

AiF-Vorhaben: „Entwicklung technischer Prozesse zur Durchführung enzymatischer Reaktionen in überkritischen Fluiden“

Abschlussbericht

Laufzeit: 01.05.02 – 30.10.04

Berichtszeitraum: 01.05.02 – 30.10.04

Teilprojekt: 13300 BG/1
Projektleiter: Dr.-Ing. Stephan Kabasci
Projektbearbeiter: Dipl.-Ing. Ulrike Ehrenstein
Dipl.-Ing. Erich Jelen

Teilprojekt: 13300 BG/2
Projektleiter: Prof. Dr. Udo Kragl
Projektbearbeiter: Dipl.-Chem. Marrit Eckstein

Teilprojekt: 13300 BG/3
Projektleiter: PD Dr. Thomas Kraska
Projektbearbeiter: Jürgen Jurtzik

Das Forschungsvorhaben wurde aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMWi) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V. (AiF) gefördert.

0	<i>Zusammenfassung</i>	3
1	<i>Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung</i>	4
2	<i>Forschungsziel/ -aufgabe</i>	5
3	<i>Stand der Wissenschaft und Technik</i>	6
3.1	Enzymkatalyse	6
3.2	Enzymkatalyse in überkritischen Fluiden	6
3.3	Modellierung der Enzymkinetik.....	7
3.4	Modellierung der Phasengleichgewichte	9
4	<i>Anlagenaufbau</i>	10
4.1	Kontinuierliche Versuchsanlage.....	10
4.2	Anlage Rostock	12
4.3	Phasengleichgewichtsapparatur	13
4.4	Technikumsanlage.....	16
5	<i>Ergebnisse</i>	18
5.1	Enzymauswahl und Immobilisierungsformen	18
5.2	Reaktionen	23
5.2.1	Voruntersuchungen	23
5.2.2	Synthese von Isoamylacetat.....	28
5.2.3	Synthese von Citronellylacetat.....	36
5.2.4	Syntheseversuche in der Technikumsanlage	37
5.3	Phasengleichgewichte	37
5.4	Modellierung	39
5.4.1	Enzymkinetik.....	39
5.4.2	Phasengleichgewichte	44
5.4.3	Gesamtprozess.....	52
6	<i>Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des Antrags</i>	58
7	<i>Wissenschaftlich-technischer Nutzen</i>	59
8	<i>Wirtschaftlicher Nutzen für KMU</i>	60
9	<i>Innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten</i>	62
10	<i>Veröffentlichungen im Rahmen des Vorhabens</i>	63
11	<i>Ausblick</i>	65
12	<i>Literaturverzeichnis</i>	66
13	<i>Durchführende Forschungsstellen</i>	69

Forschungsthema

Entwicklung technischer Prozesse zur Durchführung enzymatischer Reaktionen in überkritischen Fluiden

Das Forschungsvorhaben (AiF-Nr. 13300 BG) wurde aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMWi) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V. (AiF) gefördert.

0 Zusammenfassung

Das Ziel des Vorhabens wurde im Wesentlichen erreicht: die wissenschaftlich fundierte Modellierung der enzymatischen Wertstoffproduktion in überkritischen Fluiden als Reaktionsmedium. Sowohl die experimentellen Methoden und Versuchsanordnungen als auch das mathematische Programm zur Beschreibung des Gesamtprozesses wurden im Rahmen dieses Forschungsprojektes bereitgestellt.

An der Universität Rostock wurden Enzyme und Immobilisate identifiziert, die für den Einsatz in überkritischem CO₂ geeignet sind. Bei den Experimenten zur Reaktion zeigte sich, dass nicht jedes Enzym, das Reaktionen in organischen Lösemitteln katalysiert, auch für dieses Medium geeignet ist. Weiterhin unterscheidet sich der optimale Temperatureinsatzbereich der Enzyme in überkritischem CO₂ von dem in Lösemitteln. Der hier an einer Umesterungsreaktion gewählte reaktionskinetische Ansatz kann auch für die Übertragung auf andere enzymatische Reaktionen verwendet werden. Er gibt die beobachteten experimentellen Abhängigkeiten von Konzentrationen und Verweilzeit gut wieder.

Es wurden weiterhin an der Universität Köln Phasengleichgewichtsberechnungen der Mehrstoffgemische mit der Peng-Robinson-Gleichung durchgeführt und geeignete Short-cut-Gleichungen für die relevanten Zustandsbereiche abgeleitet. Die Simulation des Gesamtprozesses kann so in kompakter Weise erfolgen. Berechnungen der Phasengleichgewichte während der Prozesssimulation, deren Konvergenz bei den betrachteten Mehrstoffsyste men eine hohe Abhängigkeit von den gewählten Startwerten aufweist, können vermieden werden. Für die Modellierung des Gesamtprozesses wurde eine bei Fraunhofer UMSICHT entwickelte Modellierungsplattform verwendet, in die die Modelle für Reaktionskinetik und Phasengleichgewicht eingebunden wurden. Mit Hilfe dieser adaptierten Modellierungsplattform ist es in einfacher Weise möglich, auch komplexe Prozesse - wie z.B. mit fraktionierter Abscheidung - abzubilden.

Zur Verifizierung der Modellierung sollten Untersuchungen an einer vorhandenen Hochdruckanlage mit einem 6-Liter-Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Wegen gravierender technischer Probleme an dieser Anlage ließen sich die Verifizierungsexperimente nicht im vorgesehenen Umfang durchführen.

Die an den Laborversuchsanlagen gewonnenen Erkenntnisse haben das Know-how um die praktische Ausgestaltung von Reaktionsverfahren in überkritischem CO₂ bei den Forschungsstellen enorm gesteigert und die Möglichkeit zur technischen Umsetzung deutlich verbessert.

Darüber hinaus konnten wichtige Erkenntnisse aus den vorbereitenden Arbeiten zur Enzymkatalyse in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln bei einem KMU-Mitglied des projektbegleitenden Ausschusses in die Praxis umgesetzt werden.

1 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

Der Enzymtechnik kommt im Bereich der Life Sciences zunehmende Bedeutung zu. Enzyme bilden zum einen die Grundlage umweltverträglicher industrieller Produkte und Prozesse und können zum anderen vielfältige chemische Reaktionen mit hoher Spezifität bewirken. Bei einem extrazellulären Einsatz von Biokatalysatoren werden Enzyme gezielt mikrobiologisch produziert und dann isoliert eingesetzt. In den letzten Jahrzehnten wurde gezeigt, dass Biokatalysatoren ihre katalytische Aktivität auch in nicht-wässriger Umgebung behalten. Immobilisierte Enzyme, die nahezu wasserfreien Lösungsmitteln ausgesetzt werden, weisen eine stark erhöhte Temperaturbeständigkeit und eine erstaunlich breite Substratspezifität auf.

Überkritische Fluide (SCF) bieten sich alternativ zu organischen Lösungsmitteln als Reaktionsumgebung für enzymatische Umsetzungen an. Speziell überkritisches Kohlendioxid (sc-CO_2) fungiert als nicht polares Lösungsmittel und ist ungiftig, nicht brennbar und preiswert. Hingegen ist der Einsatz organischer Lösungsmittel im technischen Maßstab wegen ihrer gefährlichen Eigenschaften (Toxizität, Feuergefährlichkeit u.a.) und der gesetzlichen Regelungen (Gefahrstoffverordnung, TA-Luft) problematisch [BUCH97]. Gegenüber wässrigen Systemen bieten überkritische Fluide wesentliche Vorteile bezüglich der Reaktionskinetik und der Abtrennung der Produkte. Aus technischer Sicht stellt ein überkritisches Fluid aufgrund seiner positiven Eigenschaften (niedrige Viskosität und hohes Lösungsvermögen) ein ideales Lösungsmittel dar. Insbesondere überkritisches Kohlendioxid zeichnet sich durch vorteilhafte Stoffeigenschaften aus. Seine physikalischen Eigenschaften (Lösungsvermögen, Viskosität, Grenzflächenspannung, Dichte etc.) variieren in weitem Umfang mit Druck und Temperatur [MILL90].

Die wissenschaftlich fundierte Modellierung enzymatischer Veresterungsverfahren in SC-CO_2 steht derzeit noch aus. Dazu sind weitergehende Untersuchungen zu Phasengleichgewichten und zur Reaktionskinetik sowie die modellhafte Abbildung der zugrundeliegenden Verfahrensschritte nötig. Diese Arbeiten wurden im Rahmen dieses Projekts durchgeführt.

Fruchtige Aromaester sind wirtschaftlich interessante Substanzen, bei denen - insbesondere wenn es sich um natürliche Produkte handelt - eine steigende Nachfrage zu verzeichnen ist. Nach den Vorgaben des Lebensmittelrechts zählen die enzymatisch hergestellten Ester, wenn sie aus Rohstoffen natürlichen Ursprungs synthetisiert werden, zu den natürlichen Aromastoffen. Enzymatische Estersynthesen in wässrigen Reaktionssystemen weisen jedoch zu geringe Reaktionsgeschwindigkeiten auf. Größere Umsetzungsraten werden in organischen Lösungsmitteln erreicht, die Produktabtrennung ist allerdings kompliziert. Überkritische Fluide als Reaktionsmedium lassen eine Kombination der Vorteile beider Verfahren erwarten, obendrein entfallen organische Lösungsmittel als Arbeitsstoffe. Bei den Herstellern von Aromastoffen handelt es sich in Deutschland vielfach um kleine und mittlere Unternehmen.

2 Forschungsziel/ -aufgabe

Ziel des geplanten gemeinsamen Projekts der drei Forschungseinrichtungen (Universität Köln, Universität Rostock, Fraunhofer UMSICHT) ist die Entwicklung einer wissenschaftlich fundierten Modellierung zur Beschreibung enzymatischer Synthesen in überkritischen Fluiden (speziell: Kohlendioxid). Die Modellierung soll als Basis für die technische Umsetzung enzymatischer Reaktionen in überkritischen Fluiden (insbesondere im Hinblick auf das Scale-up) dienen. Auf der Grundlage experimenteller Untersuchungen wird eine physikalisch-mathematische Modellierung erarbeitet, die die Wirkung verschiedener Einflussfaktoren (wie Druck, Temperatur und Stoffanteile) beschreibt.

Die Modellbildung soll für die Umesterungsreaktion durchgeführt werden. Aufbauend auf den in der Literatur vorhandenen Daten sollen Experimente mit den in Abschnitt 2.1 genannten Stoffsystemen durchgeführt werden, die zusammen mit theoretischen Grundlagen die Basis für die Modellierung des Gesamtprozesses bilden.

Angestrebte Forschungsergebnisse

Als herausragendes wissenschaftlich-technisches Ergebnis wird die wissenschaftlich fundierte Modellierung der enzymatischen Wertstoffproduktion in überkritischen Fluiden als Reaktionsmedium gesehen. Die im Rahmen des Vorhabens auszuarbeitende Strategie der Verknüpfung thermodynamischer Betrachtungen mit experimentellen Laboruntersuchungen zu einer modellhaften Beschreibung der Prozesse mit dem Ziel der Auslegung von Produktionsverfahren kann methodisch auf weitere Reaktionen übertragen werden.

Der ursprüngliche Projektplan sah die Untersuchung der Lipase-katalysierten Synthese von Aromastoffen wie Isoamylacetat oder Citronellylacetat vor. In einem zweiten Projektteil sollte der Einsatz von Oxidasen z. B. für die Bayer-Villiger-Oxidation oder Hydroxylierung von Aromaten untersucht werden. Dies wurde nach Diskussion mit dem projektbegleitenden Ausschuss zugunsten der Herstellung von Octanol verändert. 2-Octanol und 2-Octylacetat gehören wie das Isoamylacetat zu Aromastoffen und kommen hauptsächlich in Champignondüften vor. Die reinen Enantiomere des 2-Octanol sind chirale Ausgangsstoffe für weiterführende Synthesen. Hier wurden zwei Verfahrensalternativen untersucht, die kinetische Racematspaltung mit Lipasen sowie die enantioselektive Reduktion mit Alkoholdehydrogenasen.

Als Beispielprodukte sind mit den herzustellenden natürlichen Aromaestern und einem chiralen Alkohol Stoffe ausgewählt worden, die von signifikantem wirtschaftlichen Interesse in der Lebensmittelindustrie und in der Pharmaindustrie sind. Von dem auf der Basis der in diesem Vorhaben zu entwickelnden Modellierung auszulegenden innovativen technischen Prozesse werden Einsparungen bei den Herstellungskosten und Umweltentlastungen durch den Verzicht auf lösemittelbasierte Systeme erwartet. Die erzeugten Produkte sind qualitativ sehr hochwertig, da keine Verunreinigungen durch das Reaktionsmedium zu erwarten sind.

Einige der Ausgangsstoffe für die untersuchten Reaktionen können zudem aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden, so dass durch die Veredelung ein erweitertes Marktpotenzial für diese Rohstoffquelle erschlossen wird.

3 Stand der Wissenschaft und Technik

3.1 Enzymkatalyse

Enzymkatalyse und biotechnologische Verfahren allgemein sind etabliert. Die Produktpalette reicht dabei von Bulkchemikalien wie Acrylamid über Lebens- und Futtermittel hin zu Feinchemikalien, die als Bausteine für Vitamine, Pharmaka und Aromastoffe eingesetzt werden. Dies spiegelt sich in zahlreichen Reviews und Textbüchern wieder (Aehl04, Bomm04, Fabe00, Pate00, Schm01). In letzter Zeit ist für derartige industriell genutzte Biotechnologische Prozesse der Begriff der „Weißen Biotechnologie“ geprägt worden (OECD, 2001, Kerr, 2003, Zinke, 2004).

Einige Beispiele sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet:

Acrylamid	Acrylnitril, H ₂ O	Nitrilhydratase in ganzen Zellen von <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	30 000 t/a - Nitto
Fructose	Glucose	Fructose-Glucose-Isomerase	8×10 ⁶ t/a - Verschiedene
Aspartam	L-Phenylalanin-OMe, Z-L-Asparaginsäure	Thermolysin	2000 t/a - DSM
(S)-Phenyl-ethylamin ^e	rac. Phenylethylamin	Lipase aus <i>Pseudomonas spec.</i>	100 t - BASF
L- <i>tert</i> -Leucin ^f	2-Oxo-3,3-dimethyl-butansäure, NH ₄ COOH	Leucindehydrogenase, Formiatdehydrogenase	100 kg - Degussa

Trotz der unbestreitbaren Erfolge gibt es nach wie vor Probleme und Herausforderungen. Eine dieser Herausforderungen ist die Enzymkatalyse unter nicht-natürlichen Bedingungen, um so z. B. durch verbesserte Löslichkeit die Produktivität zu erhöhen, durch integrierte Produktabtrennung die Ausbeute zu erhöhen oder um Nebenreaktionen zu unterdrücken. Hier spielen vor allem organische Lösungsmittel (Klib01), überkritische Fluide (Aalt99, Hart01) und in letzter Zeit ionische Flüssigkeiten (Rant03; Krag0303) eine wichtige Rolle.

3.2 Enzymkatalyse in überkritischen Fluiden

Der Einsatz von Enzymen in nicht-konventionellen Reaktionsmedien ist vielfach wünschenswert, um beispielsweise bessere Löslichkeit der Reaktanden, bessere Selektivität oder die Verschiebung von Gleichgewichten zu erreichen. Dies kann durch organische Lösungsmittel, ionische Flüssigkeiten oder überkritische Fluide (SCF) erreicht werden. Speziell überkritisches Kohlendioxid (sc-CO₂) fungiert als nicht polares Lösungsmittel und ist ungiftig, nicht brennbar und preiswert. Gegenüber wässrigen Systemen bieten überkritische Fluide wesentliche Vorteile bezüglich der Reaktionskinetik und der Abtrennung der Produkte. Aus technischer Sicht stellt ein überkritisches Fluid aufgrund seiner positiven Eigenschaften (niedrige Viskosität und hohes Lösungsvermögen) ein ideales Lösungsmittel dar. Insbesondere überkritisches Kohlendioxid zeichnet sich durch vorteilhafte Stoffeigenschaften aus. Seine physikalischen Eigenschaften variieren in weitem Umfang mit Druck und Temperatur und sind gut untersucht.

Die Vorteile einer Anwendung von Enzymen in SCF werden im Folgenden zusammengefasst:

- Bei Synthesereaktionen, in denen Wasser als Produkt entsteht, kann das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Produkte verschoben werden [KAMA95].
- Solubilisierung hydrophober Reaktanden: Die Löslichkeit hydrophober Verbindungen erhöht sich relativ zu der in Wasser [KAMA95, OECD01].
- Die thermische Beständigkeit von Biomolekülen ist in überkritischen Fluiden größer als in Wasser [KAMA95, OECD01].
- Das Lösungsmittel lässt sich einfach im geschlossenen Kreislauf führen [KAMA95, OECD01].
- Biochemische Reaktionen und Trennungen können zu einem einzigen Schritt zusammengefasst werden, womit eine erleichterte Produktaufbereitung ermöglicht wird [KAMA95, OECD01]. Produktfraktionierung und -reinigung aus dem Reaktionsgemisch sind durch eine schrittweise Reduktion des Druckes in einer Sequenz von Abscheiden leicht durchführbar [KAMA95].
- SC-CO₂ ist nicht toxisch im Gegensatz zu organischen Lösungsmitteln [BUCH97, OECD01].
- Höhere Enzymumsatzraten: Da die SCFs eine niedrigere Viskosität und eine hohe Diffusionsfähigkeit aufweisen, wird der Stoffübergangswiderstand vom Reaktionsgemisch zu den reaktionsaktiven Flächen der Enzyme stark reduziert. Hierdurch beschleunigt sich die Geschwindigkeit des reaktionskontrollierenden Stofftransports [KAMA95].
- Bedingt durch die Verfahrensbedingungen ist ein guter Schutz gegen mikrobielle Kontamination gegeben [OECD01].

Enzymatische Reaktionen in überkritischen Fluiden sind im Labormaßstab bereits durchgeführt worden. Hierzu können aus [AALT91, MICH96] folgende Beispiele aufgeführt werden:

- Lipasen [OECD01]
- Immobilisierte Lipase (Umesterung/SCF: CO₂) [MILL90]
- Protease [PAST89]
- Cellulase (SCF: CO₂) [ZHEN96]
- Alkaline Phosphatase (SCF: CO₂) [PAST89]
- Oxidasen (SCF: u. a. CO₂) [HAMM85, RANT03]
- Enzymkatalyse in überkritischem CO₂ - Racemattrennung von D,L - Menthol [MICH96]

Die enzymatische Veresterung ist in diesem Zusammenhang die im Labormaßstab am häufigsten untersuchte Reaktion. Ein Vorteil der Veresterung in SCFs ist, dass sich durch Ausnutzung der Phasengleichgewichte zwischen den beteiligten Komponenten die Reaktionsprodukte in einfachen, integrierten Prozessschritten kontinuierlich von dem Lösungsmittel extraktiv entfernen lassen. Die Tatsache, dass sich das bei der Veresterung entstehende Wasser nur zu einem geringen Teil in SC-CO₂ löst, ist zudem vorteilhaft zur Erreichung hoher Umsätze bei der Reaktion.

3.3 Modellierung der Enzymkinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter können entweder Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen (V_0 -Messungen) oder Satzreaktorversuche verwendet werden. In beiden Fällen ist ein kinetisches Modell erforderlich, das die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der

Substratkonzentration beschreibt. Als formalkinetisches Modell wird eine Gleichung verwendet, die sich durch multiplikative Verknüpfung von zwei Michaelis-Menten-Kinetiken ergibt. Dieser Ansatz ist dann korrekt, wenn das Gleichgewicht auf Seite der Produkte liegt bzw. keine Rückreaktion auftritt (Bise02). Die beiden Methoden unterscheiden sich in der Anzahl der sich ändernden Komponenten. Im Fall der V_0 -Messungen wird nur die Konzentration einer Komponente verändert, die der anderen wird konstant gehalten. Bei den Satzreaktorversuchen wird die Konzentrationsänderung aller Komponenten als Funktion der Zeit gemessen. Bei der Auswertung sind daher die Stoffbilanzen aller Komponenten erforderlich, die ein gekoppeltes Differentialgleichungssystem erster Ordnung bilden.

Die kinetischen Parameter werden durch Anpassung der kinetischen Gleichungen an **die** Messwerte mittels nicht-linearer Regression ermittelt; im Fall der Satzreaktorversuche ergänzt durch numerische Integration der Geschwindigkeitsgleichungen.

Reaktor-Grundtypen sind der Satzreaktor und der CSTR. Im idealen Betriebszustand wird von einer intensiven Durchmischung ausgegangen, d.h. es existieren keine Konzentrationsgradienten als Funktion des Ortes zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die beiden Reaktortypen unterscheiden sich in ihrem Konzentrations-Zeit-Profil (Abb. 3.1). Im Satzreaktor nimmt die Substratkonzentration mit zunehmender Zeit ab und die Produktkonzentration entsprechend zu. Anders im kontinuierlich betriebenen Rührkessel: Da dieser unter Auslaufbedingungen arbeitet, entspricht das Konzentrationsniveau in den einzelnen Volumenelementen dem am Auslass. Im stationären Zustand ist die Konzentration zeit- und ortsunabhängig. Im Gegensatz zum Satzreaktor ist im CSTR die Produktkonzentration konstant auf ihrem maximalen Wert. Im Strömungsrohrreaktor geschieht dies über die Reaktorlänge.

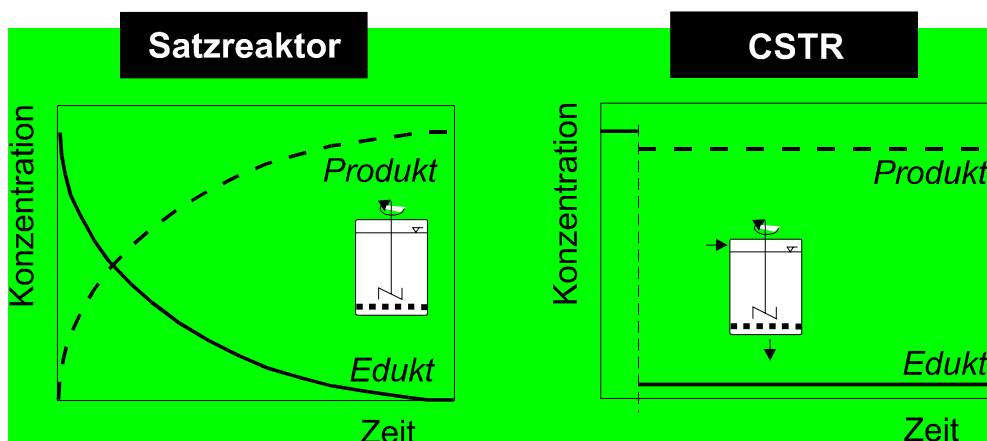


Abb. 3.1: Konzentrationsverläufe als Funktion der Zeit für den Satzreaktor und CSTR

Um die Konzentrationsverläufe als Funktion der Zeit simulieren zu können, ist es notwendig, die Stoffbilanzen für alle beteiligten Reaktanden zu formulieren. Die Stoffbilanzen sämtlicher Edukte und Produkte bilden dabei ein gekoppeltes System von Differentialgleichungen erster Ordnung. Die Konzentrationsänderung eines Stoffes pro Zeiteinheit und Volumenelement (= 'Akkumulation') setzt sich dabei aus der Konvektion, der Reaktion und der Diffusion zusammen.

$$\text{Akkumulation} = \text{Konvektion} + \text{Reaktion} + \text{Diffusion}$$

Unter der Annahme des idealen Verhaltens entfällt dabei für die hier betrachteten Reaktor-Grundtypen die Diffusion. Im Fall des Satzreaktors entfällt der Term für die Konvektion, d.h. die Konzentrationsänderung durch zu- und abgeführte Reaktanden. Befindet sich der CSTR im steady-state so ist die Akkumulation gleich Null, da der Reaktor dann unter Auslaufbedingungen arbeitet. Folgend sind die Stoffbilanzen für die beiden besprochenen Reaktoren wiedergegeben:

Satzreaktor: Akkumulation = Reaktion

$$\frac{d[S]}{dt} = \sum v_S$$

CSTR: Akkumulation = Konvektion + Reaktion

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{[S]_0 - [S]}{\tau} + \sum v_S$$

[S] aktuelle Substratkonzentration im Reaktor

[S]₀ Substratkonzentration im Zulauf

$\sum v_S$ Summe der Reaktionsgeschwindigkeitsgleichungen mit [S]-Beteiligung

τ Verweilzeit

3.4 Modellierung der Phasengleichgewichte

Die Berechnung von Phasengleichgewichten von binären Systemen ist relativ weit vorangeschritten. Es werden heutzutage in der Regel entweder empirische, meist kubische Zustandsgleichungen wie die Redlich-Kwong-Soave oder die Peng-Robinson Gleichung verwendet oder theoretisch abgeleitete Zustandsgleichungen wie zum Beispiel die SAFT Modelle [MULL01].

Die Berechnung von Mehrkomponenten Systemen wird bislang selten durchgeführt in der Regel mit kubischen Gleichungen. In der Literatur fand sich im wesentlichen eine Arbeit [CHRI95] die die hier relevanten 5-Komponenten Systeme für enzymatische Reaktionen behandelt hat.

4 Anlagenaufbau

Gemäß den Planungen, die in der Phase des Forschungsantrags verfolgt wurden, war der Aufbau zweier Versuchsanlagen im Rahmen des Projekts vorgesehen:

- a) einer Laboranlage zur experimentellen Untersuchung der Phasengleichgewichte und der enzymatischen Synthese im Zweiphasensystem (Fraunhofer UMSICHT, Oberhausen) und
- b) einer Anlage zur Untersuchung enzymatischer Reaktionen in einem einphasigen Reaktor (Universität Rostock)

Erste thermodynamische Betrachtungen ergaben jedoch, dass auch die in Oberhausen zu betrachtende Esterbildungsreaktion vorteilhafterweise nur im einphasigen, überkritischen System durchgeführt werden sollte. Daher wurden abweichend von den Planungen des Antrags die folgenden Versuchsanlagen im Rahmen des Vorhabens errichtet:

- a) Anlage zur Durchführung kontinuierlicher Reaktionen in überkritischem CO_2 in einem Festbettreaktor mit immobilisiertem Enzym (Oberhausen)
- b) Anlage zur absatzweisen oder kontinuierlichen Durchführung von Reaktionen in einem Rührbehälter oder zur Untersuchung von Phasengleichgewichten durch den Umbau einer Extraktionsanlage (Rostock)
- c) Erweiterung einer Anlage zur Messung von Phasengleichgewichten (OB)

Diese drei Versuchsanlagen sowie die bei Fraunhofer UMSICHT vorhandene Technikumsanlage werden im folgenden beschrieben.

4.1 Kontinuierliche Versuchsanlage

Bei Fraunhofer UMSICHT wurde eine Laboranlage zur Durchführung von enzymkatalysierten Reaktionen in überkritischen Fluiden geplant und gebaut. Die Anlage (Abb. 4.1) verfügt über einen 180 ml Reaktor, in den das Enzymimmobilisat als Festbett eingebracht wird. Die Trennung von CO_2 und Reaktionslösung erfolgt durch Druckabsenkung in den Abscheidebehältern. Den Transport der Fluide sowie die Komprimierung auf hohe Drücke gewährleisten eine HPLC- und eine Hochdruckpumpe. Temperiert wird die Anlage durch einen Thermostaten.

Nach der Inbetriebnahme der kontinuierlichen Anlage wurden noch vorhandene Schwachstellen, die die Versuchsdurchführung beeinträchtigten, systematisch erfasst und durch geeignete Maßnahmen korrigiert. So wurde die Wärmedämmung an sensiblen Stellen (Druckminderventile) verstärkt, Einbauten wurden in die Behälter eingebracht, um zu verhindern, dass Flüssigkeitströpfchen mitgerissen werden und die Probenahmestellen an den Abscheidern wurden optimiert, um Verluste an kondensierbarer Flüssigkeit beim Entspannen des CO_2 zu minimieren. Zudem wurde unter Verwendung einer Probeschleife mit 6-Wege-Ventil und einer HPLC-Pumpe eine zusätzliche Probenahmestelle am Reaktorausgang eingerichtet. Diese Probenahmestelle hat erheblich zur Erzielung einer hohen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit bei der Bestimmung des Umsatzes der Reaktionen beigetragen. Abbildung 4.2 zeigt die kompakt aufgebaute Versuchsanlage.

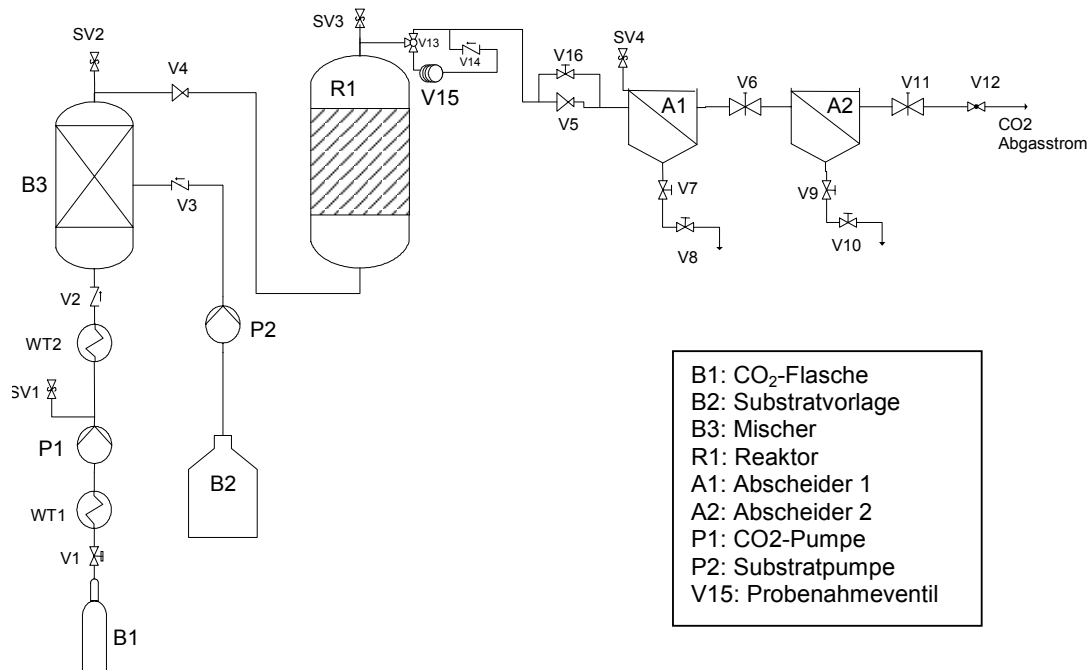


Abb. 4.1: Fließbild der kontinuierlich betriebenen Versuchsanlage mit Festbettreaktor



Abb. 4.2: Ansicht der kontinuierlichen Versuchsanlage

4.2 Anlage Rostock

Zur absatzweisen oder kontinuierlichen Durchführung von Reaktionen in einem Rührbehälter oder zur Untersuchung von Phasengleichgewichten wurde eine an der Universität Rostock vorhandene Anlage bestehend aus Rührzelle und Sichtzelle umfassend umgebaut. Die Anlage wurde zuvor vor allem für die Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen im Batch-Betrieb genutzt, für den Sie auch vom Hersteller konzipiert wurde. U.a. durch den Einbau zweier Hochdruckpumpen wurde die Anlage so erweitert, dass sie für Experimente im kontinuierlichen Betrieb geeignet ist. Weiterhin wurden Möglichkeiten zur Probenahme während der Versuche installiert. Der Anlagenumbau wurde bei Fraunhofer UMSICHT geplant und dann von Mitarbeitern aus Oberhausen und Rostock gemeinsam vorgenommen.

In Abbildung 4.3 ist das Fließschema dieser Versuchsanlage dargestellt, die mit einem Rührreaktor ausgerüstet ist. Die Probenahme zur Reaktionsbeobachtung erfolgt über ein HPLC-Ventil. Abbildung 4.4 zeigt eine Aufnahme der Anlage.

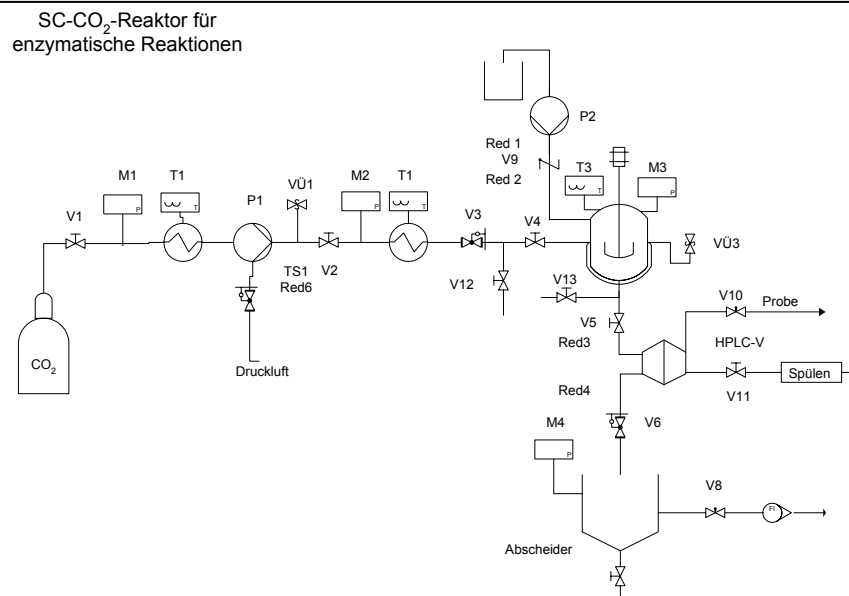


Abb. 4.3: Aufbau der Versuchsanlage mit Rührreaktor zur Untersuchung von enzymkatalysierten Reaktionen in überkritischem CO₂

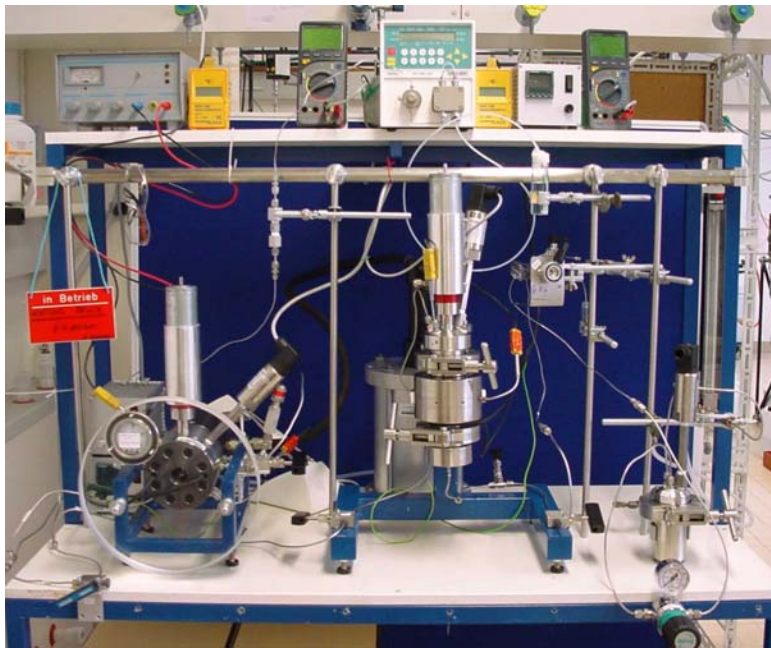


Abb. 4.4: Ansicht der Versuchsanlage

Nachdem der Umbau erfolgt war, litt die Versuchsdurchführung in dieser Anlage in hohem Maße unter den Spätfolgen der vorhergehenden Nutzung und unter dem Ausfall wichtiger Anlagenkomponenten. Besonders schwerwiegend war die lange Lieferzeit von Ersatzteilen. So hat z.B. der Ersatz eines gebrochenen Saphirglases bei der Inbetriebnahme in Rostock nahezu ein halbes Jahr gedauert, da dessen erste Ersatzlieferung kurz nach dem Einbau bereits wieder gerissen war und eine Nacharbeit an der Reaktionszelle selbst notwendig war. Zudem traten zunächst in der Rührzelle und in der Folge dann vor allem in den Entspannungsventilen immer wieder Probleme mit harzigen Verklebungen auf, die auch durch intensive Reinigung mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln nicht entfernt werden konnten. Der Start der Reaktionsversuche in Rostock zog sich daher bis fast zum Projektende hin. In ersten Vorversuchen zu Reduktionsreaktionen mit immobilisierter Alkoholdehydrogenase (ADH) fielen dann die Hochdruckventile durch Undichtheiten irreparabel aus. Die Ersatzlieferung dauerte wiederum so lange, dass keine Experimente in dieser Zelle mehr durchgeführt werden konnten.

Es sind stattdessen Anlagenteile aus Rostock für Umbauten an den Versuchsanlagen in Oberhausen (Pumpen, Probenahmeventile) zur Verfügung gestellt worden.

4.3 Phasengleichgewichtsapparatur

Da in der Anlage für die Reaktionsversuche in Oberhausen (siehe Abschnitt 4.1) nicht - wie im Antrag vorgesehen - auch Gleichgewichtsmessungen durchzuführen waren, wurde zusätzlich in Oberhausen eine Phasengleichgewichtsapparatur aufgebaut (Abb. 4.5).

Die Apparatur dient der Bestimmung von Hochdruckphasengleichgewichten in CO_2 -gelösten Substanzen (sowohl flüssig, als auch überkritisch). Es wurden sowohl Zweistoffsysteme als auch Mehrkomponenten-Systeme betrachtet. Im vorliegenden Falle die Systeme Ethanol/ CO_2 und Citronellol/ CO_2 für die Zweistoff-Systeme und das 5-Stoffmodellsystem Ethylacetat, Ethanol, Isoamylalkohol, Isoamylacetat und CO_2 . Das Zweistoff-System Ethanol/ CO_2 wurde deshalb gewählt, weil dafür gesicherte Literaturdaten vorliegen und somit bei der eigenen Vermessung des Systems die Güte der Anlage aufgezeigt werden kann. Die Ergebnisse dienen der Ergänzung

der an der Universität Köln in den Modellierungen ermittelten Phasengleichgewichtsdaten. Sie sind notwendig, um die Reaktionen gezielt unter überkritischen Bedingungen durchführen zu können.

Die Apparatur besteht aus einer Hochdrucksichtzelle (Fa. NWA – Analytics), welche mit einem hydraulischen Stempel ausgestattet ist. Damit ist es möglich, den Druck in der Zelle zu erhöhen, bzw. bei einem Druckabfall konstant zu halten, ohne neues CO_2 in das System pumpen zu müssen und bei kleinen Probevolumina das Gleichgewicht nicht zu stören. Die Flüssigphase wird durch eine HPLC-Pumpe (Fa. Kipp-Analytics) im Kreislauf gepumpt. Als Substratdosierpumpe fungiert ebenfalls eine HPLC-Pumpe (Fa. Milton Roy).

Zur Verdeutlichung der Funktion der Anlage zeigt die nachfolgende Abbildung 4.5 ein vereinfachtes R&I-Schema.

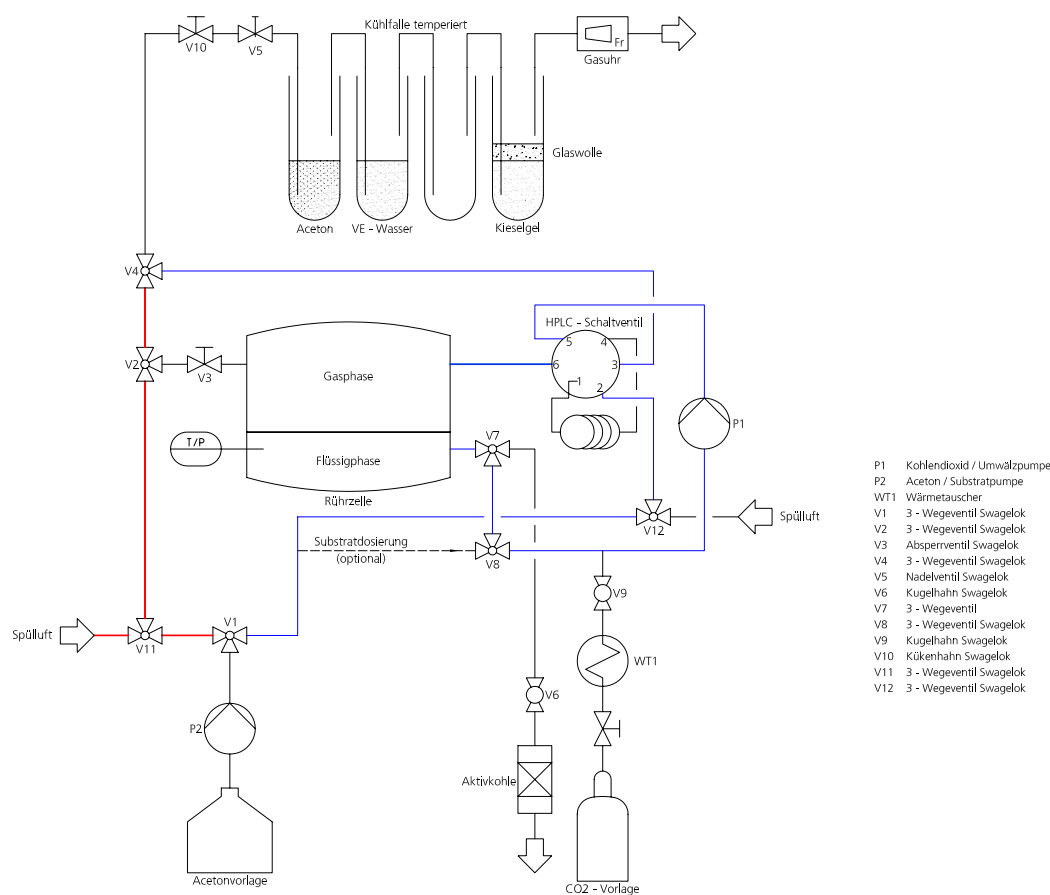


Abb. 4.5: Fließbild der Apparatur Variante 1

In ersten Experimenten ergaben sich einige Schwierigkeiten im Bereich der Flüssigprobenahme mittels des 6-Port-Ventils. Da sich herausstellte, dass das Ventil wegen Undichtheiten nicht brauchbar war, wurde es ausgebaut und die Probenahme durch die nachfolgende Variante 2 (Abb. 4.6) ersetzt. Dabei wurde auch die Anordnung der Kühlfallen geändert, so dass eine bessere Probenahme möglich wurde. Mit dieser Variante wurden die meisten Untersuchungen durchgeführt.

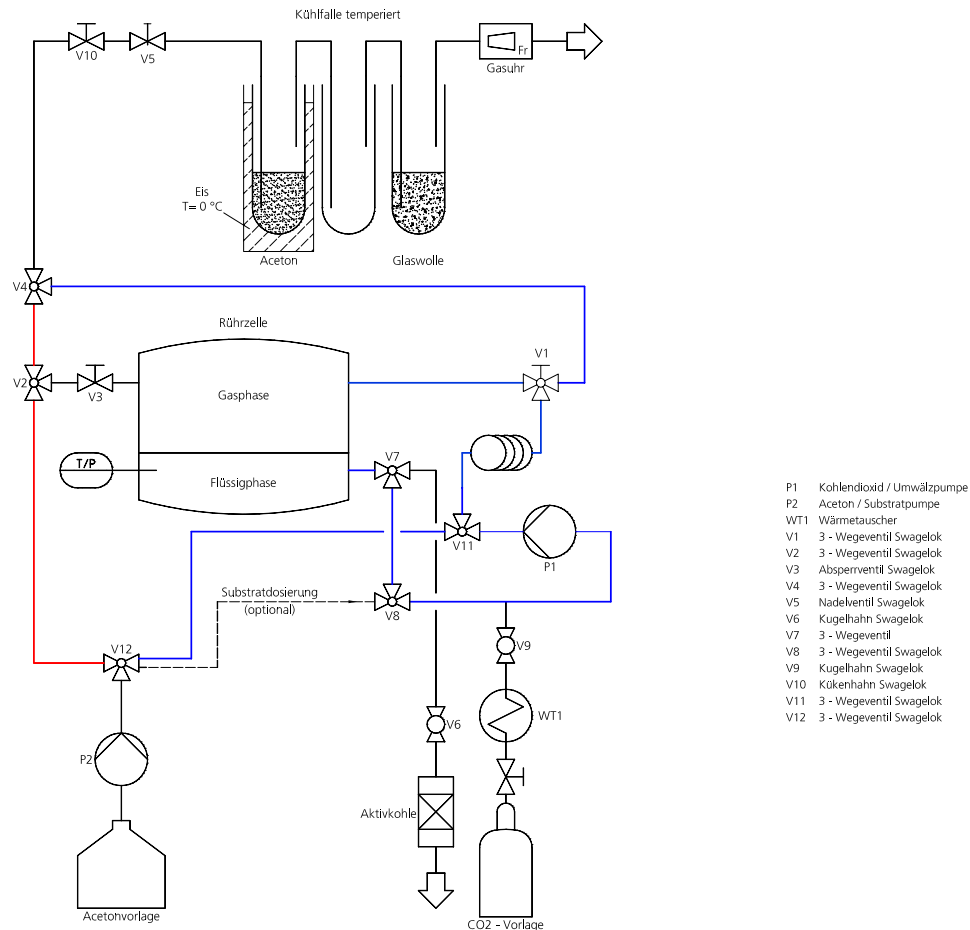


Abb. 4.6: Fließbild der Apparatur Variante 2

Das Foto in Abbildung 4.7 zeigt die Oberhausener Phasengleichgewichtsapparatur.



Abb. 4.7: Ansicht der Phasengleichgewichtsapparatur

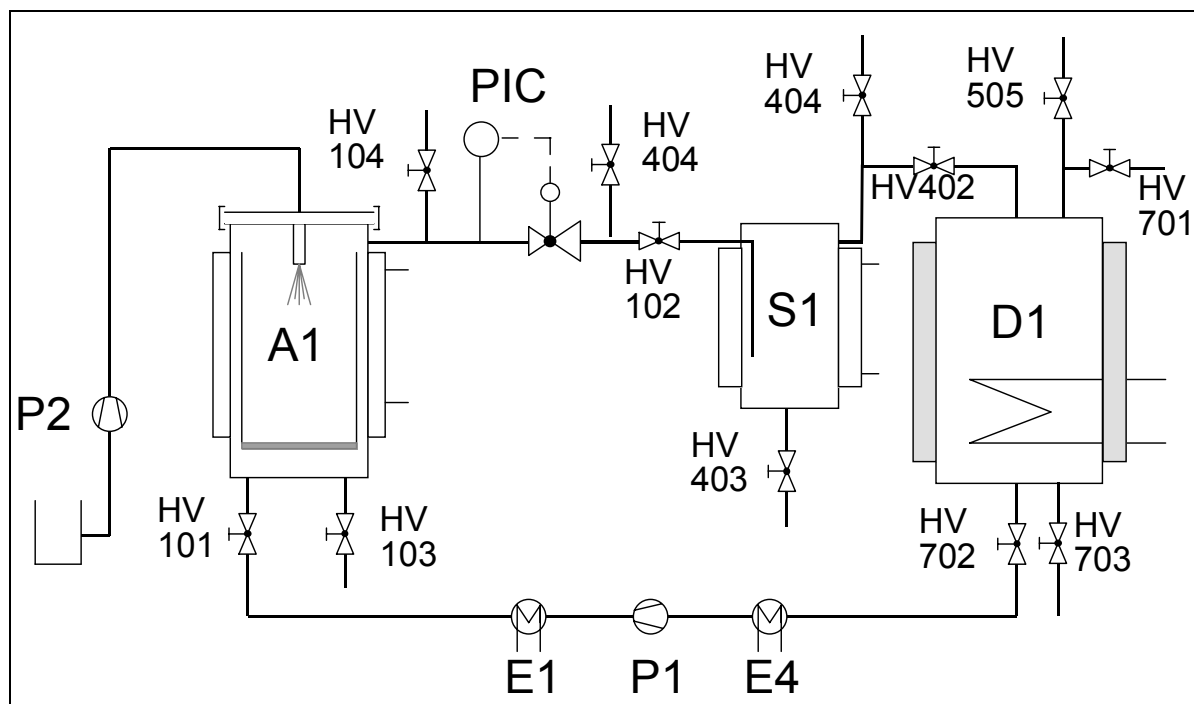
4.4 Technikumsanlage

Die bei Fraunhofer UMSICHT bereitstehende Technikumsanlage der Firma UHDE war für die abschließenden Versuche zur Maßstabsvergrößerung eingeplant. Die Versuchsanlage ist in Abb. 4.8 schematisch dargestellt. In der Anlage wird das CO₂ in flüssiger, komprimierter Form in einem Steigrohrflaschenbündel bereitgestellt. Es kann mittels einer festinstallierten pneumatisch betriebenen Pumpe in den zur Extraktionsanlage gehörenden Vorratstank gepumpt werden. Als Reaktor dient ein 6l-Edelstahlautoklav, in den mittels einer Hochdruckpumpe CO₂ entweder über den Deckel oder den Boden eingeleitet werden kann. Die Enzymschüttung wird in einem Einsatzkorb vorgelegt, Flüssigkeiten können über eine Düse am Kopf des Reaktors eingegeben werden. Temperatur und Druck im Autoklaven werden kontinuierlich erfasst und kontrolliert. Die Reaktionsprodukte werden in einem 4l-Abscheidebehälter vom CO₂ abgetrennt.

Der Druck und die Temperatur des Extraktionsmittels in den verschiedenen Anlagenteilen werden durch ein Schaltpult zentral geregelt und überwacht.

Der Reaktor und der Abscheider sind mit Klammerverschlüssen versehen, die sich nur im drucklosen Zustand öffnen lassen. Zum Heben der Deckel ist eine pneumatische Hebeeinrichtung beweglich über den Extraktor und der Abscheider angebracht.

Die Anlage ist TÜV geprüft und besitzt dementsprechende Sicherheitseinrichtungen.



A1	Kristallisator / Extraktor
P1, P2	Hochdruckpumpen
S1	Abscheider
D1	CO ₂ -Behälter
PIC	Druckregelventil
HV i	Handventile

Abb. 4.8: UHDE Hochdruckanlage im Technikumsmaßstab bei Fraunhofer UMSICHT

Da die Anlage ursprünglich keinen mit der kleinen Reaktionsanlage vergleichbaren statischen Mischer besitzt, wurde der nachfolgende Aufbau gewählt um eine Vermischung von Substrat und Kohlendioxid vor der Reaktion mit dem immobilisierten Enzym zu ermöglichen (Abb. 4.9).

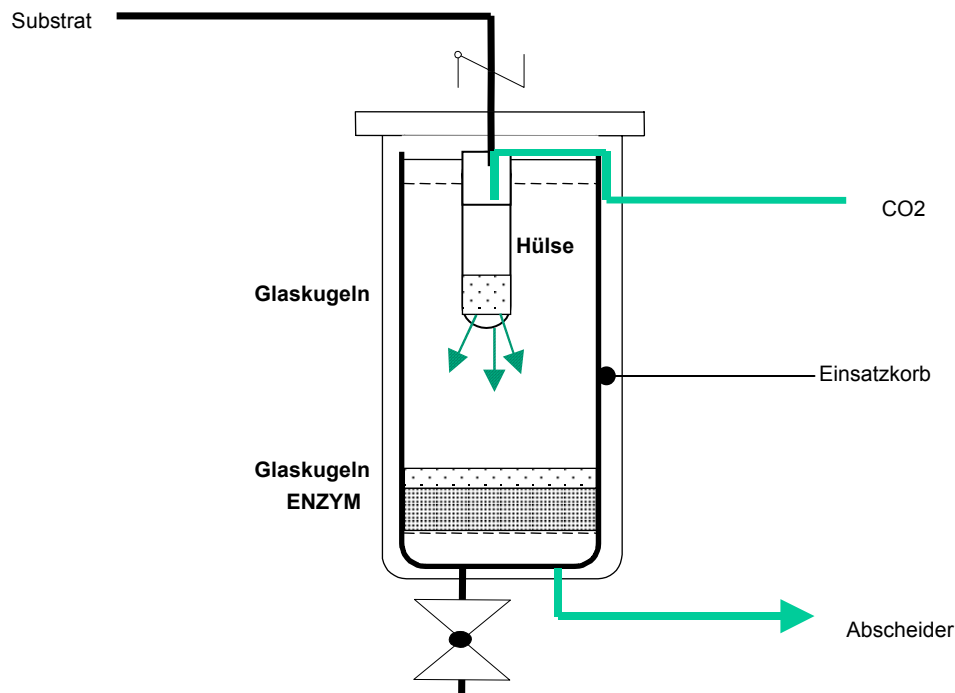


Abb. 4.9: Geplante Versuchsanordnung im Reaktor der Technikumsanlage

Dabei wird das Kohlendioxid am Kopf des Behälters zugeführt und muss den Weg durch den Zwischenraum von Behälterinnenwand und Einsatzkorb und durch die Hülse nehmen, um am Boden des Behälters durch eine Rohrleitung in den Abscheider zu gelangen. Die Füllung der Hülse mit Glaskugeln soll die Vermischung mit dem ebenfalls am Kopf zugeführten Substrat ermöglichen. Nach der erfolgten Reaktion können die Produkte am Boden des Abscheiders S1 entnommen werden.

5 Ergebnisse

5.1 Enzymauswahl und Immobilisierungsformen

Um- und Veresterung

Bei der Wahl geeigneter Lipasen für die Um- und Veresterung waren folgende Kriterien von Bedeutung:

- gute kommerzielle Verfügbarkeit
- Enzymquellen (Organismen)
- Trägermaterialien der Immobilisate
- Immobilisierungsverfahren (z.B. kovalent, adsorptiv)
- Anfangsreaktionsgeschwindigkeit v_0 [mmol/(h*g)]

Tabelle 5.1 zeigt die untersuchten Lipasen und deren Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in einer Umesterung in Hexan als Lösemittel als Beispielreaktion. Dabei fällt auf, dass Chirazym L-2, C3 und die Lipase Novozym 435 die höchsten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten ausweisen.

Für die Experimente in überkritischem CO_2 wurde zunächst Novozym 435 gewählt, da dieses Enzym auf den Trägerpartikeln gebunden ist und die Trägerpartikel größer sind. Beide Eigenschaften sind vorteilhaft für den Einsatz in Festbettreaktoren in überkritischem CO_2 .

Weiterhin ist die Lipase PS-C "Amano II" von Interesse, da es sich hierbei um einen keramischen Träger handelt, der sich für die Untersuchungen im überkritischem CO_2 als recht robust herausstellen kann. Hier ist zwar die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit v_0 gering, allerdings beziehen sich diese Werte auf die Masse [g] des Trägermaterials, wobei der keramische Träger ein höheres Gewicht aufweist als der Acrylharz des Novozym 435. Der Vergleich dieser zwei Enzyme ist zudem von Interesse, da es sich um Lipasen aus zwei verschiedenen Organismen handelt, so dass diese in den untersuchten Reaktionen sehr unterschiedliche Eigenschaften zeigen können (z.B. Substrat- und Produktinhibierungen).

Die kommerzielle Verfügbarkeit ist bei beiden Lipasen gegeben, wobei die Lipase PS-C "Amano II" laut Herstellerangabe auch für lebensmitteltechnische Anwendungen geeignet ist.

Tabelle 5.1: Kommerzielle erhältliche Lipasen

Bezeichnung und Hersteller	Enzymquelle	Immobilisierung Trägerdurchmesser	v_0 [mmol/(h*g)] in n-Hexan* (bezogen auf g Immobilisat)
Chirazyme L-2, C3, Iyo Roche Diagnostics	<i>Candida antarctica</i> , type B	non-covalent Ø 0.1mm	112
Chirazyme L-2, C2, Iyo Roche Diagnostics	<i>Candida antarctica</i> , type B		5,6
Chirazyme L-9, c-f, Iyo Roche Diagnostics	<i>Mucor miehei</i>		3,7
Chirazyme L-9, C2, Iyo Roche Diagnostics	<i>Mucor miehei</i>	adsorption Ø > 0.1mm	4,5
Novozym 435 Novo Nordisk	<i>Candida antarctica</i>	macroporous acrylic resin Ø 0.3 – 0.9mm	68
Lipozyme IL IM Novo Nordisk	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Ø 0.3 – 1.0mm	1,5
Lipase PS-C "Amano II" Amano	<i>Pseudomonas cepacia</i>	modified ceramic particles Ø 0.2mm	2,0
Lipase Fluka 62279	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Sol-Gel-AK	-

* Reaktionsbedingungen:

100mM Isoamylalkohol, 250mM Ethylacetat in n-Hexan

a_w 0.33 (Einstellung der Wasseraktivität für die Substratlösung und für die Enzympräparation über gesättigter $MgCl_2$ -Lösung)

25°C (im Thermoschüttler)

Probenvorbereitung: 1:100 in Ethylacetat

GC-Messungen: Säule DB 1701; 40°C (1min), 200°C/20°C-1min, 250°C/30°C-5min; Injektor: 180°C, Detektor: FID,

Trägergas: 2ml/min He

REM-Untersuchungen von Novozym 435 und Lipase PS-C "Amano II"

Um einen genaueren Einblick in die Trägeroberfläche und deren Porengröße zu bekommen, wurden in Rostock REM-Aufnahmen angefertigt.

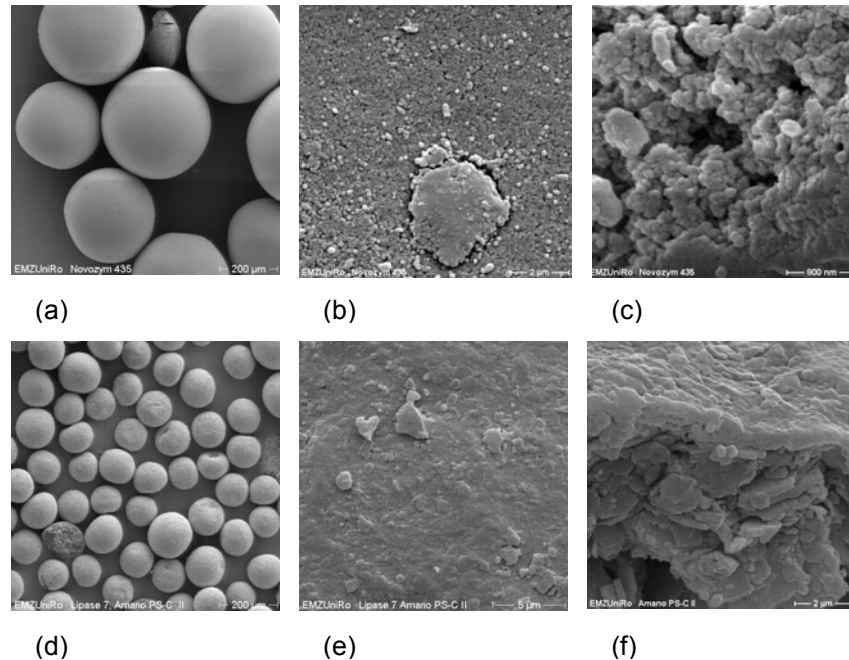


Abb. 5.2: REM-Aufnahmen der Trägeroberfläche von Novozym 435 (macroporous acrylic resin) und Lipase PS-C "Amano II" (modified ceramic particles)
(a,b,c) Novozym 435, dabei zeigt (c) den Blick von der Kugeloberfläche (rechts unten) an einer Bruchkante entlang in das Innere des Trägers
(d,e,f) Lipase PS-C "Amano II", dabei zeigt (f) den Blick auf die Bruchkante des Trägers, wobei die Kugeloberfläche oben im Bild zu sehen ist

Die Frage war, ob sich die Lipase innerhalb von großen Poren befindet, so dass mit internen Stofftransportlimitierungen zu rechnen ist. Dabei zeigt sich, dass Novozym 435 durchaus eine poröse Oberfläche besitzt (Abb. 5.2 b+c). Allerdings wird aus den REM-Aufnahmen nicht deutlich, ob die Poren von der Oberfläche bis in das Innere des Trägers reichen und sich damit immobilisiertes Enzym im Innern des Trägers befinden kann.

Im Fall der Lipase PS-C "Amano II" handelt es sich um eine unebene, aber dennoch geschlossene Trägeroberfläche, die keine Poren aufweist (Abb. 5.2 e+f). Hier ist demnach nicht mit internen Stofftransportlimitierungen zu rechnen, da das Enzym nur auf der äußeren Oberfläche des Trägers immobilisiert sein kann.

Zusätzlich wurden für Novozym 435 REM-EDX-Messungen (Energiedispersive Röntgenanalyse) angefertigt, die die Möglichkeit bieten, auf Oberflächen nach definierten chemischen Elementen zu suchen. Als charakteristisches Element zur Enzymidentifizierung wurde Schwefel gewählt, da sich dieser in einigen Aminosäuren des Proteins befindet, aber nicht im Trägermaterial vermutet wird. Auf der Partikeloberfläche konnte ein eindeutiger Peak für Schwefel ausgemacht werden. Eine EDX-Messung an der Bruchkante unterhalb der Trägeroberfläche zeigte ebenfalls geringe Mengen von Schwefel, was auf eine Enzymbeschichtung der inneren Poren hinweisen könnte. Leider war eine Quantifizierung des Enzyms nicht möglich (Methode zu ungenau). Zudem konnte nicht geklärt werden, ob die untersuchte Bruchkante des Trägers vor oder nach der Enzym-Immobilisierung entstanden ist.

Quecksilber-Pososimetrie

Zur Analyse der Meso- und Makroporenstruktur der Trägermaterialien wurde bei Fraunhofer UMSICHT für beide Enzympräparate Quecksilber-Pososimetrie nach DIN 66133 durchgeführt. Das Verfahren beruht auf Hg-Intrusion in die offenen Poren durch Druckaufbau und der Umrechnung des angelegten Druckes in den Porenradius mit Hilfe der Washburn-Gleichung. Exemplarisch wird in Abbildung 5.3 das Ergebniss von Novozym 235 grafisch dargestellt.

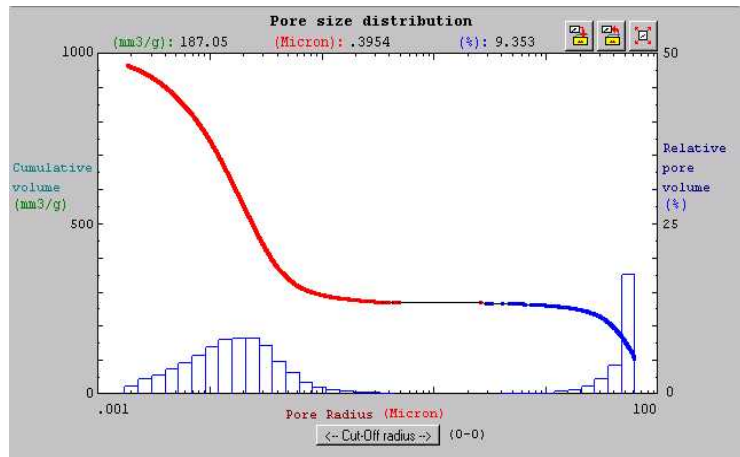


Abb. 5.3: Porenradienverteilung von Novozym 435

Für die Makroporen ergibt sich laut Porosimetrie eine spezifische Oberfläche von $10 \text{ m}^2/\text{g}$ und für die Mesoporen $130 \text{ m}^2/\text{g}$. Die Ergebnisse für den Träger auf Keramikbasis ergeben eine vollkommen andere Verteilung: Die Makroporen summieren sich zu einer spezifischen Oberfläche von $3 \text{ m}^2/\text{g}$ und die Mesoporen auf $3,5 \text{ m}^2/\text{g}$.

Um auch die Mikroporenverteilung zu erfassen, wurde weiterhin eine Porenanalyse mittels BET-Verfahren nach DIN 66131 durchgeführt. Dazu wird die physisorbierte Gasmenge (hier Stickstoff bei 77 K) mit Hilfe der Gleichung nach Brunauer, Emmett und Teller in die spezifische Mikroporenoberfläche umgerechnet. Für Novozym 435 ergibt sich ein Wert von $100 \text{ m}^2/\text{g}$ und für Amano II $2 \text{ m}^2/\text{g}$.

Sowohl die adsorptive als auch die intrusive Porenanalyse bestätigen die Ergebnisse aus den REM-Untersuchungen und ermöglichen eine Charakterisierung der Poren. Bei dem auf Acrylharz basierenden Träger wird eine bedeutende Porosität festgestellt. Bei den in der Hg-Pososimetrie scheinbar detektierten Makroporen (Abb. 3) handelt es sich allerdings um Zwickel zwischen den Partikeln. Für die Mesoporen können die mittels Hg-Pososimetrie ermittelten Werte jedoch anhand der REM-Aufnahmen validiert werden. Ebenso wird die Mikroporenverteilung als korrekt angenommen. Bei dem Keramikträger werden für die relevanten Meso- und Mikroporen um den Faktor 40 bzw. 50 kleinere Oberflächen gefunden. Als Schlussfolgerung ist der Träger von Amano II als das vorteilhaftere Material hinsichtlich möglicher Stofftransportlimitierungen anzusehen. Im Gegensatz hierzu ist jedoch die größere nutzbare (innere) Oberfläche des Novozym-Trägers zu nennen, die ein günstigeres Massenverhältnis Enzym/Trägermaterial zuließe. Eine Quantifizierung und Lokalisierung des Enzyms war jedoch auch mit o.g. REM-EDX-Analyse nicht möglich.

Synthese von Octanol

Auch für diese Reaktion wurden die zur Verfügung stehenden Lipasen auf ihre Aktivität gegenüber (R,S)-2-Octanol getestet. Bei der Auswahl ist die Selektivität der Lipase von größter Bedeutung. Daher wurde zunächst eine GC-Methode entwickelt, die in der Lage ist, die Enantiomere des Alkohols und des Esters zu trennen.¹ Eine Kalibriersubstanz für 2-Octylacetat wurde synthetisiert.²

Folgende Lipasen zeigten Aktivität gegenüber (R,S)-2-Octanol (Auswahl s. Tabelle 5.1):

Lipase 1: Chirazym L-2, C3, lyo; *Candida antarctica*, type B

Lipase 2: Chirazyme L-2, C2, lyo; *Candida antarctica*, type B

Lipase 5: Novozym 435; *Candida antarctica*

Lipase 7: Lipase PS-C „Amano II“; *Pseudomonas cepacia*

Mit optimierter Enzymmenge konnten die in Abb. 5.1 gezeigten Reaktionsverläufe für die Lipasen 1, 5 und 7 aufgenommen werden. Dabei wurde zugleich der Einfluss des Acyldonors untersucht, der einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat. Auf Grund der günstigen Gleichgewichtslage, sind die Umesterungen in Gegenwart von Vinylacetat (es entsteht Acetaldehyd, welcher aus dem Gleichgewicht entweicht) wesentlich schneller, als die Umesterungen in Gegenwart von Ethylacetat. Betrachtet man den Umsatz der Reaktion nach 60 min, so zeigt sich hier eine Verdopplung des Umsatzes im Fall von Lipase 1 und 5, obwohl nur ein Viertel der Enzymmenge eingesetzt wird (Ethylacetat: 10 mg; Vinylacetat: 2,5 mg Lipase). Im Fall der Lipase 7 erfolgt eine Umsatzsteigerung um das 10-fache, wobei auch hier die Enzymmenge verringert wurde (Ethylacetat: 100 mg; Vinylacetat: 20 mg).

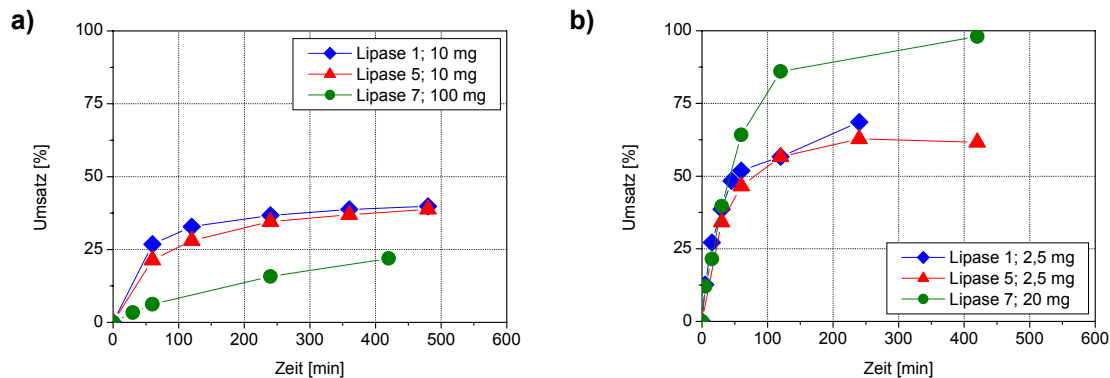


Abb. 5.1: Kinetische Racematspaltung des (R,S)-2-Octanol mit Ethylacetat (a) und Vinylacetat (b).

Lipase 1: Chirazym L-2, C3, lyo; *Candida antarctica*, type B

Lipase 5: Novozym 435; *Candida antarctica*

Lipase 7: Lipase PS-C „Amano II“; *Pseudomonas cepacia*

100 mM (R,S)-2-Octanol, 250 mM Acyldonor in n-Hexan; 30°C; a_w 0,33; 400 rpm

¹ GC mit Cyclodex-beta-I/P-Kapillarsäule: 50°C, 1 min halten; 110 ° (1°C/min), 1 min halten; 3,0 ml/min Helium

² Vorschrift: H. Becker (1996) Organikum; 20. Auflage, Johann Ambrosius Barth

Betrachtet man jedoch ausschließlich den Umsatz, so kann noch keine konkrete Aussage über die Selektivität der Lipasen gemacht werden. Generell gilt für kinetische Racematspaltungen, dass bei Umsätzen > 50 % beide Enantiomere des Alkohols zum Ester umgesetzt werden. Dies tritt bei allen untersuchten Lipasen ein, wenn Vinylacetat als Acyldonor genutzt wird (Abb. 5.5 b).

Aus den Chromatogrammen, die mit der Cyclodex-beta-IP-Kapillarsäule gemessen wurden, wird allerdings deutlich, dass die Lipase 7 über den gesamten Reaktionszeitraum nicht zwischen (*R*)- und (*S*)-2-Octanol unterscheidet. Sie besitzt somit keine genügende Selektivität für die gewünschte Racematspaltung.

Anhand dieser Versuche stellt sich Novozym 435 als geeignetes Enzym für die kinetische Racematspaltung von (*R,S*)-2-Octanol heraus. Die Racematspaltung erfolgt höchst selektiv (ee > 99 %) und verlangsamt sich nach dem Überschreiten von 50 % Umsatz. Wird hier die Reaktion bei einem Umsatz von 50 % abgebrochen, werden sowohl (*S*)-2-Octanol als auch (*R*)-2-Octylacetat mit hohem Enantiomerenüberschuss erhalten.

5.2 Reaktionen

Die im Projektverlauf durchgeführten Untersuchungen zu den Reaktionen sind unterteilt in Voruntersuchungen und Reaktionen unter Hochdruckbedingungen. Die Voruntersuchungen dienen der Feststellung möglicher Substrat- und Produktinhibierungen im Vorfeld der Hochdruckreaktionen. Die Reaktionen in unterschiedlichen Lösungsmitteln sollen eine Einordnung der unter CO₂ erzielten Ergebnisse ermöglichen.

5.2.1 Voruntersuchungen

Untersuchungen zur Um- und Veresterung

Bei der Untersuchung der Um- und Veresterung wurde Wert auf folgende Punkte gelegt:

- Vergleich der Enzymaktivität in unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln
- Substrat- und Produktinhibierung im Fall von Novozym 435
- Stofftransportlimitierungen im Fall von Novozym 435

Dabei sollten Referenzdaten in organischen Lösungsmitteln generiert werden, die dann später als Vergleich für die Reaktion in überkritischem CO₂ dienen können.

Synthese von Isoamylacetat

Vergleich der Enzymaktivität in unterschiedlichen Lösungsmitteln

Abbildung 5.4 zeigt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten v_0 der Umesterung in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und der Temperatur. Dabei wurde die Lipase Novozym 435 genutzt.

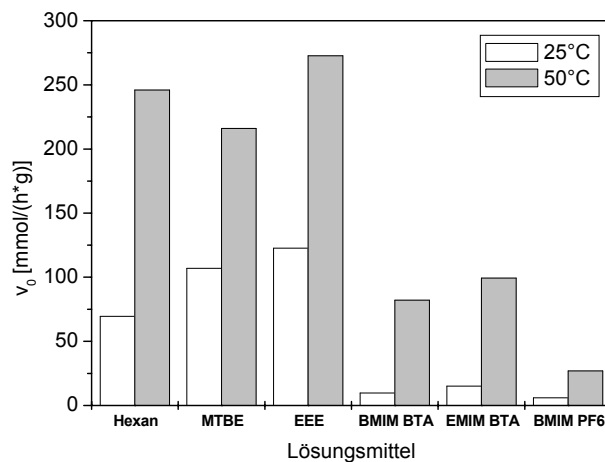


Abb.5.4: Novozym 435-katalysierte Umesterung zum Isoamylacetat in unterschiedlichen Lösungsmitteln; 100mM Isoamylalkohol, 250mM Ethylacetat, 5mg Novozym 435, a_w 0.33, 25°C und 50°C
 MTBE: Methyl-tert-butylether, EEE: Essigsäureethylester;
 ionische Flüssigkeiten:
 BMIM BTA = 1-Butyl-3-methylimidazolium-bis[(trifluoromethyl)sulfonylamid]
 EMIM BTA = 1-Ethyl-3-methylimidazolium-bis[(trifluoromethyl)sulfonylamid]
 BMIM PF6 = 1-Butyl-3-methylimidazolium-hexafluorophosphat

Als Lösungsmittel wurden verschiedene organische Lösungsmittel und einige ionische Flüssigkeiten getestet, da diese wie CO_2 als "green solvents" bezeichnet werden. Deutlich wird, dass die untersuchte Lipase bei 50 °C eine höhere Anfangsreaktionsgeschwindigkeit aufweist als bei 25 °C, da sich in diesem Bereich ihr Temperaturoptimum befindet (Herstellerangabe). In den organischen Lösungsmitteln zeigt das Enzym generell höhere Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten als in den ionischen Flüssigkeiten, organische Lösungsmittel lassen sich jedoch bei hohen Temperaturen aufgrund ihres hohen Dampfdruckes nur schwer verwenden. Als Referenzlösungsmittel wurde zunächst n-Hexan gewählt, da dieses in der Enzymkatalyse allgemein gerne als "neutrales" Lösungsmittel verwendet wird.

Substrat- und Produktinhibierung im Fall von Novozym 435

In Reaktionsansätzen, denen gezielte Mengen an Substrat und Produkt zugesetzt wurden, zeigte sich, dass Novozym 435 in n-Hexan durch folgende Substanzen inhibiert wird:

Isoamylalkohol
 Isoamylacetat
 Ethanol

Ethylacetat hat keine inhibierende Wirkung, hier zeigt sich mit zunehmender Ethylacetat-Konzentration ein stetiger Anstieg der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit. Für eine Reaktorauslegung würden diese Ergebnisse bedeuten, dass das Substrat Isoamylalkohol langsam

zudosiert werden muss, während die Produkte Isoamylacetat und Ethanol stetig aus dem Reaktor entfernt werden. Eine genaue quantitative Untersuchung sowie die Untersuchung des Enzyms Lipase PS-C "Amano II" wurde zurückgestellt, da für die Untersuchungen in überkritischem CO_2 nur Novozym 435 eingesetzt wurde. Von besonderem Interesse ist die Frage, ob durch den Übergang zu überkritischem CO_2 eine Änderung der enzymatischen Daten zu beobachten sein wird. Die später beschriebenen Untersuchungen und Modellierungen zum Gesamtsystem zeigen, dass dann die in Hexan aufgetretenen Inhibierungen keine Rolle mehr spielen bzw. in dem benutzten vereinfachten kinetischen Modell aufgehen, ohne die Anpassung wesentlich zu verschlechtern.

Stofftransportlimitierung im Fall von Novozym 435

Um das Trägermaterial genauer zu charakterisieren, wurde untersucht, ob bei der Umesterung Stofftransportlimitierungen am Träger eine Rolle spielen. Dazu wurden die Träger des immobilisierten Novozym 435 in 4 Größenfraktionen gesiebt und deren Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei äquimolaren Substratmengen ermittelt. Abbildung 5.5 zeigt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit vom Trägerdurchmesser und die Proteinbeladung in Abhängigkeit von der Trägergröße.

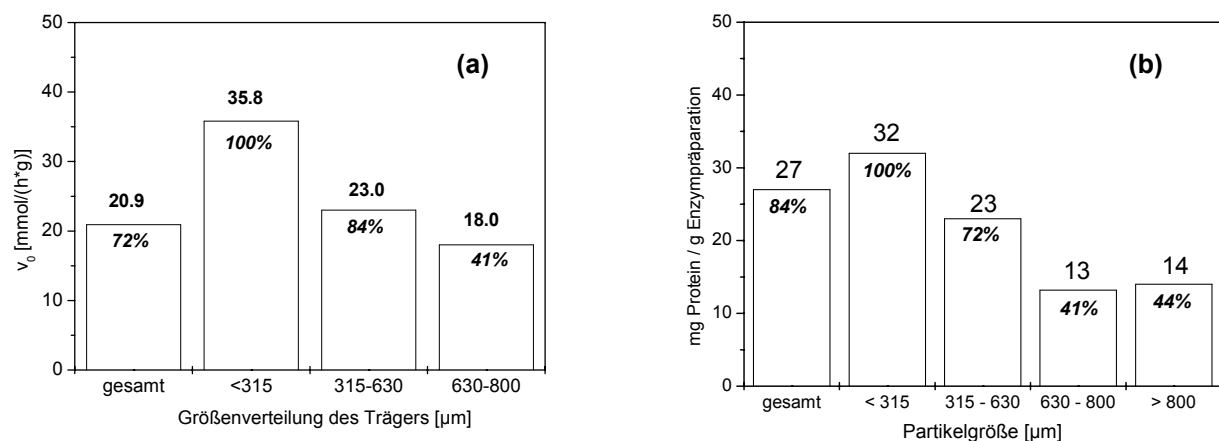


Abb. 5.5: (a) Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Trägergröße; 100mM Isoamylalkohol, 100mM Ethylacetat, 5mg Novozym 435, a_w 0.33, 25°C
(b) Proteinbeladung pro g Träger in Abhängigkeit von der Trägergröße; BCA-Assay

Die abnehmende Anfangsreaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Trägergröße korreliert in hohem Maße mit der Proteinbeladung der einzelnen Fraktionen (ermittelt über BCA-Assay). Eine Stofftransportlimitierung wird daher für die Reaktion in organischem Lösemittel ausgeschlossen. Da das überkritische CO_2 über deutlich höhere Diffusionskoeffizienten als das bei den Tests verwendete Hexan verfügt, kann daraus geschlossen werden, dass darin ebenfalls keine Stofftransportlimitierung auftritt.

Synthese von Octanol

Kinetische Racematspaltung von (R,S)-2-Octanol

Bei der lipase-katalysierte kinetischen Racematspaltung von (R,S)-2-Octanol untersucht. Hier spielt zusätzlich zur Aktivität des Enzyms gegenüber dem Substrat die Selektivität der Lipase eine Rolle. Abb. 5.6 a zeigt das Reaktionsschema der kinetischen Racematspaltung. Aus der Literatur und eigenen Experimenten ist bekannt, dass Lipasen die Umesterung des (R)-Alkohols

bevorzugen, so dass in der untersuchten Reaktion (*R*)-2-Octylacetat gebildet wird. In Abb. 5.6 b sind die Enantiomere des Ausgangsstoffes und des Esters gezeigt. 2-Octanol und 2-Octylacetat gehören wie das bisher untersuchte Isoamylacetat zu Aromastoffen und kommen hauptsächlich in Champignondüften vor. Die reinen Enantiomere des 2-Octanol sind chirale Ausgangsstoffe für weiterführende Synthesen.

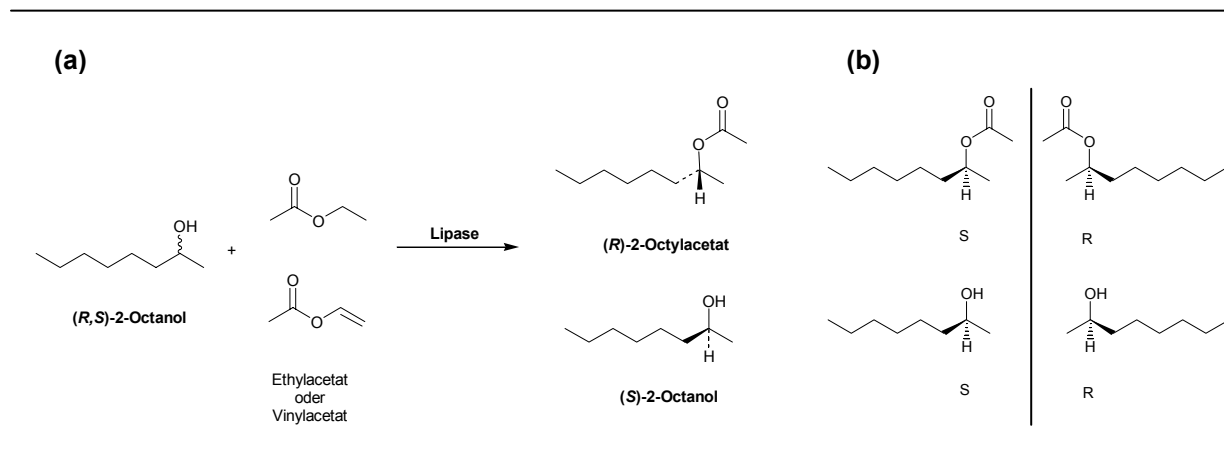


Abb. 5.6: (a) Lipase-katalysierte Racematspaltung von (*R,S*)-2-Octanol
(b) Enantiomere des 2-Octanol und des 2-Octylacetats

Reduktion von 2-Octanon zu (*R*)-2-Octanol

Da die kinetische Racematspaltung maximal zu 50 % Umsatz führt und als Hauptprodukt (*S*)-2-Octanol entsteht, ist es interessant, die Alkoholdehydrogenase-katalysierte Reduktion von 2-Octanon zu untersuchen. Genutzt wird dazu eine Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH; **Jülich Fine Chemicals**), welche 2-Octanon zu (*R*)-2-Octanol reduziert, wobei der Cofaktor NADPH verbraucht wird. Bisher gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die Reaktionen mit ADHs in überkritischem CO₂ beschreiben [MATS00, MATS03].

Alkoholdehydrogenasen werden seltener in rein organischen Medien genutzt, da sie wesentlich sensibler sind als die weit verbreiteten Lipasen. Erste Versuche zur Reduktion von 2-Octanon wurden im 2-Phasen-System aus Phosphatpuffer und Methyl-tert-butylether (MTBE) durchgeführt, wobei die ADH und der Cofaktor NADPH gelöst in der Pufferphase vorliegen und die organische Phase als Reservoir für das schlecht wasserlösliche 2-Octanon fungiert. Da NADPH sehr teuer ist und äquimolar zum umgesetzten Substrat verbraucht wird, ist die Cofaktor-Regenerierung von großer Bedeutung. Für den Reaktionsansatz im Rahmen dieses Projektes hat sich neben der enzym-gekoppelten Cofaktor-Regenerierung der substrat-gekoppelte Ansatz als sinnvoll herausgestellt, da hier kein weiteres Enzym benötigt wird. Abb. 5.7 a zeigt das Reaktionsschema der LB-ADH-katalysierten Reduktion von 2-Octanon mit substrat-gekoppelter Cofaktor-Regenerierung.

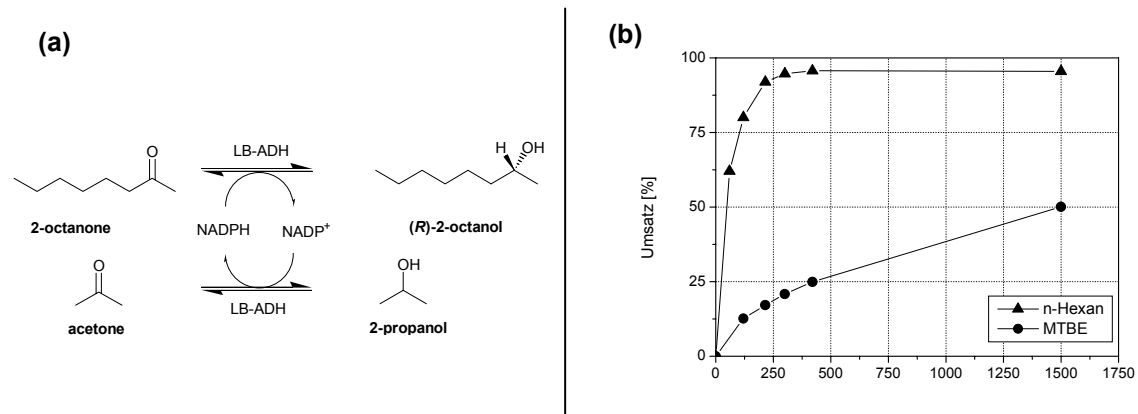


Abb. 5.7: Reduktion von 2-Octanon mit Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH); substratgekoppelte Cofaktor-Regenerierung

a) Reaktionsschema

b) Reaktionsverlauf der Reduktion von 2-Octanon mit immobilisierter LB-ADH

Immobilisierung auf Celite 560; 100 mg Immobilisat (4,5 mg LB-ADH), 2,5 ml

Substratlösung

(10 mM 2-Octanon, 2 M 2-Propanol), a_w 0,97; 30 °C, 400 rpm

Um die LB-ADH im rein organischen Medium und in SC-CO₂ nutzen zu können, ist es nötig, das Enzym zusammen mit dem Cofaktor zu immobilisieren. Als geeigneter Träger hat sich in diesem Fall Celite 560 erwiesen, worauf die ADH und NADPH adsorptiv gebunden werden können. Erste Versuche in n-Hexan zeigen sehr gute Aktivitäten der Alkoholdehydrogenase. Vergleicht man n-Hexan und MTBE als Lösungsmittel für die Reduktion, so ist die LB-ADH in n-Hexan wesentlich aktiver als in MTBE (Abb. 5.7 b).

Bei einer Nutzung der immobilisierten ADH in SC-CO₂ ist jedoch darauf zu achten, dass eine sehr hohe Wasseraktivität nötig ist ($a_w > 0,54$, [JÖNS98]). Bei Versuchen zur Cofaktorregenerierung mit weiteren Enzymsystemen, bei denen u. a. Säuren entstehen, zeigte es sich, dass die Ketonreduktion sehr schnell zum Stillstand kommt, wenn nicht der pH-Wert durch Titration konstant gehalten wird. Durch den erforderlichen hohen Wassergehalt auf dem Träger kommt es durch den hohen CO₂-Überschuß ebenfalls zu einem starken pH-Abfall, der auch nicht durch höherkonzentrierte Puffer abgefangen werden kann. Zusammen mit den aufgetretenen Problemen in der Rostocker Anlage für scCO₂ und die Belegung der Oberhausener Anlagen zu den Versuchen mit Lipase und den Gleichgewichtsmessungen konnten daher nur die Arbeiten der Reduktion im Zwei-Phasen System mit organischen Lösungsmitteln im Bewilligungszeitraum abgeschlossen werden. Allerdings wurden diese Arbeiten in enger Zusammenarbeit mit Jülich Fine-Chemicals, einer KMU aus dem Projektbegeleitenden Ausschuß durchgeführt, die die Ergebnisse direkt in die Praxis umsetzt.

5.2.2 Synthese von Isoamylacetat

Die Isoamylacetat-Synthese wurde unter Berücksichtigung verschiedener Parameter, die in Tabelle 5.2 aufgelistet sind, anhand von Umesterung und Veresterung in der kontinuierlich betriebenen Laboranlage untersucht.

Tab. 5.2: Im Rahmen des Projektes untersuchte Parameter bei der Synthese von Isoamylacetat in überkritischem Kohlendioxid

Parameter	Bereich	Erläuterung
T [°C]	40 – 60	
p [bar]	80 – 140	
MV [-]	1:1 – 10:1	Molverhältnis (MV) der Edukte Ethylacetat : Isoamylalkohol bzw. Isoamylalkohol : Essigsäure
m _E [g]	1,5 – 6	Enzymmenge (Immobilisat)
CO ₂ -Strom [l/min]	5 – 10	gemessen bei RT und 1 bar
Substratstrom [ml/min]	0,25 - 1	

Umesterung

Bei der Wahl des Molverhältnisses der Edukte galt der in den Vorversuchen ermittelte Wert von 2,5:1 als Richtwert. Bei dem Verhältnis von Kohlendioxid zu den Edukten wurde ein Wert von >95% für den CO₂-Anteil eingehalten, um zu gewährleisten, dass das Gemisch unter Prozessbedingungen überkritisch vorliegt. Stabilitätsuntersuchungen zu Beginn der Hochdruckversuche haben gezeigt, dass das Enzym über eine gute Langzeitstabilität verfügt. Um zu gewährleisten, dass die Versuchsergebnisse nicht durch einen schleichenden Aktivitätsverlust des Enzyms verfälscht werden, wurde das Immobilisat dennoch vorsorglich alle 4-5 Versuche ausgetauscht. In der Literatur finden sich ebenfalls Belege für eine hohe Langzeitstabilität von Novozym 435 unter Einfluss von überkritischem Kohlendioxid. Romero et al. haben eine Aktivitätsabnahme unter Hochdruck erst nach 30 Tagen festgestellt [ROME05].

Eine Auflistung der Versuchsparameter zu den Versuchen V1-V19 ist in Tabelle 5.3 gegeben. Die Diagramme 5.8-5.14 zeigen die für die Umesterung erzielten Versuchsergebnisse.

Tab. 5.3: Versuche V1 – V19 und zugehörige Versuchsparameter,
EAc: Ethylacetat, IOH: Isoamylalkohol, m_E : Enzymmenge

Nr.	P [bar]	T [°C]	m_E [g]	MV EAc:IOH	CO ₂ -Strom [l/min] bei 1 bar, RT	Substratstrom [ml/min]
V1	140	40	3	1:1	10	0,5
V2	140	40	3	2,5:1	10	0,5
V3	140	40	3	10:1	10	0,5
V4	140	40	3	2,5:1	5	0,25
V5	140	40	1,5	2,5:1	10	0,5
V6	140	40	6	2,5:1	10	0,5
V7	140	40	6	2,5:1	10	1
V8	140	50	3	2,5:1	10	0,5
V9	140	60	3	2,5:1	10	0,5
V10	140	70	3	2,5:1	10	0,5
V11	140	40	3	2,5:1	10	0,5
V12	110	40	3	2,5:1	10	0,5
V13	90	40	3	2,5:1	10	0,5
V14	80	40	3	2,5:1	10	0,5
V15	140	40	3	2,5:1	10	0,5
V16	140	40	3	2,5:1	10	0,5
V17	140	40	3	2,5:1	10	0,5
V18	140	40	3	2,5:1	10	0,5
V19	140	40	3	2,5:1	10	0,5

Deutlich erkennbar ist der Einfluss von Temperatur und Druck auf die erreichbaren Umsätze. Hierbei fällt auf, dass die Reaktion durch niedrige Temperaturen begünstigt wird (Abb. 5.8).

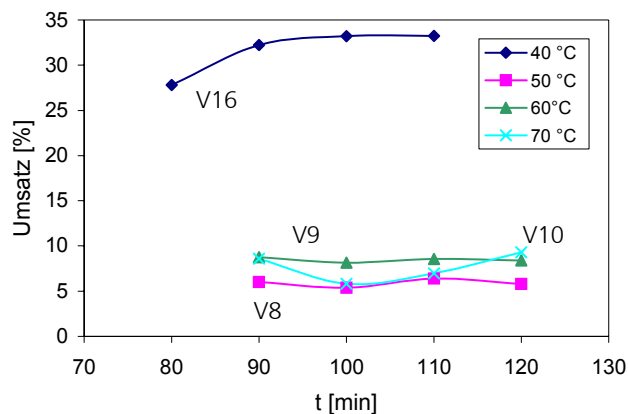


Abb. 5.8: Erzielte Umsätze bei verschiedenen Temperaturen,
Versuchsparameter: $p=140$ bar, 3 g Enzym, Molverhältnis
der Edukte 2,5:1, CO₂-Strom 10 l/min, Substratstrom 0,5 ml/min

Oberhalb von 40 °C kommt es zu einem Einbruch der Umsätze von über 30 % auf Werte unter 10 %. Eine Aktivitätsabnahme mit zunehmender Temperatur wurde für Novozym 435 bei der Isoamylacetatsynthese in überkritischem Kohlendioxid auch von Romero et al. [ROME05] festgestellt. Hier zeigen sich deutliche Unterschiede zum Einsatz von Enzymen in anderen nicht-wässrigen Systemen. Für die Reaktionen der hier verwendeten Lipase Novozym 435 in organischen Lösemitteln wird bis 60 °C i. A. ein Aktivitätsanstieg mit zunehmender Temperatur beschrieben [THUM04, GÜVE02]. Auch vom Hersteller wird eine maximale Aktivität bei hohen Temperaturen angegeben [NOVO00] angegeben. Wegen der Begrenzung der unteren Reaktionstemperatur auf 31 °C (T_{crit} von CO_2), wurde die Temperaturabhängigkeit nicht weiter untersucht, sondern in der Folge immer bei 40 °C gearbeitet.

Die Unterschiede im Umsatz bei den Versuchen bei 50, 60 und 70°C liegen im Rahmen der Messungenauigkeiten. Anhand der 40 °C-Kurve ist erkennbar, dass sich der stationäre Zustand im Reaktor etwa 90 min nach Versuchsbeginn einstellt.

Deutliche Effekte sind bei dem Reaktionssystem hingegen in Abhängigkeit vom Druck zu beobachten. Der Umsatz steigt mit zunehmendem Druck (Abb. 5.9). Ein Sprung von etwa 10 % auf Umsätze von über 20 % ist zwischen 90 und 110 bar zu beobachten. Anhand des Versuchs bei 110 bar wird das gelegentliche Auftreten von Ausreißern - vermutlich durch zufällige Fehler bei Probenahme und Analytik des Vierstoffgemischs verursacht - ersichtlich. Auch Effekte wie der Abwärtstrend im Umsatz bei dem 90 bar-Versuch wurden gelegentlich beobachtet, die sich mit hoher Wahrscheinlichkeit und trotz der durchgeführten Anlagenspülung auf das Vorhandensein von Restreaktanden aus Vorversuchen erklären lassen. Im Allgemeinen hat sich die Probenahme am Reaktorausgang (vgl. Kap. 4.1) jedoch als stabile und reproduzierbare Methode innerhalb eines Versuchs erwiesen. Der Vergleich der Diagramme 5.8 und 5.9 zeigt jedoch, dass es zwischen einzelnen Versuchsreihen auch bei gleichen Versuchsbedingungen u. U. zu leichten Abweichungen in den Ergebnissen kommen kann (Abb. 5.8, V16; Abb. 5.9, V11). Der Grund dafür liegt in geringfügigen Unterschieden in der Größenverteilung und Aktivität der eingesetzten Enzymchargen.

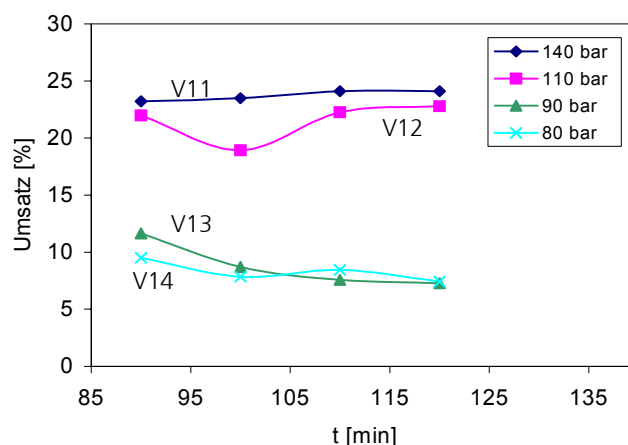


Abb. 5.9: Erzielte Umsätze bei verschiedenen Drücken,
Versuchsparameter: $T=40\text{ °C}$, 3 g Enzym, Molverhältnis
der Edukte 2,5:1, CO_2 -Strom 10 l/min, Substratstrom 0,5 ml/min

Erwartungsgemäß führt eine Vergrößerung der im Reaktor vorgelegten Enzymmenge zu Umsatzsteigerungen (Abb. 5.10). Während hierbei die Erhöhung von 1,5 auf 3 g Enzym noch in etwa zu einer Verdopplung des Umsatzes führt, erreicht man durch weitere Zugabe von Enzym nur noch geringere Umsatzsteigerungen. Auch in diesem Diagramm ist die Einstellung des stationären Zustands im Reaktor nach ca. 90 min wieder erkennbar.

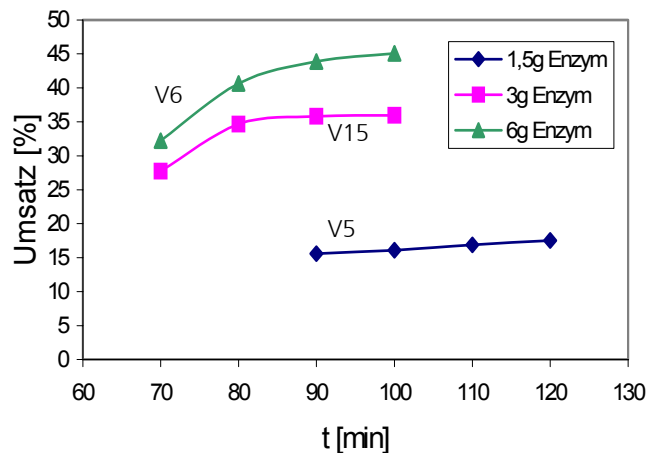


Abb. 5.10: Erzielte Umsätze bei unterschiedlichen Enzymmengen,
Versuchsparameter: $p=140$ bar, $T=40$ °C, Molverhältnis
der Edukte 2,5:1, CO_2 -Strom 10 l/min, Substratstrom 0,5 ml/min

Wird der Substratstrom bei einer Enzymmenge von 6 g auf 1 ml/min erhöht, wobei wegen des identischen CO_2 -Stroms die Verweilzeit nahezu dieselbe ist, so bleibt der Umsatz, unter Berücksichtigung der zwischen den Messreihen auftretenden Schwankungen, annähernd unverändert (Abb. 5.11). Dies zeigt, dass in dem hier betrachteten Konzentrationsbereich noch keine Stofftransportlimitierung auftritt.

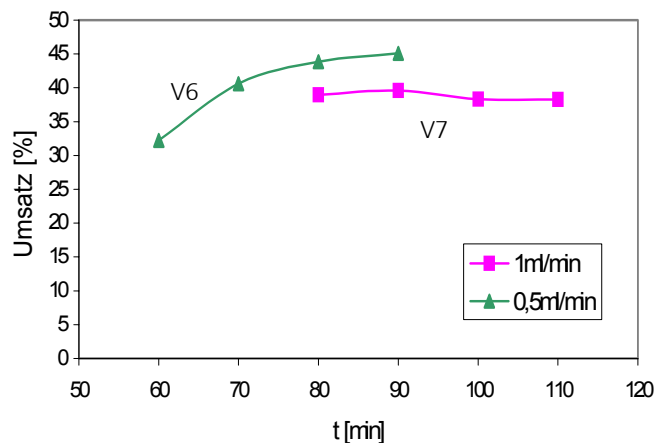


Abb. 5.11: Erzielte Umsätze bei unterschiedlichen Substratströmen,
Versuchsparameter: $p=140$ bar, $T=40$ °C, 6 g Enzym,
Molverhältnis der Edukte 2,5:1, CO_2 -Strom 10 l/min

Die Ergebnisse der Versuche mit unterschiedlichen CO_2 - und Substratströmen bei gleicher Enzymmenge (Abb. 5.12) stehen in Übereinstimmung zu den oben beschriebenen Versuchsergebnissen. Bei den beiden in Abbildung 5.12 dargestellten Versuchen wurde das Substrat/ CO_2 -Verhältnis konstant gehalten. Der halbierte Gesamtvolumenstrom bewirkt dabei eine Verdopplung der Verweilzeit. Hinsichtlich der Verweilzeit stimmen die Versuche V7 und V4 aus den Abbildungen 5.11 und 5.12 überein und in beiden Fällen werden etwa 40 % Umsatz erreicht. Der Versuch V16 aus Abbildung 5.12 zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Versuchen V15 aus Abbildung 5.10 und V2 aus Abbildung 5.13, der unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde.

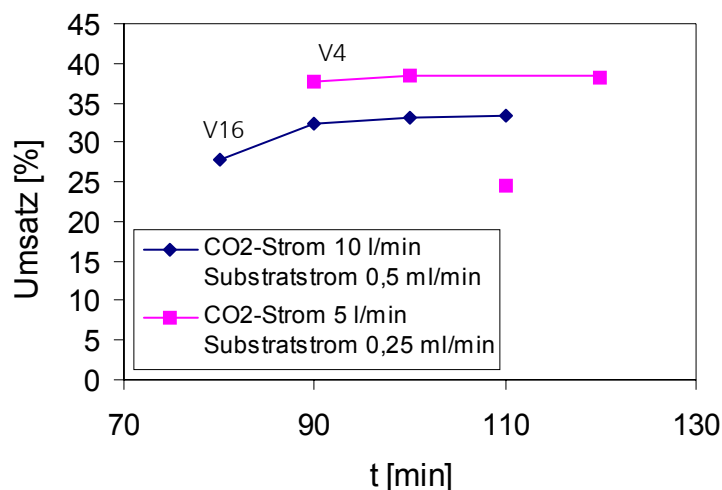


Abb. 5.12: Erzielte Umsätze bei unterschiedlichen CO₂- und Substratströmen, Versuchparameter: p=140 bar, T=40 °C, 3 g Enzym, Molverhältnis der Edukte 2,5:1

Deutlich ist der in Abbildung 5.13 dargestellte Einfluss des Molverhältnisses der Edukte zu erkennen. Mit zunehmendem Überschuss des Ethylacetats steigt der erzielbare Umsatz des Isoamylalkohols an. Die hieraus errechneten mittleren Reaktionsgeschwindigkeiten weisen ein Maximum bei dem Molverhältnis 2,5:1 auf (vgl. Abb. 5.25 in Kap. 5.4.1, V2).

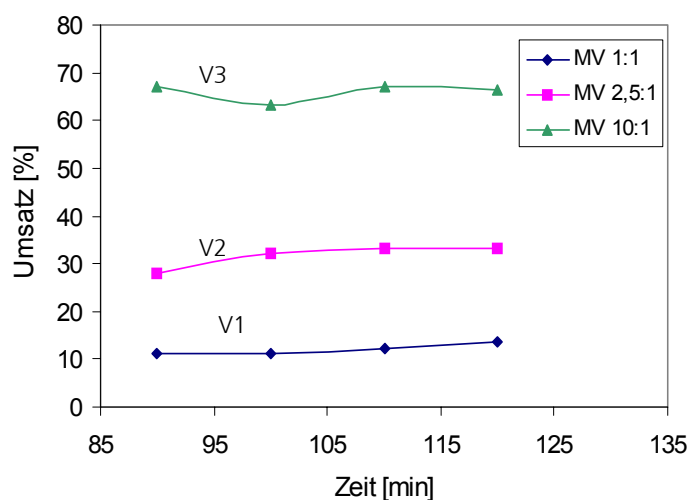


Abb. 5.13: Erzielte Umsätze bei unterschiedlichen Molverhältnissen der Edukte, Versuchparameter: p=140 bar, T=40 °C, 3 g Enzym, CO₂-Strom 10 l/min, Substratstrom 0,5 ml/min

Ein signifikanter Einfluss des Wasseranteils in der Substratlösung konnte nicht festgestellt werden. Die in Diagramm 5.14 auftretenden Abweichungen liegen unter Berücksichtigung der Fehler von Probenahme aus dem Reaktor und Analytik im Rahmen der Messungenauigkeiten. Wie bei der Temperaturabhängigkeit zeigt sich auch hier ein beachtenswerter Unterschied im Verhalten des Enzyms zwischen seinem Einsatz in überkritischem CO₂ und seinem Einsatz in organischen Lösemitteln, wo die Wasseraktivität eine wichtige Rolle spielt [GUBI93]

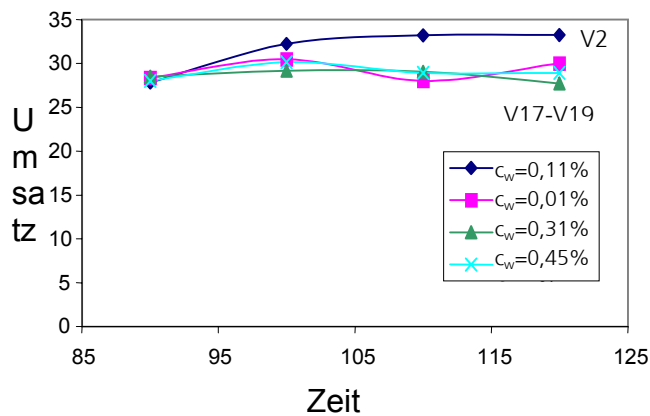


Abb. 5.14: Erzielte Umsätze bei verschiedenen Anfangswassergehalten, Versuchsp Parameter: $p=140$ bar, $T=40$ °C, 3 g Enzym, Molverhältnis der Edukte 2,5:1, CO_2 -Strom 10 l/min, Substratstrom 0,5 ml/min

Veresterung

In Tabelle 5.3 sind die zur Veresterung durchgeführten Versuche V20 – V29 mit den zugehörigen Versuchsp Parametern angegeben.

Tab. 5.3: Versuche V20 – V29 und zugehörige Versuchsp Parameter, IOH: Isoamylalkohol, ES: Essigsäure, m_E : Enzymmenge

Nr.	P [bar]	T [°C]	m_E [g]	MV EAc:IOH	CO_2 -Strom [l/min] bei 1 bar, RT	Substratstrom [ml/min]
V20	140	40	3	10:1	10	0,5
V21	140	40	3	2,5:1	10	0,5
V22	140	60	3	10:1	10	0,5
V23	140	60	3	2,5:1	10	0,5
V24	140	40	3	1:1	10	0,5
V25	140	40	3	10:1	10	0,5
V26	120	40	3	10:1	10	0,5
V27	100	40	3	10:1	10	0,5
V28	140	40	6	2,5:1	10	0,5
V29	140	40	1,5	2,5:1	10	0,5

Die lipasekatalysierte Veresterung in überkritischem Kohlendioxid zeigt hinsichtlich des Einflusses von den wesentlichen Versuchsp Parametern die gleichen Tendenzen wie die Umesterung. Abbildung 5.15 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Veresterung bei zwei verschiedenen Molverhältnissen. Zu beachten ist hier, dass im Falle der Umesterung mit Ethylacetat der Acyldonor die Überschusskomponente darstellt, während im Falle der Veresterung der Alkohol

im Überschuss und mit der Essigsäure der Acyldonor als Minderkomponente dosiert wird (Abb. 5.16). Für Ethylacetat konnte in Vorversuchen (vgl. Kap. 5.2.1) keine inhibierende Wirkung auf das Enzym nachgewiesen werden. Säuren stellen dagegen bekanntermaßen Inhibitoren für Lipasen dar. Der direkte Vergleich zwischen den Molverhältnis-Versuchen beider Reaktionen ist daher nur mit Einschränkungen möglich.

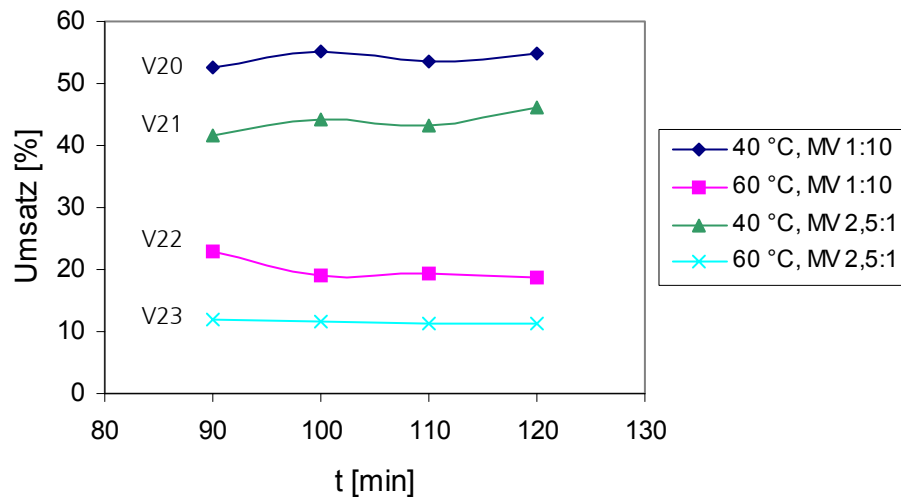


Abb. 5.15: Erzielte Umsätze bei verschiedenen Temperaturen und Molverhältnissen der Edukte, Versuchsparameter: $p=140$ bar, 3 g Enzym, CO_2 -Strom 10 l/min, Substratstrom 0,5 ml/min

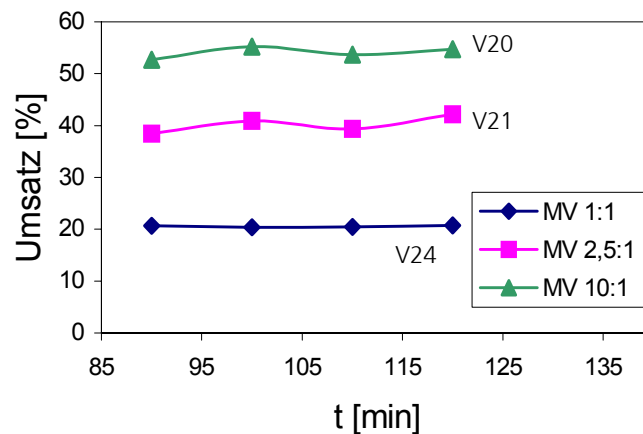


Abb. 5.16: Erzielte Umsätze bei verschiedenen Molverhältnissen der Edukte, Versuchsparameter: $T=40^\circ\text{C}$, $p=140$ bar, 3 g Enzym, CO_2 -Strom 10 l/min, Substratstrom 0,5 ml/min

Dennoch ist ersichtlich, dass sich tendenziell die gleichen Abhängigkeiten von den Betriebsparametern wie bei der Umesterung ergeben. Die Versuche zur Temperaturabhängigkeit zeigen, dass bei 60°C deutlich geringere Umsätze als bei 40°C erreicht werden. Der Versuch (60°C ; MV 2,5:1) ist bei einem Umsatz von ca. 10 % mit dem entsprechenden Versuch der Umesterung vergleichbar. Mit 55 % liegt der Umsatz bei der Veresterung bei 40°C und einem Molverhältnis von 10:1 jedoch etwas unterhalb des bei der Umesterung erzielten Umsatzes, bei einem Molverhältnis von 2,5:1 wurde dagegen ein höherer Umsatz festgestellt.

Ebenso wie bei der Umesterung nimmt der Umsatz auch bei der Veresterung mit dem Druck zu und auch hier wird eine deutliche, sprunghafte Steigerung beobachtet (Abb. 5.17). Zwischen 100 und 120 bar ist eine starke Umsatzsteigerung ersichtlich, während die weitere Zunahme zu höheren Drücken hin geringer ausfällt.

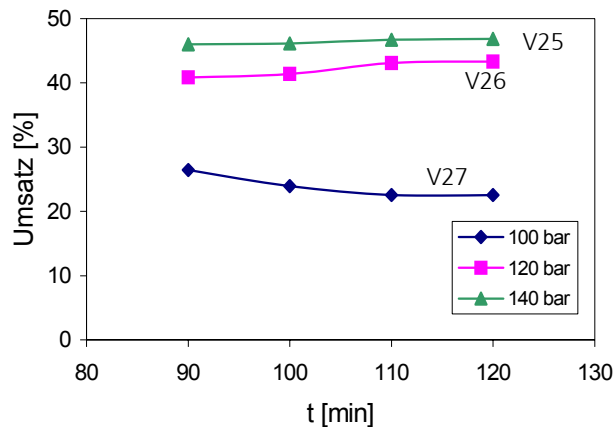


Abb. 5.17: Erzielte Umsätze bei verschiedenen Drücken,
Versuchsparameter: $T=40^{\circ}\text{C}$, $p=140$ bar, 3 g Enzym, Molverhältnis
der Edukte 10:1, CO_2 -Strom 10 l/min, Substratstrom 0,5 ml/min

Abbildung 5.18 zeigt die Abhängigkeit des Umsatzes von der Enzymmenge. Auch bei der Veresterung tritt eine Verdopplung des Umsatzes zwischen 1,5 und 3 g Enzym auf, während die Steigerung bei Einsatz von 6 g Enzym geringer ausfällt.

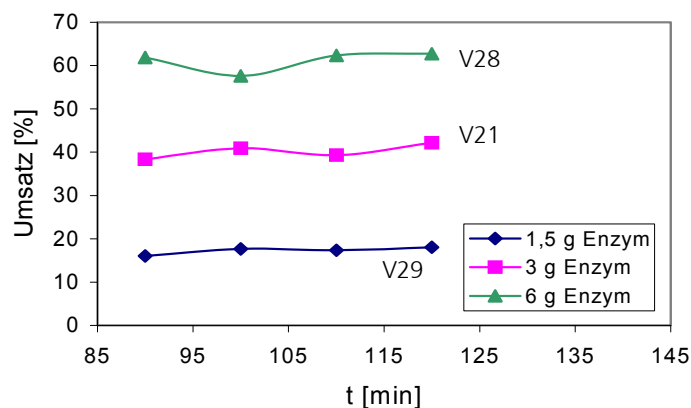


Abb. 5.18: Erzielte Umsätze bei verschiedenen Enzymmengen,
Versuchsparameter: $T=40^{\circ}\text{C}$, $p=140$ bar, Molverhältnis
der Edukte 2,5:1, CO_2 -Strom 10 l/min, Substratstrom 0,5 ml/min

5.2.3 Synthese von Citronellylacetat

Die Versuche zur Synthese von Citronellylacetat wurden bei den in Tabelle 5.4 aufgelisteten Parametern durchgeführt.

Tab. 5.4: Versuche C1 – C3 und zugehörige Versuchsparameter,
EAc: Ethylacetat, COH: Citronellol, m_E : Enzymmenge

Versuch	p [bar]	T [°C]	m_E [g]	MV EAc:COH	CO ₂ -Strom [l/min] bei 1 bar, RT	Substratstrom [ml/min]
C1	100	40	3	2,5:1	10	0,5
C2	100	60	3	2,5:1	10	0,5
C3	140	60	3	2,5:1	10	0,5

Anhand der Ergebnisse lassen sich für diese Reaktion keine nennenswerten Unterschiede im Umsatz feststellen. Es wurden jeweils Umsätze zwischen 20 und 25 % erreicht; weder Temperatur- noch Druckänderungen haben im untersuchten Bereich zu Veränderungen der Reaktionsgeschwindigkeit geführt (Abb. 5.19). Im Rahmen des Projektes konnten aus Zeitgründen keine weiterführenden Untersuchungen zu diesem Stoffsystem mehr durchgeführt werden.

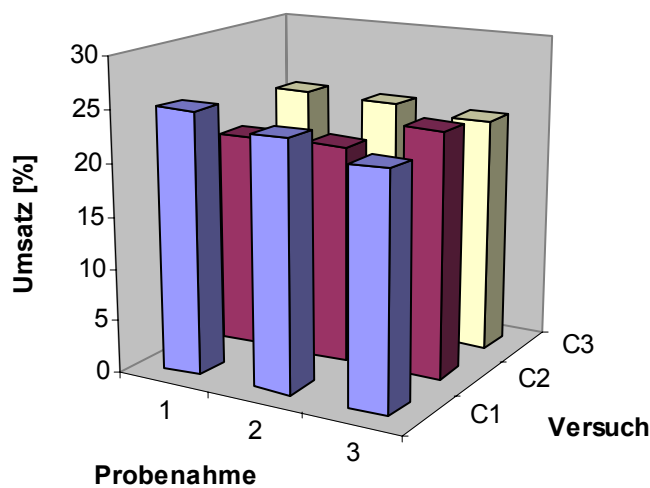


Abb. 5.19: Erzielte Umsätze bei verschiedenen Versuchen (vgl. Tab. 5.4),

5.2.4 Syntheseveruche in der Technikumsanlage

Die Versuche in der kontinuierlichen Versuchsanlage sollten durch Versuche in einer Pilotanlage verifiziert werden und einen ersten Scale-up-Schritt ermöglichen. Dazu sollten die nachfolgenden Versuche zur Herstellung von Isoamylacetat durch Umesterung durchgeführt werden:

Tab. 5.5: Versuchsplanung für die Versuche C1 – C3,
EAc: Ethylacetat, IOH: Isoamylalkohol, m_E : Enzymmenge

Versuch	p [bar]	T [°C]	m_E [g]	MV $E_{Ac:IOH}$	CO ₂ -Strom [kg/h] bei 1 bar, RT	Substratstrom [ml/min]
V1	140	40	96	2,5:1	35	16
V2	100	40	96	2,5:1	35	16
V3	140	60	96	2,5:1	35	16
V4	140	60	96	2,5:1	35	16

Es wurden mehrere Anläufe unternommen, die Reaktionen in der Technikumsanlage in überkritischem CO₂ durchzuführen. Nach anfänglichen Störungen an der Substratpumpe P2 kam es schließlich zum Totalausfall dieser Pumpe (Riss der Membran, Eintritt von Hydrauliköl in die Versuchsanlage). Eine Reparatur war im Rahmen der Projektlaufzeit nicht mehr möglich, da der Schaden an der Pumpe und der Reparaturaufwand zu hoch waren und die Beschaffung einer neuen Pumpe mit einer mehrmonatigen Lieferzeit verbunden ist.

5.3 Phasengleichgewichte

Wie bereits erwähnt wurde zunächst das System Ethanol/CO₂ vermessen, um die Güte der Versuchsanlage zu testen. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Messungen bei verschiedenen Drücken und Temperaturen.

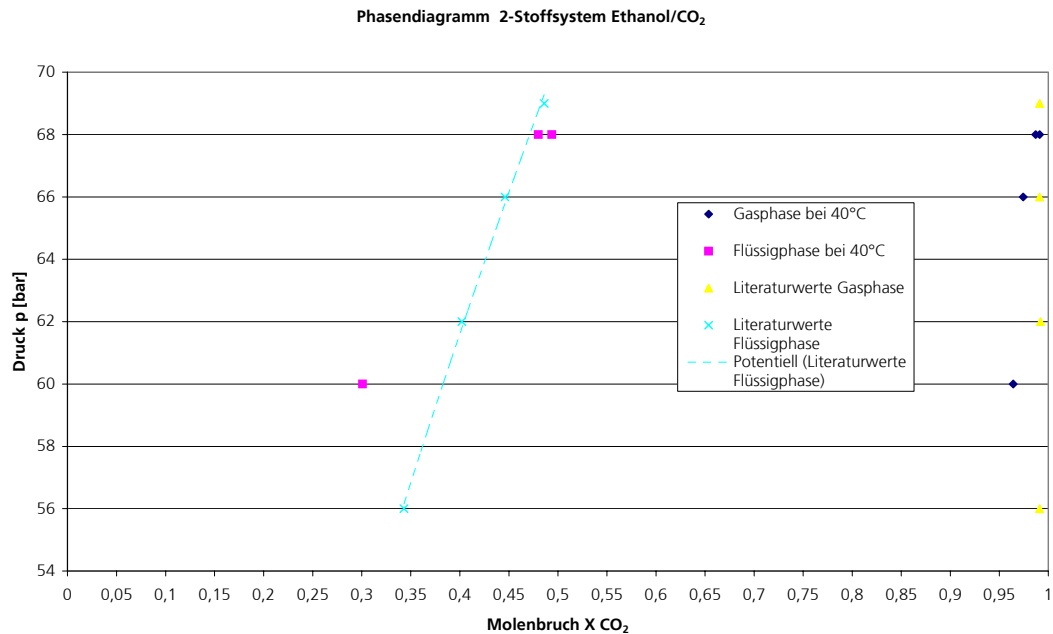


Abb. 5.20: Phasendiagramm 2-Stoffsystem Ethanol/CO₂, Literaturwerte aus [DAVI91]

Man erkennt, dass die gemessenen Werte im Bereich der Literaturwerte liegen. Demnach ist davon auszugehen, dass die Anlage in Verbindung mit der Probenahme und der Analytik verlässliche Ergebnisse liefert.

Nachfolgend wurde das Fünfstoffsystem (Ethanol/Ethylacetat/Isoamylalkohol/Isoamylacetat/CO₂) mit dem Veresterung und Umesterung reaktionstechnisch untersucht wurden, vermessen. In der Literatur ist hierzu nur ein Wertepaar im betrachteten Bereich zu finden [CHRI95]. Die nachfolgende Abbildung 5.21 zeigt die Messwerte für das oben genannte Fünfstoff-System.

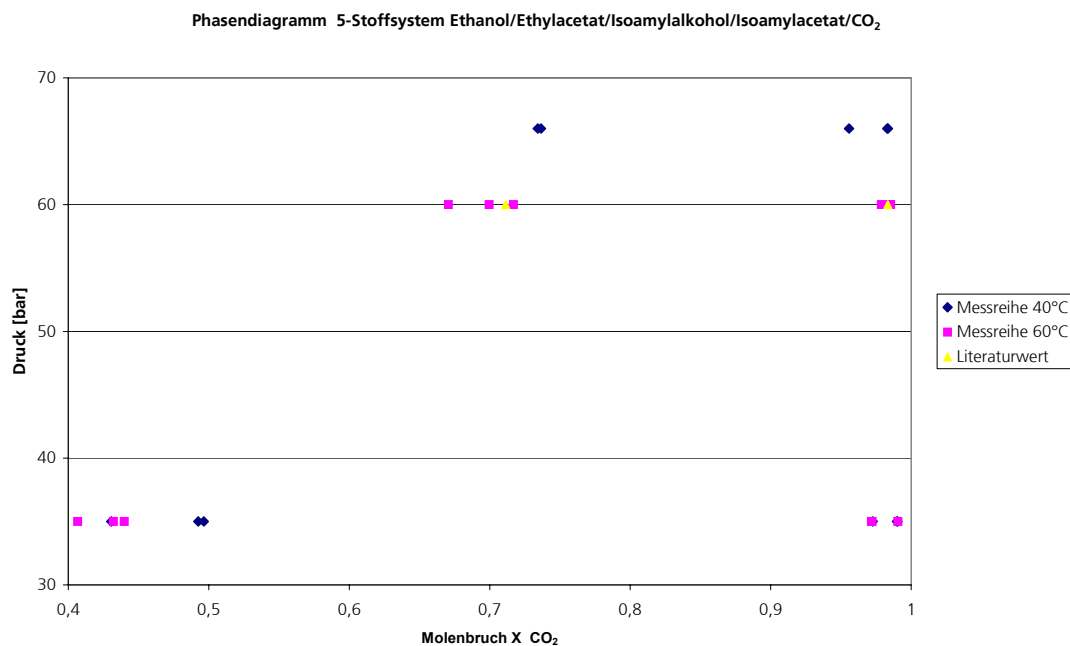


Abb. 5.21: Phasendiagramm 5-Stoffsystem
Ethanol / Ethylacetat / Isoamylalkohol / Isoamylacetat / CO₂,
Literaturwerte aus [CHRI95]

Es zeigt sich, dass hier die gemessenen Werte gewisse Schwankungen aufweisen, die durch Mittelwertbildung ausgeglichen werden, um eine ausreichende Genauigkeit zu erhalten. Wiederum zeigt der Vergleich mit dem Literaturwert, dass die Ergebnisse verlässlich sind.

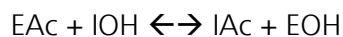
Dabei ist allerdings festzuhalten, dass die hier gezeigten Versuchsergebnisse erst gegen Ende des Projekts - nach anfänglichem Umbau sowie diversen Modifikationen und Reparaturen an der Phasengleichgewichtsanlage - ermittelt werden konnten. Weitere Messpunkte die für eine vollständige Beschreibung des Phasengleichgewichts dieses Systems notwendig gewesen wären, ließen sich in der Projektlaufzeit nicht mehr aufnehmen. Auch für das Citronellol-Stoffsystem waren nur noch orientierende Messungen möglich.

5.4 Modellierung

5.4.1 Enzymkinetik

Für die Modellierung der Enzymkinetik wird die Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik, wie bereits in Kapitel 3.3 erwähnt, ohne Berücksichtigung möglicher Inhibierungen verwendet. Die Ergebnisse werden hier am Beispiel der Umesterung von Ethylacetat und Isoamylalkohol (Kap. 5.2.2) dargestellt, da diese Reaktion am umfangreichsten untersucht wurde.

Aus der Reaktionsgleichung



mit: EAc = Ethylacetat
 IOH = Isoamylalkohol
 IAc = Isoamylacetat
 EOH = Ethanol

und den sich ergebenden Geschwindigkeitsgleichungen für die Hin- und Rückreaktion

$$v_H = [E] \cdot v_{\max,H} \cdot \frac{[\text{EAc}]}{K_{m,\text{EAc}} + [\text{EAc}]} \cdot \frac{[\text{IOH}]}{K_{m,\text{IOH}} + [\text{IOH}]}$$

$$v_R = [E] \cdot v_{\max,R} \cdot \frac{[\text{IAc}]}{K_{m,\text{IAc}} + [\text{IAc}]} \cdot \frac{[\text{EOH}]}{K_{m,\text{EOH}} + [\text{EOH}]}$$

erhält man den Satz an kinetischen Konstanten K_i sowie $v_{\max,H}$, $v_{\max,R}$ die durch nichtlineare Regression bestimmt werden müssen. Hierfür wurde unter Berücksichtigung der Strömungsverhältnisse im Reaktor ein Fortran-Programm geschrieben, dass über mehrere Solver (NLSCON, LMDIF, N2F/N2FB, NL2SNO, ELSUNC) verfügt.

Aus der Versuchsanordnung mit der Probenahmestelle am Reaktorausgang bei der kontinuierlich betriebenen Laboranlage (vgl. Kap. 4.1) folgt, dass mit jedem Versuch ein einzelner Betriebspunkt ermittelt wird. Bei gegebenem p und T wurden auf diese Weise unter gezielter Variation der Parameter Verweilzeit, Molverhältnis (MV) der Substrate, CO_2 -Strom und Substratstrom Versuchsergebnisse für die in Tabelle 5.6 aufgelisteten Parameter erhalten. Prozentual, als Umsatz des Isoamylalkohols ausgedrückt, liegen diese Daten den Berechnungen zugrunde.

Tab. 5.6: Der Modellierung zugrunde liegende Versuchsparameter und erzielte Umsätze (Mittelwerte aus Mehrfachmessungen) der Experimente zur Synthese von Isoamylacetat durch Umesterung

Nr.	P [bar]	T [°C]	m _E [g]	MV EAc:IOH	CO ₂ -Strom [l/min] bei 1 bar, RT	Substratstrom [ml/min]	Umsatz [%]
V1	140	40	3	1:1	10	0,5	12,0
V2	140	40	3	2,5:1	10	0,5	32,9
V3	140	40	3	10:1	10	0,5	65,9
V4	140	40	3	2,5:1	5	0,25	38,1
V5	140	40	1,5	2,5:1	10	0,5	16,5
V6	140	40	6	2,5:1	10	0,5	43,2
V7	140	40	6	2,5:1	10	1	38,8

Nach der Bestimmung der Geschwindigkeit am Lockerungspunkt mit Hilfe der Ergun-Gleichung [STIE94] kann für die Enzymschüttung im Reaktor ein Festbett angenommen werden. Die ermittelte Geschwindigkeit am Lockerungspunkt liegt unter Prozessbedingungen um eine Größenordnung über der Leerrohrgeschwindigkeit im Reaktor.

Für Gasströmungen durch Festbett-Schüttungen kann näherungsweise von einer idealen Rohrströmung ausgegangen werden [LEVE99]. Diese Annahme liegt der Modellierung des Reaktors zu Grunde, weshalb auf zusätzliche Verweilzeitmessungen verzichtet werden konnte. Aus den getroffenen Annahmen ergibt sich, dass die Länge des Reaktors der Höhe der Enzymschüttung entspricht. Die Verweilzeit verhält sich proportional zur Reaktorlänge, i.e. der Höhe der Enzymschüttung.

Der für das Reaktormodell aus der nichtlinearen Regression erhaltene Parametersatz ist in Tabelle 5.7 angegeben.

Tab. 5.7: Durch nichtlineare Regression bestimmter Parametersatz für die Umesterung von Ethylacetat und Isoamylalkohol bei 40°C und 140 bar

V _{max,H}	1,456 mmol/(g*min)
V _{max,R}	1,200 mmol/(kg*min)
K _{m_EAc}	0,023 mmol/ml
K _{m_IOH}	0,00093 mmol/ml
K _{m_IAC}	0,00085 mmol/ml
K _{m_EOH}	gegen 0

Die Diagramme 5.22 – 5.24 zeigen die sich aus der Kinetik ergebenden Umsatz-Verweilzeit-Kurven bzw. Konzentrations-Verweilzeit-Kurven. Die experimentell ermittelten Umsätze an den einzelnen Betriebspunkten sind in den Diagrammen zusätzlich eingetragen. Unter Berücksichtigung der Messungenauigkeiten zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen Simulation und Experiment.

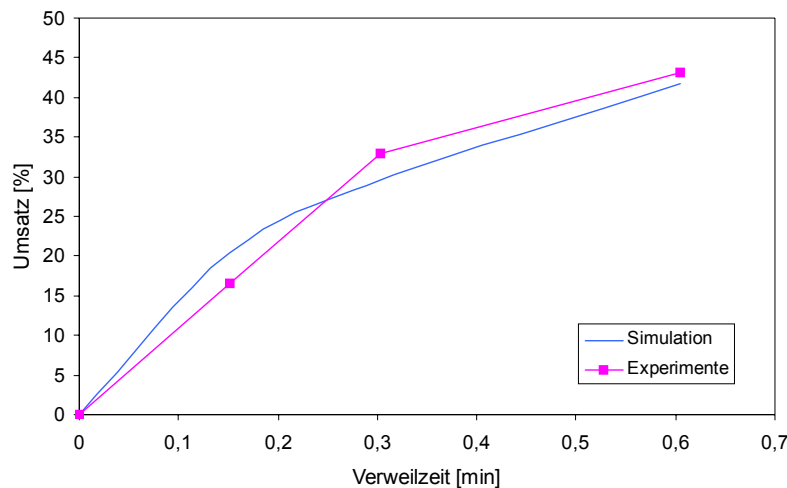


Abb. 5.22: Vergleich von Simulation und Experiment für die Versuche V2, V5 und V6

Abbildung 5.22 zeigt, dass die Steigung des Umsatzes bei geringen Enzymmengen und damit kleinen Reaktorlängen proportional zur Verweilzeit ist. Zu höheren Enzymmengen hin flacht die Steigung ab. Dieses Verhalten wurde nicht nur bei den hier modellierten Umesterungsversuchen, sondern auch bei den Veresterungsversuchen (vgl. Kap. 5.5.2 *Veresterung*) beobachtet.

Die weiteren Diagramme zeigen den Verlauf der Konzentration über der Reaktionszeit. In dem hier betrachteten Plug-Flow Festbettreaktor entspricht das der Reaktorlänge. Die eingetragenen Messwerte geben die Konzentrationen am Reaktorausgang wieder. Abbildung 5.23 veranschaulicht, dass die Reaktion in diesem Fall (Molverhältnis der Edukte von 10:1) am Reaktorausgang bereits annähernd vollständig abgelaufen ist. Eine weitere Erhöhung der Enzymmenge hätte folglich keine umsatzsteigernde Wirkung mehr gehabt. Anders verhält es sich dagegen bei Versuch V7 (Abb. 5.24). Hier ist mit einem Molverhältnis der Edukte von 2,5:1 ein erheblich größerer Anteil an Isoamylalkohol als bei Versuch V3 eingesetzt worden und eine Verlängerung des Reaktors hätte noch eine deutliche Umsatzsteigerung bewirken können.

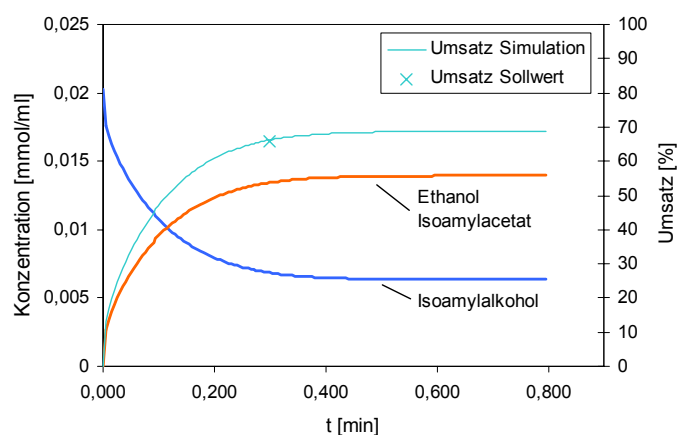


Abb. 5.23: Vergleich von Simulation und Experiment für Versuch V3, Ethylacetat liegt ausserhalb des dargestellten Konzentrationsbereichs

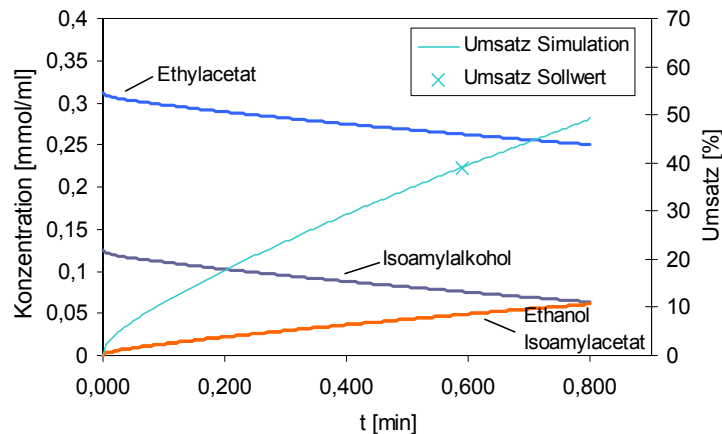


Abb. 5.24: Vergleich von Simulation und Experiment für Versuch V7

Die folgenden Abbildungen zeigen die mittleren Reaktionsgeschwindigkeiten in den Versuchen und als Ergebnis der Simulation. Weiterhin zeigt Abbildung 5.25, dass V2 und V5 die gleiche Reaktionsrate aufweisen. Dies deutet auf einen linearen Anstieg des Umsatzes zu Beginn der Reaktion, d. h. in diesem Fall bis zu einer Verweilzeit von etwa 0,3 min, hin, was auch aus Abbildung 5.22 hervorgeht. Mit zunehmender Verweilzeit flacht der Reaktionsverlauf dann ab, was sich in einer verringerten mittleren Reaktionsgeschwindigkeit bei V4 und V6 äußert. Diese beiden Versuche wurden bei unterschiedlichen Enzymmengen im Reaktor durchgeführt. Aufgrund der ebenfalls verschiedenen CO_2 - und Substratströme resultieren aber letztlich gleiche Verweilzeiten. Wird dann ausgehend von einer Enzymmenge von 6 g und einem CO_2 -Strom von 10 l/min (V6) der Substratstrom von 0,5 auf 1 ml/min erhöht (V7), so verdoppelt sich die Reaktionsgeschwindigkeit, woraus zu schließen ist, dass das Enzym im Überschuss vorliegt.

Der Vergleich der experimentell bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten (Abb. 5.25) mit den Werten aus der Modellierung (Abb. 5.26) zeigt, dass die wesentlichen Zusammenhänge im Modell korrekt wiedergegeben werden. Lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit von V5 gerät im Modell zu groß. Dies ist bereits Abbildung 5.22 zu entnehmen. Hier verläuft die Simulationskurve oberhalb des Messpunktes. Aufgrund des relativ geringen Umsatzes von 16,5 % fallen Abweichungen von wenigen Prozentpunkten hier deutlich ins Gewicht. Die hohe Reaktionsrate von V5 in der Simulation resultiert aus einem berechneten Umsatz von ca. 20 %.

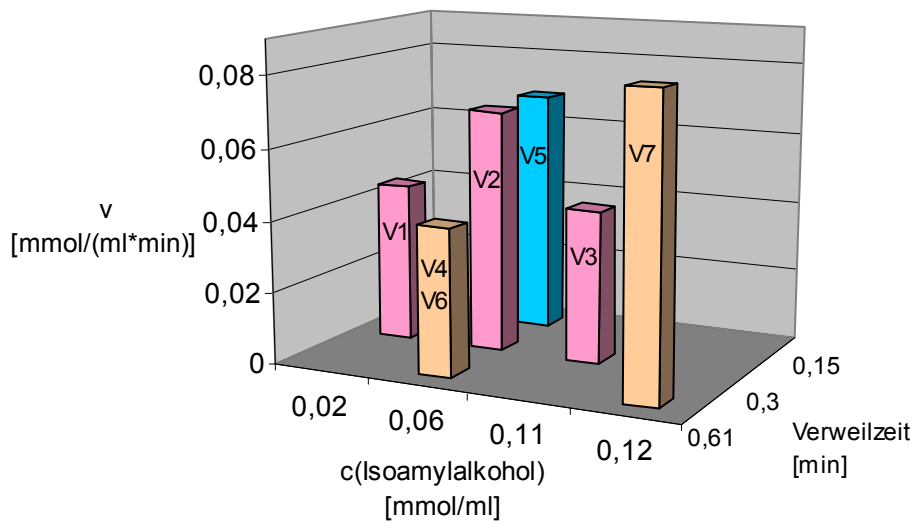


Abb. 5.25: Experimentell bestimmte Reaktionsgeschwindigkeiten zu den Versuchen V1-V7 (vgl. Tab. 5.6) in Abhängigkeit der Isoamylalkoholkonzentration und der Verweilzeit

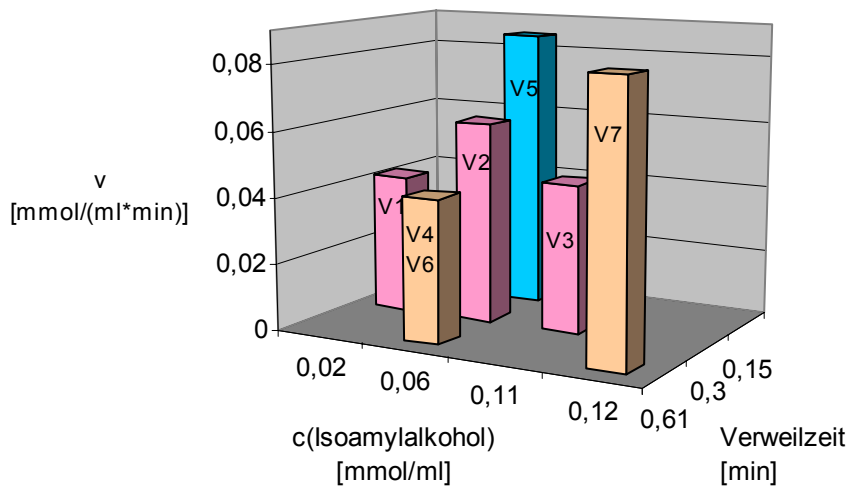


Abb. 5.26: Aus der Simulation bestimmte Reaktionsgeschwindigkeiten zu den Versuchen V1-V7 (vgl. Tab. 5.6) in Abhängigkeit der Isoamylalkoholkonzentration und der Verweilzeit

Insgesamt gesehen lässt sich feststellen, dass sowohl die experimentellen Methoden und Versuchsanordnungen als auch das mathematische Programm zur Beschreibung der Reaktionskinetik im Rahmen dieses Forschungsprojektes bereitgestellt worden sind. Dies ermöglicht in einfacher Weise die Erweiterung der Datenbasis durch Ergänzungsversuche und damit eine besser abgesicherte Modellierung der Enzymkinetik. Auch für die Übertragung auf andere Esterbildungsreaktionen kann der gewählte Ansatz verwendet werden.

5.4.2 Phasengleichgewichte

Einleitung

Gegenstand der Arbeiten der Kölner Gruppe im Rahmen dieses Projektes ist die Modellierung der Phasengleichgewichte der enzymatischen Reaktionssysteme. Ziel ist es zum einen hinsichtlich des Phasenverhaltens optimale Prozeßbedingungen zu finden sowie günstige Bedingungen für die anschließende Produktabtrennung.

Da bei der Modellierung des Phasenverhaltens eine Reihe von Edukten und Produkten sowie das überkritische Kohlendioxid als Lösungsmittel vorliegen, erhält man ein komplexes Mehrkomponentensystem. Um sich diesem komplexen System systematisch anzunähern, wurden zunächst die zugrundeliegenden binären und ternären Systeme behandelt. Die binären Subsysteme sind aus verschiedenen Gründen von Bedeutung für die Beschreibung des Gesamtsystems. Zum einen benötigt man die binären Wechselwirkungsparameter, die man aus der Anpassung der binären Phasengleichgewichte erhält, ebenfalls für die Modellierung der ternären und Multikomponentensysteme. Des weiteren werden Daten der berechneten binären Phasendiagramme als Startwerte für die Berechnung von ternären Phasendiagrammen benötigt. Dies ist deshalb notwendig, weil die numerische Lösung der Phasengleichgewichtsbedingungen relativ sensitiv auf die Startwerte für die Molenbrüche reagiert.

Im weiteren wurden ausgehend von den binären Phasengleichgewichten ternäre Phasengleichgewichte berechnet. Diese ternären Systeme stellen bereits die Edukt- oder Produktseite der hier betrachteten enzymatischen Reaktionssysteme dar. Schließlich folgte die Modellierung der vollständigen, aus fünf Komponenten bestehenden Reaktionssysteme mit einem Flash-Programm.

Softwareentwicklung

Phasengleichgewichte von Mehrkomponentensystemen

Für die Berechnung der Phasengleichgewichte wurde ein Programm entwickelt, mit dem Phasengleichgewichte für binäre und Mehrkomponenten-Systeme berechnet werden können. Zunächst wurde dieses Programm für binäre und ternäre Systeme getestet und eingesetzt. Mit diesem Programm können Phasengleichgewichte direkt bei konstant vorgegebener Temperatur und vorgegebenem Druck berechnet werden.

Flash Berechnungen

Um die optimalen Bedingungen für die Produktabtrennung zu finden, ist es ferner erforderlich, eine Flash-Rechnung durchzuführen. Unter einem isotherm-isobaren Flash-Problem versteht man, dass bei gegebenem Druck und Temperatur die Startzusammensetzung $\mathbf{z}$ vorgegeben wird. Gesucht werden die Molenbrüche der flüssigen Phase $\mathbf{x}$ und der Gasphase $\mathbf{y}$ sowie der verdampfte Anteil β . Neben der Startzusammensetzung $\mathbf{z}$ werden Schätzwerte für den verdampfenden Anteil β und für die K -Faktoren benötigt, welche sich aus dem Verhältnis der Molenbrüche der Gasphase zur Flüssigphase ergeben ($K_i = y_i / x_i$). Zu Beginn der Rechnung werden mit Hilfe der Stoffbilanzen Startwerte für $\mathbf{x}$ und $\mathbf{y}$ aus den geschätzten K -Faktoren und dem verdampfenden Anteil β bestimmt, die anschließend normiert werden müssen. Dann erfolgt die Lösung des Siededruckproblems, die Berechnung der Zustandsparameter, der Molarenvolumina, der Fugazitätskoeffizienten, der K -Faktoren und des Zielfunktionswertes, welcher mittels eines Hybridverfahrens bestimmt wird. Ist die Abbruchbedingung nicht erfüllt, so wird ein neues β bestimmt.

Shortcut-Korrelationen

Um die aus den Korrelationen der experimentellen Daten gewonnenen K -Faktoren der Gesamtprozessmodellierung möglichst unkompliziert zur Verfügung zu stellen, wurden die K -Faktoren als Funktion des Drucks für konkrete Prozessbedingungen an Korrelationsfunktionen angepasst. Aufgrund des uneinheitlichen Verlaufs der K -Faktoren in Abhängigkeit des Drucks lässt sich keine einfache geeignete Korrelationsfunktion finden. Hinzu kommt, dass bei der Anwendung von Polynomen höherer Ordnung unerwünschte Extrema in den Kurven auftreten können. Die verfügbare konventionelle Korrelationssoftware war zudem nicht in der Lage, die Koeffizienten der Polynome mit hinreichender Genauigkeit zu berechnen, um mit diesen Koeffizienten die K -Faktoren mit einer Fortran-Routine genau genug zu reproduzieren. Aus diesem Grund wurde ein Fortran-Programm zur Korrelation der K -Faktoren selbst entwickelt und anschließend zur Generierung derjenigen Korrelationen eingesetzt, die geeignet für die Gesamtmodellierung sind.

Berechnungen

Umesterung von Ethylacetat nach Isoamylacetat

Es wurden zunächst binäre und ternäre Phasengleichgewichte korreliert. Hierzu zählen folgende Systeme: CO_2 / Ethylacetat / Isoamylalkohol; CO_2 / Vinylacetat / Isoamylalkohol; CO_2 / Ethanol / Isoamylacetat; CO_2 / Acedaldehyd / Isoamylacetat; CO_2 / Ethylacetat / Isoamylacetat. In Abbildung 5.27 ist das System Ethylacetat / Isoamylacetat / CO_2 exemplarisch herausgegriffen, für das experimentelle Daten im ternären Bereich vorhanden sind [CHRI95]. Daneben sind die entsprechenden binären Subsysteme abgebildet. Es wurden keine ternären anpassbaren Parameter verwendet. In Abbildung 5.28 ist die Gasseite der Phasengleichgewichte für das ternäre System und zwei der binären Subsysteme vergrößert dargestellt. Diese Bereiche sind für die Abtrennung der Produkte von Bedeutung.

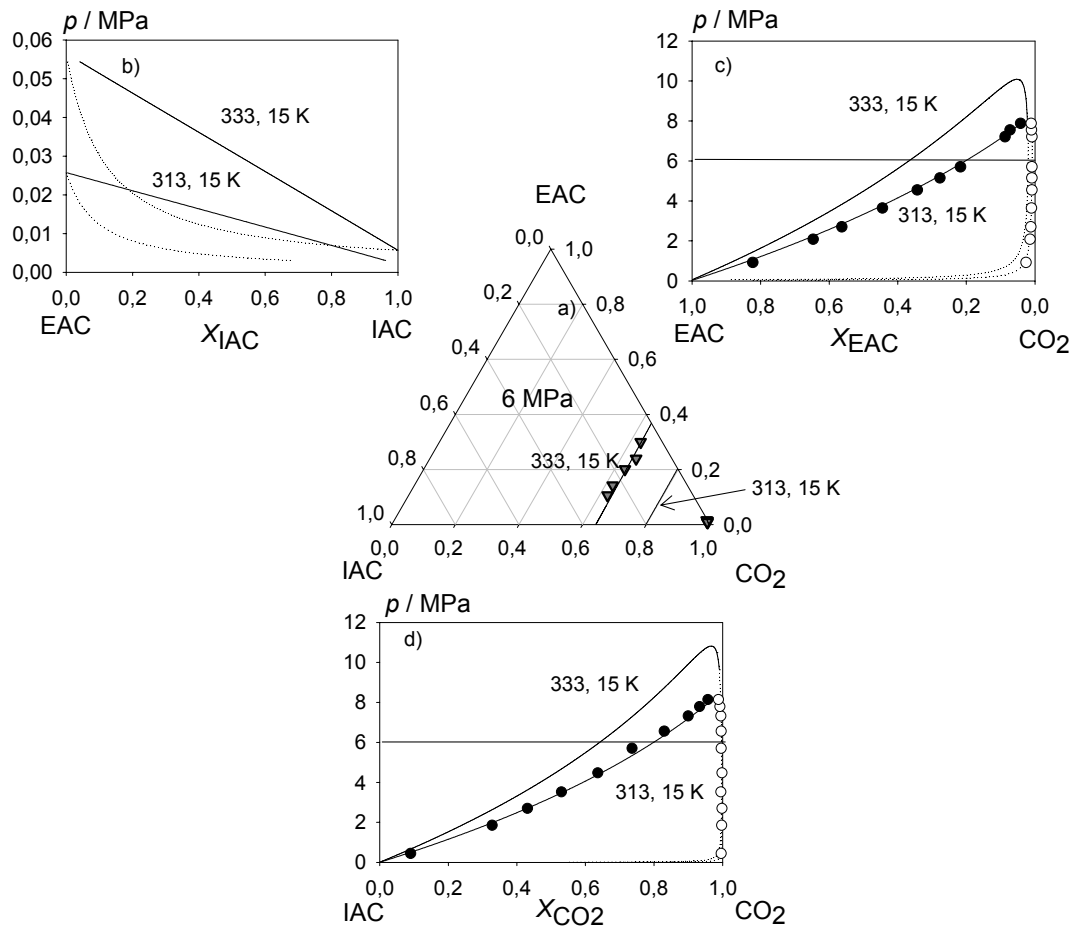


Abbildung 5.27: Ternäres Phasendiagramm : Abbildung des Systems CO_2 / Ethylacetat (EAC) / Isoamylacetat (IAC). Zusätzlich sind die binären Subsysteme dargestellt. Die Symbole sind experimentelle Daten, die der Literatur entnommen wurden: a) ternär [CHRI95]; b) Ethylacetat / Isoamylacetat; c) CO_2 / Ethylacetat [CHRI95]; d), Isoamylacetat / CO_2 [CHRI95]. Die Linien geben die Berechnung mit der Peng-Robinson-Gleichung [PENG76] wieder. Das System Ethylacetat / Isoamylacetat verbindet die linken Seiten der beiden binären CO_2 -Systeme und liegt folglich bei niedrigen Drücken.

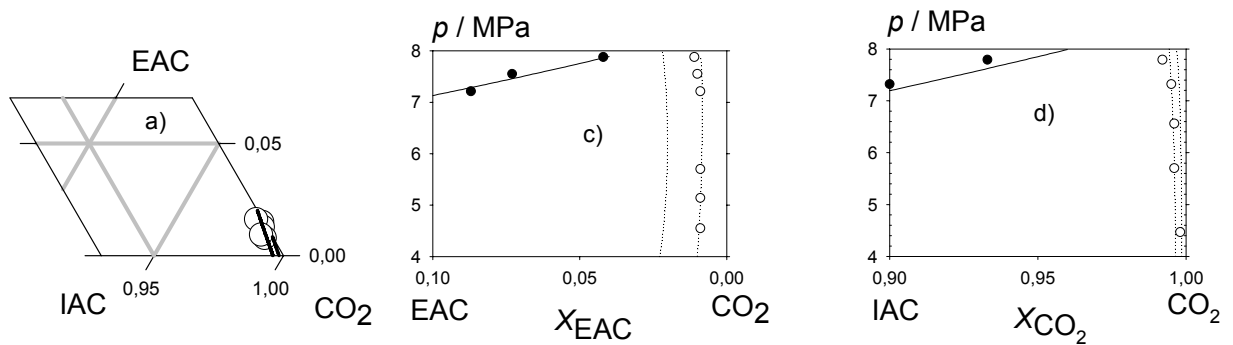


Abbildung 5.28: Vergrößerung der Phasendiagramme aus Abbildung 2 auf der Kohlendioxid-reichen Seite.

Nach der Berechnung der binären und ternären Phasendiagramme schließt sich die Berechnung der vollständigen 5-Komponenten Systeme mit dem oben beschriebenen Flash-Programm an. Um das für dieses Projekt entwickelte Flash-Programm zu verifizieren wurden zunächst die in der Literatur verfügbaren experimentellen Daten von Chrisochoou et al. [CHRI95] benutzt. In Abbildung 5.29 sind als Kreise die experimentellen Daten aus dieser Arbeit eingefügt. Die dreieckigen Punkte in der Graphik sind die Daten, die in dieser Veröffentlichung mit Hilfe der Redlich-Kwong-Soave Gleichung (RKS) berechnet wurden. Die durchgezogenen Kurven zeigen die Ergebnisse der Rechnungen, welche mit Hilfe des hier entwickelten Programms auf der Basis der Peng-Robinson-Gleichung durchgeführt wurden. Man sieht, dass die Berechnung die experimentellen Werte gut wieder gibt.

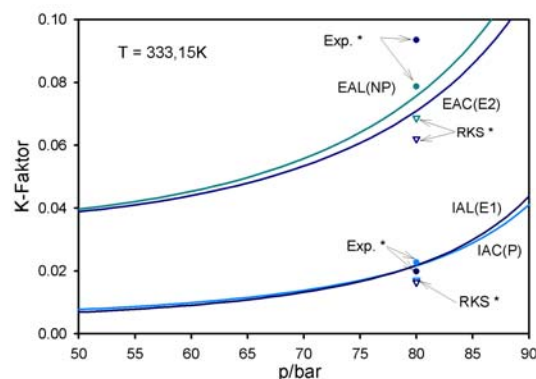


Abbildung 5.29: K-Faktoren in Abhängigkeit vom Druck bei einer Temperatur von 333,15 K mit experimentellen Daten (Kreise) und Rechnungen aus der Literatur (Dreiecke) [CHRI95].

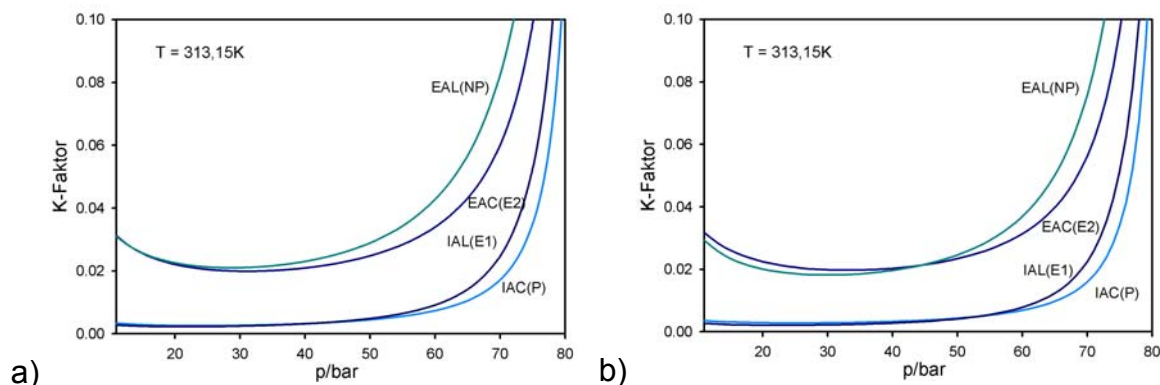


Abbildung 5.30: K-Faktoren in Abhängigkeit des Drucks bei verschiedenen Startzusammensetzungen bei 313,15 K. Startzusammensetzungen: a) $z(\text{CO}_2) = 0,98$, $z(\text{EAC}) = 0,01285714$, $z(\text{IAC}) = 0,00142857$, $z(\text{IAL}) = 0,0042857$, $z(\text{EAL}) = 0,00142857$; b) $z(\text{CO}_2) = 0,98$, $z(\text{EAC}) = 0,007745$, $z(\text{IAC}) = 0,00126$, $z(\text{IAL}) = 0,00126$, $z(\text{EAL}) = 0,009735$

Das Verhalten des Systems in Abhängigkeit des Drucks wurde für verschiedene Startzusammensetzungen $\mathbf{z}$ untersucht. In Abbildung 5.30 sind die K-Faktoren gegen den Druck bei $T = 313,15 \text{ K}$ für verschiedene Startzusammensetzungen $\mathbf{z}$ aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass sich bei beiden Graphen der Verlauf der Kurven im Druckbereich über 60 bar kaum unterscheidet. Das heißt, dass in diesem Bereich eine Variation der Startzusammensetzung kaum Einfluss auf die K-Faktoren hat. Im Druckbereich unter 60 bar kreuzen sich die Kurven von IAL und IAC, bzw. von EAL und EAC. Dieses steht im Einklang mit der Tatsache, dass sich die Dampfdruckkurven von IAL/IAC und EAL/EAC kreuzen und einen entsprechenden Einfluss auf

die Gasphase haben (Abb. 5.31). Es ist erkennbar, dass eine Veränderung der Startzusammensetzung einen gewissen Einfluss auf die Lage dieser Kreuzungspunkte der K -Faktoren hat.

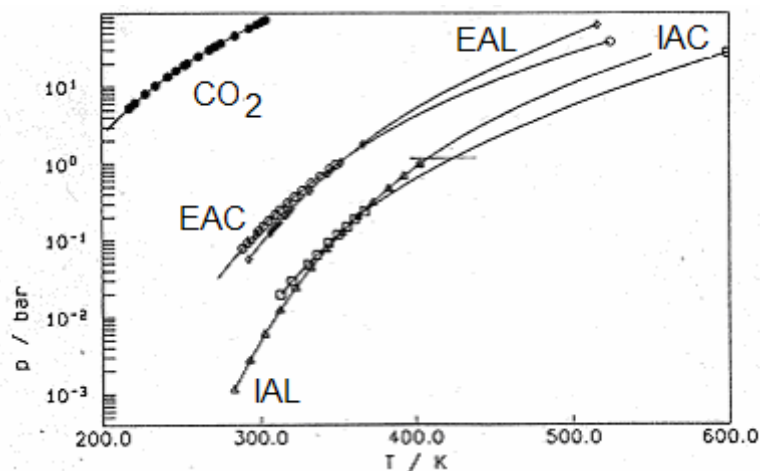


Abbildung 5.31: Dampfdrücke der Reinstoffe [CHRI95].

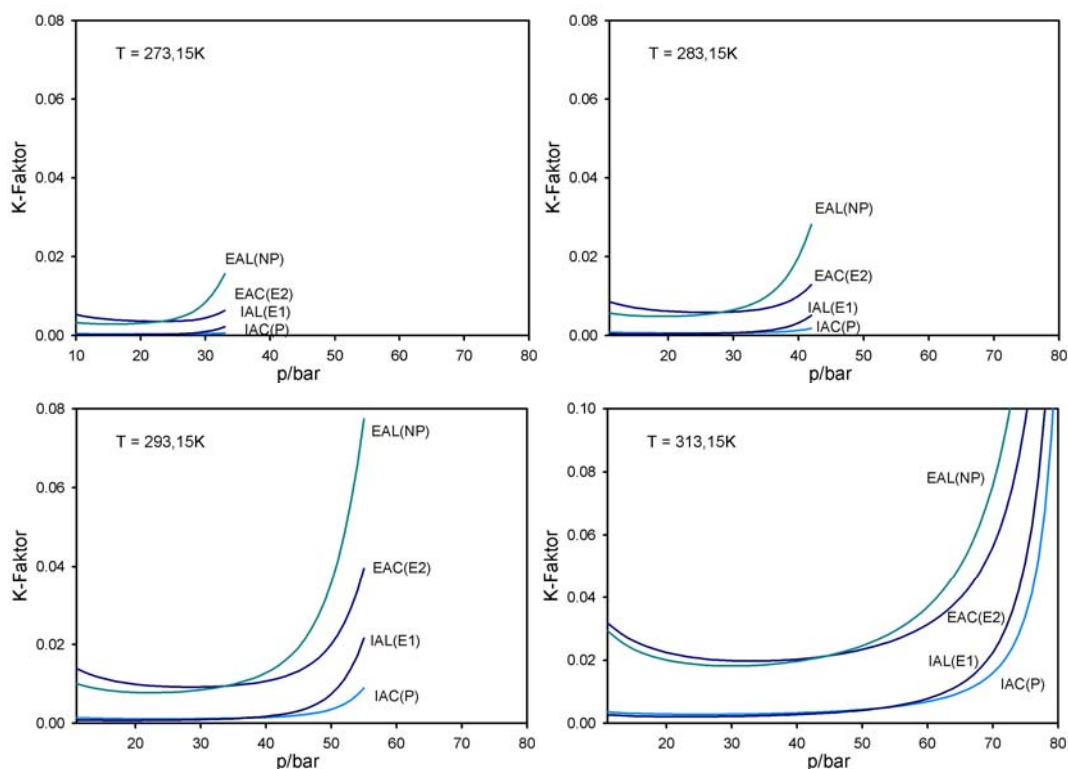


Abbildung 5.32: K -Faktoren in Abhängigkeit des Drucks bei verschiedenen Temperaturen. Startzusammensetzungen wie in Abbildung 2b.

Bei gegebener Startzusammensetzung wurde die Änderung der K -Faktoren für verschiedene Temperaturen untersucht. Um die Verhältnisse der einzelnen K -Faktoren bei unterschiedlichen Temperaturen deutlicher darzustellen, wurde die Druckachse in allen Diagrammen gleich gewählt. Abbildung 5.32 zeigt, dass sich mit zunehmender Temperatur und zunehmendem Druck die einzelnen Komponenten vermehrt in der Gasphase anreichern. Wegen der Kreuzungspunkte der K -Faktoren von EAC und EAL sowie von IAC und IAL kehrt sich die

Reihenfolge der Anreicherungen der Komponentenpaare EAC/EAL und IAC/IAL bei höheren Drücken in der Gasphase um. Diese Kreuzungspunkte verschieben sich bei Erhöhung der Temperatur hin zu höheren Drücken. Alle Graphen zeigen für EAC und EAL ein Minimum, welches sich bei Erhöhung der Temperatur nach rechts verschiebt. Eine Folge davon ist, dass sich mit abnehmendem Druck die K -Faktoren von EAC und EAL erhöhen, was eine relative Anreicherung dieser Komponenten in der Gasphase bedeutet.

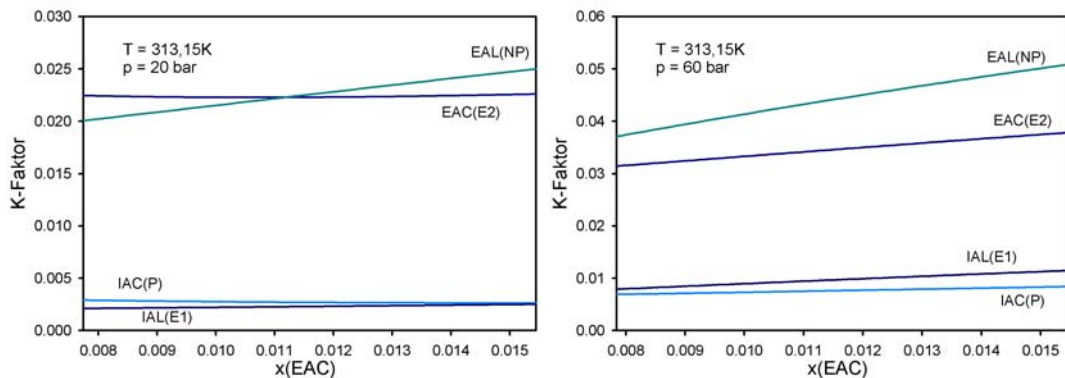


Abbildung 5.33: K -Faktoren in Abhängigkeit von $z(\text{EAC})$ bei verschiedenen Drücken. Startzusammensetzungen wie in Abbildung 2b.

Des weiteren wurden die K -Faktoren gegen die Änderung des Startmolenbruches $z(\text{EAC})$ (von 0,007745 bis 0,01549) isotherm aufgetragen (Abbildung 5.33). Im ersten Graphen ist in Abhängigkeit der Änderung der Startzusammensetzung bei einem Druck von 20 bar zu erkennen, dass sich die K -Faktoren von EAL und EAC kreuzen. Dieser Effekt zeigt sich im zweiten Graphen bei 60 bar nicht. Zum einen bedeutet das, dass es möglich ist, durch die Zugabe von EAC den Anteil von EAL in der Gasphase zu erhöhen. Zum anderen ist es möglich, den relativen Anteil von IAC in der flüssigen Phase zu erhöhen. Im zweiten Graphen bei 60 bar wird durch die Zugabe von EAC erreicht, dass sich die Anteile von EAL, EAC und IAL in der Gasphase schneller erhöhen, als der von IAC. Hier zeigt sich, dass es durch eine Änderung der Startzusammensetzung möglich ist, die Verteilung der einzelnen Komponenten in den koexistierenden Phasen zu beeinflussen. Dieses kann so weit gehen, dass es möglich ist, die Verteilung von einzelnen Komponenten in den jeweiligen Phasen, wegen der Kreuzungspunkte, umzukehren.

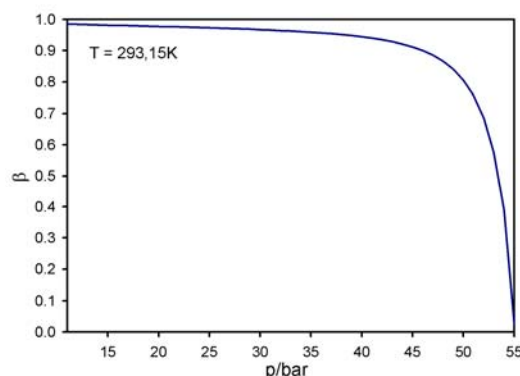


Abbildung 5.34: Verdampfender Anteil β Abhängigkeit des Drucks. Startzusammensetzungen wie in Abbildung 2a.

Da der verdampfende Anteil β in den hier betrachteten Systemen aufgrund des hohen Startwertes $z(\text{CO}_2) = 0,98$ im unterem Druckbereich sehr groß ist (Abbildung 5.34), wurde für

die flüssige Phase und die Gasphase die Stoffmenge in Abhängigkeit des Druckes bei gegebener Startzusammensetzung aufgetragen (Abbildung 5.35). Es ist zu erkennen, dass bei der hier betrachteten Stoffmengenzusammensetzung die beste Produktabtrennung - relativ zu den anderen Komponenten - bei niedrigen Drücken vorliegt.

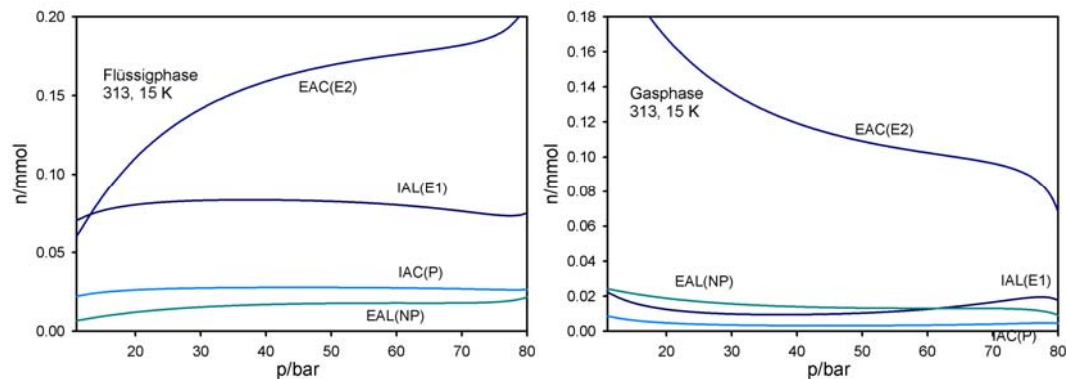


Abbildung 5.35: Stoffmengenanteil in Mol in Abhängigkeit des Druckes für die Flüssig- und Gasphase. Stoffmengen zu Beginn (entspricht Startzusammensetzungen wie in Abbildung 2a): $n(\text{CO}_2) = 21,218$ mmol, $n(\text{EAC}) = 0,27837$ mmol, $n(\text{IAC}) = 0,03093$ mmol, $n(\text{IAL}) = 0,09279$ mmol, $n(\text{EAL}) = 0,03093$ mmol.

Eine kritische Betrachtung zeigt jedoch, dass der Grad der erzielbaren Trennung des Zielprodukts (P) Isoamylacetat (IAC) von Edukt 1 (Ea) Isoamylalkohol (IAL) und Edukt 2 (E2) Ethylacetat (EAC) sowie vom Nebenprodukt (NP) Ethylalkohol (EAL) nicht sehr groß ist. Der ursprüngliche Ansatz, mittels einer gezielten Abscheidung möglichst zunächst die Edukte abzuscheiden, um sie zum Reaktoreingang zurück zu führen, und dann die Produkte abzutrennen, funktioniert für das in diesem Antrag überwiegend betrachtete Stoffsystem nicht. Die Trennung der Komponenten wird im Wesentlichen durch deren Dampfdruckverhalten und nur in geringem Umfang durch selektive Löseeigenschaften der CO_2 -reichen Gasphase bestimmt.

Vergleich von Simulation und Experiment

Ein Vergleich der im Rahmen dieses Vorhabens in der Phasengleichgewichtsapparatur experimentell ermittelten Konzentrationen mit der hier durchgeführten Modellierung zeigt am Beispiel des Stoffsystems Ethanol/ CO_2 eine gute Übereinstimmung der Werte in beiden Phasen (Abb. 5.36).

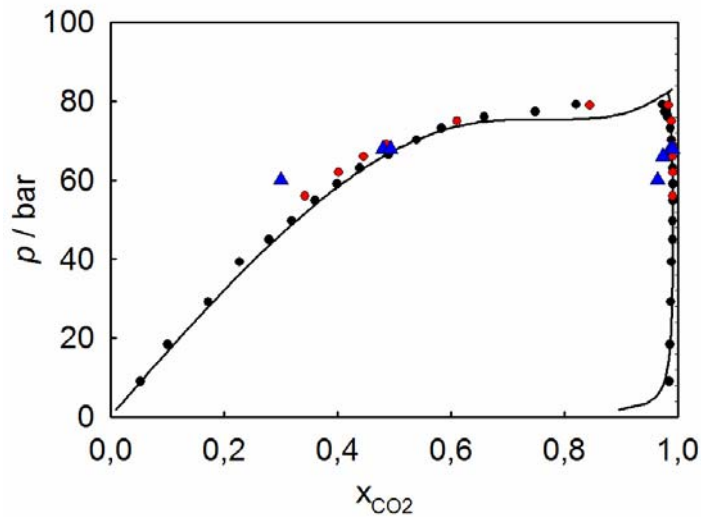
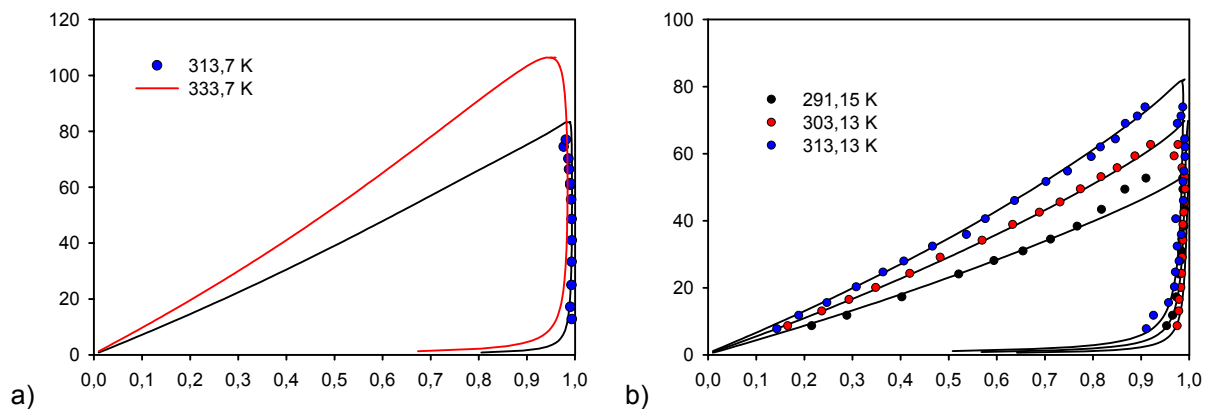
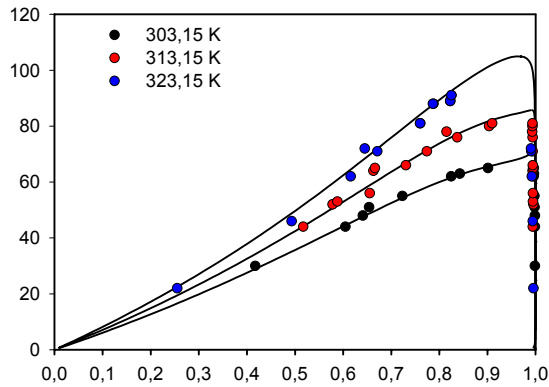


Abb. 5.36: Vergleich von Literaturdaten (rote und blaue Punkte), experimentell bestimmten Werten (blaue Dreiecke) und Simulation für das Stoffsystem Ethanol/CO₂ [DAVI91, CHRI95]

R-(2)-Octanol aus Octanon

Bei dieser Reaktion treten neben dem Edukt Octanon und dem Produkt R-(2)-Octanol noch die zwei Nebenprodukte 2-Propanol und Aceton auf. Sie sind Bestandteile der NADPH Regenierungsreaktion und müssen bei der Phasengleichgewichtsberechnung berücksichtigt werden. Zunächst wurden die Phasengleichgewichte für die binären Randsysteme dieses Reaktionssystems berechnet. Hierbei handelt es sich um die Systeme R-(2)-Octanol/CO₂, Aceton/CO₂ und 2-Propanol/CO₂. Für das System Octanon/CO₂ liegen keine experimentelle Daten vor. Auch hier gelingt die Korrelation der experimentellen Daten recht gut wie in Abbildung 5.37 ersichtlich. Das Verhalten der binären Randsysteme ist denen des Isoamylacetat-(IAC)-Systems ähnlich.

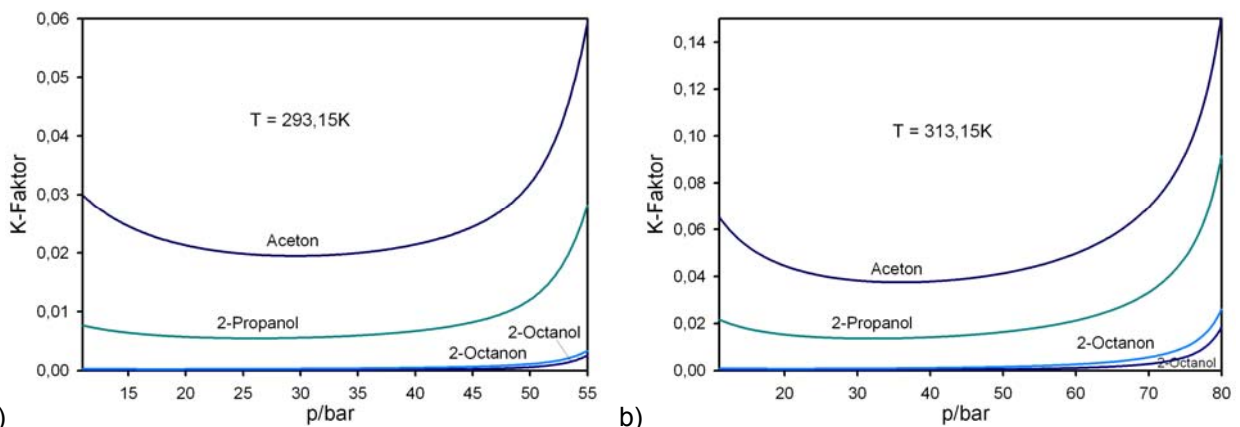




c)

Abbildung 5.37: Korrelation der binären Randsysteme für das Octanon/R-(2)Octanol System: a) R-(2)-Octanol/CO₂, Daten aus [GAMS01]. b) Aceton/CO₂, Daten aus [DAY96]. c) 2-Propanol/CO₂, Daten aus [SUZU91].

Schließlich wurden die K-Faktoren für dieses System mit dem Flash-Programm berechnet. Abbildung 5.38 zeigt, dass die Verläufe der K-Faktoren sehr ähnlich denen des IAC-Systems sind. Der Verlauf der K-Faktoren für 2-Octanon und 2-Octanol zeigt, dass deren Trennung sich mit steigender Temperatur verbessert. Aceton und 2-Propanol sind hingegen deutlich vermehrt in der Gasphase angereichert.



a)

b)

Abbildung 5.38: Berechnungen der K-Faktoren für das Octanon/R-(2)Octanol System für verschiedene Temperaturen.

5.4.3 Gesamtprozess

Auf Grundlage der mathematischen Beschreibungen von Enzymkinetik und Phasengleichgewichten ist ein Gesamtmodell des Verfahrens erstellt worden. Die Struktur der Vorgehensweise ist in Abb. 5.38 dargestellt. Aus den Phasengleichgewichtsberechnungen mit der Peng-Robinson-Gleichung werden geeignete Short-cut-Gleichungen (Kap. 5.4.2 *Shortcut-Korrelationen*) für die betrachteten Zustandsbereiche abgeleitet und in das Gesamtmodell für die Prozess-Simulation integriert. Die Simulation des Verfahrens kann so in kompakter Weise erfolgen und die aufwändige vollständige Berechnung der Phasengleichgewichte während der Prozess-Simulation können vermieden werden.

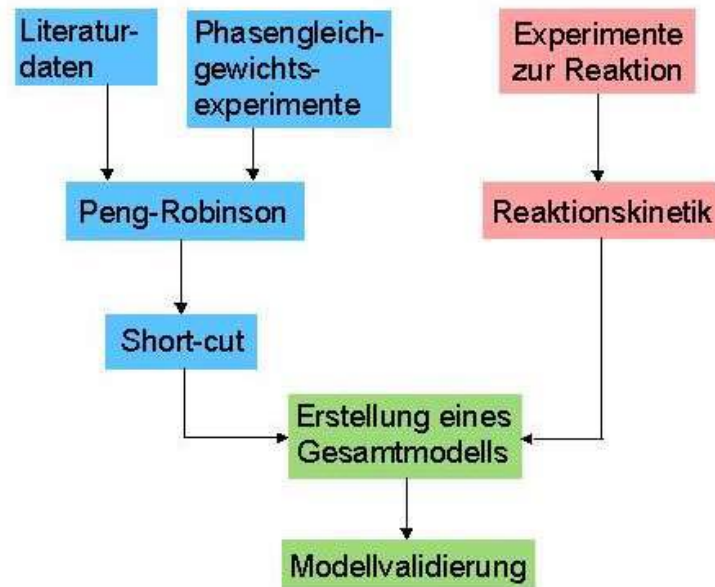


Abb. 5.38: Konzept zur Modellierung des Gesamtprozesses

Für die Modellierung des Gesamtprozesses wurde auf eine bei Fraunhofer UMSICHT entwickelte Modellierungsplattform zurückgegriffen [WACK03]. In der generativen objektorientierten Modellierung (GenOOM) steht die Realisierung flexibler, transparenter und weiterverwendbarer Modelle für spezifische Unit Operations im Mittelpunkt. Das Anlagenfließbild wird als Basis für eine synchron-parallele Formulierung allgemeiner physikalisch mathematischer Modelle für die Einzelkomponenten nebst Codegenerierung, Modelldokumentation und grafischer Benutzerschnittstelle verwendet. Das System aggregiert die zunächst separat formulierten Teilmodelle anhand der im Fließbild anzugebenden Verknüpfungen zu einem vollständigen, konsistenten Gesamtmodell des betrachteten Prozesses. GenOOM kann hierzu auf unterschiedlichen Abstraktionsebenen genutzt werden:

- Höchste Abstraktionsebene (ohne Modellbibliothek): Grafisch unterstützte Erstellung eigener mathematischer Modellkomponenten und Modelle
- Mittlere Abstraktionsebene (Branchenspezifische Modellbibliothek): Grafisch unterstützte Erstellung eigener mathematischer Modelle auf Basis vorgefertigter Modellkomponenten
- Kleinste Abstraktionsebene (Vorgefertigter Modellkatalog): Nutzung bereits vorkonfigurierter Modelle im täglichen Einsatz.

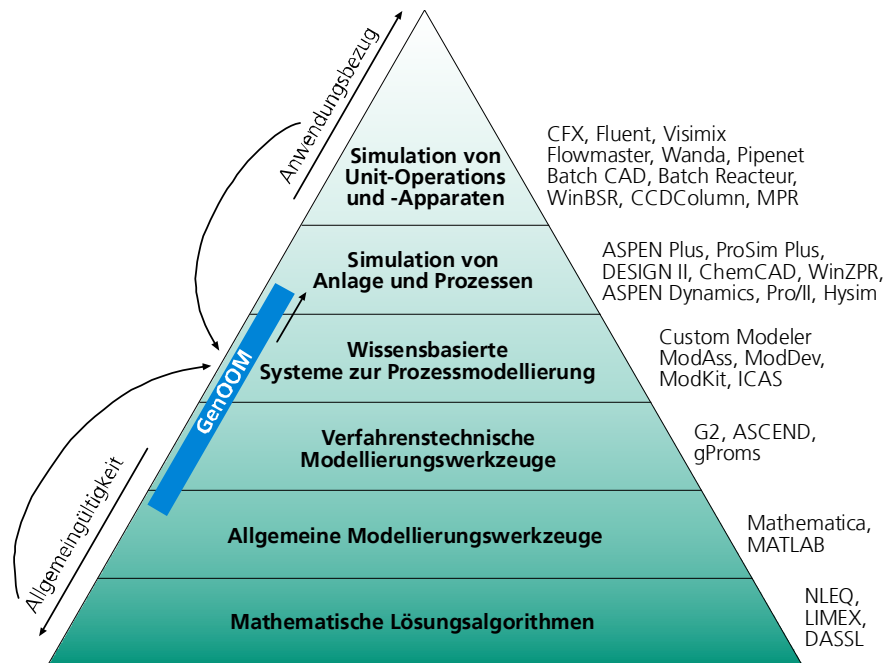


Abb. 5.39: Einordnung von GenOOM im Hinblick auf die anwendungsbezogene Spezialisierung

Für dieses Projekt wurde die Modellierungsumgebung an die spezifischen Anforderungen eines kontinuierlich betriebenen Prozesses mit enzymatischen und überkritischen Fluiden adaptiert. Dazu war die Anpassung bzw. die Integration der Modelle an bzw. für Prozessbedingungen der kontinuierlich betriebenen Versuchsanlage erforderlich. In Abbildung 5.40 ist die daraus resultierende Benutzeroberfläche mit dem Fließschema der Anlage dargestellt. Die einzelnen Anlagenkomponenten werden in modularer Weise miteinander verknüpft. Jeder Komponente werden hierfür über die Definition von Parametern und Variablen Eigenschaften zugewiesen. Schnittstellen erlauben die Verbindung mit den FORTRAN-Programmen zur Enzymkinetik (Kap. 5.4.1) und den Phasengleichgewichten (Kap. 5.4.2).

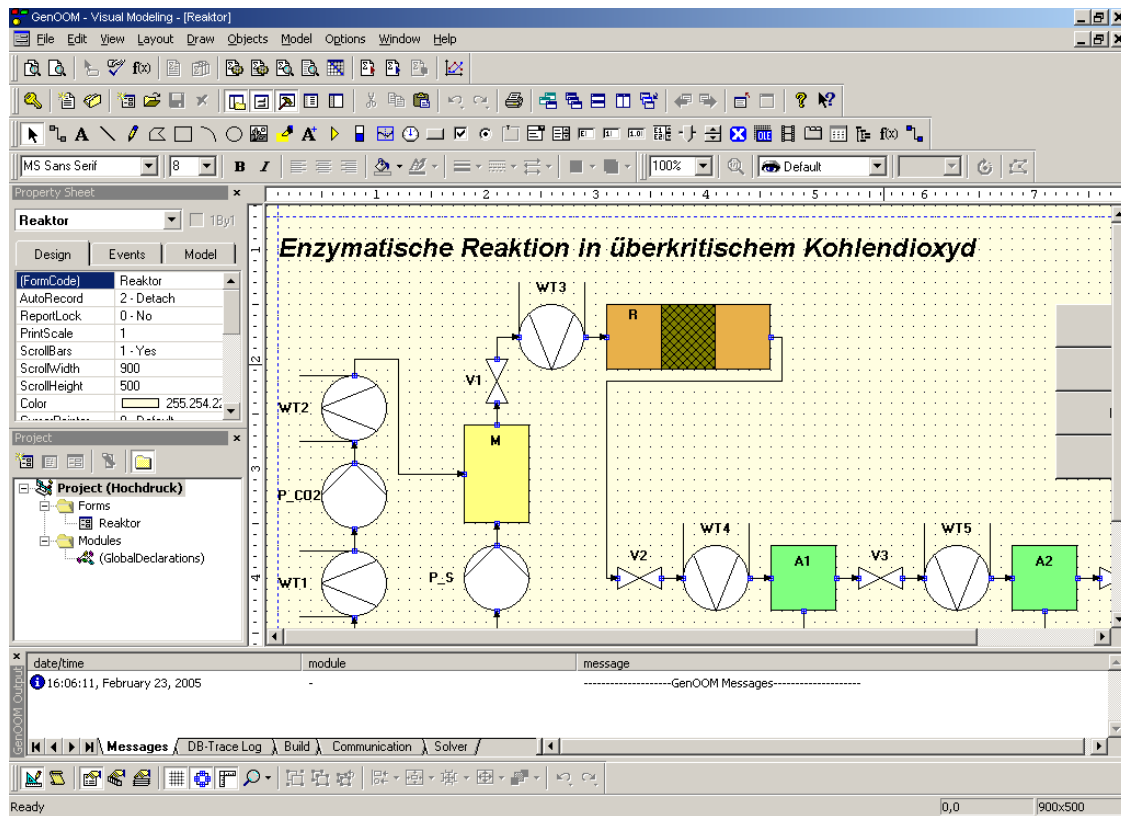


Abb. 5.40: Benutzeroberfläche von GenOOM mit dem Fließbild der kontinuierlich betriebenen Versuchsanlage

Die Modellgleichungen zur Enzymkinetik werden im Equation-Editor (Abb. 5.41) eingegeben, wonach der Modell-Quellcode in FORTRAN generiert wird (Abb. 5.42). Automatisch wird auch die Generierung der Modelldokumentation übernommen (Abb. 5.43).

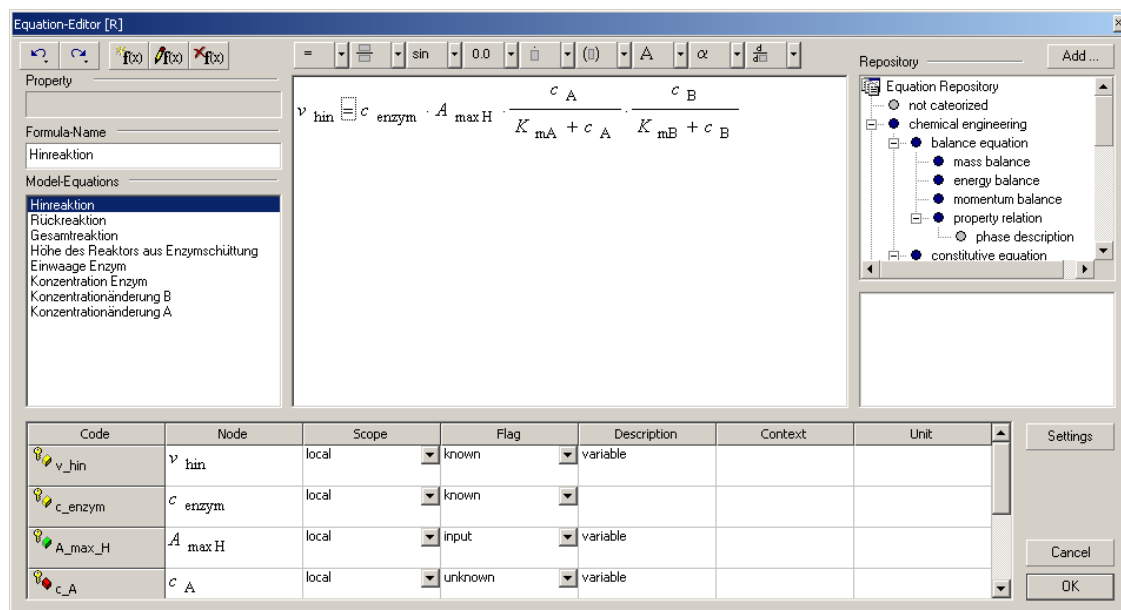
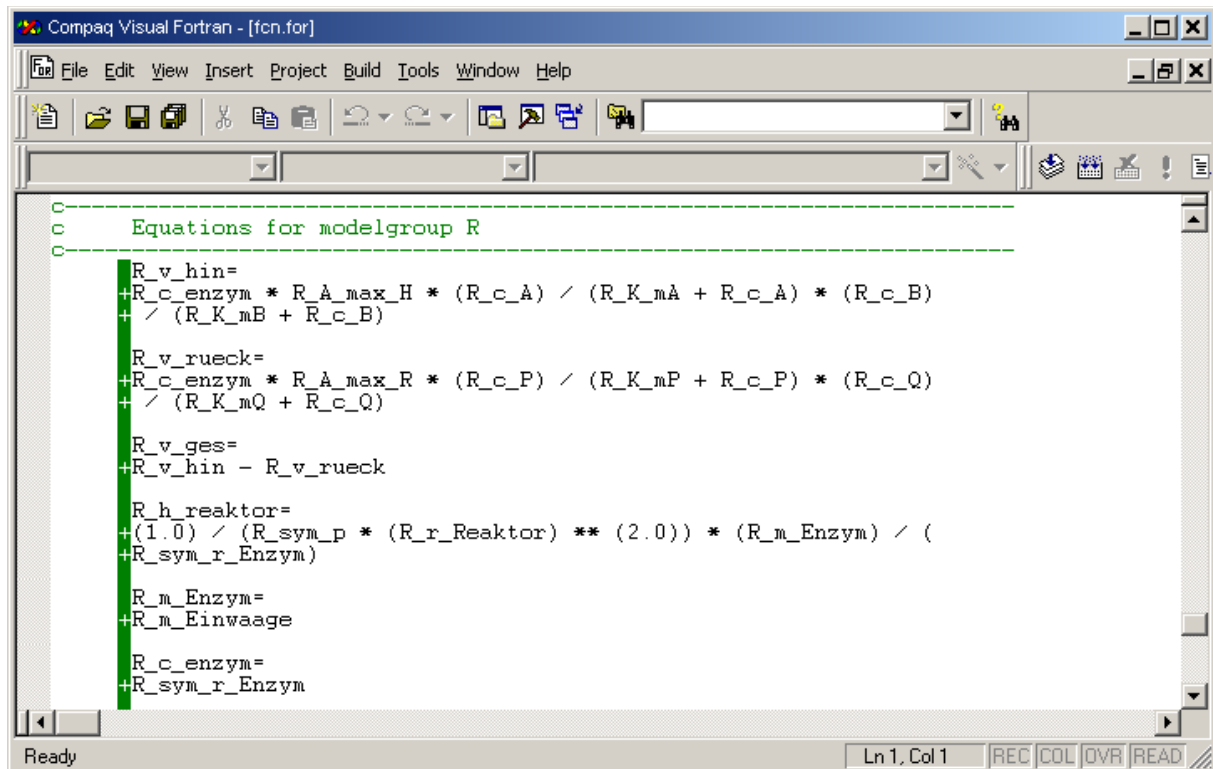


Abb. 5.41: Equation-Editor von GenOOM mit eingegebener Gleichung



```

Compaq Visual Fortran - [fcn.for]
File Edit View Insert Project Build Tools Window Help

-----
Equations for modelgroup R
-----

R_v_hin=
+R_c_enzym * R_A_max_H * (R_c_A) / (R_K_mA + R_c_A) * (R_c_B)
+ / (R_K_mB + R_c_B)

R_v_rueck=
+R_c_enzym * R_A_max_R * (R_c_P) / (R_K_mP + R_c_P) * (R_c_Q)
+ / (R_K_mQ + R_c_Q)

R_v_ges=
+R_v_hin - R_v_rueck

R_h_reaktor=
+(1.0) / (R_sym_p * (R_r_Reaktor) ** (2.0)) * (R_m_Enzym) / (
+R_sym_r_Enzym)

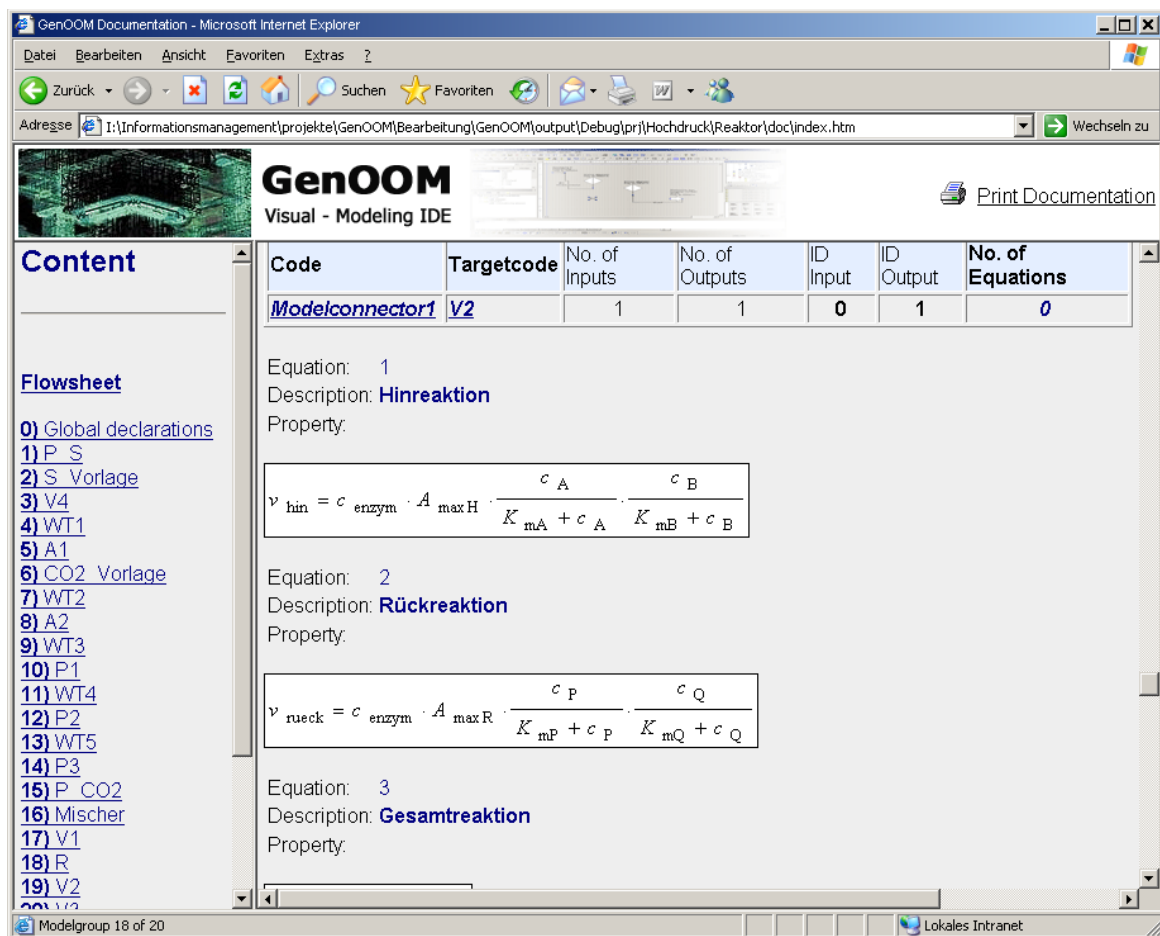
R_m_Enzym=
+R_m_Einwaage

R_c_enzym=
+R_sym_r_Enzym

```

Ready Ln 1, Col 1 REC COL QVR READ

Abb. 5.42: Generierung des Quellcodes in FORTRAN



GenOOM Visual - Modeling IDE

Print Documentation

Code	Targetcode	No. of Inputs	No. of Outputs	ID Input	ID Output	No. of Equations
Modelconnector1	V2	1	1	0	1	0

Equation: 1
Description: **Hinreaktion**
Property:

$$v_{hin} = c_{enzym} \cdot A_{maxH} \cdot \frac{c_A}{K_{mA} + c_A} \cdot \frac{c_B}{K_{mB} + c_B}$$

Equation: 2
Description: **Rückreaktion**
Property:

$$v_{rueck} = c_{enzym} \cdot A_{maxR} \cdot \frac{c_P}{K_{mP} + c_P} \cdot \frac{c_Q}{K_{mQ} + c_Q}$$

Equation: 3
Description: **Gesamtreaktion**
Property:

Modelgroup 18 of 20 Lokales Intranet

Abb. 5.43: Automatisch erstellte Modelldokumentation in GenOOM

Wie bereits bei der Betrachtung der Gleichgewichte in den Abscheidern angedeutet, haben die Simulationsergebnisse für die Herstellung von Isoamylacetat gezeigt, dass für dieses Stoffsystem aufgrund der geringen Unterschiede in den K-Werten der Einzelkomponenten keine zufriedenstellende Stofftrennung in den Abscheidern erzielt werden kann. Die dort abgeschiedenen Produktströme müssen einer nachfolgenden konventionellen, z.B. destillativen Trennung zugeführt werden. Da die erreichbaren Konzentrationsunterschiede zu gering sind, bietet es sich nicht an, die Abscheidung mehrstufig fraktioniert durchzuführen. Wie z.B. bei Extraktionsprozessen mit überkritischem Kohlendioxid, sollte die gewählte Druckstufe der Abscheidung alleine im Hinblick auf die Rückführung des CO₂ optimiert werden. Diese Aussage muss jedoch nicht für alle Stoffsysteme gelten. Bei Esterbildungsreaktionen, in denen länger-kettige Acylgruppen und Alkohole beteiligt sind, kann durch den Siedepunktunterschied der resultierenden Wachsester gegenüber den Edukten eine fraktionierte Trennung durchaus sinnvoll sein.

Auf den in der prinzipiellen Vorgehensweise gezeigten Abschluss der Modellbildung durch die Validierung in Technikumsversuchen musste auf Grund der Probleme mit der Versuchsanlage verzichtet werden (vgl. Kap. 5.2.4). Da die Scale-up-Fähigkeit des Modells nicht geprüft werden konnte und somit zum jetzigen Zeitpunkt keine belastbare Übertragung auf den Produktionsmaßstab möglich ist, wurde auf Berechnungen zur Wirtschaftlichkeit verzichtet. Die Betrachtung der Reaktionsgeschwindigkeiten zeigt jedoch, dass der Einsatz von überkritischem CO₂ als Lösemittel vergleichbare Raum-Zeit-Ausbeuten wie bei Reaktion in organischen Lösemitteln liefert.

6 Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des Antrags

Ziel des Projekts war die wissenschaftlich fundierte Modellierung der enzymatischen Wertstoffproduktion in überkritischen Fluiden als Reaktionsmedium. Dazu sollte eine Strategie zur Verknüpfung thermodynamischer Betrachtungen mit experimentellen Laboruntersuchungen zu einer modellhaften Beschreibung der Prozesse ausgearbeitet werden.

Dieses Ziel des Projekts wurde erreicht. Sowohl die experimentellen Methoden und Versuchsanordnungen als auch das mathematische Programm zur Beschreibung des Gesamtprozesses wurden im Rahmen dieses Forschungsprojektes bereitgestellt.

Es wurden Enzyme und Immobilisate identifiziert, die für den Einsatz in überkritischem CO₂ geeignet sind. Bei den Reaktionsexperimenten zeigte sich, dass nicht jedes Enzym, das Reaktionen in organischen Lösemitteln katalysiert, auch für dieses Medium geeignet ist. Auch der optimale Temperaturbereich in überkritischen CO₂ unterscheidet sich von dem in Lösemitteln. Der hier an einer Umesterungsreaktion gewählte reaktionskinetische Ansatz kann auch für die Übertragung auf andere enzymatische Reaktionen verwendet werden.

Es wurden weiterhin, wie im Antrag vorgesehen, die Phasengleichgewichte der bei der Reaktion beteiligten Substanzen sowie die Verteilungskoeffizienten (K-Faktoren) berechnet. Dazu wurden entsprechende Programme entwickelt und auf die relevanten Stoffsysteme angewendet. Aus diesen Phasengleichgewichtsberechnungen der Mehrstoffgemische mit der Peng-Robinson-Gleichung wurden geeignete Short-cut-Gleichungen für die relevanten Zustandsbereiche abgeleitet. Die Simulation des Gesamtprozesses kann so in kompakter Weise erfolgen. Berechnungen der Phasengleichgewichte während der Prozesssimulation, deren Konvergenz bei den betrachteten Mehrstoffsystemen eine hohe Abhängigkeit von den gewählten Startwerten aufweist, können vermieden werden. Für die Modellierung des Gesamtprozesses wurde eine bei Fraunhofer UMSICHT entwickelte Modellierungsplattform verwendet, in die die Modelle für Reaktionskinetik und Phasengleichgewicht eingebunden wurden. Mit Hilfe dieser adaptierten Modellierungsplattform ist es in einfacher Weise möglich, auch komplexe Prozesse - wie z.B. mit fraktionierter Abscheidung - abzubilden.

Zur Verifizierung der Modellierung sollten Untersuchungen an einer bei Fraunhofer UMSICHT vorhandenen Hochdruckanlage mit einem 6-Liter-Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Wegen gravierender technischer Probleme an dieser Anlage ließen sich die Verifizierungsexperimente nicht im vorgesehenen Umfang durchführen. Die angestrebte Scale-up-Fähigkeit des Modells konnte daher im Rahmen des Vorhabens nicht überprüft werden.

Die an den Laborversuchsanlagen gewonnenen Erkenntnisse haben das Know-how um die praktische Ausgestaltung von Reaktionsverfahren in überkritischem CO₂ bei den Forschungsstellen enorm gesteigert und die Möglichkeit zur technischen Umsetzung deutlich verbessert.

7 Wissenschaftlich-technischer Nutzen

Im Rahmen der Projektbearbeitung gelang es, thermodynamische Betrachtungen mit experimentellen Laboruntersuchungen zu einer modellhaften Beschreibung der Prozesse zu verknüpfen. Die auf der Grundlage experimenteller Untersuchungen erarbeitete physikalisch-mathematische Modellierung beschreibt die Wirkung verschiedener Einflussfaktoren wie Stoffanteile und Verweilzeit auf die Verfahrensergebnisse. Die Modellierung kann jetzt als Basis für die technische Umsetzung der enzymatischen Reaktionen in überkritischen Fluiden dienen. Damit konnte das Laborverfahren einer industriellen Anwendung entscheidend näher gebracht werden. Diese modellhafte Beschreibung des Prozesses kann auch allgemein zur Auslegung von Produktionsverfahren dienen, denn es ist möglich, sie methodisch auf weitere Reaktionen zu übertragen.

Es glückte, über die Grenzen der beteiligten Institute hinweg eine enge, interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen den Fachgebieten der Ingenieurwissenschaften, der Chemie, der Biologie, der Mischphasen-Thermodynamik sowie der molekularen Thermodynamik und der Informatik zu installieren. Die Zusammenarbeit der am Projekt beteiligten Partner aus diesen verschiedenen Fachrichtungen wird auch in Zukunft Nutzen bringen, da verwandte Fragestellungen in ähnlicher Weise bearbeitet werden können.

Auf der Basis der in diesem Vorhaben entwickelten Modellierung können weitere innovative technische Prozesse ausgelegt werden, die Einsparungen bei den Herstellungskosten und Umweltentlastungen durch den Verzicht auf lösemittelbasierte Systeme erwarten lassen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Tensiden. Die erzeugten Produkte sind qualitativ sehr hochwertig, da keine Verunreinigungen durch das Reaktionsmedium auftreten. Die erarbeiteten Forschungsergebnisse werden daher in unterschiedlichen Branchen wie Chemie, Pharmazie, Lebensmitteltechnik, Apparate- und Maschinenbau zur Umsetzung gelangen.

In dieser Hinsicht ist aus wissenschaftlicher und technischer Sicht wesentlich, dass damit sowohl für die Verwendung enzymkatalysierter Reaktionen als auch für den Einsatz von überkritischem Kohlendioxid neue Anwendungsgebiete erschlossen werden. Da es sich in beiden Fällen um umweltschonende Verfahren handelt, da Reaktionen unter mildereren Bedingungen durchgeführt werden können bzw. der Gebrauch organischer Lösungsmittel vermieden werden kann, wird damit die Verbreitung umweltschonender Methoden in der Industrie auf breiter Basis gefördert. Beide Verfahren sind zwar bekannt, aber haben noch nicht die Verbreitung erfahren, die grundsätzlich möglich ist.

Da Enzyme als Teil lebender Systeme bevorzugt in der Natur vorkommende Stoffe umsetzen, werden mit der zunehmenden Verbreitung enzymkatalysierter Reaktionen insbesondere Verfahren unter Verwendung dieser Substrate gefördert. Somit können manche der Ausgangsstoffe für die untersuchten Reaktionen aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden, so dass dadurch ein erweitertes Marktpotenzial für diese Rohstoffquelle erschlossen wird.

8 Wirtschaftlicher Nutzen für KMU

Im Rahmen der Projektdurchführung wurde die lipasekatalysierte Herstellung von Isoamylacetat umfangreich untersucht. Isoamylacetat ist die Hauptkomponente des Bananenaromas. Damit sowie auch mit den erfolgreichen orientierenden Versuchen zur Herstellung von Citronellylacetat konnte die Anwendbarkeit enzymkatalysierter Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid zur Herstellung von Aromastoffen, speziell von Aromaestern, gezeigt werden.

Daraus lässt sich ein direkter wirtschaftlicher Nutzen für KMU ableiten, denn Aromaester sind wesentliche Bestandteile aller fruchtigen Aroma- oder Riechstoffmischungen. Von den etwa 200 auf dem Markt erhältlichen natürlichen Aromastoffen sind die Hälfte Ester. Die Produktion von Riechstoffen und Aromen ist ein Wachstumsmarkt, der weltweite Gesamtmarkt beträgt 11 Mrd. Euro im Jahr 2000. Die Wachstumsraten liegen bei zwei bis drei Prozent jährlich.

Da der Markt einem erheblichen Kostendruck ausgesetzt ist, bieten neuartige Verfahrensverbesserungen den engagierten Unternehmen Marktvorteile. Die Umsetzung der Forschungsergebnisse in ein technisch ausgereiftes Produktionsverfahren trägt entscheidend zur Stärkung der in dieser Branche tätigen kleinen und mittleren Unternehmen bei, da diese zur Senkung der Herstellungskosten durch Innovationen gezwungen sind. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang auch die von der Industrie verlangte Entwicklung von mehrproduktfähigen Produktionsanlagen, was ein wesentlicher Aspekt der hier entwickelten Technologie ist.

Für die mittels Reaktion in überkritischem CO₂ hergestellten Produkte bieten sich dadurch, dass sie unter Vermeidung umweltschädlicher Lösungsmittel hergestellt wurden, auch Chancen im Markt ökologisch sensibler Verbraucher. Dieser spezielle Kundenkreis ist bekanntermaßen bereit, für spezielle Anwendungen bei Vorliegen umweltfreundlicher Produktion und rückstandsfreier Produkte höhere Preise zu akzeptieren.

Ein weiterer nicht unmittelbar quantifizierbarer wirtschaftlicher Aspekt besteht darin, dass mit den hier vorgestellten Verfahren die anwendenden Unternehmen Zugang zur sog. "Weißen Biotechnologie" erhalten und sich damit in Verfahren nachhaltiger industrieller Produktion engagieren. Dies ist in zweifacher Hinsicht von wirtschaftlichem Nutzen: Zum einen erleichtert dies einen kurzfristigen Zugang zu weiteren Anwendungen enzymkatalysierter Reaktionen in überkritischen Fluiden. Insbesondere die enantioselektiven Reduktion von Ketonen (vor allem Octanon) hat bereits starkes Interesse bei Mitgliedern des projektbegleitenden Ausschusses hervorgerufen. Eine weitere Einsatzmöglichkeit ist die Synthese von Fettsäureestern für den Einsatz in Kosmetika und Körperpflegemitteln (Thum, O.: Enzymatic Production of Care Specialties Based on Fatty Acid Esters. Tenside Surf. Det. 41(6), 287-290 (2004)). Andererseits kann durch entsprechende Werbung das Image des Unternehmens gezielt positiv beeinflusst werden, um auch für andere Produkte neue Kundenkreise zu erschließen.

Die Verfahren zur enzymatischen Katalyse in überkritischen Fluiden werden für kleine und mittelständische Anlagen-, Apparate- und Maschinenhersteller in Deutschland, die sich mit anspruchsvollen Aufgaben in Planung und Bau von Hochdruckanlagen beschäftigen, ein zusätzliches Marktpotenzial erschließen, dessen Ausschöpfung qualifizierte Arbeitsplätze sichern hilft.

Die in diesem Projekt erarbeiteten Ergebnisse können eine Grundlage dafür bilden, dass Unternehmen auch allgemeine Erfahrungen in der Anwendung überkritischer Fluide sammeln können. Ein Teil dieser Erfahrungen lassen sich auch auf andere Anwendungsgebiete wie zum Beispiel Kristallisationsprozesse, Imprägnierung oder Extraktion übertragen, so dass sich für die Unternehmen u. U. neue Arbeitsgebiete, die zum wirtschaftlichen Ertrag beitragen werden, ergeben.

Während die Arbeiten zur Enzymkatalyse in überkritischem CO₂ nicht unmittelbar in die Praxis bei einem Unternehmen umgesetzt werden konnten, haben Teile der vorbereitenden Arbeiten, bei denen organische Lösungsmittel benutzt wurden, um Vergleichsdaten zu ermitteln, bei Jülich Fine Chemicals, deren Geschäftsführer im Projektbegleitenden Ausschuß sitzt, starkes Interesse hervorgerufen. Ein Teil der Untersuchungen zur Reduktion von Octanon im Zweiphasensystem, vor allem zur Beeinflussung der Gleichgewichtslage, konnten dort in die Praxis umgesetzt werden und wurden auszugsweise gemeinsam in einem Übersichtsartikel publiziert [Ecks04].

9 Innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten

Enzymkatalysierte Reaktionen in überkritischen Lösungsmitteln wurden bislang nur im Labormaßstab untersucht, obwohl sich durch die Verwendung des neuen Lösungsmittels neuartige Anwendungen mit Substraten, die sich im üblichen Lösungsmittel Wasser nur schlecht lösen, erschließen. Ein Hindernis für weitergehende Untersuchungen war das Fehlen von Kenntnissen über die modellhafte Erfassung der Reaktionen, das auch dazu geführt hat, dass bislang keine Bereitschaft bestand, in notwendige Hochdruckapparate zu investieren.

Ein innovativer Beitrag des hier beschriebenen Projekts umfasst daher die systematische modellhafte Beschreibung des Prozesses, denn es wird möglich sein, die Scale-up-Fähigkeit der Modelle durch Verifizierungsexperimente in Technikumsanlagen nachzuweisen. Diese Vorgehensweise wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Damit wird auch die Hemmschwelle für die bereits erwähnten notwendigen Investitionen gemindert werden. Es wird dann zu erwarten sein, dass für viele weitere Produktionsprozesse innovative Reaktionsschritte unter Verwendung von Enzymen mit überkritischem Kohlendioxid als Lösungsmittel untersucht werden.

Wie bereits erwähnt erschließen sich mit Verwendung von überkritischem Kohlendioxid als neuartigem Lösungsmittels einerseits neue Anwendungen für enzymkatalysierte Reaktionen, die bislang insbesondere aufgrund zu niedriger Löslichkeit der Substrate für eine großtechnische Anwendung nicht von Interesse waren. Es ist aber andererseits zu erwarten, dass jede neue Anwendung von überkritischem Kohlendioxid in der Produktion die Bereitschaft erhöht, dieses Lösungsmittel auch für andere Anwendungen durchaus auch außerhalb enzymkatalysierter Reaktionen einzusetzen. Hier sind insbesondere die Vorteile des Kohlendioxids hinsichtlich der Umweltfreundlichkeit der betrachteten Verfahren hervorzuheben.

Die Verwendung überkritischen Kohlendioxids als Lösungsmittel bietet auch hinsichtlich der Aufarbeitung innovative Perspektiven, denn in vielen Fällen besitzen die Produkte ebenfalls eine hohe Löslichkeit in überkritischem Kohlendioxid, so dass die Isolierung aus diesem Lösungsmittel heraus erfolgen kann. Hierbei handelt es sich um innovative Verfahren, da sich überkritisches Kohlendioxid im Gegensatz zu den meisten anderen organischen Lösungsmitteln problemlos entfernen lässt, indem der Druck abgesenkt wird. Ein weiterer innovativer Ansatz besteht darin, dass durch stufenweisen Druckabbau durch fraktionierte Abscheidung ggf. eine erste Aufreinigung des oder der Zielprodukte durchgeführt werden kann. Es ist somit möglich, Reaktion und Aufreinigung miteinander zu verknüpfen.

Die Innovationen wurden bereits während der Laufzeit des Vorhabens durch Veröffentlichungen und Kongressbeiträge dem interessierten Fachpublikum bekannt gemacht. Im folgenden Abschnitt sind die Veröffentlichungen aufgelistet, die auf der Grundlage der Projektergebnisse entstanden sind.

10 Veröffentlichungen im Rahmen des Vorhabens

Ehrenstein, U.; Kabasci, S.; Weber, A.; Danzig, J.; Eckstein, M.; Kragl, U.; Jurtzik, J.; Kraska, T.
Enzymatische Reaktionen in überkritischen Fluiden
In: Kreysa, G. ; Nick, L.: 21. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2003 : Mit Firmenpräsentation Biotechnologie. 2.-4. April 2003 Technische Universität München Garching Frankfurt/Main : DECHEMA, 2003

Ehrenstein, U.; Kabasci, S.; Eckstein, M.; Kragl, U.; Jurtzik, J.; Kraska, T.
Entwicklung technischer Prozesse zur Durchführung enzymatisch katalysierter Reaktionen in überkritischen Fluiden
Chemie Ingenieur Technik 76(9), 1259, 2004

Eckstein, M., Villela Filho, M., Liese, A., Kragl, U.
Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction; Chem. Comm. (2004) 1084-1085

Eckstein, M., Daußmann, T., Kragl, U.
Recent developments in NAD(P)H regeneration for enzymatic reductions in one- and two-phase systems; Biocatal. Biotrans. 22 (2004) 89-96:

(T. Daußmann, Geschäftsführer Jülich Fine Chemicals, Mitglied im projektbegleitenden Ausschuss)

Auf folgenden Tagungen wurden die Ergebnisse in Form von Vorträgen oder Postern vorgestellt:

M. Eckstein; U. Kragl; U. Ehrenstein; S. Kabasci, *Solvent-Engineering for a lipase-catalysed transesterification*, Enzymes in Lipid Modification, 26.-28. März 2003, Greifswald

Marrit Eckstein, Jan Schumacher, Thomas Daußmann, Udo Kragl
Alkoholdehydrogenase-katalysierte Reduktion von 2-Octanon zu (R)-2-Octanol im 2-Phasen-System; XXXVII. Jahrestreffen Deutscher Katalytiker;
DECHEMA, 17. – 19.03.2004; Weimar

Cinquemani, C.; Ehrenstein, U.; Kabasci, S.; Danzig, J.; Eckstein, M.; Kragl, U.; Jurtzik, J.; Kraska, T.:
Enzymatische Reaktionen in überkritischen Fluiden
Poster; GVC/Dechema 21. Jahrestagung der Biotechnologen; München; 2.-4. April 2003

Ehrenstein, U. (Vortragende); Cinquemani, C.; Kabasci, S.; Danzig, J.; Eckstein, M.; Kragl, U.; Jurtzik, J.; Kraska, T.:
Entwicklung technischer Prozesse zur Durchführung enzymatischer Reaktionen in überkritischen Fluiden
Vortrag; GVC-Fachausschuss »Hochdruckverfahrenstechnik«; Karlsruhe; 4.-5. März 2004

Ehrenstein, U.; Cinquemani, C.; Kabasci, S; Danzig, J.; Eckstein, M.; Kragl, U.; Jurtzik, J.; Kraska, T.:

Enzymkatalysierte Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid

Poster, BioPerspectives 2004; Wiesbaden; 04.-06. Mai 2004

Ehrenstein, U.; Jelen, E.; Poturalski, S.; Kabasci, S; Eckstein, M.; Kragl, U.; Jurtzik, J.; Kraska, T.:

Enzymatische Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid

Poster, DECHEMA/GVC-Jahrestagung; Karlsruhe; 12.-14. Oktober 2004

11 Ausblick

Mit dem Abschluss des Projekts eröffnen sich neue Möglichkeiten für die sogenannte grüne Chemie.

Einerseits erschließen sich für die Herstellung vieler Stoffe, die trotz grundsätzlicher Eignung aufgrund der geringen Löslichkeit der Substrate im natürlichen wässrigen Medium nicht enzymkatalysiert hergestellt werden können, neue Synthesewege auf der Grundlage enzymkatalysierter Reaktionen. Bislang werden viele dieser Stoffe nur mit üblichen synthetischen Methoden (häufig mit hohem Energieeinsatz und unter Gebrauch organischer Lösungsmittel) hergestellt.

Eine Alternative stellt ggf. die Anwendung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln dar, die zwar einerseits durch den Einsatz des Biokatalysators ebenfalls einen verringerten Energieaufwand erfordert, andererseits aber nicht in einem unschädlichen Lösungsmittel durchgeführt wird. Außerdem wird die Stabilität der eingesetzten Enzyme gegenüber dem Einsatz im wässrigen Medium häufig deutlich verringert und die Produktisolierung wird erschwert. Häufig müssen zur Entfernung der organischen Lösungsmittel erhöhte Temperaturen eingesetzt werden, die für empfindliche Produkte durch thermischen Zerfall häufig die Ausbeute verringern.

Aber auch in einer weiteren Hinsicht erschließen sich neue Chancen für die grüne Chemie. Die Aufarbeitung der Reaktionsprodukte enzymkatalysierter Umsetzungen im wässrigen Milieu erfordert häufig organische Lösungsmittel als Extraktionsmittel. Bei Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid als Lösungsmittel wird die Aufarbeitung umweltfreundlicher, da sich das Reaktionsmedium mit einfachen Mitteln (Druckerniedrigung) rückstandsfrei entfernen lässt.

Die Akzeptanz für überkritisches Kohlendioxid für verfahrenstechnische Anwendungen mit jeder erfolgreichen Anwendung größer (ebenfalls in Hinblick auf grüne Chemie). Dies ist nicht auf das jeweilige Anwendungsgebiet beschränkt. Daher werden die Ergebnisse dieses Projektes auch eine Strahlwirkung auch außerhalb direkter chemischer Umsetzungen haben. Denkbar sind hierbei z.B. Anwendungen in der Kristallisation, für Extraktion oder in der Imprägnierung.

Sowohl in der Erschließung neuer Themen in direktem Zusammenhang mit der Themenstellung dieses Projekts als auch in Hinblick auf die erwähnten neuen Anwendungen stehen die beteiligten Partner für weitere Projekte insbesondere in Zusammenarbeit mit interessierten Unternehmen zur Verfügung. Hiermit soll sowohl die Nutzung von enzymkatalysierten Reaktionen in der Synthese als auch die Anwendung überkritischer Fluide gefördert werden.

Es ist zu erwarten, dass die genannten Arbeitsgebiete insbesondere das Interesse kleiner und mittlerer Unternehmen erwecken werden, da diese häufig spezialisierte Produkte in kleineren Produktionsmengen herstellen, für die die hier vorgestellten Verfahren von Interesse sind.

Auch für diese neuen Anwendungen wird es wesentlich sein, mit geeigneten Modellen Werkzeuge für ein Scale-up zur Verfügung zu stellen. Hier sind die beteiligten Institute offen für die Bearbeitung neuer Fragestellungen.

12 Literaturverzeichnis

- [AALT91] Aaltonen, O.; Ratakylä, M.:
Biocatalysis in supercritical CO₂
CHEMTECH **4** (1991) S. 240-248
- [AALT99] Aaltonen, O., *Enzymatic Catalysis*, Chemical Synthesis using supercritical fluids,
- [AEHL04] Aehle, W., *Enzymes in industry*, Weinheim, Wiley-VCH, 2 nd ed. (2004)
- [BOMM04] Bommarius, A. S., Riebel, B., *Biocatalysis*, Weinheim, Wiley-VCH, 1st ed. (2004)
- [BUCH97] Buchholz, K.; Kasche, V.:
Biokatalysatoren und Enzymtechnologie
Verlag VCH Weinheim, New York 1997
- [CHRI95] A. Chrisochoou, K. Schaber, U. Bolz, *Fluid Phase Equilibria* 108 (1995) 1
- [DAVI91] David W. Jennings, Rong-Jwyn Lee, and Aryn S. Teja' *J. Chem. Eng. Data* 1991, 36, 303-307: Vapor-Liquid Equilibria in the Carbon Dioxide + Ethanol and Carbon Dioxide + 1-Butanol Systems
- [DAY96] C.-Y. Day, C. J. Chang, C.-Y. Chen, *J. Chem. Eng. Data*, 41 (1996) 839.
- [FABE00] Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Berlin, Springer, 4 th ed. (2000)
- [GAMS01] T. Gamse, R. Marr, *J. Chem. Eng. Data* 46 (2001) 117.
- [GUBI93] Gubicza, L.; Kelemen-Horváth, J. *of Molecular Catalysis*, 84 (1993) L27-L32
- [HAMM85] Hammond, D. A.; Karel, M.; Klivanov, A. M.; Krukonis, V. J.:
Appl. Biochem. Biotech. **11** (1985) S. 393-400
- [HART00] Hartmann, T., Schwabe, E., Scheper, T., Combes, D., *Enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide*, Stereoselective Biocatalysis, Patel, R. N., New York, Marcel Dekker, 1st ed. (2000), 799-838
- [JESS99] Jessop, P. G., Leitner, W., Weinheim, Wiley-VCH, 1st ed. (1999), 414-445
- [JÖNS98] Jönsson, A., van Breukelen, W., Wehtje, E. ; Adlercreutz, P., Mattiasson, B. *The influence of water activity on the enantioselectivity in the enzyme-catalyzed reduction of 2-pentanone*, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* (1998) **5**, 273-276.
- [KAMA95] Kamat, S. V.; Beckman, E. J.; Russell:
Enzyme activity in Supercritical Fluids
Crit. Rev. Biotechnol. **15** (1995) S. 895-904
- [KERR03] Kerr, E., Industrial enzymes spearhead white biotech., *Genetic Engineering News* 23 (2003), 64-66

- [KLIB01] Klibanov, A. M., *Improving enzymes by using them in organic solvents*, Nature 409 (2001), 241-246
- [KRAG03] Kragl, U., Eckstein, M., Kaftzik, N., *Biocatalytic reactions in ionic liquids*, Ionic liquids in synthesis, Wasserscheid, P., Welton, T., Weinheim, Wiley-VCH, 1st ed. (2003), 336-347
- [LEVE99] Levenspiel, O., Chemical Reaction Engineering, Third Edition, Wiley 1999
- [MATS00] Matsuda, T., Harada, T., and Nakamura, K., Alcohol dehydrogenase is active in supercritical carbon dioxide, Chem. Comm. (2000), 1367-1368
- [MATS03] Matsuda, T., Watanabe, K., Kamitanaka, T., Harada, T., and Nakamura, K., *Biocatalytic reduction of ketones by a semi-continuous flow process using supercritical carbon dioxide*, Chem. Comm. (2003), 1198-1199
- [MICH96] Michor, H.; Gamse, T.; Marr, R.:
Enzymkatalyse in überkritischem Kohlendioxid – Racematabtrennung von D,L-Menthol
Chemie Ingenieur Technik **68**.(1996) S. 1120-1121
- [MILL90] Miller, D. A.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M.:
Enzymatic Inesterification of Triglycerides in Supercritical Carbon Dioxide
Ann. N.Y. Acad. Sci. **613** (1990) S. 534-537
- [MULL01] Molecular-Based Equations of State for Associating Fluids: A Review of SAFT and Related Approaches
Muller, E. A.; Gubbins, K. E.;
Ind. Eng. Chem. Res.; (Review); 2001; 40(10); 2193-2211.
- [NOVO00] Novozym 435, Product Sheet 2000, Novozymes A/S
- [OECD98] OECD Studie:
Biotechnologie für umweltverträgliche industrielle Produkte und Verfahren: Wege zur Nachhaltigkeit in der Industrie
(1998) S. 78-79
- [OECD01] Organisation for Economic Cooperation and Development, *The application of biotechnology to industrial sustainability* (2001)
- [OVER99] Overmeyer, A.:
Enzyme unter Hochdruck
BioTec **2** (1999) S. 50-52
- [PAST89] Pasta, P.; Mazzola, G.; Carrea, G.; Riva, S.:
Biotechnol. Letters **11** (1989) S. 643-648
- [PATE00] Patel, R. N., *Stereoselective Biocatalysis*, New York, Marcel Dekker (2000)
- [PENG76] D. Y. Peng, D. B. Robinson, Ind. Eng. Chem. Fundam. 15 (1976) 59.
- [RAND88] Randolph et al. AIChE J. **34** (1988) S. 1354-1360

- [RANT03] van Rantwijk, F.; Lau, R. M.; Sheldon, R. A., *Biocatalytic transformations in ionic liquids*, Trends in Biotechnology 21 (2003), 131-138
- [ROME05] Romero, M. D.; Calvo, L.; Alba, C.; Habulin, M.; Primožic, M.; Knez, Z. Enzymatic synthesis of isoamylacetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide, J. of Supercritical Fluids 33 (2005) 77-84
- [SCHM01] Schmid, A. R.; Franceschi, S.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A.; Thion, L.; Erard, M.; Vidal, C., *Industrial biocatalysis today and tomorrow*, Nature 409 (2001), 258-268
- [STIE94] Stieß, M. Mechanische Verfahrenstechnik 2, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 1994
- [SUZU91] T. Suzuki, N. Tsuge, K. Nagahama, Fluid Phase Equilibria, 67 (1991) 213.
- [THUM04] Thum, O., Enzymatic Production of Care Specialities Based on Fatty Acid Esters, Tenside Surf. Det. 41 (2004) 6, 287-290
- [WACK03] Wack, T.; Deerber, G., Generative Objekt-Orientierte Modellierung GenOOM in der Verfahrenstechnik, Chemie-Ingenieur-Technik 75 (2003), Nr. 8, S. 1142
- [ZHEN96] Zheng, Y.; Tsao, G. T.: Biotechnol Letters, **18** (1996) S. 451-454
- [ZINK04] Zinke, H., *Weißer Biotechnologie: Neue Produkte, gesellschaftlicher Nutzen und Wertschöpfungspotentiale*, Zeitschrift für Biopolitik 2/3 (2004), 31-41

13 Durchführende Forschungsstellen

1) Fraunhofer-Institut für Umwelt-, Sicherheits- und Energietechnik UMSICHT

Osterfelder Straße 3
46047 Oberhausen

Tel. (02 08) 85 98-1 00 Fax (02 08) 85 98-2 90

Institutsleiter: Prof. Dr.-Ing. Eckhard Weidner
Projektleiter: Dr.-Ing. Stephan Kabasci

2) Universität Rostock, Fachbereich Chemie, Lehrstuhl für Technische Chemie

Albert-Einstein-Str. 3a
18059 Rostock

Tel. (03 81) 4 98-18 37 Fax (03 81) 4 98-17 63

Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. Udo Kragl
Projektleiter: Prof. Dr. Udo Kragl

**3) Universität Köln, Institut für Physikalische Chemie,
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Deiters**

Luxemburger Straße 116
50939 Köln

Tel. (02 21) 4 70-45 53 Fax (02 21) 4 70-49 00

Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. Ulrich K. Deiters
Projektleiter: PD Dr. Thomas Kraska