist das aktuell realisierbare durchschnittliche Ertragsniveau.

Tabelle 21: Ölmindestpreis Koriander in Abhängigkeit des Ertragsniveaus der Saat und der Verwertungsschienen des Presskuchens, €/L.

Ertragsniveau	Futtermittel	Biogassubstrat ¹	Düngemittel	Brennstoff
<i>10 dt/ha</i>	<i>4,55</i>	<i>5,14</i>	<i>5,34</i>	<i>5,11</i>
<i>15 dt/ha</i>	<i>3,55</i>	<i>4,15</i>	<i>4,34</i>	<i>4,12</i>
<i>20 dt/ha</i>	<i>2,77</i>	<i>3,37</i>	<i>3,56</i>	<i>3,34</i>
25 dt/ha*	2,24	2,83	3,03	2,80

¹ inkl. Gärrestnutzung * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)
Kursiv hervorgehoben ist das aktuell realisierbare durchschnittliche Ertragsniveau (Frühjahrsaat: 10 bis 15 dt/ha, Herbstsaat 15 bis 20 dt/ha).

Für den Erucaraps ist mit stabilen Durchschnittserträgen zwischen 35 und 40 dt/ha zu rechnen (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Ölmindestpreis Erucaraps in Abhängigkeit des Ertragsniveaus der Saat und der Verwertungsschienen des Presskuchens, €/L.

Ertragsniveau	Futtermittel	Biogassubstrat ¹	Düngemittel	Brennstoff
30 dt/ha	0,75	1,09	1,18	1,15
<i>35 dt/ha</i>	<i>0,68</i>	<i>1,02</i>	<i>1,11</i>	<i>1,08</i>
<i>40 dt/ha</i>	<i>0,63</i>	<i>0,97</i>	<i>1,06</i>	<i>1,03</i>
50 dt/ha	0,56	0,90	1,00	0,96

¹ inkl. Gärrestnutzung

3.3.2 Betriebswirtschaftliche Richtwerte der Nebenproduktverwertung (TLL)

Einen wesentlichen Beitrag zur Wirtschaftlichkeit der Ölpflanzenverwertung leisten die Koppelprodukte Presskuchen oder Extraktionsschrot. Für Rapssaat wurde in den vergangenen vier Jahren ein sehr hoher Marktpreis erzielt, dabei wurde 2012 ein Börsenhoch von über 520 €/t erreicht. Ende Juli 2014 sank der Kurs auf den niedrigsten Stand seit drei Jahren mit zeitweise unter 310 €/t⁸⁷. Witterungsbedingungen, politische und wirtschaftliche Entwicklungen führen zu Preisschwankungen. Der Kurs für die Rapssaat wird neben dem Rapsölpreis (648 €/t) durch den Preis für Presskuchen (227 €/t) bzw. Extraktionsschrot (206 €/t) generiert (Preise Oktober 2014, UFOP 2014). Eine hohe wirtschaftliche Wertschöpfung der Koppelprodukte führt zu einem hohen Erlös für das Hauptprodukt. Presskuchen und Schrot des Rapses finden nahezu ausschließlich in der Tierfütterung Einsatz, wo sie aktuell die höchste monetäre Wertschöpfung liefern.

⁸⁷ GOYAX 2014: Matif Rapspreis, Statistiken <http://www.goyax.de/matif-raps> Zugriff: 16.06.2014

Nachfolgend soll für die Presskuchen der alternativen Ölpflanzen sowie für den Erucaraps die beste ökonomische Verwertungsmöglichkeit analysiert werden. Folgende Einsatzbereiche sind möglich und werden wirtschaftlich und rechtlich betrachtet:

Futtermittel

1. Gärsubstrat in Biogasanlagen mit Verkauf des erzeugten Stroms, Nutzung der Wärmeenergie und anschließender Ausbringung des Gärrestes als Düngemittel
2. Organisches Düngemittel
3. Brennstoff.

Die Preisfindung der Presskuchen in den einzelnen Verwertungsrichtungen resultiert aus den spezifischen Inhaltsstoffen, die laboranalytisch in der TLL ermittelt und bezüglich ihrer verwertungsrelevanten Eigenschaften bewertet wurden. Es handelt sich dabei um einen Mindestpreis, der in der weiteren Wertschöpfungskette zur Kostendeckung des Ölpreises beiträgt. Auf eine mögliche Verwendung des Ölpflanzenproteins für die technische Nutzung sowie für die Humanernährung wird hingewiesen.

3.3.2.1 Presskuchen als Futtermittel

In Deutschland wird seit Jahrzehnten der Hauptteil des Bedarfes an Eiweißfuttermitteln aus Importen, vor allem Sojaextraktionsschrot, gedeckt. Am Beispiel des Einsatzes der Koppelprodukte der Rapsölproduktion (Presskuchen, Extraktionsschrot) wird deutlich, dass deutsche Futtermittelverwerter dankbare Abnehmer für proteinreiche heimische Futtermittel sind⁸⁸. So verdoppelte sich der Verbrauch des Futtermittels Rapsextraktionsschrot in Deutschland von 2000 nach 2012 auf 3,5 Mio. t. Der Anteil des Rapsschrotes am Gesamtschrotverbrauch (Raps und Soja) wuchs im gleichen Zeitraum um 27 % auf 42 %⁸⁹. Bei der Nutzung heimischer Futtermittel werden neben der Förderung regionaler Wirtschaftskreisläufe lange Transportwege vermieden und es wird eine Alternative zu gentechnisch verändertem Importsoja geschaffen.

Rechtlicher Rahmen für den Einsatz von Koppelprodukten alternativer Ölpflanzen als Futtermittel

Um an nationalen und internationalen Qualitätssicherungssystemen teilnehmen zu können, ist die Aufnahme in für den Markt relevante Futtermittellisten unumgänglich. Raps hat Eingang in die deutsche Positivliste für Einzelfuttermittel (10. Auflage 2012) und die GMP+ International (Fassung 05/2013) gefunden. Krambe, Iberischer Drachenkopf und Koriander hingegen sind in beiden Verzeichnissen nicht vertreten. Durch die Nicht-Nennung erfolgt eine Abschottung gegenüber dem weitaus größten Teil des Marktes für Futtermittel, welcher über die Qualitätssicherungssysteme an diese Listen gebunden ist. Für Rapskuchen und -extraktionsschrot gilt der uneingeschränkte Einsatz im konventionellen Futtermittelbereich. In

⁸⁸ BDP ET AL., 2012: Gemeinsames Positionspapier des Bundesverbandes Deutscher Pflanzenzüchter (BDP), des Deutschen Bauernverbandes (DBV) und der Union zur Förderung von Öl- und Proteinpflanzen (Ufop), Eiweißstrategie <http://media.repro-mayr.de/61/538061.pdf> Zugriff 10.02.2014

⁸⁹ SCHMIDT 2013: T. Schmidt, OVID – Verband der Ölsaatenverarbeitenden Industrie in Deutschland, Vortrag: Internationaler Handel mit Futtermitteln – Bedeutung für Tierproduktion und Welternährung, im Rahmen des 1. Futtermitteltages der Arbeitsgemeinschaft bäuerliche Landwirtschaft (AbL) und Germanwatch, Hamm, 03.06.2013 http://www.vom-acker-in-den-futter-trog.de/fileadmin/Dokumente/Vom_Acker_in_den_Futtertrog/Veranstaltungen/Vortrag_OVID_Schmidt_AbL_Futtermitteltag_Hamm_03_Juni_2013.pdf Zugriff: 24.09.2014

den oben genannten Futtermittellisten findet keine Trennung in 00- und Erucaqualität statt. Bei 00-Sorten kennzeichnet die erste 0 einen geringen Gehalt an Erucasäure, die zweite 0 steht für geringe Glucosinolatgehalte. Erucasorten sind +0-Sorten, wobei + für hohe Erucasäuregehalte und 0 für geringe Glucosinolatgehalte steht. Während bei Anbau, Erfassung, Lagerung und Transport, bis hin zur Separierung in der Ölmühle eine strikte Trennung von Eruca- gegenüber 00-Raps einzuhalten ist, wird üblicherweise das Extraktionsschrot beider Sorten nach der Ölabtrennung zusammengeführt und als Futtermittel vermarktet. Aufgrund des in Deutschland im Vergleich zu 00-Raps sehr geringen Aufkommens des Erucarapses (< 3 % der Anbaufläche von Winterraps in 2013), tritt bei der Zusammenführung ein erheblicher Verdünnungseffekt ein.

Korianderöl und Korianderextrakt sind in der Liste der EU-Futtermittel-Zusatzstoffe (Register of Feed Additives, EG Nr. 1831/2003) unter Annex1, 2b, natural products, geführt. Die natural products gehören in die Kategorie Aroma und appetitanregende Stoffe und sind für alle Tierarten geeignet⁹⁰. Die deutsche Positivliste sowie der GMP+ International schließen allerdings den Einsatz von Koriandernebenprodukten aus. Somit ist der Einsatz praktisch ausgeschlossen.

Preisfindung über die Austauschmethode nach Lühr

Die Ermittlung des monetären Wertes der verschiedenen Presskuchen erfolgt über die wertbestimmenden Inhaltsstoffe Energie- und Eiweißgehalt. Auf Grundlage der „Austauschmethode nach Lühr“ wurde über ein Kalkulationsprogramm⁹¹ der Wert der Inhaltsstoffe der alternativen Ölsaatenpresskuchen mit den aktuellen Marktpreisen eines Referenzfuttermittels verglichen). Das Referenzfuttermittel besteht aus einer Zweikomponentenfuttermischung, Sojaschrot Normtyp bzw. Rapsschrot als Eiweißträger und der Futtergerste. Das Programm errechnet einen sogenannten Schatten- oder Vergleichspreis, der den monetären Wert der Inhaltsstoffe der Presskuchen angibt. Es wurden Soja- und Rapsschrot gewählt, um heimischen und importierten Eiweißfuttermitteln gleichermaßen gerecht zu werden. Außerdem ist es eine gängige Praxis, auf beide Eiweißträger zurück zu greifen und diese im Gemisch einzusetzen. Die Berechnung des Energiegehaltes beim Schwein erfolgte aus den Verdaulichkeiten der Nährstofffraktionen Rohprotein, Rohfett und verdaulicher Rest, weiterhin Stärke und Zucker, beim Wiederkäuer aus den Verdaulichkeiten von Rohfett, Rohfaser, organischer Substanz sowie dem Rohprotein⁹². Die einzelnen Verdaulichkeiten der Inhaltsstoffe wurden der Datenbank Futtermittel der DLG entnommen. Die höchste Wertschöpfung wird über die Rindermast erzielt, gefolgt von der Milchvieh- und der Schweinefütterung (siehe Tabelle 24). Ein

⁹⁰ BVL 2014: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Zusatzstoffe zugelassen nach Richtlinie 70/524/EWG und Übergangsregelung Verordnung EG 1831/2003
http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/02_Futtermittel/01_Zusatzstoffe_70_524/futtermittel_zusatzstoffe_aroma.pdf?__blob=publicationFile&v=1 Zugriff: 25.08.2014

⁹¹ LEL 2012: Landesanstalt für Entwicklung der Landwirtschaft und der ländlichen Räume Schwäbisch Gmünd LEL, Kalkulation von Substitutionswerten von Futtermitteln - Stand 09/2012, Dr. Ralf Over
https://www.landwirtschaft-bw.info/pb/MLR.LEL,Lde,W-2/Startseite/Nachhaltige+Unternehmensentwicklung/EDV_Fachanwendungen_Tierische+Erzeugung_extern.jsess ionid=3BCB3ACDBEF6B5FE1F7A92C13BE6CE11 Zugriff 28.02.2014

⁹² DLG 2011: Berechnung des Energiegehaltes in Futtermitteln, Leitfaden zur Berechnung des Energiegehaltes bei Einzel- und Mischfuttermitteln für die Schweine- und Rinderfütterung, Stellungnahme des DLG-Arbeitskreises Futter und Fütterung, Dezember 2011
http://www.dlg.org/fileadmin/downloads/fachinfos/futtermittel/Stellungnahme_Energieberechnung_Rind_Schwein.pdf Zugriff 11.02.2014

möglicher Zusatznutzen der Fettsäuren, etwa der Linolensäure im Drachenkopfpresskuchen, wird ökonomisch nicht berücksichtigt.

Tabelle 23: Nährstoffgehalte der Presskuchen je 1.000 g Frischmasse.

	MJ ME_R ¹	MJ NEL_R ²	XP ³ g/kg	UDP ⁴ %	MJ ME_S ⁵	g Lysin
Drachenkopf	11,26	6,89	203	30	5,8	12,4
Krambe	13,00	7,94	178	30	8,7	11,1
Koriander	12,24	7,48	177	30	6,6	10,0
Erucaraps	13,04	7,98	338	30	10,6	21,5
00-Raps	12,90	7,90	294	30	9,9	19,8

¹Umsetzbare Energie Rind ²Netto-Energie-Laktation Rind ³Rohprotein ⁴Unabbaubares Rohprotein ⁵Umsetzbare Energie Schwein

Tabelle 24: Mindestpreise, €/t Frischmasse nach der Austauschmethode nach Löhr, Referenzfutter Eiweißträger: 50 % Sojaschrot Normtyp (446 €/t), 50 % Rapsextraktionsschrot (252 €/t) und Futtergerste (164 €/t).

	Basis	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Erucaraps
Rindermast	XP ¹ , ME ²	220	220	213	316
Milchvieh	XP, NEL ³	215	217	211	315
Schwein	Lys ⁴ , ME	176	193	162	311
Schwein	XP, ME	173	179	163	296

¹Rohprotein ²Umsetzbare Energie ³Netto-Energie-Laktation ⁴Lysin

Antinutritive Inhaltsstoffe und Einsatzempfehlungen

Je nach Verbindung und Konzentration haben antinutritive Inhaltsstoffe negative Auswirkungen auf das Tier und dessen Gesundheit. Für Krambe und Erucaraps ist der Glucosinolatgehalt der begrenzende Faktor. Die Folgen eines überhöhten Glucosinolatverzehr sind Beeinträchtigungen der Jodaufnahme und der Synthese von Schilddrüsenhormonen, aus denen Wachstumshemmungen und Leistungsrückgang sowie Einschränkungen in der Fortpflanzungskapazität und der Leber- und Nierenfunktion resultieren. Seit den 1970er Jahren stehen glucosinolatarme Rapsorten zur Verfügung, heutige 00- und Erucarapssorten sind arm an diesem Inhaltsstoff⁹³. Trotz glucosinolatarmer Rapsorten müssen die Konzentrationen gerade bei den empfindlicheren Monogastriern (Schwein, Geflügel) beachtet werden. 18 µmol/g in der Saat akzeptieren deutsche Pflanzenzüchter und das Bundessortenamt. In Kanada beträgt der Grenzwert hingegen 12 µmol/g Saat und in der EU 25 µmol/g Saat⁹⁴. Neben der Konzentration in der Saat hängt der Gehalt im Futtermittel von der Verarbeitungsform in der Ölmühle ab. Um im Extraktionsschrot das Lösungsmittel zu entfernen, wird durch den Vorgang des Toastens unter Feuchte- und Hitzeinfluss auch der Gehalt an Glucosinolaten gesenkt. Hohe Erucasäurerationen im Futter führen zu Veränderungen des Körperfettes und in den Lipiden

⁹³ EFSA 2007: European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittelrecht, The EFSA Journal (2007) 590, Glucosinolate als unerwünschte Substanzen in Tierfutter, Wissenschaftliches Gremium für Kontaminanten in der Lebensmittelkette

http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/contam_op_ej590_glucosinolates_summary_de.pdf Zugriff: 04.09.2014

⁹⁴ SCHÖNE 2009: F. Schöne, „Verwendung von Extraktionsschroten und Presskuchen“ in Matthäus, Münch 2009: Warenkunde Ölpflanzen/Pflanzenöle, Agrimedia 2009

des Herzmuskels, was verschiedene Folgeerkrankungen nach sich zieht. Der Einsatz ist restriktiv zu halten. MAKOWSKI UND TROEGEL⁹⁵ ermittelten in Krambesaat in sechs von sieben Fällen im deutschlandweiten Anbau des Jahres 1999 Glucosinolatgehalte, die das zwei- bis dreifache des EU-Höchstwertes für glucosinolatarmen 00-Raps aufweisen. In der von der TLL durchgeführten Untersuchung wird der Glucosinolatgehalt der in Dornburg 2012 angebaute Krambesaat weit unter dem Höchstgehalt eingestuft. Es wurde ein Gehalt im Presskuchen von 2,69 µmol/g der Frischmasse gemessen. Da sich der Gehalt in der Saat zum Gehalt im Presskuchen aufgrund des Ölentzugs rechnerisch erhöht, liegen die Gehalte in der Saat unter denen des Presskuchens und somit in einem niedrigen Bereich. Bezüglich des Glucosinolatgehaltes ist also mit Schwankungen zu rechnen.

MAKOWSKI UND TROEGEL empfehlen auf Grundlage von Literaturrecherchen einen restriktiven Einsatz von Krambepresskuchen und -extraktionsschrot in der Mastschweinfütterung von 5 % der Gesamtration sowie eine maximale Glucosinolataufnahme für die Dauer der Verfütterung von 280 µmol. Bei den Wiederkäuern soll der Anteil im Kraftfutter 15 % nicht übersteigen. Bei den hohen Rohfasergehalten und der besseren Verdaulichkeit für den Wiederkäuer im Vergleich zum Schwein ist die Verfütterung an Rind und Schaf sinnvoller. Bei Erhöhung der Anteile an Krambenebenprodukten im Kraftfutter von Milchkühen auf 30 %, sanken die Aufnahme des Kraftfutters sowie die tägliche Milchmenge. Der Fettgehalt der Milch verringerte sich und das Fettsäuremuster zeigte höhere Konzentrationen an ungesättigten Fettsäuren. Der Erucasäuregehalt im Milchfett erhöhte sich auf bis zu 2 % an den Gesamtfettsäuren. In amerikanischen Studien wird der Einsatz von Krambenebenprodukten für Monogastrier abgelehnt, bei den Wiederkäuern unter Restriktionen, wie der Inaktivierung der Glucosinolate, befürwortet⁹⁶. Getoastetes Krambeextraktionsschrot ist in der US-amerikanischen „Food Additive Status List“ als „Crambe meal, heat toasted“ zugelassen⁹⁷. Die Zulassung ist auf Rinder beschränkt, der Gesamtanteil darf dabei 4,2 % der Trockenmasse der Gesamtration nicht überschreiten. Grenzwerte bezüglich der Gehalte an Wasser, Öl, Rohprotein, Rohfaser und Glucosinolaten müssen eingehalten werden⁹⁸. Anteile von 50 % Krambenebenprodukt am Gesamtprotein der Ration für Fleischerinder werden als wertvolle Eiweißquelle, ohne Auswirkungen auf Futterakzeptanz, Verdauung, Leistung oder hormonelle Belastung gesehen. Aufgrund des antinutritiven Inhaltsstoffes Glucosinolat und vergleichbarer Erucasäuregehalte ist von einer Gleichbehandlung bezüglich der Futtereinsatzmengen von Erucaraps- und Krambenebenprodukten auszugehen. 15 % im Kraftfutteranteil von Wiederkäuern nach MAKOWSKI UND TROEGEL⁹⁹ entsprechen einer Futtermenge für einen Bullen von 600 g Presskuchen pro Tag (300 kg Lebendgewicht, 8 kg Trockenmasseaufnahme/Tag, darunter 50 % Kraftfutter) bzw. für eine Milchkuh 810 g Presskuchen pro Tag (630 kg Lebendgewicht,

⁹⁵ MAKOWSKI UND TROEGEL 2001: N. Makowski, T. Troegel, Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“, Krambe – eine alternative Sommerölfrucht, Landwirtschaftsverlag Münster 2001

⁹⁶ FAO 2014: FAO – Food and Agricultural Organisation of the UN, Ecocrop <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=4922> Zugriff: 17.03.2013 http://www.dlg.org/fileadmin/downloads/fachinfos/futtermittel/Stellungnahme_Energieberechnung_Rind_Schwein.pdf Zugriff 11.02.2014

⁹⁷ FDA 2014: U.S. Food and Drug Administration, Food Additive Status List <http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm> Zugriff: 02.09.2014

⁹⁸ LII 2014: Legal Information Institut, 21 CFR 573.310 - Crambe meal, heat toasted <http://www.law.cornell.edu/cfr/text/21/573.310> Zugriff: 02.09.2014

⁹⁹ MAKOWSKI UND TROEGEL 2001: N. Makowski, T. Troegel, Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“, Krambe – eine alternative Sommerölfrucht, Landwirtschaftsverlag Münster 2001

18 kg Trockenmasseaufnahme/Tag, darunter 30 % Krafftutter). Bezüglich in der Praxis angewandte Vermischung von 00- und Erucarapsextraktionsschroten für Fütterungszwecke ist zu ergänzen, dass der Restfettgehalt in Extraktionsschroten unter 5 % liegt. Der zugeführte Erucasäureanteil ist entsprechend gering. Ängste vor jeglichem Erucasäureeinsatz sind unbegründet. Auch in der Humanernährung ist ein Erucasäuregehalt von 5 % im Fettanteil von Lebensmitteln zulässig. Aufgrund des Übergangs in das Nahrungsfett ist der Einsatz in der Tierernährung jedoch restriktiv zu halten. Da 00- und Erucarapssorten glucosinolatarm sind, ist ein negativer Einfluss diesbezüglich nicht zu befürchten.

Es spricht nichts gegen die Aufnahme der Koppelprodukte aus der Drachenkopf- und Krambeölproduktion. Als Eiweißfuttermittel können sie einen wichtigen Beitrag zur Ernährung der Nutztiere leisten.

Das gleiche gilt für Korianderprodukte. Allerdings sind hier keine Futterakzeptanz- und Verdauungsversuche bekannt, es sollten diesbezüglich Untersuchungen angestoßen werden. Für LÖHNERT ET AL.¹⁰⁰ scheint die Aufnahme des Presskuchens von Iberischem Drachenkopf in die Liste der Einzelfuttermittel aufgrund des ungenügenden Futterwertes, der durch einen hohen Rohfaseranteil, speziell durch hohe Ligningehalte bestimmt wird, nicht angeraten. Die in der Studie untersuchte Fragestellung bezog sich jedoch auf die Gewährleistung hoher Leistungsniveaus der Tiere und nicht auf das Kriterium der Aufnahme in die Positivliste. Da auch Futtermittel mit höheren Rohfaser- und Ligningehalten in der Positivliste vertreten sind, bspw. Stroh, können diese Inhaltsstoffe keine begrenzenden Faktoren für den Einsatz darstellen.

Die Schälung der Saat bietet eine Möglichkeit, den Rohfasergehalt zu senken und damit den Futterwert zu erhöhen, was für die Krambe und den Raps eine Option darstellen würde. Ökonomisch attraktive Verfahren zur Ölsaatenschälung gibt es derzeit nicht, sie sind aber Bestandteil aktueller Forschung.

In Verbindung mit einer Aufnahme in die Positivliste ist ein Einsatz der Nebenprodukte von Drachenkopf, Krambe und Koriander in extensiven Tierhaltungsverfahren wie der Mutterkuh- oder Schafhaltung mit geringen Leistungsansprüchen trotz des niedrigen Futterwertes denkbar.

Zur Aufnahme von Futtermitteln in die Positivliste existiert ein Leitfaden. Das Antragsformular ist bei der Normenkommission Einzelfuttermittel des Zentralausschusses der Deutschen Landwirtschaft auf der Webseite der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft (http://www.dlg.org/positivliste_antrag.html) herunterzuladen.

Einsatz von Ölsaatennebenprodukten in der Fütterung im ökologischen Landbau

In der ökologischen Tierhaltung ist ausschließlich die Fütterung von Presskuchen, welcher durch mechanisches Pressen der Saat entsteht, zulässig. Extraktionsschrot, bei dem die Saat mechanisch, thermisch und chemisch behandelt wird, ist aufgrund chemischer Rückstände, die in geringen Mengen im Schrot vorliegen, nicht gestattet. Extraktionsschrot wird als gesundheitlich bedenklich eingestuft. Rapssaat und Rapskuchen sind für die

¹⁰⁰ LÖHNERT ET AL. 1998: Prüfung von Presskuchen aus Iberischem Drachenkopf (*Lallemantia iberica*) an Schweinen und Schafen, Abschlussbericht, TLL, 1998

Fütterung zugelassen (EG-ÖKO-VERORDNUNG 2008). Grundsätzlich obliegen die Futtermittel der Pflicht einer Herkunft aus ökologischem Anbau. Sofern eine ausschließliche Versorgung mit selbigem nicht möglich ist, gelten Ausnahmen für Monogastrier, die bis zu 5 % nicht ökologisch erzeugtes Futter erhalten dürfen, bei der Wandertierhaltung (Form der Schafhaltung) bis zu 10 % der jährlichen Futteraufnahme¹⁰¹ (EU-VERORDNUNG ÖKOLOGISCHER LANDBAU 2013). Der Einsatz der Presskuchen von Drachenkopf, Krambe, Koriander und Erucaraps im Ökologischen Landbau wäre demzufolge in Ausnahmefällen, wenn keine ökologisch erzeugten Futtermittel verfügbar sind, möglich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ölsaatennebenprodukte von Drachenkopf, Krambe und Koriander in der deutschen Positivliste für Futtermittel nicht vertreten sind und finden damit keinen Marktzugang. Da die Nebenprodukte der Ölsaaten wertvolle Eiweißlieferanten sind, wird ihr Einsatz aus Sicht der Tierernährung als sehr positiv bewertet. Für einen Marktzugang müsste die Aufnahme in die Positivliste für Futtermittel erfolgen. Rapskuchen und -extraktionsschrot sind in der Positivliste vertreten und finden in der Praxis Einsatz.

3.3.2.2 Presskuchen als Gärsubstrat in Biogasanlagen

Rechtlicher Rahmen für den Einsatz von Koppelprodukten alternativer Ölpflanzen in Biogasanlagen und als organisches Düngemittel

Die Bioabfallverordnung (BioAbfV, Fassung 4.4.2013) regelt in Verbindung mit der Düngemittelverordnung (DüMV, Fassung 5.12.2012) die Verwertung unbehandelter und behandelter Abfälle als Düngemittel auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden. Aufgrund der Verwendbarkeit von Gärresten als Düngemittel ist auch beim Substrateinsatz in Biogasanlagen auf die Einhaltung der BioAbfV zu achten. In der DüMV sind Qualitätsanforderungen sowie Kennzeichnungsparameter für das Inverkehrbringen reglementiert.

Preisfindung

Im Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) 2009 und 2012 wird Rapskuchen in die Einsatzstoffklasse 0 gruppiert. Somit entfällt eine einsatzstoffbezogene Prämie, der sogenannte NAWARO-Bonus, und es wird nur die Grundvergütung gezahlt. Laut EEG erhalten Anlagen ab dem Zeitpunkt des Anschlusses, einen für 20 Jahre garantierten Preis für Strom- und Wärmeverkauf, welcher dem gültigen Satz des Inbetriebnahmezeitpunktes entspricht. Die Grundvergütung unterliegt gemäß dem EEG 2012 einer Degression von 2 % pro Jahr.

Mit der Novelle des EEG 2014 entfallen alle Boni für neu errichtete Anlagen. Die Einspeisevergütung sinkt auf ein Niveau der Grundvergütung (13,66 bis 11,78 ct/kWh) (EEG 2014). Dadurch wird in Verbindung mit der geforderten 100%igen Abdeckung jeglicher Neubau von landwirtschaftlichen Anlagen zum Erliegen kommen.

¹⁰¹ FDA 2014: U.S. Food and Drug Administration, Food Additive Status List
<http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm> Zugriff:
02.09.2014

Für die Ermittlung des Mindestpreises für die verschiedenen Presskuchen in einer Bestandsbiogasanlage werden in Vollkostenrechnung folgende Parameter angenommen¹⁰²:

- die Vergütung erfolgt nach EEG 2012, Inbetriebnahmejahr 2013
- die installierte BHKW-Leistung beträgt 300 kW
- der Substrateinsatz setzt sich zusammen aus 10.000 m³/a Rindergülle und 1.000 t/a Presskuchen, zur Sicherung der Leistung wird zusätzlich Maissilage eingesetzt
- für die Investitionskosten der Biogasanlage wurden 923 T€, für das Blockheizkraftwerk (BHKW) 225 T€ und für das Gärrestlager je nach Presskuchen zwischen 207 und 228 T€ angesetzt
- die Kosten für Hilfsstoffe und Sonstiges belaufen sich jährlich auf 53 T€, Wartung und Instandhaltung 48 T€, der Personalaufwand je nach Presskuchenart zwischen 14,7 und 17,4 T€, Leitung und Verwaltung zwischen 2,2 und 3,1 T€, Versicherungskosten 9,2 T€, kapitalbedingte Kosten (Abschreibungen und Zinsen) zwischen 153,8 und 157,4 T€ sowie für die Annuitäten der Biogasanlage, des BHKW's und des Lagers
- bezüglich der erzeugten Wärmeleistung werden 50 kW für die Substrataufheizung selbst verwertet, aufgrund fehlender Abnehmer bleibt die restliche Wärmeenergie ungenutzt

Die aus Sicht der Biogasanlage tolerablen Zielpreise für die Presskuchen werden entsprechend der Methanausbeuten der einzelnen Presskuchen (Hohenheimer Biogastest, siehe Tabelle 9) und den o.g. verfahrensökonomischen Unterstellungen (weitere wirtschaftliche Parameter, siehe Tabelle 25) über die Gewinngleichheit zum Substrat Maissilage (35 €/dt) ermittelt.

¹⁰² REINHOLD 2014: G. Reinhold, Hausinterna Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena

Tabelle 25: Wirtschaftlichkeitsberechnungen für die Biogasanlage.

Biomasseeinsatz						
Gülle		Rindergülle	Rindergülle	Rindergülle	Rindergülle	Rindergülle
Menge	m ³ /a	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
TS-Gehalt	%	8	8	8	8	8
oTS-Gehalt	% der TS	80	80	80	80	80
Gasausbeute	m ³ CH ₄ /kg oTS _E	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209
Koferment 1		Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissilage
Einsatzmenge	t FM/a	4.727	1.764	1.043	1.932	2.232
TS-Gehalt	%	32	32	32	32	32
oTS-Gehalt	% der TS	95	95	95	95	95
Gasausbeute	m ³ CH ₄ /kg oTS _E	0,338	0,338	0,338	0,338	0,338
Koferment 2		kein Presskuchen	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Erucaraps
Menge	t/a	0	1.000	1.000	1.000	1.000
TS-Gehalt	%	90	91	91	94	92
oTS-Gehalt	% der TS	95	95	95	93	92
Gasausbeute	m ³ CH ₄ /kg oTS _E	0,3	0,353	0,436	0,33	0,305
Anlagenparameter						
Gasverwertung (BHKW)						
BHKW-Leistung (installiert)	kW	300	300	300	300	300
BHKW-Leistung (Mittel)	kW	267	267	267	267	267
Wärmeleistung (Mittel)	MWh/a	281	281	281	281	281
Wärmenutzung (Eigenbedarf)	kW	50	50	50	50	50
Nicht nutzbare Wärme	kW	161	168	171	167	166
Leistungen						
Strom Verkauf EEG*	€/kWh	0,20	0,17	0,17	0,17	0,17
Wärme Innenumsatz (Ablösung)	€/kWh	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Ergebnis						
Summe Leistungen	T€/a	464	399	392	400	403
Summe Aufwendungen	T€/a	458	392	385	394	396
Saldo (Überschuss) EEG 2012	T€/a	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6

*2012- EEG Stromrechner (bis 5 MW, ohne Gaseinspeisung, Gülle- und Abfall-BGA § 27a und § 27b EEG 2012), TLL-Vergütungsrechner

Gärreste als Düngemittel

Das vergorene Substrat aus Rindergülle, Presskuchen und Mais ist als organisches Düngemittel im Sinne des Düngemittelrechts einzustufen. Für die Vermeidung von Nährstoffverlusten und zur optimalen Ausnutzung der Nährstoffe durch die Pflanze müssen die Einhaltung von Ausbringverboten und Sperrfristen, Abstandsaufgaben zu Gewässern, Obergrenzen für die Ausbringung und das Einarbeitungsgebot laut Düngeverordnung

umgesetzt werden. Der monetäre Wert des Gärrestes ergibt sich aus den Nährstoffpreisen und den Nährstoffgehalten, welche neben den Gärbedingungen von dem Nährstoffgehalt der eingesetzten Substrate abhängen. Aufgrund des erhöhten Aufwandes für die Ausbringung des Gärrestes im Vergleich zur mineralischen Düngung werden die für den Presskuchen anteiligen Verfahrenskosten der Gärrestausrückführung vom monetären Nährstoffwert der Inhaltstoffe abgezogen. Bezüglich der Stickstoffgehalte und –bindungsformen bewirkt der Abbau der organischen Substanz während der Fermentation, speziell der Eiweißverbindungen, eine Mineralisierung organisch gebundener Stickstofffraktionen. Somit steigt der Ammoniumanteil, was pflanzenbaulich eine höhere und kurzfristige Stickstoffdüngewirkung im Vergleich zu Rohgülle bedeutet. Gasförmige Stickstoffverluste in Ammoniakform können in Größenordnungen von 5 bis 15 % auftreten¹⁰³. Die pflanzenbaulich anrechenbare Stickstoffwirksamkeit von Gärresten beträgt abzüglich der Lagerverluste 60 % des eingegangenen Stickstoffs (N). Bei den Nährstoffen Phosphor (P), Kalium (K) und Magnesium (Mg) finden während der Fermentation keine Umsetzungsprozesse statt, der Gehalt im Gärrest entspricht dem Gehalt im Presskuchen und wird zu 100 % düngewirksam angerechnet. Der Mindestpreis für die Verwertungsschiene Biogas beinhaltet die Vergärung in der Biogasanlage und den Einsatz des Gärrestes als Düngemittel (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Mindestpreise der Presskuchen bei Vergärung in der Biogasanlage, Gärrestausrückführung als Düngemittel abzgl. Ausbringkosten und Gesamtleistung, €/t FM.

Gärrest als Düngemittel: N-Wirksamkeit 60%, P-, K-, Mg-Wirksamkeit 100%

	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Erucaraps
Vergärung	31	46	41	64
Gärrest als Düngemittel (abzgl. Ausbringungskosten)	63	40	52	72
Gesamtleistung Vergärung und Gärrest als Düngemittel	94	86	93	136

Der Erucarapskuchen erlangt mit 136 €/t Frischmasse die höchste monetäre Bewertung durch eine hohe Methanausbeute während der Fermentation und die hohen Nährstoffgehalte, vor allem Stickstoff, im Kuchen für die Bewertung des Gärrestes als Düngemittel. Die hohe Methanausbeute ist neben dem Protein- und Stärkegehalt auf den hohen Restfettgehalt zurückzuführen. Der Drachenkopfkuchen kompensiert die vergleichsweise niedrige Gasausbeute mit hohen Nährstoffgehalten, sein Zielpreis beträgt 94 €/t, ähnlich der Koriander mit 93 €/t. Die wirtschaftliche Bewertung des Krambepresskuchens erreicht mit 86 €/t in dieser Verwertungsschiene die geringste Wertschöpfung. Aus relativ geringen Nährstoffgehalten des Kuchens aus ungeschälter Saat resultiert ein niedriger Düngewert des Gärrestes. Trotz des hohen Ölgehaltes ist die Methanausbeute des Krambekuchens vergleichsweise gering, da hohe Rohfasergehalte die Methanbildung reduzieren.

Eine alternative Option, die Presskuchen in die Sonderkategorie „Bioabfallanlagen“ des EEG 2012 einzusetzen, besteht nicht, da in der Novelle des EEG 2014 der Substrateinsatz für

¹⁰³ REINHOLD ET AL., 2012: G. Reinhold, R. Riedel, W. Zorn, V. König: Merkblatt Eigenschaften von Biogasgülle, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, 2012
<http://www.tll.de/ainfo/pdf/bwx21012.pdf> Zugriff: 05.08.2014

Bioabfallanlagen nicht auf weitere Substrate ausgedehnt wurde. In dieser Kategorie bekämen Anlagen mit > 90 % Substrateinsatz einiger Abfallschlüsselnummern (20 02 01, 20 03 01, 20 03 02) aus der Gruppe der Siedlungsabfälle nach BioAbfV eine Vergütung von 16 bzw. 14 ct/kWh. Rapspresskuchen oder -extraktionsschrot finden hier keine Berücksichtigung, da sie der Gruppe der Abfälle aus der Zubereitung und Verarbeitung von u. a. Speiseölen (Abfallschlüsselnummer 02 03) zugeordnet sind. Das Gleiche gilt für Presskuchen oder Extraktionsschrote der alternativen Ölpflanzen. Der geringfügig höhere Erlös gegenüber der Grundvergütung des EEG 2012 würde jedoch auch keine wesentliche Verbesserung darstellen. Aus der drastischen Kürzung der Einspeisevergütung in der Novelle des EEG in 2014 folgt, dass wegen fehlender Wirtschaftlichkeit der Gesamtanlage kaum ein Neubau von Biogasanlagen erfolgen wird. In Altanlagen, die bis 2014 in Betrieb genommen wurden, gelten zeitlich begrenzt die Vergütungen des EEG 2009 oder 2012, welche nach heutigem Gesetzesstand auf 20 Jahre ab Inbetriebnahmejahr festgeschrieben sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz von Ölsaatennebenprodukten in Biogasanlagen und die anschließende Ausbringung des Gärrestes als Düngemittel zulässig ist. Ist bei Anwendung des EEG 2009 und 2012 noch ein wirtschaftlicher Einsatz gegeben, kommt dieser beim EEG 2014 aufgrund gesunkener Vergütungssätze völlig zum Erliegen. Für Anlagen die nach dem EEG 2012 in Betrieb gegangen sind, endet die festgeschriebene Vergütung 2034. Mit Blick auf sich verändernde politische Rahmenbedingungen und Strategien zur Sicherung der Energiebereitstellung sind Änderungen bezüglich der zukünftigen Biogasvergütungen und damit auch der Substraterlöse möglich.

3.3.2.3 Presskuchen als Düngemittel

Rechtlicher Rahmen für den Einsatz von Koppelprodukten alternativer Ölpflanzen als organisches Düngemittel

Die Bioabfallverordnung (BioAbfV, Fassung 4.4.2013) regelt in Verbindung mit der Düngemittelverordnung (DüMV, Fassung 5.12.2012) die Verwertung unbehandelter und behandelter Abfälle als Düngemittel auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden.

Nach der BioAbfV ist das Aufbringen von Ölsaatenrückständen unter Einhaltung der DüMV zulässig. Die in der BioAbfV erfassten Materialien unterliegen einer Hygienisierungspflicht. Bei seuchen- und phytohygienischer Unbedenklichkeit können auf Antrag Ausnahmen entsprechend § 10 BioAbfV erlassen werden, die von den Anforderungen an die Behandlung und Untersuchung von bestimmten Bioabfällen befreien. Im Falle der Presskuchen sollte die hygienische Unbedenklichkeit gegeben sein.

In der DüMV sind Qualitätsanforderungen sowie Kennzeichnungsparameter für das Inverkehrbringen reglementiert.

Preisfindung

Der Mindestpreis für die Verwertungsrichtung Düngemittel wird über die monetäre Bewertung der Hauptnährstoffgehalte und deren pflanzenbauliche Verfügbarkeit, abzüglich der Verfahrenskosten für die Ausbringung des Presskuchens mittels Festmiststreuer von 9,50 €/t, ermittelt (siehe Tabelle 27).

Das zugrunde liegende Mineraldüngeräquivalent (MDÄ) für Stickstoff beträgt 92 %¹⁰⁴, das heißt, es werden 92 % des im Presskuchen enthaltenen Stickstoffs düngewirksam und monetär angerechnet. Für die Nährstoffe Phosphor, Kalium und Magnesium wird langfristig eine 100%ige Verfügbarkeit aller Nährstoffe angesetzt. Die Humuswirkung bleibt wirtschaftlich unberücksichtigt. Die Mindestpreise der Presskuchen bewegen sich von 38 €/t Frischmasse für die Krambe bis 74 €/t für den nährstoffreichen Erucaraps. Unter der Annahme mittelfristig steigender Düngemittelpreise wurde das Szenario der Verdopplung der Preise von N-, P-, K- und Mg-Düngemitteln kalkuliert. Bei gleichbleibenden Applikations- und Produktionskosten für die Saat erhöhen sich die Erlöse für Krambekuchen auf 85 €/t und für Erucarapskuchen auf 158 €/t.

Tabelle 27: Mindestpreise der Presskuchen, €/t Frischmasse bei Verwertung als Düngemittel, N-Wirksamkeit 92 %, P-, K-, Mg-Wirksamkeit 100%, abzügl. Ausbringungskosten.

	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Erucaraps
Mindestpreis, €/t	62	38	49	74
Verdopplung Düngerpreise*, €/t	133	85	108	158

* Szenario Verdopplung der Düngerpreise für N, P, K und Mg bei gleichbleibenden Ausbringkosten und Produktionskosten der Ölsaaten

Im 14-jährigen Dauerdüngungsversuch im thüringischen Dornburg wurden in einer herkömmlichen Fruchtfolge Krambe-, Drachenkopf- und Rapspresskuchen als Ersatz der ersten Stickstoffgabe im Frühjahr als Kopfdüngung ausgebracht (siehe Abbildung 19). Die Fruchtfolgeglieder Sommergerste, Wintergerste, Wintererbsen, Winterweizen, Sommergerste, Körner-Erbisen, Winterweizen, Winterroggen, Wintererbsen, Winterweizen, Sommergerste, Silomais, Winterweizen und Sommergerste im Zeitraum von 1996 bis 2009, wurden mit folgenden Varianten geprüft:

1. Kopfdüngung Presskuchen, N optimal (N-Gabe über den Presskuchen entsprach zu 100% der mineralischen Düngungsvariante)
2. Kopfdüngung Presskuchen, N - 50% (N-Gabe über den Presskuchen entsprach zu 50% der mineralischen Düngungsvariante)
3. Kopfdüngung Presskuchen, N + 50% (N-Gabe über den Presskuchen entsprach zu 150% der mineralischen Düngungsvariante)
4. Einarbeitung Presskuchen zur Aussaat, N optimal (N-Gabe über den Presskuchen entsprach zu 100% der mineralischen Düngungsvariante)
5. N mineralisch, optimal (=100%)
6. N mineralisch, - 50%.

Die Stickstoffgaben während der Vegetation erfolgten in allen Prüfgliedern mineralisch. Im Durchschnitt der 14 Jahre wurde bei den Düngungsvarianten Presskuchen N optimal (Variante 1 und 4) 92 % der Erträge der mineralischen Düngungsvariante erreicht. Dabei erreichte Variante 1 91 % und Variante 4 93 % des Ertrages. In Variante 3, bei der die Ausbringmenge des Presskuchens um den Faktor 1,5, bezogen auf den N-Gehalt erhöht wurde, stieg der Ertrag auf 96 % der mineralischen Düngungsvariante¹⁰⁵.

¹⁰⁴ BIERTÜMPFEL ET AL., 2010: A. Biertümpfel, R. Heydrich, T. Graf, A. Vetter, Düngung mit Presskuchen und Strohasche, Auswertung 14jähriger Versuchsergebnisse, Jena 2010, URL: <http://www.tll.de/ainfo/pdf/asch0210.pdf>. Stand: 24.01.14

¹⁰⁵ Biertümpfel et al., 2010: A. Biertümpfel, R. Heydrich, T. Graf, A. Vetter, Düngung mit Presskuchen und Strohasche, Auswertung 14jähriger Versuchsergebnisse, Jena 2010, URL:

Für die Berechnung des Düngewertes der alternativen Ölpflanzenpresskuchen wurde analog zum beschriebenen Versuch ein Stickstoff-MDÄ von 92% zugrunde gelegt.

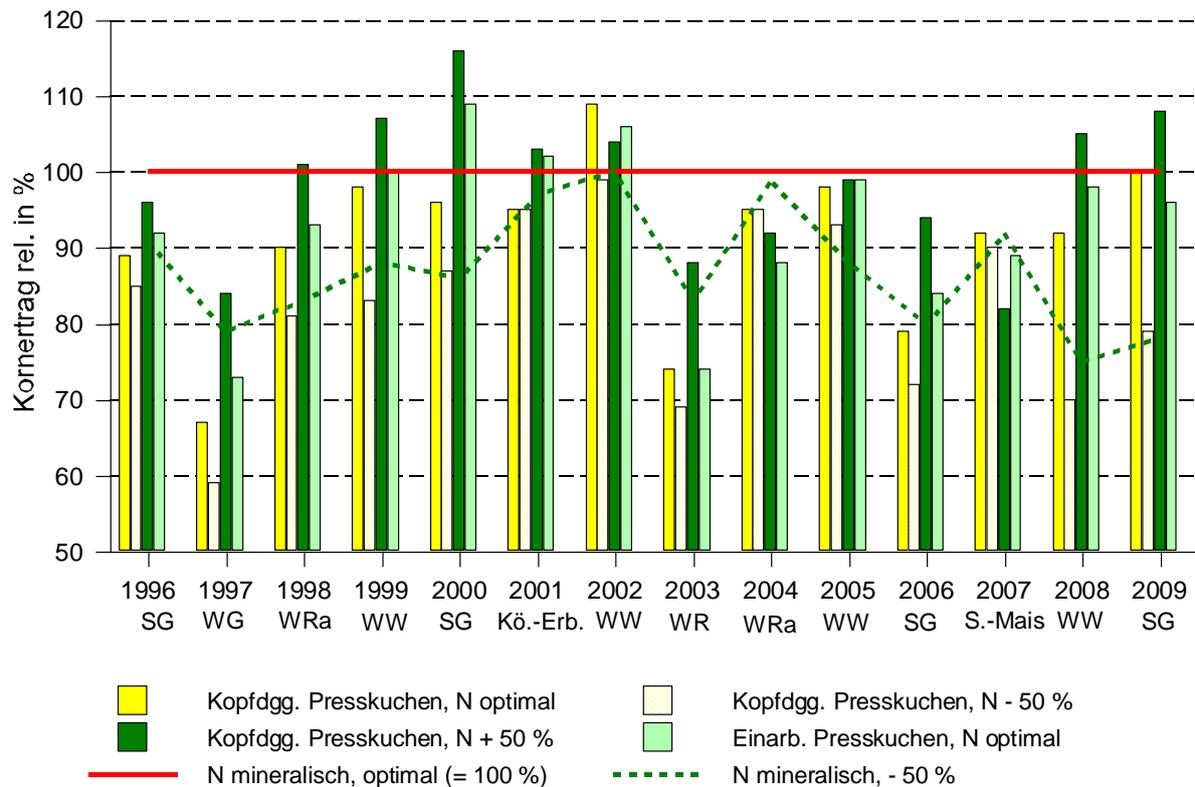


Abbildung 19: Relativer Kornertrag (2007: Ganzpflanzenertrag) bei Stickstoffdüngung mit Presskuchen im Vergleich zur mineralischen Stickstoffdüngung (=100%) in einer Fruchtfolge, Versuchsstandort Dornburg 1996 bis 2009.

Pflanzenbauliche Bewertung weiterer Inhaltsstoffe

Nach Laboranalyse liegen die pH-Werte der Presskuchen in einem schwach bis leicht sauren und damit für das Bodenmilieu wünschenswerten Bereich. Förderlich für die Humusproduktion ist der hohe Kohlenstoffgehalt, der sich unter anderem positiv auf die Bodenbiologie und physikalische Eigenschaften wie Aggregatstabilität (Erosion) oder Wasser- und Nährstoffspeicherefähigkeit auswirkt. Kohlenstoff- zu Stickstoffverhältnisse (C:N) < 20 fördern die Stickstoffmineralisation, entsprechend steht der Stickstoff der Pflanzenernährung zeitnah zur Verfügung. Die Grenzwerte der Schwermetalle Blei, Cadmium, Chrom, Kupfer, Nickel und Zink nach BioAbfV, liegen weit über den gemessenen Gehalten der Presskuchen, die Gehalte sind unbedenklich. Eine Analyse auf den Quecksilbergehalt wurde, wie in der BioAbfV gefordert, nicht durchgeführt. Aus fachlicher Sicht sind hier jedoch keine erhöhten Gehalte zu befürchten. Zu berücksichtigen ist, dass, bezogen auf den Nährstoffgehalt, der Aufwand für Lagerung und Ausbringung im Vergleich zur mineralischen Düngung deutlich erhöht ist. Aus diesem Grund wird der Einsatz in konventionellen Bewirtschaftungssystemen unter derzeitigen Bedingungen voraussichtlich keine Bedeutung erlangen. Im ökologischen Landbau hingegen, wo der Einsatz chemisch-synthetischer Stickstoffdünger sowie leicht löslicher Phosphordünger nicht gestattet ist, besteht eine Nachfrage nach alternativen Düngerformen. Gerade auf Flächen mit hoher

Wertschöpfung wie im Gemüsebau, hat die Anwendung bereits Eingang in die Praxis gefunden. Laut EU-VERORDNUNG ÖKOLOGISCHER LANDBAU (2013) ist die organische Düngung mit Erzeugnissen und Nebenprodukten aus Ökobetrieben zugelassen. Produkte aus konventioneller Landwirtschaft können eingesetzt werden, wenn die Produktionsmittel aus ökologischem Anbau nicht verfügbar sind. Alternativ zur landwirtschaftlichen Verwertung wäre die Vermarktung für den Haus- und Kleingartenbereich denkbar, da hier ein höherer Erlös erzielbar wäre. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass dieser Absatzweg nur eine Nische darstellt und hinsichtlich der Mengenabnahme dem landwirtschaftlichen Einsatz weit unterlegen wäre. Die Presskuchenverwertung als Düngemittel ist aus pflanzenbaulicher Sicht somit zu befürworten. Sie liefert eine adäquate Nährstoffquelle für die Pflanzenernährung und trägt zur Erhöhung der Bodenfruchtbarkeit bei. Der Einsatz von Presskuchen als organisches Düngemittel ist in konventionellen und, in Ausnahmen, im ökologischen Landbau möglich.

3.3.2.4 Presskuchen als Brennstoff in Feuerungsanlagen

Rechtlicher Rahmen für den Einsatz von Koppelprodukten alternativer Ölpflanzen als Brennstoff

Die Verbrennung von Presskuchen ist gegenwärtig in Feuerungsanlagen zulässig. Reglementiert wird der Einsatz durch die 4. Bundesimmissionsschutzverordnung (BImSchV), unter die genehmigungsbedürftige Anlagen einer Größe ab 100 kW fallen. In Anlagen kleiner 100 kW ist der Presskucheneinsatz aufgrund nicht vollständig geklärter Vorgehensweise bei Prüfstandsuntersuchungen der Feuerungstechnologie gegenwärtig praktisch nicht möglich. Aufgrund spezifischer Inhaltsstoffe, wie der Gehalte an Stickstoff, Schwefel, Chlor, hohe Aschegehalte und tiefe Ascheschmelzpunkte, sind geeignete Feuerungstechnologien zu verwenden. Im Rahmen des Genehmigungsverfahrens nach 4. BImSchV wird der Genehmigungsbescheid alle drei Jahre überwacht.

Preisfindung

Aufgrund der Genehmigungspflicht nach 4. BImSchV für Anlagen die Presskuchen einsetzen und den daraus resultierenden Betriebskosten, wird für den monetären Wert der Preis für Strohballen herangezogen. Diese unterliegen bezüglich des Einsatzes in der Verbrennung den gleichen rechtlichen Reglementierungen wie die Presskuchen und werden im Jahresmittel mit 95 €/t veranschlagt. Dieser Preis wird als Mindestpreis für die Presskuchen von Drachenkopf, Krambe, Koriander und Erucaraps veranschlagt. Im Vergleich der Brennstoffkostenanteile an den Wärmegestehungskosten mit anderen Brennstoffen, schneiden die Presskuchen der Ölsaaten bei einem Mindestpreis von 95 €/t und einem unterstellten Heizwert von Rapskuchen mit 2,22 ct/kWh am wirtschaftlichsten ab (siehe Abbildung 20).

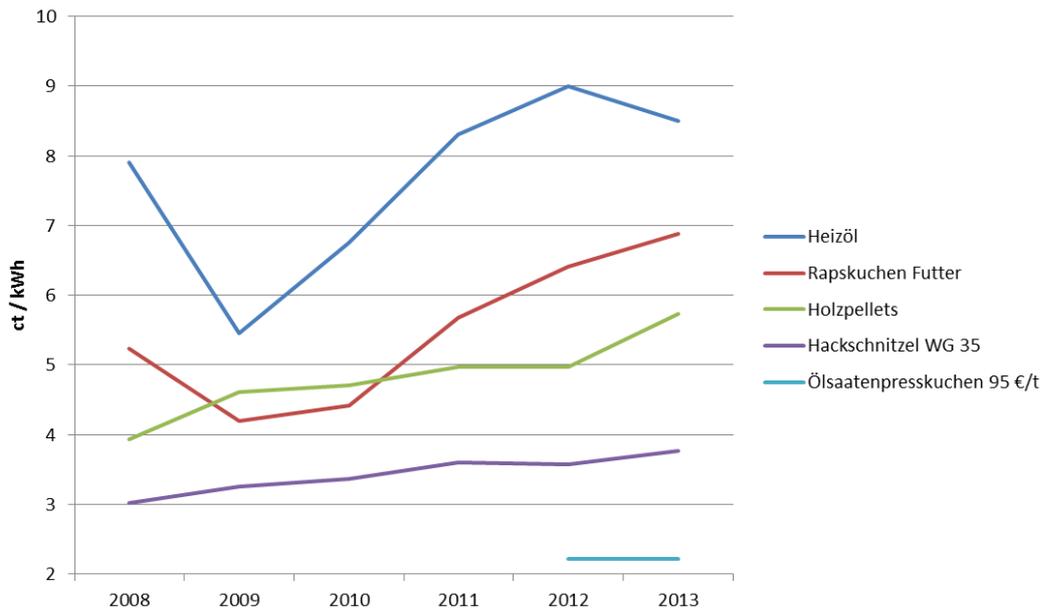


Abbildung 20: Preisentwicklung fossiler und nachwachsender Brennstoffe ((Preise Heizöl: Tecson 2014, Rapskuchen: UFOP 2014, Holzpellets: C.A.R.M.E.N. 2014, Hackschnitzel WG 35 = Wassergehalt 35 %: Kaminholz 2014, Ölsaatenpresskuchen Mindestpreis 95 €/t).

Für den Sondereinsatzstoff Presskuchen gilt: je höher die Anlagenleistung, desto kostengünstiger der Brennstoffeinsatz. Ab einer Größe von 500 kW wird der Presskucheneinsatz wirtschaftlicher, weil sich dann die niedrigen Kosten des Brennstoffes auspielen lassen. Ab einer Anlagengröße von 1 MW werden auch Holzfeuerungsanlagen genehmigungspflichtig und müssen entsprechende Filtertechnik aufweisen, die technischen Aufwendungen und Kosten für Genehmigungs- und Überwachungsbescheide einer Verbrennungsanlage mit Sondereinsatzstoffen wie Ölsaatennebenprodukte oder Stroh nähern sich denen einer Holzfeuerungsanlage an. Der Vergleich von Wärmegestehungskosten inklusive der Kapital- und Betriebskosten unterschiedlicher biogener Festbrennstoffe und fossiler Energieträger stellt heraus, dass Biomasseanlagen deutlich höhere Investitionskosten gegenüber Anlagen auf Basis fossiler Energieträger aufweisen, wobei Aufwendungen für Lagerung, Brennstoffförderertechnik, Kessel, Ascheaustrag, Pufferspeicher, Steuerung, der verwaltungsseitige Aufwand und die Rauchgasreinigung besonders ins Gewicht fallen. Für die betriebsgebundenen Kosten sind für die Biomasseanlagen leicht höhere Aufwendungen zu verzeichnen, etwa für Hilfsenergie der Förderertechnik, Wartung und Instandhaltung, Schornsteinfeger und Ascheentsorgung¹⁰⁶. Auch die Aufwendungen für das Genehmigungsverfahren nach 4. BImSchV sind hier zu nennen. Sie liegen je nach Investitionsvolumen und Quantität der nachzuweisenden Parameter im 4- bis 5-stelligen Bereich, die Überwachungskosten des Genehmigungsbescheids bewegen sich im 4-stelligen Bereich.

¹⁰⁶ HERING 2009: Thomas Hering, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Vorträge 15. Internationale Fachtagung Energetische Nutzung Nachwachsender Rohstoffe, Freiberg 10./11.09.2009: Alternative Brennstoffe in Wärmeerzeugungssanlagen bis 1 MW, Herausgeber TU Bergakademie Freiberg, Institut für Wärmetechnik und Thermodynamik

Preisentwicklung nachwachsender und fossiler Brennstoffe

Ein Vergleich der Preisentwicklung der Brennstoffkostenanteile an den Wärmegestehungskosten zeigt sowohl für fossile als auch für die nachwachsenden Rohstoffe über die letzten 6 Jahre Preisanstiege (siehe Abbildung 20).

Mit Blick auch auf künftig zu erwartende weitere Agrarpreissteigerungen haben holzartige Brennstoffe also einen klaren wirtschaftlichen Vorteil gegenüber dem Rapskuchen, der durch seinen Einsatz als Futtermittel eine hohe Wertschöpfung erzielt. Der Brennstoffkostenanteil des Heizöls lag im Mittel der sechs Jahre bei 7,65 ct/kWh. Im letzten Jahrzehnt verdoppelte sich der Preis für Heizöl, was bei einem weiteren Anstieg Vorteile, gerade für die holzartigen Brennstoffe aber auch für Rapskuchen, bedeuten würde. Wird für Ölsaatenpresskuchen ein Preis von 95 €/t kalkuliert, ergibt sich bei dem hohen Heizwert der Presskuchen ein niedriger Brennstoffkostenanteil an den Wärmegestehungskosten von 2,22 ct/kWh, der den Preis der holzartigen Brennstoffe unterschreitet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verbrennung von Presskuchen in dafür geeigneten Feuerungsanlagen ab 100 kW zulässig ist. Der Mindestpreis orientiert sich am Preis für Strohballen und beträgt für alle Presskuchen 95 €/t.

3.3.2.5 Zusammenfassung der Mindestpreise der verschiedenen Presskuchen-Verwertungen

Die höchsten Mindestpreise werden für alle Presskuchen in der Verwertungsrichtung Futtermittel generiert, obgleich für Drachenkopf, Krambe und Koriander ein praktischer Einsatz aufgrund von Reglementierung aktuell nicht möglich ist (siehe Tabelle 28). Der errechnete Mindestpreis für Erucarapskuchen von 316 €/t liegt etwa an der Obergrenze des Marktpreises der letzten Jahre für Rapskuchen.

Für Drachenkopf-, Krambe- und Korianderpresskuchen sind nur die folgenden Verwertungsrichtungen im Augenblick rechtlich zulässig. Dabei werden in der Verbrennung und der Verwertung in der Biogasanlage die höchsten Mindestpreise erzielt.

Beim Einsatz als Düngemittel wird im Mittel etwa die Hälfte des Mindestpreises der Verwertungsrichtungen Brennstoff- und Biogasnutzung generiert.

Tabelle 28: Mindestpreise der Presskuchen verschiedener Verwertungsrichtungen in €/t Frischmasse.

	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Erucaraps
Futtermittel, Rindermast	220	220	213	316
Brennstoff	95	95	95	95
Biogas inkl. Gärrestnutzung	94	86	93	136
Düngemittel	62	38	49	74

Die spezifischen Gehalte der Inhaltsstoffe der Presskuchen, auf denen die monetäre Bewertung basiert, schwanken nach Anbaujahr und Einstellungen der Presse in der Ölmühle.

Presskuchen als Proteinquelle für die Humanernährung und als technisches Protein

Eine weitere potenzielle Verwertungsrichtung von Ölsaatennebenprodukten ist die Nutzung des Proteins in der Humanernährung oder in der Technik. Für einen Einsatz in der Humanernährung gilt, dass für Produkte, die als Novel Food gelten, umfangreiche Untersuchungen erforderlich werden. Dieser Fall wäre für Drachenkopf und Krambe zu erwarten. Mögliche technische Nutzungen sind Bindemittel in Papieranwendungen und Farben, als Haft- und Klebstoff, Lösungsvermittler, Emulgator, Nutzung filmbildender Eigenschaften für Coating-Anwendungen für unterschiedliche Bereiche, thermoplastische Werkstoffe oder Fliese, z.B. in medizinischen Anwendungen. Dazu sind Proteine zu gewinnen, die über entsprechende techno-funktionelle Eigenschaften verfügen. Die dazu erforderlichen Bedingungen sind durch Untersuchungen zur Extraktion dieser Proteine zu klären. Untersuchungen für die Eignung der Proteine, sowohl im Bereich der Humanernährung als auch im technischen Bereich, sind nur angeraten, wenn das Produkt in großen Mengen anfällt. Die Informationen stammen aus einem persönlichen Gespräch mit der Pilot Pflanzenöltechnologie Magdeburg e.V. Unter derzeitigen Voraussetzungen scheinen diese Verwertungsrichtungen der alternativen Ölpflanzenpresskuchen nicht relevant.

3.3.3 Ökologische Bewertung der Wertschöpfungsketten zur Pflanzenölbereitstellung (KIT, Projektphase 1, 2009-2012)

Zur Schätzung ökologischer Wirkungen der Rohstoffbereitstellung wurden die entsprechenden Prozessketten nach Methoden der Ökobilanzierung (ISO 14040 und 14044) mit dem Simulationsprogramm Umberto abgebildet. Dabei wurde auf Sachbilanzen der Schweizer Datenbank „ecoinvent“ zurückgegriffen. Die Allokation der Emissionen erfolgte in Phase 1 nach der ökonomischen Methode. Neben den direkten Emissionen, z.B. durch Dieserverbrauch, werden auch indirekte Emissionen, z.B. Boden-Lachgasemissionen (nach IPCC 1 % des Stickstoffdüngers), berücksichtigt.

Die Pflanzenöle aus Reststoffen werden als Kuppelprodukte der zugehörigen Herstellprozesse betrachtet, die nicht vermeidbar sind. Eine Allokation ökologischer Wirkungen der Hauptprodukte erfolgt dementsprechend nicht, d.h. dem Senföl werden beispielsweise keine Emissionsdaten aus der Speisesenfherstellung anteilig zugeordnet.

Die in Phase 1 erstellten Modelle dienen als Grundlage für die Modellierungen in Phase 2 des Projekts. Ein Überblick über die Wirkungskategorien Landnutzung und Klimawandel gibt Abbildung 21 (Stand Projektende Phase 1, nicht aktualisiert). Da die Ergebnisse der ökologischen Bewertung des Anbaus und der Ölbereitstellung in Phase 2 aktualisiert und mit den betrachteten Konversionsprozessen ergänzt werden, werden die Ergebnisse hier nicht gesondert dargestellt sondern in Kapitel 3.6.2 besprochen.

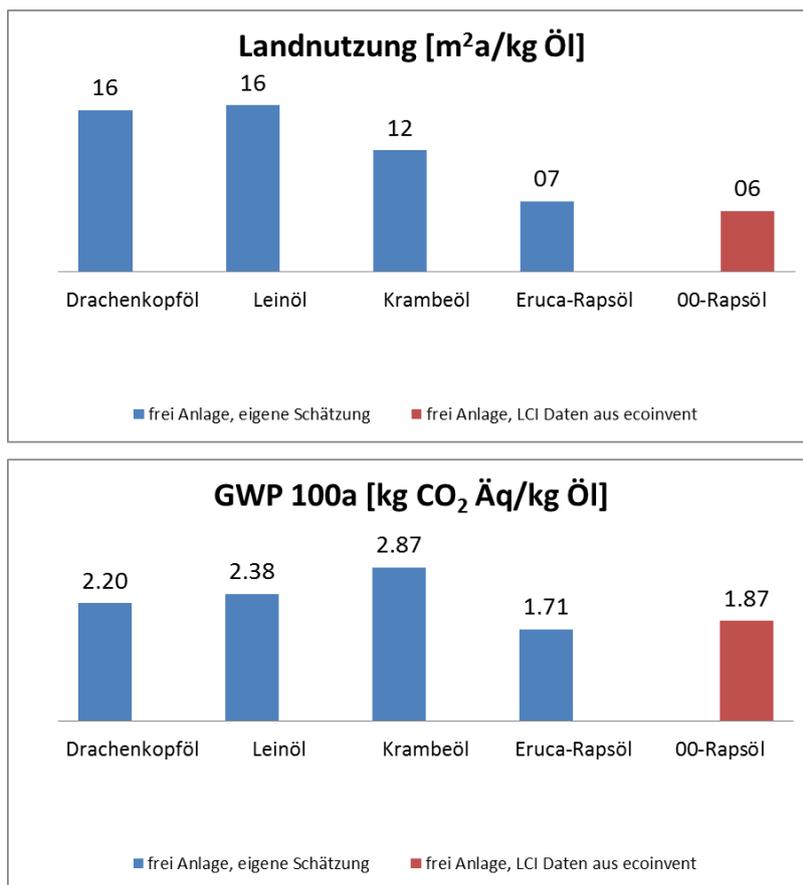


Abbildung 21: Ökologische Bewertung der Öle in den Wirkungskategorien Landnutzung und Klimawandel (Stand Projektende Phase 1, nicht aktualisiert).

3.3.4 Ökologische Bewertung des Anbaus (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)

Dieses Kapitel umfasst Recherchen zu Züchtungsarbeiten, Züchtungsfortschritt, Anbauumfang, Anbauerfahrung und Anbauwürdigkeit der vier Ölpflanzen für das gesamte Bundesgebiet. Neben den klassischen Ökosystemleistungen Fruchtfolgewardung, Agrobiodiversität und Insektenweide werden die Treibhausgasemissionen, die Flächeneffizienz und Ertragsstabilität als maßgebliche Parameter einer produktbezogenen ökologischen Bewertung analysiert. Als ökologische Indikatoren werden weiterhin die Pflanzenschutzintensität, die Auskreuzung mit der Gefahr einer ungewollten Vermischung der Genotypen sowie die Trockentoleranz als Anpassungsreaktion der Pflanzenarten auf den Klimawandel untersucht.

Zur Veranschaulichung der von den alternativen Ölpflanzen und Erucaraps generierbaren Ökosystemwirkung wurde ein Bewertungsmodell mit einer fünfstufigen Klassifizierung für jeden Parameter gewählt (siehe Tabelle 29):

- ++ sehr gute Ökosystemwirkung
- + gute Ökosystemwirkung
- nachteilige Ökosystemwirkung
- sehr nachteilige Ökosystemwirkung
- 0 keine Auswirkungen.

Die spezifischen Kriterien der gewählten Klassifizierung sind unter jedem Parameter nachzulesen.

Tabelle 29: Klassifizierung von ökologischen Indikatoren der alternativen Ölpflanzen und Erucaraps.

	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Erucaraps
Fruchtfolgewirkung	++	+	++	+
Anbaukonzentration	++	+	++	-
Agrobiodiversität	++	++	++	++
THG-Emissionen (Öl)	+	-	+	++
THG-Emissionen (Fläche)	++	++	++	-
Flächeneffizienz, Ertragsstabilität	-	-	-	+
PS-Intensität	+	++	+	-
Auskreuzung	0	+	0	-
Insektenweide	++	++	++	+
Trockentoleranz	++	++	++	+

++ sehr gute Ökosystemwirkung, + gute Ökosystemwirkung, - nachteilige Ökosystem-wirkung, - - sehr nachteilige Ökosystemwirkung, 0 keine Auswirkungen.

3.3.4.1 Züchtungsarbeiten und -fortschritt

Krambe

Züchtungsarbeiten für die Krambe begannen in den 1930er Jahren in Russland und in den 1950er Jahren in den USA und Polen. In den 1960er bis 1980er Jahren wurden verschiedene polnische und amerikanische Sorten zugelassen. In Europa erfolgte eine züchterische Bearbeitung in den 80er und 90er Jahren v.a. in den Niederlanden, Italien, Schweden, Dänemark, Polen und Deutschland. In dieser Zeit erlangten u.a. „Carmen“ und „Mario“ eine Sortenzulassung¹⁰⁷.

Alle bis dato aktuellen europäischen Sorten und Neuzüchtungen, vier amerikanische Sorten und zwei osteuropäische Landsorten, wurden in den Jahren 1995 bis 1996 sowie 1997 bis 1999 in Deutschland auf ihre Sorteneigenschaften geprüft. Die Sorten „Carmen“ und „Mario“ können uneingeschränkt empfohlen werden, sie erreichten auf den untersuchten Standorten die besten Ergebnisse bezüglich Ertrag und Qualitätsparametern¹⁰⁸. Nach Recherche von MAKOWSKI UND TROEGEL, bestehen Aussichten auf weitere Züchtungsarbeiten in den USA, den Niederlanden und Italien. Auch in der Hybridzüchtung werden Perspektiven gesehen.

Drachenkopf

Zugelassene Sorten des Iberischen Drachenkopfs gibt es nicht. Einige Firmen, wie beispielsweise Dreschflegel-Saatgut, bieten Drachenkopfsamen an. Für den Versuchsanbau wurden Herkünfte aus Genbanken und botanischen Gärten verwendet und aussichtsreiche Formen entsprechend vermehrt. In den 1940er Jahren erreichte der Iberische Drachenkopf

¹⁰⁷ Heyland et al., 2006: K.-U. Heyland, H. Hanus, E. R. Keller, Handbuch des Pflanzenbaues 4, Ölfrüchte, Faserpflanzen, Arzneipflanzen und Sonderkulturen, Eugen Ullmer KG, Stuttgart, 2006

¹⁰⁸ Makowski und Troegel 2001: N. Makowski, T. Troegel, Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“, Krambe – eine alternative Sommerölfrucht, Landwirtschaftsverlag Münster 2001

10./11.09.2009: Alternative Brennstoffe in Wärmeerzeugungsanlagen bis 1 MW, Herausgeber TU Bergakademie Freiberg, Institut für Wärmetechnik und Thermodynamik

nahezu gleiche Korn- und Ölerträge wie Öllein, Sonnenblumen oder Raps. Während letztgenannte Pflanzen bis heute angebaut und intensiv züchterisch bearbeitet wurden, geriet der Drachenkopf in Deutschland nahezu in Vergessenheit und erfuhr keine züchterische Bearbeitung.

Das Ertragsvermögen wird von VETTER UND WURL¹⁰⁹ als hoch eingeschätzt. In Gefäßversuchen wurden unter Optimalbedingungen Erträge erreicht, die ca. 60 dt/ha entsprechen. Bislang lässt sich dieses biologische Ertragsvermögen in der landwirtschaftlichen Praxis günstigstenfalls zu 30 % ausschöpfen. Vor einer züchterischen Ertragserhöhung und Erhöhung des Fettgehaltes sollte eine Ertragsstabilisierung durch die Selektion krankheitsresistenter Formen geschehen.

Koriander

Koriander als Heil- und Gewürzpflanze erfuhr in der Vergangenheit wenig züchterische Bearbeitung. In der beschreibenden Sortenliste des Bundessortenamtes 2002 sind sechs Sorten aufgeführt.

Dennoch leidet der Koriander in Jahren ungünstiger Witterung unter dem Auftreten von Krankheiten, was zu erheblichen Ertragseinbußen führen kann.

Zuchtziele sind resistente Sorten sowie höhere Frucht- und Ölerträge.

Erucaraps

Die Züchtungsarbeiten und der -fortschritt des Erucarapses sind, wie im Raps generell, weit vorangeschritten. In Deutschland ist das Züchterhaus die Rapool-Ring GmbH führend. Aktuell sind für den Erucaraps eine Linien- und eine Hybridsorte im Angebot, die mit Erträgen knapp unter dem Durchschnittsertrag von 00-Sorten aufwarten.

3.3.4.2 Anbauumfang und -erfahrung

Der Drachenkopf kam von 1925 bis 1950 in der ehemaligen UdSSR auf mehr als 20.000 ha zum Anbau. Seit den 1990er Jahren wird er im Versuchsanbau der TLL auf verschiedenen Standorten bearbeitet und geprüft. Der Anbauumfang auf Praxisflächen ist zu vernachlässigen. Auch die Krambe wurde seit den 1990er Jahren vorwiegend in Versuchsanstalten kultiviert. Von der TLL regelmäßig auf die Anbaueigenschaften geprüft, kamen 1996 bis 1999 im Rahmen eines Modellvorhabens auf verschiedenen deutschlandweiten Standorten Krambesorten zum Einsatz. Die Anbauerfahrung beider Kulturen beschränkt sich auf die Feldversuche inklusive eines minimalen Praxisanbaus im Rahmen dieser Forschungstätigkeiten. Der Koriander wurde in Thüringen letztmalig im Jahr 2008 auf 1,3 ha angebaut. Bezüglich des aktuellen deutschlandweiten Anbaus konnten keine Zahlen ermittelt werden. Auf den Versuchsflächen der TLL erfährt er regelmäßig Kultivierung.

Der Anbauumfang und die -erfahrung sind im Vergleich zu den hier betrachteten Ölpflanzen beim Erucaraps am größten. Dieser wuchs in 2013 auf 25.000 ha im Vertragsanbau mit

¹⁰⁹ VETTER UND WURL 2000: A. Vetter, G. Wurl, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Erarbeitung von produktionstechnischen Grundlagen für den Anbau von Iberischem Drachenkopf (*Lallemantia iberica* Fisch. et Mey.) sowie Erueierung von Ausgangsmaterial für die weitere Züchtung: Abschlussbericht

überwiegenden Flächenanteilen in Brandenburg. Da das Produktionsverfahren identisch mit dem des 00-Rapses ist, können Landwirte auf einen reichen Erfahrungsschatz sowie sich fortlaufend weiterentwickelnde rapsspezifische agrotechnische und agrochemische Produkte des Pflanzenbaus zurückgreifen. Der Anbau von Erucaraps ist mit Blick auf die Anbaufläche zu befürworten.

Die vorwiegend in Brandenburg liegenden Anbauflächen können ausgeweitet werden. Zu beachten sind dabei die Einhaltung einer phytosanitär vertretbaren Konzentration an Kreuzblütlern in der Fruchtfolge sowie die Abstandsauflagen zu Rapsflächen anderen Genotyps.

Aber auch für die alternativen Ölpflanzen besteht bei einer kostendeckenden und wirtschaftlich nachhaltigen Erzeugerpreisgestaltung eine Anbauwürdigkeit auf dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik. Die Korn- und Ölerträge unterscheiden sich zum langjährig etablierten Winterraps zwar zum Teil erheblich, die Vorteile liegen bei den alternativen Ölpflanzen aber ganz klar im ökologischen Bereich.

3.3.4.3 Fruchtfolgewirkung

In Deutschland dominieren mit fast drei Viertel der Ackerfläche Getreidearten, dabei vorwiegend Winterformen, den Anbau. Hohe Konzentrationen einer Kultur oder einer Pflanzenfamilie in der Fruchtfolge bringen verschiedene phytosanitäre Nachteile mit sich, die zu Belastungen und Problemen des biotischen und abiotischen Ökosystems führen. Mit einer Auflockerung einseitiger Fruchtfolgen werden aus agronomischer Sicht pilzliche, viröse und bakterielle Infektionsketten unterbrochen sowie die Wirkung der Unkrautregulierung verbessert. Durch die damit einhergehende Reduktionsmöglichkeit des Pflanzenschutzmitteleinsatzes wird der partiell bereits bestehenden Resistenzbildung von Schaderregern und Beikräutern gegenüber bestimmten Wirkstoffen vorgebeugt bzw. wird diese Resistenzbildung nicht noch verstärkt. Weiterhin werden Pflanzenschutzmittelrückstände im Erntegut verhindert bzw. reduziert und Grund- und Oberflächenwasser vor Einträgen bewahrt bzw. auch diese reduziert. Eine ausgeglichene Fruchtfolge ist gekennzeichnet durch den Wechsel von Halm- und Blattfrucht, von Winterung und Sommerung sowie der Abfolge verschiedener Pflanzenarten und -familien.

Alle Ölpflanzen sind Blattfrüchte und bilden somit ein Pendant zu den vorherrschenden Halmfrüchten, den Getreidearten, was aus pflanzenbaulicher Sicht als sehr positiv zu werten ist. Durch die Reduktion der Kartoffel- und Rübenproduktion in Deutschland in den vergangenen Jahren sind die Ölfrüchte (vor allem Raps) vielerorts die verbleibenden Blattfrüchte geworden.

Einen weiteren Vorteil bringen die Sommerungen Iberischer Drachenkopf, Krambe und Koriander durch ihre kurze Vegetationszeit mit, die im Frühjahr beginnt und im Sommer endet, was einen geringeren Einsatz von Pflanzenschutzmitteln begründet. Aufgrund der bei den Getreidearten dominierenden Winterungen (überjährige Standzeit), dienen die Sommerkulturen als phytosanitäre Gesundungskulturen. Durch den veränderten Rhythmus von Vegetations- und Bodenbearbeitungszeit werden Krankheitsinfektionsketten unterbrochen und Schädlings- und Beikrautdruck reduziert. Gegebenenfalls könnten sie auch Raum für den Anbau von Winterzwischenfrüchten bieten.

Mit Iberischem Drachenkopf als Lippenblütler (Lamiaceae) und Koriander als Doldenblütler (Apiaceae) betreten neben zwei neuen Fruchtarten auch zwei neue Pflanzenfamilien das Feld, was in der Bewertung als besonders vorteilhaft wirkt. Den Anbaukonzentrationen beider Pflanzenfamilien fällt in Deutschland und Europa keine größere Bedeutung zu. Anteile von 33 % für Doldenblütler (2 Jahre Anbaupause) und 20 % für Lippenblütler (4 Jahre Anbaupause) in der Fruchtfolge sollten aber nicht überschritten werden.

Die beschriebenen Eigenschaften führen zu folgenden Ausprägungen im Bewertungsmodell, Parameter Fruchtfolge Wirkung:

- ++ Blattfrucht, neue Pflanzenfamilie, Sommerung
Blattfrucht
- + Raps: maximale Anbaukonzentration nicht flächendeckend erreicht
Krambe: neue Art in Pflanzenfamilie und Sommerung

3.3.4.4 Anbaukonzentration

Doldenblütlerarten, wie Fenchel, Kümmel, Petersilie oder Dill und die Lippenblütler, wie die verschiedenen Minzearten, gehören neben weiteren Pflanzenfamilien zu den Heil- und Gewürzpflanzen. Diese nahmen in Deutschland 2013 mit 12.200 ha¹¹⁰. 0,1 % der Ackerfläche ein. Einer Etablierung und Ausweitung von Drachenkopf und Koriander kann aus pflanzenbaulicher Sicht nur zugestimmt werden.

Die Krambe ist eine neue Pflanzenart, gehört aber, wie der Erucaraps, zu einer in Fruchtfolgen bereits etablierten Pflanzenfamilie, den Kreuzblütlern (Brassicaceae). Die Krambe sollte nicht in eine bereits von Kreuzblütlern, wie Raps oder Senf, durchgezogene Rotation aufgenommen werden, da Pflanzenbestände gleicher Mitglieder einer Pflanzenfamilie von den gleichen Krankheiten, Schädlingen und Beikräutern befallen werden können. Eine wirksame Durchwuchsregulierung wäre ebenfalls problematisch. Die Krambe erfährt hier jedoch eine positive Beurteilung, weil sie als Sommerung die damit verbundenen pflanzenbaulichen und phytosanitären Vorteile mitbringt sowie aufgrund ihrer ausgeprägten Trockentoleranz für Grenzstandorte geeignet ist. Sie stellt also eine Alternative zum Rapsanbau und keine Konkurrenz zu ihm auf von Frühjahrs- und Frühsommertrockenheit gefährdeten Flächen dar.

Der Erucaraps ist wie der 00-Raps aus acker- und pflanzenbaulicher Sicht als Winterraps zu betrachten. Der Anbauumfang des Winterrapses, als bedeutendstem Kreuzblütler und bedeutendster Ölpflanze in Deutschland, betrug 2013 1,43 Mio. ha, was 12 % der Ackerfläche ausmacht¹¹¹ und liegt damit noch unter der für einen nachhaltigen Rapsanbau ausgewiesenen Anbaukonzentration in der Fruchtfolge von 20 %¹¹². Da sich die Anbauwürdigkeit (Standorteignung) nicht auf die gesamte Ackerfläche der Bundesrepublik erstreckt, fallen aber regional Konzentrationen von bis zu 40 % an.

¹¹⁰ PROPLANTA 2013: Anbauflächen für Heil- und Gewürzpflanzen sollen wachsen http://www.proplanta.de/Agrar-Nachrichten/Pflanze/Anbauflaechen-fuer-Heil-und-Gewuerzpflanzen-sollen-wachsen_article1376987496.html
Zugriff: 12.09.2014

¹¹¹ DESTATIS 2013: Statistisches Bundesamt, Anbaustatistiken 2013, Winterraps https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/07/PD13_252_412.html
Zugriff 26.02.2014

¹¹² GRAF ET AL., 2008: Graf, Götz, Jentsch, Vetter, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft Merkblatt Fruchtfolgestellung von Winterraps <http://www.tll.de/ainfo/pdf/ffwr0408.pdf>
Zugriff: 11.09.2014

Bei Nichteinhaltung von Anbaupausen, also Anbauzyklen kleiner vier Jahren ist mit signifikanten Ertragsdepressionen, bedingt durch hohen Krankheits- und Schädlingsdruck, die auch durch verstärkten Pflanzenschutzmitteleinsatz wirtschaftlich nicht zu kompensieren sind, zu rechnen. Weiterhin akkumulieren Krankheiten und Schädlinge am Standort und beeinträchtigen über Jahre hinweg die Ertragsbildung der Feldfrüchte. Von einer Ausweitung der Winterrapskultivierung auf Flächen mit bereits hoher Anbaukonzentration ist daher abzuraten. Der konkrete Anbauumfang für Erucaraps liegt in Deutschland 2013 bei 25.000 ha im Vertragsanbau mit überwiegenden Flächenanteilen in Brandenburg.

Allen vier Kulturen ist eine gute Vorfruchtwirkung zuzuschreiben, da sie durch die Entwicklung der Blattmasse Nährstoffe binden, die nach der Ernte auf dem Feld verbleiben und der Folgekultur nach der Mineralisierung zur Verfügung stehen.

Die beschriebenen Eigenschaften führen zu folgenden Ausprägungen im Bewertungsmodell, Parameter Anbaukonzentration:

- ++ geringe Anbaukonzentration für die Kultur und Pflanzenfamilie
- + geringe Anbaukonzentration für die Kultur, Pflanzenfamilie in gängigen Fruchtfolgen etabliert
- Anbaukonzentrationen der Kultur regional überschritten
maximale Anbaukonzentration deutschlandweit aber noch nicht erreicht

3.3.4.5 Agrobiodiversität

Die Agrobiodiversität umfasst die Vielfalt innerhalb und zwischen den Arten sowie die Vielfalt der Ökosysteme, die für Ernährung-, Land-, Forst- und Fischereiwirtschaft genutzt werden bzw. nutzbar sind. Bezüglich einer vielfältigen und multifunktionalen Landwirtschaft ist der Anbau der hier betrachteten Kulturen sehr zu begrüßen und zu befürworten.

Wie bereits in „Fruchtfolgewirkung“ erläutert, stellen der Iberische Drachenkopf als Lippenblütler und Koriander als Doldenblütler zwei Fruchtarten und gleichzeitig Pflanzenfamilien dar, deren Anbaukonzentrationen in Deutschland und Europa sehr gering sind. Die Krambe stellt als neue Art innerhalb der Familie der Kreuzblütler ebenfalls eine Bereicherung des Artenspektrums dar. Der Erucaraps bringt innerhalb der von glucosinolat- und erucasäurearmen 00-Sorten dominierten Rapsformen, eine Bereicherung des Genpools innerhalb einer Art mit sich. Die Aufnahme der drei alternativen Ölpflanzen und Erucaraps in einen großflächigeren Anbau würde zu einer größeren Variabilität innerhalb und zwischen den Arten beitragen.

Neben der Nutzpflanze profitieren weitere Lebensformen von den unterschiedlichen Anbaubedingungen der einzelnen Hauptkulturen. Die 11-monatige Standzeit des Winterrapses bietet Klein- und Kleinstlebewesen ein Habitat. Die nach der Saat schnell geschlossene Pflanzendecke bietet Überwinterungsmöglichkeiten sowie Schutz vor Erosion durch starke Niederschläge oder Windereignisse. Das Auftreten von Beikräutern wird unterdrückt, Verdunstung minimiert und Stickstoffauswaschungen reduziert. Gegebenenfalls können die Sommerungen auch Möglichkeiten zur Einordnung von Zwischenfrüchten zum Erreichen der positiven Effekte einer andauernden Pflanzendecke auf biotische und abiotische Faktoren der Bodenfruchtbarkeit und Umweltgesundheit bieten. Das zügige Jugendwachstum von Drachenkopf, Krambe und Winterraps ermöglicht es den Pflanzen, schnell eine geschlossene Bodendeckung zu erreichen, die sich u. a. positiv auf den

Wasserhaushalt des Bodens, Erosion und Konkurrenzkraft gegenüber Beikräutern auswirkt. Bezüglich der Landschaftsvielfalt stellen gerade die Sommerungen eine optische Abwechslung zu den etablierten Feldfrüchten, durch unterschiedliche Wuchshöhen, Blütezeitpunkte und Blütenfarben, dar. Während die dunkelgrünen Stängel und Blätter des Winterrapses Höhen bis 200 cm erreichen, sind die Sommerungen kleineren Wuchses. Die Krambe wird bis 150 cm, der Koriander mit seinen hellgrünen Laubblättern bis 80 cm und der Drachenkopf bis 50 cm hoch. Der Verlust von Agrobiodiversität ist ein aktuelles und schleichendes Problem. In den vergangenen Jahrzehnten sind die Felder immer monotoner geworden. Das Spektrum der Kulturpflanzen ist stark reduziert, die Welternährung basiert heute auf wenigen Kulturpflanzenarten. Eine hohe Diversität in der Landwirtschaft stellt aber eine Absicherung gegen Missernten, Schädlings- und Krankheitsanfälligkeit dar. Häufig geht die Standardisierung im Pflanzenbau mit High-Input-Verfahren einher, die große Mengen an Energie, Dünge- und Pflanzenschutzmitteln erfordern. Grundwasserverschmutzungen, Rückstände in Lebensmitteln und eine Monotonisierung von Landschaften können ökologische Folgeerscheinungen sein.

Die beschriebenen Eigenschaften führen zu folgenden Ausprägungen im Bewertungsmodell, Parameter Agrobiodiversität:

- ++ Vegetationszeit (Bodenschutz, Faunahabitat, Zwischenfrüchte)
Aufnahme neuer Art (Krambe), neuer Familie (Drachenkopf, Koriander)
zum Teil zügige Jugendentwicklung (Raps, Drachenkopf, Krambe)
Landschaftsvielfalt

3.3.4.6 THG-Emissionen

Die wichtigsten anthropogenen Treibhausgase (THG) sind Kohlenstoffdioxid (CO₂), Methan, Distickstoffmonoxid bzw. Lachgas (N₂O) und die Halogenkohlenwasserstoffe.

Die Stickstoffdüngung einer Kultur hat einen entscheidenden Einfluss auf die ihr zuzurechnenden THG-Emissionen. So beträgt der Anteil der N-Düngung an den Gesamt-THG-Emissionen im Rapsanbau über 80 %. Zu 42 % fließen dabei die Emissionen der energieintensiven Stickstoffherstellung ein, zu 41 % die Lachgas-Emissionen, die bei der Produktion auf dem Feld entstehen (WEIRAUCH, 2014).

Sowohl für die Berechnung der THG-Emissionen der Stickstoffdüngerherstellung als auch der Lachgasemissionen auf dem Feld wurde der N-Entzug des Kornes als ausgebrachte Düngermenge unterstellt. Die Kornerträge und die Ölgehalte sind mit den Mittelwerten aus dem mehrjährigen Dornburger Anbau kalkuliert (siehe Flächeneffizienz (siehe Tabelle 31), Ertragsstabilität (siehe Tabelle 32)). Als spezifische Treibhausgaswerte werden die Emissionsfaktoren (Hintergrunddaten) zur Berechnung von Standardwerten nach der Erneuerbaren Energien Richtlinie 2009/28/EG von 6,41 kg CO₂-Äquiv./kg N-Dünger für die N-Dünger Herstellung und von 4,87 kg CO₂-Äquiv./kg N für die Feldemissionen bei der N-Düngung zugrunde gelegt. Die Summe der CO₂-Äquivalente aus Düngemittelherstellung und Feldemissionen während des Anbaus ergibt die Gesamt-THG-Emissionen je Hektar und Jahr (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: CO₂-Äquivalente bei der Stickstoffdüngerproduktion und den Feldemissionen (Koriander in Frühjahrs- und Herbstsaat, Kornentzüge, Alternative Ölpflanzen und Raps).

	Drachenkopf	Krambe	Koriander Herbst	Koriander Frühjahr	Erucaraps
Entzug Korn, kg/dt FM	3,0	3,4	2,1	2,1	3,4
kg CO ₂ -Äquiv./ha	637	929	676	435	1.929
kg CO ₂ -Äquiv./t Öl (dezent. Pressung)	1.385	2.323	1.649	1.611	1.206
kg CO ₂ -Äquiv./t Öl (zent. Pressung)	1.138	1.222	1.536	1.554	974

Der Koriander weist mit 2,1 kg den geringsten N-Entzug je Dezitonne Korn auf. Es folgen der Drachenkopf mit 3 kg und die Krambe und Erucaraps mit jeweils 3,4 kg. Entsprechend des hohen Kornertrages des Erucaraps, bei dessen Produktion die höchste N-Menge je Flächeneinheit zugeführt wird, resultiert diese Intensität mit 1.929 kg CO₂-Äquivalenten je Hektar in einen zwei bis viermal höheren THG-Ausstoß gegenüber den alternativen Ölpflanzen. Bezogen auf den stofflichen Output (Tonne Öl) drehen sich die Verhältnisse aufgrund der spezifischen Korn- und Ölerträge um. Für eine Tonne Erucarapsöl werden die niedrigsten CO₂-Äquivalente emittiert, gefolgt von Drachenkopföl, Koriander und Krambe. Bei zentraler Pressung verbessern sich durch die höheren Abpressgrade in der Ölmühle die CO₂-Emissionen der Öle. Für die Visualisierung wurden zwei Bezugsgrößen dargestellt. Zum einen die THG-Emissionen je Tonne Öl, wo sich der Raps durch den hohen Öloutput am günstigsten darstellt. Zum anderen den Bezug zur Fläche, in der die alternativen Ölpflanzen durch ihre geringere Bewirtschaftungsintensität den geringeren THG-Ausstoß bewirken.

Die beschriebenen Eigenschaften führen zu folgenden Ausprägungen im Bewertungsmodell, Parameter THG-Emissionen (Öl):

- ++ < 1.500 kg CO₂-Äquivalente je Tonne Öl (dezentrale Pressung)
- + 1.500 – 2.000 kg CO₂-Äquivalente je Tonne Öl (dezentrale Pressung)
- > 2.000 kg CO₂-Äquivalente je Tonne Öl (dezentrale Pressung)

Die beschriebenen Eigenschaften führen zu folgenden Ausprägungen im Bewertungsmodell, Parameter THG – Emissionen (Fläche):

- ++ < 1.000 kg CO₂-Äquivalente je Hektar
- + > 1.000 kg CO₂-Äquivalente je Hektar
- > 1.000 kg CO₂-Äquivalente je Hektar

3.3.4.7 Flächeneffizienz und Ertragsstabilität

Bezüglich der Flächeneffizienz und Ertragsstabilität liegen klare Vorteile beim Erucaraps. Laut Züchterhaus Rapool liegt der Ertrag der Erucarapshybride Eraton in der Praxis bei 45 dt/ha, wobei unter günstigen Standort- und Witterungsbedingungen Erträge von über 50 dt/ha erreichbar sind. In Winterrapsregionen ist auch bei ungünstiger Witterung mit stabilen Kornerträgen von über 25 dt/ha zu rechnen. Das hohe Ertragspotential des Winterrapses ist zum einen auf die lange Standzeit auf dem Feld zurückzuführen, zum anderen wird der Raps seit den 1950er Jahren züchterisch bearbeitet und dank seines gefächerten Einsatzspektrums in Human- und Tierernährung sowie im Energie- und

stofflichen Bereich voraussichtlich auch zukünftig viel Züchtungsarbeit erfahren. Die Sommerungen haben aufgrund ihrer Genetik und kürzeren Standzeit nicht das Potential für vergleichbare Erträge wie Winterraps. Die Durchschnittserträge des mehrjährigen Anbaus in Dornburg betragen für Iberischem Drachenkopf 17 dt/ha, Krambe 22 dt/ha, Koriander als Herbstaussaat 25,9 dt/ha und als Frühjahrssaat 16,7 dt/ha (siehe Tabelle 32).

Der Standort Dornburg gehört nach der bundesweiten Boden-Klimaraum-Einteilung in das Anbaugebiet „Löss-Standorte der Ackerebene“. In der Einteilung Thüringens ist Dornburg dem Agrargebiet 1, Erfurter Becken, zuzuordnen. Der Lössboden mit Bodenwertzahlen im Mittel von 65 und bei Jahresniederschlägen von 584 mm, ist Dornburg als guter bis besserer Standort zu bewerten. In einem 4 jährigen Modellvorhaben für Krambe (1996 bis 1999) betragen die Erträge im Mittel 15 dt/ha, die Versuchsstandorte erstreckten sich über Mecklenburg-Vorpommern, Nordrhein-Westfalen, Baden-Württemberg und Thüringen¹¹³.

Auch hinsichtlich des Ölertrages und des Ertrages der Fettsäure mit dem höchsten Gehaltsanteil am Ölertrag je Flächeneinheit, liegt der Erucaraps aufgrund hohen Kornertrages und Ölgehaltes weit vorne (siehe Tabelle 31). Im Vergleich der erucasäureliefernden Pflanzen übertrifft der Raps bezüglich Öl und Fettsäure je Hektar bei dezentraler Pressung die Krambe um das 2,6-fache und bei zentraler Pressung um das 3,8-fache. Grundsätzlich sind die Ölausbeuten in zentralen Ölmühlen höher als in dezentralen. Bei zentraler Pressung wurde mit den gemessenen Ölgehalten der Saat minus 1 %, bei dezentraler Kaltpressung mit den in Dornburg ermittelten Abpressgraden, die denen einer dezentralen Ölmühle entsprechen, kalkuliert. Die Ölerträge des Drachenkopfs liegen bei dezentraler Pressung über denen der Krambe. Bezüglich der Linolensäureausbeute kann der Drachenkopf nicht mit den hier betrachteten Kulturen verglichen werden, deshalb wird an dieser Stelle der Lein heran gezogen. Die Erträge an Linolensäure je Hektar liegen etwa gleich auf. Der Koriander erreicht in dezentralen Mühlen etwa die Ölmenge der Krambe. Der Petroselinensäureertrag kann hier nicht mit einer anderen Kultur verglichen werden, weil der Koriander als einzige Kulturart nennenswerte Gehalte dieser Fettsäure aufweist. In dezentraler Pressung können 230 kg Petroselinensäure je Hektar generiert werden.

¹¹³ MAKOWSKI UND TROEGEL 2001: N. Makowski, T. Troegel, Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“, Krambe – eine alternative Sommerölfrucht, Landwirtschaftsverlag Münster 2001

Tabelle 31: Ölerträge je Flächeneinheit (dezentrale und zentrale Pressung) und Ertrag der Fettsäure mit dem höchsten Gehaltsanteil am Ölertrag je Flächeneinheit (dezentrale und zentrale Pressung), Alternative Ölpflanzen und Raps, Koriander in Herbst- und Frühjahrssaat.

	n	TM-Ertrag dt/ha	Ölgehalt %	Ölertrag dezent. Pr. kg/ha	Ölertrag zentr. Pr. kg/ha	höchste FS im Öl %	FS-Ertrag dezent. Pr. kg/ha	FS-Ertrag zentr. Pr. kg/ha
Erucaraps	4	46	44	1.600	1.980	55	860	1.090
Krambe	6	21	37	400	760	55	220	420
Drachenkopf	17	17	34	460	560	60	280	340
Koriander He.	4	26	18	410	440	55	230	240
Koriander Fr.	8	17	18	270	280	55	150	160
Für einen Vergleich der Fettsäureerträge:								
Lein	-	15	40	530	590	55	290	320

Durchschnittserträge und Ölgehalte Dornburger Anbau: Krambe (1998, 2000, 2006, 2007, 2012, 2013), Koriander Herbstsaat (1999, 2000, 2003, 2004), Koriander Frühjahrssaat (1999, 2000, 2003 – 2006, 2012, 2013), Drachenkopf (1995-2009, 2012, 2013), Erucaraps (2006-2008, 2013), Lein (GRAF ET AL., 2005)

Bezüglich der Ertragsstabilität sind im mehrjährigen Anbau in Dornburg bei Drachenkopf, Krambe, Koriander, aber auch Erucaraps zum Teil erhebliche Streuungen um den Mittelwert zu verzeichnen (siehe Tabelle 32). Die Ausschläge in niedrige Ertragsbereiche sind bei allen Kulturen auf Jahre ungünstiger (feuchter, kühler) Witterung zurückzuführen, was den Krankheitsbefall beförderte. Von einem Auftreten dieser Bedingungen ist eher unregelmäßig auszugehen, sie müssen aber einkalkuliert werden. Bei den Sommerungen könnte Züchtungsarbeit bezüglich Krankheitsresistenz zukünftig für stabilere Erträge sorgen. Die Streuungen bei Winterraps fallen aufgrund des hohen Ertragsniveaus nicht so stark ins Gewicht wie bei den Sommerungen.

Tabelle 32: Durchschnittserträge und Ölgehalte im Dornburger Anbau sowie im Krambe Modellvorhaben (mit Standardabweichungen), Alternative Ölpflanzen und Raps.

	Drachenkopf	Krambe	Koriander Herbst	Koriander Frühjahr	Krambe Modellvorhaben	Erucaraps
n	17	6	4	8	4	4
TM Ertrag dt/ha	17,1 (5,8)	22,0 (6)	25,9 (7,1)	16,7 (5,5)	15,0 (5)	45,8 (9,6)
Ölgehalt, % TM	34,3 (3,5)	37,2 (2,3)	18,8 (0,7)	17,2 (3,2)	-	43,6 (3,7)

Drachenkopf (1995-2009, 2012, 2013), Krambe (1998, 2000, 2006, 2007, 2012, 2013), Koriander Herbstsaat (1999, 2000, 2003, 2004), Koriander Frühjahrssaatsaat (1999, 2000, 2003-2006, 2012, 2013), Krambe Modellvorhaben (1996-1999), Erucaraps (2006-2008, 2013)

Die Krambe ist hier ungeschält betrachtet worden, sowohl bei der Aussaat als auch bei der Pressung in der Ölmühle. In Dornburger Versuchen stieg der Ertrag bei Verwendung geschälten Saatgutes signifikant an. Bei gleicher Aussaatstärke erhöhte sich der Feldaufgang der Saat, was im Versuchsjahr 1998 mit 26,1 dt/ha im Vergleich zur Aussaat ungeschälten Saatgutes ein Mehrertrag von 3,5 dt generierte. Das Schälens des Erntegutes vor der Pressung generiert auch bezüglich der Ölausbeute höhere Mengen. 34 % Ölausbeute der geschälten Saat, im Vergleich zu 20 % bei ungeschälter, entspricht einer Steigerung des Ergebnisses um 70 %. Der Pressversuch wurde in Dornburg mit der Ölmühle der TLL, die der Technik einer dezentralen Pressung entspricht, durchgeführt.

Wie die Kornerträge unterliegen auch die Ölgehalte Streuungen. Im langjährigen Dornburger Anbau wurde im Mittel für den Drachenkopf ein Ölgehalt von 34,3 % erzielt, für die Krambe 37,2 %, für Koriander in Herbstaussaat 18,8 %, in Frühjahrsaussaat 17,2 % und für den Erucaraps 43,6 % (Tab. 21). In Jahren ungünstiger Witterung ist neben den Erträgen auch die Kornfüllung beeinflusst, welche sich in den Ölgehalten niederschlägt.

Die beschriebenen Eigenschaften führen zu folgenden Ausprägungen im Bewertungsmodell, Parameter Flächeneffizienz und Ertragsstabilität:

- + relativ stabiles Ertragsniveau, intensive züchterische Bearbeitung
Höchste Öl- und Fettsäureerträge je Flächeneinheit
- relativ unstabiles Ertragsniveau, keine/kaum züchterische Bearbeitung
Geringere Öl- und Fettsäureerträge je Flächeneinheit

3.3.4.8 Pflanzenschutzintensität

„Der Behandlungsindex (BI) dient als quantitatives Maß zur Beschreibung der Intensität des chemischen Pflanzenschutzes. Er stellt die Anzahl von Pflanzenschutzmittel-Anwendungen auf einer betrieblichen Fläche, in einer Kulturart oder in einem Betrieb dar. Dabei berücksichtigt er reduzierte Aufwandmengen und Teilflächenbehandlungen“ (BMEL 2014). Dieser rein quantitative Index trifft keine Aussage über die Toxizität der eingesetzten Wirkstoffe. Die drei Sommerungen schneiden in der Pflanzenschutzintensität nach dem Behandlungsindex besser als der Erucaraps (Winterraps) ab, wobei die Krambe die geringsten Mittelaufwendungen benötigt. Der BI errechnet sich aus dem Produkt, aus dem Aufwandmengkoeffizienten (Quotient aus tatsächlicher Aufwandmenge und der im Pflanzenschutzmittelverzeichnis angegebenen maximalen indikationsbezogenen Aufwandmenge) und dem Behandlungsfaktor (Anzahl der durchgeführten Pflanzenschutzmittelanwendungen, bezogen auf die jeweilige Anbaufläche). Die Summe dieser Teilindizes der durchgeführten Einzelanwendungen auf dem Schlag oder der Bewirtschaftungseinheit ergeben dann den jeweiligen Behandlungsindex für diese Fläche und Kultur.

Die beschriebenen Eigenschaften führen zu folgenden Ausprägungen im Bewertungsmodell, Parameter Pflanzenschutzintensität:

- ++ BI: 0 – 2 → Krambe 1,4
- + BI: 2 – 4 → Drachenkopf 2,35; Koriander 3,1
- BI: 4 – 6 → Winterraps (Erucaraps) 5,2
- BI: > 6

Erfahrungsgemäß ist das Auftreten von Schaderregern bei relativ neuen bzw. selten angebauten Kulturen anfangs gering, mit steigender Anbauintensität wächst auch der Krankheitsdruck und die Intensität des Pflanzenschutzmitteleinsatzes steigt.

3.3.4.9 Auskreuzung

Der Parameter Auskreuzung betrachtet die Option, dass eine gegenseitige Befruchtung mit anderen Kulturarten der eigenen Pflanzenfamilie stattfindet und die art- oder sortentypische Zusammensetzung des Fettsäuremusters durch den Austausch des Genmaterials verändert wird. Bei der Krambe ist keine Auskreuzung mit dem familiär verwandten Raps zu

befürchten. Zu Schlägen mit bspw. 00- oder HOLLI-Raps, die auch in der Nahrungsmittelproduktion Einsatz finden, sind beim Krambeanbau deshalb keine Abstandsaufgaben einzuhalten. Der Erucaraps kreuzt sich innerhalb der Art Raps mit anderen Sorten. Ein Mindestabstand von 300 m ist einzuhalten¹¹⁴. Aufgrund mangelnden Anbaus und dem Fehlen anderer Arten von Drachenkopf und Koriander kommt der Möglichkeit einer Auskreuzung keine praktische Bedeutung zu.

Die beschriebenen Eigenschaften führen zu folgenden Ausprägungen im Bewertungsmodell, Parameter Auskreuzung:

- + Auskreuzung (Änderung des Fettsäuremusters) zu Arten/Sorten mit relevantem Anbau findet nicht statt
- Auskreuzung (Änderung des Fettsäuremusters) zu Arten/Sorten mit relevantem Anbau findet statt

3.3.4.10 Insektenweide

Die Hauptblüte der betrachteten Kulturen erstreckt sich über vier Wochen, der kalendarische Beginn variiert je nach Witterungsverlauf des Jahres. Beginnend mit der hellgelben Blüte des Winterrapses (Erucaraps) ab spätestens Mai, folgen die drei Sommerungen, zeitlich verzögert, mit weißer Blütenfarbe ab Juni. Dadurch wird das Nahrungsangebot für die bestäubenden Insekten Biene, Hummel, Fliege, Schmetterling, Käfer u. a. verlängert. Die Nektar- und Pollenqualität sowohl der Winter- als auch der Sommerform des Rapses ist ausgezeichnet, ebenso der Nektarwert des Korianders¹¹⁵. Bei der Krambe wird in verschiedener Literatur von reichlich Honig absondernden Nektarien gesprochen, die stark von Bienen und Hummeln besucht werden¹¹⁶. Auch dem Iberischen Drachenkopf wird eine Attraktivität auf Insekten zugesprochen, die Hauptbefruchtung erfolgt durch Bienen oder Hummeln¹¹⁷. Da zur Ausschöpfung des vollen Ertragspotenzials die betrachteten Kulturen von der Fremdbestäubung durch Insekten profitieren, ist auf ihre Schonung bei der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln durch die gute fachliche Praxis und die Grundsätze des integrierten Pflanzenschutzes zu achten.

Die beschriebenen Eigenschaften führen zu folgenden Ausprägungen im Bewertungsmodell, Parameter Insektenweide:

- ++ hohe Pollen- und/oder Nektarqualität, von bestäubenden Insekten besucht
Sommerungen: Verlängerung der Blüentracht gegenüber Raps
- + hohe Pollen- und/oder Nektarqualität, von bestäubenden Insekten besucht
Raps: Einschränkung aufgrund hoher Pflanzenschutz-Intensität

¹¹⁴ RAPOOL 2014: Produktinformation: HOLLI-Raps öffnet neue Märkte! <https://www.dsv-saaten.de/export/sites/dsv-saaten.de/extras/dokumente/fachinfos/raps/holli-vistive-14-RZ.pdf> Zugriff 11.09.2014

¹¹⁵ PAN 2009: PAN Germany Pestizid Aktions-Netzwerk e.V., Pflanzen für Bestäuber, Nektar-/Pollenwert Raps und Koriander http://www.pan-germany.org/download/biodiversitaet/pflanzen_fuer_bestaeuber.pdf Zugriff 26.02.2014

¹¹⁶ SCHUSTER 1992: W. Schuster, Ölpflanzen in Europa, DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main, 1992

¹¹⁷ KRIST 2013: S. Krist, Lexikon der Fette und Öle, Springer Verlag 2013

http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-1005-8_86#page-1 Zugriff 27.02.2014

3.3.4.11 Trockentoleranz

Der Drachenkopf als transkaukasische Pflanze stellt keine besonderen Ansprüche an die Bodenbedingungen. Er ist jedoch wärmeliebend, gedeiht am besten in sonnigen Lagen und zeichnet sich durch eine hohe Trockentoleranz aus. Trotz trockenen Wetters ab Blühbeginn (Mitte Juni) bis zur Ernte (Anfang August) sind Erträge bis über 20 dt/ha zu erreichen. ION ET AL. sehen im Drachenkopf eine potenzielle Alternative zu den traditionellen, in ariden Gebieten angebauten Kulturen.

Von MAKOWSKI UND TRÖGEL¹¹⁸ wird in verschiedenen Veröffentlichungen auf die gute Trockentoleranz der Krambe hingewiesen. Nach Literaturrecherche und selbst durchgeführten Experimenten sehen sie die Krambe auf Standorten unter 500 mm Jahresniederschlag als anbauwürdig, wobei der Boden möglichst ein humoser sandiger Lehmboden mit guter Wasserführung sein sollte. Auf leichten Standorten mit Bodenwertzahlen um 30 sollte der Wasserbedarf durch Jahresniederschläge ab 600 mm oder durch hoch anstehendes Grundwasser abgedeckt werden. Auf trockenen und grundwasserfernen Sandböden wird keine Anbauberechtigung gesehen.

In dreijährigen Gefäßversuchen kompensierte die Krambe begrenzte Wasserverfügbarkeit vor der Blüte und erreichte die gleichen Erträge an Erucasäure wie bei einer kontinuierlichen Wasserversorgung, jedoch bei signifikant erhöhtem Wasserverbrauch nach der Blüte¹¹⁹.

Der Koriander ist für warme und trockene Lagen prädestiniert, der Anbau ist aber auch in feuchteren und kühleren Lagen möglich¹²⁰.

Der Raps verfügt über ein ausgeprägtes Feinwurzelsystem im Oberboden. Seine bis zu 1,80 m tief in den Boden reichende Pfahlwurzel transportiert Wasser und Nährstoffe aus tieferen Bodenschichten. Schwachstellen dieses „Hochleistungswurzelsystems“ sind ein hoher Energiebedarf der Feinwurzeln sowie die Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffmangel. Auf stark verdichteten Flächen ist die Penetrationskraft der Wurzel begrenzt und führt oft zu Verkrümmungen oder stärkerer Ausbildung von Seitenwurzeln.

Für Trockenstandorte ist der Winterraps weniger gut geeignet. Für ein hohes Ertragsniveau wird eine gute Wasserversorgung benötigt. Bei einem Anbau mit geringeren Niederschlagsmengen sollte vor allem zu kritischen Wachstumsphasen ausreichend Wasser zur Verfügung stehen, was die Zeitpunkte des Schossens und der Blüte umfasst (KWS 2013). Diese kritischen Phasen fallen in den Zeitraum Frühjahr und Frühsommer, die zunehmend von Trockenheit geprägt sind.

¹¹⁸ MAKOWSKI UND TROEGEL 2001: N. Makowski, T. Troegel, Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“, Krambe – eine alternative Sommeröfrucht, Landwirtschaftsverlag Münster 2001

¹¹⁹ Jakob et al., 1999: K. Jakob, A. Bramm, N. Ochrimenko, Institut für Pflanzenbau, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), „Einfluss der Wasser- und Stickstoffversorgung auf Ertrags- und Qualitätsparameter von Krambe“, Zeitschrift Pflanzenbauwissenschaften 1/1999, ISSN 1431-8857, Verlag Eugen Ullmer GmbH & Co., Stuttgart

¹²⁰ TLL 2008: Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Anbautelegramm Koriander <http://www.tll.de/ainfo/pdf/kori0208.pdf> Zugriff: 22.09.2014

Die beschriebenen Eigenschaften führen zu folgenden Ausprägungen im Bewertungsmodell, Parameter Trockentoleranz:

- ++ Ausgesprochene Trockentoleranz
- + Eingeschränkte Trockentoleranz

Beim Vergleich der ökologischen Indikatoren wird deutlich, dass es keine Kultur gibt, die alle Parameter optimal abdeckt. Die alternativen Ölpflanzen weisen jedoch die meisten Vorteile auf.

Die Vorteile der Sommerungen liegen in ihrer geringeren Anbauintensität, was dem Ökosystem Acker weniger Agrochemikalien und fossile Energie zuführt. Sie punkten mit geringen THG-Emissionen je Flächeneinheit und einer niedrigeren Pflanzenschutz-Intensität. Diese beiden Vorteile relativieren sich aber dahingehend, als dass sie aus dem geringen Ertragspotenzial der Kulturen resultieren. Bei Erhöhung des Ertragspotenzials erhöhen sich auch diese beiden Parameter. Im Interesse der Treibhausgas-minderung und der effizientesten Ausnutzung der begrenzt zur Verfügung stehenden Ackerfläche muss das Ziel darin bestehen, mit möglichst geringem Aufwand unter Beachtung aller ökologischen Prämissen einen hohen Output pro Flächeneinheit zu generieren.

Die nicht existierende Gefahr der Auskreuzung bei der Krambe, im Vergleich zum Erucaraps, schützt vor ungewollten Vermischungen und Verunreinigungen des Genoms der Rapssaat.

Positive Klassifizierungen erhielten alle Ölfrüchte in Bezug auf die Insektenweide und die Trockentoleranz, wobei den Sommerungen bei beiden Parametern besonders gute Eigenschaften zugesprochen werden.

Auch in Punkto Agrobiodiversität sowie Fruchtfolgewardung und Anbaukonzentration erfahren alle vier Früchte positive Bewertungen, mit der Einschränkung, dass im Raps kritische Mengenanteile in der Fruchtfolge nicht überschritten werden dürfen.

Der Erucaraps (Winterraps) ist die konkurrenzstärkste Frucht bei der Betrachtung der Erntemengen an Korn und Öl. Auch bei den THG-Emissionen je Einheit Öl schneidet er mit den günstigsten CO₂-Äquivalenten je Tonne Öl ab.

3.3.4.12 Diskussion der Flächenkonkurrenz zur Food- und Non-Foodproduktion

Im Mittelpunkt der Diskussion um Nutzungskonkurrenzen steht der Wettbewerb zwischen dem Anbau von Energiepflanzen und dem Anbau von Nahrungs- und Futtermittelpflanzen.

Es gibt verschiedene Standpunkte und diskutabile Ursachen, denen steigende Lebensmittel- bzw. Flächenpreise und daraus resultierende Hungerszenarien oder Unruhen zugeschrieben werden.

Als Triebfedern werden der Anbau von Energiepflanzen, ein ansteigender Fleischkonsum mit der zur Futtermittelproduktion benötigten Agrarfläche, ein steigendes Bevölkerungswachstum, Spekulationen auf Nahrungsmittel oder zeitweise steigende Erdölpreise mit Auswirkungen auf die Preise der Produktionsmittel beschrieben.

Ob regional eine Ausweitung der Anbaufläche von Pflanzen für die stoffliche Nutzung Vorteile generiert und ökologisch, ökonomisch und ethisch vertretbar ist, muss im Einzelfall geprüft werden.

In Deutschland wachsen nachwachsende Rohstoffe auf einem Fünftel der Ackerfläche, in 2013 auf 2,4 Mio. Hektar. Energiepflanzen nehmen dabei 88 % der Fläche ein, Pflanzen für die stoffliche Nutzung 12 %¹²¹. Der Selbstversorgungsgrad für Lebensmittel liegt in Deutschland über 100 %. Eine weitere Überproduktion ist mit voranschreitender Züchtung zu erwarten

3.3.5 Ökologische und ökonomische Betrachtung der Reststofföle (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)

3.3.5.1 Senföl

Verfügbarkeit, Preise in Deutschland und Europa

2012 betrug die Jahresproduktion von Senfsaat in Deutschland 10.500 t (FAOSTAT 2014 A). Zusätzlich wurden 37.369 t importiert, dabei sind die Hauptlieferanten die Ukraine, Kanada und die Niederlande¹²². Große europäische Produzenten waren 2012 weiterhin die Ukraine mit 30.980 t, die Tschechische Republik mit 15.466 t oder Frankreich mit 13.500 t. Ungarn, Rumänien, Litauen, Slowenien, Bulgarien und Dänemark produzierten im selben Jahr zusammen 11.036 t. Bei einem Ölgehalt von 30 % in der Saat beträgt das Senfölaufkommen (Anbau und Importe) in Deutschland 2012 14.361 t Senföl, Exportzahlen sind für 2012 nicht bekannt.

Nach Angaben von FAOSTAT (2014 B) wurden im Vorjahr in Deutschland 11.300 t Senfsaat angebaut und 50.430 t importiert. Abzüglich des Exportes von 20.478 t entspricht das einem Senfölaufkommen in Deutschland von 12.376 t¹²³. Die allgemeine Verfügbarkeit für Senfsaat bzw. –öl ist aufgrund der zahlreichen europäischen und weltweiten Produktionsländer sehr gut. Der Preis für Senföl beträgt 1 €/kg bei einer Mindestabnahme von 25 t¹²⁴.

Nachhaltigkeit und Vermeidung von Klimagasen

Bezüglich der ökologischen Nachhaltigkeit im Anbau gelten für den Senf als Sommerkultur die gleichen, wie im Kapitel „Ökologische Bewertung des Anbaus“ (siehe Abschnitt 3.3.4) herausgestellten, Vor- bzw. Nachteile der alternativen Ölpflanzen.

Die Anbaufläche ist für den Körnersenf in Deutschland nicht sehr bedeutend. Bei einer Produktion von 10.500 t in 2012 und Erträgen von 20 dt/ha entspräche das einer Anbaufläche von etwa 5.000 ha. Senf wird vorwiegend als Zwischenfrucht angebaut, wobei

¹²¹ FNR 2014: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe <http://www.fnr.de/presse/pressemitteilungen/aktuelle-mitteilungen/aktuelle-nachricht/article/anbau-nachwachsender-rohstoffe-2013-auf-2,4-millionen-hektar/> Zugriff: 17.10.2014

¹²² Kulinarica 2014: Verband der Hersteller Kulinarischer Lebensmittel e.V., Marktentwicklung Senf 2012

¹²³ FAOSTAT 2014 B: FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations, Statistical Databases & Data-sets, Trade, Imports/Exports, Countries by commodity, Mustard seed <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx> Zugriff: 15.10.2014

¹²⁴ ÖHLMÜHLE KROPPESTEDT 2014: Kroppenstedter Ölmühle Walter Döpelheuer GmbH, persönliches Gespräch, 15.10.2014

die Körner nicht zur Abreife kommen. Das Senfkorn weist während des Wachstums einen hohen N-Entzug von 5,08 kg je Dezentonne auf (DÜV 2012). Bei einem Durchschnittsertrag (Dornburg) von 23,7 dt/ha entspricht das 1.490 kg CO₂-Äquivalent je Flächeneinheit. Damit beträgt die Emission der Senfproduktion verglichen mit Drachenkopf, Krambe und Koriander im Mittel das Doppelte, gegenüber Erucaraps werden 20 % weniger emittiert.

Bei Betrachtung der CO₂-Äquivalente je Stoffeinheit schneidet der Senf aufgrund des hohen N-Entzugs am ungünstigsten ab. Sowohl bei dezentraler (2.525 kg CO₂-Äquiv.) als auch bei der zentralen (2.191 kg CO₂-Äquiv.) Pressung werden je Tonne Öl die höchsten Mengen an Treibhausgasen ausgestoßen. Die CO₂-Äquivalente der alternativen Ölpflanzen und Erucaraps je Hektar und je Tonne Öl sind in Kapitel 3.3.4 Ökologische Bewertung des Anbaus, THG-Emissionen, dargestellt.

Ein Vergleich der erucasäureliefernden Pflanzen zeigt den Erucaraps hinsichtlich des Fettsäureertrages je Hektar ganz klar im Vorteil (siehe Tabelle 33). In dezentraler Pressung liefert er die 3,7-fache Menge Erucasäure je Flächeneinheit verglichen mit Krambe und Senf. Würde das Öl in einer zentralen Mühle gepresst, liefert die Krambe höhere Erucasäureerträge als der Senf, Erucaraps liegt weiter vorn.

Tabelle 33: Durchschnittserträge und Ölgehalte im Dornburger Anbau, Öl- und Erucasäureerträge je Flächeneinheit, Raps, Krambe und Senf.

	Ertrag dt/ha	Ölgehalt %	Ölertrag dezent. Pr. kg/ha	Ölertrag zent. Pr. kg/ha	höchste FS im Öl %	FS-Ertrag dezent. Pr. kg/ha	FS-Ertrag zent. Pr. kg/ha
Erucaraps	46	44	1.600	1.980	55	860	1.090
Krambe	21	37	400	760	55	220	420
Senf	24	30	590	680	40	240	270

Senf (Gelbsenf) n=11 (1998, 1999, 2001 - 2005, 2008 - 2011)

3.3.5.2 Gegenüberstellung mit vergleichbaren Ölen aus dem Anbau

Der Marktpreis des Senföls von 1 €/kg (entspricht 1,09 €/L) liegt mit Abstand unter den hier kalkulierten Ölmindestpreisen für Drachenkopf, Krambe und Koriander.

3.3.6 Zusatzinformation: Weitere Rapsorten mit veränderten Fettsäuremusters (TLL, Projektphase 2, 2012-2014)

HOLLI-Raps

HOLLI- oder Visitive-Rapsorten weisen bis zu 77 % Ölsäure im Öl auf. Die aktuelle Anbaufläche in Europa beträgt etwa 40.000 ha, in Deutschland 1.500 bis 2.000 ha.

Werden zur deutschen Anbaufläche die eingeführten Importe aus England addiert und auf die Fläche umgerechnet, läge die Anbaufläche für den deutschlandweiten Bedarf bei rund 5.000 ha. In Deutschland sind Winterformen zugelassen, in Kanada und Russland werden auch Sommerformen angebaut.

Laurinraps

Der von der Firma Calgene (inzwischen von Monsanto übernommen) Mitte der 1990er Jahre gentechnisch gezüchtete Raps enthält über 40 % Laurinsäure. Ein eingeschränkter Probeanbau dieser Sommerrapssorte fand in Kanada statt, konnte ertraglich aber nicht mit konventionellen Sommerrapssorten mithalten.

Aufgrund der preiswerteren Verfügbarkeit von herkömmlichen laurinreichen Ölen wie Palm- und Kokosöl stellte sich der Laurinraps als nicht wettbewerbsfähig dar. Hemmnisse für eine europäische Ausweitung des Anbaus waren der geringere Ertrag der Sommerform gegenüber Winterrapssorten sowie eine mangelnde Akzeptanz gegenüber transgenen Kulturen. Ende der 1990er Jahre wurde das Laurinrapsprojekt eingestellt.

3.4 Chemokatalyse (Umicore, Fraunhofer ICT, Taminco, DHW)

In dem Verbundprojekt sollten sowohl chemische als auch biologische Katalyseverfahren parallel betrachtet werden. Im Bereich der Chemokatalyse wurde der Fokus auf der „Chemischen Epoxidierung“ (3.4.2), der „Chemischen Fettspaltung und Umesterung“ (3.4.3), der „Hydrierung von Fettsäurederivaten“ (3.4.4), dem „Screening, Untersuchung, verfahrenstechnische Optimierung und Hochskalierung der Metathese von Fettsäuren und -estern“ (0), und auf die „Herstellung stickstoffhaltiger Verbindungen auf Glycerol-Basis“ (3.4.6) gelegt. Effiziente Katalysatorsysteme wurden hierfür identifiziert und optimiert (3.4.1).

3.4.1 Herstellung chemischer Katalysatoren (Umicore, Taminco, Fraunhofer ICT)

Im Bereich der Chemokatalyse sollten effizientere Katalysatorsysteme für die reduktive Aminierung sowie Metathese durch Umicore entwickelt und durch die Partner Taminco und Fraunhofer ICT getestet werden. Ziel war es, Katalysatorsysteme mit hoher Selektivität, Stabilität (turn-over-number) und Raum-Zeit-Ausbeute zu entwickeln. Es wurden Katalysatoren zur Metathese und für die Synthese stickstoffhaltiger Verbindungen weiterentwickelt.

3.4.1.1 Screening und Entwicklung von chemischen Katalysatoren zur Metathese von Fettsäuren und -estern (Umicore, Fraunhofer ICT)

Für die vorgesehenen Metathesereaktionen sollten zunächst verschiedene Katalysatorsysteme definiert werden, die dann in der anvisierten Kreuzmetathesereaktion am Fraunhofer ICT getestet werden sollten. Im Hinblick auf die bei Umicore verfügbaren Katalysatorsysteme wurde eine Einschränkung auf das Metall Ruthenium vorgenommen (weitere mögliche Katalysatormetalle für die Metathese sind z.B. Mo, W, Re).

Als Benchmark-Katalysator für die Zielreaktion wurde hierbei ein sogenannter 2nd-Generation Ruthenium-Katalysator folgender Struktur gewählt:

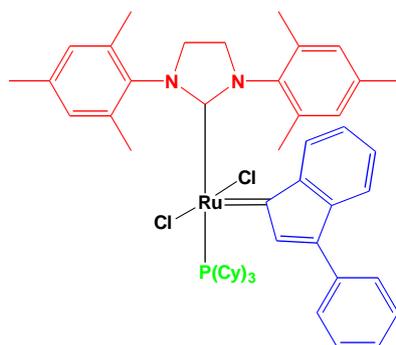


Abbildung 22: Umicore M2, Benchmark-Katalysator.

Durch die strukturelle Vorgabe dieses Katalysatorsystems und dessen markanten Strukturmerkmal (rot), der N-heterocyclischen Carbeneinheit, wurde beschlossen, die Variation der zu testenden Systeme an anderer Stelle (als der Carbeneinheit) der Katalysatorstruktur vorzunehmen. Daraus ergaben sich zu testende Systeme, deren Variationen zum Umicore M2 Katalysator dahingehend sind, dass sowohl die Phosphingruppierung (grün) als auch die Indenylidengruppierung (blau) verändert wurden.

Katalysatoren, die diese Vorgabe erfüllen, wurden wie folgt definiert, hergestellt und durch Fraunhofer ICT getestet:

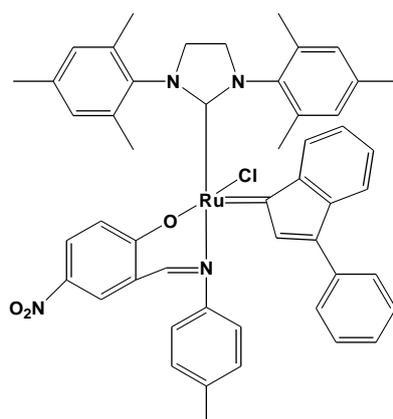


Abbildung 23: Umicore M41.

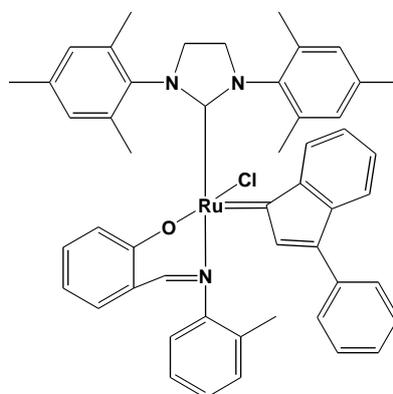


Abbildung 24: Umicore M42.

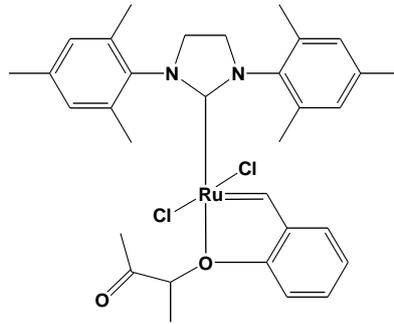


Abbildung 25: Umicore M51.

Es zeigte sich, dass all diese Systeme bisher im Vergleich zum Benchmark-Katalysator Umicore M2 unzureichende Aktivität aufwiesen. Im Falle der Serie Umicore M4 (41 und 42) wurden zudem neue Patente veröffentlicht, die die Verwendung dieser Systeme für die anvisierte Reaktion schwierig gestalten könnten [WO2010020368A11].

Im Fokus der Arbeiten standen also weitere alternative Systeme, zu diesem Zweck wurden dem Fraunhofer ICT entsprechend weitere Katalysatorsysteme zur Verfügung gestellt, die Umicore M7-Serie:

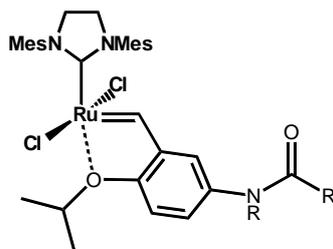


Abbildung 26: Umicore M7-Serie.

Zudem wurden weitere Entwicklungen zur Gewährleistung der Reinheit der End-Katalysatoren durchgeführt. Hierbei ist zu bemerken, dass diese Reinheit unmittelbar auch die Aktivität und ggf. Selektivität der Katalysatoren stark beeinflussen kann.

Die Synthese der Katalysatoren ist hierbei schematisch in einem retro-synthetischen Schema wie folgt zu beschreiben:

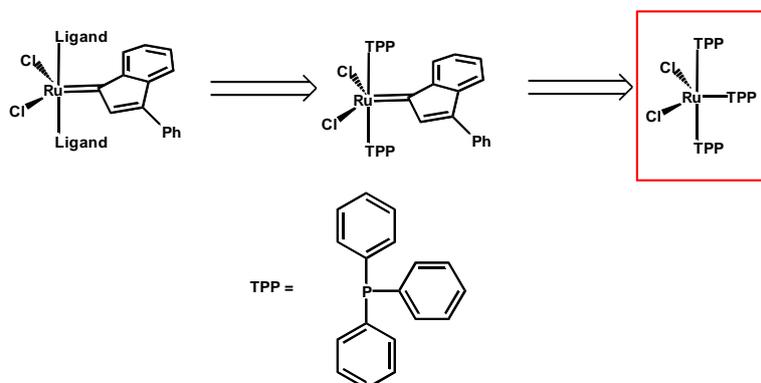


Abbildung 27: Schema der Synthese der Katalysatoren.

In diesem Schema ist zu erkennen, dass die Katalysatoren bisher aus seiner zentralen Vorstufe hergestellt werden: $\text{Ru}(\text{TPP})_3\text{Cl}_2$.

In der Synthese zu diesem zentralen Intermediat trat bisher eine nicht zu vermeidende Verunreinigung auf, die sich in den weiteren Synthesen bis hin zu den Endprodukten durchschleppte:

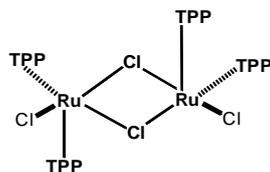


Abbildung 28: Zentrales Intermediat während der Synthese des Endproduktes.

Mit einer erfolgreichen Untersuchung dieses Effekts (u. a. durch Tieftemperatur-NMR) und einer umfangreichen Optimierung der Synthese gelang es die Synthese derart umzustellen, dass diese Verunreinigung nicht mehr auftritt. Schematisch ist die neue gefundene Synthese wie folgt dargestellt und kann für die Synthese der Nachfolgestufen (Endkatalysatoren) eingesetzt werden:

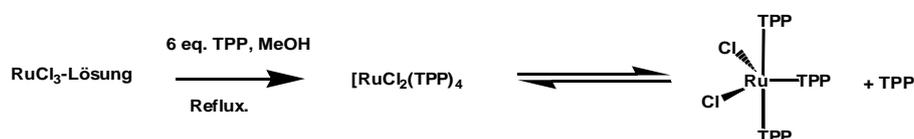


Abbildung 29: Schema der neuen Syntheseroute hin zur Katalysatorzwischenstufe.

Diese gefundene Synthese wurde vom Labormaßstab in den Pilotmaßstab skaliert und sichert somit die industrielle Synthesekette zur Herstellung multipler Metathese-katalysatorstrukturen.

3.4.1.2 Screening von Katalysatoren zur Optimierung der Hydroaminierung zur Herstellung von Diaminen aus α,ω -Hydroxycarbonsäuren und -estern (Umicore, Taminco, Fraunhofer ICT)

Des Weiteren wurden verschiedene Synthesestrategien nach eingehender Literaturrecherche (Umicore, Taminco, Fraunhofer ICT) ausgewählt, diskutiert und geplant. In Zusammenarbeit mit den Partnern Taminco und Fraunhofer ICT erfolgte eine erste Katalysatorauswahl zur Testung in Reaktionen zur Herstellung von Aminen. Nachfolgend ist eine Liste der bisher synthetisierten und getesteten Katalysatoren (CAS-Nummern und Umicore-Produkt-nummern) aufgeführt:

- Ru(acac)₃ - 14284-93-6 – 68.1874.1425
- Ru(TPP)₄Cl₂ - 15529-49-4 – 68.1874.6208
- Ru(0)(benzene)(1,3-hexadiene) – 68.1874.6430
- Ir-Cp*-Cl₂ – 68.1854.3449
- Ir-Cp*-I₂ – 68.1854.3533
- Ir(acac)₃ – 68.1854.1739
- Tris-triphenylphosphin-hydrido-carbonyl-Ru(II)-chlorid – 16971-33-8 – 68.1874.6311
- [Rh-COD-Cl]₂ - 35138-22-8 – 68.1864.3041
- [Rh-NBD-Cl]₂ - 12257-42-0 – 68.1864.3145

Aufbauend auf den erzielten Ergebnissen zu homogen metallkatalysierten Transformationen von Produkten der Metathese zu höherwertigen Substanzklassen (z.B. Aminderivate), wurden diese Synthesen weiter evaluiert und untersucht (Untersuchungen durch Taminco und Fraunhofer ICT). Diese grundlegenden Untersuchungen bedingten ein umfangreiches Katalysator-Screening, so dass eine breite Palette von weiteren Katalysatorvorstufen zur Verfügung gestellt wurde (siehe Tabelle 34). Die adressierten Metallkomplexe basieren hierbei zunächst auf den Metallen Pd, Rh, Ir und Ru, die Umicore unterstützend zur Verfügung stellte. Den Partnern wurden hierzu unterschiedliche Komplexe zur Verfügung gestellt:

Tabelle 34: Bereitgestellte Katalysatoren zur Herstellung von Aminen.

Katalysator	CAS-Nr.
Di- μ -chlor-bis(n-1,5-cyclooctadien)dirhodium(I)	603-35-0
Dichlorotris(triphenylphosphan)ruthenium(II)	15529-49-4
Tris(acetylacetonato)iridium(III)	63995-70-0
Chiralyst P 797	12354-84-6
Chiralyst P 1163	33040-12-9
[Dichloro-bis-(2,2,1-bicyclohepta-2,5-dien)-dirhodium]	12257-42-0
[Tris(acetylacetonato)ruthenium(III)]	14284-93-6

Im Laufe der Arbeiten am Fraunhofer ICT ergab sich aufgrund geringer Erfolge in Bezug auf die bisher getesteten Metallkomplexe der Bedarf an Cobalt-Katalysatoren für die Untersuchung zu neuen Aminierungskatalysatoren.

Hierbei wurde im speziellen an völlig neue, dort bisher nicht verwendete Katalysatoren gedacht wie Dicarboxylcyclopentadienylcobalt(I):

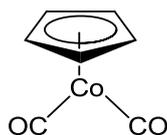


Abbildung 30: Strukturen von Dicarboxylcyclopentadienylcobalt(I).

Dieser Katalysatortyp wurde im Rahmen der weiteren Arbeiten bei Umicore industriell skaliert, d.h. synthetisch optimiert, so dass dieser in größeren Mengen zur Verfügung gestellt werden konnte

Neben anfänglichen Evaluierungsreaktionen zur Herstellung des Komplexes (unter FKZ 22017808) standen für den Komplex Dicarboxylcyclopentadienylcobalt(I) auch weitere destillative Optimierungsarbeiten an, die zum Ziel hatten, das aktuelle Produkt von Verunreinigungen zu befreien.

Im Rahmen dieser Aufreinigungsarbeiten wurde es möglich, das Produkt mit einer Reinheit >99% herzustellen.

3.4.2 Chemische Epoxidierung (Dracosa, Hobum, Fraunhofer ICT)

3.4.2.1 Chemische Epoxidierung von Metathese-Produkten (Fraunhofer ICT)

Am Fraunhofer ICT wurden Arbeiten zur Epoxidierung von Metathese-Produkten durchgeführt. Im ersten Schritt wurden dabei verschiedene Methoden der Epoxidierung anhand der Modellverbindung Ölsäuremethylester untersucht und miteinander verglichen. Im zweiten Schritt erfolgte eine Übertragung der Ergebnisse auf die beiden Metatheseprodukte 9-Octadecen und 9-Octadecen-1,18-dimethylester.

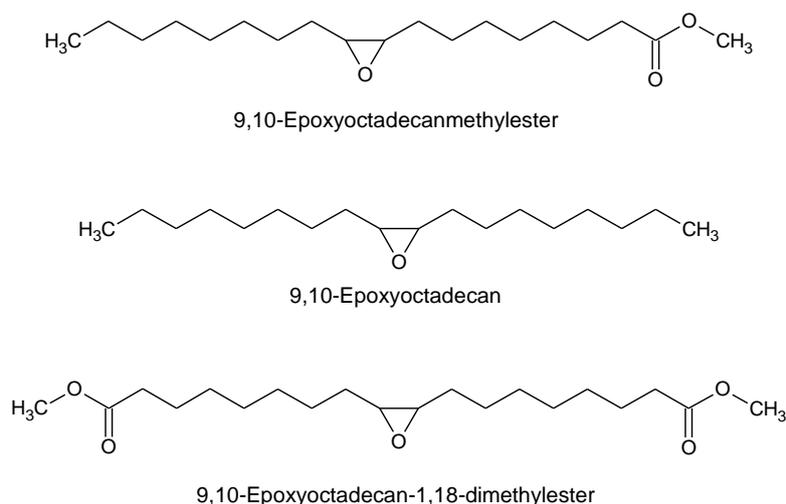


Abbildung 31: Zielstrukturen der Epoxidierung.

Die Darstellung erfolgte dabei über die Prileschajew-Epoxidierung unter Verwendung von meta-Chlorperbenzoesäure oder unter Verwendung von Ameisen- und Essigsäure unter in-situ Bildung der reaktiven Persäuren mit Wasserstoffperoxid. Weiterhin erfolgten Versuche unter Rutheniumkatalyse, sowie unter Verwendung von Methyltrioxorhenium.

Bei den Versuchen mit Methyloleat zeigte die Verwendung von Perameisensäure, sowie Methyltrioxorhenium die höchsten Umsätze im Bereich von bis zu 79 %. Die Versuche unter Katalyse mit Ruthenium lieferten nahezu keinen Umsatz. Es erfolgte aufbauend auf den erzielten Ergebnissen eine Übertragung der Methyltrioxorhenium katalysierten Reaktion auf die neuartigen Edukte Octadecen und den Dimethylester. Hierbei wurden für beide Edukte hohe Umsätze beobachtet, es trat jedoch bei allen Versuchen stets auch eine teilweise Weiterreaktion zum vicinalen Diol auf.

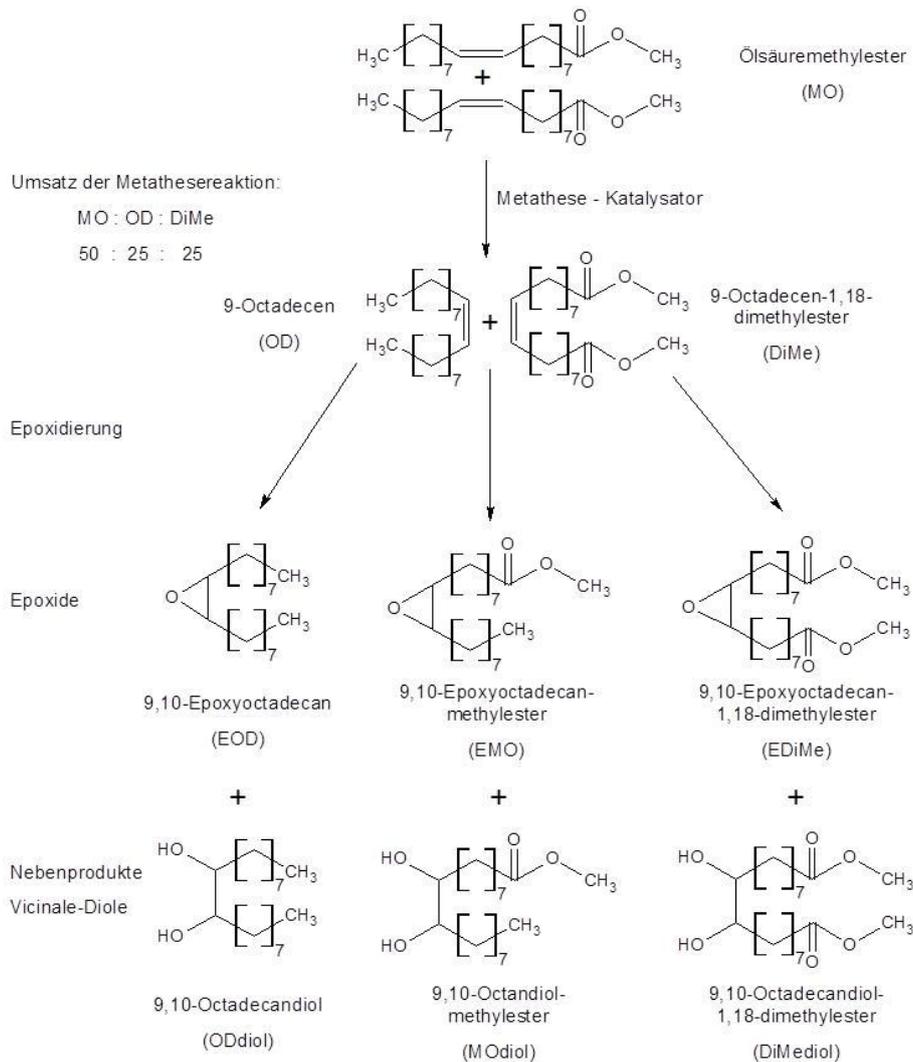


Abbildung 32: Darstellung der Metathesereaktion und der gebildeten Produkte im Überblick.

Nichtsdestotrotz konnte erfolgreich die Machbarkeit der Epoxidierung der Metatheseprodukte demonstriert werden.

3.4.2.2 Chemische Epoxidierung von Leinöl- und Drachenkopfmethylester (Dracosa)

Von der Dracosa AG wurden Leinöl bzw. Leinölmethylester als Ausgangsstoffe für die Synthesen Pflanzenöl-basierter Epoxide verwendet. Bei der Epoxidierung von Leinölmethylester entstehen nach dem von der Dracosa AG verwendeten Batch-Verfahren zur Epoxidierung neben den epoxidierten Fettsäuremethylestern eine Reihe unterschiedlicher Polyhydroxide (Abbildung 33).

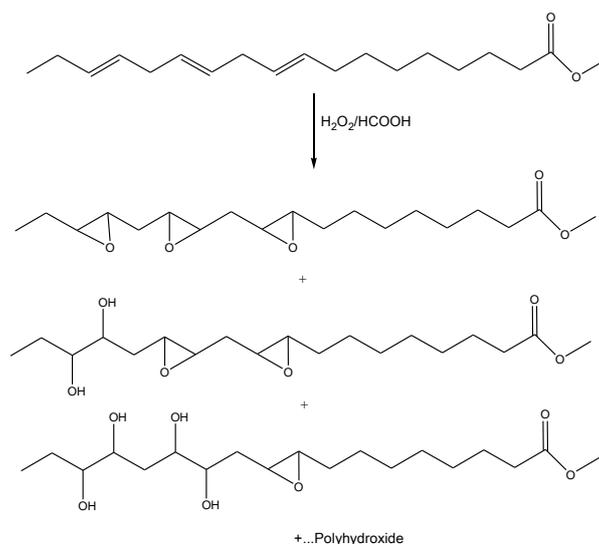


Abbildung 33: Syntheseprodukte vom Leinölmethylester am Beispiel der Linolensäure.

Unterschiedliche Reaktionsführungen erlauben es, das Verhältnis der Reaktionsprodukte zu steuern. Im Rahmen des Projekts wurden eingehende Untersuchungen über die Möglichkeiten der Einflussnahme auf das Verhältnis von Epoxid (EO) zu Polyhydroxid (PH) vorgenommen. Tabelle 35 zeigt die Änderungen der Reaktionsparameter und deren Einfluss auf die Produktzusammensetzung.

Tabelle 35: Auswahl an Reaktionen zur Untersuchung des Einflusses der Reaktionsparameter bei der Epoxidierung von Leinölmethylester.

Probe	RZ [min]	T [°C]	WPO [%]	AMS [%]	EO [%] (IZ)	PH [%]
M95	240	60	100	100	25 (9,2)	75
M96	240	60	100	78	98 (31,5)	2
M97	240	58	100	100	83 (25,7)	17
M99	240	60	113	78	95 (50)	5
M102	200	60	113	100	86 (18,9)	14
M104	200	60	120	105	74 (31)	26
M106	200	60	113	100	70 (31,6)	30

RZ = Reaktionszeit, WPO = Wasserstoffperoxid, AMS = Ameisensäure, EO = Epoxidsauerstoffausbeute, IZ = Iodzahl, PH = Polyhydroxid

Für die Beurteilung der Qualität der Epoxidierungsreaktion spielten die Ausbeute an Epoxid und die Iodzahl eine Rolle. Erste Versuche mit Drachenkopfmethylester zeigten ein sehr ähnliches Verhalten der Produktzusammensetzung in Abhängigkeit der Reaktionsparameter. Im Gegensatz dazu konnten die Epoxidierungen der Fettsäuremethylester von Sonnenblumenöl, High Oleic Sonnenblumenöl und Rapsöl gemäß Standardbedingungen hergestellt werden, ohne dass dabei Mengen >1 % Polyhydroxidverbindungen entstanden.

Für die Epoxidierungen von Fettsäuremethylestern (Rapsölmethylester, Senfölmethylester, Sonnenblumenmethylester) mit Anfangsiodzahlen bis zu 130 konnten ebenfalls standardisierte Methoden zur Epoxidierung verwendet werden, die Produktiodzahlen bis unter 5 erlaubt, ohne dass gleichzeitig die Bildung von Polyhydroxidverbindungen beobachtet werden konnte.

Für die Epoxidierung von Leinölmethylester und Drachenkopfmethylester zeigte sich, dass die Reaktionsparameter von entscheidender Bedeutung für die Ausbeute an Epoxid und die entsprechende Iodzahl sind. Hinsichtlich der Idealbedingung für eine maximale Ausbeute an EO bei einer gleichzeitig möglichst niedrigen Iodzahl konnte festgestellt werden, dass alle Reaktionsparameter einen Einfluss auf das EO:PH Verhältnis hatten:

- je höher die Temperatur desto höher der PH-Anteil (Temp. muss über 58 °C liegen und darf nicht über 65 °C steigen, da sonst die Gefahr einer unkontrollierten Reaktion besteht)
- je länger die Reaktionszeit desto höher der PH-Anteil
- je mehr H₂O₂ oder AMS desto höher der PH-Anteil
- je weniger AMS, desto niedriger Iodzahl des Eos

3.4.2.3 Chemische Epoxidierung von Drachenkopf-, Senf-, Holunderkern-, Krambe-, Tall- und Leinöl (Dracosa)

Um das Eigenschaftsprofil (z.B. hinsichtlich Viskosität, Stockpunkt, Flammpunkt, Iodzahl, OH-Zahl, Säurezahl) der Schmierstoffe der Firma Addinol zu erreichen, wurden verschiedene Epoxidierungen von Drachenkopföl, Leinöl, raffiniertem Lackleinöl und Leinöl/Leinölmethylestergemischen durchgeführt. Dabei wurde versucht, die Epoxidierungsbedingungen so einzustellen, dass durch den entsprechenden Epoxidierungsprozess Produkte generiert wurden, die den Vorgaben durch die Firma Addinol möglichst entsprechen. Um den Epoxidierungsgrad zu steuern, wurde nur der Parameter Reaktionszeit entsprechend eingestellt.

Tabelle 36: Auswahl der hergestellten Epoxide für den Einsatz als Schmierstoffe beim Projektpartner Addinol.

Probe	Ausgangsstoff	RZ [min]	IZ	Visk (40°C)[cSt]
BH120	DK-Öl	180	14,9	384
BH121	DK-Öl	150	29,7	204
BH124	Senföl	210	3,6	124
BH119	Leinöl	170	8,6	148
BH116	Leinöl/LMe	120	7,5	230

Durch Variation der Reaktionszeit und der eingesetzten Öle bzw. Öl/Fettsäuremethylestergemische gelang eine Einstellung verschiedener Parameter. Um den gesamten Zusammenhang zwischen der Reaktionszeit, den Startverbindungen und den erhaltenen Werten der Produkte zu verifizieren, bedarf es an dieser Stelle eingehender Untersuchungen. Insbesondere muss der Einfluss der Maßstabsvergrößerung auf die Produkteigenschaften untersucht werden.

Zur Bestimmung geeigneter Reaktionsbedingungen wurden Studien zur Epoxidierung von Drachenkopföl und Holunderkernöl durchgeführt. Im Fokus stand dabei das Erreichen einer möglichst vollständigen Epoxidierung bei gleichzeitiger Verhinderung der Bildung von OH-Gruppen durch säurekatalysierte Ringöffnungsreaktionen während der Epoxidierungsreaktion. Hintergrund dafür ist einerseits, dass die Reaktivität der Epoxide bei der Herstellung von Materialien mit diesen epoxidierten Pflanzenölen umso größer ist, je mehr

Epoxygruppen die Verbindung besitzt. Des Weiteren steigt durch die Anwesenheit der OH-Gruppen in den Verbindungen die Viskosität stark an, was sich für die meisten Anwendungen negativ auf die Handhabung auswirkt.

Die Epoxidierungsreaktionen von Drachenkopföl und Holunderkernöl wurden erst im Labormaßstab durchgeführt und in der Folge eine Maßstabsvergrößerung auf eine Technikumsanlage (200 L Reaktor) untersucht. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Reaktionsparameter verändert und der Einfluss dieser Veränderungen auf die Produktzusammensetzung analysiert, um die optimalen Reaktionsbedingungen festzulegen.

Weiterhin wurden im Labormaßstab Epoxidierungsreaktionen von Krambe-, Senf- und Tallöl durchgeführt und die Produkte charakterisiert.

Epoxidierung von Drachenkopföl

Parameter, die variiert werden können, sind die Reaktionszeit, die Zugabemengen von Ameisensäure und Wasserstoffperoxid, die Reaktionstemperatur und die Bedingungen der Aufarbeitung, bzw. der pH-Wert der Waschlösung. Für das Drachenkopföl wurden 70 L Pflanzenöl, 30 % H₂O₂-Lösung und konzentrierte Ameisensäure eingesetzt. Die Reaktionstemperatur wurde im Bereich < 65 °C gehalten. Veränderungen wurden hier vor allem bei der Aufarbeitung durchgeführt, da die Standardreaktionsbedingungen sich als geeignet für das Drachenkopföl gezeigt haben.

Tabelle 37: Ausgewählte Epoxidierungsreaktionen von Drachenkopföl (IZ = 200 g Jod/100g, SZ = 6,6 mg KOH / g, POZ = 0, Dichte = 0,927 g / cm³).

Einsatzstoff	Zeit [min]	IZ	OH	Analysenwerte H ₂ O	SZ	Visk.	Dichte	FZ
Drachenkopföl Laboransatz	240	4,3	19	0,08	2,4	497	-	1
Drachenkopföl Technikum (70 kg)	270	2,3	0	0,03	0,6	354	1,04	1

IZ = Iodzahl, OH = Hydroxylzahl, SZ = Säurezahl, FZ = Farbzahl

Die Tabelle 37 zeigt einen Vergleich der Reaktion im Labormaßstab und im Technikumsmaßstab. Dabei zeigt sich, dass bei der Maßstabsvergrößerung etwas längere Fahrzeiten nötig sind, um ein Produkt gleicher Qualität zu erhalten, gleichzeitig werden weniger Oxiranringe während der Epoxidierungsreaktion geöffnet und bilden OH-Gruppen aus.

Bei der Aufbereitung wurden unterschiedliche Mengen an 0,5 % Kalilauge als Waschlösung verwendet. Dabei wurde festgestellt, dass sich durch eine erhöhte Zugabe der Kalilauge die Reaktivität deutlich verringert, allerdings kann dadurch die Säurezahl deutlich erniedrigt werden.

Für alle hier untersuchten Reaktionen gilt, dass die Produkte eine Trübung zeigten. Diese wurde vermutlich durch die hohe Säurezahl des Öls hervorgerufen, da sich bei der Wäsche mit verdünnter Kalilauge Seifen bilden, die die Trübung hervorrufen. Durch Lösen des Epoxids in Aceton/Heptan und anschließender Filtration und Destillation konnte die Trübung eliminiert werden.

Epoxidierung von Holunderkernöl

Für die Epoxidierung des Holunderkernöls wurde von den Standardbedingungen für Leinöl ausgegangen: 70 L Pflanzenöl, 30 % H₂O₂-Lösung und konzentrierte Ameisensäure.

Tabelle 38: Ausgewählte Epoxidierungsreaktionen von Holunderkernöl (IZ = 175 g Jod/100g, SZ = 0,8 mg KOH / g, POZ = 0).

Einsatzstoff	Reaktionszeit [min]	IZ	OH	Analysen-Werte H ₂ O	SZ	Visk.	Dichte	FZ
Holunderkernöl Technikum (70 kg)	280	6,8	0	0,04	1,6	202	1,026	2-3
Holunderkernöl Technikum (70 kg)	280	6,8	0	0,04	1,6	202	1,026	2-3
Holunderkernöl Technikum (70 kg)	300 Neutr. auf pH 9	3,7	0	0,05	0	315	1,026	2
Holunderkernöl Technikum (70 kg)	320 WPO +10 kg	2,6	0	0,05	0,6	277	1,025	2

IZ = Iodzahl, OH = Hydroxylzahl, SZ = Säurezahl, FZ = Farbzahl

Tabelle 38 zeigt den Einfluss der Reaktionszeit auf die Iodzahl. Um die maximale Epoxidierung zu erreichen, muss eine Reaktionszeit von 320 min bei Einsatz von etwas erhöhtem Anteil an WPO eingesetzt werden. Im Vergleich zum Drachenkopföl sind längere Reaktionszeiten nötig, um Iodzahlen von unter 5 nach der Reaktion zu erreichen. Gleichzeitig können beim Einsatz von Holunderkernöl keine Farbzahlen (FZ) von 1 erreicht werden, die entsprechenden Epoxide sind immer etwas stärker eingefärbt als die entsprechenden Drachenkopfepoxide.

Epoxidierung von Holunderkernöl, Senfkernöl, Krambeöl und Tallöl im Labormaßstab

Neben den Epoxidierungsreaktionen im Technikumsmaßstab wurden die Umsetzungen von Holunderkernöl, Senfkernöl, Krambeöl und Tallöl im Labormaßstab (200 mL bis 500 mL Öl) untersucht. Im Falle des Tallöls wurden vom Fraunhofer ICT gereinigte Proben eingesetzt, da sich das Rohprodukt schlecht verarbeiten ließ.

Tabelle 39: Ausgewählte Epoxidierungsreaktionen von Holunderkernöl (IZ = 175 g Jod/100g, SZ = 0,8 mg KOH/g, POZ = 0, VZ = 215), Senfkernöl (IZ = 102 g Jod/100g, SZ = 0,3 mg KOH/g, H₂O = 0,05 %, POZ = 0, VZ = 180), Krambeöl (IZ = 94 g Jod/100g, SZ = 0,95 mg KOH/g, H₂O = 0,03 %, POZ = 0, VZ = 166) und Tallöl (IZ = 152 g Jod/100g, SZ = 150 mg KOH/g).

Einsatzstoff	Reaktionszeit [min]	IZ	OH	Analysen-Werte H ₂ O	SZ	Visk.	Dichte	FZ
Holunderkernöl	210 min.	3,6	0	0,08	1,5	275	1,030	3
Senföl	210 min.	3,1	0	0,04	0	136	-	1
Krambeöl	180 min.	2,5	0	0,02	0,75	130	0,870	1-2
Tallöl	180min.			132,2			5	

IZ = Iodzahl, OH = Hydroxylzahl, SZ = Säurezahl, FZ = Farbzahl

Tabelle 39 zeigt ausgewählte Epoxidierungsreaktionen von Holunderkernöl, Senfkernöl, Krambeöl und Tallöl. Durch die geringeren Ausgangsiodzahlen erfolgte eine vollständige Epoxidierung schon bei kürzeren Reaktionszeiten im Vergleich zum Holunderkernöl und zum Drachenkopfföl.

Die Epoxide von Senföl und Krambeöl hatten allerdings hohe Stockpunkte im Bereich von 15 °C und zeigten bei Raumtemperatur schon sehr starke Trübungen bzw. Niederschläge.

Die Epoxidierung von Tallöl führte zu einem sehr dickflüssigen Produkt, welches bei Raumtemperatur fest ist. Es zeigte schlechte Aushärteeigenschaften mit säurebasierenden Härtern und keine Aushärtung mit UV Licht nach Zugabe eines Photoinitiators. Allerdings zeigt es eine große Klebkraft bei der Verbindung von Kunststoffen und Glasscheiben. Für eine industrielle Anwendung als Permanentkleber ist die Schmelztemperatur allerdings noch zu niedrig.

Für die Öle Drachenkopfföl, Holunderkernöl, Senfkernöl, Krambeöl und Tallöl wurden Studien zu den Reaktionsbedingungen der Epoxidierung durchgeführt und für jedes Öl die optimalen Reaktionsbedingungen bestimmt. Dabei konnten für Drachenkopf- und Holunderkernöl auch die entsprechenden Bedingungen für einen industriellen Maßstab bestimmt werden. Es liegen damit detaillierte Kenntnisse für die entsprechenden Reaktionsbedingungen vor, um gezielt die gewünschten hoch epoxidierten Öle zu erzeugen.

3.4.2.4 Chemische Epoxidierung von Pflanzenölen (Hobum)

Pflanzliche ungesättigte Öle und Ester können einer Epoxidation unterworfen werden. Dabei entstehen sogenannte epoxidierte Pflanzenöle/ester (siehe Abbildung 34). Die epoxidierten Öle wurden im Projekt durch Prileschajew-Reaktionen hergestellt. Hierbei wird ein Sauerstoff-Atom von einer Persäure (Peroxycarbonsäure) auf die Kohlenstoffdoppelbindung des ungesättigten Fettsäurerestes des Pflanzenöls übertragen. Dies führt dann zu der Bildung eines Oxiranrings (Epoxidgruppe).

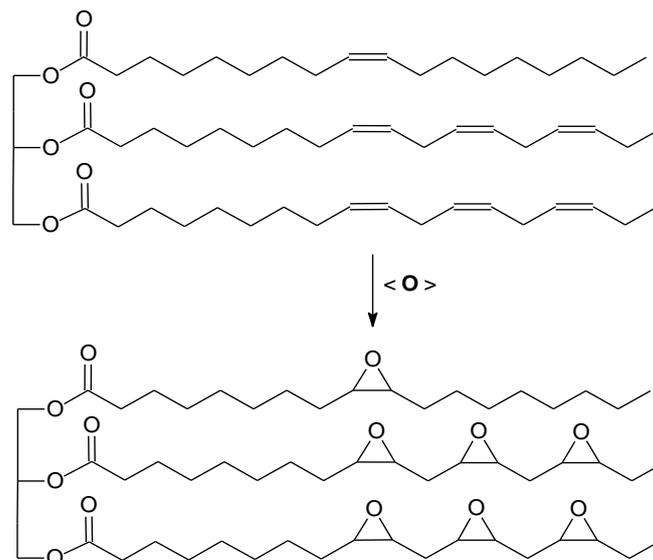


Abbildung 34: Schematische Darstellung eines epoxidierten Pflanzenöls.

Dieser Epoxidierungstyp verläuft als stereospezifische syn-Addition des elektrophilen Sauerstoffatoms der Peroxidgruppe an die Kohlenstoffdoppelbindung. Die Reaktionsführung erfolgte bis zu Restjodzahlen von unter fünf unter Beachtung eines möglichst geringen Oxiranabbaus zum Ende der Reaktion hin. Eine weitere Reduzierung der Jodzahl wirkt sich oft kontraproduktiv im Hinblick auf den angestrebten möglichst hohen Oxirangehalt aus. Je höher die Ausgangsjodzahl des eingesetzten Pflanzenöls ist, desto schwieriger wird die Reaktionsführung und desto höher ist in der Regel der prozentuale Verlust bei der Oxiranausbeute. Die Ergebnisse sind in Form der wichtigsten Kennzahlen in Tabelle 40 dargestellt. Die Ausbeuten sind nicht optimiert, da in der Regel keine ausreichenden Rohstoffmengen zur Verfügung standen. Dennoch wurden im Vorwege der jeweiligen Epoxidationen einige Betriebsparameter angepasst. Die Ausbeuten (Praxisausbeuten größerer Ansätze) liegen bezogen auf die umgesetzte Jodzahl in relativ guten (89-92%) bis hin zu sehr guten Bereichen (größer 93-99%). Weiterhin wurden die meisten der bereitgestellten Pflanzenöle zu Estern umgesetzt und ebenfalls epoxidiert. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 41 aufgeführt.

Die Versuche zur Epoxidierung der Pflanzenöle waren abgeschlossen und ließen sich problemlos ins Technikum überführen. Eine Optimierung der Prozesse würde im Vorwege eines weiteren Scale-up erfolgen.

Tabelle 40: Kennzahlen einiger epoxidiertes Pflanzenöle.

LV	Kennzahlen						Ausgangsöl
	SZ	JZ	Oxi, %	n ^D ₂₅	n ^D ₂₀	Ausbeute, %	
13233	0,09	5,52	5,37	-	1,4692	94,6	Senföl
13242	0,36	4,46	6,64	-	1,4705	88,6	Schwarzkümmelöl
13259	0,25	2,57	7,85	-	1,4694	89,3	Safloröl
13302	0,19	5,99	5,35	-	1,4700	98,9	Erucarapsöl
13307	0,14	4,37	5,13	-	1,4695	97,3	Krambeöl
13331	0,20	4,71	10,0	-	1,4790	91,7	Drachenkopföl
13527	0,17	7,90	9,89			92,5	Drachenkopföl
13379	0,63	4,38	5,27	1,4671	-	99,0	Korianderöl
13381	0,26	4,64	8,25	1,4735	-	91,6	Leindotteröl

Tabelle 41: Kennzahlen einiger epoxidiertes Pflanzenölester.

LV	Kennzahlen				Bemerkung
	SZ	JZ	Oxi, %	n ^D ₂₀	
13250	0,64	4,86	6,65	1,4558	Ester von epox. Schwarzkümmelöl
13278	0,11	2,54	7,66	1,4535	Ester von epox. Safloröl
13324	0,11	6,06	5,21	1,4550	Ester von epox. Erucarapsöl
13328B	0,11	4,37	4,99	1,4545	Ester von epox. Krambeöl
13333	0,50	4,90	9,81	1,4632	Ester von epox. Drachenkopfl
13388	0,19	3,62	5,17	1,4505	Ester von epox. Korianderöl
13390	0,22	4,74	8,08	1,4575	Ester von epox. Leindotteröl

Es wurden ebenfalls versucht die vom Projektpartner Fraunhofer ICT hergestellten Produkte der Metathese von Ölsäuremethylester zu epoxidieren. Wider aller Erwartung ließen sich diese Produkte nicht im Standardverfahren epoxidieren, obwohl sie aus einem Pflanzenölester entstanden waren und noch deren Strukturmerkmale besitzen. Die Umsetzungs-geschwindigkeiten waren ungewöhnlich niedrig und die Ausbeuten nicht akzeptabel (siehe Tabelle 42). Während beim 9-Octadecen die Epoxidation zumindest eine gewisse Umsetzung zeigte, baute sich beim 9-Octadecen-1,18-dimethylester nahezu kein Oxiran auf. Eventuell stören Nebenprodukte oder es sind Verunreinigungen enthalten.

Tabelle 42: Ergebnisse der Epoxidation von Metatheseprodukten.

LV	Kennzahlen				Bemerkung
	SZ	JZ	Oxi, %	n ^D ₂₀	
13477	0,64	64,9	2,20	1,4445	Versuch der Epoxidation von 9-Octadecen
13488	1,96	69,4	0,31	-	Versuch der Epoxidation von 9-Octadecen-1,18-dimethylester

9-Octadecen: Ausgangsjodzahl 103.5

9-Octadecen-1,18-dimethylester: Ausgangsjodzahl 80.3

Daraufhin wurde das 9-Octadecen nochmals behandelt. Die Epoxidation verlief abermals extrem schleppend und verbrauchte ungewöhnlich viel Peroxid. Dies schadete dem Produkt aber nicht und am Ende wurde ein wie gewünscht vollständig umgesetztes Produkt in sehr guter Ausbeute erhalten:

- *Oxirangehalt: 5.79 %*
- *Restjodzahl: 5.03*
- *Ausbeute: 99.1 %*

Der 9-Octadecen-1,18-dimethylester zeigte auch in der Wiederholung deutlich mehr Schwierigkeiten. Neben einem sehr schnellen Abbau des Peroxids, zeigte sich zwar die gewünschte Jodzahlverringerng aber der Oxiranaufbau fand nicht in gleichem Maße statt,

so dass die Ausbeute im Verlauf der Epoxidation zunehmend schlechter wurde. Schließlich wurde die Reaktionsführung vorzeitig beendet, weil die Ausbeute nur noch 77 % betrug (JZ 39.6 Oxiran 1.93%). Die Reaktion läuft demnach prinzipiell, aber ein unerwünschter Inhaltsstoff führt zur Zersetzung des Peroxids und dabei gebildete Hydroxyradikale zersetzen offenbar das gewünschte Reaktionsprodukt.

3.4.3 Chemische Fettspaltung und Umesterung (DHW)

Naturprodukte, wie es das Senföl darstellt, entsprechen nicht immer den Anforderungen die an sie gestellt werden, um den Endprodukten die erwünschten Eigenschaften zu verleihen. Eine Modifikation des Öls bietet die Möglichkeit, die Eigenschaften innerhalb weiter Grenzen zu verändern und für die vielfältigsten Anwendungszwecke zur Verfügung zu stellen. Prozesse, die dabei bei der DHW Anwendung finden, sind zum einen die Fettspaltung und zum anderen die Umesterung.

3.4.3.1 Chemische Fettspaltung (DHW)

In der Fettspaltung (Hydrolyse) des Triglyzerides wurden zwei von Dragosa AG und von TLL bereitgestellte, ungereinigte Senföl-Qualitäten eingesetzt. Beide gepressten, ungereinigten Senföle wurden in einem Autoklav mit Wasser bei einer Temperatur von 245-250 °C und einem Druck von 35-50 bar in einem zweistufigen Prozess in die Fettsäure und das Glycerin gespalten. Ein Katalysator ist an dieser Stelle nicht notwendig. Nach der ersten und nach der zweiten Stufe wurde jeweils das glycerinhaltige Wasser abgetrennt und die Fettsäure destillativ aufgearbeitet, um noch enthaltene Partialglyzeride und weitere Verunreinigungen abzutrennen. Das wasserhaltige Rohglycerin wurde nicht aufgearbeitet bzw. nicht analysiert.

Die destillativ aufgereinigte Fettsäure wurde in einer Ausbeute von ca. 90 % der Theorie abgetrennt. Die GC-Analyse vom Destillat belegt, dass keine Veränderung der Fettsäure-Zusammensetzung im Prozess der Spaltung und der Aufreinigung im Vergleich zum Senföl erfolgte. Die gereinigte Fettsäure wurde analysiert, wobei die in Tabelle 43 zusammengefassten Werte erhalten wurden:

Tabelle 43: Charakteristische Kenngrößen der destillativ gereinigten Fettsäure-Fraktion aus der Hydrolyse von Senföl.

Kenngröße	Wert
Säurezahl	182,6 mg KOH/g
Verseifungszahl	183,5 mg KOH/g
Iodzahl	100,4 gJ ₂ /100 g
Erstarrungspunkt	6,0 °C
kinematische Viskosität (40°C)	23,9 mm ² /s
kinematische Viskosität (100°C)	5,7 mm ² /s

Die hydrolytische Fettspaltung des Senföles wurde problemlos in der DHW sowie am Fraunhofer ICT mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

3.4.3.2 Chemische Umesterung (DHW)

Die chemische Umesterung des aufgereinigten Senföles (Vollraffinat) erfolgte im Labormaßstab der DHW unter Verwendung von Methanol in einem 2-stufigen alkalischen Prozess im Temperaturbereich von 60-70 °C. Nach der ersten Prozeßstufe wird das methanolhaltige Glycerin abgetrennt und nach erneuter Zugabe von Methanol und des Katalysators die Umesterung vervollständigt.

Das nach beiden Prozessstufen abgetrennte, methanolhaltige Glycerin wurde nicht aufgearbeitet bzw. nicht weiter analysiert. Nach Neutralisation, Wäsche und Trocknung wurde der Methylester auf Basis von Senföl mit einer Ausbeute von ca. 99 % erhalten. Die Analyse des Methylesters ergab die in Tabelle 44 aufgeführten charakteristische Kennzahlen:

Tabelle 44: Charakteristische Kennzahlen des chemisch hergestellten Senfölfettsäuremethylesters.

Kenngröße	Wert
Säurezahl	0.7 mg KOH/g
Verseifungszahl	168.2 mg KOH/g
Iodzahl	101.5 g J ₂ /100g
Erstarrungspunkt	- 7.2°C
kinematische Viskosität (40°C)	5.7 mm ² /s
kinematische Viskosität (100°C)	2.1 mm ² /s

Der Methylester wurde ebenfalls gaschromatographisch untersucht. Die Analyse zeigte, dass keine Verschiebung in der Fettsäure-Kettenverteilung zwischen dem Senföl und dem Methylester auftrat.

3.4.4 Hydrierung von Fettsäurederivaten zum Fettalkohol (DHW, Fraunhofer ICT)

Aufgabe der DHW war es, einen durch eine chemische Umesterung von Senföl dargestellten Methylester in den ungesättigten Fettalkohol zu überführen und zu analysieren. Beginnend wurde im Labormaßstab der Fettalkohol durch eine Reduktion des Methylesters mit Lithiumaluminiumhydrid unter Verwendung von Tetrahydrofuran als Lösungsmittel bei einer Temperatur von 65°C hergestellt und durch eine Vakuumdestillation gereinigt. Die Ausbeute an ungesättigten Fettalkohol beträgt ca. 80 % der Theorie. Bei dieser selektiven Reduktion bleibt die Doppelbindung im Molekül vollständig erhalten.

Die Analyse zeigt, dass ein hochjodzahliger Fettalkohol (Iodzahl 110,8 gJ₂/100 g) mit einem Erstarrungspunkt von 6,6°C erhalten werden kann (siehe Tabelle 45).

Tabelle 45: Charakteristische Kenngrößen zu den aus Senfölfettsäuremethylestern chemisch mittels Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid hergestellten Fettalkoholen.

Kenngröße	Wert
Hydroxylzahl	178,9 mg KOH/g
Iodzahl	110,8 g J ₂ /100g
Erstarrungspunkt	6,6 °C
kinematische Viskosität (40°C)	17,6 mm ² /s
kinematische Viskosität (100°C)	3,5 mm ² /s

Abschließend erfolgte die selektive Hydrierung des Senfö-Methylester zum ungesättigten Fettalkohol in der Hochdruck-Pilotanlage im Scale-up-Versuch. Der dargestellte Fettalkohol wurde im Labor destillativ gereinigt und analysiert. Die Ausbeute lag bei 88% der Theorie.

Tabelle 46: Charakteristische Kenngrößen zu den in der Hochdruck-Pilotanlage aus Senfö-Methylestern mittels selektiver Hydrierung hergestellten Fettalkoholen.

Kenngröße	Wert
Hydroxylzahl	178,5 mg KOH/g
Iodzahl	90,1 g J ₂ /100g
Erstarrungspunkt	7,4 °C

Aus der GC-Analyse ist zu entnehmen, dass der dargestellte Fettalkohol einen Gehalt an Erucylalkohol von 41,9 FI % enthält. Bedingt durch die geringere Hydrierselektivität im technischen Prozess ist die Iodzahl vom ungesättigten Fettalkohol um ca. 20 Einheiten niedriger als von dem mit der Labormethode dargestelltem Fettalkohol.

Jedoch liegen die Zusammensetzung der Alkohol-Mischungen sowie deren gemessenen Erstarrungspunkte sehr eng beieinander.

Diese Fettalkohole können als Synthesebaustein für grenzflächenaktive Substanzen, wie Emulgatoren sowie als potentieller Bestandteil von Kühlschmierstoffen für die Metallbearbeitung Verwendung finden.

Am Fraunhofer ICT erfolgten ergänzend zu den Arbeiten von DHW erste Versuche zur Hydrierung des Dimethylesters. Hier konnte auf Vorwissen für Monomethylester der Fettsäuren zurückgegriffen werden. Als Methode im Labor wurde, wie im Projektverlauf vom Projektpartner DHW gezeigt, eine Reduktion mittels Lithiumaluminiumhydrid demonstriert. Darüber hinaus wurde als Option eine Reduktion mittels grünem Wasserstoff der Firma Linde eingeplant. Diese Reduktion sollte stellvertretend für die Firma DHW aufgrund der besseren Realisierbarkeit am Fraunhofer ICT durchgeführt werden. Die Firma Linde konnte im Projektverlauf eine erfolgreiche Einspeisung in das Wasserstoffnetz des Standortes Leuna realisieren und damit die Nutzbarkeit des grünen Wasserstoffs beweisen.

3.4.5 Metathese und Herstellung längerkettiger stickstoffhaltiger Verbindungen (Fraunhofer ICT)

Bei der im Rahmen des Projektes untersuchten Metathese von Methyloleat findet eine Umlagerung von zwei Molekülen des Edukts an deren Doppelbindungen statt. Als Produkte erhält man das Olefin 9-Octadecen (25 mol-%), sowie den Diester Dimethyloleat (25 mol) und 50 mol-% des Eduktes Methyloleat. In Abbildung 35 ist ein typisches GC-Chromatogramm einer Metathesereaktion von Methyloleat dargestellt.

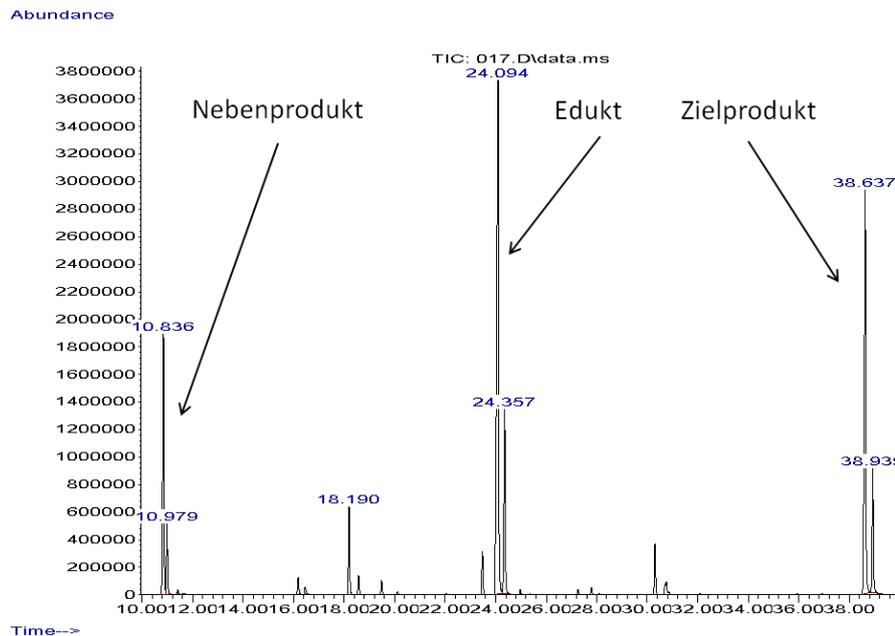


Abbildung 35: GC-Chromatogramm eines Metatheseprodukts.

Zu Beginn der Arbeiten wurde die Inaktivierung des Katalysators durch Quenchen mit verschiedenen Chemikalien untersucht. Dies ist insbesondere für kinetische Untersuchungen notwendig. Zum Quenchen wurde Ethylvinylether, Pyridin sowie eine Mischung der beiden Chemikalien bei verschiedenen Temperaturen (Siedetemperatur bzw. Raumtemperatur) verwendet. Im Versuch wurde dabei eine Reaktionslösung nach fünf Minuten mit den Chemikalien versetzt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Reaktion noch nicht abgeschlossen. Ist das Quenchen erfolgreich, findet keine weitere Umsetzung mehr statt, andernfalls stellt sich das charakteristische Gleichgewicht der Metathesereaktion ein. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 47 dargestellt.

Tabelle 47: Ergebnisse der Versuche zum Quenchen des Katalysators Umicore M2 (es werden jeweils die Flächenintegrale der beiden Isomere angegeben).

Quenchen mit	Temperatur	Summe Flächenintegrale Octadecen [%]	Summe Flächenintegrale Methyloleat [%]	Summe Flächenintegrale 1,18-Octadecen-dimethylester [%]
Ethyl-Vinylether Pyridin	RT	0,0	86,7	0,0
Ethyl-Vinylether Pyridin	Rückfluss	0,0	91,3	0,0
Ethyl-Vinylether	RT	7,8	69,4	16,3
Ethyl-Vinylether	Rückfluss	5,3	78,4	11,3

Bei den Versuchen zeigte sich, dass das Quenchen mit Ethylvinylether alleine, wie es in der Literatur häufig als Methode der Wahl beschrieben wird, nicht in der Lage ist den Katalysator M2 vollständig zu deaktivieren. Unter Verwendung von Ethylvinylether und Pyridin wurde beim Sieden unter Rückfluss trotz nicht erfolgter Reaktion eine Isomerisierung des Methyloleats beobachtet. Die Verwendung beider Chemikalien im Verhältnis 1:1 bei Raumtemperatur zeigte hingegen bei den Versuchen die besten Ergebnisse und ist deshalb die geeignetste Methode zur Katalysatordeaktivierung.

Zu Beginn wurde als Referenz der Katalysator Grubb's 2nd Generation bei einem Katalysatorverhältnis von 1:1000 verwendet. Zum Vergleich wurde der Katalysator M2 des Projektpartners Umicore für die Reaktion eingesetzt. Die Reaktion erfolgte dabei bei 60°C über einen Zeitraum von 60 Minuten. Die Analyse der Reaktionslösung erfolgt mittels GC-MS, wobei die quantitative Auswertung über die Flächenintegrale erfolgt (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37).

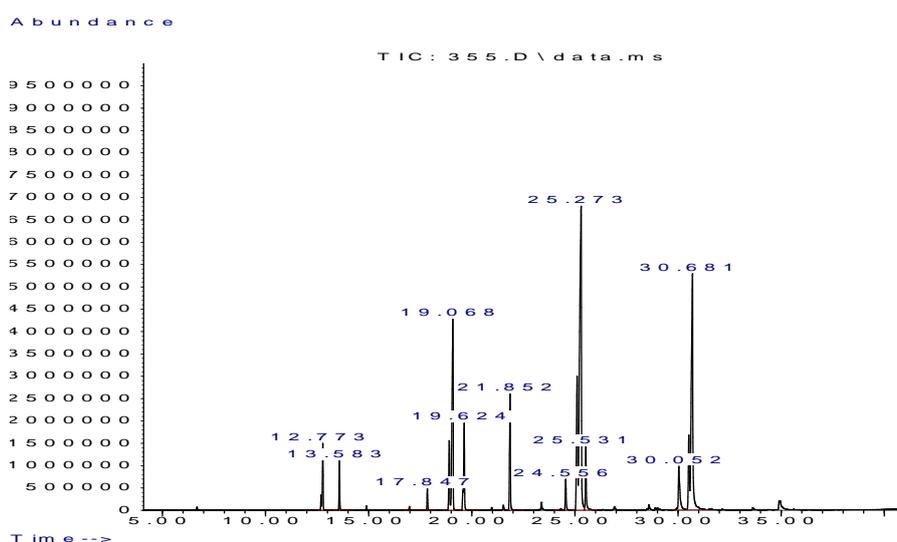


Abbildung 36: GC-Chromatogramme der Umsetzung unter Verwendung von Grubbs 2nd Generation.

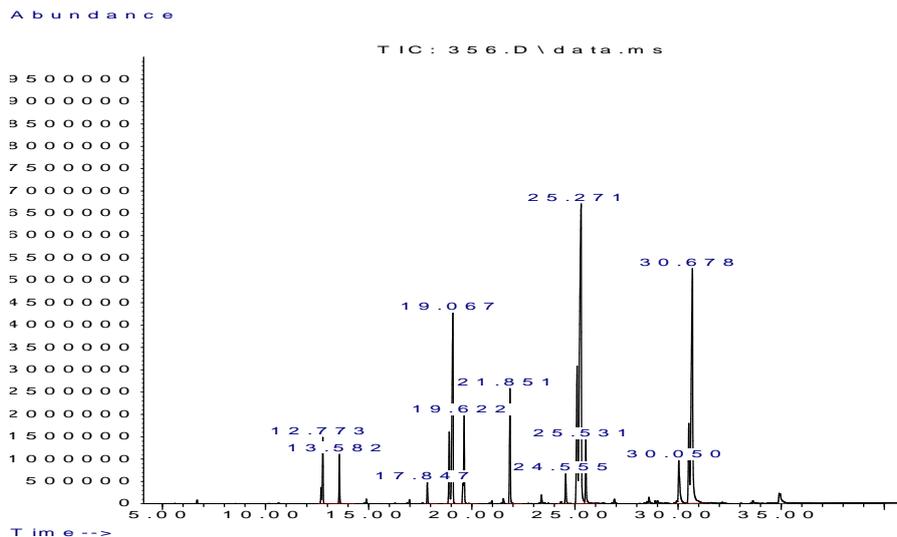


Abbildung 37: GC-Chromatogramme der Umsetzung unter Verwendung des Katalysators Umicore M2.

Bei den Versuchen zeigte sich, dass der Katalysator Umicore M2 dem Katalysator Grubbs 2nd Generation vergleichbare Ergebnisse lieferte. Dieser Katalysator wurde deshalb als zukünftige Referenz für die Durchführung weiterführender Experimente ausgewählt. Alle Versuche wurden unter Verwendung von Methyloleat, welches vom Partner DHW zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Das Edukt besitzt eine technische Reinheit von 80% (ermittelt mittels GC) und wurde daher ohne weitere Aufreinigung verwendet. Vor der Reaktion erfolgte eine Entgasung bei einer Temperatur von 90°C und einem Vakuum von 1 mbar über einen Zeitraum von zwei Stunden.

Es wurde nun untersucht, wie weit die notwendige Katalysatormenge gesenkt werden kann. Dabei zeigte sich, dass eine deutliche Reduktion möglich ist (siehe Tabelle 48).

Tabelle 48: Metathesereaktion unter Verwendung des Katalysator Umicore M2.

Umicore M2 Verhältnis Kat/Edukt	Summe Flächenintegrale Octadecen [%]	Summe Flächenintegrale Methyloleat [%]	Summe Flächenintegrale 1,18-Octadecen- dimethylester [%]
1 : 1000	15,4	47,1	30,9
1 : 2000	15,4	47,5	30,3
1 : 4000	14,5	47,5	28,5
1 : 6000	13,6	60,5	22,8
1 : 8000	2,8	84,5	3,9
1 : 10000	3,7	81,9	8,0

Dabei konnte die Reaktion erfolgreich bis zum einem Verhältnis von 1:4000 durchgeführt werden. Bei einem Katalysatorverhältnis von 1:6000 konnte keine vollständige Gleichgewichtseinstellung erzielt werden, die Metathese findet jedoch verlangsamt statt.

Für die weiterführenden Arbeiten wurden gemeinsam mit der Firma Umicore verschiedene Metathese-Katalysatoren (Umicore M1, M3x-, M4x-, M5x- und M7x-Serie) selektiert und am Fraunhofer ICT getestet. Der Schwerpunkt der Arbeiten lag dabei auf einer Untersuchung des Einflusses verschiedener Substrate auf die notwendige Katalysatormenge, der Aktivierung von Katalysatoren (soweit notwendig) sowie der weiteren Reduktion der notwendigen Katalysatorkonzentrationen.

Zu Beginn wurde untersucht, ob der kostengünstige Katalysator M1 analog dem teureren Katalysator M2 für die Reaktion geeignet ist. Es konnte jedoch bei keinem der Versuche ein Umsatz erzielt werden. Aufbauend auf den Ergebnissen des Referenzkatalysators M2 wurden anschließend Katalysatoren der Serien M3x, M4x, M5x sowie in späteren Arbeiten M7x getestet. Bei den Katalysatoren der M3x-, M4x- und M5x-Serie, welche vor der Reaktion durch Aktivierung in ihre aktive Form überführt werden müssen, wurden gemeinsam mit der Firma Umicore verschiedene Aktivierungsmethoden ausgewählt und getestet.

Dabei kamen zwei verschiedene Ansätze für die Aktivierung zum Einsatz. Zum einen können Metathese-Katalysatoren thermisch aktiviert werden. Dies wurde z.B. bei Katalysatoren der Serien M3x und M5x untersucht. Bei den Experimenten zeigte der Katalysator M31 trotz einstündiger thermischer Aktivierung bei 100 °C lediglich bei einem Verhältnis von 1:1000 und einer Reaktionszeit von 24 h einen signifikanten Umsatz von 50 %. Die Versuche der thermischen Aktivierung des Katalysators M51 bei einer Temperatur von 80 °C zeigte ebenfalls lediglich geringe Umsätze im Bereich von wenigen Prozent (<5 %).

Als zweite Aktivierungsmethode kam die Aktivierung mit Lewis-Säuren zum Einsatz. Diese Aktivierungsmethode wurde bei den Katalysatoren der M4x-Serie verwendet. Dabei wurde zum einen mit Trichlorphenylsilan, zum anderen mit Ethylenaluminiumdichlorid aktiviert. Bei der Aktivierung wurde der Katalysator zusammen mit Methyloleat vorgelegt und mit dem aktivierenden Agens versetzt und eine Stunde bei 60 °C aktiviert. Hierbei bewirkte die Verwendung von Trichlorphenylsilan keine Aktivierung des Katalysators. Mit Ethylenaluminiumdichlorid konnte eine Aktivierung des Katalysators beobachtet werden, dieser war jedoch im Vergleich zum Referenzkatalysator M2 unbefriedigend (siehe Tabelle 49):

Tabelle 49: Erreichter Umsatz bezogen auf die maximal erzielbare Gleichgewichtsausbeute.

Verhältnis Kat : Edukt	Katalysator M 41	Katalysator M 42
1 : 2500	50%	50%
1 : 5000	-	-

Um den Einfluss des gewählten Edukts auf die Reaktion zu untersuchen, wurden Methyloleate der Firma DHW (zwei verschiedene Chargen) sowie ein Ester der Firma Cognis für die Metathese verwendet und miteinander verglichen. Der starke Einfluss des gewählten Rohstoffs auf die Katalysatoraktivität könnte in einer Deaktivierung des Katalysators durch vorhandene Störkomponenten (Peroxyde, freie Säuren etc.) liegen. Die Möglichkeit der Aufreinigung der eingesetzten Edukte zur Entfernung dieser Störkomponenten war deshalb ein zentraler Punkt weiterführender Experimente. Es sollte dabei eine einfache und kostengünstige Methode gefunden werden. Hier wurde insbesondere die Behandlung des Eduktes mit Magnesiumsilikaten als Vorbehandlungsmethode gefunden. Dies erfolgt beispielsweise bei der Biodieselherstellung durch Verwendung von Produkten wie

Magnesol¹²⁵. Dabei wird das Magnesiumsilikat in Mengen von 2,5 - 5 % zugesetzt und durch Filtration entfernt. Ziel war es dadurch eine Reduktion der notwendigen Katalysatormengen zu erzielen, indem Störkomponenten einfach und kostengünstig entfernt werden¹²⁶.

Zur Überprüfung der Vorbehandlungsmethode kamen zum einen unbehandelte Ester zum Einsatz, zum anderen wurde eine Vorbehandlung mit Magnesiumsilicat (Magnesol) durchgeführt. Alle eingesetzten Ester wurden 90 Minuten bei einem Vakuum von 1 mbar und einer Temperatur von 90 °C am Rotationsverdampfer entgast. Die zusätzlich mit Magnesiumsilicat behandelten Ester wurden mit 2 Gew.-% Magnesol versetzt und 15 min gerührt. Im Anschluss daran wurde das Magnesol abfiltriert und der Ester entgast.

Bei Versuchen konnte im Hinblick auf den Effekt der Vorbehandlung kein eindeutiger Trend festgestellt werden. So zeigte der Einsatz von Magnesiumsilicat zwar bei dem Ester der Firma Cognis einen signifikanten Einfluss (Vollumsatz beim behandelten Ester vs. 10 %iger Umsatz beim unbehandelten Ester bei gleicher Katalysatormenge), bei den beiden Estern der Firma DHW trat jedoch keine Erhöhung des Umsatzes auf.

Beim Vergleich der beiden Chargen der Firma DHW zeigte sich unabhängig von einer eventuellen Vorbehandlung ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Chargen. So konnten bei Versuchen unter Verwendung der neuen Produktcharge die besten Ergebnisse der bisherigen Untersuchung erzielt werden. Selbst bei einem Katalysator : Eduktverhältnis von 1 : 10000 (entspricht 100 ppm Katalysator) konnte bereits nach einer Stunde bei 60 °C annähernd vollständiger Umsatz erzielt werden. Im Vergleich dazu wurde bei gleichen Versuchsbedingungen unter Verwendung der erste Charge (gleiche Produktspezifikationen) kaum Umsatz beobachtet (lediglich 0,5 Flächenprozent Produkt im GC-Chromatogramm).

Die Katalysatorwahl wurde im Verlauf der Arbeiten entscheidend durch ein im Februar 2010 von der Firma Cognis veröffentlichtes Patent beeinflusst, welches die Verwendung der Katalysatoren M2, sowie M41 für die Metathese von Methyloleat schützt (WO2010/020368 A1). Für weitere Untersuchungen wurde deshalb zusammen mit der Firma Umicore die Katalysatorfamilie M7x ausgewählt, welche nicht von dem Patent der Firma Cognis betroffen sind. So konnte unter Verwendung von Methyloleat der Firma DHW (neue Charge) mit den Katalysatoren M 71 SiPr und M 73 SiPr (RD) selbst bei einer Katalysatormenge von 100 ppm (Verhältnis 1:10000) nach einer Stunde vollständiger Umsatz erzielt werden. Die Katalysatoren M 71 SiPr (RD) und M 74 SiPr (RD) zeigten unter gleichen Bedingungen gute, wenn auch nicht vollständige Umsätze. Aufbauend auf den Ergebnissen wurden am ICT mit den Katalysatoren M 71 SiPr und M 73 SiPr (RD) weiterführenden Arbeiten durchgeführt. Dabei war es das Ziel die Katalysatormenge weiter zu reduzieren und die Reaktionsgeschwindigkeit detailliert zu untersuchen.

Im Verlauf der weiteren Untersuchungen konnten bei der Metathese-Reaktion mit den Katalysatoren der Serie M7.x von Umicore unter Verwendung von Methyloleat der Firma DHW (neue Charge) nach einer Stunde Reaktionszeit gute (M71 SiMes und M74 SiPr) bis vollständige Umsätze (M 71 SiPr und M73 SiPr) erzielt werden (siehe Abbildung 38). Die Versuche wurden mit einer Katalysatormenge von 100 ppm (Verhältnis 1 : 10000)

¹²⁵ http://www.make-biodiesel.org/index.php?option=com_content&view=article&id=122&Itemid=152

¹²⁶ Vortrag Richard Pederson; Materia Inc.; 3rd Workshop in Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry; Emden 15.3.2009;

durchgeführt, da Vorversuche zum Einfluss der Katalysatormenge bei einem Verhältnis von 1 : 10000 Vollumsatz zeigten. Für die weiteren Versuche wurde der Katalysator M71 SiPr aufgrund seiner guten Performance gewählt.

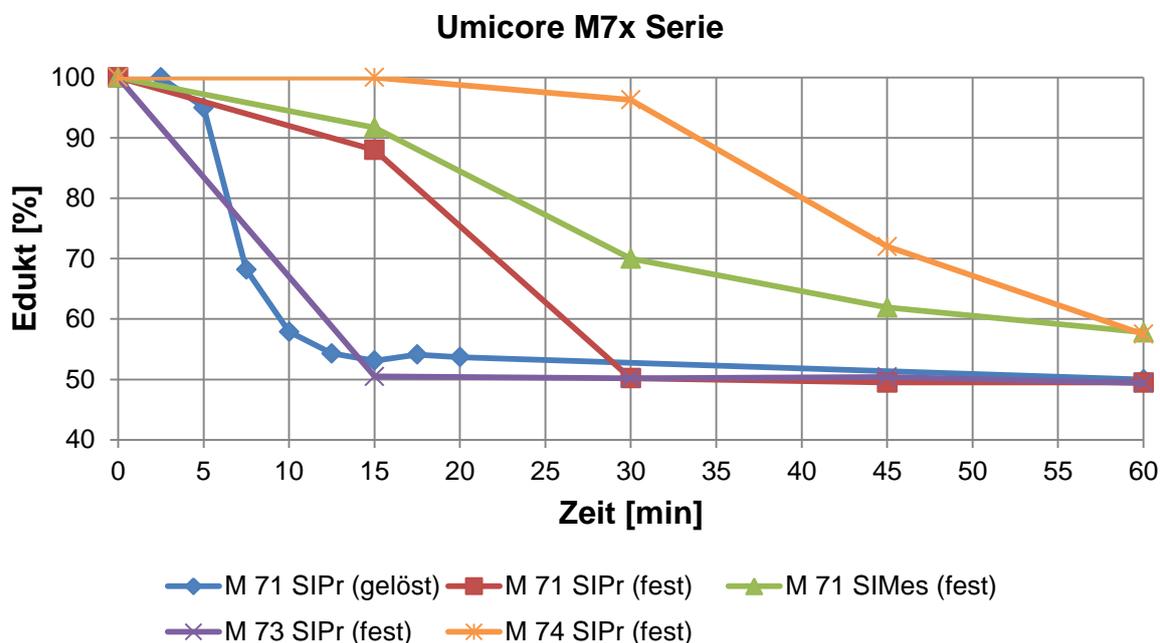


Abbildung 38: Katalysatorscreening der Umicore Serie M7.x.

Die Verwendung einer Katalysatorstammlösung lieferte hier im Vergleich zum festen Katalysator die besten Ergebnisse. Für die nachfolgenden Versuche wurde daher der verwendete Katalysator für die Katalysatorstammlösung in 1,4-Dioxan gelöst.

In weiteren Versuchen wurde die Temperaturabhängigkeit der Metathese detailliert untersucht. Hierzu wurden bei einer Katalysatormenge (M71 SiPr) von 100 ppm (Verhältnis 1 : 10000) Untersuchungen in Schritten von 10°C im Bereich zwischen Raumtemperatur und 100 °C durchgeführt. Hierbei wurde eine optimale Reaktionstemperatur von 60 °C gefunden (siehe Abbildung 39). Dies entspricht der bereits im früheren Projektverlauf empirisch mittels des Katalysators Grubbs 2nd Generation gefundenen Temperatur.

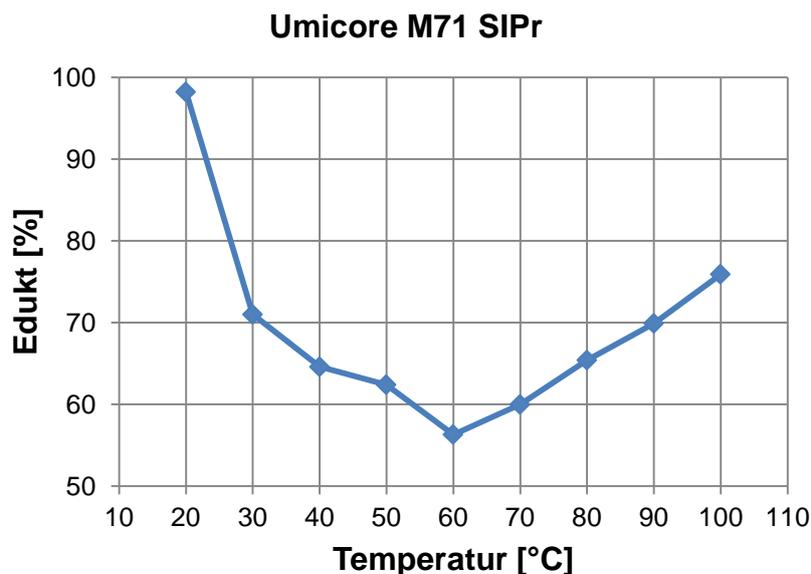


Abbildung 39: Temperaturabhängigkeit der Metathese-Reaktion.

Um eine mögliche weitere Reduktion der Katalysatormenge zu untersuchen, wurde eine Versuchsreihe mit Katalysatorverhältnissen von 1 : 10 000 - 1 : 20 000 in 1000er Schritten mit dem Katalysator M71 SiPr bei 60 °C und einer Reaktionszeit von 24 h durchgeführt. Es konnte hierdurch gezeigt werden, dass ein Vollumsatz ausschließlich bei einem Verhältnis von 1 : 10 000 stattfand. Ein Verhältnis von 1 : 11 000 und 1 : 12 000 lieferte noch einen guten Umsatz, ein Verhältnis von 1 : 13000 lediglich noch einen minimalen Umsatz.

Auch Versuche zur Reduktion der Katalysatormenge mit dem Katalysator M73 SiPr lieferten vergleichbare Ergebnisse. Ein Vollumsatz war lediglich bei einem Katalysatorverhältnis von 1 : 10 000 zu beobachten. Aufbauend auf den Ergebnissen wurde der Katalysator M71 SiPr als Katalysator der Wahl für das Scale-up der Metathese selektiert.

3.4.5.1 Scale-Up der Metathese Reaktion

Im Rahmen des Projektes wurde ein Scale-up der Metathese-Reaktion in den 10 kg Maßstab am Fraunhofer ICT durchgeführt. Nachdem im Projektverlauf als Katalysator der Wahl in umfangreichen grundlegenden Versuchen der Katalysator M71 SiPr als geeigneter Katalysator gefunden wurde, kam dieser für das Scale-up in die Selektion. Mit dem Katalysator M71 SiPr wurde eine Metathese bei den im Laborversuch gefundene optimale Katalysatormenge von 100 ppm und einer Reaktionstemperatur von 60 °C durchgeführt.

Die Maßstabsübertragung erfolgte erfolgreich im 1 kg und dann im 10 kg Maßstab (2 Versuche im 10 kg Maßstab). Hierbei wurden jeweils im Abstand von 30 min Proben gezogen und diese mittels GC-MS untersucht. Wie Abbildung 40 deutlich zeigt, lieferten beide Ansätze bereits nach einer Reaktionszeit von 0,5 h Vollumsatz (1. Probe).

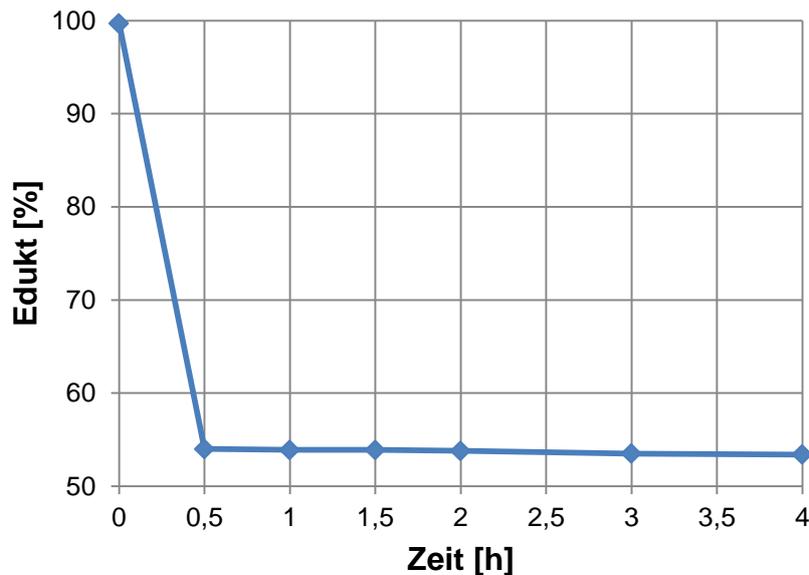


Abbildung 40: Scale-up der Metathese Reaktion im 10 kg Maßstab.

Bei den Arbeiten zum Scale-up zeigte sich, wie auch schon in vorherigen Untersuchungen im Labormaßstab, dass die Rohstoffqualität entscheidenden Einfluss auf den Umsatz hat. So liefern unterschiedliche Edukt-Chargen bei gleicher Spezifikation teilweise unterschiedliche Ergebnisse. Trotz umfangreicher Untersuchungen war es nicht möglich entsprechende Störkomponenten zu identifizieren, auch wird in der Literatur keine klare Aussage über mögliche Störkomponenten gemacht. Vielmehr wird dort meist mit hochreinen Edukten und großen Katalysatormengen gearbeitet um dem Problem zu begegnen, was im Sinne eines wirtschaftlichen Scale-Ups der Reaktion jedoch nicht zielführend ist.

Bei der Versuchswiederholung im 10 kg Maßstab war es beim zweiten Versuch notwendig, die Reaktion durch Zugabe kleiner Mengen weiteren Katalysators zu vervollständigen. Als Ursache wurde eine neue Charge des verwendeten Eduktes (Ölsäuremethylester der Firma DHW) vermutet. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde eine Versuchsmatrix erstellt und Versuche mit verschiedenen Edukt-Chargen, sowie Katalysator-Chargen durchgeführt. Dabei konnte die getroffene Vermutung, dass das eingesetzte Methyloleat entscheidend ist, bestätigt werden (siehe Tabelle 50).

Tabelle 50: Versuchsmatrix zur Untersuchung auf Störeinflüsse bei der Metathese. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgt basierend auf dem Umsatz nach 1h (++ = sehr gut bis 0 = unbefriedigend).

Katalysatorverhältnis 1 : 10 000 Zeit 1 h	Katalysator alte Charge	Katalysator neue Charge
Edukt alte Charge	+	++
Edukt neue Charge	0	0

Wie Tabelle 50 zu entnehmen ist, verläuft die Reaktion mit beiden Katalysator-Chargen annähernd identisch, wobei unter Verwendung der bei der ersten 10 kg Metathese zum Einsatz kommenden Charge (Bezeichnung in Tabelle 50: Edukt alte Charge) mit einer neuen Katalysator-Charge minimal bessere Ergebnisse erzielt wurden. Problematisch war die Reaktion bei Verwendung der neuen Rohstoff-Charge, hier wurden mit beiden, nachgewiesenermaßen aktiven Katalysator-Chargen unbefriedigende Ergebnisse erzielt. Auch hier war nach einer Stunde kein Vollumsatz erzielbar.

Es wurde deshalb bei Ansätzen im Kilogrammmaßstab die Reaktion mittels GC verfolgt, um gegebenenfalls durch Zugabe weiteren Katalysators Vollumsatz sicherzustellen. Bei der Wiederholung der 10 kg Metathese wurde, um Mengen an Reaktionslösung für die Entwicklung der Aufreinigung zu erhalten, die Reaktion durch erneute Zugabe von Katalysator zum Vollumsatz geführt. Hierbei wurde überraschenderweise gefunden, dass bereits geringe Mengen an Katalysator, welche in den verwendeten Mengen in Vorversuchen allein kaum Umsatz zeigten, die Reaktion bei erneuter Zugabe zur Reaktionslösung zum Vollumsatz führten. Es war bisher nicht möglich diesen Effekt zu erklären, auch konnten trotz umfangreicher Untersuchungen Störkomponenten nicht identifiziert werden. Alle Rohstoff-Chargen stammen aus derselben Quelle (DHW) und besitzen dieselben Spezifikationen. Mittels der zur Verfügung stehenden Analysemethoden (GC-MS, Säurezahl, OH-Zahl etc.) konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Aufbauend auf dem Scale-up in den 10 kg Maßstab erfolgte die Planung und Durchführung einer Metathese Reaktion im 100 kg Maßstab, welche in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer CBP im dortigen Technikum durchgeführt wurde. Hier konnte sowohl auf einen Reaktor geeigneter Größe, sowie eine Filtereinheit zur Abtrennung des zur Vorbehandlung verwendeten Magnesiumsilikates zurückgegriffen werden (siehe Abbildung 41).



Abbildung 41: 100 L-Reaktor mit aufgesetztem Kondensators (links) und 25 L-Filtereinheit (rechts).

Das Edukt Ölsäuremethylester wurde von der Fa. DHW Deutsche Hydrierwerke GmbH, Rodleben, in einem 220 L Fass zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden zunächst 90,0 kg Ölsäuremethylester in den Reaktor eingefüllt und das Rührwerk gestartet. Um unerwünschte Nebenkomponenten bzw. Verunreinigungen im Edukt zu entfernen, wurden Magnesiumsilikat Typ Magnesol D-Sol (Fa. The Dallas Group of America, Inc., Whitehouse NJ, USA) über das Mannloch des Reaktors zugegeben. Anschließend wurde das Edukt durch einen Thermostaten unter kontinuierlicher Stickstoffüberlagerung auf eine Temperatur von 60 °C aufgeheizt durch eine Vakuumpumpe bei einem Druck von 200 mbar entgast und daraufhin mit Stickstoff belüftet. Dieser Entgasungsvorgang wurde dreimal wiederholt, um gelösten Luftsauerstoff möglichst vollständig zu entfernen. In einem nächsten Schritt wurde das Edukt aus dem Reaktor in ein Fass überführt. Hierin sedimentierte das Magnesiumsilikat innerhalb einer Stunde nahezu vollständig. Der Überstand wurde mittels einer 25 L Drucknutsche filtriert und in den gereinigten Reaktor überführt. Unter Rühren und kontinuierlicher Stickstoffüberlagerung wurde das vorbehandelte Edukt erneut dreimalig bei 200 mbar entgast und auf 60 °C erwärmt.

Zur Herstellung der Katalysatorlösung wurden der Katalysator Typ M71 SIPr (Fa. Umicore, Hanau, Deutschland) in 1,4-Dioxan vollständig gelöst. Über eine Pumpe wurde die Katalysatorlösung mit einem Volumenstrom von 1 L/h zudosiert. Bei einem Verhältnis Katalysator zu Edukt von 1:10000 wurde ein Katalysatorüberschuss von 8 % zugegeben. In definierten Zeitabständen nach Beendigung der Katalysatorzugabe wurden Proben entnommen, durch Zugabe von Ethylvinylether/Pyridin Verhältnis von 1 : 1 gequencht und anschließend mittels GC analysiert. Die Auswertung der Analyseergebnisse erfolgte über das Verhältnis der Flächenprozent der jeweiligen Komponenten zueinander. Die Detektion erfolgte hierbei über ein Massenspektrometer. Nach positiver Reaktionskontrolle wurde zur Reaktionslösung mittels einer Pumpe Quenchlösung mit einem Volumenstrom von 100 ml/min zudosiert und die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde die gequenchte Reaktionslösung auf eine Temperatur von 20 °C abgekühlt und unter Stickstoffatmosphäre in Gebinde abgefüllt. Es wurde eine Gesamtmenge von 87,3 kg erhalten. Die Produktmuster wurden den Projektpartnern bereitgestellt. Abbildung 42 zeigt Proben des Eduktes sowie der Reaktionslösung zu Versuchsende.



Abbildung 42: Edukt und Reaktionsprodukt der Metathese.

Die Analysenergebnisse zeigen, dass die Metathesereaktion bereits nach 15 min nach beendeter Katalysatorzugabe vollständig war und maximale Ausbeute gemäß dem sich einstellenden Gleichgewicht erzielt werden konnte (siehe Abbildung 43).

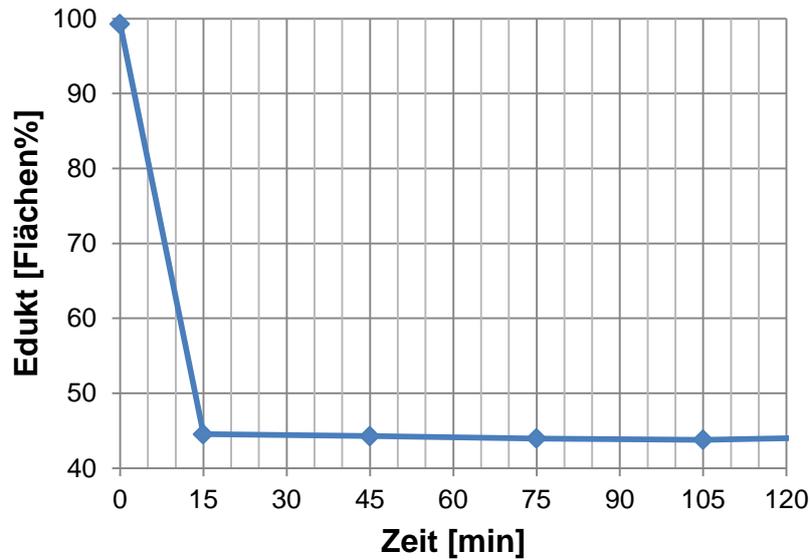


Abbildung 43: Reaktionsverlauf der Metathese Reaktion im 100 L-Maßstab – Auftragung Flächen% Edukt.

Ein Scale-up in den 100 L-Maßstab konnte damit erfolgreich durchgeführt werden. Dabei zeigte sich, dass sich die Reaktion auch im größeren Maßstab sehr gut führen lässt. Es wird erwartet, dass in entsprechenden Maßstäben eine weitere Reduktion der Katalysatormengen realisiert werden kann

3.4.5.2 Untersuchung zur Aufreinigung der Metathese-Reaktionslösung

Um reale Reaktionslösung für die Arbeiten zur Entwicklung einer Aufarbeitungsmethode zu erhalten, wurde die Reaktionslösung einer Metathese im 10 kg Maßstab verwendet. Zum Einsatz kamen dafür eine Hochtemperaturrektifikationsanlage und ein Kurzwegverdampfer (siehe Abbildung 44).



Abbildung 44: Hochtemperaturrektifikation (links) und Kurzwegdestillation (rechts).

Die eingesetzte Reaktionslösung hatte die folgende Zusammensetzung (bestimmt mittels GC über Flächenprozent):

- 12,9 % Octadecen
- 42,7 % Edukt
- 26,4 % Dimethylester

weitere Bestandteile der Lösung waren:

- Dioxan
- Pyridin
- Katalysator

Das Gemisch wurde mit folgender Methode aufgereinigt:

Destillation des Metathese-Produkts mittels der Hochtemperaturrektifikationskolonne. Die Betriebsparameter wurden so gewählt, dass das Octadecen und das Edukt über den Kopf der Kolonne abgetrennt werden (siehe Abbildung 45). Eine Dimethylester-Fraktion wurde zusammen mit schwersiedender Komponente und eventuell entstehenden schwersiedenden Zersetzungsprodukten aus dem Kolonnensumpf entnommen.

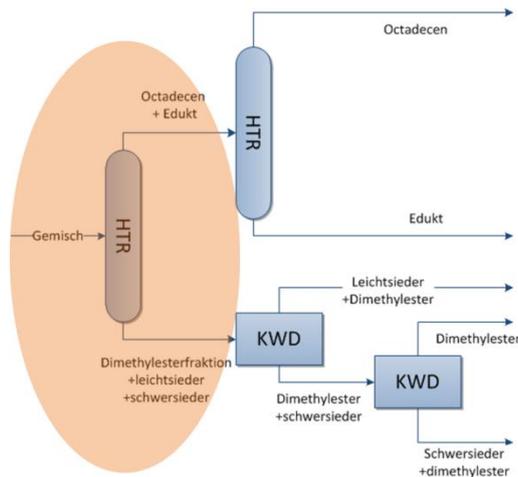


Abbildung 45: Abtrennung einer Dimethylester-Fraktion aus dem Metathese-Produkt.

Das Gemisch aus Octadecen und dem Edukt wird anschließend erneut mittels Hochtemperaturrektifikation fraktioniert, um möglichst reines Octadecen zu erhalten (siehe Abbildung 46).

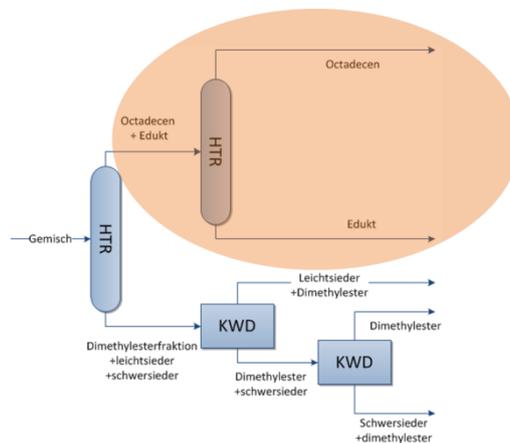


Abbildung 46: Aufreinigung einer Octadecen-Fraktion.

Die Dimethylester-Fraktion aus (1) wird anschließend mit Hilfe eines Kurzwegverdampfers aufgereinigt. Als Destillat wird ein Teil des noch enthaltenen Leichtsieders zusammen mit Dimethylester abgezogen. Der noch enthaltene Katalysator verbleibt im Sumpf (siehe Abbildung 47).

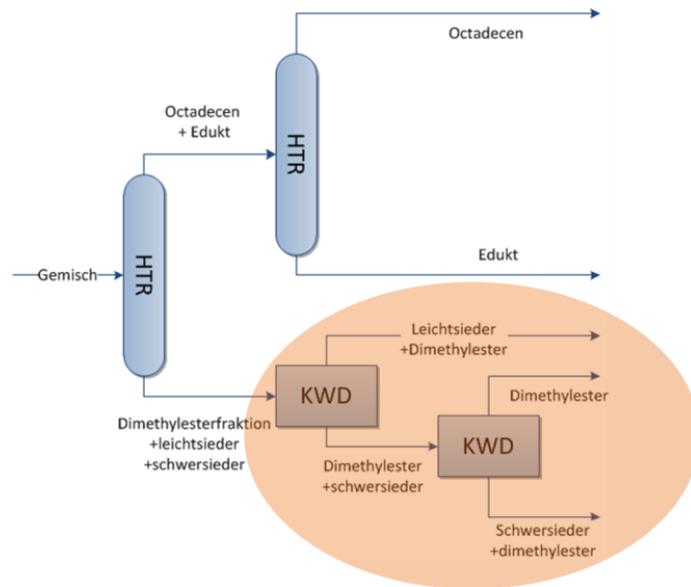


Abbildung 47: Aufreinigung von Dimethylester.

Der Rückstand aus (3) wird dann bei höheren Temperaturen abgedampft, um eine Dimethylester-Fraktion abzutrennen. Der Sumpf enthält ein Gemisch aus Katalysator (welcher keinen signifikanten Dampfdruck besitzt) und anderen schwersiedenden Stoffen. Weiterhin sind geringe Restmengen des Dimethylesters enthalten.

Der gesamte Fraktionierungsverlauf bzw. die Aufreinigungskaskade ist in Abbildung 48 zusammengefasst.

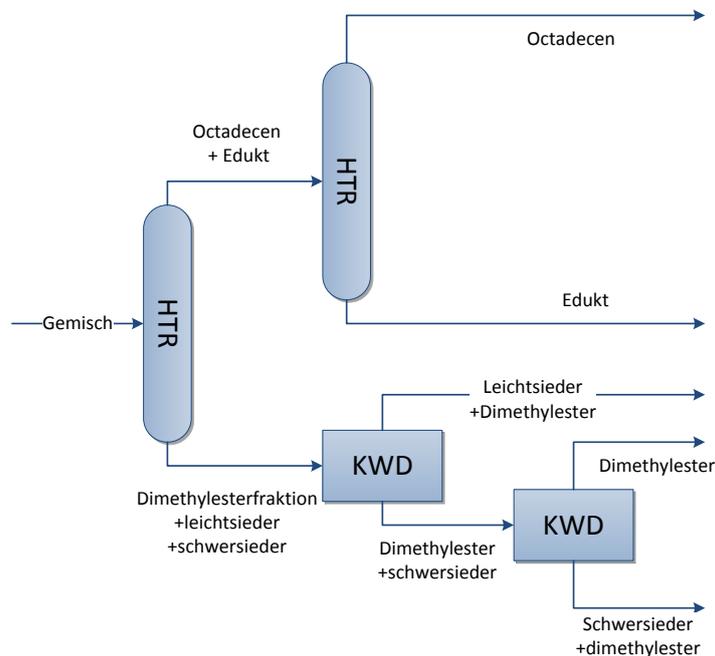


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Aufreinigungsmethode.

Abbildung 49 zeigt einen typischen Temperaturverlauf während der Destillation des Metathese-Produkts.

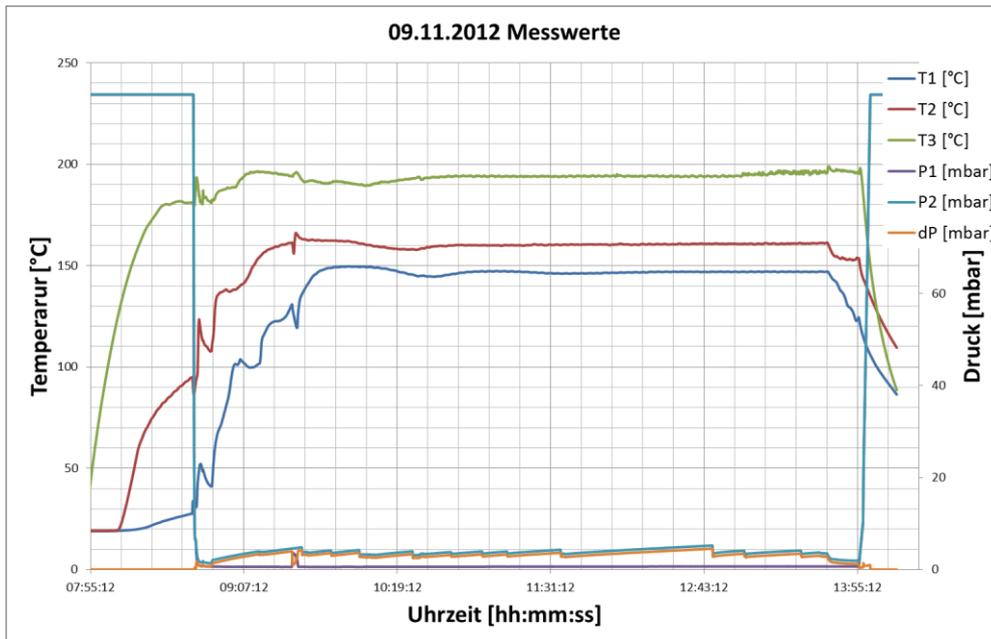


Abbildung 49: Charakteristischer Temperaturverlauf der Hochtemperaturrektifikation bei der Destillation des Metatheseprodukts (1).

Als Ergebnis wurden folgende Produktreinheiten nach der Fraktionierung erreicht:

- Octadecen-Fraktion: 61,1%
- Edukt-Fraktion 93%
- Dimethylester-Fraktion 83,7%

Die Konzentrationen der jeweiligen Fraktionen sind in Tabelle 51 zusammengefasst, ein Foto der jeweiligen Fraktionen findet sich in Abbildung 50.

Tabelle 51: Erzielte Konzentrationen bei der Aufreinigung von Metathese-Produkten.

Fraktion	Octadecen	Edukt	Dimethylester
Metathesefraktion	12,9%	42,7%	26,4%
Octadecenfraktion	61,1	0,0%	0,0%
Eduktfraktion	0,0%	93,7%	0,0%
Octadecen+Eduktfraktion	23,0%	58,4%	0,0%
Dimethylesterfraktion + Leichtsieder + Schwersieder	0,0%	0,8%	77,7%
Dimethylester + Schwersiederfraktion	0,0%	0,0%	80,9%
Leichtsieder + Dimethylesterfraktion	0,2%	4,0%	67,3%
Dimethylester	0,0%	0,0%	83,7%
Schwersieder + Dimethylester	0,0%	0,0%	43,7%



Abbildung 50: Edukt (links) - Aufgereinigte Fraktionen (Octadecen (Mitte)) und Dimethylester (rechts).

Bei der Aufreinigungskampagne zeigte sich die grundsätzliche Trennbarkeit des Produktgemisches, der Trennschnitt der Destillation konnte weiter optimiert und geeignete Parameter identifiziert werden.

Nach Abschluss der Aufreinigung und analytischer Charakterisierung erfolgt eine Bemusterung der Partner mit dem C18-Diester und dem C18-Alken. Hier wurden das Fraunhofer IGB und die Firma Hobum bemustert, um Versuche zur Epoxidierung zu ermöglichen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Rahmen des Projektes die Metathese umfangreich untersucht und im Labormaßstab optimiert werden konnte. Es war dabei möglich innovative Katalysatoren zu finden und mit diesen die technische Machbarkeit der Reaktion und der anschließenden Aufreinigung zu demonstrieren. Im Rahmen der Arbeiten erfolgte dabei ein Scale-up bis in den 100 L Maßstab und eine Bemusterung der Partner mit Produktmustern. Hierbei konnte das folgende Verfahrensschema entwickelt, demonstriert und durch den Partner KIT in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer ICT bewertet werden (siehe Abbildung 51).

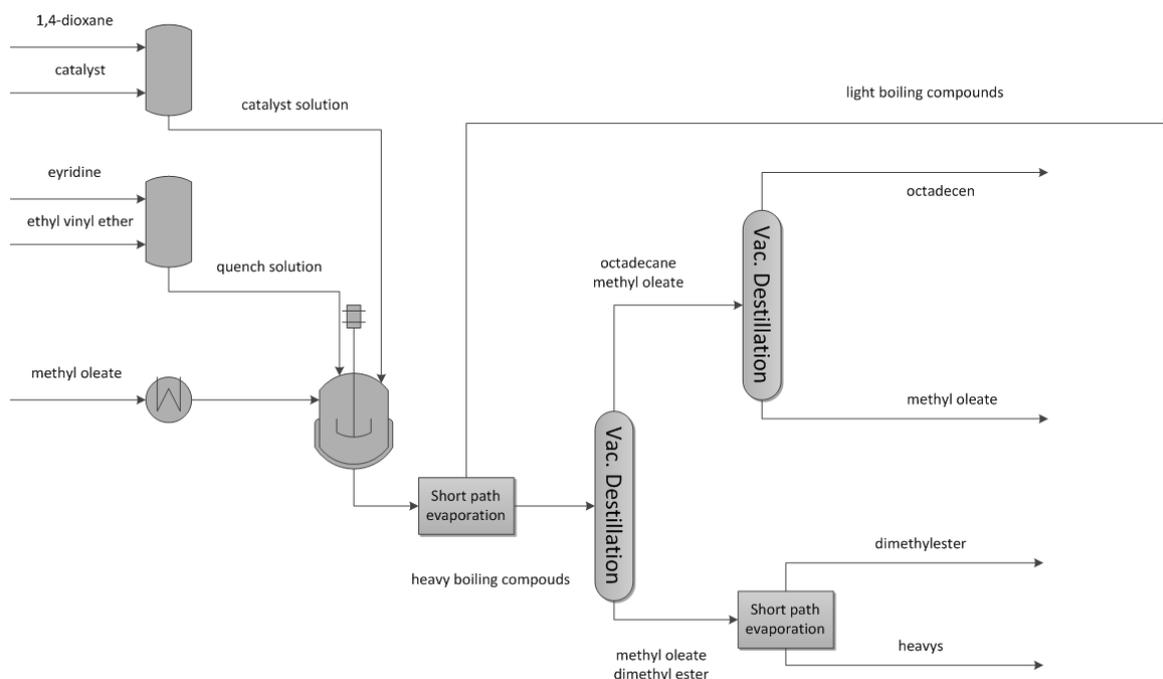


Abbildung 51: Verfahrenskonzept der Metathese von Methyloleat.

3.4.6 Herstellung stickstoffhaltiger Verbindungen (Fraunhofer ICT; Taminco, Umicore)

Als Grundlage für die Bearbeitung des Arbeitspaketes „Synthese von stickstoffhaltigen Verbindungen“ wurde von den Partnern Taminco, Umicore sowie dem Fraunhofer ICT eine gemeinsame umfangreiche Literaturrecherche zum Thema „Synthese von Aminen“ durchgeführt und ausgewertet. Ziel der Recherche war es, mögliche Routen für die Synthese hauptsächlich primärer Amine zu identifizieren und im Hinblick auf eine mögliche technische Umsetzung zu bewerten.

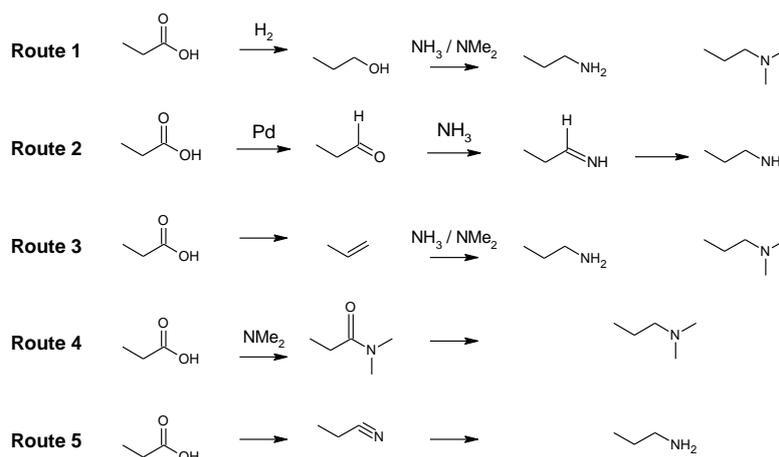


Abbildung 52: Für die Recherche selektierte mögliche Syntheserouten für die Aminsynthese.

Dabei wurde als Edukt für die Arbeiten des Fraunhofer ICT (gemeinsam mit der Firma Umicore) die Route 2 (Aldehyd-Route) ausgewählt (siehe Abbildung 52). Hierbei sollen grundsätzlich Carbonsäuren bzw. ein Ester zum Einsatz kommen, wie sie beispielsweise aus in Kapitle 3.2.4 (Metathese und Herstellung längererkettiger stickstoffhaltiger Verbindungen) in Form des 1,18-Octadecandicarbonsäuredimethylesters zugänglich sind. Aufgrund der Komplexität erfolgte eine Festlegung auf den zweiten Schritt der Reaktion, also der Umsetzung vom Aldehyd zum Amin, welche bereits alleine eine komplexe und äußerst interessante Reaktion darstellt.

Die Firma Taminco führte unterstützend aufgrund dort vorhandener umfangreicher Erfahrungen eine Untersuchung zur Machbarkeit der Route 4 (Amid-Route) durch. Die Arbeiten wurde mit dem Hinblick einer ersten Überprüfung auf grundsätzliche Machbarkeit geplant und von der Firma Taminco durchgeführt. Aufgrund des deutlich geringeren Umfangs dieses APs und der thematischen Nähe zu den Arbeiten des Fraunhofer ICT, erfolgt die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse an dieser Stelle. Die Firma Taminco untersuchte weiterhin schwerpunktmäßig die Aminierung von Glycerin, welche im entsprechenden Bericht der Firma Taminco umfassend beschrieben ist.

3.4.6.1 Herstellung von Aminen über das Amid (Taminco)

Die im Projekt (durch Metathese oder fermentative ω -Oxidation von Ölsäure) synthetisierte C18-Dicarbonsäure besitzt einen hohen Siedepunkt, was eine Synthese in der Gasphase unmöglich macht und Reaktionen in der Flüssigphase in den Fokus rückt. Aufbauend auf der durchgeführten Recherche wurde durch die Firma Taminco die Machbarkeit der Syntheseroute über das Amid untersucht. Als Modellverbindung wurde für die ersten Arbeiten die Sebacinsäure (C10) gewählt.



Abbildung 53: Synthese des Dimethylamids der Sebacinsäure.

Für die Arbeit mit Sebacinsäure wurden verschiedene Protokolle im 50 mL Maßstab (Batch) durchgeführt und bewertet. Es wurden dabei Methoden gefunden, die eine schnelle Konversion von Disäuren zu Diamid ermöglicht (2-4 h Reaktionszeit). Aufgrund der Gleichgewichtseinstellung konnte jedoch keine vollständigen Umsatz (> 99 %) erzielt werden. Problematisch ist dabei, dass freie Säuren die eingesetzten Hydrierkatalysatoren, die zur Reduktion der Diamide verwendet werden, vergiften.

Tabelle 52: Synthese des Diamids aus der Sebacinsäure.

Temperatur	DMA-Äquivalente	C10-diamid %	Zwischenprodukt %	Wasser %	Sebacinsäure %	Andere %
180 °C	4,3	92,17	2,95	0,01	3,95	1,42
200 °C	4,0	94,91	1,61	0,19	2,23	1,44
220 °C	3,5	93,43	1,86	0,05	3,56	1,08
240 °C	4,1	95,31	1,29	0,05	2,36	0,98

Es wurde deshalb ein Mehrstufenansatz mit dem Ziel eines erhöhten Umsatzes untersucht. Hierbei wird das Edukt zweimal mit einem Überschuss DMA umgesetzt und nach jedem Umsatz leichtflüchtige Komponenten und Wasser entfernt. Dadurch konnte der Umsatz der Reaktion deutlich erhöht werden, ohne dass weitere Nebenprodukte entstanden.

Tabelle 53: Zweistufige Umsetzung der Sebacinsäure zum Diamid.

Temperatur	DMA-Äquivalente	DMA-Äquivalente *	C10-diamid %	Zwischenprodukt %	Wasser %	Sebacinsäure %	Andere %
180 °C	4,7	3,5	96,75	0,68	0,02	1,56	0,99
200 °C	3,8	3,9	86,10	7,03	0,14	5,91	0,86
220 °C	4,2	2,8	98,53	/	0,00	0,56	0,92
240 °C	4,5	3,7	98,14	0,10	0,00	0,82	1,05

Bei den Arbeiten im Projekt wurde neben Dimethylamin auch Ammoniak für die Synthese primärer Amide erfolgreich eingesetzt. Dabei wurden keine Nitrile als Nebenprodukte gebildet. Als problematisch erwies sich der hohe Schmelzpunkt des Diamids von über 170 °C, was das Handling des Amids im Folgeschritt der Reduktion erschwert. Die Hydrierung des Amids zum Amin wurde im Batchautoklaven unter Verwendung gepulverter Katalysatoren getestet. Als Modellverbindung wurde das N,N-Dimethyldecanamid gewählt, welches kommerziell erhältlich ist. Als Katalysator wurden Cu, Ni und Co-basierte Katalysatoren eingesetzt. Dabei wurden Temperaturen zwischen 200 °C und 250 °C und Drücke von 50 bar gewählt. Die Umsätze erwiesen sich dabei als sehr niedrig. Weiterhin entstanden Nebenprodukte wie Alkohole, Dialkylamine und sekundäre Amine, welche mittels GC-MS und GC analysiert wurden.

Die Firma Umicore unterstützte die Arbeiten durch die Lieferung von Ru und Ir-basierten homogenen Katalysatoren. Diese wurden unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel und der gewählten Menge an verwendetem Liganden hergestellt. Dabei zeigten alle durchgeführten Synthesen, auch bereits in der Literatur beschriebene, kaum Umsatz zum Amin.

Die Arbeiten wurden deshalb zugunsten der Untersuchung der Aminierung von Glycerin durch die Firma Taminco, sowie der Umsetzung von Aldehyden zum Amin durch das ICT, nicht weiter fortgeführt.

3.4.6.2 Reduktive Aminierung von Aldehyden (Fraunhofer ICT)

Bei den Arbeiten zur reduktiven Aminierung von Aldehyden wurde der Aldehyd 1-Decanal als Modelverbindung eingesetzt. Für das AP wurde das Fraunhofer ICT durch die Firma Umicore bei Ihren Arbeiten im Rahmen des APs mit Katalysatoren (homogene Katalysatoren) versorgt und bei der Katalysatorauswahl unterstützt.

Für die Arbeiten wurden zu Beginn die in Tabelle 54 aufgeführten Katalysatoren ausgewählt.

Tabelle 54: Übersicht der ausgewählten Katalysatoren.

Katalysatorname
Di- μ -chlor-bis(η -1,5-cyclooctadien)dirhodium(I)
Dichlorotris(triphenylphosphan)ruthenium(II)
Tris(acetylacetonato)iridium(III)
Chiralyt P 797 – (Dichloro(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)-dimer)
Chiralyt P 1163
Dichloro-bis-(2,2,1-bicyclohepta-2,5-dien)-dirhodium
Tris(acetylacetonato)ruthenium(III)
Ru-Hydrido

In Phase 1 bzw. zu Beginn der Phase 2 des Projektes erfolgten Screeningversuche zur reduktiven Aminierung (siehe Abbildung 54) am Fraunhofer ICT in einem 100 mL Autoklaven der Fa. Berghof.

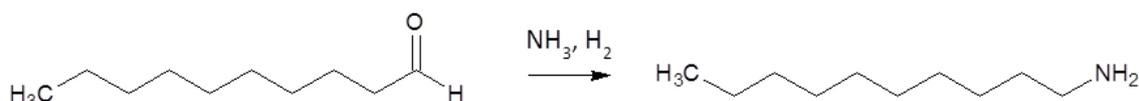


Abbildung 54: Aminierung von Decanal zu Decylamin

Aufgrund apparativer Einschränkungen bei der Dosierung gasförmigen Ammoniaks, wurden die Versuche mit 25%iger wässriger Ammoniak-Lösung durchgeführt. Als Reaktionsbedingungen wurden eine Temperatur von 100 °C (sowie 25, 50, 75°) und ein Wasserstoffdruck von 50 bar bei einer Reaktionszeit von 4 h gewählt.

Erste Analysen mittels IR zeigten einen Umsatz des Aldehyds bei allen Katalysatoren aus Tabelle 54. Vergleichende Versuche ohne Katalysator zeigten jedoch ebenfalls Umsätze des Aldehyds welche jedoch bei allen Reaktionen nicht quantifiziert werden konnten. Da mittels

IR keine genauen Aussagen zur Selektivität der Reaktion (Bildung von Aminen durch reduktive Aminierung vs. Bildung von Alkoholen durch Reduktion) möglich waren, wurde am Fraunhofer ICT versucht eine GC-MS Methode zu entwickeln und zu etablieren, welche entsprechende quantitative Aussagen ermöglicht. Leider erwiesen sich diese Arbeiten als nicht erfolgreich, es wurden deshalb umfangreiche Arbeiten zur Entwicklung einer HPLC-Methode gestartet.

Weiterhin wurde bereits zum Ende der ersten Projektphase aus Eigenmitteln eine Apparatur für Arbeiten mit Wasserstoff und gasförmigem Ammoniak vom Fraunhofer ICT beschafft (siehe Abbildung 55).



Abbildung 55: Apparatur für die Arbeiten mit gasförmigem Ammoniak. Im linken unteren Bereich sind der Kryostat zum Einkondensieren flüssigen Ammoniaks, sowie der Handgriff der Spindelpumpe zu erkennen.

In der Apparatur ist es möglich, in einem Vorratsgefäß, welches mit einem Kryostaten gekühlt wird, gasförmiges Ammoniak einzukondensieren. Der flüssige Ammoniak kann dann im Anschluss mittels einer Spindelpumpe in den Reaktor dosiert werden. Die Masse an zudosiertem Ammoniak wird hierbei über einen Coriolis-Durchflussmesser bestimmt. Darüber hinaus ist die Apparatur mit einem Wasserstoffkompressor und einer Schutzgasversorgung ausgestattet.

Die Anlage ist zum unabhängigen Betrieb von vier Autoklaven ausgelegt. Für die Synthesen der Amine wurde ein Autoklav der Firma Paar beschafft, welcher mit einem Gaseintragsrührer ausgestattet ist und bei Temperaturen von bis zu 350 °C bei 350 bar betrieben werden kann.

Nach der inzwischen erfolgten Inbetriebnahme konnten nun Versuche zur reduktiven Aminierung unter Einsatz von gasförmigem bzw. flüssigem Ammoniak durchgeführt werden. Als Modellverbindung wurde wiederum 1-Decanaldehyd verwendet, welcher im Gegensatz zu den Edukten auf Basis der Ölsäure kommerziell verfügbar ist.

Nachdem umfangreiche Arbeiten zur Entwicklung einer geeigneten Analysemethode (IR, GC usw.) zu Beginn nicht erfolgreich waren, und die durchgeführten Versuche mittels IR etc. nicht hinreichend charakterisiert werden konnten, wurde untersucht, ob die Reaktionslösungen mittels NMR quantifiziert werden können. Dies schien zumindest nach NMR-Messungen der Reinstoffe möglich zu sein, so dass es vermutlich mittels NMR möglich ist, den Reaktionsverlauf zu untersuchen. Bei den Messungen der alten Proben, aber auch der Messung eines Wiederholungsversuchs mittels NMR konnte kein Zielprodukt und somit kein Umsatz der untersuchten Katalysatoren nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass dies auf zu milde Reaktionsbedingungen zurückzuführen war.

Begleitet wurden die Arbeiten durch eine weiterhin stattfindende umfangreiche Methodenentwicklung aus welcher schlussendlich eine HPLC-Methode zur Bestimmung des Umsatzes und des Gehalts an primärem Amin hervorging. Nicht möglich ist hierbei die Bestimmung sekundärer und tertiärer Amine, welche nicht an der bei der Methode eingesetzten Derivatisierungsreaktion teilnehmen. Es ist deshalb nicht möglich mit dieser Methode die Selektivität detailliert zu untersuchen. Es erfolgte deshalb zu Beginn als Hauptkriterium des Screenings die Suche nach einem Katalysator mit hohem Umsatz bei hohem gebildetem Anteil an primärem Amin.

Bei den Arbeiten erfolgte die Ausweitung der Versuchsmatrix bezüglich Temperatur und Druck. Hier wurden Temperaturen im Bereich von 80 bis 140 °C untersucht. Weiterhin wurden Drücke zwischen 70 und 130 bar untersucht. Die Reaktionszeiten wurden üblicherweise mit 5 h gewählt, es fanden jedoch auch Versuche mit verkürzten und verlängerten Reaktionszeiten statt (2,5 und 10 h). Alle Versuche wurden mit gasförmigem Ammoniak üblicherweise, aber nicht ausschließlich, in Methanol als Lösungsmittel durchgeführt. Die verwendeten Katalysatoren basierten auf den Metallen Rhodium, Ruthenium, Iridium und Cobalt wobei verschiedene Liganden, meist jedoch Triphenylphosphin (TPP) zum Einsatz kamen.

Bei den Arbeiten konnte ein Katalysatorsystem gefunden werden, welches bei optimalen Bedingungen Ausbeuten von bis zu 41 % an primärem Amin erreicht. Hierbei wird der Katalysator der ersten Generation zugeordnet. Bei der Reaktion tritt annähernd vollständiger Umsatz auf. Die gebildeten Nebenprodukte konnten nicht mittels HPLC und bedingt durch ihren sehr hohen Siedepunkt ebenfalls nicht mittels GC identifiziert werden. Einige (aber nicht alle) der gebildeten Nebenprodukte konnten qualitativ mittels Pyrolyse-GC als sekundäre und tertiäre Amine identifiziert werden, was sich auch mit den Erwartungen an das Nebenproduktspektrum deckt.

Weiterhin wurde ein bisher nicht als aktiv für die untersuchte Reaktion bekannter Katalysator gefunden, welcher aktuell Ausbeuten von 20 % primärem Amin liefert. Hierbei wurde eine Versuchsmatrix mittels Design of Experiments DoE (Software: Statgraphics, Statpoint Technologies, Inc.) erstellt und ausgewertet. Die Auswertung der zehn durchgeführten Versuche belegt eine deutliche Temperaturabhängigkeit der durchgeführten Reaktion (siehe Abbildung 56).

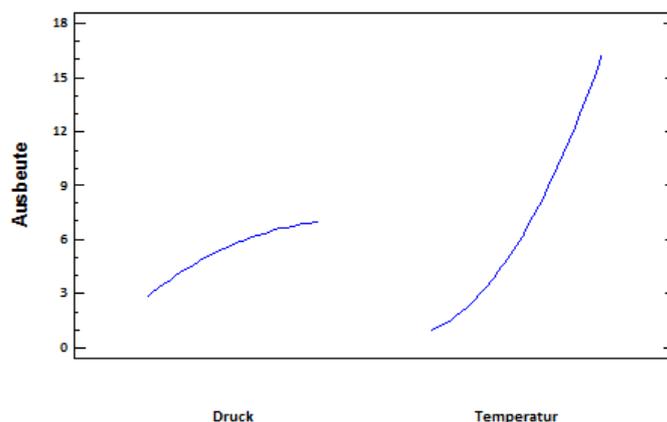


Abbildung 56: Einfluss der Parameter Druck und Temperatur auf die Ausbeute der Reaktion an primärem Amin.

Der gewählte Reaktionsdruck ist im Vergleich hierzu ebenfalls vom Einfluss her signifikant aber deutlich geringer als der Einfluss der Temperatur. Bei der Auswertung des DoE zeigte sich weiterhin, dass das Optimum der Ausbeute vermutlich außerhalb des untersuchten Bereiches liegt. Durch weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen und der verwendeten Liganden etc. wird deshalb mit weiteren Verbesserungen der Reaktion zu rechnen sein. Im Moment findet zu letztem Katalysator eine Prüfung auf Patentierbarkeit durch die Partner ICT und Umicore statt.

3.4.7 Aminierung von Glycerin (Taminco)

Fettsäuren und Derivate werden in großen Mengen in der chemischen Industrie und als Biokraftstoff verwendet. Größtenteils werden diese Fettsäuren aus natürlichen Fetten und Ölen unter Bildung von Glycerin als Nebenprodukt gewonnen. Zum Beispiel werden in der Biodieselproduktion 100 kg Glycerin pro Tonne Biodiesel erzeugt. Zur Schaffung eines höheren Mehrwertes beinhaltet ein nachhaltiges Produktionsmodell einer Bioraffinerie daher auch Absatzmärkte für Glycerin. Viele Unternehmen und Forschungsgruppen haben Vermarktungsmöglichkeiten für Glycerin analysiert¹²⁷.

Im großtechnischen Maßstab werden Amine üblicherweise über ihre korrespondierenden Alkohole hergestellt. Dabei kommen üblicherweise drei verschiedene Katalysatortypen zum Einsatz: feste Säuren, Phosphate und reduzierte Metallkatalysatoren. In jüngster Zeit wird verstärkt über den Einsatz homogener Katalysatoren, z.B. auf Basis von Ruthenium berichtet^[2,1] wobei entsprechende Systeme bisher nicht im technischen Maßstab für die Synthese von Bulkchemikalien zum Einsatz kamen.

Im Projekt war es ein Ziel eine Technologie zu entwickeln, die die selektive Umwandlung von Glycerin in funktionelle Aminoalkohole oder Diamine erlaubt. Solche Moleküle könnten als Bausteine für die Herstellung erneuerbarer Tenside oder von Flockulierungsmitteln Verwendung finden.

¹²⁷ Pagliaro, M. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, (2007), 4434-4440

3.4.7.1 Aminierung von Glycerin in der Flüssigphase an heterogenen reduzierten Metalkatalysatoren

Glycerin ist eine hochviskose hochsiedende Verbindung, was aufgrund der schweren Verdampfbarkeit eine Aminierung in der Flüssigphase nahelegt. Es wurden deshalb Versuche unter Verwendung typischer Kupferkatalysatoren durchgeführt. Dabei wurde bei Temperaturen von 200 °C bis 250 °C gearbeitet. Durch Zusatz von Wasserstoff werden die Metalle in reduzierter Form gehalten. Als Aminierungsreagenz wurde Dimethylamin eingesetzt. Reaktionen wurden in einem 300 ml Hochdruckautoklaven, welcher die Kontrolle des benötigten erhöhten Drucks erlaubt, durchgeführt. Verschiedene heterogene Katalysatoren wurden verwendet. Im Fall von pulverförmigen Katalysatoren oder Extrudaten, wurde der Katalysator in einem Katalysatorkorb im Inneren des Reaktors platziert (siehe Abbildung 57 unten).

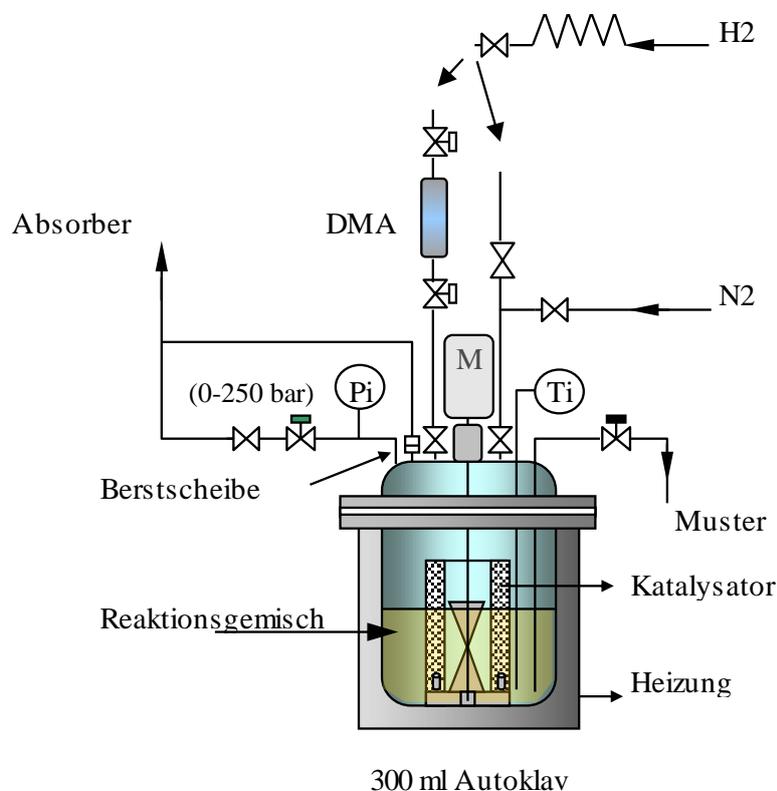


Abbildung 57: Versuchsaufbau für Screening Tests in der Flüssigphase.

Bei den Versuchen wurden komplex Reaktionsmischungen mit bis 30 verschiedenen Aminen erhalten. Dies liegt in der Tatsache des Auftretens dreier konkurrierender Reaktionen begründet: Der Aminierung (Zielreaktion), Hydrogenolyse führt zu C3 Molekülen aus trifunktionalem Glycerin) und der Transalkylierung führt zu sekundären Aminen anstelle der erwarteten tertiären Amine). Die Produktverteilung konnte zwar im begrenzten Umfang durch Variation der Reaktionsparameter beeinflusst werden, trotzdem konnte unter Verwendung der Katalysatoren der ersten Generation kein, zugleich ökonomisch relevantes, System gefunden werden.

Bei Temperaturen, die zu hohen Umsetzungen führen war kein einzelnes Produkt in dem Reaktionsgemisch mit einer Selektivität, die größer als 25% war, vorhanden. Die Selektivität zu einem Einzelprodukt könnte etwas durch Arbeiten mit niedrigen Temperaturen verbessert werden, aber da wurde die Umwandlung stark beeinflusst (siehe Abbildung 58)

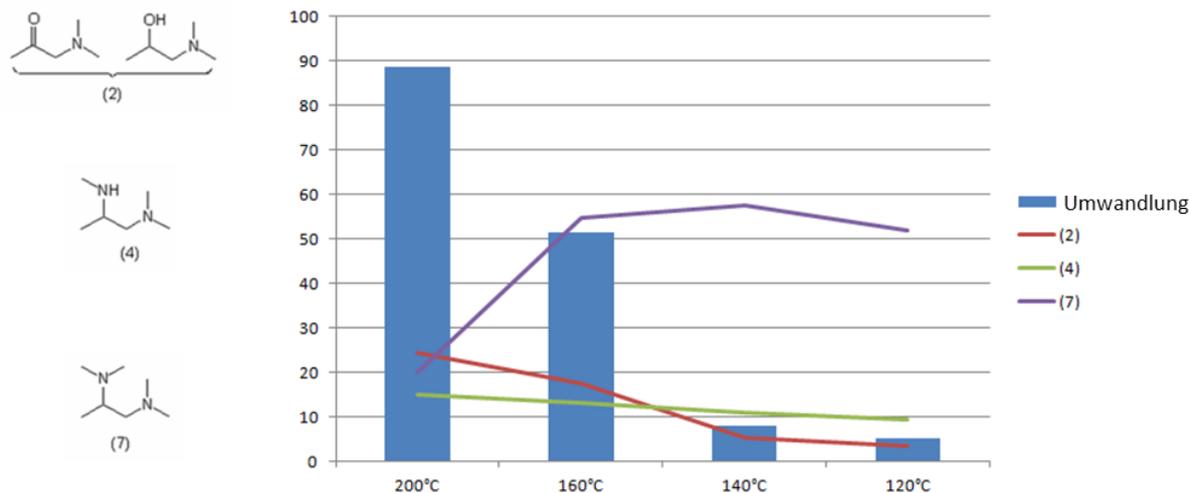


Abbildung 58: Einfluss der Temperatur auf die Selektivität und die Umwandlung von flüssiger Phase Aminierung von Glycerin mit DMA über einen Cu-Katalysator.

3.4.7.2 Aminierung von Glycerin in der Flüssigphase mit homogenen Metallkatalysatoren

Die bei der Verwendung heterogener Katalysatoren notwendigen harschen Reaktionsbedingungen verstärken die beobachteten Nebenreaktionen Hydrogenolyse und Transalkylierung. Es wurde deshalb untersucht, ob die für die homogene Katalyse in der Regel notwendigen deutlich milderen Bedingungen Nebenreaktionen zurückdrängen und somit die Selektivität der Reaktion erhöht wird. Ein weiterer Vorteil der homogenen Katalyse ist die Möglichkeit der Optimierung der Selektivität und Aktivität durch Veränderung der Liganden. Darüber hinaus kann die Reaktion durch Zugabe von Additiven weiter beeinflusst werden.

Im Rahmen der Arbeiten wurden mehr als 300 Experimente in einem Hochdurchsatz-Screening durchgeführt (siehe Abbildung 59).

Liganden und zentrale Metallatome wurden in Verbindung mit den Reaktionsbedingungen und der Zugabe von verschiedenen Additiven, verändert. Aus den Screeningversuchen wurde festgestellt, dass Pincer Komplex **2** besonders gute Aminierungsfähigkeiten hat. Der Komplex **2** kann über eine Ligandenaustauschreaktion mit **1** in Isopropanol als Lösungsmittel hergestellt werden (siehe Abbildung 60).



Abbildung 59: HT-Screening-Geräte mit Hochdruckschläuchen.

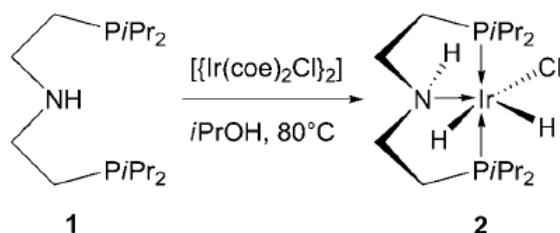
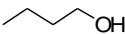
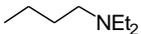
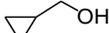
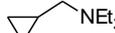
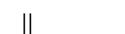
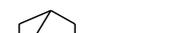
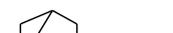
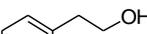
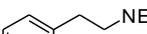
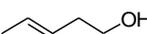
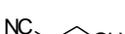
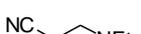
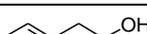
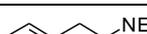
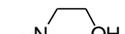


Abbildung 60: Synthese des Ir-Pincer Komplexes 2.

Die Aminierungsleistung des Komplexes kann mit verschiedenen Alkoholen als Substrat nachgewiesen werden (siehe Tabelle 55). Auch eine sehr gute Verträglichkeit mit funktionellen Gruppen konnte beobachtet werden.

Tabelle 55: Aminierung von monofunktionellen Alkoholen mit Ir-Komplex 2.

	Alkohol	Amin	Ausbeute [%]
1			35 40 ^[c]
2			35 ^[f]
3			39 40 ^[c]
4			60 79 ^[c]
5			40
6			54 55 ^[c]
7			66 71 ^[c]
8			74 ^[e] 82 ^[c,e] 98 ^[d,e]
9			21 40 ^[f]
10			27 98 ^[f,g]
11			15 60 ^[f]

[a] Bedingungen, soweit nicht anders angegeben: Alkohol (1 mmol), Ir-Komplex 2 (1 mol%), Molares Verhältnis von Alkohol / Amin = 1: 3, T = 120 °C; [b] GC-Ausbeute wurde mit N-Methylpyrrolidon als interner Standard bestimmt; [c] NaOtBu wurde als Zusatzstoff verwendet (Molares Verhältnis von 2 zu NaOtBu = 1:1.1); [d] NaHCO₃ wurde als Zusatzstoff verwendet ((Molares Verhältnis von 2 zu NaHCO₃ = 1:1.1); [e] bis 5 % der N,N-diethyl-3-hydroxypropanamide und 3-(diethylamino)-N,N-diethylpropanamide wurden als Nebenprodukt gebildet; [f] T = 140 °C, t = 24 h, Katalysator = 1 mol %; [g] Molares Verhältnis von Alkohol / Amin = 1:1.2.

Der Katalysator wurde auch mit multifunktionellen Alkoholen als Substrat bewertet. Als Modellverbindungen wurden dabei Ethylenglykol und Alkylamine verwendet (siehe Abbildung 61). Hierbei zeigte der Ir-Pincer Komplex **2** selbst bei milden Reaktionsbedingungen (< 150 °C) einen Vollumsatz bei hoher Selektivität zum Aminoalkohol. Die Reaktion verlief ohne Lösungsmittel und mit einem Ethylenglykol/Diethylaminverhältnis von 1:3 bei 120°C. Nach 20h wurde in Gegenwart von 1,0 mol% des Katalysators, eine Ausbeute von 99% erzielt. Die Reaktion verlief in allen Fällen ohne die Bildung von Nebenprodukten. In starkem Gegensatz dazu, zeigte keiner der anderen getesteten Katalysatoren vergleichbare Ergebnisse.

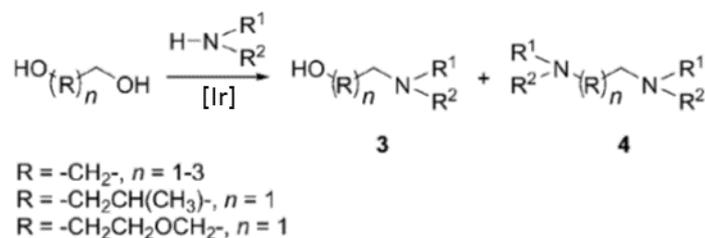


Abbildung 61: Modellreaktion für die Aminierung von polyfunktionellen Alkoholen mit Ir-Komplex 2.

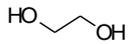
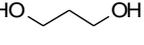
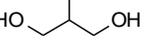
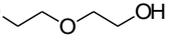
Tabelle 56: Ir katalysierte Aminierung von Ethylenglycol mit Diethylamin.

	Katalysator	Menge [mol%]	Zeit [Stunde]	Ausbeute [%] ^[e]	Selektivität 3/4
1	2	1.0	20 ^[b]	99	>99/<1
2	2	1.0	6 ^[b]	97	>99/<1
3	2	1.0	2 ^[c]	96	>99/<1
4	2	0.3	20 ^[b]	84	>99/<1
5	2	0.3	6 ^[b]	83	>99/<1
6	2	0.3	6 ^[d]	69	>99/<1
7	2	0.3	2 ^[c]	86	>99/<1
8	[[Ir(cod)Cl] ₂]	0.3	20 ^[b]	33	50/50
9	[[Ir(cod)Cl] ₂]/3PPh ₃	1.0	20 ^[d]	89	21/79
10	[[Ir(cod)Cl] ₂]/2dppe	2.0	20 ^[d]	94 ^[f]	19/81
11	IrCl ₃ .nH ₂ O	1.0	6 ^[b]	8	7/93
12	IrCl ₃ .nH ₂ O/3PPh ₃	1.0	20 ^[b]	20	<1/>99

[a] Bedingungen: Ethylenglykol (1 mmol), das Molverhältnis von Ethylenglykol / Diethylamin = 1: 3, ohne Lösungsmittel; [b] T = 120 °C; [c] T = 140 °C; [d] T = 100 °C; [e] GC-Ausbeute wurde mit N-Methylpyrrolidon als interner Standard bestimmt; [f] bis zu 5% nicht identifizierte Nebenprodukte wurden gebildet.

Ir-Katalysator 2 erwies sich ebenfalls als aktiv und hoch selektiv mit anderen Diolen und Aminen (siehe Tabelle 57).

Tabelle 57: Ir Komplex 2 als Aminierungskatalysator für verschiedene Diole und Amine.

	Katalysator	Amin	Ausbeute [%] ^[b]	Selektivität 3/4
1		HNEt ₂	99 ^[c]	>99/<1
2		HNEt ₂	97 ^[c,g]	>99/<1
3		HNMe ₂	97 ^[c]	99/1
4		Piperidine	99 ^[d,f]	>99/<1
5		Pyrrrolidine	96 ^[e,f]	99/1
6		HNMe ₂	93 ^[d,g]	90/10
7		HNEt ₂	86 ^[c]	>99/<1
8		HNEt ₂	88 ^[d]	99/1
9		HNEt ₂	91 ^[c,f]	98/2
10		HNEt ₂	86 ^[c]	>99/<1
11		HNEt ₂	87 ^[d]	99/1
12		HNEt ₂	48 ^[c]	88/12
13		HNEt ₂	56 ^[c,f]	84/16
14		HNEt ₂	77 ^[d]	76/24
15		HNMe ₂	86 ^[d,g]	70/30
16		HNEt ₂	44 ^[c]	80/20
17		HNEt ₂	62 ^[d]	75/25
18		HNMe ₂	49 ^[d,g]	70/30

[a] Bedingungen: Diol (1 mmol), Katalysator (1 mol %), molares Verhältnis von Diol/Amin = 1:3, t = 20 h; [b] GC-Ausbeute wurde mit N-Methylpyrrolidon als interner Standard bestimmt; [c] T = 120°C; [d] T = 140°C; [e] T = 100°C; [f] NaOtBu als Zusatzstoff (Molares Verhältnis von 2 zu NaOtBu = 1:1.1); [g] Reaktion wurde in DME (Konzentration von Diol = 1.2 molL⁻¹) durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchung wurden in ChemCatChem publiziert¹²⁸. Der Versuch der Übertragung der Ergebnisse auf Glycerin war jedoch leider nicht erfolgreich. Es wurde deshalb die Versuchsmatrix erweitert, mit dem Ziel geeignete Katalysatorsysteme für Glycerin zu finden. Dabei wurde entweder kein Umsatz oder ein vollständiger Abbau zu C1- und C2-Fragmenten beobachtet. Diese Produkte besitzen entweder keinen Wert oder sind über effizientere Routen zugänglich.

¹²⁸ Andrushko, N. et al., *ChemCatChem*, 2 (6), 640-643 (2010)

3.4.7.3 Aminierung von Glycerin in der Flüssigphase mit Photokatalyse

Photokatalyse wird im Allgemeinen bei niedrigen Temperaturen durchgeführt. Die Aktivierung der Reaktion wird hier durch Licht anstelle von Wärme induziert (siehe Abbildung 62). Dies könnte von großem Vorteil bei der Aminierung von Glycerin sein, weil die Temperaturen, die zur thermischen Aktivierung erforderlich sind, in der Nähe oder oberhalb der Temperatur liegen, die den Abbau der Reaktionsprodukte bewirken.

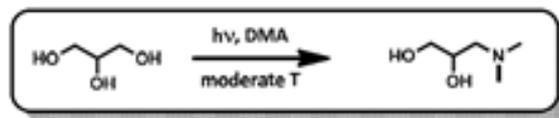


Abbildung 62: Photokatalytische Synthese.

Es wurden deshalb Reaktionsgemische aus Glycerin und Aminen mit UV-Licht in Gegenwart eines Photokatalysators behandelt. Als Photokatalysator wurden TiO_2 und mit Gold dotiertes TiO_2 getestet. Mit mehreren Modellsubstraten, jedoch nur bei Verwendung von mit Metall dotierten TiO_2 , konnten Amine als Reaktionsprodukte beobachtet. Bei der Verwendung von TiO_2 ohne Dotierung wurden durch Oxidation Aldehyde und Imine gebildet. Weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass es sich vermutlich mechanistisch um einen sogenannten "borrowing hydrogen" Mechanismus handelt, wie er bei metallischen Katalysatoren bei thermischer Belastung auftritt (siehe Abbildung 63).

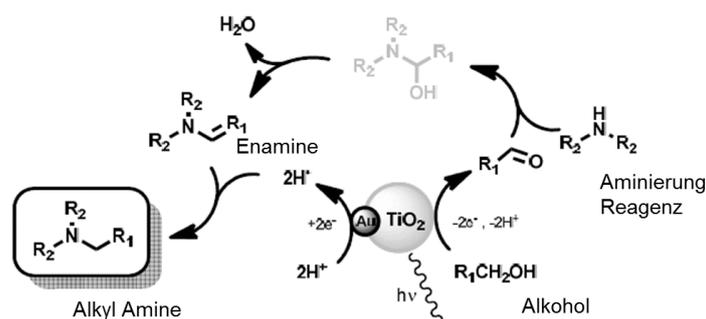


Abbildung 63: Vermuteter Mechanismus der photokatalytischen Reaktion.

Obwohl Screeningversuche mit Modellverbindungen vielversprechende Ergebnisse für diese neuartige Technologie lieferten, wurde die Untersuchung der Photokatalyse für die Glycerin-Aminierung nach zwei Monaten beendet. Grund waren die unter Verwendung von Glycerin, im Vergleich zu den Modell Substraten, erzielten schlechteren Ergebnisse. Darüber hinaus waren die Ergebnisse, die mit den unten beschriebenen klassischen katalytischen Methoden gewonnen wurden vielversprechender.

3.4.7.4 Aminierung von Glycerin in der Gasphase unter Verwendung heterogener reduzierter Metalkatalysatoren

Trotz des hohen Siedepunktes von Glycerin wurde mittels Simulation eine effektive Verdampfung durch Einsatz eines Trägergasstroms vorhergesagt. Dies lässt die Machbarkeit einer Aminierung von Glycerin in der Gasphase wahrscheinlich werden. Der Vorteil einer Gasphasenreaktion ist die im Vergleich zur Flüssigphase schnellere Adsorption/Desorption an der Katalysatoroberfläche, was den Anteil an Nebenreaktionen reduzieren sollte. Es wurde deshalb ein Festbettreaktor im Labormaßstab für die Durchführung von Versuchen in

kontinuierlicher Betriebsführung aufgebaut. Es wurden verschiedene Cu- und Co-Katalysatoren in Pellet-Form getestet, als Aminierungsmittel kam Dimethylamin und Wasserstoff als Trägergas zum Einsatz. Bei den Versuchen wurden wiederum zahlreiche Nebenreaktionen beobachtet. Zusätzlich trat eine Verkokung des Katalysators auf. Auch wenn in der Literatur Methoden zur Regenerierung verkokter Katalysatoren beschrieben sind, sind diese Protokolle nicht auf die verwendeten reduzierten Metallkatalysator-Systeme übertragbar.

3.4.7.5 Aminierung von Glycerin in der Gasphase unter Verwendung heterogener fester Säuren

Vorteil der festen Säuren ist die Möglichkeit auftretende Verkokungen durch thermische Behandlung zu entfernen und die Katalysatoren so zu regenerieren. Die Verwendung von festen Säuren als Katalysator für die Aminierung ist in der Literatur beschrieben, erfordert jedoch üblicherweise deutlich harschere Reaktionsbedingungen¹²⁹.

Bei den Versuchen mit Glycerin zeigten sich große Unterschiede bei der Katalysatorperformance in Abhängigkeit vom eingesetzten Typ. Viele Katalysatoren litten jedoch unter erheblicher Koksbildung. Während diese Art von Katalysatoren durch die Verbrennung von Koks bei erhöhter Temperatur im Beisein von Luft regeneriert werden kann, war die Koksbildungsgeschwindigkeit so schnell, dass die Aminierungs-/Regenerationszyklen unzumutbar kurz würden. Weiterhin war die übermäßige Koksbildung im Inneren der Katalysatorpartikel nachteilig für die Unversehrtheit der Partikel. Schließlich verringerte die Koksbildung natürlich auch die Gesamtausbeute des Verfahrens.



Abbildung 64: Verschiedene Beispiele für feste Säurekatalysatoren, die in einem Festbett-Gasphasen-Testreaktor getestet wurden.

Allerdings, eine Klasse von festen Säurekatalysatoren, die bemerkenswert niedrige Koksbildung aufweisen, wurde gefunden. Durch sorgfältiges Abstimmen der Katalysatorzusammensetzung und des Syntheseverfahrens könnte eine Katalysatorart gefunden werden, die kaum Koks über einen Zeitraum von 100 h kontinuierlichen Dauerbetriebes erzeugt. Durch „design of experiments“, könnte die Leistung des Katalysators außerdem optimiert werden, um ein multifunktionelles Amin in mehr als 70% Selektivität von Glycerin zu ergeben.

¹²⁹ Fischer, A.; Mallat, T.; Baiker, A. *Catalysis Today*, 37, 167-189 (1997).

3.5 Biokatalyse (Eucodis, Universität Halle-Wittenberg, Fraunhofer IGB)

Für biokatalytische Umesterung-, Hydrolyse-, Epoxidierung- und ω -Funktionalisierungsreaktionen wurden neue Biokatalysatoren entwickelt. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf der Entwicklung geeigneter Lipasen gelegt. Ausgewählten Lipasen wurden bezüglich prozessrelevanter Eigenschaften charakterisiert (3.5.1). In einem zweiten Schritt wurden die Lipasen auf ihre Eignung in spezifischen Reaktionen weiter untersucht (Epoxidierung (3.5.2 und 3.5.3), Veresterung (3.5.1.4 und 3.5.8.1), Umesterung (3.5.1.5 bis 3.5.1.7 und 3.5.8.2). Parallel wurden Expressionstämme für die Lipasen entwickelt (3.5.6 und 3.5.7), sowie Immobilisierungsversuche durchgeführt (3.5.5 und 3.5.6.3). Ausgewählte Lipasen wurden fermentativ hergestellt und für Hochskalierungsexperimente eingesetzt.

Als weiterer Schwerpunkt wurden Produktionsstämme zur ω -Funktionalisierung von Fettsäuren oder Fettsäuremethylestern untersucht (0). Verschiedene S1-Stämme wurden ausgewählt und erste Stammoptimierungen durchgeführt. Parallel erfolgte eine Verfahrensoptimierung mit dem *C. tropicalis*-Stamm H3434 (3.5.10).

3.5.1 Untersuchung und Auswahl geeigneter Lipasen (Eucodis)

Mit dem Ziel der Verwertung von heimischen pflanzlichen Ölen und der Gewinnung von Synthesebausteinen in Form von freien Fettsäuren, Fettsäureestern sowie Glycerol erfolgte auf der Grundlage der Enzymtechnologie der Eucodis Bioscience die Bereitstellung und detaillierte Charakterisierung von insgesamt 31 neuen Lipasen und Esterasen, von denen elf **Eucodis** Lipasen (EL001-EL016) in größeren Mengen produziert und an das IGB für Epoxidierungsstudien verschickt wurden. Zur Enzymproduktion im Labormaßstab erfolgte eine Expression in *E. coli* im 1 Liter- bzw. 10 Liter-Maßstab als batch bzw. fed batch Fermentation. Nach der Zellernte und dem Zellaufschluss schlossen sich zur Reinigung eine Hitzefällung und/oder Ammoniumsulfatfällung an. Nach einem optionalen Puffertausch wurde der Lipase-enhaltende Extrakt einer Sprüh- oder Gefriertrocknung unterworfen.

Für eine Produktion der finalen Enzymkandidaten EL012 und EL070 (Katalysatoren erster und zweiter Generation) über den Labor (Gramm)maßstab hinaus wurden die Lipase-enhaltenden Vektoren sowie die Fermentations- und Reinigungsprotokolle an das CBP und die Uni Halle-Wittenberg versendet.

Mit dem Ziel einer gerichteten Immobilisierung der EL012 wurden darüber hinaus mittels molekularbiologischer Methoden *N*- bzw. *C*-terminale Immobilisierungstags eingefügt sowie Aminosäureaustausche gegen Cystein vorgenommen. Die Expression der von Eucodis erzeugten EL012 Varianten, die gerichtete Immobilisierung und Charakterisierung bezüglich Hydrolyse- und Syntheseaktivität der Enzyme erfolgte im Arbeitskreis von Professor Pietzsch (Uni Halle-Wittenberg).

Basierend auf den etablierten Fermentations- und Reinigungsprotokollen der EL012 wurde am Fraunhofer CBP ein Scale-up der EL012-Produktion vorgenommen und eine ungerichtete Immobilisierung des Biokatalysators unter Variation des polymeren Trägermaterials durchgeführt. Die Bestimmung der Hydrolyse- und Syntheseaktivität der EL012-OC- und EL012-OD-Chargen sowie die Untersuchung des Einflusses der Trocknungsmethode auf die Aktivität des immobilisierten Enzyms erfolgten in Kooperation mit der Uni Halle und mit Eucodis Bioscience.

Initiale Studien zur kovalenten ungerichteten Knüpfung der Eucodis Lipasen 12 und 70 an polymere Enzymcarrier beinhalteten zunächst eine Optimierung des Trägermaterials hinsichtlich Partikelgröße und Porendurchmesser (ReliZyme™ EP113/S und EP403/S, Sepabeads® EP503/S) sowie Spacerlänge (Epoxy EP, Aminoepoxy HFA, Ethylamino EA; Abbildung 65) und identifizierten ReliZyme™ EP403/S der Fa. Resindion als das Trägermaterial der Wahl. Dieser hochporöse nukleophile Enzymcarrier besteht aus Polymethacrylat, hat eine Partikelgröße von 100-300 µm, einen Porendurchmesser von 40-60 nm und eine funktionelle Epoxygruppe, über die das zu immobilisierende Protein gekuppelt wird. Charakteristische Merkmale wie eine hohe chemische, physikalische und thermische Stabilität sowie ein quellarmes Verhalten und eine mechano-osmotische Resistenz zeichnen dieses Material aus.

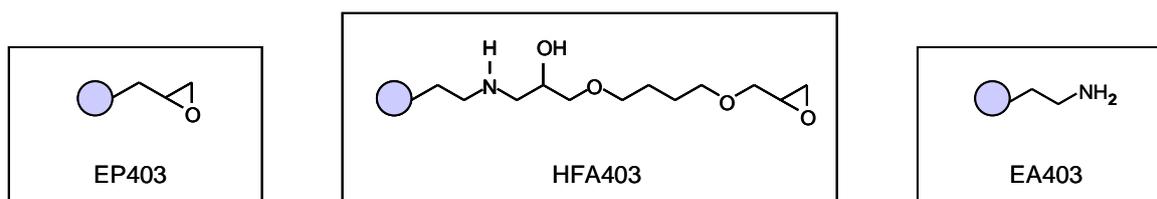


Abbildung 65: Variation des Spacers am Trägermaterial ReliZyme™ EP403.

Darüber hinaus erfolgte eine Variation der Immobilisierungsbedingungen hinsichtlich Puffer (Molarität, pH, Zusatz von Salzen), Nachbehandlung mit Nucleophilen (Ethanolamin, Ethylendiamin, Glycin) und Trocknungsmethode (Luft, Aceton, Methanol, Glycerol). Als optimale Parameter erwiesen sich eine mehrtägige Inkubation von Enzym und Matrix in 1 M Phosphatpuffer, pH 7 bei 25°C, kein Posttreatment und Lufttrocknung.

Prozessrelevante Eigenschaften wie Syntheseaktivität (siehe Abbildung 66), Temperaturstabilität und Wiederverwendbarkeit (siehe Abbildung 67) derartiger immobilisierter EL070-Proben wurden anhand der Veresterung von Palmitinsäure mit Methanol in Toluol eingehend untersucht.

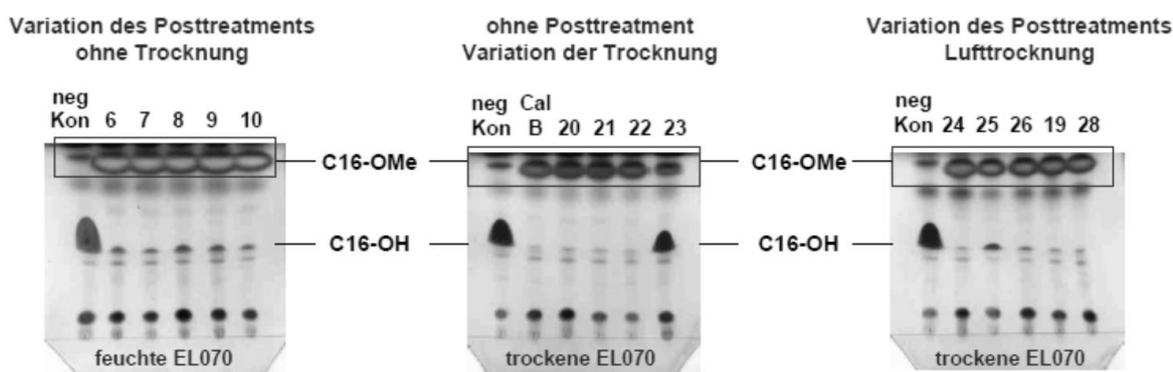


Abbildung 66: Einfluß von Posttreatment und Trocknung auf die EL070immob-katalysierte Methylierung von Palmitinsäure in Toluol. Reaktionsbedingungen: 0,01 mmol Palmitinsäure, 0,1 mmol Methanol, 50 mg feuchte EL070, 10 mg trockene EL070, Toluol, 30°C, 22 h.

Unter den gewählten Bedingungen konnten hocheffiziente Veresterungsprozesse nahezu unabhängig von der Methode des Posttreatments und der Trocknung bei Temperaturen bis zu 60°C und einer maximal 10-maligen Wiederverwendung des trägergebundenen Katalysators nachgewiesen werden.

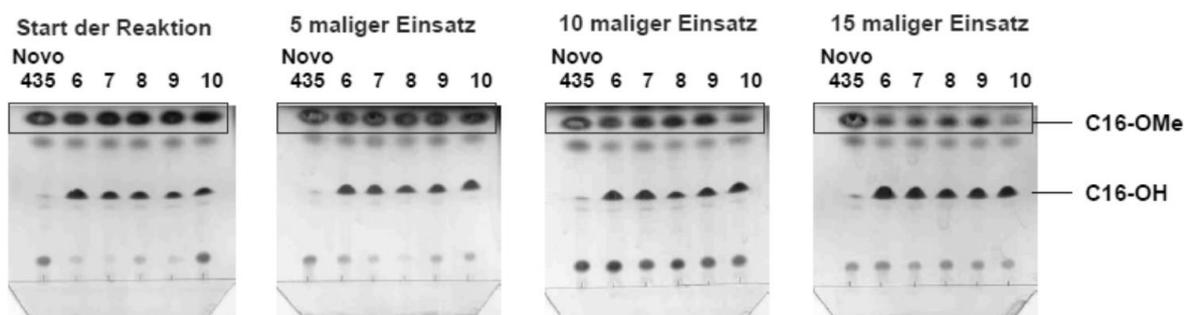


Abbildung 67: Wiederverwendbarkeit der EL070immob für die enzymatische Veresterung von Palmitinsäure in Toluol. Reaktionsbedingungen: 0,01 mmol Palmitinsäure, 0,1 mmol Methanol, 50 mg feuchte EL070, 2 mg Novo435, Toluol, 30°C, 22 h.

Für das weitere Screening wurden die Lipasen in spezifischen Reaktionen eingesetzt und untersucht (siehe folgende Kapitel 3.5.1.1 bis 3.5.1.7, 3.5.2).

3.5.1.1 Fettsäurespezifität der Lipasen

Die initiale Charakterisierung der ausgewählten Biokatalysatoren EL001-EL074 hinsichtlich Temperaturoptimum, Spaltung von Triglyceriden und Substratspezifität für Carbonsäureester ergab eine optimale Enzymaktivität in einem Bereich zwischen 30°C und 40°C sowie einen signifikanten Einfluss der Länge des Acylrestes auf die Hydrolyserate. Die Bestimmung der Fettsäurespezifität der Lipasen war demnach von grundlegender Bedeutung für alle weiteren geplanten Vorhaben und kann routinemäßig mit Hilfe eines spektrophotometrischen Testsystems realisiert werden (siehe Abbildung 68).

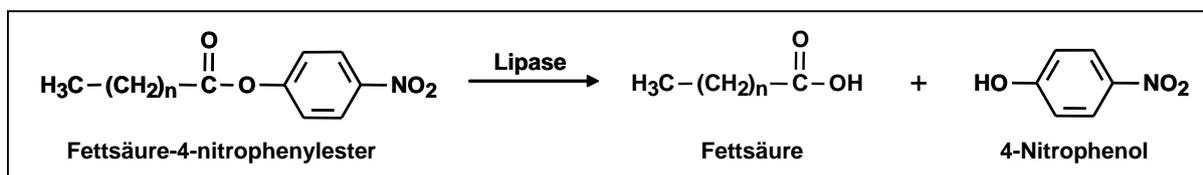


Abbildung 68: Testsystem zur Evaluierung der Fettsäurespezifität von Lipasen.

So führt die Hydrolyse von Fettsäure-4-nitrophenylestern mittels aktiver Lipasen zur Freisetzung der korrespondierenden Fettsäure und 4-Nitrophenol, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden kann. Für das geplante Screening auf die Kettenlängenspezifität von Lipasen wurden zunächst gesättigte Fettsäuren bestehend aus 4, 8, 12, 16, 18, 20 und 22 C-Atomen als Substrate ausgewählt. Da ungesättigte Fettsäuren den Hauptanteil der Fettsäuren in Pflanzenölen ausmachen, sollte darüber hinaus die Akzeptanz der einfach ungesättigten Ölsäure (C18:1), Gondosäure (C20:1) und Erucasäure (C22:1) sowie die der 2- und 3-fach ungesättigten Linol- (C18:2) und Linolensäure (C18:3) als typische Inhaltsstoffe von Pflanzenölen getestet werden. Der Einsatz von *trans*-Ölsäure, Elaidinsäure genannt, war insofern von Interesse, um den Einfluss der Konfiguration der Doppelbindung auf die Substratspezifität von Lipasen aufzuklären.

Während die 4-Nitrophenylester der gesättigten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C4 bis C18 kommerziell erhältlich sind, galt es die Derivate der Arachinsäure (C20:0) und Behensäure (C22:0) sowie aller ein- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren chemisch unter Einsatz der Carbodiimid-Methode herzustellen. Dazu wurden equimolare Mengen an Fettsäure, 4-Nitrophenol sowie Kupplungsreagenz in trockenem Dichlormethan gelöst und

über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Waschen der organischen Phase mit gesättigter NaCl-Lösung, dem Trocknen über NaSO₄ und dem Entfernen des Lösemittels gelang eine Aufreinigung der Rohprodukte mittels Chromatographie. Im Anschluss an die NMR-spektroskopische, massenspektrometrische und chromatographische Überprüfung der Identität und Reinheit der Fettsäure-4-nitrophenylester erfolgte deren Einsatz in einem Mikrotiterplattenassay unter standardisierten Hydrolysebedingungen der Fa. AMANO (pH 7, 37°C). Um eine vollständige Löslichkeit der langkettigen Fettsäuren ≥C16 auch über einen längeren Reaktionszeitraum zu garantieren, wurde sich anstelle eines 0.1 M Phosphatpuffers ohne Detergenzien für ein Reaktionsmedium mit einem Gehalt an 0,5% (m/v) Triton X-100 und 0,1% (m/v) Gummi arabicum entschieden.

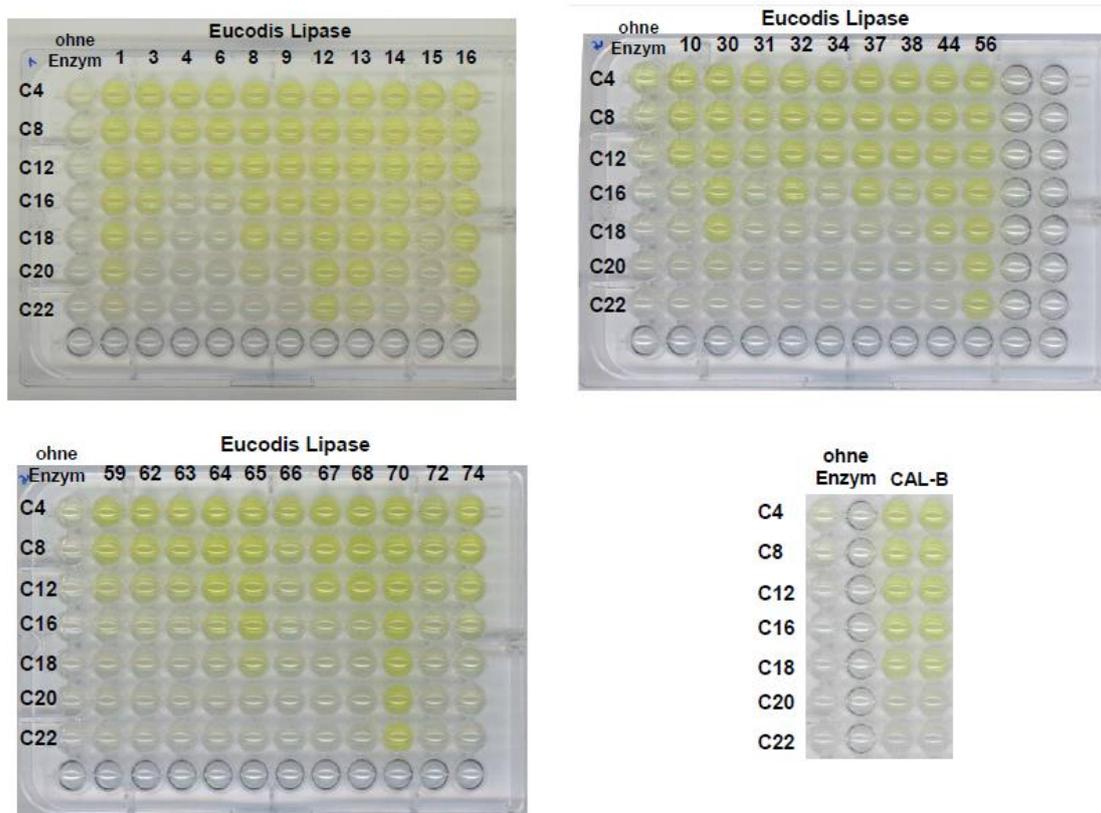


Abbildung 69: Kettenlängenspezifität der Eucodis Lipasen EL001-EL074 und Cal B gegenüber gesättigten Fettsäuren. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphatpuffer, 0,5 % (m/v) Triton X-100, 0,1 % (m/v) Gummi arabicum (pH 7,0); 10% (v/v) DMF; [Fettsäure-4-nitrophenylester]: 0,5 mM; [Lipase]: 0,5 mg/ml; 37°C; 2 h.

In Abbildung 69 sind die Kettenlängenpräferenzen der 31 neuen Eucodis Lipasen EL001-EL074 sowie der *Candida antarctica* lipase B (Cal B; Referenzlipase) nach einer Inkubation von 0.5 mM Fettsäure-4-nitrophenylester mit 0.5 mg/ml Protein über einen Zeitraum von 2 h bei 37°C vergleichend gegenübergestellt. Die gelb gefärbten Kavitäten der Mikrotiterplatten zeigen sehr anschaulich, dass die Fähigkeit von Lipasen zur Hydrolyse von Acyl-4-nitrophenylestern mit zunehmender Kettenlänge der Fettsäure abnimmt. So spalten alle 31 untersuchten Eucodis Lipasen sowie Cal B erfolgreich die Esterderivate der kurzkettigen Buttersäure, Caprylsäure und Laurinsäure. Eine Verlängerung der Kettenlänge der Fettsäure von 12 auf 16 C- bzw. 18 C-Atome hat einen deutlichen Spezifitätsverlust seitens der Lipasen 4, 6, 10, 15, 32, 34, 37, 38, 59, 62, 63, 64, 66, 72 und 74 gegenüber dem Palmitat und zusätzlich der Lipasen 44, 67 und 68 gegenüber dem 4-Nitrophenylstearat zur Folge.

Hervorhebenswert ist der experimentelle Befund, dass im Falle des 20 C-Atome-haltigen Esterderivates eine Hydrolyse durch die Lipasen 1, 8, 12, 13, 14, 16, 56 sowie 70 katalysiert wurde und sogar für die C22-haltige Verbindung 4-Nitrophenylbehenat ein Umsatz durch die 6 Eucodis Lipasen 1,12,13, 16, 56 und 70 beobachtbar war.

Ohne für jede individuelle Lipase ins Detail zu gehen, lässt eine genaue Analyse der kinetischen Daten folgende zusammenfassende Aussagen zu: Alle untersuchten 32 Lipasen wiesen gegenüber dem kurzkettigen Butyrat bzw. dem Octanoat die höchste Aktivität auf, wobei sich die Lipasen 8, 64, 65 und 70 durch Werte >1000 mU/mg hervorhoben.

Der Einsatz des mittellangen Laurinsäurederivates hatte für alle Enzyme zwar eine Verringerung jedoch messbare Hydrolysegeschwindigkeiten zur Folge. Betrachtet man hingegen die Akzeptanz der länger-kettigen Palmitinsäure und Stearinsäure, so wird ein signifikanter Spezifitätsverlust seitens 18 Eucodis Lipasen offenbar, der sich entweder in nicht messbaren oder spezifischen Aktivitäten <1 mU/mg äußerte. Im Falle der langkettigen C20- und C22-haltigen Arachinsäure- und Behensäureester konnte im Gegensatz zur Referenzlipase Cal B für die Eucodis Lipasen 1, 12, 13, 14, 16, 31/II, 56 und 70 ein enzymatischer Umsatz erzielt werden, wobei sich besonders EL056 und EL070 durch vergleichsweise hohe spezifische Aktivitäten von der Buttersäure bis hin zur Behensäure auszeichneten.

Nach der Evaluierung der Substratspezifität von Lipasen gegenüber gesättigten Fettsäuren der Kettenlänge C4 bis C22 schlossen sich Studien zur Akzeptanz der ausgewählten ungesättigten Fettsäuren an. In Analogie zu den vorangegangenen Studien erfolgte der Einsatz der chemisch synthetisierten 4-Nitrophenylester sowohl im Mikrotiterplattenassay zur Darstellung eines Gesamtüberblicks als auch in hydrolysekinetischen Untersuchungen zur Ermittlung von spezifischen Aktivitäten. In Abbildung 70 sind die Spezifitäten der Eucodis Lipasen sowie Cal B gegenüber ein- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren zusammengefasst. Ebenso wie in Abbildung 69 wird ersichtlich, dass über einen Zeitraum von 2 h unter den gewählten Bedingungen, d.h. die Wahl eines detergenzhaltigen Puffers, nahezu keine Spontanhydrolyse der Acyl-4-nitrophenylester stattfindet.

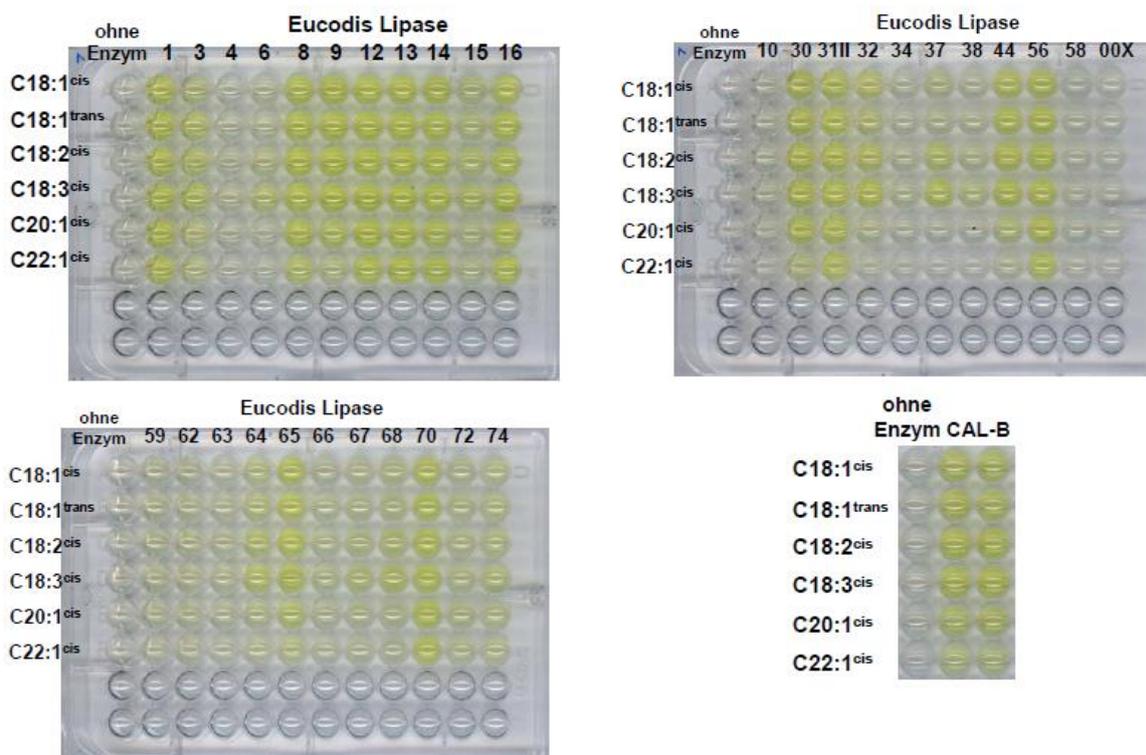


Abbildung 70: Kettenlängenspezifität der Eucodis Lipasen EL001-EL074 und Cal B gegenüber ungesättigten Fettsäuren. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphatpuffer, 0,5 % (m/v) Triton X-100, 0,1 % (m/v) Gummi arabicum (pH 7,0); 10% (v/v) DMF; [Fettsäure-4-nitrophenylester]: 0,5 mM; [Lipase]: 0,5 mg/ml; 37°C; 2 h.

Im Gegensatz dazu resultierte der Einsatz der Lipasen 1, 3, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 30, 31/II, 44, 56, 65, 70 sowie Cal B in der sichtbaren Gelbfärbung aller Kavitäten, was einer erfolgreichen enzymatischen Hydrolyse aller ungesättigten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C18, C20 und C22 entspricht. Interessanterweise konnte für die Lipasen 4, 6, 10, 34, 59, 62, 63 und 66 eine deutlich verminderte Akzeptanz (keine Gelbfärbung) der einfach ungesättigten Ölsäure, Elaidinsäure, Gondosäure und Erucasäure ermittelt werden, wohingegen für die EL006 eine gewisse Präferenz der dreifach ungesättigten Linolensäure erkennbar war. Generell sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass das Vorhandensein einer bzw. mehrerer Doppelbindungen innerhalb der Fettsäure zu einer besseren Lipase-katalysierten Umsetzung unabhängig vom eingesetzten Enzym führte.

In Übereinstimmung zu den 4-Nitrophenylestern der gesättigten Fettsäuren wurden auch für die ein- und mehrfach ungesättigten Fettsäurederivate die spezifischen Hydrolyseaktivitäten bestimmt. Wie aus den experimentellen Daten hervorging, konnten für eine Vielzahl an Eucodis Lipasen (EL 4, 6, 10, 34, 38, 59, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 72, 74) nur außerordentlich geringe Umsatzgeschwindigkeiten von <1 mU/mg getestet werden, weshalb auf ihre Darstellung in Tabelle 2 verzichtet wurde. Im Gegensatz resultierte die Spaltung von ungesättigten Fettsäureestern der Kettenlänge \geq C18 mittels der Lipasen 12, 56 und 70 in spezifischen Aktivitäten von >100 mU/mg und mittels der Lipasen EL013 und EL016 in Werten zwischen 15 und 50 mU/mg.

Eine genaue Analyse der Hydrolyseraten von Öl-, Gondo- und Erucasäure hinsichtlich des Einflusses der Kettenlänge der Fettsäure verdeutlicht den bereits erwähnten Fakt, dass mit steigender Anzahl der Kohlenstoffatome die Geschwindigkeit der Spaltung der jeweiligen Acyl-4-nitrophenylester abnimmt. Vergleicht man hingegen die spezifischen Aktivitäten der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren gleicher Kettenlänge (C18) miteinander, so wird für alle untersuchten Eucodis Lipasen sowie die Referenzlipase Cal B eine deutliche Bevorzugung des dreifach ungesättigten Estersubstrates sichtbar, welche sich in den höchsten Umsatzraten des Linolensäurederivates äußern.

3.5.1.2 Regioselektive enzymatische Hydrolyse

Lipasen werden wegen ihrer Regio- und Substratselektivität häufig zur Modifizierung von Fetten und Ölen mittels Hydrolyse, Veresterung und Umesterung genutzt, um Lipide mit wertvollen (lebensmittel)technischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften zu gewinnen. Um bei dieser Fettspaltung alle Edukte, Produkte und Intermediate detektieren zu können, ist jedoch die Etablierung einer leistungsfähigen Analytik notwendig, die den Nachweis von Fettsäuren, Triglyceriden, 1,2- und 1,3-Diglyceriden sowie Monoglyceriden erlaubt (siehe Abbildung 71).

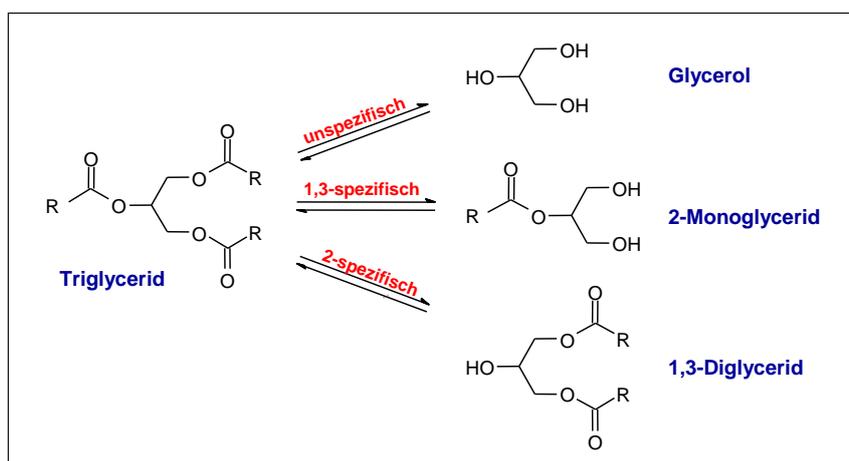


Abbildung 71: Regiospezifität von Lipasen.

Aufgrund der starken Lipophilie dieser Verbindungen haben sowohl in der quantitativen als auch qualitativen Fettanalytik besonders gaschromatographische Verfahren essentielle Bedeutung erlangt. Als Methode der Wahl wurde sich jedoch alternativ für die Dünnschichtchromatographie entschieden, da sie eine einfache Charakterisierung typenreiner Glyceride auch bei hohen Enzymkonzentrationen und inhomogenen Lösungen erlaubt.

Als optimales System zur Separierung von Tri-, Di- und Monoglyceriden sowie Fettsäuren und Glycerol erwiesen sich, wie Abbildung 72 am Beispiel von Tri-, Di- und Monopalmitin bzw. -octanoin zeigt, Hochleistungskieselgelpplatten (HPTLC Platten) als stationäre Phase und ein Gemisch aus 80 Anteilen Petrolether, 20 Anteilen Diethylether, 2 Anteilen Essigsäure sowie 0,5 Anteilen Methanol als mobile Phase. Die Anfärbung der Spots erfolgte wegen des guten Kontrastes mittels einer 10%igen Phosphomolybdänsäure in Ethanol, wobei die HPTLC Platten zur gleichmäßigeren Verteilung der Färbelösung darin eingetaucht wurden.

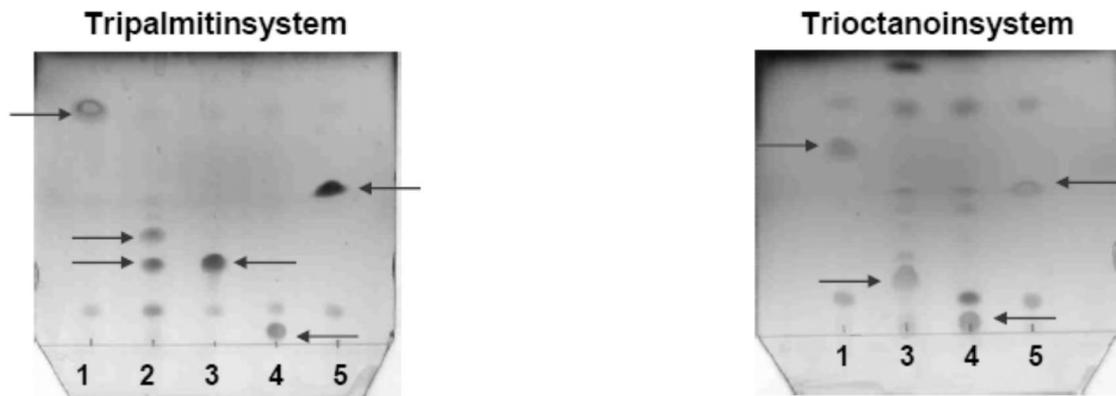


Abbildung 72: Dünnschichtchromatographisches System zur Separierung von Acylglyceriden und Fettsäuren. 1 = Triglycerid, 2 = 1,3+1,2-Diglycerid, 3 = 1,2-Diglycerid, 4 = Monoglycerid, 5 = Fettsäure. Analysebedingungen: HPTLC Platten, 80/20/2/0,5 (v/v/v/v; Petrolether/Diethylether/Essigsäure/MeOH), Detektion mittels ethanolischer Phosphomolybdänsäure.

Nach der erfolgreichen Etablierung einer leistungsfähigen Analysenmethode stand in den nachfolgenden Experimenten die Ermittlung der Regiospezifität der Eucodis Lipasen EL001-EL074 im Mittelpunkt des Interesses. Als Testsysteme wurden unter Berücksichtigung der Fettsäurespezifität der Lipasen die kommerziell verfügbaren typenreinen Triglyceride Tripalmitin und Trioctanoin ausgewählt und in Abhängigkeit von der Interpretierbarkeit der Resultate an jeweiliger Stelle abgebildet. Bezüglich des Reaktionsmediums wurde sich für das organische Lösemittel Toluol entschieden, in welchem die Aktivität zahlreicher Eucodis Lipasen erfolgreich nachgewiesen wurde. Eine Optimierung der Enzym- und Substratkonzentration hinsichtlich einer guten Detektierbarkeit aller Edukte und Produkte ergab eine optimale Enzymmenge von 5 bis 20 mg und Substratkonzentrationen von 5 mM im Falle des Tripalmitins und 10 mM im Falle des Trioctanoins bei einer Reaktionszeit von 24 Stunden. Um nun die Fähigkeit aller produzierten Eucodis Lipasen sowie der Referenzlipase Cal B zur regioselektiven Spaltung der beiden ausgewählten Triglyceride evaluieren zu können, erfolgte unter optimierten Bedingungen zunächst die Hydrolyse von Tripalmitin und Trioctanoin mittels der Eucodis Lipasen EL001-EL016. Als Negativkontrolle wurde die nichtenzymatische Fetthydrolyse mitgeführt.

Anhand der DC-Analyse nach einer 24stündigen Inkubationszeit wird ersichtlich (siehe Abbildung 73), dass die Eucodis Lipasen EL004, EL006, EL008 und EL009 trotz Einsatz des Triglycerides mit kurzkettigen Fettsäuren keine detektierbare Akkumulation von 1,2- bzw. 1,3-Dioctanoin katalysierten (siehe Abbildung 73d), die wiederum eine Bestimmung der Regiospezifität dieser vier Enzyme gestatten würde. Da auch eine Erhöhung der Enzymkonzentrationen keinerlei Veränderung der Zusammensetzung der Reaktionsgemische bewirkte, kann vermutet werden, dass Triglyceride nicht zu den nativen Substraten dieser Lipasen zählen bzw. dass die gewählten Bedingungen nicht den Enzymanforderungen genügen. Ein völlig anderes Resultat ergab jedoch die Konversion des längerkettigen Triglycerides Tripalmitin mittels der Eucodis Lipasen 1, 3, 12, 13, 14, 15 und 16 (siehe Abbildung 73a-c). So hatte eine Variation der Lipasemengen eine deutliche Entstehung von 1,2-Dipalmitin im Falle der Lipasen EL001, EL012, EL013, EL014, EL016 und möglicherweise auch EL015 zur Folge, was der Abspaltung eines Palmitinsäurerestes aus der Position 3 entspricht und als Hinweis auf eine 1,3-Regiospezifität dieser Enzyme gedeutet werden könnte.

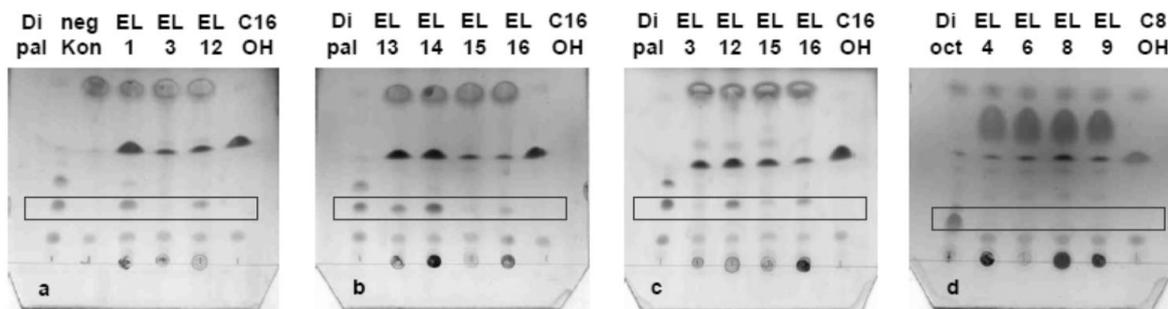


Abbildung 73: EL001-EL016-katalysierte regio-spezifische Hydrolyse von Tripalmitin (a-c) und Trioctanoin (d). Reaktionsbedingungen: 5 mM Tripalmitin, 10 mM Trioctanoin, 5 mg Lipase (a+b), 10 mg Lipase (c+d), Toluol, 30°C. Analysebedingungen: HPTLC Platten, 80/20/2/0,5 (v/v/v/v; Petrolether/Diethylether/Essigsäure/MeOH), Detektion mittels ethanolischer Phosphomolybdänsäure. Dipal = Mischung von 1,2- und 1,3-Dipalmitin, Dioct = 1,2-Dioctanoin, C16-OH = Palmitinsäure, C8-OH = Octansäure, neg Kon = Negativkontrolle ohne Lipase.

Betrachtet man die Hydrolyse des Trioctanoins durch die Eucodis Lipasen 8B/C, 10, 17, 20 sowie 30-56 vergleichend mit dem Umsatz durch die Referenzlipase Cal B über einen Zeitraum von 24 Stunden (siehe Abbildung 74a-d), so zeichnen sich die vier Enzyme EL020, EL031, EL032 und EL056 durch eine deutlich detektierbare Bildung von 1,2-Dioctanoin aus. Diese resultiert aus der enzymatischen Hydrolyse der Esterbindung in Position 3 und ist ein Indiz für die 1,3-Regiospezifität der genannten Enzyme. Überraschend war der experimentelle Befund unter Einsatz der in der Literatur als 1,3-spezifisch beschriebenen Referenzlipase Cal B. Wie Abb. 8d veranschaulicht, hat die Cal B-katalysierte Spaltung von Trioctanoin die Bildung von zwei Produkten in nahezu gleicher Menge zur Folge, die auf der Grundlage entsprechender Referenzen eindeutig als 1,2- und 1,3-Dioctanoin identifiziert wurden. Dieses Resultat steht im Einklang mit den Transesterifizierungsreaktionen von Monopalmitin mittels Cal B (Daten nicht gezeigt), in denen ebenfalls die Formierung von 1,2- und 1,3-Dipalmitin detektiert werden konnte, die auf eine Unspezifität dieser kommerziell erhältlichen Enzymcharge hindeutet.

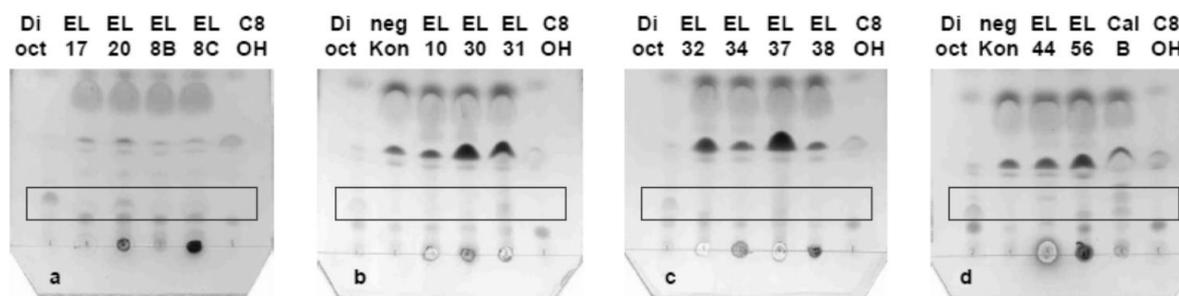


Abbildung 74: EL008-EL056- sowie Cal B-katalysierte regio-spezifische Hydrolyse von Trioctanoin (a-d). Reaktionsbedingungen: 10 mM Trioctanoin, 5 mg Cal B, 20 mg Lipase, Toluol, 30°C. Analysebedingungen: HPTLC Platten, 80/20/2/0,5 (v/v/v/v; Petrolether/Diethylether/Essigsäure/MeOH), Detektion mittels ethanolischer Phosphomolybdänsäure. Dioct = 1,2-Dioctanoin, C8-OH = Octansäure, neg Kon = Negativkontrolle ohne Lipase.

Eine detaillierte Analyse der EL059-EL074-katalysierten Umsetzung von Trioctanoin und Tripalmitin in Abbildung 75 ergab lediglich im Falle der vier Enzyme EL066, EL068, EL070 und EL074 Hinweise auf ihre Fähigkeit zur regio-spezifischen Hydrolyse von Triglyceriden. So führte die eintägige Inkubation von jeweils 20 mg Lipase mit Substrat in Toluol zur Bildung von 1,2-Dioctanoin bzw. 1,2-Dipalmitin, welche die Abspaltung der jeweiligen Fettsäure aus der *sn*3-Position voraussetzt. Für die Eucodis Lipase EL066 wurde darüber hinaus im

Bereich des 1,3-Diglycerides eine Bande beobachtet, die aus Verunreinigungen der Enzympräparation stammt und bereits zum Startpunkt der Reaktion detektierbar war (DC nicht abgebildet), jedoch die Bildung von 1,3-Dioctanoin nicht ausschließen kann.

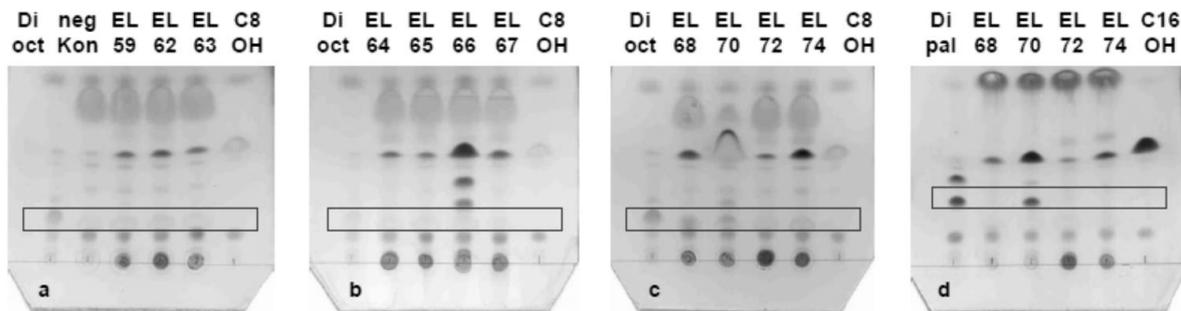


Abbildung 75: EL059-EL074-katalysierte regiospezifische Hydrolyse von Trioctanoin (a-c) und Tripalmitin (d). Reaktionsbedingungen: 5 mM Tripalmitin, 10 mM Trioctanoin, 20 mg Lipase, Toluol, 30°C. Analysebedingungen: HPTLC Platten, 80/20/2/0,5 (v/v/v/v; Petrolether/Diethylether/Essigsäure/MeOH), Detektion mittels ethanolischer Phosphomolybdänsäure. Dipal = Mischung von 1,2- und 1,3-Dipalmitin, Dioct = 1,2-Dioctanoin, C16-OH = Palmitinsäure, C8-OH = Octansäure, neg Kon = Negativkontrolle ohne Lipase.

Zusammenfassend kann aus den experimentellen Befunden zur Hydrolyse von Tripalmitin und Trioctanoin in Kombination mit den Ergebnissen der Umesterung von 1-Palmitin mit Palmitinsäure-4-nitrophenylester (Daten nicht gezeigt) folgendes hinsichtlich der Regiospezifität der produzierten Eucodis Lipasen formuliert werden: Neben einer Vielzahl hydrolyse- und umesterungsnegativer Enzyme erwiesen sich die Biokatalysatoren EL001, EL012, EL013, EL014, EL015, EL016, EL020, EL031, EL032, EL056, EL068, EL070 und EL074 als 1,3-regiospezifisch. Im Falle der Referenzlipase Cal B sowie der Eucodis Lipase 66 war die Bildung von 1,3- sowie 1,2-Diacylglycerid detektierbar, jedoch nicht einwandfrei als solche nachgewiesen.

3.5.1.3 Enzymatische Hydrolyse

Nach der erfolgreichen Etablierung einer leistungsfähigen Analysenmethode zur Bestimmung der Regioselektivität der Eucodis Lipasen stand in den nachfolgenden Experimenten die Lipase-katalysierte Hydrolyse von Pflanzenölen im Mittelpunkt des Interesses. Als Öle wurden zu diesem Zweck von der Fa. Dracosa zur Verfügung gestelltes gereinigtes Senföl, Drachenkopfföl und Holunderkernöl sowie ungereinigtes Krambeöl als komplexe Triglyceride ausgewählt. Hinsichtlich des Reaktionsmediums wurde sich für den detergentenhaltigen Phosphatpuffer (pH 7,0) entschieden, in dem die Spezifität/Aktivität aller 31 Eucodis Lipasen gegenüber kurz- und langkettigen Fettsäureestern bereits erfolgreich nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 58 und Tabelle 59, Abbildung 69 und Abbildung 70). Eine initiale Optimierung der Enzym- und Substratkonzentration hinsichtlich einer guten Detektierbarkeit aller Edukte und Hydrolyseprodukte ergab unter Einsatz der Eucodis Lipase EL012 als Katalysator und Senföl als Substrat eine optimale Enzymmenge von 10 mg/mL und einen Gehalt an 20 µl Pflanzenöl/ml bei einer Reaktionszeit von einigen Tagen. Um nun die Fähigkeit aller produzierten Eucodis Lipasen sowie der Referenzlipase Cal B zur Spaltung der vier Pflanzenöle zu evaluieren, erfolgte unter optimierten Bedingungen zunächst die Hydrolyse von gereinigtem Senföl mittels der Eucodis Lipasen 1-16. Als Negativkontrolle wurde die spontane Ölhydrolyse mitgeführt. Anhand der DC-Analyse nach einer 48 stündigen Inkubationszeit wird ersichtlich (siehe Abbildung 76), dass nur die Lipasen 1, 12, 13, 14, 16 und in gewissem Maß auch 15 zu einer enzymatischen Hydrolyse

von Senföl führen. Der Einsatz der Lipasen 3, 4, 6, 8 und 9 hat hingegen die Bildung von Produkten in Mengen zur Folge, die sich kaum von der der Spontanhydrolyse unterscheidet. Diese experimentellen Befunde stehen im Einklang mit der in den Hydrolysestudien gefundenen Akzeptanz langkettiger Fettsäuren seitens der Lipasen 1, 12, 13, 14, (15) und 16 (siehe Abbildung 69 und Abbildung 70, Tabelle 58 und Tabelle 59).

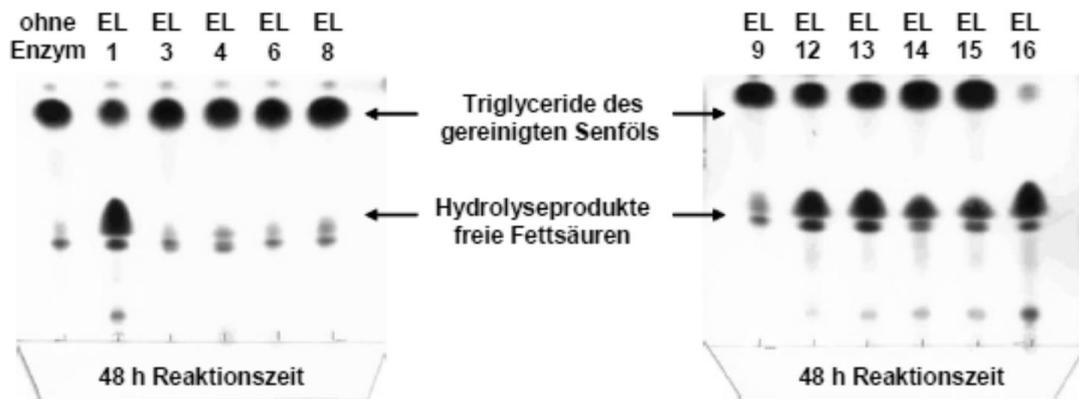


Abbildung 76: Lipase-katalysierte Spaltung von gereinigtem Senföl. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphatpuffer, 0,5 % (m/v) Triton X-100, 0,1 % (m/v) Gummi arabicum (pH 7,0); 37°C; [Senföl]: 2 µl/100 µl, [EL001-EL016]: 1 mg/100 µl. Analysebedingungen: HPTLC Platten, 80/20/2/1 (v/v/v/v;Petrolether/Diethylether/Essigsäure/MeOH), Detektion mittels ethanolischer Phosphomolybdänsäure.

Zur Ermittlung dessen, ob die enzymatische Triglyceridspaltung über einen langen Zeitraum vollständig und unabhängig vom eingesetzten Pflanzenöl verläuft, wurde das Experiment mittels der aktiven Lipasen 1, 12, 13, 14 und 16 unter Einsatz von Senf-, Drachenkopf-, Holunderkern- und Krambeöl wiederholt. Eine Analyse der Reaktionen über mehrere Tage hinsichtlich des Ölgehaltes macht einen kompletten Abbau von Senföl und Drachenkopföl in die entsprechenden Monomere durch die Eucodis Lipasen 1, 12, 13 und 16 deutlich (siehe Abbildung 77). Für sowohl das Holunderkernöl (Ausnahme EL001) als auch das Krambeöl reichte hingegen eine Reaktionszeit von 96 h nicht aus, um vollständig enzymatisch degradiert zu werden.

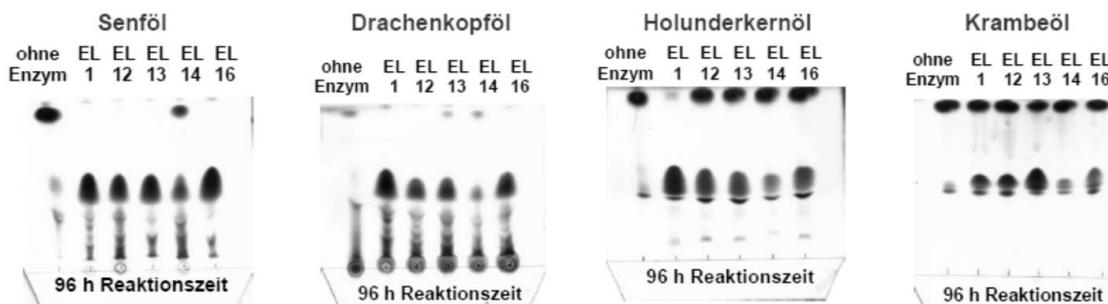


Abbildung 77: EL001-EL016-katalysierte Spaltung von Pflanzenölen. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphatpuffer, 0,5 % (m/v) Triton X-100, 0,1 % (m/v) Gummi arabicum (pH 7,0); 37°C; [Öl]: 2 µl/100 µl, [EL001-EL016]: 1 mg/100 µl. Analysebedingungen: HPTLC Platten, 80/20/2/1 (v/v/v/v;Petrolether/Diethylether/Essigsäure/MeOH), Detektion mittels ethanolischer Phosphomolybdänsäure.

Betrachtet man vergleichend die Hydrolyse der vier Pflanzenöle durch die ebenfalls zur Hydrolyse längerer Fettsäurederivate befähigten Eucodis Lipasen EL030, EL031/II, EL056, EL065 und EL070 über einen Zeitraum von vier Tagen (siehe Abbildung 78), so

zeichnet sich nur die EL070 durch eine nahezu vollständige Konversion der eingesetzten vier komplexen Fette aus. Im Falle des Drachenkopföls wurde darüber hinaus eine fast komplette Umsetzung mittels der Lipasen 31/II und 56 erzielt, wohingegen die Anwendung von Senf- und Krambeöl als Triglyceridsubstrate zu unvollständigen enzymatischen Abbaureaktionen führte.

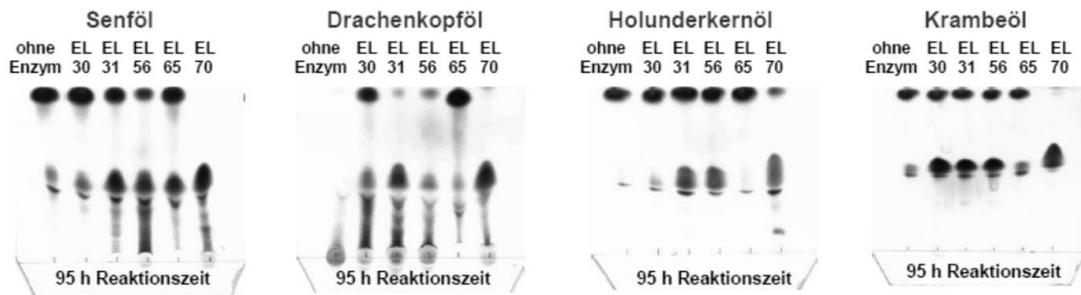


Abbildung 78: EL030-EL070-katalysierte Spaltung von Pflanzenölen. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphatpuffer, 0,5 % (m/v) Triton X-100, 0,1 % (m/v) Gummi arabicum (pH 7,0); 37°C; [Öl]: 2 µl/100 µl, [EL001-EL016]: 1 mg/100 µl. **Analysebedingungen:** HPTLC Platten, 80/20/2/1 (v/v/v/v; Petrolether/Diethylether/Essigsäure/MeOH), **Detektion** mittels ethanolischer Phosphomolybdänsäure.

Ein ähnliches Resultat wurde auch unter Einsatz der Referenzlipase B aus *Candida antarctica* (Cal B) erzielt. So veranschaulicht Abbildung 79 einen kompletten Umsatz von Drachenkopföl (Bahn 6) sowie eine partielle enzymatische Hydrolyse von Krambe-, Senf- und Holunderkernöl (Bahn 2, 4 und 8).

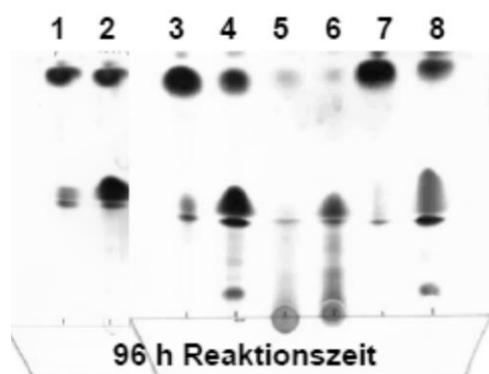


Abbildung 79: Cal B-katalysierte Spaltung von Pflanzenölen. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Phosphatpuffer, 0,5 % (m/v) Triton X-100, 0,1 % (m/v) Gummi arabicum (pH 7,0); 37°C; [Öl]: 2 µl/100 µl, [Cal B]: 1 mg/100 µl.

- 1, 3, 5, 7 = spontane Öhydrolysen
- 2 = Cal B-katalysierte Krambeölhydrolyse
- 4 = Cal B-katalysierte Senföhydrolyse
- 6 = Cal B-katalysierte Drachenkopföhydrolyse
- 8 = Cal B-katalysierte Holunderkernöhydrolyse

Analysebedingungen: HPTLC Platten, 80/20/2/1 (v/v/v/v; Petrolether/Diethylether/Essigsäure/MeOH), **Detektion** mittels ethanolischer Phosphomolybdänsäure.

Zur Identifizierung der gebildeten Hydrolyseprodukte mittels Massenspektrometrie erfolgten die Reaktionen über mehrere Tage in Phosphatpuffer ohne Detergenzien, da sowohl Triton X-100 als auch Gummi arabicum als periodisch wiederkehrende Störsignale im Massenspektrum auftreten.

Nach einer Chloroform-Extraktion der Lipidbestandteile und Resuspension dieser in einem Gemisch aus ACN/MeOH wurden ESI-Spektren im Negativmodus aufgenommen (siehe Abbildung 80). Die beispielhaft mittels der Eucodis Lipase 12 gebildeten Hydrolyseprodukte des Senföls konnten als Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure identifiziert werden.

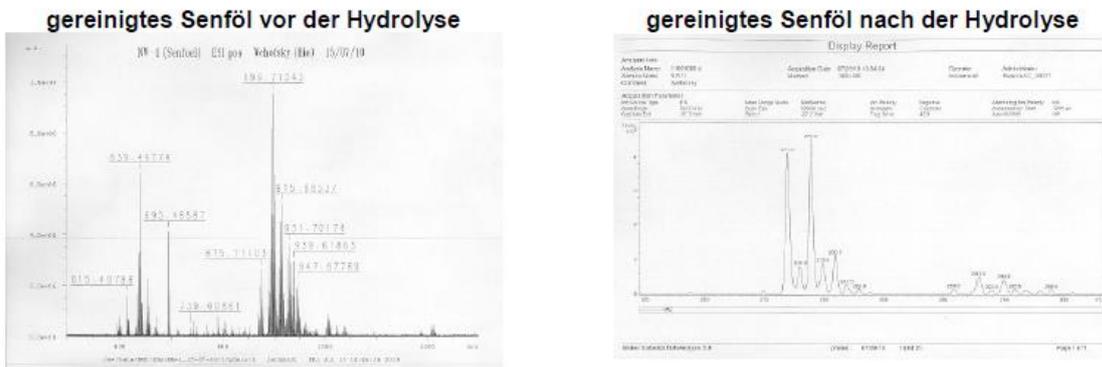


Abbildung 80: ESI Massenspektren vor und nach der EL012-katalysierten Hydrolyse von gereinigtem Senföl. Entstandene Hydrolyseprodukte: Stearinsäure (m/z: 282,9 [M-H]-); Ölsäure (m/z: 280,9 [M-H]-); Linolsäure (m/z: 279,0 [M-H]-); Linolensäure (m/z: 277,0 [M-H]-).

Nach dem chromatographischen Nachweis einer generellen Hydrolysierbarkeit der vier ausgewählten Pflanzenöle im wässrigen Milieu (siehe Abbildung 76 bis Abbildung 79) stand in den nachfolgenden Experimenten die Quantifizierung der enzymatischen Ölhydrolyse im Mittelpunkt. Als komplexe Triglyceride wurden zu diesem Zweck wiederum das von der Fa. Dracosa zur Verfügung gestellte gereinigte Senföl, Drachenkopfföl und Holunderkernöl sowie das ungereinigte Krambeöl eingesetzt. Als Biokatalysatoren waren neben der Referenzlipase Cal B vor allem die Eucodis Lipasen EL001, EL012, EL013, EL016 und EL070 von besonderer Bedeutung, da sie sich durch eine breite Akzeptanz von mittel- und langkettigen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auszeichneten (siehe Abbildung 69 und Abbildung 70, Tabelle 58 und Tabelle 59).

Zur Evaluierung kinetischer Parameter in der Form von spezifischen Aktivitäten erfolgte die Herstellung stabiler Öl-Wasser-Emulsionen in 2% (m/v) Gummi arabicum durch 2minütige Ultraschallbehandlung (30% Amplitude) mittels eines BRANSON Sonifiers W-250 D. Nach einer thermischen Äquilibration dieser Emulsionen bei 37°C und Zugabe optimierter Lipasekonzentrationen wurde der zeitliche Verlauf der Pflanzenölhydrolyse basierend auf der Fettsäurefreisetzung durch Konstanthaltung eines neutralen pH Wertes verfolgt (pH 7 Stat Titration mittels 0,01 N NaOH, Autotitrator der Fa. SCHOTT). Ein Unit (U) Lipaseaktivität wurde definiert als die Enzymmenge, die 1 µmol Fettsäure pro Minute unter den gewählten Reaktionsbedingungen freisetzt.

Diese detaillierte Analyse der kinetischen Daten verdeutlichte mit Werten von ca. 700-5000 mU/mg die schnellste enzymatische Ölkonzersion durch die beiden Eucodis Lipasen EL070 und EL001. Im Gegensatz dazu katalysierten EL012 und EL016 die Pflanzenölhydrolyse um wenigstens eine Zehnerpotenz langsamer (74-138 mU/mg) und gelangten somit in den Bereich des Referenzzyms Cal B, für das im Einklang mit den Fettsäurespezifitäten die geringsten Ölumsatzraten ermittelt wurden. Besonders interessant war der experimentelle Befund, dass sich unabhängig von der verwendeten Lipase die Hydrolysegeschwindigkeiten der vier Pflanzenöle trotz diverser Fettsäurezusammensetzung und Herkunft nur minimal unterschieden. Krambeöl mit einem vergleichsweise hohen Gehalt an Erucasäure (C22:1) wurde dabei prinzipiell mit der höchsten Geschwindigkeit hydrolysiert.

Nach der erfolgreichen kinetischen Charakterisierung der Pflanzenölhydrolyse im wässrigen Medium schlossen sich prozessrelevante Untersuchungen in organischen Lösemitteln wie Hexan und Toluol an, die zu anderen Reaktionsprodukten als in wässrigen Systemen führen können. Da in der Literatur ein positiver Einfluss von tertiären Aminen auf das Ausmaß der Triglyceridkonversion beschrieben wurde (A. Bilyk et al., JAOCS, Vol. 68, Nr. 5, 1991, 320-323), erfolgte in initialen Studien der Einsatz von äquimolaren Mengen an N,N'-Diisopropylethylamin, Triethylamin und Tributylamin bei der exemplarisch ausgewählten EL070-katalysierten Hydrolyse von Senföl in Toluol. Wie aus der Abb. 15a hervorgeht, ist die Lipase 70 auch ohne Zugabe von Base in der Lage, Senföl zu einem gewissen Grad in Toluol zu spalten (2. Bahn). Betrachtet man hingegen den enzymatischen Umsatz in Gegenwart von Aminen (siehe Abbildung 81, 3.-5. Bahn), so wird im Falle von N,N'-Diisopropylethylamin und besonders Triethylamin eine deutlich verstärkte Bildung von Fettsäuren sichtbar, die das Resultat einer beschleunigten Lipase-katalysierten Fetthydrolyse darstellt. Ein direkter Vergleich des Einflusses unterschiedlicher Mengen an Triethylamin auf die EL070-katalysierte Senfölydrolyse demonstriert den größten geschwindigkeits-steigernden Effekt bei Zugabe von 10 Äquivalenten Base (Abbildung 81b, 4.-6. Bahn). Im Gegensatz dazu führte die spontane, d.h. nichtenzymatische Umsetzung von Öl und Base zu keiner Entstehung von Hydrolyseprodukten (siehe Abbildung 81b, 1.-3. Bahn).

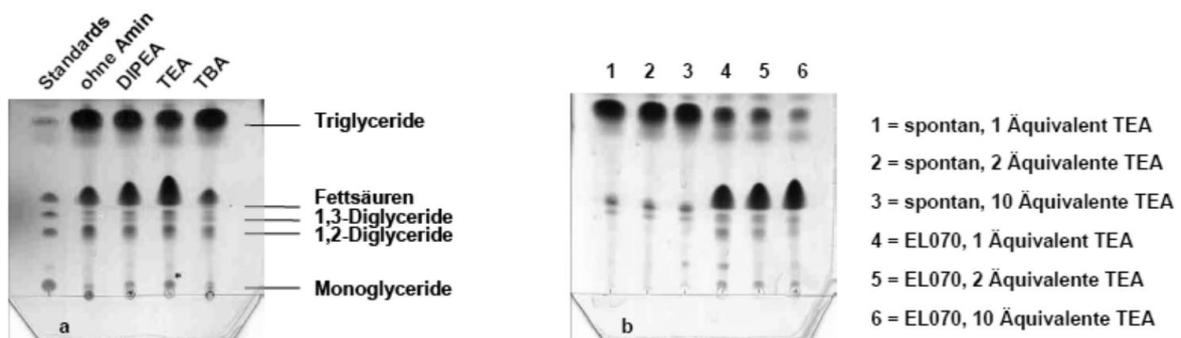


Abbildung 81: Einfluß verschiedener Amine (a) und Triethylaminkonzentrationen (b) auf die EL070-katalysierte Senfölydrolyse in Toluol. Reaktionsbedingungen: 0,0025 mmol Senföl, 0,0025 mmol DIPEA/TEA/TBA (Abb. 15a), 0,0025/0,005/0,025 mmol TEA (Abb. 15b), 5 mg EL070, Toluol, 30°C, 22 h Reaktionszeit. TEA = Triethylamin, DIPEA = N,N'-Diisopropylethylamin, TBA = Tributylamin.

An die erfolgreiche Optimierung der Reaktionsbedingungen schlossen sich die finalen Hydrolyseexperimente in Toluol unter Einsatz von 0,0025 mmol Pflanzenöl als Substrat, 0,025 mmol Triethylamin als Additiv und definierten Mengen der Katalysatoren Cal B, EL001, EL012, EL013, EL016 und EL070 an. Inkubationszeiten von 22 Stunden bei einer Temperatur von 30°C demonstrieren deutlich (siehe Abbildung 82), dass die Eucodis Lipasen EL001, EL012 und EL070 zu einem nahezu vollständigen Abbau aller komplexen Triglyceride zu den Monomeren Fettsäuren und Glycerol führten. Interessanterweise katalysierten über denselben Zeitraum trotz Anwendung vergleichbarer Enzymkonzentrationen die drei Lipasen Cal B, EL013 und EL016 nur eine unvollständige Hydrolyse aller vier Pflanzenöle, welche das Resultat einer verminderten Akzeptanz langkettiger Fettsäuren und/oder eines Aktivitätsverlustes im gewählten Reaktionsmedium Toluol darstellen könnte.

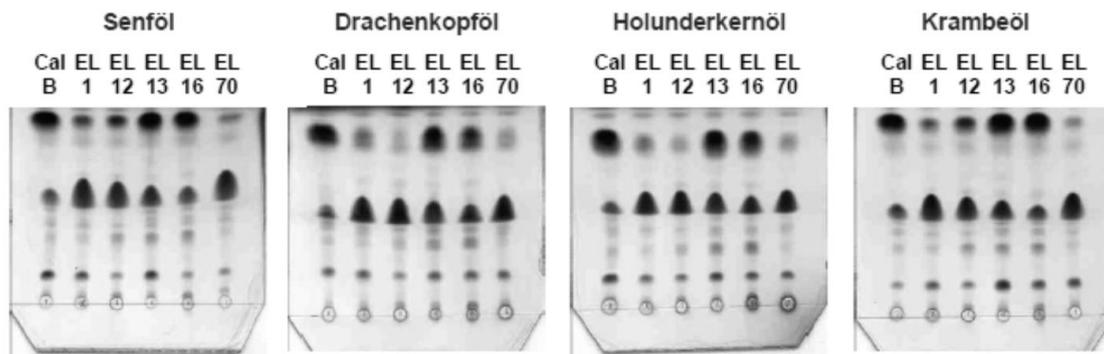


Abbildung 82: Lipase-katalysierte Hydrolyse von Pflanzenölen in Toluol. Reaktionsbedingungen: 0,0025 mmol Öl, 0,025 mmol Triethylamin, 10-40 mg Lipase, Toluol, 30°C, 22 h Reaktionszeit.

Eine sichtbare Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit aller vier Pflanzenöle im organischen Medium konnte jedoch in dem für Lipasen ebenfalls gebräuchlichen Lösungsmittel Hexan erzielt werden. So gelang die vollständige Hydrolyse von Senf-, Drachenkopf-, Holunderkern- und Krambeöl entweder in wenigen Stunden (EL001, EL012, EL070, siehe Abbildung 83) oder innerhalb eines Tages (EL013, EL016, Cal B, Daten nicht gezeigt).

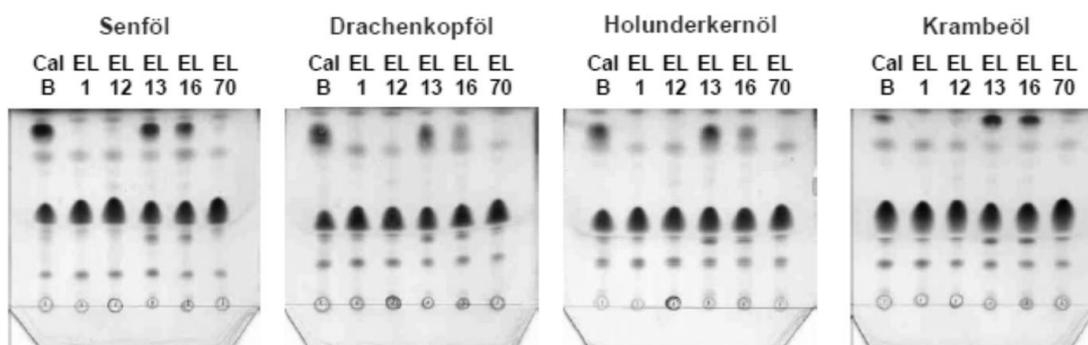


Abbildung 83: Lipase-katalysierte Hydrolyse von Pflanzenölen in Hexan. Reaktionsbedingungen: 0,0025 mmol Öl, 0,025 mmol Triethylamin, 10-40 mg Lipase, Hexan, 30°C, 8 h Reaktionszeit.

3.5.1.4 Enzymatische Veresterung

Zur Ermittlung der Fähigkeit der favorisierten Eucodis Lipasen die Veresterung von Fettsäuren katalysieren zu können, wurde sich sowohl für die kurzkettige Octansäure als auch für die langkettige Ölsäure und Arachidinsäure als Substrate entschieden. Im Hinblick auf die industriell bedeutsame Biodieselproduktion diente Methanol als Alkoholkomponente, Toluol wurde zunächst als Reaktionsmedium gewählt. Sowohl die enzymatischen als auch die spontanen, d.h. nichtenzymatischen Veresterungen wurden wie folgt durchgeführt: 0,025 mmol Arachidinsäure bzw. 0,1 mmol Octan- und Ölsäure wurden mit einem fünffachen Überschuss an Alkohol in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Lipase über Nacht in Toluol bei einer Temperatur von 30°C inkubiert. Eine Bestimmung der Produktausbeute erfolgte indirekt durch titrimetrische Ermittlung der nichtumgesetzten Fettsäuren. Neben der quantitativen Analyse wurde darüber hinaus eine dünnschichtchromatographische Kontrolle der enzymatischen Veresterung unter Verwendung des bereits optimierten Trennsystems durchgeführt (HPTLC, 80/20/2/0,5 (v/v/v/v; Petrolether/Diethylether/Essigsäure/MeOH, Detektion mittels Phosphomolybdänsäure).

Tabelle 58 fasst die Syntheseeffizienzen der Lipase-katalysierten Veresterung von Octan-, Öl- und Arachidinsäure mit Methanol nach einer eintägigen Reaktionszeit zusammen und erbringt den klaren Nachweis einer hocheffizienten Methylierbarkeit von Fettsäuren mittels der favorisierten Eucodis Lipasen EL001, EL012, EL013 und EL070 sowie der Referenzlipase Cal B. Produktausbeuten von weniger als 95% konnten durch eine simple Verlängerung der Inkubationsdauer bis zu einem vollständigen Fettsäureverbrauch und demnach quantitativen Methylierungsgrad der jeweiligen Fettsäure gesteigert werden. Überraschenderweise katalysierte die EL016 keine der Veresterungsreaktionen.

Tabelle 58: Lipase-katalysierte Methylierung von Fettsäuren in Toluol. Reaktionsbedingungen: 0,025-0,1 mmol Fettsäure, 0,125-0,5 mmol Methanol, 5-40 mg Lipase, Toluol, 30°C, 24 h Reaktionszeit.

Lipase	Produktausbeute [%] an Fettsäuremethylester		
	Octansäure (C8:0)	Ölsäure (C18:1)	Arachidinsäure (C20:0)
Cal B	> 95	> 95	> 95
EL001	> 95	> 95	> 95
EL012	> 95	89	83
EL013	> 95	92	87
EL016	kein Produkt	kein Produkt	kein Produkt
EL070	> 95	> 95	> 95

Im Hinblick auf eine erfolgreiche Lipase-katalysierte Abtrennung von Harz- und Fettsäuren des Tallöls bestand nun die Hoffnung darin, dass sich die Fettsäuren des Tallöls wie soeben beschrieben vollständig enzymatisch methylieren lassen, wohingegen die Harzsäuren des Tallöls aufgrund ihrer komplexen chemischen Struktur unreaktiv sind. Eine Bestätigung dieser Annahme gelang in ersten Vorversuchen zur Methylierbarkeit typischer Tallöl-Fettsäure- und Tallöl-Harzsäure-Fractionen in Form von Abietinsäure und Ölsäure (siehe Abbildung 84). Während die Ölsäure erwartungsgemäß nahezu vollständig unter Einsatz der ausgewählten Enzyme Cal B, EL001, EL012, EL013 und EL070 in den entsprechenden Methylester überführt werden konnte (mittlere DC-Platte), resultierten auch lange Reaktionszeiten von einem Tag und mehr in keinerlei chemischer Veränderung der Abietinsäure (linke DC-Platte).

Um nun im Falle des Tallöls eine Abtrennung von Harz- und Fettsäuren nachweisen zu können, wurde der zunächst im unteren mmol-Bereich durchgeführte Methylierungsansatz (rechte DC-Platte) in den semipräparativen Maßstab überführt. Es erfolgte eine über-Nacht-Inkubation von 500 mg Roh tallöl mit einem Überschuss an Methanol und 200 mg Eucodis Lipase EL070 in Toluol bei 30°C. Nach einer dünnschichtchromatographischen Kontrolle des Verlaufes der Veresterungsreaktion wurde das methylierte Reaktionsprodukt mittels Flashchromatographie unter Einsatz von Petrolether als mobiler Phase und Kieselgel 60 als stationärer Phase von den nichtumgesetzten Säuren abgetrennt und zur detaillierten Analyse an das Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie in Pfingsttal versandt.

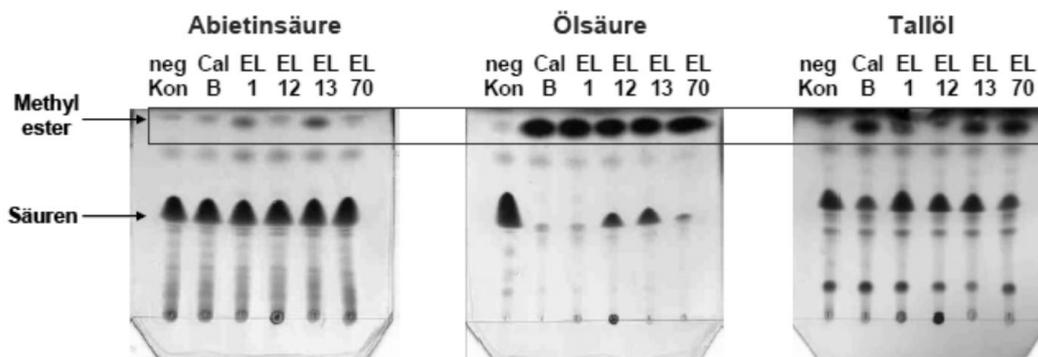


Abbildung 84: Lipase-katalysierte Methylierung von Abietinsäure, Ölsäure und Tallöl. Reaktionsbedingungen: 0,01 mmol Tallöl, 0,05 mmol Säure, 0,05-0,25 mmol MeOH, 5-20 mg Lipase, Toluol, 30°C, 24 h Reaktionszeit.

3.5.1.5 Umesterung der Pflanzenöle in klassisch organischen Lösungsmitteln

Wie aus den bisher präsentierten Ergebnissen hervorging, wurden aufgrund auf ihrer Spezifität für langkettige gesättigte und ungesättigte Fettsäuren sowie ihrer Fähigkeit zur Hydrolyse der vier ausgewählten heimischen Pflanzenöle im wässrigen und organischen Milieu die Eucodis Lipasen EL012, EL013, EL016 und EL070 als Katalysatoren erster und zweiter Generation ausgewählt. Im Hinblick auf einen Einsatz dieser favorisierten Enzyme zur Konversion nachwachsender Rohstoffe war die Lipase-katalysierte Umesterung von Senföl, Drachenkopföl, Holunderkernöl und Krambeöl Gegenstand weiterer Untersuchungen.

In initialen Experimenten erfolgte zunächst eine Optimierung der Reaktionsbedingungen bezüglich Temperatur und Reaktionsmedium. In Anlehnung an das Aktivitätsspektrum der Enzyme wurde ein Temperaturbereich von 30°C bis 50°C untersucht, als gebräuchliche organische Reaktionsmedien kamen Hexan und Toluol zum Einsatz. Eine Kontrolle des Syntheseverlaufes erfolgte dünnschichtchromatographisch mittels HP TLC Platten als stationärer Phase und einem optimierten 90/10 (v/v) Petrolether-Diethylether-Gemisch als mobiler Phase. Wie aus Abbildung 85 bei genauer Betrachtung der FAME Spots hervorgeht, sind die exemplarisch ausgewählten Biokatalysatoren EL001 und EL013 prinzipiell in der Lage, die gewünschte Umesterung der Triglyceride der Pflanzenöle in die korrespondierenden Fettsäuremethylester zu katalysieren. Während die Reaktionstemperatur für die Transesterifizierungsreaktion eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint, konnte für beide untersuchte Eucodis Lipasen Hexan als das Lösungsmittel der Wahl identifiziert werden.

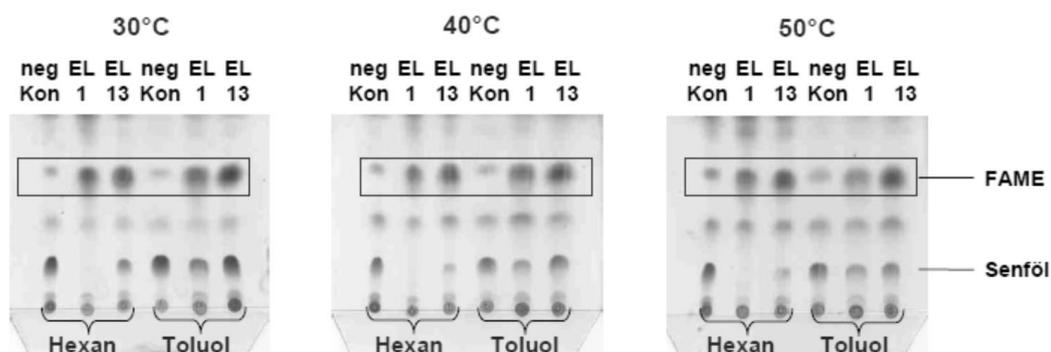


Abbildung 85: Einfluß von Temperatur und Medium auf die EL001- und EL013-katalysierte Umesterung von Senföl. Bedingungen: 0,5 mg Senföl, 25 Äqu. MeOH, 20 mg EL001/EL013, Toluol/Hexan, 30-50°C, 46 h Reaktionszeit.

Betrachtet man darüber hinaus den Einfluss des Methanolgehalts auf den EL013-katalysierten Umesterungsprozess von Senföl bei einer Temperatur von 30°C in Hexan als organischem Lösemittel (siehe Abbildung 86), so wird eine deutliche Hemmung der Lipaseaktivität in Gegenwart eines 50- bis 100-fachen Methanolüberschusses im Vergleich zum 25-fachen Methanolüberschuss erkennbar.

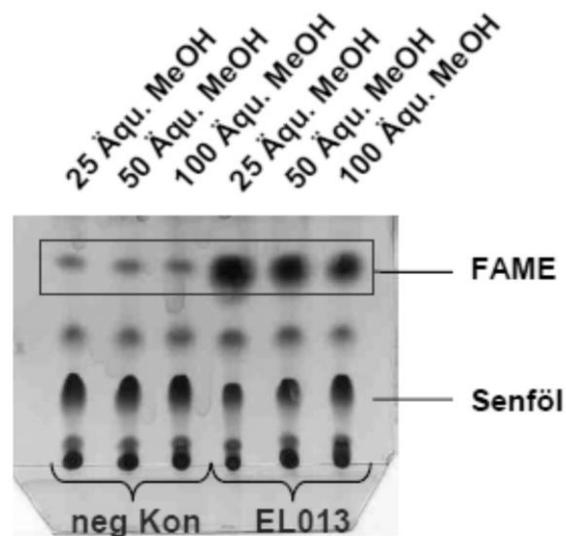


Abbildung 86: Einfluß des Methanolgehalts auf die EL013-katalysierte Umesterung von Senföl in Hexan bei 30°C. Bedingungen: 0,5 mg Senföl, 25-100 Äqu. MeOH, 20 mg EL013, Hexan, 30°C, 22 h Reaktionszeit.

Auf der Grundlage der initialen Optimierungsstudien erfolgten die finalen Lipase-katalysierten Umesterungsreaktionen von 100 mg Senf-, Drachenkopf-, Krambe- und Holunderkernöl durch die Eucodis Lipasen EL001 sowie EL070 bei 30°C in Hexan unter Einsatz von 25 Äquivalenten Methanol. Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Konversion der komplexen Triglyceride der Pflanzenöle in die korrespondierenden Fettsäuremethylester ist in Abbildung 87 zusammengefasst und veranschaulicht eine nahezu quantitative Umwandlung der ausgewählten Pflanzenöle in FAME innerhalb von 46 h. Eine Verlängerung der Reaktionszeit von zwei Tagen auf eine Woche brachte allerdings nicht die erhoffte vollständige Konversion von Drachenkopföl und Holunderkernöl und macht derartig lange Inkubationszeiten wenig sinnvoll.

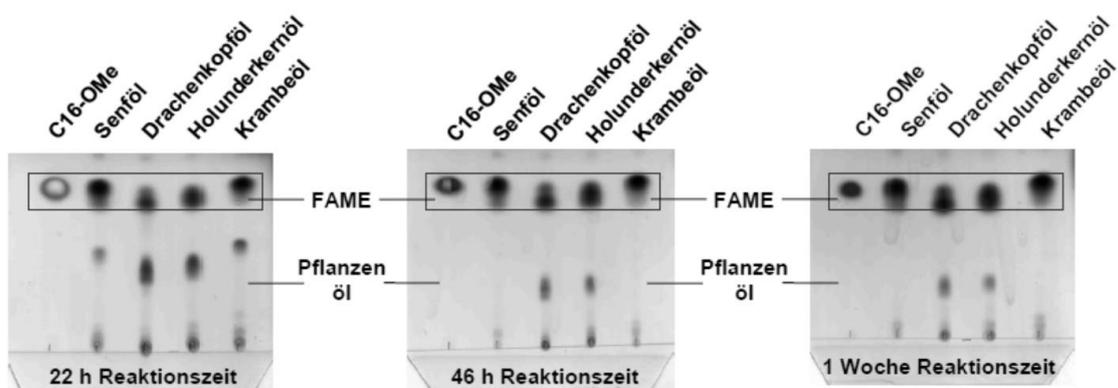


Abbildung 87: EL001- und EL070-katalysierte Umesterung von Pflanzenölen in Hexan bei 30°C. Bedingungen: 100 mg Pflanzenöl, 25 Äqu. MeOH, 100 mg EL001/EL070, 7,5 ml Hexan, 30°C, 22 h-1 Woche Reaktionszeit.

Für eine Charakterisierung der enzymatisch gebildeten Transesterifizierungsprodukte mittels Gaschromatographie erfolgte zunächst eine säulenchromatographische Abtrennung von Triglyceriden und Fettsäuremethylestern mittels Kieselgel 60 als stationärer Phase und einem Petrolether-Essigester-Gemisch als mobiler Phase. Die detaillierte GC-Analyse der FAME-Fractionen erfolgte im Arbeitskreis von Prof. M. Pietzsch (Universität Halle-Wittenberg) gemäß dem in der ersten Projektphase durchgeführten Ringversuch zur Untersuchung der Fettsäurezusammensetzung der Pflanzenöle. Es kamen ein GC-Gerät der Fa. Agilent-Technologies (Agilent 7890A), eine SBP-PUFA-Kapillarsäule (Supelco, 30 m x 0,25 mm x 0,20 µm), FID-Detektion, Splitinjektion sowie ein Stufengradient zur Separierung von kurz-, mittel- und langkettigen FAME zum Einsatz. Die GC-Chromatogramme in Abbildung 88 demonstrieren in Übereinstimmung zu den NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Transesterifizierungsprodukte (nicht abgebildet) die hohe Reinheit der mittels EL070-produzierten Fettsäuremethylester, die auf der Basis kommerziell erhältlicher analytischer Standards (Supelco 37 Component FAME Mix; Supelco FAME Mix RM-3) exakt identifiziert und quantifiziert werden konnten (siehe auch Tabelle 59).

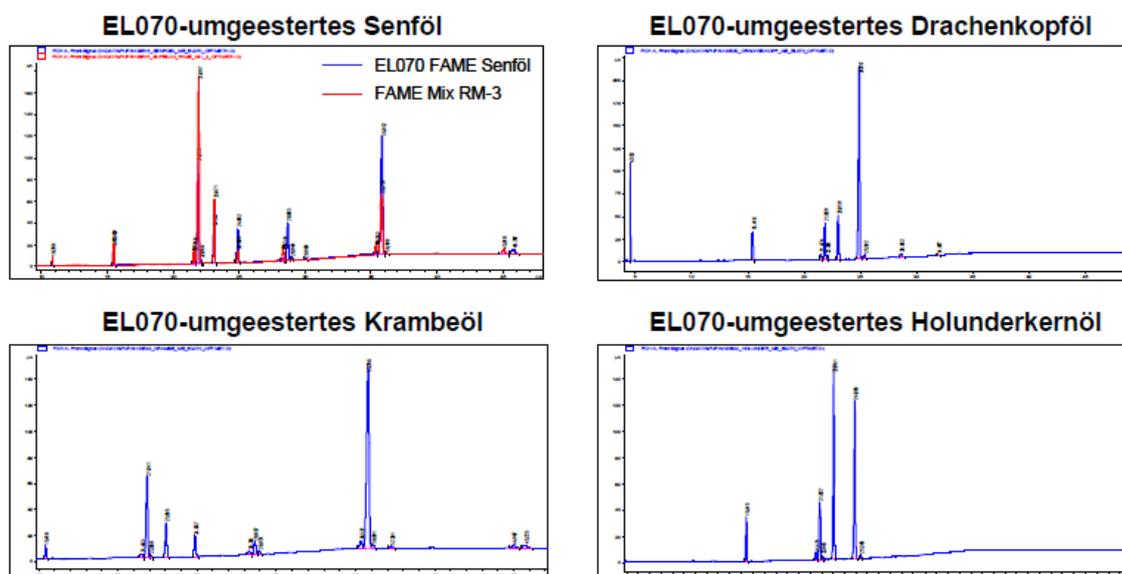


Abbildung 88: GC-Analyse der mittels EL070 gebildeten Fettsäuremethylester.

Ohne bezüglich der Daten in Tabelle 59 ins Detail gehen zu wollen, macht eine genaue Analyse der Methylester der interessanten mittel- und langkettigen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu den Ringversuchen deutlich, dass sowohl die EL001 als auch die EL070 ohne jegliche Regio- und/oder Fettsäureselektivität eine vollständige Konversion der ausgewählten Pflanzenöle in die entsprechenden Fettsäuremethylester katalysieren. Demzufolge lassen sich solche Umesterungen in Zukunft ebenso biokatalytisch mit den neuen Eucodis Lipasen EL001 und EL070 durchführen, da sich die enzymatisch gebildeten Produkte (FAMES) nicht von den chemisch-katalytischen unterscheiden.

Tabelle 59: Fettsäuremuster nach der chemischen und EL001- bzw. EL070-katalysierten Umesterung von Senföl, Drachenkopfl, Holunderkernöl und Krambeöl.

Pflanzenöl	Lipase	C16:0	C18:0	C18:1 <i>cis/trans</i>	C18:2	C18:3	C20:1	C22:1	C24:1
Senf	EL001	3,37	0,91	24,0/1,40	9,21	9,64	10,2	35,5	1,92
	EL070	2,47	1,01	23,0/0,85	8,30	8,48	10,6	40,8	2,51
	chemisch	2,25	0,93	22,9	8,20	9,00	10,3	40,8	2,40
Drachenkopf	EL001	6,97	1,59	11,7/1,88	13,7	58,8	1,50	0,22	-
	EL070	6,44	1,77	10,5/1,25	12,7	60,9	1,54	-	-
	chemisch	6,40	1,80	10,9	13,3	60,4	1,50	-	-
Holunderkern	EL001	7,25	1,23	9,79/1,58	39,3	37,1	0,36	-	-
	EL070	7,13	1,51	12,1/0,81	41,9	35,8	-	-	-
	chemisch	1,44	-	12,3	40,8	35,2	-	-	-
Krambe	EL001	3,11	0,89	15,0/1,11	7,46	5,33	3,06	55,8	1,17
	EL070	2,10	0,90	17,4/0,46	7,37	4,56	3,14	56,3	1,34
	chemisch	1,79	0,88	15,5	6,90	5,25	2,88	59,0	1,45

Untersucht man hingegen die enzymatische Umesterung von Senföl, Drachenkopfl, Holunderkernöl und Krambeöl bei 30°C in Hexan unter Einsatz der Eucodis Lipasen EL012 und EL013, so wird selbst über einen langen Reaktionszeitraum von drei Tagen nur eine partielle Umesterung der Triglyceride zu Fettsäuremethylestern beobachtet (siehe Abbildung 89).

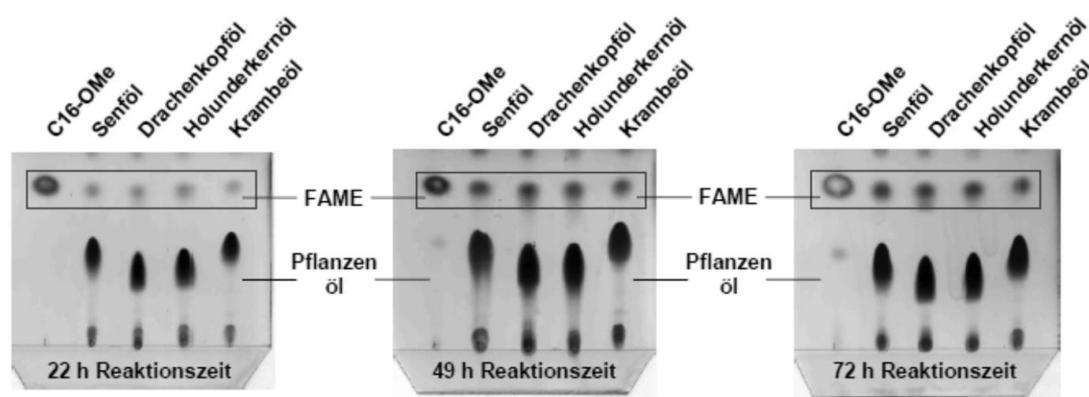


Abbildung 89: EL012- und EL013-katalysierte Umesterung von Pflanzenölen in Hexan. Bedingungen: 100 mg Pflanzenöl, 25 Äqu. MeOH, 200 mg EL012/EL013, 7,5 ml Hexan, 30°C, 22-72 h Reaktionszeit.

Ursache hierfür könnte einerseits eine zu geringe Enzymaktivität unter den ausgewählten Reaktionsbedingungen sein. Andererseits wäre eine restriktive Substratspezifität/selektivität dieser beiden Lipasen denkbar, welche wiederum die Anreicherung bestimmter Fettsäuren in Form ihrer Methylester hervorrufen könnte. Zur gaschromatographischen Untersuchung dessen wurden alle Reaktionsansätze mittels Flashchromatographie aufgereinigt und anschließend in entsprechender Konzentration von Herrn M. Wolfram (AK Prof. M. Pietzsch, Universität Halle-Wittenberg) analysiert. Wie aus dem direkten Vergleich der Fettsäure-

muster der mittels EL012 und EL013 umgeesterten Pflanzenöle hervorgeht (siehe Tabelle 60), gibt es signifikante Differenzen im Bereich von C16:0, *trans* C18:1 sowie allen längerkettigen Fettsäuremethylestern zu verzeichnen. Während sich die mittels EL012 gebildeten FAME nur unwesentlich von den chemischen Umesterungsprodukten unterscheiden (siehe Tabelle 60), resultierte der Einsatz der EL013 in einer Akkumulation von Palmitinsäure-OMe und Elaidinsäure-OMe sowie in einer Abreicherung längerkettiger gesättigter und ungesättigter Fettsäuren. Demzufolge lassen sich mit Hilfe der Eucodis Lipase 13 gezielt mittelkettige Fettsäuren aus den Triglyceriden entfernen und es kommt zu einer Akkumulation vorwiegend langkettiger Fettsäuren in den Triglyceriden.

Tabelle 60: Fettsäurezusammensetzung nach der EL012- und EL013-katalysierten Umesterung von Senföl, Drachenkopfl, Holunderkernöl und Krambeöl.

Pflanzenöl	Lipase	C16:0	C18:0	C18:1 <i>cis/trans</i>	C18:2	C18:3	C20:1	C22:1	C24:1
Senf	EL012	3,42	1,02	20,2/1,18	8,33	8,93	11,6	40,5	1,93
	EL013	24,9	0,73	3,68/27,4	1,47	2,18	2,51	10,1	-
Drachenkopf	EL012	15,3	1,41	8,90/1,61	12,3	64,3	1,61	1,17	-
	EL013	22,6	0,53	2,26/25,3	3,77	20,1	0,25	-	-
Holunderkern	EL012	6,62	1,15	9,62/0,88	39,8	40,3	0,35	-	-
	EL013	21,8	0,83	4,15/22,1	15,5	14,4	-	-	-
Krambe	EL012	3,18	0,91	13,8/0,87	7,00	4,33	3,95	58,9	0,97
	EL013	27,4	0,56	2,71/29,9	1,60	0,99	0,69	7,32	-

3.5.1.6 Umesterung der Pflanzenöle in ionischen Flüssigkeiten

Nach der erfolgreichen Transesterifizierung der vier ausgewählten heimischen Pflanzenöle in gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln wie Hexan bestand nun das Ziel nachfolgender Studien darin, alternative Reaktionsmedien zur Umesterung von Triglyceriden zu etablieren.

Als sogenannte grüne Lösungsmittel rückten dabei die ionischen Flüssigkeiten in den Mittelpunkt, welche eine relativ neuartige Klasse an Lösungsmitteln darstellen, bei Temperaturen unter 100°C flüssig sind und aus organischen Kationen und (an)organischen Anionen diverser Strukturen bestehen. Charakteristische Merkmale wie ihre exzellenten Lösemittleigenschaften, ihre hohe thermische und chemische Stabilität sowie ihre potentielle Fähigkeit der Beeinflussung der Stabilität, Aktivität und Selektivität von Enzymen qualifizierten sie per se als Reaktionsmedien der Wahl für Biokonversionen. Basierend auf dem erfolgreichen Einsatz verschiedener Hydrolasen in ionischen Flüssigkeiten zur Alkoholyse, Aminolyse, Perhydrolyse, Kinetischen Trennung von Alkoholen, Umesterung/Synthese von Peptidderivaten sowie Proteinrenaturierung wurden für die geplanten Umesterungsexperimente fünf verschiedene ionische Flüssigkeiten ausgewählt (siehe Abbildung 90). Als Anionen kamen das Tetrafluorborat sowie das Hexafluorophosphat zur Anwendung. Bei den Kationen wurden 1-Ethyl-3-methylimidazolium-, 1-Butyl-3-methylimidazolium- und 1-Octyl-3-methylimidazoliumderivate in die Studien einbezogen, welche eine Variation der Kettenlänge des Alkylsubstituenten am Imidazoliumring erlaubten.

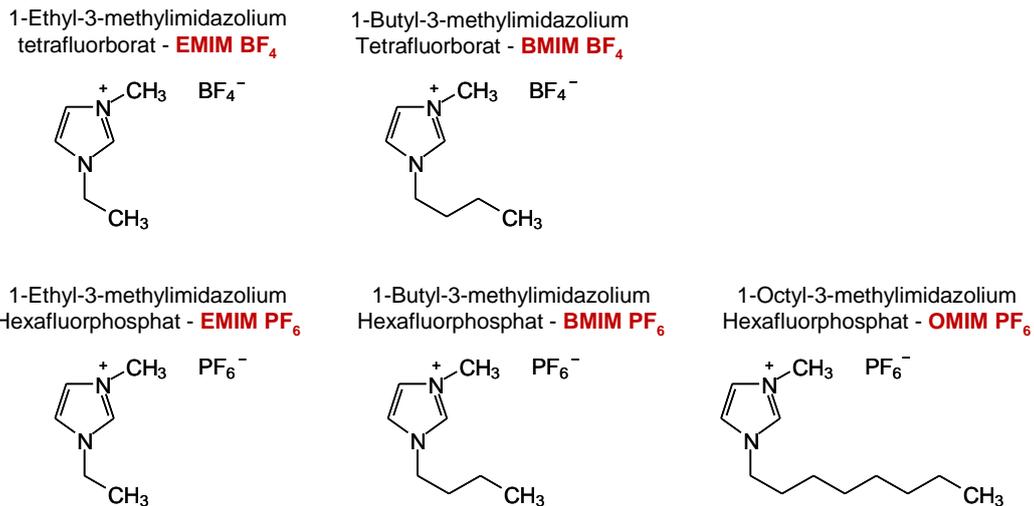


Abbildung 90: Chemische Strukturen der experimentell eingesetzten ionischen Flüssigkeiten.

Auf der Grundlage von vorhandenen Literaturdaten wurden die Umsetzungen zunächst mit dem Referenzenzym Cal B (Novo 435) etabliert, um im nachfolgenden Schritt die neuen Eucodis Lipasen einzusetzen. Der zeitliche Verlauf der Novo 435-katalysierten Umesterung von Senföl bei 60°C in einem Gemisch aus 45% (v/v/v) Senföl, 45% (v/v/v) ionischer Flüssigkeit und 10% (v/v/v) MeOH ist in Abbildung 91 zusammenfassend dargestellt. Aus der Betrachtung der abnehmenden Triglyceride des Senföls und der zunehmenden Fettsäuremethylester geht klar hervor, dass innerhalb von acht Stunden eine vollständige Transesterifizierung des Senföls in den ionischen Flüssigkeiten BMIM PF₆ und OMIM PF₆ stattfindet. Eine Verkleinerung der Größe des Anions bei gleichbleibendem Kation hatte im Falle von BMIM BF₄ eine deutliche Reduzierung der Reaktionsgeschwindigkeit von Novo 435 zur Folge. Für die Verwendung der beiden kurzkettingen 1-Ethyl-3-methylimidazoliumderivate als Cosolvent reichten im Gegensatz dazu auch zwei Tage Reaktionszeit nicht aus, eine vollständige enzymatische Konversion des Senföls zu erzielen.

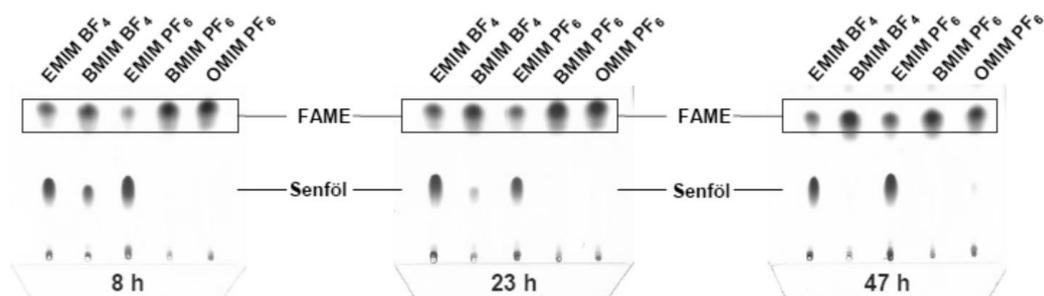


Abbildung 91: Novo 435-katalysierte Umesterung von Senföl in diversen ionischen Flüssigkeiten. Bedingungen: 45 % (v/v/v) Senföl, 45 % (v/v/v) ionische Flüssigkeit, 10 % (v/v/v) MeOH, 20 mg Novo 435, 60°C, 8-47 h.

Vergleicht man den in Abbildung 92 dargestellten zeitlichen Verlauf der Novo 435-katalysierten Umesterung von Senföl in BMIM PF₆ mit dem im gebräuchlichen organischen Lösemittel Toluol, so wird überraschenderweise eine signifikant schnellere Transesterifizierung in der ionischen Flüssigkeit beobachtet. Während in BMIM PF₆ nach 20 min bereits mehr als 50% der Triglyceride in die Monomere überführt wurden und nach einer Stunde eine nahezu vollständige Konversion von Senföl realisiert ist, können über den selben Zeitraum unter Einsatz von Toluol als Cosolvent immer noch Triglyceride detektiert werden.

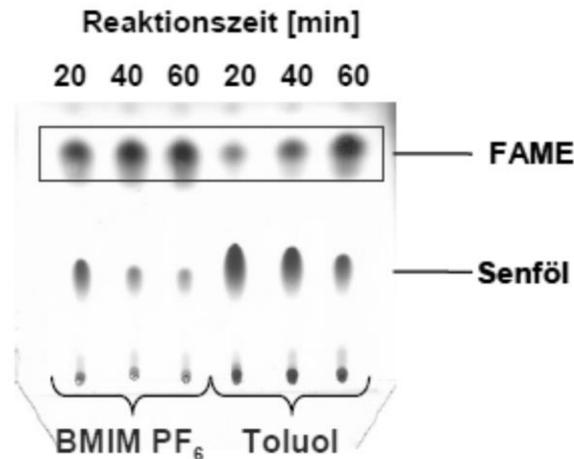


Abbildung 92: Zeitvergleich der Novo 435-katalysierten Umesterung von Senföl in BMIM PF₆ und Toluol. Bedingungen: 45 % (v/v/v) Senföl, 45 % (v/v/v) BMIM BF₆/Toluol, 10 % (v/v/v) MeOH, 20 mg Novo 435, 60°C, 20-60 min Reaktionszeit.

Basierend auf der Anwendung von Novo 435 zur Umesterung von Pflanzenölen in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten wurden in den nachfolgenden Experimenten die favorisierten Eucodis Lipasen für derartige Transesterifizierungsreaktionen eingesetzt. Aus der DC-Analyse nach einer Reaktionszeit von einem Tag wird ersichtlich (siehe Abbildung 93), dass die EL001, EL013, EL016 und EL070 generell ihre aus organischen Lösemitteln bekannte Enzymaktivität in den ausgewählten ionischen Flüssigkeiten behalten. In Übereinstimmung zum Referenzenzym Novo 435 erwies sich auch für diese Enzyme BMIM PF₆ als das Reaktionsmedium der Wahl, wohingegen die ionischen Flüssigkeiten mit den kurzen Ethyl- und den langen Octylketten am Imidazoliumring die geringste Umesterungsrate verursachten.

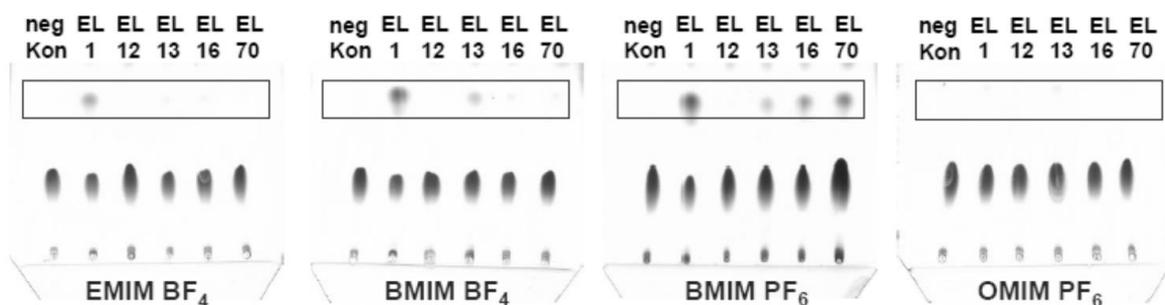


Abbildung 93: Eucodis Lipasen-katalysierte Umesterung von Senföl in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten. Bedingungen: 45 % (v/v/v) Senföl, 45 % (v/v/v) ionische Flüssigkeit, 10 % (v/v/v) MeOH, 20 mg EL001/EL012/ EL013/EL016/EL070, 30°C, 47 h Reaktionszeit.

Um feststellen zu können, ob eine Art Aufquellen der lyophilisierten Eucodis Lipasen für die vergleichsweise geringe Umsatzrate verantwortlich ist, erfolgte der Einsatz der EP403/S-immobilisierten EL070 zur Umesterung von Senföl in einem Gemisch aus 45% (v/v/v) Senföl, 45 % (v/v/v) BMIM PF₆/OMIM PF₆ und 10% (v/v/v) Methanol. Wie aus Abbildung 94 aus der Betrachtung der FAME Spots hervorgeht, gelang über einen Zeitraum von zwei Tagen eine vollständige EL070_{immob}-katalysierte Konversion aller Triglyceride, wohingegen die Verwendung von EMIM BF₄ und BMIM BF₄ als Cosolvent keinerlei enzymatischen Umsatz zur Folge hatte.

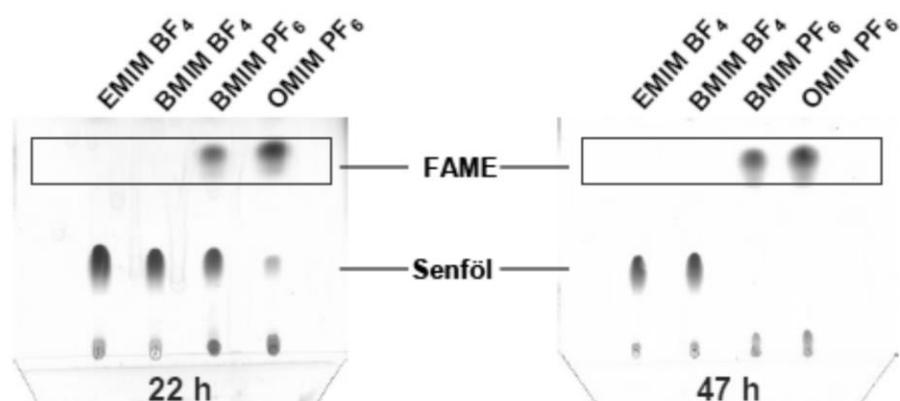


Abbildung 94: EL070immob-katalysierte Umesterung von Senföl in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten. Bedingungen: 45 % (v/v/v) Senföl, 45 % (v/v/v) ionische Flüssigkeit, 10 % (v/v/v) MeOH, 50 mg EL070immob, 30°C, 22-47 h.

3.5.1.7 Umesterung der Pflanzenöle ohne Lösungsmittelzusatz

Nachdem die Verwertung nachwachsender Rohstoffe mittels enzymatischer Umesterung von Pflanzenölen sowohl in herkömmlichen organischen Lösungsmitteln wie Hexan als auch in „grünen“ Lösemitteln wie ionischen Flüssigkeiten exemplarisch demonstriert werden konnte, galt es solche Biokonversionen ohne jeglichen Lösemittelzusatz genauer experimentell zu studieren. Zu diesem Zweck erfolgte unter Einsatz von Novo 435 eine Optimierung der Reaktionstemperatur in einem Bereich von 40°C bis 60°C sowie eine Variation des Methanolgehalts von 1% (v/v) bis zu 10% (v/v). Wie aus den drei HP Dünnschichtplatten bei Betrachtung der gebildeten Fettsäuremethylester klar hervorgeht (siehe Abbildung 95), katalysiert Novo 435 erfolgreich über einen Zeitraum von 21 Stunden in Abhängigkeit von den gewählten Reaktionsparametern die gewünschte Umesterung der komplexen Triglyceride von Senföl in die korrespondierenden FAME. Bezüglich des Einflusses der Temperatur kann konstatiert werden, dass für die geplante Transesterifizierung 60°C das Optimum der Enzymaktivität zu sein scheint. Hinsichtlich des Methanolgehalts wird ersichtlich, dass unabhängig von der gewählten Reaktionstemperatur acht Prozent Methanol die höchste Konversionsrate von Senföl zur Folge haben.

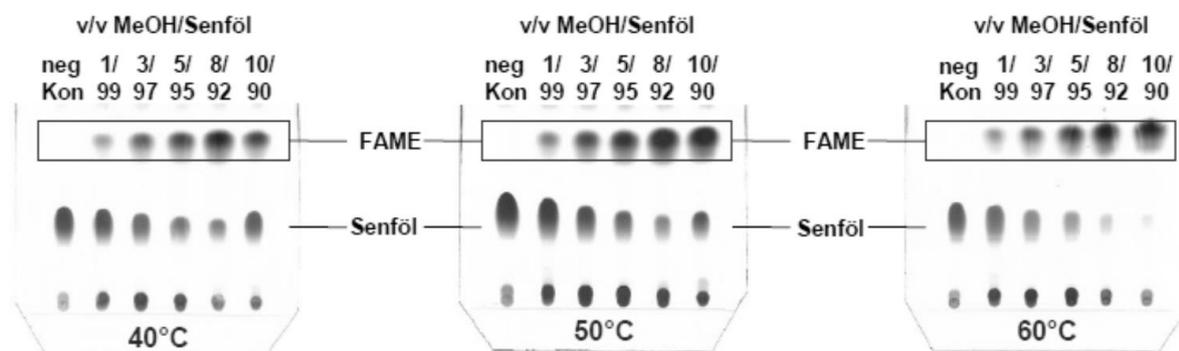


Abbildung 95: Einfluss der Temperatur und des Methanolgehalts auf die Novo 435-katalysierte Umesterung von Senföl ohne Lösungsmittelzusatz. Bedingungen: 90-99 % (v/v) Senföl, 1-10 % (v/v) MeOH, 10 mg Novo 435, 40-60°C, 21 h Reaktionszeit.

Betrachtet man darüber hinaus den Einfluss höherer Methanolkonzentration auf den Novo 435-katalysierten Umesterungsprozess von Senföl, so wird über einen Temperaturbereich von 40°C bis 60°C eine hemmende Wirkung von 20-50% (v/v) Alkohol im Vergleich zu einem Methanolgehalt von 10% (v/v) beobachtet (siehe Abbildung 96).

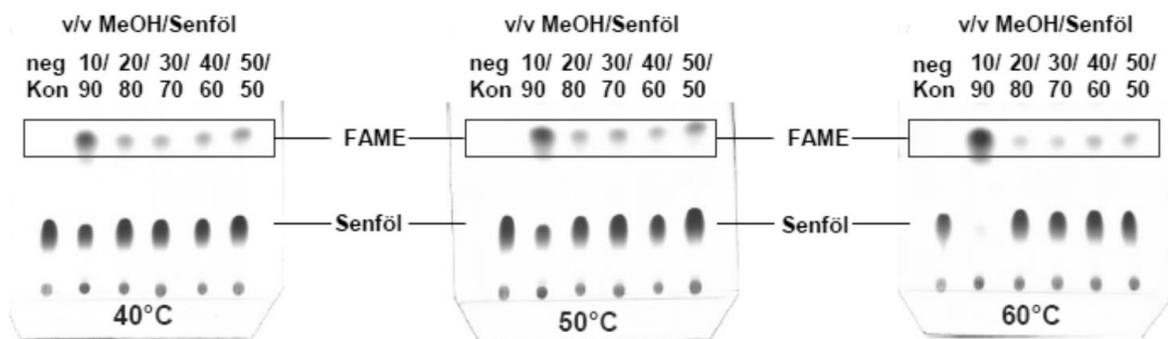


Abbildung 96: Einfluss der Temperatur und des Methanolgehalts auf die Novo 435-katalysierte Umesterung von Senföl ohne Lösungsmittelzusatz. Bedingungen: 50-90 % (v/v) Senföl, 10-50 % (v/v) MeOH, 10 mg Novo 435, 40-60°C, 21 h Reaktionszeit.

Den Optimierungsstudien unter Einsatz von Novo 435 als Biokatalysator schlossen sich vergleichbare Untersuchungen zur lösemittelfreien Transesterifizierung von Senföl mittels der kovalent und adsorptiv immobilisierten Eucodis Lipasen EL070-EP und EL012-OC an. In Übereinstimmung zum Referenzenzym Novo 435 erwiesen sich Methanolgehalte in einem Bereich zwischen 5 % und 10 % (v/v) als optimal für die katalytische Aktivität (siehe Abbildung 97).

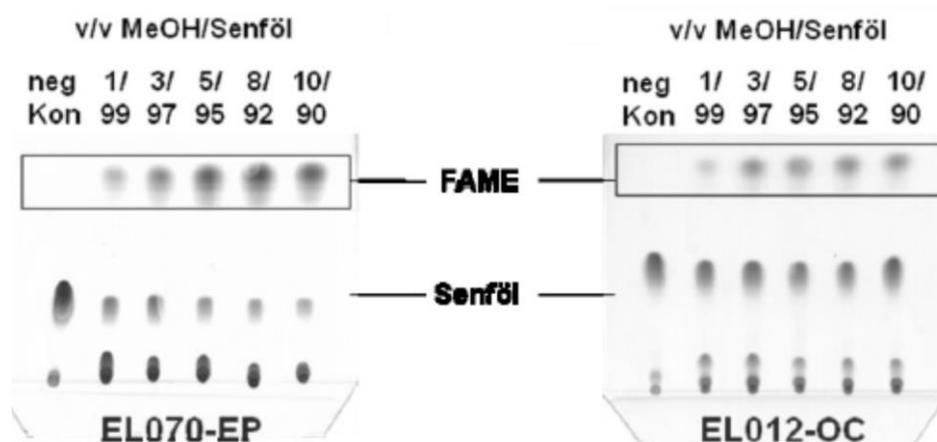


Abbildung 97: Einfluss des Methanolgehalts auf die EL012/EL070immob-katalysierte Umesterung von Senföl ohne Lösungsmittelzusatz. Bedingungen: 90-99% (v/v) Senföl, 1-10% (v/v) MeOH, 50 mg EL070-EP, 50 mg EL012-OC, 40°C, 24 h.

Ein ebenso positives Resultat für die lösemittelfreie Umesterung von Senföl konnte für den Einsatz von Oleylalkohol als Alkoholkomponente erhalten werden (siehe Abbildung 98). Sprühgetrocknete und immobilisierte Enzymchargen der EL012 und EL070 eigneten sich ebenso wie Novo 435 unabhängig von der Reaktionstemperatur zur effizienten Synthese von Fettsäureoleylestern. Während unter Einsatz aller immobilisierten Lipasen über Nacht eine vollständige Konversion von Senföl erzielt wurde, führte die Anwendung der sprühgetrockneten EL012-JM nur zu einer partiellen Ölumesterung, die sich möglicherweise durch den Einsatz höherer Enzymkonzentrationen steigern ließe.

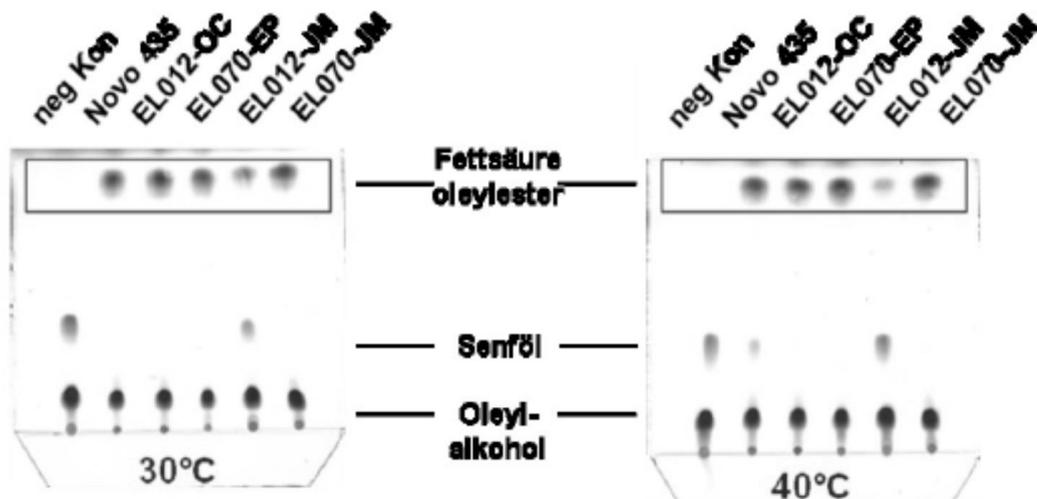


Abbildung 98: Lipase-katalysierte Umesterung von Senföl mit Oleylalkohol ohne Lösungsmittelzusatz. Bedingungen: 100 µl Senföl, 100 µl Oleylalkohol, 10 mg Novo435, 10 mg EL012 (JM), 10 mg EL070 (JM), 50 mg EL012-OC (immob), 50 mg EL070-EP (immob), 30°C / 40°C, 20 h.

3.5.2 Screening nach epoxidierenden Lipasen (Fraunhofer IGB)

Im Rahmen des Projektes wurde am Fraunhofer IGB ein Screening auf epoxidierende Enzyme durchgeführt. Diese Screening hatte zum Ziel neue Enzyme zu identifizieren, die die Bildung von Epoxiden katalysieren. Für diese Screening wurden 13 neue Lipasen/Esterasen des Projektpartners Eucodis, eine Chlorperoxidase (Cpa), acht am Fraunhofer IGB produzierte Lipasen und neun kommerziell verfügbare Lipasen in nichtimmobilisierter Form verwendet. Als Referenz kamen die kommerziell erhältliche Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym®435) in immobilisierter Form und die entsprechend nicht-immobilisierte Lipase B aus demselben Organismus zum Einsatz. Den eigentlichen Versuchen zur Epoxidierung mit unterschiedlichen Enzympräparaten ging die Entwicklung und Etablierung verschiedener Analysemethoden voraus:

- NBP-Test: photometrischer Test im Mikrotiterplattenmaßstab basierend auf einer Reaktion von Epoxidgruppen mit 4-(4-Nitrobenzyl)pyridine (NBP)
- GC-FID: Die GC-FID-Methode wurde von der zentralen Analytik am IGB etabliert und basiert auf einer Derivatisierung von Triglyceriden und freien Fettsäuren zu dem jeweiligen Fettsäuremethylestern.
- HPLC-MS: Die HPLC-MS-Methode (basierend auf einem Gradientenlauf) wurde ebenfalls von der zentralen Analytik etabliert.
- Dünnschichtchromatographie (DC): Die DC-Methode ist zur Analyse von Ölen, Fettsäuren, Fettsäuremethylestern und den korrespondierenden Epoxiden geeignet. Als stationäre Phase kommt eine DC Kieselgel 60 F₂₅₄-Platte zum Einsatz. Das Laufmittel besteht aus n-Heptan, Diethylether und Essigsäure. Die Färbelösung besteht aus Essigsäure, 10%iger Schwefelsäure, p-Anisaldehyd und Wasser (VE).
- Jodzahl: Die Jodzahl wird nach der Europäischen Norm EN ISO 3961 bestimmt. Zur Ermittlung der Jodzahl wird eine Prüfmenge in Lösemittel gelöst und mit Wijs-Reagenz versetzt. Nach einer festgelegten Zeit werden Kaliumiodid und Wasser zugegeben und das freigesetzte Iod mit Natriumthiosulfatlösung titriert.

Das Screening auf epoxidierende Enzyme wurde in 96-Deep-Well-Platten mit einem Volumen von 2,2 mL und anschließend in 4 mL Vials mit Schraubdeckel durchgeführt. Als Substrat kam ausschließlich Ölsäure (OA) zum Einsatz, da die Analyse von Ölsäure (OA) und dem Reaktionsprodukt Epoxystearinsäure (ESA) relativ einfach ist. Die Versuche wurden mit einer 10%-igen Wasserstoffperoxid-Lösung durchgeführt, um so eine mögliche Inaktivierung des freien Enzyms zu reduzieren. In diesen Experimenten konnten Lipasen der Firma Eucodis identifiziert werden, die eine Persäurebildung katalysieren und somit für die Epoxidierung von Ölsäure (OA) einsetzbar sind.

Tabelle 61 zeigt eine qualitative Bewertung der getesteten Enzyme. Die Bildung von Epoxystearinsäure (ESA) konnte für die Eucodis Lipasen EL001 und EL012, Novozym® 435, die nicht-immobilisierte Lipase B aus *Candida antarctica* und die am Fraunhofer IGB produzierte Lipase IGB-PL nachgewiesen werden. Für alle anderen Lipasen war die Bildung von Epoxiden nicht nachweisbar.

Tabelle 61: Ergebnis des Screenings nach epoxidierenden Enzymen - Untersucht wurde der Umsatz von Ölsäure zu Epoxystearinsäure mit unterschiedlichen Lipasen der Fa. Eucodis, einer am IGB produzierten Lipase IGBpa, einer Chlorperoxidase und der Lipase B aus *Candida antarctica* in immobilisierter Form (Novozym® 435) und als freies Enzym.

Eucodis Lipase Nr.													Andere Enzyme		Referenz	
1	3	4	6	8	9	12	13	14	15	16	56	70	IGB-PL	Cpa	Novo435 (immob.)	Lipase aus <i>C.antarctica</i> (freies Enzym)
+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

„+“: Epoxystearinsäure nachgewiesen; „-“: Epoxystearinsäure nicht detektiert

In weiteren Versuchen wurde nochmals versucht die Epoxidierung mit Lipase EL012 weiter zu optimieren. Im Focus dieser Versuche stand vor allem der Einfluss der H₂O₂-Zugabe auf den Umsatz von Ölsäure.

Die Versuche haben gezeigt, dass sowohl die einmalige als auch die schrittweise Zugabe von 30%-iger H₂O₂-Lösung keinen erhöhten Umsatz ermöglichte, sondern möglicherweise zu einer Inaktivierung des freien Enzyms führten.

Aus diesem Grund wurde eine 15%-ige H₂O₂-Lösung mit Hilfe einer Schlauchpumpe zugeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss des eingesetzten Molverhältnisses von H₂O₂ zu C-C-Doppelbindung auf den Umsatz von Ölsäure untersucht. Die Umsetzung von Ölsäure konnte durch die Verwendung einer 15%-igen H₂O₂-Lösung geringfügig erhöht werden. Die Erhöhung des H₂O₂:C=C-Molverhältnisses führte hingegen nicht zu einem gesteigerten Umsatz der Ölsäure zu Epoxystearinsäure.

Die Versuche zur variierten Wasserstoffperoxid-Zugabe zu Reaktionsansätzen mit freien Enzymen führten insgesamt zu der Erkenntnis, dass es trotz des Einsatzes einer niedrigeren H₂O₂-Konzentration und einer schrittweisen Zugabe der Wasserstoffperoxid-Lösung zu einer Inaktivierung des freien Enzyms kommen kann. Eine gesteigerte Stabilität kann hier gegebenenfalls durch eine Immobilisierung des Enzyms erreicht werden.

Im Verlauf der Screeningversuche konnten die von Eucodis zur Verfügung gestellte Lipasen EL001 und EL012 und die am Fraunhofer IGB produzierte Lipase (IGBpa) als neue Enzyme zur Epoxidierung von Ölsäure identifiziert werden. Außerdem konnte die Epoxidierung von Ölsäure mit Novozym® 435 und der freien *C. antarctica* Lipase gezeigt werden.

Die als potentiell geeignetes Enzym identifizierte Lipase EL012 der Fa. Eucodis wurde von der Uni Halle in *E.coli* exprimiert und als Enzymlösung in 50 Vol.% Glycerin zur Verfügung gestellt und in dem bereits etablierten Epoxidierungsansatz mit Ölsäure als Substrat getestet. Anhand dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass sich die rekombinant exprimierte Lipase EL012 ebenfalls für die Epoxidierung von Ölsäure eignet. In Abbildung 99 ist beispielhaft das Ergebnis einer dünnenschichtchromatographischen Analyse der Umsetzung von Ölsäure (OA) zu Epoxystearinsäure (ESA) gezeigt.



Abbildung 99: Dünnschichtchromatographische Analyse der Epoxidierung von 0,3 M Ölsäure (OA) in Toluol zu Epoxystearinsäure (ESA) mit verschiedenen Lipasen in nicht-immobilisierter Form: rekombinante Lipase EL012 (rek. EL12), in Wildtyp-Stamm exprimierte Lipase EL012 (EL12) und Lipase B aus *Candida antarctica*. Aufgetragen wurden Proben nach 4, 8 und 24 h Inkubation bei Raumtemperatur.

Zusätzlich zu den von Eucodis bereitgestellten Lipasen wurden am IGB sieben weitere Stämme der *Pseudozyma spp.* kultiviert, auf Lipaseaktivität im Kulturüberstand untersucht und deren Eignung für die enzymatische Epoxidierung getestet. Die Lipasen werden nachfolgend mit PL1-PL7 bezeichnet. Zur Lipase-Gewinnung wurden die einzelnen *Pseudozyma*-Stämme im Komplexmedium mit Sojaöl kultiviert und der Überstand analysiert. Abbildung 100 zeigt die Ergebnisse der dünnenschichtchromatographische Analyse der Epoxidierung von Ölsäure mit verschiedenen aufkonzentrierten Kulturüberständen nach 21 h Reaktionszeit. Auf diesem Wege konnte eine Lipase aus einer weiteren *Pseudozyma sp.* (PL1) eindeutig identifiziert werden, die ein zur Epoxidierung geeignetes Enzym exprimiert. Bei zwei weiteren Stämmen (PL3 und PL4) war auf Höhe der Epoxystearinsäure (ESA) eine schwache Bande zu erkennen.

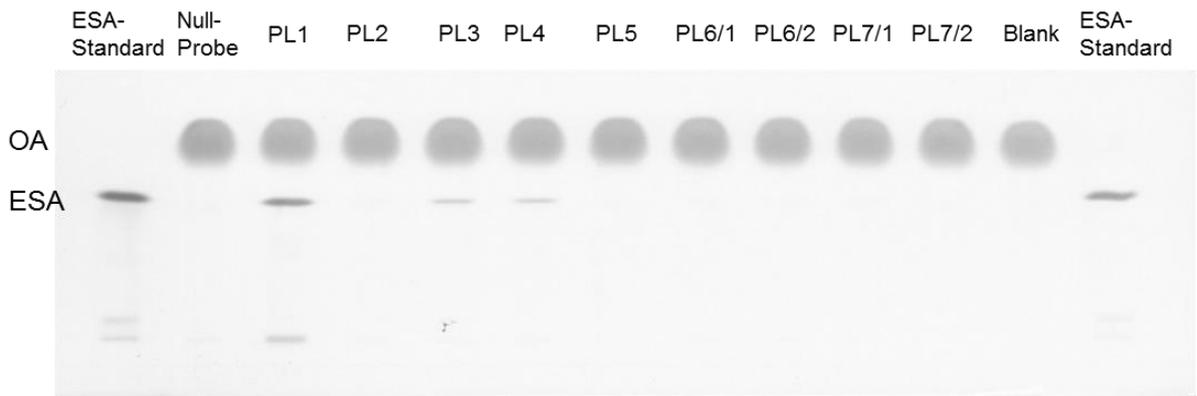


Abbildung 100: Dünnschichtchromatographische Analyse der Epoxidierung von 0,3 M Ölsäure (OA) in Toluol zu Epoxystearinsäure (ESA) mit Kulturüberständen verschiedener *Pseudozyma spp.* Aufgetragen wurden Proben nach 21 h Inkubation bei Raumtemperatur.

Um das Spektrum an Enzymen nochmals zu erweitern, wurden zusätzlich folgende kommerziell verfügbare Lipasepräparate (kvL) untersucht, die im weiteren Verlauf mit kvL1-kvL9 bezeichnet werden sollen.

Zuerst wurde von den einzelnen Enzympräparaten die Lipaseaktivität mit dem p-Nitrophenyloctanoat-Assay bestimmt und die Aktivität zur Berechnung der einzusetzenden Enzymmenge benutzt. Für einzelne Lipasepräparate (kvL3, kvL6 und kvL7) konnte dabei keine eindeutige Lipaseaktivität gegen p-Nitrophenyloctanoat ermittelt werden. Hier wurde jeweils spezifische Menge Präparat pro mmol C=C eingesetzt. Bei den Versuchen zur Epoxidierung von Ölsäure konnte für die Lipasepräparate kvL2, kvL6, kvL7 und kvL9 mittels Dünnschichtchromatographie eine Umsetzung zu Epoxystearinsäure nachgewiesen werden. Tabelle 62 fasst die in der 1. Förderphase hinsichtlich der Epoxidierung positiv getesteten Enzyme nochmals zusammen.

Tabelle 62: Zusammenfassung der für eine Epoxidierung positiv getesteten Enzymen: Untersucht wurde der Umsatz von Ölsäure zu Epoxystearinsäure mit unterschiedlichen Lipasen der Fa. Eucodis, verschiedener am IGB produzierten Lipase und der Lipase B aus *Candida antarctica* in immobilisierte Form (Novozym® 435) und als freies Enzym.

Lipase	c(OA) in mol/L	spez. Aktivität in U/mmol C=C	ESA Bildung
<i>C.antarctica</i> (immobilized)	1,5	1,28	+++
<i>C.antarctica</i> (free enzyme)	0,3	10	++
EL001	1,5	10	+
EL012	1,5	10	+
EL012 (Charge 2)	0,3	10	+
rek. EL012 (expres. in <i>E.coli</i>)	0,3	10	+
IGB-PL (10x)	1	1,28	++
IGB-PL (10x) (50 v/v Glycerin)	1	1,28	++
kvL2	0,3	10	++
kvL7	0,3	640 mg/mmol C=C	+
kvL6	0,3	20 mg/mmol C=C	++
kvL6	0,3	560 mg/mmol C=C	++
kvL9	0,3	10	++
PL4	0,3	0,2	+
PL3	0,3	0,2	+
PL1	0,3	0,2	+

+++ : hoher Umsatz zu ESA; ++ : guter Umsatz zu ESA; + : geringer Umsatz zu ESA

Nachdem die im Rahmen des Screenings für die chemo-enzymatische Epoxidierung positiv getestete Eucodis Lipase EL012 von der Uni Halle rekombinant hergestellt wurde und dem rekombinante Enzym ebenfalls Epoxidbildung nachgewiesen werden konnte, wurden von der Uni Halle zwei adsorptive auf Lewatit VP OC 1600 immobilisierte Präparate der EL012 zur Verfügung gestellt. Verglichen wurde dabei die adsorptive Immobilisierung in An- und Abwesenheit von Triton X-100. Als Substrat zur Untersuchung der Eignung der immobilisierten EL012 für die Epoxidierung wurde 0,3 M Ölsäure in Toluol als Lösemittel eingesetzt. Neben wässrigem Wasserstoffperoxid (30 Gew.%) wurde zusätzlich Harnstoffgebundenes Wasserstoffperoxide eingesetzt, das im Vergleich zur wässrigen Variante eine verlangsamte Wasserstoffperoxidfreisetzung ermöglicht und das Enzym so geschont werden kann. Pro mmol Ölsäure wurden 21 mg immobilisierter Lipase eingesetzt.

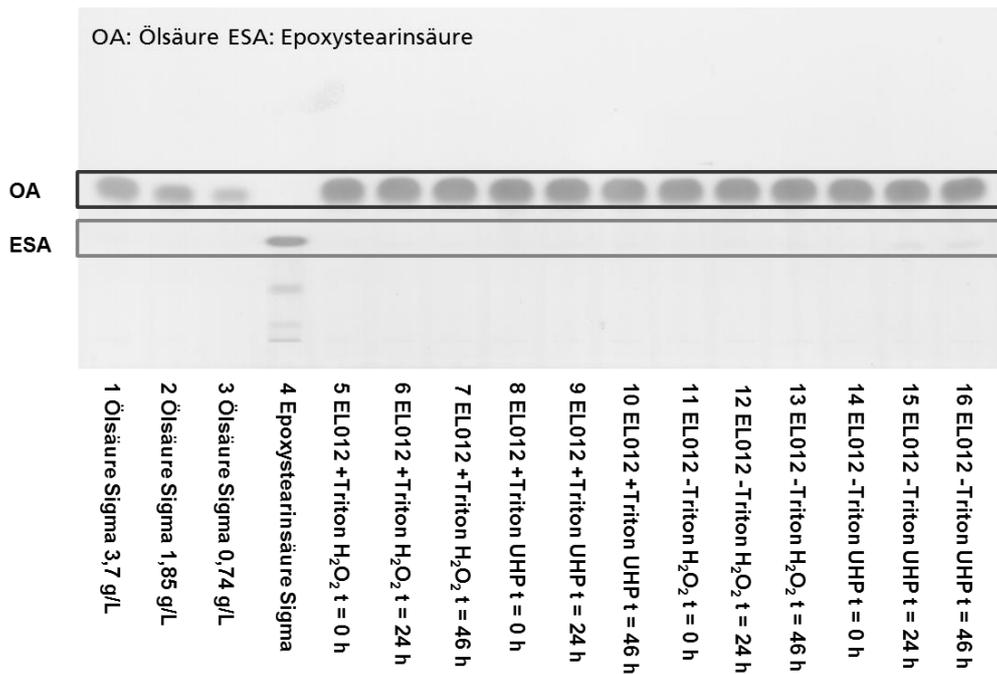


Abbildung 101: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Epoxidierung von 0,3 M Ölsäure (OA) mit auf Lewatit VP OC 1600 immobilisierter Eucodis Lipase EL012. Die Immobilisierung wurde in An- (+Triton) und Abwesenheit (-Triton) von Triton X-100 durchgeführt (Universität Halle-Wittenberg).

Das Ergebnis der dünnschichtchromatographischen Analyse der Versuchsansätze ist in Abbildung 101 gezeigt. Eine Epoxidbildung konnte mit beiden Präparaten über eine Reaktionszeit von 46 h bei 30 °C nicht beobachtet werden, während die Verwendung der kommerziell verfügbaren Lipase B aus *Candida antarctica* bei vergleichbaren Reaktionsbedingungen bereits nach 24 h zu einer annähernd vollständigen Umsetzung von Ölsäure führte (Ergebnis nicht gezeigt).

3.5.3 Biochemische Epoxidierung (Fraunhofer IGB)

Des Weiteren beschäftigte sich das Fraunhofer IGB mit der enzymatischen Herstellung von Epoxiden auf Basis pflanzlicher Fettsäuren, Fettsäuremethylester und Öle. Erste Untersuchung zur Etablierung der Methode der chemo-enzymatischen Epoxidierung wurden mit der immobilisierte Lipase B aus *C. antarctica* (Novozym® 435) als Enzympräparat und Ölsäure als Substrat durchgeführt. Nach der Methodenetablierung wurden weiterführende Experimente durchgeführt, um die Umsetzung verschiedener Substrate zu optimieren.

3.5.3.1 Optimierung der chemo-enzymatischen Epoxidierung unterschiedlicher Substrate

Das Epoxidierungsverfahren wurde mit der kommerziell erhältlichen immobilisierten Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym[®] 435) optimiert. In den ersten Experimenten kamen die in

Tabelle 63 aufgeführten Substrate zum Einsatz:

Tabelle 63: Liste der eingesetzten Substrate für erste Experimente zur Etablierung des Verfahrens für verschiedene Substrate.

Freie Fettsäuren	Fettsäuremethylester	Pflanzliche Öle
Ölsäure	Ölsäuremethylester	Öl 1 (hoch-Linolensäure Öl)
Linolsäure		Öl 2 (Hoch-Linolsäure Öl)
Linolensäure		Öl 3 (hoch-Erucasäure Öl)
Erucasäure		

Folgende Prozessparameter wurden für unterschiedliche Substrate untersucht und optimiert:

- Eingesetzte Enzymmenge (mg Novozym[®] 435 pro mmol C=C)
- Zugabe von Wasserstoffperoxid (einmalige oder schrittweise Zugabe, unterschiedlich H₂O₂:C=C-Molverhältnisse, verschiedene H₂O₂-Konzentrationen)
- Lösemiteleinsatz (bisher nur Toluol als Lösemittel)
- Temperatur
- Menge der zugegebenen freien Fettsäure bei der Epoxidierung von Ölen

Die Versuche zur Optimierung des Epoxidierungsprozesses wurden in 2 mL 96-Deep-Well-Platten und im Screening-Gerät „Heidolph Synthesis 1“ jeweils in Batch-Ansätzen durchgeführt. Durch die Optimierung der oben aufgeführten Einflussparameter ist es gelungen, die in Tabelle 63 aufgeführten Substrate annähernd zu 100 % zu den entsprechenden Epoxiden umzusetzen. Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie für die Umsetzung der einzelnen Substrate bei optimierten Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 102 aufgeführt.

OA: Ölsäure

LA: Linolsäure

α -LA: Linolensäure

MO: Ölsäuremethylester

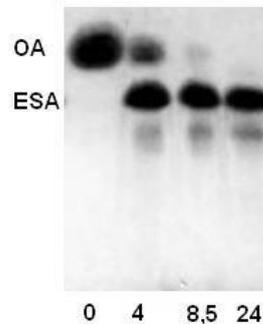
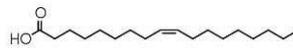
ESA: Epoxystearinsäure

EDA: Epoxybehensäure

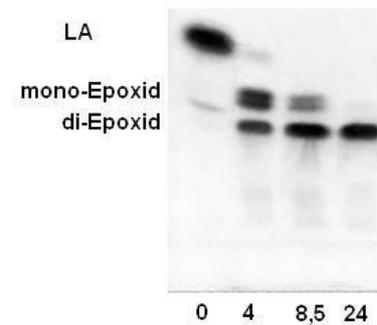
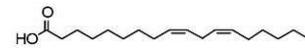
EME: Epoxystearinsäuremethylester

TG: Triglycerid

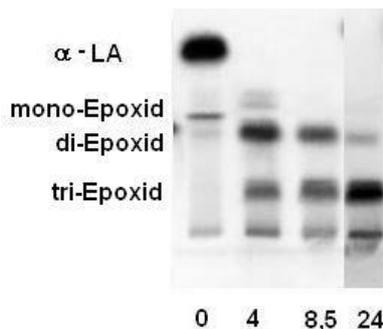
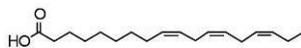
A: Ölsäure



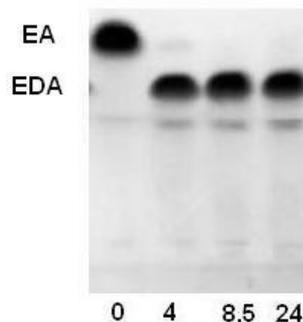
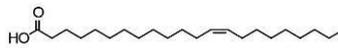
B: Linolsäure



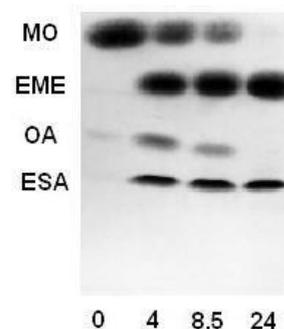
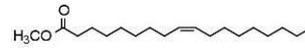
C: Linolensäure



D: Erucasäure



E: Ölsäuremethylester



F: Öl 1



G: Öl 2



H: Öl 3



Abbildung 102: Dünnschichtchromatographische Analyse der Umsetzung von (A) Ölsäure, (B) Linolsäure, (C) Linolensäure, (D) Erucasäure, (E) Ölsäuremethylester, (F) Öl 1, (G) Öl 2 und (H) Öl 3 bei optimierten Reaktionsbedingungen.

Abbildung 102 A zeigt die Umsetzung von Ölsäure (OA) zu Epoxystearinsäure (ESA). In Abbildung 102 B ist die Epoxidierung von Linolsäure zu Mono- und Di-Epoxiden dargestellt. Nach 24 h konnte ein annähernd vollständiger Umsatz zum Di-Epoxid erreicht werden. In

Abbildung 102 C ist die Konversion von Linolensäure dargestellt. Linolensäure konnte nach 24 h weitestgehend zum Tri-Epoxid umgesetzt werden. Eine vollständige Umsetzung von Erucasäure zu Epoxybehensäure konnte bereits nach 8,5 h erreicht werden. Das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie (DC) zur Epoxidierung von Erucasäure ist in Abbildung 102 D abgebildet. Die Epoxidierung von Öl 1, Öl 2 und Öl 3 ist in Abbildung 102 F-H gezeigt. Die unterschiedlichen Öle konnten jeweils nach 24 h zu den epoxidierten Ölen umgesetzt werden. Die epoxidierten Öle enthalten als Nebenprodukt jeweils Epoxystearinsäure (ESA), die aus der Ölsäure entsteht, die jeweils zum Reaktionsansatz zugegeben wird, um die Bildung von Di- und Monoglyzeriden zu vermeiden. Die Epoxidierungsprodukte der einzelnen Öle unterscheiden sich durch ihren Gehalt an epoxidierten Doppelbindungen, je nachdem wie hoch der Anteil an C-C-Doppelbindungen im Ausgangssubstrat war. Öl 1 und Öl 2 enthalten einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, im Wesentlichen Linolsäure und Linolensäure, und haben somit nach der Epoxidierung einen hohen Anteil an Epoxid-Gruppen. Öle mit einem höheren Epoxidgehalt sind in Abbildung 102 F-H daran zu erkennen, dass sie bei der verwendeten DC-Methode weniger schnell wandern und somit nach der Färbung weiter unten auf der DC-Platte lokalisiert sind.

3.5.3.2 Mustermengen-Herstellung mittels chemo-enzymatischer Epoxidierung verschiedener Substrate im Batch-Ansatz

Auf Basis der Ergebnisse der Optimierungsversuche im Kleinmaßstab (<5 mL) erfolgte für die Substrate Ölsäure, Ölsäuremethylester, Öl 1, Öl 2 und Öl 3 ein Herstellung von Mustermengen im Batch-Experiment bis zum 250 mL-Schüttelkolbenmaßstab. Die Ansätze enthielten folgende Komponenten:

- Ölsäure, Ölsäuremethylester, Öl 1, Öl 2 und Öl 3
- Novozym[®] 435
- 30%-ige H₂O₂-Lösung
- Ölsäure bei Epoxidierung von Öl 1, Öl 2 und Öl 3

Die Reaktionsansätze wurden für 43 h bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte mit 200 rpm inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach 0, 4, 18, 24 und 43 h. Die einzelnen Proben wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Epoxidierung im größeren Maßstab mit verschiedenen Substraten bei optimierten Reaktionsbedingungen ebenfalls mit nahezu vollständigen Umsätzen durchgeführt werden kann.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die einzelnen Ansätze aufgearbeitet. Die Aufarbeitung ist schematisch in Abbildung 103 gezeigt. Zuerst wird dabei das immobilisierte Enzym durch Filtration entfernt. Anschließend kann die wässrige H₂O₂-Phase in einem Scheidetrichter (oder durch Zentrifugation) abgetrennt und noch in der organischen Phase gelöstes Wasserstoffperoxid durch mehrfaches Waschen mit vollentsalztem Wasser entfernt werden. Ein weiter Aufarbeitungsschritt, der im Schema noch nicht aufgeführt wurde, könnte bei der Epoxidierung von Ölen darin bestehen die freien Fettsäuren (Epoxyfettsäuren) durch eine alkalische Wäsche z.B. mit 5 %-iger Na₂CO₃-Lösung aus der Ölphase zu entfernen. Dieser Aufarbeitungsschritt könnte vor der Trocknung mit 10 Gew.% Na₂SO₄ (bezogen auf die Masse der organischen Phase) stattfinden. Im letzten Schritt der Aufarbeitung wird das Lösemittel (bisher Toluol) durch Vakuumdestillation entfernt.

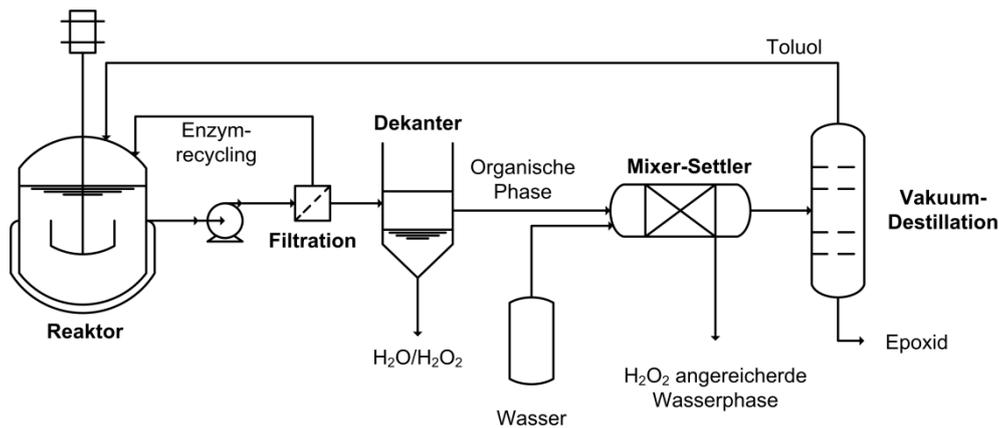


Abbildung 103: Schematische Darstellung der Epoxidauflaufbereitung.

Die Versuchsansätze, die wie in Abbildung 103 beschrieben, aufbereitet wurden, wurden anschließend nochmals mittels Dünnschichtchromatographie analysiert, um gegebenenfalls Veränderungen in der Zusammensetzung der organischen Phase zu erkennen. Bei der Analyse der aufbereiteten Epoxidierungsprodukte wurde kein verändertes Bandenmuster festgestellt.

Tabelle 64: Bestimmung von Jodzahl (IZ), Säurezahl (SZ), Wassergehalt (H₂O in %) und pH-Wert für die aufbereiteten Epoxide aus Ölsäure, Ölsäuremethylester, Öl 1, Öl 2 und Öl 3 (Quelle: Dracosa AG).

Proben	IZ(Sub,theor.) (g I/100g)*	IZ (g I/100g)	X(IZ) (%)	SZ (mg KOH/g)	H ₂ O (%)	Bemerkung
Ölsäure (Epoxystearinsäure, ESA)	89	1,27	98,5	162	0,37	fest bei RT
Ölsäuremethylester (Epoxystearinsäuremethylester + ESA)	85	6,9	91,9	41,2	0,27	trüb bei RT
Öl 1 (Epoxid Öl 1 + ESA)	205	13,6	93,4	29,8	0,26	trüb bei RT
Öl 2 (Epoxid Öl 2 + ESA)	185	10,7	94,2	26,7	0,38	trüb bei RT
Öl 3 (Epoxid Öl 3 + ESA)	100	9,8	90,2	15,4	0,2	trüb bei RT

* Theoretische Jodzahl des Substrats nach Rüschen gen. Klaas 1999: $IZ = (n \cdot 25380) / M$ mit n als Anzahl an C=C-Bindungen pro Molekül und M als Molmasse des jeweiligen Substrats¹³⁰

Zusätzlich wurden die aufbereiteten Epoxidproben durch die Fa. Dracosa in Bezug auf Jodzahl (IZ), Säurezahl (SZ), Wassergehalt und pH-Wert untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 64 aufgeführt. Zusätzlich ist dort eine kalkulierte theoretische Jodzahl für die jeweiligen Substrate angegeben, die sich aus der Anzahl n an C=C-Bindungen pro Molekül (für die Öle bestimmt aus der GC-Analyse der Fettsäuremuster) und der Molmasse berechnen lässt. Durch die Jodzahl-Bestimmung konnte ein hoher Umsatz der einzelnen

¹³⁰ Rüschen gen. Klaas & Warwel (1999), Industrial Crops and Products, 9, pp. 125-132

Substrate zu den korrespondierenden Epoxiden im Bereich von 90 bis über 98% bestätigt werden. Die hohen Säurezahlen für die Epoxide aus den drei Ölen sind im Wesentlichen auf die Zugabe der freien Fettsäure zum Reaktionsansatz und nicht auf die Hydrolyse der Triglyzeride zurückzuführen, während die erhöhte Säurezahl bei der Umsetzung von Ölsäuremethylester ausschließlich auf die Perhydrolyse des Fettsäuremethylesters zurück zu führen ist.

3.5.3.3 Epoxidierung verschiedener Fettsäure-Fractionen aus der Tallölaufarbeitung

Zusätzlich zu den Versuchen mit verschiedenen Pflanzenölen wurden Experimente zur Epoxidierung von verschiedenen Tallöl-Fettsäure-Fractionen (TOFA) am Fraunhofer IGB durchgeführt. Diese aufgereinigten Fettsäure-Fractionen wurden vom Fraunhofer ICT zur Verfügung gestellt. Der Gehalt an unterschiedlichen Fettsäuren, die gemessene Jodzahl und der unter Annahme der Jodzahl maximal mögliche Epoxidsauerstoffgehalt sind in Tabelle 65 aufgeführt. Die verwendeten Tallöl-Fractionen enthalten damit über 80 Gew.% Fettsäuren und zeichnen sich dabei vor allem durch einen hohen Anteil an Ölsäure und Linolsäure (jeweils ca. 36 %) aus.

Die Reaktionsansätze wurden anhand der in Tabelle 65 aufgelisteten Angaben ausgelegt. Zur Epoxidierung wurde Novozym[®] 435 eingesetzt. Wässriges Wasserstoffperoxid wurde im Überschuss zugegeben und die Ansätze jeweils bei Raumtemperatur für 24 h im Schüttelkolben inkubiert. Zur qualitativen Beurteilung des Reaktionsverlaufes wurde in einem ersten Schritt die Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

Tabelle 65: Fettsäuregehalt, Jodzahl und theoretisch maximal möglicher Epoxidsauerstoffgehalt für drei unterschiedliche Tallöl-Fettsäure-Fractionen.

Name	V141111 VDL dest1	V141111VDL TOFA dest1	V141111VDL TOFA dest2
C18:1- Ölsäure	36,42%	36,28%	36,11%
C18:2- Linolsäure	36,25%	36,65%	35,59%
C18:3-Linolensäure	8,80%	9,11%	8,41%
Isodextropimaric acid	0,82%	0,96%	1,51%
Summe	82,28%	83,01%	81,61%
I _Z _{gemessen} (g I / 100 g)	159	153	157
OO _{max} nach Dinda 2008 ¹³¹ => gemessener IV	9,98	9,60	9,85

Das Ergebnis der Analyse der Epoxidierung verschiedener Tallöl-Fettsäure-Fractionen ist in Abbildung 104 gezeigt. Auf Bahn 1 und 2 wurden Standards für Ölsäure und Epoxystearinsäure aufgetragen. Die anderen Bahnen zeigen jeweils den Reaktionsverlauf der Epoxidierung nach 4, 8 und 24 h. Dabei ist für alle drei vom Fraunhofer ICT zur Verfügung gestellten Fettsäure-Fractionen ein vergleichbarer Reaktionsverlauf zu erkennen. Bereits nach 4 h hat die Fettsäurekonzentration (schwarz umrandete Banden) deutlich

¹³¹ Dinda *et al.* (2008), *Bioresource Technology*, 99, pp. 3737-3744

abgenommen und die Bildung von einfach- und mehrfach epoxidierten Fettsäuren (Banden 1 und 2 unterhalb der Fettsäure-Bande) war zu beobachten. Nach 24 h wurden die enthaltenen Fettsäuren weitestgehend zu den jeweiligen Epoxiden umgesetzt. Im oberen Bereich der DC sind weitere Banden zu erkennen, die im Verlauf der Reaktion ebenfalls verschwinden. Die einzelnen Banden konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Es handelt sich dabei aber vermutlich um Fettsäureester und Harzsäurereste.

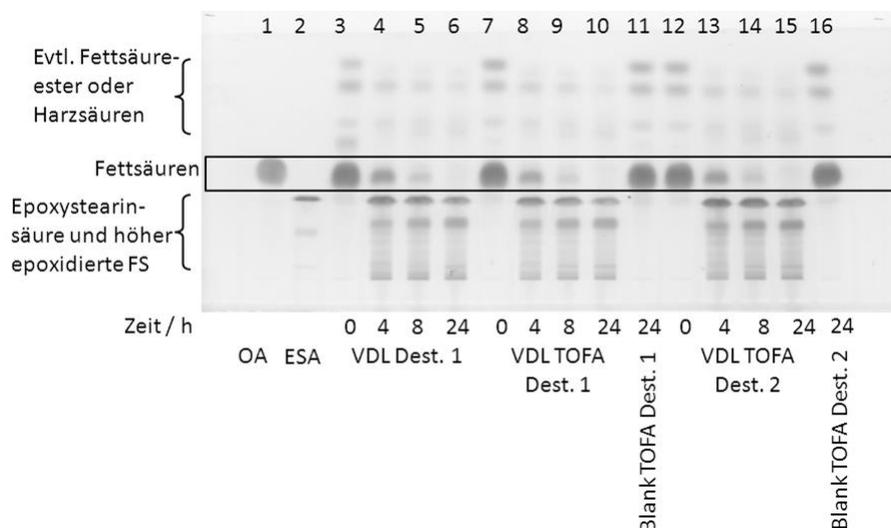


Abbildung 104: Dünnschichtchromatographische Analyse der Umsetzung verschiedener Tallöl-Fettsäure-Fractionen (TOFA) zu epoxidierten Fettsäuren bzw. anderer Produkte nach verschiedenen Reaktionszeiten.

Ergänzend zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Reaktionsansätze wurden die Proben nach 24 h Inkubation aufgearbeitet und deren Jodzahl (IZ) bestimmt. Auf Basis der gemessenen Jodzahl der Epoxide und der Jodzahl des Substrates (siehe Tabelle 65) wurde wieder ein Jodzahl-basierter Umsatz berechnet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 105 dargestellt. Für alle Fettsäure-Fractionen konnte bei der enzymkatalysierten Epoxidierung ein Umsatz von über 85% erzielt werden.

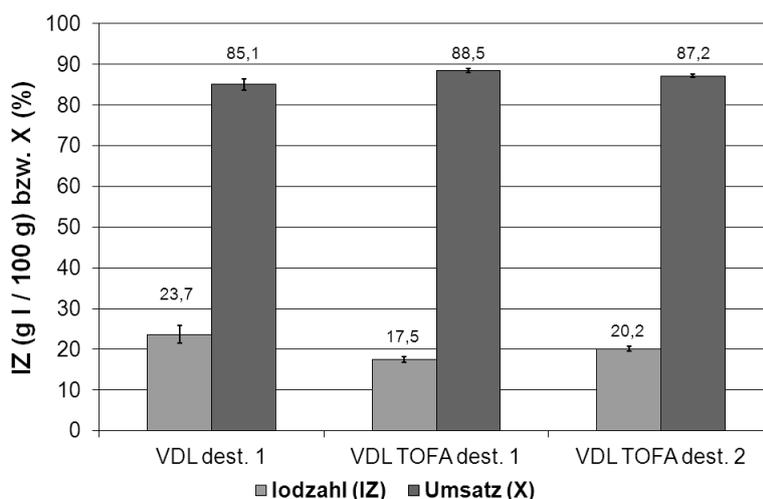


Abbildung 105: Jodzahl (IZ) und Umsatz (X) auf Basis der Jodzahl bei der chemoenzymatischen Epoxidierung verschiedener Tallöl-Fettsäure-Fractionen mit Novozym® 435 nach 24 h Inkubation im Schüttelkolben bei Raumtemperatur.

Die verschiedenen TOFA-Fractionen konnten damit ebenfalls erfolgreich mit Novozym® 435 epoxidiert werden. Besonders interessant bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung erschien die Farbentwicklung während der Reaktion. Hier wurde festgestellt, dass es durch die Epoxidierung zu einer deutlichen Farbänderung von gelblich nach dunkelrot kam (siehe Abbildung 106). Dieser Effekt war bei der chemischen Epoxidierung durch die Fa. Dracosa nicht zu beobachten.

A



B

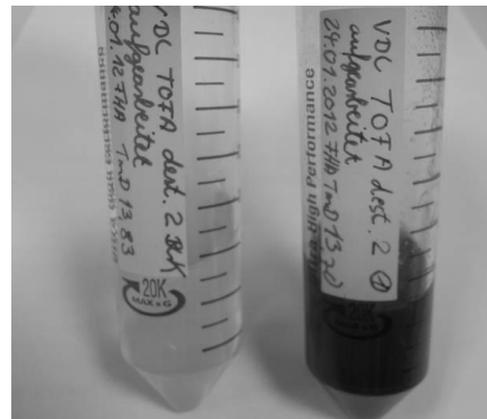


Abbildung 106: Farbentwicklung bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung verschiedener Tallöl-Fettsäure-Fractionen mit Novozym® 435 jeweils im Vergleich zu einem Blank-Ansatz ohne Enzymzugabe. (A) Fettsäure-Fraktion VDL TOFA dest. 1; (B) Fettsäure-Fraktion VDL TOFA dest. 2.

3.5.3.4 Stabilität unterschiedlicher Varianten der immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica*

Nachdem die auf Acrylharz immobilisierte Lipase B aus *Candida antarctica* erfolgreich für die enzymatische Epoxidierung verschiedener Substrate eingesetzt wurde, sollte auch die Stabilität im Detail untersucht werden. Dabei wurde zusätzlich zum bisher verwendeten Standardpräparat Novozym® 435 (CalB immobilisiert auf Acrylharz) eine alternative CalB-Variante immobilisiert auf Immobead 150 betrachtet. In einer vorangegangenen kinetischen Untersuchung hatte sich herausgestellt, dass sich beide CalB-Varianten (auf Polyacryl und Immobead 150) in vergleichbarem Maße eignen, um Ölsäure durch Zusatz von Wasserstoffperoxid vollständig zu 9,10-Epoxystearinsäure umzuwandeln (Ergebnisse nicht gezeigt). Außerdem sollte in dieser Versuchsreihe der Einfluss eines Waschschrittes mit Toluol zwischen den Reaktionszyklen untersucht werden. Untersucht wurde die Stabilität beider Präparate bei 40 und 50 °C. Ein Reaktionszyklus entspricht einer Umsetzung von 1 M Ölsäure in Toluol über 14 h Reaktionszeit bei der jeweiligen Temperatur.

Zur qualitativen Analyse wurde die Dünnschichtchromatographie und zur quantitative Analyse die Gaschromatographie eingesetzt. Der Umsatz und die Ausbeute wurden auf Basis der gemessene Ölsäure- und 9,10-Epoxystearinsäurekonzentrationen berechnet. In den nachfolgenden Diagrammen ist der Ölsäureumsatz über der Zyklusnummer aufgetragen. Innerhalb eines Diagrammes sind die Umsätze beider Lipasen, jeweils mit und ohne Waschen dargestellt.

Stabilität von CalB auf Polyacryl und Immobead 150 bei 40 °C

Für die Versuchsreihe bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C wurden nach vorheriger Auswahl anhand der Ergebnisse der dünnenschichtchromatographischen Analyse die Reaktionszyklen 1, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 mittels Gaschromatographie quantitativ analysiert. Für Novozym[®] 435 (blau Balken) wurde über die ersten 10 Reaktionszyklen jeweils eine Ölsäureumsatz von über 80 % erreicht, während die CalB-Variante immobilisiert auf Immobead 150 (rote Balken) auch nach 14 Reaktionszyklen noch einen Ölsäureumsatz von über 90 % ermöglichte (siehe Abbildung 107). Des Weiteren wurde festgestellt, dass sich ein zusätzlicher Waschschrift zwischen den einzelnen Reaktionszyklen eher negative auf die Aktivität auswirkt. Dieser Effekt wird vor allem bei dem adsorptiv immobilisierten CalB-Präparat Novozym[®] 435 deutlich. Nach 14 und 16 Reaktionszyklen ist für Novozym[®] 435 mit zusätzlichem Waschschrift (dunkelblau) und ohne Waschschrift (hellblau) ein deutlicher Unterschied im Ölsäureumsatz (~40 % versus ~70 % nach Zyklus 14) zu erkennen (siehe Abbildung 107).

Zur Vergleichbarkeit mit Literaturangaben wurde die gebildete Masse an ESA pro Enzymmasse berechnet. Da die ESA Konzentration nicht für jeden Zyklus gemessen wurde, wurde angenommen, dass die ESA Konzentration für nicht gemessene Zyklen der darauffolgend gemessenen Konzentration entspricht. Es handelt sich bei dem berechneten Wert somit nicht um einen absoluten Wert, sondern um eine grobe Näherung. Für Novozym[®] 435 bei 40 °C wurde so die ESA-Menge aus den ersten 10 Zyklen gemittelt, da der Umsatz in diesem Bereich etwa konstant war. Es ergaben sich 6,7 g ESA pro 16 mg Enzym für die Ansätze welche gewaschen wurden und 7,18 g ESA pro 16 mg Enzym für die Ansätze ohne Waschen. Für CalB auf Immobead 150 wurde die ESA Masse über die ersten 14 Zyklen gemittelt. Mit Waschen ergaben sich 10,6 g ESA pro 32 mg Enzym und ohne Waschen 11,54 g ESA pro 32 mg Enzym. Der Unterschied der eingesetzten Enzymmenge von Novozym[®] 435 und CalB Immobead 150 beruht dabei auf dem Unterschied in der zuvor bestimmten spezifischen Immobilisataktivität, in der CalB Immobead 150 gegen p-Nitrophenyloctanoat nur die Hälfte der Aktivität von Novozym[®] 435 zeigte.

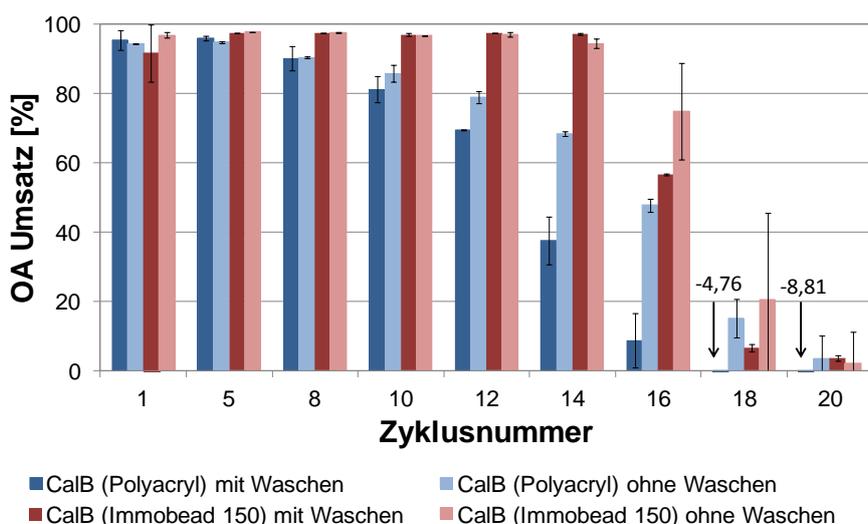


Abbildung 107: Ölsäureumsatz für 20 aufeinanderfolgende Reaktionszyklen. Verglichen werden CalB auf Polyacryl und auf Immobead 150 bei 40 °C. Die Umsätze wurden basierend auf den Konzentrationen, ermittelt durch die Gaschromatographie, berechnet. Die Versuche wurden für jede Parameterkombination zweifach durchgeführt, dargestellt sind, zu jeder Zyklusnummer, die Mittelwerte beider Ansätze.

Betrachtet man somit neben dem zu erreichenden Umsatz über eine maximale Zykluszahl auch die pro Immobilisatmenge produzierte Produktmenge, so schließt Novozym® 435 bei 40 °C ohne zusätzlich Waschschrift mit ca. 450 g Epoxystearinsäure pro g Novozym® 435 in 10 Zyklen gegenüber 360 g pro g CalB Immobead 150 in 14 Zyklen etwas besser ab.

Stabilität von CalB auf Polyacryl und Immobead 150 bei 50 °C

Bei 50 °C wurden die Proben der Zyklen 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10 (vergleiche Abbildung 108) mittels Gaschromatographie untersucht. Auch bei 50 °C wurde nach fünf Zyklen mit CalB auf Immobead 150 ein höherer Ölsäureumsatz erzielt als mit Novozym® 435. Insgesamt ist bei 50 °C eine erheblich beschleunigte Deaktivierung der Enzyme festzustellen, was sich in einer deutlich geringeren Zykluszahl niederschlägt.

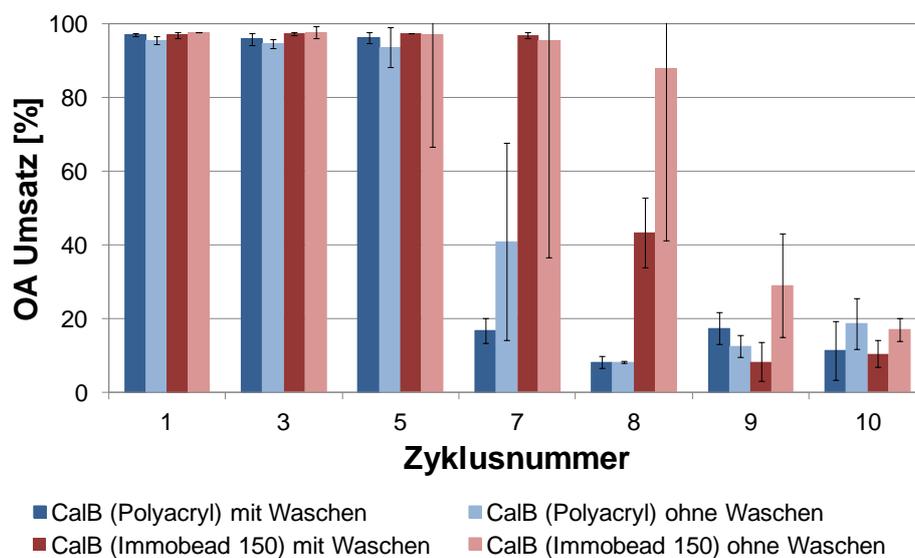


Abbildung 108: Ölsäureumsatz für 20 aufeinanderfolgende Reaktionszyklen. Verglichen werden CalB auf Polyacryl und auf Immobead 150 bei 50 °C. Die Umsätze wurden basierend auf den Konzentrationen, ermittelt durch die Gaschromatographie, berechnet. Die Versuche wurden für jede Parameterkombination zweifach durchgeführt, dargestellt sind, zu jeder Zyklusnummer, die Mittelwerte beider Ansätze.

3.5.3.5 Prozessoptimierung der chemo-enzymatischen Epoxidierung

In Ergänzung zu den vorangegangenen Optimierungs- und Herstellungsansätzen im Kleinmaßstab (<5 mL) und Schüttelkolbenmaßstab (ca. 200 mL) sollte ein weiterer Optimierungsschritt zur systematischen Untersuchung verschiedener Prozessparameter im gerührten Reaktionsmaßstab erfolgen. Dazu sollte die chemo-enzymatischen Epoxidierung von Öl 1 und Öl 3 mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung und folgenden Parametern betrachtet werden:

- Enzymmenge
- Reaktionstemperatur
- Reaktionszeit
- Lösemittelmenge

Der sogenannte Versuchsraum wurde aufgrund der Auswahl eines „Central Composite Designs“ durch Sternpunkte, welche Parameterwerte außerhalb des eigentlichen Versuchsraumes annehmen, und den Zentralpunkt im Mittelpunkt des Versuchsraumes erweitert. Insgesamt wurden 27 unabhängige Versuchsansätze je verwendetem Pflanzenöl durchgeführt. Die Analyse der einzelnen Parameterkombinationen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie, FT-IR und titrimetrischer Epoxidsauerstoffbestimmung (OO-Gehalt). Die statistische Analyse und Erstellung des mathematischen Modells mittels Design Expert[®] basiert ausschließlich auf den gemessenen Epoxidsauerstoffwerten.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 66 zusammengefasst. Die qualitativen Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie und der FT-IR Spektroskopie (Ergebnisse nicht gezeigt) spiegeln sich in der Epoxidsauerstoffgehaltbestimmung wider. Für Öl 1 wurde der höchste Epoxidsauerstoffgehalt, von 9,5 %, in Ansatz 14, mit viel Enzym, geringer Temperatur, langer Reaktionszeit und hoher LM Menge gemessen. Einer der geringsten OO-Werte wurde für Ansatz 1, mit minimalen Parameterwerten (OO-Gehalt = 2,4 %) bestimmt. Diese Tendenz war auch über das FT-IR Spektrum ersichtlich.

Bei der qualitativen Analyse der Ansätze mit Öl 3 mittels DC wurde für Ansatz 16, mit ausschließlich hohen Parameterwerten, ein hoher Epoxidgehalt bestimmt. Der OO-Gehalt für diesen Ansatz liegt bei 6,1 %, welches der höchste gemessene Wert war. Für Ansatz 1, mit ausschließlich minimalen Parameterwerten, wurde über die DC ein sehr geringer Epoxidsauerstoffgehalt vermutet. Der ermittelte OO-Gehalt von 0,6 % für Ansatz 1 bestätigt diese Beobachtung.

Anhand des gemessenen Epoxidsauerstoffgehalts konnte mittels Design-Expert[®] 7.1.5 für beide pflanzlichen Öle ein mathematisches Modell erstellt werden. Das Modell beschreibt den Epoxidsauerstoffgehalt (OO-Gehalt) in Abhängigkeit der vier Einflussgrößen Enzymmenge, Reaktionstemperatur, Reaktionszeit und Lösemittelmenge.

Beide Modelle erwiesen sich als signifikant. Diese Modelle und deren korrigiertes Bestimmtheitsmaß sind in Tabelle 67 dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß beschreibt die Summe der Fehlerquadrate, die durch das Modell erklärt werden. Das korrigierte Bestimmtheitsmaß berücksichtigt dabei die Anzahl der Faktoren die zur Erklärung des Modells eingehen. Ein Bestimmtheitsmaß nahe eins bedeutet, dass das Modell den Zusammenhang zwischen den Parametern und dem gemessenen Epoxidsauerstoffgehalt gut reproduziert.

Der Mittelpunkt des Versuchsplans wurde in einem dreifachen Ansatz durchgeführt und analysiert (Ansatz 25 bis 27, siehe Tabelle 66). Durch die Mittelpunkte können Aussagen zur Reproduzierbarkeit dieser Parameterkombinationen gemacht werden. Ergeben sich für drei unabhängige Versuche drei exakt gleiche Epoxidsauerstoffgehalte, wird von einer sehr hohen Reproduzierbarkeit ausgegangen. Für Öl 1 ergab sich für die drei Mittelpunkte ein OO-Wert von $8,8 \pm 0,3$ % und für Öl 3 ein OO-Wert von $5,7 \pm 0,1$ %.

Tabelle 66: Statistischer Versuchsplan zur Untersuchung des Einflusses der Prozessgrößen Enzymmenge, Temperatur, Zeit und Lösemittelmenge zusammen mit den experimentell erhaltenen Epoxidsauerstoffgehalten für zwei verschiedene Pflanzenöle.

Ansatz	Faktor 1: Enzymmenge (g/mol _{C=C})	Faktor 2: Temperatur (°C)	Faktor 3: Zeit (h)	Faktor 4: Lösemittel (wt. % org. Phase)	OO(ÖI 1) (%)	OO(ÖI 3) (%)
1	-1	-1	-1	-1	2,4	0,6
2	+1	-1	-1	-1	4,0	0,9
3	-1	+1	-1	-1	1,8	0,7
4	+1	+1	-1	-1	2,7	1,1
5	-1	-1	+1	-1	3,8	1,2
6	+1	-1	+1	-1	8,4	1,8
7	-1	+1	+1	-1	2,2	0,7
8	+1	+1	+1	-1	2,9	1,6
9	-1	-1	-1	+1	5,2	2,9
10	+1	-1	-1	+1	7,4	4,0
11	-1	+1	-1	+1	4,1	3,0
12	+1	+1	-1	+1	8,0	5,1
13	-1	-1	+1	+1	9,2	5,2
14	+1	-1	+1	+1	9,5	6,0
15	-1	+1	+1	+1	4,6	4,1
16	+1	+1	+1	+1	8,3	6,1
17	-1,41	0	0	0	4,7	2,6 ^a
18	+1,41	0	0	0	9,8	5,9
19	0	-1,41	0	0	7,8	3,3 ^a
20	0	+1,41	0	0	3,3	1,7
21	0	0	-1,41	0	4,1	1,9 ^a
22	0	0	+1,41	0	7,8	5,8
23	0	0	0	-1,41	4,0	1,6
24	0	0	0	+1,41	7,9	5,3 ^a
25	0	0	0	0	8,4	5,7
26	0	0	0	0	8,9	5,7
27	0	0	0	0	9,0	5,7

^a Diese Werte gingen nicht in die Berechnung des mathematischen Modells ein

Die Modelle der beiden pflanzlichen Öle unterscheiden sich stark. Die verschiedenen Parameter gehen in unterschiedlichem Ausmaß in die Berechnung des OO-Gehaltes ein. Auch die Wechselwirkungen der Einflussgrößen sind unterschiedlich stark gewichtet.

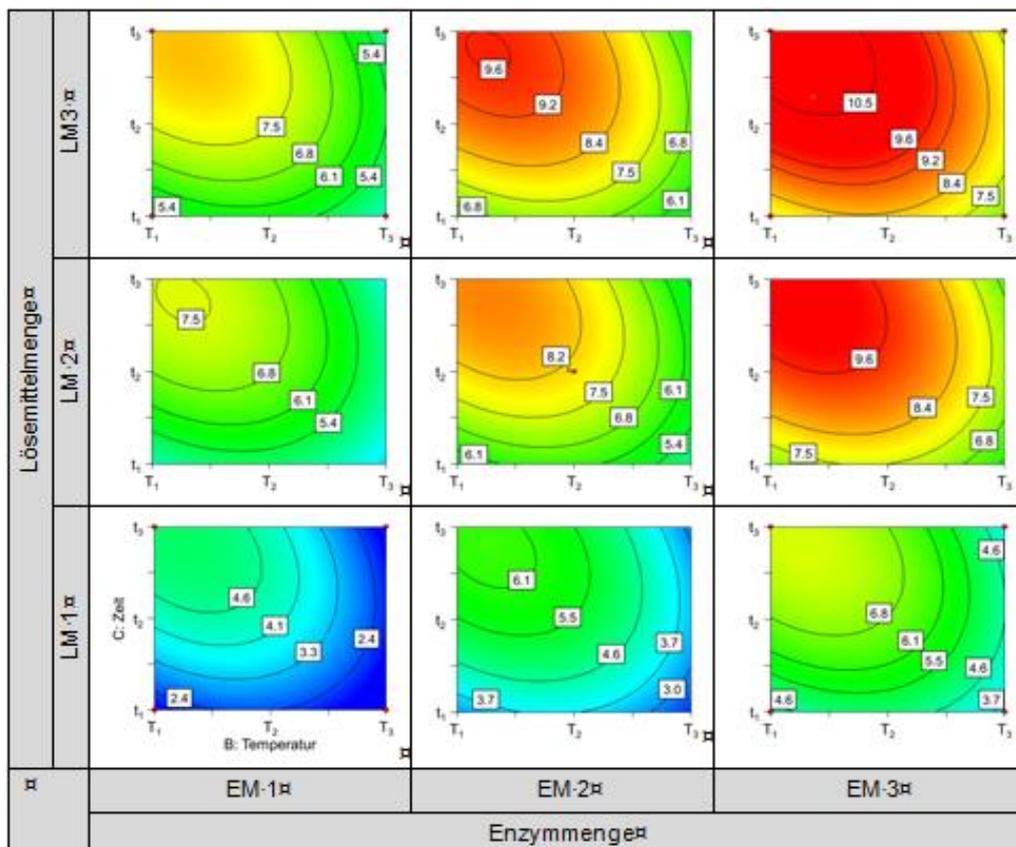
Tabelle 67: Durch Design Expert® 7.1.5 erstellte mathematische Modelle zur Beschreibung der Zielgröße, des Epoxidsauerstoffgehalts, in Abhängigkeit der vier untersuchten Parameter für Öl 1 und Öl 3.

Ölsorte	Modell	Gleichung	Adj R ² (ANOVA)
Öl 1	Reduziertes quadratisches Modell	OO-Gehalt = - 26,0774 + 0,5016 * Enzymmenge + 0,8832 * Temperatur + 1,1713 * Zeit + 0,2089 * LM Menge - 0,0108 * Temperatur * Zeit - 0,0108 * Temperatur ² - 0,0244 * Zeit ² - 0,0014 * LM Menge ²	0,8619
Öl 3	Reduziertes quadratisches Modell	OO-Gehalt = - 33,1033 - 0,0008 * Enzymmenge + 1,5722 * Temperatur + 0,1249 * Zeit + 0,1393 * LM Menge + 0,0038 * Enzymmenge * LM Menge - 0,0033 * Temperatur * Zeit + 0,0018 * Zeit * LM Menge - 0,0192 * Temperatur ² - 0,0012 * LM Menge ²	0,9805

Für Öl 1 und Öl 3 wurde die Jodzahl bestimmt und daraus der maximal mögliche Epoxidsauerstoffgehalt errechnet. Für Öl 1 ergab sich eine IZ von $186,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ und für Öl 3 eine IZ von $100,0 \text{ g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$. Daraus errechneten sich entsprechend für Öl 1 und Öl 3 maximale Epoxidsauerstoffwerte von 10,5 % respektive 5,9 %.

Die reduzierten quadratischen Modelle beschreiben den Zusammenhang zwischen den Parametern und der Zielgröße in einem 5 dimensionalen Raum. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 109 und Abbildung 110 als Zusammenfassung in Konturdiagrammen dargestellt. Um den Zusammenhang aller 5 Größen (Enzymmenge, Temperatur, Zeit, Lösemittelmenge und Epoxidsauerstoffgehalt) darzustellen, wurde folgendes Schema gewählt. Die einzelnen Schaubilder zeigen den Zusammenhang zweier Parameter zum Epoxidsauerstoffgehalt, welcher als Niveaulinien dargestellt ist. Die beiden übrigen Parameter sind innerhalb der einzelnen Schaubilder konstant. Die Schaubilder selbst sind wiederum in einem 2 dimensional Achsensystem angeordnet. Diese Achsen beschreiben die zwei fehlenden Einflussgrößen stufenweise. Für Öl 1 ist in den einzelnen Schaubildern die Zeit über der Temperatur aufgetragen. Die übergeordneten Achsen zeigen die Lösemittelmenge (vertikal) und die Enzymmenge (horizontal), beide Faktoren variieren auf 3 Stufen. Je stärker die Rotfärbung wird, desto höher ist der Epoxidsauerstoffgehalt. So wurde der höchste OO-Gehalt für hohe Lösemittelmengen (LM 3), Enzymmengen (EM 3), lange Reaktionszeiten von t_2 bis t_3 , jedoch geringen Temperaturen, zwischen T_1 und T_2 , berechnet. Dieser beträgt 10,2 %, was einer Ausbeute von über 97 % entspricht. Die Feinheiten können in dieser Darstellungsform nur für die Reaktionszeit und die Temperatur aufgelöst werden. Es wird aber dennoch deutlich, dass eine Verminderung in der Enzymmenge auf EM 2 einen größeren Einfluss auf den OO-Gehalt hat, als die Verminderung der Lösungsmittelmenge

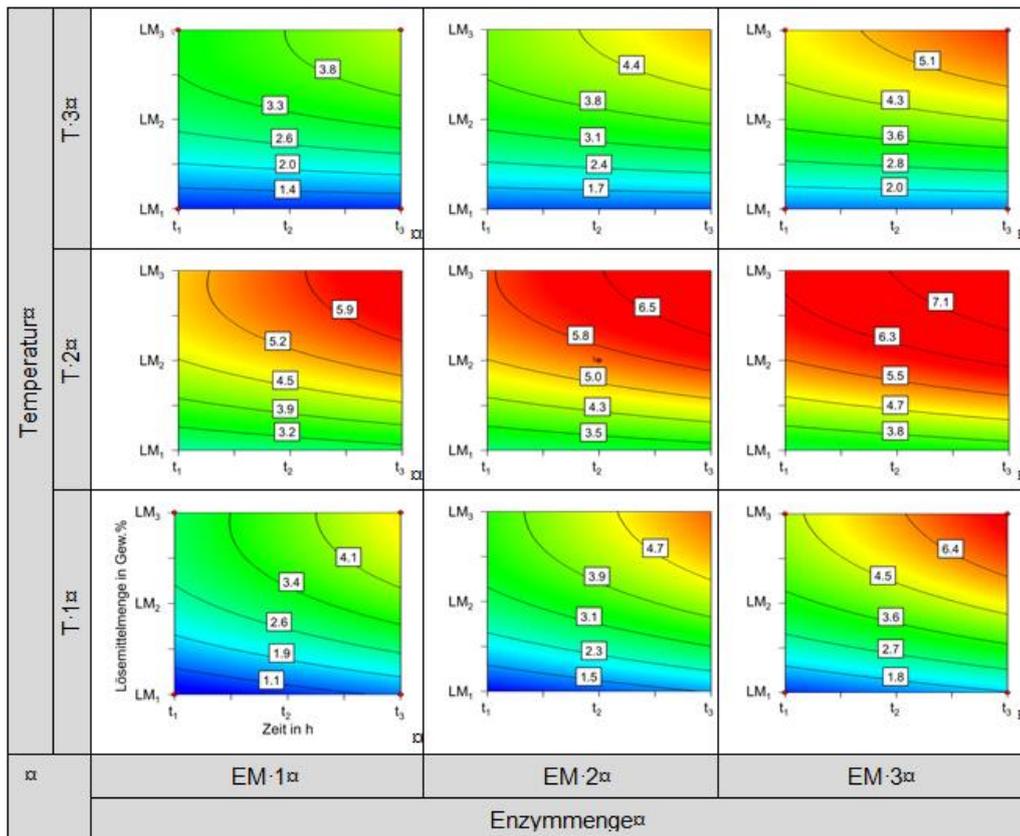
von LM 3 auf LM 2. So sind für hohe Enzymmengen (EM 3) und mittlere Lösemittelmengen (LM 2), unter weiterhin langer Reaktionszeiten und geringen Temperaturen, Epoxid-sauerstoffwerte von 9,4 % zu erreichen. Dies entspricht einer Ausbeute von 89,5 %.



Es gilt: $t_1 < t_2 < t_3$ $T_1 < T_2 < T_3$ $LM\ 1 < LM\ 2 < LM\ 3$ $EM\ 1 < EM\ 2 < EM\ 3$
 Niveaulinien: Epoxidsauerstoffgehalt [%]

Abbildung 109: Darstellung des mathematischen Modells für Öl 1 mittels Konturplots. Die x-Achse der einzelnen Bilder beschreibt die Temperatur, die y-Achse die Reaktionszeit. Die übergeordnete horizontale Achse steht für die Enzymmenge und die übergeordnete vertikale Achse zeigt die Lösemittelmenge. Die Niveaulinien beschreiben den Epoxidsauerstoffgehalt in %.

Für Öl 3 wurde das reduzierte quadratische Modell nach demselben Schema dargestellt. Allerdings mit dem Unterschied, dass in den einzelnen Schaubildern die Lösemittelmenge über der Zeit aufgetragen wurde und die Schaubilder in horizontaler Richtung nach der Enzymmenge und in vertikaler Richtung nach der Temperatur aufgetragen sind. Innerhalb jeden Schaubildes wird ersichtlich, dass der höchste OO-Gehalt für lange Reaktionszeiten (t_2 - t_3) und hohen Lösemittelmengen (LM_1 - LM_2) erreicht werden kann. Außerdem wird deutlich, dass der höchste Epoxidsauerstoffgehalt für mittlere Temperaturen (T_2) und für hohe Enzymmengen (EM 3) errechnet wird. Der höchste errechnete OO-Gehalt liegt bei 7,1 %, dies entspricht einer Ausbeute von über 120 %. Das Modell simuliert somit Epoxidsauerstoffgehalte, welche oberhalb des theoretisch maximal möglichen Epoxidsauerstoffgehaltes liegen. Der höchste tatsächlich gemessene Epoxidsauerstoffgehalt lag für Öl 3 in Ansatz 16, mit ausschließlich maximalen Parameterwerten, bei 6,1 %. Werte von bis zu 7,1 %, wie sie in Abbildung 110 dargestellt sind, zu erreichen, ist praktisch nicht möglich. Zusammenfassend zeigt das Modell, dass sich hohe Temperaturen nachteilig auf den Epoxidsauerstoffgehalt auswirken und eine hohe Enzymmenge hingegen wirkt sich positiv auf den OO-Gehalt aus. Dies wird innerhalb der einzelnen Zeilen deutlich.



Es gilt: $t_1 < t_2 < t_3$ $T_1 < T_2 < T_3$ $LM_1 < LM_2 < LM_3$ $EM_1 < EM_2 < EM_3$
 Niveaulinien: Epoxidsauerstoffgehalt [%]

Abbildung 110: Konturplots des mathematischen Modells für Öl 3. Auf der x-Achse der Konturplots ist die Zeit dargestellt, auf der y-Achse die Lösungsmittelmenge. In horizontaler Richtung sind die Schaubilder nach der Enzymmenge geordnet und in vertikaler Richtung nach der Temperatur. Die Niveaulinien beschreiben den Epoxidsauerstoffgehalt in %.

Auf Grundlage der mathematischen Modelle kann eine Parameteroptimierung durchgeführt werden. Für die jeweilige Problemstellung können dadurch optimale Werte für die Enzymmenge, die Reaktionstemperatur, die Reaktionszeit und die Lösemittelmenge ermittelt und der Epoxidsauerstoffgehalt zu dieser Parameterkombination vorhergesagt werden. Die Optimierung kann mit Design-Expert[®] durchgeführt. Die Software schlägt dabei in der Regel für eine vorgegebene Problemstellung mehrere optimale Parameterkombinationen vor. Die Resultate der Optimierung sollen aufgrund geplanter weiterer Verwertung nicht gezeigt werden

3.5.3.6 Epoxidierung von 9-Octadecen

Bei der chemischen Herstellung von α,ω -Dicarbonsäuredimethylestern aus Ölsäure mittels Metathese (siehe Kapitel 3.4.5) fällt 9-Octadecan als Koppelprodukt der Reaktion an. Dieses Koppelprodukt soll zur ganzheitlichen Verwertung aller Produkte anhand der chemoenzymatischen Epoxidierung funktionalisiert werden. 9-Epoxyoctadecan könnte anschließend bei Taminco weiter umgesetzt werden und ist anschließend interessant als Tensid. 9-Octadecan wurde vom Fraunhofer ICT aus der Reaktionsmischung destillative aufgereinigt und dem Fraunhofer IGB für erste Experimente zur Verfügung gestellt.

9-Octadecen wurde dazu in Dimethylcarbonat (DMC) gelöst und erfolgreich anhand der immobilisierten Lipase B aus *C. antarctica* (Novozym® 435) zum Epoxid umgesetzt. Dabei dient DMC neben der Funktion als Lösemittel auch als Cosubstrat zu Lipase-katalysierten Persäurebildung. Die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Analyse sind in Abbildung 111 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass 9-Octadecen (OD) und Ölsäuremethylester (MO) jeweils annähernd vollständig zu Produkten umgesetzt wurden, die polarere Eigenschaften aufweisen und daher weniger weite Laufstrecken zeigen. Außerdem ist eine schwache Bande an Epoxystearinsäure (ESA) zu erkennen, die durch teilweise Hydrolyse von Ölsäuremethylester bzw. Epoxystearinsäuremethylester entsteht.

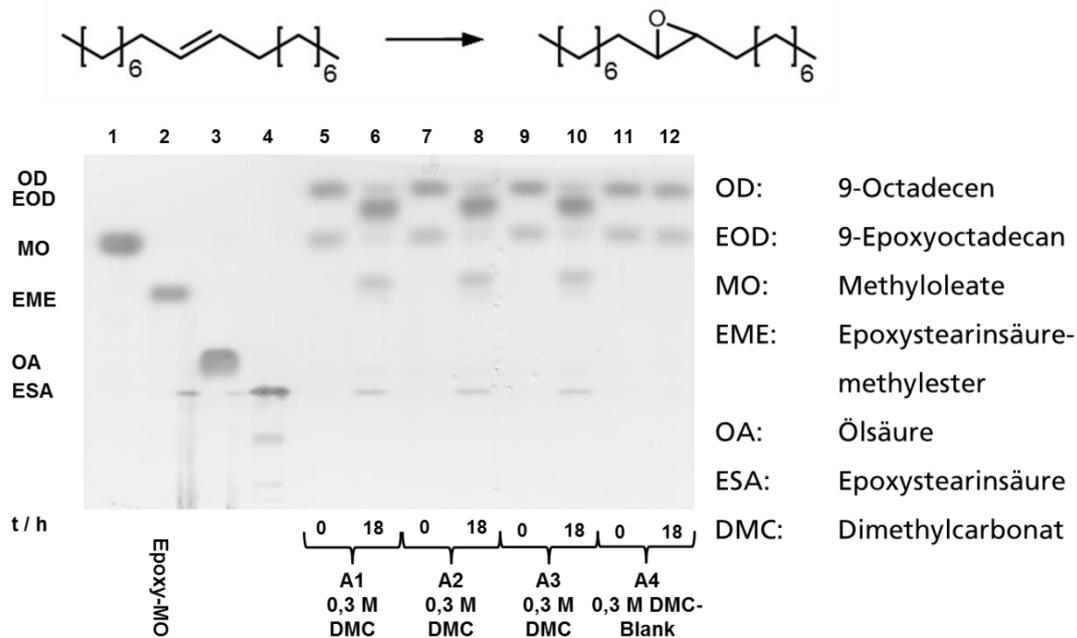


Abbildung 111: Dünnschichtchromatographische Analyse der CalB-katalysierten chemoenzymatischen Epoxidierung von 9-Octadecen in Dimethylcarbonat (DMC) als Lösemittel.

3.5.3.7 Epoxidierung von DHW Ölsäuremethylester (84 %)

Die Epoxidierung von Ölsäuremethylester wurde bereits für Ölsäuremethylester von Sigma-Aldrich gezeigt. Zur Herstellung des Epoxids sollte zusätzlich technischer Ölsäuremethylester der Firma DHW eingesetzt werden um so die Verwertbarkeit unterschiedlicher Substratquellen zu demonstrieren. Der DHW-Ölsäuremethylester konnte erfolgreich in einer lösemittelfreien Reaktion zu den entsprechenden Epoxidprodukten umgesetzt werden (siehe Abbildung 112). Es ist festzustellen, dass durch die Lipase-katalysierte Reaktion als Nebenprodukt auch Epoxystearinsäure entsteht. Aus Sicht der Tensidherstellung sollten der Anteil freier Fettsäuren und deren Epoxide möglichst gering sein.

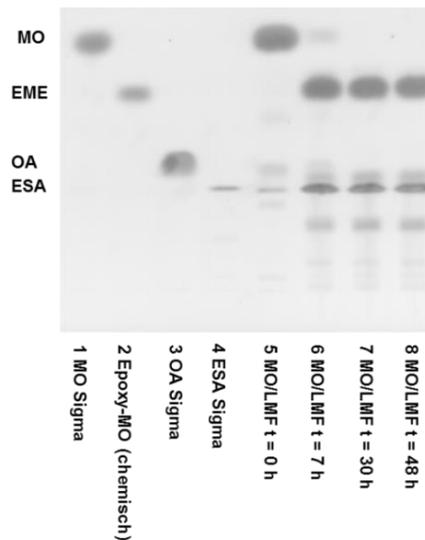


Abbildung 112: Lösemittelfreie Epoxidierung von Ölsäuremethylester (84 %, bereitgestellt von DHW).

Nach der Epoxidierung wurde das Epoxystearinsäuremethylester/Epoxystearinsäure-Gemisch aufgearbeitet und sollte in einem anschließenden zweiten Schritt mit Lipase und Methanol wieder verestert werden. Dazu wurden unterschiedliche Methanol-Startkonzentrationen eingesetzt und nach 16 h jeweils bei allen Ansätzen die gleiche Methanolkonzentration hergestellt (siehe Abbildung 113). Mit geringerer Methanolkonzentration (2 Gew.%) ist nach 18 h Reaktionszeit eine deutlich geringere Veresterung zu erkennen (siehe Abbildung 113, Bahn 9 und Bahn 15) als mit 8 Gew.% Methanol (siehe Abbildung 113, Bahn 6 und Bahn 12). Bei 40 und 50 C wurde ein vergleichbares Ergebnis erzielt. Nach Zugabe einer zweiten Portion Methanol und einer bis zu 48 h vorlaufenden Reaktion wurde in allen Ansätzen unabhängig von der Methanol-Startkonzentration eine vergleichbare Veresterung erreicht. Allerdings konnte bisher keine vollständige Entfernung der freien Fettsäuren erreicht werden. Weitere Schritte zur vollständigen Veresterung der vorhanden freien Fettsäurederivate könnten beispielsweise durch die Verwendung von Molekularsieb zur Entfernung des frei werdenden Wasser sein.

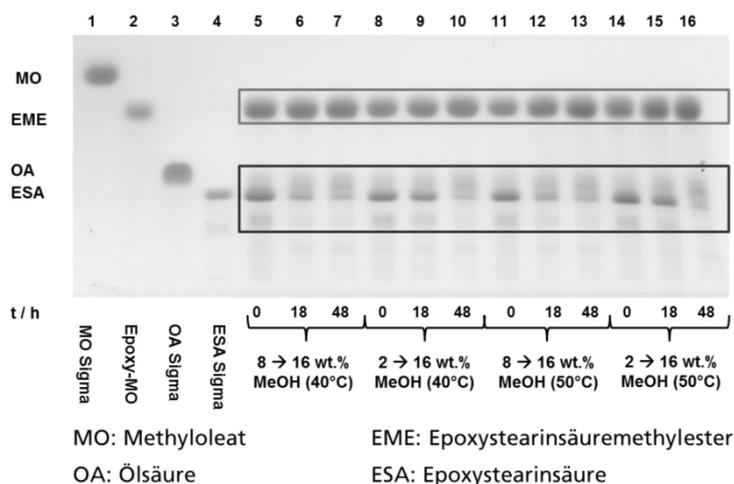


Abbildung 113: Rückveresterung von Epoxystearinsäure bei 40 und 50 °C und verschiedenen Methanolkonzentrationen.

3.5.3.8 Epoxidierung verschiedener Pflanzenöle und Charakterisierung der Pflanzenöl-Epoxide

Der Prozess zur Epoxidierung der in diesem Projekt ausgewählten nicht-essbaren Pflanzenöle wurde in vorangegangenen Experimenten mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung für zwei hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung sehr unterschiedliche Öle optimiert. Zur Erweiterung des Substratspektrums wurden auch die anderen im Konsortium bereitgestellten Pflanzenöle mittels der angepassten Methode chemo-enzymatisch umgesetzt und deren Epoxidprodukte hinsichtlich Produkteigenschaften, wie beispielsweise Epoxidsauerstoffgehalt und Viskosität, charakterisiert. Zur Bewertung der chemo-enzymatischen Epoxidierungsreaktion soll die Ausbeute für die einzelnen Pflanzenöle auf Basis des theoretisch maximal möglichen Epoxidsauerstoffgehaltes (OO_{max}) bestimmt werden.

Als erste Kenngröße wird die Jodzahl der einzelnen Pflanzenöle bestimmt. Die Jodzahl gibt an wie hoch der Anteil an C=C-Doppelbindungen pro 100 g Pflanzenöl ist. Die Bestimmung der Jodzahl erfolgte titrimetrisch nach der DIN-Norm EN ISO 3961.

Die, mit dieser Methode, berechneten Mittelwerte der Jodzahlen sind in Tabelle 68 zusammen mit den Fettsäurespektren der einzelnen Pflanzenöle und den maximal zu erreichenden Epoxidsauerstoffgehalten dargestellt. Zur Berechnung des Mittelwerts wurde jeweils eine Dreifachbestimmung der Stammlösung aus Pflanzenöl und Ölsäure durchgeführt, die als Substrat der chemo-enzymatischen Epoxidierung genutzt wurde.

Tabelle 68: Fettsäurezusammensetzung (in %), mittleres Molekulargewicht auf Basis der Fettsäurezusammensetzung, Iodzahl für die hinsichtlich der chemo-enzymatischen Epoxidierung getesteten Pflanzenöle inklusiver der zugegebenen freien Fettsäuren und daraus resultierender maximal möglicher Epoxidsauerstoffgehalt (in %).

	ÖI 4	ÖI 5	ÖI 6	ÖI 7	ÖI 3	ÖI 8	ÖI 9	ÖI 10	ÖI 11	ÖI 12	ÖI 13	ÖI 14	ÖI 15	ÖI 2	ÖI 16	ÖI 1
Palmitinsäure	19,2	-	6,6	22,3	-	-	5,6	11,1	12,6	12,8	13,4	8,1	8,9	8,6	7,5	9,0
Palmitoleinsäure	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stearinsäure	3,2	-	2,9	2,7	-	-	2,6	5,9	2,6	4,1	3,1	4,3	5,3	0,0	5,4	3,1
Ölsäure	67,1	17,6	10,1	45,6	23,8	14,8	60,8	42,7	35,8	27,8	21,4	33,6	21,5	14,0	22,8	15,6
Linolsäure	9,0	10,1	80,3	29,4	10,2	13,1	21,9	40,3	49,0	50,2	58,5	54,0	64,3	41,1	20,7	18,1
α -Linolensäure	-	6,9	-	-	10,2	8,6	9,0	-	-	5,0	-	-	-	36,3	43,6	54,3
Gadoleinsäure	-	3,4	-	-	10,4	5,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eicosadiensäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-	-	-	-
Behensäure	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erucasäure	-	58,1	-	-	42,1	58,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C24:1(Nervonsäure)	-	1,6	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MW(ÖI) ¹ / g mol ⁻¹	868,9	992,7	874,8	866,4	971,7	985,4	878,1	874,7	872,8	871,3	874,5	876,1	875,0	872,0	873,5	871,8
IZ ² (ÖI+OA) nach Wijs	79,7	82,8	144,3	95,2	103,8	96,3	107,0	113,9	111,2	124,9	122,0	123,6	130,1	171,0	172,4	196,4
OO _{max} ³ / %	4,79	4,96	8,34	5,66	6,14	5,72	6,32	6,70	6,55	7,30	7,14	7,23	7,58	9,73	9,80	11,02

¹Mittlere Molmasse berechnet aus der Fettsäurezusammensetzung

²Jodzahl bestimmt nach der Methode nach Wijs (DIN EN ISO 3961)

³Maximal möglicher Epoxidsauerstoffgehalt in Massenprozent berechnet auf Basis der gemessenen Jodzahl für die jeweilige Stammlösung aus Öl und freier Fettsäure nach Dinda 2008¹³²

¹³² Dinda *et al.* (2008), *Bioresource Technology*, 99, 3737-3744

Der Epoxidsauerstoffgehalt für die chemo-enzymatisch epoxidierten Pflanzenöle wurde titrimetrisch nach der AOCS Official Method Cd 9-57 bestimmt. In Abbildung 114 sind der mittlere Epoxidsauerstoffgehalt der drei parallelen Reaktionsansätze und die Ausbeute bezogen auf den theoretisch erreichbaren Epoxidsauerstoffgehalt (siehe Tabelle 68) dargestellt.

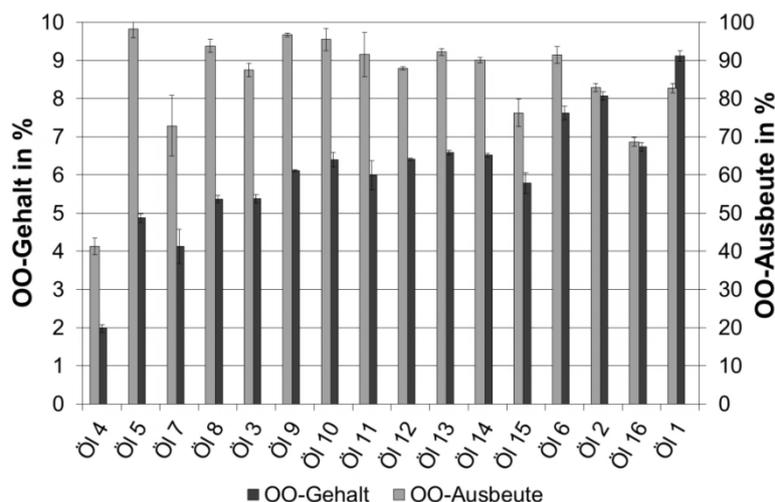


Abbildung 114: Darstellung des mittleren gemessenen Epoxidsauerstoffgehalts (dunkelgrau) und der Epoxidsauerstoffausbeute (hellgrau) in Bezug auf den maximal erreichbaren OO-Gehalts aus Tabelle 68.

Die Abbildung 114 zeigt, dass mit der chemo-enzymatische Epoxidierung hohe Ausbeuten von bis zu über 95% erreichen werden können. Für die meisten Pflanzenöle, außer Öl 4, wurden nach 24 h Inkubationszeit Epoxidausbeuten zwischen 70 und >90% erzielt. Die Ausbeute der Epoxidierung von Öl 4 ist mit 42,1% deutlich geringer als bei den restlichen epoxidierten Pflanzenölen. Es ist nicht auszuschließen, dass Bestandteile des verwendeten Pflanzenöls einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von Novozym 435[®] ausüben. Beim Einsatz von Novozym 435[®] zur Herstellung von Biodiesel aus pflanzlichen Ölen zeigte sich, dass Phospholipide die enzymatische Abspaltung von Fettsäuren aus Triacylglyceriden hemmen¹³³. Bei der Epoxidierung von α -Pinen zeigte sich ein inhibitorischer Effekt nach Zugabe von mehr als 2 M Octansäure¹³⁴.

Verschiedene kinetische Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass die Reaktionsbedingungen, wie die Menge an Lösemittel, die Enzymkonzentration und die Reaktionstemperatur, entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute der Reaktion haben¹³⁵. Daher lassen sich Schwankungen in der Reaktionsausbeute auch durch mögliche Unterschiede in der Menge an verwendetem Lösemittel oder durch Temperaturschwankungen während der chemo-enzymatischen Epoxidierung erklären. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen kann dazu beitragen, in möglichst umweltverträglichen Reaktionen, die Ausbeuten weiter zu steigern.

¹³³ Du *et al.* (2004), *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40, 2, pp. 187-190

¹³⁴ Skouridou *et al.* (2003), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21,1 pp. 67-69

¹³⁵ Vlcek & Petrovic (2006), *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83, 3, pp. 247-252

Untersuchung des Einflusses der Epoxidierung auf die Viskosität des Pflanzenöls

Die Viskosität stellt eine wichtige Kenngröße für mögliche Anwendungsgebiete der epoxidierten Pflanzenöle dar. Die Viskosität kann entscheidend für die Auswahl eines Pflanzenöls für eine bestimmte Anwendung sein und definiert die technischen Voraussetzungen an einen industriellen Prozess. So hängt beispielsweise die Wahl eines geeigneten Rührers für chemische Modifikationen, im industriellen Maßstab, von der Viskosität des Substrates ab.

Vor der Messung der Viskosität bei konstanter Scherrate wurde das Fließverhalten der Öle untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Messung der Schubspannung bei einer Zunahme der Scherrate ($0,1 \text{ s}^{-1}$ bis 1000 s^{-1}) durchgeführt.

Bei der logarithmischen Darstellung der Scherrate gegen die Schubspannung zeigte sich ein linearer Zusammenhang. Somit wurde gezeigt, dass es sich bei den verwendeten Ölen um Newtonsche Fluide handelt, deren Fließverhalten durch die Viskosität charakterisiert werden kann. Damit wurde auch gezeigt, dass die Viskosität der nativen und epoxidierten Öle unabhängig von der Scherrate ist.

Die gemessenen Viskositäten sind in Abbildung 115 graphisch dargestellt. Öl 1 hat mit $0,0319 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ die geringste gemessene Viskosität während Öl 5 mit einer Viskosität von $0,0664 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ die höchste Viskosität der nativen Pflanzenöle aufweist. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der Viskositäten in den epoxidierten Pflanzenölen. Bei der Epoxidierung von Öl 4 zeigt sich nur eine sehr geringe Zunahme der Viskosität. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei der Epoxidierung nur zu eine geringen Ausbeute ($42,1\%$) erreicht werden konnte (siehe Abbildung 114).

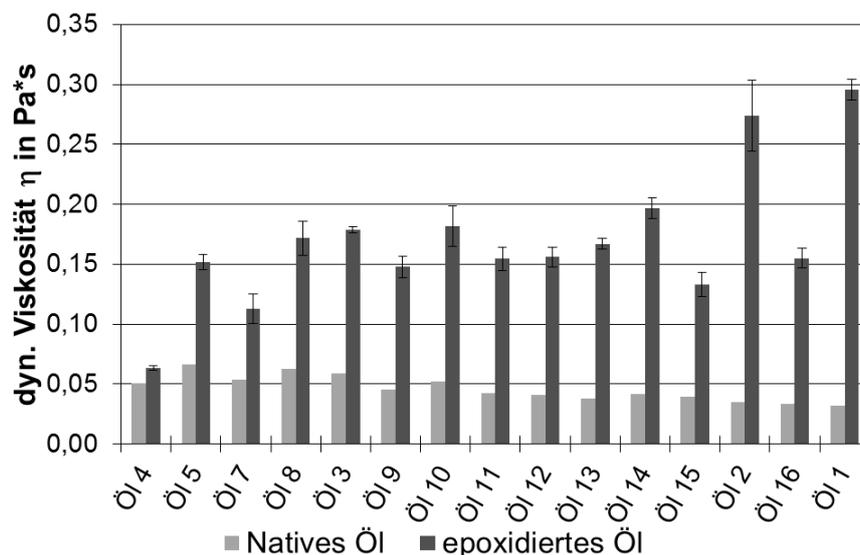


Abbildung 115: Vergleich der Viskosität von nativem Pflanzenöl (hellgrau) und dem Mittelwert aus den drei parallel epoxidierten Pflanzenölsansätzen (dunkelgrau).

Erwartungsgemäß zeigt sich in allen epoxidierten Ansätzen eine Zunahme der Viskosität gegenüber dem nativem Pflanzenöl. Untersuchungen mit epoxidiertem -Ölsäure-, Linolsäure- und Linolensäuremethylester haben gezeigt, dass die Viskosität bei epoxidiertem Linolensäuremethylester mit drei Oxirangruppen deutlich höher war als bei den Fettsäuren mit weniger Oxirangruppen. Die Zunahme der Viskosität beruht auf den zusätzlichen

Elektronenpaaren, die in der Oxirangruppe enthalten sind. Diese Elektronenpaare verursachen stärkere intermolekulare Wechselwirkungen im Pflanzenöl und erhöhen damit die Viskosität¹³⁶.

Korrelationsbeziehungen der Viskosität mit Substrat- und Produkteigenschaften

Um mögliche Korrelationen zwischen der Viskosität und den anderen Kenngrößen der Pflanzenöle zu identifizieren, wurde die Viskosität des nativen Pflanzenöls mit 5 mol% Ölsäure (x-Achse) gegen die Jodzahl pro mittlere Kettenlänge des Pflanzenöls auf der y-Achse aufgetragen (siehe Abbildung 116).

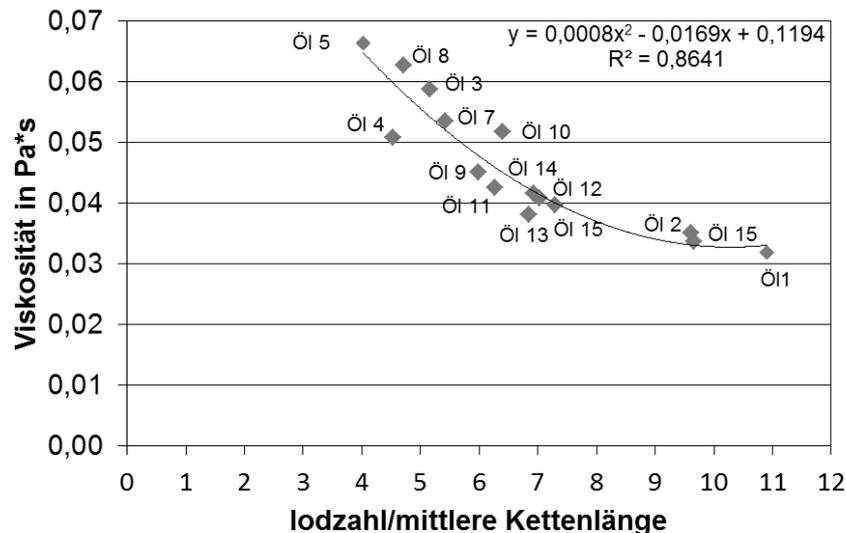


Abbildung 116: Korrelation zwischen der Viskosität der nativen Pflanzenöle und der gemessenen Jodzahl pro mittlere Kettenlänge. Im Diagramm sind die Formel der Trendlinie sowie deren Varianz (R²) angegeben.

y-Achse: gemessene Viskosität des nativen Pflanzenöls nach Zugabe von 5 mol% Ölsäure
x-Achse: IZ (ermittelte Jodzahl) bezogen auf die mittlere Fettsäure-Kettenlänge des Öls

Durch die Auftragung der Viskosität gegen die Jodzahl bezogen auf die mittlere Kettenlänge des nativen Pflanzenöls ergibt sich eine nicht-lineare Beziehung. Diese Beziehung kann durch die Formel $y=0,0008x^2-0,0169x+0,1194$ angegeben werden.

Anhand der Abbildung 115 wird deutlich, dass die Epoxidierung zu einer Zunahme der Viskosität führt. Die Differenz zwischen der Viskosität des epoxidierten Öls und des nativen Öls wurde gegen den gemessenen Epoxidsauerstoffgehalt aufgetragen (siehe Abbildung 117).

¹³⁶ Sharma *et al.* (2007), Green Chemistry, 9, 5, pp. 469-474

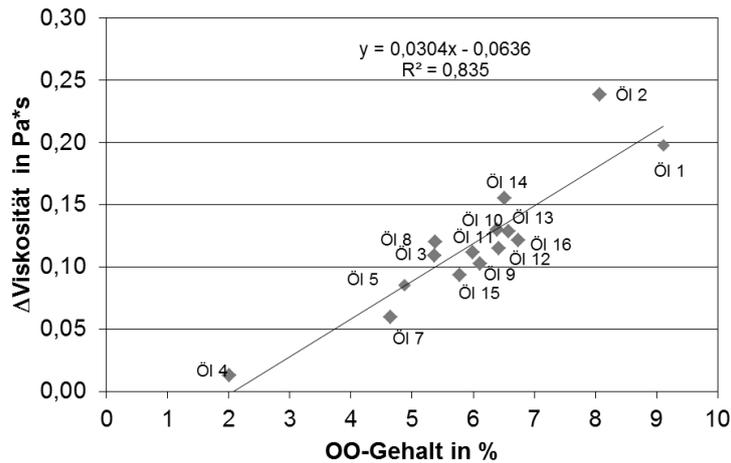


Abbildung 117: Lineare Abhängigkeit der Viskositätsänderung vom Epoxidsauerstoff im Pflanzenöl. Im Diagramm sind die Formel der Regressionsgeraden sowie deren Varianz (R^2) angegeben.

Die Auftragung der Viskositätsänderung gegen den Epoxidsauerstoffgehalt zeigt einen linearen Zusammenhang, der durch die Formel $y=0,0304x-0,0636$ dargestellt werden kann.

Durch diese Auftragung soll eine Beziehung zwischen dem Anteil an Oxirangruppen im Pflanzenöl und der daraus resultierenden Viskositätszunahme gezeigt werden. Um mögliche Unterschiede in der Viskosität der nativen Pflanzenöle auszugleichen wird nur die Zunahme der Viskosität betrachtet. Als Maß für die Epoxidierung wird der Epoxidsauerstoffgehalt betrachtet. Mit dieser Kenngröße wird die Anzahl an Oxirangruppen angegeben.

Die gezeigte Korrelation der Viskositätsänderung zum Gehalt an Epoxidsauerstoff bezieht aber neben dem Epoxidsauerstoff keine weiteren Faktoren mit ein. Nach der chemischen Modifikation von epoxidiertem Sojaöl durch Veresterung mit 2-Ethylhexylgruppen konnte eine hohe Viskosität beobachtet werden. Dabei war die Viskosität deutlich höher als der Epoxidsauerstoffgehalt vermuten ließ¹³⁷. Dies lässt darauf schließen, dass die Viskosität noch von weiteren Faktoren, als dem Epoxidsauerstoffgehalt, beeinflusst werden kann.

3.5.3.9 Scale-Up der chemo-enzymatischen Epoxidierung

Nachdem die Prozessbedingungen in Kleinmaßstab optimiert und die Übertragbarkeit der Prozessbedingungen auf eine Vielzahl verschiedener Substrate demonstriert wurde, sollte in einem nachfolgenden Schritt auch die Skalierbarkeit der chemo-enzymatischen Epoxidierung betrachtet werden.

Aufgrund dessen, dass es sich bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung um ein Verfahren auf Basis eines dreiphasigen Reaktionssystems handelt, wurde ein wesentlicher Einfluss der Tropfengrößenverteilung auf die Reaktionsgeschwindigkeit angenommen. Im Zusammenhang mit der Maßstabsvergrößerung zweiphasiger flüssig/flüssig Reaktionssystem ist die volumenspezifische Rührerleistung eines der wichtigsten Kriterien. In der Literatur ist beschrieben, dass durch das Einbringen der gleichen volumenspezifischen Rührerleistung ein konstante Sauterdurchmesser d_{32} und somit eine konstante volumenbezogene Phasengrenzfläche in verschiedenen Größenmaßstäben realisiert werden

¹³⁷ Sharma et al. (2007), Green Chemistry, 9, 5, pp. 469-474

kann¹³⁸. Für die Maßstabsvergrößerung der chemo-enzymatischen Epoxidierung ist die Kenntnis über die volumenspezifische Rührleistung von großer Bedeutung. Ist die volumenspezifische Rührleistung, die zur Herstellung einer bestimmten Tropfengrößenverteilung benötigt wird, bekannt, so kann diese beim Scale-up konstant gehalten werden und eine vergleichbare Tropfengrößenverteilung im technischen Maßstab erzielt werden.

Die volumenspezifische Rührleistung wurde für verschiedene Reaktorkonfigurationen aus verschiedenen Rührerdrehzahlen, Reaktorgrößen (1 und 10 L), Lösemittelgehalten und Dispersphasenanteilen (Wasserstoffperoxidmenge) bestimmt. Nach der Bestimmung der Nettoleistung wird diese ins Verhältnis zum Füllvolumen gesetzt, um die volumenspezifische Rührleistung $P/V = P_V$ in W/m^3 zu erhalten. Um das Kriterium $H/D=1$ einzuhalten, wurde das Füllvolumen in einem 1 L Glasreaktors auf 800 mL und das für einen 10 L Glasreaktor auf 6,75 L eingestellt. Um nun die gleiche volumenspezifische Rührleistung im 10 L Reaktor und im 1 L Reaktor zu erbringen, wurde die benötigte Drehzahl im 10 L Reaktor nach mittels der Formel $n_H = n_M \cdot \mu^{-\frac{2}{3}}$ berechnet.

Nach dieser Formel wurde die Drehzahl im 10 L Reaktor bestimmt, um anschließend den Einfluss durch die Änderung des Größenmaßstabs auf die Konversion von Öl 1 bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung feststellen zu können. Im 1L-Maßstab wurden grundlegende Experimente durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Parameter im Zusammenhang mit einem skalierbaren Reaktionssystem nochmals zu evaluieren. Der erste Versuchsblock sollte unter Verwendung einer vorgegebenen Lösungsmenge LM 1 und einem konstanten Dispersphasenanteil DPA 1 der Einfluss der Drehzahl validiert (siehe Abbildung 118), um im nachfolgenden Schritt den Einfluss des Lösungsmittelanteils bei konstanter Drehzahl und Dispersphasenanteil zu untersuchen (siehe Abbildung 119). Anschließend wird in Abbildung 120 der Einfluss des Dispersphasenanteils auf die chemo-enzymatische Epoxidierung dargestellt, indem der Lösungsmittelanteil und die Rührerdrehzahl konstant gehalten werden.

Um die Ausbeute bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung bestimmen zu können, musste zuerst die Jodzahl bestimmt werden. Mit der bestimmten Jodzahl kann der maximal mögliche Epoxidsauerstoffgehalt berechnet werden, um im nächsten Schritt die Ausbeute zu bestimmen.

Einfluss der Drehzahl

Um den Einfluss der Drehzahl auf die Umsetzung der im Öl 1 enthaltenen C=C-Doppelbindungen zu Epoxidgruppen zu untersuchen, wurde die chemo-enzymatische Epoxidierung bei den Drehzahlen 350, 600, 1000 und 1400 rpm durchgeführt. Dabei wurde jeweils ein Lösungsmittelanteil LM 1 und ein Dispersphasenanteil DPA 1 eingesetzt. Mit zunehmender Drehzahl sind kleinere Sauterdurchmesser und damit eine vergrößerte Phasengrenzfläche zu erwarten. Dadurch sollte der Stofftransfer zwischen den beiden Phasen maximiert werden und in schnelleren Umsetzungen mit steigenden Drehzahlen resultieren. In Abbildung 118 ist der Epoxidsauerstoffgehalt in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen Drehzahlen dargestellt.

¹³⁸ Zlokarnik (1999), Rührtechnik: Theorie und Praxis

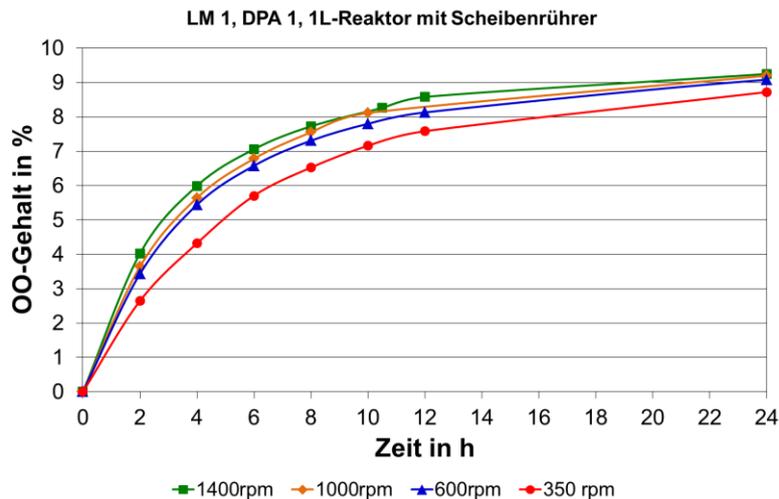


Abbildung 118: Einfluss der Rührerdrehzahl auf die Umsetzung von C=C-Doppelbindungen des Öl 1 zu Epoxidgruppen bei der Verwendung von LM 1 und DPA 1.

Wie man anhand des Diagrammes erkennen kann, wird bei der Reaktion mit einer höheren Drehzahl eine höhere Umsatzrate erzielt. Zu jedem Zeitpunkt kann durch eine höhere Drehzahl eine schnellere Umsetzung der C=C-Doppelbindungen zu Epoxidgruppen erreicht werden, was die eingehende Erwartung einer schnelleren Konversion bestätigt. Nach 24 h wurden Ausbeuten von 91 (350 rpm) bis maximal 97 % (1400 rpm) erreicht. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich auf den bei 1400 rpm erzeugten kleineren Sauterdurchmesser zurückführen, da das Enzym die Reaktion aufgrund der größeren Phasengrenzfläche a optimaler katalysieren kann. Im Vergleich zu den Experimenten bei 1000 und 1400 rpm konnte bei der Reaktion bei 350 und 600 rpm inhomogene Zonen im oberen Reaktorbereich festgestellt werden, die ein komplettes Durchmischen des Reaktorinhaltes aufgrund von geringer Turbulenz verhinderte.

Im Hinblick auf die Stabilität des immobilisierten Enzyms sind geringerer Drehzahl sicherlich zu bevorzugen, da das immobilisierte Enzym aufgrund geringerer mechanische Beanspruchung voraussichtlich mehrere Reaktionszyklen überstehen und dadurch neben Enzymkosten zusätzlich Kosten durch den geringeren Leistungsbedarf eingespart werden können. Die um knapp 1,4 % verringerte Ausbeute lässt sich durch diese Vorteile voraussichtlich hinnehmen.

Einfluss des Lösungsmittelanteils

Im Folgenden wird auf den Einfluss des Lösungsmittelanteils bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung eingegangen. Dabei wurden Experimente mit verschiedenen Lösungsmittelanteilen LM 1, LM 2, LM 3 und LM 4 durchgeführt. Die Experimente wurden alle bei einer Drehzahl von 1000 rpm und gleichem Verhältnis an H_2O_2 zu C=C-Doppelbindung gestartet. Das bedeutet, dass bei unterschiedlichen Lösungsmittelanteilen verschiedene Dispersphasenanteile eingesetzt wurden.

Bei Epoxidierungen im kleineren Maßstab wurde am Fraunhofer IGB mit Verringerung des Lösungsmittelanteils eine langsamere Konversion der C=C-Doppelbindungen zu Epoxidgruppen festgestellt. Außerdem ergaben Experimente ohne Lösungsmittel keine zufriedenstellende Umsetzung, bei der C=C-Doppelbindungen mit geringeren Ausbeuten epoxidiert wurden. Aus diesem Grund wurde mit zunehmendem Lösungsmittelanteil eine

verbesserte Konversion erwartet. In Abbildung 119 ist der Epoxidsauerstoffgehalt in Abhängigkeit von der Zeit für die verschiedenen Lösungsmittelanteile bei 1000 rpm dargestellt.

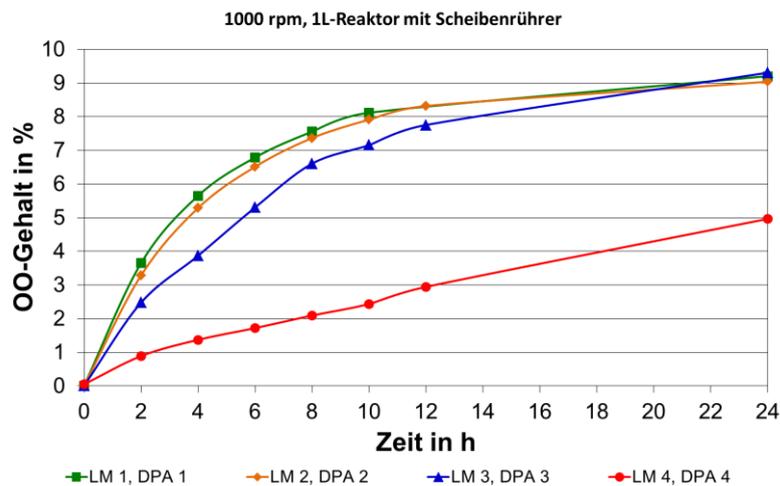


Abbildung 119: Einfluss des Lösungsmittelanteils auf die Umsetzung von C=C-Doppelbindungen in Öl 1 zu Epoxidgruppen bei einer Drehzahl von 1000 rpm und der Verwendung der realen Dispersphasenanteile.

Wie man anhand der Verläufe der Graphen sehen kann, kommt es bei der Umsetzung der C=C-Doppelbindungen zu Epoxidgruppen zu einem Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmendem Lösungsmittelanteil. Nach 24 Stunden ergibt sich für die Verwendung von LM 3 eine mit LM 2 und LM 1 vergleichbare Epoxidausbeute, die 97 % beträgt.

Aus Sicht einer Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute wird mit einem geringeren Lösungsmittelanteil zwar ein höherer Dispersphasenanteil, also ein größeres Volumen an H₂O₂ eingesetzt. Allerdings wird mit geringerem Lösungsmittelanteil auch mehr Öl bezogen auf das gesamte Reaktionsvolumen eingesetzt. Aus diesem Grund wurden bei LM 3 auch die meisten Epoxidgruppen am Ende der Reaktion gebildet.

Im Gegensatz dazu verläuft die chemo-enzymatische Epoxidierung mit LM 4 deutlich langsamer, was auf die geringere katalytische Aktivität der Lipase zurückzuführen sein könnte. Vlček und Petrovič haben in ihren Experimenten, unter Variation des Lösungsmittelanteils, einen optimalen Lösungsmittelanteil von rund 50 Gew. % festgestellt und nach 24 h eine Ausbeute von 97 % erzielt¹³⁹. Bei der Epoxidierung von Öl 1 im 1L-Maßstab hingegen konnte auch mit LM 3 eine Ausbeute von 97 % erreicht werden. Rüschen, Klaas und Warwel konnten zwar auch hohe Ausbeuten von 88 bis 96 % nach bereits 16 h erreichen, jedoch wurde bei diesen erzielten Ausbeuten ein hoher Lösungsmittelanteil von rund 90 Gew. % eingesetzt¹⁴⁰.

Jedoch sollte auch hier wieder die Enzymaktivität beachtet werden, da der Großteil der Kosten für enzymkatalysierte Verfahren bei dem verwendeten Enzym liegt. Sollte die Enzymaktivität durch den geringen Lösungsmittelanteil vermindert werden, sollte dennoch

¹³⁹ Vlček & Petrovič (2006), Journal of the American Oil Chemists' Society, 83, 3, pp. 247-252

¹⁴⁰ Rüschen, Klaas & Warwel (1999), Industrial Crops and Products, 9, 2, pp. 125-132

ein höherer Lösungsmittelanteil bei der Reaktion verwendet werden. Da der Einsatz von Lösungsmittel zwar reduziert, aber nicht darauf verzichtet werden kann, benötigt der Reaktor weiterhin Explosionsschutzmaßnahmen im industriellen Maßstab. Die Reduktion der Kosten für das verwendete Enzym würde somit den Einsatz von mehr Lösungsmittel rechtfertigen.

Die eingehende Erwartung, dass mit höherem Lösungsmittelanteil eine bessere Umsetzung der C=C-Doppelbindung zu Epoxidgruppen erreicht werden kann, hat sich teilweise bestätigt. Hohe Ausbeuten können bei der Epoxidierung von Öl 1 im 1L-Maßstab mit unterschiedlichen Lösemittelanteilen (LM 1 bis 3) innerhalb von 24 h Inkubationszeit erzielt werden.

Einfluss des Dispersphasenanteils

Um den Einfluss des Dispersphasenanteils zu ermitteln, wurden Experimente mit LM 1 bei 1000 rpm und den Dispersphasenanteilen DPA 3, DPA 2 und DPA 1. Mit steigendem Dispersphasenanteil und einem Überschuss an H_2O_2 pro Mol C=C-Doppelbindung kann das Enzym die Persäurebildung vermutlich leichter katalysieren. Aus diesem Grund wird mit zunehmendem Dispersphasenanteil (DPA 1 > DPA 2 > DPA 3) eine schnellere Konversion der C=C-Doppelbindungen zu Epoxidgruppen erwartet.

In Abbildung 120 ist der Epoxidsauerstoffgehalt in Abhängigkeit von der Zeit unter Verwendung der verschiedenen Dispersphasenanteile bei einer Drehzahl von 1000 rpm dargestellt.

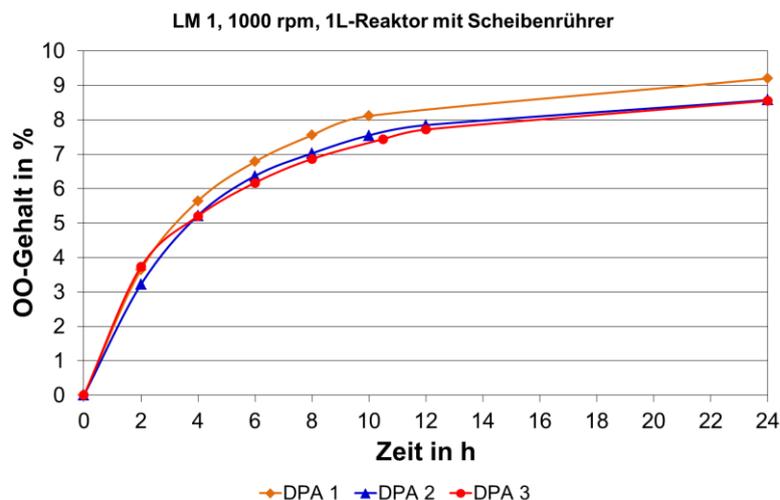


Abbildung 120: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Umsetzung von C=C-Doppelbindungen des Öl 1 zu Epoxidgruppen bei einer Drehzahl von 1000 rpm.

Anhand der Graphen lässt sich eine gesteigerte Umsetzung der C=C-Doppelbindungen zu Epoxidgruppen bei höherem Dispersphasenanteil erkennen. Für DPA 1 wird mit 96 % die höchste Ausbeute erzielt. Für DPA 2 wird eine Ausbeute von 90 % und für DPA 3 eine Ausbeute von 89% erreicht. Auch Viček und Petrovič konnten bei zwei verschiedenen H_2O_2 zu C=C-Doppelbindung Verhältnissen ähnliche Ausbeuten bei der Umsetzung von Sojaöl erzielen¹⁴¹.

¹⁴¹ Viček & Petrovič (2006), Journal of the American Oil Chemists' Society, 83, 3, pp. 247-252

Bei der Verwendung von DPA 3 wurde bei der Umsetzung von Öl 1 eine Ausbeute von rund 90 % erzielt, wonach noch maximal 10 % unreaktiertes Wasserstoffperoxid im Reaktionsmedium zur Verfügung stehen können. Aus Optimierung-technischer Sicht und aus Sicht der finalen Abfallbeseitigung sollte die verwendete Menge an Wasserstoffperoxid und damit der verwendete Dispersphasenanteil möglichst gering gehalten werden und ist deshalb ein wichtiger Punkt, um die Kosten für die Reaktion zu senken¹⁴². Durch die Reduktion des Dispersphasenanteils wird bei einem Reaktionsansatz mit gleichbleibender Lösungsmittelkonzentration zudem bei gleichbleibendem Reaktorvolumen eine größere Menge Öl eingesetzt. Aus diesem Grund werden trotz der Differenz in der Ausbeute die meisten Epoxidgruppen bei DPA 3 gebildet.

Falls eine Epoxidausbeute von rund 90 % der C=C-Doppelbindungen für die weitere Verwendung des epoxidierten Öls ausreichen, sollte DPA 3 eingesetzt werden, da die eingesetzte Menge an Wasserstoffperoxid in diesem Fall minimiert würde. Dadurch können Kosten eingespart und die Stabilität des Enzyms aufgrund der minimalen Exposition gegenüber Wasserstoffperoxid eventuell gesteigert werden.

Experimentelle Übertragung der Epoxidierung von Öl 1 vom 1 L- zum 10 L-Maßstab

Die vorangegangenen Experimente im 1L-Maßstab hatten zum einen das Ziel relevante Prozessgrößen in einem skalierbaren Reaktionssystem zu evaluieren und zum anderen Basisinformationen für eine Maßstabsvergrößerung in den 10 L- und anschließend 100 L-Maßstab zu liefern (siehe Abbildung 121).

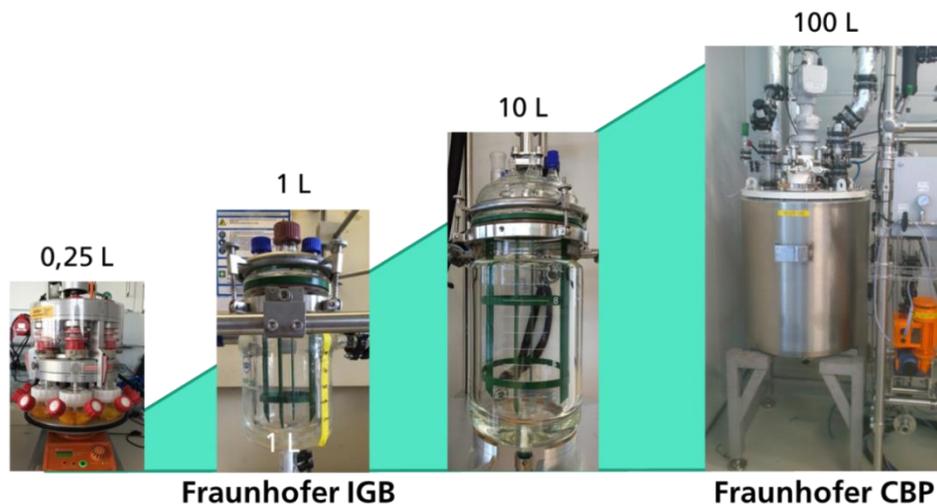


Abbildung 121: Am Fraunhofer IGB und CBP zur Verfügung stehende Reaktoren zur Optimierung und Maßstabsvergrößerung der chemo-enzymatischen Epoxidierung.

Als Übertragungskriterium sollte aufgrund des mehr-phasigen Reaktionssystems die volumenspezifische Rührleistung herangezogen werden. Die Formel zur Berechnung einer benötigten Rührerdrehzahl in der Hauptausführung auf Basis von Modellversuchen unter Annahme eines turbulenten Strömungsregims wurde bereits vorgestellt. Als Basis zur Evaluierung der Skalierbarkeit der chemo-enzymatischen Epoxidierung sollte das Epoxidierungsexperiment im 1 L-Maßstab mit LM 1, DPA 1 und einer Rührerdrehzahl von

¹⁴² Viček & Petrović (2006), Journal of the American Oil Chemists' Society, 83, 3, pp. 247-252

1000 rpm unter Verwendung eines 6-Blatt-Scheibenrührers mit entsprechendem Strombrecher genutzt werden. Nach der Formel zur Berechnung der Drehzahl im größeren Maßstab ergibt sich für die Ausführung im 10L-Maßstab mit Strombrecher und 6-Blatt-Scheibenrührer eine Rührerdrehzahl von 630 rpm, um einen gleichbleibenden volumenbezogenen Leistungseintrag zu gewährleisten. Der Verlauf der chemo-enzymatischen Epoxidierung im 1L- und 10L-Maßstab mit Scheibenrührer, Strombrecher und dem Maßstab entsprechender Rührerdrehzahl ist in Abbildung 122 anhand des Epoxidsauerstoffgehaltes über die Reaktionszeit dargestellt. Da der 100L-Reaktor am Fraunhofer CBP derzeit nur mit einem 2-stufigen Impellerrührer ohne Strombrecher ausgestattet ist, wurde am Fraunhofer IGB ein „Downsizing“-Ansatz mit entsprechend ausgelegtem 2-stufigem Impellersystem durchgeführt, um die Umsetzung mit einem alternativen Rührersystem zu demonstrieren und die Machbarkeit am Fraunhofer CBP abzuschätzen. Die Ergebnisse des Experiments sind ebenfalls in Abbildung 122 gezeigt.

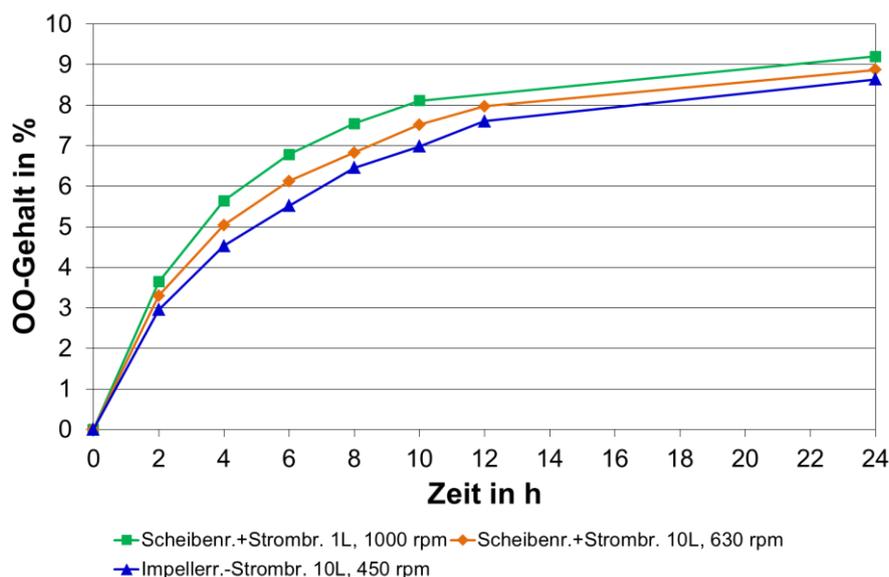


Abbildung 122: Vergleich der Epoxidierung von Öl 1 mit LM 1 im 1L-Maßstab mit Scheibenrührer und Strombrecher bei 1000 rpm mit einem Vergleichsansatz mit Scheibenrührer und Strombrecher im 10L-Maßstab und einem zum CBP-Setup des 100L-Reaktors vergleichbaren Ansatz im 10L-Maßstab mit 2-stufigem Impellerrührer (450 rpm) ohne Strombrecher.

Durch die Experimente der chemo-enzymatischen Epoxidierung konnten verschiedene Einflüsse auf die Umsatzgeschwindigkeit der C=C-Doppelbindungen zu Epoxidgruppen in einem skalierbaren Reaktionssystem identifiziert werden. Unter den oben beschriebenen stofflichen und betriebsbedingten Parametern können nach 24 Stunden Ausbeuten von rund 96 % erwartet werden und es wird ein Mittelmaß zwischen Umsatzgeschwindigkeit und Beanspruchung des immobilisierten Enzyms gefunden. Der Vergleich der Umsatzgeschwindigkeiten im 1 L- und 10 L-Maßstab in Abbildung 122 zeigt, dass die Umsetzung im 10 L-Maßstab nur minimal langsamer verläuft als im 1 L-Maßstab. Auf Basis dieses Ergebnisses ist anzunehmen, dass die chemo-enzymatische Epoxidierung in einem entsprechend ausgelegten 100L Reaktor ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden kann. Das Experiment zur Epoxidierung von Öl 1 mit derselben stofflichen Einstellung und 2-stufigem Impellerrührer bei 450 rpm zeigt im Vergleich zum Ansatz mit Scheibenrührer und Strombrecher bei 630 rpm nochmals eine minimal geringere Umsatzgeschwindigkeit. Allerdings kann auf Basis dieses Experimentes geschlossen werden, dass eine

konstruktive Anpassung des 100 L-Reaktors am Fraunhofer CBP nicht erforderlich sein sollte, um die chemo-enzymatische Epoxidierung auch in diesem Maßstab erfolgreich durchführen zu können.

3.5.3.10 Epoxidierung in einem Festbettreaktor mit Novozym[®] 435

Zusätzlich zu den bisher dargestellten Ansätzen zur Epoxidierung von Öl 1 wurde ein Experiment zur Umsetzung an einem mit Novozym[®] 435 beladenen Festbett durchgeführt. Ein kontinuierlicher Prozess könnte einige wirtschaftliche Vorteile zum Satzbetrieb mit sich bringen. Durch den Einsatz eines Festbettreaktors könnte zum Beispiel das benötigte Reaktorvolumen reduziert werden. Außerdem könnte die Stabilität des Katalysators aufgrund einer im Vergleich zu Rührsystemen geringeren mechanischen Belastung möglicherweise gesteigert werden. Durch diese beiden Ansatzpunkte wäre es möglich die Investitionskosten für Reaktor und Katalysator eventuell zu senken.

In Abbildung 123 ist der Versuchsaufbau zu sehen. Zum Aufbau des Festbetts wurde Glaswolle und anschließend Novozym[®] 435 in einen Glaszylinder gegeben. Die Festbettlänge betrug ca. 4 cm. Als Reaktionsgefäß kam ein 50 mL Erlenmeyerkolben mit Bodenauslass zum Einsatz. Die Reaktionsmischung wurde direkt im Erlenmeyerkolben angesetzt und mittels Magnetrührer homogenisiert. Die Reaktionsmischung wurde kontinuierlich mittels einer 32 rpm Pumpe (Watson Marlow, Ref A804, Hub: 50) im Kreislauf durch den Festbettreaktor geführt. Die Probenahme erfolgte in einem Zeitintervall von 2 h. Dazu wurden 100 µL des Reaktionsansatzes entnommen und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert.

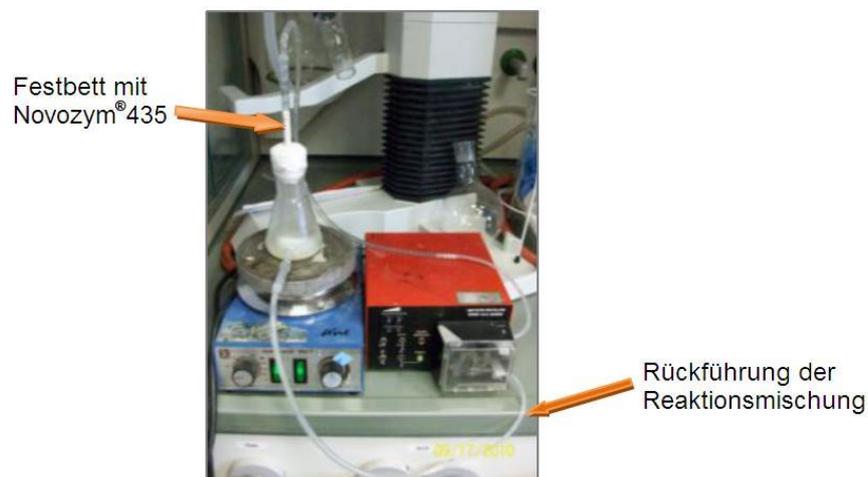


Abbildung 123: Versuchsaufbau zur Epoxidierung von Öl 1 in einem Festbettreaktor mit Novozym[®] 435.

Das Ergebnis der dünnschichtchromatographischen Analyse der Proben aus der Epoxidierung von Öl 1 an einem Festbett mit Novozym[®] 435 ist in Abbildung 124 (links) gezeigt. Zum Vergleich wurde das Ergebnis der Epoxidierung von Öl 1 in einem Batch-Ansatz (Heidolph Synthesis 1 Screening-Gerät) dargestellt (siehe Abbildung 124 rechts). Es ist zu sehen, dass Öl 1 in einem Festbettreaktor epoxidiert werden konnte. Allerdings konnten fast ausschließlich Produkte mit einem niedrigen Anteil an Epoxygruppen detektiert werden, nachdem das Reaktionsgemisch für sechs Stunden im Kreislauf geführt wurde. Aus Abbildung 124 (rechts) ist zu erkennen, dass bei einer Epoxidierung von Öl 1 im Batch-Ansatz (Heidolph Screening-Gerät) nach einer Reaktionszeit von 4 h ebenfalls hauptsächlich

epoxidierte Triglyzeride (ETG) mit einem geringeren Anteil an Epoxygruppen zu detektieren war. Die Epoxidierung in einem Festbettreaktor stellt somit eine Alternative zum klassischen Batch-Ansatz dar.

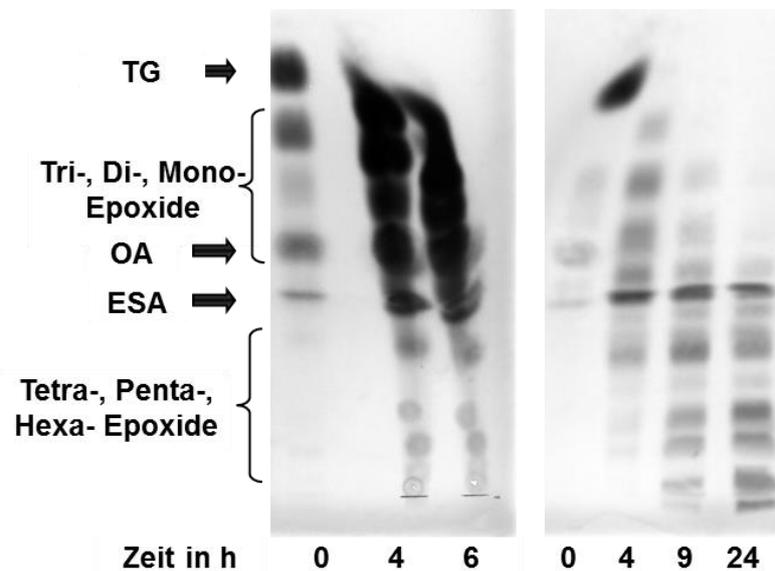


Abbildung 124: Dünnschichtchromatographie zur Epoxidierung von Öl 1 in einem Festbettreaktor (links) im Vergleich zur Epoxidierung im Heidolph Synthesis 1 Screening-Gerät (rechts).

3.5.4 Heterologe Expression der Lipasen (Universität Halle-Wittenberg)

Die Auswahl der Lipasen zur Umsetzung der im Projekt relevanten pflanzlichen Öle erfolgte anhand der in den Kapiteln zuvor beschriebenen Screening-Ergebnisse von Eucodis und Fraunhofer IGB. Hierbei zeigten die Eucodis-Lipasen EL012, EL013 und EL016 besonders gute Eigenschaften hinsichtlich der Abspaltung langkettiger Fettsäuren aus p NP-Estern (C18 - C22) und hinsichtlich der Öglichkeit zur Durchführung von Epoxidierungsreaktionen. Zur Entwicklung geeigneter Produktionsstammes für diese Lipasen wurde im Vorfeld der Untersuchungen eine Literatur- und Patentrecherche durchgeführt, um ein entsprechendes Expressionssystem konstruieren zu können. Unter Absprache mit Eucodis wurden die einzelnen Kriterien des Expressionssystems festgelegt. Als Produktionsorganismus diente *E. coli* BL21(DE3). Die Nukleotid-Sequenzen der Lipasen wurden an die Codon Usage des Produktionsorganismus angepasst. Zusätzlich wurde im Hinblick auf die spätere Reinigung jeweils ein C-terminaler His₆-Tag in die Sequenzen integriert. Zur Regulation der Genexpression wurde ein IPTG-induzierbares Promotersystem genutzt. Als Selektionsmarker für die Kultivierung diente Ampicillin.

Die konstruierten Plasmide wurden von Eucodis zur Verfügung gestellt und zur Transformation des Produktionsorganismus *E. coli* BL21(DE3) eingesetzt. Mit den erhaltenen Klonen wurden Glycerin-Kryokulturen angelegt, die als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen.

Die Untersuchung des Wachstums der transformierten Zellen und die Überprüfung der Produktbildung infolge der Induktion mit IPTG erfolgte im 500 mL-Schüttelkolbenmaßstab (SK). Hinsichtlich des Wachstumsverhaltens auf LB_{AMP}-Medium wurden für die Produktionsstämme auch nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C keine signifikanten

Unterschiede zum Referenzstamm *E. coli* BL21(DE3) ohne Plasmid beobachtet (ohne Abb.). Bei allen drei Produktionskulturen konnte mittels SDS-PAGE-Analyse die Zunahme einer entsprechenden Bande im zu erwartenden Molekulargewichtsbereich festgestellt werden. Diese Banden traten bei der Kultivierung des o.g. Referenzstammes nicht auf.

Zur Untersuchung der Aktivität und Reinigung der Lipasen wurde jeweils die in den Schüttelkolbenversuchen hergestellte Biofeuchtmasse (ca. 2 g) mittels Hochdruck-homogenisation (HDH) aufgeschlossen und die Rohenzymextrakte mittels Nickel-Chelat-Affinitäts-chromatographie (IMAC) gereinigt. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Lipasen erfolgte titrimetrisch unter Verwendung von Olivenöl-Emulsionen. Die gemessenen Aktivitätswerte der jeweiligen Rohenzymextrakte und ausgewählter IMAC-Peak-Fractionen sind in Tabelle 69 aufgeführt. Als Negativ-Kontrollen für den Aktivitätstest dienten Rohenzymextrakt des Referenzstammes *E. coli* BL21(DE3) bzw. Elutionspuffer (IMAC). Bei beiden Kontrollproben konnte kein Signalanstieg festgestellt werden, woraus geschlossen werden kann, dass die erhaltenen Messwerte in Tabelle 69 eindeutig auf die Aktivität der Zielenzyme zurückgeführt werden können.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem entwickelten Expressionssystem die drei Zielproteine in löslicher und aktiver Form in *E. coli* exprimiert werden können und, dass eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie möglich ist.

Tabelle 69: Produzierte Lipase-Aktivitäten unter Verwendung von LBamp-Medium (Assay: 5 % v/v Olivenöl; 2 % w/v Gummi Arabicum; 45 mM CaCl₂; pH 8; 37 °C).

	EL012	EL013	EL016
Volumetrische Aktivität Rohextrakt (RE) [U/L _{Medium}]	49700	22800	63600
produzierte Aktivität pro Schüttelkolben [U]	24850	11400	31800
spez. Aktivität RE [U/mg Protein]	155	61	179
Peak-Fraktion IMAC [U/mL]	3015	747	2910
spez. Aktivität IMAC-Fraktion [U/mg Protein]	4080	283	4235

Zur Produktion der Lipasen im größeren Maßstab wurden daraufhin Untersuchungen hinsichtlich möglicher Nährmedien durchgeführt. Hierbei erwies sich das in der Literatur beschriebene Komplexmedium nach Gerber et al.¹⁴³ als ein geeignetes Medium, mit dem in kurzer Zeit relativ hohe Zelldichten erreicht werden können ohne, dass eine vorherige Medienadaption der Zellen notwendig ist. Durch die Verwendung von Glycerin als Hauptkohlenstoffquelle besteht zusätzlich die Möglichkeit das bei der Hydrolyse der entsprechenden Pflanzenöle anfallende Glycerin im Projekt für die Produktion der Biokatalysatoren zu verwerten.

Zunächst konnte im 500 mL-Schüttelkolbenmaßstab unter Verwendung des oben genannten Komplexmediums (Abk. „GB“) die Überexpression der Zielproteine nachgewiesen werden. Abbildung 125 zeigt beispielhaft den Verlauf der Expression der Lipase EL012. Die gemessenen Aktivitäten im jeweiligen Rohenzymextrakt nach Aufschluss der Zellen sind in Tabelle 70 angegeben.

¹⁴³ Gerber et al., *Protein Expression Purif.* **2008**, 59, 203-214

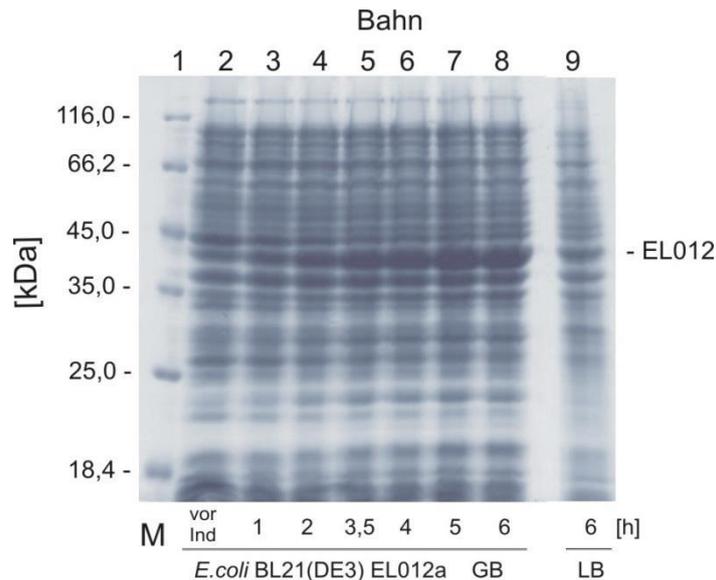


Abbildung 125: Verlauf der Produktion von Lipase EL012 in *E. coli* BL21(DE3) auf Komplex-Medium GB. In definierten Abständen wurden 1/OD-Proben der Schüttelkolbenkultur angelegt. Bahn 1: Marker; Bahn 2 - 8: 1/ OD-Proben *E. coli* BL21(DE3) EL012a nach Induktion mit 1 mM IPTG nach 0 - 6 h; Bahn 9: 6 h nach Induktion unter Verwendung von LB-Medium.

Tabelle 70: Aktivitätsmesswerte der Rohenzymextrakte der Lipase EL012 - EL016; Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) EL01x bei 37 °C auf modifiziertem Komplexmedium: 50 g/L Hefeextrakt; 10 g/L Glycerin; 0,5 g/L NH₄Cl; 8,4 g/L K₂HPO₄; 0,1 g/L MgSO₄ x7H₂O; Induktion mit 1mM IPTG).

	EL012	EL013	EL016
Volumetrische Aktivität Rohextrakt (RE) [U/L _{Medium}]	145800	9000	94200
produzierte Aktivität pro Schüttelkolben [U]	72900	4500	47100

Nach erfolgreicher Produktion der drei Lipasen im Schüttelkolbenmaßstab wurde eine Übertragung des Verfahrens auf den Bioreaktormaßstab durchgeführt, um zum einen den Produktionsmaßstab zu erhöhen und zum anderen den Prozess unter kontrollierten Bedingungen ablaufen zu lassen, was im Schüttelkolben nur begrenzt umsetzbar ist.

Unter Verwendung des oben genannten Komplexmediums wurde zunächst für Lipase EL012 eine Batch-Fermentation im 12 L-Maßstab durchgeführt. Nach einer Prozessdauer von 6,8 h (Induktion 3 h) lag die Biotrockenmassekonzentration (BTM) bei 10 g/L. Die produzierte Gesamtaktivität betrug 4,8 Mio. U.

Darauf aufbauend wurde ein Fed-Batch-Verfahren entwickelt mit anfänglicher Batch-Phase (Startvolumen 12 L) zur Anzucht der Zellen und einer sich anschließenden Phase mit konstanter Zufütterung von Substrat (15 % (w/w) Hefeextrakt und 25 % (v/w) Glycerin). Hierbei wurden nach einer Gesamtkultivierungsdauer von 12 h eine Biotrockenmassekonzentration von 20 g/L erhalten. Während der Produktbildungsphase von 6 h wurde die Lipase EL012 in einer Menge von 22 Mio. U produziert, was einer theoretischen Produktmenge von ~ 5,4 g entspricht.

Anschließend erfolgte für dieses Fed-Batch-Verfahren eine Vergrößerung des Produktionsmaßstabes. Die Verläufe der Biomasse-, Substrat- und Produktkonzentration der Fermentation sind in Abbildung 126 dargestellt. Das Startvolumen betrug 36 L. Nachdem am

Ende der Batch-Phase das Startsubstrat von den Zellen verbraucht wurde, wurde bis zum Prozessende frische Nährlösung mit konstanter Zuflussrate zugefüttert. Nach 12 h konnten ca. 3,4 kg Biofeuchtmasse geerntet werden. Die in diesem Prozess produzierte Gesamtaktivität betrug hochgerechnet 51,5 Mio. U.

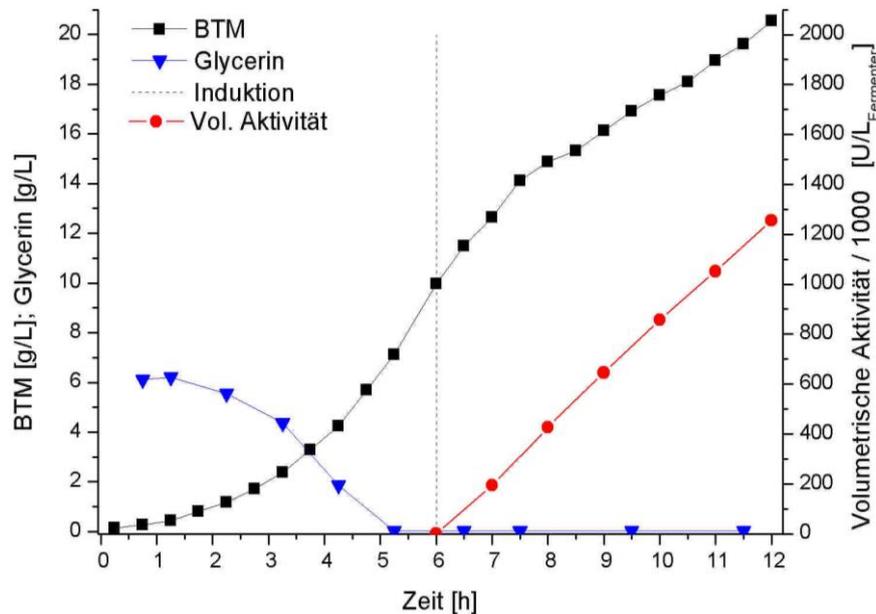


Abbildung 126: Verlauf der Konzentration von Biomasse, Substrat und Produkt während der Fermentation FKW27 (41 L) zur Produktion von Lipase EL012. Die Kultivierung des Stammes E. coli BL21(DE3) EL012a erfolgte im Fed-Batch-Verfahren im Bioreaktor Biostat Dplus 75 bei 37 °C auf Komplexmedium GB.

Zur Produktion der Lipase EL013 wurden vor der Kultivierung der Zellen im Bioreaktor Untersuchungen zur Expressionstemperatur durchgeführt, da in Vorversuchen beobachtet worden war, dass ein großer Teil des Zielproteins innerhalb der Zellen in einer inaktiven, unlöslichen Form gebildet wurde. In einer Reihe von Schüttelkolbenversuche mit unterschiedlichen Temperaturen während der Produktbildungsphase zeigten sich bei 34 °C die besten Ergebnisse hinsichtlich der produzierten Aktivität. Daher wurde auch bei der Produktion im Bioreaktor eine Temperaturabsenkung von 37 °C auf 34 °C zu Beginn der Produktbildungsphase durchgeführt. Die Maßstabsvergrößerung im Bioreaktor wurde analog zu Lipase EL012 durchgeführt.

Ebenso erfolgten die Untersuchungen zur Produktion der Lipase EL016 nach der gleichen Vorgehensweise wie bei Lipase EL012.

In Abbildung 127 sind die Ergebnisse der einzelnen Fermentationen hinsichtlich der jeweils produzierten Aktivität vergleichend dargestellt. Die gemessenen Aktivitätswerte bei Lipase EL013 fallen deutlich geringer aus im Vergleich zu EL012 bzw. EL016. Dies ist auf unterschiedliche Substratspezifitäten der Lipasen gegenüber den in der Substratlösung des Aktivitätstests (Olivenöl-Emulsion) enthaltenen veresterten Fettsäuren zurückzuführen.

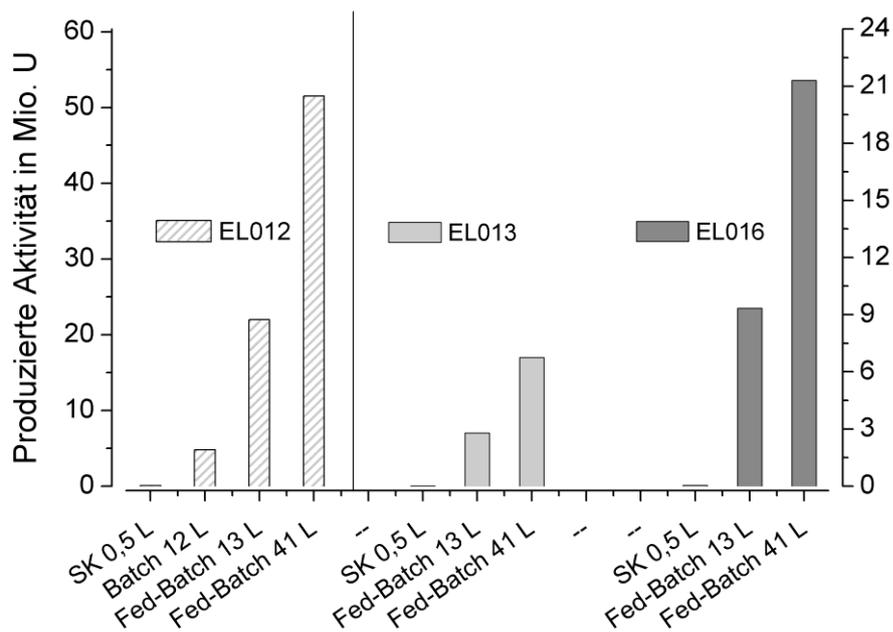


Abbildung 127: Übersicht über die in den verschiedenen Produktionsstufen hergestellte Lipase-Aktivität (Assay: Hydrolyse von Olivenöl).

Nach erfolgter Produktion der Lipasen im Bioreaktor wurde die Reinigung näher untersucht. Die Lipase-Sequenzen wurden während der Entwicklungsphase des Expressionssystems (AP 2.3) auf genetischer Ebene so konstruiert, dass die vom Produktionsstamm gebildeten Enzyme eine zusätzliche Aminosäuresequenz (His₆) enthalten, mit der die Aufreinigung und Abtrennung von Fremdproteinen vereinfacht werden kann. Hierzu wird eine Affinitätschromatographie über Ni²⁺-Chelat-Komplexe (IMAC) genutzt. Im kleinen Maßstab, unter Verwendung der in den Schüttelkolbenversuchen gewonnenen Biofeuchtmasse (2 - 3 g pro Ansatz), konnte die Reinigung der einzelnen Lipasen mittels Säulenchromatographie erfolgreich durchgeführt werden.

Beim Scale-Up der Reinigung, um größere Mengen Lipase aus der in den Fermentationen erzeugten Biofeuchtmasse zu isolieren, wurde jedoch eine verstärkte Präzipitation in den Elutionsfraktionen beobachtet. Nach genauerer Untersuchung des Präzipitats wurde festgestellt, dass es sich bei den unlöslichen Bestandteilen hauptsächlich um aggregierte Lipase handelte. Dieser Zusammenhang konnte ebenfalls über eine Bilanzierung der Lipase-Aktivität bestätigt werden, da der Aktivitätsverlust bei den Reinigungsversuchen bis zu 96 % betrug.

Aus diesem Grund wurde nach einer alternativen Möglichkeit gesucht, die Zielproteine zu reinigen und Fremdproteine zu entfernen, um bei späteren Untersuchungen störende Nebenaktivitäten ausschließen zu können. Hierbei wurde auf das Verfahren der Batch-Adsorption zurückgegriffen, bei der der Lipase-haltige Rohenzymextrakt nach Aufschluss der Zellen außerhalb einer Säule unter Einsatz einer geeigneten Durchmischung mit dem Chromatographiematerial inkubiert wird. Nachdem die Lipase an das Trägermaterial gebunden wurde, erfolgten mehrere Waschschriffe und anschließend die Elution des Zielproteins vom Träger. Es traten zwar in diesem Verfahren ebenfalls Präzipitate auf, jedoch konnte durch diese Behandlung eine zu starke Aufkonzentrierung der Lipase, wie es bei der Säulenchromatographie der Fall war, vermieden werden. Der Gesamtaktivitätsverlust bei

diesem Verfahren belief sich auf ~ 18 %, was eine deutliche Verbesserung gegenüber der vorherigen Methode darstellt. Nach Elutionsschritt 1 konnten ca. 300.000 U vom Trägermaterial desorbiert werden. Die Gesamtausbeute nach 3 Elutionsschritten betrug 73 %. Ein Vergleich der relativen Aktivitäten der einzelnen Fraktionen der Reinigung ist in Abbildung 128 dargestellt.

Entsprechende Ergebnisse wurden auch bei der Reinigung der Lipase EL013 nach Durchführung der Batch-Adsorption erhalten. Nach Aufschluss von ~ 26 g Biofeuchtmasse und Adsorption des Zielproteins an das Trägermaterial konnten ca. 83 % der Aktivität mittels drei Elutionsschritten desorbiert werden.

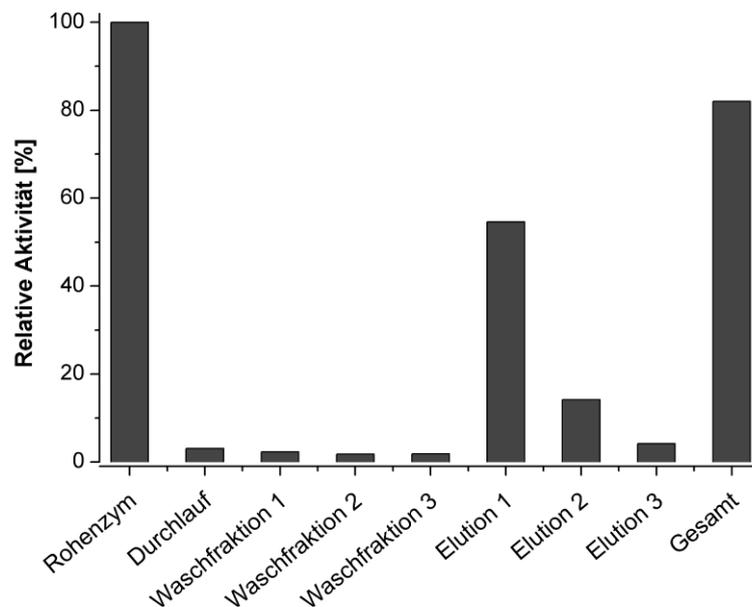


Abbildung 128: Relative Aktivität der Fraktionen während der Reinigung von Lipase EL012 mittels Batch-Adsorption. 50 g Biofeuchtmasse wurden mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen und die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Die Bindung erfolgte an Ni²⁺-Streamline Chelating (GE, Healthcare). Die Elution wurde mit Imidazol durchgeführt. Die im Rohenzymextrakt enthaltene Aktivität wurde als Referenz für die Berechnung der relativen Aktivität herangezogen (100%). Die Gesamtkaktivität in allen Fraktionen betrug 82 %.

3.5.5 Immobilisierungsuntersuchungen der Lipase EL012 im Labormaßstab (Universität Halle-Wittenberg)

Hinsichtlich der Immobilisierung der im Projekt relevanten Biokatalysatoren wurde u.a. der Ansatz verfolgt, die Enzyme zielgerichtet und möglichst unter Erhalt der Aktivität auf geeigneten Trägermaterialien zu fixieren. Eine Möglichkeit zur Durchführung dieser zielgerichteten Immobilisierung besteht in der Nutzung von molekularbiologischen Methoden, um Veränderungen in der Protein-Sequenz vorzunehmen und somit die Kopplung sowie die Ausrichtung des Enzyms auf dem Träger zu beeinflussen.

Innerhalb des Arbeitspaktes wurden zu diesem Zweck für ausgewählte Kopplungsmethoden entsprechende Varianten der Lipase EL012 konstruiert (siehe Tabelle 71). Die Produktion, Reinigung und Immobilisierung wurde, wie nachfolgend beschrieben, in Projektphase 2 durchgeführt.

Tabelle 71: Enzym-Varianten der Lipase EL012 zur Untersuchung der zielgerichteten Immobilisierung.

Nummer	Kopplungsmethode	Mutante
1	Nutzung Aminogruppen	K28R, K84R, K185R, K207R, K229R, K251R, K329R "KXR"
2	Nutzung Glutaminreste	NQ-EL012
3		EL012-CQ
4	Nutzung Cysteinreste	EL012 S2C
5		EL012 S259C
6		EL012 S333C
7		EL012 S2C, S259C, S333C "SXC"

Nach der erfolgreichen Produktion der Lipase EL012 (Wildtyp) im Labormaßstab der Universität Halle-Wittenberg wurde in Absprache der Projektpartner Eucodis, Fraunhofer IGB, Fraunhofer CBP und Universität Halle-Wittenberg der Produktionsprozess in den Technikumsmaßstab am Fraunhofer CBP übertragen. Die Vorversuche zu Zellaufschluss und Isolierung der Lipase fanden nach einem Protokoll von Eucodis in Zusammenarbeit der Universität Halle-Wittenberg und dem Fraunhofer CBP im Labormaßstab statt. Die dabei gewonnenen Daten wurden im Anschluss vom Fraunhofer CBP für die Durchführung einer Fed-Batch-Fermentation im 300 L-Bioreaktor und die darauffolgende Reinigung der Lipase genutzt.

Im Hinblick auf die Immobilisierung der Biokatalysatoren wurden für die Lipase zusätzliche Enzym-Varianten entwickelt. EL012 zeigte in den Voruntersuchungen der Projektpartner unter den ausgewählten Lipasen die besten Resultate. Zur Untersuchung der zielgerichteten Immobilisierung dieser Lipase wurden verschiedene Strategien verfolgt, in denen die Kopplung u.a. über proteinogene Aminogruppen, über Glutaminreste oder auch über Cysteinreste erfolgen sollte. Die hierfür benötigten Lipase-Mutanten wurden in Zusammenarbeit der Universität Halle-Wittenberg und Eucodis erstellt. Für Mutante 1 wurde von Uni Halle eine externe Gensynthese in Auftrag gegeben. Die Plasmide für die Mutanten 2 – 7 wurden von Eucodis zur Verfügung gestellt.

Mit Hilfe dieser Plasmide wurde die Transformation des Produktionsstammes *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Die Kultivierung dieser Stämme erfolgte analog zur Produktion der Wildtyp-Lipasen im 500 mL-Schüttelkolbenmaßstab.

Alle sieben Lipase-Mutanten wurden während der Induktionsphase der Kultivierung deutlich überexprimiert. Abbildung 129 zeigt beispielhaft die Produktion der Lipase EL012-CQ im Vergleich zur Wildtyp-Lipase. Aufgrund einer veränderten Codon Usage der Mutanten 2 - 7 lag nach 6 h Induktion mehr Zielprotein vor als bei der Produktion der Wildtyp-Lipase.

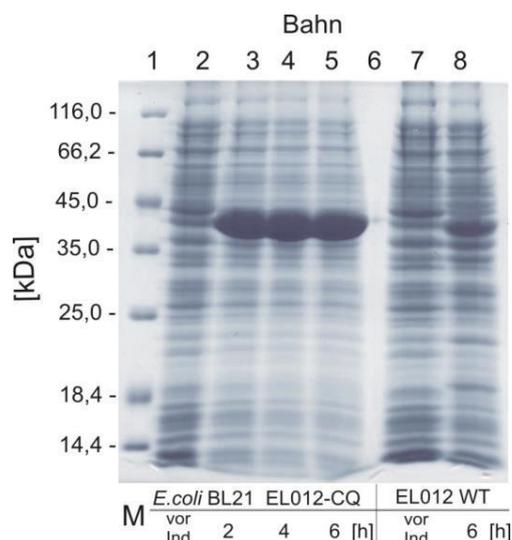


Abbildung 129: SDS-PAGE-Analyse von 1/OD-Proben der Produktion der Lipase-Mutante EL012-CQ. Die Kultivierung erfolgte im 500 mL Schüttelkolbenmaßstab bei 37 °C auf Komplexmedium GB. Bei einer OD_{600nm} von 0,5 wurde mit 1 mM IPTG induziert.

Zur Reinigung der Lipase-Varianten kam das bereits etablierte Batch-Adsorptionsverfahren zum Einsatz. In Tabelle 72 sind die spezifischen Aktivitäten der gereinigten Lipasen aufgeführt. Nach Zellaufschluss zeigte sich bei fast allen Mutanten (außer KXR), dass ein großer Teil des Zielproteins in unlöslicher Form gebildet wurde. Dennoch konnte im Vergleich zur Produktion von EL012 WT mehr aktives Protein in den Zellen angereichert werden, was sich in der biofeuchtmasse-bezogenen Aktivität widerspiegelt. Die Werte der spezifischen Aktivität nach Reinigung der jeweiligen Mutanten lagen im Bereich des Wildtyp-Enzyms.

Tabelle 72: Vergleich der Aktivität verschiedener Lipase-Mutanten (Assay: Hydrolyse von Olivenöl).

Nummer Mutante	Reaktive Gruppen zur Kopplung	Lipase-Bezeichnung	Spezifische Aktivität Rohextrakt [U/mg]	Biofeuchtmasse-bezogene Aktivität [U/g]	Spezifische Aktivität Elution 1 [U/mg]
Wildtyp		EL012 WT	185	12117	2613
1	Aminogruppen	EL012 KXR	170	14492	2739
2	Glutaminreste	NQ-EL012	222	14054	2182
3		EL012-CQ	924	62679	3105
4	Cysteinreste	EL012 S2C	624	41678	3162
5		EL012 S259C	309	16684	2629
6		EL012 S333C	201	13360	3000
7		EL012 SXC	405	25628	2718

Immobilisierung durch Adsorption

Die Trägerfixierung von Enzymen über reine Adsorptionsvorgänge stellt die einfachste Immobilisierungsmethode dar. Der Vorteil besteht darin, dass für die Kopplung prinzipiell keine Veränderungen an Enzym und Träger notwendig sind. Da jedoch keine kovalenten Bindungen ausgebildet werden, ist man mit dem Einsatz des Immobilisats auf organische Lösungsmittel beschränkt. Im wässrigen Milieu ist in der Regel mit einer unerwünschten Ablösung des Enzyms vom Träger zu rechnen.

Das in der Literatur häufig beschriebene Lipase-Präparat Novo435 wird durch Proteinadsorption auf das Ionenaustauschermaterial Lewatit VP OC 1600 der Firma LanXess gewonnen. Dieses kommerziell erhältliche Präparat dient auch in einigen projekt-relevanten Reaktionen als Referenz-Katalysator.

Daher wurde versucht, die Lipase EL012 mittels Adsorption auf das erwähnte Trägermaterial zu immobilisieren. In 2 parallelen Ansätzen wurde EL012 in An- und Abwesenheit des Detergenz Triton X-100 als Stabilisator auf den Träger adsorbiert. Nach erfolgter Kopplung wurden die Immobilisate getrocknet und bei 4 °C gelagert.

Das *p*-Nitrophenylpalmitat-Assay konnte für die Aktivitätsbestimmung nicht eingesetzt werden, da es im wässrigen System zu einer Desorption des Enzyms kam.

Kopplung über Glutamin-Tags durch Einsatz einer mikrobiellen Transglutaminase

Die mikrobielle Transglutaminase (MTG) katalysiert die Quervernetzung von proteingebundenen Glutamin-Resten (Q) und primären Aminen. Dadurch ist es möglich, Proteine über MTG-zugängliche Q-Reste auf entsprechende Aminogruppen-haltige Trägermaterialien kovalent zu fixieren. In verschiedenen Vorversuchen der Uni Halle konnte gezeigt werden, dass die Lipase EL012 WT in ihrer nativen Form nicht von der MTG als Substrat erkannt wird. Im Gegensatz dazu konnte eine Reaktivität zwischen der MTG und den mit Q-Tag versehenen Mutanten NQ-EL012 (N-terminaler Tag) und EL012-CQ (C-terminaler Tag) nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Kopplung der Enzym-Varianten wurde das kommerzielle Trägermaterial EAH-Sepharose (GE Healthcare) eingesetzt. Das Ergebnis der Immobilisierungsversuche ist in Abbildung 130 dargestellt. Im Fall der Wildtyp-Lipase EL012 ohne Q-Tag konnte nur eine relativ geringe Aktivität von 0,02 U/g auf dem Träger gemessen werden. Die Kopplung der beiden Q-Tag-Varianten führte dagegen mit 0,93 und 1,65 U/g zu deutlich höheren Aktivitäten. Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Fusion von Lipase und Q-Tag unter Verwendung von MTG eine zielgerichtete kovalente Immobilisierung möglich ist. Ohne Zusatz von MTG (Adsorptionsversuch) während der Inkubation der Lipasen mit Trägermaterial erfolgte eine vergleichsweise geringe Bindung von Lipase. Weiterhin ist ersichtlich, dass die Position des Q-Tags in der Lipase-Sequenz scheinbar einen Einfluss auf die Aktivität des Immobilisats hat. Hier scheint sich die C-terminale Position des Tags vorteilhaft auszuwirken.

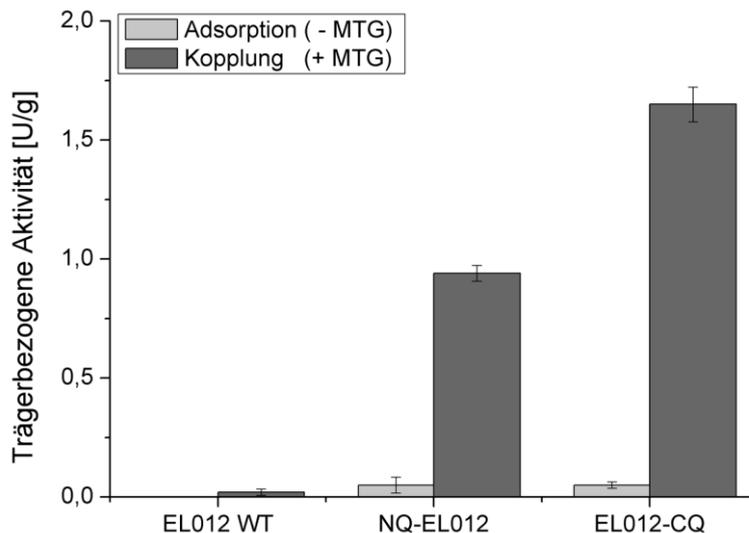


Abbildung 130: Vergleich der trägerbezogenen Aktivität (Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat) verschiedener Varianten der Lipase EL012 WT nach Kopplung an EAH-Sepharose unter Verwendung von MTG.

Zur Verringerung der unspezifischen Adsorption der Lipase wurde die Kopplung von EL012-CQ zusätzlich in Anwesenheit von 0,5 % (w/v) Triton X-100 und 500 mM NaCl durchgeführt, wodurch gleichzeitig die trägerbezogene Aktivität auf 2,34 U/g gesteigert werden konnte.

Weiterhin konnte durch die Variation der Trägerbeladung (Erhöhung Enzymmenge bei konstanter Trägermenge) die messbare Aktivität auf dem Träger auf bis zu 6 U/g gesteigert werden. Der Anteil der auf dem Träger wiedergefundenen Aktivität, bezogen auf die initial eingesetzte Aktivität, lag bei allen Kopplungsansätzen im Bereich von 15 bis 19 %. Diese relativ geringe Wiederfindung kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden.

Zum einen können innerhalb des porösen Materials aufgrund auftretender Diffusionslimitierungen nicht alle Lipase-Moleküle gleichermaßen mit Substrat in Kontakt kommen. Zum anderen wurde beobachtet, dass die jeweils zur Kopplung eingesetzte Lipase-Aktivität nie vollständig an den Träger gebunden werden konnte. Der nicht koppelbare Anteil lag in der Regel bei ca. 33 %. Eine unzureichende Trägerkapazität oder eine Inaktivierung der MTG während der Kopplungsreaktionen konnten als Ursachen dafür ausgeschlossen werden. Vielmehr konnte mittels tryptischem Verdau und anschließender massenspektrometrischer Analyse nachgewiesen werden, dass die eingesetzte MTG zusätzlich zur Kopplung eine Nebenreaktion katalysierte, bei der die Glutamin-Seitenkette im Q-Tag zu Glutamat umgewandelt wurde. Eine anschließende Kopplung dieser modifizierten Lipase-Moleküle war somit nicht mehr möglich.

Zur Untersuchung der Wiederverwendbarkeit der mittels MTG immobilisierten Lipase EL012-CQ wurde das Immobilisat wiederholt zur Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) eingesetzt und jeweils zwischen den Zyklen die entsprechenden Reaktionsprodukten über verschiedene Waschschrte entfernt. Das Ergebnis ist in Abbildung 131 dargestellt. Nach 6 Reaktionszyklen verringerte sich die Aktivität auf dem Träger auf 72 %. Vermutlich wurde in den ersten Durchgängen der verbliebene, nicht kovalent gebundene Teil der Lipase ausgewaschen. Ein weiterer Aktivitätsverlust konnte in den darauffolgenden Zyklen nicht beobachtet werden. Die Stabilität des Immobilisats ist demnach unter den getesteten Bedingungen gegeben.

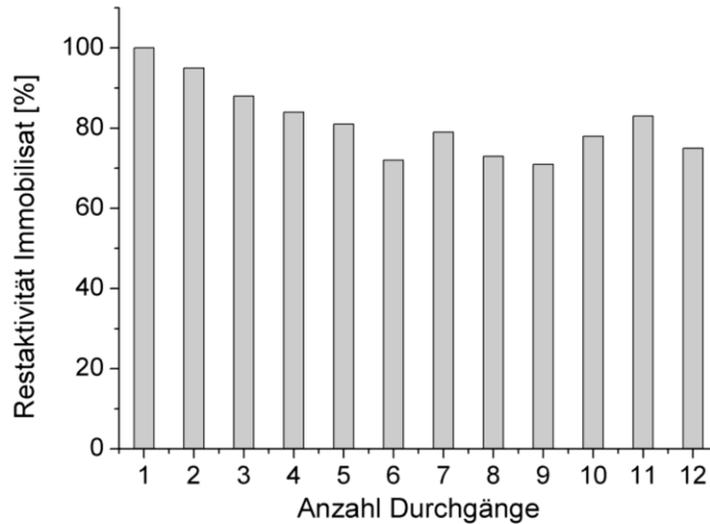


Abbildung 131: Restaktivität der auf EAH-Sepharose immobilisierten Lipase EL012-CQ bei wiederholtem Einsatz zur Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat.

Nutzung proteinogener Thiolgruppen zur kovalenten Kopplung

In einem weiteren Ansatz zur zielgerichteten Immobilisierung wurde die Möglichkeit untersucht, Lipase EL012 über zusätzlich eingeführte Thiolgruppen kovalent zu fixieren.

Da in vorangegangenen Versuchen zur Immobilisierung der Lipase an poröse Trägermaterialien die Wiederfindung der gekoppelten Aktivität teils erheblich durch Diffusionsvorgänge beeinflusst wurde, sollte zur Untersuchung der Kopplung der Cys-Varianten ein alternativer Ansatz verfolgt werden. Als Modelträger kamen in diesem Fall funktionalisierte Glasobjektträger (Größe 76 x 26 mm) zum Einsatz. Bedingt durch die vergleichsweise geringe spezifische Oberfläche der Objektträger sollte damit der Einfluss einer möglichen Diffusionslimitierung während des Lipase-Aktivitätstest verringert werden.

Die Objektträger wurden über eine Beschichtung mit Polyethylenglykol und Maleinimid funktionalisiert (PEG/MAL; MicroSurfaces, Inc.), wobei die Maleinimid-Gruppe bei neutralem pH-Wert spezifisch mit freien Thiolgruppen reagiert.

Die Kopplung wurde für die drei Lipase-Varianten mit jeweils einer einzelnen Substitution von Ser zu Cys (S2C, S259C und S333C) sowie einer Mutante mit der Kombination der drei Einzelmutationen (SXC) untersucht. In Abbildung 132 ist das Ergebnis der Kopplungsversuche der verschiedenen Cys-Varianten vergleichend dargestellt. Die Lipase-Varianten mit zusätzlich eingeführten Thiolgruppen zeigten jeweils eine höhere Aktivität auf dem Träger als das Wildtyp-Enzym EL012.

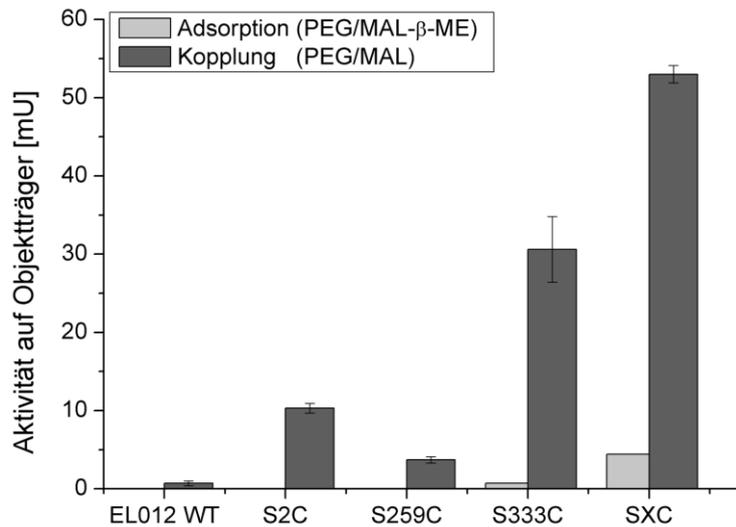


Abbildung 132: Vergleich der gekoppelten Aktivität verschiedener Lipase-Varianten nach Inkubation mit PEG/MAL-beschichteten Glasobjektträger bzw. mit PEG/MAL-Trägern, die mit β -Mercaptoethanol (β -ME) geblockt wurden.

Die Aktivitätsunterschiede der 3 Einzelmutanten S2C, S259C und S333C lassen sich vermutlich auf Unterschiede in der Zugänglichkeit der jeweiligen Thiolgruppen auf der Proteinoberfläche zurückführen. Die Kombination der Mutationen (SXC) wirkt sich unter den getesteten Bedingungen positiv auf die koppelbare Aktivität aus.

Die Bilanzierung der einzelnen Lipase-Kopplungsreaktionen ist mit dem verwendeten System nur begrenzt möglich. Aufgrund der geringen Oberfläche der Objektträger kann nur eine relativ geringe Menge Lipase gebunden werden, so dass in den meisten Fällen im Verlauf der Inkubation von Enzym und Träger keine signifikante Aktivitätsabnahme im Überstand messbar war. Einzig für Mutante SXC konnte mit 28 % (84 mU) eine deutliche Verringerung der Aktivität in der Lösung festgestellt werden. 63 % dieser Aktivität konnten im Anschluss auf dem Träger wiedergefunden werden.

In entsprechenden Kontrollansätzen mit Objektträgern, die vor Enzymzugabe mit β -Mercaptoethanol geblockt wurden, konnte gezeigt werden, dass eine unspezifische Adsorption der Lipasen nicht oder nur in sehr geringem Umfang erfolgt.

Im Anschluss an die Kopplung wurden die immobilisierten Cys-Varianten auf Stabilität hinsichtlich Wiederverwendbarkeit im *p*NPP-Assay untersucht. Nach 6 Reaktionszyklen wurden folgende Restaktivitäten gemessen: S2C \rightarrow 70 %; S259C \rightarrow 73 %; S333C \rightarrow 82 % und SXC \rightarrow 88 %. Die 3-fach-Mutante SXC weist somit im getesteten System eine geringfügig höhere Stabilität auf, die eventuell auf eine Mehrfachbindung der Enzymmoleküle mit dem Trägermaterial zurückgeführt werden könnte.

Durch Verwendung der funktionalisierten PEG/MAL- Objektträger konnten die verschiedenen Cys-Varianten auf eine Eignung zur Kopplung sowie auf eine mögliche Wiederverwendbarkeit gescreent werden. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Mutanten S333C und SXC potentielle Kandidaten für weitere Untersuchungen zur Immobilisierung darstellen.

Nutzung proteinogener Aminogruppen zur kovalenten Kopplung

Kopplung mittels Carbodiimid (EDC)

Das Prinzip bei der Immobilisierung über Carbodiimide beruht auf der Bildung von Amidbindungen zwischen Carboxyl- und Aminogruppen auf der entsprechenden Träger- bzw. Proteinoberfläche. Als Kopplungsreagenz wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) gewählt.

Hierzu wurden Untersuchungen zu einem geeigneten Trägermaterial, zur Trägerbeladung und zum Einfluss von Zusätzen während der Kopplung der Lipase EL012 WT durchgeführt. Außerdem wurden verschiedene Kombinationen zur Aktivierung des Trägers vor Enzymzugabe bzw. zur Enzymadsorption mit anschließender Quervernetzung untersucht.

Die besten Resultate hierzu wurden bei Verwendung des Ionenaustauschermaterials Lewatit CNP 105 erhalten, indem das Enzym in Gegenwart von Triton X-100 zunächst an den Träger adsorbierte und nach anschließender EDC-Zugabe kovalent gebunden wurde.

Die Lipase-Aktivität auf dem Träger betrug 1 U/g. Die Immobilisierungsausbeute war mit ~ 2 % relativ niedrig, da der Anteil an nicht kovalent gebundenem Enzym auf dem Träger vergleichsweise hoch war und durch verschiedene Waschschrte vom Träger entfernt wurde.

Kopplung über Oxiran-Gruppen

Das Prinzip beruht auf der Adsorption des Proteins auf einen Träger mit Oxiran-Gruppen (Sepabeads EC-EP/S) bei hoher Ionenstärke mit anschließender kovalenter Bindung des Proteins. Die Immobilisierung der Lipasen EL012 WT und EL012 KXR wurde in 1 M Phosphat-Puffer pH 7 über 24 h durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 73 dargestellt. Es zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich Aktivität und Ausbeute. Für beide Enzyme wurde in Kontrollansätzen ohne Trägermaterial ein erheblicher Aktivitätsverlust erhalten. Die geringere Stabilität der Mutante im Immobilisierungspuffer kann als mögliche Ursache für die geringe Aktivität auf dem Träger in Betracht gezogen werden.

Tabelle 73: Immobilisierung der Lipasen EL012 WT und KXR auf Sepabeads EC-EP/S (Assay: Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat).

Ansatz	Träger-bezogene Aktivität [U/g]	Immobilisierungsausbeute [%]	Restaktivität nach 2 h (ohne Träger) [%]
EL012 WT	1,21	22,8	49
EL012 KXR	0,04	0,4	11

Kopplung mittels Glutaraldehyd

Weiterhin wurde die Möglichkeit untersucht, das Reagenz Glutaraldehyd (GA) zur kovalenten Kopplung der Lipasen an entsprechende aminogruppen-haltige Trägermaterialien einzusetzen. Diesbezüglich wurde das Immobilisierungsverhalten der Lipasen EL012 WT und EL012 KXR für verschiedene Trägerbeladungen sowie pH-Werte bei der Kopplung untersucht. Außerdem kamen Materialien mit unterschiedlicher Oberflächenhydrophobizität zum Einsatz. Abhängig von den jeweiligen Bedingungen wurden trägerbezogene-Aktivitäten bis zu 0,44 U/g mit einer entsprechenden Ausbeute von ~ 5 % erhalten. Als Ursachen für die geringen Ausbeuten wurden in Abhängigkeit des Trägers verschiedene Effekte identifiziert. Zum einen traten Zugänglichkeitsprobleme des Substrates in die Poren des Trägers auf und zum anderen führte bereits die Interaktion des Enzyms mit nicht-aktiviertem Träger zu einem erheblichen Aktivitätsverlust. Die für die zielgerichtete Immobilisierung designte Lipase-Variante EL012 KXR zeigte unter den getesteten Bedingungen verglichen mit EL012 WT keine Vorteile hinsichtlich Aktivität oder Stabilität.

In parallelen Versuchen zur Inkubation der löslichen Lipase EL012 WT mit Triton X-100-haltigem Bicarbonat-Puffer bei pH 10 und Glutaraldehyd (ohne Träger) konnte beobachtet werden, dass unter diesen Bedingungen eine deutliche Steigerung der volumetrischen Aktivität der Lipase eintritt (siehe Abbildung 133). Vermutlich führte die Anwesenheit des Detergenz Triton X-100 zu einer aktiveren Konformation der Lipase (Öffnung der „Deckelregion“ über dem aktiven Zentrum), die durch die Reaktion mit Glutaraldehyd stabilisiert wurde. Dieser Effekt wurde im Anschluss genauer untersucht.

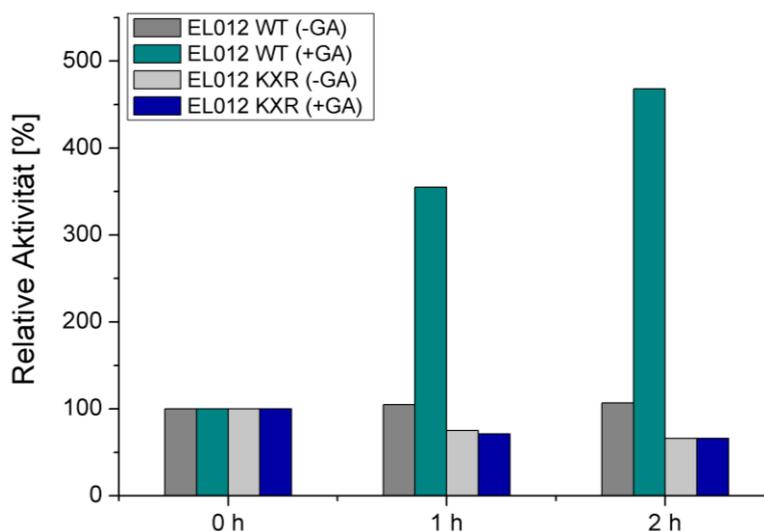


Abbildung 133: Verlauf der relativen Aktivität der Lipasen EL012 WT und EL012 KXR gegenüber *p*-Nitrophenylpalmitat während der Inkubation bei 25 °C in An- und Abwesenheit von 270 µM Glutaraldehyd.

Zunächst wurde festgestellt, dass ohne den Zusatz des Detergenz Triton X-100 keine Aktivierung stattfindet. Demnach ist dieser Effekt von der Anwesenheit von Grenzflächen im Ansatz abhängig. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Aktivierung bei der Mutante KXR nicht auftritt (siehe Abbildung 133). Daraus kann geschlossen werden, dass die Modifikation der Lipase EL012 WT durch GA an einer bzw. mehrerer der entsprechenden Mutationspositionen stattfinden muss.

Unter Verwendung von Lipase EL013, die nicht die lipase-typische „Deckelregion“ oberhalb des aktiven Zentrums besitzt, wurde ebenso keine Aktivierung beobachtet. Dies stellt ein weiteres Indiz für die Hypothese dar, dass GA während der Aktivierung von Lipase EL012 deren Deckelregion in einer offenen Konformation fixieren würde.

Zusätzlich wurde der Einfluss der verschiedenen Pufferkomponenten (Konzentration von Triton X-100, NaCl, GA und pH-Wert) auf die Lipase-Aktivierung untersucht. Die größten Auswirkungen zeigten sich bei der Variation der GA-Konzentration. Unter Zusatz von 0,68 mM GA konnte eine Erhöhung der Ausgangsaktivität innerhalb von 2 h auf das 8-fache gemessen werden.

Eine Übertragung des Aktivierungseffekts auf andere Lipase-Reaktionen, wie z.B. die Hydrolyse von Triacylglyceriden (Tributyryn, Olivenöl), war nicht erfolgreich. Die Umsetzung dieser Ester konnte im Vergleich zum Standardsubstrat *p*NPP durch eine GA-Modifikation nicht beschleunigt werden. Eventuell ist die durch Triton X-100 und GA hervorgerufene Konformationsänderung im Lipase-Molekül für diese Substratklasse (Molekülgröße) nicht ausreichend.

Es wurde außerdem die Kombination aus Lipase-Aktivierung und anschließender Immobilisierung über den His-Tag der Lipase untersucht (siehe Abschnitt E).

Kopplung über His₆-Tag

Eine weitere Möglichkeit zur zielgerichteten Immobilisierung besteht in der Nutzung des His₆-Tags der Lipase EL012, der bisher zur Reinigung des Enzyms verwendet wurde (siehe AP 2.2). Hierzu wurde das gereinigte Enzym-Präparat EL012 WT in Gegenwart von Triton X-100 und NaCl an das Trägermaterial Streamline Chelating (GE Healthcare) über die Ausbildung von Ni²⁺-Chelat-Komplexen gebunden. Je nach eingesetztem Enzym-zu-Trägerverhältnis konnten Aktivitäten auf dem Träger zwischen 0,4 und 3,2 U/g gemessen werden. Die Wiederfindung der Aktivität lag zwischen 8 und 60 %.

Parallel dazu wurde die Möglichkeit untersucht die in Abschnitt D) beschriebene Aktivierung der Lipase durch Glutaraldehyd mit einer Immobilisierung zu kombinieren. Nach Durchführung der Behandlung mit Glutaraldehyd war es möglich, die modifizierte Lipase über den His₆-Tag an das Trägermaterial Streamline Chelating zu binden. Durch Variation der Trägerbeladung konnte eine maximale Aktivität von 3,8 U/g ermittelt werden. Verglichen mit der unbehandelten Lipase konnte so durch die GA-Modifikation je nach eingesetzter Beladung eine bis zu 2,5-fache Steigerung der Aktivität auf dem Träger erreicht werden. Bei gleicher Beladung des Trägers kann demnach die modifizierte Lipase EL012 WT das eingesetzte Substrat *p*NPP besser umsetzen.

Abschließend wurde für die Wiederverwendbarkeit des Immobilisats mit GA-modifizierter Lipase untersucht. In Abbildung 134 ist zu sehen, dass ein wiederholter Einsatz des Immobilisats im Test möglich ist. Die Restaktivität nach 10 Zyklen lag bei 96 %.

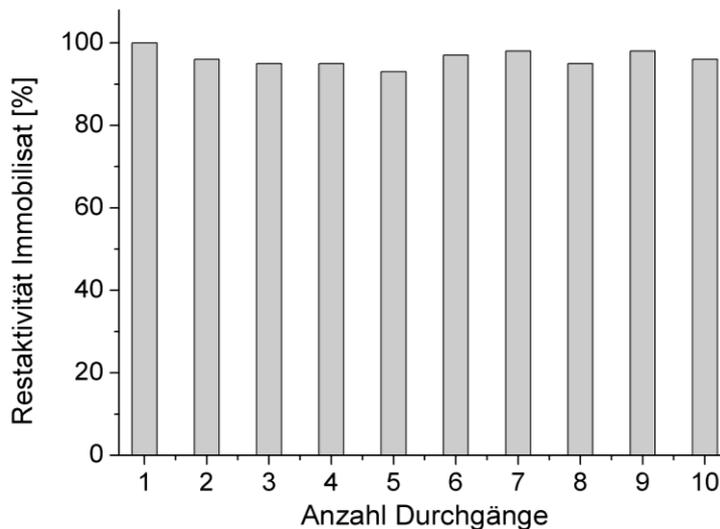


Abbildung 134: Restaktivität der auf Ni²⁺-Streamline Chelating immobilisierten, Glutaraldehyd-behandelten Lipase EL012 WT bei wiederholtem Einsatz zur Hydrolyse von p-Nitrophenylpalmitat.

3.5.6 Fermentative Herstellung der Lipase EL012 (Fraunhofer CBP)

Zu Beginn des Projektes wurden heterologe Expressionsstämme (*E.coli*) zur Produktion relevanter Biokatalysatoren (Lipasen) durch Eucodis Bioscience entwickelt und für weiterführende Umsetzungsreaktionen innerhalb des Projekts geeignete Lipasen ausgewählt (EL012, EL013 und EL016). Die fermentative Herstellung dieser Enzyme wurde an der Universität Halle bis zu einem Maßstab von 50 L durchgeführt, wobei die Fermentation der Lipase EL012 zur höchsten fermentativen Ausbeute (volumetrische Aktivität) führte und eine erste Optimierung der Enzymreinigung stattfand. Im weiteren Projektverlauf kristallisierte sich bei Screening-Versuchen bei Eucodis eine neue erfolgsversprechende Lipase (EL070) heraus, welche gute Ergebnisse bei Ver- und Umesterungsversuchen lieferte. Zur Bereitstellung größerer Enzymmengen erfolgte in enger Zusammenarbeit mit beiden Partnern eine Skalierung der Fermentationsprozesse für die zwei ausgewählten Lipasen am Fraunhofer CBP. Dafür standen Fermenter verschiedener Größen (beispielhaft in Abbildung 135 dargestellt) sowie unterschiedliche Anlagen für die Produktaufarbeitung zur Verfügung.

Zunächst erfolgte die Übertragung des etablierten Fermentationsprozesses zur Herstellung der Lipase EL012 von der Universität Halle zum Fraunhofer CBP im 10 L-Maßstab. Fermentationsparameter, wie Temperatur, pH-Wert, Kopfraumdruck im Behälter sowie pO₂-Regelung über die Rührerdrehzahl wurden dabei konstant gehalten. Die Prozesse wurden anhand des Verbrauchs der C-Quelle (Glycerin) und des Anstiegs der Biotrockenmasse gegenübergestellt. Ein Vergleich der Produktivität (Enzymaktivität) war leider nicht möglich, da zum Einen bei der Universität Halle die Aktivitätsbestimmung nur am Ende der Fermentation stattfand und zum Anderen aufgrund der verfügbaren Geräte unterschiedliche Methoden zur Messung der Aktivität verwendet wurden.



Abbildung 135: 10 L-Fermenter (links) und 300 L-Fermenter (rechts) der Fa. Frings am Fraunhofer CBP.

In Abbildung 136 sind die Fermentationsverläufe von Fraunhofer CBP (10 L-Maßstab) und der Universität Halle (50 L-Maßstab) anhand der Biomassebildung (grün) und Substrataufnahme (rot) dargestellt.

Alle drei Fermentationen zeigen tendenziell gleiche Verläufe in Substratverbrauch und Biomassebildung. Es wurde nach 11 h Fermentationsdauer eine Biotrockenmasse von etwa 20 g/L erreicht. Ein Unterschied besteht in der Wachstumsphase (Batch 0-5 h). Der Expressionsstamm in den Fermentationen am Fraunhofer CBP wächst etwas schneller (spezifische Wachstumsrate $\mu = 1/h$) als in der Fermentation an der Universität Halle ($\mu = 0,7/h$), was in dem schnelleren Anstieg der Biomassekonzentration erkennbar ist. Grund hierfür ist eine optimierte Überimpfstrategie bei den Vorkulturen am Fraunhofer CBP, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Mikroorganismen jeweils in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Nach Verbrauch des Glycerins (5-6 h Batchdauer) wurde mit IPTG induziert und gleichzeitig der Fed-Batch (Glycerin-Feed) gestartet. Danach verliefen sowohl die Biomasse- als auch die Glycerinkonzentration identisch. Zur Bestimmung der Enzymaktivität während der Fermentation wurden im Vorfeld am Fraunhofer CBP Methoden zum Zellaufschluss sowie zur Protein- und Aktivitätsbestimmung im kleinen Maßstab etabliert. Wie in Abbildung 136 erkennbar und in zuvor durchgeführten Schüttelkolbenversuchen (nicht dargestellt), verläuft die Produktivität für etwa 4-5 h nach der Induktion linear und beginnt danach zu stagnieren.

Da die Drehzahl über eine Kaskadenregelung in Abhängigkeit vom gelösten Sauerstoff (pO_2) reguliert wurde und eine ständige Versorgung der Mikroorganismen mit Sauerstoff der wichtigste Faktor darstellte, wurde als Scale-Up-Parameter ein konstanter pO_2 -Wert verwendet.

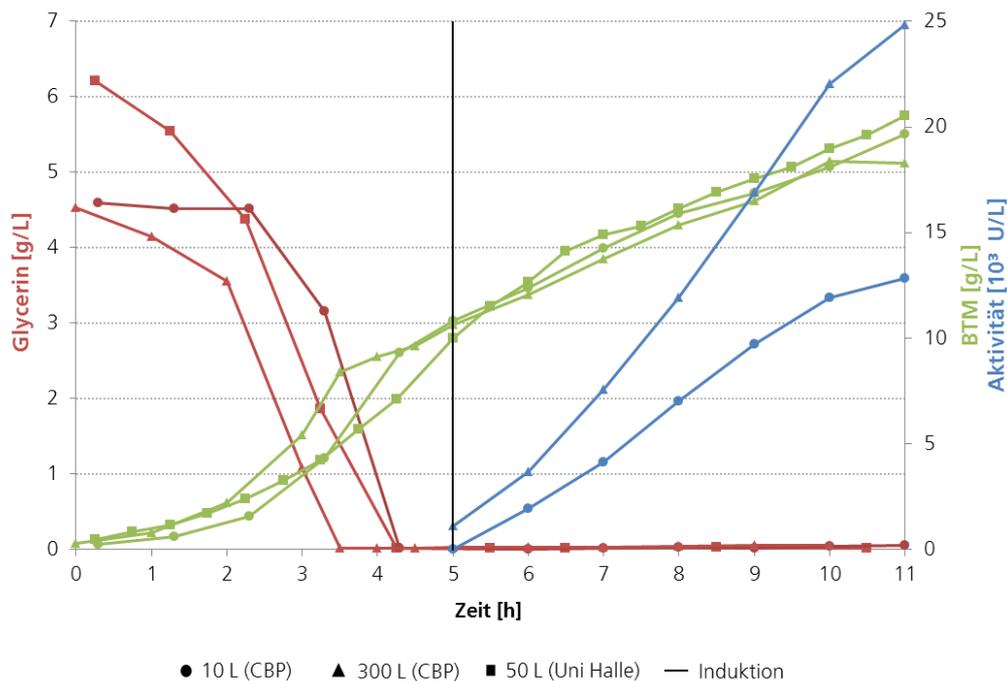


Abbildung 136: Vergleich der Reproduzierbarkeit der EL012-Produktion am Fraunhofer CBP (10 L = Kreis, 300 L = Dreieck) und an der Universität Halle (50 L = Quadrat) anhand der Verläufe der Biomasse (grün), des Substrats Glycerin (rot) und der Lipaseaktivität (blau) bei gleichen Fermentationsbedingungen. Die vertikale Linie kennzeichnet den Zeitpunkt der Induktion.

In Abbildung 137 ist der Verlauf der Lipaseproduktion bezogen auf den Proteingehalt der Zellen während der 300 L-Fermentation dargestellt. Dass die Kurve nicht bei null beginnt, lässt sich damit erklären, dass die Induktion etwa 20 min gedauert hat. Somit begann die Enzyymbildung bevor die erste Probe genommen werden konnte. Dies bestätigen die Daten aus der 10 L-Fermentation. Im kleineren Maßstab nimmt die Induktion nur einige Sekunden in Anspruch, wodurch der Startwert bei null liegt (siehe Abbildung 137). Weiterhin ist zu sehen, dass die spezifische Lipaseaktivität nach 6 h gegen 5,5 U/mg Protein konvergiert. Auch dies wurde im 10 L-Maßstab beobachtet. Somit sollte die Fermentationsdauer nach der Induktion nicht verlängert werden. Zwar könnte die Gesamtausbeute noch etwas erhöht werden, jedoch steigt damit auch die Wahrscheinlichkeit von Verunreinigungen. Die vermehrte Bildung von anderen Zellproteinen führt zu einem erschwerten Downstream Processing mit möglicherweise höherem Produktverlust oder einem Produkt mit geringerer Reinheit.

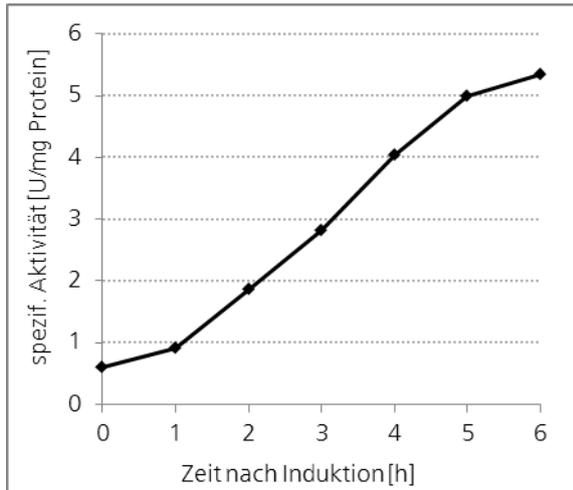


Abbildung 137: Anstieg der spezifischen Lipaseaktivität in den Zellen während der 300 L Fermentation. Es ist der zeitliche Verlauf nach Induktion mit 1 mM IPTG dargestellt.

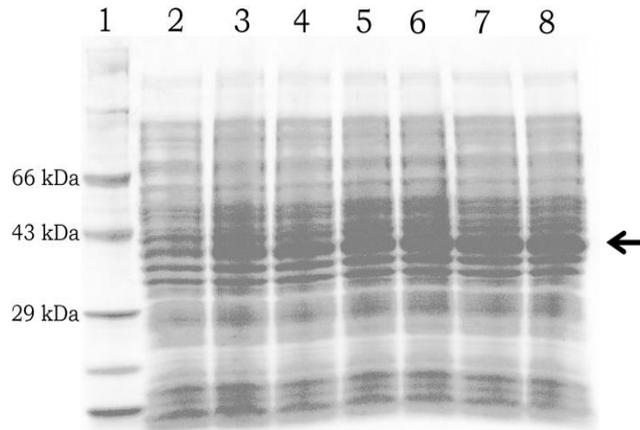


Abbildung 138: SDS-PAGE zur Kontrolle der Lipaseproduktion während der 300 L Fermentation. Zeitpunkte nach der Induktion mit 1 mM IPTG. 1: Marker, 2: nach 0 h, 3: nach 1 h, 4: nach 2 h, 5: nach 3 h, 6: nach 4 h, 7: nach 5 h, 8: nach 6 h. Der Pfeil deutet auf die Laufhöhe der Lipase.

In Abbildung 138 ist eine SDS-PAGE der 300 L-Fermentation über den Zeitraum nach der Induktion zu sehen. Es ist sehr gut zu erkennen, dass die Konzentration der Lipase mit jeder Stunde der Fermentation steigt und andere Proteine in ihrer Menge unverändert bleiben. Diese Abbildung ist repräsentativ auch für die 10 L-Fermentation. Jedoch ist die Produktivität im 300 L-Maßstab (231,51 U/g_{BTM}/h) etwa 60 % höher als bei der 10 L-Fermentation (143,38 U/g_{BTM}/h). Dies kann auf eine nicht optimale Temperaturregelung bei der Fermentation im 10 L-Maßstab zurückgeführt werden. Aufgrund langer Ansprechzeiten der Regler sank die Temperatur kurzzeitig bis auf 32 °C ab, wodurch die Wachstums- und Produktionsbedingungen nicht mehr optimal waren. Weiterhin wurden die Vorkulturen für den 10 L-Fermenter in Schüttelkolben durchgeführt, wohingegen für den 300 L-Fermenter der 10 L-Reaktor als Inokulum eingesetzt wurde. Somit waren die Mikroorganismen bereits in der Vorkultur optimalen Wachstumsbedingungen ausgesetzt, d.h. optimale Durchmischung, geregelter pH-Wert und keine Sauerstofflimitation, was zu einem schnelleren Wachstum und einer besser Enzymproduktion führte.

3.5.6.1 Modellierung der Fermentation der Lipase EL012

Im Rahmen des Projektes fand die mathematische Beschreibung der Fermentationsverläufe im 10 L- und 300 L-Maßstab statt. Dazu wurde ein einfaches Modell auf Basis der Monod-Kinetik und festen Ausbeutekoeffizienten sowie einer konstanten, biomassebezogenen Produktbildung verwendet (siehe Tabelle 74). Die Lösung des gewöhnlichen Differentialgleichungssystems sowie die Schätzung der Parameter erfolgten mit Matlab.

Tabelle 74: Berechnungsgrundlagen zur mathematischen Beschreibung des Fermentationsverlaufes.

Bezeichnung	Formel
Änderung der Biomassekonzentration:	$\frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_x - \frac{F}{V} \cdot c_x$
Änderung der Substratkonzentration:	$\frac{dc_s}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot c_x + \frac{F}{V} \cdot (c_F - c_s)$
Produktbildung:	$\frac{dc_p}{dt} = q_p \cdot c_x - \frac{F}{V} \cdot c_p$
Ausbeutekoeffizient	$Y_{X/S} = \begin{cases} Y_{X/S} & \text{vor Induktion} \\ Y_{X/S,I} & \text{nach Induktion} \end{cases}$
Biomassebezogene Produktbildung	$q_p = \begin{cases} 0 & \text{vor Induktion} \\ q_p & \text{nach Induktion} \end{cases}$

Wie Abbildung 139 und Abbildung 140 zeigen, konnten beide Fermentationen mit dem gewählten Modell generell gut nachgebildet werden. Somit ist diese Art von Modell grundsätzlich zur Beschreibung der Lipaseproduktion geeignet.

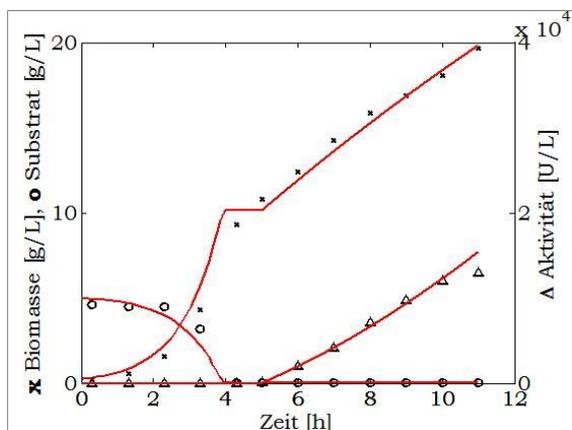


Abbildung 139: Modellierung der 10 L-Fermentation. Die Datenpunkte (Kreuz, Kreis, Dreieck) entsprechen den realen Werten, die roten Linien beschreiben den simulierten Verlauf der Fermentation.

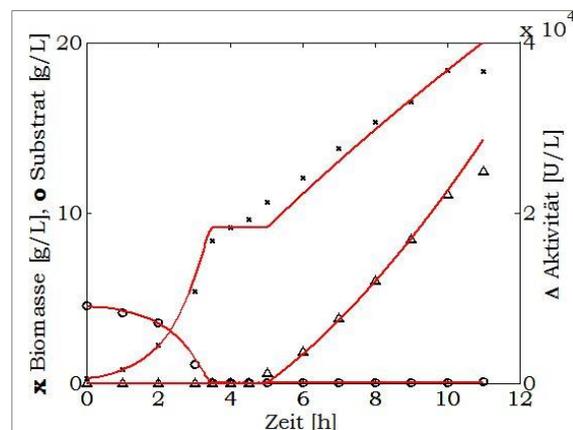


Abbildung 140: Modellierung der 300 L-Fermentation. Die Datenpunkte (Kreuz, Kreis, Dreieck) entsprechen den realen Werten, die roten Linien beschreiben den simulierten Verlauf der Fermentation.

Vergleicht man die angepassten Modellparameter der beiden Fermentationsläufe (siehe Tabelle 75), so zeigen die maximale Wachstumsrate (μ_{max}), die Monodkonstante (K_S) und der Ausbeutekoeffizient Biomasse aus Substrat ($Y_{X/S}$) vergleichbare Werte. Diese spielen hauptsächlich in der Batchphase eine Rolle, welche durch das Modell reproduzierbar abgebildet wird.

Tabelle 75: Modellparameter.

Parameter	Werte	
Fermenter	10 L	300 L
μ_{\max} [1/h]	0,97	1,10
$Y_{x/s}$ [g BM/g S]	0,55	0,51
K_S [g/L]	0,11	0,17
$Y_{x/s,l}$ [g BM/g S]	3,29	2,85
q_p [U/g/h]	163	339

Erst nach einsetzender Glycerinlimitation traten Probleme in der Modellierung auf. So unterscheiden sich die Biomasse-Substrat-Ausbeute nach der Induktion ($Y_{x/s,l}$) sowie die Produktbildungsrate (q_p) sehr stark zwischen den beiden Fermentationen. Ursache dessen könnte in der bereits beschriebenen Temperaturabweichung während der Regelung der 10 L-Fermentation liegen. Eines der größten Probleme für ein aussagekräftiges Modell stellt die Gegenwart von komplexen Medienbestandteilen dar. Dies zeigt sich gut bei der 300 L-Fermentation (siehe Abbildung 140). Die Glycerinlimitation wurde ca. 1,5 h vor Feedstart bzw. Induktion erreicht. In dieser Zeit wird durch das Modell kein Wachstum vorausgesagt, tatsächlich zeigte die Biomasse aber einen annähernd linearen Anstieg. Dieser resultiert wahrscheinlich aus kohlenstoffhaltigen Substanzen im Hefeextrakt, die nur mit großem Aufwand bilanzierbar sind. Aufgrund der zusätzlichen C-Quellen kommt es während der Fermentation zur Überlagerung verschiedener Substratlimitationen, wodurch der ermittelte K_S -Wert sicherlich nicht der Wahrheit entspricht. Dies macht eine Beschreibung der vorliegenden Fermentation nur bedingt möglich, wodurch das ermittelte Modell nur zur Interpolation von Daten anwendbar ist. Wahrscheinlich eignet sich das Modell aber auch zur Vorhersage von Änderungen in den Startbedingungen bzw. von Änderungen des Induktionszeitpunktes. Dazu bedarf es allerdings noch weiterer Validierungsexperimente. Um eine Extrapolierbarkeit zu gewährleisten, sollte bestenfalls auf ein chemisch definiertes Fermentationsmedium umgestellt werden. Falls dies nicht möglich ist, sollte zumindest die Kohlenstoffkonzentration im Medium verfolgt werden, da eine vollständige Analyse der Medienzusammensetzung wahrscheinlich unmöglich ist.

3.5.6.2 Aufarbeitung der Lipase EL012

Das Protokoll zur Aufreinigung der EL012 wurde vom Projektpartner Eucodis vorgegeben. Da die EL012 ein thermostabiles Enzym ist, sollte eine Aufreinigung durch Hitzefällung erfolgen. Andere thermoinstabile Proteine fallen bei höheren Temperaturen aus und können abgetrennt werden, wobei die EL012 als lösliche Form im Überstand verbleibt. Bei Eucodis wurde der Hitzefällungsschritt bei einer Temperatur von 65 °C vorgenommen. In einem Vorversuch zur Evaluierung im kleinen Maßstab mit den definierten Bedingungen wurde das Enzym jedoch nahezu vollständig ausgefällt (siehe Abbildung 141) und lag inaktiv im Pellet vor (siehe Abbildung 142, Spur 5).

Im Unterschied zu Eucodis wurde für den Scale-Up eine durch die Universität Halle modifizierte EL012 verwendet, bei welcher die Signalsequenz gegen einen His-Tag ausgetauscht wurde. Dies diente zur besseren Aufreinigung des Enzyms im Labormaßstab, könnte jedoch ein Grund für die geringere Temperaturstabilität darstellen. Laut Angaben der Literatur erreicht die T1-Lipase, zu welcher die EL012 gehört, ihre maximale Aktivität bei 70 °C, eine Stabilität über 30 min wurde dagegen nur bei 60 °C nachgewiesen^{144,145}.

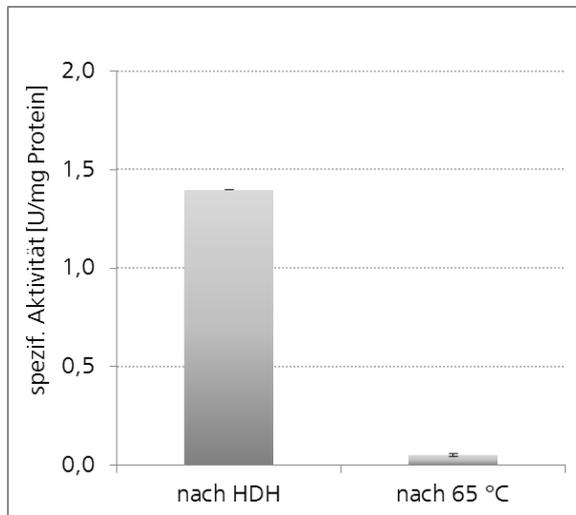


Abbildung 141: Spezifische Aktivität nach Zellaufschluss mit dem Hochdruckhomogenisator (HDH) im Vergleich zur Enzymaktivität nach 30 min Hitzefällung bei 65 °C. Die Balken entsprechen dem Mittelwert aus drei Replikaten und die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

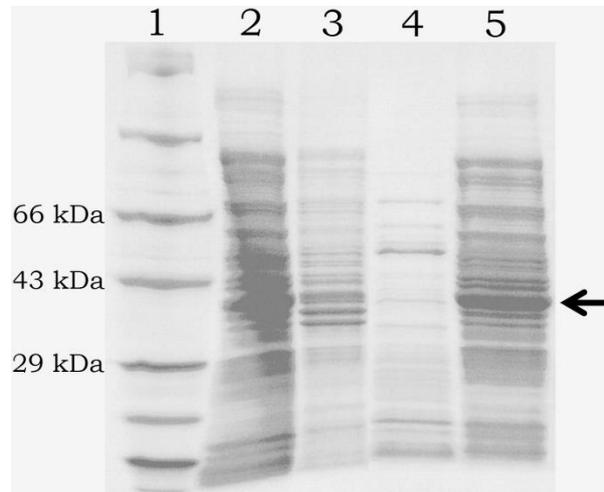


Abbildung 142: SDS-PAGE nach Hitzefällung. 1: Marker, 2: Überstand nach HDH, 3: Pellet nach HDH, 4: Überstand nach 65 °C, 5: Pellet nach 65 °C. Der Pfeil deutet auf die Laufhöhe der Lipase.

Der Hitzefällungsschritt war somit nicht eins zu eins von Eucodis übertragbar und musste verbessert werden. Daraufhin wurde die Lipaseaktivität in Abhängigkeit der Fällung bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Das Ergebnis bestätigte noch einmal, dass die Lipase bei 65 °C inaktiviert wird (siehe Abbildung 143 und Abbildung 144). Die spezifische Aktivität und damit der Aufreinigungsgrad waren bei einer Temperatur von 50 °C am höchsten, weshalb die Hitzefällung im großen Maßstab bei 50 °C durchgeführt wurde.

¹⁴⁴ Abd Rahman *et al.*, 2007

¹⁴⁵ Mahadevan & Neelagund, 2013

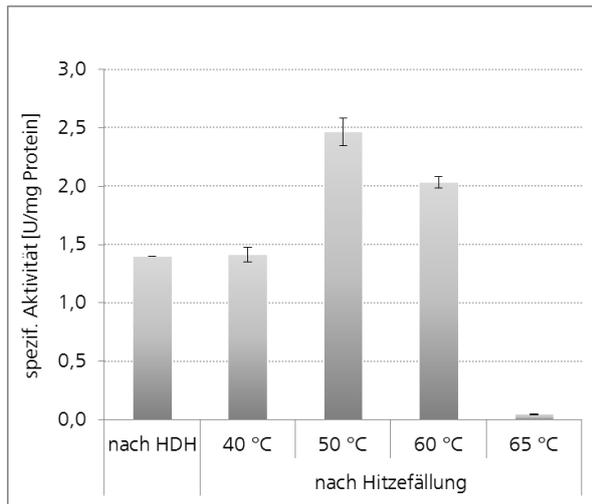


Abbildung 143: Spezifische Aktivität nach Zellaufschluss mit dem Hochdruckhomogenisator (HDH) im Vergleich zur Aktivität nach Hitze fällung bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Balken entsprechen dem Mittelwert aus zwei Replikaten und die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

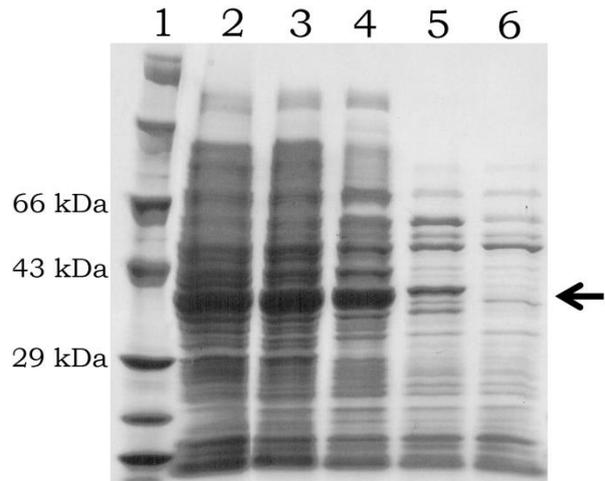


Abbildung 144: SDS-PAGE von Überständen nach Hitze fällung bei unterschiedlichen Temperaturen. 1: Marker, 2: nach HDH, 3: nach 40 °C, 4: nach 50 °C, 5: nach 60 °C, 6: nach 65 °C. Der Pfeil deutet auf die Laufhöhe der Lipase.

Der gesamt Aufarbeitungsprozess bestand aus der Abtrennung der Biomasse von der Klarphase durch einen Tellerseparator, dem Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator, einer Inkubation mit Detergenz zur Verringerung der Anlagerung der Lipase an Zellbruchstücke, einer Hitze fällung, einer Abtrennung der Zelltrümmer durch erneute Separation und einer anschließenden Fällung zur Aufkonzentrierung (siehe Abbildung 145). Bereits in der zuvor durchgeführten Evaluierungsphase wurde auf einen durch Eucodis zusätzlich geplanten Separationsschritt nach der Detergenz-Behandlung und vor der Hitze fällung verzichtet, um mögliche Produktverluste zu minimieren.

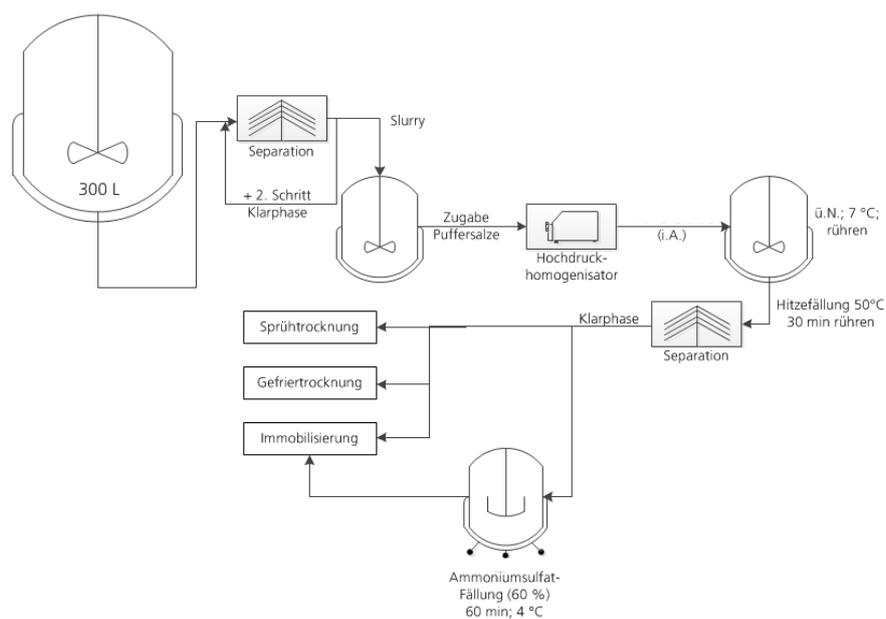


Abbildung 145: Fließdiagramm des Aufarbeitungsprozesses der Lipase EL012. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: i.A. = im Ansatz, ü.N. = über Nacht.

In Tabelle 76 sind die relativen Ausbeuten, Volumen und spezifischen Aktivitäten in den einzelnen Aufreinigungsschritten aufgelistet. Nach Behandlung mit Detergenz konnte im großen Maßstab keine Verbesserung der Enzymausbeute erzielt werden. Es war sogar eine Reduktion der Aktivität um nahezu 25 % zu verzeichnen.

Tabelle 76: Übersicht Aufarbeitungsprozess und Aktivitätsausbeute der Lipase EL012 aus der 300 L-Fermentation.

	Aktivität [U/L]	Protein [$\mu\text{g/mL}$]	Volumen [L]	Gesamt-Aktivität [U]	spezif. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]
nach HDH	20.376	26.802	70	1.426.351	0,7603	100
nach Detergenz	15.507	25.544	70	1.085.487	0,6071	76,10
nach Hitzefällung	4.213	12.653	70	294.928	0,3330	20,68
nach Separator	2.866	10.663	40	114.660	0,2688	8,04
nach AS-Fällung	10.927	29.795	10	109.274	0,3667	7,66

Warum es zu diesem Verlust kam, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Lipaseaktivität muss während der Detergenz-Behandlung überwacht werden, um eine optimale Inkubationszeit festzulegen. Es sollte dabei auch der Kosten-Nutzen-Faktor berücksichtigt werden. Sollte sich herausstellen, dass Detergenz keinen deutlichen positiven Einfluss auf die Enzymaktivität hat, sollte dieser Schritt weggelassen werden. Mit etwa 55 % ging der höchste Verlust jedoch mit der Hitzefällung bei 50 °C einher. Dies ist auch sehr deutlich in der SDS-PAGE zu erkennen (siehe Abbildung 146). Der größte Anteil der Lipase wurde gefällt und befindet sich damit im Pellet (Spur 7) und nicht wie erwartet im Überstand (ÜS) (Spur 6). Die hitzegefällte Lipase zeigte im Pellet keine Aktivität mehr.

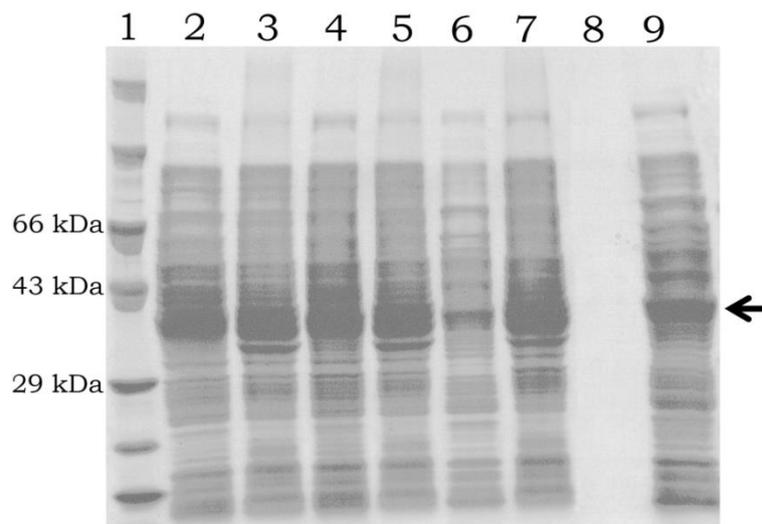


Abbildung 146: SDS-PAGE des Aufarbeitungsprozesses nach der 300-L-Fermentation. 1: Marker, 2: ÜS nach HDH, 3: Pellet nach HDH, 4: ÜS nach Detergenz, 5: Pellet nach Detergenz, 6: ÜS nach Hitzefällung, 7: Pellet nach Hitzefällung, 8: ÜS nach AS-Fällung, 9: Pellet nach AS-Fällung. Der Pfeil deutet auf die Laufhöhe der Lipase.

Die Ursache dafür könnte in den längeren Aufheiz- und Abkühlphasen liegen, welche im Labormaßstab sehr schnell, im Technikumsmaßstab jedoch wesentlich langsamer realisiert werden können. Hinzu kommt, dass aufgrund des in der Automatisierung hinterlegten Reglers beim Aufheizen des Behälters die Temperatur an der Behälterinnenwand den eingestellten Sollwert von 50 °C wahrscheinlich übersteigt. Die Suspension war demnach für eine unbestimmte Zeit höheren Temperaturen ausgesetzt, was zur Hitzefällung des Zielproteins führen kann. Für eine Skalierung sollte daher idealerweise die Kinetik der Inaktivierung bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen werden und damit das Temperaturprofil im technischen Maßstab ausgelegt werden. Eine weniger aufwändige Möglichkeit besteht in der Aufzeichnung des Aufheiz- und Abkühlverhaltens des Fällungsreaktors und der Nachstellung dessen im Labormaßstab, um einen optimalen Aufreinigungsschritt zu evaluieren.

Ein weiteres Problem stellte die Abtrennung von Zellbruchstücken und des hitzegefällten Proteins mittels Separator dar. Bereits nach der Fermentation war nur eine Einengung der Biomasse um 1/3 möglich. Nach der Hitzefällung sollte zukünftig eine andere Trennmethode angewandt werden, da auch nach dem dritten Separationsschritt keine eindeutige Klarphase abtrennbar war. Dies erklärt den weiteren Aktivitätsverlust von ca. 12 %. Eine mögliche Alternative bietet zum Beispiel eine Röhrenzentrifuge. Diese Trennmethode konnte erfolgreich an der Universität Halle durchgeführt werden, jedoch ist am Fraunhofer CBP die notwendige Ausstattung für den großen Maßstab nicht gegeben. Auch Filtrationssysteme können in Betracht gezogen werden, wobei hier ein Verblocken der Membran auftreten könnte. Als weitere Alternative wäre eine Fällung mit Polyethylenimin (PEI) oder anderen Polyaminen denkbar. PEI ist ein kationisches Polymer, welches negativ geladene Makromoleküle wie zum Beispiel Nukleinsäuren und saure Proteine bindet und dadurch ein schnell präzipitierendes Netzwerk bildet. Die Ausbeute ist mit einer Protein A Affinitätschromatographie vergleichbar. Die Methode ist einfach handhabbar und zudem kostengünstig.

Im letzten Schritt des Aufarbeitungsprozesses, der Aufkonzentrierung mittels Ammoniumsulfat-Fällung, ist kein gravierender Verlust zu verzeichnen. Dennoch sollte dieser Schritt optimiert werden, um z.B. durch die stufenweise Anwendung eine bessere Aufreinigung zu erhalten. Durch Zugabe von Ammoniumsulfat (AS) zunächst in geringen Konzentrationen könnte die Lipase in Lösung gehalten und unlösliche Bestandteile abgetrennt werden. Nach Erhöhung der AS-Konzentration würde die Lipase präzipitieren und kann von anderen nicht ausgefällten Proteinen separiert werden¹⁴⁶.

Im Gegensatz zum Fermentationsprozess ließen sich die etablierten Aufarbeitungsprozesse im Labormaßstab nicht problemlos auf die 300 L-Fermentation übertragen. Hier besteht nach wie vor ein großes Optimierungspotential. Trotz der Schwierigkeiten in der Aufarbeitung konnten durch die Fermentation im 300 L-Maßstab die benötigten größeren Mengen an Enzym für AP3 bereitgestellt werden. Das gereinigte Enzym wurde aliquotiert und verschiedenen Konservierungsverfahren unterzogen. Dazu gehörten Sprüh- und Gefriertrocknung sowie Konzentrierung durch Ammoniumsulfat-Fällung und Darstellung in Lösung. Für die Konservierung eignete sich die Gefriertrocknung sehr gut. Die Aktivität nach

¹⁴⁶ Burgess RR. 2009. Protein precipitation techniques. *Methods Enzymol*: 463, 331-42

Gefriertrocknung und zwölf Wochen Lagerung lag nach wie vor bei 100 %. In Bezug auf die Lagerfähigkeit zeigte sich, dass dies auch in flüssiger Form möglich ist, wenn das Enzym zuvor mittels Ammoniumsulfat gefällt wurde. Das Ammoniumsulfat-gefällte Enzym zeigte nach einer Lagerung von acht Wochen bei 4 °C nahezu unveränderte Aktivitätswerte. Dies könnte man darauf zurückführen, dass Proteine in Kombination mit Ammoniumsulfat sehr stabil sind. Die Aufbewahrung als Rohenzymextrakt ist dagegen nicht empfehlenswert. Nach Lagerung des Rohenzymextraktes bei 4 °C war nach sechs Wochen nur noch 1/3 Restaktivität nachweisbar. Aber auch bei -20 °C war der Aktivitätsverlust mit 50 % sehr hoch.

3.5.6.3 Immobilisierung der Lipase EL012

Um eine einfache An- und mögliche Wiederverwendung der Lipase in enzymatisch katalysierten Reaktionen zu erhalten, könnte eine Immobilisierung des Enzyms an ein Trägermaterial von Vorteil sein. Bei der Immobilisierung lag der Fokus auf der adsorptiven Bindung. Bei den verwendeten Materialien handelte es sich um Octyl (OC)- und Octadecyl (OD)-modifizierte Träger, welche häufig in der Literatur beschrieben sind^{147,148}. Die Hydrolyseaktivität der immobilisierten EL012 konnte nicht mit dem am Fraunhofer CBP etablierten Lipaseaktivitätsassay analysiert werden, da das Trägermaterial die Messung beeinflusst. Sowohl das gemessene Reaktionsprodukt als auch das Substrat selbst binden am Träger. Aus diesem Grund wurde die Methode der Hydrolyse von Olivenöl an der Universität Halle genutzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 147 dargestellt. Bei beiden Trägermaterialien ist zu erkennen, dass die Aktivitäten im Überstand sehr gering sind (OD: 3,9 %; OC: 14,1 %) und auf eine erfolgreiche Immobilisierung des Enzyms hindeuten. Eine Enzymaktivitätsmessung des Überstandes mit dem Assay am Fraunhofer CBP (Hydrolyse von pNPP; Ergebnisse nicht gezeigt) zeigte ebenfalls niedrige Wiederfindungsrate. Jedoch schien das Enzym mit 10,3 % am OD-Träger nicht sehr aktiv zu sein. Die Aktivität der Lipase am OC-Material ist mit 57 % (680 U/g) nahezu 6-fach höher als an OD. Die Ursache hierfür ist nicht abschließend geklärt. Es ist bekannt, dass das aktive Zentrum bei Bindung an die Octadecyl-Gruppe zum Träger gerichtet ist¹⁴⁹ und deshalb für Substratmoleküle und deren katalytische Umsetzung schlechter erreichbar ist. Damit könnte die geringere Aktivität am OD-Träger erklärt werden. Als Fazit lässt sich sagen, dass für die Immobilisierung der Lipase EL012 das Octyl-Trägermaterial besser geeignet ist.

¹⁴⁷ Cunha AG, Fernandez-Lorente G, Bevilaqua JV, Destain J, Paiva LMC, Freire DMG, Fernandez-Lafuente R & Guisan JM. 2008. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase—a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology*: 146, 49-56

¹⁴⁸ Perez D, Martin S, Fernandez-Lorente G, Filice M, Guisan JM, Ventosa A, Garcia MT & Mellado E. 2011. A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PLoS One*: 6, e23325

¹⁴⁹ Palomo et al., 2004

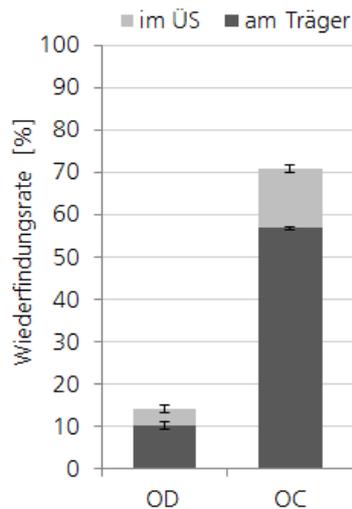


Abbildung 147: Wiederfindung der Lipaseaktivität am Trägermaterial und im Überstand (ÜS).

3.5.7 Fermentative Herstellung der Lipase EL070 (Fraunhofer CBP)

Im weiteren Projektverlauf wurde auch die Lipase EL070 fermentativ hergestellt, da diese bei den Umesterungsversuchen des Projektpartners Eucodis gute Katalyseaktivitäten zeigte. Produktionsstamm sowie Protokolle für Fermentation und Aufarbeitung zur Herstellung der EL070 wurden von Eucodis zur Verfügung gestellt. Die Fermentation wurde im 1 m³-Maßstab durchgeführt, wobei der 100 L-Fermenter als Vorkultur (Inokulum) zum Einsatz kam. Der Fermentationsverlauf ist in Abbildung 148 dargestellt. Die Glucose war nach einer Batchdauer von etwa 3,5 h verbraucht, woraufhin ein exponentielles Feeding gestartet wurde (Fed-Batch). Nach 10,75 h wurde mit IPTG induziert und zeitgleich auf eine konstante Feedrate gewechselt. Mit 24 h Fermentationsdauer wurde eine Biomasse mit einer optischen Dichte von 70,6 erreicht, was im Vergleich zur Fermentation der EL012 höher ist.

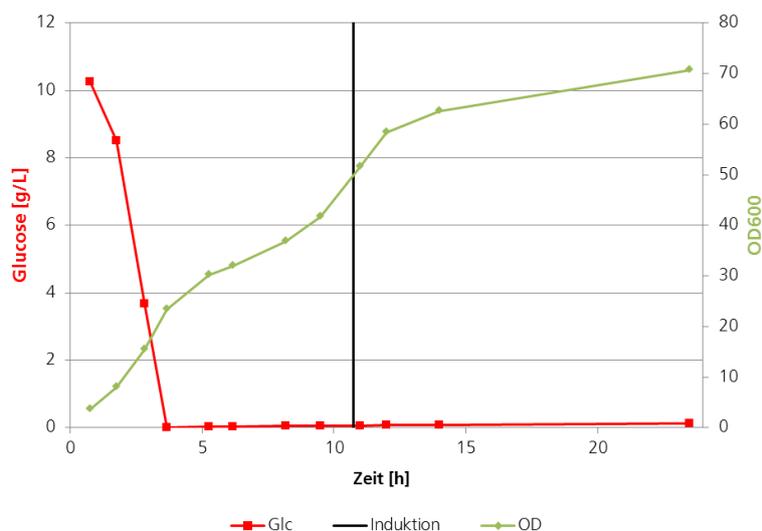


Abbildung 148: Produktion der EL070 am CBP im 1-m³-Maßstab. Die Biomassebildung ist in grün und der Substratverbrauch (Glukose) in rot dargestellt. Die vertikale Linie kennzeichnet den Zeitpunkt der Induktion.

Für die Aufreinigung der Lipase EL070 wurde die Fermentationsbrühe zunächst separiert und die Zellen mittels eines Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Nach erneuter Separation erfolgten eine Ammoniumsulfat-Fällung sowie eine Ultrafiltration (UF) und im Anschluss wurde die Suspension zur Konservierung sprüh- bzw. gefriergetrocknet. Der gesamte Aufarbeitungsprozess ist in Abbildung 149 dargestellt.

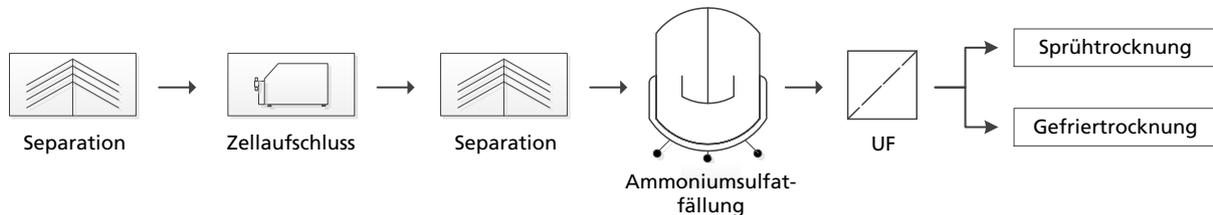


Abbildung 149: Fließdiagramm des Aufarbeitungsprozesses der Lipase EL070.

Wie schon bei der Lipase EL012 ließen sich die bei Eucodis etablierten Aufarbeitungsprozesse nicht direkt auf den 1 m³-Maßstab am Fraunhofer CBP übertragen. So wurde vorab in der Evaluierungsphase zusammen mit Eucodis entschieden auf die Behandlung mit Detergenz zu verzichten, da dieses Detergenz sehr teuer ist und bei der EL012 im großen Maßstab erhebliche Verluste einbrachte. Damit konnte ebenfalls der von Eucodis geplante zusätzliche Separationsschritt eingespart werden, was neben dem zeitlichen Vorteil ebenso den Produktverlust minimiert. Die Aktivitätsausbeute der fermentativ hergestellten Lipase am CBP betrug 2,3 U/mg Trockenmasse (siehe Tabelle 77) und lag damit nur etwa bei 20 % im Vergleich zu Eucodis. Dafür konnte eine höhere spezifische Aktivität von 36,10 U/mg Protein erreicht werden, was auf eine höhere Reinheit der Lipase schließen lässt. Die Ammoniumsulfat-Fällung scheint nicht so effizient gewesen zu sein wie bei Eucodis und führte zu einem recht hohen Verlust. Auch in Abbildung 150 wird deutlich, dass Eucodis eine höhere Lipase-Ausbeute erreichte (Spur 2), die Reinheit aber am Fraunhofer CBP dafür höher war (Spur 3).

Tabelle 77: Vergleich der EL070-Ausbeute am Fraunhofer CBP mit Eucodis

	Eucodis	CBP - lyophilisiert
U/mg Trockenmasse	11,1	2,3
U/mg Protein	22,82	36,10

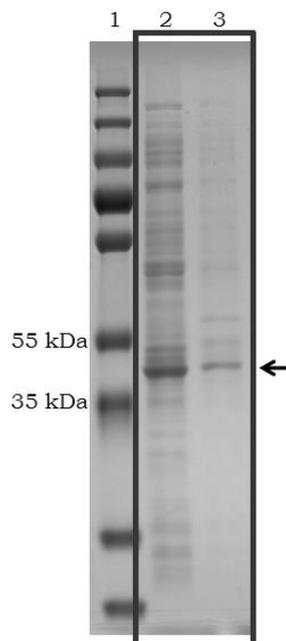


Abbildung 150: SDS-PAGE der EL070 von Eucodis im Vergleich zur EL070 vom CBP. 1: Marker, 2: EL070 lyophilisiert von Eucodis, 3: EL070 lyophilisiert vom CBP. Der Pfeil deutet auf die Laufhöhe der Lipase.

Hinsichtlich der Lagerstabilität zeigte sich, dass die Lipase EL070 sowohl in sprüh- als auch in gefriergetrockneter Form über einen Zeitraum von mindestens 6,5 Wochen stabil ist. Aufgrund des Projektendes war eine längerfristige und abschließende Analyse im Rahmen des Projektes nicht möglich. Das Fraunhofer CBP wird die Enzymstabilität aber auch zukünftig weiter untersuchen.

3.5.8 Ver- und Umesterung vermittelt durch die fermentativ hergestellten Lipasen und Scale-Up (Fraunhofer CBP)

Die Syntheseleistung der produzierten EL012 wurde in Zusammenarbeit mit Eucodis am Standort Halle untersucht. Bei beiden Reaktionen kam Toluol als Lösemittel zum Einsatz, weshalb die Ansätze nur im Labormaßstab durchgeführt wurden. Für eine spätere Maßstabsvergrößerung war es Ziel, auf Lösemittel zu verzichten. Die Detektion der Reaktionsprodukte erfolgte mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie, wodurch in erster Linie eine Ja/Nein-Aussage getroffen werden kann. Das Rohenzymextrakt (RE) sowie das an OC immobilisierte Enzym zeigten eine Syntheseaktivität, d.h. Bildung von Fettsäuremethylestern. Die Veresterung von Palmitinsäure mit Methanol und die Umesterung von Senföl mit Methanol verliefen erfolgreich, wobei sich auch hier das Octyl-Material als besser herausstellte (siehe Abbildung 151). Grundsätzlich ist die Umesterungsreaktion nicht so effektiv wie die Veresterung, was an dem unvollständigen Umsatz des Senföls ersichtlich ist (nur geringe Abnahme der Bandenstärke). Aber selbst die positiv-Kontrolle, eine hochaktive Lipase (Novo 435), ist in dieser Zeit nicht fähig eine vollständige Umesterung zu erreichen. Senföl ist als Triglyzerid größer und schwerer zugänglich als eine Fettsäure, wie sie bei der Veresterung eingesetzt wird.

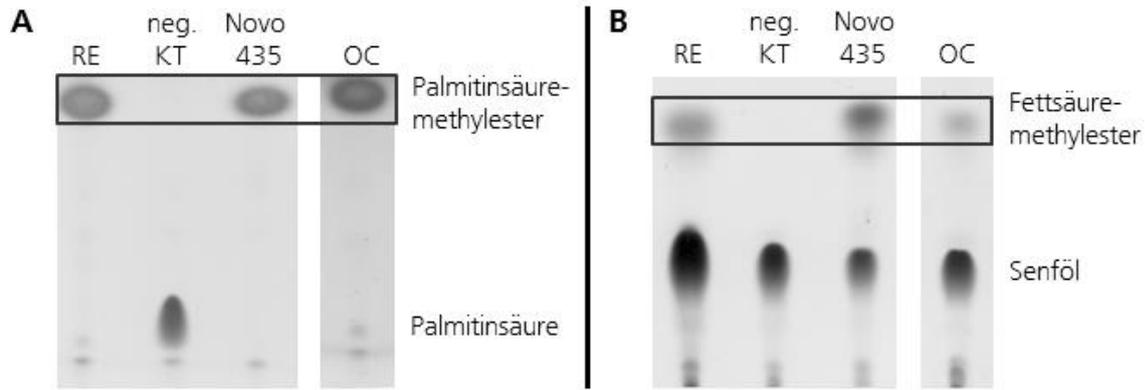


Abbildung 151: (A) Veresterung von Palmitinsäure mit Methanol nach 24 h bei 30 °C. Lösemittel Toluol. (B) Umesterung von Senföl mit Methanol nach 24 h bei 30 °C. Lösemittel Toluol. RE = Rohenzymextrakt, OC = EL012 an Octyl-Träger immobilisiert.

3.5.8.1 Scale-Up Veresterung

Für die Maßstabsvergrößerung der Veresterung bis in den 10 L-Maßstab (siehe Abbildung 155) wurde nach Rücksprache mit dem IGB und Eucodis die sprühgetrocknete Pseudozymalipase (PL) verwendet. Diese wurde im Rahmen eines anderen Projektes produziert (Helber *et al.*, 2014) und zeigte in Vorversuchen bei Eucodis eine wesentlich bessere Syntheseleistung (Esterbildung) als die EL012 (siehe Abbildung 152 und Abbildung 153, hervorgehoben mit grüner Markierung). Weiterhin konnten die Reaktionen lösemittelfrei durchgeführt werden und stellen hinsichtlich der Sicherheitsaspekte und Wirtschaftlichkeit ein besseres Potential für eine mögliche industrielle Anwendung dar.

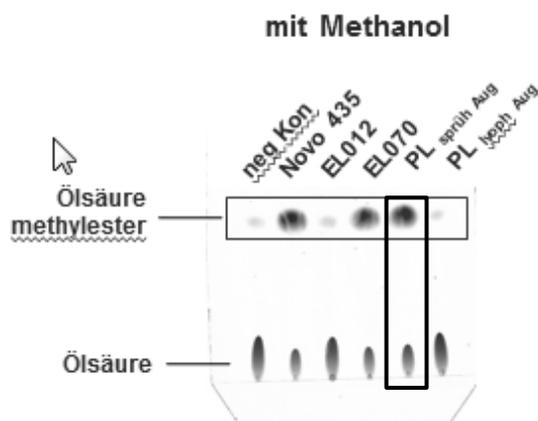


Abbildung 152: Veresterung von Ölsäure mit Methanol im 200- μ L-Maßstab. Lösemittelfrei; 10 mg Novo 435 bzw. EL070; 30 mg PL bzw. EL012; 50°C; 22 h. © Eucodis

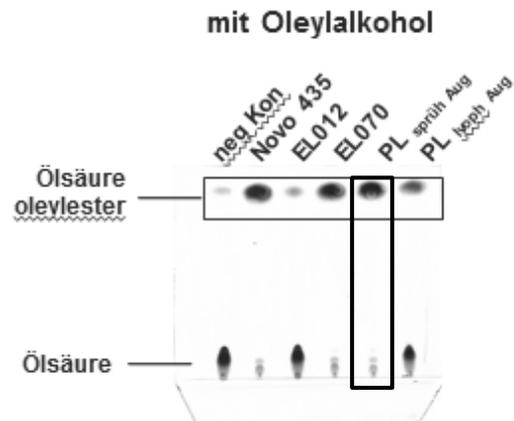


Abbildung 153: Veresterung von Ölsäure mit Oleylalkohol im 200- μ L-Maßstab. Lösemittelfrei; 10 mg Novo 435 bzw. EL070; 30 mg PL bzw. EL012; 50°C; 22 h. © Eucodis

Die Veresterungsreaktion von Ölsäure und Oleylalkohol konnte erfolgreich bis in den 10 L-Maßstab durchgeführt werden. In Abbildung 154 ist zu sehen, dass der größte Teil der Reaktion bereits nach 4 h abgeschlossen ist und die Konzentration an Ölsäureoleylester nur noch unwesentlich zunahm. Zu Beginn der Reaktion liegt das Enzym unlöslich in dem Öl-Alkohol-Gemisch vor, weshalb der Reaktionsansatz eine trübe Suspension darstellt (siehe Abbildung 155 - 0 h). Nach 3 h kam es dann zu einer Phasentrennung. Zu diesem Zeitpunkt ist durch die Veresterung so viel Wasser als Nebenprodukt gebildet worden, dass sich das

Enzym zunächst im Wasser löst. Da die Konzentration der Lipase im wässrigen Anteil sehr hoch ist, kommt es zur Aggregation, welche zur Sedimentation des Enzyms führt. Während sich das Produkt, der Ölsäureoleylalkohol, in der klaren flüssigen Phase befindet, hat sich nach 4 h das gesamte Enzym am Boden des Reaktors abgesetzt. Die Rührerleistung des Glasreaktors reichte nicht aus, um eine homogene Durchmischung über die Reaktionsdauer von 3 h hinaus zu gewährleisten. Für eine weiterführende Prozessoptimierung hinsichtlich Scale-Up sollten Untersuchungen zu verschiedenen Rührersystemen erfolgen, um eine optimale enzymatisch katalysierte Veresterungsreaktion sicherzustellen.

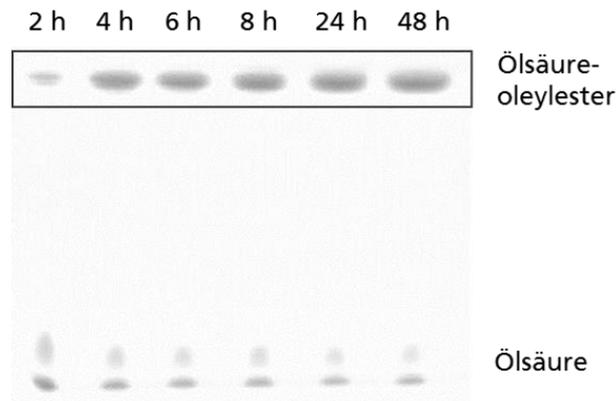


Abbildung 154: Veresterung von Ölsäure mit Oleylalkohol im 10-L-Reaktor. Lösemittelfrei; 50 g/L Pseudozyma Lipase; 75 rpm; 50 °C.

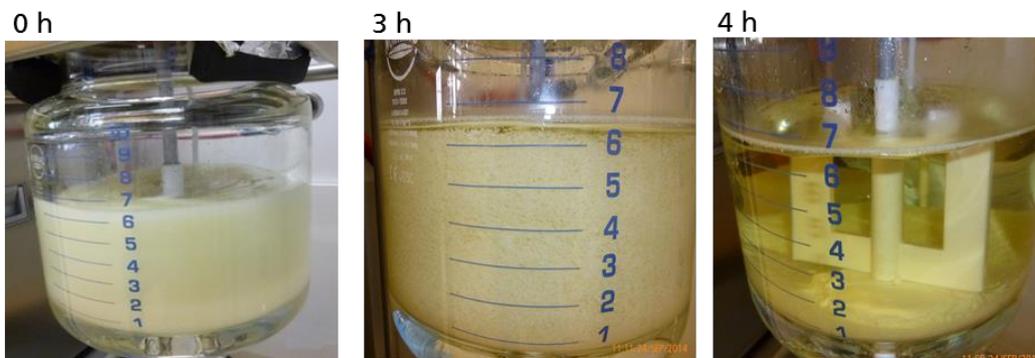


Abbildung 155: Zeitlicher Verlauf der Veresterungsreaktion von Ölsäure mit Oleylalkohol im 10 L-Reaktor.

Weiterhin wurde die Ölsäure auch mittels Methanol verestert. Diese Reaktion konnte ebenfalls erfolgreich bis in den 10-L-Maßstab durchgeführt werden (siehe Abbildung 156). Nach 24 h war keine weitere Zunahme an Ölsäuremethylestern zu verzeichnen. Wie schon bei der Produktion von Ölsäureoleylester kam es auch hier zu einer Phasentrennung (vergleichbar zu Abbildung 155), welche die erfolgreiche Veresterungsreaktion durch Bildung des Nebenproduktes Wasser abbildet. Der so produzierte Ölsäuremethylester kann interessierten Partnern, z.B. für Metathesereaktionen in AP 3.4, zur Verfügung gestellt werden.

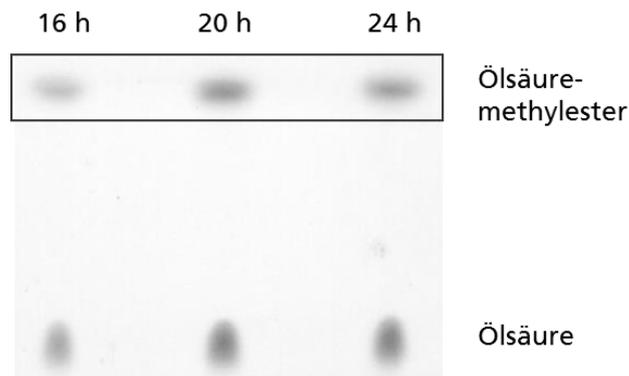


Abbildung 156: Veresterung von Ölsäure mit Methanol im 10 L-Reaktor. Lösemittelfrei; 50 g/L Pseudozyma Lipase; 75 rpm; 50 °C.

3.5.8.2 Scale-Up Umesterung

In Voruntersuchungen bei Eucodis zur Umesterung von Pflanzenölen zeigte sich, dass Krambeöl mittels Lipase EL070 vollständig zu Fettsäureoleylester umgesetzt werden kann (siehe Abbildung 157). Im Gegensatz dazu wiesen die Lipase EL012 sowie die Pseudozyma-Lipase kaum Syntheseleistung auf. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Umesterung von Krambeöl mit Methanol zu Fettsäuremethylester erzielt. Daraufhin wurde die am Fraunhofer CBP produzierte Lipase EL070 für den Scale-Up der Umesterung von Krambeöl verwendet. Mit den so produzierten Fettsäuremethylestern könnten die Projektpartner Addinol und DHW bemustert werden.

Eine Umesterung von Krambeöl mit Methanol und der am Fraunhofer CBP hergestellten Lipase EL070 war jedoch im Schüttelkolbenmaßstab nicht möglich. Wie zuvor beschrieben lag die Ausbeute bei der fermentativen Enzymherstellung im Vergleich zu Eucodis nur bei etwa 20%. Da die Aktivität pro Milligramm sprühgetrocknetes Enzym 1/5 derer bei Eucodis betrug, wurde die Reaktion unter Einsatz der 5-fachen Enzymmenge wiederholt. Es konnte dennoch keine deutliche Umesterung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 158). Aus diesem Grund wurde der Versuch nur bis in den Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt und nicht weiter aufskaliert.

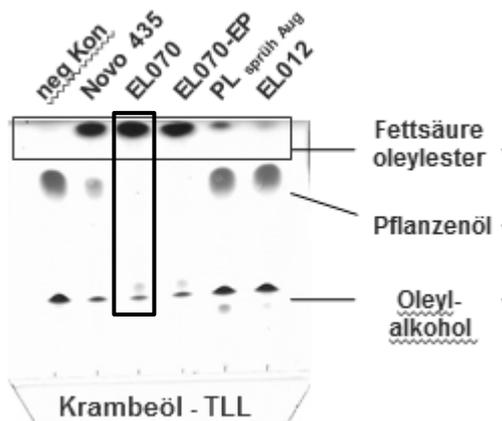


Abbildung 157: Umesterung von Krambeöl mit Oleylalkohol im 200- μ L-Maßstab. Lösemittelfrei; 10 mg Novo 435 bzw. EL070 (frei); 50 mg EL070-EP (immob); 30 mg EL012 bzw. PL; 40 °C; 21 h. © Eucodis

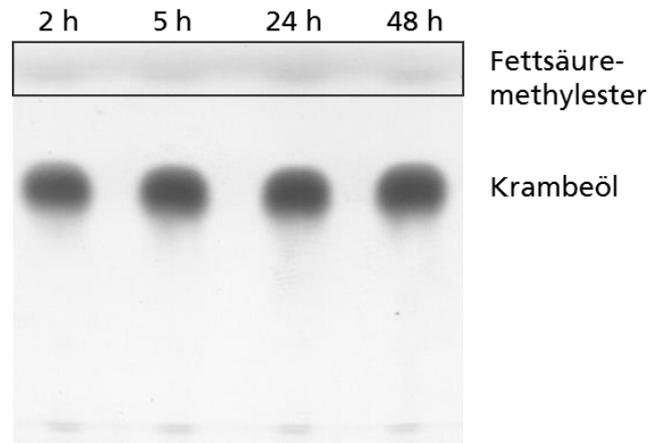


Abbildung 158: Umesterung von Krambeöl mit Methanol im Schüttelkolbenmaßstab. Lösemittelfrei; 250 g/L EL070; 150 rpm; 40 °C.

Die Syntheseleistung der Lipase EL070 sollte für ein weiteres Pflanzenöl untersucht werden. Dafür wurde die Umesterung von Sonnenblumenöl mit Oleylalkohol gewählt, welche zu besseren Ergebnissen führte als die Versuche mit Krambeöl (siehe Abbildung 159). Jedoch auch in dieser Reaktion musste die 5-fache Enzymmenge einsetzen werden, um die Bildung von Fettsäureoleylestern nachzuweisen. Da der Einsatz einer so großen Enzymmenge unwirtschaftlich ist, wurde auch dieser Versuch nur im Schüttelkolben durchgeführt und nicht weiter aufskaliert. Das Reaktionsprodukt kann interessierten Projektpartnern zur weiteren Verwendung zur Verfügung gestellt werden.

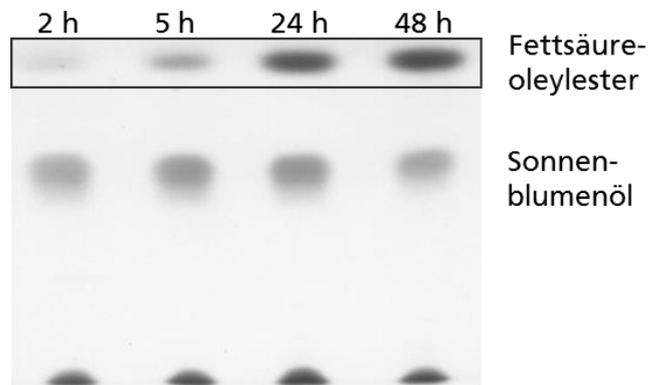


Abbildung 159: Umesterung von Sonnenblumenöl mit Oleylalkohol im Schüttelkolben. Lösemittelfrei; 250 g/L EL070; 150 rpm; 40 °C.

3.5.9 Entwicklung von Produktionsstämmen für die ω -Funktionalisierung (Fraunhofer IGB)

Für die Produktion von langkettigen Dicarbonsäuren (DCA) ist für spezielle Hefen der Stoffwechselweg der ω -Oxidation beschrieben¹⁵⁰ (siehe auch Abbildung 5). Hierbei können Alkane durch enzymatische endständige Oxidation über drei Zwischenstufen in Fettsäuren und diese durch erneute Oxidation in DCA umgewandelt werden. Dadurch ist eine Verwertung von Alkanen möglich. Fettsäuren und DCA werden durch den Weg der β -Oxidation im Stoffwechsel abgebaut und dienen als Kohlenstoffquelle dem Wachstum der Mikroorganismen. Ziel der Stammentwicklung für die Herstellung von langkettigen DCA ist die Identifikation eines S1-Stammes, der DCA produziert. Der bisher am IGB etablierte Stamm mit guter DCA-Bildung aus Ölsäure ist ein *Candida tropicalis*, der eine Deletion im Fettsäure-Katabolismus besitzt und Fettsäuren nicht mehr als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Dieser Stamm ist in Deutschland in die Sicherheitsstufe S2 eingestuft und daher für einen großtechnischen Maßstab zur Herstellung von langkettigen, ungesättigten DCA nicht interessant, da hohe sicherheitstechnische Vorkehrungen zu treffen sind, die kostenintensiv sind. Es ist daher erstrebenswert, eine industrielle Produktion von DCA mit einem S1-Stamm zu etablieren.

3.5.9.1 Identifizierung von S1-Stämmen zur DCA-Produktion

Mittels Literaturrecherche sollten demnach S1-Stämme identifiziert werden, die bereits als DCA-produzierend oder Alkan-verwertend beschrieben sind. Der Stoffwechselweg der β -Oxidation ist in nahezu allen Organismen vorhanden, der der ω -Oxidation jedoch nicht. Parallel zur Oxidation der Alkane und Fettsäuren werden diese abgebaut. Die Geschwindigkeit dieser auf- und abbauenden Wege ist daher für eine Identifikation von DCA-produzierenden Stämmen wichtig, denn es können nur dann DCA nachgewiesen werden, wenn die DCA-abbauenden Reaktionen langsamer ablaufen als die DCA-aufbauenden Reaktionen.

Um geeignete DCA-Produzenten für eine spätere industrielle Produktion zur Verfügung stellen zu können, wurden basierend auf den Erfahrungen mit bekannten Stämmen (*C. tropicalis*, *C. maltosa*, *Y. lipolytica*) Kriterien zur Literaturrecherche nach potentiellen Industriestämmen festgelegt. Die Kriterien beinhalten notwendige Ausgangseigenschaften der späteren Industriestämme wie die charakteristischen Stoffwechseleigenschaften, Klassifizierung in Sicherheitsstufen und Verfügbarkeit der Stämme verbunden mit der aktuellen Patentsituation. Aufgrund der festgelegten Kriterien konnten mehrere potentiell interessante wildtypische Hefestämme identifiziert werden (siehe Tabelle 78). Für einen weiteren experimentellen Versuch wurde zunächst das Wachstum der Hefen auf verschiedenen pflanzlichen Fettsäuren als einzige Kohlenstoffquelle untersucht. Alle ausgewählten Stämme konnten auf Fettsäuren über den vorhandenen Oxidationsweg verstoffwechseln (siehe Tabelle 78). Weitere Experimente zur DCA-Produktion wurden mit dem in der Tabelle aufgeführten *Stamm 4* durchgeführt.

¹⁵⁰ Eschenfeldt *et al.*(2003), Applied and Environmental. Microbiology, 69 (10), 5992

Tabelle 78: Ausgewählte potentielle DCA-Bildner mit S1-Status.

Stamm	Sicherheitsstufe	ω -Oxidation bekannt	β -Oxidation vorhanden	Bevorzugte Substrate im Plattenscreening
<i>Candida tropicalis</i> Wildtyp	S2	Ja	Ja	Laurinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Erucasäure, Olein
Stamm 1	S1	Ja	Ja	Laurinsäure, Ölsäure, Erucasäure, Olein
Stamm 2	S1	Ja	Ja	Ölsäure, Erucasäure
Stamm 3	S1	Ja	Ja	Olein, Laurinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure
Stamm 4	S1	Ja	Ja	Laurinsäure, Olein, Linolensäure

Um experimentell nachzuweisen, dass *Stamm 4* tatsächlich über den Stoffwechselweg der ω -Oxidation verfügen, wurde zunächst eine Screeningmethode im Schüttelkolben etabliert. Bei der etablierten Methode wird das Wachstum von der Produktion der DCA entkoppelt. Der Stamm wird zunächst im Kulturmedium über Nacht kultiviert und nach Verbrauch der Glukose eine pH-Änderung von pH 5,5 auf pH 8,0 herbeigeführt. Die Produktionsphase wird dann durch Zugabe von Ölsäure und geringe kontinuierliche Glukosezugabe gestartet. Alle Screeningversuche wurden in 500 ml Schikanekolben mit 100 mL Medium durchgeführt. Um eine gute Durchmischung der wässrigen Lösung und der hydrophoben Substrate (frei Fettsäuren, Fettsäuremethylester etc.) und eine reproduzierbare Probenahme gewährleisten zu können, wurde die Kultur mit einem Magnetrührstäbchen auf einer Rührplatte gleichmäßig gerührt und nicht auf einem Rotationsschüttler geschüttelt. Tabelle 79 zeigt die gemessene DCA-Produktion von *Stamm 4* im Vergleich zu dem β -Oxidations-negativen *C. tropicalis*-Stamm H5343 über einen Kultivierung von drei Tagen.

Tabelle 79: Untersuchung der DCA-Produktion des Stammes 4 im Vergleich zu *C. tropicalis* H5343 mit Ölsäure als Substrat.

t [h]	<i>C. tropicalis</i> H5343 (β -Oxidations-negativ) DCA [g/L]	Stamm 4 (Wildtyp) DCA [g/L]
0	0	0
24	0	0
48	1.4	1.7
144	2.9	0

In den Überständen beider Stämme konnte nach 48 h Stunden vergleichbare DCA-Konzentrationen gemessen werden. Aufgrund der β -Oxidation wird die DCA von *Stamm 4* nach 144 h wieder abgebaut. In *C. tropicalis* H5343 wurden Gene der β -Oxidation deletiert, so dass ein Abbau der DCA nicht mehr möglich ist und die DCA im Überstand akkumuliert. Um die DCA-Produktion in dem wildtypischen Stamm 4 zu optimieren ist somit eine Blockierung der β -Oxidation notwendig.

3.5.9.2 Optimierung der DCA-Produktion durch Blockierung der β -Oxidation

Die Blockierung der β -Oxidation kann auf enzymatischer (Inhibition) oder genetischer (Deletion) Ebene erfolgen. Beide Ansätze wurden parallel verfolgt.

Screening nach Inhibitoren der β -Oxidation

Zum Screening geeigneter chemischer Inhibitoren wurden Experimente mit *C. tropicalis* durchgeführt. Der Wildtyp von *C. tropicalis* wird hierbei hinsichtlich der Inhibitorwirkung auf die β -Oxidation (Fettsäureabbau) und der β -Oxidations-negative Stamm H5343 hinsichtlich eines möglichen Nebeneffektes auf die ω -Oxidation (DCA-Bildung) im Experiment eingesetzt und untersucht. Der Inhibitor ist geeignet, wenn die β -Oxidation unterdrückt, die ω -Oxidation dabei aber nicht beeinflusst wird. Eine Inhibition beider Stoffwechselwege ist theoretisch möglich, da die Ausgangssubstrate identisch sind und möglicherweise Enzyme beider Stoffwechselwege durch Inhibition beeinflusst werden könnten. Durch Literaturrecherche wurden verschiedene Inhibitoren identifiziert, welche für eine Anwendung in Frage kommen. Zunächst wurden getestet: 2-Bromohexadecansäure (BHA), Methylencyclopropylacetat (MCPA), Erucasäure (ES) und 4-Pentensäure (4-PA). Die Inhibitoren wurden zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 1, 10, 50, 100 mM) in Mineralsalzmedium-Agarplatten mit Olein oder Glukose als einziger C-Quelle gebracht und mit *C. tropicalis* Wildtyp beimpft und inkubiert. Nach sechs Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum mit der Positivkontrolle (Glukose ohne Inhibitor) verglichen. MCPA stellte sich bereits ab 10 mM als toxisch heraus. BHA zeigte eine inhibitorische Wirkung ab 10 mM ohne gleichzeitige toxische Wirkung bei Wachstum auf Glukose. 4-PA wirkte mit Olein als C-Quelle bereits ab 1 mM wachstumshemmend und zeigte zudem ab 10 mM verringertes Wachstum auf Glukose. Dies legt eine toxische Wirkung ab 10 mM nahe. Bei Erucasäure blieb erst bei 100 mM das Wachstum auf Olein aus, es zeigte dabei jedoch auch geringeres Wachstum auf Glukose (siehe Tabelle 80).

Tabelle 80: Ergebnisse der Agarplattenversuche mit Inhibitoren der β -Oxidation, auf den Platten wurde *C. tropicalis* Wildtyp ausgestrichen und sechs Tage bei 30 °C inkubiert. Wachstum „+“ deutlich, „(+)" schwach, „-“ nicht vorhanden.

Inhibitor	MCPA		BHA		4-PA		ES	
	Glukose	Olein	Glukose	Olein	Glukose	Olein	Glukose	Olein
0	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	(+)	+	+	+	+
10	-	(+)	+	-	(+)	-	+	+
50	-	-	+	-	-	-	+	(+)
100	-	-	+	-	-	-	(+)	-

Eine Inkubation auf Agarplatten lässt keinen Schluss auf eine DCA-Bildung zu, da die verstoffwechselten Substrate vollständig in Biomasse umgesetzt werden und keine Anreicherung von DCA erfolgt. Daher war es notwendig, Versuche in Submerskultur durchzuführen, um die Wirkung des Inhibitors auf die β - und ω -Oxidation beurteilen zu können. Mögliche Effekte der Inhibition wurden mit BHA und MCPA exemplarisch durchgeführt.

Zunächst wurde BHA als vielversprechender Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen in Flüssigkultur eingesetzt. Die Screeningversuche beinhalteten eine 24-stündige Wachstumsphase und eine 10-tägige Produktionsphase. Zu Beginn der Produktionsphase wurde das Substrat für die DCA-Bildung zugegeben (Olein) und verschiedene Konzentrationen von 1, 10, 20 und 50 mM an Inhibitor eingestellt. Ein Kolben ohne Inhibitor diente als Kontrolle der DCA-Bildung. Eine Konzentration von 1 mM hatte hierbei keinen Effekt auf die DCA-Bildung oder den Fettsäureabbau. Mit zunehmender Konzentration ließ sich jedoch bei dem β -Oxidations-negative Stamm H5343 beobachten, dass die spezifische DCA-Bildungsrate geringer ausfiel, je mehr Inhibitor zugesetzt worden war. Ein negativer Einfluss auf die ω -Oxidation lässt sich damit nicht ausschließen. Bei Verwendung des wildtypischen *C. tropicalis*-Stammes ließ sich bei Einsatz verschiedener Inhibitor-konzentrationen von BHA keine DCA-Bildung detektieren. Dies kann durch eine unzureichende Inhibitorwirkung auf die β -Oxidation bzw. eine gleichzeitige Inhibition der ω -Oxidation begründet sein.

Der Einsatz von 1 mM MCPA im Schüttelkolben hatte keinen Einfluss auf die DCA-Bildung von H5343, der Wildtyp produzierte jedoch keine DCA.

Weitere potentielle Inhibitoren wurden nicht untersucht. Im Verlauf des Projektes wurde dafür mit der genetischen Modifikation des S1-Stammes *Stamm 4* begonnen, um eine Blockierung der β -Oxidation zu bewirken.

Deletion der β -Oxidation in dem potentiellen DCA-Produktionsstamm Stamm 4

Sowohl Monocarbonsäure als auch DCA können auf dem Weg der β -Oxidation abgebaut und zum Aufbau von Biomasse genutzt werden. Der Produktionsstamm *Candida tropicalis* H5343 ist in der β -Oxidation deletiert, dies führt zu erhöhter DCA-Produktion im Vergleich zum Wildtyp. Um in dem ausgewählten *Stamm 4* die β -Oxidation zu deletieren, mussten dafür zunächst die entsprechenden Genkandidaten identifiziert werden. Daher wurde eine Recherche nach an der β -Oxidation beteiligten Genen in *Candida tropicalis* durchgeführt, um homologe Proteine in dem *Stamm 4* identifizieren zu können (siehe Tabelle 81).

Als Zielgene für eine Deletion der β -Oxidation in *Stamm 4* wurden die Gene codierend für die Acyl-CoA Oxidase (*pox*) ausgewählt, da diese entscheidend für den ersten Schritt des β -Oxidationsstoffwechsels sind. Durch Blast-Analyse konnten in dem Genom von *Stamm 4* drei potentielle *pox*-Gene identifiziert werden. Für die Deletion der *pox*-Gene musste zunächst ein Transformationssystem etabliert werden. Für die Herstellung kompetenter Zellen für eine Transformation wurde ein Protokoll entwickelt über das mittels einer Lithiumacetatbehandlung und einem darauf folgenden Hitzeschocks die Aufnahme von Fremd-DNA erfolgen kann. Die Deletion der *pox*-Gene erfolgt mittels homologer Rekombination. Dafür mussten Deletionskonstrukte mit einem Resistenzmarker zur Selektion der Mutanten und beidseitigen homologen Flanken erstellt werden.

Tabelle 81: Enzyme der β -Oxidation und entsprechende Gene in *Candida tropicalis*.

Enzyme	Gen in <i>Candida tropicalis</i>	Referenz
very long-chain fatty acid transport protein	XM_002548593.1	Butler et al. 2009
long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 = Acyl-CoA-synthetase (?)	XM_002546305.1	Butler et al. 2009
3-Ketoacyl-CoA-Thiolase*	CTPKCTA (AB025647.1), CTPKCTB (AB025648.1)	Kanayama et al. 1994
Acyl-CoA oxidase (AOX)	3 Gene: POX2 (M18259.1), POX4 (M12160.1), POX5 (M12161.1)	Okazaki et al. 1986
Carnitine-Acetyltransferase	1 Gen: CT-CAT (D84549.1)	Kawachi et al. 1996

* Deletion ohne Effekt für DCA-Bildung (Hara et al. 2001)

Im Verlauf der gentechnischen Arbeiten zeigten sich Schwierigkeiten mit der gezielten Deletion der *pox*-Gene, weshalb die Arbeiten zunächst langsam vorrangigen. Aus diesem Grund wurde der Wildtypstamm schließlich durch eine Mutante ersetzt, die eine erhöhte und gezielte Integration der Delektionskonstrukte über homologe Rekombination ermöglichte. Dadurch könnten die ersten beiden *pox*-Gene in *Stamm 4* erfolgreich deletiert werden. Die Deletion des letzten *pox*-Gens konnte vor Projektabschluss nicht erzielt werden. Die letzten gentechnischen Arbeiten zur Blockierung der β -Oxidation in *Stamm 4* werden derzeit durchgeführt.

3.5.9.3 Re-Klassifizierung des S2-Stammes *C. tropicalis* H5343

Bislang ist der untersuchte *C. tropicalis* Stamm H5343 (ATCC 20962) in Deutschland S2 klassifiziert. Nach umfangreicher Literaturrecherche konnte die Isolierung des Ursprungsstamms von pK233 (ATCC 20336) und dessen Einstufung als *Candida tropicalis* im Jahr 1966 von Tanabe *et al.* nachgewiesen werden. Seitdem werden sowohl der Ursprungsstamm als auch die davon abgeleiteten Mutanten wie ATCC 20913 und ATCC 20962 als *C. tropicalis* geführt. Bei der Erstellung der Veröffentlichung (1966) waren heute gängige Methoden zur Speziesbestimmung wie die DNA-Sequenzanalyse hochkonservierter Regionen nicht bekannt. Daraus ergaben sich grundlegende Hinweise, dass ATCC 20962 nicht mehr ausreichend klassifiziert bzw. charakterisiert ist und der Stamm wurde am Fraunhofer IGB mit aktuellen genetischen (Sequenzanalyse der ITS- und der D1-D2 Region) und der 18S-Region) sowie phänotypischen Methoden (Kohlenstoffassimilationstests) genauer untersucht. Unter Verwendung entsprechender Referenzstämmen in der ITS- und der D1-D2 Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass es sich bei H5343 nicht um ein *C. tropicalis* Isolat handelt. Für die D1-D2 Region von pK233 konnte die höchste Verwandtschaft zu *Candida aquae-texoris* ATCC 201456 und *Candida viswanathii* ATCC 22981 gezeigt werden. Auch bei Stammbaumanalyse der ITS-Region bildet ATCC 20962 wiederum ein eigenes unabhängiges Cluster weit entfernt von dem Referenz *Candida tropicalis*-Stamm ATCC 750.

Mittels umfangreicher Kohlenstoffassimilationstests (API ID32C, Firma BioMerieux) sollten diese Ergebnisse genauer verifiziert werden. Innerhalb der Testreihen mit 31 unterschiedlichen Kohlenstoffquellen wurde wiederum *Candida tropicalis* ATCC 750 als Referenz eingesetzt. H5343 zeigte im direkten Vergleich mit *Candida tropicalis* ATCC 750 8 Unterschiede bei der Substratverwertung. Die durch die Sequenzierung der D1-D2 Region identifizierten nahen Verwandten *Candida aquae-textoris* ATCC 201456 und *Candida viswanathii* ATCC 22981 unterschieden sich ebenfalls von ATCC 20962 bei 5 Substraten. Die Ergebnisse der Stammbaumanalyse und der Kohlenstoffassimilationstests bestätigen die Annahme, dass es sich bei H5343 nicht um ein *C. tropicalis*-Isolat, sondern um einen bisher nicht beschriebenen Organismus handelt. Die Arbeiten zu den phylogenetischen Untersuchungen für den DCA-Bildner *C. tropicalis* H5343 wurden zur Veröffentlichung eingereicht. Die Umbenennung in von H5343 zu *Candida cenacerosene* wurde offiziell bestätigt. Derzeit werden weitere Versuche durchgeführt um die Pathogenität von *C. cenacerosene* zu prüfen und eine Rückstufung in Deutschland von S2 auf S1 zu erzielen.

3.5.10 ω -Funktionalisierung mittels *C. tropicalis* (Fraunhofer IGB)

Für eine Herstellung von DCA-Probemengen für verschiedene Projektpartner wurde der S2- und DCA-Produktionsstamm *C. tropicalis* H5343 im Bioreaktor kultiviert und die Fermentation hinsichtlich Medium und Biomasseproduktion optimiert. Die Fermentation wird zweistufig geführt und ist in eine Wachstums- und eine Produktionsphase unterteilt. Während der Wachstumsphase wurde Glukose vorgelegt und die Biomassebildung bei pH 5,5 und 30 °C verfolgt. Zur Erhöhung der Biomassemenge wurden Glukose und weitere Nährmediumskomponenten mit unterschiedlichen Zufütterungsstrategien zugegeben. Nach Verbrauch der Glukose wurde die Produktionsphase gestartet. Der pH-Wert wurde dabei auf 8,0 eingestellt, eine geringe Glukosezugabe erfolgte, ebenso wie die Substratzugabe (Fettsäure) für die DCA-Bildung. Die Zugabe von Glukose wurde so eingestellt, dass sich diese im Medium nicht anreicherte, Glukose diente zur Aufrechterhaltung des Erhaltungsstoffwechsels der Zellen, da diese nicht in der Lage sind, Fettsäuren als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Mit einer Menge von 0,88 g Glukose pro Gramm Biomasse pro Tag konnte im eigenen Experiment die höchste DCA-Konzentration und die höchste spezifische DCA-Bildungsrate erreicht werden.

3.5.10.1 Vergleich von Komplexmedium und Mineralsalzmedium

In früheren Experimenten wurde zur Etablierung der Fermentation in Komplexmedium nach Picataggio *et al.* verwendet und als Fettsäuresubstrat Ölsäuremethylester (aus Rapsöl) eingesetzt¹⁵¹. Für eine bessere Aufreinigung der DCA wurde angestrebt, die Fermentation statt auf Komplexmedium (enthält komplexe Bestandteile wie Hefeextrakt und Pepton) auf Mineralsalzmedium zu kultivieren. Die DCA-Produktion wurde hinsichtlich der spezifischen DCA-Bildungsraten (DCA-Bildung pro Zeit und Biomasse) verglichen, da nach Verbrauch der Glukose in Mineralsalzmedium deutlich weniger Zellen vorlagen als im Komplexmedium.

¹⁵¹ Picataggio *et al.* (1992), Nature Biotechnology, 10 (8), 894.

Es ergaben sich die gleichen spezifischen Produktbildungsrate q_P in Komplex- und Mineralsalzmedium (siehe Abbildung 160). Die Konversionsrate des Biokatalysators war demzufolge unabhängig vom Nährmedium. Mineralsalznährmedium kann damit als effektives Medium für die Herstellung der langkettigen DCA verwendet werden.

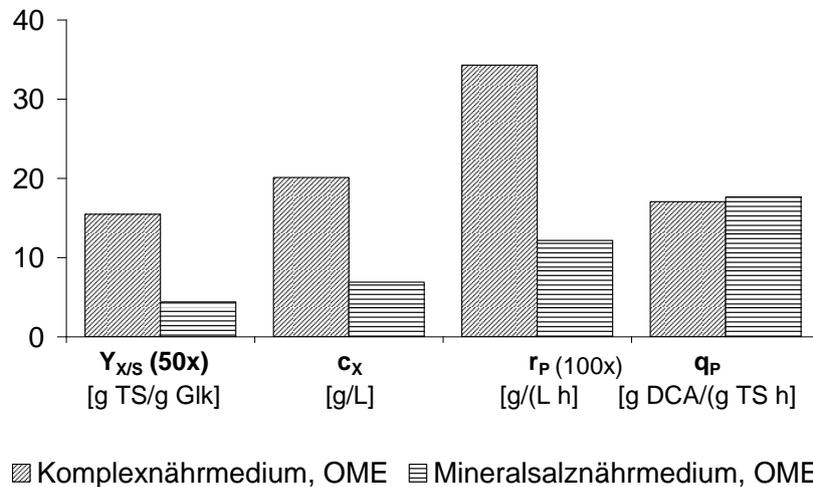


Abbildung 160: Vergleich DCA-Bildung in Komplex- und Mineralsalzmedium.

3.5.10.2 Zufütterungsstrategien

Anhand der spezifischen Produktbildungsrate konnte bereits bei der Übertragung von Komplex- auf Mineralsalzmedium der Zusammenhang zwischen Biomasse und Produktbildung gezeigt werden. Dies wird auch aus Abbildung 161 deutlich, in der die Abhängigkeit der Produktbildungsrate von der Biomassekonzentration aufgezeigt wird. Zur Erhöhung der DCA-Produktion wurde daher das Wachstum der Mikroorganismen durch unterschiedliche Feed-Strategien in Mineralsalzmedium optimiert. Es wurden folgende Feed-Strategien untersucht:

- Absatzweiser Prozess (Batch)
- Repeated Batch
- Zulaufverfahren (Fed Batch) mit konstanter Flussrate und Zulaufverfahren (Fed Batch) mit konstanter Wachstumsrate

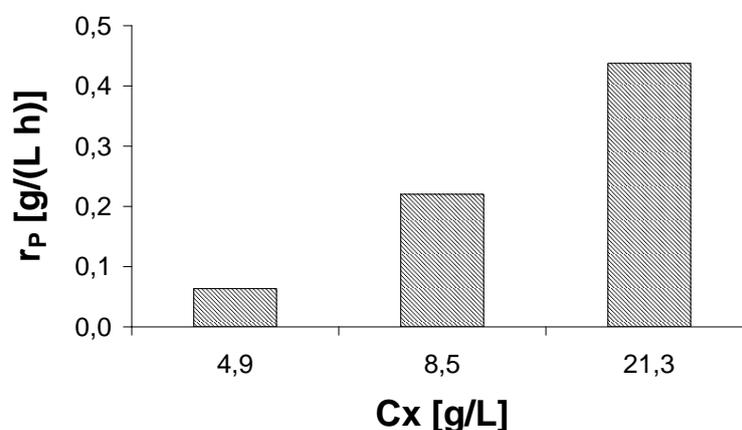


Abbildung 161: Abhängigkeit der DCA-Bildungsrate von der Biomasse.

Höchste Biomassekonzentrationen konnten in den Fed Batch-Verfahren erzielt werden. Beim Fed Batch-Verfahren mit konstanter Zuflussrate von 0,12 L/h konnte im 20-L-Maßstab eine Biomassenkonzentration von 32 g TS/L nach 22 h erhalten werden. Beim Zulaufverfahren mit exponentieller Flussrate konnte sogar eine Biomassekonzentration von 40 g TS/L nach bereits 15 h erreicht werden. Neben der höheren Biomasseausbeute ist dieses Verfahren zudem für ein Hochzelldichteverfahren effizienter als der Fed Batch mit konstanter Flussrate, da die Wachstumsrate konstant gehalten wird und sich nicht aufgrund der konstanten Zuflussrate gegen Null nähert.

3.5.10.3 Einfluss der Stickstoffquelle auf die DCA-Produktion

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Auslegung des Mediums als Zulauf für die Produktionsphase war die Stickstoffquelle. Es konnte festgestellt werden, dass die Dicarbonsäurebildungsrate stark von der im Bioreaktor befindlichen Ammonium- bzw. Stickstoffkonzentration abhing. Sowohl eine zu geringe als auch zu hohe Ammoniumkonzentration verursachte eine Abnahme der Produktbildungsrate (siehe Abbildung 162).

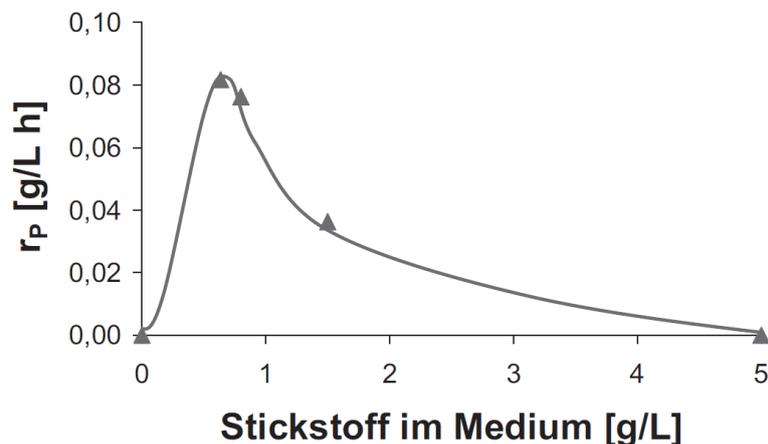


Abbildung 162: Abhängigkeit der DCA-Bildungsrate von der Stickstoffmenge im Medium.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Stickstoffkonzentration im Bioreaktor von 0,6 g/L zugegeben in Form von Ammoniumsulfat die höchste DCA-Bildungsrate zeigte. Das Ammoniumsalz wurde während der Produktionsphase mit einer spezifischen Rate von 0,47 mg N/(gTS h) zugegeben, um die Stickstoffkonzentration im Medium konstant zu halten. Der Verbrauch des Stickstoffs ist durch überlagerte Prozesse erklärbar. Zum einen wird der Stickstoff für die Proteinbildung benötigt, die auch während einer wachstumsentkoppelten Produktionsphase grundsätzlich erfolgen muss, wie z. B. Induktion und Bereitstellung der Transportproteine für Substrat, Enzyme der Stoffwechselwege zur Umsetzung der Fettsäure in DCA. Zudem wurde das Ammonium bei dem während der Produktionsphase verwendeten pH-Wert von 8 beim aeroben Betrieb als Ammoniak aus dem Fermenter herausgestrippt. Der Einsatz von undissoziierbaren Verbindungen wie beispielsweise Harnstoff kann diesen Effekt unterbinden. In Vorexperimenten konnte das Wachstum und die DCA von *C. tropicalis* auf Harnstoff als Stickstoffquelle bereits gezeigt werden. Der Einfluss auf die DCA-Produktionsrate wird noch untersucht.

3.5.10.4 Produktionsoptimierung

Aufgrund der vorhergehenden Untersuchungen wurde ein Fed Batch-Prozess zur Konversion von Olein (C18:1 Fettsäure) zu 1,18-Oktadecendisäure ausgelegt. Für Olein konnte somit in einem optimierten Prozess mit einer Produktbildungsrate von $r_p = 0,44 \text{ g/(L h)}$ ein stöchiometrischer Umsatz zu 100 g/L 1,18-Oktadecendisäure erhalten werden. In der Literatur ist die DCA-Bildung aus verschiedenen Substraten wie Alkanen und Fettsäuren beschrieben. Hohe Produktionsraten wurden bisher nur für Fettsäuren bis zu einer Kettenlänge von C14 beschrieben. Picataggio *et al.* erreichte in Komplexmedium maximale Produktionsraten von bis zu $1,33 \text{ g/(L h)}$ für Methylmyristat (C14). Kunishige *et al.* konnten die Bildung hydroxylierter Oktadecendisäure aus methylierter Ölsäure mit einer Produktbildungsrate von $0,02 \text{ g/(L h)}$ zeigen und Fabritius *et al.* produzierte aus Rapsöl hydroxylierte Oktadecendisäure mit einer Rate von $0,05 \text{ g/(L h)}$.

3.5.10.5 Aufreinigung der DCA

Ein zusätzlicher wichtiger Faktor bei der Prozessführung war die Berücksichtigung des Aufreinigungsverfahrens (downstream processing).

Für die Polymerisierung sind die Dicarbonsäuren vor allem von den Monocarbonsäuren bzw. Fettsäuren abzutrennen, um unerwünschte Nebenreaktionen zu unterbinden. Die Abtrennung stellt in der Regel einen sehr aufwendigen Prozess dar, somit wurde bereits während des Fermentationsprozess die Zugabe der Fettsäure (Ölsäure) so ausgelegt, dass diese im Bioreaktor nicht akkumuliert wurde.

Weitere Aufreinigungsstrategien wurden untersucht. In Vorexperimenten konnte mittels saurer Fällung keine zufriedenstellende Reinheit erreicht werden (10 % DCA-Gehalt), daher wurde eine Aufreinigung durch Lösemittlextraktion etabliert. Die DCA wurde mit den Zelltrümmern nach der Fermentation und Hitzesterilisation abzentrifugiert, mit Wasser resuspendiert und 0,1 Volumenanteil konzentrierter Salzsäure (32 %) zugegeben. Anschließend wurden 2 Volumenteile Extraktionsgemisch (1+1-Gemisch aus n-Hexan und tertiär-Butylmethylether) hinzugefügt und die Lösung mittels Rührung auf einer Magnetrührplatte zehn Minuten extrahiert. Durch Zentrifugation wurde die organische von der wässrigen Phase getrennt und die organische Phase eingeengt. Das erhaltene Extrakt wurde hinsichtlich der Zusammensetzung analysiert. Die Methode ermöglicht keine selektive Abtrennung von Ölsäure und 1,18-Oktadecendisäure aus der Fermentationslösung. Je nach Zusammensetzung der Fermentationsprobe schwankt der Gehalt an Ölsäure dabei im Extrakt bei verschiedenen Aufreinigungsversuchen bei Verwendung unterschiedlicher Fermentationsproben. Für Versuche zur Polymerisierung wurde die Proben „V7b“ (Ölsäuregehalt 9 %) und „V8-IGB“ (Ölsäuregehalt 2 %) an die Firma DRACOSA versendet (siehe Tabelle 82).

Tabelle 82: Übersicht der Proben aus Fermentationsproben aufgereinigter 1,18-Oktadecendicarbonsäure (DCA) und Ölsäure.

Probe	Originale Probe – Gehalt an		Extrahierte Probe – Gehalt an	
	Ölsäure	DCA	Ölsäure	DCA
V6 (F34AAP2)	1,2 %	7,1 %	14 %	86
V7b (F34AAP1)	0,6 %	6,5 %	9 %	91 %
V8-IGB (F35X1)	0,4 %	10,9 %	2 %	98 %

Des Weiteren wurde dem Fraunhofer ICT für weitere Aufreinigungsversuche die Probe „V6“ mit einem Ölsäuregehalt von 14 % geschickt. Durch Extraktion mit überkritischem CO₂ konnte der Gehalt an Ölsäure auf 5 % reduziert werden.

3.5.10.6 Substratscreening: Verwendung unterschiedlicher Fettsäurequellen

Neben dem in der Fermentation eingesetzten Olein als Substrat sollten in Schüttelkolbenexperimenten weitere Fettsäurequellen auf ihre Umsetzbarkeit mit *C. tropicalis* getestet werden.

Folgende freie Fettsäuren wurden als Substrat evaluiert:

- Linolsäure (C18:2)
- α-Linolensäure (C18:3)
- Erucasäure (C22:1)

Während der Produktionsphase wurde täglich Dünnschichtchromatographien (DC) durchgeführt, um die Kulturen auf die DCA-Bildung zu untersuchen.

Die Untersuchung der Linol- und α-Linolensäure war besonders interessant, da diese Fettsäuren mehr als eine Doppelbindung besitzen. Werden die korrespondierenden DCA dieser Fettsäuren als Monomere für die Kunststoffherstellung eingesetzt, so können an den Doppelbindungen Funktionalisierungen oder ein Cross-Linking vorgenommen werden.

Die DCA der Erucasäure ist aufgrund der zusätzlichen Kohlenstoffatome noch hydrophober als die 1,18-Octadecendisäure. Durch den Einsatz dieser Dicarbonsäure bei der Kunststoffherstellung könnten die hydrophoben Eigenschaften der entstehenden Polymere im Vergleich zur Verwendung der 1,18-ODDA noch weiter verstärkt werden.

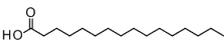
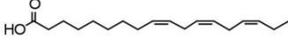
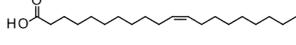
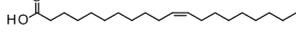
Zusätzlich zu den freien Fettsäuren wurde die Umsetzbarkeit von Fettsäuremethylestergemischen untersucht. Fettsäuremethylestergemische können relativ kostengünstig aus pflanzlichen Ölen gewonnen werden. Ein mögliches Verfahren, um Fettsäuremethylester aus den, in den Pflanzenölen enthaltenen, Triacylglyceriden zu gewinnen, stellt die säurekatalysierte Umesterung dar. Es wurde darauf geachtet, dass die entsprechenden Pflanzenöle nicht in Konkurrenz mit der Nahrungsmittelindustrie stehen.

Folgende Gemische wurden untersucht:

- Senfölmethylester
- Drachenkopfmethylester
- Holunderkernölmethylester

Die Fettsäuremethylestergemische enthalten jeweils unterschiedliche Fettsäuremethylester, abhängig davon welche Fettsäuren in den jeweiligen Pflanzenölen enthalten waren. Die genaue Zusammensetzung der Gemische kann Tabelle 83 entnommen werden.

Tabelle 83: Zusammensetzung der Fettsäuremethylestergemische. Die Daten wurden mittels Gaschromatographie am Fraunhofer IGB ermittelt.

Fettsäure	Senfölmethylester	Drachenkopfmethylester	Holunderkernölmethylester	
Palmitinsäure (C16:0)		3,2 %	9,1 %	9,3 %
Ölsäure (C18:1)		24,7 %	17,8 %	15,4 %
Linolsäure (C18:2)		9,8 %	17,9 %	44,7 %
α-Linolensäure (C18:3)		9,7 %	46,5 %	29,1 %
Gadoleinsäure (C20:1)		10,7 %	2,3 %	1,5 %
Erucasäure (C22:1)		39,1 %	3,2 %	0 %

Zusammenfassend konnten alle betrachteten Substrate mit *C. tropicalis* in DCA umgewandelt werden.

3.6 Prozessbewertung (KIT, InfraLeuna)

In diesem Kapitel werden die von den Projektpartnern entwickelten biokatalytischen und chemokatalytischen Umsetzungen der Öle, Ölsäuren, für eine großtechnische Umsetzung bewertet. Eine Übersicht der folgenden Kapitel ist nachfolgend dargestellt.

Ökonomische Bewertung

Zur Beurteilung der Wirtschaftlichkeit werden auf Basis der von den Projektpartnern zur Verfügung gestellten Prozessbilder zunächst Apparatenlisten erstellt. Anschließend erfolgt unter Berücksichtigung der Verarbeitungs- bzw. Produktkapazitäten für einen in Absprache mit den Projektpartnern festgelegten Basisfall die Schätzung der Investitionen mit techno-ökonomischen Methoden. Aus den Investitionen und den technischen Prozessdaten werden die einzelnen Kostenkomponenten abgeleitet und zu Herstellkosten für die einzelnen Prozesse und Hauptprodukte zusammengefasst. Die Annahme einer minimal notwendigen Gewinnmarge führt ferner zu Mindestabsatzpreisen. Die Rentabilität und damit wirtschaftliche Attraktivität des Betriebes von Produktionsanlagen kann mit Hilfe der Kapitalwertmethode auf Basis geschätzter Herstellkosten und angenommener Leistungen,

d.h. zu erzielender Erlöse, abgeschätzt werden. Aufgrund der Bewertung in einer frühen Entwicklungsphase und der Vielzahl an möglichen Produkten der Bioraffinerie ist die Abschätzung erzielbarer Erlöse und Kapitalwerte zum derzeitigen Stand der Entwicklung noch nicht möglich. Der Focus wird daher auf eine detaillierte Investitionsschätzung und Modellierung der Massen- und Energieflüsse als Grundlage für die Identifizierung von Schlüsselgrößen für die Bewertungen gelegt. Unsicherheiten und Variationen werden mit Szenario- und Sensitivitätsanalysen abgebildet.

Ökologische Bewertung

Im Rahmen der ökologischen Wirkungsabschätzung werden die Kategorien Klimawandel, Landnutzung, Versauerung, Eutrophierung und die Erschöpfung abiotischer Ressourcen (Klassifizierung mit der Methode des *Centrum voor Milieukunde, CML*, Universität Leiden) untersucht. Dafür sind Inventare der einzelnen Emissionen zu erstellen, die in den genannten Kategorien zusammen gefasst sind. Für Klimawandel sind dies beispielsweise primär Kohlendioxid, Methan und Lachgasemissionen. Für eine ökologische Bilanzierung wird auf vorhandene Inventare aus Datenbanken wie *ecoinvent* zurück gegriffen, die dann mit der Simulationssoftware *Umberto* verknüpft und den tatsächlichen Prozessbedingungen entsprechend angepasst und erweitert werden.

Soziale Bewertung

Effekte des Produktionsbetriebs hinsichtlich Arbeitsplatzschaffung, Arbeitsrisiken und Preiseffekten sind Teil der sozialen Bewertung. Direkte Arbeitsplatzeffekte lassen sich unmittelbar aus den Personalbedarfen für den Bau und Betrieb der Anlagen ableiten. Zur Abschätzung indirekter Arbeitsplatzeffekte werden volkswirtschaftliche Multiplikatoren eingesetzt. Arbeitsrisiken sind wesentlich durch Sicherheitsaspekte der Prozesse bestimmt (z.B. Gefährlichkeit der Einsatzstoffe, Temperatur- und Druckbereiche), die jeweils geeigneten Kategorien zugeordnet werden müssen. Bei der Untersuchung von Preiseffekten werden ausgehend von der Größe des Rohstoffbedarfs und unter Berücksichtigung der geographischen Ausgestaltung der Bereitstellungsketten potenzielle regionale und gegebenenfalls überregionale Auswirkungen identifiziert und analysiert.

Bewertete Prozesse

Es werden für folgende Prozesse Bewertungen durchgeführt:

- Enzymatische Epoxidierung
- Enzymherstellung für die Epoxidierung
- Fermentierung zu Dicarbonsäuren
- Chemokatalytische Metathese
- Aminierung von Glycerin
- Umesterung zur Abschätzung der Preise von FAME und Ölsäuren

Weitere Prozesse werden aufgrund des sehr frühen Entwicklungsstands noch nicht in die Bewertung aufgenommen.

3.6.1 Ökonomische Bewertung der Prozesse

Für die ökonomische Bewertung der Prozesse werden jeweils die Verfahren kurz beschrieben und die Prozessannahmen für die großtechnische Umsetzung getroffen. Anschließend wird eine Investitionsschätzung vorgenommen. Für die Schätzung der Herstellkosten werden investitionsabhängige Kosten aus der Investitionsschätzung berechnet, Mengen der Roh- und Betriebsstoffe sowie Energiebedarfe pro Jahr auf Basis der Stoffflüsse erfasst und deren Kosten bestimmt, und die Personal- und sonstigen Kosten berechnet. Der Personalbedarf wird so abgeschätzt, dass angenommen wird, dass die Mitarbeiter mehrere Prozesse betreuen, und je nach Prozessdurchführung (kontinuierlich, Batch) und Prozessdauer (z.B. Fermentationsdauer) eingeplant werden (Schätzung, keine Optimierung berechnet).

3.6.1.1 Enzymatische Epoxidierung

Bei der enzymatischen Epoxidierung werden Doppelbindungen der Pflanzenöle (Triglyceride) epoxidiert. Dazu wird das Pflanzenöl und kleine Mengen an Fettsäuren mit Wasserstoffperoxid und Enzymen versetzt. Als Lösungsmittel kommt im Basisfall Toluol zum Einsatz. Die Epoxidierung wird als Batch-Prozess durchgeführt, deren Verweildauer im Fermenter 10 Stunden beträgt. Das Reaktionsgemisch wird zur Rückgewinnung der Enzyme filtriert und anschließend zur Abtrennung der wässrigen Phase (Wasser und Wasserstoffperoxid) dekantiert. Weiteres Wasserstoffperoxid wird durch Zugabe von Natriumcarbonat oder Wasser in einem Mixer entfernt. Anschließend wird das Lösemittel mittels Vakuumdestillation entfernt und aus dem Sumpf das Produkt Triglyceridepoxide gewonnen.

Für die großtechnische Realisierung wird für den Basisfall eine Kapazität von 2000 t Produkt pro Jahr angenommen und Öl 1 als Rohstoff eingesetzt. Ferner wird angenommen, dass ein Batch mit Aufbereitung an einem Arbeitstag durchgeführt werden kann und dabei 8,48 t produziert werden können. Pro Jahr werden 236 Arbeitstage benötigt. Die Enzyme haben eine angenommene Wiederverwendbarkeit von 15 Zyklen.

Investitionsschätzung

Die Schätzung der Investitionshöhe für die Hauptkomponenten der Anlagen erfolgt anhand des Fließbildes und der Größe der Stoffflüsse (siehe Abbildung 103). Tabelle 84 zeigt aggregiert die benötigten Hauptanlagenapparate und die Investitionshöhe nach Preisanpassung auf das Jahr 2011 und Größendegression auf die benötigte Anlagengröße.

Tabelle 84: Investitionsschätzung der Hauptanlagenapparate der enzymatischen Epoxidierung.

Anlagenapparate	Quelle	Investition
Lagertanks für Edukte und Produkt	Peters et al. (2003)	214 k€
Reaktor mit Rührer	Chauvel (2003)	264 k€
Enzymrückgewinnung (crossflow membrane)	Peters et al. (2003)	4,5 k€
Dekanter	Chauvel (2003)	113 k€
Mixer-Settler	Chauvel (2003)	147 k€
Destillationskolonne mit Kocher und Kondensator	eigene Modellierung in ASPEN PLUS mit Cost evaluator	147 k€
Pumpen	Peters et al. (2003)	84 k€
Investition Hauptanlagenteile		972 k€

Neben den Investitionen für die Hauptkomponenten der Anlage werden weitere Investitionen (z.B. Nebenkomponenten, Engeneering) nach der Zuschlagfaktormethode nach (Peters, Timmerhaus, & West, 2003) berechnet (siehe Tabelle 85). Diese Zuschlagfaktoren werden für alle weiteren Prozesse ebenfalls verwendet.

Tabelle 85: Zuschlagfaktoren zur Investitionsschätzung.

	Zuschlagsfaktor
Installation	0,400
Rohrleitungen (installiert, fest und flüssig)	0,310
Dämmung (Apparate, Maschinen und Rohrleitungen)	0,085
Prozessleittechnik (installiert)	0,260
Elektrische Systeme (installiert)	0,225
Gebäude (neue Einheit in bestehender Anlage, fest und flüssig)	0,290
Geländeanpassung	0,100
Direkte Komponenten (Installation, Rohre, Gebäude, etc.)	2,670
Enginnering und Überwachung	0,300
Rechtliche Angelegenheiten	0,080
Konstruktion	0,400
Aufschlag Auftragnehmer (Contractor's fee)	0,080
Unsicherheit	0,300
Indirekte Komponenten (Engineering, Rechte, Unsicherheit, etc.)	1,160
Summe Zuschlagfaktoren (Investition Inside Battery Limits (FCI))	3,830

Für die enzymatische Epoxidierung ergeben sich für den Basisfall nach Zuschlag für direkte und indirekte Komponenten **Investitionen in Höhe von 3,7 Mio. €** (FCI¹⁵²), inkl. Umlaufkapital von 20 % ergeben sich 4,5 Mio. € (TCI¹⁵³).

Schätzung der Herstellkosten

Die Abschätzung der Herstellkosten für den Basisfall setzt sich aus folgenden Kosten zusammen:

Investitionsabhängige Kosten:

Die investitionsabhängigen Kosten werden nach der Faktormethode (Peters, Timmerhaus, & West, 2003) bestimmt (siehe Tabelle 86).

Tabelle 86: Faktoren zur Bestimmung der investitionsabhängigen Kosten.

Investitionsabhängige Kosten (pro Jahr)	Faktor
Abschreibungen (auf FCI)	0,10
Reparatur und Instandhaltung (auf TCI)	0,07
Versicherungen (auf TCI)	0,01
Realsteuern (auf FCI)	0,01
Kalkulatorische Zinsen	0,04

Für die enzymatische Epoxidierung im Basisfall betragen die investitionsabhängigen Kosten 871 k€ pro Jahr,

Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten:

In Tabelle 87 werden die jährlichen Mengen der Roh- und Betriebsmittel sowie deren Preisannahmen aufgelistet.

¹⁵² Fixed capital investment

¹⁵³ Total capital investment

Tabelle 87: Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten der enzymatischen Epoxidierung (Basisfall).

	jährl, Mengen	Preisannahmen
Rohstoffe		
Öl 1	1888 t/a	1,30 €/kg
H ₂ O ₂	1199t/a	455 €/t (50% ig)
Sekundäre Einsatzstoffe		
Enzyme	5340 kg/a	141 €/kg ¹⁵⁴
Lösemittel	54 t/a	600 €/g
Ölsäure	215 t/a	1442 €/t
Energie		
Dampf (Destillationskolonne)	2997 t/a	
Strom (Rührer + Pumpen)	89 MWh/a	
Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten		4,18 Mio. €/a

Die Kosten für Rohstoffe, Betriebsstoffe und Energie belaufen sich auf ca. 4,18 Mio. € pro Jahr.

Personalkosten:

Es wird ein Personalbedarf von drei Angestellten à 100.000 €/a angenommen. Indirekte Personalkosten werden faktoriell mit dem Faktor 0,1 der direkten Personalkosten berechnet. Direkte und indirekte Personalkosten betragen 330 k€/a.

Sonstige Kosten und Overheadkosten

Sonstige Kosten entstehen durch Verwaltung und Vertrieb, die mit dem Faktor 0,2 der Personalkosten und 0,02 der Summe aus investitionsabhängigen, betriebsmittelverbrauchsabhängigen und Personalkosten berechnet werden (respektive). Die sonstigen Kosten betragen für den Basisfall der enzymatischen Epoxidierung 178 k€ pro Jahr. Als Overheadkosten wird ein Faktor von 0,05 auf die Summe der Personalkosten und betriebsmittelverbrauchsabhängigen Kosten angenommen. Für den Basisfall der enzymatischen Epoxidierung betragen die Overheadkosten 225 k€.

Die jährlichen Herstellkosten nach Summierung der Kostenarten betragen für den Basisfall der enzymatischen Epoxidierung rund 5,8 Mio. € pro Jahr. Bei einer Jahresproduktion von 2000 t Epoxiden pro Jahre betragen die Herstellkosten ca. **2,89 € pro kg Produkt**. Den größten Anteil der Herstellkosten nehmen mit 42 % die Kosten für Öl 1 ein, gefolgt von den investitionsabhängigen Kosten (15 %).

¹⁵⁴ Preisannahme basierend auf Bewertung der Herstellung von Enzymen, vgl. folgende Prozessbewertung

Verfahrensvarianten

Für die enzymatische Epoxidierung liegen weitere Daten für Verfahrensvarianten vor und konnten bewertet werden. Dazu werden jeweils die Investitionen und die jährlichen Betriebsmittelbedarfe angepasst. In Tabelle 88 sind die betrachteten Verfahrensalternativen aufgelistet und die Herstellkosten bei Öl 1 als Rohstoff angegeben. In der lösemittelfreien Prozessvariante können v.a. investitionsabhängige Kosten eingespart werden, da die destillative Abtrennung von Toluol und Kosten für Toluol wegfallen. Die lösemittelfreie Umsetzung verringert etwas die Ausbeute, mit einer längeren Verweilzeit könnte dies ausgeglichen werden. Eine längere Verweilzeit erhöht allerdings die Investitionen, v.a. da ein größerer Reaktor bei gleichbleibender Output-Kapazität notwendig ist.

Tabelle 88: Herstellkosten für Verfahrensalternativen der enzymatischen Epoxidierung von Öl 1.

Szenario	Herstellkosten [€/kg]
Basisfall	2,89
mit 50 %-igem H ₂ O ₂	2,88
lösemittelfrei	2,78
lösemittelfrei, doppelte Verweilzeit	3,03

3.6.1.2 Enzymherstellung für die Epoxidierung

Für die Enzymproduktion werden in einem Batch-Verfahren die Enzyme intrazellulär produziert. Die Biomasse wird anschließend abgetrennt, gepuffert und die Zellen in einem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Nach Freisetzung der Enzyme mit einem Hilfsdetergens werden die Enzyme in einer Hitzefällung ausgefällt und immobilisiert/getrocknet (siehe Abbildung 163). Die Stoffflüsse, Fließbilder und Prozessannahmen entstanden in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer CBP.

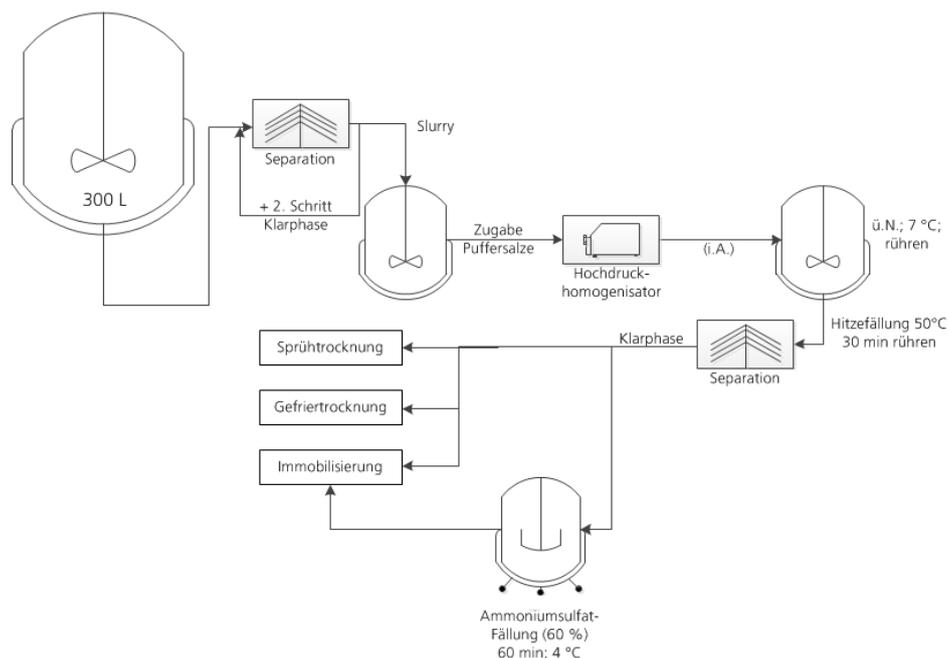


Abbildung 163: Prozessflussbild der Herstellung von Enzymen für die Epoxidierung (Quelle: Fraunhofer CBP).

Für die enzymatische Epoxidierung werden 5,34 t Enzyme pro Jahr benötigt. Es wird angenommen, dass dies der Jahresproduktionsmenge der Enzymherstellung entspricht. Ferner wird angenommen, dass ein Batch pro Tag mit Aufarbeitung durchführbar ist und 21,4 kg Enzyme produziert werden können. Es werden 250 Arbeitstage veranschlagt.

Investitionsschätzung

Tabelle 89 listet die Investitionen für die aggregierten Hauptkomponenten der Anlage auf. Die Schätzung der Investition für die Hauptanlagenteile beträgt 218 k€. Die Gesamtinvestitionen (Faktormethode, siehe Tabelle 85) ergeben **835 k€** (FCI), bzw. 1,0 Mio. € inkl. Umlaufkapital (TCI).

Tabelle 89: Investitionsschätzung der Hauptanlagenapparate für die Enzymproduktion.

Anlagenapparate	Quelle	Investition
Fermenter	Chauvel (2003)	77 k€
Rotary Drum Filter	Peters et al. (2003)	16 k€
Mix-Tank	Chauvel (2003)	47 k€
Hochdruckhomogenisator	Peters et al. (2003)	78 k€
Investition Hauptanlagenteile		218 k€

Schätzung der Herstellkosten

Die Schätzung der Herstellkosten erfolgt analog zur enzymatischen Epoxidierung (Kapitel 3.6.1.1). Die investitionsabhängigen Kosten belaufen sich auf rund 300 k€ pro Jahr.

Die jährlich benötigten Roh- und Betriebsstoffe werden in Tabelle 90 zusammengefasst. Die betriebsmittelverbrauchsabhängigen Kosten belaufen sich auf 298 k€ pro Jahr (siehe Tabelle 90).

Tabelle 90: Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten der Enzymproduktion.

	jährl. Mengen	Preisannahmen
Rohstoffe und Sekundäre Einsatzstoffe		
Komponente 1	19,0222 t/a	750 €/t
Komponente 2	0,2336 t/a	500 €/t
Komponente 3	3,9246 t/a	1782 €/t
Komponente 4	0,0467 t/a	500 €/t
Komponente 5	0,0467 t/a	2000 €/t
Komponente 6	n.e.	
Komponente 7	n.e.	
Komponente 8	33,3723 t/a	7490 €/t
Komponente 9	0,0445 t/a	3000 €/t
Komponente 10	0,5607 t/a	1782 €/t
Komponente 11	1,8689 t/a	4000 €/t
Komponente 12	33,7328 t/a	500 €/t
Komponente 13	1,6371 t/a	500 €/t
Energie		
Strom (Rührer + Pumpen)	129 kWh/a	
Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten		298 k€/a

n.e.: nicht erfasst

Für den Personalbedarf werden zwei Angestellte angenommen. Direkte und indirekte Personalkosten betragen 220 k€ pro Jahr. Sonstige Kosten und Overhead belaufen sich auf 57 und 26 k€ pro Jahr.

Es ergeben sich **Herstellkosten von 141 € pro kg Enzyme.**

3.6.1.3 Fermentierung zu Dicarbonsäuren

Die Fermentierung von Fettsäuren zu Dicarbonsäuren (ω -Funktionalisierung) wird als Fed-Batch durchgeführt. Dazu wird zunächst eine Impfkaskade in 5 Rührkesseln (6 L bis 60 m³) durchgeführt. Die eigentliche Fermentation findet anschließend mit einem Gesamt-Arbeitsvolumen von 1000 m³ in 7 Hauptfermentern mit einem jeweiligen Volumen von 160 m³ und einer Verweilzeit von 16 Tagen statt. Anschließend wird die Biomasse abgetrennt und die in Lösung befindlichen Dicarbonsäuren durch Säure ausgefällt. Die ausgefällten Dicarbonsäuren werden abgetrennt und getrocknet (siehe Abbildung 164).

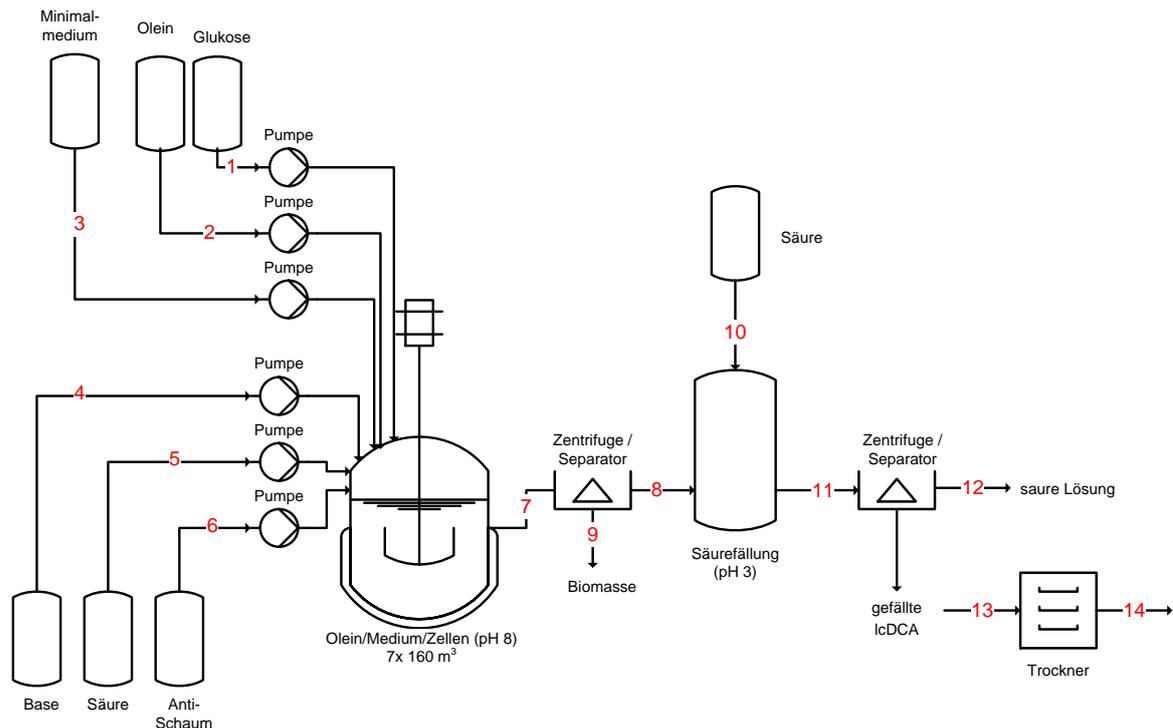


Abbildung 164: Prozessfließbild der Dicarbonsäurefermentation (Quelle: Fraunhofer IGB).

Es wird eine Jahresproduktion von 1000 t Dicarbonsäuren pro Jahr angenommen und 250 Arbeitstage pro Jahr. Es wird angenommen, dass ein Batch mit Aufbereitung 26 Tage dauert. Pro Jahr werden 12,5 Batches durchgeführt. Für den Basisfall wird Ölsäure als Rohstoff angenommen. Die Stoffflüsse, Fließbilder und Prozessannahmen entstanden in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer IGB.

Investitionsschätzung

Für die Schätzung der Investitionen für die Hauptanlagenkomponenten wird angenommen, dass die Fällung im Reaktor stattfinden kann, für die Abtrennung der Feststoffe kann jeweils die gleiche Zentrifuge eingesetzt werden. Die Investitionen für die Hauptanalgenteile wird auf 2,2 Mio. € geschätzt.

Tabelle 91: Investitionsschätzung der Hauptanlagenapparate für die Dicarbonsäurefermentation.

Anlagenapparate	Quelle	Investition
Lagertanks für Edukte und Produkt	Peters et al. (2003)	376 k€
Reaktoren (7 je 160 m ³) mit Rührer	Chauvel (2003)	1.699 k€
Impfkaskade (Rührkessel)	Chauvel (2003)	480 k€
Zentrifuge	Peters et al. (2003)	217 k€
Pumpen	Peters et al. (2003)	119 k€
Investition Hauptanalgenteile		2.891 k€

Nach dem faktoriellen Zuschlag für die weiteren Investitionen (siehe Tabelle 85) ergeben sich **Gesamtinvestitionen von 11 Mio. €** (FCI), inkl. Umlaufkapital 13,8 Mio. € (TCI).

Schätzung der Herstellkosten

Die Schätzung der Herstellkosten erfolgt analog zur enzymatischen Epoxidierung (Kapitel 3.6.1.1). Die investitionsabhängigen Kosten belaufen sich auf rund 2,2 Mio. € pro Jahr.

Die jährlich benötigten Roh- und Betriebsstoffe werden in Tabelle 92 zusammengefasst. Die betriebsmittelverbrauchsabhängigen Kosten betragen rund 3,7 Mio. € pro Jahr (siehe Tabelle 92).

Tabelle 92: Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten der Dicarbonsäurefermentation.

	jährl, Mengen	Preisannahmen
Rohstoffe		
Ölsäure	2313 t/a	1442 €/t
Glukose	250 t/a	465 €/t
Sekundäre Einsatzstoffe		
Nährmediumsbestandteile	120 t/a	1000 €/t
Säure	n. e.	
Base	n. e.	
Antischaummittel	n. e.	
Energie		
Strom (Rührer + Pumpen)	676 MWh/a	
Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten		3,67 Mio. €/a

n.e.: nicht erfasst

Für den Personalbedarf werden drei Angestellte angenommen. Direkte und indirekte Personalkosten betragen 330 k€ pro Jahr. Sonstige Kosten und Overhead belaufen sich auf 194 und 200 k€ pro Jahr.

Es ergeben sich **Herstellkosten von 6,62 € pro kg Dicarbonsäure**. Die höchsten Kosten werden durch die Rohstoffkosten für Ölsäure verursacht (50 % der Herstellkosten). Die investitionsabhängigen Kosten nehmen 28 % der Herstellkosten ein.

3.6.1.4 Chemokatalytische Metathese

Bei der chemokatalytischen Metathese werden aus Fettsäuremethylestern Dimethylester (methylierte Dicarbonsäuren) und den Fettsäurelängen entsprechende langkettige Kohlenwasserstoffe mit Doppelbindung (z.B. bei Ölsäure Octadecen) mit Hilfe eines Katalysators gebildet. Das Verfahren wird als Batch-Prozess (siehe Abbildung 165) durchgeführt mit einer Reaktoraufenthaltsdauer von 2 Stunden. Die Aufreinigung des Reaktionsgemisches erfolgt mittels mehrerer Destillationen. Nichtreagierte FAME werden rückgeführt. Die Stoffflüsse, Fließbilder und Prozessannahmen entstanden in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer ICT.

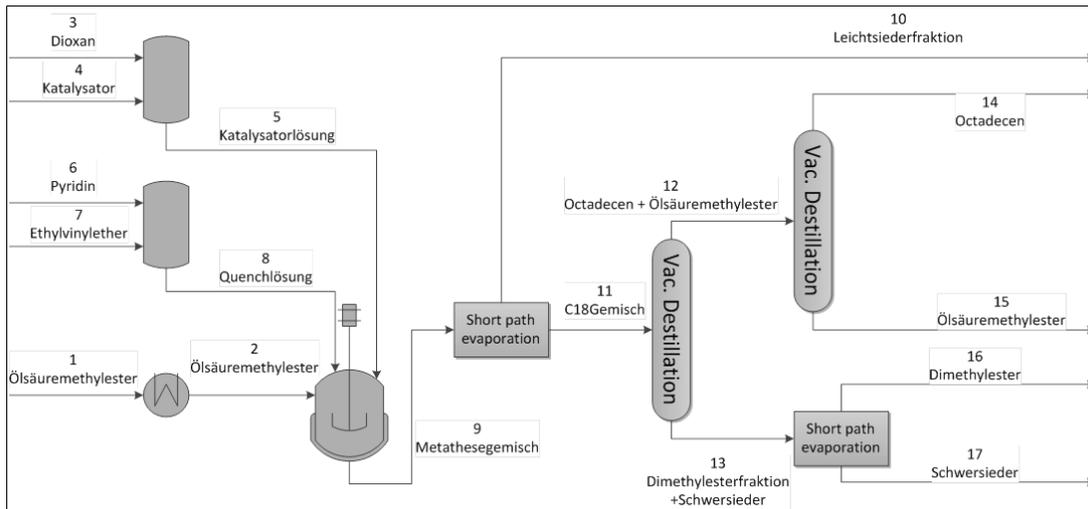


Abbildung 165: Prozessfließbild der Metathese (Quelle: Fraunhofer ICT).

Im Basisfall kommt als Rohstoff Ölsäuremethylester zum Einsatz. Es wird ein Jahresinput von 2000 t FAME angenommen mit einem Jahresoutput (En und Dimethylester) von 938 t für den Basisfall (393,5 t/a En und 544,5 t/a Dimethylester). Es werden zwei Batches pro Tag durchgeführt bei 250 Produktionstagen pro Jahr.

Investitionsschätzung

Tabelle 93 listet die Investitionen für die aggregierten Hauptkomponenten der Anlage auf. Die Schätzung der Investition für die Hauptanlagenteile der Metathese beträgt 722 k€. Die Gesamtinvestitionen (Faktormethode, siehe Tabelle 85) ergeben **2,8 Mio. €** (FCI), bzw. 3,3 Mio. € inkl. Umlaufkapital (TCI).

Tabelle 93 Investitionsschätzung der Hauptanlagenapparate der chemokatalytischen Metathese.

Anlagenapparate	Quelle	Investition
Lagertanks für Edukte und Produkt	Peters et al. (2003)	109 k€
Reaktor mit Rührer	Peters et al. (2003)	71 k€
Wärmetauscher	Peters et al. (2003)	71 k€
Destillationskolonnen mit Kocher und Kondensator	eigene Modellierungen in ASPEN PLUS mit Cost evaluator	383 k€
Pumpen	Peters et al. (2003)	89 k€
Investition Hauptanlagenteile		722 k€

Schätzung der Herstellkosten

Die investitionsabhängigen Kosten betragen 555 k€ pro Jahr. Die betriebsmittelverbrauchsabhängigen Kosten betragen 2637 k€ pro Jahr (zugrunde gelegte Stoff- und Energiebedarfe und Preisannahmen siehe Tabelle 94). Für den Personalbedarf werden 3 Angestellte angenommen. Personalkosten, Overheadkosten und sonstige Kosten belaufen sich auf 330 k€, 148 k€ und 139 k€ pro Jahr.

Tabelle 94: Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten der Metathese.

	jährl, Mengen	Preisannahmen
Rohstoffe		
Ölsäuremethylester	1014 t/a	2000 €/t
Sekundäre Einsatzstoffe		
Dioxan	23 t/a	1725 €/t
Katalysator	550 kg/a	550 €/kg
Pyridin	5,3 t/a	4500 €/t
Ethylvinylether	4,9 t/a	1500 €/t
Energie		
Dampf	5958 t/a	
Kühlwasser	842 m ³ /a	
Strom (Rührer + Pumpen)	10 MWh/a	
Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten		2,6 Mio. €/a

Die **Herstellkosten für beide Hauptprodukte betragen 3,76 €/kg**. Wird eine Massenallokation der Herstellkosten angenommen, betragen die Herstellkosten für das Alken 1,58 €/kg und für die Dimethylester 2,18 €/kg. 53 % der Herstellkosten sind bedingt durch den Rohstoff Ölsäuremethylester gefolgt von 15 % für investitionsabhängige Kosten und 7 % für Personalkosten.

3.6.1.5 Aminierung von Glycerin

Bei der Aminierung von Glycerin wird chemokatalytisch DMA-Aceton hergestellt. Ein Wasser-Glycerin-Gemisch (40 w.-% Glycerin) wird mit DMA versetzt und reagiert mit Hilfe eines Katalysators zu DMA-Aceton. Das Reaktionsgemisch wird destillativ in mehreren Stufen aufgetrennt. Nicht reagierte Einsatzstoffe werden in den Prozess rückgeführt (Fließbild siehe Abbildung 166). Es wird angenommen, dass der Prozess kontinuierlich gefahren wird. Es wird eine Ausbeute von 33 % angenommen mit einer Selektivität von 90 %. Das Fließbild, die Prozessannahmen (Ausbeuten, Selektivität, Mischungsverhältnisse) und die Berechnung der Stoffflüsse entstanden in Absprache mit Taminco.

Es wird eine Kapazität von 5000 t DMA-Aceton pro Jahr angenommen bei 7000 Betriebsstunden pro Jahr.

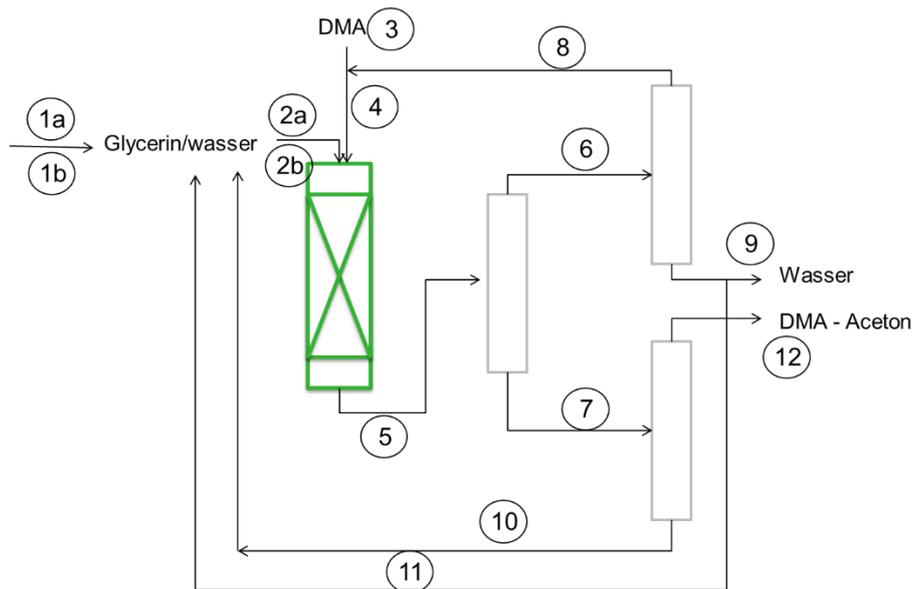


Abbildung 166: Prozessfließbild der Aminierung von Glycerin (Quelle: Taminco, angepasst KIT).

Investitionsschätzung

Tabelle 95 listet die Investitionen für die aggregierten Hauptkomponenten der Anlage auf. Die Schätzung der Investition für die Hauptanlagenteile der Aminierung von Glycerin beträgt 1822 k€. Die Gesamtinvestitionen (Faktormethode, siehe Tabelle 85) ergeben **7,0 Mio. €** (FCI), bzw. 8,4 Mio. € inkl. Umlaufkapital (TCI).

Tabelle 95 Investitionsschätzung der Hauptanlagenapparate der chemokatalytischen Aminierung von Glycerin.

Anlagenapparate	Quelle	Investition
Lagertanks für Edukte und Produkt	Peters et al. (2003)	513 k€
Reaktor (Gasphase)	Peters et al. (2003)	460 k€
Wärmetauscher	Peters et al. (2003)	165 k€
Destillationskolonnen	eigene Modellierungen in ASPEN PLUS mit Cost evaluator	159 k€
Wasseraufbereitung	Peters et al. (2003)	
Pumpen	Peters et al. (2003)	307 k€
Investition Hauptanlagenteile		1822 k€

Schätzung der Herstellkosten

Die investitionsabhängigen Kosten betragen 1633 k€ pro Jahr. Die betriebsmittelverbrauchsabhängigen Kosten betragen 9573 k€ pro Jahr (zugrunde gelegte Stoff- und Energiebedarfe und Preisannahmen siehe Tabelle 96). Für den Personalbedarf werden 5 Angestellte angenommen. Personalkosten, Overheadkosten und sonstige Kosten belaufen sich auf 550 k€, 588 k€ und 357 k€ pro Jahr.

Tabelle 96: Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten der Aminierung von Glycerin.

	jährl, Mengen	Preisannahmen
Rohstoffe		
Glycerin	5060 t/a	750 €/t
DMA	2475 t/a	1590 €/t
Katalysator	892 kg/a	700 €/kg
Energie		
Dampf	47236 t/a	
Kühlwasser	261 Tm ³ /a	
Strom (Rührer + Pumpen)	2149 kWh/a	
Betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten		9,57 Mio. €/a

Es ergeben sich **Herstellkosten von 2,54 € pro kg DMA-Aceton**. 30 und 31 % der Herstellkosten entstehen durch Kosten für Glycerin und DMA. 76 % der Herstellkosten sind betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten (9 % Energiekosten), 13 % investitionsabhängige Kosten und 4 % Personalkosten.

3.6.1.6 Umesterung

Die Umesterung wird zur Abschätzung von Preisen für Fettsäuren und –methylestern aus Drachenkopföl, Krambeöl und Erucarapsöl durchgeführt, für die keine Marktpreise existieren. Für diese Öle lagen sowohl Preise (Info TLL) als auch die Fettsäurezusammensetzung (Info Fraunhofer IGB) vor, die für die Berechnungen notwendig sind. Die Bewertung basiert auf Literaturdaten für eine alkalisch-katalysierte Biodieselproduktion nach (West, Posarac, & Ellis, 2008). Es werden zunächst die Literaturdaten für einen Basisfall angepasst. Dazu werden 7920 Betriebsstunden pro Jahr mit einer Kapazität von 7941 t Fettsäuremethylester (FAME) (aus Literautr) pro Jahr und Sonnenblumenöl als Rohstoff (in Literatur Speiseölabfälle) angenommen. Es wird eine Anpassung der Preise für Investitionen und Betriebsstoffe vorgenommen. Zur Abschätzung der investitionsabhängigen Kosten werden die Faktoren aus Tabelle 85 herangezogen und dieselben Preise für Energie wie für die übrigen Prozessbewertungen verwendet. Die investitionsabhängigen Kosten belaufen sich auf 514 k€ pro Jahr (Investition 2,56 Mio. €), betriebsmittelverbrauchsabhängige Kosten auf 2037 k€ pro Jahr (7794 t/a Sonnenblumenöl, 916 t/a Methanol, 79 t/a NaOH, 1166 t/a Katalysator, Energie), Personalkosten (8 Angestellte à 100.000 €/a) auf 880 k€, Overheadkosten auf 146 k€ pro Jahr und sonstige Kosten auf 176 k€ pro Jahr. Es ergeben sich Herstellkosten von 0,45 € pro kg Produkte (FAME und Glycerin) bei einem Preis für Sonnenblumenöl von 131 €/t (Preis für Speiseölabfälle angepasst aus (West, Posarac, & Ellis, 2008)). Wird eine Massenallokation der Produkte vorgenommen, ergeben sich 0,41 € pro kg Sonnenblumen-FAME und 0,04 € pro kg Glycerin. Bei einer angenommenen Marge von 20 % ergeben sich Preise für Sonnenblumen-FAME von 0,52 €/kg und für Glycerin 0,05 €/kg.

Für die Berechnung der Preise der FAME aus Drachenkopf, Krambe, Koriander und Erucaraps wird von einer gleichbleibenden Kapazität von 7941 t FAME pro Jahr

ausgegangen. Da sich die Fettsäurezusammensetzungen der Öle stark unterscheiden, werden zunächst die mittleren Molmassen der Öle, ihrer Fettsäuren und ihrer Methylester berechnet. Bei Gleichbleibendem Masse-Output an FAME ändert sich der Öl-Masseinput und Glycerin-Output, da z.B. bei einer eher kürzerkettigen Fettsäurezusammensetzung mehr Triglyceride notwendig sind um die Kapazität an FAME zu erreichen und gleichzeitig mehr Glycerin erhalten wird. Es wird angenommen, dass 10 % des Öls nicht umgesetzt werden. Die Betriebsmittelbedarfe und die Investitionen werden linear (Betriebsstoffe) oder mit einer Größendegression (Energie, Investitionen) (Potenz 0,8 bzw. 0,7) bezogen auf den Basisfall angepasst. Die Herstellkosten werden massenalloziiert. Zur Berechnung der FAME-Preise wird eine Marge von 20 % auf die Herstellkosten angenommen. Es wird außerdem angenommen, dass Fettsäuren dieselben Preise wie FAME besitzen. Tabelle 97 listet die Ölinputs und FAME- und Glycerin-Outputs auf sowie Ölpreise, FAME-Herstellkosten und FAME-Preise.

Tabelle 97: In- und Outputs der Umesterung, Ölpreise, Herstellkosten und Preise für FAME.

	Basisfall Literatur Sonnenblumenöl	Drachen- kopföl	Krambeöl	Koriander- öl	Erucaraps- öl
Ölinput [t/a]	7873	8631	8661	7905	8654
FAME-Output [t/a]	7941	7941	7941	7941	7941
Glycerin-Output [t/a]	821	1072	695	828	704
Ölpreise [€/kg]	1,30	1,37	2,60	2,44	0,69
Herstellkosten FAME [€/kg]	0,40	1,44	1,62	2,67	0,95
Preise FAME [€/kg]	0,48	1,73	1,94	3,20	1,14

3.6.1.7 Rohstoffalternativen und Sensitivätsbetrachtung

In den betrachteten Prozessen nehmen die Rohstoffkosten den größten Anteil der Herstellkosten, v.a. für Öle, Ölsäuren und Methylester, ein (vgl. Kapitel 3.6.1.1 bis 3.6.1.6). Daher werden die Herstellkosten auf die Rohstoffalternativen aus Drachenkopföl, Krambeöl, Korianderöl und Erucarapsöl hin in einer vollständigen Enumeration untersucht. Für jedes Verfahren werden jeweils die Investitionen und Betriebsmittelbedarfe angepasst und die Herstellkosten berechnet. In Tabelle 98 werden die Herstellkosten der Verfahren für den Basisfall und bei Einsatz der Rohstoffalternativen aufgelistet. Wie in Tabelle 98 ersichtlich ist, verringert der Einsatz von Erucarapsöl deutlich die Herstellkosten, bis zu 25 %. Da sich durch den Einsatz von Erucarapsöl ein deutlicher ökonomischer Vorteil ergibt und bislang keine wesentlichen stofflichen Vorteile für die Verwendung anderer Rohstoffe ergeben haben (vgl. Kapitel 3.8), wird die Verfahrensalternative mit Erucarapsrohstoffen für alle weiteren Betrachtungen herangezogen.

Tabelle 98: Herstellkosten bei Verwendung von Rohstoffalternativen aus verschiedenen Ölsaaten, fett markiert: die günstigsten Herstellkosten mit Rohstoffalternative (Rohstoffe aus Erucarapsöl).

	Basisfall (Basisrohstoff)	Drachen- kopföl	Krambe- öl	Koriander- öl	Eruca- rapsöl
<i>Epoxidierung</i> HK [€/kg]	(Öl 1) 2,89	2,89	2,97	4,05	2,28
<i>DCA-Fermentation</i> HK [€/kg]	(Ölsäure) 6,62	7,44	8,23	11,45	6,12
<i>Metathese</i> HK [€/kg] (für beide Produkte)	(Ölsäuremethylester) 3,81	3,54	3,73	4,80	2,80

Neben den Rohstoffalternativen wurden weitere Sensitivitätsanalysen für die jeweils zwei bis drei einflussreichsten Kostenanteile der Herstellkosten durchgeführt. Es werden Parametervariationen für die Kapazität der Anlage, Rohstoffpreise und ggf. Enzympreise untersucht Abbildung 167. Die Kapazität beeinflusst die Investition¹⁵⁵ und somit investitionsabhängige Kosten, die Rohstoffe und Betriebsstoffe (linear), die Energiebedarfe¹⁵⁶, den Personalbedarf¹⁵⁷, Overheadkosten und sonstige Kosten. Eine Erhöhung der Kapazität um 20 % reduziert die Herstellkosten der betrachteten Verfahren um 10-16 %. Eine Verringerung der Kapazität um 20 % steigert die Herstellkosten um 14-23 %. Bei der enzymatischen Epoxidierung, DCA-Fermentation und Metathese beeinflusst eine Preisänderung der Rapsölrrohstoffe um ± 20 % die Herstellkosten um 6 bis 10 %.

¹⁵⁵ Annahme: $Investition_{neu} = Investition_{Basis} * (Kapazität_{neu} / Kapazität_{Basis})^{0,7}$

¹⁵⁶ Annahme: $Energiebedarf_{neu} = Energiebedarf_{Basis} * (Kapazität_{neu} / Kapazität_{Basis})^{0,8}$

¹⁵⁷ Annahme: $Personalbedarf_{neu} = Personalbedarf_{Basis} * (Kapazität_{neu} / Kapazität_{Basis})^{0,8}$

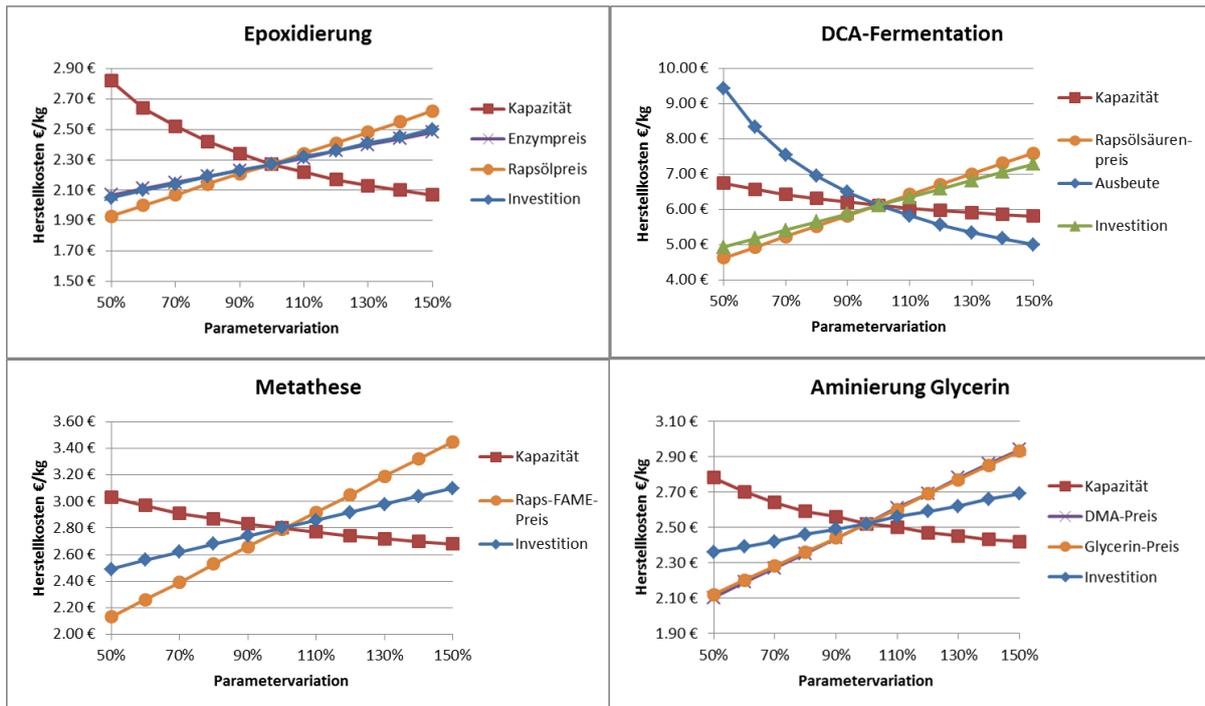


Abbildung 167: Sensitivität der Herstellkosten bei Parametervariation der Kapazitäten und Rohstoffpreise der betrachteten Prozesse (Rohstoffe aus Rapsöl).

3.6.1.8 Zusammenfassung

Für die ökonomische Bewertung wurden auf Grundlage der Stoff- und Energieströme für die Prozesse enzymatische Epoxidierung, Dicarbonsäure-Fermentierung, Metathese und Aminierung von Glycerin Investitionen für die Anlagen und die Herstellkosten ermittelt. Für die Prozesse Enzymproduktion und Umesterung der Öle wurden ebenfalls Herstellkosten bzw. Preise für die Produkte berechnet, die in die Kalkulationen der anderen Verfahren eingehen. Die Herstellkosten für die Produkte (Summe der Produkte bei Metathese) der betrachteten Verfahren (mit Erucaraps als Rohstoff für Epoxidierung, DCA-Fermentierung und Metathese) werden in Tabelle 99 zusammengefasst. Wird eine Marge von 20 % angenommen ergeben sich Preise von 2,73 € bis 6,57 € pro kg Produkt.

Tabelle 99: Herstellkosten und Preise (20 % Marge) der Produkte der Bioproduktion.

Verfahren	Produkt(e)	HK [€/kg]	Preis [€/kg]
<i>Epoxidierung</i>	Epoxide der Triglyceride	2,28	2,73
<i>DCA-Fermentation</i>	Dicarbonsäuren	6,12	7,34
<i>Metathese</i>	Dicarbonsäuremethylester, Ene	2,80	3,36
<i>Aminierung von Glycerin</i>	DMA-Aceton	2,52	3,03

Die einflussreichste Schlüsselgröße auf die Herstellkosten der Produkte der Bi Raffinerie sind die Rohstoffkosten für die Pflanzenöle und darauf basierend die Kosten für Fettsäuren-/methylester. Die Preise der Öle liegen je nach Pflanze zwischen 0,69 und 2,60 € pro kg. Ein weiterer wesentlicher Einflussfaktor auf die Herstellkosten ist die Kapazität der Anlagen (siehe Kapitel 3.6.1.7).

3.6.2 Ökologische Bewertung der Prozesse

Für die ökologische Bewertung der Prozesse wird die gesamte Wertschöpfungskette bis zum Produkt („sog. cradle-to-gate-Analyse“) betrachtet. Es werden die Stoff- und Energieströme des Anbaus der Ölsaaten, des Transports zum Erfasser, der Trocknung der Ölsaaten, des Transports zur Ölmühle, der Kaltpressung der Öle, des Transports zur BioProduktion, ggf. der Umesterung und des jeweiligen Prozesses erfasst. Die Stoff- und Energieströme werden mit Hilfe der Software *Umberto* modelliert und simuliert und sind mit LCI/LCIA-Daten der Datenbank *ecoinvent 2.2* hinterlegt. Ein Beispiel für die Modellierung zeigt Abbildung 168, die den schematischen Überblick über die Wertschöpfungskette zeigt. Die Modellierung der Einzelschritte (Transitionen, dargestellt als „blaue Kästchen“) verzweigt die Wertschöpfungskette weiter. Für diese Arbeiten wird auf den Vorarbeiten aus Phase 1 aufgebaut, die den Anbau bis zum Öl bewertete. Die Modellierungen wurden aktualisiert, z.B. für Ölsaaten, Pflanzenschutzmittel und -mengen, Transporte, und ergänzt um die jeweiligen Prozesse. Im Vergleich zu Phase 1 wird eine Kaltpressung extern durchgeführt, da die Daten der TLL dafür zur Verfügung gestellt wurden.

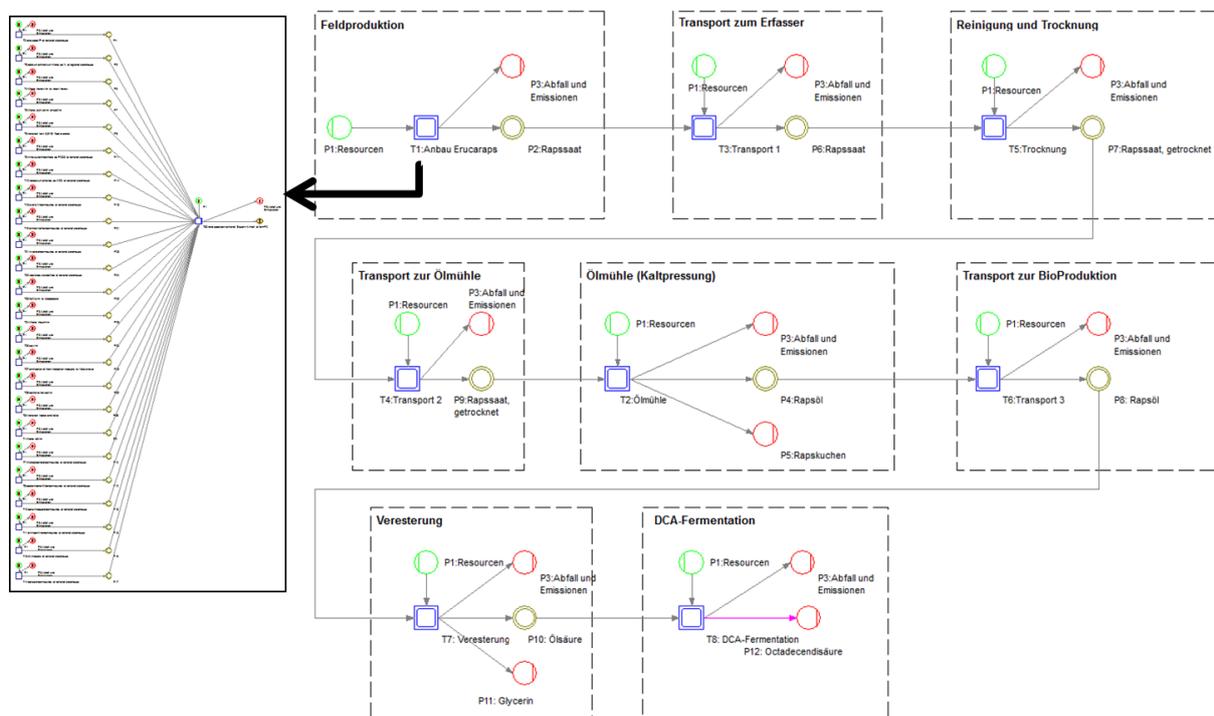


Abbildung 168: Modellierung der Wertschöpfungskette mit Erfassung der Stoff- und Energieströme am Beispiel der DCA-Fermentierung, weitere Verzweigung schematisch dargestellt für den Anbau der Ölsaaten.

Für alle ökologischen Prozessbewertungen wird Erucaraps als Rohstoff angenommen, da er ökonomische Vorteile (vgl. Kapitel 3.6.1.7) und in den Vorbetrachtungen aus Phase 1 die ökologisch vorteilhafteste Rohstoffalternative darstellt. Es werden 10 tkm Transport der Ölsaaten zum Erfasser (zur Trocknung), 150 tkm zur Ölmühle und 100 tkm zur BioProduktion angenommen. Es wird ferner angenommen, dass die Veresterung am Produktionsstandort stattfindet (extern). Das Verhältnis von Öl zu Presskuchen beträgt 0,44/0,66. Es wird, im Gegensatz zu Phase 1 (ökonomische Allokation), eine Massenallokation für die Bewertung der Produkte zur Berücksichtigung von Nebenprodukten (z.B. Presskuchen, Glycerin) vorgenommen.

Zur ökologischen Wirkungsabschätzung werden die Midpoint-Kategorien Klimawandel, Landnutzung Versauerung, Eutrophierung und abiotischer Ressourcenverbrauch (Klassifizierung mit der Methode des *Centrum voor Milieukunde, CML*, Universität Leiden) untersucht.

Zunächst werden die Gesamtemissionen der Wertschöpfungsketten berechnet (siehe Abbildung 169). Bei der Wertschöpfungskette der Aminierung von Glycerin gehen 73 % der Treibhausgasemissionen auf den Anbau von Erucaraps zurück und 10 % auf die Aminierung. Die Eutrophierung wird zu 49 % vom Anbau und zu 48 % von der Aminierung verursacht. Der größte Anteil der Versauerung ist mit 83 % der Erucarapsanbau. Der Landverbrauch wird zu 99,5 % durch den Anbau von Erucaraps hervorgerufen. Der abiotische Ressourcenverbrauch wird zu 48 % vom Erucarapsanbau, zu 21 % von der Veresterung und zu 18 % durch die Aminierung verursacht.

76 % der Treibhausgase, 86 % der Eutrophierung, 82 % der Versauerung und 98 % der Landnutzung bei der DCA-Fermentierung-Wertschöpfungskette werden durch den Erucarapsanbau verursacht. Zur Erschöpfung abiotischer Ressourcen tragen der Anbau zu 55 % und die Verseifung zu 24 % bei.

Bei der Epoxidierungs-Wertschöpfungskette gehen 53 % der Treibhausgase auf den Erucarapsanbau zurück, 40 % auf die Epoxidierung. Die Eutrophierung und Versauerung wird zu 72 bzw. 48 % vom Anbau und zu je 26 % von der Epoxidierung hervorgerufen. Die Landnutzung geht zu 92 % auf den Anbau zurück. Der abiotische Ressourcenverbrauch wird zu 57 % von der Epoxidierung dominiert gefolgt vom Anbau (35 %).

Bei der Metathese-Wertschöpfungskette werden 49 % der Treibhausgase vom Erucarapsanbau emittiert, 39 % von der Metathese. Die Eutrophierung geht zu 87 % auf den Anbau und zu 7 % auf die Metathese, die Versauerung zu 69 und 22 % respektive zurück. Die Flächennutzung wird zu 99 % durch den Anbau bedingt. Beim abiotischen Ressourcenverbrauch gehen 52 % auf die Metathese, 28 % auf den Anbau und 12 % auf die Veresterung zurück.

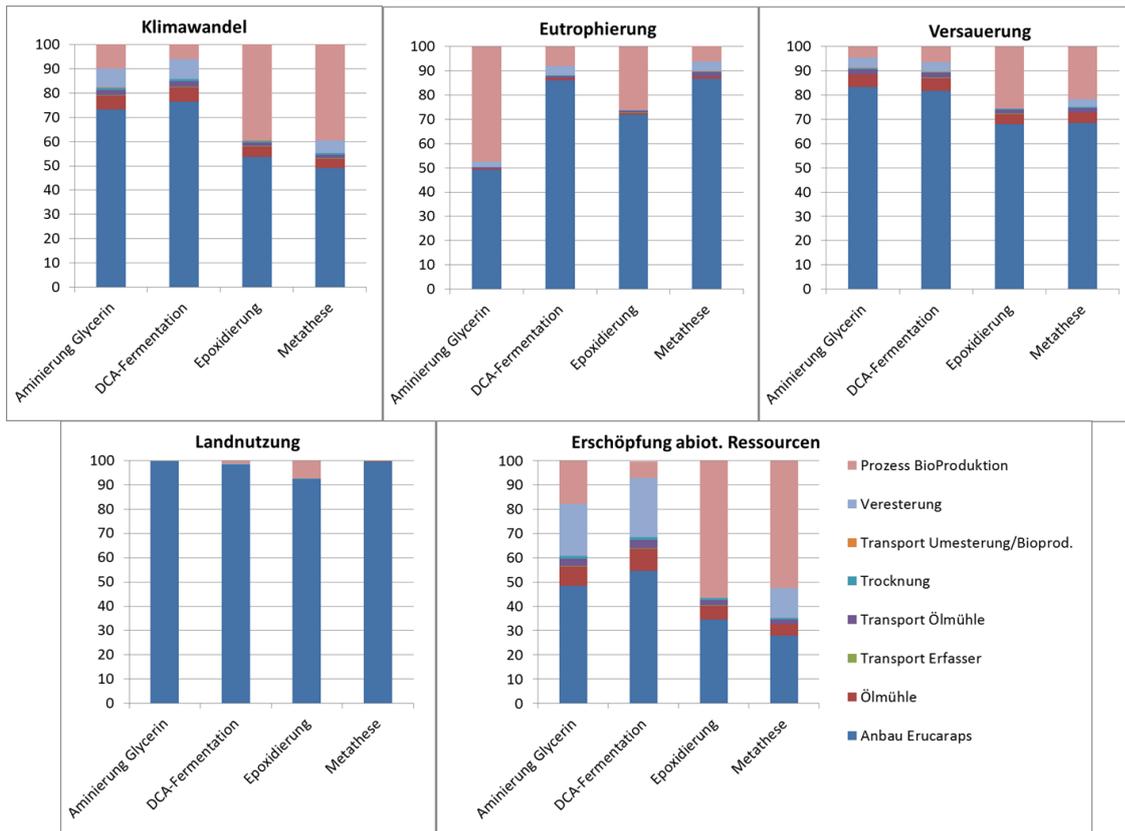


Abbildung 169: Wirkungsabschätzung der Wertschöpfungsketten; Anteile der einzelnen Schritte der Wertschöpfungskette an den Emissionen in %.

Anschließend wird eine Massenallokation der Emissionen auf die Produkte und Kuppelprodukte vorgenommen. Die Ergebnisse der Wirkungsabschätzung werden in Abbildung 170 jeweils als Emissions-Äquivalente pro kg Produkt (ggf. für Summe der Produkte bei Metathese) dargestellt.

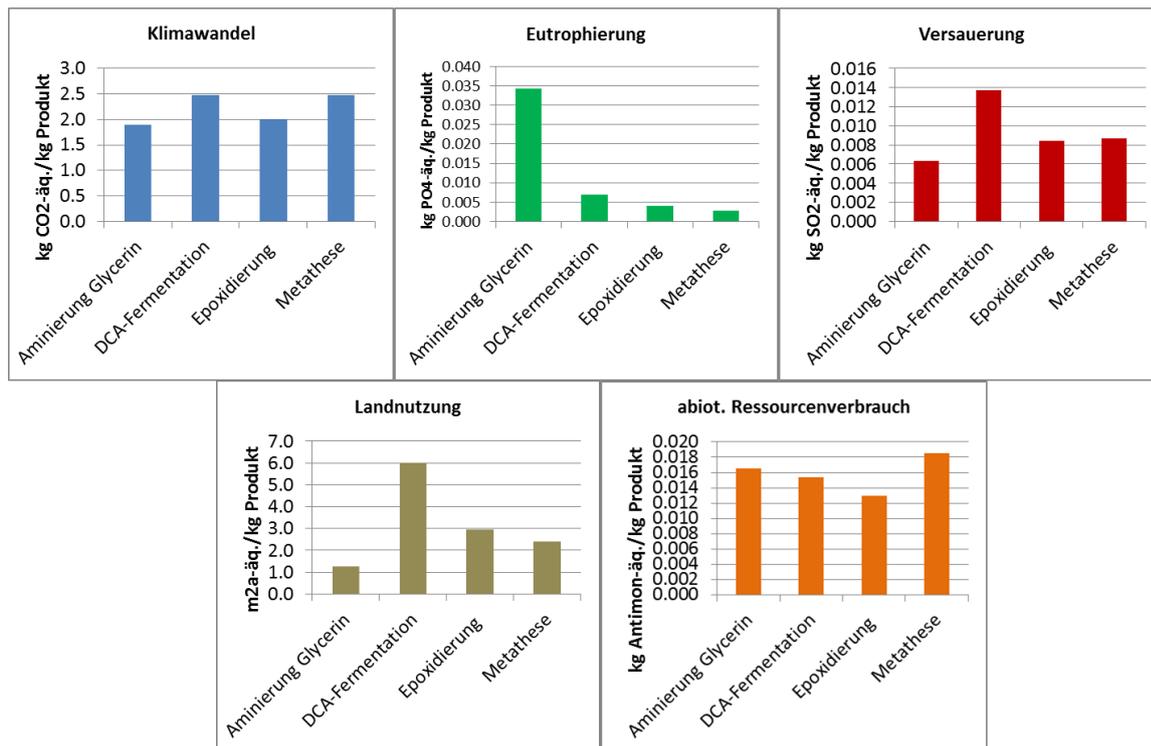


Abbildung 170: Wirkungsabschätzung der Wertschöpfungsketten mit den jeweiligen Prozessen, Massenallokation (Angabe bezogen auf jeweilige(s) Produkt(e)), Emissionsäquivalente pro kg Produkt.

Die Produkte der Bioproduktion verursachen 1,89 bis 2,48 kg CO₂-Äquivalente pro kg Produkt. Bei der Eutrophierung liegen die Emissionsäquivalente zwischen 0,002 und 0,0065 kg PO₄-Äquivalente pro kg Produkt, außer für die Aminierung von Glycerin, die aufgrund der Emissionsverteilung auf die Transitionen (49 % Anbau und 48 % Aminierung) einen höheren Wert von 0,034 kg PO₄-Äquivalente pro kg Produkt besitzt. Die Versauerungswerte liegen zwischen 0,006 und 0,013 kg SO₂-Äquivalente pro kg Produkt, die Landnutzung zwischen 1,3 und 5,7 m²a pro kg Produkt und der abiotische Ressourcenverbrauch zwischen 0,013 und 0,0185 kg Antimon-Äquivalenten pro kg Produkt.

Als wichtigste Schlüsselgröße, v.a. für die Wirkungskategorien Klimawandel, Versauerung, Eutrophierung und Landnutzung, lässt sich der Anbau der Ölsaaten identifizieren. Durch eine Erhöhung der Erträge, z.B. durch Züchterfolge, ließen sich die spezifischen Emissionen pro Mengeneinheit (z.B. kg) an Ölsaaten reduzieren. In der Kategorie „abiotischer Ressourcenverbrauch“ tragen auch Hilfs- und Betriebsmittel, wie z.B. Chemikalien und Energiebedarf der Veresterung und der Prozesse der Bioraffinerie, einen hohen Anteil bei.

3.6.3 Soziale Prozessbewertung

Vgl. Produktbewertung in Kapitel 3.8.4

3.6.4 Diskussion und Ausblick der Prozessbewertung

Die Prozessbewertung wurde zu einem frühen Stand der Entwicklung der einzelnen Prozesse durchgeführt. Die für die Bewertungen grundlegenden Massen- und Energiebilanzen für die angenommen großtechnischen Kapazitäten stammen teilweise aus Labor- und Demonstrationsversuchen, deren Ergebnisse hochskaliert wurden. Zum Teil

lagen auch Berechnungen aus Prozesssimulationen (chem. Metathese, Fraunhofer ICT) vor. Je nach Prozess konnten noch nicht alle Massen- und Energieströme erfasst werden und Stoffkreisläufe geschlossen werden. Beispielsweise müssen im weiteren Entwicklungsverlauf Abfall- und Abwasserströme erfasst werden und geeignete Verwertungskonzepte erarbeitet werden.

3.7 Produktherstellung und Charakterisierung (Taminco, Dracosa, Hobum, Addinol)

Die Synthesebausteine wurden zur Herstellung verschiedener Produkte eingesetzt. Zur Herstellung von Polymeren wurden neue Epoxid- und Härtersysteme untersucht und bezüglich Stabilität, Aushärtegeschwindigkeit, Stabilität etc. optimiert (3.7.1 und 3.7.3). Amine wurden für den Einsatz als Flockungshilfsmittel untersucht (3.7.6). Schmierstoffe wurden entwickelt und anwendungstechnisch untersucht (0). Polyamine werden als Bausteine für die Herstellung von Tensiden verwendet (3.7.5).

3.7.1 Harze auf Basis von Pflanzenölepoxid-Derivaten (Dracosa)

Die hergestellten Epoxide wurden zu ihrer Charakterisierung generell auf folgende analytische Daten hin untersucht: Iodzahl, OH-Zahl, Epoxidzahl, Wassergehalt, Farbzahl, Säurezahl, Viskosität bei 40 °C, pH-Wert, Dichte, Stockpunkt, IR Spektrum

Die Herstellung der Epoxide wurde bereits in Abschnitt 3.4.2 beschrieben.

3.7.1.1 Härter auf Basis von Fettsäuremethylesterepoxiden

Neben den Untersuchungen zur Herstellung von Epoxiden auf Basis von Pflanzenölen und Fettsäuremethylestern war die Herstellung von neuen Härtersystemen für diese Art von Epoxiden von großer Bedeutung. Diese Epoxide können in der Regel nicht durch herkömmliche Härter zu Materialien ausgehärtet werden, sondern durch ihre geringere Reaktivität der sekundären Epoxidgruppen wurden neue Härtersysteme benötigt, um neue feste Materialien herstellen zu können.

Die Basis für neue Härtersysteme bildeten hierbei organische Säuren und ihre Anhydride. Innerhalb dieses Projekts wurde versucht durch Kombination mit Epoxiden und unterschiedlichen organischen Säuren und Säureanhydriden neue möglichst flüssige Härter zu generieren, die zumindest zum Teil aus nachwachsenden Rohstoffen respektive Pflanzenölen bestehen.

Als mögliche Kandidaten für die Synthese standen insbesondere die unterschiedlichen Fettsäuremethylester zur Verfügung und als reaktive Partner z.B. Trimellitsäureanhydrid (siehe Abbildung 171) oder Pyromellitsäureanhydrid (siehe Abbildung 172):

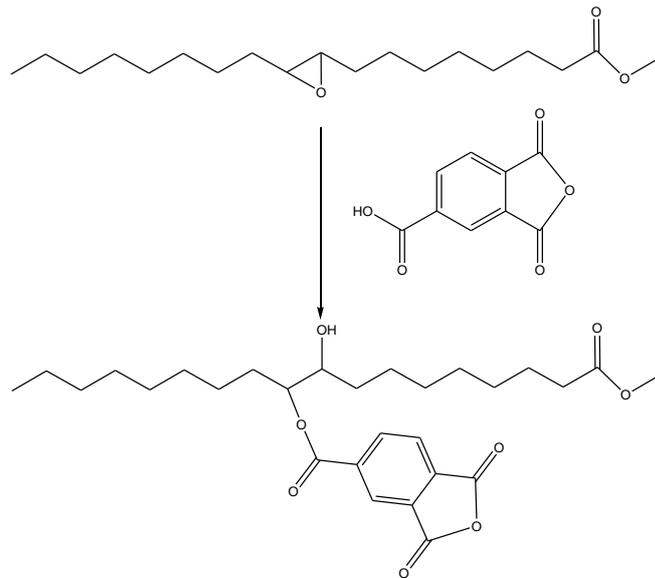


Abbildung 171: Beispielhafte Syntheseroute von Ölsäuremethylesterepoxid und Trimellit-säureanhydrid.

Die Untersuchungen der Synthesen der neuen Härter erfolgten in zwei unterschiedlichen Ansatzgrößen. Einerseits wurden die Synthesen im Labormaßstab durchgeführt und zusätzlich im Technikumsmaßstab, da sich im Verlauf der Untersuchungen herausgestellt hatte, dass neben der Temperatur und der Reaktionsdauer auch die Größe des Ansatzes eine entscheidende Rolle für das Eigenschaftsprofil der Härter darstellt. Insbesondere die nachträgliche Eindickung der Härter stellte bei größeren Ansätzen ein Problem für die weitere Verarbeitbarkeit der Härter dar.

Tabelle 100 zeigt eine Auswahl an synthetisierten neuen Härtern unter Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel:

Tabelle 100: Auswahl der Synthesen neuer Härtersysteme.

Probe	Epoxid [mol]	Säureanhydrid [mol]	RZ [h]	Lösungsmittel
HOL1	1 RMeE	1 PMSDA	8	Aceton
HOL3	1RMeE	1 PMSDA	16	Aceton
HOL4	1 RMeE	1 PMSDA	20	Aceton
HOL8	1/10 RMeE	1/20 PMSDA	10	Aceton
HOL14a	1/10 RMeE	1/12 PMSDA	10	Aceton
TMA1	1 RMeE	1 TMSA	20	Aceton
HOLS	1 SMeE	1 PMSDA	10	Aceton
HOL THF	1 RMeE	1 PMSDA	10	THF
HOLT9a	8 kg RMeE	4,9 kg PMSDA	10	Aceton

Die Eignung der Härterkomponente wurde durch eine Umsetzung mit Leinölepoxid ($IZ < 10$) überprüft und dabei die Aushärtezeit und die Shore-Härte des neuen Materials als Charakterisierungsgrößen herangezogen.

Tabelle 101: Shore-Härten verschiedener Härter in Abhängigkeit von der Zeit am Beispiel des Härters HOL T21.

Tag	RT	65°C	130°C
1	elastisch	elastisch	elastisch
3	22	24	27
5	33	37	27
9	40	37	28

Es wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, um die Eigenschaften der neuen Materialien zu beeinflussen, insbesondere die Aushärtezeit zu verkürzen und die Härte der Materialien zu erhöhen. Hierzu wurden während der Reaktion verschiedene Alkohole wie Pentaerythrit, Ethylenglycol, Polyethylenglycole und andere in unterschiedlichen Anteilen hinzugegeben.

Die Vielzahl der Versuche, von denen oben nur ein kleiner Teil beispielhaft erwähnt wurde, ergab, dass die besten Ergebnisse in den ersten grundlegenden Experimenten mit Rapsölmethylesterepoxid und PMSDA erreicht wurden (siehe Abbildung 172). Die Aushärtezeit betrug ca. 10 bis 12 h bei Raumtemperatur, 15 bis 20 min bei 65 °C und 3 min bei 135 °C. Die Harz/Härterssysteme zeigten eine deutliche Nachhärtung bis zu 10 Tagen.

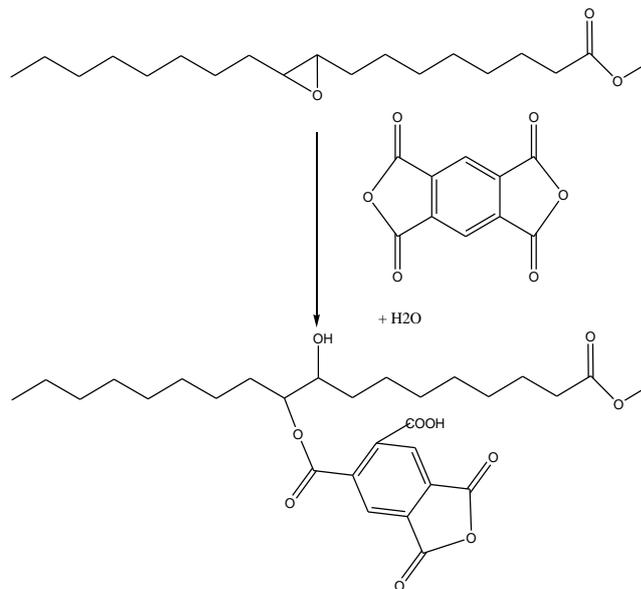


Abbildung 172: Reaktion von Pyromellitsäuredianhydrid mit Ölsäuremethylesterepoxid.

Im weiteren Verlauf des Projekts wurden Untersuchungen zur Verbesserung der Aushärteeigenschaften der Härter durchgeführt. Als variable Parameter wurden die Reaktionsdauer, das Molverhältnis von PMSDA zu RMeE und Reaktionsunterbrechungen untersucht. Weiterhin wurden durch Additive die Eigenschaften modifiziert, um den Einfluss auf insbesondere die Viskosität und Lagerstabilität zu untersuchen und zu verbessern.

Tabelle 102: Ausgewählte Reaktionen zur Herstellung des neuen Härterers.

Lfd. Nr.	Reaktion (Rückfluss)		Bemerkungen
		Detail	
HOLT25	10 h	6,75 h+3,25 h	analog HOLT 23 6 Wo stabil
HOLT26	15 h	9,5 +5,5 h	analog HOLT 24 8 Wo stabil
HOLT27	10 h	durchgängig	6 Mo
HOLT28	10 h	durchgängig	Wdh. HOLT27, 3%/ 5% sowie 5 % OSA mit 0,5%Byk
HOLT29	20 h	10+10 h	3% / 5% nOSA sowie 0,5% Byk 6 Mo stabil
HOLT30	10 h	6h + 4h mit WoE	2 Mo stabil
HOLT31	10 h	7h + 3h	5% OSA +0,5%Byk
HOLT33	10 h	7h + 3h	ca. 10-15 % Aceton bleibt im Ansatz-Langzeitvers.
HOLT34	14h	6,5h+7,5h	mit 5% nOSA Langzeitbeob. 6 Mo stabil
HOLT35	20h	7h+7h+6h=>WoEe	min.5 Mo stabil
HOLT36	10h	7h+3h	hohe Viskosität !!
HOLT55	19h	9h + 8h + 2h	Gute Aushärtung min. 2 Mo stabil

Tabelle 102 zeigt, dass idealerweise eine längere Reaktionszeit für eine längere Standzeit günstig war, da kürzere Reaktionszeiten zu Aushärtungen des Härterers führten. Weiterhin ergab sich aus den Versuchen, dass eine Vermischung mit einem Säureanhydrid die Lagerstabilität des Härterers deutlich erhöhte. Verschiedene Versuche zur Implementierung eines Entschäumers zeigten, dass 0,5 % Byk 088 die Schaumbildung bei der Aushärtung verhinderte. Andere Entschäumer beeinflussten entweder die Aushärte-geschwindigkeit negativ, zeigten keine Wirkung bzw. beinhalteten Lösungsmittel, die in diesem Zusammenhang nicht erwünscht waren.

Bei der Bewertung der Härtereigenschaften wurde in erster Linie die Shore-Härte in Abhängigkeit der Zeit bestimmt. Generell ließen sich folgende Werte bei der Aushärtung von Leinölepoxid mit dem neuen Härter erreichen:

Tabelle 103: Bewertung der Aushärtung von Leinölepoxid mit dem neu entwickelten Härter.

Kenngröße	Erreichbare Werte
Shore-Härte	D 50 - 65
Biegezug	11-13 ungefüllt, gefüllt bis 18 N/mm ²
E-Modul	512 - 570 MPa
Charpy	Einstellbar 0,6 bis 1,6 kJ/m ²
Bleistifthärte	4H

Die Materialien erwiesen sich als stabil gegenüber Biodiesel, Wasser, Säure, Ethanol, quellen allerdings bei längerer Einwirkung von Aceton und THF. Außerdem zeigten sich die Materialien nicht stabil gegenüber starken Laugen.

Tabelle 104: Ausgewählte Härtereaktionen der Härter HOLT 34 und 35.

HOLT34		HOLT35	
Zeit	RT	Zeit	RT
1 Tag	elastisch	1 Tag	elastisch
5 Tage	42	2 Tage	16
10 Tage	52	9 Tage	42

Um die Aushärtegeschwindigkeit zu erhöhen und gleichzeitig eine erhöhte Alkalibeständigkeit zu erreichen, wurden sowohl Hexafluorophosphat-Verbindungen als auch Trifluormethansulfonat-Verbindungen in Anteilen von 2 bzw. 0,005 % eingesetzt. Hierbei zeigte sich bei qualitativen Versuchen eine erhöhte Aushärtegeschwindigkeit.

3.7.1.2 Vergleich unterschiedlicher Harze auf Basis epoxidierter Pflanzenölderivate

Um eine Bewertung der Eignung der in Abschnitt 3.4.2.3 beschriebenen epoxidierten Drachenkopf- und Holunderkernöl-Verbindungen zu leisten, wurden diese beiden Epoxide und zum Vergleich epoxidiertes Leinöl im Verhältnis 2:1 mit dem Härter HOL versetzt und die Aushärtezeiten und die Shore-Härte der Produkte untersucht (siehe Tabelle 105).

Tabelle 105: Auswahl der Testergebnisse zur Untersuchung verschiedener epoxidierter Öle (Aushärtung bei 65 °C und 130 °C wurden 20 min bzw. 5 min durchgeführt und die Proben danach bei Raumtemperatur gelagert. Der Wert ABZ bezieht sich auf die Abbindezeit mit 2 % eines kationischen Photoinitiators).

Charge	EO	IZ (gJod/100g)	Viskosität (cst)	ABZ (sek.)	Ritztest	FZ	Shore-Härte
Holunder HK2	9,7	3,8	233	80	3H	2-3	40
							49
							50
Drachenkopf D113/114	11,0	2,1	391	90	3H		52
							55
							54
Leinöl Z235/236	10,0	5,9	291	120	3H	1	54
							55
							55

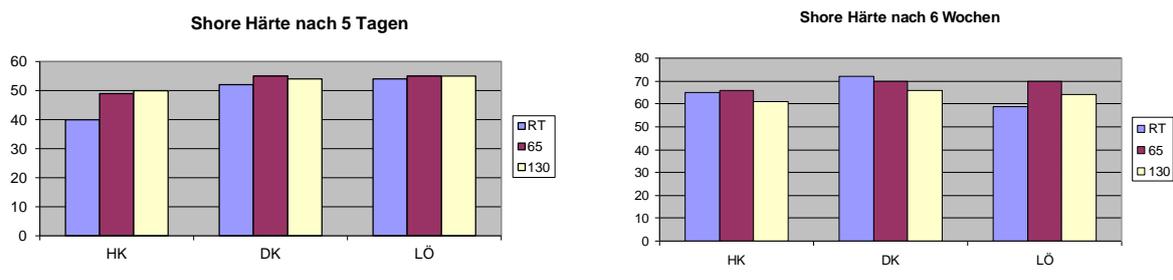


Abbildung 173: Shore-Härte nach 5 Tagen und 6 Wochen Aushärtung.

Die Ergebnisse aus diesen Tests (siehe Tabelle 105 und Abbildung 173) und der Vergleich mit dem Benchmark epoxidiertes Leinöl zeigten, dass sowohl epoxidiertes Drachenkopfol als auch epoxidiertes Holunderkernöl gut als Ausgangsverbindungen für neue Materialien fungieren können. Das Produkt aus dem Holunderkernöl fällt in seiner Performance nur leicht gegenüber dem epoxidierten Drachenkopfol ab.

Vom Fraunhofer IGB wurden der Dracosa AG unterschiedliche Muster von epoxidierten Ölen aus der biochemischen Epoxidierung zur Verfügung gestellt. Diese wurden einerseits auf ihre Kennzahlen (IZ, SZ, Wassergehalt) hin untersucht, gleichzeitig wurde von der Dracosa AG das entsprechende auf Drachenkopfol basierende Produktgemisch auf seine Reaktivität hin untersucht. Sowohl die Aushärtung mittels UV-Licht (nach Zugabe von 2 % kationischem Photoinitiator), als auch die Reaktion mit dem Härter HOLT ergaben Ergebnisse, die mit den chemisch erzeugten Drachenkopfeoxiden vergleichbar sind.

Es konnte gezeigt werden, dass auf epoxidiertem Rapsölmethylester basierende Härter geeignet sind, um epoxidierte Pflanzenöle zu Duroplasten auszuhärten. Dabei sind die Aushärtegeschwindigkeit und die Festigkeit noch nicht vollständig ausreichend für viele Anwendungen, in diesem Bereich muss die Performance noch verbessert werden. Sowohl epoxidiertes Drachenkopfol, als auch mit kleinen Abstrichen epoxidiertes Holunderkernöl eignen sich zur Herstellung von Duroplasten, die ein vergleichbares Eigenschaftsprofil wie epoxidiertes Leinöl besitzen.

Stabilitätstests

Um die Stabilität der Produkte aus den neuen Härtern mit epoxidiertem Drachenkopfol genauer zu bestimmen, wurden Reihenuntersuchungen mit verschiedenen Proben und unterschiedlichen Lösungsmitteln, bzw. Medien durchgeführt (siehe Tabelle 106). Es wurden verschiedene Proben hergestellt, die nachfolgend mit V1, V2 und V3 bezeichnet werden.

Die Untersuchungen zeigten eine sehr gute Stabilität gegenüber unpolaren Lösungsmitteln (Diesel, Biodiesel, Heptan), Wasser und Säuren. Dagegen zeigten sich Zerstörungen in Benzin E5, Ethanol, Ethylacetat und Benzin E10. Weitere Untersuchungen zeigten außerdem eine Auflösung der Proben in starken Basen.

Tabelle 106: Stabilität der Proben gegenüber unterschiedlichen Lösemitteln nach 1 Monat Lagerung.

Lösungsmittel	Proben V1	V2	V3 o. Füllstoff
Ethanol	nicht stabil	nicht stabil	gerissen
Biodiesel	stabil	stabil	
Benzin E5	leicht gerissen	leicht gerissen	Zersetzung
Diesel (schw. Kann.)	stabil	stabil	stabil
Heptan	stabil	stabil	stabil
Ethylacetat	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung
Wasser	stabil	stabil	stabil
n/10 HCL	stabil	stabil	stabil
Benzin E10	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung
Shore-Härte			
Ethanol	30-35	35	10
Biodiesel	50	50	45-50
Benzin E5	30-35	30	
Diesel (schw. Kann.)	55-60	55-60	45-50
Heptan	55	55	45-50
Ethylacetat	25-30	25-30	aufgelöst
Wasser	50	45-50	40
n/10 HCL	50	45-50	45
Benzin E10	25-30	25-30	aufgelöst

Modifikation der neuen Härter

Innerhalb des Projektes wurden neue Härter auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen für die Härtung von epoxidierten Pflanzenölen entwickelt. Die daraus herstellbaren neuen Materialien zeigten gute Eigenschaften. Allerdings gab es in der Anwendung limitierende Faktoren. Hier ist vor allem die fehlende Alkalibeständigkeit zu nennen, weiterhin war eine erhöhte Aushärtegeschwindigkeit und eine höhere Endhärte, sowie eine bessere Beständigkeit gegenüber Lösungsmitteln wünschenswert.

Zur Verbesserung der Performance der neuen Härter wurden verschieden generelle Richtungen eingeschlagen:

- a) Zugabe von sehr starken (HBF_4 , Trifluormethansulfonsäure, Methansulfonsäure) oder langkettigen organischen Säuren in katalytischen Mengen
- b) Zugabe von Metalltriflaten als Katalysatoren
- c) Zugabe von Hexafluorantimonaten und Hexafluorophosphaten als Katalysatoren
- d) Zugabe von Aminen
- e) Aushärtung ohne Härter, nur durch Zugabe von Metaltriflaten

Zusätzlich wurden Untersuchungen vorgenommen über die Eignung von unterschiedlichen nicht flüchtigen Lösungsmitteln, die die neuen Katalysatoren lösen und so die Möglichkeit der Vermischung mit den epoxidierten Pflanzenölen erlauben.

Wurden bei der Umsetzung geeignete Materialien erzeugt, wurden die Aushärtezeiten bei Raumtemperatur und 60 °C bestimmt, sowie die Shore-Härte. Einige Proben wurden auf ihre Beständigkeit gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln, Säuren und Laugen untersucht.

Im Folgenden werden ausgewählte Beispiele für den Einsatz neuer Katalysatoren und Hilfsstoffe zur Verbesserung der Performance der neuen Härter zusammengefasst:

Versuche mit Aminen

Versuche durch die Unterstützung von Metaltriflatverbindungen Amine für ringöffnende Reaktionen einzusetzen, schlugen fehl. Die Reaktionszeiten waren viel zu lang, z. T. mehrere Tage und die erreichten Härten der Materialien waren bei weitem nicht ausreichend. Zudem wiesen die Proben, die auf ihre Stabilität gegenüber Basen getestet wurden, keine ausreichende Alkaliresistenz auf.

Versuche mit HBF_4 und Füllstoff

Versuche HBF_4 für die Beschleunigung einzusetzen, zeigten schnelle Aushärtezeiten, allerdings waren die untersuchten Proben nicht alkaliresistent. Weiterhin traten Probleme auf, wenn die Ansatzgrößen im Kilobereich angesiedelt waren. In diesen Fällen war die exotherme Energie der Reaktion so groß, dass die Reaktionen unkontrolliert abliefen und die Materialien „verbrannten“.

Versuche mit HBF_4 und unterschiedlichen nicht flüchtigen Lösungsmitteln

Beim Einsatz von HBF_4 ohne die Verwendung zusätzlicher Füllstoffe führten schon kleine Einsatzmengen zu unkontrollierten Reaktionen und keinen geeigneten Materialien.

Versuche mit Lutropur MSA 100 (Methansulfonsäure)

Der Einsatz von Methansulfonsäure führte wie auch der Einsatz von HBF_4 zu unkontrollierbaren Reaktionen

Versuche mit TFMS (Trifluormethansulfonsäure)

Zahlreiche Versuche des Einsatzes von TFMS zeigten, dass lediglich der Einsatz in Kombination mit Metaltriflaten zu geeigneten Materialien führt. Bei einem direkten Einsatz der TFMS mit z.B. dem Härter HOL, oder verschiedenen Lösemitteln konnten keine kontrollierbaren Reaktionen durchgeführt werden. Die Versuche der TFMS in Kombination mit Mg/Zn-Triflat zeigt eine schnelle Aushärtung mit z.T. guten Härten der Materialien.

Versuche mit Ölsäure und „super sauren“ Salzen

Versuche Ölsäure in Kombination mit Triflaten oder Hexafluororosphatsalzen als Härter einzusetzen zeigten entweder zu lange Aushärtezeiten, oder / und zu geringe Shore-Härten der Produkte. Die Ölsäure scheint als Weichmacher in den Systemen zu fungieren und ist aufgrund ihrer schwach sauren Eigenschaften nicht in der Lage die Reaktionen zu beschleunigen.

Stabilitätstests gegenüber KOH-Lösung und gegenüber Lösemitteln

Sämtlich in der oben beschriebenen Proben zeigten keine ausreichende Alkalistabilität, nach max. 10 Tagen zeigten sich jeweils Auflösungserscheinungen. Eine Ausnahme zeigte die Probe: EP mit Zn-Triflat und Mg-Triflat, die auch nach 4 Wochen Lagerung in KOH-Lösung noch vollständig stabil war.

Tabelle 107: Stabilitätstests von ausgewählten Materialien, die mit Metaltriflaten gehärtet wurden.

Rezeptur/ Kennzeichnung	Ausgangs- Gewicht in g	Kontroll- Datum	Gewicht in g	Bemerkungen
1	5,38	05.03.2012	5,38	Probe am 27.02.2012 fest
		10 d	5,38	Probe 6 Std. bei 70 Grad in TS
		30 d	5,35	wird braun, danach in KOH
		90 d	5,32	nach 15 Wochen noch fest
2	16,87	03.04.2012	16,87	gut
		14 d	16,87	gut
		90 d	16,87	nach 12 Wochen noch fest

Tabelle 107 zeigt eine sehr gute Alkalistabilität der mit Metaltriflaten gehärteten Epoxide.

Tabelle 108: Stabilität gegenüber Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	MH39/0,2	MH39/0,1	MH55/0,1	CaTriflat	ZnTriflat
Beständigkeit					
Ethanol	leicht gerissen	leicht gerissen	leicht gerissen	gerissen	gerissen
Biodiesel	stabil	stabil	stabil		
Benzin E5					
Diesel (schw. Kann.)	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil
Heptan	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil
Ethylacetat	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung
Wasser	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil
n/10 HCL	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil
Benzin E10	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung
Shore-Härte					
Ethanol	40	35-40	40	10	15
Biodiesel	45-50	50	50	30-35	35-40
Benzin E5	30-35	35-40	25-30	10	15
Diesel (schw. Kann.)	45-50	55	55	40	40-45
Heptan	50	50-55	50	35-40	40
Ethylacetat	25	25-30	25-30	10	10
Wasser	45	45-50	50	30	35-40
n/10 HCL	45	45-50	45-50	30	30
Benzin E10	25	30	25-30	5	5

Die Untersuchungen (siehe Tabelle 108) zeigen, wie auch die reinen Harz/Härter Materialien, eine sehr gute Stabilität gegenüber unpolaren Lösungsmitteln (Diesel, Biodiesel, Heptan), Wasser und Säuren, dagegen zeigten sich Zerstörungen in Benzin E5, Ethanol, Ethylacetat und Benzin E10.

Um die entsprechenden Metaltriflate in das Epoxid einzubringen, wurden verschiedene Lösemittel eingesetzt. Als bedingt geeignet wurde Butyrolacton gefunden, welches im Polymer stabil verbleibt und die Aushärtegeschwindigkeit sowie die Endhärte nur bedingt herabsetzt. Allerdings wurde festgestellt, dass das Material zwar ausgehärtet werden konnte, die Oberfläche aber klebrig blieb, was nur durch Abdeckung der Proben verhindert werden konnte. Es findet also in einer noch nicht näher spezifizierten Form eine Reaktionsinhibierung an der Luft statt.

Es konnte gezeigt werden, dass auf epoxidiertem Rapsölmethylester basierende Härter geeignet sind, um epoxidierte Pflanzenöle zu Duroplasten auszuhärten. Die Ergebnisse der ersten Projektphase konnten verbessert werden durch eine Erhöhung des Anteils an PMSDA unter gleichzeitiger Verbesserung der Herstellungseconomie. Durch den Einsatz von Metaltriflaten konnte die Performance der neuen Materialien verbessert werden, hier ist aber in der zweiten Förderphase noch deutliches Verbesserungspotential. Die neuen Materialien basierend auf epoxidiertem Pflanzenöl und den neuen Härtern zeigen hervorragende Stabilität gegenüber Wasser, Säuren und unpolaren Lösemitteln.

3.7.2 Hydrophobierungsmittel (Dracosa)

Innerhalb des Projekts sollten die hydrophoben Eigenschaften von ausgehärteten Epoxiden und damit ihre Eignung als Hydrophobierungsmittel untersucht werden. Dabei wurden Proben betrachtet, denen generell zwei unterschiedliche Aushärtemechanismen zugrunde liegen:

1. Aushärtung von Pflanzenölepoxiden mittels UV-Licht nach Zugabe eines entsprechenden Photoinitiators
2. Aushärtung der Pflanzenölepoxide mittels der in Abschnitt 3.7.1 beschriebenen neuen Härtersysteme

Einsatz von Octadecendicarbonsäure

Im Rahmen der Untersuchungen zu den hydrophoben Eigenschaften sollte untersucht werden, in wie weit der Einsatz von Octadecendicarbonsäure, die auf biochemischem Weg durch das Fraunhofer IGB hergestellt wurden und der Dracosa AG zur Verfügung gestellt wurden, zu einer Verbesserung der hydrophoben Eigenschaften von UV-gehärteten Schichten beitragen kann.

Hierzu wurde von der Dracosa AG die Octadecendicarbonsäure mit Leinölepoxid umgesetzt und das Produkt mit Hilfe eines kationischen Photoinitiators eine Beschichtung erzeugt.

Zum Vergleich wurden Schichten von reinem Leinölepoxid und Leinölepoxid, modifiziert mit Oxalsäure, hergestellt und Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Die Kontaktwinkelmessungen erfolgten durch das Fraunhofer IGB.

Die Untersuchungen zeigten nur einen geringen bis keinen Einfluss der Octadecendicarbonsäure auf die hydrophoben Eigenschaften der Schicht.

Hydrophobe Eigenschaften von Zweikomponentensystemen

Die hydrophoben Eigenschaften der neuen Härter wurden anhand beschichteter Betonsteine beurteilt, die in ein Wasserbad gehängt wurden, um die Haftung am Beton zu überprüfen (siehe Abbildung 174).



Abbildung 174: Beschichteter Betonklotz, nach ca. 3 Monatiger Lagerung im Wasserbad.

Die Lagerung im Wasser am eigenen Gewicht zeigt deutlich die Stabilität der Schicht gegenüber Wasser.

Die Charakterisierung der hydrophoben Eigenschaften erfolgte am Fraunhofer IGB durch Bestimmung des Kontaktwinkels mit Wasser und Vorrückbedingungen, was der Erstbenetzung der Oberfläche entspricht, und unter Rückzugsbedingungen, was Auskunft über das Entnetzungsverhalten gibt. Jede Probe wurde an drei Messstellen untersucht. Darüber hinaus wurde die freie Oberflächenenergie (OFE) der Harze bestimmt. Durch Kontaktwinkelanalysen mit weiteren definierten Flüssigkeiten, Ethylenglykol und Diiodomethan, und einer Auswertung der Daten nach dem theoretischen Modell von Wu wurden diese Werte für jede Probe berechnet. Die Messungen erfolgten mit dem Kontaktwinkelmesssystem OCA40 der Firma DataPhysics Instruments bei 22 °C. Die Berechnung der OFE nach Wu erfolgte aus den Vorrückrandwinkeln der Messungen. Das Modell nach Wu berücksichtigt die Beiträge von polaren und dispersiven Beiträgen zur gesamten freien Oberflächenenergie.

Die drei Proben zeigen im Rahmen der Standardabweichung identische Werte für die Kontaktwinkel mit Wasser und den Gesamtwert der freien Oberflächenenergien. Die Standardabweichungen sind sehr gering, was für eine homogene Oberfläche spricht. Die Kontaktwinkelhysterese mit Wasser, die sich aus der Differenz von Vorrück- und Rückzugkontaktwinkel ergibt, beträgt 10-15°. Durch den Kontakt mit Wasser finden also Umorganisationen an der Harzoberfläche statt, z.B. durch Einlagerung von Wassermolekülen in die obersten Atomlagen. Die OFE enthält für alle Proben polare Beiträge, wobei diese bei der Probe #3 etwas geringer ausfallen als bei den beiden anderen Proben. Im Vergleich zu Paraffin-Wachsen (ca. 31 mN/m), Polypropylen (ca. 30 mN/m), Silikon (ca. 25 mN/m) und Polytetrafluorethylen (ca. 20 mN/m) sind die OFE der Proben geringer.

Tabelle 109: Ergebnisse der Untersuchung der hydrophoben Eigenschaften von drei UV ausgehärteten Harzen.

Probe	CA _{adv} (H ₂ O) [°]	CA _{rec} (H ₂ O) [°]	OFE gesamt [mN/m]	OFE dispers [mN/m]	OFE polar [mN/m]
#1	83,4±0,4	69,4±0,7	39,7±0,5	33,2±0,5	6,5±0,2
#2	83,2±0,4	70,2±1,3	40,2±0,6	32,9±0,5	7,3±0,2
#3	83,7±1,1	67,8±1,9	39,0±0,3	36,8±0,2	2,2±0,2

Für die Anwendung als Hydrophobierungsmittel bzw. wasserabweisender Beschichtungen wurden insbesondere Duroplaste untersucht, die durch die Reaktion von epoxidierten Ölen mit den neuen Härtern in einer 2-komponentigen Umsetzung erzeugt wurden.

Tabelle 110: Als Beispiele eine Farbbeschichtung auf Metal/Farbe.

14.06.10	6	EP Holt 27 5% Sunfast blue Baryt F	Gut zu verarbeiten, Farbe etwas dunkel 15.06. fest, leicht klebrig 16.06. klebfrei Probekörper gegossen, Glas, Holz, Metall gestrichen, Probe auf Körper aus Heb 2 bzw. Riz.- EP/EP/2%PI
----------	---	---	--



Abbildung 175: Wasserabweisende Farbbeschichtung (stabil nach 9 Monaten).

Wasserabweisende Fußbodenbeschichtungen können z.B. durch Kombination folgender Komponenten erzeugt werden:

- Drachenkopfepoxid
- HOL (Härter)
- Sandfraktion
- Barytmehl F
- TiO₂



Abbildung 176: Wasserabweisende Fußbodenbeschichtung.

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Systemen zur Hydrophobierung von Oberflächen wurde untersucht, inwieweit epoxidierte Pflanzenöle, epoxidierte Pflanzenölmethylester und die reinen Methylester als in situ Hydrophobisierungsmittel für die Herstellung von hydrophoben Zement bzw. Beton geeignet sind.

Um eine geeignete Anwendung zu gewährleisten, müssen die entsprechenden Verbindungen in Wasser suspendiert werden und eine stabile Suspension bilden. In der Folge kann die Suspension direkt dem Anmachwasser bei der Herstellung des Betons hinzugegeben werden.

Voraussetzungen für eine Eignung als Hydrophobierungsmittel sind:

- a) Hydrophobe Wirksamkeit bei der Anwendung
- b) Keine negativen Auswirkungen bei der Aushärtung des Betons
- c) Keine Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften
- d) Kein nachträgliches Auswaschen der hydrophobierenden Substanz

Dazu wurden Testreihen mit verschiedenen Emulgatoren in unterschiedlichen Konzentrationen zur Emulsionsbildung von insbesondere Rapsölmethylester und Rapsölmethylesterepoxid durchgeführt.

Herstellung langzeitstabiler Emulsionen

Langzeitstabile Emulsionen für einen möglichen Einsatz als Hydrophobierungsmittel wurden durch den Einsatz von einem speziellen Emulgator erfolgreich erzeugt.

Herstellung von Betonmusterplatten:

Platte

250 g Mörtel in 25 ml Wasser verrührt, in Form gegossen, mehrere Tage antrocknen lassen und dann ausgeschalt.

Platten noch 28 Tage vollständig trocknen lassen

Tabelle 111: Herstellung von Testplatten für die Bestimmung der Hydrophoben Wirkung.

Platte 1	Wasser pur		stabil
Platte 2	LUFA	Emulgator + LUFA	stabil
Platte 3	RMe	RMe + Emulgator + Additiv + H ₂ O	stabil
Platte 4	RMe-E	RMe + RMe-E + Additiv + H ₂ O	stabil
Platte 5	LUFA	LUFA + Emulgator + H ₂ O	stabil

Abkürzungen: LUFA: epoxidiertes Pflanzenölmethylesterderivat von Dracosa AG

3.7.3 Polymere auf Basis Pflanzenöl-basierter Polyole aus Epoxidölen (Hobum)

Für die Polymerherstellung wurden die in dem Projekt erstellten epoxidierten Öle oder deren Derivate und die neuen Härter eingesetzt. Da die neu zu entwickelnden Härter z.T. aus den oben genannten Gründen zunächst noch nicht zur Verfügung standen, wurden neue Polymere aus Derivaten der im Projekt epoxidierten Öle/Ester und Isocyanaten untersucht.

Epoxidierte Pflanzenöle können in einer Ringöffnungsreaktion auch in Polyole überführt werden (siehe Abbildung 177). Hierbei entsteht aus einer Oxirangruppe ein vicinales Diol. Gegenüber der ursprünglichen Oxiranfunktionalität bedeutet dies eine Verdopplung der funktionellen Gruppen, was für eine hohe Vernetzungsdichte vorteilhaft ist.

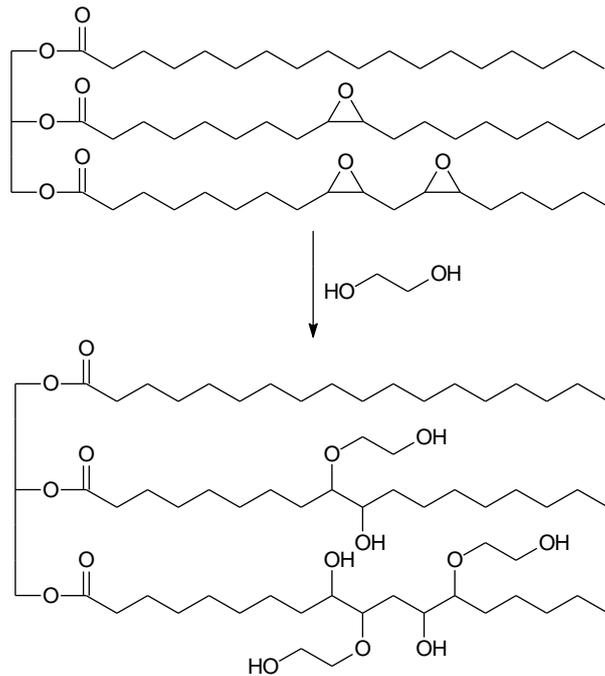


Abbildung 177: Synthese von Polyolen aus epoxidierten Pflanzenölen.

Die so erzeugten Polyole lassen sich in üblicher Weise mit Isocyanaten zu Polyurethanen vernetzen (siehe Abbildung 178).

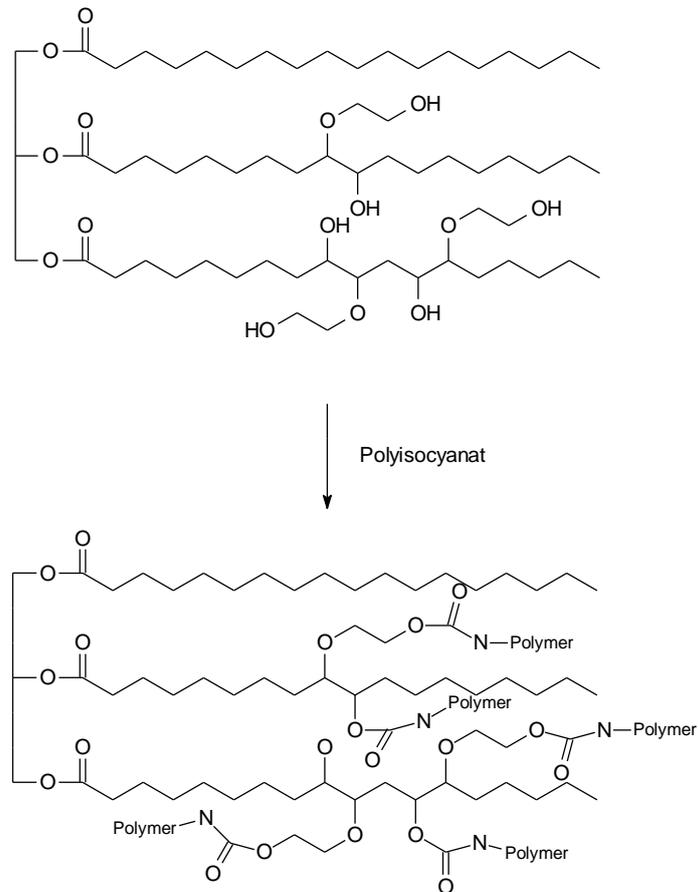


Abbildung 178: Schema der Polyaddition von Pflanzenölpolyolen mit Isocyanat.

Es konnte eine Vielzahl von neuen Polyolen hergestellt werden (Tabelle 112). Die Spannbreite der Kennzahlen ermöglicht den Einsatz der Produkte in einem weiten Bereich von Anwendungen wie zum Beispiel Coatings und Fußbodenbeschichtungen. Auch Composite mit unterschiedlichsten Fasermaterialien sind herstellbar. Wenn auch die Anzahl der marktrelevanten Isocyanattypen beschränkt ist, so sind die Möglichkeiten auf Grund der Vielzahl der Polyoltypen schier unendlich. Zur Anwendungsprüfung werden die Polyole dann entsprechend ihrer Eigenschaften, beispielsweise Funktionalität, Viskosität oder Molekulargewicht, entweder alleine oder in Abmischungen zusammen mit verschiedensten Isocyanattypen unter Verwendung von Katalysatoren und Additiven zu Polyurethanen vernetzt. Danach werden relevante Kennwerte ermittelt und bewertet.

Tabelle 112: Polyole auf Basis der epoxidierten Produkte.

LV	Kennzahlen		
	SZ	V_{25} , mPa*s	OHZ
13237	0,39	1820	69
13256	0,50	3370	414
13268	1,30	280	214
13334	0,62	43000	522
13339	1,35	1460	282
13376	0,36	9300	455
13396	0,23	1480	337
13397	0,42	13820	445
13500	0,57	58050	515

Im Folgenden sind einige Ergebnisse aus den Anwendungstests mit Polyolen aus epoxidierten Pflanzenölen gezeigt.



Abbildung 179: Polyurethanplatten und Vergusssysteme.



Abbildung 180: Polyurethanschäume: Die wahrscheinlich wichtigste Anwendung für Polyurethane sind Schäume (oben links Weichschaum, Mitte Hartintegralschaum und rechts Isolationsschaum).



Abbildung 181: Hydrophobierung und Beschichtung von Steingut.

Man kann deutlich erkennen, dass ein Eignung, der aus den im Projekt erhaltenen Materialien gegeben ist. Allerdings ist ein Vergleich der neuen Materialien mit den aus bereits am Markt erhältlichen Produkten aus „Standard-Pflanzenölen“ ist noch nicht abgeschlossen, da noch Ergebnisse aus Bemusterungen bei Kunden ausstehen.

Gegen Ende des Projektes war dann auch die Entwicklung des Härtersystems (Analogie zur von Dracosa in der ersten Projektphase vorgestellten Polymerisationmethodik) so weit fortgeschritten, das erste Vergleiche zu den Dracosaergebnissen angestellt werden konnten. Weiterhin konnte geprüft werden, ob die von Dracosa für die zweite Projektphase

vorgesehenen notwendigen Verbesserungen erreichbar sind oder nicht. Dies waren Verbesserungen hinsichtlich Aushärtegeschwindigkeit, Chemikalienbeständigkeit, mechanischer Festigkeiten, Verarbeitungseigenschaften und Lagerfähigkeit. Die Aushärtung konnte verbessert werden. Jedoch ist das System für Anwendungen bei Raumtemperatur und darunter in einigen Fällen immer noch zu langsam, so dass hier weiterer Entwicklungsbedarf besteht. Hinsichtlich der Chemikalienbeständigkeit wurden zunächst Prüfmedien verwendet, die auch Dracosa geprüft hatte, so dass ein Vergleich der Ergebnisse möglich ist.

Tabelle 113: Chemikalienbeständigkeit eines Prüfkörpers gegen unterschiedliche Prüfmedien.

Prüfmedium	Prüfkörper, RT	Prüfkörper, 130 °C	Prüfkörper gefüllt, 130 °C	Bemerkung
Wasser	beständig	beständig	beständig	
Benzin E10	kurzzeitig	kurzzeitig	kurzzeitig	Ethanolanteil
Ethanol	mittel	mittel	mittel	besser als bei E10
Ethylacetat	nicht	kaum	nicht	schnelles Anlösen
Natronlauge (5%ig)	nicht	nicht	nicht	Verseifung



Abbildung 182: Beständigkeit eines Prüfkörpers gegenüber Ethylacetat (links), Benzin E10 (mitte) und Wasser (rechts).

Die Beständigkeiten (siehe Tabelle 113) gegen unpolare Medien wie Diesel, Fettsäureester und andere sind im Allgemeinen sehr gut. Auch gegen Wasser erhält man eine relativ gute Beständigkeit. Gegenüber Ethylacetat und andere Lösemittel ist die Beständigkeit nicht immer gegeben. Selbst gegen verdünnte Lauge ist die Widerstandskraft sehr gering, da das Polymer „verseift“ wird. Die Gesamtheit der Beständigkeiten konnte zwar geringfügig verbessert werden, aber das System zeigt die Problematik aller Polyestersysteme. Polyester unterliegen einer Hydrolyse, die durch Laugen stark beschleunigt wird. Auch die Beständigkeit gegenüber Lösemittel entspricht weitgehend der von petrochemischen Polyestern. All dies liegt daran, dass das gewählte Härtingssystem die epoxidierten Pflanzensysteme chemisch gesehen zu einem Polyester vernetzt – daran lässt sich nichts ändern. Die zuvor untersuchten Polyurethansysteme zeigen in der Regel höhere Beständigkeiten. Jedoch muss man immer den Einsatzbereich abwägen. Es gibt für jedes dieser Systeme vorteilhafte Anwendungsbereiche, so dass es sinnvoll ist beide Systeme zur Marktreife zu bringen.

Auch die Verarbeitungseigenschaften und Lagerfähigkeit des Hoburnsystems sind vorteilhafter als beim System aus der ersten Projektphase. Die mechanischen Festigkeiten können nicht verglichen werden, da keine Daten aus der ersten Phase vorliegen. Auf Grundlage der verbesserten Verarbeitungseigenschaften ist aber auch hier vor einer Verbesserung aus zu gehen.

Zum Abschluss wurden einige grundlegende Anwendungstests durchgeführt.



Abbildung 183: Mineralvergussysteme.

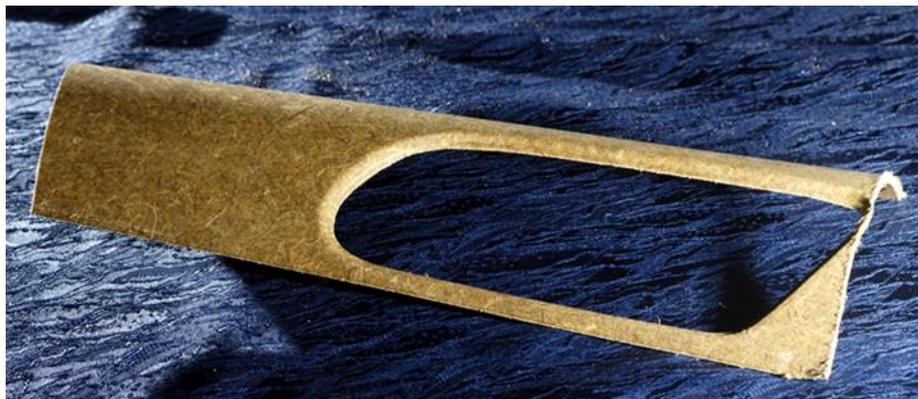


Abbildung 184: Naturfaserverbundcomposit.

Die Systeme sind noch nicht abschließend betrachtet, da einige Testergebnisse lange Prüfphasen benötigen und einige Optimierungsarbeiten nicht Projektbestandteil waren.

Bislang konnten keine eindeutigen Vorteile der in Projekt untersuchten Pflanzenöle im Vergleich zu „Standard-Pflanzenölen“ identifiziert werden. Einzig das Drachenkopfol zeigte gewisse Tendenzen bezüglich einer Sonderstellung auf Grund seiner extrem hohen Iodzahl. Genaueres muss aber noch untersucht werden.

Bei entsprechenden Marktpreisen könnten alternativ zu einigen „Standard-Pflanzenölen“ auch Pflanzenöle aus dem Projekt eingesetzt werden.

Die beiden Polymersysteme zeigen ihre Stärken in verschiedenen Bereichen, so dass sie sich ergänzen.

3.7.4 Schmierstoffe (Addinol)

3.7.4.1 Schmierstoffester aus Senföl - Vorstufen von DHW

Polyolester finden aufgrund ihres speziellen Eigenschaftsprofils als Grundöle im Schmierstoffbereich ein breites Anwendungsfeld. Als biologisch leicht abbaubar und umweltfreundliches Basisöl wird unter anderem auch TMPTO, ein Triester auf der Basis von Trimethylolpropan (TMP) und Ölsäure genutzt.

Im Rahmen des Projektes wurden drei Polyolester auf Basis von Senfölfettsäure im Labormaßstab hergestellt. Als Polyole wurden Trimethylolpropan (TMP), Neopentylglycol (NPG) und das Pentaerythritol (PE) ausgewählt. Die chemo-katalytische Veresterung der destilliv gereinigten Senfölfettsäure mit dem Polyol erfolgte im Temperaturbereich von 180 bis 240 °C.

Der im DHW hergestellte, Senföl-basierende TMP-Ester zeigt ein physiko-chemisches Basisprofil, das qualitativ annähernd einem marktüblichen TMP-trioleat entspricht.

Um andere, potentielle Anwendungsfelder abdecken zu können, wurden weitere Polyolester auf Basis von Senföl-Fettsäure mit Neopentylglycol (NPG) und mit Pentaerythritol (PE) im Labor der DHW hergestellt.

Die Prüfung der physiko-chemischen Eigenschaften zeigte, dass der NPG-Ester im Vergleich zu dem TMP-Ester einer geringere Viskosität und der PE-Ester eine höhere Viskosität aufweisen. Das Tieftemperaturverhalten der Ester liegt im mittleren Bereich und etwas höher gegenüber analoger Produkte im Markt. Alle drei Ester haben einen Flammpunkt von oberhalb 290°C.

In Tabelle 114 sind die spezifischen Eigenschaften der Polyolester zusammengefasst:

Tabelle 114: Spezifische Eigenschaften verschiedener Polyolester auf Basis von Senföl-Fettsäuren.

Ester	Säurezahl (mg KOH/g)	Jodzahl (g I ₂ /100g)	Stockpunkt (°C)	Kinematische Viskosität (mm ² /s) bei 40°C
TMP-triester	0,9	92,5	-26	56,2
NPG-diester	0,6	88,9	-29	31,0
PE-tetraester	0,7	98,4	-16	72,8

Erfordert eine Anwendung eine definierte Viskositätsprofil, so ist es auch möglich, über Mischungen der drei Polyolester, gezielt anwendungsspezifische Produkteigenschaften d.h. z.B. einen Viskositätsbereich ISO VG 46 einzustellen.

Produktmuster der Senföl-basierenden Polyolester wurden dem Projektpartner Addinol GmbH zur anwendungstechnischen Prüfung übergeben.

Sollten diese Ester als Basisöl in den Schmierstoffbereich Eingang finden, so sollte es auch möglich sein, hier andere Erucasäure-reiche Pflanzenöle, wie Eruca-Raps oder Krambe, als C22-Quelle alternativ zu nutzen.

3.7.4.2 Schmierstoffe – Anwendung und Herstellung

Synthetische Schmierstoffe werden vorzugsweise bei den folgenden Bedingungen eingesetzt:

- 1) Extreme Temperaturen, bei denen üblicherweise mit mineralölbasierenden Produkten wegen deren Oxidationsanfälligkeit nicht gearbeitet werden kann.
- 2) Bei Anlagen, die mit hohen Belastungen gefahren werden, oder bei denen mit Verunreinigungen gerechnet werden muss.
- 3) Bei häufig auftretenden Stillständen, die durch mechanische Probleme verursacht werden.
- 4) Weiterhin bei Maschinenschäden, die beim Einsatz von Mineralölen zu erwarten sind. Wenn mit hohem Energieverbrauch und starkem Verschleiß, z. B. an Lagern etc. gerechnet werden muss.
- 5) Bei schwer zugänglichen Schmierstellen, die selten geschmiert werden, und deshalb die Gewährleistung einer konstanten Schmierung von großer Bedeutung ist.

Im konkreten Fall für Anwendungen bei extremen Temperaturen, beispielsweise zur Schmierung von Ketten, die mit Temperaturen bis zu +280 °C beaufschlagt werden, bedeutet es, dass vom Basisöl mindestens die folgenden Anforderungen erfüllt werden:

- beachtliche thermische Stabilität
- ausgezeichnetes Schmiervermögen
- gute Verdunstungsbeständigkeit

Als Ausgang für die Untersuchungen diene ein Anforderungsprofil für synthetische Basisöle, das in Tabelle 115 dargestellt ist und bei Schmierstoffen eingesetzt wird:

Tabelle 115: Anforderungsprofil für synthetische Basisöle, die bei Schmierstoffen eingesetzt werden.

Kennwert	Einheit	Anforderung	Bemerkung
Aussehen		flüssig, klar	
Viskosität bei 40 °C	mm ² /s	46; 220	vorzugsweise; eventuell auch Verdicker
Viskositätsindex		> 100	
Neutralisationszahl	mg KOH/g	< 0,1	sehr wichtig
Hydroxylzahl	mg KOH/g	< 10	z.B. für Demulgiervermögen
Iodzahl	gl/100g	< 90	besser: < 5
Wasser	mg/kg	< 500	
Pourpoint	°C	max. - 20	
Flammpunkt	°C	> 270	
Schwermetallgehalt	mg/kg	< 1	
Filtrierbarkeit	%	bestanden	speziell für Hydrauliköl
Elastomerverträglichkeit		bestanden	1000 h; 80°C; NBR 1
Stahlkorrosion A		bestanden	24 h bei 60°C; gegen dest. Wasser
Kupferkorrosion	Korr.grad	max. 2	3 h bei 100°C
			trockener TOST, 95°C, Fe/Cu;
Oxidationsstabilität	h	> 1000	Zeit bis zum Erreichen Δ NZ = 2 mg KOH/g
Temperaturstabilität		bestanden	In-House-Test für HT; 200°C; 24h

Pflanzenölepoxyde als Basisöle

Pflanzenölepoxyde wurden bei ADDINOL als Basisöle bisher nicht eingesetzt.

In der ersten Projektphase wurden die folgenden Produkte der Fa. Dracosa auf ihre Eignung für Schmierstoffformulierungen untersucht.

- epoxidiertes Senföl (3 Modifikationen)
- epoxidiertes Leinöl (3 Modifikationen)
- Epoxid aus Leinöl und Leinölmethylester
- Epoxid aus Senfölmethylester
- Crambemethylester
- epoxidiertes Leinöl
- epoxidiertes Lackleinöl
- epoxidiertes Drachenkopföl (5 Modifikationen)

Von den durch Fa. Dracosa zur Verfügung gestellten Mustern hat sich nur das Produkt Dracowol EP 10 (epoxidiertes Lackleinöl) für eine Verwendung als Basisöl für Hochtemperaturanwendungen geeignet erwiesen. Bei einer Optimierung des Produktes sollte allerdings der Flammpunkt und gegebenenfalls das Kälteverhalten (Pourpoint) verbessert werden. Methylester sind wegen der relativ niedrigen Viskositäten und der hohen Verdampfungsverluste für Hochtemperaturanwendungen nicht geeignet. Bei einigen Produkten, z.B. beim epoxidierten Senföl wurden vergleichsweise größere Mengen an störenden Metallgehalten gefunden, die vermutlich aus der bei Dracosa angewandten

Neutralisationsreaktion stammen. Die fünf Modifikationen epoxidiertes Drachenkopföl sind wegen der vergleichsweise niedrigen Flammpunkte als Hochtemperaturschmierstoffe nicht einsetzbar. Eine der beiden Leinölepoxide wurde als Basis für Hochtemperaturuntersuchungen herangezogen. Der relativ hohe Flammpunkt und die geringe Flüchtigkeit sind üblicherweise ideale Voraussetzungen für Hochtemperaturschmierstoffe. Den Hochtemperaturtest hat das Leinölepoxid nicht bestanden. Der Zusatz von thermostabilen Antioxidantien erbrachte ebenfalls keine Verbesserung gegenüber den derzeit eingesetzten handelsüblichen Estern. Üblicherweise werden nach dem Hochtemperaturtest weiche elastische Rückstände erhalten. Mit dem addivierten Leinölepoxid wurden harte und verkrustete Rückstände gebildet. Schmierstoffe, die zur Kettenschmierung im Hochtemperaturbereich verwendet werden, dürfen keine harten Rückstände bilden, da sonst der Verschleiß an der Kette erhöht wird. Die Epoxide aus Senföl und gereinigtem Senföl sind Produkte, die nur unzureichende Kälteeigenschaften haben, d.h. diese Produkte sind bei Raumtemperatur pastös bis fest. Bei Formulierungen mit Additiven zur Verbesserung des Kälteverhaltens (Pourpointdepressatoren) konnten die Kälteeigenschaften nicht signifikant verbessert werden. Diese Produkte wurden in die weiteren Betrachtungen nicht einbezogen. Der ursprünglich angedachte Einsatz von Drachenkopfölepoxid als Basisölvariante für biologisch abbaubare Getriebeöle wurde aus den folgenden Gründen abgebrochen. Die Oxidationsstabilität ist auch nach Zusatz von Antioxidantien geringer. Es gibt eine gewisse Tendenz zur Korrosivität gegenüber Stahl. Weiterhin wurde eine Neigung zur Schaumbildung beobachtet. Bei den üblicherweise eingesetzten synthetischen Basisölen, z.B. Polyalphaolefine (PAO) treten diese Probleme nicht bzw. nur in sehr geringem Maße auf.

Nach dem Ausscheiden des Partners Dracosa mussten neue Möglichkeiten zur Bereitstellung von epoxidierten Ölen gefunden werden. Vom Fraunhofer IGB wurden jeweils 100 mL der folgenden epoxidierten Öle für weitere Screenings zur Verfügung gestellt:

- epoxidiertes Krambeöl
- epoxidiertes Rapsöl
- epoxidiertes Drachenkopföl
- epoxidiertes Senföl
- epoxidiertes Leinöl
- epoxidiertes Sonnenblumenöl

Auf Grund des Zustandes bei Anlieferung, gekennzeichnet durch teilweise ausgefallene Bestandteile, wurden die Proben zu Beginn durch mehrmaliges Erwärmen auf max. 50°C im Trockenschrank und anschließendes Rühren homogenisiert. Auf diese Weise konnten mit dem epoxidierten Krambeöl, epoxidierten Drachenkopföl und epoxidierten Sonnenblumenöl weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

In Tabelle 116 sind die Kennwerte dargestellt:

Tabelle 116: Kennwerte der nativen und chemo-enzymatischen epoxidierten Pflanzenöle.

Produkt	Flammpunkt (°C)	V 40 (mm ² /s)	V 100 (mm ² /s)	Visko. Index
epox. Drachenkopföl	200	181	19,9	127
Drachenkopföl	?			
epox. Krambeöl	118	108	16,8	169
Krambeöl	274			
epox. Sonnenblumenöl	184	148	15,2	148
Sonnenblumenöl	316			

Leider konnten die bei einigen Dracosa-Epoxiden teilweise hohen Flammpunkte von ca. 300°C nicht realisiert werden. Die Diskrepanz zwischen dem Ausgangsöl und dem epoxidierten Öl macht das deutlich. Eventuell stören hier noch nicht abgetrennte Lösungsmittelanteile.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die während der Projektzeit untersuchten Pflanzenölepoxyde für den vorgesehenen Einsatzfall als Basisöle für Hochtemperaturschmierstoffe und Getriebeöle nicht geeignet sind.

Pflanzenölester als Basisöle

Polyolester werden vielfältig in der Schmierstoffindustrie eingesetzt. Als biologisch leicht abbaubarer und umweltfreundlicher Schmierstoff findet unter anderem auch TMP-TO – ein Trioleat auf der Basis von Trimethylolpropan (TMP) – Verwendung. Vergleichbar wäre dieser mit Estern auf Basis von Senfölfettsäure, die im Rahmen des Projektes hergestellt wurden. Die Veresterung der destillierten Senfölfettsäure mit TMP erfolgt katalytisch bei Temperaturen um die 220 °C. Der senfölbasierende Polyolester zeigt zu einem TMP-Trioleat vergleichbare Eigenschaften. Von Fa. DHW wurde ein TMP-Ester und ein NPG-Ester auf Basis Senföls zur Verfügung gestellt und untersucht. In einem zweiten Schritt wurden mit den Fettsäureestern Fertigprodukte hergestellt und analysiert. Mit dem TMP-Ester wurde ein Biohydrauliköl der Viskositätsklasse (ISO-VG) 68 formuliert, und nach DIN ISO 15380 (Schmierstoffe, Industrieöle und verwandte Produkte – Anforderungen für die Kategorien HETG, HEPG, HEES und HEPR) geprüft. Auf Basis des NPG-Esters wurde ein Biohydrauliköl der ISO-VG 32 formuliert, das ebenfalls nach der DIN ISO 15380 geprüft wurde. Weiterhin wurde aus einem Gemisch von TMP- und NPG-Ester ein Biohydrauliköl der ISO-VG 46 formuliert, und ebenfalls nach DIN ISO 15380 untersucht. Die aus den beiden Estern formulierten Biohydrauliköle erfüllen die Mindestanforderungen von DIN ISO 15380. Hydrauliköle mit der ISO-VG 46 werden in der Industrie am häufigsten eingesetzt.

In Tabelle 117 sind wichtige Kennwerte der formulierten Schmierstoffe aufgeführt:

Tabelle 117: Wichtige Kennwerte der auf Basis von Senfölfettsäuren formulierten Schmierstoffe.

Ester	Hydrauliköltyp	Viskosität (mm ² /s)	Viskositätsindex	Pourpoint (° C)	Flammpunkt (° C)
TMP	HEES 68	63	195	- 34	305
NPG	HEES 32	31	215	- 21	293
60% TMP / 40% NPG	HEES 46	47	203	- 27	300

Im Rahmen des Projektes wurden weiterführende Arbeiten mit den drei formulierten Biohydraulikölen HEES 32, HEES 46, HEES 68 vorgenommen. Dabei wurden hauptsächlich Langzeituntersuchungen, z.B. zur Stabilität der formulierten Produkte durchgeführt.

In der zweiten Projektphase wurde von DHW noch ein Pentaerythritetraester auf Senfölbasis zur Verfügung gestellt. In Tabelle 118 sind die Kennwerte des Pentaerythritetraesters dargestellt:

Tabelle 118: Kennwerte des auf Senfölbasis hergestellten Pentaerythritetraesters.

Ester	Hydrauliköltyp	Viskosität (mm ² /s)	Viskositätsindex	Pourpoint (° C)	Flammpunkt (° C)
Pentaerythrit	HFDU 68	74	197	-20	327

Eine Anwendung als Basisöl für Hydrauliköle vom Typ HEES 68 ist möglich. Allerdings bietet sich auf Grund des hohen Flammpunktes und Zündpunktes von 327°C eine Anwendung als schwerentflammbares Hydrauliköl vom Typ HFDU an. Eine Prüfung, vor allem für schwerentflammbare Hydraulikfluide nach DIN EN ISO 12922 und dem 7. Luxemburger Bericht sollte sich noch anschließen.

Die vorgestellten Untersuchungen haben gezeigt, dass mit den auf Basis von gereinigtem Senföl hergestellten Estern können Biohydrauliköle unterschiedlicher Viskosität hergestellt werden.

Pflanzenöle als Basisöle

Die folgenden Produkte der Fa. Dracosa wurden im Berichtszeitraum auf ihre Eignung für Schmierstoffformulierungen untersucht.

- gereinigtes Senföl
- gereinigtes Holunderkernöl

Der Einsatz von gereinigtem Senföl als Basisöl für Sägekettenöle wurde untersucht. Grundlage waren die relativ guten verschleißmindernden Eigenschaften, die bereits das unadditivierte Öl zeigte. Mit dem gereinigten Senföl wurde mit üblichen Additiven ein Sägekettenhaftöl formuliert, und entsprechend den für Sägekettenhaftölen bestehenden Mindestanforderungen und ausgewählten Anforderungen von KWF Groß-Umstadt (Kuratorium für Waldarbeit und Forsttechnik e.V.) geprüft.

Schmiereigenschaften, Alterungs- und Kältefließverhalten entsprechen den Anforderungen. Die Tabelle 119 beinhaltet ausgewählte schmierungstechnische Kennwerte:

Tabelle 119:Schmierstofftechnische Kennwerte für gereinigtes Senföl.

Öl	Schmierstoff	Viskosität (mm ² /s)	Viskositätsindex	Pourpoint (° C)	Flammpunkt (° C)
gereinigtes Senföl	Sägeketten- haftöl	68	214	- 29	290

Ein Einsatz von gereinigtem Holunderkernöl war auf Grund des hohen Wassergehaltes nicht möglich. Die verschleißmindernden Eigenschaften des unadditivierten Öles fallen deutlich schlechter als beim Senföl aus. Bei der Lagerung wurde ein Anstieg der Neutralisationszahl beobachtet. Was man ggf. mit entsprechenden Antioxidantien unterbinden kann.

Es wurden weiterführende Arbeiten mit dem Sägekettenhaftöl auf Senfölbasis vorgenommen. Mit einem von TLL zur Verfügung gestellten größeren Muster (5l) bestand die Möglichkeit Langzeituntersuchungen, z.B. zur Stabilität der formulierten Produkte und praxisnahe Einsatztests durchzuführen.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass der Einsatz von gereinigtem Senföl als Sägekettenhaftöl möglich ist.

Betontrennmittel

Von DHW wurde ein Betontrennmittel-Konzentrat (Bezeichnung: AS V 133 / MO 3716) zur Untersuchung erhalten. Das Trennmittel hat die folgende Basiszusammensetzung Fettalkohol-Ethylenoxid/ Ölsäure/Rapsöl/Emulgator. Es handelt sich hierbei um eine Musterformulierung, die durch den Einsatz von anderen Ölen modifiziert werden kann.

Vor Weiterverarbeiten musste das Konzentrat durch Rühren homogenisiert werden. Die Untersuchung der Emulsionsstabilität über einen Zeitraum von sechs Monaten wurde mit einem Mischungsverhältnis 90% Wasser und 10% Trennmittelkonzentrat durchgeführt. Vorteile von Emulsionstrennmitteln bestehen darin, dass an Sichtbetonflächen sehr gute Resultate erreicht werden. Weiterhin tritt keine Lösungsmittelbelastung auf. Emulsionstrennmittel sind ready-to-use-Produkte, d.h. es gibt keine Fehler bei der Mischungsherstellung auf der Baustelle, keine Abhängigkeiten von der Wasserhärte des eingesetzten Wassers usw. Eignung für Sichtbeton. Die Praxisuntersuchungen wurden mit positivem Ergebnis durchgeführt.

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass Betontrennmittel-Konzentrate zur Herstellung von Emulsionen eine weitere Anwendungsmöglichkeit sind.

Epoxidiertes Sojabohnenöl (ESBO)

Von HOBUM wurde ein epoxidiertes Sojabohnenöl zur Verfügung gestellt, dass bezüglich Einsatz als Korrosionsschutzadditiv für Umlauföle getestet werden sollte. Ein direkter Einsatz als Additiv ist allerdings wegen des hydrophilen Charakters von ESBO nicht möglich. Es musste deshalb mit einer Lösungsmittelvariante gearbeitet werden. Erste Tests haben gezeigt, dass das in Umlaufölen gelöste ESBO eine gute Wirkung gegenüber sauren Gasen

zeigt. Die Arbeiten sind noch nicht abgeschlossen, vor allem ist ein umfangreicher Praxiseinsatz geplant. In Tabelle 120 sind wichtige schmierungstechnische Kennwerte von untersuchten Mustern dargestellt:

Tabelle 120: Zusammenfassung der Schmierstoff-Kenngrößen unterschiedlicher Muster.

Muster- bezeich- nung	Viskosität.		Viskositätsindex	Flammpunkt COC (°C)	Pour- point (°C)	Neutralisationszah _ (mg KOH/g)	Elemente	HT-Test	Bemerkung/ Einsatzmög- lichkeit
	bei 40 °C (mm ² /s)	bei 100 °C (mm ² /s)							
gereinigtes Senföl	45	9,8	214	300	-21	0,1	ohne	n.b.	400 ppm Wasser Sägekettenöl
Drachen- kopföl- epoxid/A	398	32,4	117	234	-12	1	ohne	n.b.	Getriebeöl (?)
Drachen- kopföl- epoxid/B	861	50,8	108	222	-15	3,7	ohne	n.b.	Verdicker
Leinöl- epoxid/C	353	30,2	119	227	-6	0,19	ohne	n.b.	
Leinöl- epoxid/D	307	27,7	121	302	-6	0,3	ohne	negativ	Einsatz von Antioxidantien: keine Verbesserung im HT-Test
Epoxid aus gereinigtem Senföl	141	19	153	268	15	0,1	Kalium: 800 ppm?	n.b.	Pourpoint zu hoch
Senföl- epoxid	143	19	151	290	12	0,43	ohne	negativ	Pourpoint zu hoch
Holunder- Kernöl (gereinigt)	26	7	248	320	-30	<0,1	ohne	n.b.	1400 ppm Wasser
TMP-Ester (Senfölbasis)	63	12,2	195	305	-34	1	ohne	n.b.	Hydrauliköl

HT-Test: In-House Hochtemperaturtest

3.7.5 Grenzflächenaktive Substanzen (Taminco, DHW)

3.7.5.1 Tenside (Taminco)

Polyamine werden als Bausteine für die Herstellung von Tensiden verwendet. Beide ermöglichen die Einführung eines hydrophoben Teils, auf der einen Seite, gewöhnlich gewonnen aus einer natürlichen Fettsäure, und auf der anderen Seite durch die Einführung eines geladenen polaren Molekülteils. Die resultierenden Tenside sind typischerweise sehr mild und finden Verwendung in der Körperpflege. In der Regel werden sie derzeit basierend auf petrochemischen Rohstoffen hergestellt.

Das Polyamin, das aus Glycerin erhalten werden konnte, bestand den wirtschaftlichen Vergleich mit seinen petrochemischen Äquivalenten. Da die molekulare Struktur schwierig ist, ist weitere Forschung notwendig, um die Eigenschaften der entsprechenden Tenside, die aus diesem neuen Baustein gewonnen wurden, zu bewerten. Um dies zu tun, wurde das Polyamin in Kilogramm-Mengen produziert. Proben wurden an drei Tensid-Unternehmen versendet, um das Produkt in ihrem Tensid-Herstellungsverfahren zu bewerten und um die Leistungsfähigkeit der resultierenden Tenside in Körperpflege-Anwendungen zu evaluieren.

3.7.5.2 Grenzflächenaktive Substanzen aus Epoxiden (DHW)

Ein wichtiger Punkt der Projektbearbeitung ist die Herstellung grenzflächenaktiver Substanzen auf Basis ausgewählter, heimischer Öle aus dem non-food-Bereich und deren erste anwendungstechnischer Prüfung. Es sollte eine neue Synthesevariante erprobt werden, ausgehend von den durch die Projektpartner bereitgestellten Synthesebausteinen, wie Epoxide oder durch vom DHW selbst hergestellten Fettalkohole. Durch eine gezielte chemische Modifikation der funktionellen Gruppe sollten alternative Emulgatorsysteme aus heimischen Rohstoffen gewonnen werden.

In Zusammenarbeit mit der Addinol Lube Oil GmbH wurde eine Basisformulierung für ein umweltfreundliches Bautrennmittel entwickelt, dass als Basis für unsere anwendungstechnischen Produktprüfungen genutzt werden sollte.

Für eine erfolgreiche Einführung eines neuen Produktes im Markt müssen neben der Produktqualität, dem spezifischen anwendungstechnischen Eigenschaftsprofil und dem Preis auch verschiedene gesetzliche Rahmenbedingungen für das jeweilige Anwendungsgebiet beachtet und erfüllt werden.

Unter diesen Vorgaben wählten wir verschiedene grenzflächenaktive Substanzen, wie Fettalkoholethoxylate und heimische Pflanzenöle aus, um hier eine Modellformulierung als Basis einer Trennmittel-Entwicklung zu nutzen und ausprüfbar zu können.

Beginnend nutzen wir das heimische Rapsöl, Ölsäure und ethoxylierte C16/C18-Fettalkohole in den Laborversuchen. Daraus wurden verschiedene Kombinationen wässriger Formulierungen hergestellt und erste physikalisch, chemische Eigenschaften, wie Dichte, Viskosität und pH ermittelt.

Insbesondere die Lagerstabilität der Emulsion ist ein wesentliches Qualitätskriterium. Hierzu wurden 24 Stundentests bei unterschiedlichen Temperaturen ausgeführt und das Verhalten der jeweiligen Formulierung im Detail geprüft. Die richtige Wahl des Emulgators bzw. der Co-Emulgatoren ist hier entscheidend für die Stabilität der Emulsion.

Als Ergebnis unserer intensiven Laborarbeit wurde zusammen mit der Addinol Lube Oil GmbH eine Basisformulierung entwickelt, die die gestellten Anforderungen an ein umweltfreundliches Bautrennmittel erfüllt. Das gebrauchsfertige Produkt ist eine homogen weiße Flüssigkeit bestehend aus Wasser, Pflanzenöl, Emulgator und Fettsäure. Die darin enthaltenen organischen Bestandteile bestehen aus ca. 80% nachwachsenden Rohstoffen bzw. deren Derivaten.

Alternativ kann auch ein Trennmittel-Konzentrat angeboten werden, welches vom Anwender mit Wasser vor Ort auf seine Anforderungen und Gegebenheiten zubereitet werden kann.

Um das Ergebnis extern bestätigen zu können, wurde ein erstes Muster an die Addinol Lube Oil GmbH zu weiteren anwendungstechnischen Prüfung übergeben.

Aufbauend auf den Ergebnissen aus der Projektbearbeitung und Erfahrungen zur Epoxidierung wurde von der Hobum Oleochemicals GmbH ein partiell epoxidiertes Pflanzenöl als Rohstoff an DHW übergeben und analysiert (siehe Tabelle 121). Anhand dieses Rohstoffes wurden die geplanten Arbeiten auf dem Gebiet der grenzflächenaktiven Verbindungen durchgeführt.

Tabelle 121: Analyse vom partiell epoxidierten Pflanzenöl von der Hobum Oleochemicals GmbH.

Kriterium	Beobachtung / Wert
Aussehen bei 25°C	klares, gelbliches Öl
Verseifungszahl	177,9 mg KOH/g
Oxiranzahl	3,2 % (Hobum)
Stockpunkt	- 15,0 °C
Dichte bei 20°C	0,94 g/cm ³

Aus der Kombination einer selektiven Ringöffnung des Epoxides und einer nachgeschalteten alkalisch katalysierten Ethoxylierung wurden chemisch modifizierte Triglyzeride mit unterschiedlichen Ethoxylierungsgraden dargestellt und diese analytisch charakterisiert.

Die Ethoxylierungsversuche vom epoxidierten Pflanzenöl wurden in der DHW-Pilotanlage im Temperaturbereich von 150-170°C durchgeführt. Die Umsetzung zum Zielprodukt verlief relativ langsam. Im Labor wurden die Rohprodukte zum Finalprodukt aufgearbeitet. In Tabelle 122 sind die Eigenschaften zweier modifizierter Triglyzeride kurz zusammengestellt:

Tabelle 122: Eigenschaften zwei mittels Ethoxylierung chemisch modifizierter Triglyzeride auf Basis von partiell epoxidiertem Pflanzenöl.

	Modifiziertes Triglyzerid mit 15 EO-Einheiten	Modifiziertes Triglyzerid mit 40 EO-Einheiten
Aussehen bei 25°C	klares, gelbliches Öl	klares, gelbliches Öl
Verseifungszahl	118,7 mg KOH/g	70,9 mg KOH/g
Hydroxylzahl	63,8 mg KOH/g	49,9 mg KOH/g
Stockpunkt	-6,0 °C	22,0 °C
Dichte bei 20°C	1,01 g/cm ³	1,04 g/cm ³
kin. Viskosität bei 40°C	164,9 mm ² /s	241,4 mm ² /s
Aussehen einer Lösung von 1% in Wasser bei 25°C	milchig-trüb	klar, farblos

Die anwendungstechnische Prüfung dieser alternativen, grenzflächenaktiven Verbindungen zeigte, dass diese Materialien mit Wasser Emulsionen ausbilden können.

Aus den Ergebnissen der Performance-Tests ist aber zu erkennen, dass die gebildeten Emulsionen bei der Lagerung sowie unter Temperaturstress nicht stabil sind.

Aus diesem Grund kann ein Einsatz in der Bautrennmittel-Basisformulierung nicht erfolgreich umgesetzt werden.

Es müssen weitere chemische Modifizierungen erfolgen, um die passenden Produkteigenschaften und stabile Emulsionen zu erzeugen.

3.7.6 Flockungshilfsmittel (Taminco)

Tertiäre Aminoalkohole, wie beispielsweise N, N-Dimethylaminoethanol (DMAE), werden in großem Maßstab verwendet, um Flockungshilfsmittel herzustellen, die in der Wasseraufbereitung verwendet werden. Diese Flockungshilfsmittel sind in der Regel hochmolekulare Polymere mit positiven Ladungen. Da Schmutz oder Schlamm in Wasseraufbereitungsverfahren wenig negativ geladen ist, bewirken diese kationischen Partikel die Aggregation von Schlammpartikeln und die Erhöhung ihrer Sedimentation.

Positive Ladungen auf organischen Molekülen können durch Quaternisierung eines tertiären Stickstoffatoms in einer Amin-Funktionalität generiert werden. DMAE wird in ein Monomer durch Veresterung mit (Meth) Acrylsäure-Arten eingebaut. Aminoalkohole werden derzeit durch Ethoxylierung des entsprechenden Alkohols hergestellt und werden daher aus petrochemischen Rohstoffen abgeleitet.

Das Aminoalkohol, welches aus Glycerin gewonnen werden konnte wurde als erneuerbare Alternative zu DMAE bewertet. Der Alkohol bietet die gleichen Funktionen in der Anwendung, konnte jedoch der auf der Grundlage einer Tonne basierenden wirtschaftlichen Bewertung nicht standhalten.

3.8 Produktbewertung (KIT)

Zur Abschätzung der Marktpotenziale der Produkte der Bioproduktion werden die Produkte darauf geprüft, ob sie konventionell hergestellte Produkte substituieren können (Versuche Projektpartner), sich für neue Produkte eignen und eine ökonomische und/oder ökologische Vorteilhaftigkeit gegenüber Referenzen aufweisen.

3.8.1 Anwendungsgebiete und Auswahl von Referenzsystemen (KIT)

Die Produkte der Bioraffinerie können einerseits konventionelle Produkte bzw. Produktanteile substituieren oder stellen andererseits neue Ausgangsstoffe für die Entwicklung neuer Produkte dar. Es wurden im Projekt zahlreiche Anwendungen getestet und neue Produkte entwickelt. Beispielsweise wurden Produkte aus der Epoxidierung für den Einsatz als Schmierstoffbestandteil oder Hydrophobierungsmittel erfolgreich getestet. Durch eine Anpassung von Formulierungen können die Produkte der Bioraffinerie dazu beitragen, erdölbasierte Produktanteile zu ersetzen. Ein Beispiel für ein neu entwickeltes Produkt aus Bioraffinerieprodukten ist ein Polyester hergestellt aus Epoxiden des Drachenkopfs. Gegenüber Polyestern aus Epoxiden anderer Pflanzenöle weist dieses Polyester technische Vorteile durch seine strak härtenden Eigenschaften bedingt durch eine hohe Anzahl an Linolensäuren des Drachenkopfs auf. In Tabelle 123 werden mögliche Einsatzgebiete der Produkte und der Status der Anwendungsversuche aufgelistet. Epoxide der Triglyceride eignen sich für Schmiermittel, Trennmittel und Monomere für Polymere, z.B. Epoxidharze. Die Dicarbonsäuren aus der Dicarbonsäurefermentierung bzw. der Metathese (Dicarbonsäuredimethylester) können aufgrund der zwei Säuregruppen einen Rohstoff für Polymere (z.B. Polyester) darstellen. DMA-Aceton ist als Ausgangsmolekülbaustein für weitere Reaktionen möglich.

Tabelle 123: Produkte der Bioproduktion und ihre möglichen Einsatzbereiche.

Produkt	Einsatzgebiete	Status
Epoxide	Schmierstoffe, Trennmittel, Polyole, Polyurethane, Polyester, Epoxidharz	getestet
Dicarbonsäuren	Polyester, Epoxidharz	
DMA-Aceton	Molekülbaustein für weitere Reaktionen	angedacht

Die Auswahl geeigneter Referenzsysteme für eine vergleichende Produktbewertung der Produkte aus der Bioraffinerie mit konventionellen Produkten ist herausfordernd, da es sich bei vielen Produkten aus der Bioraffinerie um neue Produkte mit neuen Eigenschaften handelt, zu denen keine oder nur adäquate Vergleichsprodukte existieren. Dennoch werden aus den möglichen Einsatzbereichen der Produkte für die ökologische und ökonomische Produktbewertung mögliche Referenzsysteme bzw. -produkte (Daten aus Literatur oder Datenbanken) zum Vergleich hergeleitet. Die Epoxide eignen sich als Schmierstoffe, daher wird das Referenzsystem „Schmieröl“ aus der Datenbankecoinvent 2.2 als erste Referenz gewählt. Dicarbonsäuren werden mit dem Referenzsystem „Terephthalsäure“ (ecoinvent 2.2), die Monomer mit zwei Säuregruppen zur Herstellung von PET, eines Polyesters, ist, verglichen. Epoxidharze werden aus Epoxiden und Di- oder Polyolen oder Disäuren gebildet, so zum Beispiel aus Bisphenol A und Epichlorhydrin. Möglicherweise lassen sich durch Polymerisierung der Epoxide und Dicarbonsäuren aus der Bioproduktion ebenfalls Epoxidharze herstellen. Daher wird eine Polymerisierung (Annahme: molar 1:1,

Berechnet als Summe der Emissions-/Flächenäquivalente der Epoxide und Dicarbonsäuren (ohne weitere Emissionen des Polymerisierungsschritts aufgrund unvollständiger Daten) dieser Produkte mit dem Referenzsystem „Epoxidharz“ (ecoinvent 2.2) verglichen. Ein Überblick über die Referenzsysteme liefert Tabelle 124.

Tabelle 124: Produkte der Bioproduktion und Referenzsysteme (aus Datenbank ecoinvent 2.2) für die Bewertung.

Produkt	Referenzsystem
Epoxide aus enzym. Epoxidierung	Schmieröl
Dicarbonsäuren	Terephthalsäure
Epoxid (enzym. Epoxidierung) + Dicarbonsäure (fermentativ)	Epoxidharz

Die hier gewählten Referenzen dienen für einen ersten möglichen Vergleich zu konventionellen Produkten zur Abschätzung von Umweltwirkungen. Die Referenzen unterscheiden sich hierbei z.T. stofflich stark von den Produkten der Bioraffinerie (z.B. Terephthalsäure) und auch die Produkteigenschaften sind oft nicht vergleichbar. Geeignete Referenzen müssen in der weiteren Produktentwicklung für jedes Produkte individuell identifiziert und bewertet werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit auf Grund des Entwicklungsstands nicht möglich.

3.8.2 Ökonomische Produktbewertung (KIT)

Da es sich bei den Produkten der Bioproduktion um neu entwickelte Produkte handelt, die bislang nicht auf dem Markt gehandelt werden, existieren keine Marktpreise zum direkten Vergleich von Preisen. Die Herstellkosten der Bioproduktionsprodukte werden meist hauptsächlich von Kosten der Rohstoffe ausgehend von den Ölen beeinflusst. Verglichen mit Palmöl, dessen Marktpreis bei ca. 500 €/t¹⁵⁸ liegt (oder Sojabohnenöl 550 €/t¹⁵⁹), liegen die Ölpreise für Drachenkopfl (1300 €/t) und Krambeöl (1530 €/t) 160 bis 200 % über deren Marktpreisen. Erucarapsöl mit 690 €/t liegt nur ca. 40 % über deren Marktpreisen und daher im Rahmen der Preise für andere Öle (z.B. Sonnenblumenöl). Ökonomisch ist die Verwendung der betrachteten Öle außer Erucaraps für die Substitution herkömmlicher Produktanteile, z.B. in Schmierstoffen, somit meist nicht vorteilhaft. Bislang bedingten die besonderen Fettsäurezusammensetzungen der Rohstoffe nur in wenigen Fällen einen technischen Vorteil bei der Produktion oder bei den Eigenschaften der Produkte, der höhere Rohstoffpreise rechtfertigen würde. Spezielle Produkteigenschaften der Bioproduktionsprodukte in und für Spezialanwendungen konnte bislang vor allem für das Polyester aus Drachenkopflepoxyden gezeigt werden. Solche Spezialanwendungen, die durch die besondere Fettsäurezusammensetzung des eingesetzten Ausgangsöls bedingt sind, zeigen einen möglichen wirtschaftlichen Weg für die Umsetzung des Verfahrens und für die Anwendung der Produkte, die auch einen höheren Rohstoffpreis rechtfertigen könnten. Weitere Spezialanwendungen sollten entwickelt werden, bzw. neue Einsatzgebiete erdacht und entwickelt werden.

¹⁵⁸ <http://www.finanzen.net/rohstoffe/Palmoelpreis/euro> abgerufen am 11.09.2014

¹⁵⁹ <http://www.finanzen.net/rohstoffe/sojaoelpreis/euro> abgerufen am 11.09.2014

Ferner müssen die neu entwickelten Produkte der Bioproduktion registriert und zugelassen (REACH) werden. „REACH führt zu zeit- und kostenintensiven Chemikaliengenehmigungen, wodurch für kleine und mittlere Unternehmen sowie für innovative Spezialprodukte mit einer gravierenden Zusatzbelastung zu rechnen ist. So erfordert z. B. die Umstellung von Sojaepoxid auf Rapsepoxid die Neuzertifizierung des gesamten nachgelagerten Produktstammbaums.“. Dennoch zeigen die im Projekt untersuchten Nutzungswege der Produkte vielversprechende Anwendungsfelder auf, deren Weiterentwicklungen weiter verfolgt werden sollte. Die Rohstoffkosten könnten durch Ertragssteigerungen z.B. durch Züchtung gesenkt werden und eine Anwendung dieser Öle attraktiver machen.

3.8.3 Ökologische Produktbewertung (KIT)

In der ökologischen Produktbewertung werden mögliche Produkte der Bioraffinerie mit den ausgewählten Referenzen verglichen. Wie bereits erwähnt, ist die Auswahl geeigneter Referenzprozesse zum derzeitigen Entwicklungsstand herausfordernd, da die Produkte der BioProduktion und ihre Anwendungen meist neu sind und auf dem Markt keine/wenige geeignete Vergleichsprodukte existieren (siehe Kapitel 3.8.1). Eine Erweiterung der Systemgrenzen auf den gesamten Lebenszyklus konnte zum derzeitigen Entwicklungsstand noch nicht betrachtet werden. Eine Abschätzung erfolgt durch eine sog. „cradle-to-gate“-Betrachtung („von der Wiege bis zum Fabrikator“). In Abbildung 185 werden die Produkte und Referenzprodukte zum Vergleich in den jeweiligen Wirkungskategorien dargestellt. Die Epoxide (aus enzymatischer Epoxidierung) zeigen in der Kategorie Versauerung eine Vorteilhaftigkeit von 10 % und in der Kategorie abiotischer Ressourcenverbrauch von 62 % auf. In den Wirkungskategorien Klimawandel, Eutrophierung und Landnutzung kann keine Vorteilhaftigkeit erzielt werden (90, 100 und 10800 % mehr Emissionen bzw. Landnutzung respektive). Dicarbonsäuren aus Fermentation und Metathese im Vergleich zu Terephthalsäure zeigt nur in der Kategorie abiotischer Ressourcenverbrauch Vorteile von 43 %. Die Kategorien Klimawandel, Eutrophierung, Versauerung und Landnutzung liegen 30, 262, 110 und 25800 % über der Referenz. Für den Vergleich von Epoxidharz aus Dicarbonsäuren (DCA-Fermentation) und Epoxiden (enzymatisch) der Bioproduktion mit der Referenz „Epoxidharz“ zeigen sich Vorteile von 63 % in der Kategorie Klimawandel, von 10 % in der Kategorie Eutrophierung, von 71 % in der Kategorie Versauerung und von 73 % in der Kategorie abiotischer Ressourcenverbrauch. Nur die Kategorie Landnutzung liegt stark über der Referenz. Emissionen für den Polymerisierungsschritt wurden nicht betrachtet (vgl. oben), es handelt sich um eine optimistische Schätzung.

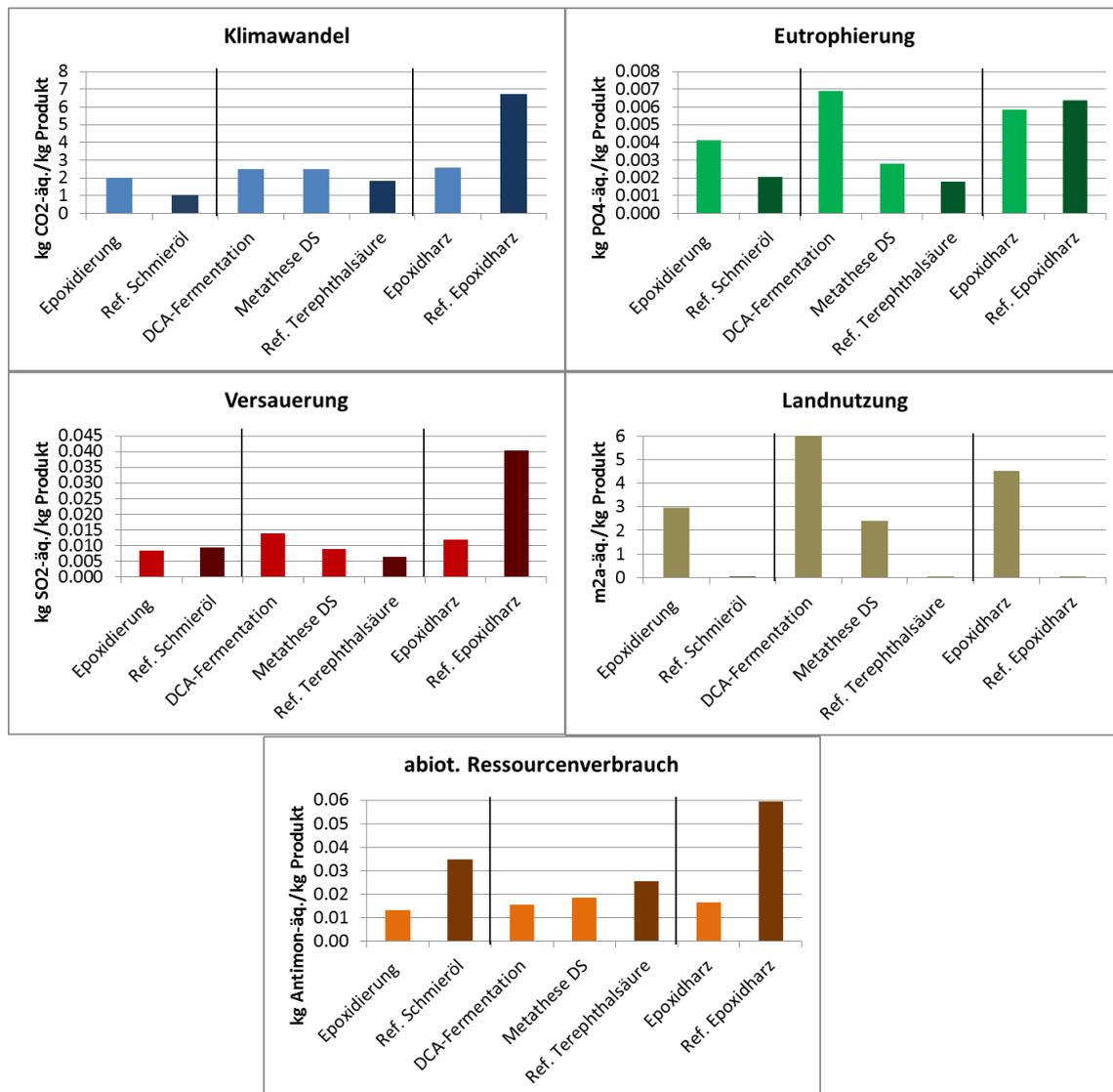


Abbildung 185: Vergleich der Produkte aus der Bioproduktion zu konventionellen Referenzprodukten in einer frühen Entwicklungsphase in den jeweiligen Wirkungskategorien für eine erste vergleichende Abschätzung der Umweltwirkungen (jeweils pro kg Produkt) (in der weiteren Produktentwicklung ist eine geeignete Referenz für jedes Produkt individuell zu identifizieren).

Alle betrachteten Wertschöpfungsketten zeigen eine deutlich erhöhte Landnutzung im Vergleich zu den Referenzen, da nachwachsende Rohstoffe verwendet werden. Die CML-Kategorie Landnutzung („land-use competition“) gibt nur die benötigte Flächengröße an, macht aber keine Aussagen zur Qualität der Nutzung und zu Flächentransformationen. In Deutschland ist nicht davon auszugehen, dass es zu Flächentransformationen kommt, da Wald- und stillgelegte/Grünflächen nicht oder nur bedingt in Agrarflächen umgewandelt werden dürfen. Kommen andere Ölsaaten als Rohstoffe zum Einsatz, wie z.B. Drachenkopf, Krambe oder Koriander, sind zusätzliche Emissionen zu erwarten, da aufgrund geringerer Flächenerträge eine größere Fläche für dieselbe Menge Öl bearbeitet werden muss.

Diskussion und Fazit zur ökologischen Produktbewertung

Verglichen mit den hier ausgewählten Referenzprodukten zeigen die Produkte der Bioproduktion meist keine ökologischen Vorteile auf. Vorteile zeigen sich im Verbrauch der abiotischen Ressourcen, wo weniger fossile Rohstoffe im Vergleich zu den gewählten

Referenzen verbraucht werden. Der größte Anteil der Emissionen wird jeweils durch den Anbau der Ölsaaten verursacht. Eine Ertragssteigerung reduziert die spezifischen Emissionen pro kg Ölsaaten und wäre vorteilhafter. Die Eignung der Auswahl der Referenzprodukte ist kritisch zu betrachten, da sich die Produkte und Eigenschaften schwer vergleichen lassen. Die hier dargestellten Wirkungskategorien bilden nur einen Teil möglicher ökologischer Bewertungen ab (vgl. Kapitel 3.8.1). Weitere wichtige ökologische Aspekte werden in den klassischen Wirkungskategorien nicht/unzureichend betrachtet. So werden z.B. positive Wirkungen des Anbaus der Ölsaaten in den Fruchtfolgen oder Auswirkungen auf die Biodiversität hier nicht betrachtet (Weitere Informationen hierzu siehe Kapitel 3.3.4).

3.8.4 Soziale Produktbewertung (KIT)

Die soziale Produktbewertung wurde aufgrund des Entwicklungsstadiums innerhalb des Projektes nicht detailliert untersucht. Zu den sozialen Kriterien zählen u.a. die Arbeitssicherheit, die Gesundheit, Gleichstellung und die Schaffung neuer Arbeitsplätze. Durch den Anbau der Ölsaaten und der Durchführung der weiteren Prozessschritte sind keine Gefahren der Arbeitssicherheit oder Gesundheit zu erwarten, z.B. da dies in Deutschland rechtlich geregelt und vergleichbar mit der chemischen Industrie ist (vgl. VDI 6310). Durch eine großtechnische Umsetzung ist mit der Schaffung neuer Arbeitsplätze zu rechnen, deren Höhe erst nach einer detaillierten integrierten Prozessplanung und Prozessscheduling abgeschätzt werden kann. Für die Prozesse selbst werden nach ersten groben Schätzungen ca. 20-30 direkte Arbeitsplätze entstehen, mit zusätzlichen indirekten Arbeitsplätzen, z.B. Verwaltung oder ggf. in neuen Ölmühlen, etc. ist zu rechnen.

3.8.5 Fazit Produktbewertung (KIT)

Die untersuchten Prozesse innerhalb des Projektes führen zu einer Vielzahl an möglichen Produkten und Anwendungsgebieten. So wurde beispielsweise eine Integration einiger Produkte in bestehende Formulierungen gezeigt, z.B. Schmierstoffe und Hydrophobisierungsmittel. Die Anwendung der Produkte in neuen weiterführenden Produkten befindet sich noch in der Entwicklung, z.B. als Monomere für neue Polymere. Die Nutzung der Rohstoffe aus den Ölen der im Projekt betrachteten Ölsaaten beeinflussen maßgeblich die Herstellkosten der Produkte. Da bislang oft kein technischer Vorteil durch die Fettsäurezusammensetzungen der Öle nachgewiesen werden konnte, sind die hohen Rohstoffkosten oftmals nicht gerechtfertigt und ggf. durch günstigere Alternativen aus konventionellen Ölsaaten mit höheren Erträgen ersetzbar. Ein Polyester hergestellt aus Drachenkopfülepoxyd zeigte aufgrund der hohen Anteile an epoxidierten Linolensäuren im Vergleich zu anderen Ölepoxyden besonders gute Härteeigenschaften. Spezialanwendungen solcher Art rechtfertigen ggf. einen höheren Preis für die Ölrrohstoffe. Für einige der betrachteten Prozesse sind ggf. auch reine Rohstoffe (z.B. reine Ölsäure) von Vorteil um Produktgemische zu vermeiden. Die Auswahl geeigneter Referenzsysteme für eine vergleichende Produktbewertung der Produkte aus der Bioraffinerie mit konventionellen Produkten ist schwierig, da es sich bei vielen Produkten aus der Bioraffinerie um neue Produkte mit neuen Eigenschaften handelt, zu denen keine/wenige adäquate Vergleichsprodukte existieren. Dennoch wurde ein Vergleich mit möglichen Referenzen v.a. in der ökologischen Produktbewertung durchgeführt, um eine erste Einordnung der Bewertungsergebnisse im Verhältnis zu existierenden Produktsystemen vorzunehmen. Im Vergleich zu den ausgewählten Referenzen konnten in der hier durchgeführten Analyse und

Wirkungskategorien keine wesentlichen Vorteile nachgewiesen werden. Die Auswahl der Referenzen ist hierbei kritisch zu betrachten und sollte in den weiteren Produktentwicklungsstufen neu analysiert und durchgeführt werden. Höhere Erträge (z.B. durch Züchtung) beim Anbau der Ölsaaten würden die Ergebnisse jedoch positiv beeinflussen (Emissionen pro kg Öl wären geringer). Des Weiteren konnten bedingt durch den z.T. frühen Entwicklungsstand noch nicht alle Stoff- und Energieströme erfasst werden, so z.B. Abfall- und Abwasserströme, die für die Schließung der Stoffkreisläufe notwendig sind.

3.8.6 Anwendungen und Marktpotential (InfraLeuna)

3.8.6.1 9-Octadecen

Interne Olefine werden großtechnisch durch Oligomerisierung von Ethen und anschließender Isomerisierung hergestellt. Das in der Oligomerisierung entstehende alpha-Olefin-Stoffgemisch (statistische Verteilung der Kettenlänge) wird destillativ getrennt. Bei den niederen Olefinen bis C10 gelingt dies in hoher Reinheit, so dass diese u. a. als Comonomere in Polyethylen eingesetzt werden können. Die höheren Olefine > C10 werden oftmals als mehr oder weniger eng geschnittene Fraktionen weiterverwendet, wobei der Hauptschwerpunkt in den Fraktionen C12/C14 sowie C10/C14 für die Weiterverarbeitung zu linearen Alkoholen für die Tensidproduktion liegt.

C16-C18-interne Olefine, vergleichbar 9-Octadecen, werden als „Offshore drilling fluids“ in großem Umfang verwendet (Bsp.: Shell NEOFLO* 1-68i, Chevron Phillips AlphaPlus C18 IS, ...). Der Vorteil dieses Produkts besteht u. a. in der geringen aquatischen Toxizität und der guten biologischen Abbaubarkeit.

Die Umsetzung von C16/C18-internen Olefinen mit SO₃ führt zu internen Olefinsulfonaten, die in der Ölindustrie zur Erhöhung der Förderausbeute eingesetzt werden (enhanced oil recovery).

Der Gesamtmarkt an drilling fluids/oilfield chemicals wird für 2020 auf \$40 Mrd. prognostiziert¹⁶⁰.

Eine weitere großtechnische Anwendung von Octadecen ist die Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid zu C18-Alkenyl Succinic Anhydride (ASA) (siehe Abbildung 186), welches in der Papierveredlung als Leimungsmittel eingesetzt wird (Bsp.: Albemarle 18 ASA, MareASA).

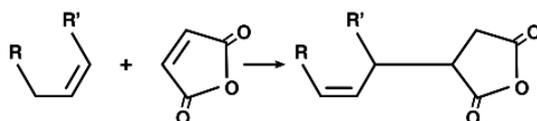


Abbildung 186: Umsetzung von Octadecen mit Maleinsäureanhydrid zu C18-Alkenyl Succinic Anhydride (ASA).

¹⁶⁰ Global Industry Analyst, Inc., 2014:
http://www.strategyr.com/Oil_Field_Oilfield_Chemicals_Market_Report.asp.

Der Weltmarkt für ASA's und Alkylketendimeren (AKD) betrug ca. 0,8 Mio. t/a (2011)¹⁶¹.

Es wäre auch denkbar, 9-Octadecen mit Ethylen in einer Kreuzmetathese-Reaktion zum 1-Decen umzusetzen, welches dann wiederum durch Polymerisation in Poly-Alpha-Olefine (PAO) überführt werden kann. PAOs sind hochwertige synthetische Hochleistungsschmierstoffe der Gruppe IV mit einer exzellenten Oxidationsstabilität, extrem guten Tief- und Hochtemperaturverhalten sowie einem optimalen Viskositäts-Temperaturverhalten. Der Markt für PAOs ist immens und betrug 2010 ca. 500.000 t/a, wobei der Anteil an 1-Decen-PAOs deutlich geringer ist¹⁶².

In allen drei Fällen wäre ein Austausch der petrochemisch hergestellten Produkte durch die auf der Basis von nachwachsenden Rohstoffen, d. h. Pflanzenölen, hergestellten technisch leicht möglich, da diese in der chemischen Struktur nahezu identisch sind. Die vom Konsortium avisierten ca. 500 t/a 9-Octadecen können bei geeignetem Marketing und Kostenstruktur vom Markt entsprechend der Marktanalyse absorbiert werden.

3.8.6.2 9-Octadecen-1,18-diacarbonsäure (DCA) und deren Ester

Aromatische und lineare Dicarbonsäuren verschiedener Kettenlängen sind neben den entsprechenden Diaminen und Glykolen/Polyalkoholen die Grundbausteine für technisch relevante Polyester und Polyamide. Kommerziell sind bisher nur Polyamide auf der Basis von C6-, C10- und C12-Dicarbonsäuren verfügbar (siehe Abbildung 187).

Entsprechende Produkte aus 9-Octadecen-1,18-Dicarbonsäure, d. h. C18-Polyester/Polyamide sind bisher vor allem in Patenten und der wissenschaftlichen Literatur beschrieben worden¹⁶³. Die Eigenschaften wie Schmelzpunkt, Glastemperatur, Kristallinität und Polarität der Polyamide bzw. korrespondierenden Polyester werden dabei durch die Kettenlänge der Komponenten bestimmt^{164,165}. Der Schmelzpunkt z. B. nähert sich mit zunehmender Kettenlänge einem Grenzwert an⁵². Ein PA 23.23 weist einen niedrigen Schmelzpunkt von nur 151 °C auf, während der Polyester PE 23.23 innerhalb dieser Reihe ein Maximum bei 110 °C darstellt (siehe Abbildung 187 und Abbildung 188; weitere Werte liegen beim Bearbeiter vor).

¹⁶¹ C. Howe, R. Hogan, S. Wildes: Soy Chemicals for Paper Processing – A Market Opportunity Study; Omni Tech Int., Ltd., 2011

¹⁶² IHS Chemical: PEP Review 2010-2 „Exxon Mobil's UHVI PAO Lubricant Blend Stock“

¹⁶³ Diplomarbeit: Veronika Erben (Fraunhofer ICT, 2010)

¹⁶⁴ H. Komoto: Review of Physical Chemistry of Japan Vol. 37 (1967), 105 - 111

¹⁶⁵ F. Stempfle, P. Roesle, S. Mecking: ACS Symposium Series: 2012, 151 - 164

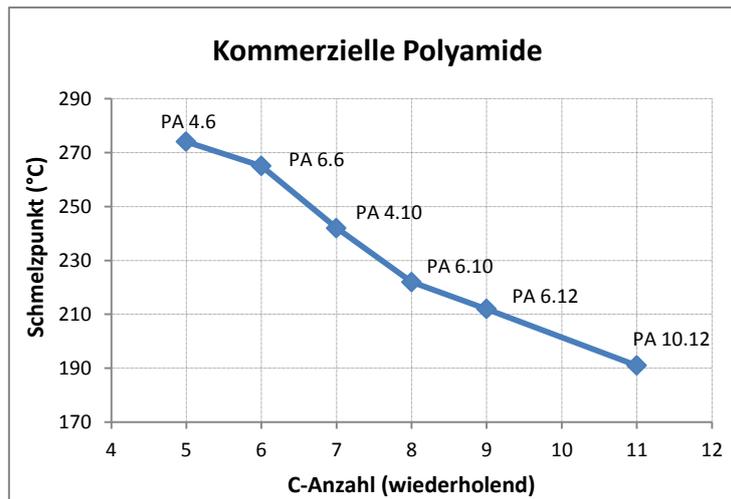


Abbildung 187: Schmelzpunkte kommerzieller Polyamide (PA X.Y)¹⁶⁶.

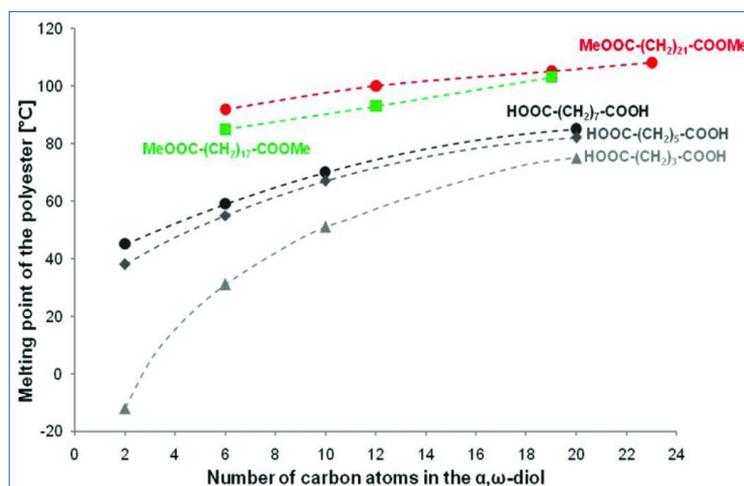


Abbildung 188: Schmelzpunkte von langkettigen Polyestern in Abhängigkeit von der Kettenlänge¹⁶⁷.

Aus diesem Umstand ergeben sich Möglichkeiten zur Polymermodifizierung sowohl von Polymerblends als auch von Copolymeren. Bislang wurde dies jedoch nur in wenigen kommerziellen Anwendungen realisiert, u. a. in Schmelzklebstoffen (Macromelt- Klebstoffe von Henkel¹⁶⁸).

Ungeachtet dessen hat Elevance Renewable Sciences, Inc. 2013 in Singapur eine Bioraffinerie in Betrieb genommen, die bei wachsender Nachfrage aus dem Markt bis zu 10 - 20 kt/a Octadecan-1,18-dicarbonsäure, d. h. die gesättigte Dicarbonsäure aus dem Metathese- Prozess, produzieren kann¹⁶⁹. Der Markenname ist „Inherent™ C18 Diacid“. Der Prozess ist etwas abweichend von dem vom Konsortium begangenen Weg, da hier direkt die pflanzlichen Öle einer Kreuzmetathesereaktion mit Ethylen, Propylen bzw. anderen Olefinen ausgesetzt werden. Primärprodukte sind dabei α -Olefine und interne Olefine wie Decen

¹⁶⁶ Bioplastics Magazine, Vol. 8, 5 (2013,), 7 - 10

¹⁶⁷ F. Stempfle, D. Quinzler, I. Heckler, S. Mecking: Macromolecules; 44 (2011), 11. - S. 4159-4166

¹⁶⁸ US 6960315 B2

¹⁶⁹ <http://www.elevance.com/news-releases/>

(C10-Olefin), sowie 9-Decensäure und deren Ester, die wiederum als Ausgangsstoffe für weitere Umsetzungen dienen oder direkt weiter verwendet werden können.

Daneben wird 9-Octadecen-1,18-dicarbonsäure in einigen Kosmetika wie Gesichtswasser zur Akne- Behandlung und Body Lotion in geringen Mengen sowie als Ausgangsstoff für die Riechstoffsynthese (Zibeton = synthetischer Moschusduft) eingesetzt.

9-Octadecen-1,18-dicarbonsäure (DCA) ist noch weit entfernt, ein kommerzielles Massenprodukt zu sein. Ein geeignetes aktives Marketing und weitere praxisnahe Entwicklungsarbeiten in Zusammenarbeit mit der Industrie, wie es Elevance zeigt, können den Markt für dieses Produkt aber weiterentwickeln.

3.8.6.3 Epoxidierte Pflanzenöle

Epoxidierte Pflanzenöle sind im Markt als Weichmacher und Stabilisatoren für PVC, EPDM und Kautschuk sowie als Reaktivverdünner und Modifikatoren in Lacken und Lackharzen/Druckfarben etabliert. Ein Ersatz durch die im Projekt hergestellten epoxidierten Öle sollte nach anwendungstechnischer Überprüfung und bei wirtschaftlicher Äquivalenz möglich sein. Ebenfalls möglich ist die Verwendung der epoxidierten Öle in lösungsmittelfreien, strahlenhärtenden Lacken für Holz und Holzwerkstoffe, wie sie von der DREISOL GmbH & Co. KG beschrieben wurden¹⁷⁰.

Aussichtsreich sollten sich auch Polyesterpolyole, wie sie durch Umsetzung der epoxidierten Pflanzenöle mit Glycolen zugänglich sind, in der PUR- Formulierungen für Schäume, Lacke oder Dispersionen vermarkten lassen¹⁷¹.

Der Gesamtmarkt an epoxidiertem Lein- und Sojaöl beträgt ca. 60.000 t/a (Produktion an ESBO in Europa 2010). Wenn von einem angestrebten Marktanteil von 5 - 10 % ausgegangen wird, würde dies eine Anlagengröße von 3 – 5000 t/a bedeuten. Dies stimmt in etwa mit der vom Konsortium angedachten Anlagengröße von 2000 t/a Epoxid überein.

3.8.6.4 Diamine und Propanolamine

Der Prozess zur homogen katalysierten Reduktion von Dicarbonsäureamiden bzw. der reduktiven Aminierung von Dicarbonsäuren zu primären Aminen konnte durch die Projektpartner untersucht werden. Es traten deutliche Mengen an Nebenprodukten wie sekundäre und tertiäre Amine auf. Eine kommerzielle Vermarktung der Endprodukte ist derzeit noch nicht gegeben.

Das von Taminco entwickelte Verfahren zur Aminierung von Glycerin liefert Produkte, für die es reale Marktchancen in der Tensidindustrie sowie zur Gasabsorption gibt. Taminco avisiert deshalb ca. 5000 t/a als reales Produktionsvolumen an.

¹⁷⁰ DREISOL GmbH & Co. KG: Abschlussbericht über ein Entwicklungsprojekt; Az. 08150, gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (http://www.abiosus.org/docs/Projektbericht_holz.pdf)

¹⁷¹ Vgl. HOBUM Oleochemicals GmbH: MERGINOLE

3.8.6.5 Erucasäure und Erucamid

Erucasäure und Erucamide sind im Konsortium bisher nicht explizit als Produkte betrachtet worden, obwohl Erucasäure im Prozess der Fettspaltung bei geeigneten Ölen wie Krambeöl, Senföl oder Erucarapsöl leicht zugänglich ist. Der Markt betrug 2008 in Europa ca. 40.000 t/a Erucasäure und 12.000 t/a Erucamid, die vor allem als Gleitmittel in der Polyethylen-Extrusion eingesetzt werden. In der zukünftigen Anlagenkonzeption sollte dies mit beachtet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in den Verfahren angestrebten Synthesebausteine ein hohes Marktpotential aufweisen. Ein geeignetes Marketing vorausgesetzt, sollten sich die Synthesebausteine im angestrebten Volumen im Markt platzieren lassen können.

3.8.7 Regulatorische Beschränkungen (InfraLeuna)

Bei den in den Prozessen der Projektpartner angestrebten Endprodukten handelt es sich z. T. um „neue“ Produkte. Für die zukünftige Markteinführung ist eine bestehende REACH-Registrierung eine Voraussetzung für das Inverkehrbringen und die kommerzielle Nutzung dieser Stoffe. Eine Neuregistrierung ist mit erheblichen Aufwand (toxikologische Gutachten) und Kosten verbunden. Dies muss bei der abschließenden Bewertung der Marktchancen mit berücksichtigt werden.

Für eine begrenzte Auswahl der Synthesebausteine wurde der Status der REACH-Registrierung überprüft. Die nachfolgende Tabelle 125 erhebt dabei nicht den Anspruch auf Vollständigkeit für alle in den Verfahren herstellbaren Produkte, sondern muss als lebendes Element weiter ergänzt werden.

Tabelle 125: REACH- Registrierung einzelner Synthesebausteine.

Produkt	CAS	EINECS-Nr.	REACH Reg.-Nr.	Produzenten (Beispiel)
epoxidierte C16-C18-FS-Me-Ester	158318-67-3	605-143-8	01-2119976377-21-0000	Faci S.p.a.
Epoxidierte C14-C22 FS-2-EH-Ester	95370-96-0	305-962-8	01-2119474680-35-0000	Faci S.p.a.
1-Octadecen	112-88-9	204-012-9	01-2119474213-44-0000	Shell Chemicals
Octadecen	27070-58-2 ¹	248-205-6	01-2119485375-29-0000	Shell Chemicals, INEOS
(E)-9-Octadecen	5557-31-3			IS Chemical Technology
(Z)-9-Octadecen	7206-25-9			
Octadecen-9-dicarbonsäure, (9Z)	20701-68-2	606-606-7	pre-registered	UCB Chimica Iberia s.a.
Dimethyl Octadecen-9-dioat	13481-97-5	603-876-8	pre-registered	
(Dimethylamino)-aceton	15364-56-4	239-402-8	pre-registered	
1-Dimethylamino-2-propanol	108-16-7	203-556-4	01-2119977067-27-0000	BASF, Acros Organics

¹Bemerkung: Octadecen (CAS 27070-58-2) - Mischung aus isomerisierte C18-alpha-Olefinen (inklusive 20 % verzweigter C18-Olefine) (zufällige Position der Doppelbindung), z.B. NEOFLOW 1-68i

3.9 Prozessintegration (KIT)

Mit der Verknüpfung der einzelnen Bewertungsmodelle wurde eine Bewertung des integrierten Produktionsnetzwerkes erstellt. Da sich die betrachteten Prozesse in ihrer Durchführung, Aufarbeitung und den benötigten Hilfsstoffen unterscheiden, ist eine Prozessintegration v.a. durch Nutzung der Infrastruktur am Standort möglich. Dazu zählen die Bereitstellung von Elektrizität, Dampf, Wasser und die Abwasserverwertung. Im Austausch mit der InfraLeuna wurden die benötigten jährlichen Mengen für die betrachteten Prozesse für den Standort Leuna berechnet und auf Basis der Verbrauchsmengen Preise für die Bewertungsarbeiten zur Verfügung gestellt. Die Preisdaten wurden bereits in den Berechnungen der Prozessbewertung berücksichtigt. Die weitere Integration, z.B. die Verwendung von Produkten und Nebenprodukten am Standort wurden von der InfraLeuna untersucht.

3.10 Prozessintegration (InfraLeuna)

Durch den Projektverbund wurden eine Vielzahl von chemischen und biochemischen Prozessen im Labormaßstab untersucht, um aus pflanzlichen Ölen wertvolle Zwischenprodukte und Synthesebausteine herstellen zu können (siehe Abbildung 189).

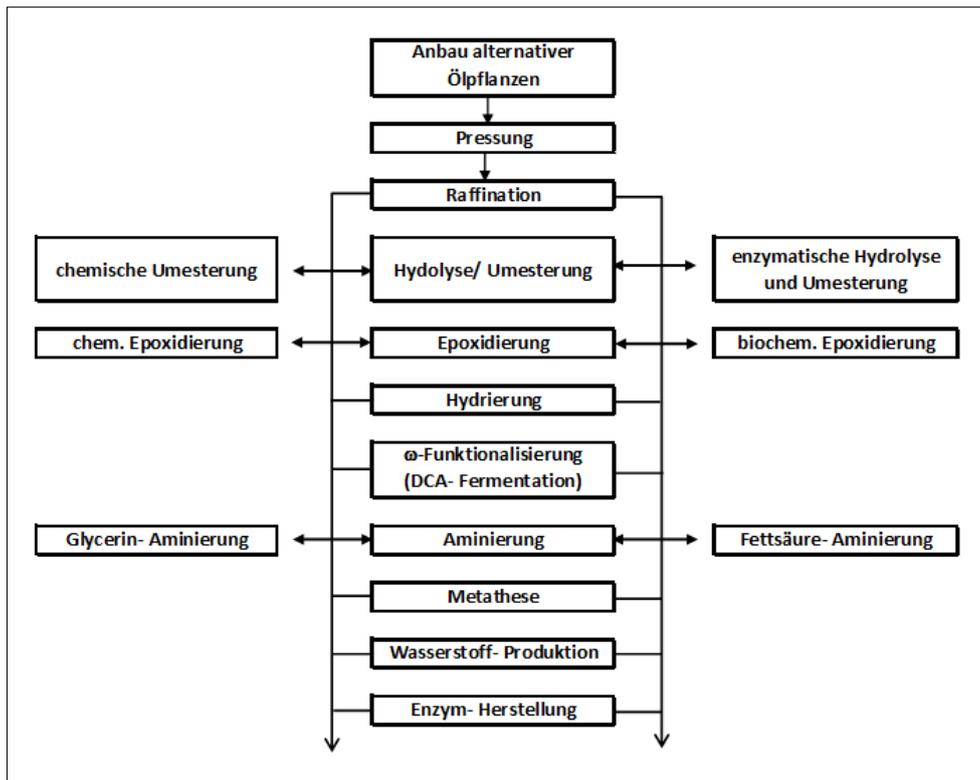


Abbildung 189: Vom Projektverbund untersuchte Prozesse.

Das Ziel war die Übertragung der Prozesse vom Labor in den Technikums- oder Produktionsmaßstab und deren Integration in Form einer Bioraffinerie bzw. eines Anlagenkomplexes in einen Verbundstandort. Mit den Projektpartnern musste entschieden werden, wie die Systemgrenzen gelegt werden und wie hoch der Integrationsgrad der Gesamtanlage werden sollte. Im Konsens wurde deshalb von zwei, möglicherweise sogar drei lokal getrennten, aber jeweils integrierten Anlagenkomplexen ausgegangen (siehe Abbildung 190), wobei die Einbeziehung des Komplexes Fettsäure – Hydrierung – Umesterung, wie er zur Zeit in dieser Form beim DHW in Rodleben existiert, ebenfalls eine Option darstellen könnte. Die Ölpresung und Raffination könnte in einer zentralen Ölmühle oder in kleineren, in der Nähe der Anbauflächen gelegenen Mühlen, erfolgen. Beide Szenarien haben jeweils gewisse Vor- und Nachteile, die es gegeneinander abzuwägen gilt. Einer erhöhten Ölausbeute der zentralen Verarbeitung steht ein erhöhter Transportaufwand und damit verbunden eine schlechtere Ökobilanz gegenüber¹⁷². Bei der Konzeptionierung einer realen Anlage zu einem späteren Zeitpunkt sind hier die Projektpartner gefragt, diese Frage zu klären. Die Einbeziehung der Herstellung der im Projektverbund verwendeten homogenen Katalysatoren in die Gesamtanlage macht aus ökonomischen Gesichtspunkten wenig Sinn, da die benötigten Mengen relativ gering sind und auf Grund der Komplexität der Herstellung und des benötigten Know-Hows dies wirtschaftlicher in einem darauf spezialisierten Unternehmen wie UMICORE bewerkstelligt werden kann.

¹⁷² A. Diehlmann, G. Kreisel: Abschlussbericht über ein Forschungsprojekt, Az. 08150, DBU

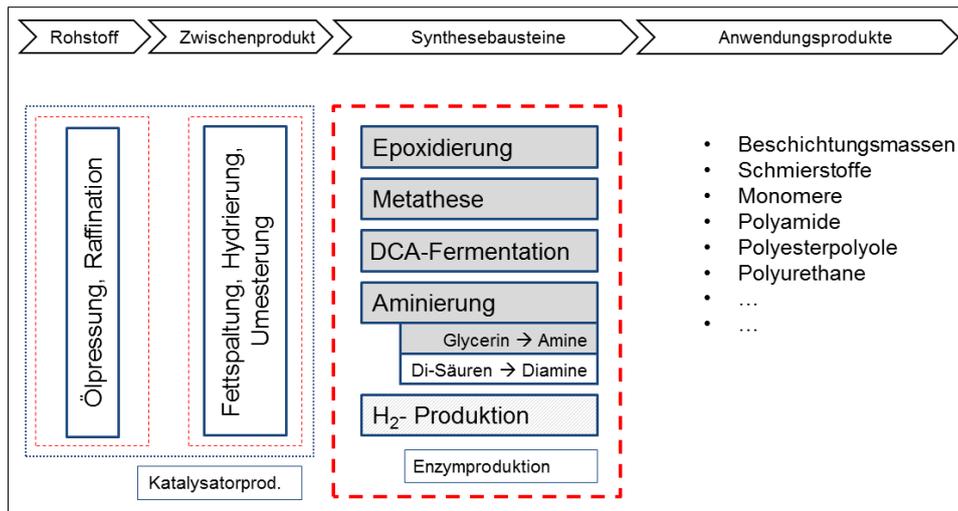


Abbildung 190: Systemgrenzen und Integrationsgrad.

Die in Abbildung 190 grau unterlegten Prozesse wurden durch das KIT aus Laborverfahren in ein technisches Verfahrensabbild übertragen und mathematisch modelliert. Als Anlagengrößen wurden von den Projektpartnern folgende Größen vorgegeben (siehe Tabelle 126), die sich u. a. aus einer Abschätzung der Marktchancen der Endprodukte ergaben (vgl. dazu 3.11 Stoffliche Integration).

Tabelle 126: Prozessintegration ausgewählter Prozesse mit entsprechend angestrebten Produktmengen.

Prozess	Angestrebte Produktmenge
Metathese	400 t/a Octadecen 500 t/a 1,18-Octadecendicarbonsäuredimethylester
Aminierung	5000 t/a Dimethylaminoacetone
DCA-Fermentation / ω-Funktionalisierung	1000 t/a 1,18-Octadecendicarbonsäure
Biochemische Epoxidierung	2000 t/a epoxidiertes Öle

Aus den Diskussionen des KIT mit den Projektpartnern zur Prozessintegration ging hervor, dass die einzelnen Prozesse im Wesentlichen parallel verlaufen und die Integration sich in erster Linie auf die thermische Integration der Anlagen beschränkt. Dies wurde in der Modellierung durch das KIT berücksichtigt.

Auf der Grundlage der vom KIT berechneten Medienverbräuche für die o. g. Anlagengrößen wurden die Preise für die Utilities (Strom, Dampf, Kühlwasser, Frischwasser) sowohl für die Einzelanlagen als auch für die integrierte Anlage bestimmt und an das KIT zur weiteren Prozessbewertung übergeben (siehe Tabelle 127).

Tabelle 127: Medienverbrauch und kalkulierte Utility- Preise für die Einzelanlagen und für eine integrierte Anlage.

Prozess	Bezeichnung	Verbrauch	Jahresverbrauch (8760 h/a)	Leistungsspitze	AP-Preis	LP-Preis	Mengenpreis
Metathese	Strom 0,4 kV	1,188 kW	10,41 MWh	8 kW			149,00 €/MWh
	Mitteldruckdampf	0,680 t/h	5.958 t	1 t/h	17,183 €/t	72.741,12 €/t/h	
	Frischwasser (Kühlwasser)	0,096 m ³ /h	842 m ³	0,14 m ³ /h			175,374 €/Tm ³
Aminierung Glycerin	Strom 0,4 kV	0,223 kW	1,95 MWh	0,3 kW			149,00 €/MWh
	Mitteldruckdampf	4,853 t/h	42.512 t	6,1 t/h	17,183 €/t	72.741,12 €/t/h	
	Kühlwasser	26,781 m ³ /h	234.605 m ³	34 m ³ /h			48,039 €/Tm ³
	Abwasser ¹		1.782 m ³				
DCA-Fermentation	Strom 0,4 kV	10,827 kW	94,84 MWh	41,6 kW			149,00 €/MWh
Biochemische Epoxidierung	Strom 0,4 kV	10,121 kW	88,66 MWh	36,9 kW			149,00 €/MWh
	Mitteldruckdampf	0,342 t/h	2.997 t	0,5 t/h	17,183 €/t	72.741,12 €/t/h	
	Abwasser ¹		14.823 m ³				

Integrierte Anlage	Strom 6 kV	22,000 kW	195,00 MWh	86,9 kW	93,89 €/MWh	206.409,35 €/MW	
	Mitteldruckdampf	5,875 t/h	51.467 t	7,4 t/h	17,183 €/t	72.741,12 €/t/h	
	Kühlwasser	26,878 m ³ /h	235.447 m ³	34 m ³ /h			48,039 €/Tm ³
	Abwasser		16.606 m ³				

¹ Sofern das Abwasser bzgl. seiner Zusammensetzung nicht vorflutgerecht ist, wird eine Behandlung in der Zentralen Abwasserbehandlungsanlage (biologische Behandlung) der InfraLeuna GmbH notwendig. Dafür fallen Kosten an, die jedoch erst nach Vorliegen der vollständigen Zusammensetzung des Abwassers und Prüfung der Einleitbedingungen in die Zentrale Abwasserbehandlungsanlage kalkuliert werden können.

In Abhängigkeit vom Jahresverbrauch und den Leistungsspitzen wurden entweder Mengenpreise (Strom, Kühlwasser, Frischwasser) oder eine Kombination von Arbeitspreis und Leistungspreis (Dampf) berücksichtigt. Der sich aus dem Arbeits- und Leistungspreis ergebende Mischpreis kann formal durch folgende Formel errechnet werden:

$$MP = (AP * \text{Jahresverbrauch} + LP * \text{Vorhaltekapazität}) / \text{Jahresverbrauch}$$

Für die Auslegung einer Anlage ergeben sich folgende Einschränkungen bzw. Möglichkeiten zur Optimierung:

- Im Prozess Metathese wird auf Grund der geringen Menge an Kühlwasser vorgeschlagen, die Nutzung der zentralen Kühlwasserversorgung durch eine Durchflusskühlung mit Frischwasser zu ersetzen. Der Grund dafür ist der verringerte Installationsaufwand und damit verbunden geringere Investitionskosten, da bei Verwendung von Frischwasser z.B. eine Rückkühlleitung entfällt.
- Im integrierten Prozess muss überlegt werden, ob die Errichtung und der Betrieb eines lokalen Kühlwerks kostengünstiger ist als eine Versorgung mit Kühlwasser aus dem zentralen Netzwerk.

- Eine integrierte Anlage kann kostengünstiger errichtet werden, da die im Normalfall für jede Einzelanlage zu entrichtenden Anschlusskosten und Baukostenzuschüsse nur einmal für die Gesamtanlage an den Standortbetreiber zu entrichten sind.
- Die Anschlusskosten können zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschätzt werden, da diese abhängig von der Lage des Grundstücks im Industriepark sind. Eine Zuweisung eines Areals zum jetzigen Zeitpunkt ist auf Grund des eingeschränkten Ergebnisstands zur integrierten Gesamtanlage incl. Flächenbedarf nicht möglich. Ziel ist es aber mit Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit des Gesamtverfahrens, die notwendigen Erschließungs- und Anschlusskosten durch eine optimale Wahl des Areals zu minimieren.
- Die technische Grenze für die kontinuierliche Abnahme von Mitteldruckdampf liegt bei 0,5 t/h. Bei einem diskontinuierlichen Verbrauch über längere Zeit unterhalb dieser Grenze, wie bei den Einzelanlagen avisiert, kann es zur verstärkten Kondensatbildung in den Dampfleitungen kommen, so dass ein sicherer Betrieb der Dampfleitungen nicht mehr gewährleistet werden kann. Als Alternativen wären eine elektrische oder gasbasierte Beheizung bzw. ein lokaler kleiner Dampferzeuger in Betracht zu ziehen, die wiederum die Investitionskosten erhöhen, gleichzeitig aber die Flexibilität senken würde.
- Über die Kosten zur Abwasserbehandlung können keine Aussagen getroffen werden, da zum gegenwärtigen Zeitpunkt weder Angaben zur Menge als auch zur Zusammensetzung des entstehenden Abwassers von den Projektpartnern getroffen werden können. Es müsste ebenso erst einmal die Frage der prinzipiellen Behandlungsfähigkeit des Abwassers in einer Kläranlage positiv beantwortet werden können.

3.11 Stoffliche Integration (InfraLeuna)

Neben der Prozessintegration wurde untersucht, inwiefern sich die Umsetzungsprodukte aus den vom Projektverbund untersuchten Prozessen in einen Stoffverbund integrieren lassen können.

Die Produkte stellen theoretisch interessante Synthesebausteine für weitere Polymere oder Spezialchemikalien dar, wären aber auch die Ausgangsbasis für direkte Applikationen in der Industrie. Die potentiellen Anwendungen der Synthesebausteine wurden soweit möglich in der Literatur recherchiert und beispielhaft in Tabelle 128 zusammengefasst.

Tabelle 128: Produkte und Synthesebausteine und deren potentielle Anwendungen in der Industrie.

Prozess	Produkt	Potentielle Anwendung
Metathese	Octadecen	Drilling fluids Schmierstoffe und Additive Chemikalien für die Papierleimung (ASA = alkenyl succinic anhydride)
	Octadecen-dicarbon säuredimethylester	Polyester, Polyamide
DCA-Fermentation (ω -Funktionalisierung)	Octadecendicarbon säure (DCA)	Kosmetikindustrie Polyester, Polyamide Korrosionsschutzmittel Hot Melt- Klebstoffe PVC-Additive
Glycerin - Aminierung	Dimethylamino-Aceton Dimethylamino-Propanol	DMA-Propanol --> Tenside Korrosionsinhibitor, Gaswäsche
Aminierung	Langkettige Diamine	Polyamide
Epoxidierung	Fettsäure-Epoxide	Beschichtungen, Harze, Lacke PVC-Additive und Stabilisatoren
	Epoxidierte Öle	Schmierstoffe Umsetzung zu Polyesterpolyolen
Synthesegas aus Glycerin	„grüner“ Wasserstoff/ Synthesegas	Hydrierung --> im Projekt (?) „clean energy“ --> Wasserstoff- Antrieb
Raffination/ Umesterung	TMP- Oleat/ Raffinierte Öle	Schmieröle, Sägekettenöle, Hydrauliköle, Trennöle

Diese Zusammenstellung sagt noch nichts über die tatsächliche kommerzielle Verwendungsmöglichkeit und das Marktpotential der Produkte aus. Da diese oftmals keine kommerziell verfügbaren Produkte darstellen, wurde z. T. auf verfügbare vergleichbare Produkte ausgewichen und deren Marktgröße untersucht.

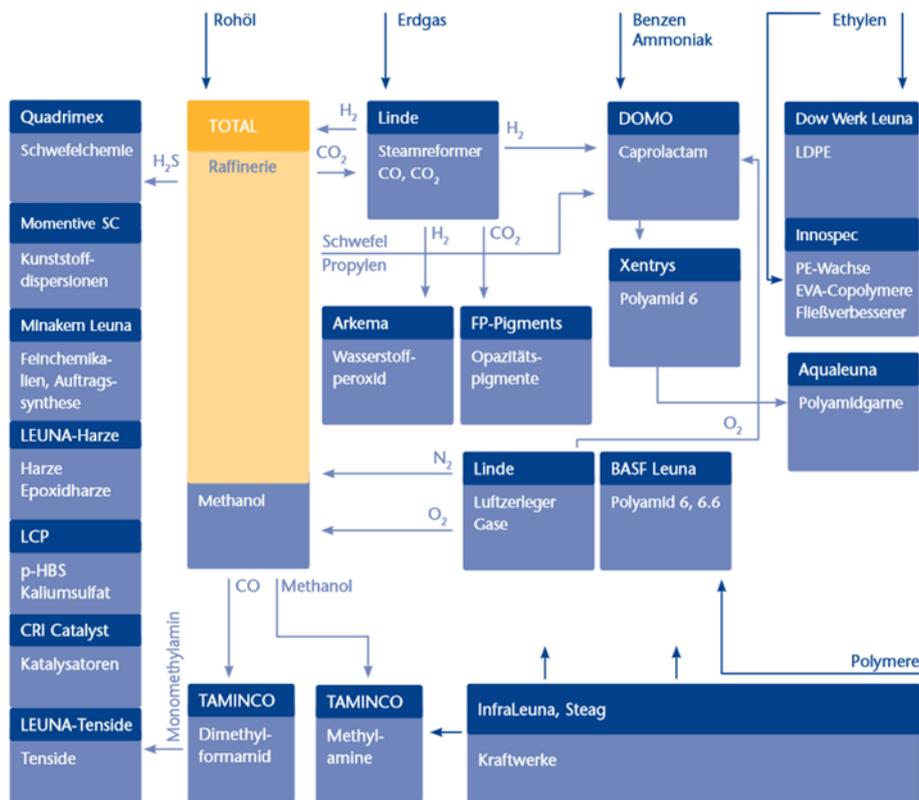


Abbildung 191: Interner Stoffverbund am Chemiestandort Leuna.

Einer der Grundgedanken des Projekts war es, die Produkte aus den chemischen und biotechnologischen Verfahren als Ausgangsprodukte für weitere Umsetzungen in den Stoffverbund an einem Chemiestandort, speziell Leuna (siehe Abbildung 191), einfließen zu lassen oder um bestehende petrochemisch-basierte Produktlinien ablösen zu können. Hoffnungen ergaben sich besonders für die Produkte aus der Metathese und der ω -Funktionalisierung, die zusammen mit den Diaminen aus der Aminierungsreaktion als Monomere für Polyamide fungieren könnten. Dieser Ansatz lässt sich jedoch am Standort Leuna zum jetzigen Zeitpunkt nicht realisieren. DOMO Caproleuna GmbH produziert ausschließlich Polyamid 6 auf der Basis von Caprolactam-6; eine Produktion von Polyamid X.Y (X= Diamin, Y= Dicarbonsäure), in die die Synthesebausteine Octadecendicarbonsäure und die Diamine einfließen könnten, existiert bisher nicht. BASF als weiteres Standortunternehmen, das im Segment Polyamide tätig ist, betreibt ausschließlich eine Compoundierung am Standort.

Für die anderen im Projekt dargestellten Verbindungen existieren bisher am Standort Leuna ebenfalls nur eingeschränkte oder keine Verwendungsmöglichkeiten. Nur für DMA-Propanol (Taminco) und raffiniertes Senföl (Addinol) sowie bei ökonomischer Vertretbarkeit die epoxidierten Öle (Hobum) kommt ein zukünftiger kommerzieller Einsatz in Betracht. Es bleibt zu klären, inwiefern die Leuna Harze GmbH die epoxidierten Öle als Flexibilisierungsmittel in ihre Epoxid-Formulierungen einfließen lassen kann.

4 Verwertung

Im folgenden Abschnitt werden die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten nach Projektende durch die einzelnen Projektpartner beurteilt und Angaben zur geplanten Verwertung aufgeführt.

4.1 Wirtschaftliche, wissenschaftliche und technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Fraunhofer IGB

Epoxidierende Enzyme und biochemische Epoxidierung

Am Fraunhofer IGB wurden im Zusammenhang mit diesem Verbundvorhaben geeignete Screeningmethoden zur Identifikation epoxidierender Enzyme entwickelt und die entsprechenden analytischen Methoden etabliert. Die Enzyme, bei denen eine hohe Perhydrolyse-Aktivität nachgewiesen werden konnte, die für die Epoxidierung notwendig ist, sollen durch Schutzrechtsanmeldungen patentiert werden. Das Fraunhofer IGB wird diese Schutzrechtsanmeldungen dazu nutzen, interessierten Firmen eine biokatalytische Epoxidierung zur Verfügung zu stellen, und somit auch wirtschaftlich zu verwerten.

Bei den neuen Enzymen besteht zudem das Potential durch eine mögliche günstigere Herstellung in Kombination mit einer optimierten Immobilisierungstechnik und damit gesteigerten katalytischen Aktivität und Stabilität optimiert zu werden. Weiterführende Projekte zur Identifikation noch stabilerer Biokatalysatoren können nach Projektende angegangen werden.

Der vom Fraunhofer IGB entwickelte Prozess zur enzymatischen Herstellung von Epoxiden konnte im 10 L-Maßstab optimiert werden. Das Fraunhofer IGB hat sich mit diesen Arbeiten in dem Bereich Scale-Up und Modellierung positioniert. Mustermengen im kg-Maßstab können auf Basis der in diesem Projekt erzielten Erkenntnisse in Zusammenhang mit nachfolgenden Arbeiten zur Verfügung gestellt werden. Ein Transfer der Aufskalierung für andere Prozesse ist möglich, eine wirtschaftliche Verwertung somit möglich. So können z. B. Auftragsarbeiten für Firmen durchgeführt werden, die die Aufskalierung von Laborsynthesen wünschen.

Eine Schutzrechtsanmeldung des Verfahrens ist derzeit in Arbeit. Im Allgemeinen hat der Prozess das Potenzial für eine wirtschaftliche Anwendung, sofern es vor allem gelingt die Biokatalysatorkosten im Prozess weiter zu senken. Eine entsprechende Kostensensitivitätsanalyse wurde vom IIP durchgeführt.

Gegenüber der auf dem Markt erhältlichen wenigen Epoxide aus Pflanzenölen (z.B. aus Sojabohneöl und Leinöl) bedarf es jedoch noch weiterer anwendungstechnische Charakterisierung, um einen im Produktsegment der Pflanzenölepoxide wirtschaftlich konkurrenzfähigen Prozess zu etablieren.

Um diesen Forschungsbedarf zu decken sollen baldmöglichst weitere Fördergelder akquiriert werden, um das Potential der Enzyme und des Verfahrens noch besser nutzen zu können. Aufgrund des erfolgreichen Abschlusses und der Arbeit während des Projektes zeigten sich mehrere Projektpartner offen für eine neue Zusammenarbeit woraus wiederum auch Industrieaufträge resultieren könnten.

Produktionsstämme für die ω -Funktionalisierung

Die Stammentwicklung eines potentiellen DCA-Produzenten wurde innerhalb des Projektes vorangetrieben. Zudem wurden grundlagenorientierte Arbeiten vorgenommen, die für ein besseres Verständnis der Genetik und der Stoffwechselwege des Fettsäuremetabolismus des ausgewählten Stammes geführt haben. Neben der Blockierung der β -Oxidation ist zudem eine Überaktivierung der ω -Oxidation vorgesehen. Es wird daher stark angenommen, dass die Stammentwicklung ca. 3 Jahre nach Projektende abgeschlossen sein wird. Forschungsgelder zur Stammentwicklung sollen beantragt werden. Generell wird eine spätere kommerzielle Verwertbarkeit der Stämme als sehr gut eingestuft. Im Rahmen des Projektes wurden neue gentechnische Methoden zur Modifikation und analytische Methoden entwickelt, die nachfolgend weiter in das Portfolio des Fraunhofer IGB aufgenommen wurden, um auch Kunden aus diesem Bereich zu akquirieren.

Der vom Fraunhofer IGB entwickelte Prozess zur fermentativen Herstellung von DCA konnte im 40 L-Bioreaktor optimiert werden. Vorangehend wurde die wirtschaftliche Verwertung des Scale-up eines chemisch-enzymatischen Verfahrens vorgestellt. Analog dazu hat das Fraunhofer IGB sein Portfolio auch um die Aufskalierung eines ganzzellkatalytischen Verfahrens erweitert. Da der Technikums- oder Pilotmaßstab Vorstufen einer industriellen Nutzung darstellen, sind vonseiten der Industrie Aufträge diesbezüglich zu erwarten, da auch hier die Erkenntnisse für andere ganzzellkatalytische Verfahren genutzt werden können. Die Aufskalierung bietet auch für die Gewinnung industrieller Partner für Forschungsprojekte neue Erfolgsaussichten. Für eine Beteiligung von Industrieunternehmen ist die Herstellung von Musterproben von großem Interesse, da die hergestellten Produkte auch ausgiebig getestet werden sollen. Dies vereinfacht die Gewinnung dieser und erhöht die Chance zukünftig eine größere Anzahl an Projekten initiieren zu können.

DHW

Im Rahmen des Projektes wurden alternative, einheimische Öle untersucht und daraus erste potentielle Produkte dargestellt. Momentan erfordert eine industrielle Nutzung von Senföl und Drachenkopfföl sowie daraus hergestellter Derivate noch weitere Grundlagenforschung. Die Untersuchungsergebnisse aus der Projektbearbeitung zeigen, dass Produkte, wie die Polyolester aus Senföl, ein vielversprechendes Eigenschaftsprofil aufweisen, um sie im Schmierstoffbereich nutzen zu können. Jedoch muss die Wirtschaftlichkeit zu den petrochemisch als auch zu oleochemisch basierenden Produkten gegeben sein oder gesetzliche Vorgaben einen Einsatz erfordern.

Vor Beginn der Markteinführung alternativer Produkte muss auch die einheimische Rohstoffversorgung über Anbauverträge abgesichert werden. Insbesondere für die Wirtschaftlichkeit ist es entscheidend, die Bereitstellungskosten der Öle über neue Pflanzenzüchtungen oder durch neue Anbaumethoden abzusenken. Sollte ein solches Vorhaben beginnen, so werden Ergebnisse erst längerfristig zur Verfügung stehen.

Hobum

Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten sind in erster Linie an die Rohstoffpreise der eingesetzten Öle gebunden. Ebenso ist in einigen Fällen eine Prüfung der Zulassungen (Reach...) erforderlich.

Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende können noch nicht abgeschätzt werden. Gleichwohl werden die Entwicklungen der Polymersysteme im Eigeninteresse fortgeführt.

Eucodis

Die innerhalb der beiden Förderperioden identifizierten Enzyme aus der Familie der Lipasen sind für unterschiedliche Applikationen wie die Hydrolyse, Veresterung, Umesterung oder Epoxidierung interessant und haben demnach eine entsprechend hohe wirtschaftliche Bedeutung für Eucodis Bioscience.

Neben dem innovativen Einsatz bei der Epoxidierung von ungesättigten Fettsäuren ist eine gezielte Freisetzung von Fettsäuren bzw. Fettsäureestern durch Hydrolyse bzw. Umesterung von heimischen pflanzlichen Ölen in wässrigen bzw. organischen Medien bei niedrigen Temperaturen von großem industriellem Interesse. Entsprechende Pflanzenölester finden als Schmierstoffe, „functional food“, Kosmetika oder in der Herstellung von Biopolymeren Verwendung.

Die im Laufe des fünfjährigen Projektes umfassend charakterisierten und bis zur Anwendungsreife entwickelten Lipasen können sowohl Kunden aus der chemischen Industrie als auch Kunden aus der pharmazeutischen Industrie, Kosmetikindustrie und Lebensmittelindustrie angeboten werden. So werden in der pharmazeutischen Industrie Lipasen zur Generierung neuer Wirkstoffe eingesetzt, während in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie derartige Enzyme zur Herstellung von Emulgatoren sowie strukturierten bzw. energiereduzierten Fetten dienen. Die dargestellten Ergebnisse belegen deutlich, dass die eingesetzten neuen Lipasen gegenüber kommerziell erhältlichen Enzymen wesentlich verbesserte Eigenschaften aufweisen, die für eine spätere industrielle Nutzung wichtig sind. Neben der weiteren Prozessentwicklung durch die Projektpartner in diesem Verbundprojekt findet daher eine gezielte Vermarktung der Lipasen durch Eucodis statt. Mit dem im Projekt gewonnenen Wissen um die Eigenschaften der Lipasen können diese nun gezielt den potenziellen Kunden aus Feinchemie, Pharma und Kosmetikindustrie angeboten werden.

In diesem Projekt werden erstmals die Vorteile der Eucodis Lipasen gegenüber den bisher am Markt erhältlichen Lipasen, insbesondere CalB als Referenzenzym, anschaulich und wissenschaftlich begründet gezeigt. Synthesewege für neue, auf nachwachsenden Rohstoffen basierende chemische Synthese-Bausteine sollen in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern aus Industrie, aber auch aus universitären Forschungseinrichtungen identifiziert werden. Neben Kohlehydraten bieten sich ja wie schon in diesem Projekt bearbeitet, insbesondere die Pflanzenöle an, um hieraus solche neuen Synthesebausteine zu generieren. Die ersten Schritte einer solchen Pflanzenöl und -fett basierten Synthesekette bestehen meist aus einer spezifischen Umesterung der Fettsäuren. Gerade für diese Umesterung konnte im Rahmen dieses Projektes schon gezeigt werden, dass die neuen Eucodis-Lipasen hier ein großes Potenzial besitzen und Vorteile gegenüber

herkömmlichen chemischen Verfahren haben. Im Laufe des Projektes hat sich insbesondere herausgestellt, dass sich die Eucodis-Lipasen hier ein großes Potenzial besitzen und Vorteile gegenüber herkömmlichen chemischen Verfahren haben. Im Laufe des Projektes hat sich insbesondere herausgestellt, dass sich die Eucodis-Lipasen nicht nur hervorragend dazu eignen, Methyl-Ester der Fettsäuren herzustellen, sondern auch langkettige oder verzweigte Alkohole als Substrat akzeptieren, deren Ester dann in der Pharma- und Kosmetikindustrie als feuchtigkeitsspendende Ester bzw. technisch als Schmierstoffe und Emulgatoren eingesetzt werden können. Es wird daher angestrebt, in diesen Bereichen im Rahmen akademisch-industrieller Kooperationen solche Fettsäureester mit neuen Eigenschaften herzustellen, die in Pharma, Kosmetik oder Feinchemie eingesetzt werden können. Mit einer Vermarktungsstrategie aufbauend auf diesen Daten kann der Zugang zu den entsprechenden Entwicklungsabteilungen geschaffen und daher leichter neue Kunden gewonnen werden. Erste wirtschaftliche Erfolge zeigen sich im Interesse verschiedener Firmen aus dem Bereich Ölverarbeitung für Lebensmittel und Kosmetik. Da die Produktzyklen bis zur Marktreife in der Kosmetik bzw. Feinchemie deutlich kürzer sind als z. B. in der Pharma-Branche, aber auch als in der technischen Großproduktion zum Ersatz erdölbasierter Produkte, ist es möglich, solche Prozesse von der Entwicklung über Prototypen und Pilotproduktion bis hin zur Produktion in einem Zeitraum von 3-5 Jahren

Aus der Sicht von Eucodis Bioscience kann das Projekt daher insgesamt als Erfolg gewertet werden.

Fraunhofer ICT

Metathese

Die erzielten Ergebnisse der Untersuchungen der Metathese zeigten die prinzipielle Machbarkeit des Verfahrens auf. Dabei wurden weitere signifikante Möglichkeiten der Verfahrensverbesserung insbesondere in Hinblick auf eine optimierte industrielle Anwendung offensichtlich. Diese können in Folgeprojekten bearbeitet und gemeinsam mit der Industrie umgesetzt werden. Für Fraunhofer besteht hier die Möglichkeit zur Verwertung in weiteren Projekten.

Die Metathese wurde im Rahmen des Projektes erfolgreich in den 100 L Maßstab skaliert, hierbei konnte die technische Machbarkeit demonstriert werden. Der Verlauf der Arbeiten zeigt, dass zum einen eine weitere Hochskalierung ohne vorhersehbare Probleme machbar ist. Weiterhin konnten Verfahrensverbesserungen aus dem Scale-up abgeleitet werden, welche weitere Ansätze für Optimierungen des Gesamtverfahrens in zukünftigen Arbeiten aufzeigen. Ergänzt wurden die Arbeiten mit einem Proof-of-concept für die Aufarbeitung der Reaktionsgemische und einer Kostenbetrachtung für das KIT, welche ebenfalls das Potential des Verfahrens aufzeigt.

Zusätzlich ermöglichten die Arbeiten der Firma Umicore Prozesswissen für die Anwendung der dort hergestellten Katalysatorsysteme aufzubauen.

Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten der Metathese werden als hoch angesehen. Notwendig ist allerdings das Aufgreifen der Arbeiten durch Hersteller der Produkte und die Anwendung durch Endanwender (z.B. Polymerhersteller). Die Arbeiten in diesem Projekt haben hierzu grundlegende Arbeiten geleistet, welche den Grundstein für entsprechende Folgeprojekte oder interne Arbeiten legen.

Das hohe wirtschaftliche Potential belegt auch die Errichtung einer Anlage für die Herstellung entsprechender Verbindungen mittels Metathese in Asien.

Synthese von stickstoffhaltigen Verbindungen

Im Rahmen der Arbeiten konnte ein neues Katalysatorsystem gefunden werden, welches jedoch weiterer Arbeiten bedarf, um die Performance von Katalysatoren auf Basis von Rhodium zu erreichen. Nichtsdestotrotz stellt diese Erkenntnis ein Ergebnis über dem Stand der Technik dar, welches interessante neue Ansätze für wissenschaftliche Arbeiten liefert.

Die Arbeiten des Fraunhofer ICT auf dem Gebiet der stickstoffhaltigen Verbindungen mit Schwerpunkt der reduktiven Aminierung wurden grundlagenorientiert, mit dem Ziel der Suche nach geeigneten Katalysatoren, sowie dem allgemeinen Verständnis der Reaktion angelegt und durchgeführt. Hierbei konnten geeignete Katalysatoren gefunden werden. Hierauf aufbauend sind weiterführende Arbeiten möglich, welche aufgrund der Art der Reaktion auch zu wirtschaftlich relevanten Prozessen zur Herstellung von Aminen führen können.

InfraLeuna

Das Gesamtvorhaben verfolgte einen prozess- und produktorientierten Ansatz. Es ergänzt die Bestrebungen der InfraLeuna GmbH, eine Technologieplattform zur integrierten Herstellung von biobasierten Produkten durch chemische und biotechnologische Verfahren auf der Basis nachwachsender Rohstoffe am Standort Leuna zu begründen und zu etablieren. Erste Schritte wurden dazu bereits durch die Gründung des Fraunhofer-Zentrums für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP) in Leuna und die Mitarbeit der InfraLeuna in weiteren Forschungsprojekten mit dem Schwerpunkt Entwicklung und Skalierung von chemisch-biotechnologischen Verfahren und deren Integration in einen Industriestandort begonnen.

Das Anliegen der InfraLeuna GmbH ist es, einen schrittweisen Umbau des Standortes Leuna hin zu einem von fossilen und nachwachsenden Rohstoffen gleichermaßen geprägten Chemiestandort zu vollziehen. Durch die Integration der Synthesebausteinherstellung und der Folgechemie innerhalb der weiteren Wertschöpfungskette in den Produktionsverbund kann zudem die Umstrukturierung des Produktionsstandorts weg von der petrochemischen Massenproduktion hin zu einem Spezialchemikalien-Verbundstandort initiiert werden. Die Erkenntnisse aus dem Projekt können von der InfraLeuna dazu verwendet werden, die dazu notwendigen Konzeptionen und Planungen für den Wandel weiter zu verfolgen und zu konkretisieren. Aufbauend auf der neuen Rohstoffbasis lassen sich Projekte zur weiteren Diversifizierung des Standortes Leuna entwickeln. Standortunternehmen, die nicht am beantragten Projekt beteiligt waren, sowie Unternehmen von außen können so evtl. von den Vorteilen einer Nutzung nachwachsender Rohstoffe am Standort Leuna überzeugt werden, so dass es mittelfristig zum Aufbau neuer Produktlinien oder zur Ansiedlung von neuen

Firmen kommt. Dies würde die Geschäftsbasis der InfraLeuna als Infrastruktur- und Dienstleistungsunternehmen nachhaltig und langfristig verbreitern.

Die Erkenntnisse aus dem Projekt können von der InfraLeuna dazu verwendet werden, die dazu notwendigen Konzeptionen und Planungen für die oben beschriebene Entwicklung weiter zu verfolgen und zu konkretisieren. Aufbauend auf der neuen Rohstoffbasis lassen sich Projekte zur weiteren Diversifizierung des Standortes Leuna entwickeln. Standortunternehmen, die nicht am beantragten Projekt beteiligt waren, sowie Unternehmen von außen können so evtl. von den Vorteilen einer Nutzung nachwachsender Rohstoffe am Standort Leuna überzeugt werden.

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Die zahlreichen gewonnenen Erkenntnisse und Erfahrungen können nach Projektende in verschiedener Hinsicht genutzt werden. Beispielsweise erwies sich das entwickelte Fed-Batch-Fermentationsverfahren als geeignet, um die verschiedenen, im Projekt relevanten Lipasen bis zu einem Maßstab von 50 L zu produzieren. Die Übertragbarkeit dieses Verfahrenskonzeptes auf weitere, biotechnologisch interessante Proteine konnte bereits im eigenen Hause nachgewiesen werden und wird auch zukünftig weiter untersucht. Insbesondere stellten die erzielten Ergebnisse zur Lipase-Produktion im 50 L-Maßstab der Universität Halle-Wittenberg die Grundlage für die Maßstabsvergrößerung am Fraunhofer CBP dar. Die daraus resultierenden Daten können den Industrie-Partnern des Konsortiums eine Betrachtung der Wirtschaftlichkeit und eine anschließende Verwertung erleichtern.

Darüber hinaus tragen die Ergebnisse der verschiedenen Immobilisierungsstrategien zu einem besseren Verständnis der Vorgänge und Effekte bei der kovalenten Fixierung von Lipasen bei. Die gewonnenen Erfahrungen können ebenso für die Immobilisierung anderer Zielproteine verwertet werden.

Eine kommerzielle Nutzung der im Projekt erhaltenen Resultate seitens der Universität Halle-Wittenberg ist nicht geplant.

Taminco

Die Aminbausteine, die aus Glycerin gewonnen werden, sind neue Chemikalien, die auf klassischen petrochemischen Wegen nicht leicht zugänglich sind. In diesem Sinne gibt es keinen vergleichbaren direkten Konkurrenten. Also gelten die neuen biologisch basierten Verbindungen in einigen Anwendungen als Ersatz für petrochemisch erzeugte Produkte, wie Tenside. Sie bieten den Vorteil eines „grünen Etiketts“, welches in verschiedenen Marktsegmenten wichtig ist. Aminbausteine, aus Glycerin abgeleitet, können am Chemiestandort Leuna hergestellt werden, da die notwendigen Rohstoffe (Glycerin, H₂, DMA) lokal vorhanden sind. Aus Gründen der Versorgung und Rückführung sollte die Anlage in einen Methylamine-produzierenden Betrieb integriert werden.

Die Forschung an der Herstellung von Diaminen aus Disäuren über Diamide hat gezeigt, dass dies nicht der bevorzugte Weg zur Herstellung von Diaminen ist. Daher wird Taminco in diesem Bereich keine Aktionen mehr durchführen.

Tenside für Epoxide müssen weiter entwickelt werden um die wirklichen Vorteile dieser neuen Klasse von kationischen Tensiden einschätzen zu können und um genügend Material zur Tensidcharakterisierung und erste Anwendungstests bei einem ausgewählten Kunden zu erhalten (ca. ein Jahr nach Projektende). TMA.HCl ist ebenfalls am Standort Leuna vorhanden und epoxidierte Fettsäuren können leicht transportiert werden. Die zusätzliche Verwendung von TMA verbessert die Wirtschaftlichkeit und den "Verbund" der Methylamine-Anlage am Standort Leuna.

Umicore

Für die im Bericht genannten Metallkomplexe laufen Arbeiten zur wirtschaftlichen Verwertung bzw. Integration. Die in diesem Projekt gewonnen Erkenntnisse zur Synthese der Produkte eignen sich nach aktuellem Stand nicht für einen patentrechtlichen Schutz.

KIT

Dieses Projekt wurde vom KIT IIP aus wissenschaftlichen Zwecken durchgeführt. Es werden keine Erfindungen oder wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende verfolgt.

In direkter Nachfolge zu dem Vorhaben bieten sich weitergehende Bewertungen der möglichen Produkte an. Vielversprechende Produkte wurden vielfach erst gegen Ende des Projekts identifiziert und konnten daher nicht mehr tiefgehend bewertet werden. Insbesondere hinsichtlich geeigneter Referenzen besteht hier daher weiterer Forschungsbedarf.

Aus methodischer Sicht stellt die Entwicklung generalisierter Bewertungsansätze weiterhin eine Herausforderung dar. Hier spielt die Balance zwischen notwendigen tiefgehenden Analysen, und den hierfür notwendigen Daten, die in frühen Entwicklungsstadien meist noch nicht vorliegen oder nur mit erheblichem Aufwand und Unsicherheiten geschätzt werden können, eine große Rolle. Unsicherheiten technischer und ökonomischer Parameter, aber bisweilen auch ökologischer Wirkungsabschätzungsmethoden, sollten vermehrt in die Betrachtungen mit aufgenommen werden. Auch im Hinblick auf die für insbesondere neue Produkte und Anwendungen vielfach nicht existierenden stofflichen Referenzsystemen fehlen noch geeignete Daten und Methoden.

Addinol

Pflanzenölester

Gute Aussichten bestehen für den Einsatz der Esteröle auf Senfölbasis bei den Biohydraulikölen vom Typ HEES. Dabei besteht die Möglichkeit die Viskositätsklassen 32, 46 und 68 herzustellen. Ein weiterer interessanter Anwendungsfall ist das Basisöl für schwerentflammbare Hydraulikfluide. Der Einsatz als schwerentflammbare Hydraulikflüssigkeit erfordert die Freigabe nach dem 7. Luxemburger Bericht. Eine wichtige Entscheidung für den Einsatz der Pflanzenölester ist eine ausreichende Menge an den jeweiligen Rohstoffen. Es sind dabei eine konstante Produktqualität und marktübliche Preise anzustreben.

Einsatz von Pflanzenölen

Als Verlustschmiermittel mit der Anwendung als Sägekettenöl ist gegeben. Dabei könnte auch über den möglichen Ersatz für Rapsöl nachgedacht werden. Etwas gewöhnungsbedürftig ist der Geruch des Senföles. Im Vergleich zum bisher eingesetzten Rapsöl hebt sich der Geruch der mit Senföl formulierten Produkte deutlich ab. Diese Aufgabenstellung sollte allerdings lösbar sein, z.B. durch Desodorierung. Auch hier gilt, dass bei einer ausreichend vorhandenen Menge und Qualität der Rohstoffe und marktübliche Preise ein Einsatz möglich ist.

Betontrennmittel

Die von DHW vorgeschlagene Lösung sollte auch bei diesem Partner hergestellt werden. Gute Chancen werden bei der Vermarktung durch DHW und/oder Addinol gesehen. Weiterhin besteht die Möglichkeit das Produkt Herstellern von Bauhilfsstoffen anzubieten. Eine entscheidende Voraussetzung für den Einsatz ist die ausreichende Menge an den jeweiligen Rohstoffen. Weiterhin muss eine konstante Qualität bestehen. Und außerdem sind marktübliche Preise anzustreben.

TLL

Aufgrund der Fettsäurezusammensetzung und daraus resultierenden Eigenschaften der verarbeiteten Pflanzenöle wird seitens der Projektpartner im Iberischen Drachenkopf und im Koriander das größte Potenzial für eine praktische Anwendung gesehen.

Stellschrauben für einen günstigen Erzeugermindestpreis und daraus resultierend eine günstige Bereitstellung der pflanzlichen Öle ergeben sich in erster Linie durch Züchtungsmaßnahmen. Hier liegt der Fokus auf dem Etablieren von Krankheitsresistenzen und beim Drachenkopf zudem in einem festen Kornsitz. Diese Züchtungsziele allein dienen bereits der Ertragerhöhung und -stabilisierung. Aus einer Bearbeitung des Ölgehaltes und zusätzlich des Kornertrages würden weitere Ertragsverbesserungen resultieren. Das aktuell erkennbare Ertragspotenzial und die vorhandene Variabilität der alternativen Ölpflanzen lässt positive Züchtungsergebnisse erwarten. Allerdings bedingt der Fremdbefruchtercharakter der einzelnen Arten Mindestlaufzeiten von 10 bis 12 Jahre für erste züchterische Erfolge.

Ein weiterer Beitrag zur Verbesserung der Ertragsparameter liegt in der Optimierung der Anbauverfahren. Insbesondere Untersuchungen zu einem optimalen Pflanzenschutz müssten folgen.

Eine Verbesserung bezüglich der Ölausbeute würde das Pressen in einer zentralen Ölmühle garantieren. Hier sollte dann zudem eine monetäre Bewertung des Rapsextraktionsschrotes in verschiedenen Anwendungsvarianten vorgenommen werden. Hinsichtlich eines attraktiven Ölpreises ist der Einsatz der Nebenprodukte in der Futtermittelindustrie zu favorisieren, weil hier die höchste Wertschöpfung erzielt wird. Folglich müssen die Nebenprodukte von Drachenkopf und Koriander in die Positivliste für Futtermittel aufgenommen werden.

Fraunhofer CBP

Lipasen kommen als Biokatalysatoren in den verschiedensten Industriezweigen zum Einsatz, unter anderem in der Lebensmittelindustrie zur Herstellung von Geschmacks- und Duftstoffen, in der Abfallwirtschaft zur Bioremediation oder in der Pharmaindustrie zur Produktion von reinen Enantiomeren [Benjamin & Pandey, 1998; Pandey et al., 1999]. Eine der derzeit bedeutendsten Lipasen mit epoxidierenden Eigenschaften ist die Lipase CalB aus *Candida antarctica*. Die rekombinante Herstellung von CalB wurde bereits mehrmals in *E. coli* untersucht und optimiert [Liu et al., 1996; Larsen et al., 2008]. Jedoch liegt hier das Enzym vor allem in Inclusion Bodies vor. Weitaus erfolgreicher ist die Expression von CalB in *P. pastoris* [Vadhana et al., 2013; Samuel et al., 2013; Yang et al., 2013]. Da die Expression in *P. pastoris* mit einer Methanolinduktion einhergeht und damit besonderen Bau- und Sicherheitsregulierungen unterliegt, ist ein Markt für die Produktion in *E. coli*-Systemen gegeben.

Die durch den Projektpartner Eucodis identifizierten Lipasen innerhalb der ersten Projektphase, welche in *E. coli* exprimiert werden, könnten nicht nur den Markt erweitern sondern die bisher genutzten Enzyme durch bessere katalytische Eigenschaften ablösen. Dem Fraunhofer CBP gelang es, verschiedene Lipasen bis in den 1 m³-Maßstab zu produzieren. Die Fermentationen verliefen unproblematisch und lieferten in Bezug auf die Biomasse und den Substratverbrauch reproduzierbare Ergebnisse. Die Übertragung der Aufbereitungsverfahren war dagegen mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Hier sind weiterführende Optimierungen notwendig, um die Wirtschaftlichkeit des Prozesses zu steigern und höhere Ausbeuten zu erzielen. In Frage kommen zum Beispiel die Fällung mittels Polyethylenimin zur Abtrennung von negativ geladenen Makromolekülen oder eine stufenweise und somit spezifischere Fällung mit Hilfe von Ammoniumsulfat, welche nicht nur zur Aufkonzentrierung dient. Zum anderen ist es wichtig, eine Alternative zur Trennung mittels Separator zu finden. Kleine Zelltrümmer können mit dieser Methode nicht effizient entfernt werden. In der Universität Halle erwies sich zum Beispiel eine Röhrenzentrifuge als sinnvoll. Auch Filtrationssysteme könnten in Betracht gezogen werden, wobei hier auf ein Verblocken der Membran geachtet werden muss. So stehen am Fraunhofer CBP beispielsweise Mikro- und Ultrafiltrationssysteme sowie ein Trommelzellenfilter zur Verfügung, die bisher für diese Anwendungen nicht getestet werden konnten. Bei der Lipase EL070 muss insbesondere die Ammoniumsulfat-Fällung optimiert werden. Zum einen bezüglich der eingesetzten Konzentrationen von gesättigter Ammoniumsulfat-lösung, zum anderen wie bei der EL012 hinsichtlich einer stufenweise und somit spezifischere Fällung. Für die Optimierung der Aufbereitungsprozesse beider Lipasen muss mit mindestens ein Jahr Arbeit gerechnet werden.

Lipasen können je nach Reaktionsbedingungen verschiedene Reaktionen katalysieren, wie zum Beispiel die Hydrolyse von Triglyceriden, Ver- und Umesterungen, Alkoholyse und Acidolyse. Eine weitere Reaktion, bei denen Lipasen zum Einsatz kommen können, ist die chemo-enzymatische Epoxidierung. Die Veresterung konnte am Fraunhofer CBP erfolgreich im 10 L-Maßstab durchgeführt werden. Bevor diese Reaktion weiter in den industriellen Maßstab skaliert wird, sind Untersuchungen zu verschiedenen Rührersystemen notwendig (Dauer ca. 3 Monate), um eine optimale enzymatisch katalysierte Veresterungsreaktion sicherzustellen. Im Gegensatz zur Veresterung konnte die Umesterung nicht erfolgreich im 10 L-Maßstab gezeigt werden. Da es durch die Bildung von Wasser bei der Reaktion zur Ablagerung der Lipase kam sind Folgeexperimente notwendig. Um eine optimale

enzymatisch katalysierte Veresterungsreaktion sicherzustellen, sollte eine weiterführende Prozessoptimierung Untersuchungen zu verschiedenen Rührersystemen beinhalten. Weiterhin könnte an einem System gearbeitet werden, bei dem das Nebenprodukt Wasser kontinuierlich während der Reaktion abgeführt wird. Diese Untersuchungen könnten in etwa einem Jahr abgeschlossen sein.

Die biochemische Epoxidierung von Pflanzenölen und Fettsäuren konnte am Fraunhofer IGB bis in einen Maßstab von 10 L erfolgreich etabliert werden. Eine Übertragbarkeit an die verfügbaren Anlagen am Fraunhofer CBP könnte somit über das Projektende hinaus erfolgen.

4.2 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Fraunhofer IGB

Es konnten geeignete Screeningmethoden entwickelt und potentielle epoxidierende Enzyme gefunden werden, die in Anschlussprojekten weiter betrachtet werden können. Mögliche Ansätze können dabei die Optimierung der Biokatalysatoren mittels Protein Engineering in Kombination mit der Optimierung von Immobilisierungsvarianten für zwei-phasige Reaktionssysteme sein. Die biochemische Epoxidierung wurde erfolgreich bis in den kleinen Technikumsmaßstab etabliert. Eine weitere Maßstabsvergrößerung scheint aus aktueller Sicht nicht problematisch zu sein. Die Methode kann sehr gut genutzt werden, um in nachfolgenden Projekten Mustermengen im kg-Maßstab bereit zu stellen.

Im Rahmen der Arbeiten konnten erste Schritte zur Stammentwicklung eines potentiellen S1-DCA-Produzenten erfolgen, welche in weiterführenden Projekten abgeschlossen werden soll. Die technische Durchführbarkeit der fermentativen Herstellung von DCA konnte im Projekt demonstriert werden und ermöglicht die Herstellung von Synthesebausteinen (im 40 L Maßstab), die als interessante Feinchemikalien für Polymeren genutzt werden können. Einige Parameter des Prozesses könnten in Folgeprojekten jedoch noch besser untersucht werden wie z.B. die Nutzung anderer Stickstoffquellen. Auch eine Optimierung der analytischen Methoden zum Nachweis von DCA im Kulturüberstand könnte in weiteren Projekten optimiert werden. Folgeprojekte und hieraus resultierende Ergebnisse über den Stand der Wissenschaft für die Entwicklung neuer Produktionsstämme wie auch für die Bioprozessentwicklung zur ω -Funktionalisierung werden als realistisch und machbar eingeschätzt.

Weiterführende Projektinitiativen wurden bereits erarbeitet (Projektvorhaben: Eth-Na – Ethanolische Native Extraktion geschälter Rapssaat, sowie EpoxyGlue - Neue Verfahren zur Herstellung von innovativen biobasierten Zweikomponenten-Klebstoffen für Bauwerkstoffe).

DHW

Im Rahmen der Projektbearbeitung wurden erste Ansätze aufgezeigt, Senföl und Drachenkopföl als heimische Rohstoffe für die Herstellung chemischer Synthesebausteine und für erste Folgeprodukte zu nutzen. Sollten Erucasäure-reiche Produkte im Schmierstoffbereich vom Markt gefordert werden, so kann man auf Erucasäure-reiches Rapsöl alternativ zurückgreifen. Theoretisch ist es ebenso möglich, Epoxide aus dem heimischen Leinöl für grenzflächenaktive Verbindungen zu nutzen.

Ein speziell auf diese Zielstellung zugeschnittenes Projekt müsste die notwendigen Schritte technisch als auch wirtschaftlich abklären.

Hobum

Eine wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit an den Fortgang dieses Projektes - insbesondere aber an die Umsetzung bei den Projektpartnern und Bemusterungsergebnisse gebunden.

Eucodis

Die Projekt-Lipasen lassen sich zum Beispiel zur Herstellung von feuchtigkeitsspendenden Estern („emollient esters“) in Pharma und Kosmetik oder in der Herstellung von Schmierstoffen einzusetzen. Hierzu sind in diesem Projekt bereits sehr erfolgreich Ergebnisse bei der Umesterung von Pflanzenölen erzielt worden, die einen solchen Einsatz wirtschaftlich sinnvoll erscheinen lassen. Daher wird angestrebt im Anschluss dieses Projektes gezielt in diesen Bereichen weitere Forschung und Prozessentwicklung zu betreiben, um den industriellen Endanwendern die Möglichkeiten von Lipase-basierten Prozessen aufzuzeigen. Diese Forschung wird voraussichtlich sowohl mit akademischen, institutionellen wie auch industriellen Partnern durchgeführt werden. Die noch zu entwickelnden Prozesse insbesondere für die Kosmetikindustrie können dann sehr rasch zu patentfähiger, neuer Intellectual Property führen, von der Eucodis und seine Partner profitieren werden.

Die im Rahmen des Projektes entwickelten und charakterisierten neuen Lipasen sind jedoch inzwischen zum Großteil auch Bestandteil des Eucodis Produktportfolios geworden, so dass diese Enzyme auch von Forschern weltweit für deren eigene Forschung bezogen werden können. Auf diese Art und Weise werden die Projekt-Lipasen auch neuen Anwendungen zugeführt, die Eucodis als kleineres Biotech-Unternehmen nicht alle alleine weiterverfolgen kann, bei einem Erfolg aber durch den Verkauf der Enzyme in größeren Mengen profitieren wird.

Fraunhofer ICT

Die technische Durchführbarkeit der Metathese konnte im Projekt demonstriert werden und ermöglicht einen Zugang zu den Zielprodukten der Metathese als Synthesebaustein interessanter neuartiger Feinchemikalien, sowie von Polymeren mit neuartigen Stoffeigenschaften.

Für die Metathese wird deshalb im Falle einer Weiterentwicklung im industriellen Umfeld eine wirtschaftliche Anschlussfähigkeit als realistisch machbar vorgesehen.

InfraLeuna

Mit der Errichtung des Fraunhofer CBP ist der Grundstein dafür gelegt worden, die initialen Projekte kontinuierlich zu verfolgen und auszubauen. Es gibt damit eine organisatorische, wissenschaftliche und technische Basis für die Fortführung der Entwicklungsarbeiten. InfraLeuna wird sich auch weiterhin an der Begleitung der Skalierungs- und Entwicklungsarbeiten im CBP beteiligen. Im Mittelpunkt steht dabei die Umsetzung in industrielle Maßstäbe.

Gerade durch das Fraunhofer CBP ist die Möglichkeit vorhanden, Projektansätze stark zu vernetzen und durch die Integration in den Standort schnell und kostengünstig in eine industrielle Dimension zu entwickeln. Die Aktivitäten der Partnerunternehmen des Standortes zeigen außerdem, dass das Interesse an einer Fortführung der Projekte erfolversprechend und über die Beteiligungen wirtschaftlich tragfähig ist.

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Im Rahmen des Projektes ergaben sich interessante Fragestellungen, die zukünftig weiter untersucht werden könnten. Ein weiterführendes Screening von geeigneten Trägermaterialien zur Immobilisierung der produzierten Lipase-Varianten wäre im Hinblick auf einen wirtschaftlichen Einsatz der Biokatalysatoren von Vorteil. Dies würde die Suche nach Trägern mit optimalen Eigenschaften hinsichtlich Porosität, Dichte funktioneller Gruppen sowie Materialkosten beinhalten. Durch zusätzliche Untersuchungen zur Optimierung der Stabilität der Immobilisate könnte die Wirtschaftlichkeit der jeweiligen Anwendung erhöht werden. Weiterhin wäre eine detaillierte Aufklärung der Mechanismen bei der Lipase-Aktivitätssteigerung durch die Modifikation mit Glutaraldehyd hilfreich, um diesen Aktivierungseffekt für technisch relevante Reaktionen nutzen zu können.

Taminco

Das durch Aminierung von Glycerin hergestellte 3-Dimethylamino-2-propan wird derzeit durch einige potentielle Kunden (Hauptakteure der Tensidindustrie) geprüft. Im Falle eines positiven Ergebnisses, werden mehr Proben benötigt (nur eine begrenzte Menge konnte für die erste Testrunde zur Verfügung gestellt werden). Zusätzlich muss die Gasphase des Aminierungsverfahrens hochskaliert werden. Da der Katalysator, der verwendet wird ein experimenteller Katalysator ist, braucht man einen

Partner, der den Katalysator kommerzialisiert. Prozessentwicklung wird sowohl für die Aminierung als auch die reduktiven Aminierungsschritte benötigt und die Entwicklung von Reinigungsverfahren ist notwendig. Dies kann parallel zur Tensid und Formulierungsentwicklung mit ausgewählten Partnern realisiert werden. Bis zur Vermarktung kann es noch 3-5 Jahre dauern.

KIT

Die Ergebnisse des Projekts werden für die weitere Nutzung v.a. durch Veröffentlichungen zur Verfügung gestellt. Ferner sind die Ergebnisse des Vorhabens eingegangen in die Erarbeitung der von der Bundesregierung herausgegebenen „Roadmap Bioraffinerien“ sowie die VDI Richtlinie 6310 „Klassifikation und Gütekriterien von Bioraffinerien“. Auch nach Abschluss des Projektes werden die Ergebnisse in Form von Zeitschriftenaufsätzen sowie

auf Konferenzen verbreitet. In direkter Nachfolge zu dem Vorhaben bieten sich weitergehende Bewertungen der möglichen Produkte an. Vielversprechende Produkte wurden vielfach erst gegen Ende des Projekts identifiziert und konnten daher nicht mehr tiefgehend bewertet werden. Insbesondere hinsichtlich geeigneter Referenzen besteht hier daher weiterer Forschungsbedarf. Parallel dazu finden Gespräche mit der Industrie und Forschungseinrichtungen im Rahmen der durchgeführten Arbeiten zur Ergebnisverwertung und Umsetzung der identifizierten und bewerteten Maßnahmen statt. In bisherigen Gesprächen zeigten die Gesprächspartner ein großes Interesse an sowohl an den fachlichen Ergebnissen als auch an der eingesetzten Methodik sowie den hiermit ermöglichten Planungen. Mehrere weiterführende Projektinitiativen mit der Fokussierung auf einzelne Prozesspfade und -produkte wurden bereits erarbeitet und vorgestellt (z.B. die Projektvorhaben: Eth-Na – Ethanolische Native Extraktion geschälter Rapssaat, sowie EpoxyGlue - Neue Verfahren zur Herstellung von innovativen biobasierten Zweikomponenten-Klebstoffen für Bauwerkstoffe), in denen basierend auf den Vorhabensergebnissen die Bewertungsansätze weiterentwickelt werden sollen. Aus methodischer Sicht stellt die Entwicklung generalisierter Bewertungsansätze weiterhin eine Herausforderung dar. Hier spielt die Balance zwischen notwendigen tiefgehenden Analysen, und den hierfür notwendigen Daten, die in frühen Entwicklungsstadien meist noch nicht vorliegen oder nur mit erheblichem Aufwand und Unsicherheiten geschätzt werden können, eine große Rolle. Unsicherheiten technischer und ökonomischer Parameter, aber bisweilen auch ökologischer Wirkungsabschätzungsmethoden, sollten vermehrt in die Betrachtungen mit aufgenommen werden. Auch im Hinblick auf die für insbesondere neue Produkte und Anwendungen vielfach nicht existierenden stofflichen Referenzsystemen fehlen noch geeignete Daten und Methoden.

Addinol

Nach Vorliegen entsprechend größerer Rohstoffmengen sind Feldversuche vorgesehen.

Fraunhofer CBP

Es konnte ein erfolgreicher Scale-Up von zwei Fermentationsprozessen mit *E. coli* gezeigt und erste Verfahrensoptimierungen der Enzymaufreinigung durchgeführt werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich Anlagenbetrieb und Prozessführung können in nachfolgenden Projekten angewendet und erweitert werden.

Die biochemische Epoxidierung wurde am Fraunhofer IGB erfolgreich bis in den kleinen Technikumsmaßstab etabliert. Eine weitere Maßstabsvergrößerung scheint aus aktueller Sicht nicht problematisch zu sein. Die Methode kann sehr gut genutzt werden, um in nachfolgenden Projekten Mustermengen im kg-Maßstab bereit zu stellen, um Markteintrittsprogramme dieser Materialien zu starten.

4.3 Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte

Taminco

Die Ergebnisse der Aminierung von Glycerin an HPA wurden als Patent eingereicht. 14/09/2014 (EP 1 41 84259).

Fraunhofer IGB

Während der Projektlaufzeit wurden durch das Fraunhofer IGB zwei Patente zur chemoenzymatischen Epoxidierung auf den Weg gebracht. Ein Patent fokussiert dabei auf die Verwendung neuer Lipasen zur Epoxidierung Pflanzenöl-basierter Substrate (DE 10 2014 210 031.3). Das zweite Patent zielt darauf ab das entwickelte Verfahren abzusichern.

Fraunhofer ICT

Zusätzlich erfolgt im Jahr 2015 gemeinsam mit dem Partner Umicore die Prüfung auf eine mögliche Patentierung des neu gefundenen Katalysators. Hierzu erfolgen im Moment letzte Versuche aus Eigenmitteln des Fraunhofer ICT.

4.4 Erkenntnisse von Dritten

Auf dem Gebiet der Aminierung sind keine signifikanten Ergebnisse zum bearbeiteten Themengebiet bekannt. Bei der Metathese erfolgte die Patentierung der untersuchten Reaktion durch die Firma Cognis. Das Patent WO2010020368A11 beschreibt hierbei explizit die Metathese von Methyloleat mit den Katalysatoren M2 und M41. Mit den Katalysatoren der M7 Serie wurden jedoch geeignete Katalysatoren gefunden, die vom Patent nicht betroffen sind.

Über die Projektlaufzeit hinweg wurden im Wesentlichen zwei Publikationen von Sun *et al.* veröffentlicht, die sich mit der Epoxidierung von Pflanzenölen mit niedrigen Jodzahlen <115 beschäftigen:

Sun *et al.* (2011), Enzymatic Epoxidation of Corn Oil by Perstearic Acid, Journal of the American Oil Chemists' Society

Sun *et al.* (2011), Enzymatic epoxidation of Sapindus mukorossi seed oil by perstearic acid optimized using response surface methodology, Industrial Crops and Products, Vol. 33, pp. 676-682

4.5 Veröffentlichungen

Publikationen

- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2013): Herstellung Pflanzenöl-basierter Epoxide - Chemo-enzymatische Epoxidierung als Alternative zur chemischen Synthese, GIT Labor-Fachzeitschrift 3/2013
- Eingereichter Buchbeitrag: Buchtitel „Industrial Biocatalysis“; Editor – Prof. Dr. Peter Grunwald; Titel des Buchbeitrages: Lipase-catalyzed epoxidation of fatty compounds and alkenes
- Zibek, S., S. Huf, W. Wagner, T. Hirth, and S. Rupp, Fermentative Herstellung der α,ω -Dicarbonsäure 1,18-Oktadecendisäure als Grundbaustein für biobasierte Kunststoffe, in Chemie Ingenieur Technik. 2009. p. 1797-1808.
- Huf, S., S. Krügener, T. Hirth, S. Rupp, and S. Zibek, Biotechnological synthesis of long-chain dicarboxylic acids as building blocks for polymers, in European Journal of Lipid Science and Technology. 2011. p. 548-561.
- Helber, N., Vater, B., Haitz, F., Torkler, S., Patzsch, K., und Zibek, S. Herstellung von Enzymen: Maßstabsübertragung vom Laborprozess zur Pilotanlage. 2014. GIT Labor-Fachzeitschrift. 10: 33 – 35.
- Wagner, W., Stefan, S. C., Werner, N., Hirth, T., Rupp, S., und Zibek, S. Phylogenetic reclassification of potential dicarboxylic acid production strains of the genus *Candida* (eingereicht).
- Fröhling, M.; Schweinle, J.; Meyer, J.-C.; Schultmann, F. (2011): Logistics of renewable raw materials. In: Hirth, T.; Ulber, R.; Sell, D.: Renewable Raw Materials - New Feedstocks for the Chemical Industry, Wiley-VCH, Weinheim S. 49-94

Poster und Vorträge

- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2012). Optimization and process engineering for the chemo-enzymatic epoxidation of fatty acids and non-conventional plant oils. AICHEM 2012 - 30th International Exhibition Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology, Frankfurt, Germany
- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2012). Chemo-enzymatic epoxidation of non-conventional plant oils – process optimization using response surface methodology, 3rd International Workshop of COST Action CM0903 (UBIOCHEM): Sustainable production of fuels/energy, materials & chemicals from biomass, Thessaloniki, Greece
- Carrillo Riveros, P. A., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2011). Chemo-enzymatic epoxidation of fatty acids, fatty acid esters and plant oils. 4th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry. Karlsruhe, Germany, Abiosus e.V.
- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2012). Comparison of chemo-enzymatic epoxidation of oleic acid with different immobilized lipases. 5th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry. Karlsruhe, Germany, Abiosus e.V.
- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2012). Optimization of the chemo-enzymatic epoxidation of non-conventional plant oils by RSM, 3. Kooperationsforum Biopolymere, Straubing, Germany

- Haitz, F., T. Hirth, S. Rupp, S. Zibek (2012). Optimization of the chemo-enzymatic epoxidation of non-conventional plant oils by RSM, 7th CeBiTec-Symposium 2012 - Bio-integrated Organic Synthesis in Industry: Biocatalytic Breakthroughs, Industrial Processes, Emerging Fields, Bielefeld, Germany
- Huf, S., W. Wagner, T. Hirth, S. Rupp, and S. Zibek, Production of α,ω -dicarboxylic acids via biotransformation of fatty acids by the use of *Candida tropicalis*, in Industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe - Chemie, Biotechnologie, Verfahrenstechnik. 2010, Dechema e.V. : Frankfurt am Main, Germany. p. 106.
- Huf, S., W. Wagner, T. Hirth, S. Zibek, and S. Rupp, Identification of yeast strains for the synthesis of α,ω -dicarboxylic acids, in International Symposium on Biopolymers 2010. 2010, Universität Stuttgart, Institut für Mikrobiologie BIOPRO Baden-Württemberg GmbH DECHEMA e.V.: Stuttgart, Germany. p. 186.
- Huf, S., W. Wagner, T. Hirth, S. Rupp, and S. Zibek, Optimization of 1,18-octadecenedioic acid synthesis via biotransformation by the use of *Candida tropicalis*, in 3rd Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry. 2010, abiosus e.V. Conferences: Emden.
- Huf, S., P.A. Carrillo Riveros, W. Wagner, T. Hirth, S. Rupp, and S. Zibek, Biotechnological production of long chain α,ω -dicarboxylic acids and epoxy-derivates from plant oil, in Frontiers In Biorefining: Biobased Products from Renewable Carbon. 2010: Georgia, USA.
- Huf, S., W. Wagner, T. Hirth, S. Rupp, and S. Zibek, Production of alpha-, omega-dicarboxylic acids via biotransformation of fatty acids by the use of *Candida tropicalis*, in International conference on renewable resources & biorefineries. 2010: Düsseldorf. p. 64.
- Kowollik, K., Rivas-Nass, A., DECHEMA Industrial Use of Renewable Raw Materials: Chemistry, Biotechnology, Process Engineering; 2012. K. Kowollik, Fraunhofer ICT; A. Rivas Nass, Umicore AG & Co. KG, Catalysts for the metathesis of oils and fats – access to novel bifunctional compounds based on renewable resources.
- Kowollik, K., Rivas-Nass, A., ProcessNet-Jahrestagung 2014 – Tandemvortrag. K. Kowollik, Fraunhofer ICT; A. Rivas Nass, Umicore AG & Co. KG. Metathesis of oils and fats – access to industrial relevant compounds based on renewable resources.
- Laure, S.; Fröhling, M.; Meyer, J. C.; Schultmann, F.; Trippe, F.: Techno-economic and ecological assessment approaches for new biomass value chains. In: Proceedings of the 5th International Conference on Sustainable Energy and Environment (SEE 2014), Bangkok, 19.-21. November 2014.
- Fritsche, U.R.; Fröhling, M.; Gerlach, J.; Gröngroft, A.; Günther, A.; Günther, J.; Kamm, B.; Klenk, I.; Laure, S.; Meyer, J.C.; Schweinle, J.; Stichnothe, H.; Strohm, K.; Trippe, F.; Peters, D.; Wagemann, K. (2012): Economic and Ecological Assessment of Biorefineries – Findings of the German Biorefinery Roadmap Process. Proceedings of the 4th Nordic Wood Biorefinery Conference
- Meyer, J.C.; Fröhling, M.; Schultmann, F. (2010): Economic and ecological evaluation of alternative vegetable oils as biorefinery feedstock. Posterbeitrag zur Konferenz: European Forum for Industrial Biotechnology, EuropaBio, 19.-21.10.2010, Edinburgh (UK)

- Fröhling, M.; Meyer, J.C.; Haase, M.; Schultmann, F. (2010): Ökonomisch-ökologische Bewertung von Rohstoffen, Prozessen und Produkten einer integrierten Ölpflanzenraffinerie, in: Tagungsband Industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe - Chemie, Biotechnologie, Verfahrenstechnik, 20.-21.01.2010, Frankfurt am Main
- Energiepflanzenfeldtag der TLL, 11.07.2013 in Dornburg
- Öffentliches Fachgespräch der TLL „Stoffliche Nutzung Nachwachsender Rohstoffe“, 12.12.2013 in Jena
- Energiepflanzenfeldtag der TLL, 03.07.2014 in Dornburg
- Posterbeitrag zur naro.tech, 10. Internationales Symposium „Werkstoffe aus Nachwachsenden Rohstoffen“, 16./17.09.2014 in Erfurt
- Novel Microbial Lipases: Versatile Tools for Biotechnology, N. Wehofsky^a, C. Meyer^a, M. Berlinger^b, S. Sroka^b, J. Modregger^b, Eucodis Bioscience GmbH, ^a Halle/Saale, Germany, ^b Vienna, Austria, 10th Euro Fed Lipid Congress, "Fats, Oils and Lipids: from Science and Technology to Health", 23-26 September 2012, Cracow, Poland.

5 Anhang

Anhang 1: Richtwerte für Kosten der Produktion von Iberischem Drachenkopf und Erzeugermindestpreis.

Position		ME ¹	Ertragsniveau				
		dt/ha	10	15	20	25*	30*
Direktkosten	Saatgut	€/ha	38	38	38	38	38
	Düngemittel	€/ha	58	86	115	144	173
	Pflanzenschutzmittel	€/ha	93	113	131	131	131
	Aufbereitung, Sonstiges	€/ha	13	17	21	27	32
	Summe	€/ha	201	255	305	339	374
Arbeits erledigungs- kosten	Unterhaltung Maschinen	€/ha	74	76	77	78	79
	Kraft- u. Schmierstoffe	l/ha	76	77	79	80	81
	Kraft- u. Schmierstoffe 1 €/l	€/ha	76	77	79	80	81
	Maschinenvermögen	€/ha	1526	1558	1581	1594	1607
	Schlepperleistungsbesatz	kW/ha	0,38	0,4	0,42	0,43	0,44
	AfA Maschinen	€/ha	132	135	138	139	140
	Arbeitszeitbedarf termingebunden	AKh/ha ²	3,9	4,1	4,2	4,3	4,4
	Arbeitszeitbedarf nicht termingebunden	AKh/ha ²	2	2,2	2,3	2,3	2,4
	Personalkosten 9,49 €/h 50% Nebenkosten	€/ha	85	89	92	95	97
Leitung, Verwaltung (Personalkosten)	Anteil an Produktion 43%	€/ha	37	38	40	41	42
Arbeits erledigung inkl. Lohn + Verwaltung	Summe	€/ha	404	416	426	432	438
Flächenkosten	Pacht 3,2 €/BP ³	BP ³	35	45	55	55	55
		€/ha	112	144	176	176	176
Sonstige Kosten	Berufsgenossenschaft	€/ha	10	10	10	10	10
	sonst. allg. Betriebsaufwand	€/ha	55	55	55	55	55
	Summe	€/ha	65	65	65	65	65
Summe Kosten		€/ha	782	881	972	1013	1053
Flächenzahlung	10% Modulation	€/ha	311	311	311	311	311
	Ackerlandprämie	€/ha	345	345	345	345	345
Gewinnschwellenpreis inkl. Flächenzahlung		€/dt	50,8	40,6	35,1	29,7	26,2
Erzeugermindestpreis inkl. Flächenzahlung ⁴		€/dt	72,8	55,3	46,1	38,5	33,5

¹ Maßeinheit ² Arbeitskraftstunde/Hektar ³ Bodenpunkte ⁴ inkl. 220 €/ha Gewinn * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 2: Richtwerte für Kosten der Produktion von Krambe und Erzeugermindestpreis.

Position		ME ¹	Ertragsniveau				
			dt/ha	10	15	20	25*
Direktkosten	Saatgut	€/ha	38	38	38	38	38
	Düngemittel	€/ha	83	124	166	207	249
	Pflanzenschutzmittel	€/ha	81	81	81	81	81
	Aufbereitung, Sonstiges	€/ha	13	17	21	27	32
	Summe	€/ha	215	261	307	353	400
Arbeiterledigungs- kosten	Unterhaltung Maschinen	€/ha	76	78	79	81	83
	Kraft- u. Schmierstoffe	l/ha	79	82	85	88	91
	Kraft- u. Schmierstoffe 1 €/l	€/ha	79	82	85	88	91
	Maschinenvermögen	€/ha	1562	1594	1625	1656	1687
	Schlepperleistungsbesatz	kW/ha	0,42	0,45	0,48	0,51	0,54
	AfA Maschinen	€/ha	135	138	140	143	145
	Arbeitszeitbedarf termingebunden	AKh/ha ²	4,2	4,4	4,7	4,9	5,1
	Arbeitszeitbedarf nicht termingebunden	AKh/ha ²	2,2	2,3	2,5	2,5	2,5
	Personalkosten 9,49 €/h 50% Nebenkosten	€/ha	91	96	102	105	108
Leitung, Verwaltung (Personalkosten)	Anteil an Produktion 43%	€/ha	39	41	44	45	47
Arbeiterledigung inkl. Lohn + Verwaltung	Summe	€/ha	421	436	450	463	474
Flächenkosten	Pacht 3,2 €/BP ³	BP ³	35	45	55	55	55
		€/ha	112	144	176	176	176
Sonstige Kosten	Berufsgenossenschaft	€/ha	10	10	10	10	10
	sonst. allg. Betriebsaufwand	€/ha	55	55	55	55	55
	Summe	€/ha	65	65	65	65	65
Summe Kosten		€/ha	813	906	998	1057	1116
Flächenzahlung	10% Modulation	€/ha	311	311	311	311	311
	Ackerlandprämie	€/ha	345	345	345	345	345
Gewinnschwellenpreis inkl. Flächenzahlung		€/dt	54,0	42,3	36,5	31,6	28,3
Erzeugermindestpreis inkl. Flächenzahlung ⁴		€/dt	76,0	57,0	47,5	40,4	35,7

¹ Maßeinheit ² Arbeitskraftstunde/Hektar ³ Bodenpunkte ⁴ inkl. 220 €/ha Gewinn * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 3: Richtwerte für Kosten der Produktion von Koriander und Erzeugermindestpreis.

Position		ME ¹	Ertragsniveau				
			dt/ha	10	15	20	25*
Direktkosten	Saatgut	€/ha	100	100	100	100	100
	Düngemittel	€/ha	50	75	100	125	150
	Pflanzenschutzmittel	€/ha	154	236	236	236	236
	Aufbereitung, Sonstiges	€/ha	13	17	21	27	32
	Summe	€/ha	316	428	457	488	518
Arbeits erledigungs- kosten	Unterhaltung Maschinen	€/ha	75	78	79	79	80
	Kraft- u. Schmierstoffe	l/ha	76	79	80	81	82
	Kraft- u. Schmierstoffe 1 €/l	€/ha	76	79	80	81	82
	Maschinenvermögen	€/ha	1545	1597	1610	1623	1636
	Schlepperleistungsbesatz	kW/ha	0,39	0,41	0,43	0,44	0,45
	AfA Maschinen	€/ha	134	140	141	142	143
	Arbeitszeitbedarf termingebunden	AKh/ha ²	4,0	4,3	4,4	4,5	4,5
	Arbeitszeitbedarf nicht termingebunden	AKh/ha ²	2,1	2,2	2,3	2,4	2,5
	Personalkosten 9,49 €/h 50% Nebenkosten	€/ha	87	93	95	98	100
Leitung, Verwaltung (Personalkosten)	Anteil an Produktion 43%	€/ha	37	40	41	42	43
Arbeits erledigung inkl. Lohn + Verwaltung	Summe	€/ha	410	430	436	442	448
Flächenkosten	Pacht 3,2 €/BP ³	BP ³	35	45	55	55	55
		€/ha	112	144	176	176	176
Sonstige Kosten	Berufsgenossenschaft	€/ha	10	10	10	10	10
	sonst. allg. Betriebsaufwand	€/ha	55	55	55	55	55
	Summe	€/ha	65	65	65	65	65
Summe Kosten		€/ha	904	1067	1134	1171	1207
Flächenzahlung	10% Modulation	€/ha	311	311	311	311	311
	Ackerlandprämie	€/ha	345	345	345	345	345
Gewinnschwellenpreis inkl. Flächenzahlung		€/dt	85,3	68,0	54,4	35,3	30,7
Erzeugermindestpreis inkl. Flächenzahlung ⁴		€/dt	110,9	88,4	70,7	44,1	38,0

¹ Maßeinheit ² Arbeitskraftstunde/Hektar ³ Bodenpunkte ⁴ inkl. 220 €/ha Gewinn * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 4: Richtwerte für Kosten der Produktion von Erucaraps und Erzeugermindestpreis.

Position		ME ¹	Ertragsniveau				
			dt/ha	10	20	30	40
Direktkosten	Saatgut	€/ha	67	81	67	74	81
	Düngemittel	€/ha	79	147	216	284	353
	Pflanzenschutzmittel	€/ha	176	176	176	213	256
	Aufbereitung, Sonstiges	€/ha	15	26	37	49	61
	Summe	€/ha	337	431	496	621	751
Arbeits erledigungs- kosten	Unterhaltung Maschinen	€/ha	67	69	69	73	77
	Kraft- u. Schmierstoffe	l/ha	76	80	80	85	89
	Kraft- u. Schmierstoffe 1 €/l	€/ha	76	80	80	85	89
	Maschinenvermögen	€/ha	1732	1811	1785	1880	1989
	Schlepperleistungsbesatz	kW/ha	0,37	0,39	0,42	0,45	0,49
	AfA Maschinen	€/ha	153	161	158	166	176
	Arbeitszeitbedarf termingebunden	AKh/ha ²	4,9	5,1	5,2	5,6	6,0
	Arbeitszeitbedarf nicht termingebunden	AKh/ha ²	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	Personalkosten 9,49 €/h 50% Nebenkosten	€/ha	105	108	109	115	121
Leitung, Verwaltung (Personalkosten)	Anteil an Produktion 43%	€/ha	45	47	47	49	52
Arbeits erledigung inkl. Lohn + Verwaltung	Summe	€/ha	446	465	464	488	516
Flächenkosten	Pacht 3,2 €/BP ³	BP ³	35	35	35	45	55
		€/ha	112	112	112	144	176
Sonstige Kosten	Berufsgenossenschaft	€/ha	10	10	10	10	10
	sonst. allg. Betriebsaufwand	€/ha	55	55	55	55	55
	Summe	€/ha	65	65	65	65	65
Summe Kosten		€/ha	961	1073	1137	1318	1508
Flächenzahlung	10% Modulation	€/ha	311	311	311	311	311
	Ackerlandprämie	€/ha	345	345	345	345	345
Gewinnschwellenpreis inkl. Flächenzahlung		€/dt	69,4	40,5	29,1	26,5	25,1
Erzeugermindestpreis inkl. Flächenzahlung ⁴		€/dt	91,4	51,5	36,5	32,0	29,5

¹ Maßeinheit ² Arbeitskraftstunde/Hektar ³ Bodenpunkte ⁴ inkl. 220 €/ha

Anhang 5: Grundparameter der Produktion von Iberischem Drachenkopf, Krambe und Koriander.

Position	ME	Ertragsniveau				
		dt/ha	10	15	20	25*
Ackerzahl	-	35	45	55	55	55
Rohware naturtrocken(< 9 %)	%	25 %	50 %	75 %	75 %	75 %
Trocknungsanteil	%	75 %	50 %	25 %	25 %	25 %
Feuchtware	dt/ha	7,7	7,7	5,1	6,4	6,4
Kornfeuchte d. Trocknungsware	%	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
Basisfeuchte	%	9 %	9 %	9 %	9 %	9 %
Schwundfaktor	-	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Bruttoertrag	dt/ha	10,2	15,2	20,1	25,1	25,1
Schwarzbesatz < 2 %	%	25 %	50 %	75 %	75 %	75 %
Schwarzbesatz 5 %	%	75 %	50 %	25 %	25 %	25 %
Rohware mit Aufbereitung	%	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %
Rohware ohne Aufbereitung	%	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %

*bei Drachenkopf nur auf Versuchsflächen * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 6: Grundparameter der Produktion von Erucaraps.

Position	ME	Ertragsniveau				
		10	20	30	40	50
	dt/ha	10	20	30	40	50
Ackerzahl	-	35	35	35	48	62
Rohware naturtrocken(< 9 %)	%	30 %	50 %	60 %	60 %	60 %
Trocknungsanteil	%	70 %	50 %	40 %	40 %	40 %
Feuchtware	dt/ha	4,1	8,2	12,2	16,3	20,4
Kornfeuchte d. Trocknungsware	%	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
Basisfeuchte	%	9 %	9 %	9 %	9 %	9 %
Schwundfaktor	-	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Bruttoertrag	dt/ha	10,1	20,1	30,2	40,3	50,4
Rohware mit Aufbereitung	%	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %
Rohware ohne Aufbereitung	%	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %

Anhang 7: Spezialkosten Pflanzenschutz für die Produktion von Iberischem Drachenkopf.

Kategorie	Mittel	AWM ¹	Preis	Kosten	Ertragsniveau, dt/ha					Ertragsniveau, dt/ha				
					10	15	20	25*	30**	10	15	20	25*	30*
		kg/l/ha	€/kg/l	€/ha	Behandlungsfaktor					anteilige Mittelkosten, €/ha				
Dikotyle Herbizide	VA ² Butisan [#]	2	35,3	71	1	1	1	1	1	70,6	70,6	70,6	70,6	71
	NA ³ Basagran [#]	2	34,7	69	0	0	0,25	0,25	0,25	0	0	17,4	17,4	69
	Summe				1	1	1,25	1,25	1,25	70,6	70,6	88	88	88
Gramnizide	Fusilade Max [#]	1	23,3	23	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2	2	2	2	2
	Summe				0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2	2	2	2	2
Fungizide	Folicur [#]	1,5	27	41	0,5	1	1	1	1	93	113	131	131	131
	Summe				0,5	1	1	1	1	20,3	40,5	40,5	40,5	40,5
PS ⁴ insgesamt					1,6	2,1	2,35	2,35	2,35	93	113	131	131	131

¹ Aufwandmenge ² Voraufbau ³ Nachaufbau ⁴ Pflanzenschutz # Pflanzenschutzmittel hat keine Zulassung in Kultur

* Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 8: Spezialkosten Pflanzenschutz für die Produktion von Krambe.

Kategorie	Mittel	AWM ¹	Preis	Kosten	Ertragsniveau, dt/ha					Ertragsniveau, dt/ha				
					10	15	20	25*	30*	10	15	20	25*	30*
		kg/l/ha	€/kg/l	€/ha	Behandlungsfaktor					anteilige Mittelkosten, €/ha				
Dikotyle Herbizide	VA ² Butisan	2	35,3	71	1	1	1	1	1	70,6	70,6	70,6	70,6	70,6
	Summe				1	1	1	1	1	71	71	71	71	71
Gramnizide	Fusilade Max	1	23,3	23	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2	2	2	2	2
	Summe				0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2	2	2	2	2
Insektizide	Mospilan SG [#]	0,2	85,4	17	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	93	9	9	9	9
	Summe				0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	20,3	9	9	9	9
PS ³ insgesamt					1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	81	81	81	81	81

¹ Aufwandmenge ² Voraufbau ³ Pflanzenschutz # Pflanzenschutzmittel hat keine Zulassung in Kultur * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 9: Spezialkosten Pflanzenschutz für die Produktion von Koriander.

Kategorie	Mittel	AWM ¹	Preis	Kosten	Ertragsniveau, dt/ha					Ertragsniveau, dt/ha				
					10	15	20	25*	30*	10	15	20	25*	30*
		kg/l/ha	€/kg/l	€/ha	Behandlungsfaktor					anteilige Mittelkosten, €/ha				
Dikotyle Herbizide	VA ² Bandur	3	22,6	68	1	1	1	1	1	68	68	68	68	68
	Summe				1	1	1	1	1	78	78	78	78	78
Gramnizide	Targa Super	2	17,7	35	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4	4	4	4	4
	Summe				0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4	4	4	4	4
Fungizide	Cuprozin Flüssig (2-malige Anwendung)	3	27,4	82	0,5	1	1	1	1	41	82	164	164	164
	Summe				1	2	2	2	2	20	82	164	164	164
PS ³ insgesamt					2,1	3,1	3,1	3,1	3,1	154	236	236	236	236

¹ Aufwandmenge ² Voraufschlag ³ Pflanzenschutz * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 10: Spezialkosten Pflanzenschutz für die Produktion von Erucaraps.

Kategorie	Mittel	AWM ¹	Preis	Kosten	Ertragsniveau, dt/ha					Ertragsniveau, dt/ha				
					10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
		kg/l/ha	€/kg/l	€/ha	Behandlungsfaktor					anteilige Mittelkosten, €/ha				
Herbizide	VA ² Cirrus	0,24	240,3	58	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	3	3	3	3	3
Dikotyle ohne Kamille	VA ² Brasan	2,5	31,6	79	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	4	4	4	4	4
	VA ² Nimbus CS	2,5	31,9	82	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	12	12	12	12	12
Dikotyle mit Kamille	VA ² Colzor Trio	3,5	24,5	86	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	9	9	9	9	9
	VA ² /NA ³ Butisan Gold	2,5	35,2	88	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	13	13	13	13	13
	NA ³ Butisan Top	2	42,5	85	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	34	34	34	34	34
	NA ³ Fuego	1,5	28,3	42	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	2	2	2	2	2
	Summe			65	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	77	77	77	77	77
Gramnizide	Agil-S	0,8	26,3	21										
	Fusilade Max	1	23,5	24										
	Targa Super	1	17,8	18										
	Select 240 SC	0,5	16,8	8										

Kategorie	Mittel	AWM ¹	Preis	Kosten	Ertragsniveau, dt/ha					Ertragsniveau, dt/ha				
					10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
		kg/l/ha	€/kg/l	€/ha	Behandlungsfaktor					anteilige Mittelkosten, €/ha				
	Öl	1	16,8	17										
	Focus Ultra	2	19,7	39										
	Summe bzw. Mittelwert			25	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	14	14	14	14	14
Problem-Unkräuter	Effigo	0,35	115,2	40										
	Fox	1	20,6	21										
	Stomp Aqua	2	13,9	28										
	Summe			30	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	1	1	1	1	1
Unkrautbehandlung insgesamt	Summe				1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	93	93	93	93	93
Fungizide (Sclerotinia, Phoma)	Mirage 45 EC	1,5	16,9	25										
	Folicur	1	28	28										
	Caramba	1,25	28,4	36										
	Cantus Gold	0,5	110,5	55										
	Harvesan	0,8	44	35										
	Proline	0,7	75,4	53										
	Prosaro	1	54,2	54										
	Summe bzw. Mittelwert			41	1	1	1	1,75	2,5	41	41	41	72	102
Insektizide Rapsglanzkäfer	Trafo WG	0,1	48,7	5										
	Fastac SuperContact	0,1	84,5	8										
	Trebon 30 EC	0,2	55,8	11										
	Biscaya	0,3	62	19										
	Summe bzw. Mittelwert			11	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	1	1	1	2	3
Stängel- und Blüten-schädlinge	Trafo WG	0,15	48,7	7										
	Fastac SuperContact	0,1	84,5	8										
	Karate Zeon	0,075	118,5	9										
	Decis fl.	0,3	27,5	8										
	Trebon 30 EC	0,2	55,8	11										
	Biscaya	0,3	62	19										
	Plenum 50 WG	0,15	122	18										
	Summe bzw. Mittelwert			12	1,2	1,2	1,2	1,4	1,9	14	14	14	16	22
Insektizide	Summe				1,3	1,3	1,3	1,6	2,2	15	15	15	18	25
Wachstumsregler	Folicur	1	28	28										
	Moddus	0,5	64	32										
	Caramba	1,2	28,4	34										
	Carax	1	31,1	31										
	Tilmor	1,2	31,1	37										
	Toprex	0,5	69,5	35										

Kategorie	Mittel	AWM ¹	Preis	Kosten	Ertragsniveau, dt/ha					Ertragsniveau, dt/ha				
					10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
		kg/l/ha	€/kg/l	€/ha	Behandlungsfaktor					anteilige Mittelkosten, €/ha				
	Summe bzw. Mittelwert			33	0,15	0,15	0,15	0,25	0,4	5	5	5	8	13
Schnecken	Mesuroi Schneckenkorn	5	6,9	35										
	Schneckenkorn	4	5	20										
	Delicia Schnecken-Linsen	3	7,2	22										
	Pro Limax	4	4,8	19										
	Summe bzw. Mittelwert			24	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	10	10	10	10	10
Feldmäuse	Ratron Giftlinsen	1	11,5	12										
	Ratron Giftweizen	2	4,9	10										
	Summe bzw. Mittelwert			11	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	3	3	3	3	3
Totalherbizide	Glyphosat-Mittel	5	5,4	27										
	Roundup UltraMax	4	9	36										
	Roundup Power Flex	3,75	9,6	36										
	Summe bzw. Mittelwert			33	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	10	10	10	10	10
PS ⁴ insgesamt	Summe				5	5	5	6,2	7,7	176	176	176	227	284

¹ Aufwandmenge ² Voraufbau ³ Nachaufbau ⁴ Pflanzenschutz

Anhang 11: Summe der Direktkosten für die Produktion von Iberischem Drachenkopf.

Position	Spezifizierung		ME ¹	Ertragsstufen					
				dt/ha	10	15	20	25*	30*
Saatgut	Saatstärke		kg/ha	15	15	15	15	15	
	Zukauf 2,53 €/kg ²		€/ha	38	38	38	38	38	
	Summe		€/ha	38	38	38	38	38	
Düngung	Entzug Korn, kg/dt	Preis €/kg							
	N	3,01	1,0	€/ha	30	45	60	75	90
	P	0,70	1,8	€/ha	13	19	25	32	38
	K	1,59	0,8	€/ha	13	19	25	32	38
	Mg	0,27	0,8	€/ha	2	3	4	5	6
	Summe		€/ha	58	86	115	144	173	
Pflanzenschutz			€/ha	93	113	131	131	131	
Aufbereitung u. Sonstiges	Trocknung		F%	10	10	10	10	10	
	10 F% ³ 0,97 €/dt	Feuchtware	dt/ha	7,6	7,6	5,1	6,3	7,6	
	je weiteres % 0,29 €/dt	Kosten	€/dt	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	
	Summe Trocknung		€/ha	7	7	5	6	7	
	Aufbereitung		m%	25	50	75	75	75	
	Reinigung 3-8% SB ⁴	0,61 €/dt	€/ha	2	5	9	11	14	
Hagelversicherung		€/ha	4	6	7	9	11		
	13,6‰								
	Körnerbelüftung m.		m %	0	0	0	0	0	
	Dieselgebläse								
	Fall: Einlagerung								
	0,5 l DK ⁵ /t	1 €/l	€/ha	0	0	0	0	0	
Aufbereitung u. Sonstiges	Summe		€/ha	13	17	21	27	32	

¹ Maßeinheit ² Mittelwert aus Senf und Lein weil kein Marktpreis für Iberischen Drachenkopf vorhanden ³ Feuchte ⁴ Schwarzbesatz ⁵ Dieselkraftstoff * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 12: Summe der Direktkosten für die Produktion von Krambe.

Position	Spezifizierung		ME ¹	Ertragsstufen					
				dt/ha	10	15	20	25*	30*
Saatgut	Saatstärke		kg/ha	15	15	15	15	15	
	Zukauf 2,53 €/kg ²		€/ha	38	38	38	38	38	
	Summe		€/ha	38	38	38	38	38	
Düngung	Entzug Korn, kg/dt	Preis €/kg							
	N	3,35	1,0	€/ha	34	50	67	84	101
	P	0,70	1,8	€/ha	13	19	25	32	38
	K	4,00	0,8	€/ha	32	48	64	80	96
	Mg	0,60	0,8	€/ha	5	7	10	12	14
	Summe		€/ha	83	124	166	207	249	
Pflanzenschutz			€/ha	81	81	81	81	81	
Aufbereitung u. Sonstiges	Trocknung		F%	10	10	10	10	10	
	10 F% ³ 0,94 €/dt	Feuchtware	dt/ha	7,6	7,6	5,1	6,3	7,6	
	je weiteres % 0,31 €/dt	Kosten	€/dt	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	
	Summe Trocknung		€/ha	7	7	5	6	7	
	Aufbereitung		m%	25	50	75	75	75	
	Reinigung 3-8% SB ⁴	0,33 €/dt	€/ha	2	5	9	11	14	
Hagelversicherung		€/ha	4	6	7	9	11		
	6,7‰								
	Körnerbelüftung m.		m %	0	0	0	0	0	
	Dieselgebläse								
	Fall: Einlagerung								
	0,5 l DK ⁵ /t	1 €/l	€/ha	0	0	0	0	0	
Aufbereitung u. Sonstiges	Summe		€/ha	13	17	21	27	32	

¹ Maßeinheit ² Mittelwert aus Senf und Lein weil kein Marktpreis für Krambe vorhanden ³ Feuchte ⁴ Schwarzbesatz ⁵ Dieselkraftstoff * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 13: Summe der Direktkosten für die Produktion von Koriander.

Position	Spezifizierung		ME ¹ dt/ha	Ertragsstufen				
				10	15	20	25*	30*
Saatgut	Saatstärke		kg/ha	10	10	10	10	10
	Zukauf 10 €/kg		€/ha	10	10	10	10	10
	Summe		€/ha	100	100	100	100	100
Düngung	Entzug Korn, kg/dt	Preis €/kg						
	N 3,35	1,0	€/ha	21	32	42	53	63
	P 0,70	1,8	€/ha	11	17	23	28	34
	K 4,00	0,8	€/ha	13	19	26	32	39
	Mg 0,60	0,8	€/ha	5	7	10	12	14
	Summe		€/ha	50	75	100	125	150
Pflanzenschutz			€/ha	154	236	236	236	236
Aufbereitung u. Sonstiges	Trocknung		F%	10	10	10	10	10
	10 F% ² 0,94 €/dt	Feuchtware	dt/ha	7,6	7,6	5,1	6,3	7,6
	je weiteres % 0,31 €/dt	Kosten	€/dt	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97
	Summe Trocknung		€/ha	7	7	5	6	7
	Aufbereitung		m%	25	50	75	75	75
Reinigung 3-8% SB ³	0,33 €/dt	€/ha	2	5	9	11	14	
Hagelversicherung 6,7‰ ⁴		€/ha	4	6	7	9	11	
	Körnerbelüftung m.		m %	0	0	0	0	0
	Dieselgebläse							
	Fall: Einlagerung							
	0,5 l DK ⁴ /t	1 €/l	€/ha	0	0	0	0	0
Aufbereitung u. Sonstiges	Summe		€/ha	13	17	21	27	32

¹ Maßeinheit ² Feuchte ³ Schwarzbesatz ⁴ Dieseldieselkraftstoff * Züchtungsfortschritt (Ertragsanstieg /-stabilisierung)

Anhang 14: Summe der Direktkosten für die Produktion von Erucaraps.

Position	Spezifizierung		ME ¹ dt/ha	Ertragsstufen					
				10	20	30	40	50	
Saatgut		Saatstärke	Saatgutpreis						
	Linien sorte	3,1 kg/ha	17,4 €/kg	%	55	55	55	30	5
	Hybridsorte	0,32 U ² /ha	257 €/U ²	%	45	45	45	70	95
	Nachbau			%	0	0	0	0	0
	Summe			€/ha	67	67	67	77	86
Düngung	Entzug Korn, kg/dt		Preis €/kg						
N		3,35	1,0	€/ha	45	91	136	182	227
P		0,70	1,8	€/ha	14	28	42	56	70
K		4,00	0,8	€/ha	7	13	20	27	33
Mg		0,60	0,8	€/ha	2	5	7	10	12
S		30 kg/ha	0,35	€/ha	11	11	11	11	11
	Summe			€/ha	79	147	216	284	353
Pflanzenschutz	Herbizide			€/ha	93	93	93	93	93
	Fungizide			€/ha	41	102	41	72	102
	Insektizide			€/ha	15	25	15	18	25
	Wachstumsregler			€/ha	5	13	5	8	13
	Allg. Schädlinge + Totalherbizide			€/ha	23	23	23	23	23
	Summe			€/ha	176	256	176	213	256
Aufbereitung u. Sonstiges	Trocknung			F%	10	10	10	10	10
	10 F% ³ 0,97 €/dt		Feuchtware	dt/ha	7,1	10,2	12,2	16,3	20,4
	je weiteres % 0,29 €/dt		Kosten	€/dt	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97
	Summe Trocknung			€/ha	7	10	12	16	20
	Aufbereitung 0,61 €/dt			m%	50	50	50	50	50
				€/ha	3	6	9	12	15
	Hagelversicherung 13,6 ‰			€/ha	5	10	16	21	26
	Körnerbelüftung m. Dieselgebläse			m %	0	0	100	100	100
	Fall: Einlagerung								
	0,5 l DK ⁴ /t		1 €/l	€/ha	0	0	1,5	2,0	2,5
Aufbereitung u. Sonstiges	Summe			€/ha	15	26	38	51	64

¹ Maßeinheit ² Unit ³ Feuchte ⁴ Schwarzbesatz ⁵ Dieseldieselkraftstoff

Anhang 15: Maschinenkosten und Arbeitszeitbedarf für die Produktion von Iberischem Drachenkopf, Krambe und Koriander.

Arbeitsart	Schlep- per	Bez. Ba- sis ¹	Leis- tung	Schlep- per	Arb.z. bed. ²	Rep.kos ten ³	DK- ⁴ Verbr.	AfA ⁵	Masch. verm. ⁶	Verf. kost. ⁷	Ertragsniveau dt/ha				
											10	15	20	25*	30*
	kW		ha bzw. t/h	Sh ⁸ /ha bzw. t	Akh ⁹ /ha bzw. t	€/ha bzw. t	l/ha bzw. t	€/ha bzw. t	€/ha bzw. t	€/ha bzw. t	Bearbeitungsfaktor				
Grunddüngung mit Grossflächenstreuer inkl. Beladen 60dt; dt/ha; 24 m	67	ha	10,1	0,10	0,10	0,7	0,8	1,3	14	5,2	1	1	1	1	1
Stoppelsturz mit Schwergrubber 6 m flach	120	ha	4,0	0,25	0,25	7,9	6,5	8,8	119	29	1	1	1	1	1
Grundbodenbearbeitung m.Pflug u.Packer; 2,8 m	138	ha	1,1	0,93	0,93	20,6	25,0	22,4	292	89,4	1	1	1	1	1
Saatbettbereitung mit Gerätekombination; aufgesattelt; 8 m	138	ha	4,7	0,21	0,21	6,2	5,7	16,1	221	33	1	1	1	1	1
Aussaat mit Kreiselegge u. pneumatischer Sämaschine 6 m inkl.Saatguttransport. ; 4 kg/ha	181	ha	2,1	0,49	0,49	14,4	13,6	20,6	225	59,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Aussaat mit Kreiselegge u. pneumatischer Sämaschine 9 m inkl. Saatguttransport 4 kg/ha	106	ha	3,4	0,29	0,29	5,2	5,0	15,4	185	32,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cambridgewalzen ; 10 m	67	ha	4,5	0,22	0,22	2,9	2,6	5,1	69	15,9	1	1	1	1	1
Striegeln ; 18 m	83	ha	11,9	0,08	0,08	3,1	1,8	3,3	40	10,2	1	1	1	1	1
Feldspritze 3000 l; 200 l/ha inkl. Wassertransport; 24 m	74	ha	9,8	0,15	0,15	2,1	1,2	4,5	39	11,3	Drachenkopf				
											1,60	2,10	2,35	2,35	2,35
											Krambe				
											1,60	1,60	1,60	1,60	1,60
											Koriander				
											2,10	3,10	3,10	3,10	3,10
N-Düngung m. Schleuderstreuer; direktes Verfahren; 3 dt/ha; inkl. Transport u. Umschlag (TU); 24 m	67	ha	8,9	0,11	0,11	0,8	0,8	1,3	14	5,6	1	1	1	1	1
Mähdrusch m. Strohreißer; 7500l; 6m	175	ha	1,6		0,62	17,5	18,9	46,5	465	97,1	1	1	1	1	1
Korntransport m. Allradschlepper u. Doppelzug zum Erfasser; 20 km; 20 t/TE (Transporteinheit)	138	t	7,1	0,14	0,14	1,4	2,3	2,1	26	9	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
	138	t	2,7	0,37	0,37	3,3	6	2,1	62	23,4	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Korntransport m. Allradschlepper u. 1 Anhänger zum Zwischlager; 5 km; 10 t/TE	67	t	8,3	0,12	0,12	1,0	0,9	1,0	13	5,8	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Ein-u. Auslagerung Teleskoplader; 40 t/h; 80 kW	80	t	40,0	0,050	0,05	0,2	0,5	0,5	6	2,4	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Kornlager 7,2 kt ¹⁰ m.Unterflurbelüftung; 5 Monate		t			0,05	1,4	0,0	5,4	120	8	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Drachenkopf															
Summe Feldproduktion o. Ernte, 15 dt/ha	0,37			2,6	2,6	56,5	55,1	85,8	1055	261					
Summe Feldproduktion o. Ernte, 20 dt/ha	0,37			2,6	2,6	57,0	55,4	86,9	1064	264					
Summe Feldproduktion o. Ernte, 25 dt/ha	0,37			2,6	2,6	57,0	55,4	86,9	1064	264					
Summe TU ⁹ nach Lagerung, 15 dt/ha	0,06			0,5	0,5	3,9	5,5	5,2	66	26					
Summe TU nach Lagerung, 20 dt/ha	0,08			0,6	0,6	5,2	7,3	7,0	88	35					

Summe TU nach Lagerung, 25 dt/ha	0,09			0,8	0,8	6,5	9,2	8,7	110	43					
Krambe															
Summe Feldproduktion o. Ernte, 15 dt/ha	0,36			2,5	2,5	55,4	54,5	83,6	1035	255					
Summe Feldproduktion o. Ernte, 20 dt/ha	0,36			2,5	2,5	55,4	54,5	83,6	1035	255					
Summe Feldproduktion o. Ernte, 25 dt/ha	0,36			2,5	2,5	55,4	54,5	83,6	1035	255					
Summe TU ⁹ nach Lagerung, 15 dt/ha	0,11			0,8	0,8	6,7	11,1	9,8	121	47					
Summe TU nach Lagerung, 20 dt/ha	0,15			0,1	0,1	9,0	14,8	13,1	161	63					
Summe TU nach Lagerung, 25 dt/ha	0,19			1,4	1,4	11,2	18,5	16,3	201	79					
Koriander															
Summe Feldproduktion o. Ernte, 15 dt/ha	0,37			2,6	2,6	56,5	55,1	85,8	1093	261					
Summe Feldproduktion o. Ernte, 20 dt/ha	0,37			2,6	2,6	56,5	55,1	85,8	1093	261					
Summe Feldproduktion o. Ernte, 25 dt/ha	0,37			2,6	2,6	56,5	55,1	85,8	1093	261					
Summe TU ¹¹ nach Lagerung, 15 dt/ha	0,06			0,5	0,5	3,9	5,5	5,2	66	26					
Summe TU nach Lagerung, 20 dt/ha	0,08			0,6	0,6	5,2	7,3	7,0	88	35					
Summe TU nach Lagerung, 25 dt/ha	0,09			0,8	0,8	6,5	9,2	8,7	110	43					

¹ Bezugsbasis ² Arbeitszeitbedingungen ³ Reparaturkosten ⁴ Dieselkraftstoffverbrauch ⁵ Aufwendungen für Abnutzung ⁶ Maschinenvermögen ⁷ Verfahrenskosten
⁸ Schlepperstunde ⁹ Arbeitskraftstunde ¹⁰ Kilotonnen ¹¹ Transport und Umschlag * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 16: Maschinenkosten und Arbeitszeitbedarf für die Produktion von Erucaraps.

Arbeitsart	Schlep- per	Bez. Ba- sis ¹	Leis- tung	Schlep- per	Arb.z. bed. ²	Rep.kos ten ³	DK- ⁴ Verbr.	AfA ⁵	Masch. verm. ⁶	Verf. kost. ⁷	Ertragsniveau dt/ha				
											10	20	30	40	50
	kW		ha bzw. t/h	Sh ⁸ /ha bzw. t	Akh ⁹ /ha bzw. t	€/ha bzw. t	l/ha bzw. t	€/ha bzw. t	€/ha bzw. t	€/ha bzw. t		Bearbeitungsfaktor			
Grunddüngung mit Grossflächenstreuer inkl. Beladen 60dt; dt/ha; 24 m	67	ha	10,1	0,10	0,10	0,7	0,7	1,4	14,5	5	1	1	1	1	1
Stoppelsturz mit Schwergrubber 6 m flach	120	ha	4,0	0,25	0,25	7,9	6,3	8,8	118,9	29	1	1	1	1	1
Grundbodenbearbeitung m.Pflug u.Packer; 2,8 m	138	ha	1,1	0,93	0,93	20,6	25,0	23,3	302,6	91	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Grundbodenbearbeitung m.Schwergrubber; 4,5 m	138	ha	1,9	0,52	0,52	10,3	14,9	12,7	164,3	51	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Saatbettbereitung mit Gerätekombination; aufgesattelt; 8 m	138	ha	4,7	0,21	0,21	6,2	5,7	16,7	227,9	34	1	1	1	1	1
Aussaats mit Kreiselegge u. pneumatischer Sämaschine 6 m inkl.Saatguttransport ; 4 kg/ha	181	ha	2,3	0,49	0,49	14,4	13,5	21,2	232,4	61	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Aussaats mit Kreiselegge u. pneumatischer Sämaschine 9 m inkl. Saatguttransport 4 kg/ha	106	ha	4,3	0,29	0,29	5,2	5,3	15,6	187,2	33	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cambridgewalzen ; 10 m	67	ha	4,5	0,22	0,22	2,9	2,6	5,2	70,4	16	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Feldspritze 3000 l; 200 l/ha inkl. Wassertransport; 24 m	74	ha	10	0,14	0,14	1,6	1,2	3,8	40,6	10	4,5	4,5	4,5	5,5	6,9
Giftweizenverlegung m.Quad 15 kW u.Legeflinte		ha	0,5	0,2	0,22	0,3	0,6	0,8	4,7	55	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
N-Düngung m. Schleuderstreuer; direktes Verfahren; 3 dt/ha; inkl. Transport u. Umschlag (TU); 24 m	67	ha	11,1	0,09	0,09	0,7	0,7	1,2	13,4	5	2	2	2	2	2
Mähdrescher SF mit Strohhäcksler u.Rapsvorsatz; 6m	175	ha	1,3		0,75	15,8	23,9	65,2	652,5	123	1	1	1	1	1
Korntransport m. Allradschlepper u. Doppelzug zum Erfasser; 20 km; 20 t/TE (Transporteinheit)	138	t	7,4	0,14	0,14	1,3	2,2	2,1	26,3	8,9	1	2	3	4	5
Korntransport m. Allradschlepper u. 1 Anhänger zum Zwischlager; 5 km; 10 t/TE	67	t	8,6	0,12	0,12	1,0	0,9	1,0	12,9	5,7	1	2	3	4	5
Ein-u. Auslagerung Teleskoplader; 40 t/h; 80 kW	80	t	48	0,042	0,04	0,2	0,4	0,4	4,9	2	1	2	3	4	5
Kornlager 7,2 kt ¹⁰ m.Unterflurbelüftung; 5 Monate		t			0,05	1,5	0,0	6	138,9	8,7	1	2	3	4	5
Summe Feldproduktion o. Ernte, 30 dt/ha	0,35			2,7	3,2	49,7	49,8	86	1053	263					
Summe Feldproduktion o. Ernte, 40 dt/ha	0,36			2,8	3,3	51,3	51,1	90	1096	274					
Summe Feldproduktion o. Ernte, 50 dt/ha	0,38			3,0	3,5	53,5	52,8	95,4	1153	288					
Summe TU ¹¹ nach Lagerung, 30 dt/ha	0,11			0,9	0,9	7,4	10,4	10,5	132	50					
Summe TU nach Lagerung, 40 dt/ha	0,14			1,2	1,2	9,9	13,9	14	176	66					
Summe TU nach Lagerung, 50 dt/ha	0,18			1,5	1,5	12,3	17,3	17,5	221	83					

¹ Bezugsbasis ² Arbeitszeitbedingungen ³ Reparaturkosten ⁴ Dieselkraftstoffverbrauch ⁵ Aufwendungen für Abnutzung ⁶ Maschinenvermögen ⁷ Verfahrenskosten ⁸ Schlepperstunde ⁹ Arbeitskraftstunde
¹⁰ Kilotonnen ¹¹ Transport und Umschlag

Anhang 17: Arbeitskosten für die Produktion von Iberischem Drachenkopf und Koriander.

Position	Produktionsabschnitt	ME ¹	Ertragsstufe					
Arbeitszeit- bedarf		dt/ha	10	15	20	25*	30*	
	Feldproduktion ohne Ernte	AKh ² /ha	2,5	2,6	2,6	2,6	2,6	
	Feldernte	AKh/ha	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	
	Transport bei Verkauf zur Ernte	AKh/ha	0,14	0,21	0,3	0,4	0,4	
	Transport, Umschlag und Lagerung	AKh/ha	0,4	0,5	0,7	0,9	1,1	
	Regiestundenzuschlag	%	20	20	20	20	20	
	nicht termingebundene Arbeiten		AKh/ha	Drachenkopf				
				2,04	2,16	2,25	2,33	2,4
			AKh/ha	Koriander				
				2,08	2,24	2,32	2,39	2,45
	Summe Verkauf zur Ernte o. nicht termingebundener Arbeit		AKh/ha	4,0	4,3	4,4	4,5	4,5
	Summe nach Lagerung o. nicht termingebundener Arbeit		AKh/ha	Drachenkopf				
4,2				4,5	4,8	5,0	5,2	
		AKh/ha	Koriander					
			4,3	4,7	4,9	5,1	5,3	
Arbeitskosten	9,49 €/h 50% LNK ³							
	Summe Verkauf zur Ernte	€/ha	Drachenkopf					
			85	89	92	95	97	
			€/ha	Koriander				
				87	93	95	98	100
	Summe Verkauf nach Einlagerung		€/ha	Drachenkopf				
				89	95	100	104	108
		€/ha	Koriander					
			91	99	103	107	111	

¹ Maßeinheit ² Arbeitskraftstunde ³ Lohnnebenkosten * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 18: Arbeitskosten für die Produktion von Krambe.

Position	Produktionsabschnitt	ME ¹	Ertragsstufe					
Arbeitszeit- bedarf		dt/ha	10	15	20	25*	30*	
	Feldproduktion ohne Ernte	AKh ² /ha	2,5	2,5	2,5	2,6	2,6	
	Feldernte	AKh/ha	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	
	Transport bei Verkauf zur Ernte	AKh/ha	0,37	0,56	0,7	0,9	1,1	
	Transport, Umschlag und Lagerung	AKh/ha	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	
	Regiestundenzuschlag	%	20	20	20	20	20	
	nicht termingebundene Arbeiten		AKh/ha	2,18	2,32	2,47	1,5	2,5
	Summe Verkauf zur Ernte o. nicht termingebundene Arbeit		AKh/ha	4,2	4,4	4,7	4,9	5,1
	Summe nach Lagerung o. nicht termingebundene Arbeit		AKh/ha	4,5	4,8	5,2	5,6	5,9
	Arbeitskosten	9,49 €/h 50% LNK ³						
	Summe Verkauf zur Ernte		€/ha	91	96	102	105	108
				Summe Verkauf nach Einlagerung	€/ha	95	102	109

¹ Maßeinheit ² Arbeitskraftstunde ³ Lohnnebenkosten * Züchtungsfortschritt (Ertragsanhebung bzw. -stabilisierung)

Anhang 19: Arbeitskosten für die Produktion von Erucaraps.

Position	Produktionsabschnitt	ME ¹	Ertragsstufe				
			10	20	30	40	50
Arbeitszeit- bedarf		dt/ha	10	20	30	40	50
	Feldproduktion ohne Ernte	AKh ² /ha	3,2	3,2	3,2	3,3	3,5
	Feldernte	AKh/ha	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	Transport bei Verkauf zur Ernte	AKh/ha	0,1	0,3	0,4	0,5	0,7
	Transport, Umschlag und Lagerung	AKh/ha	0,3	0,7	1	1,4	1,7
	Regiestundenzuschlag	%	20	20	20	20	20
	nicht termingebundene Arbeiten	AKh/ha	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	Summe Verkauf zur Ernte o. nicht termingebundene Arbeit	AKh/ha	4,9	5,1	5,2	5,6	6
	Summe nach Lagerung o. nicht termingebundene Arbeit	AKh/ha	5,1	5,6	5,9	6,6	7,3
Arbeitskosten	9,49 €/h 50% LNK ³						
	Summe Verkauf zur Ernte	€/ha	105	108	109	115	121
	Summe Verkauf nach Einlagerung	€/ha	108	115	120	129	139

¹ Maßeinheit ² Arbeitskraftstunde ³ Lohnnebenkosten

Anhang 20: Tierspezifische Verdaulichkeiten der Inhaltstoffe, % TM.

Verdaulichkeiten (D)	Wiederkäuer (Rind)	Schwein
DXP (Protein)	86,16	74,07
DXL (Fett)	82,97	61,24
DOS (org.S.)	80,03	66,77
DXF (Faser)	48,02	38,78

Anhang 21: Presskuchenmindestpreise €/dt Frischmasse, Vergleichsfutter Sojaschrot-Normtyp und Futtergerste*.

	Basis	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Eruca-Raps	00-Raps
Rindermast	XP / ME	24,00	23,13	22,55	36,14	32,48
Milchvieh	XP / NEL	23,09	22,88	22,31	35,91	32,26
Schwein	XP / ME	20,05	19,75	18,41	33,98	29,94
Schwein	Lys / ME	19,85	21,12	17,83	34,99	32,33

*Preise Referenzfuttermittel vom 25.02.2014 (Proteinmarkt, 2014 und Proplanta, 2014)

Anhang 22: Presskuchenmindestpreise €/dt Frischmasse, Vergleichsfutter Rapsextraktionsschrot und Futtergerste*.

	Basis	Drachenkopf	Krambe	Koriander	Eruca-Raps	00-Raps
Rindermast	XP / ME	19,99	20,90	20,04	27,13	25,28
Milchvieh	XP / NEL	19,83	20,59	19,78	27,14	25,22
Schwein	XP / ME	14,58	16,08	14,11	25,17	22,48
Schwein	Lys / ME	15,36	17,56	14,46	27,29	25,24

* Preise Referenzfuttermittel vom 25.02.2014 (Ufop, 2014 und Proplanta 2014)