

Maisgranulat zur Immobilisierung von Lipasen

M. Mittelbach, C. Krotscheck et al.

Berichte aus Energie- und Umweltforschung

38/2006

Impressum:

Eigentümer, Herausgeber und Medieninhaber:
Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie
Radetzkystraße 2, 1030 Wien

Verantwortung und Koordination:
Abteilung für Energie- und Umwelttechnologien
Leiter: DI Michael Paula

Liste sowie Bestellmöglichkeit aller Berichte dieser Reihe unter <http://www.nachhaltigwirtschaften.at>
oder bei:

Projektfabrik Waldhör
Währingerstraße 121/3
1180 Wien

Maisgranulat zur Immobilisierung von Lipasen

Univ.-Prof. Dr. M. Mittelbach, Mag. R. Uitz
Mag. A. Friedl, P. Knopper, Mag. S. Schober
*Institut für Chemie
Karl-Franzens-Universität Graz*

Dr. C. Krotscheck
*Technisches Büro für Verfahrenstechnik
Innovationszentrum Ländlicher Raum*

Dr. E. Ahn, Dr. T. Hilber, DI S. Sopouch
Biodiesel International Anlagenbau

Graz, April 2005

Ein Projektbericht im Rahmen der Programmlinie



Impulsprogramm Nachhaltig Wirtschaften

Im Auftrag des Bundesministeriums für Verkehr, Innovation und Technologie

Vorwort

Der vorliegende Bericht dokumentiert die Ergebnisse eines Projekts aus der Programmlinie FABRIK DER ZUKUNFT. Sie wurde im Jahr 2000 vom Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie im Rahmen des Impulsprogramms Nachhaltig Wirtschaften als mehrjährige Forschungs- und Technologieinitiative gestartet. Mit der Programmlinie FABRIK DER ZUKUNFT sollen durch Forschung und Technologieentwicklung innovative Technologiesprünge mit hohem Marktpotential initiiert und realisiert werden.

Dank des überdurchschnittlichen Engagements und der großen Kooperationsbereitschaft der beteiligten Forschungseinrichtungen und Betriebe konnten bereits richtungsweisende und auch international anerkannte Ergebnisse erzielt werden. Die Qualität der erarbeiteten Ergebnisse liegt über den hohen Erwartungen und ist eine gute Grundlage für erfolgreiche Umsetzungsstrategien. Anfragen bezüglich internationaler Kooperationen bestätigen die in FABRIK DER ZUKUNFT verfolgte Strategie.

Ein wichtiges Anliegen des Programms ist es, die Projektergebnisse – seien es Grundlagenarbeiten, Konzepte oder Technologieentwicklungen – erfolgreich umzusetzen und zu verbreiten. Dies soll nach Möglichkeit durch konkrete Demonstrationsprojekte unterstützt werden. Deshalb ist es auch ein spezielles Anliegen die aktuellen Ergebnisse der interessierten Fachöffentlichkeit zugänglich zu machen, was durch die Homepage www.FABRIKderZukunft.at und die Schriftenreihe gewährleistet wird.

Dipl. Ing. Michael Paula

Leiter der Abt. Energie- und Umwelttechnologien

Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie

Inhaltsangabe

| | |
|---|----|
| Synopsis | 11 |
| Einleitung | 12 |
| A) Einführung in die Thematik | 12 |
| B) Vorarbeiten | 13 |
| C) Schwerpunktsetzung | 13 |
| D) Einpassung in die Programmlinie „Fabrik der Zukunft“ | 14 |
| E) Methoden der Bearbeitung | 14 |
| F) Gliederung des Projekts | 15 |
| 1. Literatarbeit | 19 |
| 1.1 Biodiesel | 19 |
| 1.2 Lipasen als Biokatalysatoren | 20 |
| 1.3 Immobilisierung von Enzymen | 26 |
| 1.4 Maiskolbengranulat als Trägermaterial | 28 |
| 2. Screening der Lipasen | 31 |
| 3. Screening der Immobilisierungstechniken | 34 |
| 3.1 Wiederholter Einsatz von immobilisierten Enzymen | 41 |
| 3.2 Bestimmung des Immobilisierungsgrades | 42 |
| 3.3 Auswahl der Größe des Maiskolbengranulats | 44 |
| 3.4 Immobilisierungszeit und -temperatur | 46 |
| 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Vorversuche | 47 |
| 4. Laborversuche zur Veresterung und Umesterung | 48 |
| 4.1 Umesterung im Batch-Prozess | 48 |
| 4.1.1 Batch-Prozess mit Lösungsmittel | 48 |
| 4.1.1.1 Bestimmung der optimalen Umesterungstemperatur | 48 |
| 4.1.1.2 Bestimmung des optimalen Öl-Alkohol-Verhältnisses | 49 |
| 4.1.1.3 Reduzierung der Lipasenmenge | 51 |
| 4.1.1.4 Einsatz von Billig-Lipasen im optimierten Batch-Verfahren | 52 |
| 4.1.2 Batch-Prozess ohne Lösungsmittel | 53 |
| 4.1.2.1 Umesterung mit höheren Alkoholen | 53 |
| 4.1.2.2 Versuche mit Proben aus der Praxis | 57 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.2.3 Regenerationsversuche..... | 59 |
| 4.1.2.4 Versuche mit weiteren Lipasen..... | 60 |
| 4.1.3 Veresterung im Batch-Prozess | 62 |
| 4.1.3.1 Veresterung von Ölsäure mit Methanol | 62 |
| 4.1.3.2 Veresterung von Ölsäure mit höheren Alkoholen | 64 |
| 4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Batch-Versuche | 65 |
| 4.3 Kontinuierliches Verfahren..... | 67 |
| 4.3.1 Schlaufenreaktor | 67 |
| 4.3.1.1 Überprüfen des Methanolgehalts am GC-FID | 69 |
| 4.3.2 Rohrreaktor | 70 |
| 4.3.2.1 Umesterung im Rohrreaktor - Allgemeine Vorgangsweise | 71 |
| 4.3.2.2 Auswahl der Lipase H..... | 72 |
| 4.3.2.3 Optimierung der Reaktionsparameter..... | 73 |
| 4.3.2.4 Variation der Verweilzeit..... | 75 |
| 4.3.2.5 Einsatz von nicht-stöchiometrischen Mengen an Methanol..... | 76 |
| 4.3.2.6 Kontinuierliche Umesterung mit höheren Alkoholen | 77 |
| 4.3.2.7 Umesterung einer Realprobe mit hohem Gehalt an freien Fettsäuren .. | 78 |
| 4.3.2.8 Untersuchungen zum mehrstufiger Prozess..... | 79 |
| 4.3.2.9 Einsatz der unspezifischen Lipase U..... | 81 |
| 4.3.2.10 Einsatz von <i>iso</i> -Propanol als Regenerierungsmittel | 84 |
| 4.3.3 Veresterung im Rohrreaktor | 85 |
| 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse im kontinuierlichen Verfahren | 86 |
| 5. Bewertung der technischen Umsetzung | 90 |
| 5.1 Wirtschaftliche Bewertung der Biodieselproduktion | 90 |
| 5.2 Wirtschaftliche Darstellung des Referenzprozesses zur Biodieselherstellung | 90 |
| 5.2.1 Die einzelnen Verfahrensschritte im Biodieselprozess..... | 92 |
| 5.3 Wirtschaftliche Bewertung der Biodieselproduktion unter Einsatz von Lipasen | |
| | 94 |
| 5.3.1 Preisrecherche Lipasen..... | 94 |
| 5.3.2 Kurzbeschreibung des Lipasen-Verfahrens..... | 97 |
| 5.4 Vergleichende wirtschaftliche Darstellung..... | 104 |
| 5.5 Ökologische Bewertung der Biodieselproduktion aus Altspeise- und Pflanzenöl | |
| | 107 |

| | |
|--|-----|
| 5.6 Bewertung des ökologischen Druckes mit dem SPI..... | 107 |
| 5.7 Der Ökologische Fußabdruck der Rapsölproduktion | 112 |
| 5.8 Ökologische Darstellung des Referenzprozesses zur Biodieselherstellung.. | 113 |
| 5.9 Ökologische Potenziale des Referenzprozesses | 117 |
| 5.10 Ökologische Bewertung der Biodieselproduktion mit Lipaseneinsatz | 121 |
| 5.11 Ökologische Bewertung des Trägermaterials Maiskolbengranulat | 123 |
| 5.12 Vergleichende ökonomische und ökologische Darstellung | 124 |
| 6. Ausblick | 128 |
| 6.1 Schlussfolgerungen..... | 128 |
| 6.2 Chancen, Schwierigkeiten und Risiken bei der Realisierung | 129 |
| 6.3 Empfehlung für weiterführende Forschung | 130 |
| 6.4 Verwertung der Ergebnisse..... | 131 |
| 7. Verzeichnisse | 133 |
| 7.1 Abkürzungsverzeichnis | 133 |
| 7.2 Literaturverzeichnis | 134 |
| 7.3 Abbildungsverzeichnis | 143 |
| 7.4 Tabellenverzeichnis | 146 |

Synopsis

Das Ziel des Projekts ist die Entwicklung einer neuen Methode zur Herstellung von Biodiesel und ähnlicher Verbindungen. Durch heterogene, enzymatische Katalyse ist es möglich, die Nachteile der herkömmlichen Biodieselproduktion auszuschließen. Lipasen werden, um das Preis-Leistungsverhältnis des Prozesses zu verbessern, auf unlöslichem Trägermaterial immobilisiert. Als neues Trägermaterial wird der kostengünstige und leicht zugängliche nachwachsende Rohstoff Maiskolbengranulat verwendet. Das Ziel des Projektes ist es, ein ökonomisches, gut funktionierendes, industriell anwendbares Verfahren für die Produktion von Estern niederer und höherer Alkohole zu entwickeln.

The main objective of the project is to improve the method for producing biodiesel or similar products by enzymatic catalysis. Enzymatic methods may overcome the drawbacks of the conventional biodiesel production. In order to use the enzyme catalyst repeatedly and to improve the cost benefit ratio of the process immobilization technology must be carried out by appropriate methods. The aim within this project is to substitute the commonly used high-priced complex polymer carrier by a low-cost vegetable by-product such as corn cob. The objective is to find a method to catalyze the production of fatty acid methyl esters by corn cob immobilized lipases which can be used in industrial scale.

Einleitung

A) Einführung in die Thematik

Das vorliegende Projekt liefert wichtige Beiträge hinsichtlich innovativer Produktionsmethoden und effizientem Ressourceneinsatz sowie zur Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen. Das Projekt hat das direkte Ziel, Lipasen als heterogene Katalysatoren für die Veresterung und Umesterung von Fettsäuren bzw. Glyceriden einzusetzen. Dies soll durch Immobilisierung (=Adsorption) von verschiedenen Lipasen auf Maiskolbengranulat (MKG) ermöglicht werden. Lipasen haben große Bedeutung als Biokatalysatoren in der Fett- und Ölindustrie, hier vor allem für Interesterifikationen, sind aber als einmal verwendbare Katalysatoren für die Herstellung von Bulkprodukten wie z.B. Biodiesel heute noch zu teuer.

Hier erweist sich die Immobilisierung (IM) als optimale Lösung. Immobilisierte Enzyme können öfters und ohne Probleme oder aufwändige Präparation bei verschiedensten Reaktionen eingesetzt werden. Dadurch scheint es möglich, Lipasen möglichst rentabel auch als Biokatalysatoren für die Biodieselproduktion, insbesondere für die Produktion von Ethylestern und anderer Ester höherer Alkohole, wie z.B. Isopropylester, zu verwenden. Immobilisierte Lipasen sind zwar schon seit längerer Zeit im Einsatz, aber als Träger dafür wurden bis jetzt meist Polymere wie Polyethylen eingesetzt. Der neue Ansatz, der für dieses Projekt gewählt wurde, basiert auf der Verwendung eines nachwachsenden Rohstoffs als innovatives Trägermaterial.

Derzeit gibt es für die Produktion von Estern höherer Alkohole nur schlecht funktionierende klassische Methoden, die zusätzlich große Probleme mit Abfallstoffen mit sich bringen. Klassische Methoden verwenden Kalium- oder Natriumhydroxid als Katalysatoren, die im Anschluss neutralisiert werden müssen und so große Mengen an Salzen bilden, die entweder zu entsorgen sind, oder im Falle von Kalilauge als Düngemittel eingesetzt werden. Verwendet man Biokatalysatoren, so kommt es dadurch zusätzlich zu einer Verringerung von Abfallstoffen, aber auch zum Wegfall von anderen recht teuren Produktionsschritten, wie z.B. der aufwändigen Aufreinigung der Glycerinphase.

B) Vorarbeiten

In einer Vorstudie im Auftrag der Steiermärkischen Landesregierung (vgl. Bericht „Mais und Mehr“, Kornberg Institut 2000) wurden Verwertungsmöglichkeiten für die Erntereste aus Maiskulturen untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die Ernterückstände von Mais nicht wertlose Abfälle sind, sondern eine wertvolle Ressource darstellen. Die Maiskolben haben sich als idealer Rohstoff erwiesen, der bereits durch mechanische Verarbeitung qualitativ hochwertige Produkte ergibt. Maiskolbengranulat weist hervorragende adsorptive Eigenschaften auf, die den Einsatz von Produkten aus diesem Rohstoff für eine breite Palette von Anwendungen geeignet erscheinen lassen. Vor allem die Verwendung als Ölbindemittel und als Tierhygiene-Material können hier angeführt werden, diese Produkte wurden im Projekt „Gewinnung von adsorptiven Produkten aus Maisreststoffen“, Fabrik der Zukunft, Projekt 804135, bereits untersucht.

Eine weitere Verwertungsmöglichkeit des Maiskolbengranulates ist die Verwendung als Trägersubstanz für bioaktive Stoffe bzw. für Pestizide oder als Langzeitdüngemittel. Schließlich erscheint die Immobilisierung von Enzymen auf Maiskolbengranulat eine besonders interessante und viel versprechende Verwertungsmöglichkeit für Maiskolbengranulat zu sein; mögliche Enzyme sind vor allem Lipasen und DNasen bzw. RNasen.

Aus den möglichen Produkten auf der Basis von Maiskolben, die in der Vorstudie identifiziert wurden, soll in diesem Projekt ein Produktionsverfahren zur Immobilisierung von Lipase auf Maiskolbengranulat für die Biodieselherstellung erforscht werden. Hier könnte vor allem die Tatsache genutzt werden, dass es durch das Projekt "Gewinnung von adsorptiven Produkten aus Maisreststoffen", Fabrik der Zukunft, Ausschreibung 1 (Projekt 804135) bereits möglich ist, Maiskolbengranulat in verschiedenen Qualitäten wie z. B. verschiedene Korngrößen und Fraktionen herzustellen.

C) Schwerpunktsetzung

Die Produktauswahl wurde getroffen, da ein Forschungsschwerpunkt des Instituts für Chemie, Bereich Organische und Bioorganische Chemie, Arbeitsgruppe Nachwachsende Rohstoffe, die Herstellung, Charakterisierung und Verwendung von Biokraft-

stoffen, insbesondere Biodiesel, darstellt. So konnte bereits im Jahre 1990 zum ersten Mal die Veresterung (VE) und Umesterung (UE) von Fettderivaten mit Lipasen von der eigenen Arbeitsgruppe entwickelt und publiziert werden (*M. Mittelbach, 1990*).

D) Einpassung in die Programmlinie „Fabrik der Zukunft“

Das vorliegende Projekt liefert wichtige Beiträge hinsichtlich innovativer Produktionsmethoden und effizientem Ressourceneinsatz sowie zur Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen. Die im Projekt vorgeschlagene Verwendung von Lipasen, welche auf nachwachsenden Rohstoffen immobilisiert sind, könnte zu einer deutlichen Reduktion von Ressourcen bei der Biodieselproduktion führen, da der eingesetzte Katalysator wieder verwendet werden kann. Der vorgeschlagene Prozess kann zu einer stark vermehrten Biodieselproduktion führen, was voll den Zielen der Programmlinie entspricht. Die im Antrag beschriebenen Ziele entsprechen insbesondere folgenden Leitprinzipien der „Fabrik der Zukunft“: Prinzip der Nutzung erneuerbarer Ressourcen, Effizienzprinzip, Prinzip der Rezyklierungsfähigkeit und dem Prinzip der Sicherung von Arbeit, Einkommen und Lebensqualität.

Bei positiven Resultaten des vorliegenden Projektes ist natürlich eine technische Weiterentwicklung und Anwendung vorgesehen. Die Wahl des industriellen Partners, der reichlich Erfahrung im Anlagenbereich mit zahlreichen Referenzen auf diesem Gebiet besitzt, garantiert bei positiven Ergebnissen eine konsequente Weiterentwicklung.

E) Methoden der Bearbeitung

Im ersten Schritt des Projektes wird eine Literaturstudie sowie eine weitere technische Analyse der vorhandenen Arbeiten über Immobilisierung von Lipasen durchgeführt. Zusätzlich wird die kommerzielle Erhältlichkeit der Enzyme geprüft. In dieser Phase soll die Auswahl der entsprechenden Enzyme getroffen werden. Im zweiten Arbeitsschritt erfolgt ein erstes Screening der Lipasen in Lösung bzw. Suspension

auf ihre spezielle Eignung für Ver- und Umesterungsreaktionen, um zwei bis drei Vertreter für Immobilisierungsversuche auszusuchen.

Im nächsten Schritt sollen unterschiedliche Immobilisierungstechniken getestet werden, um die bestmögliche Stabilität und Aktivität der Lipasen am Maiskolbengranulat zu erreichen. Mit der optimierten Immobilisierungstechnik werden dann Versuchsmuster für die Ver- und Umesterungsreaktionen hergestellt.

In Laborversuchen werden die Aktivität und die Stabilität der hergestellten Lipasen-Muster untersucht. Für die Veresterungen und Umesterungen werden verschiedene Alkohole wie etwa Methanol, Ethanol und *iso*-Propanol eingesetzt. Die Versuchsbedingungen werden optimiert, um eine Umsetzung im technischen Maßstab planen zu können. In einer eigens entwickelten Laborapparatur sollen erste Vorversuche für eine kontinuierliche Fahrweise mit dem heterogenen Katalysator durchgeführt werden, um eine großtechnische Auslegung besser bewerten zu können.

Anhand der erarbeiteten Ergebnisse soll im letzten Arbeitsschritt eine Bewertung für eine großtechnische Umsetzung erstellt werden, wobei insbesondere ökonomische und ökologische Aspekte im Vordergrund stehen. Es soll dabei einerseits die Einsparung von Chemikalien gegenüber herkömmlicher Biodiesel-Technologien wie auch die mögliche Einsparung von Anlagenequipment überprüft werden. Ein Vergleich der Stoffbilanzen zwischen neuer und herkömmlicher Technologie soll erstellt werden. Eine Marktstudie zum Thema Lipasen und eine grobe Wirtschaftlichkeitsrechnung zum Thema Adsorption von Lipasen auf Maisgranulat soll erstellt werden.

Am Ende des Projekts soll die Basis für ein kostengünstiges, gut funktionierendes Verfahren für die Produktion von Estern niederer und höherer Alkohole vorliegen.

F) Gliederung des Projekts

Detaillierte Darstellung des Arbeits- und Zeitplans

Gesamtdauer des Projektes: 26 Monate

Das Projekt ist in fünf Arbeitsschritte unterteilt.

Arbeitsschritt 1: Literatursuche

In diesem Arbeitsschritt wird die aktuelle Literatur zum Thema dahingehend untersucht, welche Lipasen sich bisher am besten für ähnliche Anwendungen bewährt haben. Zusätzlich muss geprüft werden, welche Lipasen kommerziell erhältlich sind.

Meilenstein 1: Auswahl geeigneter Lipasen

Arbeitsschritt 2: Screening der Lipasen in Lösung bzw. Suspension

In einem ersten Screening sollen kommerziell erhältliche Lipasen auf ihre spezielle Eignung für Ver- und Umesterungsreaktionen in Lösung bzw. Suspension geprüft werden, um zwei bis drei Vertreter für Immobilisierungsversuche auszusuchen.

Meilenstein 2: Auswahl von Modell - Lipasen für Immobilisierungsversuche

Arbeitsschritt 3: Immobilisierungsversuche

Mit den ausgewählten Lipasen werden Immobilisierungsversuche an Maiskolbengranulat durchgeführt. Es werden verschiedene Techniken untersucht, wobei insbesondere der Immobilisierungsgrad sowie die Beständigkeit der Immobilisierung geprüft werden. Mit der optimierten Immobilisierungstechnik werden dann Versuchsmuster für die Ver- und Umesterungsreaktionen hergestellt. Im Falle einer nicht zufrieden stellenden Immobilisierung der Enzyme auf Maisgranulat können auch andere Träger auf der Basis nachwachsender Rohstoffe, wie zellulosehaltige Produkte, getestet und für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

Meilenstein 3: Bereitstellung immobilisierter Lipasen-Muster

Arbeitsschritt 4: Laborversuche zur Veresterung und Umesterung

In Laborversuchen werden die Aktivität und die Stabilität der hergestellten Lipasen-Muster untersucht. Dabei werden sowohl chemisch reine Referenzsubstanzen wie auch in der Praxis übliche Produktmuster eingesetzt. In Reihenuntersuchungen wird insbesondere die Abnahme der Aktivität der Katalysatoren in Abhängigkeit von der Anzahl an Versuchswiederholungen geprüft. Für die Veresterungen und Umesterungen werden verschiedene Alkohole wie Methanol, Ethanol und Isopropanol einge-

setzt. Die Versuchsbedingungen werden optimiert, um eine Umsetzung im technischen Maßstab planen zu können.

In einer eigens konstruierten Laborapparatur sollen erste Vorversuche für eine kontinuierliche Fahrweise mit dem heterogenen Katalysator durchgeführt werden, um eine großtechnische Auslegung besser bewerten zu können.

Meilenstein 4: Schaffung von Grundlagen zur Bewertung einer großtechnischen Umsetzung

Arbeitsschritt 5: Bewertung einer möglichen technischen Umsetzung

Anhand der erarbeiteten Ergebnisse soll eine Bewertung für eine großtechnische Umsetzung erstellt werden, wobei insbesondere ökonomische und ökologische Aspekte im Vordergrund stehen. Es soll dabei einerseits die Einsparung von Chemikalien gegenüber herkömmlicher Biodiesel-Technologien wie auch die mögliche Einsparung von Anlagenequipment überprüft werden. Ein Vergleich der Stoffbilanzen zwischen neuer und herkömmlicher Technologie soll erstellt werden.

Eine Marktstudie zum Thema Lipasen und eine grobe Wirtschaftlichkeitsrechnung zum Thema Adsorption von Lipasen auf Maisgranulat soll erstellt werden.

1. Literaturarbeit

1.1 Biodiesel

Die Glycerinester der Fettsäuren, Fette und Öle, stellen etwa 99% der Lipide natürlichen Ursprungs dar. Aus diesem nachwachsenden Rohstoff kann eine große Vielzahl an Produkten hergestellt werden. Eine viel versprechende Möglichkeit ist die Methanolyse der Glycerinester, die dabei hergestellten Fettsäuremethylester (FAME) werden als Biodiesel bezeichnet (*Mittelbach and Wörgetter, 1983, Ma and Hanna, 1999, Knothe, 2002, Mittelbach and Remschmidt, 2004*).

Biodiesel stellt vor allem in einer Zeit der schwindenden Petroleumreserven und des zunehmenden Umweltbewusstseins eine Alternative zum herkömmlichen Diesel dar. Er bietet geringere Emissionswerte, biologische Abbaubarkeit und damit eine höhere Umweltverträglichkeit (*Krahl, 1996, 1998, Rudolph and He, 2004, Carraretto et al., 2004, Powlson et al., 2005*).

Für die Verwendung bzw. Herstellung von Treibstoffen aus Ölen oder Fetten gibt es im Prinzip vier Prozessmöglichkeiten (*Fukuda et al., 2001*):

1. Direkte Verwendung des Öls
2. Pyrolyse: Die Pyrolyse ist die Zersetzung von flüssigen oder festen organischen Stoffen durch Hitze unter Luftabschluss. Die Temperaturen liegen etwa zwischen 400 und 700°C.
3. Micro-Emulsifikation: Der Einsatz von Microemulsionen mit Solventien wie Methanol, Ethanol und 1-Butanol wurde bereits in vielen Studien untersucht, um das Problem der hohen Viskosität von Öl zu lösen. Microemulsionen sind isotrope, klare, thermodynamisch stabile Dispersionen von Öl, Wasser, einem Tensid und oft einem kleinen amphiphilen Molekül.
4. Umesterung: Die Umesterung, auch Alkoholyse, ist der Austausch eines Alkohols eines Esters durch einen anderen Alkohol in einem der Hydrolyse ähnlichen Prozess, nur dass Wasser durch Alkohol ersetzt wird.

Mögliche Alkohole sind Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol etc. Methanol und Ethanol werden aufgrund ihrer geringen Kosten und ihrer chemischen und physikalischen Vorteile hauptsächlich eingesetzt.

Klassische Methoden zur Fettsäuremethylester (FAME)-Herstellung verwenden Kali- oder Natronlauge als Katalysatoren, die im Anschluss neutralisiert werden müssen und so große Mengen an Salzen bilden, die zur Entsorgung anfallen. Die dabei entstandenen Kalisalze können auch als Düngemittel eingesetzt werden. Das Zweitprodukt Glycerin benötigt einige aufwändige Aufbereitungsschritte um in einer zufriedenstellenden Qualität vorzuliegen. Dieser industrielle Prozess wird von *Ahn und Mittelbach, 2002* beschrieben.

Die Fettsäureester höherer Alkohole (*Isopropylester* etc.) sind ein interessantes Zwischenprodukt in der Synthese von Kosmetika oder Schmiermitteln (*Shaw et al., 1991, Wu et al., 1996, Hills, 2003*). Derzeit gibt es für die Produktion von Estern höherer Alkohole nur schlecht funktionierende klassische Methoden, die zusätzlich Probleme der Entsorgung von Abfallstoffen mit sich bringen.

1.2 Lipasen als Biokatalysatoren

Eine mögliche Alternative zu herkömmlichen Katalysatoren ist der Einsatz von Biokatalysatoren. Ein Biokatalysator ist ein Enzym oder eine Zelle, die sowohl die erforderliche Aktivität besitzt, um den Prozess kosteneffektiv zu machen, als auch die charakteristischen Fähigkeiten für einen erfolgreichen und günstigen Einsatz im Industriemaßstab besitzt (*Cheetham, 1998, Villeneuve, 2003*).

Für diese chemischen Umsetzungen sind Enzyme als Katalysatoren besonders geeignet, hierbei vor allem Lipasen, da sie im großen Ausmaß erhältlich sind. Sie werden vor allem aus Mikroorganismen, aber auch von Tierzellen und Pflanzen, hergestellt. Das bei der Biodieselproduktion anfallende Glycerin kann in hoher Reinheit erhalten werden, was zusätzlich zur Kosteneffektivität beiträgt (*Kaieda et al., 1999, Shimada et al., 2002, Shah et al., 2003*). Der Einsatz von Lipasen bringt eine enorme Einsparung von Grundchemikalien wie Kaliumhydroxid und anorganischen Säuren, da diese Hilfsstoffe bei einem Einsatz von Lipasen nicht notwendig sind. Pro Tonne Biodiesel werden derzeit ca. 13 kg Kaliumhydroxid und ca. 11 kg konzentrierte Schwefelsäure eingesetzt, welche bei Einsatz von Lipasen nicht mehr benötigt werden. Bei einer Biodieselanlage mittlerer Größe mit einer Kapazität von 20.000 t/a führt das zu einer jährlichen Einsparung von bis zu 260 Tonnen Kaliumhydroxid und 220 Tonnen Schwefelsäure.

Lipasen sind eine Untergruppe von Enzymen und stellen damit hochmolekulare Eiweißstoffe dar. Als Katalysatoren erhöhen sie die Geschwindigkeit von chemischen Reaktionen und bewirken damit einen hohen Stoffumsatz. Sie zählen zu der Gruppe der Hydrolasen, die je nach der Bindungsart, die sie spalten, in Esterhydrolylasen (Esterasen), Glykosidhydrolasen und Peptidhydrolasen unterteilt ist. Die Esterasen sind wiederum eingeteilt in Carboxylesterhydrolasen (Lipasen), Phosphohydrolasen und Sulfohydrolasen. (Karlson *et al.*, 1994, Lehninger *et al.*, 2001, Aehle, 2004)

Lipasen gehören zu der Gruppe der α,β -Hydrolasen, da sie sowohl α -Helices als auch β -Faltblätter enthalten.

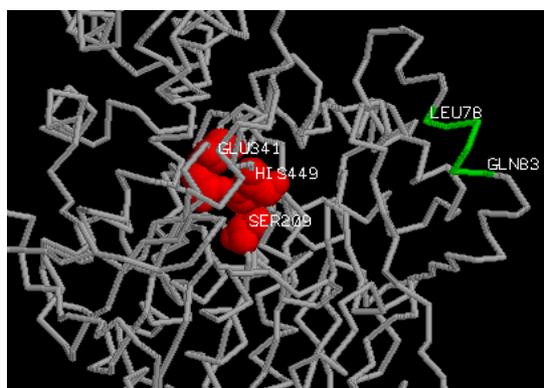
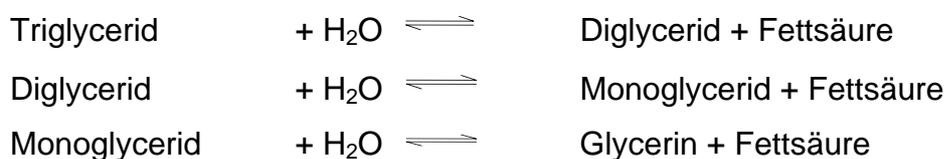


Abbildung 1: Struktur einer Lipase. Aktives Zentrum (rot), der Bereich zwischen LEU 78 und GLN 83 bildet eine helikale Polypeptidkette (Lid) (grün)¹

Lipasen stellen die wichtigste Gruppe von Biokatalysatoren für biotechnologische Anwendungen dar (Houde *et al.*, 2004).

Lipasen katalysieren die Hydrolyse von Glycerinestern (Fetten), es entstehen Diglyceride, Monoglyceride und freie Fettsäuren (Beisson *et al.*, 2000).



Eine Aktivierung der Lipase ist stets mit einer Konformationsänderung verbunden. Es gibt eine „offene“ und eine „geschlossene“ Form. In der geschlossenen Form machen helikale Polypeptidstrukturen (als „Lid“ bezeichnet) das Zentrum für Substrat und Lösungsmittel unerreichbar; das Enzym ist inaktiv. An einer Grenzfläche zwischen hydrophoben und hydrophilen Regionen (z.B.: Öl/Wasser) kommt es durch

Interaktion zu einer Konformationsänderung, die zu der „offenen“ Form führt. Diese Änderungen resultieren in dem Preisgeben der großen hydrophoben Oberfläche, die das katalytische Zentrum umgibt, das nun mit der hydrophoben Grenzfläche interagiert. Das katalytische Zentrum, das ins Enzym eingebettet ist, ist nun erreichbar, die Lipase ist aktiv (Derewenda et al., 1992, Berg et al., 1998, Chahinian et al., 2003).

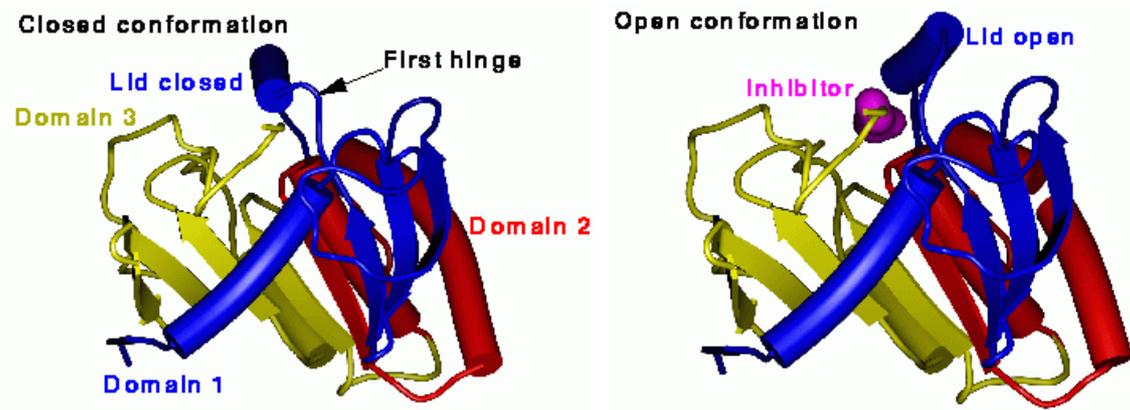


Abbildung 2: Geschlossene, inaktive Form (links) und offene, aktive Form (rechts) von *Rhizomucor miehei*.²

Noch ist allerdings der Mechanismus der Grenzflächenaktivierung nicht vollständig aufgeklärt (Foresti and Ferreira, 2004). Das aktive Zentrum umfasst hydrophobe und hydrophile Regionen. Triglyceride binden an den hydrophoben Bereich, zwei polare Reste im aktiven Zentrum unterstützen die Bindung (Xu, 2003).

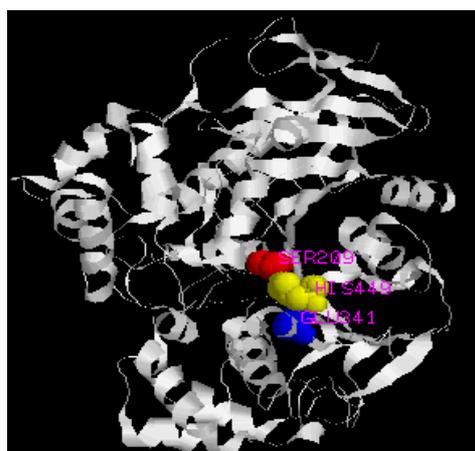


Abbildung 3: Das katalytische Zentrum umfasst SER 209 (rot), GLU 341 (blau) und HIS 449 (gelb)¹

Lipasen können, basierend auf ihre Spezifität, in drei Gruppen eingeteilt werden (*Gandhi, 1997*):

- Unspezifische Lipasen spalten Acylglycerolmoleküle an zufälligen Stellen, es entstehen freie Fettsäuren (FFA) und Glycerin, mit Diglyceriden (DG) und Monoglyceriden (MG) als Zwischenprodukten.
- 1,3-spezifische Lipasen (regiospezifisch) katalysieren die Abgabe der Fettsäure an der ersten und dritten Position des Glycerins (*Segura et al., 2004*).
- Mit fettsäure-spezifischen Lipasen werden nur bestimmte Typen von Fettsäuren abgespalten (*Yahya et al., 1998, Villeneuve, 2003*).

Lipasen sind selektiv in Bezug auf Kettenlänge und Position der Doppelbindungen (*Flores et al., 2000, Mezetti et al., 2003*). Sie können also die Fettsäurezusammensetzung von Ölen ändern und neue Produkte mit den gewünschten chemischen und physikalischen Eigenschaften herstellen (*Jaeger and Eggert, 2002, Negishi et al., 2005, Zhu and Yu, 2005, Palomo et al., 2005*).

Lipasen katalysieren auch die enantioselektive Derivatisierung chiraler Verbindungen und eine Menge von Ver- und Umesterungen, sowie Inter- und Intraesterifizierungen, Hydrolysen etc. Lipasen sind sensitiv auf sterische Effekte an der Säureseite, aber unempfindlich auf sterische Effekte an der Alkoholseite (*Osterberg et al., 1989, Suan and Sarmidi, 2004, Xi and Xu, 2005*).

Anwendung finden Lipasen in der Fettspaltung, Modifikation von Fetten und Ölen, Synthese von organischen Verbindungen, Herstellung von Biopolymeren, Biodiesel, Schmiermitteln, Synthese von Feinchemikalien, Therapeutika und Waschmittelzusätzen. Neben der Hydrolyse werden auch andere chemische Prozesse wie etwa Aminolyse, Thiotransesterifikation und Oximolyse katalysiert (*Zaks and Klibanov, 1985, Yahya et al., 1998, Jaeger and Eggert, 2002*).

Ihre Hydrolyseaktivität korreliert direkt mit ihrer Syntheseaktivität, aber nicht mit der Aktivität, die sie bei der Umesterung zeigen (*Yahya et al., 1998, Linko et al., 1995 and 1998*).

Die enzymatisch katalysierte Methanolyse funktioniert nach folgendem Prinzip: Die Triglyceride (TG) werden schrittweise mittels Lipase zu Methylestern umgeestert. Gleichzeitig werden auch freie Fettsäuren, welche vor allem in Altspeiseölen als auch

in bestimmten Pflanzenölen in höherer Konzentration vorkommen können, mit Methanol verestert. Somit kann der sonst notwendige Zwei-Stufen-Prozess (1. Veresterung, 2. Umesterung) in einem Arbeitsschritt durchgeführt werden.

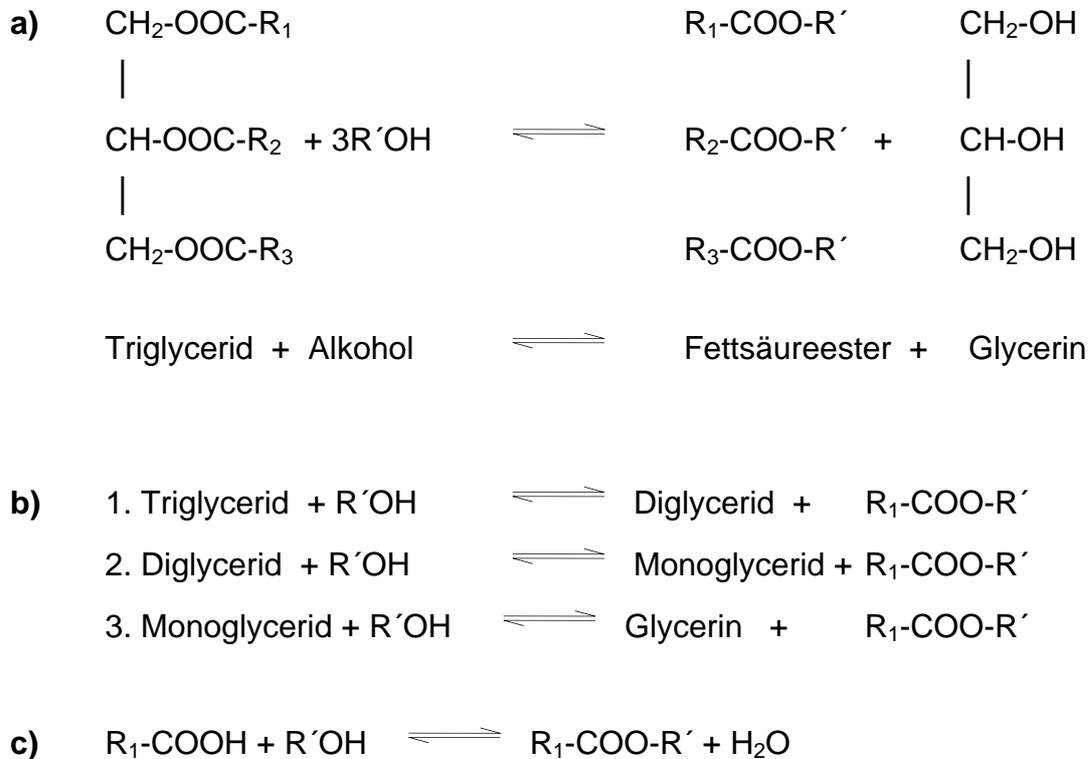


Abbildung 4: Reaktionsschema der Umesterung und Veresterung von Triglyceriden mit Alkohol

- a) allgemeine Bruttogleichung der Umesterung
- b) Teilgleichungen der Umesterung; R₁, R₂, R₃, R' sind Alkylgruppen
- c) Veresterung

Durch die hohen Kosten der Herstellung und Aufreinigung von Lipase ist das Preis-Leistungs-Verhältnis bei einem einmaligen Einsatz der Enzyme ungünstig, es muss eine Möglichkeit gefunden werden, die es ermöglicht, die Lipasen wiederholt einzusetzen (*Mittelbach, 1990, Samukawa et al., 2000, Fukuda et al., 2001, Iso et al., 2001, Watanabe et al., 2002*). In der Literatur finden sich viele Arbeiten betreffend den Einsatz von Lipasen in der Umesterung von Fetten und Ölen.

| Lipase | Öl/Fett | Alkohol | LM | Prozessbedingungen | Referenz |
|--|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--|-------------------------------|
| <i>Mucor miehei</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> | Talg | Methanol, Ethanol, Butanol | Hexan, Petrolether | 3:1 (mol: mol) ROH: TG, 0-6% Wasser; 12.5 – 25% Lipase, 16h, 45°C. | <i>Foglia et al.</i> 1998 |
| <i>Candida rugosa</i> | Rapsöl | 1-Butanol, 2-Ethyl 1- Hexanol | Kein LM | 3: 1 (mol: mol) ROH. TG, 3.3% Lipase, 3% Wasser, 37°C, 3h. | <i>Wu et al.</i> , 1996 |
| <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , immob. | Sonnen- blumenöl | Methanol | Kein LM | 3: 1 (mol: mol) ROH. TG, 10% Lipase, 40°C, 48h, three-step batch process. | <i>Soumanou et al.</i> , 2003 |
| <i>Candida sp. immob.</i> , <i>Mucor miehei</i> immob. | Sonnen- blumenöl | Ethanol (96%) | Petrolether | 11: 1 (mol: mol) ROH. TG, 20% Lipa- se, 45°C, 5h. | <i>Mittelbach</i> , 1990 |
| <i>Candida antarctica</i> , im- mob. | Rapsöl, Sojaöl, Alts- peiseöl | Methanol | Kein LM | 3: 1 (mol: mol) ROH. TG, 4% Lipase, 30°C, 50h, three-step flow oder batch process. | <i>Watanabe et al.</i> , 2001 |
| <i>Candida antarctica</i> , im- mob. | Baumwoll- saatöl | Methanol, Iso- Amylalkohol | Kein LM | 4: 1 (mol: mol) ROH: TG, 30% Lipase, 50°C, 7h, one-step batch process | <i>Köse et al.</i> , 2002 |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | Sojaöl | Methanol | Kein LM | 3: 1 (mol: mol) ROH. TG, 35°C, 70h, three-step batch process | <i>Kaieda et al.</i> , 1999 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Sonnen- blumenöl | Methanol, Ethanol, 1- Propanol | Petrolether | 11: 1 (mol: mol) ROH. TG, 20% Li- pase, 45°C, 5h, one-step batch proc- ess. | <i>Mittelbach</i> , 1990 |

Tabelle 1: Auswahl einiger lipasen-katalysierter Umesterungsreaktionen; Prozentangaben beziehen sich auf die Masse des Triglycerids

1.3 Immobilisierung von Enzymen

Unter Immobilisierung versteht man die Einschränkung der Beweglichkeit des Biokatalysators mit Hilfe chemischer und physikalischer Methoden (*Villeneuve, 2003*). Durch Immobilisierung lassen sich Enzyme länger aktiv halten und können wiederholt eingesetzt werden (*Turner and Vulfson, 2000, Persson et al., 2002, Chang and Juang, 2005*). Zur Immobilisierung stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Welches der Verfahren angewandt wird, hängt sowohl vom Enzym selbst als auch vom Einsatzgebiet des Immobilisats ab (*Dumitriu and Chornet, 1998*).

Immobilisierungstechniken:

- 1.) Adsorption an einen Träger: Die älteste und zugleich einfachste Immobilisierungsmethode ist die adsorptive Methode. Als Träger dienen sowohl anorganische Stoffe wie Aktivkohle, silikatische und mineralische Materialien (Celite), als auch organische Materialien wie natürliche und synthetische Polymere. Das Enzym wird an der Oberfläche eines benachbarten Trägers angereichert. Bei der Adsorption dringen Moleküle ins Innere der Nachbarphase ein (*Geluk et al., 1992, Bastida et al., 1998, Charusheela and Arvind, 2002*).

Die physikalische Adsorption wird hauptsächlich durch Van-der-Waalsche-Kräfte bewirkt. Bei diesem Vorgang bleibt die adsorbierte Verbindung chemisch unverändert. Die physikalische Adsorption ist reversibel.

Bei der Chemisorption tritt eine chemische Bindung zwischen adsorbierter Substanz und Oberfläche ein, wodurch das adsorbierte Molekül in seiner chemischen Natur verändert wird. Die Chemisorption ist nicht direkt reversibel.

Immobilisierung durch Adsorption wird meist ausgeführt mittels Inkubation des Trägers und des Enzyms in einem Puffersystem oder durch Präzipitation der Lipase aus einem Puffer mit Aceton auf die Oberfläche des Trägers (*Crooks et al., 1995*).

Enzymimmobilisierung durch ionische Bindung ist eine der wichtigsten Anwendungen für die Produktion von nichtionischen Trägern für nicht-

ionische Substrate (*Iso et al., 2001, Ferrer et al., 2002, Soumanou and Bornscheurer, 2003, Yesiloglu, 2005*).

- 2.) Alternativ dazu gibt es die kovalente Bindungsmethode bei der eine Bindung höherer Stabilität zwischen Enzym und Trägermaterial eingegangen wird (*Carneiro-Da-Cunha et al., 2002*).

Nichtessentielle Aminosäurereste des Enzyms gehen mit chemisch aktiviertem Trägermaterial, wie etwas DEAE-Cellulose, eine kovalente Bindung ein (*Kambourouva et al., 2003*). Dies ist die am intensivsten untersuchte Immobilisationstechnik, vor allem für die Immobilisierung von Biokatalysatoren an Cellulose liegen viele Studien vor (*Arroyo et al., 1993, Sanchez-Montero and Sinisterra, 1993, Köse et al., 2002*).

- 3.) Mikroverkapselung oder Membranverkapselung: Semipermeable Mikrokapseln werden verwendet um Enzyme, Zellen, Zellextrakte und anderes biologisch aktive Material einzuschließen (*Villeneuve et al., 2000*).
- 4.) Einschluss in Gelen, Filmen oder Beads: Das Enzym befindet sich in einer polymeren Matrix. Substrat und Produkte können sich relativ frei bewegen. Diese Verfahren werden hauptsächlich bei der Immobilisation von mikrobischen Zellen angewandt (*Reetz and Zonta, 1996, Boulbaba and Thomas, 1998, Ban et al., 2002, Hama et al., 2004, Chauhan et al., 2004*).
- 5.) Quervernetzung der Enzyme: Die Lipasen lagern sich durch kovalente Quervernetzung zusammen und bilden so ein stabiles Enzymaggregat (*Hilal et al., 2004, Palomo et al., 2005*).

Durch die Immobilisierung wird die Stabilität durch Anlagerung des Enzyms an mehreren Stellen des festen Trägers stark erhöht, insbesondere die erhöhte Temperaturtoleranz ist von großer Bedeutung (*Turner and Vulfson, 2000*). Die Immobilisierung behindert großteils die Auffaltung der Enzymkonformation und die Zerrüttung des aktiven Zentrums tritt seltener auf. Durch die Immobilisierung exponiert sich das aktive Zentrum auch mehr als in der nativen Form, dadurch wird der Protonentransfer zu den Aminosäureresten an der aktiven Seite weniger behindert (*Malcata et al., 1992, Wu et al., 1996*). Immobilisierung kann also die Enzyme in einem gewissen Ausmaß

vor Denaturierung schützen. Es verhindert die Aggregatbildung des Enzyms und ermöglicht so eine gewissen Homogenität (*Fernandez-Lorente et al., 2003*).

Hohe mechanische Stärke und hohe chemische Resistenz des Trägermaterials sind erwünscht, ebenso die leichte Regenerierbarkeit mit aktivem Enzym. Vor allem bei hydrophoben Trägern zeigt sich, dass die Aktivität der immobilisierten Enzyme höher ist als die der gebundenen, da es durch die Orientierung am Träger zu einer höheren Einwirkung auf das Enzym kommt (*Iso et al., 2001*).

Das Trägermaterial beeinflusst den Wassergehalt in der Nähe der Enzyme und die Abtrennung der Reaktanten und/oder der Produkte in der Reaktionsmischung. Da die thermische Stabilität stark an den Wassergehalt in Nachbarschaft der Enzyme verknüpft ist, sollte der ideale Träger nicht mehr Wasser enthalten als notwendig, um die Denaturierung des Enzyms zu verhindern (*Lee and Parkin, 2001*). Immobilisierung auf hydrophilen Trägern führt oft zu einem Verlust an Lipase-Aktivität, da hier das Enzym einer Konformationsänderung unterworfen wird. Der hydrophile Träger verringert auch die Löslichkeit von hydrophoben Substraten in hydrophilen Regionen und damit auch die Erreichbarkeit der Substrate an der aktiven Seite. In wenigen Fällen stellt auch der Träger eine sterische Behinderung dar. Die Enzymaktivität ist im Allgemeinen bei hydrophoben Trägern höher (wie Celit oder Bonopore) (*Yahya et al., 1998, Palomo et al., 2004*). Ein weiterer Vorteil ist die enzymfreie Produktgewinnung und die Ermöglichung einer kontinuierlichen Prozessführung.

1.4 Maiskolbengranulat als Trägermaterial

Maiskolben sind eine hochwertige Ressource, die bereits durch mechanische Verarbeitung qualitativ hochwertige Produkte ergeben. Maiskolbengranulat weist hervorragende adsorptive Eigenschaften auf, die den Einsatz von Produkten aus diesem Rohstoff für eine breite Palette von Anwendungen geeignet erscheinen lassen. Vor allem die Verwendung als Ölbindemittel, als Trägersubstanz für Langzeitdüngemittel und als Tierhygiene-Material können hier angeführt werden, diese Produkte wurden im Projekt „Gewinnung von adsorptiven Produkten aus Maisreststoffen“, Fabrik der Zukunft, Projekt 804135, bereits untersucht.



Abbildung 5: Maiskolbengranulat

Der Maiskolben besteht zu etwa 80 – 85% aus Holocellulose, einem Gemisch aus Cellulose und Hemicellulose. Den Rest bildet vor allem Lignin, ein Naturstoff, der in verholzenden Pflanzen die Räume zwischen den Zellwänden ausfüllt. Dieses hydrophobe Polymer zeigt selbst keine adsorptiven Eigenschaften (*Krotscheck and Nievoll, 2002*). Cellulose (Poly- β -(1-4)-anhydro-D-glucopyranose) ist ein Polysaccharid, das aus β -D-Glucoseeinheiten über β -1,4-glycosidische Bindungen kettenförmig aufgebaut ist.

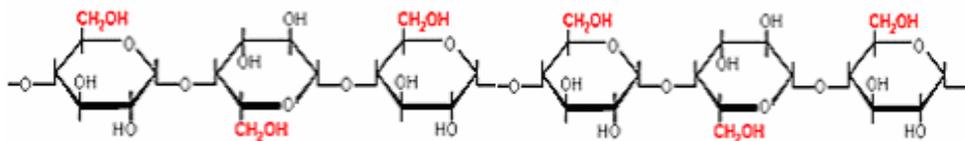


Abbildung 6: Cellulose

Dieses Biopolymer ist einer der wichtigsten nachwachsenden Rohstoffe.

Hemicellulosen (Polyosen) bestehen aus verschiedenen Monosacchariden, wie etwa Galactose, Glucose, Mannose oder Arabinose. Sie weisen aufgrund des höheren Verzweigungsgrades eine vergrößerte Oberfläche auf und erhöhen so die Kapillarkwirkung des Granulats. Die hydrophoben Biopolymere weisen durch ihre Struktur bedingt hervorragende adsorptive Eigenschaften auf.

Die Immobilisierung von Enzymen auf Maiskolbengranulat erscheint als eine besonders interessante und viel versprechende Verwertungsmöglichkeit für Maiskolbengranulat, mögliche Enzyme sind vor allem Lipasen und DNasen bzw. RNasen (*Sanchez-Montero et al, 1989, Sanchez-Montero and Sinisterra, 1993, Moreno et al. 1991, Martinez et al., 1990*).

Durch das vorangegangene FdZ-Projekt ist es bereits möglich, Maiskolbengranulat in verschiedenen Korngrößen und Fraktionen herzustellen. Vorteile bei der Verwendung von Maiskolbengranulat als Trägermaterial sind der relativ geringe Preis, die Verfügbarkeit und die Umweltverträglichkeit des Rohstoffes. Es kann daher als zukunftssträchtige Alternative zu kommerziell erhältlichem Trägermaterial gesehen werden, das durch seinen hohen Preis eine wirtschaftliche Durchführung der Biodieselproduktion fraglich machen würde.

2. Screening der Lipasen

Basierend auf der Auswertung der Literaturarbeit und der Prüfung der Verfügbarkeit von Lipasen wurden 21 unterschiedliche Lipasen aus Mikroorganismen, Pilzen und Pflanzen für ein erstes Screening ausgewählt. Ausschlaggebend waren die Verfügbarkeit und die Garantie der gleich bleibenden Qualität des Enzyms über einen längeren Zeitraum, sowie der Preis. Es wurde darauf geachtet, mit der Auswahl ein möglichst breites Spektrum abzudecken. Die Anbieter **Fluka**, **Amano**, **Novozymes** und **Meito** decken den Enzymmarkt weitgehend ab, so werden etwa 40% des Weltmarktes von der dänischen Firma Novozymes beliefert, Amano ist neben Meito Marktführer im asiatischen Raum und Fluka hat große Bedeutung in Mitteleuropa.

Es wurden international bereits zahlreiche Arbeiten durchgeführt, die die optimalen Reaktionsbedingungen für immobilisierte und freie Enzyme untersuchen.

Die verschiedenen Literatur-Methoden wurden verglichen und auf ihre Anwendbarkeit hin überprüft.

Lipasen werden meist im wässrigen Medium zur Hydrolyse von Fetten eingesetzt, bei der Herstellung von Fettsäurealkylestern ist es aber unabdingbar in nicht-wässrigen Systemen zu arbeiten um die Bildung von freien Fettsäuren zu minimieren. In den nachfolgenden Versuchen wird als Rohstoff Rapsöl eingesetzt. Rapsöl ist das in der Biodieselherstellung am häufigsten eingesetzte Öl.

Es wurden drei unterschiedliche Ansätze ausgearbeitet, die sich in der Wahl des Lösungsmittels (Petrolether, Hexan, lösungsmittelfreies System), im Öl-Alkohol-Verhältnis und in der Menge der zugesetzten Lipase unterscheiden. Im lösungsmittelfreien System wird die Menge an zugesetztem Alkohol erhöht, um die Mischbarkeit der Reaktanten zu verbessern. Für alle Methoden wird eine Reaktionsdauer von 5h bei 45°C gewählt, die Reaktanten und der Katalysator werden vermischt und unter Rückfluss gerührt.

Methode 1: 2.00g Öl, 0.22g MeOH (1mol: 3mol), 8.5ml Hexan, 45°C, 10 % [m/m] Lipase, 45°C, 5h Rühren

Methode 2: 2.00g Rapsöl, 0.29g Methanol (1mol: 4mol), 50ml Petrolether, 20% [m/m] Lipase (0.4g; bezogen auf die Einwaage Öl), 45°C, 5h Rühren

Methode 3: 2.00g Rapsöl, 0.33g Methanol (1mol: 4.5mol), 30% [m/m] Lipase, 45°C, 5h Rühren

Der Umesterungsgrad der solcherart katalysierten Reaktion wird mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) mit Brechungsindex (RI)-Detektor bestimmt.

Die Lipasen werden, um eine bessere Übersicht zu gewähren, mit Buchstaben gekennzeichnet.

Einige Lipasen konnten nur einmal im Screening eingesetzt werden, da die vorhandene Enzymmenge sich als zu gering für einen zweiten Ansatz erwies. Ergeben diese Lipase in der ersten Methode kein überzeugendes Ergebnis, wird keine weitere Enzymmenge mehr nachgekauft. Dieser Fall wird in der Tabelle mit „x“ gekennzeichnet.

1. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, gibt es sehr große Unterschiede in der Aktivität der Lipasen in der Methanolyse von Rapsöl. Der Gehalt des gebildeten Methylesters variiert von <1% bis 96.5%.
2. Lipasen, die in allen drei Methoden einen Methylestergehalt von unter 10% aufweisen, werden ausgeschieden.
3. Weisen Lipasen in mindestens zwei von drei Methoden einen Methylestergehalt von über 70% auf, werden sie für das Screening der Immobilisierungstechniken ausgewählt.

In allen drei Medien zeigt **Lipase P (Lipase AH, Amano)** ein kontinuierlich gutes Ergebnis, allerdings wurde diese Lipase kurz nach dem Screening der Immobilisierungsmethoden von der Enzymfirma vom Markt genommen, sodass sie für das Projekt nicht weiter berücksichtigt werden konnte. Als Nachfolgeprodukt wurde **Lipase J (Lipase PS, Amano, *Pseudomonas cepacia*)** lanciert, die im Screening sogar bessere Umsatzraten brachte. Lipase **K**, die bei der Umesterung in Petrolether über 90% Methylestergehalt erreichte, zeigte jedoch in Methode 1 (7.2% ME) und 3 (0.6% ME) kaum Aktivität. Sie wurde weitergetestet, aber aufgrund extrem streuender Ergebnisse, die keine Reproduzierbarkeit aufwiesen, beim Screening der IM-Techniken nicht weiter berücksichtigt.

| Lipase | % ME nach Methode 1 | % ME nach Methode 2 | % ME nach Methode 3 |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|
| A (<i>Rhizopus oryzae</i> , Fluka) | 5.0 | 3.5 | x |
| B (Wheat Germ, Fluka) | 10.2 | 6.2 | 2.4 |
| C (<i>Candida cylindracea</i> , Fluka) | 1.5 | 0.8 | 1.5 |
| D (<i>Pseudomonas fluorescens</i> , Fluka) | 7.5 | 6.0 | 0.8 |
| E (<i>Aspergillus niger</i> , Fluka) | 4.8 | 0.2 | 0.9 |
| F (Hog pancreas, Fluka) | 5.1 | 5.1 | 0.6 |
| G (<i>Candida antarctica</i> B, Novozymes) | 2.2 | x | x |
| H (<i>Thermomyces lanuginosus</i> , Novozymes) | 96.5 | 13.4 | 76.8 |
| I (Lipase GC-20, <i>Geotrichum candidum</i> , Amano) | 0.8 | x | x |
| J (Lipase PS, Amano, <i>Pseudomonas cepacia</i>) | 83.5 | 70.2 | 68.8 |
| K (Lipase L, Amano, 10) | 7.2 | 90.8 | 0.6 |
| L (Lipase AP 6, <i>Aspergillus</i> , Amano) | 1.7 | 0.2 | x |
| M (Lipase G, Amano, 50) | 14.8 | 0.6 | x |
| N (Lipase F, AP-15, <i>Rhizopus oryzae</i> , Amano) | 15.5 | 1.7 | x |
| O (Lipase R, Amano) | 0.7 | 0.5 | x |
| P (Lipase AH, Amano) | 71.8 | 71.8 | 71.1 |
| Q (Lipase M, Amano, 10, <i>Mucor miehei</i>) | 2.1 | x | x |
| R (Lipase N Conc, <i>Rhizopus niveus</i> , Amano) | 1.0 | 0.6 | x |
| S (Lipase CE, Amano) | 71.6 | 5.3 | 4.8 |
| T (Lipase PS-C, Amano, II) | 36.4 | 21.7 | 31.2 |
| V (Lipase MY, <i>Candida rugosa</i> , Meito) | 13.2 | 0.7 | x |

Tabelle 2: Screening der Lipasen; Methylestergehalt (ME)

Die übrigen Enzyme zeigen zu geringe Katalysator-tätigkeit, als dass sie für weitere Versuche berücksichtigt werden können. **Für das Screening der Immobilisierungstechniken werden die Lipasen H, J und P herangezogen.**

3. Screening der Immobilisierungstechniken

Nach der Auswahl der drei Lipasen wird das Screening der Immobilisierungstechniken durchgeführt. Als innovatives Trägermaterial wird Maiskolbengranulat verwendet. Das MKG stammt aus dem Gebiet um Feldbach (Steiermark), Ernte 2003, wo es in einer Großmühle auf eine Größe von 3.5-5mm vorgemahlen wurde. In einer Labormühle wird es auf die gewünschte Korngröße zerkleinert und anschließend der beim Mahlen entstandene Staub mit Pressluft ausgeblasen.

Es wurden zweiundzwanzig geeignete Methoden aus der Literatur für ein erstes Screening ausgewählt.

Die verschiedenen Immobilisierungsmethoden sind im Anhang genau definiert, sie unterscheiden sich in der Vorbehandlung des Trägermaterials, im pH-Wert des Adsorptionsmediums, der Immobilisierungszeit und -temperatur, sowie in der Wahl von verschiedenen Hilfsstoffen und in der Lagerung des Immobilisats. Die Tabelle 3 bietet eine Übersicht über die angewandten Methoden.

Von Methoden, die mit umwelttechnisch bedenklichen Chemikalien wie etwa Cyanbromid (*Melius et al.*, 1974) oder 1,1'-Carbonyldiimidazol (*Carneiro-da-Cunha et al.*, 2002) für die Aktivierung der Polysaccharidträger arbeiten, wurde bereits im Vorfeld Abstand genommen.

Die Methoden **A-H, K, L, O-R, U und V** beruhen auf **Adsorption der Lipase** am Maiskolbengranulat.

Elektrostatische Wechselwirkungen beeinflussen die Menge der Lipase, die adsorbiert werden kann. Diese Menge ist immer pH-Wert-abhängig und ist nahe des isoelektrischen Punktes des Proteins, $\text{pH} = 4.2$, am höchsten, da hier die kompakte Proteinstruktur am stabilsten und damit seitliche Abstoßung minimiert ist. Bei einem pH-Wert unter $\text{pH} = 4.2$ sind Cellulose (Hauptbestandteil des Maiskolbengranulats) und Lipase entgegengesetzt geladen, bei höheren pH-Werten tragen sie das gleiche Ladungsvorzeichen.

Diese elektrostatischen Wechselwirkungen treten zwischen geladenen Gruppen und/oder Dipolen von Cellulose und Lipase auf. Dies beeinflusst die Affinität des Proteins an der Oberfläche.

Die hydrophoben Wechselwirkungen spielen eine große Rolle in der Protein-Adsorption, da die Lipase nach der Aminosäurezusammensetzung ein hydrophobes Molekül ist. Daher kann eine große treibende Kraft bei Adsorption aus dem wässrigen Medium angenommen werden. Änderungen in der Sekundärstruktur der Lipase können auch eine treibende Kraft in der Adsorption sein. Einen großen Beitrag zur Adsorption kann eine Dehydratation der hydrophoben Regionen von Cellulose und Protein beitragen. Lipasen agieren an der Öl-Wasser-Grenzfläche, wobei die Lipasen bei der Adsorption ihren hydrophoben Teil in Richtung Ölfläche wenden (vgl. *Geluk et al.*, 1992, *Ferrer et al.*, 2002, *Gitlesen et al.*, 1997).

Methoden **I, J, M, N, S und T** arbeiten mit einem durch Tosylierung aktivierten Träger. Die Bindung der Enzyme erfolgt über ihre Aminogruppen an Monolayern von Tosylgruppen, welche ihrerseits auf Hydroxylgruppen des Maiskolbengranulats aufbauen. Dies produziert stabile und aktive Enzyme durch die Bildung von sekundären Amino-Gruppen zwischen Protein und Träger (*Arroyo et al.*, 1993, *Sanchez-Montero and Sinisterra*, 1993).

Die nach diesen Techniken immobilisierte **Lipase P**, die im Lipasenscreening sehr gut abgeschnitten hat, wird anschließend als Biokatalysator für die Umesterung von Rapsöl mit Methanol eingesetzt und der Methylestergehalt bestimmt.

2.00g Öl werden mit 0.33g Methanol (1.5fache stöchiometrische Menge) und 50ml Hexan versetzt, 200mg immobilisiertes Enzym auf 1g MKG zugegeben und fünf Stunden bei 45°C und 320rpm geschüttelt.

| Bezeichnung | Bindung | pH | Temp. | Hilfsstoffe | Träger | Lagerung |
|-------------|------------|-------------------|-------|-----------------------|---|---------------------------|
| A | Adsorption | 7.0 | 20°C | | Waschen in Puffer | Lyophilisieren |
| B | Adsorption | | 20°C | Immobil. in Hexan | Waschen in Puffer | Exsikkator |
| C | Adsorption | 7.0 | 20°C | | Keine Vorbehandlung | In Hochvakuum dehydrieren |
| D | Adsorption | 7.0 | 20°C | 30Min in -20°C Aceton | Waschen in Puffer | 20°C unter Vakuum |
| E | Adsorption | 7.0 | 20°C | | Waschen in Puffer | 4°C |
| F | Adsorption | 9.0 | 20°C | | Waschen in Puffer | 4°C |
| G | Adsorption | 4.7 | 20°C | | Waschen in Puffer | 4°C |
| H | Adsorption | 7.0 | 20°C | Ethylenglykol | Waschen in Puffer | Lyophilisieren, 0°C |
| I | Kovalent | 6.5; anschl. 7.0; | | TsCl | Waschen in Puffer, trocknen mit Aceton, aktivieren mit TsCl | 4°C |
| J | Kovalent | 9.0; 4.0; 8.0; | 30°C | TsCl | Waschen in Puffer, trocknen mit Aceton, aktivieren mit TsCl | 4°C bei pH=6.4 |
| K | Adsorption | 6.5; anschl. 7.0; | 30°C | | Waschen in Puffer, trocknen mit Aceton | |
| L | Adsorption | 9.0; 4.0; 8.0; | 30°C | | Waschen in Puffer, trocknen mit Aceton | 4°C bei pH=6.4 |
| M | Kovalent | 6.5; anschl. 7.0; | 30°C | TsCl | Aktivieren mit TsCl | |
| N | Kovalent | 9.0; 4.0; 8.0; | 30°C | TsCl | Aktivieren mit TsCl | 4°C bei pH=6.4 |
| O | Adsorption | 6.5; anschl. 7.0; | 30°C | | Keine Vorbehandlung | |
| P | Adsorption | 9.0; 4.0; 8.0; | 30°C | | Keine Vorbehandlung | 4°C bei pH=6.4 |
| Q | Adsorption | 8.0 | 4°C | | Keine Vorbehandlung | 2°C |
| R | Adsorption | 8.0 | 20°C | | Keine Vorbehandlung | 2°C |
| S | Kovalent | 8.0 | 4°C | TsCl | Aktivieren mit TsCl | 2°C |
| T | Kovalent | 8.0 | 20°C | TsCl | Aktivieren mit TsCl | 2°C |
| U | Adsorption | 7.0 | 20°C | Ethanol, abs. | Waschen mit abs. EtOH | Vakuum |
| V | Adsorption | 7.0 | 20°C | Ethanol, abs. | Waschen mit abs. EtOH und Puffer | Vakuum bei 20°C |

Tabelle 3: Übersicht Immobilisierungsmethoden

Um eine Ablösung des adsorbierten Enzyms vom Maiskolbengranulat zu vermeiden werden die Umesterungen nun in einem thermostatisierten Schüttler (IKA KS 130) durchgeführt, welcher sich in einem auf die gewünschte Temperatur gewärmten Trockenschrank befindetet.

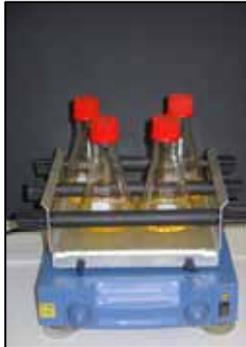


Abbildung 7: Umesterung am Laborschüttler

Der erhaltene Umesterungsgrad wird bestimmt, je höher dieser ist, als umso besser erweist sich die Immobilisierung.

Die Referenz wird durch eine freie, unimmobilisierte Lipase geliefert. Nach dem ersten Zyklus wird die immobilisierte Lipase unter Vakuum abfiltriert und für einen weiteren Zyklus mit frischen Edukten herangezogen.

Wie man aus der Tabelle 4 ersehen kann weisen die Ergebnisse eine hohe Streuung auf, so werden bei der Umesterung zwischen 1-76% Methylester erhalten.

Es ist weder für die Adsorption noch für die kovalente Bindung ein klarer Trend zu erkennen. Ausschlaggebend sind vielmehr die IM-Temperatur und im Falle der Adsorption der pH-Wert des Adsorptionsmediums. So ist etwa bei **Methode F**, die bei einem pH-Wert von 9 arbeitet, nur ein Umsatz von 1-2% ME erkennbar. Der hohe pH-Wert scheint die elektrostatischen Wechselwirkungskräfte zwischen Protein und Träger zu verringern. So sind die Ergebnisse für **Methode E und G**, die beide nach demselben Prinzip, aber bei niedrigeren pH-Werten arbeiten, um einiges besser. Dies widerspricht der These von *Gitlesen et al.*, 1997, der keine signifikante Abhängigkeit der Adsorptionskraft vom pH-Wert des Adsorptionspuffers sieht, da die dominierenden Adsorptionskräfte hydrophobe und nicht elektrostatische Wechselwirkungen sind.

| | % TG (a) | % DG (b) | % MG (c) | % FFA (d) | % ME (e) |
|----------------------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|
| Referenz Lipase P unimmob. | 6.9 | 5.8 | 1.3 | 3.0 | 83.0 |
| A | 31.9 | 14.2 | 4.5 | 7.4 | 41.9 |
| B | 52.9 | 14.0 | 3.7 | 1.7 | 27.7 |
| C | 86.6 | 9.1 | 0.0 | 0.7 | 3.5 |
| D | 98.7 | 0.9 | 0.2 | 0.2 | <0.1 |
| E | 39.6 | 16.6 | 4.1 | 7.8 | 31.9 |
| E ₁ | 25.4 | 13.3 | 1.8 | 3.0 | 56.5 |
| F | 78.5 | 13.3 | 1.4 | 4.8 | 2.0 |
| F ₁ | 92.1 | 5.5 | 0.6 | 0.9 | 1.0 |
| G | 17.7 | 10.0 | 3.1 | 7.4 | 61.4 |
| G₁ | 10.6 | 8.7 | 1.5 | 3.1 | 76.1 |
| H | 65.5 | 19.6 | 2.6 | 9.5 | 2.8 |
| I | 64.3 | 13.8 | 4.4 | 2.2 | 15.4 |
| I ₁ | 62.0 | 14.4 | 4.8 | 1.6 | 17.2 |
| J | 55.6 | 18.4 | 3.9 | 4.3 | 17.7 |
| J ₁ | 50.7 | 15.7 | 5.3 | 1.5 | 26.8 |
| K | 55.2 | 15.8 | 4.2 | 2.3 | 22.5 |
| K ₁ | 56.7 | 14.8 | 4.8 | 1.6 | 22.1 |
| L | 47.5 | 14.2 | 4.7 | 2.1 | 31.4 |
| L₁ | 35.1 | 15.1 | 5.4 | 1.8 | 42.6 |
| M | 39.2 | 16.0 | 5.5 | 5.8 | 33.5 |
| M ₁ | 62.7 | 16.9 | 3.9 | 6.1 | 10.4 |
| N | 17.8 | 9.1 | 3.0 | 2.3 | 67.9 |
| N₁ | 20.4 | 11.3 | 3.5 | 3.8 | 61.1 |
| O | 78.9 | 10.3 | 2.6 | 1.5 | 6.7 |
| O ₁ | 76.0 | 11.6 | 2.8 | 1.4 | 8.2 |
| P | 64.1 | 13.5 | 4.6 | 2.0 | 15.8 |
| P ₁ | 51.3 | 15.9 | 5.3 | 2.2 | 25.3 |
| Q | 64.9 | 14.0 | 4.7 | 3.3 | 13.3 |
| Q ₁ | 53.7 | 16.7 | 5.0 | 2.8 | 21.8 |
| R | 64.6 | 14.1 | 4.6 | 2.9 | 13.8 |
| R ₁ | 68.3 | 13.8 | 4.2 | 1.9 | 11.8 |
| S | 88.3 | 7.4 | 1.0 | 1.8 | 1.5 |
| S ₁ | 90.4 | 5.9 | 0.8 | 1.0 | 1.8 |
| T | 86.5 | 7.9 | 2.0 | 1.5 | 2.1 |
| T ₁ | 87.7 | 7.3 | 1.1 | 1.1 | 2.8 |
| U | 77.5 | 8.1 | 5.8 | 4.5 | 4.0 |
| V | 91.3 | 5.2 | 0.5 | 1.0 | 1.9 |

Tabelle 4: Screening Immobilisierungsmethoden mit Lipase P - ₁: Das immobilisierte Enzym wird für einen zweiten Zyklus erneut als Katalysator eingesetzt. a) Triglycerid; b) Diglycerid; c) Monoglycerid; d) freie Fettsäuren; e) Methylester

Diese Ergebnisse bestärken aber die Thesen von *Geluk et al.*, 1992, der die Meinung vertritt, dass die elektrostatischen Kräfte die Lipasenmenge, die adsorbiert wird, determinieren.

Methode G, die mit einem Adsorptionspuffer arbeitet dessen pH-Wert von 4.7 nahe am isoelektrischen Punkt des Enzyms liegt, weist auch bessere Umesterungsraten auf und wird daher weiter untersucht. Auch bedingt offenbar der Zusatz von Ethylenglykol bei **Methode H** eine geringere Aktivität der Lipase. Die Vorbehandlung des Trägers mit absolutem Ethanol bei den **Methoden U und V** verringert ebenfalls den Umesterungsgrad auf unter 5% ME-Gehalt. Ethanol im Überschuss kann zu teilweiser Deaktivierung von Lipasen führen, es scheint, dass auch der zugegebene Puffer diesen Effekt nicht verhindern kann. Durch die extrem hohe Acetonkonzentration in **Methode D** wird das gesamte Enzym deaktiviert, es kommt zu einer Zerstörung des aktiven Zentrums der Lipase, sodass sie keine katalytischen Fähigkeiten mehr besitzt (*Mohapatra and Hsu, 1997*).

Bei den Immobilisierungsmethoden mit Trägermaterial, das mit p-Toluensulfonylchlorid aktiviert wurde, erweisen sich die Varianten **L** und **N** am geeignetsten, ansonsten scheint diese Aktivierung aber nur geringen Einfluss auf den Immobilisierungsgrad zu haben. Es scheint, dass dieser in erster Linie von den Immobilisierungsparametern abhängt und nicht von der Vorbehandlung des Trägers. So werden bei den Varianten **S** und **T** trotz des aktivierten Trägermaterials bei der Umesterung von Rapsöl kaum partielle Glyceride und Methylester gebildet. Ein möglicher Grund dafür kann sein, dass die aktivierten Hydroxygruppen des Maiskolbengranulats sich an oder neben die katalytische Triade der Lipase binden und so das aktive Zentrum sterisch gehindert wird, was zu einer verringerten Aktivität führt.

Nach diesen ersten Immobilisierungsversuchen werden die drei besten Methoden G, L und N für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Um die mit **Lipase P** erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, werden diese viel versprechenden Immobilisierungsmethoden mit **Lipase H und J** wiederholt.

Ein wichtiges Kriterium für die Umesterungsaktivität der immobilisierten Lipasen ist neben der Bildung der Methylester auch die Abnahme der Triglyceridkonzentration. Die Verringerung der TG-Konzentration bei der Umesterung von immobilisierter Lipase P, H und J wird nun gegenübergestellt, um so die IM-Techniken zu bewerten. Alle Versuche wurden zweifach durchgeführt, die detaillierten Ergebnisse finden sich im Anhang.

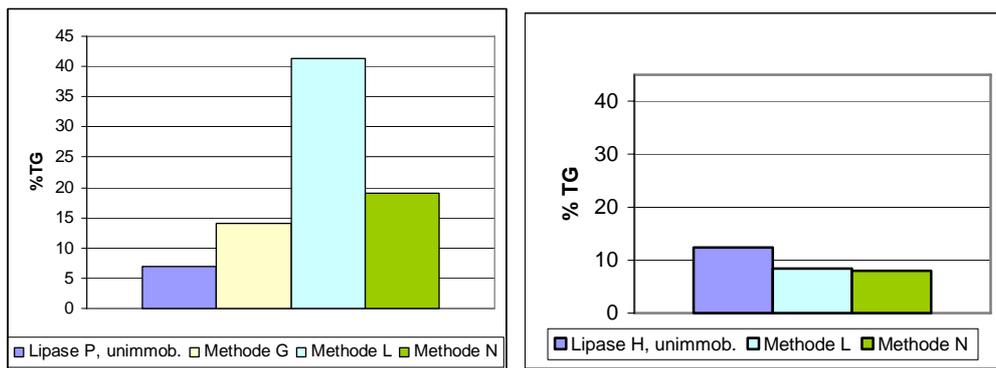


Abbildung 8: Screening Immobilisierungsmethoden mit Lipase P (links) und H (rechts); verbleibender Triglyceridgehalt

Methoden **L** und **N** erweisen sich bei Lipase **H** als annähernd gleich gut geeignet. Die Werte für Methode **G** bei Lipase **H** schwanken stark und werden daher im Diagramm nicht berücksichtigt. Beim Einsatz von Lipase **P** zeigt sich jedoch, dass die Methode **L** den höchsten Gehalt an verbleibenden TG aufweist, während jedoch Methode **G** nach der freien, unimmobilisierten Lipase den geringsten Gehalt an Triglyceriden aufweist.

Auch bei der Immobilisierung von Lipase **J** ist zu beobachten, dass das beste Ergebnis wieder, wenn auch mit minimal höherem Umesterungsgrad als für **L** und **N**, für Methode **G** erhalten wurde.

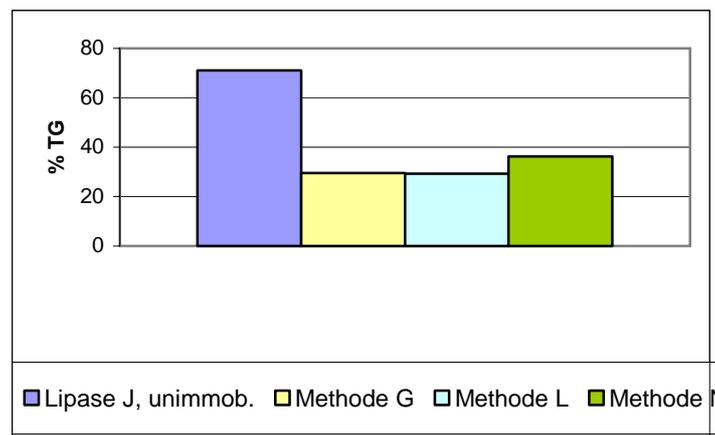


Abbildung 9: Screening Immobilisierungsmethoden mit Lipase J; verbleibender Triglyceridgehalt;

Nach diesem ersten Screening war **Lipase P** nicht mehr käuflich erhältlich, sodass die weiteren Versuche nur noch mit **Lipase H** und **J** durchgeführt werden.

3.1 Wiederholter Einsatz von immobilisierten Enzymen

Ein wichtiges Beurteilungskriterium für die Immobilisierung von Lipasen ist die Dauerhaftigkeit mit der diese am Träger verbleiben. Durch Versuche zum wiederholten Einsatz der immobilisierten Enzyme wird die Qualität der einzelnen Immobilisierungstechniken untersucht. In diesen Versuchen wird nur Lipase H getestet, da die Dauerhaftigkeit der Immobilisierung unabhängig von der Enzymart sein sollte.

Lipase H wurde nach den Methoden **G**, **L** und **N** immobilisiert und damit eine Umesterung durchgeführt. Nach diesem Einsatz wurden die immobilisierten Enzyme unter Vakuum abfiltriert und ohne weitere Behandlung erneut für vier weitere Umesterungszyklen mit jeweils frischen Öl-Methanol-Ausgangsstoffen eingesetzt. So wird jede immobilisierte Lipase fünffach eingesetzt. Mittels Flüssigkeitschromatographie wird der Methylestergehalt gemessen.

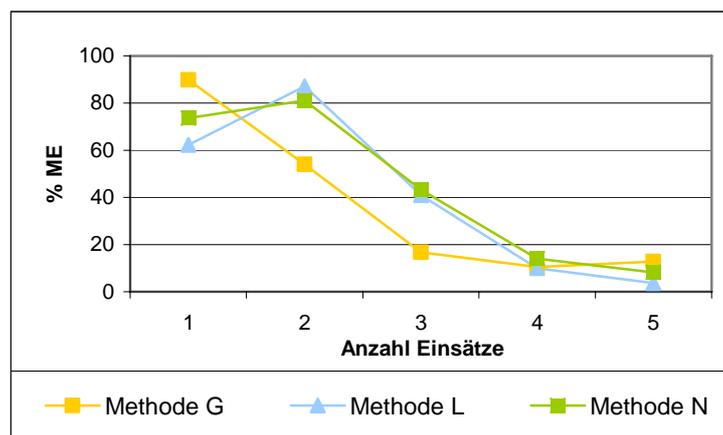


Abbildung 10: Wiederholter Einsatz von immobilisierten Enzymen

Methode **G** startet mit dem höchsten Anfangswert an Methylestern, fällt jedoch nach dem ersten Einsatz stark in seiner Umsatzrate ab, um sich nach dem vierten Einsatz zu stabilisieren. Methode **L** und **N** zeigen sehr ähnliches Verhalten, im zweiten Einsatz weisen beide einen höheren Umsatz als bei der Initialreaktion aus, im Anschluss daran nimmt aber auch ihre Aktivität stetig und deutlich ab. Um die Immobilisierungstechnik, die den höchsten Gehalt an immobilisiertem Enzym aufweist, auswählen zu können, wird von diesen drei Methoden der Proteingehalt des Filtrats nach der Immobilisierung bestimmt. Eine Entscheidungsfindung soll mittels **Bradford-Proteingehaltsbestimmung** erfolgen. Diese Bestimmung misst den Gehalt an Pro-

tein (und somit an Lipase) am Trägermaterial. Durch diesen Test ist es möglich, die Menge an immobilisiertem Enzym am Träger anzugeben, nicht jedoch dessen Aktivität.

3.2 Bestimmung des Immobilisierungsgrades

Der Proteingehalt wird mittels der Proteingehaltsbestimmungsmethode nach Bradford durchgeführt (*Bradford, 1976*). Der **Bradford-Assay** beruht auf der Anfärbung durch den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G 250. Dabei kommt es bei dem Kontakt von Proteinen mit dem Farbstoff zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 595 nm.

Um die Immobilisierungstechnik, die den höchsten Gehalt an immobilisiertem Enzym aufweist, auswählen zu können, wird von den drei **Methoden G, L und N** der Proteingehalt des Filtrats nach der Immobilisierung bestimmt, da es sehr schwer ist, bereits immobilisiertes Enzym wieder quantitativ vom Träger herunter zu lösen. Der Gehalt an immobilisiertem Enzym errechnet sich aus der Differenz an ursprünglich eingesetztem Enzym und dem Enzym, das im Filtrat nach der Immobilisierung detektiert werden kann.

$$E_{\text{immob.}} = E_0 - E_{\text{Filtrat}}$$

Zu Beginn ist es bei einem so spezifischen Test, wie der Bradford-Bestimmung wichtig, eine Kalibrationsgerade für das entsprechende Enzym aufzustellen. Für die Untersuchungen wird **Lipase H** ausgewählt.

Um Störungen der Messung durch den durch das Maiskolbengranulat leicht gefärbten Puffer auszuschließen, wurde diese Lösung in einem UV-VIS-Photometer auf ihre Extinktion im Messbereich von 400 bis 800 nm untersucht. Bei einer Wellenlänge $\lambda=595\text{nm}$ wird ein Extinktionswert von 0.002 gemessen. Das bedeutet, dass die Ergebnisse der Proteingehaltsbestimmung nicht durch Interferenzen mit dem Adsorptionsmittel gestört werden. Es erfolgt eine Dreifachbestimmung.

Die Kalibrationskurve folgt beim Bradford-Protein-Assay über einen größeren Konzentrationsbereich einer Polynomfunktion zweiter Ordnung.

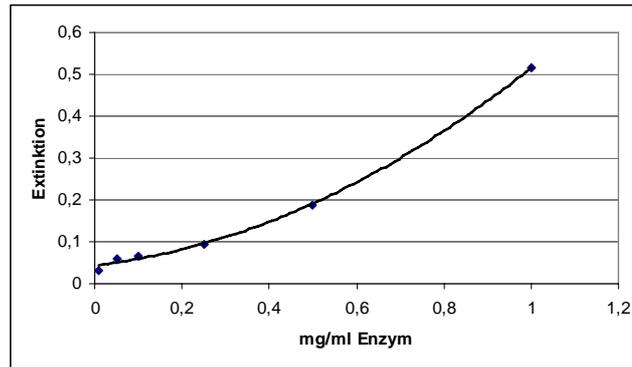


Abbildung 11: Kalibrationskurve für Lipase H mittels Bradford- Proteingehaltsbestimmung

Kalibrationskurve

$$y = 0.3529x^2 + 0.1185x + 0.04398$$

$$R^2 = 0.9981$$

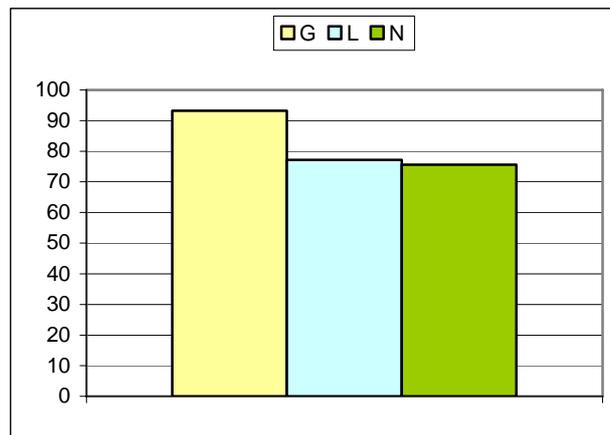


Abbildung 12: Immobilisierungsgrad der Methoden G, L und N

Der Immobilisierungsgrad gibt an, wie viel Prozent des bei der Immobilisierung eingesetzten Enzyms/Proteins am Träger immobilisiert sind. Man kann aus dieser Abbildung ersehen, dass die Immobilisierung der **Methode G**, die auf Adsorption bei pH=4.7 beruht, den bei weitem höchsten **Immobilisierungsgrad** von durchschnittlich **93.2%** besitzt; Das bedeutet, dass von 100mg im Adsorptionspuffer vorliegenden Enzym über 93mg am Maiskolbengranulat immobilisiert werden. Die Immobilisierungsmethoden auf dem tosylaktiviertem Granulat verliefen mit 77.4% für **L** und 75.8% für **N** ebenfalls erfolgreich.

Diese Resultate stehen in Korrelation mit den in der Umesterung erhaltenen Ergebnissen. Basierend auf diesen Ergebnissen ist zu ersehen, dass für Umesterungen mit

immobilisierter Lipase nach Methode **G** die geringste Enzymmenge nötig ist, was die Kosten des Lipasenprozesses erheblich verringert.

Methode **L und N** benötigen die Aktivierung mit p-Toluensulfonylchlorid, was nicht nur zeit- und kostenaufwändig, sondern wegen des erhöhten Chemikalienverbrauchs auch weniger ökonomisch und nachhaltig ist.

Daher wird die Methode G als die geeignete Immobilisierungsvariante von Lipasen auf Maiskolbengranulat ausgewählt.

Der verwendete Puffer besteht aus den gebräuchlichen, umweltverträglichen und billigen Chemikalien Essigsäure und Natriumacetat. Dieser Puffer, der in geringer Konzentration von 0.1mol/l vorliegt, ist auch wiederholt im Immobilisierungsprozess einsetzbar und verbessert somit die Umweltbilanz des Lipasenprozesses durch verringerten Chemikalieneinsatz.

Lipase H gibt es im Handel auch in zwei immobilisierten Formen. Eine Form verwendet Silicagel als Trägermaterial, die andere Form wird als Granulat von Lipase, Natriumsulfat, Kaolin, Cellulose und Polyethylenglykol gehandelt. Der mit dem Bradford-Assay bestimmte Proteingehalt ergab für die erste Form einen Enzymgehalt von 9.9%, während die **selbst entwickelte IM-Methode einen Enzymgehalt von über 18%** (0.93g Enzym pro 0.5g MKG) aufweist. Das kommerziell erhältliche Granulat war aufgrund seiner Zusammensetzung nicht mit dieser Methode zu bestimmen, da es durch das gelöste, nicht abzentrifugierbare Granuliermaterial zu störenden Interferenzen kommt.

3.3 Auswahl der Größe des Maiskolbengranulats

Das Maiskolbengranulat hat ursprünglich eine Korngröße von 3.5 bis 5mm: Die gewünschten Korngrößen werden mit einer Mikrofeinmühle mit Schneidmahlkopf und verschiedenen Einsätzen gemahlen. Um den Staubanteil des Granulats zu verringern wird es anschließend mit Pressluft ausgeblasen. Nach der Evaluation der Immobilisierungsmethoden wurde in einer Versuchsreihe die geeignete Größe des Maiskolbengranulats bestimmt.

Es wurde Granulat mit der **Korngröße 0.5mm, 1mm, 2mm und 3.5- 5mm** ausgewählt, um als Trägermaterial für **Lipase H und J** zu fungieren.



Abbildung 13: Mühle und Fraktionen des Maiskolbengranulats

Die solcherart immobilisierten Lipasen werden als Biokatalysator für die Umesterung eingesetzt und der Umesterungsgrad bestimmt. Diese Untersuchungen werden im Doppelansatz durchgeführt, die im Diagramm dargestellten Werte entsprechen den erhaltenen Durchschnittswerten.



Abbildung 14: Maiskolbengranulatfraktionen; Methylestergehalt für Lipase H

Die größte Korngröße von **3.5- 5mm** scheint für die Immobilisierung am wenigsten geeignet zu sein, da hier bezogen auf die Einwaage Maiskolbengranulat, die geringste Oberfläche für die Immobilisierung zur Verfügung steht. Bei der Korngröße **0.5mm** ist der Anteil an nicht-adsorptiv wirkenden Staubpartikeln und Lieschenrückständen zu hoch, als dass ein zufrieden stellender Immobilisierungsgrad gewährleistet wäre.

Die **2mm-Fraktion** zeigt bessere Resultate als die Korngröße von **1mm**, was darauf schließen lässt, dass bei dieser Korngröße ein ausgewogenes Verhältnis von zur

Verfügung gestellter Oberfläche des Granulats und Menge der zu immobilisierenden Lipase besteht.

Als Trägermaterial für alle Immobilisierungen wird nun Maiskolbengranulat mit der Korngröße von 2mm eingesetzt.

3.4 Immobilisierungszeit und -temperatur

Die im Screening angeführten Immobilisierungsmethoden wurden mit Maiskolbengranulat der Größe **2mm** durchgeführt. Die Immobilisierungszeit, die Zeit, die die Lipasen und das Trägermaterial im Absorptionspuffer verbleiben, wurde dabei von **einer Stunde auf zwei Stunden** variiert, die Temperatur von **20 auf 30°C**.

Als Enzyme werden die **Lipasen H und J** eingesetzt. Alle Versuche wurden doppelt durchgeführt.

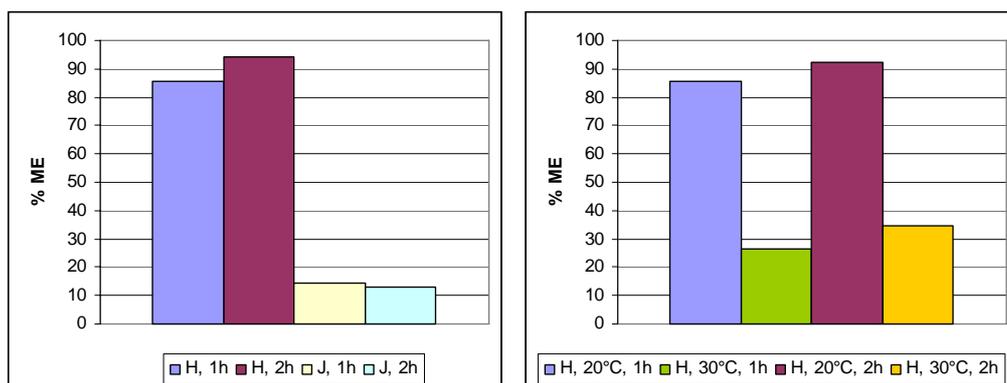


Abbildung 15: ME-Ausbeute bei verschiedenen Immobilisierungsbedingungen

Bezüglich der Immobilisierungszeit wurde **2h** als optimal befunden, da hier in einem Großteil der Untersuchungen ein sehr hoher Umesterungsgrad erzielt werden konnte, das bedeutet, dass der Immobilisierungsprozess nach einer Stunde noch nicht vollständig abgeschlossen ist, sondern etwa zwei Stunden benötigt, um sein Gleichgewicht zu erreichen.

Die Steigerung der Immobilisierungstemperatur brachte einen negativen Effekt, bei erhöhter Temperatur kann die Lipase Aggregate bilden und so stehen weniger freie Gruppen für die Adsorption zur Verfügung. Aufgrund der negativen Ergebnisse der

Immobilisierung bei 30°C für Lipase H wurden diese für Lipase J nicht mehr durchgeführt.

Für alle nächsten Immobilisierungen wurden als optimale Bedingungen 2mm Maiskolbengranulat-Fraktion, 20°C Immobilisierungstemperatur und 2h Immobilisierungszeit festgelegt.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Vorversuche

Es wurden 21 Lipasen für die Methanolyse von Rapsöl in Lösungsmittel und lösungsmittelfreien System untersucht, wobei sich die drei **Lipasen H, J und P** als am besten geeignet erwiesen. Mit diesen wurden **22 Immobilisierungstechniken**, die auf Adsorption oder auf kovalente Bindung basieren, ausgetestet. Die drei viel versprechenden (**G, L und N**) wurden weiteren Testreihen unterzogen und auf wiederholte Einsetzbarkeit geprüft, sowie eine Proteingehaltsbestimmung durchgeführt. **Methode G** erwies sich als die beste Technik, die für die weiteren Arbeiten herangezogen wird. Sie beruht auf der **Adsorption von Lipase** auf dem Träger Maiskolbengranulat mit einer Korngröße von 2mm in einem Acetatpuffer bei **pH=4.7**, einer Immobilisierungszeit von zwei Stunden und einer Immobilisierungstemperatur von 20°C. Der **Immobilisierungsgrad** beträgt über **93%** und ist damit um einiges höher als der der anderen Methoden.

4. Laborversuche zur Veresterung und Umesterung

Nach dem Screening der Lipasen und der Immobilisierungstechnik ist es möglich immobilisierte Lipase H und J auf Maiskolbengranulat herzustellen. Diese Immobilisate sollen nun in Laborversuchen zur Um- und Veresterung eingesetzt werden. Der erste Schritt ist nun die Optimierung der Reaktionsbedingungen im Batch-Prozess. Ausgehend von diesen Ergebnissen werden die Katalysatoren im kontinuierlichen Verfahren in einer selbst entwickelten Laborapparatur eingesetzt.

4.1 Umesterung im Batch-Prozess

4.1.1 Batch-Prozess mit Lösungsmittel

Die Vorversuche im Rahmen des Screenings der Lipasen haben gezeigt, dass Hexan ein geeignetes Lösungsmittel für die lipasenkatalysierte Umesterung darstellt. Im folgenden Kapitel sollen die Parameter Umesterungstemperatur, molares Verhältnis von Öl zu Alkohol und Lipasengehalt untersucht werden.

Alle Versuche werden mit nach **Methode G** immobilisierter **Lipase H und J** durchgeführt, die Bestimmung des Umesterungsgrades erfolgt mittels Flüssigkeitschromatographie mit Brechungsindexdetektor.

4.1.1.1 Bestimmung der optimalen Umesterungstemperatur

Es werden Umesterungen von Rapsöl mit Methanol bei verschiedenen Umesterungstemperaturen (**20, 30, 40, 50°C**), bei einem Verhältnis Öl: MeOH = 1mol:4.5mol (50% MeOH Überschuss) (nach *Mittelbach*, 1990) und 5h Reaktionszeit und 10 Gewichtsprozent immobilisierter Lipase auf einem Laborschüttler mit 320rpm durchgeführt.

Für alle Umesterungen wurde als Katalysator immobilisierte **Lipase H und J** verwendet, wobei die Immobilisierung mit den Bedingungen 2mm MKG-Fraktion, 20°C Immobilisierungstemperatur und 2h Immobilisierungszeit nach bisher beschriebener Immobilisierungstechnik durchgeführt wurde.

Die Umesterungen bei verschiedenen Temperaturen (20, 30, 40 und 50°C) lieferten folgende ME-Ausbeuten, die in Abbildung 16 dargestellt sind.

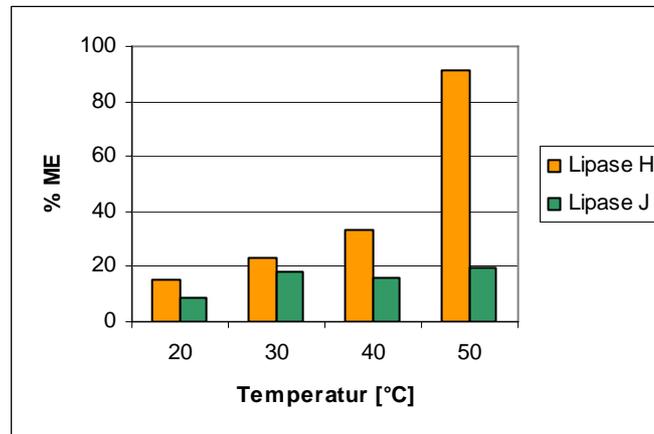


Abbildung 16: ME-Ausbeute bei der UE mit Lipase H und J bei verschiedenen Temperaturen

Der zweite Umesterungsversuch der Lipase H bei 50°C Reaktionstemperatur zeigt eine signifikante Erhöhung des ME-Gehalts verglichen mit der erhaltenen ME-Ausbeute bei den anderen Temperaturen. Auch bei Lipase J ist dieser Trend des höheren Umsatzes bei höherer Temperatur zu erkennen, wenn auch nicht in der gleich starken Ausprägung.

Die besten Resultate erhielt man bei 50°C Umesterungstemperatur, **in allen weiteren Batch-Versuchen wird daher bei 50°C gearbeitet.**

4.1.1.2 Bestimmung des optimalen Öl-Alkohol-Verhältnisses

Öl-Methanol-Verhältnis

Für die Methanolyse wird der Umsatz von Reaktionen mit 0, 20, 40, 100 und 200% Überschuss Methanol untersucht:

Alle Bestimmungen werden doppelt durchgeführt, die detaillierten Ergebnisse finden sich im Anhang.

Für **Lipase H** ist das beste Öl-Methanol-Verhältnis **1:4.2 (40% MeOH Überschuss)**, wobei eine ME-Ausbeute von **durchschnittlich 92.1%** erhalten wurde.

Lipase J zeigt bei 20%igen Methanolüberschuss den höchsten Methylestergehalt von 28.1%.

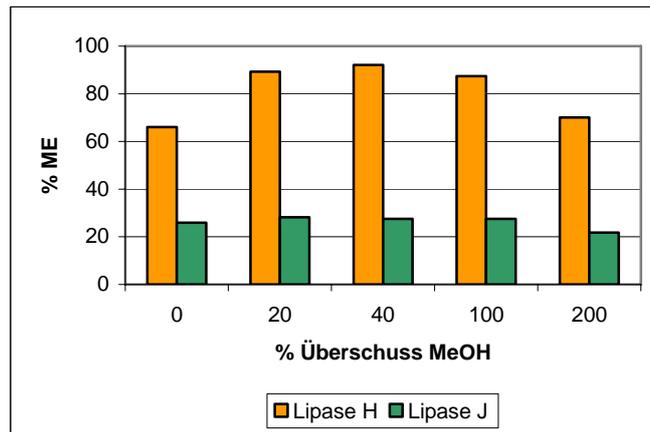


Abbildung 17: ME-Ausbeute bei der Variation der Öl-Methanol-Verhältnisse

Als Katalysator für die Umesterung mit Methanol ist die auf MKG immobilisierte **H-Lipase** besser geeignet, mit welcher man hohe Esterausbeuten von **91-93%** erhält.

Alle weiteren Batch-Versuche werden mit einem 40%igen Überschuss an Methanol durchgeführt.

Öl-Ethanol-Verhältnis

Für Ethanol wurde der Umsatz von Reaktionen mit **40/100 und 266% Überschuss** Ethanol untersucht:

Es wurden Umesterungen von Rapsöl mit Ethanol bei verschiedenen Öl-Ethanol-Verhältnissen mit immobilisierter Lipase H und J durchgeführt, um das beste Verhältnis zu finden.

Bei der UE mit **Lipase H** erhält man bei einem Öl-Ethanol-Verhältnis von **1: 11** (ca. 270% Ethanol Überschuss) eine Ethylester-Ausbeute von nur **60-69%**.

Lipase J lieferte ähnliche Ethylester-Ausbeuten von ungefähr **50%** bei allen untersuchten molaren Verhältnissen. Die immobilisierte Lipase H ist für die Ethanolyse nicht so gut geeignet wie für die Methanolyse, man erhält nur mit einem großen Überschuss von ca. 270% Ethanol eine Ausbeute von nur 60-69%.

Lipase H zeigt eine deutlich höhere Aktivität bei der Methanolyse, wo sehr hohe Methylester-Ausbeuten von 91-93% mit nur einem geringen Überschuss von 40% Methanol erhalten werden.

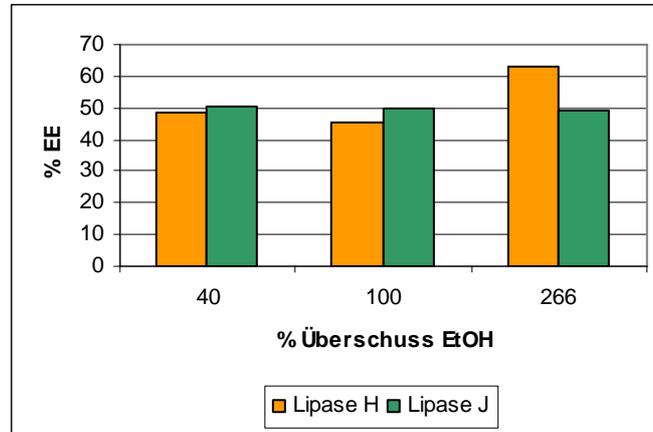


Abbildung 18: EE-Ausbeute bei der Variation des Öl-EtOH-Verhältnisses

Der gegenteilige Effekt zeigt sich bei der immobilisierten Lipase J, die bei der Ethanololyse eine etwa doppelt so hohe Umsatzrate als bei der Alkohololyse mit Methanol liefert.

4.1.1.3 Reduzierung der Lipasenmenge

Bei allen bisherigen Versuchen wurden 10 Gewichtsprozent Lipase, bezogen auf die Masse des eingesetzten Öls, für die Immobilisierung auf Maiskolbengranulat verwendet. Nun wird der Gehalt an Lipase verringert und untersucht, ob man auch mit geringerer Lipasenmenge vergleichbare Umsätze erzielen kann.

Es wurden Umesterungen von Rapsöl mit Methanol bei den folgenden Umesterungsbedingungen (50°C, Öl:MeOH= 1:4.2 bzw. 40% Überschuss, 5h, 320rpm, Hexan als Lösungsmittel), mit verschiedenen Mengen an immobilisierter Lipase H (**10/ 7.5/ 5/ 2.5 und 1.25 Gewichtsprozent**) durchgeführt.

Wie zu erwarten war, wird der höchste Methylestergehalt mit der größten eingesetzten Lipasenmenge erzielt, so erhält man bei 10 Gewichtsprozent Lipase H etwa 90% Methylester. Jedoch werden mit 7.5% [m/m] Lipase H noch durchschnittlich. 84%

Methylester erhalten. Zwischen den Umesterungen mit 10 und 7,5 % [m/m] Lipase gibt es nur einen geringen Unterschied von ca. 6% Methylester-Ausbeute.

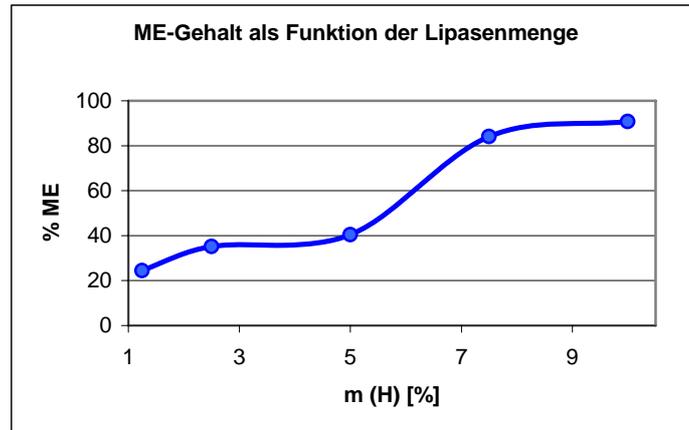


Abbildung 19: ME-Ausbeuten bei der UE mit verschiedenen Lipasemengen

Im Intervall von 5 zu 7.5 % [m/m] ergibt sich, wie im Diagramm ersichtlich, eine viel höhere Steigerung des Umsatzes.

Aus ökonomischen Gründen kann man versuchen, die UE später in einem kontinuierlichen Prozess mit weniger als 10 % [m/m] Lipase durchzuführen.

4.1.1.4 Einsatz von Billig-Lipasen im optimierten Batch-Verfahren

Erste Recherchen bezüglich des Lipasenpreises haben ergeben, dass der Großanteil der kommerziell erhältlichen Lipasen sehr hochpreisig ist. Daher sollen nun zwei im Vergleich sehr günstige Lipasen auf ihre Fähigkeit hin die Umesterung zu katalysieren getestet werden.

Die Lipasen aus Schweinpankreas (**HP**, hog pancreas) und Weizenkeimen (**WG**, wheat germ) sind unspezifisch und haben ein breites Anwendungsspektrum.

Als Umesterungsbedingungen wurden 50°C, ein molares Verhältnis von 1: 4.2 für Methanol und 1:11 für Ethanol, Hexan als Lösungsmittel, 5h Reaktionszeit, 320rpm und 10% [m/m] Lipase gewählt. Alle Versuche werden im Doppelansatz durchgeführt.

Die Lipase aus Schweinepankreas zeigt tendenziell höhere Umsätze, die jedoch in keinem Vergleich zu den erzielten Ausbeuten von Lipase H stehen.

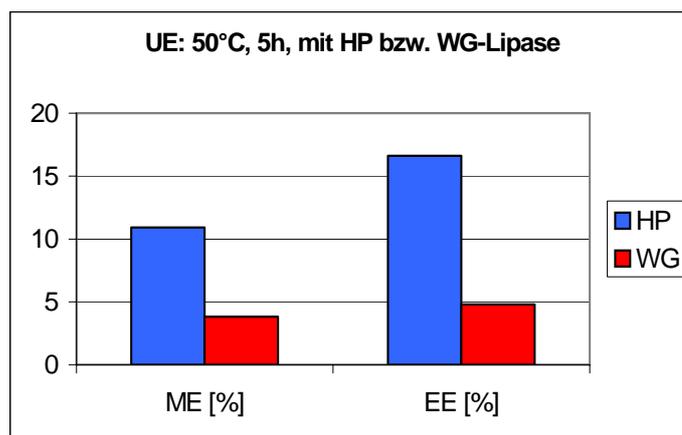


Abbildung 20: ME- und EE-Ausbeuten der UE mit HP- und WG-Lipasen

Prinzipiell sind diese Billig-Lipasen besser für die Ethanolyse geeignet als für die Umesterung mit dem kurzkettigen Alkohol Methanol. Aber da trotz optimierter Bedingungen nur ein so geringer Umesterungsgrad von maximal 12% Methylester bzw. 17% Ethylester zu erzielen war, werden diese Lipasen, trotz ihres niedrigen Preises, für weitere Untersuchungen nicht berücksichtigt.

4.1.2 Batch-Prozess ohne Lösungsmittel

Ab diesem Schritt werden alle Prozesse ohne Lösungsmittel durchgeführt. Der Gebrauch von Lösungsmittel ist energieintensiv, da das Lösungsmittel zur Wiederverwendung abdestilliert werden muss und erschwert daher auch eine Adaptierung im kontinuierlichen Prozess und eine Anwendung im industriellen Maßstab.

4.1.2.1 Umesterung mit höheren Alkoholen

Lipasen eignen sich als Katalysatoren für die Alkoholyse von Glyceriden. Ihre Aktivität ist auch abhängig von der Struktur und Kettenlänge des eingesetzten Alkohols. Je nach Lipasenstamm zeigen sie Präferenz gegenüber kurz- oder langkettigen, linearen oder verzweigten Alkoholen. Aus diesem Grund wird nun eine Versuchsreihe mit verschiedenen Alkoholen durchgeführt. Da man in den Vorversuchen mit Methanol und Ethanol zu dem Schluss kam, dass unterschiedliche Alkohole ein unterschiedli-

ches optimales Verhältnis zu Öl zeigen, werden die folgenden Versuche mit 50% und 40% Überschuss Alkohol durchgeführt.

1mol TG: 4.5, bzw. 4.2mol Alkohol, 10 % [m/m] Lipase H (immob. auf MKG, 2mm), 5h Reaktionszeit bei 50°C.

Die Probenahme erfolgt nach 1, 3, 6, 24. und 48h.

Es wurden folgende Alkohole untersucht:

Ethanol 96%ig, absolutes Ethanol, *n*-Propanol, *iso*-Propanol, 1-Butanol und 2-Butanol;

Anschließend wird mit Methanol, Ethanol (96%), *iso*-Propanol und 1-Butanol noch der Reaktionsverlauf mit der Zeit bestimmt und aus den Ergebnissen der Methanolyse die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante berechnet.

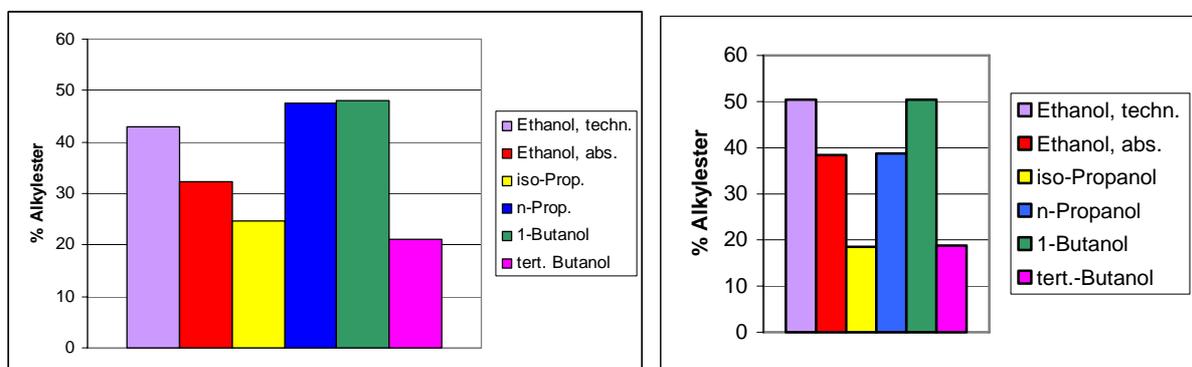


Abbildung 21: UE nach 5h mit verschiedenen Alkoholen bei 50% (links) und 40% (rechts) ROH-Überschuss

Bei der Methanolyse werden unter den oben beschriebenen Bedingungen 55-60% Methyl ester erhalten, dieser Wert kann in den Experimenten mit höheren Alkoholen nicht erreicht werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Reaktionsparameter für die Umesterung mit Methanol optimiert sind. Der höchste Umesterungsgrad in diesem Versuch wird mit **96%-igen Ethanol, *n*-Propanol und 1-Butanol** erzielt. Absolutes Ethanol erbringt eine niedrigere Ethylester-Ausbeute als technisches Ethanol, das untermauert die These, dass Enzyme eine geringe Wasserhülle brauchen, um katalytisch wirken zu können. Liegt im System gar kein Wasser vor, verhindert das Fehlen einer Wasser-Öl-Grenzfläche um die Lipase das Öffnen des Lides und damit

des aktiven Zentrums der Lipase. Es kommt zu einer Behinderung der katalytischen Kraft.

Lipase H zeigt eine eindeutige Präferenz Richtung linearer Alkohole (Ethanol, 1-Butanol, *n*-Propanol), die verzweigten Alkohole (*iso*-Propanol, *tert.*- Butanol) weisen eine geringere Umsatzrate auf.

Vergleicht man die Ergebnisse, die man mit unterschiedlichem Überschuss an Alkohol erhält, so ist aus den Diagrammen jeweils der gleiche Trend abzuleiten. Das wasserfreie Ethanol wird zu einem geringeren Anteil zu Alkoholyse herangezogen. *n*-Propanol eignet sich besser zu dieser enzymatisch katalysierten Umesterung als *iso*-Propanol. Der Gehalt an Propylestern ist bei höherer Konzentration des eingesetzten Alkohols höher, bei Ethanol aber niedriger. Eine Erhöhung der Eduktkonzentration führt zu einer Verlagerung des Gleichgewichts auf Produktseite. Ethanol scheint aber in höheren Konzentrationen die Lipase teilweise zu deaktivieren. Kommt ein Ethanol-Tröpfchen in direkten Kontakt mit dem aktiven Zentrum des Enzyms wird dieses inhiert und kann nicht mehr katalytisch tätig sein.

Man muss also für jeden Alkohol das optimale Verhältnis finden, das noch zu keiner Deaktivierung des Proteins aber zu einer möglichst weiten Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts führt.

Reaktionsverlauf mit der Zeit

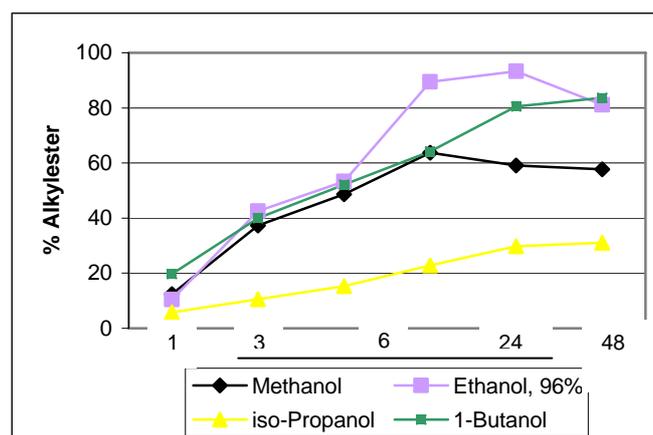


Abbildung 22: Reaktionsverlauf mit der Zeit

Die Ergebnisse der Vorversuche bestätigen sich: 96%-iges Ethanol und 1-Butanol liefern erneut den höchsten Umsatz. Der Alkylestergehalt steigt bei 1-Butanol, als auch bei *iso*-Propanol, mit der Zeit an, der Gehalt an Methyl- und Ethylester nimmt

jedoch bei erhöhter Reaktionsdauer (ab 48 Stunden) ab, die Rückreaktion zu den partiellen Glyceriden und Triglyceriden setzt wieder ein. Da bei diesem Batch-Prozess das gebildete Glycerin nicht abgetrennt wird, steht es für die Rückreaktion zur Verfügung, der Umesterungsgrad wird gesenkt. Das Reaktionsgleichgewicht wird durch das freie Glycerin wieder in Richtung der Edukte gedrängt. Diese ist entweder durch eine Erhöhung der Konzentration der Ausgangsprodukte oder durch Abtrennung des Nebenprodukts Glycerin zu verhindern.

Es werden mehr Ethyl- und Butylester gebildet als Methylester, das zeigt, dass Lipasen Präferenz für Reaktionen mit höheren Alkoholen aufweisen. *iso*-Propanol ist aufgrund seiner verzweigten Struktur sterisch am Kontakt mit der katalytischen Triade des Enzyms gehindert.

Versuche im kontinuierlichen Prozess sollen sowohl mit Ethanol als auch mit 1-Butanol durchgeführt werden.

Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante sagt aus, wie viele Moleküle der Testsubstanz pro Zeiteinheit durch die Reaktion umgewandelt werden.

Für die Umesterung wird eine **Reaktion Pseudo-1. Ordnung** angenommen. (*Paiva et al.*, 2000, *Wu and Tsai*, 2004)

Es wird eine Umesterung von Rapsöl (0.5g) mit 40% Überschuss Methanol (0.075g) und 10 Gewichtsprozent Lipase H (50mg auf 1g MKG) bei 50°C und 320rpm durchgeführt. Nach 1, 3, 5 und 7 Stunden wird eine Probe gezogen

Der Konzentrationsverlauf berechnet sich nach:

$$c_E = c_A \cdot e^{-k \cdot \tau}$$

wobei k die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante [$\text{h}^{-1}, \text{min}^{-1}, \text{s}^{-1}$] und τ die Verweilzeit [h, min, s] ist.

Diese Gleichung nach k aufgelöst ergibt:

$$k = -\ln\left(\frac{c_{TG}}{c_{TG,0}}\right) \cdot \frac{1}{t}$$

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche nach einer definierten Reaktionsdauer werden in diese Gleichung eingesetzt und so die Geschwindigkeitskonstanten für mehrere Reaktionszeiten bestimmt (siehe Anhang): Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante errechnet sich als arithmetisches Mittel aus den Einzelwerten.

$$\underline{k = 0.505}$$

Mit dieser Konstante ist es nun möglich Reaktionsverläufe über die Zeit vorherzusagen.

4.1.2.2 Versuche mit Proben aus der Praxis

Umesterung von Rindertalg und von Rapsöl mit etwa 10% FFA

Im Zuge des Projekts sollen auch Umesterungen mit in der Praxis anfallenden Realproben durchgeführt werden. Es wurden aus der Vielzahl der Möglichkeiten zwei wichtige Vertreter, Rindertalg und Rapsöl mit einem hohen Gehalt an freien Fettsäuren, ausgewählt.

Rindertalg: Im Jahr 2003 fielen in den EU-15 2.586.000 t Rindertalg an. Davon gingen 25% in den Energiesektor, 35% wurden für Futtermittel verwendet, 33% gingen in die Seifen- oder Oleochemie und nur 7% wurden als Nahrungsmittel eingesetzt. Mit einem maximalen Potenzial an Tierfett von 2.300.000 t/a stellt es eine wichtige Ressource für den Biodieselsektor dar.

Es wird eine Rindertalgprobe gewählt, die mit 16.95% einen sehr hohen Gehalt an freien Fettsäuren aufweist. Mit der herkömmlichen Umesterungsmethode ist es notwendig, zwei bis drei Vorveresterungsschritte durchzuführen, bevor eine alkalisch katalysierte Umesterung möglich ist. Es wird nun untersucht, ob dieser Nachteil mit der lipasenkatalysierten Umesterung aufgehoben werden kann.

Ein weiteres großes Potenzial für die Biodieselproduktion stellt gebrauchtes Altspeiseöl dar, das auch oft einen hohen Gehalt an freien Fettsäuren aufweist. Dies wurde mit einer Mischung aus Rapsöl und etwa 10% Ölsäure nachgestellt, um eine möglichst gleich bleibende Qualität über einen langen Zeitraum zu gewährleisten. In realen Altspeiseölproben sind sehr oft oxidierbare Stoffe enthalten, die die Eigenschaften des Produktes mit der Zeit verändern können. Rapsöl wird mit technischer Ölsäure gemischt, um ein Gemisch mit 10% freie Fettsäuren zu erhalten. Die HPLC-Messung ergibt einen Gehalt an freien Fettsäuren von 9.3%.

Um optimale Batch-Bedingungen zu erhalten, arbeitet man mit 40% Alkohol-Überschuss.

Die Öl- und Fettproben werden 10 % [m/m] immobilisierter Lipase H versetzt und bei 50°C und 320rpm geschüttelt. Nach 1, 3, 5 und 7h erfolgt eine Probennahme.

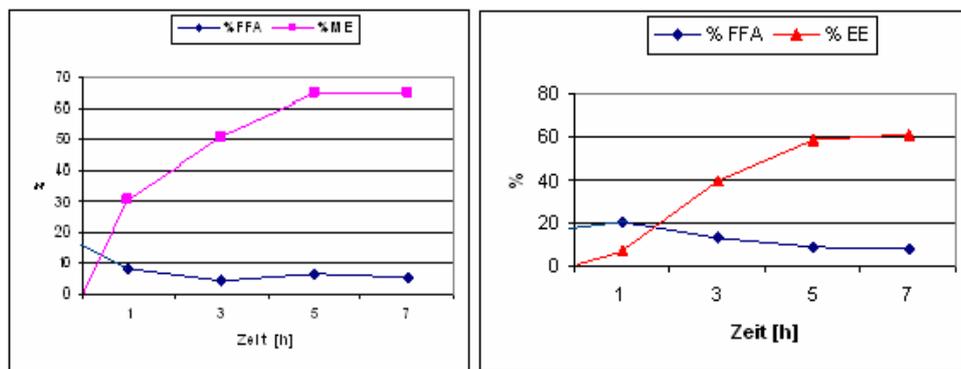


Abbildung 23: Umesterung von Rindertalg mit Methanol bzw. Ethanol

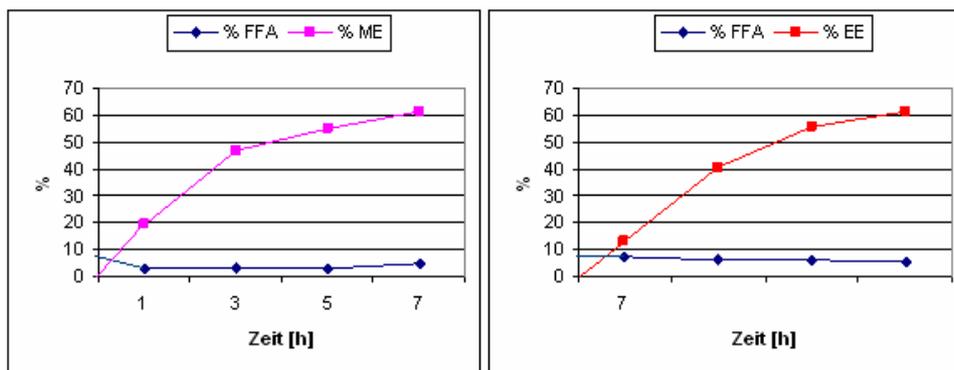


Abbildung 24: Umesterung von Rapsöl mit 9.3% FFA mit Methanol bzw. Ethanol

4.1.2.3 Regenerationsversuche

Die Aktivität der immobilisierten Lipase nimmt mit Anzahl der Einsätze ab. Dafür können einige Gründe angeführt werden. Der entscheidende scheint jedoch zu sein, dass das bei der Reaktion gebildete Glycerin sich an das Enzym anlagert und so das aktive Zentrum besetzt. Somit ist ein direkter Kontakt zwischen Enzym und Reaktanten nicht mehr möglich, die Umesterungsrate wird sinken. Dies kann dadurch verhindert werden, dass das anfallende Glycerin jeweils nach einer Umesterung vom Träger gewaschen wird ohne dabei das immobilisierte Enzym vom Träger oder den Träger selbst mitzureißen. Aufgrund der Polarität des Glycerins soll ein polares bis schwach polares Regenerierungsmittel eingesetzt werden. Es soll nach einem Lösungsmittel, welches zur Regenerierung des Enzyms eingesetzt werden kann, gesucht werden. Zur Auswahl wurden *tert.*-Butanol, Ethanol, Wasser, Methanol und *iso*-Propanol herbeigezogen. Mit den immobilisierten **Enzymen H und J** soll drei Mal 5h umgeestert werden, wobei zwischen jeder Umesterung das immobilisierte Enzym mit dem jeweiligen Lösungsmittel gewaschen wird. Das Lösungsmittel (damit auch Öl/MeOH) wird dann abgesaugt, und erneut die entsprechende Menge an Öl und Methanol wieder dem Katalysator zugegeben. Es soll getestet werden, ob sich eines der Lösungsmittel positiv auf die Enzymaktivität auswirkt und damit den ME-Gehalt steigert. Umgeestert wird bei 50 °C mit 10 % [m/m] Enzym.

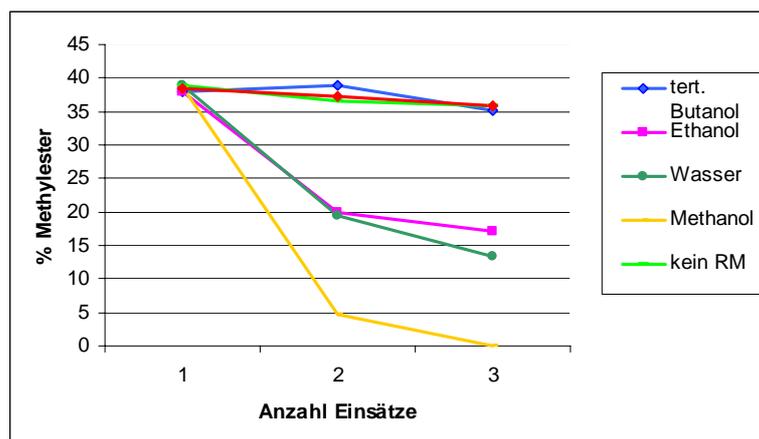


Abbildung 25: Regenerierungsversuche

Wenn man die Ergebnisse der behandelten Enzyme mit denen der unbehandelten vergleicht, sieht man, dass kein deutlicher Unterschied festzustellen ist. Es wird daher vorerst ohne Regenerierungsmittel gearbeitet, obwohl *iso*-Propanol laut Literatur

(Chen et al., 2003) Potenzial als Regenerierungsmittel aufweist. *Tert.*- Butanol zeigt zwar ähnliche Fähigkeiten, ist aber aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften (wird bei Raumtemperatur bei erhöhtem Druck fest) nicht geeignet in einem kontinuierlichen Verfahren eingesetzt zu werden. Die Lipase, die mit Methanol regeneriert wird, verliert sofort jegliche Aktivität, sie wird, durch die Zerstörung ihres aktiven Zentrums, sofort deaktiviert. Die polaren Regenerierungsmittel scheinen nicht nur das störende Glycerin sondern auch die Lipasen vom Träger zu waschen, mit sinkendem Immobilisierungsgrad muss die Umesterungsrate sinken. Die unpolaren Regenerierungsmittel entfernen wiederum das Glycerin nicht, das so weiter adhäsiv an der Lipase verbleibt und diese so sterisch an der Katalyse hindert. (Geluk et al., 1992) In dieser Versuchsreihe konnte kein zufrieden stellendes Regenerierungsmittel gefunden werden.

4.1.2.4 Versuche mit weiteren Lipasen

Freie vs. immobilisierter vs. flüssigkeitsstabilisierter Lipase H

Lipase H wird von einer großen Enzymproduktionsfirma in drei unterschiedlichen Formulierungen angeboten, die hier auf ihre Eignung in der Umesterungsreaktion von Rapsöl mit Methanol untersucht werden sollen. Zusätzlich wird der Stamm der Lipase H bei der DSZM bestellt und auf dem Nährmedium SNLH gezüchtet, die daraus gewonnenen ganzen Zellen werden auch als Biokatalysator eingesetzt.

Formulierung 1: Lipase H immobilisiert auf Silicagel (Aerosil), Cellulose und Maltodextrin

Formulierung 2: Lipase H immobilisiert auf Kaolin mit Natriumsulfat

Formulierung 3: Lipase H flüssigkeitsstabilisiert in Wasser und Propylenglykol

Formulierung 4: Lipase H immobilisiert nach Methode G auf Maiskolbengranulat

Formulierung 5: Ganze Zellen von H werden auf Maiskolbengranulat immobilisiert.

Formulierung 6: Die ganzen Zellen werden direkt als Katalysator eingesetzt.

Mit diesen sechs unterschiedlichen Formulierungen desselben Lipasenstammes wird jetzt eine optimierte Umesterung ohne Lösungsmittel durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Da der Gehalt an aktiver Lipase H in den ganzen Zellen des H-Stammes nicht bekannt ist, wird ein Gehalt von 100% aktivem Enzym angenommen.

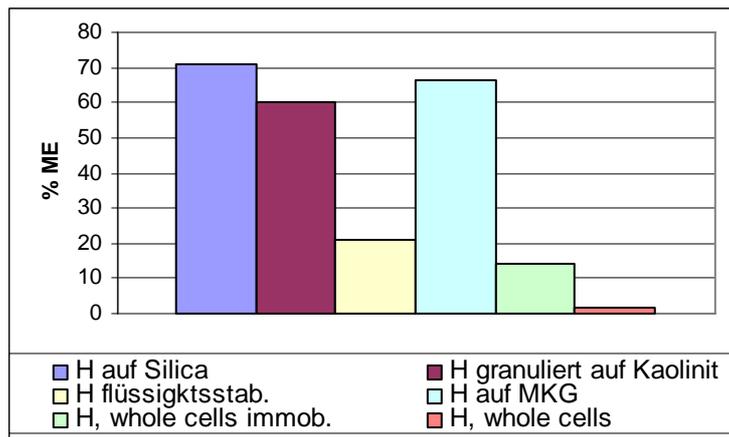


Abbildung 26: Umesterung mit verschiedenen Formulierungen der Lipase H

Der höchste Umsatz wurde mit der kommerziell erhältlichen Formulierung 1, Lipase H auf Silicagel, erzielt. Jedoch erzielt die selbst entwickelte Immobilisierungstechnik von Lipase H auf Maiskolbengranulat nur ein knapp niedrigeres Ergebnis von durchschnittlich 66.5% ME zu durchschnittlich 71% der Formulierung 1. Die Formulierung 2, Lipase H granuliert mit Kaolinträger, erzielt eine Methylesterausbeute von durchschnittlich 60%, wohingegen die flüssigkeitsstabilisierte Formulierung nur geringe Ausbeuten von etwa 21% ME bietet. Die ganzen Zellen der Lipase H katalysieren ohne Aufreinigung die Reaktion nur zu einem geringen Maße, nur knapp 15% ME werden gebildet. Das ist darauf zurückzuführen, dass die Menge an aktiver Lipase in den ganzen Zellen nicht bekannt ist und man daher von keinem vergleichbaren Lipasengehalt ausgehen kann. Jedoch ist klar ersichtlich, dass die Immobilisierung der ganzen Zellen die Aktivität um eine Zehnerpotenz steigert, so können mit den immobilisierten ganzen Zellen nur 1.5% ME erhalten werden. Dies ist ein klarer Hinweis auf die Effizienz der selbst entwickelten Immobilisierungstechnik.

Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass die Aufarbeitung und Immobilisierung der Lipase von sehr hoher Bedeutung für deren katalytische Fähigkeit ist. Da mit der auf Maiskolbengranulat immobilisierten Lipase das zweitbeste Ergebnis erzielt werden kann, ist die selbst entwickelte Immobilisierung auf diesem billigen Trägermaterial ein neuer und äußerst viel versprechender Weg, der Potenzial für die Zukunft beinhaltet.

4.1.3 Veresterung im Batch-Prozess

4.1.3.1 Veresterung von Ölsäure mit Methanol

Lipasen haben auch die Fähigkeit die Veresterung von Fettsäuren mit Alkoholen zu katalysieren. Sie haben die Fähigkeit in einem Reaktionsschritt sowohl die Ver- als auch die Umesterung zu katalysieren, das stellt einen großen Vorteil gegenüber der herkömmlichen alkalisch katalysierten Umesterung dar. Enthält der Rohstoff einen Gehalt an freien Fettsäuren, der über 3% liegt, musste bisher im herkömmlichen Prozess ein zusätzlicher, sauer katalysierter Veresterungsschritt, vorgeschaltet werden. Bei lipasenkatalysierten Prozessen können diese zwei Reaktionsschritte parallel, ohne Zeitverlust und Kostenaufwand, ausgeführt werden.

Die ungesättigte Ölsäure ist mit circa 63% Hauptbestandteil des Rapsöls.

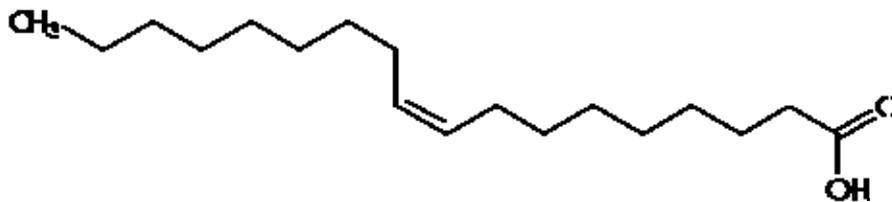


Abbildung 27: Strukturformel der Ölsäure

Andere Namen für Ölsäure $C_{18}H_{34}O_2$ sind cis-9-Octadecensäure und Oleinsäure.

Um das beste molare Verhältnis von Methanol und Ölsäure zu finden, wird eine Versuchsreihe aufgebaut. **1 Mol Ölsäure wird mit 1/ 2/ 5/ 10Mol Methanol verestert.**

Es werden 10% [m/m] immobilisierte Lipase H verwendet. Die Reaktionszeit beträgt 5h, bei 50°C und 320rpm. Als Rohstoff wird technische Ölsäure gewählt, die einen Gehalt an freien Fettsäuren von 96.9% aufweist.

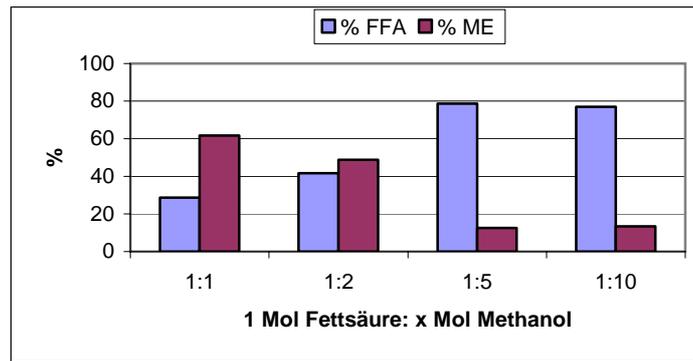


Abbildung 28: Veresterung von Ölsäure mit unterschiedlichen Fettsäure-Alkohol-Verhältnissen

Wie aus dem Diagramm klar ersichtlich ist, nimmt der Gehalt an gebildetem Methyl-ester bei Überschuss an Methanol deutlich ab. Werden bei stöchiometrischen Verhältnis nach 5 Stunden Reaktionszeit über 60% Methylester gebildet, sind es bei 100% Überschuss Methanol nur mehr knapp 50%. Erhöht man die Alkoholkonzentration noch mehr auf das 5fache stöchiometrische Verhältnis, können nur mehr durchschnittlich 12% Ester gebildet werden. Anhand dieses Beispiels ist die Deaktivierung der Lipase durch einen Überschuss an Methanol besonders deutlich.

Alle folgenden Veresterungsreaktionen werden im stöchiometrischen Verhältnis von 1 Mol Ölsäure zu 1 Mol Alkohol ablaufen.

Da der Ausgangsstoff keine reine sondern eine technisch reine Ölsäure ist, erhält dieser neben Fettsäuren auch noch einen gewissen Gehalt an Tri- Di- und Monoglyceriden, die im Zuge der Reaktion, wenn auch nicht vollständig, umgeestert werden.

Veresterung von Ölsäure mit Methanol - Reaktionsverlauf mit der Zeit

Mit dem optimalen Verhältnis von 1 Mol Ölsäure zu 1 Mol Methanol wird der Verlauf der Veresterungsreaktion mit die Zeit beobachtet. Die Probennahme erfolgt nach 1, 3, 5, 6 und 24 Stunden.

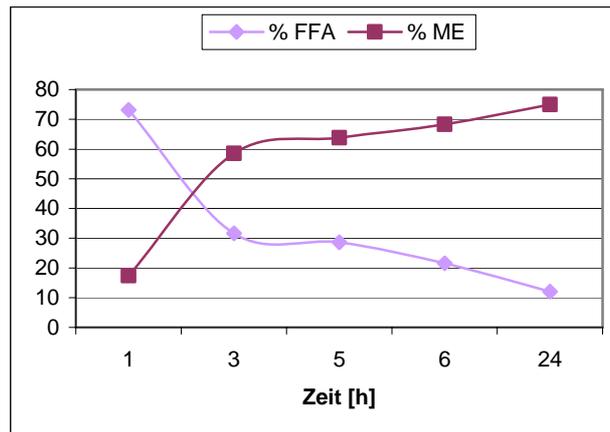


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Veresterungsreaktion

Der Anstieg des Methylstergehalts erfolgt sprunghaft zwischen der ersten und dritten Stunde, danach steigt sie noch bis zur sechsten Stunde leicht an, im weiteren Verlauf ist die Zunahme weniger groß. Die Abnahme des freien Fettsäuregehalts ist zu Reaktionsbeginn am höchsten. Das bedeutet, dass die Reaktionsgeschwindigkeit zu Beginn der Veresterung am größten ist und sich dann, ab einer gewissen Umsatzrate, verringert. Die Reaktion ist auch nach 24 Stunden nicht vollständig abgelaufen.

4.1.3.2 Veresterung von Ölsäure mit höheren Alkoholen

Reaktionsverlauf mit der Zeit

Die Veresterungsreaktion wird nun mit der stöchiometrischen Menge an Ethanol und *iso*-Propanol durchgeführt.

Es werden 2.00g Ölsäure (7.1mmol) mit 7.1mmol Alkohol versetzt, 0.2g immobilisierte Lipase H zugegeben und bei 50°C bei 320rpm geschüttelt. Die Probennahme erfolgt nach 1, 3, 6 und 24 Stunden.

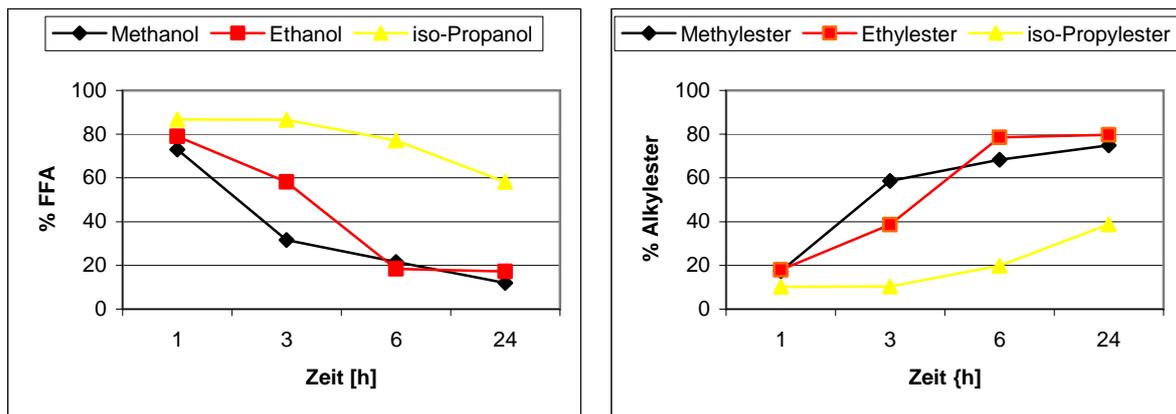


Abbildung 30: Abnahme der freien Fettsäuren bzw. Zunahme der Alkylester in der Veresterungsreaktion über die Zeit

Auch in der Veresterungsreaktion ist der gleiche Trend wie in der Umesterungsreaktion erkennbar. Es werden mit Ethanol, 96%-ig, sehr gute Ergebnisse erzielt, die sogar über denen von Methanol liegen. *Iso-Propanol* hingegen scheint für die lipasenkatalysierte Veresterungsreaktion nicht sehr gut geeignet zu sein. Auch nach 24 Stunden werden nur etwa 40% *iso-Propylester* erhalten. Auch bei der Veresterung mit Ethanol ist die Reaktionsgeschwindigkeit am Beginn der Reaktion am größten, erreicht der Ethylestergehalt einen Wert von über 75%, verlangsamt sich die Reaktion, als Grund dafür kann die Verschiebung des Gleichgewichts angeführt werden. Bei der Bildung von Propylestern jedoch erfolgt die Reaktion langsam, zwischen erster und dritter Stunde ist keine Erhöhung der Esterkonzentration zu beobachten, erst danach steigt die Konzentration langsam aber stetig an. Durch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf über 24 Stunden könnte eine Steigerung des Umsatzes erzielt werden.

4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Batch-Versuche

Die selbst entwickelte Immobilisierungstechnik hat sich auch im direkten Vergleich mit kommerziell erwerblichen Lipasenformulierungen bestätigt.

Es wurden Umesterungen von Rapsöl und von Realproben mit Methanol durchgeführt, die idealen Batch-Bedingungen sind **40%-iger Methanol-Überschuss, 10 % [m/m] Lipase H, immobilisiert nach Methode G auf Maiskolbengranulat, eine Reaktionszeit von fünf Stunden sowie Schütteln bei 320rpm und 50°C**. So ge-

nannte Billig-Lipasen haben sich nicht als geeigneter Substitut für Lipasen H und J erwiesen.

Es wurden Umesterungen mit reinem und technischem Ethanol, *n*-Propanol, *iso*-Propanol, 1-Butanol und 2-Butanol durchgeführt, wobei sich Ethanol, *n*-Propanol und 1-Butanol als am besten geeignet erwiesen. Bei Versuchen zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit über die Zeit stellte sich heraus, dass nach einer Reaktionszeit von über 24h eine Rückreaktion, basierend auf der Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts und der Bildung des Nebenprodukts Glycerin, stattfinden kann.

Die Untersuchung der lipasenkatalysierten Veresterung ergab ein optimales molares Verhältnis von **1 Mol Fettsäure zu 1 Mol Alkohol**, sie wurde mit Methanol, Ethanol und *iso*-Propanol durchgeführt, wobei mit Ethanol die besten Ergebnisse erzielt werden.

Sowohl die Umesterung der Realproben Rindertalg und Rapsöl mit einem erhöhten Gehalt an freien Fettsäuren verliefen zufrieden stellend, wenn auch die Umesterungsrate etwas geringer ist als bei reinem Rapsöl. Der hohe Gehalt an freien Fettsäuren wird durch die einstufige lipasenkatalysierte Ver- und Umesterung deutlich gesenkt. Eindeutig gezeigt wurde die erhöhte Aktivität der immobilisierten Lipase gegenüber der Lipase in freier Form, jener als ganze Zelle oder jener in flüssigkeitsstabilisierter Form.

4.3 Kontinuierliches Verfahren

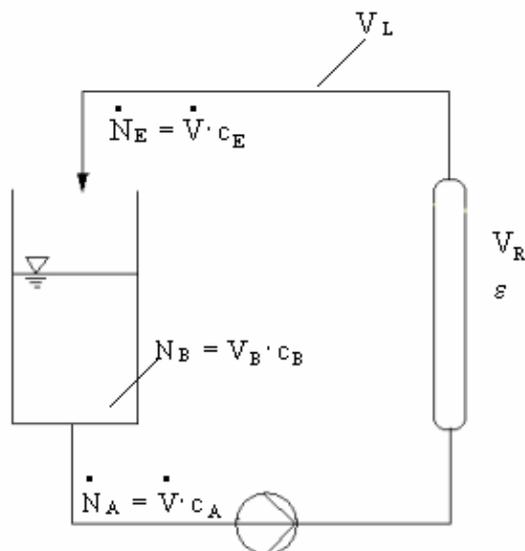
Die Ergebnisse der Batch-Versuche zur Ver- und Umesterung sollen nun angewandt werden, um ein kontinuierliches Verfahren zur lipasenkatalysierten Umesterung zu entwickeln.

In Absprache mit den Verfahrenstechnikern des Industriepartners wird ein Fixed Bed Reaktor aus einem eigens konstruierten Laborapparat entwickelt.

Diese Apparatur kann sowohl als Schlaufen- als auch als Rohrreaktor betrieben werden.

4.3.1 Schlaufenreaktor

Im Schlaufenreaktor werden vier Versuche durchgeführt, um die im Batch optimierten Parameter auf ihre Eignung in der kontinuierlichen Verfahrensweise hin zu prüfen.



- c_AAustrittskonzentration
- c_EEintrittskonzentration
- c_BKonzentration – Vorlagebehälter
- V_BBehältervolumen
- V_RReaktorvolumen
- V_LLeitungsvolumen
- \dot{V}Volumenstrom
- εLückengrad
- \dot{N}_A ...Molenstrom – Austritt
- \dot{N}_E ...Molenstrom – Eintritt
- N_BMolanzahl – Vorlagebehälter

Abbildung 31: Modell Schlaufenreaktor

Das immobilisierte Enzym wird in eine Glassäule, die an beiden Enden ein Schlauchanschlussgewinde aufweist, befüllt. An einem Ende der Glassäule befindet sich eine Fritte, die das Austreten von Maiskolbengranulat verhindert. Die mit Katalysator befüllte Säule wird als Reaktor bezeichnet. Da die Säule nicht vollständig mit

Katalysator gefüllt wird, werden inerte Glasperlen mit einem Durchmesser von 2mm als Spacer verwendet. Als Pumpe wird eine FMI-Taumelkolbenpumpe gewählt.

Der Reaktor wird, um eine gleich bleibende Reaktionstemperatur zu gewährleisten, in einem großen Heizbad, das mittels Heizmagnetrührer mit Kontaktthermometer gesteuert wird, thermostatisiert.

Die Reaktanten Öl und Methanol werden vor der Reaktion mit einem UltraTurrax-Gerät homogenisiert.



Abbildung 32: Aufbau ohne Heizbad

Für den Reaktor wird eine **Reaktion 1. Ordnung** angenommen. Der Konzentrationsverlauf über den Reaktor berechnet sich nach:

$$c_E = c_A \cdot e^{-k \cdot \tau} \quad (1)$$

wobei k die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante [$\text{h}^{-1}, \text{min}^{-1}, \text{s}^{-1}$] und τ die Verweilzeit [$\text{h}, \text{min}, \text{s}$] ist.

Aus dem Volumenstrom kann die **Verweilzeit** im Reaktor (Säule) pro Durchgang errechnet werden.

Es werden im Schlaufenreaktor vier mit 2.0g auf MKG immobilisierter Lipase H katalysierte Umesterungen (A-D) mit jeweils 40% Überschuss Methanol bei 50°C vorgenommen, die Reaktionsparameter sind im Anhang angeführt.

Geht man von der im „Batch-Verfahren“ entwickelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k = 0.505$ aus, kann man im Schlaufenreaktor von einer Abnahme der Triglyceridkonzentration nach **Abbildung 33** ausgehen. Dem wird die experimentell bestimmte Triglyceridabnahme gegenübergestellt.

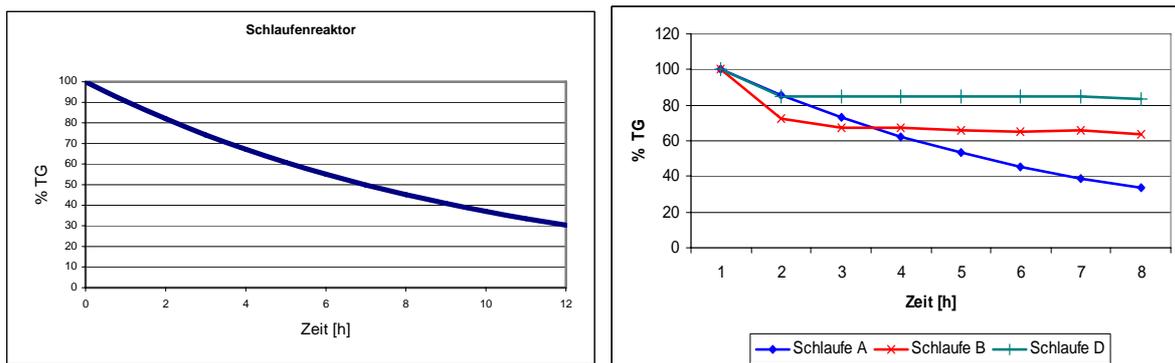


Abbildung 33: Diagramm: Abnahme der Triglyceridkonzentration im Schlaufenreaktor; Theoretische Voraussage (links), experimentelle Werte (rechts)

Die erhaltenen Ergebnisse weisen eine breite Streuung auf, so entspricht die Abnahme der Triglycerid-Konzentration bei Versuch A den theoretischen Voraussagen, jedoch ist sowohl bei Versuch B als auch bei Versuch D die Abnahme um einiges geringer. Der niedrige Reaktionsumsatz in diesen beiden Ansätzen wird auf eine nicht ausreichende Methanolkonzentration zurückgeführt, daher wird die Änderung der Methanolkonzentration während der Reaktion im Schlaufenreaktor beobachtet.

4.3.1.1 Überprüfen des Methanolgehalts am GC-FID

Die Proben aus Versuch D werden auf ihren Methanol-Gehalt hin untersucht. Im Vorfeld wird eine Kalibrierung bezüglich des Methanol-Gehalts in der Reaktionsmischung vorgenommen. Die Proben werden gaschromatographisch mit Flammenionisationsdetektor analysiert. Für die Kalibration wird eine Mischung von 80% Rapsöl und 20% destilliertem Rapsölmethylester als Referenzsubstanz verwendet.



Abbildung 34: GC-FID; HP 6890 GC-System

Diese Referenzsubstanz wird mit 15, 10 und 5% Methanol gespikt, die Spektren aufgenommen und eine Kalibrationsgerade ermittelt.

Bei **40% Überschuss Methanol** sollte **theoretisch ein Methanolgehalt von 15.3%** erhalten werden.

Die Messungen der Fraktionen des Schlaufenreaktorversuches D ergeben, dass bei 40%igem Überschuss an Methanol nach dem Durchgang durch die Säule der gesamte Methanol-Überschuss entgast ist, im Gemisch befindet sich aber auch noch nach fünf Stunden der stöchiometrisch zur Umesterung benötigte Methanol-Gehalt von 10.9%. Der Methanol-Gehalt sinkt mit der Zeit ab, dies könnte durch eine kontinuierliche Methanol-Zugabe während der Reaktion kompensiert werden.

Um den Reaktionsverlauf besser untersuchen zu können, wird in weiterer Folge nicht mehr im Schlaufenreaktor gearbeitet, sondern der Aufbau zu einem Rohrreaktor umgebaut.

4.3.2 Rohrreaktor

Hier kann das Öl-Methanol-Gemisch nach einmaligem Durchgang durch die Säule aufgefangen und analysiert werden. So ist es möglich, genau definierte Verweilzeiten im Reaktor zu erhalten und etwaige Fehler sofort zu korrigieren.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe werden 41 Experimente durchgeführt.

- c_AAustrittskonzentration
- c_EEintrittskonzentration
- c_BKonzentration – Vorlagebehälter
- V_BBehältervolumen
- V_RReaktorvolumen
- V_LLeitungsvolumen
- \dot{V}Volumenstrom
- εLückengrad
- \dot{N}_A ...Molenstrom – Austritt
- \dot{N}_E ...Molenstrom – Eintritt
- N_BMolanzahl – Vorlagebehälter

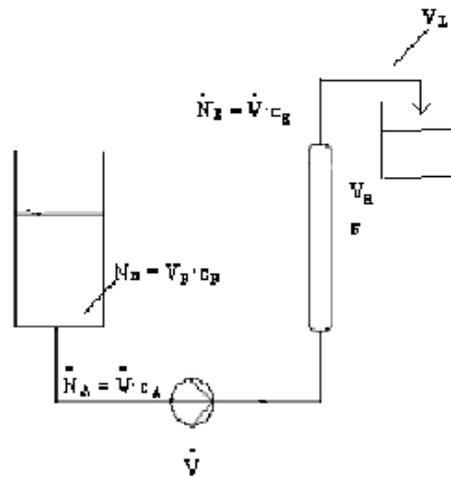


Abbildung 35: Rohrreaktor

In den Versuchen werden das optimale Öl-Alkohol-Verhältnis für Veresterung und Umesterung, die Lage der Säule, die geeignete Flussrichtung des Reaktionsgemisches, die optimale Verweilzeit, sowie die Menge und Standzeit des Enzyms ermittelt. Es erfolgt zusätzlich eine wiederholte Einspeisung von gesammelten Fraktionen vorhergehender Versuche in Reaktoren mit neuem Enzym. Es werden Umesterungen und Veresterungen mit Methanol und höheren Alkoholen durchgeführt. Das Freivolumen der Säule beträgt etwa 37cm^3 , daher werden jeweils 40ml Fraktionen getrennt gesammelt. Die Zeit, die benötigt wird, um diese 40ml zu sammeln, wird als **Verweilzeit** des Reaktionsgemisches in der Säule definiert. Das Sammeln einer Fraktion bei einer definierten Verweilzeit wird als „**Durchgang**“ bezeichnet. Die Einzelfraktionen, mit einem Volumen von 40ml und einer definierten Verweilzeit, werden chromatographisch untersucht und ausgewertet.

4.3.2.1 Umesterung im Rohrreaktor - Allgemeine Vorgangsweise

2.0g Lipase H werden auf etwa 10g MKG (2mm) immobilisiert (in 250 ml 0.1M Acetat-Puffer). Das immobilisierte Enzym wird vor der Reaktion etwa 20 min in reinem Öl eingelegt und vorgequollen. Danach wird damit die Säule befüllt, das restliche Volumen wird mit Glaskugeln aufgefüllt (Lückengrad = 0.59).

Nun wird die Säule in das auf 50°C thermostatisierte Wasserbad eingebracht, welches gleichzeitig als Explosions-Schutz fungiert.

Die Säule wird mit einem Öl-Alkohol-Gemisch, das vorher mit dem Ultraturrax homogenisiert wurde, rasch durchgespült.

Dann wird der Fluss möglichst gering und gleichmäßig eingestellt, alle 40 ml (~Freivolumen der Säule) werden Fraktionen geschnitten und dann auf den Umesterungsgrad mittels HPSEC-RI analysiert. Die Verweilzeit (Zeit, in der das Öl/MeOH-Gemisch vom Anfang der Säule bis zum Ende der Säule fließt) wird genau definiert.

- Die gesammelten Fraktionen werden mit **F1, F2, F3,...** bezeichnet.

Im Anhang findet sich ein Überblick über die durchgeführten Umesterungen und Veresterungen im Rohrreaktor:

Bei der Umesterung entsteht als Nebenprodukt Glycerin, das sich an das Maiskolbengranulat und an die Lipase anlagern kann und so den Katalysator sterisch hindert, an der Reaktion teilzunehmen; dieser Effekt kann bei der wiederholten Einspeisung beobachtet werden.

Die Glycerin-Detektion erfolgt nach der Bestimmungsmethode der **Biodiesel-Norm EN14214**. Diese ist eine gaschromatographische Methode mit Flammenionisationsdetektor.

Um das Reaktionsgemisch vom gebildeten Glycerin zu befreien, wird eine Wäsche eingeführt. Anschließend wird das Gemisch gestrippt, um überschüssiges Wasser und Methanol zu entfernen. Vor und nach dieser Wäsche wird der Glycingehalt des Gemisches bestimmt.

Aus der Vielzahl der durchgeführten Experimente wird nun in diesem Kapitel eine kleine Auswahl der erhaltenen Ergebnisse angeführt. Die Reaktionsparameter für den kontinuierlichen Prozess Öl-Alkohol-Verhältnis, Temperatur, Verweilzeit, Lage der Säule und Lipasenmenge werden optimiert. Es werden Ver- und Umesterung mit Methanol und höheren Alkoholen durchgeführt.

4.3.2.2 Auswahl der Lipase H

Die Lipase H wurde für die Immobilisierung auf MKG sowohl aus Formulierung 1 (immobilisiert auf Silicagel) (Versuch 1, 2) als auch aus Formulierung 3 (flüssigkeitsstabilisiert) (Versuch 3, 4) gewonnen.

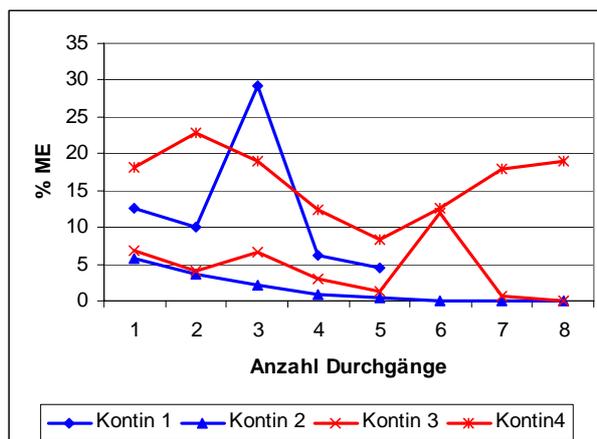


Abbildung 36: Kontinuierliches Verfahren 1-4; Vergleich der Lipase H aus Formulierung 1 und 3;

Die Lipase H immobilisiert aus Formulierung 3 zeigt im Vergleich zur Immobilisierung aus Formulierung 1 (bei 40% Überschuss an Methanol) bessere Ergebnisse bei der Umesterung.

In allen nachfolgenden Umesterungen wird deshalb nur mehr die Lipase H aus der dritten Formulierung (flüssigkeitsstabilisiert) auf Maiskolbengranulat immobilisiert.

4.3.2.3 Optimierung der Reaktionsparameter

Öl-Alkohol-Verhältnis, Lage der Säule, Temperatur

In den folgenden Versuchen zur kontinuierlichen Methanolyse werden 0-100% Überschuss an Methanol eingesetzt, die Lage der Säule sowohl von vertikal auf horizontal als auch die Flussrichtung variiert und die Temperatur von 50°C auf 40°C verändert. Aus Abbildung 37 ist ersichtlich, dass durch die Änderung des Öl-Alkohol-Verhältnisses eine Steigerung des ME-Gehalts erzielt werden kann.

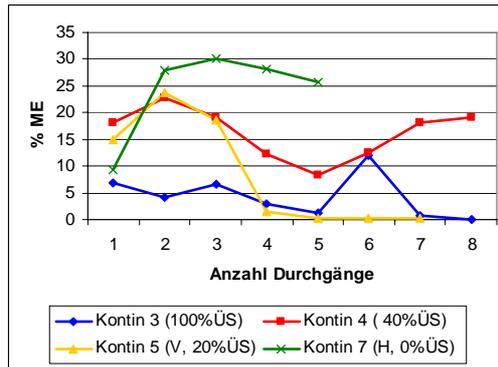


Abbildung 37: Umesterungen mit unterschiedlichen TG:ROH-Verhältnissen

Bei 100%igem Überschuss an Methanol (Kontinuierlicher Prozess 3) wird im Durchschnitt die geringste Methylester-Ausbeute erhalten, zufrieden stellende Ergebnisse werden bei 40% Überschuss (Kontinuierlicher Prozess 4) erzielt. Überraschend geringer Umsatz wurde bei der Senkung des Methanolgehalts auf 20% Überschuss (Kontinuierlicher Prozess 5) erhalten. Der größte Umsatz wurde beim Einsatz der stöchiometrischen Menge an Methanol (Kontinuierlicher Prozess 7) erzielt. Die weiteren kontinuierlichen Umesterungen werden daher maximal mit der stöchiometrischen Menge an Alkohol durchgeführt. Wie die Ergebnisse der Versuche 3, 4, 5 und 7 zeigen birgt ein Überschuss an Methanol immer die Gefahr der Deaktivierung der Lipasen in sich.

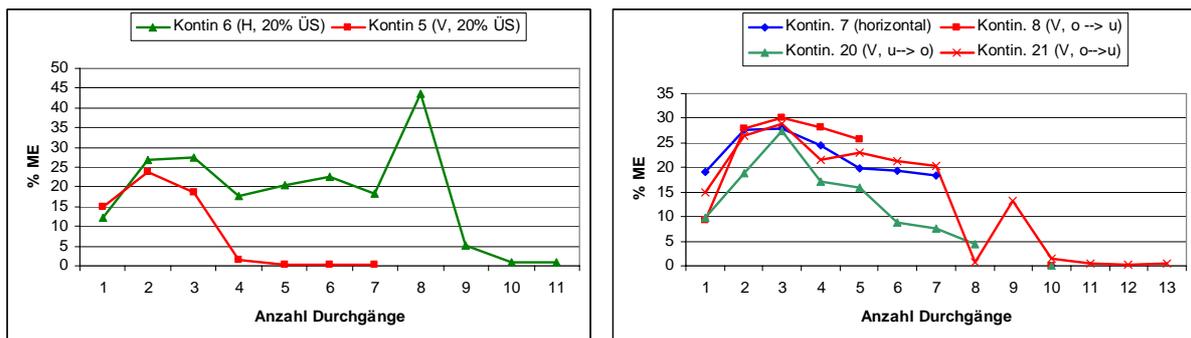


Abbildung 38: Lage der Säule, 20% Überschuss Methanol (links), kein Überschuss Methanol (rechts)

Bei 20% Alkohol-Überschuss erreicht man mit einer horizontalen Lage der Säule einen höheren Umesterungsgrad als bei vertikaler Lage. Überdies ist bei der waag-

rechten Säule der Fluss leichter konstant zu halten. Dies spricht für eine waagrechte Fixierung der Säule bei geringem Alkoholüberschuss.

Bei 20% Methanolüberschuss ist die waagrechte Fixierung der Säule besser geeignet, bei Einsatz der stöchiometrischen Alkoholmenge ändert sich jedoch dieses Bild. Wie Abbildung 38 deutlich zeigt, werden die höchsten Methylesterausbeuten bei einer vertikalen Säulenlage erreicht. Entscheidend ist jedoch die Flussrichtung. So sind die guten Ergebnisse von 30% Methylester nur bei einem Fluss von oben nach unten erreichbar. Die Verringerung der Temperatur von 50°C auf 40°C bei den Versuchen 7 und 8 ergab eine höhere Umsatzrate.

So werden in Hinkunft alle Reaktionen mit einer vertikal-fixierten Säule und einer Flussrichtung von oben nach unten, bei 0% Alkohol-Überschuss und 40°C durchgeführt.

4.3.2.4 Variation der Verweilzeit

Die Variation der Verweilzeiten von 0.5 bis zu 1.5 Stunden führte tendenziell zum erwarteten Ergebnis. So wurde bei der kürzesten Verweilzeit von 0.5h der geringste Gehalt an Methylestern gebildet. Mit der Erhöhung der Verweilzeit stieg auch die Umesterungsrate der Reaktion, jedoch nicht in dem erhofften Maße von Faktor 2 (1h) bzw. Faktor 3 (1.5h).

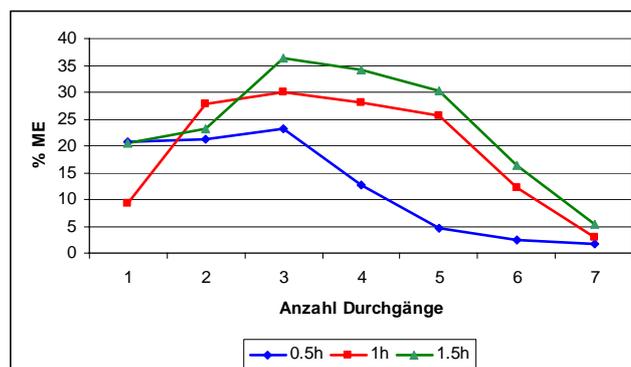


Abbildung 39: Variieren der Verweilzeit

In weiteren Versuchen wird die Verweilzeit von 1.5h auf 4h erhöht, sowie der Gehalt an Lipasen auf bis zu 5.0g gesteigert. Damit soll eine Steigerung des Reaktionsumsatzes erzielt werden.

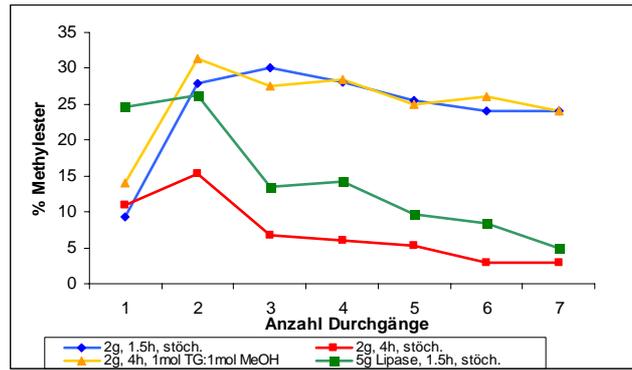


Abbildung 40: Erhöhung des Lipasengehalts und der Verweilzeit

Aus diesem Diagramm ist zu erkennen, dass die Erhöhung der Lipasenmenge auf 5.0g und der Verweilzeit auf 4h bei einem stöchiometrischen Öl-Alkohol-Verhältnis zu einer Verringerung des Umesterungsgrades führt. Bei zu dichter Packung oder direktem Lipasen-Alkohol-Kontakt kann die Aktivität des Enzyms nicht aufrechterhalten werden. Wird jedoch die Methanolmenge herabgesetzt, kann eine höhere Methyl-terausbeute erreicht werden. Diese ist bei einer Reaktionsdauer von 4 Stunden jedoch nur geringfügig höher als bei einer Verweilzeit von 1.5 Stunden. Dies war nicht zu erwarten, wenn man die ersten Versuche zur Variation der Verweilzeit heranzieht. Da zusätzlich der Aufwand bei einer höheren Verweilzeit durch eine komplikationsreiche Flussregulierung erheblich erschwert ist, **werden alle weiteren Versuche bei einer Verweilzeit von 1.5h durchgeführt.**

4.3.2.5 Einsatz von nicht-stöchiometrischen Mengen an Methanol

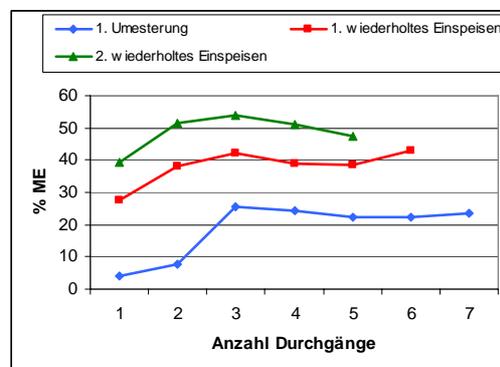


Abbildung 41: Wiederholtes Einspeisen, 1Mol TG: 1Mol MeOH

In den Versuchen zum kontinuierlichen Prozess 15-17 wurde 1 mol MeOH/mol TG (1/3 der stöchiometrischen Menge) eingesetzt, die Fraktionen gesammelt und die Mischfraktion in eine Säule mit „frisch“ immobilisiertem Enzym eingespeist. Nach dem dreimaligen Einspeisen (siehe Abbildung 41) konnten bis zu **53.8%** Methylester erreicht werden, was das bisher beste Ergebnis im kontinuierlichen Prozess darstellt.

4.3.2.6 Kontinuierliche Umesterung mit höheren Alkoholen

Es werden Umesterungen von Rapsöl mit **Ethanol, *iso*-Propanol und 1-Butanol** durchgeführt. Der Alkohol wurde im stöchiometrischen Verhältnis zugegeben, die Lage der Säule ist vertikal mit einer Flussrichtung von oben nach unten, die Reaktionstemperatur liegt bei 40°C, die Verweilzeit beträgt 1.5 Stunden. Der Gehalt an gewonnenem Alkylester wird mittels Flüssigkeitschromatographie bestimmt.

Wie man aus Abbildung 42 deutlich erkennen kann, wird der höchste Umsatz von 46% mit 1-Butanol erzielt. Ethanol wird in einem höheren Ausmaß als *iso*-Propanol in der Umesterung umgesetzt. Es werden sowohl mehr Ethyl-, Propyl- und Butylester als Methylester gebildet. Dies lässt den Schluss zu, dass der Lipasenstamm H die Reaktionen von höheren und linearen Alkoholen präferiert. Auf diesem Gebiet der Umesterung mit höheren Alkoholen liegt ein großes Potenzial der Lipase H.

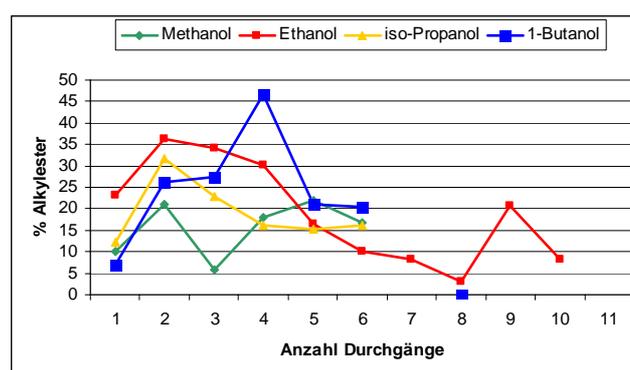


Abbildung 42: Kontinuierliche Umesterung mit verschiedenen Alkoholen

Bei der Reaktion mit Ethanol ist anzumerken, dass auch nach Schwankungen im Fluss immer noch ein hoher Ethylester-Gehalt erhalten werden kann. Kommt es je-

doch bei der Methanolyse zu einem Flusstau wird die Lipase durch Methanol-Tröpfchen derart deaktiviert, dass kein guter Umsatz mehr zu erwarten ist. Ethanol, sowie die höheren Alkohole, deaktivieren Enzyme also nicht im selben Ausmaß wie Methanol.

Umesterung katalysiert mit der kommerziell erhältlichen Formulierung 1 der Lipase H

Um die Qualität der selbst entwickelten Immobilisierungstechnik im Rohrreaktor zu messen, wird der kontinuierliche Umesterungsprozess mit der kommerziell erhältlichen Formulierung 1 der Lipase H durchgeführt.

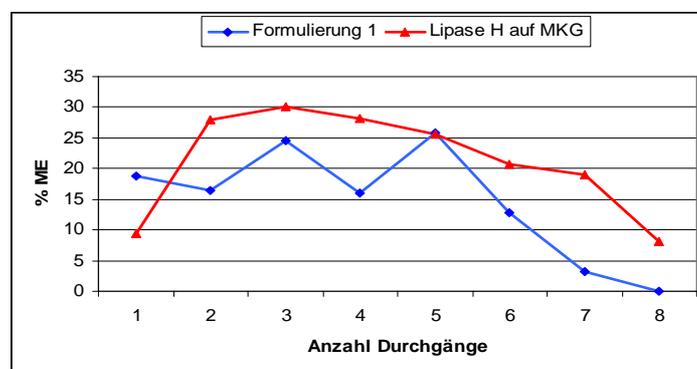


Abbildung 43: Umesterung im Rohrreaktor katalysiert mit Lipase H in Formulierung 1

Die Ergebnisse sind deutlich schlechter als mit der selbst immobilisierten Lipase, der dort erreichte Höchstwert von 36.5% wird bei weitem nicht erreicht. Auch weist die selbst immobilisierte eine höhere Stabilität auf.

Die lässt den Schluss zu, dass die selbst entwickelte Immobilisierungstechnik um einiges besser für die kontinuierliche Umesterung geeignet ist.

4.3.2.7 Umesterung einer Realprobe mit hohem Gehalt an freien Fettsäuren

Als Probe aus der Praxis wird Rapsöl mit einem definierten Gehalt an freien Fettsäuren gewählt. Die freien Fettsäuren weisen im Eduktgemisch einen Prozentsatz von 9.3% auf, dieser steigt in der ersten Fraktion auf über 15% um dann im Lauf der Reaktion wieder abzunehmen.

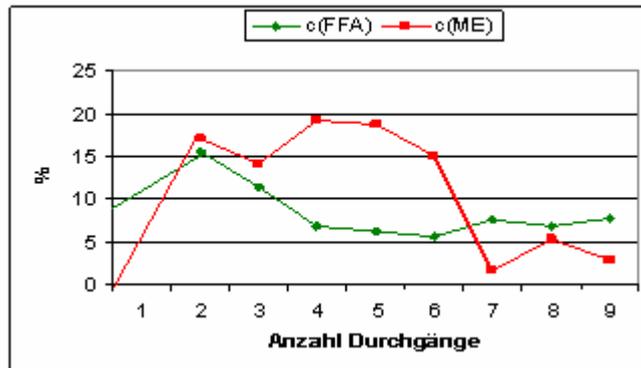


Abbildung 44: Konzentrationsverlauf der FFA und TG bei UE der Realprobe

Es wird ein Durchschnittswert von etwa 7.5% FFA erreicht, der aber nur wenig unter dem Ausgangswert liegt. Auch bei der Bildung der Methylester ist nur eine eher geringe Performance zu beobachten, so werden in den ersten 7.5h der Umesterung (F1-F5) 14-19% Methylester gebildet, jedoch fällt die Ausbeute ab Durchgang 6 auf 1.7%. Im Gegensatz zu den kontinuierlichen Umesterungen mit reinem Rapsöl ist die Umsatzrate für die Realprobe deutlich niedriger. Trotz der Veresterungsfähigkeit der Lipasen zeigt sich eine geringere Leistung der Lipase H bei einem hohen Anteil an freien Fettsäuren. Dieses Ergebnis korreliert auch mit den Resultaten der kontinuierlichen Veresterung von Ölsäure.

Wiederholtes Einspeisen des Reaktionsgemisches

4.3.2.8 Untersuchungen zum mehrstufiger Prozess

In den kontinuierlichen Prozessen 9-11 wird jeweils die Sammelfraktion des vorangegangenen Versuchs wiederholt in den Reaktor eingespeist. Im Reaktor befindet sich frische, immobilisierte Lipase H auf MKG. Das Ziel dieser Versuche ist es einen möglichst hohen Gehalt an Methylester zu erhalten.

In diesen Versuchen wurde eine Mischfraktion (24% ME-Gehalt), welche aus vorangegangenen Versuchen gesammelt wurde, in eine Säule mit „frisch“ immobilisiertem Enzym eingespeist, die daraus gesammelten Fraktionen wurden wieder zu einer Mischfraktion (41% ME-Gehalt) vereint, welche erneut in eine Säule mit „frisch“ immobilisiertem Enzym eingespeist wurde.

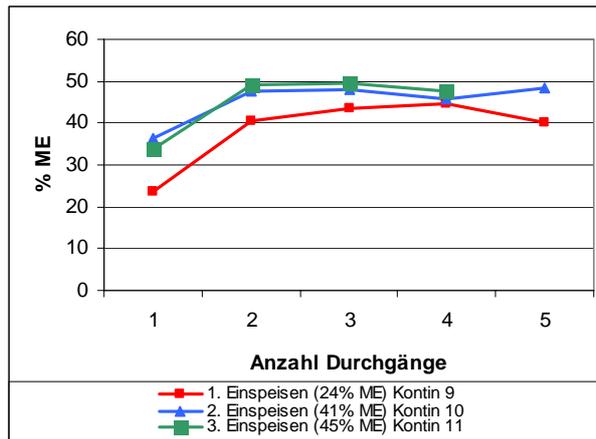


Abbildung 45: Wiederholtes Einspeisen einer Mischfraktion

Ein drittes Mal wurde nun die gesammelte Mischfraktion aus diesem Versuch (45% ME-Gehalt) wiederholt eingespeist. Abbildung 45 zeigt, dass die Zunahme an ME nach jedem Mal Einspeisen nur gering ansteigt. Die verbleibenden Diglyceride (**16.3%**), Monoglyceride (**26.2%**) und freie Fettsäuren (**3.5%**) ließen sich jedoch nicht weiter zu Methylester umsetzen. Trotzdem ist der erreichte Methylester-Gehalt um einiges höher als in den vorhergehenden Versuchen.

Es werden weitere Versuche (siehe Abbildung 46) zum mehrstufigen Prozess durchgeführt. Der Gehalt an Methylester steigt beim wiederholten Einspeisen relativ langsam. Es wird stets nur ein geringes Umsatzpotenzial ausgenützt.

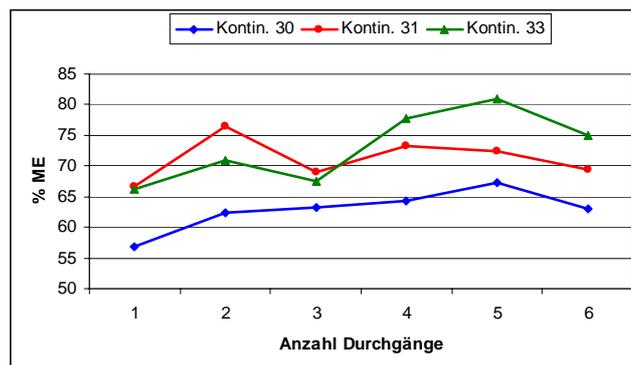


Abbildung 46: Wiederholtes Einspeisen in Kontin. 30, 31 und 33

Der Diglycerid-Anteil ist in allen Sammelfractionen relativ hoch. Ein möglicher Grund dafür ist, dass Lipase H an der sn2-Position des Glycerin-Backbone nicht angreifen kann und so ein erhöhter Anteil an sn1,2-Diglyceriden im Gemisch verbleibt, der nur schwer abbaubar ist. Dies wird nun gaschromatographisch untersucht.

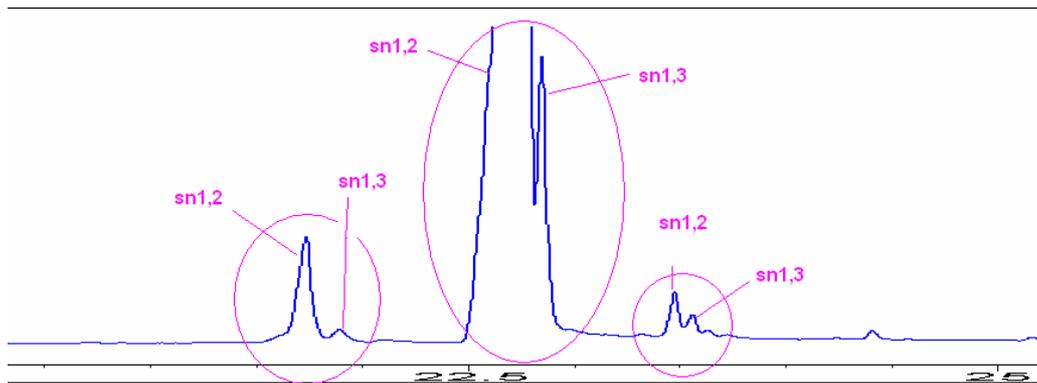


Abbildung 47: Chromatogramm der Diglyceridverteilung der Mischfraktion 33

Der Hauptanteil der Diglyceride sind, wie man aus der Abbildung ersehen kann, die unsymmetrischen sn1,2-Diglyceride. Die sn2-Position wird also nur schwach von der Lipase H angegriffen. Um eine möglichst vollständige Umsetzung zu gewährleisten ist eine Lipase vonnöten, die die sn2-Position angreift.

4.3.2.9 Einsatz der unspezifischen Lipase U

Im Lauf der kontinuierlichen Umesterungen im Rohrreaktor ergibt sich das Problem, dass der Umesterungsgrad ab einem Methylestergehalt von etwa 70% nicht weiter steigerbar war. Ein entscheidender Grund dafür war der unvollständige Abbau der Diglyceride und der Monoglyceride. Der Hauptanteil der Diglyceride besteht, aufgrund der Spezifität der Lipase H, aus sn1,2-DG. Um auch die sn2-Position am Diglycerid beziehungsweise am Monoglycerid angreifen zu können, wird nach einer unspezifischen oder sn2-spezifischen Lipase gesucht, die Präferenz auf diese Position aufweist.

Es wurde eine neue flüssigkeitsstabilisierte Lipase U gefunden, die zur Zeit des Lipasenscreenings noch nicht zur Verfügung stand. Sie ist eine fungale, unspezifische Lipase.

A) Diese Lipase U wird nun zunächst im Batch-Verfahren getestet.

Lipase U wird nach der etablierten Immobilisierungstechnik auf Maiskolbengranulat adsorbiert und als Katalysator für eine Umesterung im Batch eingesetzt. Dieses Ergebnis weist einen sehr hohen Umesterungsgrad auf, die Lipase ist sehr gut für die Umesterung von Triglyceriden mit Methanol geeignet.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wird die Lipase U sowohl in immobilisierter als auch in flüssigkeitsstabilisierter Form für die Batch-Umesterung eines Gemisches, hervorgehend aus dem kontinuierlichen Verfahren 33, eingesetzt.

Die Menge an Methanol wird jeweils auf die in der Mischfraktion noch befindliche Menge an TG, DG, MG und FFA bezogen und im stöchiometrischen Verhältnis zugegeben. Es wird 5 Stunden bei 50°C und 320 rpm geschüttelt.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wird die Lipase U sowohl in immobilisierter als auch in flüssigkeitsstabilisierter Form für die Umesterung eines Gemisches, hervorgehend aus dem kontinuierlichen Verfahren 38, eingesetzt. Um diese Ergebnisse relativieren zu können, werden sie auch mit immobilisierter und mit flüssigkeitsstabilisierter Lipase H durchgeführt.

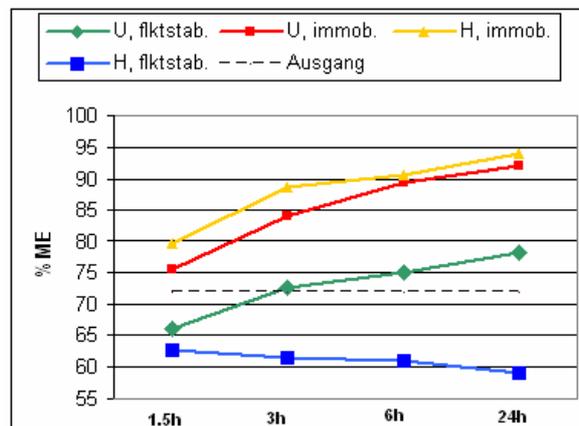


Abbildung 48: Verlauf des Methylestergehalts bei UE mit Lipase H und U

Die Bildung der Methylester ist bei den flüssigkeitsstabilisierten Lipasen deutlich schlechter als bei den immobilisierten. Das liegt vor allem an der vermehrten Bildung an freien Fettsäuren beim Einsatz der flüssigen Lipasen. Bei Einsatz der flüssigen Lipase H setzt die Rückreaktion der Umesterung sogar in dem Ausmaß ein, dass auch noch nach 24h weniger Methylester vorliegen als in der Ausgangsmischung vorhanden waren.

Beim Einsatz der immobilisierten Enzyme wird der Methylester-Anteil kontinuierlich gesteigert, allerdings sind nur bei immobilisierter Lipase H nach 24 Stunden über 95% Methylester erreichbar. Die unspezifische Lipase U erreicht in der immobilisierten Form aber einen Umesterungsgrad, der nur wenig darunter liegt. Der Gehalt an

freien Fettsäuren ist sehr stark von der Formulierung der Lipase abhängig. So sinkt der Gehalt an freien Fettsäuren (siehe Anhang) bei der immobilisierten Lipase H auf unter 0.1%, während er bei der flüssigkeitsstabilisierten Form bei über 23% liegt. Der Wasseranteil der Lipasenbereitung ist so hoch, dass er destruktiv ins Reaktionsgeschehen eingreift. Bei der Lipase U ist dieser Trend auch, wenn auch nicht in diesem hohen Ausmaß, vorhanden.

Wichtig ist aber vor allem das Verhalten der partiellen Glyceride, insbesondere der Monoglyceride, während der Reaktion.

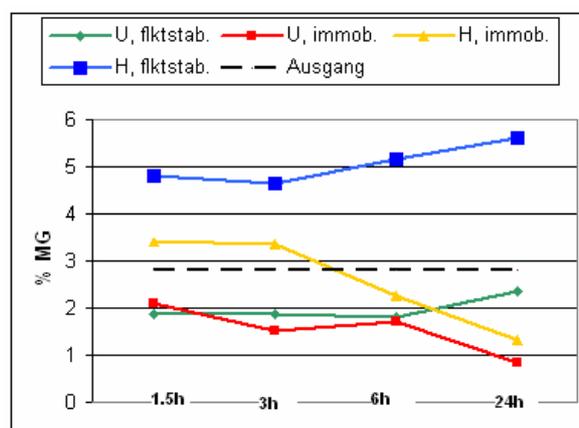


Abbildung 49: Verlauf des Monoglyceridgehalts bei UE mit Lipase H und U

Die unspezifische Lipase U wirkt direkt auf die Monoglyceride ein, so nimmt der anfängliche MG-Anteil von etwa 3% bei einer von immobilisierter Lipase U katalysierten Umesterung durchwegs ab. Dies ist aber bei der flüssigkeitsstabilisierten Lipase H nicht der Fall. Auch bei der immobilisiert eingesetzten Lipase H steigt der MG-Gehalt anfangs an. Man kann aus diesem Diagramm also gut ersehen, dass die Unspezifität der Lipase U sich positiv auf den Abbau der partiellen Glyceride auswirkt. Damit ist sie sehr gut für einen Einsatz in einem Reaktionsansatz mit einem bereits fortgeschrittenen Umesterungsgrad, der einen hohen Anteil an partiellen Glyceriden aufweist, geeignet. Es ist aber dabei in Betracht zu ziehen, dass sich die Fettsäureposition in den Mono- oder Diglyceriden durch Acylmigration während der Reaktion fortlaufend ändern kann, daher wäre der Einsatz von reiner sn2-spezifischer Lipase in diesem Fall nicht sinnvoll. (Xu, 2000)

Ganz klar ersichtlich ist auch der Vorteil der immobilisierten Lipase gegenüber der flüssigkeitsstabilisierten Lipase, es werden weniger freie Fettsäuren und mehr Methylester gebildet. Damit hat sich die selbst die selbst entwickelte Immobilisierungstechnik erneut bestätigt.

B) Die auf MKG immobilisierte Lipase U wird nun im kontinuierlichen Verfahren 42 als Katalysator eingesetzt, als Ausgangsmaterial wird die Mischung vom kontinuierlichen Verfahren 33 verwendet.

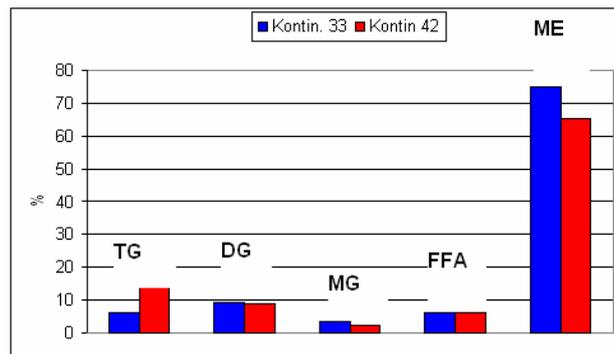


Abbildung 50: Vergleich der Mischfraktionen der kontinuierlichen Prozesse 33 (Ausgang) und 42

In diesem mit Lipase U katalysierten Prozess 42 ist deutlich die Rückreaktion der Umesterung zu beobachten. Während der Methylestergehalt sinkt, steigt der Gehalt an partiellen Glyceriden und an Triglyceriden.

Die Lipase U scheint aufgrund des hohen Glyceringehalts die Reaktion nicht weiter in Richtung der Methylester katalysieren zu können. Die im Batch-Verfahren gezeigte Aktivität der Lipase U konnte im kontinuierlichen Verfahren nicht bestätigt werden.

Sie ist für den Einsatz im Rohrreaktor nicht geeignet.

4.3.2.10 Einsatz von *iso*-Propanol als Regenerierungsmittel

iso-Propanol hat sich im Batch-Prozess als geeignetes Regenerierungsmittel für Lipase H immobilisiert auf MKG erwiesen. Daher wird *iso*-Propanol nun im kontinuierlichen Verfahren eingesetzt. Es wird eine Methanolyse unter optimierten Bedingungen durchgeführt, nach 10 Durchgängen wird die Säule mit *iso*-Propanol gespült. Danach wird wieder Öl-Methanol-Gemisch in die Säule eingebracht, die Fraktionen werden gesammelt und der Umesterungsgrad gemessen.

Schon im Ausgangsprozess ist eine Abnahme der Umesterungsrate wahrnehmbar, diese ist durch den Einsatz von *iso*-Propanol nicht aufzuhalten. So sinkt der Methyl-estergehalt nach dem Regenerierungsschritt stark ab. Für den kontinuierlichen Prozess muss eine andere Regenerierungsmethode gefunden werden.

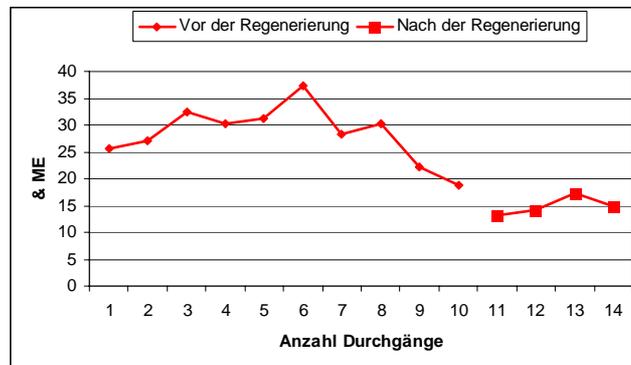


Abbildung 51: *iso*-Propanol als Regenerierungsmittel

4.3.3 Veresterung im Rohrreaktor

Als Ausgangsprodukt für die kontinuierliche Veresterung wird eine technische Ölsäure mit einem Gehalt von 96.9% freie Ölsäure eingesetzt. Die Fettsäure und der Alkohol werden im stöchiometrischen Verhältnis, nach Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax-Gerät, in die Säule eingebracht. Der verbleibende Gehalt an freien Fettsäuren nach der Veresterungsreaktion wird titrimetrisch bestimmt.

Der höchste Alkylestergehalt von über 50% wird mit Methanol erzielt, allerdings nimmt der Methylestergehalt mit zunehmender Standzeit der Lipase stark ab. Ethanol gibt einen relativ stabilen Veresterungsgrad und zeigt nach über zehn Stunden auch noch beinahe 20% Ethylester.

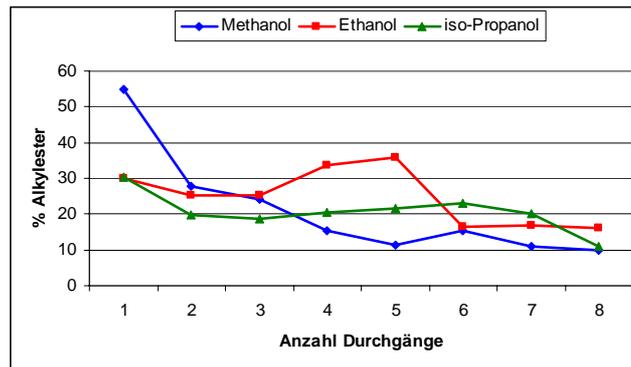


Abbildung 52: Veresterung mit Methanol, Ethanol und *iso*-Propanol

Die geringsten Veresterungsraten werden mit *iso*-Propanol erzielt, allerdings werden auch bei der Propanolyse beinahe durchwegs über 20% Propylester synthetisiert.

Die Veresterungsreaktion wird von der Lipase H nicht im selben Ausmaß wie die Umesterungsreaktion katalysiert. Sie scheint besser für die Umesterung geeignet zu sein. Dies ist auf das bei der Veresterung gebildete Wasser und der damit verbundenen Verschiebung des Gleichgewichts zurückzuführen. Eine mögliche Lösung dieses Problems wäre die Entfernung des Wassers aus dem Reaktionsmedium.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse im kontinuierlichen Verfahren

Nach kinetischen Berechnungen ergibt sich ein errechneter Methylestergehalt von etwa 70% nach 12 Stunden Reaktionszeit im Schlaufenreaktor. Der gebildete Methylester im selbst konstruierten Schlaufenreaktor liegt aber nur bei maximal 11%. Ein Teil des eingesetzten Methanols entgast, jedoch gewährt der verbleibende Methanolanteil noch eine vollständige Umesterung der Reaktionsmischung.

Daher wird statt dem Schlaufen- nun ein Rohrreaktor konstruiert, der den Vorteil bietet, jede Fraktion nach Durchfluss durch den Reaktor genau untersuchen zu können.

Die optimalen kontinuierlichen Methanolysebedingungen im Rohrreaktor sind ein stöchiometrisches Verhältnis von Öl zu Alkohol, eine Reaktionstemperatur von 40°C, eine Verweilzeit von 1.5h in einer senkrecht fixierten Säule mit einer Flussrichtung von oben nach unten.

Der höchste Umsatz der kontinuierlichen Umesterung von 46% wird mit 1-Butanol erzielt. Ethanol wird in einem höheren Ausmaß als *iso*-Propanol in der Umesterung

umgesetzt. Es werden sowohl mehr Ethyl-, Propyl- und Butylester als Methylester gebildet. Dies lässt den Schluss zu, dass der Lipasenstamm H die Reaktionen von höheren und linearen Alkoholen präferiert. Auf diesem Gebiet der Umesterung mit höheren Alkoholen liegt ein großes Potenzial der Lipase H.

Bei der Reaktion mit Ethanol ist anzumerken, dass auch nach Schwankungen im Fluss immer noch ein hoher Ethylester-Gehalt erhalten werden kann. Kommt es jedoch bei der Methanolyse zu einem Flusstau wird die Lipase durch Methanol-Tröpfchen derart deaktiviert, dass kein guter Umsatz mehr zu erwarten ist. Ethanol, sowie die höheren Alkohole, deaktivieren Enzyme also nicht im selben Ausmaß wie Methanol.

Die kontinuierliche Veresterung von Ölsäure mit Alkohol wird bei stöchiometrischen Verhältnissen durchgeführt. Der höchste Alkylestergehalt von über 50% wird mit Methanol erzielt, allerdings nimmt der Methylestergehalt mit zunehmender Standzeit der Lipase stark ab. Ethanol gibt einen relativ stabilen Veresterungsgrad und man erhält nach über zehn Stunden noch beinahe 20% Ethylester. Die geringsten Veresterungsraten werden mit *iso*-Propanol erzielt, allerdings werden auch hier beinahe durchwegs über 20% Propylester synthetisiert.

Die Veresterungsreaktion wird von der Lipase H nicht im selben Ausmaß wie die Umesterungsreaktion katalysiert. Sie scheint für die Umesterung besser geeignet zu sein.

Bei einer Flussschwankung im Rohrreaktor kommt es leicht zu einer Entmischung der Öl-Methanol-Emulsion, daher werden Umesterungsversuche durchgeführt in denen Methanol in einem nicht-stöchiometrischen Verhältnis von 1Mol Öl zu 1Mol Methanol eingesetzt wird, um so eine vorzeitige Deaktivierung der Lipase zu verhindern. Es werden auch beim mehrmaligen Einspeisen der Fraktionen vergleichbare Ergebnisse wie beim herkömmlichen Umesterungsprozess erhalten.

Das Problem beim mehrmaligen Einspeisen der Fraktionen in den Rohrreaktor ist das bei der Reaktion gebildete Glycerin, das sich an die Lipase anlagert und sie so sterisch an der Katalysator-tätigkeit hindert (vgl., *Dossat et al.*, 1997). Mittels des GC/FID-Verfahren wird detektiert, dass etwa die Hälfte des während der Reaktion

gebildeten freien Glycerins in der Säule verbleibt und auf diese Weise den Katalysator verklebt. Es ist daher notwendig eine Glycerinwäsche einzuführen.

Nach jedem Durchlauf durch die Säule werden ein Wasch- und Extraktionsschritt sowie ein Stripp-Durchgang durchgeführt, um das gebildete freie Glycerin und überschüssiges Methanol zu entfernen.

Eine weitere Möglichkeit das Glycerin zu entfernen ist die Regenerierung der Enzyme. *iso*-Propanol hat sich im Batch-Prozess als mögliches Regenerierungsmittel für Lipase H immobilisiert auf Maiskolbengranulat erwiesen. Dieser Trend ist jedoch im kontinuierlichen Verfahren nicht auszumachen. Schon im Ausgangsprozess ist eine Abnahme der Umesterungsrate wahrnehmbar, diese ist durch den Einsatz von *iso*-Propanol nicht aufzuhalten. So sinkt der Methylestergehalt nach dem Regenerierungsschritt stark ab und ist sogar geringer als der Esteranteil im Ausgangsgemisch. Beim Regenerierungsschritt wird die Säule mit Druck mit *iso*-Propanol gespült. Es ist anzunehmen, dass *iso*-Propanol neben dem gewünschten Effekt der Glycerinentfernung von Maiskolbengranulat auch einen Großteil der immobilisierten Lipase mit sich reißt.

Es liegt noch ein weiteres Problem bei der mehrmaligen Einspeisung von Sammelfraktionen in den Reaktor vor. In Mischungen mit einem hohen Umesterungsgrad ist der Anteil der partiellen Glyceride stark erhöht. Der Hauptanteil der Diglyceride sind die unsymmetrischen *sn*1,2-Diglyceride Die *sn*2-Position wird also nur schwach von der Lipase H angegriffen.

Um eine möglichst vollständige Umsetzung zu gewährleisten, ist eine Lipase vonnöten, die die *sn*2-Position angreift. Dafür bietet sich die unspezifische Lipase U an. Beim Einsatz der Lipase U stellt sich jedoch eine Rückreaktion ein, der Umesterungsgrad sinkt. Die im Batch-Verfahren gezeigte Aktivität der Lipase U kann im kontinuierlichen Verfahren nicht bestätigt werden.

Schließlich wird noch die katalytische Fähigkeit in Bezug auf die kontinuierliche Methanolyse von Rapsöl der selbst immobilisierten Lipase H mit einer kommerziell erhältlichen Formulierung der Lipase H verglichen. Die Ergebnisse der erwerbbaaren Lipase H sind deutlich schlechter als mit der selbst immobilisierten Lipase, der dort erreichte Höchstwert von 36.5% wird bei weitem nicht erreicht. Auch weist die selbst

immobilisierte Lipase eine höhere Stabilität auf. Die lässt den Schluss zu, dass die selbst entwickelte Immobilisierungstechnik um einiges besser für die kontinuierliche Umesterung geeignet ist.

5. Bewertung der technischen Umsetzung

5.1 Wirtschaftliche Bewertung der Biodieselproduktion

Jede neue technologische Entwicklung muss neben der technischen Machbarkeit auch die wirtschaftliche Prüfung bestehen. In diesem Abschnitt wird untersucht, inwieweit sich das neue Prozessdesign im Vergleich zur bewährten, bisher eingesetzten Biodieseltechnologie wirtschaftlich verhält und ob der Einsatz der Lipasen in den erarbeiteten Settings ökonomische Vorteile bringt. Zur Darstellung der technischen Änderungen des enzymatisch katalysierten Verfahrens wird der derzeitige Stand der Technik der Biodieselproduktion als Referenz gegenüber gestellt.

Als Basis für die Bewertung der Wirtschaftlichkeit beider Verfahren bzw. für die ökologische Betrachtung wurden Anlagendaten angenommen, die im Anhang zu finden sind.

5.2 Wirtschaftliche Darstellung des Referenzprozesses zur Biodieselherstellung

Es gibt heute viele standardisierte Arten der Prozessdarstellung in wirtschaftlicher Hinsicht. Die hier gewählte Vollkostenrechnung in der Produktion vereinfacht die Darstellung von Zeitreihen auf einen übersichtlichen Produktionszustand. Das Ziel besteht darin (ohne auf Finanzierungsvolumina und deren Deckung eingehen zu müssen) in der Minimierung der Produktionskosten, ohne dass auf Marketing, Verkauf oder die Erlössituation eingegangen wird. Es wird weiters angenommen, dass die Produktqualität „Biodiesel“ bei allen Prozessen gleich ist und daher potenziell die gleichen Erträge am Markt erzielt werden können. Die Wirtschaftlichkeit des Prozesses wurde auf MS Excel modelliert und berechnet, wobei die Vollkosten der Herstellung (inklusive Annuitäten) als Vergleichspunkt herangezogen wurden, da diese auch direkt in Relation mit der ökologischen Bewertung mittels SPI (siehe unten) stehen.

Es wurden folgende Basisannahmen zur Berechnung der Annuitäten der Anlagen getroffen: der Zinssatz der Annuität auf Fremd- und Eigenkapital beträgt 6,0% p.a., Bauwerke und Anlagen werden auf 10 Jahre abgeschrieben, was einer Gesamtinvestition von 10.4 Mio. € entspricht. Die Anlage verarbeitet 25.000 t/a und hat eine Verfügbarkeit von 330 Tagen im Jahr, d.h., dass in ca. 19 Produktionsminuten eine

Tonne Rohöl verarbeitet werden. Es ergibt sich für den Referenzprozess folgende Kostenstruktur:

| Aufwand | Kostenanteil | Kommentare |
|------------------------|--------------|--------------------------------|
| Rohstoffe | 79.4% | hochrelevant |
| Hilfsstoffe | 8.7% | wesentlich |
| Energie/Transporte | 1.0% | hoher Eigenversorgungsgrad |
| Investitionen/Personal | 15.0% | hochwertige Installationen |
| Emissionen/Abfälle | 0.1% | keine Kosten |
| Beiprodukte | -4.1% | Erlöse für Glycerin und Dünger |
| | 100% | Vollproduktionskosten |

Tabelle 5: Kostenstruktur des Referenzprozesses Stand der Technik (Übersicht)

Man erkennt die hohe Relevanz der Rohstoffe, allen voran die nativen Öle und weniger wichtig das Methanol, sowie die Laugen und Säuren. Dagegen sind die Investitions- und Personalkosten sehr gering, da der Automatisierungsgrad der Anlage und das flüssige Medium ohne große Schwierigkeiten zu handhaben ist. Man erkennt auch, dass Abfälle und Emissionen weitgehend vermieden werden bzw. dass diese auf Grund der heutigen Rechtslage (z.B. CO₂) keine Kosten verursachen.

Die Produktionskosten inklusive der Rohstoffkosten pro Tonne Einsatzöl belaufen sich im Referenzprozess auf **480 €** (die Gutschriften der Beiprodukte wurden bereits abgezogen). Bei den heutigen Erlösen von rund **530 €** ergibt sich damit ein **Deckungsbeitrag von rund 50 €** pro eingesetzte Tonne Einsatzöl. Wesentlich für den Vergleich zwischen dem bestehenden basisch katalysierten Herstellungsverfahren und dem hier vorgestellten neuen Ansatz mit enzymatischer Katalyse sind jedoch die Produktionskosten pro kg Produkt, diese müssen durch den neuartig gestalteten Prozess mit Anwendung von Lipasen fallen, bzw. muss dieser Prozess geringere Kosten verursachen.

5.2.1 Die einzelnen Verfahrensschritte im Biodieselprozess

Die eingesetzten Öle und Fette können Verunreinigungen wie zum Beispiel Wasser und Feststoffe enthalten, die in der Biodieselproduktion störend sind. Diese müssen in einem vorgeschalteten Verfahrensschritt, der Ölaufbereitung, abgetrennt werden. Diese Einheit wurde für die folgende vergleichende Wirtschaftlichkeitsrechnung nicht berücksichtigt, da auch beim Lipasen-Verfahren von Rohstoffen in derselben vorge-reinigten Qualität ausgegangen wird.

In weiterer Folge wird das eingesetzte Öl dem Anlagenteil Veresterung zugeführt. Freie Fettsäuren werden dabei zu Methylester umgewandelt. Auch diese Einheit wurde für die vergleichende Wirtschaftlichkeitsrechnung nicht berücksichtigt.

Wie Abbildung 53 zeigt, wird beim BDI-Verfahren in einem meist zweistufigen U-mesterungsprozess das Einsatzöl mit der Mischung aus Methanol und Katalysator Kaliumhydroxid vermischt. Dabei entstehen Methylester und Glycerin. Das gebildete Glycerin setzt sich zusammen mit dem Katalysator und dem überschüssigen Methanol ab. Die Glycerinphase gelangt zur Nebenproduktaufbereitung.

Der entstandene Methylester enthält noch Reste an Methanol, Katalysator und Wasser. In der folgenden Methylester-Reinigung werden diese Verunreinigungen abge-trennt und der Nebenproduktaufbereitung zugeführt.

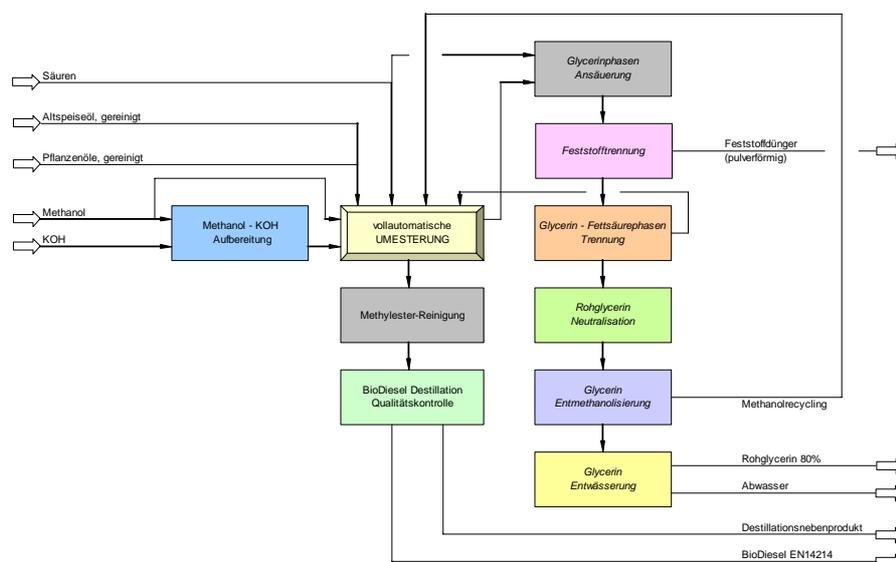


Abbildung 53: Vereinfachtes Verfahrensfliessbild des KOH-Verfahrens von BDI Anlagenbau GmbH

Im letzten Schritt der Biodiesel-Herstellung wird der Methyl ester destillativ gereinigt. Dabei werden letzte Verunreinigungen abgetrennt. Schwerflüchtige Verunreinigungen fallen bei der Destillation als Destillationsnebenprodukt an, das aufgrund seines hohen Energieinhalts Heizöl substituiert und damit direkt in der Biodiesel-Anlage als Recycle verbleibt.

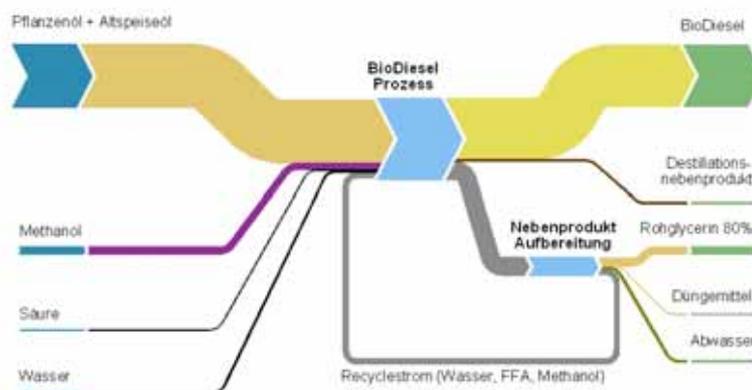
Die Glycerinphase aus der Umesterung wird gemeinsam mit den Phasen der Methyl ester-Reinigung angesäuert. Bei der Ansäuerung werden Katalysatorreste und Seifen mit Säure zu Feststoff, Wasser und freien Fettsäuren umgesetzt. Die Fettsäurephase ist so nicht mehr mit der Glycerinphase mischbar und kann daher gemeinsam mit dem Feststoff vom Glycerin abgetrennt werden.

Der Feststoff wird im Anschluss zu einem rieselfähigen Feststoffdünger verarbeitet.

Die Fettsäurephase wird in die Veresterung zurückgeführt. Damit werden 100% der verwertbaren Fettsäuren ohne Verluste zu Biodiesel verarbeitet.

Die saure Glycerinphase wird nach der Abtrennung des Feststoffs und der Fettsäuren neutralisiert.

BDI - Verfahren



14.02.2005

Copyright © BDI Anlagenbau GmbH. Alle Rechte vorbehalten.

Abbildung 54: Sankey-Diagramm (vereinfacht) des KOH-Verfahrens von BDI Anlagenbau GmbH

Im letzten Prozessschritt der Nebenproduktaufbereitung wird das Rohglycerin in einer Destillationsanlage vom Methanol und zum Teil vom Wasser befreit. Das gewonnene Rohglycerin liegt somit als verkaufbares Nebenprodukt vor.

Das abgetrennte Methanol-Wasser-Gemisch wird in einer weiteren Destillationskolonne getrennt. Sowohl das Methanol, als auch das Wasser werden als Recycle wieder im Prozess eingesetzt.

5.3 Wirtschaftliche Bewertung der Biodieselproduktion unter Einsatz von Lipasen

5.3.1 Preisrecherche Lipasen

Für die in den Arbeitsschritten 2 bis 4 ausgewählten Lipasen wurden Hersteller befragt und Angebote über industrielle Mengen eingeholt. Die so recherchierten Preise wurden Basis der wirtschaftlichen Bewertung und des Verfahrensvergleiches. Für die primäre Recherche wurde davon ausgegangen, dass für eine Tonne Biodiesel 5% Lipasen benötigt werden. Weiters zeigte eine Literaturrecherche, dass die Lipasen bis zu 100% rezykliert werden können. Die Literatur spricht außerdem von 100 möglichen Zyklen. Danach müssen die Enzyme ausgewechselt werden. Dies erbrachte eine erforderliche Jahresmenge von 1.000 bis 1.500 kg Enzym. Weiterführende Literaturrecherchen förderten allerdings Angaben von Halbwertszeiten von lediglich 400 bis 500 h zutage. Dies könnte auch zu einem Bedarf von 5.000 kg Enzympräparat pro Jahr führen. Die Anfragen bezogen sich in dieser Recherche allerdings auf 1.000 bis 1.500 kg pro Jahr.

Folgende Firmen wurden kontaktiert:

1. Novozymes Deutschland GmbH
2. Amano Enzyme Europe Ltd.
3. Biopract GmbH (D)

Anmerkung zur Abkürzung "KLU" Tabelle 6: Es handelt sich um eine firmenspezifische Bezeichnung für die International Units (IU), wobei 1U der Enzymmenge entspricht, die ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt.

In Absprache mit dem Projektteam wurden folgende Produkte angefragt:

| Bezeichnung | Typ | Charge | Verfügbarkeit | Aktivität | Hersteller |
|--------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------|---|
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Lipozyme TL IM | LA 35000606 | | 4000KLU/g | Novozymes |
| Früher | SP 523 | Batch PPW 3942 | | | Novo Nordisk (Mutter von Novozymes) |
| | | | | | |
| Lipase AH | | LPAHQ001K | Nicht verfügbar | | Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japan |
| Lipase CE | Amano 5 | 01023TM5 | Nicht verfügbar | | Amano Pharmaceutical Co. |
| Lipase PS-C | Amano II | ILPSAY0551604K | Nicht verfügbar | | Amano Pharmaceutical Co. |
| Lipase PS | Amano | LPSAB0650345 | empfohlen | | Amano Pharmaceutical Co. |

Tabelle 6: Angefragte Lipasen bei Enzymfirmen mit Vertretung in Europa

Tabelle 6 zeigt auch, dass insbesondere drei Lipasen der Fa. Amano nicht (mehr) verfügbar sind. Die weitere Kommunikation mit der Fa. Amano wurde abgebrochen, da insbesondere von der Fa. Biopract eine engere Zusammenarbeit angeboten wurde.

Die Fa. Novozymes bot per E-Mail ein Produkt zum Preis von 60.00 €/kg (Größenordnung einer Charge von 1.000 bis 1.500 kg Enzym). Die angebotene Charge war bereits auf einem Kunststoffträger immobilisiert, sodass zur Anwendung im Projekt diese zuerst mobilisiert werden musste.

Schlussendlich bot die Fa. Biopract eine Zusammenarbeit an, da diese Firma im Frühjahr 2004 gerade damit begonnen hatte ein eigenes Lipasen-Programm aufzubauen. Es wurden unterschiedliche Muster für Voruntersuchungen zugesagt. Allerdings konnte das Waschmittelenzym aus Lipase H nicht angeboten werden. Es wurde durch Dr. Blokesch (Fa. Biopract) allerdings darauf hingewiesen, dass Novozy-

mes mit einem neuartigen Stamm zur Produktion von gängigen (45% Anteil) Waschmittelenzymen experimentierte.

Innerhalb eines Monats konnte durch die Fa. Biopract eine entsprechende Waschmittel-Lipolase in Form eines Referenzmusters besorgt werden. Durch den Auftragnehmer wurde daraufhin sofort der direkte Kontakt zwischen Frau Renate Uitz und Dr. Blokesch hergestellt.

Außerdem wurden folgende Enzyme angeboten:

- Lipopan (Novozymes),
- je eine Lipase der Fa. Quest und der Fa. Biovet (Peshtera)
- in kleinen Mengen außerdem die Lipasen CC und AN der Fa. Lyven

In Abstimmung mit der Projektleitung wurden allerdings keine weiteren Lipasen zur Untersuchung herangezogen, da den Versuchen (kontinuierliche Umsetzung) mit den bisherigen Proben der Vorrang gegeben wurde, da diese sehr Erfolg versprechend verliefen.

Das getestete, bereits immobilisierte Enzym, erbrachte nicht die positiven Ergebnisse, wie sie eigentlich erhofft wurden (siehe Auswertung der Versuche). Daher wurde zuletzt eine flüssigkeitsstabilisierte Formulierung desselben Enzyms getestet. Diese wurde über den Kontakt bei der Novozymes Deutschland GmbH um 22€ pro kg im 25 kg Kanister angeboten. Es ist damit zu rechnen, dass dieses Produkt um maximal 19.50 € pro Kilogramm in großen Mengen zu beziehen sein wird. Dieses Enzym hatte bei weitem bessere Immobilisierungseigenschaften und brachte am Maisgranulat einen besseren Umsatz. Mit diesem Wert wird in den Betrachtungen gerechnet.

Anfang 2005 wurde von Novozymes eine neue Lipase U, die ebenso wirksam wie die Lipase H sein soll, empfohlen. Novozymes gibt an, diese Lipase um 15€ pro Kilogramm frei Haus bei größeren Abnahmemengen liefern zu können. Bei Projektende wurde eine neu entwickelte Lipase mit derselben Wirksamkeit von Novozymes ins Spiel gebracht, die um 10€/kg und derselben Wirksamkeit angeboten wurde.

Es zeigt sich, dass einerseits der Preis der Lipase und andererseits deren Lebensdauer (Standzeit im Prozess) die wesentlichen Parameter bei der Wirtschaftlichkeit

des neuen Prozesses darstellen. Dazu wird folgend eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt.

5.3.2 Kurzbeschreibung des Lipasen-Verfahrens

Als wesentlicher Unterschied zum BDI Verfahren entfällt beim enzymatisch katalysierten Lipasen-Verfahren, das in Abbildung 55 und Abbildung 56 dargestellt ist, der Prozessschritt der Methanol/Kaliumhydroxid-Anmischung und die Vorveresterung. Anstelle der Katalysatoranmischung wird beim Lipasen-Verfahren der Biokatalysator, bestehend aus MKG als Trägersubstanz und einer Enzymlösung, in einem eigenen Verfahrensschritt batchweise hergestellt.

Dabei wird das fettspaltende Enzym als Enzymlösung in flüssigkeitsstabilisierter Formulierung gemeinsam mit dem Trägermaterial, dem Maiskolbengranulat, in einer Pufferlösung entsprechend gerührt. Das fettspaltende Enzym gelangt dabei in der nun verdünnten Enzymlösung in Kontakt mit dem dispergierten Maiskolbengranulat und bleibt durch Adhäsion an diesem Trägermaterial haften. Durch entsprechende Behandlung (Trocknung) wird das Enzym auf dem Träger-Granulat immobilisiert.

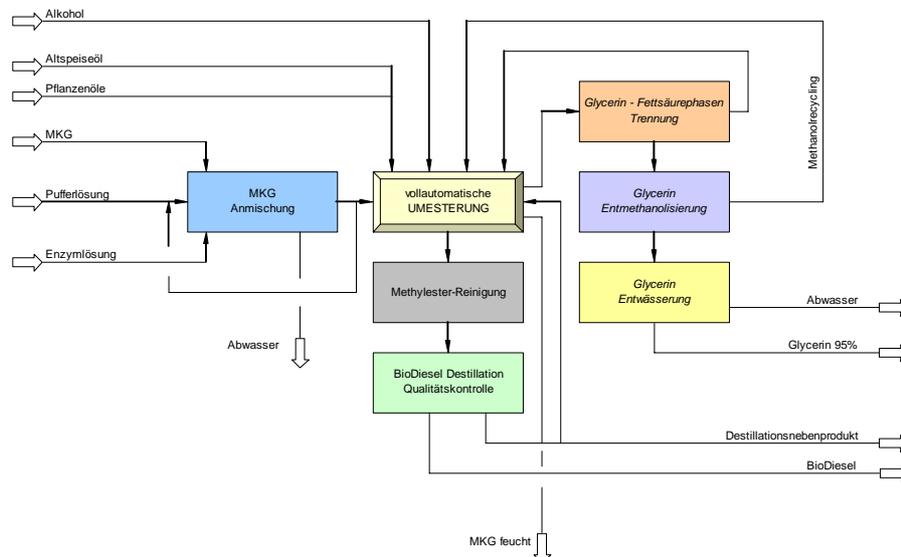


Abbildung 55: Vereinfachtes Verfahrensfliessbild des Lipasen-Verfahrens zur Biodieselerstellung

Nach der Trocknung wird das wasserfreie, aktivierte Maiskolbengranulat als heterogener Katalysator wie eine Packung in einem Reaktor vorgelegt und schließlich mit dem Einsatzrohstoff (Rapsöl, Altspeiseöl) kontaktiert. Die Pufferlösung wird rezykliert und für den nächsten Batch zu frischem Maiskolbengranulat und neuer Enzymlösung zugesetzt.

Die Umesterungsreaktion läuft auch bei diesem Verfahren kontinuierlich bei Niederdruck ab. Als mögliches Konzept für die Umesterung wurden fünf seriell hintereinander geschaltete Reaktoren, die mit dem aktivierten Maiskolbengranulat befüllt sind, vorgesehen. Nach einigen Zyklen wird der heterogene Biokatalysator mit Wasser regeneriert, um Verklebungen von Öl und Glycerin an der aktivierten Oberfläche des Maiskolbengranulats zu vermeiden.

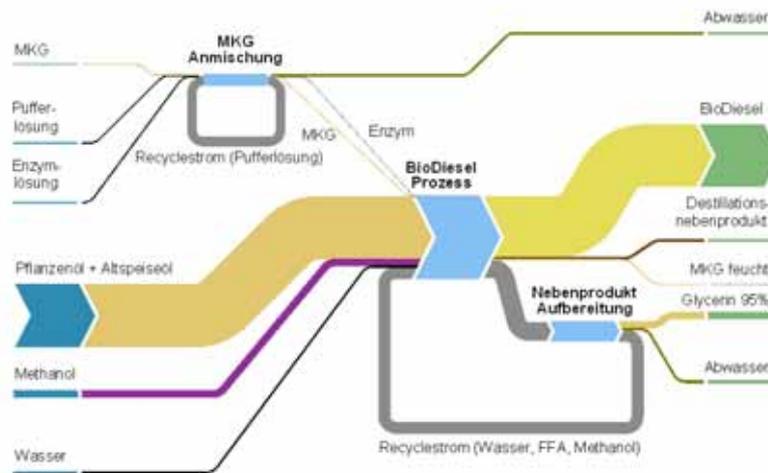
Für den kontinuierlichen Dauerbetrieb werden zwei weitere baugleiche Reaktoren benötigt, die aus dem laufenden Betrieb genommen und rezykliert werden. Dabei wird die verbrauchte Packung (Maiskolbengranulat) entnommen und durch frisches, aktiviertes Material ersetzt.

Das bei der Umesterungsreaktion entstehende Glycerin wird gemeinsam mit der Methyl esterphase kontinuierlich aus dem gepackten Reaktor ausgetragen. Zusätzlich wird die Möglichkeit, Glycerin bereits während der Umesterung abzuscheiden, folgendermaßen vorgesehen: 2 getrennte Mixer-Settler-Stufen können bei Bedarf zwischen den einzelnen Umesterungsreaktoren zwischengeschaltet werden. Als Hilfsstoff für die Glycerin-Abtrennung in diesen Mixer-Settler-Reaktoren wird Wasser zugeführt.

Die anschließenden Wäschen zur Biodieselreinigung und die abschließende Destillation sind beim Lipasen-Verfahren vergleichbar mit dem BDI-Verfahren und wurden daher nicht extra bewertet.

Durch die im Vergleich zum klassischen KOH-Verfahren geringere Salzfracht im Prozess vereinfacht sich beim Lipasen-Verfahren die Glycerin-Aufbereitung. Die Glycerinphase aus der Umesterung wird nach der Abtrennung der Fettsäuren in einer gepackten Kolonne entmethanolisiert und entwässert. Das dabei abgetrennte Methanol wird wieder dem Biodieselprozess zugeführt. Eine Ansäuerung und die anschließende Abtrennung von Feststoff entfallen. Nach der Glycerindestillation kann eine Qualität von 95% Rohglycerin angenommen werden.

Lipasen - Verfahren



16.03.2005

Copyright © BDI Anlagenbau GmbH. Alle Rechte vorbehalten.

Abbildung 56: Sankey-Diagramm (vereinfacht) des Lipasenverfahrens zur Biodieselherstellung

Beim Lipasen-Verfahren entfällt die Feststoffaufbereitung. Damit entsteht allerdings auch kein Feststoffdünger als mögliches verwertbares Produkt.

Nach der angenommenen Standzeit des Biokatalysators in der Umesterung muss das aktivierte Maiskolbengranulat z.B. in Biogasanlagen entsorgt werden.

Wie in den folgenden Abbildungen gezeigt werden kann, bestimmen beim Lipasen-Verfahren der Preis der Enzymlösung und die mögliche Standzeit des Biokatalysators die Gesamtwirtschaftlichkeit.

| Baugruppe | BDI (KOH)- Verfahren [%] | Lipasen- Verfahren [%] | Verhältnis BDI / Lipasen-Verfahren [-] |
|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---|
| Katalysatoranmischung | 5% | 20% | 4.7 |
| Umesterung inkl. Wäsche | 22% | 20% | 1.0 |
| Biodiesel-Destillation | 40% | 40% | 1.0 |
| Glycerinaufbereitung | 33% | 8% | 0.25 |
| Gesamtinvestition (Summe) | 100% | 85% | 0.85 |
| Betriebskosten | 100% | 220% | 2.2 |

Tabelle 7: Übersicht über die Gesamtinvestition – aufgeschlüsselt nach Baugruppen – und die laufenden Betriebskosten der beiden Biodiesel-Verfahren; BDI-Verfahren: Basis mit jeweils 100% bewertet

In Tabelle 7 wurden die gesamten Betriebskosten und die Investitionskosten der wesentlichen Baugruppen des BDI-Verfahrens und des Lipasen-Verfahrens bewertet. Die einzelnen Positionen für das etablierte BDI-Verfahren wurden als Basis herangezogen und mit jeweils 100% bewertet.

Im Vergleich dazu sind Potenziale des neuen Lipasen-Verfahrens zu erkennen, das durch die vereinfachte Glycerin-Aufbereitung – die abzutrennende Salzfracht durch den Einsatz von Kaliumhydroxid fällt hier weg - insgesamt um ca. 15% geringere Investitionskosten aufweist. Die aufwändigere Katalysatoranmischung des enzymatischen Biokatalysators (20% der Gesamtinvestition) geht dabei weniger in die Gesamtkosten ein, als die deutlich teurere Baugruppe vermuten lässt. In Tabelle 7 sind weiters Faktoren zu den Investitionskosten bzw. Betriebskosten der einzelnen Positionen als dimensionsloses Verhältnis von BDI-Verfahren zum Lipasen-Verfahren angegeben.

Die Investitionen für die Fettvorbehandlung (Abtrennung von Wasser und Feststoffen), die Nebenanlagen (Wärme- und Kühlenergieerzeugung, Druckluft, Stickstoff) sowie das Tanklager wurden in diesem Vergleich nicht berücksichtigt, da diese für beide Verfahren ident sind.

Da allerdings die Betriebskosten beim Lipasen-Verfahren durch den hohen Preis der Enzymlösung mehr als doppelt so hoch wie beim herkömmlichen BDI-Verfahren sind, werden in den folgenden Abbildungen nur mehr die Parameter Standzeit des Biokatalysators und Kosten der Enzymlösung näher betrachtet.

Tabelle 8 stellt in Tabellenform den Return of Investment ROI (in %) in Abhängigkeit von der Standzeit des Biokatalysators und von den Kosten der Enzymlösung dar. Der ROI wurde nach der Definition von Dupont ermittelt:

$$\text{ROI} = [\text{Cash Flow} + \text{Fremdkapitalzinsen}] \times 100\% / \text{Investitionskosten}$$

Der aktuelle Marktpreis für fettspaltende Enzyme in flüssigkeitsstabilisierter Formulierung wurde mit rund 10 €/kg Enzymlösung angenommen.

Wie Tabelle 8 zeigt, muss für einen positiven ROI unter den momentanen Marktbedingungen der untersuchte heterogene Biokatalysator während einer Standzeit von mindestens 1.700 h seine volle Aktivität aufrecht erhalten.

| Enzympreis Standzeit | 1 [€/kg] | 5 [€/kg] | 10 [€/kg] |
|-------------------------|----------|----------|-----------|
| | 200 [h] | 10% | -149% |
| 500 [h] | 29% | -29% | -109% |
| 1000 [h] | 36% | 11% | -28% |
| 1500 [h] | 38% | 22% | -2% |
| 1700 [h] | 39% | 24% | 4% |
| 2000 [h] | 39% | 27% | 11% |
| 2500 [h] | 39% | 30% | 18% |

Tabelle 8: Tabellarische Übersicht des Return of Investment ROI (in %) – abhängig vom Enzympreis (in [€/kg]) und der Standzeit des Biokatalysators (in [h]); Annahme: Break even des Lipasen-Verfahrens für Enzymkosten von ca. 10 €/kg bei ca. 1.700 h Standzeit

Auf Basis des in Arbeitsschritt 4 erarbeiteten Technologievorschlages wurde eine wirtschaftliche Bewertung für eine industrielle Anlage derselben Größenordnung durchgeführt.

Um die Grundlagenergebnisse dieses Projektes mit den großtechnischen Produktionsbedingungen des etablierten Biodiesel-Verfahrens vergleichen zu können, wurde durch Maßstabsübertragung (Scale up) das Lipasen-Verfahren ebenfalls in einer Anlagengröße von 25.000 to jährlich hergestelltem Biodiesel betrachtet (siehe Kurzbeschreibung des Lipasen-Verfahrens).

Das Verfahrenskonzept einer bestehenden Biodieselanlage als Referenzanlage wurde entsprechend den geänderten Prozessbedingungen bei Einsatz von immobilisierten Lipasen angepasst. Die entwickelte Prozessvariante „LIP 100%r“ benötigt um ca. 20% geringere Investitionskosten als die Referenzanlage. Folgende Ergebnisse der wirtschaftlichen Bewertung können zusammengefasst werden:

Die in den Versuchen nachgewiesene Standzeit von zumindest 200 Stunden für die immobilisierte Lipase ergibt einen benötigten Enzymeinsatz von fast 20kg pro Tonne Rohöl. Dies würde einen Lipasenverbrauch von 490 Tonnen pro Jahr nach sich ziehen. Die daraus entstehenden Kosten sind bestimmend für die Wirtschaftlichkeit des Prozesses.

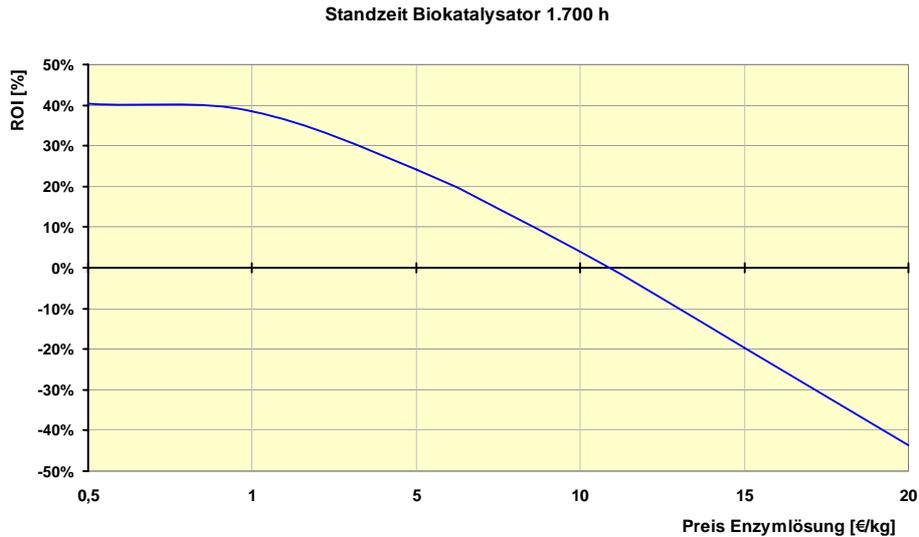
| Aufwand | Kostenanteil | Kommentare |
|------------------------|--------------|----------------------------|
| Rohstoffe | 58% | hochrelevant |
| Hilfsstoffe | 35% | hochrelevant |
| Energie/Transporte | 3% | hoher Eigenversorgungsgrad |
| Investitionen/Personal | 9% | günstigere Installationen |
| Emissionen/Abfälle | 0.1% | kaum Kosten |
| Beiprodukte | -5.2% | gute Erlöse für Glycerin |

Tabelle 9: Kostenstruktur des Referenzprozesses unter Einsatz von Lipasen (Übersicht, Standzeit 200h)

Bei einem Preis von 10€/kg Lipase ist der Prozess nicht umsetzbar und es entsteht ein jährlicher Verlust von ca. 3 Mio. €. Positiv fällt beim Lipasen-Verfahren auf, dass das anfallende Glycerin eine sehr gute Qualität aufweist und dadurch mit einem im Vergleich zur Glycerinqualität des etablierten Verfahrens doppelt so hohen Verkaufspreis in die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung aufgenommen werden kann.

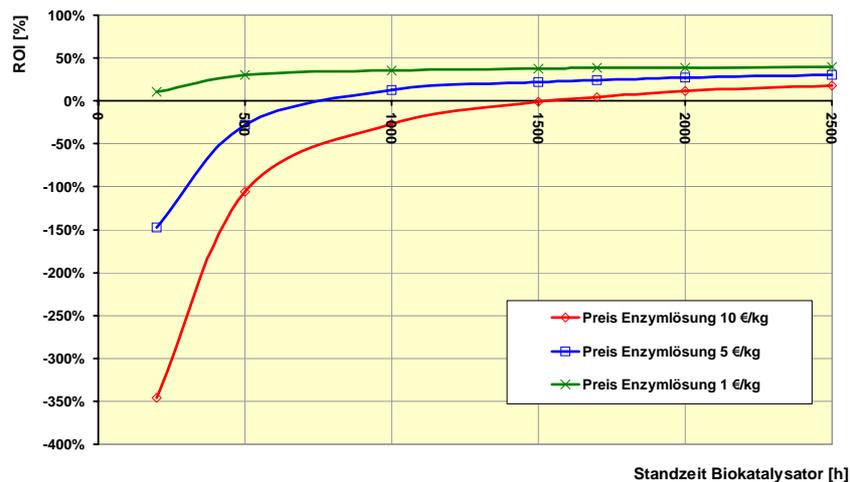
Aufgrund dieses Ergebnisses stellt sich unweigerlich die Frage, ab welcher Standzeit der Lipase der Prozess mit minimalem wirtschaftlichen Gewinn umgesetzt werden kann. Diese schwach positiv bilanzierende Variante „**LIP min.**“ ergab eine notwendige Standzeit von mindestens 640 Stunden. Um denselben Gewinn zu erzielen wie bei der Referenzanlage mit dem etablierten BDI Herstellungsverfahren wurde die Variante „**LIP=BDI**“ durchgerechnet. Dabei zeigte sich, dass die Standzeit der Lipase bei voller Aktivität unter der derzeit gültigen Preissituation mit 10€/kg Lipase zumindest 1.700 Stunden betragen müsste. Anders betrachtet müsste bei gleicher Standzeit die Lipase bei „LIP min.“ um den Faktor 3,2 günstiger werden oder nur 3.13 €/kg kosten.

In Abbildung 57 ist für die angenommene Standzeit des Biokatalysators von 1.700 h der Einfluss der Kosten für die Enzymlösung auf den Return of Investment ROI dargestellt. Der momentane Marktpreis von mindestens 10€/kg Enzymlösung stellt den Break even dar.



**Abbildung 57: Return of Investment des Lipasen-Verfahrens in Abhängigkeit von den Kosten der Enzym-
lösung; Annahme: Standzeit des Biokatalysators 1.700 h**

In Abbildung 58 ist als zukünftiges Szenario der Zusammenhang von ROI und Standzeit des Biokatalysators in Abhängigkeit vom Preis der Enzymlösung dargestellt. Es zeigt sich, dass kürzere Standzeiten des Biokatalysators nur bei deutlich niedrigeren Katalysatorkosten wirtschaftlich vertretbar sind. Das Lipasen-Verfahren kann demnach bei einem angenommenen Preis von 1€/kg Enzymlösung auch bei Standzeiten des Biokatalysators unter 200 h wirtschaftlich sein.



**Abbildung 58: Return of Investment des Lipasen-Verfahrens in Abhängigkeit von der Standzeit des Bio-
katalysators; Dargestellt für unterschiedliche Preise der Enzymlösung: 1€/kg, 5€/kg, 10€/kg**

Beim Szenario „LIP=BDI“ müsste der Preis auf 1.82 €/kg fallen. Beide Lösungsansätze, sowohl ein Fallen der Lipasen-Preise bei zukünftigem hohen Mengenbedarf als auch eine Verlängerung der Standzeit durch weitere Entwicklungsarbeit sind aus der heutigen Sicht denkbar. In der Tabelle 10 finden sich die dazugehörigen Daten:

| Vergleich €/t | LIP min. | LIP be | Kommentare |
|------------------------|----------|--------|----------------------------|
| Rohstoffe | 73.0% | 76.9% | hochrelevant |
| Hilfsstoffe | 17.7% | 13.3% | relevant |
| Energie/Transporte | 4.0% | 4.2% | hoher Eigenversorgungsgrad |
| Investitionen/Annuität | 11.8% | 12.4% | günstigere Installationen |
| Emissionen/Abfälle | 0.1% | 0.1% | kaum Kosten |
| Beiprodukte | -6.6% | -6.9% | gute Erlöse für Glycerin |

Tabelle 10: Benötigte Kostenstruktur des Prozesses unter Einsatz von Lipasen (Standzeit 640h bzw. 1.100h)

5.4 Vergleichende wirtschaftliche Darstellung

In diesem Abschnitt werden zusammenfassend die wesentlichen Merkmale in der wirtschaftlichen Betrachtung herausgestrichen. Wie oben erwähnt hat der neu entwickelte Prozess unter Nutzung immobilisierter Lipasen auf Maiskolbengranulat durchwegs gute Chancen bereits in naher Zukunft in den Bereich der Wirtschaftlichkeit und höherer Renditen einzudringen.

| Vergleich €-Anteil | SdT 02 | 100% Rec. | LIP 100%r | LIP min. | LIP be |
|-------------------------------|----------|---------------------|------------|-----------|-----------|
| Rohstoffe | 76.6% | 79.4% | 57.8% | 73.0% | 76.9% |
| Hilfsstoffe | 8.4% | 8.7% | 34.8% | 17.7% | 13.3% |
| Energie/Transporte | 4.4% | 1.0% | 3.2% | 4.0% | 4.2% |
| Investitionen/Annuität | 14.4% | 15.0% | 9.3% | 11.8% | 12.4% |
| Emissionen/Abfälle | 0.1% | 0.1% | 0.1% | 0.1% | 0.1% |
| Beiprodukte | -4.0% | -4.1% | -5.2% | -6.6% | -6.9% |
| <i>Kostendifferenz in €/t</i> | <i>1</i> | <i>0 (Referenz)</i> | <i>171</i> | <i>26</i> | <i>-1</i> |

Tabelle 11: Kostenstruktur der bestehenden und neu entwickelten Prozesse im Vergleich

In der Tabelle 11 sind die wirtschaftlich betrachteten Varianten parallel dargestellt. „SdT 02“ ist jener häufig in der Praxis umgesetzte Prozess, dessen Energieeinsatz durch Heizöl gedeckt wurde (vgl. höhere Energiekosten). Dies wird heute im „100% Rec.“ Prozess durch die interne Verwertung des Destillationsrückstandes bewerkstelligt. Dadurch können fossile Energieträger zu Gunsten der eingesetzten Pflanzen-Ölressourcen vermieden werden.

Beide Prozesse ohne Lipasen haben absolut betrachtet nur eine Kostendifferenz pro Tonne Produkt von einem Euro. Bei Einsatz von Lipasen mit 200h Standzeit und 10€/kg ergibt das Szenario „LIP 100%“ Mehrkosten von 171 € pro Tonne Biodiesel-Produkt. Dieses Szenario ist unwirtschaftlich, da die Hilfsstoffkosten viel wesentlicher die Betriebskosten beeinflussen als die Ersparnis der Investitionskosten oder die Chemikalienkosten. Aber z.B. bei 6.3 €/kg Lipasekosten und einer Standzeit von bereits 400h könnte der Prozess „LIP min.“ bereits wirtschaftlich betrieben werden. Gleiche Erlöse und Rendite hat der Prozess „LIP=BDI“ bei dem bei einer Standzeit von 400h die Lipase nur 3.6 €/kg kosten dürfte.

Zusammenfassung Vorteile / Nachteile des Lipasen-Verfahrens

Im Vergleich zum BDI-Verfahren zeigen sich beim neu entwickelten Lipasen-Verfahren die folgenden Unterschiede:

Wirtschaftliche Vorteile bietet das Lipasen-Verfahren gegenüber dem BDI Referenz-Verfahren durch die niedrigeren Investitionskosten bedingt durch den Wegfall der Düngemittelaufbereitung und durch die gestiegene Qualität des Glycerins. Die ökologischen Vorteile des neu entwickelten Prozessmodells sind im folgenden Kapitel dargestellt – beides spricht für das nachhaltige Potenzial des erforschten Prozesses.

Vorteile des Lipasen-Verfahrens

- Geringere Gesamtinvestitionskosten
- Geringere Salzfrachten bei der Biodiesel-Herstellung
- Vereinfachte Glycerin-Aufbereitung
- Zukunftspotenzial bei niedrigeren Enzymkosten

- Erhöhte Arbeitsplatzsicherheit, da keine konzentrierten Säuren und Laugen eingesetzt werden
- Entsorgung des verbrauchten Maiskolbengranulates ist problemlos in Biogasanlagen möglich
- Das eigentliche Lipasen-Verfahren (ohne Anmischung des Biokatalysators) ist weitestgehend hilfsstofffrei

Nachteile des Lipasen-Verfahrens

- Beim derzeitigen Stand der Enzympreise deutlich höhere Katalysatorkosten
- Bei kurzer Standzeit des Biokatalysators zu hohe Betriebskosten
- Keine abgesicherten Versuchsergebnisse für Annahme einer hohen Standzeit des Biokatalysators
- Erhöhter Arbeitsaufwand beim Handling des Biokatalysators

5.5 Ökologische Bewertung der Biodieselproduktion aus Altpeise- und Pflanzenöl

Noch mehr als bei der wirtschaftlichen Bewertung gibt es Möglichkeiten und Modelle der ökologischen Bewertung. Im vorliegenden geht es um die technische Änderung eines Produktionsprozesses auf Basis neuer Technologie und eines neuen Verfahrensschrittes. Aus diesem Grund wählen wir einen Bewertungsstandard, der aus der Verfahrenstechnik heraus entwickelt wurde und mit Hilfe dessen sich Prozessänderungen sensitiv abbilden lassen: es ist dies die ökologisch-strategische Bewertung mittels SPI (Sustainable Process Index). Dieser bewertet die entwickelten Produktionssysteme in Hinblick auf deren ökologische Druck über die gesamte Prozesskette – d.h. von der Entnahme der Ressourcen aus der Ökosphäre bis zur Integration und Degeneration aller Stoffe erneut in der Ökosphäre, wie es der Techniker und Prozessingenieur als Hilfestellung beim Design neuer Verfahren als Handhabe benötigt. Es werden damit ökologisch relevante Systemteile und deren Effizienz ermittelt und Verbesserungsvorschläge in Hinblick auf Verfahren und Technologiewahl erarbeitet.

5.6 Bewertung des ökologischen Druckes mit dem SPI

Der SPI (Sustainable Process Index, zu Deutsch Ökologischer Fußabdruck, ÖFA) wurde seit 1991 an der TU Graz, ab 1998 in der Privatwirtschaft konzeptiv und praktisch entwickelt. Der SPI ist eine hochaggregierte Maßzahl, die die ökologischen Auswirkungen (Stoff- und Energieströme) einer Anlage (eines Prozesses) auf der Basis von Fläche zusammenfasst. Durch diese Aggregation können Ressourceneinsatz (Rohstoffe, Energie) und Emissionen in Luft, Wasser und Boden in **einem** vergleichbaren Maß dargestellt werden. Seit 1998 ist der SPITM als Marke (Österreichisches Patentamt AM 3103/98; Reg.Nr. 180 270) von C. Krotscheck geschützt.

Nachdem neben dem wirtschaftlichen Anreiz insbesondere ökologische Argumente bei der Verbreitung von Biodiesel eine Rolle spielen, findet sich in diesem Abschnitt die ökologische Bewertung mit dem "Ökologischen Fußabdruck" (z.B. Krotscheck, Narodoslowsky, 1996; Krotscheck, Obernberger, König, 2000). Der Ökologische Fußabdruck (Konzept SPI) ist ein Maß für den Druck einer Anlage oder eines Prozesses auf die Umwelt. Die Dimension des Fußabdruckes "m²a" bedeutet, dass eine bestimmte Aktivität einen Quadratmeter Erdoberfläche ein Jahr lang nutzt. Je mehr Fläche desto mehr Umweltdruck geht von der Aktivität aus. Da der Ökologische

Fußabdruck ein strategisches Bewertungsinstrument ist, können verschiedenste Umwelteinflüsse (Rohstoffproduktion, Energieeinsatz, Transport, Emissionen, etc.) nebeneinander dargestellt - und damit in ihrer Wichtigkeit bewusst gemacht - werden. Dieser Relevanzcheck soll hier für verschiedene Rahmenbedingungen über den gesamten Lebenszyklus dargestellt werden.

Der SPI fußt auf der Bilanzierung eines Prozesses: auf der Sachbilanz von Stoff- und Energieströmen. Darüber hinaus können Strukturgüter und Personal im SPI erfasst und bewertet werden. Alle Leistungen der Öko- und Wirtschaftssphäre werden auf derselben Basis 'Flächengebrauch' zusammengefasst. Damit ist jene Fläche gemeint, welche es ermöglicht, einen Prozess nachhaltig in die umgebenden Systeme einzubetten.

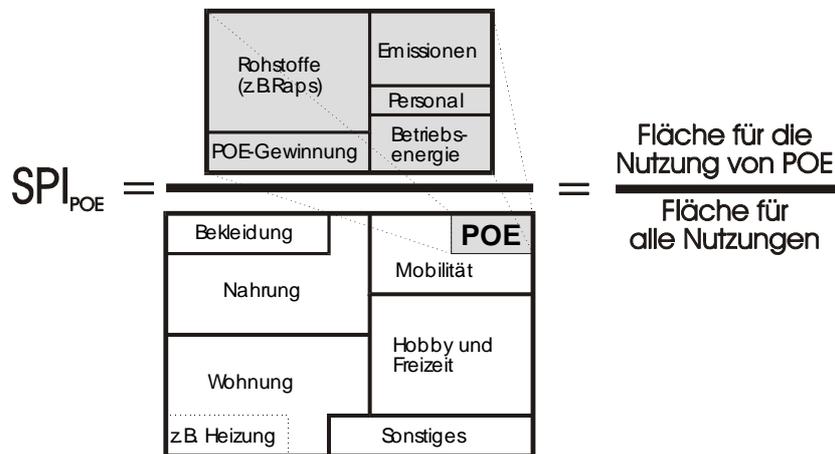


Abbildung 59: Der SPI der Nutzung von Pflanzenöl in Treibstoffen (Schema)

Ausgehend von dem Gedanken, dass das primäre Einkommen der Erde solare Energie ist, woran nahezu jeder lebende Prozess gekoppelt ist, wird die Erdoberfläche zur Basisdimension in der Bewertung gewählt. Der SPI selbst ist das Verhältnis zweier Flächen: Die eine ist die Fläche, die ein Prozess (eine Dienstleistung) zu seiner Einbettung in die Ökosphäre benötigt, die andere ist jene Fläche, die jedem Menschen auf statistischer Ebene zur Verfügung steht. Als Beispiel ist in der Abbildung 59 der SPI für **Pflanzenöl** (POE) in Dieseltreibstoffen verdeutlicht. Dort ist ersichtlich, worauf der absolute Wert des SPI hinweist:

| | |
|-----------------|--|
| SPI << 1 | ein SPI sehr viel kleiner als eins bedeutet, dass die Dienstleistung in der Nachhaltigkeit sehr 'billig' ist (z.B. für tägliche Konsumgüter) |
| 0,001 < SPI < 1 | liegt der SPI zwischen Null und Eins, so kann die betrachtete Dienstleistung für die nachhaltige Entwicklung geeignet sein |
| SPI > 1 | ist der SPI größer als eins, so ist der Prozess für die Nachhaltigkeit zu ineffizient - die Dienstleistung zu 'teuer' |

Wie aus den Begriffen 'billig' und 'teuer' ablesbar, spiegelt der SPI eine gewisse Kostenbasis wider. Analog zum Geld gesehen, verdeutlicht der SPI den Wert einer Dienstleistung (eines Produktes) für einen Konsumenten in Verhältnis zu seinem Gesamteinkommen. Der SPI veranschaulicht daher das 'sich leisten können' auf der Bewertungsbasis der nachhaltigen Entwicklung. Die Fläche als 'Rechenwert' im SPI entspricht nicht einer geographischen realen Erdoberfläche. Diese kann nur im stark regionalisierten Anwendungsbereich direkt identifiziert werden. Darüber hinaus basiert der SPI auf einer wissenschaftlichen Methodik und Datenbasis, die soziale Debatten nicht beeinflussen können. Daher ist er besonders für die Langzeitplanung geeignet. Die Basis des SPI ist intuitiv attraktiv. Nicht nur weil Fläche ein allgemein vorstellbares Maß ist, sondern auch, weil die Fläche der begrenzende Faktor einer nachhaltigen Wirtschaft ist. Anwendbar ist der SPI grundsätzlich auf drei Gebieten:

Verbesserung von bestehenden Prozessen im Sinne der nachhaltigen Entwicklung

Bestehende Prozesse können mit dem SPI analysiert, durchleuchtet und mit Alternativen und verbesserten Prozessvarianten verglichen werden. In diesem Fall kann von vorhandenen (bereits auf Stoff- und Energieflüsse erforschten) Prozessvarianten die ökologischste ausgewählt werden. Die Ergebnisse werden dem Prozessbetreiber Schwachstellen aus dem Blickwinkel der Nachhaltigkeit vor Augen führen. Daraus können bestehende Prozesse für die Zukunft adaptiert und für die Nachhaltigkeit wettbewerbsfähig gemacht werden.

Strategische Entscheidungshilfe bei der Wahl von Technologien und Dienstleistungs-systemen

Technologien werden in jeder gesellschaftlichen Facette, vom Kaffeehaus über die Landwirtschaft bis zur Industrie, angewendet. Technologien benötigen eine bestimmte Zeit von der Entwicklung bis zur technischen Reife (10 bis 15 Jahre) und sie haben eine gewisse Einsatzdauer (10 bis 25 Jahre). Die technischen Hilfsmittel werden daher heute für einen Zeitraum vorausgeplant, in dem ökologische Belange viel stärker in den wirtschaftlichen Alltag hineinwirken werden. Ebenso beinhalten Dienstleistungssysteme (ein System, das eine bestimmte Dienstleistung bereitstellen kann) eine Anzahl von vernetzten Technologien, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf den Markt gekommen sind.

All das bewirkt, dass Technologien in eine Zeit hinein produzieren, in welcher Belange der nachhaltigen Entwicklung mehr Bedeutung haben werden als heute. Der aus obigen Annahmen folgende Zeithorizont ist zwischen 20 und 40 Jahren. In dieser Zeit (bis 2025) wird sich die Erdbevölkerung nach den gängigen Prognosen wahrscheinlich verdoppelt haben (rd. 12 Mrd. Menschen). Dann werden besonders effiziente Technologien in Hinsicht auf Flächengebrauch benötigt werden. Hier ist eine strategische Entscheidungshilfe vonnöten, die allgemein auf einer überregionalen, statistischen Datenbasis eine verlässliche Reihung von Techniken und Dienstleistungssystemen liefert. Hier kann ein hoher Flächengebrauch auf eine hochwertige - also teure - Dienstleistung hindeuten. Diese Information ist in Hinblick auf die zukünftige Marktposition von großem Wert.

Eignung von Prozessen für bestimmte Regionen

Der SPI ist auch dazu geeignet, im regionalen Kontext Prozesse zu bewerten. Dabei wird die interregionale Ebene der Bewertung verlassen. Regionale Zusammenhänge und lokale Daten ermöglichen eine standortbezogene Reihung von Techniken oder Dienstleistungssystemen. Dabei können vorhandene Synergien und Mehrfachnutzungen von Flächen inkludiert werden. Das Ergebnis dieser Bewertung führt zur nachhaltigsten Nutzung von regionalen Ressourcen (Rohstoffe, Energien, Kultur, Anlagen- und Humankapital etc.) und Beiprodukten (Nebenprodukte, Abfälle aller Art, Rückstände), die möglicherweise in anderen regionalen Prozessen Verwendung fin-

den. Der regionale Kontext bringt Subsysteme der Wirtschaftssphäre mit solchen der Ökosphäre in direkten Zusammenhang. Der regionale Bezug bietet die Möglichkeit das Kriterium des Erhaltes der lokalen Generations- und Degenerationspotentiale direkt anzuwenden.

Bewertungsmethoden

Der SPI bewertet folgendermaßen: Der Ressourceneinsatz wird über Erneuerungsraten oder Erträge berechnet. Vom Menschen verursachte Emissionen werden mit natürlichen Flüssen verglichen. Das Umweltkompartiment Wasser, zum Beispiel, wird über den Niederschlag erneuert, der um die Transpiration verringert wird. Gleichzeitig werden über Grund- und Oberflächenwasser natürlich gelöste Stoffe abtransportiert. Niederschlag und Stofftransport sind in der Ökosphäre am einfachsten flächenbezogen darzustellen. Eine Emission einer Anlage in das Kompartiment Wasser wird im SPI-Konzept auf die natürliche Stromdichte referenziert, die durch den Wasserfluss pro m² in die Geosphäre, sowie durch die natürlichen Übergangsströme in das Kompartiment Wasser bestimmt wird. Die einem Massen- oder Energiestrom zugehörige Fläche (auch der Ökologische Fußabdruck genannt) einer Emission entspricht dem Areal, das die Ökosphäre zur Dissipation bzw. Degeneration eines Stromes gleicher Menge und Qualität benötigt.

Die Fähigkeiten des SPI machen ihn aus folgenden Gründen für die integrierte Systembewertung besonders vorteilhaft:

- ◆ integrierte Bewertung von Ressourcen (Rohöl, Chemikalien, Energieträger) und Emissionen (aus der Dampferzeugung, Prozess) auf einer Basis (Flächenbedarf, Ökologischer Fußabdruck); Erstellung der Schwachstellenmatrix erfolgt damit gleichzeitig ressourcen- und medienübergreifend
- ◆ einfache Adaption der Bewertungsbasis (Normalisierung der Daten über Erneuerungsraten und lokale, natürliche Konzentrationen) an lokale Gegebenheiten

Der SPI (bzw. der Ökologische Fußabdruck) wurde bereits in der Industrie (Papier-, Elektronik-, Grundstoff- und Baustoffindustrie, Energiesysteme, Abfallwirtschaft), in Land- und Forstwirtschaft sowie bei der Evaluierung von Verkehrssystemen eingesetzt (siehe dazu auch <http://vt.tu-graz.ac.at/spi/>). Die Einsatzfähigkeit für Standort-

und Regionsbewertung, Ecodesign (Produkt-, Prozess- und Nutzenbewertung) und zur Quantifizierung und Operationalisierung des Umweltmanagements (nach EMAS) wurde in Projekten dargestellt (z.B. Dielacher, 1997).

Auch für diese Aufgabenstellung hat die Verwendung des SPI gegenüber anderen Bewertungsansätzen große Vorteile, da er die Relevanz der verschiedenen Schritte im Prozess, die vorgelagerten Ketten (Dieselgewinnung, Transport, Landwirtschaft-Ölsaaten, Anlagenherstellung ...) und die nachgelagerten Schnittstellen (Emissionen, Entsorgung) des Prozesses berücksichtigen kann (über den gesamten Lebenszyklus). Der dadurch entstehenden Überblick betrifft damit die Gesamtwirkung der Erzeugung von 1 kg Biodiesel (bzw. beim tiefergehenden Vergleich die Dienstleistung Mobilität).

5.7 Der Ökologische Fußabdruck der Rapsölproduktion

In der Tabelle 12 ist die Berechnung des Ökologischen Fußabdrucks (er hat die Einheit m^2a) für 1 Kilogramm Rapsöl dargestellt, da dieser Rohstoff sowohl wirtschaftlich als auch ökologisch die Bewertung dominiert. Am Feld (in der Landwirtschaft) entsteht dabei ca. 2/3 des ökologischen Druckes, bei der Verarbeitung und Zulieferung (in der Industrie) etwa 1/3.

Den Löwenanteil am Ökologischen Fußabdruck machen in Landwirtschaft und Verarbeitung die Verwendung fossiler Energieträger aus (vgl. die Positionen Ackern bis Dreschen und Ölgewinnung).

Kann die gesamte Ölgewinnung in der Steiermark abgewickelt werden, und werden nur nachwachsende Energieträger (z.B. Rapsöl im Traktor und Hackschnitzel bei der Trocknung) verwendet, so reduziert sich der Wert von 252 auf 140 m^2a/kg Rapsöl. Hier erkennt man, wie wichtig es ist, eine durchgängige ökologische Linie in der gesamten Prozesskette schrittweise umzusetzen. Im Vergleich zu Bauholz mit ca. 20 m^2a/kg ist Rapsöl ein „wertvoller“ Rohstoff, der voll ausgenutzt werden muss.

| Zusammenfassung LCA Rapsverwertung | | | | |
|---|-------------|----------------|-----------------------------|---------------|
| Quelle: Projekt POEM, C. Krotscheck 2002 | | | | |
| Aktion/Tätigkeit | Wert | Einheit | m²a/kg Öl | Anteil |
| Herbstackerung | 1,9 | Ah | 15,1 | 7% |
| Düngung | 0,7 | Ah | 4,9 | 2% |
| Saatbeetbereitung | 1 | Ah | 5,3 | 2% |
| Aussaat | 1 | Ah | 7,6 | 3% |
| Kopfdüngung | 0,5 | Ah | 3,5 | 2% |
| Unkrautbekämpfung | 0,5 | Ah | 4,0 | 2% |
| Grubbern | 1 | Ah | 5,3 | 2% |
| Drusch | 1 | Ah | 17,5 | 8% |
| Arbeitskraft | 14,5 | Ah | 3,5 | 2% |
| Maschinenaufwand | 246 | €/ha | 11,4 | 5% |
| Saatgut | 4 | kg/ha | 3,6 | 2% |
| Anbaufläche | 1 | ha | 9,6 | 4% |
| Stickstoff N | 145 | kg/ha | 14,1 | 6% |
| P2O5 | 61 | kg/ha | 2,2 | 1% |
| K2O | 65 | kg/ha | 0,7 | 0% |
| CaO | 300 | kg/ha | 0,7 | 0% |
| Bor | 1 | kg/ha | 0,0 | 0% |
| Pflanzenschutz | 109 | € | 7,0 | 3% |
| Düngeremissionen: Leitfläche N | | Acker | 17,6 | 8% |
| Traktor, Transport | 8 | km | 2,4 | 1% |
| Rapssamen, Ertrag | 3000 | kg/ha | 135,9 | 60% |
| Ölertrag | 1040 | kg Öl/ha | | |
| Lkw, Transport | 50 | km | 8,4 | 4% |
| Ölgewinnung Strom | 0,10 | kWh/kg Samen | 8,3 | 4% |
| Ölgewinnung Heizöl | 0,42 | kWh/kg Samen | 75,8 | 33% |
| Rapsöl ab Ölpreise | | | 228,3 | |

Tabelle 12: Der SPI der Pflanzenölproduktion in Österreich (Landwirtschaft, Ölpreise)

5.8 Ökologische Darstellung des Referenzprozesses zur Biodieselherstellung

Bis vor kurzer Zeit entstand bei der Reinigung des Produktes über eine Destillation ein Rückstandprodukt von ca. 30kg der üblicherweise mit den Glycerinresten verkauft wurde. Glycerin und Rückstandprodukt können beide thermisch verwertet werden. Aus der Bilanz in Tabelle 13 erkennt man den wesentlichen ökologischen Einfluss des zugekauften fossilen Brennstoffes „Heizöl“ und der Emissionen (ca. 15% des gesamten ökologischen Druckes). Aus diesem Grund und auf Grund der steigenden Erdölpreise ging man dazu über, die thermisch verwertbaren Reststoffe in der eigenen Anlage zu nutzen (siehe unten, Prozess 100% rec.).

Der SPI hat die Grundeinheit [m²a]: dies bedeutet, dass ein Vorgang (ein Produkt, etc.) einen Quadratmeter (Erdoberfläche) exklusiv für ein Jahr in Anspruch nimmt. Im

Sinne der Flächenkonkurrenz aller Vorgänge auf der Erde bedeutet das wiederum, dass Nachhaltigkeit insbesondere dann gegeben ist, **je kleiner der Flächenbedarf** ist. Vorgänge (Produkte, Prozesse) mit kleinem “Ökologischem Fußabdruck” sind für die nachhaltige Entwicklung besser geeignet als solche mit großem Fußabdruck. Um einen guten Überblick analog zu den Produktionskosten zu geben, wurde der SPI auch in Rohstoffe, Energiearten, Personal und Anlagen/Wartung etc. getrennt dargestellt.

| Aufwand „SdT 02“ | m ² a/t Öleinsatz | m ² a/kg | Kommentare |
|----------------------|------------------------------|---------------------|---|
| Rohstoffe | 97.036 | 100 | hochrelevant |
| Hilfsstoffe | 57.744 | 59,5 | hochrelevant |
| Energie | 7.130 | 7 | hoher Eigenversorgungsgrad |
| Transport | 22.270 | 23 | wesentlich |
| Investitionen | 10.853 | 11 | hochwertige Installationen |
| Emissionen | 31.275 | 32 | Leitfläche: CO ₂ , NO _x und CSB |
| Reststoffe, Abwässer | -5.906 | -6 | geringer Einfluss |
| Beiprodukte | -7.731 | -8 | eher unbedeutend |
| <i>Summe</i> | <i>212.670</i> | <i>219</i> | |

Tabelle 13: Bewertung der Sachbilanz der Biodieselherstellung mittels SPI für den Prozess „SdT 02“

Die in Tabelle 14 errechneten Werte aggregieren eine Vielzahl von Daten nach der Rechenvorschrift des SPI Konzeptes.

Jede SPI Berechnung gliedert sich in drei große Teilbereiche: die Sachbilanz, die Bewertung und die Wirkbilanz (die gewichtete Sachbilanz) in m²a. Die Produkte wurden aliquot zu ihrem Verkaufserlös mit dem Gesamtfußabdruck belastet. Im Detail erkennt man folgende hohe ökologische Relevanzen: beim Einsatz nativer Pflanzenöle, bei der Verwendung von MeOH fossilen Ursprungs, der CO₂ Emissionen aus der Dampferzeugung, beim Transportaufwand durch Sammlung und Zulieferung der (Sekundär-) Rohstoffe.

| Art | I | Aufwand | Menge | Unit | Datenherkunft | GD | spez. ÖFA | L | Bezug | GW | ÖFA | % | GT |
|--------|---|-------------------------------------|---------|------|----------------------|----|---------------------|---|---------------|------|---------|------------------|----|
| Output | | Emissionen | | kg | | | | | | | | | |
| a | | CO2 (fossil) | 168 | kg | Bil. Heizöl EL | h | 164 | y | | h | 27.496 | 12 | h |
| a | | CO | 264.000 | mg | Bil. Heizöl EL | m | 0,00011 | | | m | 30 | 0 | m |
| a | | NOx | 495.000 | mg | Bil. Heizöl EL | h | 0,0076 | y | | h | 3.779 | 2 | h |
| a | | SO2 | 396.000 | mg | Bil. Heizöl EL | m | 0,0039 | y | | h | 1.553 | 1 | h |
| a | | N2 | 2,38 | kg | Anlagenbilanz | m | 6,4 | | | m | 15 | 0 | m |
| w | | MeOH | 0,032 | kg | über Luftemission | m | 1250 | | 10% in w Re | m | 40 | 0 | m |
| | | Reststoffe, Abwässer | | | | | | | | | | | |
| w | | CSB | 500.000 | mg | Messungen | h | 0,00014 | y | | h | 69 | 0 | h |
| w | | Abwasser HA | 20,9 | kg | üblicher Bürobetrieb | h | 0,009 | | DISS | m | 0 | 0 | m |
| l | | Restmüll | 0,1 | kg | üblicher Bürobetrieb | m | 15,6 | y | DISS | m | 1 | 0 | m |
| l | | PVC-Abfälle | 0,5 | kg | üblicher Bürobetrieb | m | 46,8 | y | DISS | m | 23 | 0 | m |
| l | | Biomüll | 0,0 | kg | üblicher Bürobetrieb | n | 0 | | Kompostierung | | 0 | 0 | m |
| b | | Destillationsrückstand | 30,0 | kg | Hu=37 MJ/kg | h | -200 | | | m | -6.000 | -3 | m |
| b | | Altpapier | 0,1 | kg | üblicher Bürobetrieb | n | 0 | y | ARA | h | 0 | 0 | n |
| b | | Prozessabwasser | 60,0 | kg | Bewertung über CSB | h | | | | h | 0 | 0 | h |
| | | Produkte | | | | | m ² a/kg | | | | | | |
| p | | Biodiesel | 970 | kg | Hauptprodukt | h | 219 | | | 0,96 | 212.670 | | m |
| p | | Rohglycerin 80% | 120 | kg | Sek. Rohstoff | h | 58 | | | 0,03 | 6.924 | | m |
| p | | Feststoffdünger | 30 | kg | Kalisalze | h | 27 | | | 0,00 | 808 | | m |
| | | Produktzuordnung über Verkaufspreis | | | | | | | Summe | | 220.402 | m ² a | |

Tabelle 14: Beispiel der detaillierten Sachbilanzbewertung mittels SPI (SdT 02), Teilausschnitt Output

Die Sachbilanz enthält (Mengen pro Tonne Öl-Rohstoff), deren Datenherkunft und die Einschätzung der Datengenauigkeit (GD) in n – nieder, m – mittel und h – hoch. Eine hohe Genauigkeit ergibt ein ebensolcher Ergebnis. Danach kommen die spezifischen Ökologischen Fußabdrücke (spez. ÖFA), die aus anderen Sachbilanzen (y bedeutet die Vorkette wurde bereits untersucht) und deren Bewertung stammen. Dies sind praktisch die „ökologischen Übergabekosten“ an den Prozess Biodieselherstellung – je größer die Werte, desto aufwendiger dessen Herstellung und desto umweltbelastender ist dessen Nutzung. Auch hier findet sich eine Spalte mit der Genauigkeit der Wertungsdaten (GW). GD und GW ergeben schließlich die Fehlergröße des totalen Ergebnisses (GT) – die Genauigkeit Total. Diese Fehlerbandbreite wird aus dem Grund mitgeführt, dass man die Exaktheit des Ergebnisses der ökologischen Bewertung darstellen kann. Gibt es Datenzeilen mit hoher Beeinflussung des Ergebnisses (hier z.B. Rapsöl), die eine niedere GT haben, so wird das Ergebnis unscharf sein.

Um die Genauigkeit des Ergebnisses darzustellen werden die Fehlertoleranten mit den GT multipliziert. So ergibt sich für den Großteil der hier gemachten Analysen, dass der Fehler unter 11% liegt, und damit das Ergebnis für eine SPI Analyse mit komplexer Sach- und Wirkungsbilanz sehr gut ist.

| Genauigkeit | +/- Bereich |
|--------------------|--------------------|
| Klasse h | 7% |
| Klasse m | 12% |
| Klasse n | 40% |

Tabelle 15: Genauigkeit

Der bewertete Referenzprozess (100% rec.) ist in der Tabelle 16 dargestellt. Wie oben erwähnt, deckt die Anlage ihren Prozesswärmebedarf aus den Rückständen und kann so nahezu autoenergetisch arbeiten. Man erkennt in den Summenwerten, dass 27.400 m²a pro Tonne Rohöl an Fußabdruck eingespart werden können. Das sind immerhin -12.5% durch diese Maßnahme, obwohl dadurch 3.4% weniger Produkt die Anlage verlassen.

| Zusammenfassung | m²a/t Öl | m²a/kg | Kommentare |
|------------------------|----------------------------|--------------------------|--|
| Rohstoffe | 97.036 | 103 | hochrelevant |
| Hilfsstoffe | 57.744 | 62 | hochrelevant |
| Energie | 1.191 | 1 | hoher Eigenversorgungsgrad |
| Transport | 22.270 | 24 | bedeutend |
| Investitionen | 10.853 | 12 | hochwertige Installationen |
| Emissionen | 3.783 | 4 | Leitfläche: NO _x und CSB |
| Reststoffe, Abwässer | 94 | 0 | Rezyklierung ist bereits gegen-gerechnet |
| Beiprodukte | -6.994 | -7 | eher unbedeutend |
| | 185.977 | 198 | |

Tabelle 16: SPI Bewertung der Biodieselherstellung für den Referenzprozess 2003 (Überblick)

Ähnlich wie bei der wirtschaftlichen Bewertung spielen hier Rohstoffe und deren Zulieferung eine übergeordnete Rolle. Der Rest ist eher irrelevant. Positiv fällt auf, dass nach der Modernisierung der autoenergetischen Versorgung (mit Heizöl 38 m²a/kg Energie und Emissionsaufwand – Leitfläche CO₂) die Emissionen der Anlage selbst in die Umweltmedien weitgehend gelöst ist. D.h., dass der Standort sehr sau-

ber und schonend produziert, und dass sich der Umweltdruck in der Vorkette (Öle und Methanol) sowie in der Anwendung (Verbrennungskraftmaschinen) verlagert. Zur Zuordnung der Beiprodukte ist anzumerken, dass keine Substitutionsmethode angewendet wurde, sondern eine Allokation über den Verkaufswert in €. Dies gewährleistet eine unverfälschte Aussage ohne angenommene Gutschriften (z.B. Glycerin wird statt Heizöl eingesetzt).

Das Ergebnis der SPI Berechnung in diesem Kapitel ist der spezifische Fußabdruck z.B. 198 m²a pro Kilogramm Biodiesel. Dieser ist für ein Verfahren ähnlich wie die Produktionskosten ein ausreichender Vergleichsmaßstab. Er beschreibt jenen Aufwand an Fläche, die exklusiv über 1 Jahr lang für die Herstellung von 1 kg Biodiesel benötigt wird. Man könnte nun weiterrechnen und annehmen, dass ein Österreicher 15.000km im Jahr zurücklegt, dessen Auto 7 kg pro 100km verbraucht. Das ergäbe eine Menge von 1.050 kg pro Jahr an Biodiesel oder in diesem Fall mit einem Fußabdruck von 207.900m² (ca. 20 Hektar). Bei ca. 10,5 Hektar pro Einwohner in Österreich wäre der SPI ca. 2, was bedeutet, dass diese Art der Mobilität in der Zukunft nicht gehalten werden kann. Mit allen Einsparungspotenzialen und 62 m²a/kg (siehe unten) ergäbe sich ein SPI von 0,63. Hier wird deutlich, dass die übliche Art der Mobilität auf die ganze Menschheit nicht übertragbar ist, und dass diese in Zukunft auch in Europa wieder reduziert werden wird.

5.9 Ökologische Potenziale des Referenzprozesses

Wir haben oben gezeigt, wie positiv sich die Nutzung des Destillatrückstandes in der eigenen Anlage auswirkt. In diesem Abschnitt sollen weitere ökologischen Potenziale und deren Größenordnung dargestellt werden. Zunächst der Schritt von fossilen Treibstoffen in der landwirtschaftlichen Produktion, der Ölgewinnung und der Zulieferung zu alternativen Treib- und Heizstoffen. Es wurde Biodiesel im Transport und Hackschnitzel (Waldhackgut) in der Ölgewinnung angenommen.

| Zusammenfassung | m ² a/t Öl | m ² a/kg | Kommentare | Anteil |
|----------------------|-----------------------|---------------------|--|--------|
| Rohstoffe | 46.784 | 50 | hochrelevant | 37% |
| Hilfsstoffe | 57.744 | 62 | hochrelevant | 45% |
| Energie | 1.191 | 1 | hoher Eigenversorgungsgrad | 1% |
| Transport | 12.259 | 13 | wesentlich | 10% |
| Investitionen | 10.853 | 12 | hochwertige Installationen | 8% |
| Emissionen | 3.783 | 4 | Leitfläche: NO _x und CSB | 3% |
| Reststoffe, Abwässer | 94 | 0 | Rezyklierung ist bereits gegen-gerechnet | 0% |
| Beiprodukte | -4.810 | -5 | eher unbedeutend | -4% |
| | 127.898 | 136 | | |

Tabelle 17: SPI Bewertung der Sachbilanz „Biodieselherstellung“ mit alternativen Treibstoffen und Energieträger in der Vorkette (Szenario „öko Trbst.“)

Man erkennt die wesentlichen Vorteile, die dadurch in der Vorkette (bei den Lieferanten) entstehen. Das Rohmaterial wird dadurch deutlich ökologischer und „billiger“ im Sinne des SPI. In diesem Szenario wird das aus fossilen Rohstoffen produzierte MeOH (zumeist aus Erdgas) zu 38% SPI bestimmend, wohingegen der Rest der Rohstoffe nur 36% ausmachen. Daher wird im nächsten Schritt gezeigt, was die Verwendung von MeOH aus regenerativen Quellen (z.B. hier aus Biogas und Holzgas) für zusätzliche ökologische Vorteile bringen kann.

| Zusammenfassung | m ² a/t Öl | m ² a/kg | Kommentare | Anteil |
|----------------------|-----------------------|---------------------|--|--------|
| Rohstoffe | 46.784 | 50 | hochrelevant | 55% |
| Hilfsstoffe | 12.858 | 14 | relevant | 15% |
| Energie | 1.191 | 1 | hoher Eigenversorgungsgrad | 1% |
| Transport | 12.259 | 13 | | 14% |
| Investitionen | 10.853 | 12 | hochwertige Installationen | 13% |
| Emissionen | 3.783 | 4 | Leitfläche: NO _x und CSB | 4% |
| Reststoffe, Abwässer | 94 | 0 | Rezyklierung ist bereits gegen-gerechnet | 0% |
| Beiprodukte | -3.183 | -3 | eher unbedeutend | -4% |
| | 84.639 | 90 | | |

Tabelle 18: SPI Bewertung der Sachbilanz „Biodieselherstellung“ zusätzlich mit regenerativem Methanol (Szenario „öko MeOH“)

Im Vergleich zum Referenzprozess (198 m²a/kg) liegt man mit diesen zwei Optimierungsschritten bereits bei 90 m²a/kg (-55%).

Der letzte hier dargestellte Optimierungsschritt ist der erhöhte Einsatz von Sekundärrohstoffen, da für natives „sauberes“ Pflanzenöl der Einsatz als Treibstoff auch ohne aufwendige Veresterungstechnologie möglich ist. Der Wert der Biodieselproduktion und auch der wirtschaftliche Vorteil liegen insbesondere in der Aufbereitung sekundärer Rohstoffe aus der Wirtschaft. Hier ist nun angenommen, dass nur mehr 10% natives Rapsöl in der Anlage Verwendung finden, dafür 90% Altspeiseöle und -fette.

| Zusammenfassung | m ² a/t Öl | m ² a/kg | Kommentare | Anteil |
|----------------------|-----------------------|---------------------|--|--------|
| Rohstoffe | 18.821 | 20 | hochrelevant | 33% |
| Hilfsstoffe | 12.858 | 14 | | 22% |
| Energie | 1.191 | 1 | hoher Eigenversorgungsgrad | 2% |
| Transport | 12.259 | 13 | | 21% |
| Investitionen | 10.853 | 12 | hochwertige Installationen | 19% |
| Emissionen | 3.783 | 4 | Leitfläche: NO _x und CSB | 7% |
| Reststoffe, Abwässer | 94 | 0 | Rezyklierung ist bereits gegen gerechnet | 0% |
| Beiprodukte | -2.169 | -2 | eher unbedeutend | -4% |
| | 57.689 | 62 | | |

Tabelle 19: Zusammenfassung SPI Bewertung unter Erhöhung des sekundären Pflanzenöl-Rohstoffes auf 90% (Ausnutzung aller wesentlichen Optimierungspotenziale, Szenario „10% nativ“)

Daraus folgen zusammengefasst aus Sicht der **ökologischen Bewertung wichtige Optimierungspotenziale** nach dem Stand der Technik des Jahres 2002 (SdT 02):

1. Nutzung des Destillatrückstandes neben Heizöl (mit. Dest. Rec.)
2. Nutzung des Destillatrückstandes statt Heizöl (100% Rec.) zur autoenergetischen Versorgung der Anlage - 3,4% weniger Produkt

3. Ausstattung der Vorkette (Lieferanten) mit ökologischem Treibstoff (Landwirtschaft, Verarbeitung und Logistik der Öle), z.B. über Abnahmeverträge (öko Trbst.)
4. Ersatz des MeOH durch regenerativ hergestelltes (z.B. aus Biogas oder Vergärung – öko MeOH)
5. Reduktion des Einsatzes nativer Öle auf ein Minimum von 10 Prozent (10% nativ)

| Position | SdT 02 | mit Dest. rec. | 100% Rec. | öko Trbst. | öko MeOH | 10% nativ |
|-------------------------------|---------|----------------|-----------|------------|----------|-----------|
| Roh/Hilfsstoffe | 154.780 | 154.780 | 154.780 | 104.528 | 59.642 | 31.679 |
| Energie | 7.130 | 4.271 | 1.191 | 1.191 | 1.191 | 1.191 |
| Transport | 22.270 | 22.270 | 22.270 | 12.259 | 12.259 | 12.259 |
| Investitionen | 10.853 | 10.853 | 10.853 | 10.853 | 10.853 | 10.853 |
| Emissionen | 31.275 | 18.038 | 3.783 | 3.783 | 3.783 | 3.783 |
| Reststoffe, Abwässer | -5.906 | 94 | 94 | 94 | 94 | 94 |
| Beiprodukte | -7.731 | -7.377 | -6.994 | -4.810 | -3.183 | -2.169 |
| Summe | 212.670 | 202.929 | 185.977 | 127.898 | 84.639 | 57.689 |
| | | | | | | |
| Biodiesel m ² a/kg | 219 | 209 | 198 | 136 | 90 | 62 |
| Relation | 111% | 105% | 100% | 69% | 46% | 31% |

Tabelle 20: Zusammenfassung verschiedener Szenarien (SdT – Stand der Technik 02, Referenz 100% Rec.) kumuliert – die Szenarien bauen aufeinander auf

Man erkennt aus Tabelle 20 eine stetige Ökologisierung der Biodieselherstellung. Auch für die Zukunft gibt es viele Möglichkeiten der Verbesserung. Man erkennt auch, dass diese Verbesserungen nicht allein durch den Betriebsstandort erreicht werden können, sondern dass hier systemisch das Netzwerk aus Lieferanten, Verarbeiter, Logistikern und Kunden neu gedacht und als Ganzes gesehen werden muss. So können BD Produktionsanlagen zum Ausgangspunkt von Verbesserungen in der

Landwirtschaft, beim Transport und bei der Verarbeitung nativer Öle werden, die das Wirtschaftssystem als Ganzes immer nachhaltiger machen. In diesem Fall würde der BD Anlage einer Region Aufklärungs- und Vermittlungsarbeit zufallen, die sich aber im eigenen Produkt ökologisch bezahlt machen.

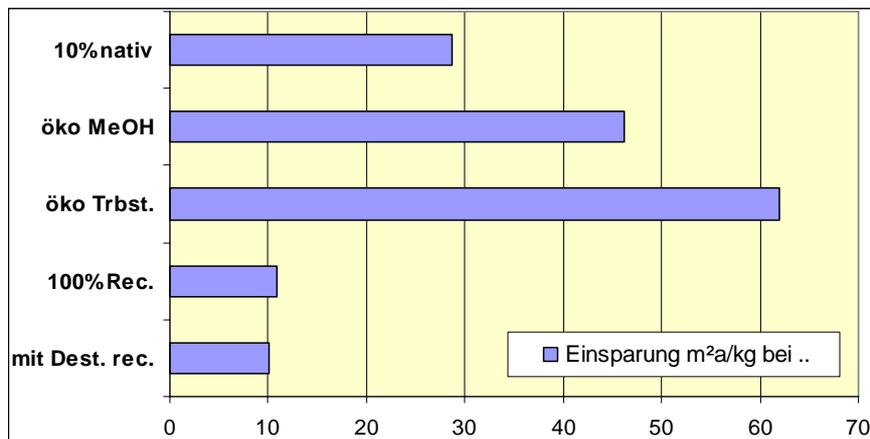


Abbildung 60: Reduktion des SPI per kg Biodiesel-Produkt durch verschiedene Maßnahmen

Die Szenarien 10% nativ und 100% Rec. können am Standort des Betreibers umgesetzt werden und haben in Summe eine Reduktionsleistung des Umweltdruckes um ca. 50 m²a/kg. Die Vorkettenumstellung auf regenerative Treibstoffe und auf Methanol aus nachwachsenden Quellen haben für die Zukunft die größten Effekte.

5.10 Ökologische Bewertung der Biodieselproduktion mit Lipaseneinsatz

Welche ökologischen Effekte der Einsatz von Lipasen in zukünftigen Prozessen haben wird, ist in diesem Abschnitt dargestellt. Wie bereits im Abschnitt der wirtschaftlichen Bewertung dargestellt, benötigt die entwickelte Prozessvariante „LIP 100%“ um ca. 20% geringere Investitionskosten als die Referenzanlage. Folgende Ergebnisse der ökologischen Bewertung können zusammengefasst werden:

Der vergleichbare Referenzprozess hatte einen SPI von 198 m²a/kg Biodieselprodukt und lag damit ökologisch schlechter, obwohl dieses Szenario mit der in den Versuchen nachgewiesenen Standzeit von 200 Stunden für die immobilisierte Lipase wirtschaftlich wesentlich schlechter liegt.

| Zusammenfassung | m ² a/t Öl | m ² a/kg | Kommentare | Anteil |
|--------------------|-----------------------|---------------------|---|--------|
| Rohstoffe | 97.306 | 100 | hochrelevant | 53% |
| Hilfsstoffe | 56.604 | 58 | hoher Eigenversorgungsgrad | 31% |
| Energie/Transporte | 30.362 | 31 | aufwendige Zulieferung | 16% |
| Investitionen | 8.883 | 9 | ca. 20% Einsparungen | 5% |
| Emissionen/Abfälle | 3.873 | 4 | Leitfläche: CO ₂ , NO _x und CSB | 2% |
| Beiprodukte | -11.730 | -12 | hochwertiges Glycerin (95%) | -6% |
| | 185.299 | 191 | | |

Tabelle 21: SPI Bewertung der Biodieselherstellung unter immobilisierter Lipasen (Referenzprozess, Standzeit 200h)

Die aus dem Lipasenverbrauch entstehenden Kosten sind hochrelevant für die Wirtschaftlichkeit des Prozesses – sind aber ökologisch über den Lebenszyklus betrachtet etwas besser. Wie im Wirtschaftlichkeitsabschnitt wollen wir auch hier die zwei Szenarien (1) „LIP min.“ mit einer Standzeit von 640 Stunden und (2) „LIP be“ mit einer Standzeit von 1.100 Stunden darstellen, um den Vergleich zur wirtschaftlichen Bewertung zu ermöglichen:

| Zusammenfassung | LIP min. | | | LIP be | |
|--------------------|---------------------|--------|--|---------------------|--------|
| | m ² a/kg | Anteil | | m ² a/kg | Anteil |
| Rohstoffe | 100 | 54% | | 100 | 54% |
| Hilfsstoffe | 54 | 29% | | 53 | 29% |
| Energie/Transporte | 31 | 17% | | 31 | 17% |
| Investitionen | 9 | 5% | | 9 | 5% |
| Emissionen/Abfälle | 4 | 2% | | 4 | 2% |
| Beiprodukte | -12 | -6% | | -12 | -6% |
| | 187 | | | 186 | |

Tabelle 22: SPI Bewertung der Biodieselherstellung unter immobilisierter Lipasen (Referenzprozess, Standzeit 200h)

In der ökologischen Bewertung erkennt man, dass zwischen den zwei Szenarien LIP min. und LIP be kaum ein Unterschied besteht, da andere Faktoren einen weit relevanteren Einfluss haben, als der Einsatz der Lipasen, die auf dem Trägermaterial Maiskolbengranulat gebunden sind. Der Reststoff an „Lipase+Trägermaterial“ nach der Nutzung kann entweder kompostiert, verbrannt oder in Biogasanlagen eingesetzt werden, wobei sich insbesondere letztere Möglichkeit positiv auf den Umsatz in Biogasanlagen auswirken kann, da ein Teil der Lipasen nach wie vor aktiv ist.

5.11 Ökologische Bewertung des Trägermaterials Maiskolbengranulat

Der Innovationsgehalt des vorliegenden Projektes liegt auf dem Einsatz von Maiskolbengranulat, einem nachwachsenden Rohstoff. Kommerziell erhältliche, immobilisierte Lipasen sind herkömmlich auf einem komplexen Polymerträger, hauptsächlich Polyethylen, gebunden. Polyethylen wird, wie auch Polypropylen, aus Erdöl gewonnen. Dies ergibt für den SPI von MKG und Polyethylen folgende Bewertung:

| | MKG | Polyethylen |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Von = minimaler Wert | 11.9 m ² a/kg | 675 m ² a/kg |
| Bis = realer Wert | 27.6 m ² a/kg | 1030 m ² a/kg |

Tabelle 23: Unterschied Maiskolbengranulat-Polyethylen

Diese Werte sind inklusive Zustellung frei Haus und jeweils bezogen auf die Masse von 1kg.

Das bedeutet, dass alleine hier beim Trägermaterial ein Faktor von 37 bis 57 erreicht wird.

Wesentliche Vorteile des MKG:

1. nachwachsender Rohstoff
2. weniger Energiebedarf
3. weniger Emissionen ins Wasser bei der Herstellung
4. leichte Entsorgung

Der SPI des BDI Prozesses würde bei LIP+Polyethylen um den durchaus wesentlichen Wert von 5% steigen. Dieses Ergebnis ist ein deutliches Zeichen für die ökologische Relevanz eines umweltverträglichen, leicht abbaubaren und nachwachsenden Rohstoffs.

5.12 Vergleichende ökonomische und ökologische Darstellung

Immobilisierte Lipasen als Beitrag einer nachhaltigen Prozesstechnologie

In diesem Abschnitt gehen wir der Frage nach, inwieweit auf Maisgranulat immobilisierte Lipasen einen Beitrag zu einer nachhaltigen Prozesstechnologie liefern können. Diese Frage enthält die Teilgebiete:

- Wie weit ist der Prozess der Biodieselherstellung innerhalb der Anlage noch optimierbar?
- Welchen Beitrag kann der Einsatz von Lipasen liefern?
- Sind positive Wirkungen der geänderten Technologie nur heute gegeben oder bleiben strategische Vorteile in der Zukunft?
- Hat der Einsatz von Lipasen positive Wirkung auf die Vor- und Nachkette der Biodieselanlage?
- Erhöht der Einsatz von Lipasen die Arbeitssicherheit der Belegschaft und der Anwender?

Diesen Fragen wollen wir uns hier schrittweise nähern. Die Abbildung 61 zeigt im Überblick der SPI in $\text{m}^2\text{a}/\text{kg}$ Biodiesel auf Grund diverser Herstellungsmöglichkeiten. Man erkennt, dass sich die Technologie der Destillatrückstandverwertung positiv auf die Umwelt (insbesondere bei den Emissionen) auswirkt und dass der Lipaseprozess eine weitere Ökologisierung darstellt.

Man erkennt aber auch, dass die auf Lipasen geänderte Prozesstechnologie keinen „Sprung“ in der Ökologisierung des Prozesses darstellt und auch nicht darstellen kann, da die direkten Einflüsse des **Produktionsstandortes „Biodieselanlage“ praktisch unter 5%** liegen. Der Rest der „Abhängigkeiten“ über den Lebenszyklus folgern aus den vorgelagerten Prozessketten – der Ölgewinnung, der Stromerzeugung, der Hilfsstoffherstellung, des Anlagenbaus oder des Transportes.

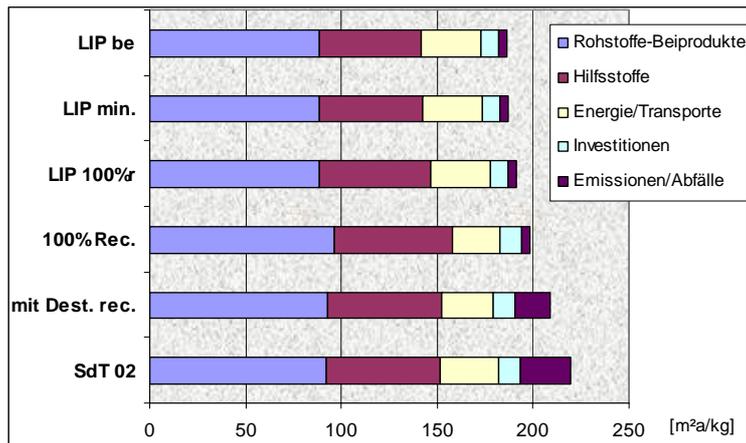


Abbildung 61: SPI per kg Biodiesel-Produkt bei verschiedenen Prozessen nach Kategorie (im Balken Rohstoffe werden die Beiprodukte subtrahiert dargestellt)

Wir haben gezeigt, dass diese Einflüsse der Vorkette starken Einfluss auf die Lebenszyklusperformance haben und dass im Szenario „10% nativ“ der Fußabdruck von 200 auf 62 m²a/kg (-70%) gesenkt werden kann. Die damit zusammenhängenden Lösungen sind jedoch nicht vom Betreiber allein zu erreichen, sondern nur im **Netzwerk der Lieferanten**.

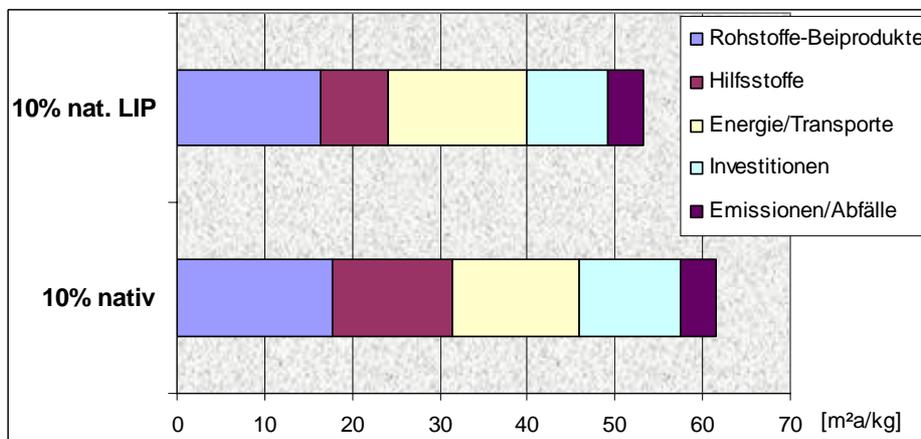


Abbildung 62: SPI per kg Biodiesel-Produkt bei verschiedenen Prozessen nach Kategorie (im Balken Rohstoffe werden die Beiprodukte subtrahiert dargestellt)

Durch die Abbildung 62 haben wir die Frage zu beantworten versucht, ob denn der Lipaseprozess auch im nachhaltigeren Szenario der „10% nativ“ (inkl. der oben angeführten Verbesserungsschritte) Vorteile besitzt. Diese Frage ist insbesondere des-

halb wichtig, als die Zukunftsfähigkeit des Prozesses zentraler Inhalt der Forschungen war. Und in dieser Zukunftsannahme wird deutlich, dass

1. die Hilfsstoffe des konventionellen Prozesses (insbesondere Laugen, Säuren) ökologisch problematisch sind,
2. der Aufwand bei den Investitionen reduziert werden kann,
3. und dass das hochwertige Glycerin beim Lipaseprozess in der nachhaltigen Stoffflusswirtschaft ohne Probleme in der Nachkette eingesetzt werden kann.

Diese Vorteile zeichnen den entwickelten Prozess gegenüber dem heutigen Stand der Technik nachhaltig aus. Der Vorteil der Lipasentechnologie **vergrößert in Zukunft sogar seinen „ökologischen Abstand“** von 6% auf 13%.

Im Zusammenhang auf den positiven Einfluss auf die Vor- und Nachkette des Prozesses „Biodieselerzeugung“ kann vermerkt werden, dass die „**harten Chemikalien**“ (wie Kalilauge oder Schwefelsäure) um **den Faktor 30 durch den Lipaseprozess reduziert** werden. Dies bewirkt eine enorme Zunahme an **Arbeitsicherheit** für die Belegschaft, ein sichereres Handling der im Betrieb, eine starke **Reduktion des Gefahrenpotenzials** bei Störfällen, sowie in der Nachkette eine enorme Qualitätssteigerung des Rohglycerins. Der Einsatz von hochprozentigen Säuren ist nur mehr im Bereich der Katalysatoranmisch-Anlage notwendig und damit auf einen kleinen Bereich begrenzt.

Durch die **geringe Belastung des Rohglycerins** durch Salze oben genannter Säuren kann dieses – ohne viele Abfälle in der Nachkette der Biodieselanlage zu produzieren – effizient weiter verarbeitet werden. Dies schlägt sich auch wirtschaftlich positiv beim Lipase-Prozess nieder, da das anfallende Glycerin eine enorm hohe Qualität aufweist und dadurch als echtes Produkt (nicht nur als Beiprodukt), zu einem mehr als doppelt so hohen Preis im Vergleich zur Referenz, verkauft werden kann.

Einen weiteren Vorteil in der Zukunft bildet die **Vereinfachung der Produktionsanlage**. Weniger Finanzierungsbedarf fördert den Aufbau von Neuanlagen. Geringere Investitionskosten bedeuten gleichzeitig auch immer, dass die Technologie auf dezentralere, kleinere Einheiten angewendet werden kann, ohne an Wirtschaftlichkeit

zu verlieren. Der Einsatz der Lipasen kann dadurch auch den Trend zu Regionalisierung stärken und damit in Zukunft Transportwege verkürzen helfen.

Mit dieser Schlussbetrachtung kann man zusammenfassend sagen, dass der Einsatz von auf Maiskolbengranulat immobilisierten Lipasen einen Beitrag zur nachhaltigen Entwicklung auf vielen Ebenen leistet:

1. Reduktion des Ökologischen Fußabdruckes (wirkt sich in Zukunft voraussichtlich noch stärker aus)
2. Verbesserung der Beiproduktqualität; weniger Abfälle im Prozess und in der Nachkette
3. Vereinfachung der Produktionsanlage und Reduktion der Investitionskosten um 20%; Verbesserung der Wirtschaftlichkeit ab einer Standzeit über 1.100h
4. einfache Rückführung der Reststoffe in Biogasanlagen oder über Kompostierung
5. Erhöhung des Einsatzes erneuerbarer Ressourcen durch den Einsatz von Maiskolbengranulat
6. Reduktion des Gefahrenpotenzials bei Störfällen durch Verringerung der „harten Chemie“ um -97%

6. Ausblick

6.1 Schlussfolgerungen

Im Rahmen des Projekts „Immobilisierung von Lipasen auf Maiskolbengranulat – Schlüsseltechnologie zur Biodieselherstellung“ konnte eine wissenschaftliche Methode entwickelt werden, die eine mögliche Alternative zur derzeitigen Biodieselherstellung darstellen könnte. Wenn die Standzeit der Lipasen erhöht werden kann, wäre es möglich, diese Methode für den großindustriellen Maßstab zu adaptieren.

Zurzeit ist der Lipasenpreis aber noch ein entscheidender Hinderungsgrund. Es ist aber zu vermuten, dass dieser in absehbarer Zeit stark sinken wird und das lipasenkatalysierte Verfahren nicht nur ökologisch sondern auch ökonomisch interessant wird. Daher ist es notwendig, die Preisentwicklung am internationalen Markt weiter intensiv zu beobachten.

Durch die Verwertung des bisher ungenutzten Reststoffes Maiskolbengranulat ergibt sich eine Chance auf Zusatzeinkommen in der Landwirtschaft. Gerade in Hinblick auf die kleinräumig strukturierte Landwirtschaft ist dies ein wichtiger Faktor für die Erhaltung wirtschaftlicher Betriebe. Diese Entwicklung könnte durch einen Aufbau von dezentralen Klein-Biodieselanlagen zusätzlich gefördert werden. Gerade der Sektor der wirtschaftlichen, dezentralen Prozesstechnik ist in den letzten Jahrzehnten in der Steiermark zurückgegangen.

Der nachhaltige Charakter der entwickelten Immobilisierungsmethode und Biodieselherstellung ist ein Faktor dafür, dass diese Prozessindustrie zukunftsfähig ist. Damit werden hochqualifizierte Arbeitsplätze in wirtschaftlich benachteiligten Gebieten geschaffen und andererseits der heimischen Anlagenbauindustrie wertvolle Impulse geboten. Ein Aufbau einer Referenzanlage als Demonstrationsprojekt wäre denkbar. Die hier vorgestellten Technologien sind zusätzlich exportierbar und bieten einen gewaltigen Wissensvorsprung. Die Zusammenstellung des Projektteams aus wissenschaftlichen und industriellen Partnern sowie Umweltexperten ist ein Garant für die bestmögliche Nutzung dieses Technologievorsprungs.

So kann eine zukunftsweisende Technologie für die Nutzung nachwachsender Rohstoffe geschaffen werden.

Eine der wesentlichen Erkenntnisse für das Projektteam war die Einschätzung und Beurteilung einer zukunftsweisenden Technologie, nämlich die Verwendung von biogenen Katalysatoren sowie deren Immobilisierung auf einem nachwachsenden Rohstoff. Enzyme werden zwar bereits in der Lebensmitteltechnologie zur Katalyse eingesetzt, bisher aber noch kaum für die Herstellung von Fettsäurealkylestern. Als limitierende Faktoren wurden der Preis und die Lebensdauer der Lipasen erkannt, während sonst keine technischen Hindernisse oder Schwierigkeiten zu erwarten sind.

Die gewonnenen Erkenntnisse können nicht sofort in eine technische Biodieselproduktion umgesetzt werden, da der Preis für die kommerziell erhältlichen Enzyme derzeit zu hoch ist. Allerdings kann eine Umsetzung sofort durchgeführt werden, wenn andere Fettsäurealkylester damit hergestellt werden, welche einen höheren Marktpreis erzielen und mit herkömmlichen Verfahren nicht hergestellt werden können. Dazu zählen z.B. Fettsäureester mit höheren oder verzweigten Alkoholen, welche ein besseres Kälteverhalten als Methylester zeigen und die z.B. aus Tierfett hergestellt werden könnten.

Die Ergebnisse des vorliegenden Projektes dienen als Grundlage für weiterführende Arbeiten für alle jene Gruppen, welche sich bereits mit biokatalytischen Verfahren beschäftigt haben. Die erfolgreiche Immobilisierung auf einem nachwachsenden Rohstoff kann einer breiten technischen Verwendung den Durchbruch verschaffen. Eine erfolgreiche technische Umsetzung wird auch zu einem Preisverfall von Lipasen führen.

6.2 Chancen, Schwierigkeiten und Risiken bei der Realisierung

Im Vergleich zu etablierten Verfahren erfordert die hier dargestellte Technologie keine höheren Investitionskosten. Prinzipiell ist die Maßstabsübertragung von experimentellen Ergebnissen nicht immer problemlos möglich. So kann es in der industriellen Anwendung zu notwendigen Veränderungen in den Immobilisierungs- oder Umesterungsparametern kommen, die noch nicht klar absehbar sind. Hiefür sollte ein Upscaling in einer Pilotanlage durchgeführt werden. Eine derartige Pilotanlage könnte in den Technikumsräumen des industriellen Partners BDI Anlagenbau Ges.m.b.H. aufgebaut werden. In einem Langzeitversuch im Pilotmaßstab kann die Lebensdauer des enzymatischen Katalysators ermittelt werden, womit auch der maximale Preis

für die Enzyme kalkuliert werden kann. Leider sind bis jetzt die Enzymfirmen noch nicht in der Lage die erforderliche Menge Enzym für eine 50.000 jato-Anlage zur Verfügung zu stellen. Dies müsste erst verhandelt werden. Ein wichtiger Schritt für eine technische Umsetzung ist die Partnerschaft mit einer Enzymfirma, die an einer gemeinsamen Entwicklung eines billigen Katalysators interessiert ist. In einer derartigen Kooperation muss an der kostengünstigen Produktion geeigneter Lipasen gearbeitet werden. Wenn eine derartige Kooperation gefunden wird, ist die Umsetzung in einer Demonstrationsanlage der nächste Schritt.

Jedoch ist klar, dass basierend auf der EU-Direktive 32/2003, derzufolge bis zum Jahr 2010 mindestens 5.75% des Energiebedarfs im Transportsektor aus nachwachsenden Rohstoffen stammen sollen, erhöhter Handlungsbedarf besteht. Insbesondere Biodiesel als der bereits am längsten bewährte alternative Kraftstoff mit der größten Akzeptanz wird in den nächsten Jahren wesentlich dazu beitragen die EU-Ziele zu erfüllen. Der hier untersuchte lipasenkatalysierte Biodieselprozess kann aufgrund seiner Neuheit ein weiterer Schritt zu noch günstigeren biogenen Treibstoffen sein. Maiskolbengranulat als nachwachsender, bisher ungenutzter Rohstoff stellt zusätzlich einen hohen Anreiz dar. Es sind keine Besorgungsengpässe bezüglich Maiskolbengranulat zu erwarten.

Die Bewertung der ökologischen Auswirkungen der neu erforschten Technologie der auf Maisgranulat immobilisierten Lipase zeigt, dass der Einsatz der Lipasen einen Beitrag zur nachhaltigen Entwicklung leistet. Die Berechnungen ergeben, dass sich der ökologische Vorteil der Lipasentechnologie gegenüber dem heutigen Referenzprozess in der nachhaltigen Zukunft sogar noch vergrößert.

Für die hier angeführten Chancen gilt, dass sie umso größer sind, je schneller der erwachsene Technologievorsprung genützt wird.

6.3 Empfehlung für weiterführende Forschung

Maiskolbengranulat hat sich als ein Trägermaterial mit ausgezeichneten adsorptiven Eigenschaften erwiesen. Lipasen können beinahe quantitativ darauf immobilisiert werden. Es bietet sich an diese umweltverträglichen Katalysatoren in sensibleren Bereichen wie etwa in der Kosmetikindustrie (Hautcremen, ...) oder Lebensmittelindustrie (Margarine, strukturierte Triglyceride für Diätöle) einzusetzen. Vor allem der

Bereich der strukturierten Triglyceride stellt für die Anwendung eines derart spezifischen Katalysators wie Lipase ein hohes Potenzial mit großer Aktualität dar.

Durch die Kombination verschiedener Lipasenstämme auf einem Trägermaterial könnten auch Produkte wie Biodiesel mit noch höherem Wirkungsgrad erzeugt werden. Es wird auch möglich sein, andere Enzyme auf Maiskolbengranulat zu immobilisieren, die auch als Katalysator in anderen Bereichen eingesetzt werden können. So wurden derart immobilisierte DNasen und RNasen bereits in der chemischen Synthese angewandt.

Weiterer Forschungsbedarf besteht in der Entwicklung spezieller Lipasen, die auf der einen Seite ideal für die Herstellung von Fettsäurealkylestern abgestimmt sind und nicht von Methanol deaktiviert werden, und die auf der anderen Seite eine hohe Lebensdauer besitzen, um sie für einen langen Einsatz verwenden zu können. Dies muß in Kooperation mit einem Enzymhersteller erfolgen, welcher auch eine langjährige Produktion dieser Enzyme mit gleich bleibender Qualität gewährleistet. Dabei könnten einfache und schnelle Screening-Verfahren eingesetzt werden, um aus einer Fülle von möglichen Enzymen verschiedenster Organismen die richtigen auszuwählen zu können. Diese könnten dann charakterisiert und biotechnologisch hergestellt werden.

6.4 Verwertung der Ergebnisse

Die Projektvorstellung und die Präsentation der Zwischenergebnisse erfolgte im Rahmen der **FdZ-Meetings** am 12. 6. 2003, 12. 10. 2004 und 9. 12. 2004 in Wien.

Zusätzlich wurden **interne Meetings** zwischen den Projektpartnern abgehalten: 8. Jänner, 3. März, 4. Mai, 6. Juli, 6. Oktober, 1. Dezember 2004 sowie am 23. Februar 2005. In diesen Treffen wurden Zwischenergebnisse präsentiert und weitere Vorgehensweisen und die Aufgabenverteilung besprochen.

Im Rahmen der Science Week 2004 in Graz wurde ein Poster mit dem Titel **„MAISterklasse- Mais als nachwachsender Rohstoff“** präsentiert.

Zusätzlich nahm Frau Uitz an dem „International Congress on Biocatalysis“ von 29. August bis 1. September 2004 in Hamburg teil, wo sie das Poster **”Production of Fatty-Acid-Methyl-Esters Catalyzed by Lipases Immobilized on Corn Cob**

Granulate” präsentiert wurde. Eine weitere Teilnahme und Posterpräsentation **“Continuous Production of Fatty Acid Alkyl Esters Catalyzed by Lipases Immobilized on Corn Cob Granulate”** erfolgte am „Enzymes in Lipid Technology“-Kongress, der von 26. bis 28. Jänner 2005 in Kopenhagen stattfand. Dabei konnten die Arbeiten bereits vorgestellt und zahlreiche internationale Kontakte geknüpft werden.

7. Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| DG | Diglyceride |
| EtOH | Ethanol |
| FFA | Freie Fettsäuren |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| GC | Gaschromatographie |
| GPC | Gelpermeationschromatographie |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HPSEC | High Performance Size Exclusion Chromatography |
| IM | Immobilisierung |
| ME | Methylester |
| MeOH | Methanol |
| MG | Monoglyceride |
| MKG | Maiskolbengranulat |
| RI | Refraktionsindex |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| TG | Triglyceride |
| UE | Umesterung |
| VE | Veresterung |
| % [m/m] | Gewichtsprozent |

7.2 Literaturverzeichnis

Aehle, W. (2004). *Enzymes in Industry*. Wiley-Vch.

Ahn, E. and M. Mittelbach. (2002) The use of waste animal fats as feedstock for the production of an environmental friendly fuel for diesel engines (Biodiesel); In: Food safety assurance in the pre-harvest phase, Vol.1, Eds.: Frans J.M. Smulders, John D. Collins. 342-345

Arroyo, M., J. M. Moreno, et al. (1993). Immobilization/stabilization on different hydroxylic supports of lipase from *Candida rugosa*. Journal of Molecular Catalysis. **83**: 261-71.

Ban, K., S. Hama, et al. (2002). Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for Biodiesel fuel production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **17**: 157-165.

Basri, M., K. Ampon, et al. (1995). Enzymatic synthesis of fatty esters by hydrophobic lipase derivatives immobilized on organic polymer beads. Journal of the American Oil Chemists' Society. **72**: 407-11.

Bastida, A., P. Sabuquillo, et al. (1998). A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. Biotechnology and Bioengineering. **58**: 486-493.

Beisson, F., A. Tiss, et al. (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. European Journal of Lipid Science and Technology. **102**: 133-153.

Berg, O. G., Y. Cajal, et al. (1998). Interfacial Activation of Triglyceride Lipase from *Thermomyces (Humicola) lanuginosa*: Kinetic Parameters and a Basis for Control of the Lid. Biochemistry. **37**: 6615-6627.

Bosley, J. A. and A. D. Peilow (1997). Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading. Journal of the American Oil Chemists' Society. **74**: 107-111.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. **72**: 248-54.

Carneiro-Da-Cunha, M. G., J. M. S. Rocha, et al. (2002). Covalent immobilization of lipase on different supports. Latin American Applied Research. **32**: 69-72.

Carraretto, C., A. Macor, et al. (2004). Biodiesel as alternative fuel: experimental analysis and energetic evaluations. Energy. **29**: 2195-2211.

Castillo, E., V. Dossat, et al. (1997). The role of silica gel in lipase-catalyzed esterification reactions of high-polar substrates. Journal of the American Oil Chemists' Society. **74**: 77-85.

Chahinian, H., V. Belle, et al. (2003). The role of pancreatic lipase C2-like domain in enzyme interaction with a lipid-water interface. European Journal of Lipid Science and Technology. **105**: 590-600.

Chang, M.-Y. and R.-S. Juang (2005). Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. Enzyme and Microbial Technology. **36**: 75-82.

Charusheela, A. and L. Arvind (2002). Enzyme catalyzed hydrolysis of esters using reversibly soluble polymer conjugated lipases. Enzyme and Microbial Technology. **30**: 19-25.

Chauhan, G. S., S. Mahajan, et al. (2004). Immobilization of lipase on hydrogels: Structural aspects of polymeric matrices as determinants of enzyme activity in different physical environments. Journal of Applied Polymer Science. **92**: 3135-3143.

Cheetham, P. S. J. (1998). "What makes a good biocatalyst?" Journal of Biotechnology **66**: 3-10.

Chen, J.-W. and W.-T. Wu (2003). Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. Journal of Bioscience and Bioengineering. **95**: 466-469.

Chua, L. S. and M. R. Sarmidi (2004). Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **28**: 111-119.

Crooks, G. E., G. D. Rees, et al. (1995). Comparison of hydrolysis and esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-stabilized water-in-oil microemulsions: I. Effect of pH and water content of reaction kinetics. Biotechnology and Bioengineering. **48**: 78-88.

Crooks, G. E., G. D. Rees, et al. (1995). Comparison of hydrolysis and esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-stabilized water-in-oil microemulsions: II. Effect of Temperature on reaction kinetics and general considerations of stability and productivity. Biotechnology and Bioengineering. **48**: 190-196.

Derewenda, U., A. M. Brzozowski, et al. (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. Biochemistry. **31**: 1532-41.

Dominguez De Maria, P. and J. V. Sinisterra Gago (1999). Causes of unreproducibility of *C. rugosa* lipase-catalyzed reactions in slightly hydrated organic media. Tetrahedron. **55**: 8555-8566.

Dossat, V., D. Combes, et al. (1999). Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. Enzyme and Microbial Technology. **25**: 194-200.

Du, W., Y. Xu, et al. (2004). Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for Biodiesel production with different acyl acceptors. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **30**: 125-129.

Dumitriu, S. and E. Chornet (1998). Polysaccharides. Structural Diversity and Functional Versatility. New York, Marcel Dekker.

Fernandez-Lorente, G., J. M. Palomo, et al. (2003). Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. Biotechnology and Bioengineering. **82**: 232-237.

Ferrer, M., F. J. Plou, et al. (2002). Effect of the immobilization method of lipase from *thermomycetes lanuginosus* on sucrose acylation. Biocatalysis and Biotransformation. **20**: 63-71.

Foglia, T. A., L. A. Nelson, et al. (1998). Production of Biodiesel, lubricants and fuel and lubricant additives. U.S. 94. US, (United States Dept. of the Army, USA). 8 pp.

Foresti, M. L. and M. L. Ferreira (2004). Computational Approach to Solvent-Free Synthesis of Ethyl Oleate Using *Candida rugosa* and *Candida antarctica* B Lipases. I. Interfacial Activation and Substrate (Ethanol, Oleic Acid) Adsorption. Biomacromolecules. **5**: 2366-2375.

Flores, M. V., J. J. W. Sewalt, et al. (2000). The nature of fatty acid modifies the equilibrium position in the esterification catalyzed by lipase. Biotechnology and Bioengineering. **67**: 364-371.

Fukuda, H., A. Kondo, et al. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering. **92**: 405-416.

Gandhi, N. N. (1997). Applications of lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society. **74**: 621-634.

Geluk, M. A., W. Norde, et al. (1992). Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on cellulose and its influence on lipolytic activity. Enzyme and Microbial Technology. **14**: 748-54.

- Gitlesen, T., M. Bauer, et al. (1997). Adsorption of lipase on polypropylene powder. Biochimica et Biophysica Acta. **1345**: 188-196.
- Hama, S., H. Yamaji, et al. (2004). Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for Biodiesel fuel production. Biochemical Engineering Journal. **21**: 155-160.
- Hills, G. (2003). Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. European Journal of Lipid Science and Technology. **105**: 601-607.
- Hilal, N., R. Nigmatullin, et al. (2004). Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes. Journal of Membrane Science. **238**: 131-141.
- Houde, A., A. Kademi, et al. (2004). Lipases and their industrial applications. An overview. Applied Biochemistry and Biotechnology. **118**: 155-170.
- Iso, M., B. Chen, et al. (2001). Production of Biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **16**: 53-58.
- Jaeger, K.-E. and T. Eggert (2002). Lipases for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. **13**: 390-397.
- Kaieda, M., T. Samukawa, et al. (2001). Effect of methanol and water contents on production of Biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. Journal of Bioscience and Bioengineering. **91**: 12-15.
- Kaieda, M., T. Samukawa, et al. (1999). Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. Journal of Bioscience and Bioengineering. **88**: 627-631.
- Kambourova, M., N. Kirilova, et al. (2003). Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC7. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **22**: 307-313.
- Karlson, P., D. Doenecke, et al. (1994). Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Auflage. Wiley-Vch.
- Köse, O., M. Tuter, et al. (2002). Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. Bioresource technology. **83**: 125-9.

Knothe G. (2002). Current perspectives on Biodiesel. INFORM-International News on Fats, Oils and Related Materials. **12**. 461-474.

Krahl, J. K. Prieger, A. Munack, and J. Bünger. (1996). Übersicht über Emissionen von Rapsölkraftstoffen und deren Umweltauswirkungen. VDI-Bericht Nr. 1297. Düsseldorf: VDI-Verlag.

Krotscheck, C., R. Nievoll, et al. (2003). Gewinnung von adsorptiven Produkten aus Maisreststoffen. Endbericht. Fabrik der Zukunft. Feldbach, Steirisches Vulkanland Regionalentwicklung GmbH.

Krotscheck, C., M. Narodslawsky. (1996). The Sustainable Process Index - A new Dimension in Ecological Evaluation - Ecological Engineering. **6/4**. 241-258

Krotscheck, C., I. Obernberger, F. König. (2000). Ecological assessment of integrated bioenergy systems using the Sustainable Process Index. Biomass and Bioenergy **18**. 341-368

Krotscheck, C., B. Resch, R. Santner, E. Wogroly et al. (2002). Pflanzenölmotoren unterschiedlicher Leistungsklassen für stationäre Anwendungen in der Steiermark, Teil 1 (POEM 1). Endbericht des Ökocluster Oststeiermark im Auftrag der Steirischen Landesregierung, Abteilung Wissenschaft und Forschung, Weiz-Graz

Lee, C.-H. and K. L. Parkin (2001). Effect of water activity and immobilization on fatty acid selectivity for esterification reactions mediated by lipases. Biotechnology and Bioengineering. **75**: 219-227.

Levenspiel, O. (1999). Chemical Reaction Engineering, 3rd Edition. New York, John Wiley & Sons.

Linko, Y. Y., M. Lamsa, et al. (1995). Lipase biocatalysis in the production of esters. Journal of the American Oil Chemists' Society. **72**: 1293-9.

Linko, Y. Y., M. Lamsa, et al. (1998). Biodegradable products by lipase biocatalysis. Journal of biotechnology. **66**: 41-50.

Ma, F. and M. A. Hanna (1999). Biodiesel production: a review. Bioresource Technology. **70**: 1-15.

Malcata, F. X., H. R. Reyes, et al. (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. Enzyme and Microbial Technology. **14**: 426-46.

Martinez, M. C., J. M. Sanchez-Montero, et al. (1990). New insolubilized derivatives of ribonuclease and endonuclease for elimination of nucleic acids in single cell protein concentrates. Biotechnology and Applied Biochemistry. **12**: 643-52.

Melius, P. and B.-C. Wang (1974). Immobilization of lipase to cyanogen bromide activated polysaccharide carriers. Advances in Experimental Medicine and Biology. **42**: 339-43.

Mezzetti, A., C. Keith, et al. (2003). Highly enantioselective kinetic resolution of primary alcohols of the type Ph-X-CH(CH₃)-CH₂OH by *Pseudomonas cepacia* lipase: effect of acyl chain length and solvent. Tetrahedron: Asymmetry. **14**: 3917-3924.

Mittelbach, M. (1990). Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. **67**: 168-70.

Mittelbach, M. and C. Remschmidt. (2004). Biodiesel. A comprehensive handbook.

Mittelbach M., M. Wörgetter, J. Pernkopf and H. Junek. (1983) Diesel Fuel Derived from Vegetable Oils: Preparation and Use of Rape Oil Methyl Ester. Energy in Agriculture **2**, 369-384.

Mohapatra, S. C. and J. T. Hsu (1997). Lipase kinetics in organic-water solvent with amphipathic substrate for chiral reaction. Biotechnology and Bioengineering. **55**: 399-407.

Moreno, J. M., J. M. Sanchez-Montero, et al. (1991). Hydrolysis of nucleic acids in single-cell protein concentrates using immobilized benzonase. Applied Biochemistry and Biotechnology. **31**: 43-51.

Mustranta, A., P. Forssell, et al. (1993). Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in non aqueous systems. Enzyme and Microbial Technology. **15**: 133-9.

Negishi, S., Y. Arai, et al. (2005). Efficient process for producing symmetrical triglyceride. PCT Int. Appl. WO, 40 pp.

Nelson, D., M. Cox. Lehninger Biochemie. (2001). 3. Auflage. Springer.

Nelson, L. A., T. A. Foglia, et al. (1996). Lipase-catalyzed production of Biodiesel. Journal of the American Oil Chemists' Society. **73**: 1191-1195.

Osterberg, E., A. C. Blomstrom, et al. (1989). Lipase catalyzed transesterification of unsaturated lipids in a microemulsion. Journal of the American Oil Chemists' Society. **66**: 1330-5.

Paiva, A. L., V. M. Balcao, et al. (2000). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. Enzyme and Microbial Technology. **27**: 187-204.

Palomo, J. M., C. Ortiz, et al. (2005). Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. Enzyme and Microbial Technology. **36**: 447-454.

- Palomo, J. M., R. L. Segura, et al. (2004). Purification, Immobilization, and Stabilization of a Lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by Interfacial Adsorption on Hydrophobic Supports. Biotechnology Progress. **20**: 630-635.
- Palomo, J. M., R. L. Segura, et al. (2005). Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution. Tetrahedron: Asymmetry. **16**: 869-874.
- Persson, M., I. Mladenoska, et al. (2002). Preparation of lipases for use in organic solvents. Enzyme and Microbial Technology. **31**: 833-841.
- Powlson, D. S., et al. (2005). Biofuels and other approaches for decreasing fossil fuel emissions from agriculture. Annals of Applied Biology. **146**. 193-2001.
- Reetz, M. T., A. Zonta, et al. (1996). Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. Biotechnology and Bioengineering. **49**: 527-34.
- Rudolph, V. and Y. He. (2004). Research and development trends in Biodiesel. Developments in Chemical Engineering and Mineral Processing, **12**. 461-474.
- Sanchez-Montero, J. M. and J. V. Sinisterra (1993). Immobilization of nucleases on corn cob. Journal of Molecular Catalysis. **84**: 391-8.
- Sanchez-Montero, J. M., J. V. Sinisterra, et al. (1989). DNase activity of micrococcal endonuclease insolubilized on corn cob. Applied Biochemistry and Biotechnology. **22**: 205-14.
- Segura, R. L., J. M. Palomo, et al. (2004). Different Properties of the Lipases Contained in Porcine Pancreatic Lipase Extracts as Enantioselective Biocatalysts. Biotechnology Progress. **20**: 825-829.
- Selmi, B., E. Gontier, et al. (1997). Enzymic synthesis of tricaprylin in a solvent-free system: lipase regiospecificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel. Biotechnology Techniques. **11**: 543-547.
- Selmi, B. and D. Thomas (1998). Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. Journal of the American Oil Chemists' Society. **75**: 691-695.
- Shah, S., S. Sharma, et al. (2003). Enzymatic transesterification for Biodiesel production. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics. **40**: 392-399.

Shah, S., S. Sharma, et al. (2004). Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of Jatropha Oil. Energy & Fuels. **18**: 154-159.

Shaw, J. F., D. L. Wang, et al. (1991). Lipase-catalyzed ethanolysis and isopropanolysis of triglycerides with long-chain fatty acids. Enzyme and Microbial Technology. **13**: 544-6.

Shimada, Y., Y. Watanabe, et al. (2002). Enzymatic alcoholysis for Biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **17**: 133-142.

Soumanou, M. M. and U. T. Bornscheuer (2003). Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. Enzyme and Microbial Technology. **33**: 97-103.

Turner, N. A. V., E. N. (2000). "At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?" Enzyme and Microbial Technology. 27(1-2): 108-113.

Villeneuve, P. (2003). Plant lipases and their applications in oils and fats modification. European Journal of Lipid Science and Technology. **105**: 308-317.

Villeneuve, P., J. M. Muderhwa, et al. (2000). Customizing lipases for biocatalysis. A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic. **9**, 113-148.

Watanabe, Y., Y. Shimada, et al. (2002). Conversion of degummed soybean oil to Biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **17**: 151-155.

Watanabe Y., Shimada, A. Sugihara, Y. Tominaga. (2001) Enzymatic Conversion of Waste Edible Oil to Biodiesel Fuel in a Fixed-Bed Bioreactor, Journal of the American Oil Chemists' Society **78** (7), 703-707.

Wu, H.-S. and M.-J. Tsai (2004). Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. Enzyme and Microbial Technology. **35**: 488-493.

Wu, W.-H, T. A. Foglia et al. (1998). Low-temperature property and engine performance evaluation of ethyl and isopropyl esters of tallow and grease. Journal of the American Oil Chemist's Society, **75**, 1173-1178.

Wu, X. Y., S. Jaskelainen, et al. (1996). An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. Enzyme and Microbial Technology. **19**: 226-231.

Xi, W.-W. and J.-H. Xu (2005). Preparation of enantiopure (S)-ketoprofen by immobilized *Candida rugosa* lipase in packed bed reactor. Process Biochemistry. **40**: 2161-2166.

Xu, X. (2003). Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. European Journal of Lipid Science and Technology. **105**: 289-304.

Xu, Y., W. Du, et al. (2003). A novel enzymatic route for Biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. Biotechnology Letters. **25**: 1239-1241.

Yahya, A. R. M., W. A. Anderson, et al. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. Enzyme and Microbial Technology. **23**: 438-450.

Yesiloglu, Y. (2004). Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. **81**: 157-160.

Yesiloglu, Y. (2005). Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. Process Biochemistry. **40**: 2155-2159.

Zaks, A. and A. M. Klivanov (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **82**: 3192-6.

Zhu, S., Y. Wu, et al. (2005). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on a pH-sensitive support for enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. Journal of biotechnology **116**: 397-401.

Internetquellen

¹www.itb.uni-stuttgart.de

²www.bioeng.ucsd.edu

³www.ismatec.de

7.3 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Struktur einer Lipase..... | 16 |
| Abbildung 2: Geschlossene, inaktive Form (links) und offene, aktive Form (rechts) von <i>Rhizomucor miehei</i> . ² | 22 |
| Abbildung 4: Reaktionsschema der Umesterung und Veresterung von Triglyceriden mit Alkohol..... | 24 |
| Abbildung 5: Maiskolbengranulat..... | 29 |
| Abbildung 6: Cellulose | 29 |
| Abbildung 7: Umesterung am Laborschüttler..... | 37 |
| Abbildung 8: Screening Immobilisierungsmethoden mit Lipase P (links) und H (rechts); verbleibender Triglyceridgehalt | 40 |
| Abbildung 9: Screening Immobilisierungsmethoden mit Lipase J; verbleibender Triglyceridgehalt; | 40 |
| Abbildung 10: Wiederholter Einsatz von immobilisierten Enzymen | 41 |
| Abbildung 11: Kalibrationskurve für Lipase H mittels Bradford-Proteingehaltsbestimmung | 43 |
| Abbildung 12: Immobilisierungsgrad der Methoden G, L und N | 43 |
| Abbildung 13: Mühle und Fraktionen des Maiskolbengranulats..... | 45 |
| Abbildung 14: Maiskolbengranulatfraktionen; Methylestergehalt für Lipase H..... | 45 |
| Abbildung 15: ME-Ausbeute bei verschiedenen Immobilisierungsbedingungen | 46 |
| Abbildung 16: ME-Ausbeute bei der UE mit Lipase H und J bei verschiedenen Temperaturen | 49 |
| Abbildung 17: ME-Ausbeute bei der Variation der Öl-Methanol-Verhältnisse | 50 |
| Abbildung 18: EE-Ausbeute bei der Variation des Öl-EtOH-Verhältnisses..... | 51 |
| Abbildung 19: ME-Ausbeuten bei der UE mit verschiedenen Lipasenmengen..... | 52 |
| Abbildung 20: ME- und EE-Ausbeuten der UE mit HP- und WG-Lipasen | 53 |
| Abbildung 21: UE nach 5h mit verschiedenen Alkoholen bei 50% (links) und 40% (rechts) ROH-Überschuss | 54 |
| Abbildung 22: Reaktionsverlauf mit der Zeit | 55 |
| Abbildung 23: Umesterung von Rindertalg mit Methanol bzw. Ethanol | 58 |
| Abbildung 24: Umesterung von Rapsöl mit 9.3% FFA mit Methanol bzw. Ethanol... .. | 58 |
| Abbildung 25: Regenerierungsversuche..... | 59 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 26: Umesterung mit verschiedenen Formulierungen der Lipase H..... | 61 |
| Abbildung 27: Strukturformel der Ölsäure..... | 62 |
| Abbildung 28: Veresterung von Ölsäure mit unterschiedlichen Fettsäure-Alkohol- Verhältnissen..... | 63 |
| Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Veresterungsreaktion..... | 64 |
| Abbildung 30: Abnahme der freien Fettsäuren bzw. Zunahme der Alkylester in der Veresterungsreaktion über die Zeit..... | 65 |
| Abbildung 32: Aufbau ohne Heizbad | 68 |
| Abbildung 33: Diagramm: Abnahme der Triglyceridkonzentration im Schlaufenreaktor; Theoretische Voraussage (links), experimentelle Werte (rechts) | 69 |
| Abbildung 34: GC-FID; HP 6890 GC-System..... | 70 |
| Abbildung 35: Rohrreaktor..... | 71 |
| Abbildung 36: Kontinuierliches Verfahren 1-4; Vergleich der Lipase H aus Formulierung 1 und 3; | 73 |
| Abbildung 37: Umesterungen mit unterschiedlichen TG:ROH-Verhältnissen..... | 74 |
| Abbildung 38: Lage der Säule, 20% Überschuss Methanol (links), kein Überschuss Methanol (rechts)..... | 74 |
| Abbildung 39: Variieren der Verweilzeit..... | 75 |
| Abbildung 40: Erhöhung des Lipasengehalts und der Verweilzeit..... | 76 |
| Abbildung 41: Wiederholtes Einspeisen, 1Mol TG: 1Mol MeOH..... | 76 |
| Abbildung 42: Kontinuierliche Umesterung mit verschiedenen Alkoholen | 77 |
| Abbildung 43: Umesterung im Rohrreaktor katalysiert mit Lipase H in Formulierung 1 | 78 |
| Abbildung 44: Konzentrationsverlauf der FFA und TG bei UE der Realprobe..... | 79 |
| Abbildung 45: Wiederholtes Einspeisen einer Mischfraktion | 80 |
| Abbildung 46: Wiederholtes Einspeisen in Kontin. 30, 31 und 33..... | 80 |
| Abbildung 47: Chromatogramm der Diglyceridverteilung der Mischfraktion 33 | 81 |
| Abbildung 48: Verlauf des Methylestergehalts bei UE mit Lipase H und U | 82 |
| Abbildung 49: Verlauf des Monoglyceridgehalts bei UE mit Lipase H und U..... | 83 |
| Abbildung 50: Vergleich der Mischfraktionen der kontinuierlichen Prozesse 33 (Ausgang) und 42 | 84 |
| Abbildung 51: <i>iso</i> -Propanol als Regenerierungsmittel | 85 |
| Abbildung 52: Veresterung mit Methanol, Ethanol und <i>iso</i> -Propanol..... | 86 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 53: Vereinfachtes Verfahrensfliessbild des KOH-Verfahrens von BDI Anlagenbau GmbH | 92 |
| Abbildung 54: Sankey-Diagramm (vereinfacht) des KOH-Verfahrens von BDI Anlagenbau GmbH | 93 |
| Abbildung 55: Vereinfachtes Verfahrensfliessbild des Lipasen-Verfahrens zur Biodieselherstellung | 97 |
| Abbildung 56: Sankey-Diagramm (vereinfacht) des Lipasenverfahrens zur Biodieselherstellung | 99 |
| Abbildung 57: Return of Investment des Lipasen-Verfahrens in Abhängigkeit von den Kosten der Enzymlösung; Annahme: Standzeit des Biokatalysators 1.700 h..... | 103 |
| Abbildung 58: Return of Investment des Lipasen-Verfahrens in Abhängigkeit von der Standzeit des Biokatalysators; Dargestellt für unterschiedliche Preise der Enzymlösung: 1€/kg, 5€/kg, 10€/kg | 103 |
| Abbildung 59: Der SPI der Nutzung von Pflanzenöl in Treibstoffen (Schema) | 108 |
| Abbildung 60: Reduktion des SPI per kg Biodiesel-Produkt durch verschiedene Maßnahmen | 121 |
| Abbildung 61: SPI per kg Biodiesel-Produkt bei verschiedenen Prozessen nach Kategorie (im Balken Rohstoffe werden die Beiprodukte subtrahiert dargestellt) ... | 125 |
| Abbildung 62: SPI per kg Biodiesel-Produkt bei verschiedenen Prozessen nach Kategorie (im Balken Rohstoffe werden die Beiprodukte subtrahiert dargestellt) ... | 125 |

7.4 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Auswahl einiger lipasen-katalysierter Umesterungsreaktionen; Prozentangaben beziehen sich auf die Masse des Triglycerids | 25 |
| Tabelle 2: Screening der Lipasen; Methylestergehalt (ME) | 33 |
| Tabelle 3: Übersicht Immobilisierungsmethoden | 36 |
| Tabelle 4: Screening Immobilisierungsmethoden mit Lipase P - ₁ : Das immobilisierte Enzym wird für einen zweiten Zyklus erneut als Katalysator eingesetzt. a) Triglycerid; b) Diglycerid; c) Monoglycerid; d) freie Fettsäuren; e) Methylester..... | 38 |
| Tabelle 5: Kostenstruktur des Referenzprozesses Stand der Technik (Übersicht)... | 91 |
| Tabelle 6: Angefragte Lipasen bei Enzymfirmen mit Vertretung in Europa | 95 |
| Tabelle 7: Übersicht über die Gesamtinvestition – aufgeschlüsselt nach Baugruppen – und die laufenden Betriebskosten der beiden Biodiesel-Verfahren; BDI-Verfahren: Basis mit jeweils 100% bewertet | 99 |
| Tabelle 8: Tabellarische Übersicht des Return of Investment ROI (in %) – abhängig vom Enzympreis (in [€/kg]) und der Standzeit des Biokatalysators (in [h]); Annahme: Break even des Lipasen-Verfahrens für Enzymkosten von ca. 10 €/kg bei ca. 1.700 h Standzeit..... | 101 |
| Tabelle 9: Kostenstruktur des Referenzprozesses unter Einsatz von Lipasen (Übersicht, Standzeit 200h) | 102 |
| Tabelle 10: Benötigte Kostenstruktur des Prozesses unter Einsatz von Lipasen (Standzeit 640h bzw. 1.100h) | 104 |
| Tabelle 11: Kostenstruktur der bestehenden und neu entwickelten Prozesse im Vergleich..... | 104 |
| Tabelle 12: Der SPI der Pflanzenölproduktion in Österreich (Landwirtschaft, Ölpresse) | 113 |
| Tabelle 13: Bewertung der Sachbilanz der Biodieselherstellung mittels SPI für den Prozess „SdT 02“ | 114 |
| Tabelle 14: Beispiel der detaillierten Sachbilanzbewertung mittels SPI (SdT 02), Teilausschnitt Output..... | 115 |
| Tabelle 15: Genauigkeit..... | 116 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 16: SPI Bewertung der Biodieselherstellung für den Referenzprozess 2003 (Überblick) | 116 |
| Tabelle 17: SPI Bewertung der Sachbilanz „Biodieselherstellung“ mit alternativen Treibstoffen und Energieträger in der Vorkette (Szenario „öko Trbst.“) | 118 |
| Tabelle 18: SPI Bewertung der Sachbilanz „Biodieselherstellung“ zusätzlich mit regenerativem Methanol (Szenario „öko MeOH“) | 118 |
| Tabelle 19: Zusammenfassung SPI Bewertung unter Erhöhung des sekundären Pflanzenöl-Rohstoffes auf 90% (Ausnutzung aller wesentlichen Optimierungspotenziale, Szenario „10% nativ“)..... | 119 |
| Tabelle 20: Zusammenfassung verschiedener Szenarien (SdT – Stand der Technik 02, Referenz 100% Rec.) kumuliert – die Szenarien bauen aufeinander auf | 120 |
| Tabelle 21: SPI Bewertung der Biodieselherstellung unter immobilisierter Lipasen (Referenzprozess, Standzeit 200h) | 122 |
| Tabelle 22: SPI Bewertung der Biodieselherstellung unter immobilisierter Lipasen (Referenzprozess, Standzeit 200h) | 122 |
| Tabelle 23: Unterschied Maiskolbengranulat-Polyethylen | 123 |