

Prozessentwicklung zur
biotechnologischen Produktion von
Acrolein aus Nebenprodukten der
Bioethanolherstellung

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von
Sebastian Oehmke

aus
Berlin

Hamburg 2014

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Martin Kaltschmitt

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. An-Ping Zeng

2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Irina Smirnova

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit entstand während meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik der Technischen Universität Hamburg-Harburg. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. An-Ping Zeng für die Betreuung der Dissertation und die Möglichkeit an diesem Thema zu arbeiten. Die vielen Freiräume trotz hoher Anforderungen, sowie die immer vorhandene Möglichkeit zum fachlichen Austausch haben entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr.-Ing. Irina Smirnova für das Zweitgutachten und Prof. Dr.-Ing. Martin Kaltschmitt für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Bioprozess- und Biosystemtechnik, des Instituts für Technische Biokatalyse sowie des Instituts für Thermische Verfahrenstechnik für ihre Unterstützung, eine hervorragende Arbeitsatmosphäre und für anregende Diskussionen. Besonders möchte ich mich bei Niels Dankert, Jonasz Gradkowski und Max Kschowak bedanken, deren Diplom- beziehungsweise Masterarbeiten ich betreut habe.

Den Firmen CropEnergies AG und N.prior energy GmbH (ehemals Prokon Nord Energiesysteme GmbH) danke ich für die Überlassung von Versuchsmaterial.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meiner Frau Jeannette für ihre Unterstützung und ihre außerordentliche Geduld.

Vielen Dank auch an meine Familie und Freunde, die mich durch meine Promotionszeit begleitet haben.

Abstract

Since fossil resources are of limited availability, chemicals from renewable resources become more interesting for scientists and the industry. Promising platform chemicals include 3-hydroxypropionaldehyde and its anhydride acrolein. However, existing approaches are not sufficient for an economic production in industrial scale. Therefore, it was examined in this thesis how far stillage, a glycerol containing byproduct of the bioethanol production process, can be used for the 3-hydroxypropionaldehyde/ acrolein production and how far this production can be integrated into the bioethanol process according to the biorefinery concept to solve existing problems and to reduce production costs. Calculations as well as batchwise and continuous experiments were carried out in 5 ml to 2 l scale in the area of biocatalyst production, biotransformation, purification and cost estimation. The whole cell biocatalyst *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 is not able to use the yeast cells from bioethanol production residues for its growth. However, it has been shown that it does not need all the nutrients in MRS medium and yeast extract is sufficient as the only source of amino acids and vitamins for its growth and enzyme production. The 3-HPA production in bioethanol production residues is 68 % higher than in a comparable aqueous glycerol solution under the same conditions and it requires less biocatalyst. A combination of dehydration and simple distillation is suitable to convert 3-hydroxypropionaldehyde into acrolein and separate it from the biotransformation broth at 37 ° C. 105±8 g/l acrolein in aqueous solution were obtained in high purity. The cost estimation of a possible process has shown that the calculated cost for acrolein can likely catch up with production costs from crude oil in the near future with appropriate optimization. Hence it was shown that basing the process on stillage from the bioethanol process can improve the biotechnological production of 3-hydroxypropionaldehyde/ acrolein from renewable resources.

3-Hydroxypropionaldehyde, Platform chemical, Biotransformation, Biorefinery, Bioethanol

Zusammenfassung

Da fossile Quellen endlich sind, werden Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen immer interessanter für die Forschung und Industrie. Zu den vielversprechenden Plattformchemikalien gehört das Stoffpaar 3-Hydroxypropionaldehyd/ Acrolein. Jedoch sind bisherige Ansätze für eine wirtschaftliche Produktion von 3-Hydroxypropionaldehyd/ Acrolein im industriellen Maßstab nicht ausreichend. Deshalb wurde in dieser Arbeit geprüft, inwieweit sich Schlempe, ein glycerinhaltiges Nebenprodukt der Bioethanolherstellung, zur 3-Hydroxypropionaldehyd/ Acrolein Produktion nutzen lässt und inwieweit diese Produktion in den Bioethanolprozess im Sinne des Bioraffineriekonzeptes integriert werden kann, um bestehende Probleme zu lösen und Produktionskosten zu reduzieren. Dazu wurden ansatzweise und kontinuierliche Versuche im 5 ml bis 2 l Maßstab sowie Berechnungen in den Bereichen Biokatalysatorproduktion, Biotransformation, Aufreinigung und Kostenschätzung durchgeführt. Der Ganzzellbiokatalysator *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 ist nicht in der Lage die Hefezellen aus Bioethanolproduktionsrückständen für sein Wachstum zu nutzen, jedoch hat sich gezeigt, dass er nicht alle Nährstoffe im MRS Medium benötigt und Hefeextrakt als einzige Quelle von Aminosäuren und Vitaminen für sein Wachstum und seine Enzymproduktion ausreichend ist. Die 3-HPA Produktion ist in Bioethanolproduktionsrückständen 68% höher als in einer vergleichbaren Glycerinlösung bei gleichen Bedingungen und es wird weniger Biokatalysator benötigt. Eine Kombination aus Dehydratisierung und einfacher Destillation ist geeignet, um das 3-Hydroxypropionaldehyd simultan in Acrolein umzuwandeln und aus der Biotransformationsbrühe bei 37°C abzutrennen, wodurch 105 ± 8 g/l Acrolein in Wasser mit hoher Reinheit gewonnen werden können. Die Kostenschätzung eines möglichen Prozesses hat gezeigt, dass die ermittelten Kosten des Acroleins in einer Größenordnung liegen, welche zeigt, dass der angedachte Prozess bei entsprechender Optimierung in naher Zukunft zu den Produktionskosten aus Rohölderivaten aufschließen kann. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich eine Anlehnung an den Bioethanolprozess nutzen lässt, um die biotechnologische Produktion von 3-Hydroxypropionaldehyd/ Acrolein aus nachwachsenden Rohstoffen zu verbessern.

3-Hydroxypropionaldehyd, Plattformchemikalie, Biotransformation, Bioraffinerie, Bioethanol

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Stand der Forschung	7
2.1	Der Bioethanol-Prozess	7
2.2	Milchsäurebakterien	10
2.2.1	Lactobacillus reuteri	11
2.3	Glycerin	13
2.4	3-Hydroxypropionaldehyd und Acrolein	14
2.4.1	Acrolein	15
2.4.2	3-HPA	17
2.5	Chemische Verfahren zur Herstellung von 3-HPA und Acrolein	19
2.6	Biologische Verfahren zur Herstellung von 3-HPA und Acrolein	21
2.7	Verfahren zur Aufreinigung von 3-HPA und Acrolein	25
3	Ziele und Aufgabenstellung	29
3.1	Ziele	30
3.2	Hypothesen	31
3.2.1	Biokatalysatorproduktion	31
3.2.2	Biotransformation	31
3.2.3	Aufreinigung	32
3.2.4	Kostenschätzung	32
3.3	Aufgaben	32
3.3.1	Biokatalysatorproduktion	32
3.3.2	Biotransformation	33
3.3.3	Aufreinigung	34
3.3.4	Kostenschätzung	34

4	Biokatalysatorproduktion	35
4.1	Einleitung	35
4.2	Materialien und Methoden	36
4.2.1	Ausgangsmaterialien und Mediovorbereitung	36
4.2.2	Stamm und Stammhaltung	36
4.2.3	Kultivierung in Anaerobflaschen	37
4.2.4	Kultivierung im Fermenter	37
4.2.5	Metabolitenquantifizierung	38
4.2.6	Quantifizierung der Biomasse	39
4.2.7	GDHt Aktivitäts-Assay	40
4.3	Ergebnisse	40
4.3.1	Nährstoffreduktion	41
4.3.2	Glycerineinfluss	42
4.3.3	Ersetzen von Extrakten durch Schlempe	44
4.3.4	Wachstum mit Ethanol	49
4.3.5	Vereinfachung des Produktionsprozesses	50
4.3.6	Steigerung der Ausbeute	52
4.4	Diskussion	54
4.4.1	Nährstoffreduktion	54
4.4.2	Glycerineinfluss	56
4.4.3	Ersetzen von Extrakten durch Schlempe	57
4.4.4	Wachstum mit Ethanol	59
4.4.5	Vereinfachung des Produktionsprozesses	60
4.4.6	Steigerung der Ausbeute	61
5	Biotransformation	63
5.1	Einleitung	63
5.2	Material und Methoden	64
5.2.1	Ausgangsmaterialien und Mediovorbereitung	64
5.2.2	Stamm und Stammhaltung	64
5.2.3	Biokatalysatorproduktion	64
5.2.4	Biotransformation	65
5.2.5	Metabolitenquantifizierung	65
5.2.6	GDHt Aktivitäts-Assay	66
5.3	Ergebnisse	66

5.3.1	Transformation in verschiedenen Medien	66
5.3.2	Transformation bei verschiedenen Bedingungen	66
5.3.3	Transformation in Anwesenheit von Ethanol	74
5.4	Diskussion	77
5.4.1	Transformation in verschiedenen Medien	77
5.4.2	Transformation bei verschiedenen Bedingungen	78
5.4.3	Transformation in Anwesenheit von Ethanol	82
6	Aufreinigung	85
6.1	Einleitung	85
6.2	Material und Methoden	87
6.2.1	Ausgangsmaterialien und Medientvorbereitung	87
6.2.2	Stamm und Stammhaltung	88
6.2.3	3-HPA Produktion mit Semicarbazid	88
6.2.4	Spaltung des 3-HPA-Semicarbazid Addukts	88
6.2.5	3-HPA Produktion ohne Aldehydfänger	89
6.2.6	Bindung von 3-HPA in einer zweiten fl. Phase	90
6.2.7	Bestimmung der Dehydratisierungskinetik	90
6.2.8	Reaktivdestillation	93
6.2.9	Reaktivstripping	94
6.2.10	Quantifizierung	95
6.3	Ergebnisse	95
6.3.1	Alternative Verfahren	95
6.3.2	Dehydratisierung	97
6.3.3	Destillation	106
6.3.4	Stripping	106
6.4	Diskussion	108
6.4.1	Alternative Verfahren	108
6.4.2	Dehydratisierung	110
6.4.3	Destillation	113
6.4.4	Stripping	114
7	Kostenschätzung	117
7.1	Einleitung	117
7.2	Material und Methoden	119

7.2.1	Auslegung	119
7.2.2	Kostenermittlung	134
7.2.3	Sensitivitätsanalyse	136
7.3	Ergebnisse	136
7.3.1	Auslegung	136
7.3.2	Kostenermittlung	142
7.3.3	Sensitivitätsanalyse	145
7.4	Diskussion	149
7.4.1	Auslegung	149
7.4.2	Kostenermittlung	152
7.4.3	Sensitivitätsanalyse	153
8	Abschließende Zusammenfassung und Ausblick	157
	Literaturverzeichnis	160

Abbildungsverzeichnis

1.1	Durchschnittliche Rohölimportkosten für Deutschland (×), Japan (△) und die USA (◇) zwischen 1992 -2011 ([Int12])	1
1.2	Nutzung von 3-HPA und Acrolein als Plattformchemikalien und eine Auswahl an Anwendungsmöglichkeiten	3
2.1	Allgemeine Darstellung eines Bioethanolprozesses ([Cro11b], [Cro11a], [Kal01])	7
2.2	Stoffwechselwege von Lactobacilli sp. ([ZERU06], [LPDP02])	12
2.3	Europäische Preise für 99,7% Reinstglycerin zwischen 1981 und 2007 ([ABG07])	14
2.4	Chemische Struktur von 3-HPA und Acrolein	15
2.5	Allgemeine Reaktionen aliphatischer Aldehyde ([FBH+83])	16
2.6	Konzentrationsabhängige Verteilung des 3-HPA Systems (3-HPA (×), HPA-Hydrat (△), HPA-Dimer (◇) und Andere (□)) in wässriger Lösung bei 20°C ([VL04])	18
2.7	Etablierte chemische (–) und biologische (––) Reaktionen rund um Acrolein und 3-HPA ([BMM+03], [BMS+06], [AS94], [AKP+05], [AW93], [Eur00a], [ZLC08], [KHS08], [HBM+00][Rap08b], [ZB02], [Ste05], [GSJ+09], [Bes00], [FT08]),	20
4.1	Biotrockenmasse von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS+ Medium, wobei jeweils eine Medienkomponente weggelassen wurde.	41

4.2	Biotrockenmasse (\square) und spezifische GDHt-Aktivität (\boxtimes) von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS Medium. Die Medien enthalten statt aller drei Extraktkomponenten nur 4 g/l Hefeextrakt, 8 g/l Fleischextrakt oder 10 g/l Pepton.	42
4.3	Biotrockenmasse (\times) und spezifische GDHt-Aktivität (Δ) von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in MRS+ Medium mit verschiedenen Glycerinkonzentrationen.	43
4.4	Biotrockenmasse (\times) und BTM-spezifische GDHt-Aktivität (Δ) von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 Kulturen nach Kultivierung bei 37°C in MRS Medium. Die Kulturen wurden täglich mit der Vorherigen inokuliert (2%), die erste mit einer MRS Vorkultur.	44
4.5	Verlauf der 3-HPA Konzentration (Δ), der optischen Dichte (\times) und der 1,3-PDO Konzentration (\diamond) bei einer Batch-Kultivierung von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 in Dünnschlempe mit Süßmaische (entsprechend 30 g/l Glukose) bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 mit NaOH geregeltem pH.	45
4.6	Durch Säureproduktion erzielte pH Reduktion (\square) und Glukoseverbrauch (\boxtimes) von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS Medium. Die Konzentration der Extrakte wurde um 1/8 gesenkt und mit 6ml/l bzw. 50ml/l Sirup (resultiert in 0,24 bzw. 2 g/l Glycerin) oder Bierhefe ersetzt.	46
4.7	Durch Säureproduktion erzielte pH Reduktion von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS Medium. Die Konzentration der Extrakte wurde bei gleichzeitiger Zugabe von Sirup (resultiert in 2 g/l Glycerin, unbehandelt \square , lysiert \boxtimes) und Süßmaische (resultiert in 20 g/l Glukose) gesenkt.	47

4.8	<i>L. reuteri</i> Biotrockenmasse und spezifische GDHt-Aktivität von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS Medium mit unterschiedlichem Extraktgehalt (100% (×), 75% (Δ), 50% (◇)).	47
4.9	<i>L. reuteri</i> Biotrockenmasse (□) und spezifische GDHt-Aktivität (⊠) von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS Medium. „MRS+“ enthält 2 g/l Glycerin und „MRS + 50 ml/l Sch“ Sirup (resultiert in 2 g/l Glycerin).	48
4.10	Biotrockenmasse (×) und spezifische GDHt-Aktivität (Δ) von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in MRS+ Medium mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen.	49
4.11	Biotrockenmasse (–) und Glukosekonzentration (–) bei steriler (×), steriler unbegaster (Δ) und unsteriler unbegaster (◇) Batch-Kultivierung von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 in MRS+ bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 mit NaOH geregeltem pH.	50
4.12	Glycerinkonzentration (–), 1,3-PDO Konzentration (–) und 3-HPA Konzentration (⋯) bei steriler (×), steriler unbegaster (Δ) und unsteriler unbegaster (◇) Batch-Kultivierung von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 in MRS+ bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 mit NaOH geregeltem pH.	51
4.13	Laktatkonzentration (–), Acetatkonzentration (–) und Ethanolkonzentration (⋯) bei steriler (×), steriler unbegaster (Δ) und unsteriler unbegaster (◇) Batch-Kultivierung von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 in MRS+ bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 mit NaOH geregeltem pH.	51
4.14	Maximale BTM (□) und spezifische GDHt-Aktivität (⊠) bei steriler, steriler unbegaster und unsteriler unbegaster Kultivierung Batch-Kultivierung von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 in MRS+ bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 mit NaOH geregeltem pH.	52

4.15	Die maximale BTM (\square) und die spezifische GDHt-Aktivität (\boxtimes) bei verschiedenen Kultivierungsmethoden von <i>L. reuteri</i> ATCC 53608 in MRS+ bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 geregeltem pH.	53
5.1	Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in gesiebttem DDGS, Sirup und 0,1 M Phosphatpuffer + Glycerin. Die Startbedingungen waren 1,3 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 20°C und pH 6,5.	67
5.2	1,3-Propandiolkonzentrationen (-) und Laktatkonzentrationen (--) während der anaeroben Biotransformation in gesiebttem DDGS (\diamond), Sirup (Δ) und 0,1 M Phosphatpuffer + Glycerin (\times). Die Startbedingungen waren 1,3 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 20°C und pH 6,5.	67
5.3	Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in 0,1 M PP, gefiltertem, zentrifugiertem und purem Sirup. Die Startbedingungen waren 1,5 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.	68
5.4	3-HPA Konzentrationen während der anaeroben Biotransformation in 0,1 M PP (\times), gefilterten (\circ), zentrifugierten (\diamond) und puren Sirup (Δ) enthaltenden Medium. Die Startbedingungen waren 1,5 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.	69
5.5	Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in Wasser (\times) und gefiltertem Sirup (Δ) bei verschiedenen pH Werten. Die Startbedingungen waren 1,6 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l bzw. 10 g/l Glycerin und 20°C.	70
5.6	Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in Wasser (\times) und gesiebttem DDGS (Δ) bei verschiedenen pH Werten. Die Startbedingungen waren 1,7 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin und 20°C.	70

5.7	Glycerinkonzentrationen (-) und 1,3-Propandiolkonzentrationen (--) während der anaeroben Biotransformation in gefiltertem Sirup bei pH 2,5 (◇), gesiebttem DDGS bei pH 3,5 (△) und wässriger Glycerinlösung bei pH 2,5 (×). Die Startbedingungen waren 1,7 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 10 g/l bzw. 15 g/l Glycerin und 20°C.	71
5.8	Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in gefiltertem Sirup (×) und 0,1 M PP (△) bei verschiedenen GDHt-Aktivitäten. Die Startbedingungen waren 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.	72
5.9	Glycerinkonzentrationen (-), 1,3-Propandiolkonzentrationen (--) und 3-HPA Konzentrationen (⋯) während der anaeroben Biotransformation in gefilterten Sirup bei 0,8 u/ml (×), 1,5 U/ml (△) und 2,3 U/ml (◇). Die Startbedingungen waren 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.	73
5.10	Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in 0,1 M PP unter verschiedenen Gasatmosphären. Die Startbedingungen waren 1,5 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 20°C und pH 6.	73
5.11	Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in gefiltertem Sirup. Die Startbedingungen waren 1,5 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.	74
5.12	Glycerinkonzentrationen (-) und 1,3-Propandiolkonzentrationen (--) während der anaeroben Biotransformation in gefiltertem Sirup bei 1 bar (×), 0,3 bar (△) und 0,1 bar (◇). Die Startbedingungen waren 1,5 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.	75
5.13	Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in 0,1 M PP ohne Ethanol und mit 80 g/l Ethanol. Die Startbedingungen waren 4 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.	76

5.14	Glycerinkonzentrationen (-) und 1,3-Propandiolkonzentrationen (--) während der anaeroben Biotransformation in 0,1 M PP ohne Ethanol (x) und mit 80 g/l Ethanol (Δ). Die Startbedingungen waren 4 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.	76
6.1	Verschiedene Ansätze zur in-situ Abtrennung von Aldehyden: (A) Fangen mit präzipitierenden Aldehydfängern und Abtrennung durch Fällung; (B) Fangen und Abtrennen mit immobilisierten Aldehydfängern; (C) Fangen mit unmischbaren Aldehydfängern und Abtrennung durch Phasentrennung; (D) Lösung in unmischbaren Lösungsmitteln und Abtrennung durch Phasentrennung; (E) Reaktion zur Siedepunktsreduktion und Abtrennung durch Destillation; (F) Reaktion zur Flüchtigkeitserhöhung und Abtrennung durch Lösung in einer Gasphase. . .	86
6.2	Hammett Aciditätsfunktion H_0 bei verschiedenen Phosphorsäurekonzentrationen ([AM66])	92
6.3	Experimentelle Ergebnisse (\square) verglichen mit berechneten idealen Ergebnissen (\boxtimes) für das Lösen bzw. reaktive Fangen von 3-HPA aus Transformationsmedium in einer zweiten Phase in verschiedenen unmischbaren Lösungsmitteln bei 25°C und einem 1:1 Mischungsverhältnis.	96
6.4	Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C.	98
6.5	Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C. Integralmethode für die Reaktion 1. Ordnung.	98
6.6	Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C. Integralmethode für die Reaktion 2. Ordnung.	99

6.7	Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C. Integralmethode für eine Gleichgewichtsreaktion.	99
6.8	Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 65 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -2,0$) und 37°C.	100
6.9	Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 65 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -2,0$) und 37°C. Integralmethode für eine Gleichgewichtsreaktion.	101
6.10	Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 25°C.	101
6.11	Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 25°C. Integralmethode für eine Gleichgewichtsreaktion.	102
6.12	Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA (\times) zu Acrolein (Δ) bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C.	103
6.13	Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA (\times) zu Acrolein (Δ) bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C. Integralmethode für eine Gleichgewichtsreaktion.	103
6.14	Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA (\times) zu Acrolein (Δ) bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration, Amberlyst 36 Katalysator und 37°C.	104
6.15	Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA (\times) zu Acrolein (Δ) bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration, Amberlyst 36 Katalysator und 37°C. Integralmethode für eine Gleichgewichtsreaktion.	105

6.16 Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA (\times) zu Acrolein (Δ) bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration, feste Phosphorsäure als Katalysator und 37°C.	105
6.17 Chromatogramm des Destillats. Der einzige Peak ist Acrolein bei 27,5 Minuten.	107
7.1 Potentieller schematische Aufbau einer Anlage zur in-situ Pro- duktion von Acrolein aus Schlempe: Transformationsbereich (1), Dehydratisierungsbereich (2), Destillationsbereich (3).	118

Tabellenverzeichnis

1.1	Weltweites Marktvolumen und aktuelle Preise der wichtigsten acrolein-basierten Chemikalien	2
4.1	Produktivitäten verschiedener Verfahren zur Biokatalysatorproduktion in MRS+ Medium bei 37°C und pH 5,5. Rüstzeiten wurden nicht berücksichtigt.	53
4.2	Enthaltene Aminosäuren des verwendeten Peptons, Fleischextrakts und Hefeextrakts ([Car12c], [Car12a], [Car12b])	55
6.1	Lösungen der Integralmethode zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für ausgewählte Reaktionstypen ([Lev99], [APL08], [Ham73])	91
6.2	Ergebnisse des Fangens von 3-HPA mit Semicarbazid und der Spaltung des 3-HPA-semicarbazons durch Aceton oder Säure vor oder nach der Fällung.	96
6.3	Experimentelle Ergebnisse verglichen mit berechneten idealen Gleichgewichtsergebnissen für die säurekatalysierte Reaktiv-Batchdestillation von Transformationsmedium bei $H_0 = -1$, 37° C, 62 mbar und einer Dephlegmatortemperatur von 25°C.	106
6.4	Experimentelle Ergebnisse verglichen mit berechneten idealen Gleichgewichtsergebnissen für das säurekatalysierte Reaktiv-Stripping mit N_2 von Transformationsmedium bei $H_0 = -1$, 37° C und Umgebungsdruck.	107
7.1	Exponenten verschiedener Bauteile zur Größenanpassung der Kosten	134
7.2	Chemical Engineering Plant Cost Index des Chemical Engineering Magazins. Mittlerer Wert in verschiedenen Jahren.	135

7.3	Parameter der Auslegung der Anlage zur biotechnologischen Produktion von Acrolein aus Schlempe	136
7.4	Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung des Transformationsbereichs. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.	138
7.5	Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung des Dehydratisierungsbereichs. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.	139
7.6	Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung des Destillationsbereichs. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.	140
7.7	Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung der Gesamtdimensionen des Reaktors inklusive Kolonnenbereich. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.	140
7.8	Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung der Wärmeübertrager. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.	141
7.9	Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung des Dampfjektors zur Vakuumerzeugung. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.	142
7.10	Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung der Biokatalysatorproduktion. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.	143
7.11	Referenzkosten zur Ermittlung Investitionskosten für die einzelnen Apparate. Es handelt sich nur um Materialkosten.	143
7.12	Investitionskosten der Produktion von Acrolein aus nachwachsenden Rohstoffen mit dem gewählten Ansatz.	144

7.13	Referenzkosten zur Ermittlung der Hilfsstoffkosten für die Berechnung der Betriebskosten.	145
7.14	Betriebskosten der Produktion von Acrolein aus nachwachsenden Rohstoffen mit dem gewählten Ansatz.	146
7.15	Sensitivitätsanalyse. Ermittelte Verstärkungen (Ω) für die Variation ausgesuchter Variablen, bei denen eine Verstärkung $> 0,1$ auftritt.	147
7.16	Sensitivitätsanalyse. Ermittelte Verstärkungen (Ω) für die Variation der Equipmentkosten und Hilfsstoffkosten.	148

Abkürzungen, Symbole und Indizes

Abkürzung	Beschreibung
1,3-PDO	1,3-Propandiol
3-HPA	3-Hydroxypropionaldehyd
abs.	absolut
Bier	Bierhefe
Bio-HPA	Transformationsmedium nach der Transformation, welches 3-HPA und Glycerin enthält
CFU	Colony forming Unit
DDGS	Distillers Dried Grains with Solubles
EtOH	Ethanol
Ext.	Extrakte (Hefeextrakt, Fleischextrakt, Pepton)
fl.	flüssig
GC	Gaschromatograph
GDHt	Glycerindehydratase
Gew.-%	Gewichtsprozent
GGW	Gleichgewicht
Gluk.	Glukose
Konti.	Kontinuierliche Fermentation
L.	<i>Lactobacillus</i>
max.	maximal
MIC	Minimum Inhibitory Concentration für <i>E. coli</i> K12
MRS	Medium nach de Man, Rogosa, Sharpe ([DMRS60])
MRS+	MRS Medium supplementiert mit 2 g/l Glycerin
OD	Optische Dichte
PP	Phosphatpuffer

Abkürzung	Beschreibung
REACH	Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals
SC-Bio-HPA	Transformationsmedium nach der Transformation, welches 3-HPA, Glycerin, Phosphatpuffer und Semicarbazid enthält
Sch	Sirup
spez.	spezifisch
vol.-%	Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen
zentr.	zentrifugiert

Symbol	Einheit	Beschreibung
A		Parameter
A	m^2	Fläche
α		relative Flüchtigkeit
B		Parameter
BC	EUR	Betriebskosten
bc	EUR/kg	spezifische Betriebskosten
\dot{BC}	EUR/h	stündliche Betriebskosten
BTM	g/l	Biotrockenmasse
C	mM	Konzentration
C		Parameter
c_p	$\frac{J}{mol \cdot K}$	Wärmekapazität
CC	EUR	Kapitalkosten
D		Parameter
D	m	Durchmesser
d	mm	Wandstärke
ΔP	$mbar$	Druckverlust
E		Parameter
e	kg/kg	Entrainmentrate
E_0	$kcal/mol$	Aktivierungsenergie

Symbol	Einheit	Beschreibung
η	$Pa \cdot s$	dynamische Viskosität
f		Faktor
F	$m/s \cdot \sqrt{kg/m^3}$	F-Faktor
f_{st}	bar	Stressfaktor des Materials
G	kU	Katalysatormenge
g	kU/l	Katalysatorkonzentration
g	m/s^2	Gravitationsbeschleunigung
\dot{G}	kU/h	Katalysatorstrom
GC	EUR	Gesamtkosten
gc	EUR/kg	spezifische Gesamtkosten
$\dot{G}C$	EUR/h	stündliche Gesamtkosten
H	J/mol	Enthalpie
H	m	Höhe
H_0		Hammett Acidität
HTU	m	Höhe einer Trennstufe
IC	EUR	Investitionskosten
ic	EUR/kg	spezifische Investitionskosten
$\dot{I}C$	EUR/h	stündliche Investitionskosten
K		Gleichgewichtskonstante
k	$1/min$	Gesamtreaktionsgeschwindigkeitskonstante
k_{-1}	$1/min$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Rückreaktion
k_1	$1/min$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Hinreaktion
M	t	Masse
m	t/m^3	spezifische Masse
\dot{M}	t/h	Massenstrom
MM	g/mol	Molmasse
N		Trennstufenzahl
n	$1/min$	Drehzahl
$N_T - N_B$		Wert zur Bestimmung der Feedstufe
Ne		Newtonzahl
OD	AU	optische Dichte

Symbol	Einheit	Beschreibung
P	bar	Druck
p	$\frac{kU}{m^3_{reaktor} \cdot h}$	Produktivität
φ		Lückengrad
q	MJ/t	spezifische Wärmeenergie
\dot{Q}	MJ/h	Wärmeenergiestrom
r	mM/h	Reaktionsgeschwindigkeit
R	$\frac{J}{mol \cdot k}$	Universelle Gaskonstante
rd	m	Rührerdurchmesser
Re		Reynoldszahl
ρ	kg/m^3	Dichte
S		Trennfaktor
t	h	Zeit
T	$^{\circ}C$	Temperatur
τ	h	Verweilzeit
U	$\frac{W}{m^2 \cdot k}$	Wärmeübergangskoeffizient
V	l	Volumen
v	m/s	Geschwindigkeit
\dot{V}	m^3/h	Volumenstrom
W	W	Leistung
X	mol	Molare Menge
x	mol/mol	Molenbruch
\dot{X}	$kmol/h$	Molenstrom
Y		Wirkungsgrad
y	kg/MU	Laugenbedarf
z	$\%$	Kreditzinssatz

Index	Beschreibung
0	Zum Zeitpunkt 0, Bezugswert
650	Wellenlänge 650 nm
A	Acrolein

Index	Beschreibung
<i>a</i>	Abschreibung
<i>a</i>	Antoine
<i>Acr</i>	Acrolein
<i>arb</i>	Arbeit
<i>b</i>	Bau
<i>betr</i>	Betrieb
<i>cap</i>	Kapazität der Anlage
<i>cond</i>	Kondensator
<i>cw</i>	Kühlmittel
<i>Dd</i>	Durchmesser zu Rührerdurchmesser
<i>deh</i>	Dehydrierungsbereich
<i>dest</i>	Destillat
<i>e</i>	im Gleichgewichtszustand
<i>ejec</i>	Dampfejektor
<i>evap</i>	Verdampfer
<i>F</i>	Feedstufe
<i>gluc</i>	Glukose
<i>glyc</i>	Glycerin
<i>HD</i>	Höhe zu Durchmesser
<i>HPA</i>	3-Hydroxypropionaldehyd
<i>HS</i>	Kopfbereich
<i>i</i>	Variable
<i>in</i>	Eingang
<i>inert</i>	Inerter Stoff (CO_2)
<i>int</i>	Einbauten
<i>K</i>	Kolonnenbereich
<i>K + R</i>	Kolonnenbereich und Reaktionsbereich
<i>kat</i>	Katalysator
<i>leak</i>	Leckage
<i>lys</i>	lysiert
<i>min</i>	minimal
<i>N</i>	Trennstufen
<i>NaOH</i>	Natriumhydroxid

Index	Beschreibung
<i>NH3</i>	Ammoniakwasser
<i>out</i>	Ausgang
<i>pack</i>	Packung
φ	freier Anteil
<i>prod</i>	Biokatalysatorproduktion
<i>PS</i>	Heizdampf
<i>Q</i>	Wärmeenergiestrom
<i>R</i>	Reaktionsbereich
<i>rec</i>	Zurückgewonnen
<i>recyc</i>	Wiederverwendung
<i>ref</i>	Referenz
<i>rem</i>	Rest
<i>reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>s</i>	Exponentenmethode
<i>sied</i>	Siedepunkt
<i>stat</i>	hydrostatisch
<i>sub</i>	Substrat
<i>sumpf</i>	Sumpfprodukt
<i>T</i>	Temperatur
<i>trans</i>	Transformation
<i>trap</i>	Kühlfalle
<i>vap</i>	Verdampfung
<i>W</i>	Wasser
<i>wld</i>	Schweißnahtqualität
<i>Wph</i>	Wässrige Phase
<i>x</i>	Flüssigphase
<i>y</i>	Dampfphase

Kapitel 1

Einleitung

Fossile Kohlenstoffquellen, wie Erdöl, sind begrenzt und deren Erschließung wird immer teurer (siehe Abbildung 1.1). Deshalb wird immer häufiger die Verwendung nachwachsender Rohstoffe zur Produktion von Kraftstoffen und Chemikalien favorisiert. Prozesse zur Herstellung von Kraftstoffen aus nachwach-

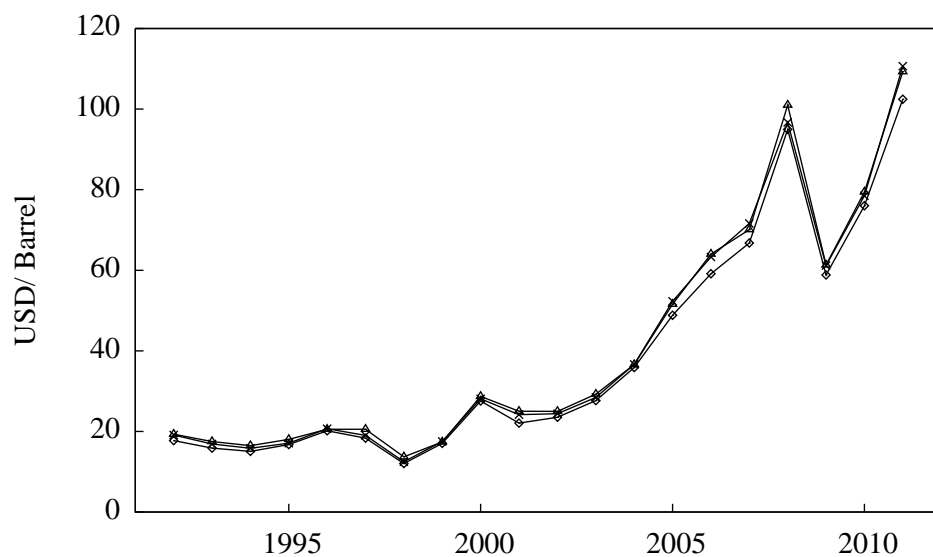


Abbildung 1.1: Durchschnittliche Rohölimportkosten für Deutschland (x), Japan (Δ) und die USA (◇) zwischen 1992 -2011 ([Int12])

senden Rohstoffen sind bereits im industriellen Maßstab etabliert und werden weiter erforscht. Auch die Produktion von neuartigen bzw. etablierten Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen tritt immer mehr in den Fokus der For-

schung (siehe [XZ08], [SDQ⁺10], [KTZ10] u.a.). Aufgrund des großen Marktes (siehe Tabelle 1.1, Preise außer für 1,3-PDO sind Mittelwerte aus mindestens vier Preisangaben verschiedener Anbieter am 23.07.2012) und der Verwendung in Hygieneartikeln und Textilien, ist die biologische Produktion einer Plattformchemikalie für acrolein-basierte Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen ein aktuelles Forschungsgebiet von großem industriellen Interesse (siehe [HKK⁺10], [GSJ⁺09]) u.a.). Darüber hinaus bilden diese Derivate des Acroleins die Grundlage für einen großen Teil der heutzutage produzierten Lacke, Harze, Latex, Kleber, Elastomere, Kunstfasern, Superabsorber und Kunststoffe. Darüber hinaus können über 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA), ein weiteres Derivat des Acroleins, neue Märkte erschlossen werden (siehe Abbildung 1.2). Der

Tabelle 1.1: Weltweites Marktvolumen und aktuelle Preise der wichtigsten acrolein-basierten Chemikalien

Name	Marktvolumen [Mt/a]	Datum	akt. Preis [USD/kg]	Quellen
Acrolein	0,4	2000	2,0	[Etz00], [Ali12]
Acrylsäure	3,5	2003	2,3	[Soc02], [Ali12]
Acrylnitril	5,2	2005	2,2	[Gin07], [Ali12]
1,3-Propandiol	> 0,05	2008	≈ 1,8	[SASI09]

bekannteste industriell angewendete Prozess, welcher nachwachsende Rohstoffe zur Produktion einer Plattform für acrolein-basierte Chemikalien nutzt, basiert auf der biotechnologischen Produktion von 3-Hydroxypropionsäure statt der klassischen Plattformchemikalie Acrolein ([GSJ⁺09], [SC05]). Jedoch wird 3-Hydroxypropionsäure nur von genetisch veränderten Organismen in wirtschaftlicher Menge produziert und hat unvorteilhafte Stoffeigenschaften. So ist sie sehr hydrophil und zersetzt sich bei höheren Temperaturen ([Bud91]). Auch der Bedarf an teuren Nährstoffen und die geringe Produktivität sind ein Problem. Darüber hinaus führen geringe Ausbeuten, schwierig abzutrennende Nebenprodukte und Salzbildung durch Titration zu einer aufwendigen und kostenintensiven Aufreinigung ([WP04]). Die aktuelle Forschung fokussiert sich deshalb auf 3-HPA, was aufgrund seiner hohen Reaktivität das Potential hat, selektiv abgetrennt zu werden. Die aktuellen Ansätze konzentrieren sich auf das Binden von 3-HPA mit sogenannten Aldehydfängern, sowie auf die

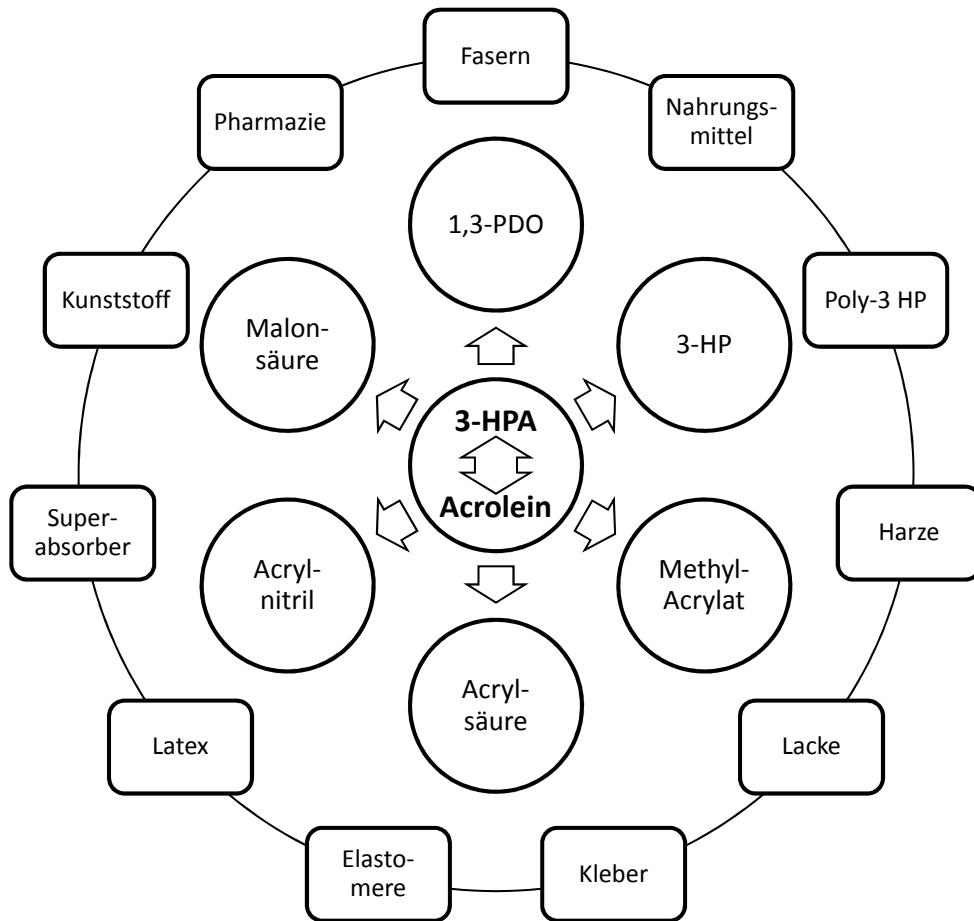


Abbildung 1.2: Nutzung von 3-HPA und Acrolein als Plattformchemikalien und eine Auswahl an Anwendungsmöglichkeiten

Abtrennung über Fällung oder Immobilisierung der Aldehydfänger ([KWW12], [RLJ⁺11], [Ulm07]). Diese Aldehydfänger binden zwar *in-situ* das 3-HPA wodurch für die Mikroorganismen toxische Konzentrationen vermieden werden können und somit deren Produktivität länger erhalten bleibt, jedoch bereitet die Trennung des 3-HPA vom Aldehydfänger und die Rezyklierung des Aldehydfängers Probleme (siehe Kapitel 2.7). Aufgrund ihrer hohen Reaktivität können Aldehydfänger ebenfalls toxisch wirken, was die Entsorgung der Fermentationsbrühe bei Kontamination sehr erschwert. Neben einer kostenintensiven Aufreinigung sind hohe Substratkosten und hohe Mediumkosten für die Biokatalysatorproduktion (Mikroorganismenwachstum) weitere Faktoren, die die biotechnologische Produktion einer Plattformchemikalie für acroleinbasierte Stoffe in großen Mengen zu geringen Preisen erschweren und bisher noch nicht wissenschaftlich bearbeitet wurden.

Die vorliegende Arbeit versucht durch die Wahl eines neuen Ansatzes, in allen diesen problematischen Bereichen (Biokatalysatorproduktion, Substratkosten und Aufreinigung) kostensparende Lösungen zu ermitteln. Dieser neue Ansatz beruht auf den als „pepper periods“ aus der Bioethanolproduktion seit langem bekannten, aber in Bezug auf die biotechnologische Produktion einer Plattformchemikalie für acroleinbasierte Stoffe wenig beachteten Vorfällen. Hierbei tritt spontan und ungewollt genau diese biotechnologische Produktion von Acrolein, aus einer bisher ungenutzten Glycerinquelle, auf ([WH51]):

Während der sogenannten „pepper periods“ wachsen Milchsäurebakterien (Biokatalysatorproduktion) neben der Ethanol produzierenden Hefe. Diese Bakterien wandeln das von den Hefen nebenbei produzierte Glycerin in 3-HPA um (Substratalternative). Bei den Destillationsbedingungen der Ethanoldestillation dehydratisiert das 3-HPA teilweise zu Acrolein, der klassischen Plattformchemikalie, und wird mit dem Ethanol abdestilliert (Aufreinigung). Aufgrund seines pfefferartigen Geschmacks und seiner reizenden Wirkung schon bei minimalen Konzentrationen, muss das Acrolein vom Ethanol abgetrennt werden, wenn dieser zu Genusszwecken verwendet werden soll ([SDLB54]).

Diesen zufälligen und unkontrollierten Vorgang (detailliert beschrieben in Kapitel 2.1) in einem optimierten und im Sinne des Bioraffineriekonzepts in einem in den Ethanolprozess integrierten Verfahren auszunutzen, könnte zusätzlich

die Plattformchemikalie Acrolein zu vertretbaren Kosten produzieren. Darüber hinaus würden alle Prozesse, welche die Abfallprodukte der Bioethanolproduktion (Schlempe) verwenden, sicherer gemacht. Durch die gezielte Umwandlung und Abtrennung des Glycerins, kann keine spontane Acroleinproduktion mehr stattfinden.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb zu prüfen, inwieweit sich Erfahrungen aus dem kontaminierten Bioethanolprozess zur Acroleinproduktion nutzen lassen und inwieweit sich ein solcher Prozess in den Ethanolprozess im Sinne des Bioraffineriekonzeptes integrieren lässt, um bestehende Probleme zu lösen und Produktionskosten zu reduzieren.

Hierzu wird in Kapitel 2 auf Seite 7 ein Einblick in den aktuellen Stand der Forschung auf diesem Gebiet gegeben und anschließend die resultierenden Ziele und Aufgaben dieser Arbeit in Kapitel 3 auf Seite 29 abgeleitet. Danach werden die Versuche zu den Bereichen Biokatalysatorproduktion in Kapitel 4 auf Seite 35, Biotransformation in Kapitel 5 auf Seite 63 und Aufreinigung in Kapitel 6 auf Seite 85 betrachtet. Es folgt eine Abschätzung möglicher Kosten einer Prozessvariante in Kapitel 7 auf Seite 117 und abschließend eine generelle Zusammenfassung mit Ausblick auf weitere zu klärende Fragen in Kapitel 8 auf Seite 157.

Kapitel 2

Stand der Forschung

2.1 Der Bioethanol-Prozess

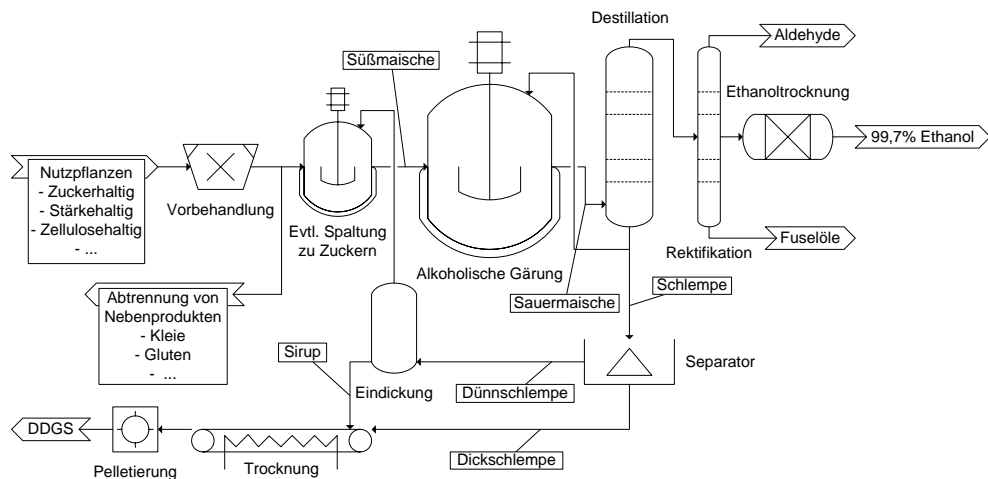


Abbildung 2.1: Allgemeine Darstellung eines Bioethanolprozesses ([Cro11b], [Cro11a], [Kal01])

Für die biotechnologische Produktion von Ethanol wird als Substrat Zucker benötigt. Dieser kann entweder direkt aus zuckerhaltigen Pflanzen, wie Zuckerrüben oder Zuckerrohr, gewonnen werden oder durch Abbau von Stärke oder Cellulose zu Zucker (siehe Abbildung 2.1). Die gängigsten Stärkehaltigen Pflanzen, die zur Ethanolproduktion herangezogen werden sind Getreide, Mais und Kartoffeln. Die Nutzung von Cellulose aus Holz oder Stroh ist noch ein sehr dynamisches Forschungsfeld, wo nicht absehbar ist, welche Pflanzen

sich durchsetzen werden ([LT06]). Die Zusammensetzung des Mediums vor der Alkoholischen Gärung (Süßmaische) kann somit je nach Ausgangspflanze stark variieren. Dazu kommt noch, dass im Sinne des Bioraffineriekonzepts Teile der Kulturpflanzen vor der Einmischung abgetrennt werden können, um diese anderweitig zu nutzen. Hierzu zählt zum Beispiel die Abtrennung von Kleie und Gluten aus Weizen. Die Medien müssen teilweise mit Zugaben von Stickstoffquellen, Vitaminen und Spurenelementen aufgebessert werden, um den Ansprüchen der ethanolbildenden Mikroorganismen zu genügen (persönliche Kommunikation Dr. C. Janz, N.prior, Stade). Der am häufigsten verwendete Organismus ist *Saccharomyces cerevisiae* welcher relativ geringe Anforderungen an das Medium stellt ([LT06]). Im Gegensatz dazu gelten Lactobacillen, welche am häufigsten eine Kontamination der alkoholischen Gärung verursachen und zu einer Acroleinproduktion führen, als relativ anspruchsvoll ([LRHO⁺77], [SSPV06]). Sie sind jedoch teilweise in der Lage Hefezellen zu lysieren und somit fähig, eine weitere Nährstoffquelle zu erschließen (siehe Kapitel 2.2), was ihr Wachstum in nährstoffarmen Medien während der alkoholischen Gärung erklären kann.

Die Ethanolproduktion kann ansatzweise oder kontinuierlich betrieben werden. Die Fermenter werden in der Regel aus Kostengründen nicht sterilisiert, sondern die Süßmaische bei Temperaturen über 60°C eingefüllt, um Kontaminationen zu minimieren. Die alkoholische Gärung findet dann bei Temperaturen um 35°C statt. Hierbei ist es üblich, zuzulassen, dass der pH Wert bis auf einen Wert von ca. pH 4,5 sinkt. Es werden finale Ethanolkonzentrationen in der nun sogenannten Sauermaische von 100 - 150 g/l angestrebt (persönliche Kommunikation Dr. J. Kube, Agraferm, Pfaffenhofen). Detaillierte Beschreibungen der industriell angewendeten alkoholischen Gärprozesse sind u.a. in ([Kal01]) erörtert. Die aktuelle Arbeit betreffend ist jedoch nicht bekannt, inwieweit das von den Hefen gebildete Ethanol das Wachstum der kontaminationbildenden Lactobacillen hemmt. Auch wurde bisher nicht wissenschaftlich untersucht, inwiefern Lactobacillen wie *L. reuteri*, die aus einer anderen Quelle isoliert wurden und für ihre hohe 3-HPA Produktion und Resistenz bekannt sind, die Fähigkeit besitzen, die Komponenten der Süßmaische zu nutzen und Hefezellen zu lysieren.

Wenn Lactobacillen in der Süßmaische gewachsen sind und eine Kontamination

hervorgehoben haben, was sehr häufig der Fall ist, bedeutet dies nicht automatisch, dass auch Acrolein im Destillat zu finden ist. Dies bildet sich in der Regel erst, wenn eine Kontamination in der Schlussphase der alkoholischen Gärung, wenn fast die gesamte Glukose verbraucht ist, auftritt([MBC54]). Diese Beobachtung deckt sich mit den Erfahrungen aus der gezielten 3-HPA Produktion. Nur wenn nicht genug Redoxäquivalente vorhanden sind, akkumuliert sich 3-HPA, was zu Acrolein reagieren kann, anstatt zu 1,3-Propanediol (1,3-PDO) umgewandelt zu werden. Dies kann unter anderem durch Glukosemangel verursacht werden (siehe Kapitel 2.2). Dieser Effekt wird gezielt in einem zweistufigen Prozess zur Produktion von 3-HPA mit *L. reuteri* genutzt (siehe Kapitel 2.6). Das Glycerin, welches von den Lactobacillen als Substrat zur Produktion von 3-HPA genutzt wird, bilden die Hefen zur Osmoregulation unabhängig von der Substratquelle (siehe Kapitel 2.3 auf Seite 13). Glycerinkonzentrationen in der Maische liegen bei 60-120 g pro Liter Ethanol ([ZB02]). Bisher wurde jedoch nicht untersucht, welchen Einfluss die anderen Bestandteile der Maische auf die 3-HPA Produktion haben. Auch die optimalen Parameter zur 3-HPA Produktion in Maische sind unbekannt.

Während der alkoholischen Gärung sinkt der pH Wert auf 4,2 bis 4,7 und wird nun Sauermaische genannt([Kal01]). Die Lactobacillen haben mit diesen pH Werten kein Problem. Wird jedoch die Sauermaische zur Destillation auf Siedetemperatur gebracht, reicht diese Säurekonzentration in Kombination mit der Temperatur von ca. 100°C im Kolonnensumpf aus, um 3-HPA zu Acrolein zu dehydratisieren ([Kal01]). Die Kinetiken der Dehydratisierung sind unter diesen Bedingungen nicht gut erforscht und deshalb ist nicht bekannt, wie vollständig die Dehydratisierung während der Ethanoldestillation ist (siehe Kapitel 2.7).

Da Acrolein einen niedrigeren Siedepunkt als Ethanol hat, sammelt sich dieses im Kopf der Destillationskolonne und muss um die Qualitätsanforderungen des Ethanols zu erreichen, von diesem gegebenenfalls abgetrennt werden. Weitere Informationen zur Destillation von Acrolein sind in Kapitel 2.7 beschrieben.

Das gewonnene Ethanol muss anschließend noch entwässert werden, da es mit Wasser ein Azeotrop bildet. Hierauf soll jedoch nicht weiter eingegangen werden, da dies für die vorliegende Arbeit nicht relevant ist. Interessierte seien an Kaltschnitt verwiesen ([Kal01]).

Der Rückstand nach der Ethanolabtrennung wird in der Regel als Schlempe oder Vinasse bezeichnet. Diese wird teilweise in den Fermentationsprozess zurückgeführt, wodurch Lag-Phasen reduziert und die Raum-Zeit-Ausbeute erhöht werden kann ([Kal01]). Nebenprodukte wie die Schlempe, können auch im Sinne des Bioraffineriekonzeptes einer weiteren Verwendung als Viehfutter oder als Substrat zur Biogasproduktion zugeführt werden ([Kal01],[Bra82]). Es ist jedoch bisher nicht bekannt, inwieweit gebildetes 3-HPA oder verbleibendes Acrolein die Schlempeverwertung beeinflusst. Zum besseren Transport und zur besseren Lagerung wird die Schlempe häufig nach Entwässerung und Trocknung zu sogenannten „Distillers Dried Grains with Solubles“ (DDGS) gepresst ([Roe01]). Es ist bekannt, dass DDGS mit geringerem Glycerinanteil oder Glukoseanteil eine bessere Rieselfähigkeit besitzen, was ein zusätzlicher Vorteil der Glycerinumwandlung sein könnte([Kam90]).

Heutzutage wird im Allgemeinen immer häufiger angestrebt, Bioethanolanlagen zu sogenannten Bioraffinerien auszubauen, um mit einem größeren Produktportfolio besser auf Marktschwankungen reagieren zu können. Dazu werden die vorhandenen Substrate, wie Stärke oder Glukose, auch anderen Verwendungen zugeführt und Nebenprodukte, wie zum Beispiel DDGS oder Gluten, weiterverwendet ([KK04]).

2.2 Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien sind am häufigsten für eine Acroleinproduktion während einer kontaminierten alkoholischen Gärung verantwortlich. Milchsäurebakterien sind gram-positive, nicht sporenbildende, unbewegliche, anaerobe aber meist aerotolerante Stäbchen oder Kokken, die sich durch die Produktion von Milchsäure aus Kohlenhydraten auszeichnen. Sie lassen sich in homofermentative aus Glukose ausschließlich Milchsäure produzierende Bakterien und in heterofermentative Bakterien unterteilen, die weitere Nebenprodukte wie Essigsäure, Ethanol und CO_2 bilden ([Krä11]). Sie haben sich an das Wachstum in nährstoffreichen Umgebungen angepasst und weisen dadurch beschränkte Synthesefähigkeiten und große Nährstofftransportkapazitäten auf ([MSW⁺06]). Manche Lactobacillen besitzen proteolytische Fähigkeiten. Sie sind zum Beispiel in der Lage Hefezellen zu lysieren, um sich neue Nährstoffquellen zu erschließen

([BMCD04]). Milchsäurebakterien werden seit Jahrtausenden dazu genutzt, Lebensmittel haltbarer zu machen und deren Geschmack sowie Konsistenz zu beeinflussen. Durch ihr schnelles Wachstum, ihre starke Milchsäureproduktion bei gleichzeitig hoher Säuretoleranz und die Produktion von Bakterioziden, dominieren Sie auf Lebensmitteln und verdrängen Organismen, welche diese verderben können ([Han02]). Aufgrund ihrer langen folgenfreien Verwendung werden Milchsäurebakterien als unbedenklich eingestuft („generally recognised as safe“, GRAS) ([Ham98]). Darüber hinaus siedeln Milchsäurebakterien, vor allem Lactobacillen, auch häufig im Magen-Darm-Trakt von Säugetieren und wirken dort probiotisch. Probiotisch bedeutet, dass das Vorhandensein von lebenden Organismen in einer adäquater Menge sich positiv auf die Gesundheit ihres Wirtes auswirkt ([Foo06]). Milchsäurebakterien verdrängen durch ihre Fähigkeiten potentiell pathogene Organismen von den Schleimhäuten. Durch die Produktion von Vitaminen und kurzkettigen Fettsäuren aus unverdaulichen Nahrungsbestandteilen verbessern sie zusätzlich die Verdauung ([HNAM94], [HHG+01]).

2.2.1 *Lactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri ist ein stäbchenförmiges, heterofermentatives Milchsäurebakterium, das einzeln oder in kleinen Ketten aus bis zu fünf Bakterien wächst ([KSK80]). Es ist in Lebensmitteln wie Sauerteig-, Fleisch- und Milchprodukten sowie im Magen-Darm-Trakt und Urogenitalbereich von Menschen und Tieren zu finden ([ACDL89]). Es kann unter anderem auf den Kohlenhydraten Arabinose, Fruktose, Glukose, Laktose, Maltose, Ribose und Saccharose wachsen ([KSK80]). Aufgrund seiner Anpassung an nährstoffreiche Lebensräume, benötigt *L. reuteri* jedoch auch noch eine ganze Reihe weiterer Aminosäuren, Spurenelemente und Vitamine. Für *L. reuteri* ATCC 55730 (SD2112) sind die Ansprüche an ein definiertes Medium bekannt ([SSPV06]). *L. reuteri* ist außerdem in der Lage Glycerin über 3-HPA in 1,3-PDO umzuwandeln, kann jedoch Glycerin nicht als Kohlenstoffquelle für das Wachstum nutzen ([LPDP02]). Wenn aufgrund einer fehlenden Hexosenquelle nicht ausreichend NADH produziert werden kann, stoppt die Konversion von 3-HPA zu 1,3-PDO und 3-HPA akkumuliert sich (siehe Diagramm 2.2). Dieser Effekt kann in einem zweistufigen Verfahren zur gezielten 3-HPA Produktion genutzt werden (siehe Kapitel

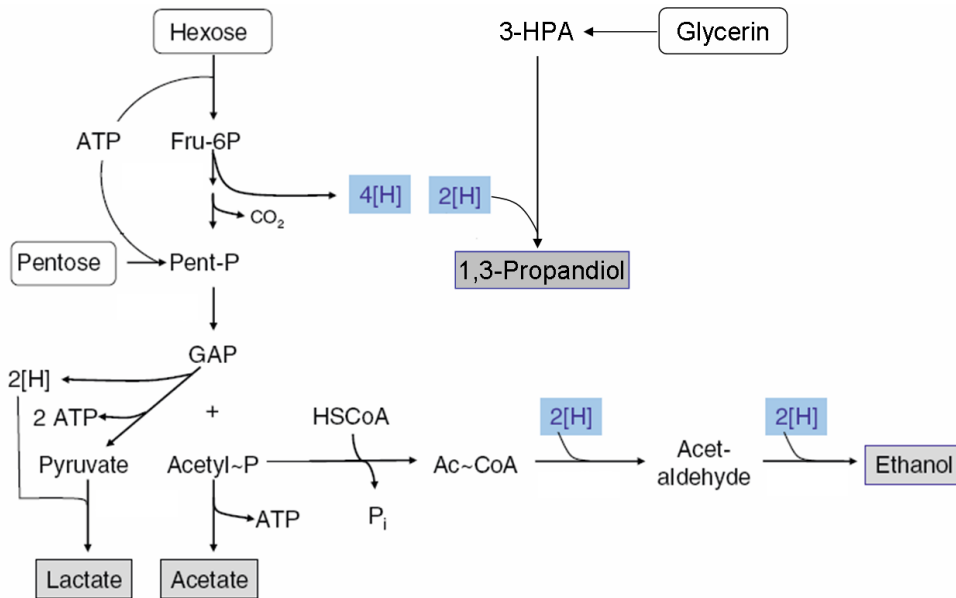


Abbildung 2.2: Stoffwechselwege von *Lactobacilli* sp. ([ZERU06], [LPDP02])

2.6). Die Umwandlung von Glycerin in 3-HPA durch die Glycerindehydratase (GDHt) benötigt Vitamin B12 als Kofaktor, das jedoch von *L. reuteri* selbst gebildet und regeneriert werden kann ([ABR60], [SS60], [STM⁺09], [Tor00], [SLHR⁺08]).

L. reuteri ATCC 53608, 55730 und dessen Nachfolger gelten als probiotisch und sind in der Lage größere Mengen an 3-HPA zu tolerieren und zu exkretieren. So liegt für *L. reuteri* ATCC 55730 die minimale inhibierende 3-HPA Konzentration bei 30 - 50 mM und die minimale bakteriozide Konzentration bei 60 - 120 mM ([CLV⁺07]). *L. reuteri* exkretiert 3-HPA teilweise sogar aktiv um Konkurrenten zu bekämpfen ([DL97]). Im Gegensatz zu diesen aus tierischen Exkrementen oder menschlicher Brustmilch isolierten Stämmen ist nicht bekannt ob *L. reuteri* Stämme, die zum Beispiel aus Sauerteig oder anderen der Maische aus der Bioethanolproduktion ähnlichen Medien isoliert wurden, auch in der Lage sind größere Mengen 3-HPA zu akkumulieren ([TVH⁺03]).

Es ist nicht bekannt welche proteolytischen Fähigkeiten *L. reuteri* ATCC 53608, der Stamm mit der bisher größten bekannten 3-HPA Produktionsfähigkeit, ([DBVL05]) besitzt. Untersuchungen an *L. reuteri* F275 und NRRL 14171

deuten auf ein schwaches proteolytisches System hin ([LBR⁺10], [HMROG05]), während *L. reuteri* CRL 1098 ein ausgeprägtes proteolytisches System besitzt ([RFV01]).

2.3 Glycerin

Glycerin ist eine klare, farblose, viskose Flüssigkeit (1410 *mPa·s* bei 20°C) mit einem Siedepunkt von 290°C, einer Dichte von 1,262 *g/cm³* bei 20°C, einem Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten von $\log P_{OW} = -2,5$, einer Molmasse von 92 *g/mol* und ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar ([Eur00c]). Es wird entsprechend den Kriterien der Richtlinien 67/548/EWG bzw. 1999/45/EG oder der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 als nicht gefährlich eingestuft ([Car12d]). Seit Jahrtausenden ist Glycerin ein Nebenprodukt der Seifenherstellung und fällt auch seit Jahrhunderten bei der Kerzenproduktion an. Seit dem Ende der 1940er Jahre wird es synthetisch aus Propen hergestellt. In den letzten Jahren spielt Glycerin als Nebenprodukt aus der Biodieselproduktion eine immer dominierendere Rolle ([PCK⁺07]). Hier findet eine Umesterung mit Methanol von pflanzlichen Ölen und Fetten statt. Dieses aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnene Glycerin fällt im Verhältnis ca. 1:10 als sogenanntes Rohglycerin mit einem Glyceringehalt von 80 - 82% und den weiteren Inhaltsstoffen Wasser (10 - 15%), NaCl (5 - 7%) und Methanol (0,01 - 0,5%) an ([DLG09]). Rohglycerin kann heutzutage wirtschaftlich zu Reinstglycerin aufgereinigt werden ([PCK⁺07]). Die aus der Bio-Dieselverbreitung resultierende Stilllegung herkömmlicher Anlagen und der Ausbau rohglycerinverarbeitender Anlagen sowie Änderungen in der Förderungspolitik führen zu starken Schwankungen des Glycerinpreises ([ABG07]). Außerdem ist Glycerin ein Stoff mit einem sehr weiten teilweise hochpreisigem Anwendungsspektrum. Glycerin wird u.a. in der Kosmetikindustrie, in der Pharmaindustrie, in der Nahrungs- und Genussmittelindustrie, zur Sprengstoffherstellung, zur Herstellung von Kunststoffen und anderen Chemikalien und als Additiv im Bausektor oder in der Kraftstoffproduktion genutzt ([SP87]). Aus diesen Gründen werden in der Regel für die biotechnologische Produktion von Massenchemikalien häufig andere Substrate wie Glukose bevorzugt ([GSJ⁺09]). Jedoch wird auch Glycerin von einigen Mikroorganismen zur Osmoregulation während des Wachstums auf Glukose

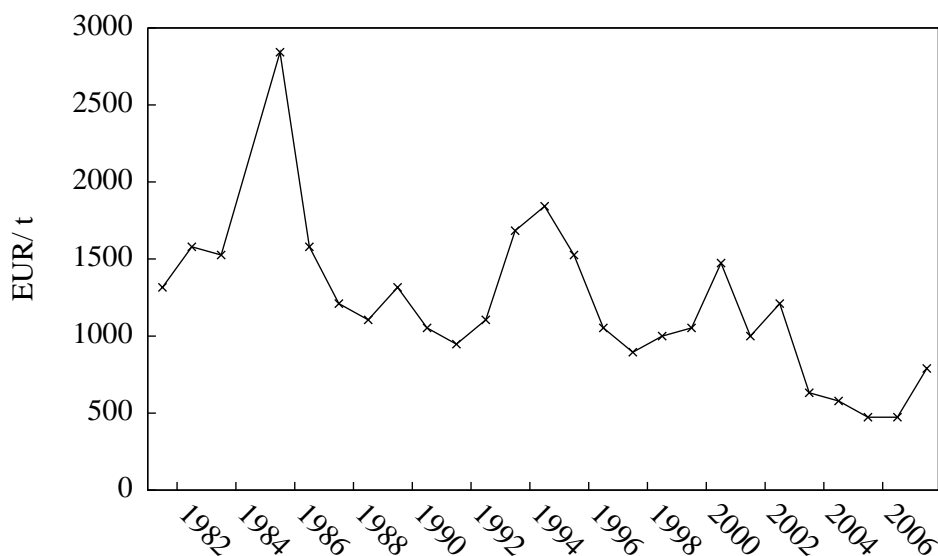


Abbildung 2.3: Europäische Preise für 99,7% Reinstglycerin zwischen 1981 und 2007 ([ABG07])

produziert ([WZFP01]). So produzieren Hefen während der alkoholischen Gärung in der Regel 60-120 g Glycerin pro Liter produziertem Ethanol ([ZB02]). Bei der Ethanolproduktion wird das Glycerin bisher nicht kommerziell genutzt, da dessen Konzentration in der Schlempe für eine wirtschaftliche Aufreinigung zu Reinstglycerin nicht ausreicht. Es gibt zwar Ansätze, die Glycerinkonzentration in der Schlempe auf über 20 g pro 100 g vergärbaren Zucker zu steigern ohne die Ethanolausbeute zu beeinträchtigen, jedoch wird auch dies bisher nicht kommerziell realisiert ([Kam90]). Das in Schlempe enthaltene Glycerin ist somit bisher dem Glycerinmarkt nicht zugänglich und unterliegt deshalb auch nicht seinen Schwankungen. Wenn Glycerin das Zielprodukt ist, können auch osmotolerante Organismen eingesetzt werden, mit denen eine Glycerinkonzentration von 120 g/l erreicht werden kann ([WZFP01]).

2.4 3-Hydroxypropionaldehyd und Acrolein

Die Stoffeigenschaften von 3-HPA und Acrolein sind entscheidend für deren Handhabung und Verhalten während der Produktion und während ihrer Aufreinigung. Acrolein ist ein ungesättigtes aliphatisches Aldehyd und 3-HPA das

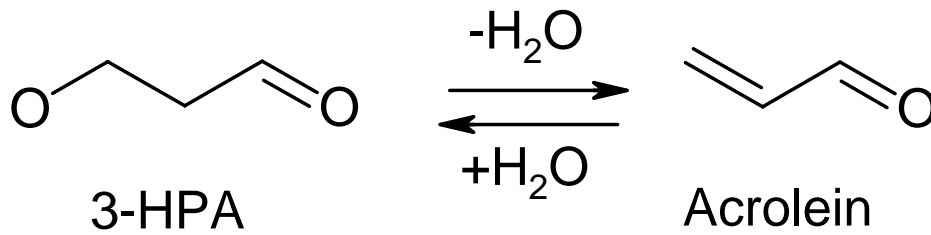


Abbildung 2.4: Chemische Struktur von 3-HPA und Acrolein

dazugehörige gesättigte aliphatische Hydroxyaldehyd (Aldol) ([KSF+00]). Aldehyde dienen oft als Plattformchemikalien, da sie im Allgemeinen sehr reaktiv sind (siehe Abbildung 2.5). So konnte Lüthi-Peng et al. zeigen, dass 3-HPA bereits bei Fermentationsbedingungen (pH 6,25, 37°C) schnell mit Aminosäuren reagiert ([LPSP02]). Aliphatische Aldehyde tendieren dazu zu polymerisieren und zu oxidieren, deshalb werden sie in der Regel während der Lagerung zum Beispiel durch Stabilisatoren, Antioxidantien oder eine Schutzatmosphäre geschützt. Aufgrund ihrer Instabilität ist auch die Aufreinigung von Aldehyden oft schwierig, so dass sie dafür in ein stabileres Derivat oder Oligomer umgewandelt und nach der Aufreinigung daraus wieder isoliert werden müssen ([KSF+00]).

2.4.1 Acrolein

Acrolein wurde 1843 entdeckt, als es sich bei einer Glycerindestillation aus diesem bildete ([Red43]). Acrolein ist eine klare Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 53°C (1 atm) und bildet mit Wasser ein Azeotrop (2,6 gew.-% H_2O im Azeotrop) welches bei 52,4°C siedet (1 atm). Es hat eine Dichte von 0,838 g/cm^3 bei 25°C, einen Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten von $\log P_{OW} = -0,68$, eine Molmasse von 74 g/mol, und löst sich mit bis zu 20,6 Gew.-% bei 20°C in Wasser ([KSF+00], [Eur00a]). Acrolein ist leicht entzündlich, giftig bei Verschlucken und Hautkontakt, sehr giftig beim Einatmen und für Wasserorganismen und kann schwere Verätzungen verursachen. Acrolein kann zwar die DNS schädigen, aufgrund einer kleinen Datenbasis und widersprüchlicher Ergebnisse ist es aber nicht einstuftbar in Bezug auf dessen Karzinogenität bei Menschen (Gruppe 3). Die maximal erlaubte Arbeitsplatzkonzentration liegt bei 0,2 mg/m^3 ([IAR95]).

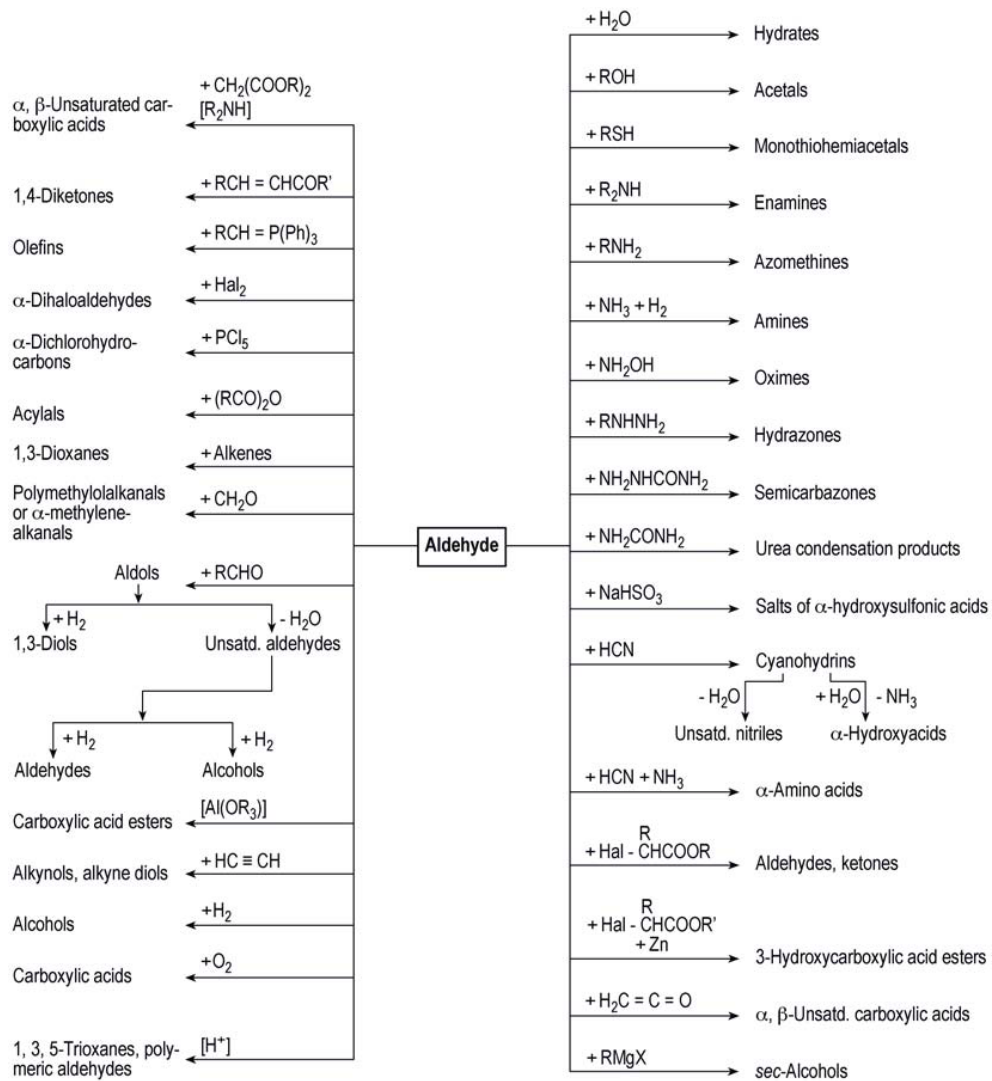


Abbildung 2.5: Allgemeine Reaktionen aliphatischer Aldehyde ([FBH+83])

Heutzutage fungiert Acrolein hauptsächlich als nicht isoliertes Zwischenprodukt auf dem Syntheseweg zu 1,3-PDO, Acrylsäure, Acrylnitril und Acrylat, welche für die Produktion von Lacken, Harzen, Latex, Klebern, Elastomeren, Kunstfasern, Superabsorbentien und Kunststoffen eingesetzt werden. Isoliertes Acrolein wird unter anderem für die Produktion von Methionin, Glutaraldehyd oder als Biozid eingesetzt ([AFH⁺00], [SHG08]).

2.4.2 3-HPA

3-HPA ist eine farblose, hochviskose, vollständig in Wasser lösliche Flüssigkeit mit einer Molmasse von 74 g/mol und mit einem Siedepunkt von 38,1°C bei 0,3 mbar, welche bei höheren Temperaturen zu Acrolein dehydratisiert oder sich zu Formaldehyd und Acetaldehyd zersetzt ([Rüt10], [VGKP03], [LMWG89], [Ber09]). 3-HPA ist nicht REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) registriert. Alle Chemikalien, die in der EU verkauft werden oder in die EU importiert werden, müssen REACH registriert sein. Ausgeschlossen von einer REACH Registrierungsspflicht sind Nahrungsmittelinhaltsstoffe, Pharmazeutika und nicht isolierte Zwischenprodukte. Für vorregistrierte Chemikalien gibt es eine Übergangsfrist. 3-HPA war vorregistriert, hätte jedoch bis zum 30.11.2010 registriert werden müssen ([ECH09]). Deshalb sind nur wenige Informationen über 3-HPA veröffentlicht.

Es gibt keinen „International Uniform Chemical Information Database“ (IUCLID) Datensatz für 3-HPA ([ESI09]). Trotzdem können einige Eigenschaften aus der nahen Verwandtschaft zu Acrolein antizipiert werden. Acrolein ist leicht entzündlich, wenn 3-HPA erhitzt wird dehydratisiert es zu Acrolein und hat dann die selben Eigenschaften. Acrolein gilt auch als sehr stark gewässergefährdend. Jedoch liegt Acrolein in Wasser hauptsächlich als 3-HPA vor, auf dass somit das Gleiche zutrifft ([Eur00a]).

3-HPA liegt in Wasser immer mit Acrolein und mit einem als Reuterin bekannten System aus 3-HPA, 3-HPA Dimer und 3-HPA Hydrat im Gleichgewicht vor, dessen Zusammensetzung von der 3-HPA Gesamtkonzentration abhängt ([VGKP03]) (siehe Abbildung 2.6). Unter sauren Bedingungen und/ oder hohen Temperaturen dehydratisiert 3-HPA leicht wieder zu Acrolein. So ist bekannt, dass Acrolein bei einer Destillation bei ca. 100°C im Ethanoldestillat gefunden werden kann, wenn nach der Alkoholischen Gärung die Sauermai-

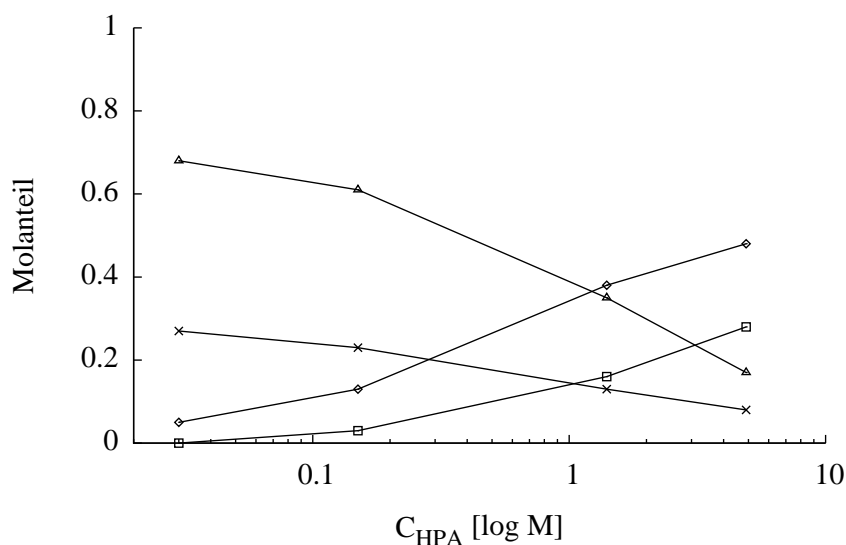


Abbildung 2.6: Konzentrationsabhängige Verteilung des 3-HPA Systems (3-HPA (\times), HPA-Hydrat (Δ), HPA-Dimer (\diamond) und Andere (\square)) in wässriger Lösung bei 20°C ([VL04])

sche einen pH Wert unter 5 hatte ([Kal01]). Bei 40°C und einer Schwefelsäurekonzentration zwischen 0,2 N und 3,8 N liegen 9% des 3-HPA als Acrolein vor, unabhängig von der Säurekonzentration ([HS50]). Das Verhalten bei noch saureren Bedingungen, wie sie auch mit sauren Harzen oder sogenannten Feststoffsäuren erreicht werden können, ist nicht bekannt. Unter Dehydratisierungsbedingungen kann anstelle von Acrolein auch Formaldehyd + Acetaldehyd aus 3-HPA gebildet werden. Dies tritt vermehrt bei hohen Temperaturen auf und wird bei niedrigeren Temperaturen und saureren Bedingungen minimiert ([Ber09], [Lon11]).

3-HPA wirkt toxisch auf eine Vielzahl von gram-positiven Bakterien, gram-negativen Bakterien, Protozoen, Hefen, Pilzen, Bakteriophagen und Viren und ist somit ein wirkungsvolles Desinfektionsmittel, das mit Glutaraldehyd und Formaldehyd konkurrieren könnte ([CLV⁺07], [Rüt10]). 3-HPA könnte auch wie Acrolein als aquatisches Herbizid eingesetzt werden, da dessen Wirkung ja hauptsächlich in Form von 3-HPA erzielt wird ([AFH⁺00]). Ein antibiotischer Effekt von 3-HPA wurde bei *Trypanosoma brucei brucei* infizierten Mäusen festgestellt ([YR92]). Die indirekte Anwendung von 3-HPA durch *L. reuteri* Zellen als probiotisches Nahrungsergänzungsmittel und Konservierungsmittel

ist bereits etabliert und macht eine Anwendung von isoliertem 3-HPA für diesen Bereich nicht notwendig ([Bio09]). 3-HPA wird auch als Mittel zur Zellfixierung vorgeschlagen. Er zeigt eine vergleichbare Fixierungscharakteristik und eine geringere Zytotoxizität im Vergleich zu Glutaraldehyd, jedoch erfolgt die Fixierung deutlich langsamer ([SCLH03]). 3-HPA kann auch direkt als Intermediat zur Produktion von 1,3-Propanediol oder zur Produktion von 3-HP genutzt werden. 1,3-PDO ist ein Monomer der Polytrimethylenterephthalatproduktion ([ZB02]). 3-HP kann in Malonsäure umgesetzt werden und ist ein potentielles Monomer für neuartige Kunststoffe ([WP04]).

2.5 Chemische Verfahren zur Herstellung von 3-HPA und Acrolein

Eine biotechnologische Produktion von 3-HPA oder Acrolein muss mit den chemischen Verfahren konkurrieren. 3-HPA wird bis heute nur als nicht isoliertes Zwischenprodukt der 1,3-PDO Produktion synthetisiert und ist nicht auf dem Markt erhältlich. Im sogenannten „Degussa-Prozess“ wird 1,3-Propanediol über 3-HPA und Acrolein aus Propen produziert ([AW93]). Der katalytische Schritt von Propen erreicht eine Ausbeute von 90% und einen Umsatz von 97,54% ([BMM+03]). Nach Brossmer et al. ([BA00]) wird die Transformation von Acrolein zu 3-HPA mit einem Umsatz von 93% bei 50°C an einem Kationenaustauscher innerhalb von einer Stunde vollzogen. Vergleichbare Umsätze lassen sich auch bei 20°C und neutralem pH durch Hydratisierung in Wasser erreichen ([Eur00a]). Die Ausbeute der Umwandlung von 3-HPA zu 1,3-PDO beträgt 78% ([AW93].)

Ein weiterer Ansatz ist der „Shell-Prozess“. Ethylenoxid wird durch Hydroformulierung in 3-HPA und 1,3-PDO umgewandelt ([AS94]). Da das Zielprodukt des Shell-Prozesses 1,3-PDO ist, muss das erzeugte 3-HPA in einer zweiten Reaktion, zum Beispiel mit der oben beschriebenen Reaktion, in 1,3-PDO umgewandelt werden ([AW93]). Es wurden auch Katalysatoren gefunden, die in der Lage sind statt der 3-HPA/ 1,3-PDO Mischung aus Ethylenoxid 100% 3-HPA zu synthetisieren was aber für den Shellprozess nicht zielführend war ([AS94]). Der Shell-Prozess wurde von Allen et al. dahingehend verbessert, dass 1,3-PDO aus Ethylenoxid in einem einzigen Schritt mit einer Ausbeute von 81% durch

Minimierung der 3-HPA Synthese produziert werden kann ([AKP⁺05]). Anstatt die aus der Petrochemie stammenden Grundstoffe Propen und Ethylenoxid zur Produktion von 3-HPA beziehungsweise Acrolein zu nutzen, kann Glycerin chemisch zu Acrolein dehydratisiert werden. ([BMS⁺06], [CWLX09]). Hierbei wird 5 Gew.-% Glycerin in wässriger Lösung bei 150 bar und 345°C katalysiert mit $2,5 \cdot 10^{-3}$ Gew.-% Phosphorsäure umgesetzt. Die Ausbeute beträgt 71,8% ([BMS⁺06]). Versuche mit auf Zeolithen basierenden Katalysatoren zeigen eine überlegene Leistung, jedoch wird auch ersichtlich, dass bei der Verwendung von Rohglycerin (50 gew.-%) Verunreinigungen zu einem Verblocken des Reaktors nach fünf Stunden führen ([JLS⁺10]). Eine chemische Umwandlung des in Schlempe enthaltenen Glycerins ist somit unrealistisch, da die Glycerinkonzentrationen zu gering sind und die Schlempe zu viele andere Stoffe enthält. Sollte es gelingen Acrolein chemisch aus nachwachsenden Rohstoffen zu produzieren, könnte dies wieder wie oben beschrieben chemisch in 3-HPA umgewandelt werden.

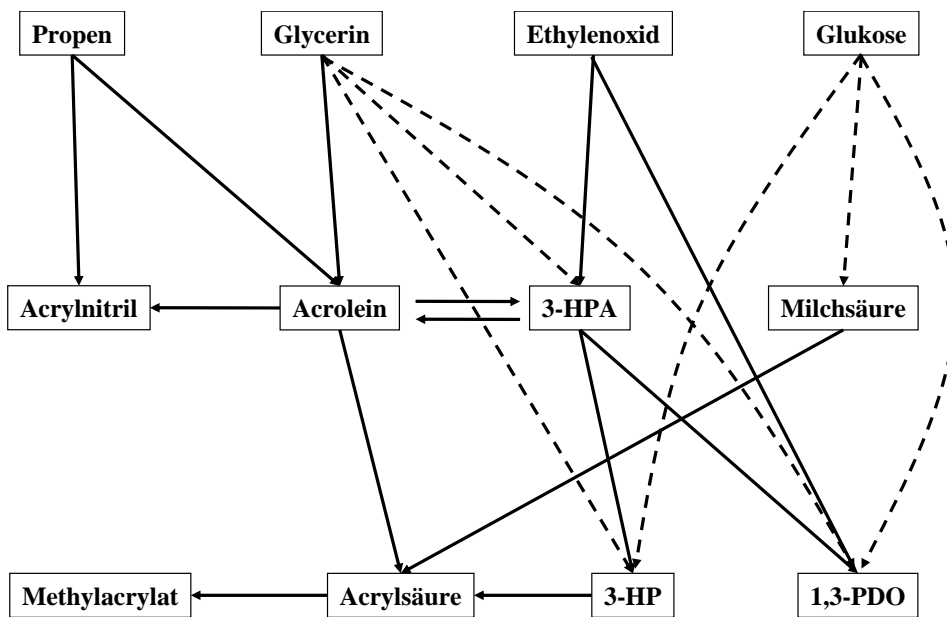


Abbildung 2.7: Etablierte chemische (-) und biologische (--) Reaktionen rund um Acrolein und 3-HPA ([BMM⁺03], [BMS⁺06], [AS94], [AKP⁺05], [AW93], [Eur00a], [ZLC08], [KHS08], [HBM⁺00][Rap08b], [ZB02], [Ste05], [GSJ⁺09], [Bes00], [FT08]),

2.6 Biologische Verfahren zur Herstellung von 3-HPA und Acrolein

Eine hohe Selektivität und Ausbeute auch bei stark verdünnten Ausgangsmethoden mit vielen Verunreinigungen kann durch biologische Verfahren anstelle von chemischen Verfahren erreicht werden.

Es ist bisher kein Organismus bekannt, der in der Lage ist, direkt Acrolein zu produzieren. Vermeintliche Entdeckungen waren darauf zurückzuführen, dass Acrolein während der analytischen Auswertung aus dem von Organismen produzierten 3-HPA entstanden ist ([SS60]). Es gibt viele verschiedene Ansätze 3-HPA biotechnologisch aus nachwachsenden Rohstoffen zu produzieren. 3-HPA kann über einen einzelnen enzymatischen Schritt mit Hilfe der Glycerindehydratase aus Glycerin erhalten werden. Wenn jedoch ausreichend NADH durch Glycolyse vorhanden ist, wird 3-HPA kaum akkumuliert und stattdessen 1,3-PDO, das Endprodukt der Glycerinfermentation, gebildet (siehe auch Kapitel 2.2.1). Eine weitere Herausforderung für die 3-HPA Produktion stellt dessen toxischer Effekt auf die produzierenden Organismen und seine Umgebung dar (siehe Kapitel 2.4). Bisherige Strategien zur Steigerung der 3-HPA Produktion können auf zwei Grundideen zurückgeführt werden, die Stimulation der 3-HPA Produktion und die Vermeidung inhibierender 3-HPA Konzentrationen. Ansätze zur Stimulation der 3-HPA Produktion sind:

- Co-Kultivierung mit einem artfremden Mikroorganismus, der durch seine Anwesenheit eine stärkere 3-HPA Exkretion provoziert.
- Anwendung eines zweistufigen Prozesses. Biomasseproduktion in einem ersten Schritt und als zweiten Schritt eine Biotransformation in einem glycerinhaltigen Medium, das durch Mangel einer geeigneten Kohlenstoffquelle kein Wachstum und keine NADH Produktion ermöglicht. 3-HPA wird akkumuliert und die Produktion von 1,3-PDO und anderer Nebenprodukte minimiert.
- Expression der für die Exkretion von 3-HPA und dessen Biokonversion aus Glycerin notwendigen Gene in einem schnell wachsenden und einfach zu kultivierenden Organismus.

- Überexpression von Genen, die für die 3-HPA Produktion vorteilhaft sind und Entfernung derer, die sie behindern.
- Unterbinden der Reaktion von 3-HPA zu 1,3-PDO mit geeigneten Chemikalien.

Ansätze, um inhibierende 3-HPA Konzentrationen zu vermeiden sind:

- Nutzung 3-HPA resistenter Organismen (zum Beispiel *L. reuteri* ATCC 53608).
- Anwendung einer Festbettkultivierung zur schnellen Produktabtrennung.
- Binden des 3-HPA mit sogenannten Aldehydfängern, die mit ihm einen nichttoxischen Komplex bilden (siehe Kapitel 2.7 auf Seite 25).
- *In situ* 3-HPA Entfernung (siehe Kapitel 2.7 auf Seite 25).

1997 wurde in einem Patent die Co-Kultivierung von *L. reuteri* and *E. coli* K12 beschrieben ([DL97]). Bei $\frac{CFUE. coli/ml}{CFUL. reuteri/ml} > 0,5$ wurde *L. reuteri* dazu provoziert, im Vergleich zu der Abwesenheit des *E. coli* K12 vermehrt 3-HPA zu exkretieren. Es ist dabei nicht notwendig, dass der zweite, artfremde Organismus Glycerin verstoffwechseln kann. Die 3-HPA Produktionsrate pro *L. reuteri* „Colony forming units“ (CFU) ist direkt proportional zu den CFU des *E. coli* K12. Die stimulierende Wirkung eines artfremden Organismus bedarf Zellkontakt zwischen den Organismen und beide müssen vital sein. Dies bedeutet, dass die 3-HPA Exkretion sich wieder verringert, wenn der zweite Organismus durch das im Medium vorhandene 3-HPA abgetötet wird. Der Botenstoff, der *L. reuteri* dazu verleitet mehr 3-HPA zu exkretieren, konnte nicht ermittelt werden. Aus diesen Gründen wurde in dem Patent dieser Ansatz nicht weiter verfolgt, sondern der zweistufige Prozess, beschrieben bei Slininger et al., Lüthi-Peng et al. und Doleyres et al., als vorteilhafter betrachtet ([SVB90], [LPSP02], [DBVL05]). Dobrogosz et al. waren in der Lage mit der Co-Kultivierung sowie mit dem zweistufigen Prozess eine 3-HPA Konzentration von 96 MIC (ca. 9,6 mM ([LPSP02])) zu erreichen ([DL97]).

Der zweistufige Prozess wurde von Slininger et al. ([SBS83]) etabliert und von Vancauwenberge et al. ([VSB90]), Lüthi-Peng et al. ([LPSP02]), Doleyres et al. ([DBVL05]) und Rütli et al. ([Rüt10]) weiter untersucht. Die allgemeine Strategie des zweistufigen Prozesses besteht darin, im ersten Schritt

3-HPA produzierende Mikroorganismen wie *L. reuteri*, die Glycerin nicht für die Glycolyse nutzen können, in einem nährstoffreichen glycerinhaltigen Medium zu kultivieren, um einen schnellen Biomasseaufbau und die Induktion der Glycerindehydratase (GDHt) zu erreichen. Hierbei sollte möglichst wenig 3-HPA und andere Nebenprodukte gebildet werden. Die Biomasse wird dann von der Fermentationsbrühe abgetrennt und die Brühe entsorgt. Im zweiten Schritt werden die Zellen in einer wässrigen Glycerinlösung resuspendiert und vollführen die Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA. Lüthi-Peng et al. konnten zeigen, dass bei einer Biotransformation in MRS Medium statt in Wasser supplementiert mit Glycerin höhere 3-HPA Konzentrationen erreicht werden. In MRS Medium ist 3-HPA jedoch auch weniger stabil ([LPSP02]). Eine Biotransformation in Schlempe oder in Rohglycerin wurde bisher nicht untersucht. Auch die optimalen Parameter zur 3-HPA Produktion in Schlempe sind unbekannt. Der limitierende Faktor des zweistufigen Prozesses ist der Tod der Bakterien durch das akkumulierte 3-HPA. Mit dem zweistufigen Prozess und *L. reuteri* ATCC 53608 konnten Lüthi-Peng et al. bei 37°C und 200 mM Glycerin in Wasser eine 3-HPA Konzentration von 170 mM und eine Ausbeute von 85% erreichen ([LPSP02]). Doleyres et al. erreichten bei 30°C und 400 mM Glycerin in Wasser eine 3-HPA Konzentration von 235 ± 3 mM und eine Ausbeute von 62% ([DBVL05]).

Eine Kostenreduktion der 3-HPA Produktion wurde von Schaffer et al. angestrebt ([SWH08]). Sie nutzten *Bacillus megaterium* DSM 319, das in der Lage ist aerob zu wachsen, den Kofaktor Cobalamin (Co-Enzym Vitamin B12) zu produzieren und eine 3-HPA Konzentration von 160 mM im ruhenden Zustand zu tolerieren. In *B. megaterium* wurde die Glycerindehydratase und der Co-Enzym Vitamin B12 Reaktivierungsfaktor aus *L. reuteri* ATCC 55730 erfolgreich überexprimiert und weitere Gene so überexprimiert beziehungsweise unterexprimiert, dass die 3-HPA Produktion gesteigert wurde. Auch dieser Organismus soll mit dem zweistufigen Prozess (beschrieben auf Seite 22) genutzt werden. Die erreichten 3-HPA Konzentrationen und Ausbeuten wurden nicht veröffentlicht.

Toraya et al. haben den Weg gewählt, *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 25955 oder *E. Coli* JM 109 mit überexprimierter Glycerindehydratase und dessen Reaktivierungsfaktor aus *K. Pneumoniae* ATCC 25955 mit Toluol zu behan-

deln, um diese abzutöten und die Zellwand zu perforieren. Die so behandelten *K. Pneumoniae* Zellen, welche normalerweise auf Glycerin wachsen und 1,3-PDO bilden anstatt 3-HPA zu akkumulieren, sowie die genetisch veränderten *E. Coli* waren beide in der Lage, 196 mM 3-HPA mit einer Ausbeute von 98% zu produzieren. Allerdings musste dem Medium Vitamin B12 zugesetzt werden ([TYM⁺08]).

Das maximal produzierte 3-HPA ist durch den Tod der Organismen limitiert. Um hohe 3-HPA Konzentrationen und eine mehrmalige Verwendung des Biokatalysators zu erreichen, können 3-HPA resistente Stämme wie *L. reuteri* ATCC 53608 oder *L. reuteri* ATCC 55730 verwendet werden ([VL04], [Rüt10]).

Eine Festbettkultivierung von *L. reuteri* ATCC 55730 wurde erfolgreich an der ETH Zürich durchgeführt. Erreichte maximale 3-HPA Konzentrationen lagen mit 239 mM in derselben Größenordnung wie die bei der dispersen Transformation. Mit drei sequentiellen einstündigen Transformationen bei 20°C wurden kumuliert bis zu 316 mM 3-HPA produziert. Jedoch war eine Revitalisierung der Zellen durch eine Inkubation in MRS Medium nach der Transformationssequenz in keinem der untersuchten Fälle erfolgreich, sondern durch ein Absterben der Zellen gekennzeichnet ([Rüt10]). Bei Transformationen mit immobilisierten *L. reuteri* ATCC 55730 bei 35°C unter Anwesenheit des Aldehydfängers Carbohydrazid konnten mit einer Produktivität von über 10 g/l·h 10 sequentielle dreistündige Durchgänge ohne Produktivitätsverlust durchgeführt werden. Es wurden kumulativ 67 g 3-HPA produziert ([HKK⁺10]).

Durch diese Aldehydfänger kann die Umwandlung von 3-HPA in 1,3-PDO unterdrückt werden ([SVB90] [VSB90] [Ulm07]). Aldehyde reagieren zum Beispiel reversibel mit Semicarbazid oder Carbohydrazid, wodurch die Aldehydgruppe kaschiert wird. Das so gebundene 3-HPA kann nicht weiter zu 1,3-PDO reagieren, und es verliert seine toxische Wirkung auf die produzierenden Mikroorganismen. Andererseits sind Aldehydfänger aufgrund ihrer Reaktivität selbst auch gesundheitsgefährdend oder sogar toxisch ([Sig12a], [Sig12b]). Mit dem Einsatz von Aldehydfängern kann während einer Fermentation die 3-HPA Endkonzentration auf 54 g/l mit Semicarbazid ([Ulm08]) und auf 150 g/l mit Carbohydrazid gesteigert werden ([KWV12]). Die Spaltung von 3-HPA und Aldehydfänger sowie die Rückgewinnung der Aldehydfänger gestaltet sich jedoch schwierig (siehe auch Kapitel 2.7).

Wenn 3-HPA beziehungsweise Acrolein als Plattformchemikalie für die Produktion von Acrylsäure aus nachwachsenden Rohstoffen herangezogen werden soll, muss der in dieser Arbeit behandelte Prozess auch mit der Acrylsäureproduktion aus 3-HP oder Milchsäure konkurrieren. Beide können biotechnologisch produziert werden und sind nicht so toxisch wie Acrolein (siehe Kapitel 2.4). Eine Milchsäureproduktion im industriellen Maßstab ist bereits etabliert ([BAS09], [Uhd09], [Vol09]). Milchsäure kann chemisch zu Acrylsäure mit einer Ausbeute von 67,9% umgewandelt werden ([ZLC08], [YST+11], [SYT+10]). Die patentierte chemische Dehydratisierung von 3-HP zu Acrylsäure hat eine Ausbeute von 87% ([KHS08]). Auch 1,3-PDO kann direkt fermentativ aus Glycerin ([XZ08], [ZB02]) oder Glukose ([Ste05]) gewonnen werden. Allerdings ist die Aufreinigung von 3-HP, Milchsäure oder 1,3-PDO deutlich aufwendiger als die Aufreinigung von Acrolein ([GSJ+09], [DH06], [SST+69]).

2.7 Verfahren zur Aufreinigung von 3-HPA und Acrolein

Aufgrund seines niedrigen Siedepunktes wird Acrolein in der Regel destillativ aus wässrigen Lösungen gewonnen. Da Acrolein dazu neigt unter Hitze zyklische Dimere und Polymere zu bilden, die zu Fouling in der Kolonne und Produktverlust sowie zur Verunreinigung des Produkts führen können, wird während der Destillation meistens ein Polymerisationsinhibitor (zum Beispiel Hydrochinon) zugegeben. Die Menge der Zersetzungsprodukte steigt exponentiell mit der Temperatur und folgt dem Potenzgesetz gegenüber Acroleinkonzentration und Verweilzeit. Um die Temperaturen zu reduzieren, wird bei einem Druck zwischen Umgebungsdruck und 100 mbar, häufig bei einem Druck um 600 mbar, destilliert ([SDS03], [BTM75], [SST+69]).

3-HPA zersetzt sich bei höheren Temperaturen, deshalb ist eine Destillation nur mit großen Verlusten bei sehr niedrigen Drücken möglich ([Nef04a], [Nef04b]). Hall und Stern erreichten eine Ausbeute von weniger als 20% bei einer Destillationstemperatur von 38°C ([HS50]). Obwohl 3-HPA sehr hydrophil ist, schlagen Arntz und Wiegand eine Extraktion von 3-HPA mit kurzkettingen Estern oder Isobutanol vor, es wurden aber keine Ergebnisse zur Effektivität bestimmter Lösungsmittel veröffentlicht ([AW93]). Ulmer ermittelt den

Nernstschen Verteilungskoeffizienten von 3-HPA zwischen Isobutanol und Wasser zu $P_{SW} = 0,67$. Die Bedingungen, unter denen der Verteilungskoeffizient ermittelt wurde, sind nicht veröffentlicht ([Ulm08]). Um 3-HPA zu entfernen, kann es auch mit einer chemischen Reaktion gebunden werden. Stickstoffverbindungen mit mindestens einer primären Aminogruppe wie Aminoguanidinsalze, Aminophenole, Hydroxylamine, Hydrazide, Hydrazo-Verbindungen, Semicarbazide, Naphthalindiamine, Ethylendiamine, Bisulfite wie Alkalibisulfite, Natriumbisulfite, Kaliumbisulfite, Thiole wie Dodecanthiol, Alkohole wie Polyvinylalkohol oder stark basische Ionenaustauscher wie Amberlite IRA 400 werden in vielen Bereichen als sogenannte Aldehydfänger eingesetzt ([BSNL06], [KRW+87], [MSS+06], [KKF06], [RC81], [AHM65]). Für eine Anwendung zur *in-situ* Entfernung von 3-HPA aus Fermentationsbrühe, sollte ein potentieller Aldehydfänger darüber hinaus in der Lage sein, sich von 3-HPA zu lösen, ohne das 3-HPA oder den Aldehydfänger zu verändern, wenig toxisch wirken und sich leicht von der Wasserphase separieren lassen. Aldehyde binden reversibel an Alkoholgruppen (R-OH), Aminogruppen ($R - NH_2$), Azidgruppen ($R - NHNH_2$), Thiolgruppen (R-SH), Wasser (Hydratisierung) und sich selbst (Dimerisation) über eine Gleichgewichtsreaktion (Abbildung 2.5). Bisulfite hingegen zerfallen bei einer Spaltung vom Aldehyd in Schwefeldioxid und Wasser ([LKK05]).

Rütti hat das Bindungsvermögen von 3-HPA an Polyvinylalkohol (Mw 89000-98000), nichtionischen hydrophoben Adsorbentien (Amberlite XAD-16), immobilisierten Sulfitionen (Amberlite IRP-69), stark basischen Ionenaustauschern (Amberlite CG-400), immobilisierten Aminogruppen (Dünnschichtchromatographie) und immobilisierten Hydrogensulfit (Amberlite IRA-400) bei 20°C untersucht. Keine Bindung von 3-HPA konnte bei den ersten drei beobachtet werden. 3-HPA bindet irreversibel an Amberlite CG-400 und die immobilisierten Aminogruppen verzögern nur teilweise die Eluation von 3-HPA, binden dies aber nicht dauerhaft. Die immobilisierten Hydrogensulfite zeigten ein gutes Binden und Lösen von 3-HPA, konnten aber nicht wiederverwendet werden, da die Hydrogensulfite mit dem 3-HPA zusammen als Addukt von dem Träger mit dem NaCl gesättigten Eluat gelöst wurden. Nach Gefriertrocknung des Eluats und anschließender Ethanolextraktion des 3-HPA und destillativen Entfernung des Ethanols konnte 3-HPA nur mit einer Reinheit von 34,1 mol-%

gewonnen werden. Darüber hinaus wurde bei *in-situ* Anwendung des Amberlite IRA-400 die 3-HPA Produktion inhibiert ([RLJ⁺11], [RLJ⁺11]).

Vielversprechende Ergebnisse beim Binden von 3-HPA mit Hydrazidgruppen erzielten Ulmer et al. und Krauter et. al.. Sie waren in der Lage in der Anwesenheit von Semicarbazid 54 g/l 3-HPA und in der Anwesenheit von Carbohydrazid 150 g/l 3-HPA jeweils als Addukt ohne signifikante Akkumulation von freiem 3-HPA in der Fermentationsbrühe zu erreichen ([Ulm07], [KWV12], siehe auch Kapitel 2.6). Für die Separation von 3-HPA schlägt Ulmer die Fällung des Addukts aus Hydrazidkomplex und 3-HPA durch Einwirkung von Hitze vor. Die Rückgewinnung von 3-HPA und Hydrazidkomplex soll anschließend durch saure Spaltung des Addukts oder durch eine Verdrängung des 3-HPA mit Aceton erfolgen. Die Spaltung von gelösten 3-HPA-Azidkomplex bei sauren Bedingungen sowie die leichte Fällbarkeit von Semicarbazid und Carbohydrazid ist seit langem bekannt ([Jen59], [CH95]). Ulmer konnte zeigen, dass sich 3-HPA aus dem 3-HPA-Azid Addukt vor der Fällung durch Aceton verdrängen lässt, hat jedoch nicht den vollständigen Aufreinigungsprozess untersucht. Auch Krauter et al. haben ihr angestrebtes Aufreinigungsverfahren nicht beschrieben ([KWV12]).

Abgesehen von dem problematischen und mit hohen Verlusten versehenen Destillationsansatz und dem problematischen Hydrogensulfitansatz war bisher nur eine chromatographische Aufreinigung von 3-HPA erfolgreich. Hierbei wurde nach der Biotransformation in Wasser mit 200 mM Glycerin das gefilterte Medium gefriergetrocknet, in Aceton gelöst und mit Aceton : Ethylacetat über eine präparative Silica Gel 60 Säule eluiert. Nach der Entfernung der Lösungsmittel mit Vakuumdestillation wurde das Produkt wieder mit Aceton : Ethylacetat über eine präparative Silica Gel 60 Säule eluiert und anschließend das Lösungsmittel mit Vakuumdestillation entfernt. Insgesamt betrug die Ausbeute an reinem 3-HPA 45% des ursprünglich eingesetzten Glycerins bei einer Ausbeute der Produktion von 85% ([VGKP03]). Für die Produktion einer Massenchemikalie im industriellen Maßstab scheint diese Methode nicht geeignet.

Kapitel 3

Ziele und Aufgabenstellung

Die Produktion einer Plattformchemikalie für Acrolein-basierte Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen ist von großem wirtschaftlichen Interesse. Der Stand der Forschung zeigt, dass vor allem vier Ansätze miteinander konkurrieren. Die chemische Umsetzung von Glycerin aus der Biodieselherstellung zu Acrolein, die biotechnologische Produktion von 3-HP aus Glukose, die chemische Umsetzung von biotechnologisch aus Glukose produzierter Milchsäure zu Acrylsäure und die biotechnologische Produktion von 3-HPA aus Glycerin. Bei allen vier Ansätzen sind noch schwerwiegende Probleme zu lösen, bevor eine wirtschaftliche Produktion im industriellen Maßstab realisierbar ist. So benötigt die chemische Umsetzung zu Acrolein reines, relativ hoch konzentriertes Glycerin, das aufgrund der vielen Anwendungsmöglichkeiten einem schwer berechenbaren Markt und großen Preisschwankungen unterliegt. Die Produktion von Milchsäure (2-Hydroxypropionsäure) und 3-HP (3-Hydroxypropionsäure) hat mit hohen Nährstoffkosten, einer aufwendigen Aufreinigung und im Falle von 3-HP mit einer geringen Produktivität zu kämpfen. Dagegen hat die Produktion von 3-HPA aufgrund seiner hohen Reaktivität das Potential zu einer kosteneffektiven Aufreinigung und der einfache enzymatische Schritt von Glycerin zu 3-HPA ermöglicht eine hohe Produktivität. Jedoch zeigt der Stand der Forschung, dass auch die biotechnologische Produktion von 3-HPA mit hohen Nährstoffkosten und unzuverlässigen Substratkosten zu kämpfen hat. Darüber hinaus konnte eine kosteneffektive Aufreinigung unter Ausnutzung der Reaktivität von 3-HPA bisher nicht etabliert werden. Die Besinnung auf den kontaminierten Ethanolprozess scheint vielversprechend, da hier lebens-

mittelkonforme Bakterien 1) auf einem günstigen Substrat wachsen, 2) eine bisher ungenutzte Glycerinquelle verwenden und 3) das Produkt in Form von Acrolein leicht über das großtechnisch einsetzbare Verfahren der Destillation aus der Fermentationsbrühe entfernt wird. Jedoch zeigt der Stand der Forschung, dass die genauen Vorgänge während einer Infektion der alkoholischen Gärung noch nicht detailliert untersucht wurden.

3.1 Ziele

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb zu prüfen, ob sich Denkanstöße aus dem kontaminierten Ethanolprozess nutzen lassen, um die Probleme der biotechnologischen Produktion von 3-HPA aus Glycerin zu minimieren, und ob eine Integration der Produktion einer Plattformchemikalie für Acrolein-basierte Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen in den Bioethanolprozess im Sinne des Bioraffineriekonzeptes möglich ist, um etwaige Synergieeffekte zu nutzen. Darüber hinaus soll eine erste Abschätzung der Wirtschaftlichkeit eines potentiellen Prozesses zur Acroleinproduktion mit den gewonnenen Erkenntnissen durchgeführt werden (siehe Kapitel 7).

Um den Arbeitsaufwand in einem überschaubaren Rahmen zu halten, sollen sich die folgenden Untersuchungen auf den lebensmittelkonformen *L. reuteri* ATCC 53608, den bisher besten 3-HPA Produzenten, und auf Sirup beziehungsweise DDGS aus Weizen beschränken. In einer späteren Anwendung der Erkenntnisse wird zwar eine Verwendung von Sauermaische oder Schlempe angestrebt, jedoch wird aufgrund ihrer begrenzten Lagerfähigkeit und im Sinne reproduzierbarer Ergebnisse auf den Sirup und DDGS zurückgegriffen.

Das Forschungsfeld der biotechnologischen 3-HPA Produktion aus Glycerin, in dem mögliche Verbesserungsansätze überprüft werden sollen, lässt sich in drei Bereiche einteilen:

- Die Produktion des biologischen Ganzzellkatalysators *L. reuteri* ATCC 53608, welcher die Reaktion von Glycerin zu 3-HPA katalysiert (siehe Kapitel 4).
- Die Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA durch den Ganzzellkatalysator *L. reuteri* ATCC 53608 (siehe Kapitel 5).

- Die Abtrennung und Aufreinigung des 3-HPA aus der Fermentationsbrühe mit geeigneten Mitteln (siehe Kapitel 6).

3.2 Hypothesen

Bezüglich der noch offenen Fragen, die sich aus dem Stand der Forschung ergeben, werden folgende Hypothesen aufgestellt.

3.2.1 Biokatalysatorproduktion

- Das bisher zur Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 verwendete MRS+ Medium ([DMRS60]) enthält mehr Nährstoffe als es benötigt.
- Das Glycerin in Nebenprodukten der Bioethanolherstellung (Sirup, DDGS) induziert die Produktion des für die Umwandlung von Glycerin in 3-HPA zuständigen Enzyms und steigert somit die spezifische Aktivität des Enzyms während der Biotransformation.
- *L. reuteri* ATCC 53608 ist in der Lage Hefezellen zu lysieren, wodurch hefehaltige Nebenprodukte der Bioethanolherstellung (Sirup, DDGS) die Extrakte im Wachstumsmedium ersetzen können.
- *L. reuteri* ATCC 53608 zeigt eine so hohe Ethanolresistenz, dass es ihm möglich ist, in Sauermaische zu wachsen.

3.2.2 Biotransformation

- *L. reuteri* ATCC 53608 ist in der Lage in Nebenprodukten der Bioethanolherstellung (Sirup, DDGS) eine Biotransformation durchzuführen und das darin enthaltene Glycerin für die Produktion von 3-HPA zu nutzen.
- Die weiteren Bestandteile der Nebenprodukte der Bioethanolherstellung (Sirup, DDGS) fördern die Akkumulation von 3-HPA durch *L. reuteri* ATCC 53608.
- *L. reuteri* ATCC 53608 zeigt eine so hohe Ethanolresistenz, dass es ihm möglich ist, in Sauermaische die Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA durchzuführen.

3.2.3 Aufreinigung

- Eine Dehydratisierung von 3-HPA unter sehr sauren Bedingungen und milden Temperaturen kann eine Bildung von Acetaldehyd und Formaldehyd anstelle von Acrolein minimieren.
- Die Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein lässt sich in Kombination mit der Destillation dazu nutzen, um biotechnologisch produziertes 3-HPA aus dem Transformationsmedium zu entfernen und auf nichtinhibierende Konzentrationen zu senken.
- Die Dehydratisierung von 3-HPA und die Entfernung von Acrolein lässt sich auch mit geeigneten Feststoffsäuren bei Biotransformationsbedingungen durchführen, um eine *in-situ* Abtrennung zu ermöglichen.

3.2.4 Kostenschätzung

- Mit den vorhandenen Informationen und in diesem Projekt ermittelten Daten lassen sich die Kosten eines potentiellen Prozesses abschätzen.
- Die Kosten für die Produktion der Plattformchemikalie Acrolein aus nachwachsenden Rohstoffen liegen mit einem in diesem Projekt entwickelten Prozess in einem Bereich, der mit den aktuellen Produktionskosten bei entsprechender Prozessoptimierung in naher Zukunft vergleichbar ist.

3.3 Aufgaben

Aus dem Stand der Forschung und den aufgestellten Hypothesen lassen sich folgende Aufgaben ableiten.

3.3.1 Biokatalysatorproduktion

- Überprüfung, ob einzelne MRS Komponenten für das Wachstum von *L. reuteri* ATCC 53608 obsolet sind.

- Der Effekt von Glycerin auf das Wachstum und die GDHt Aktivität soll untersucht werden, da die Nebenprodukte aus der Bioethanolproduktion auch Glycerin neben den Hefezellen enthalten, welche das Potential haben könnten, die Extrakte im Wachstumsmedium zu ersetzen.
- Es soll überprüft werden, ob *L. reuteri* ATCC 53608 in der Lage ist Hefezellen zu lysieren und die Nebenprodukte der Bioethanolproduktion für das Wachstum zu nutzen.
- Es soll überprüft werden, ob *L. reuteri* ATCC 53608 in der Lage ist bei den in der Süßmaische üblichen Ethanolkonzentrationen zu wachsen. Dies soll dazu dienen abschätzen zu können, ob es möglich ist, die Acroleinproduktion an dieser Stelle in Bioethanolprozess zu integrieren.
- Es soll überprüft werden, ob durch eine unsterile und unbegaste Biokatalysatorproduktion wie er bei der Bioethanolproduktion üblich ist, Nachteile entstehen welche den Kostenvorteil entgegenstehen würden.
- Es soll überprüft werden, ob durch Veränderung der Prozessführung die spezifische GDHt Aktivität gesteigert werden kann. Hier wurde bisher eine Titration mit Ammoniak, eine Glukosezufütterung und eine kontinuierliche Prozessführung nicht untersucht.

3.3.2 Biotransformation

- Transformation in Nebenprodukten der Bioethanolherstellung bei verschiedenen Feststoffkonzentrationen, pH Werten, Biokatalysatorkonzentrationen, Temperaturen, Drücken und unter verschiedenen Atmosphären.
- Es soll überprüft werden, ob *L. reuteri* ATCC 53608 in der Lage ist bei den in der Süßmaische üblichen Ethanolkonzentrationen die Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA durchzuführen. Dies soll dazu dienen abschätzen zu können, ob es möglich ist die Acroleinproduktion an dieser Stelle in Bioethanolprozess zu integrieren.

3.3.3 Aufreinigung

- Test verschiedener Verfahren und Hilfsstoffe zur reaktiven Entfernung und Aufreinigung von 3-HPA aus dem Transformationsmedium. Dies soll dazu dienen entscheiden zu können, ob bisher untersuchte oder die hier getesteten Ansätze in der Lage sind, effektiver zu sein als die Aufreinigung mittels Dehydratisierung und Destillation.
- Bestimmung der Dehydratisierungskinetik bei verschiedenen Temperaturen und Säurekonzentrationen.
- Vergleich der Effektivität von Vakuum-Reaktivdestillation und reaktiven Gas-Stripping bei 37°C zur Entfernung von 3-HPA über Acrolein.
- Vergleich verschiedener Feststoffsäuren auf ihre Eignung 3-HPA zu Acrolein bei 37°C zu dehydratisieren.

3.3.4 Kostenschätzung

- Kostenschätzung mit Hilfe einer rigorosen Auslegung. Equipmentkosten und Hilfsstoffkosten sollen mit der Exponentenmethode abgeschätzt werden und alle weiteren Kostenpunkte mittels Zuschlagsfaktoren.
- Eine Sensitivitätsanalyse soll zeigen, welche Faktoren den größten Einfluss auf die Produktkosten haben und wo eine Optimierung des Prozesses das größte Potential hat.

Kapitel 4

Biokatalysatorproduktion

4.1 Einleitung

Die Kosten der Biokatalysatorproduktion haben einen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtkosten des Produktionsprozesses, vor allem wenn die Katalysatorstandzeit begrenzt ist. Die Kosten der Katalysatorproduktion lassen sich durch die Reduzierung der Substrate auf die Minimalanforderungen und durch den Ersatz reiner Komponenten durch günstigere Komplexsubstrate wie Schlempe reduzieren. Auch die Vereinfachung der Biokatalysatorproduktion, zum Beispiel durch einen unsterilen und unbegasteten Betrieb sowie eine Steigerung der Ausbeute, kann Investitionskosten und Betriebskosten sparen.

Die optimalen Parameter für eine Batch-Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 in MRS Medium sind bekannt ([DBVL05]). Auch ein an die Bedürfnisse des sehr ähnlichen *L. reuteri* ATCC 55730 angepasstes definiertes Medium ist bekannt ([SSPV06]). Jedoch wurde der aus Schweinedärmen isolierte *L. reuteri* ATCC 53608 bisher nicht in Nebenprodukten aus der Bioethanolherstellung kultiviert und deren Einfluss auf das Wachstum und die GDHt Aktivität untersucht. Darüber hinaus ist bekannt, dass *L. reuteri* ATCC 53608 als aerotolerant gilt und in der Lage ist mit Hilfe von 3-HPA das Wachstum von gram-positiven Bakterien, gram-negativen Bakterien, Protozoen, Hefen, Pilzen, Bakteriophagen und Viren zu inhibieren ([Rüt10]). Ergebnisse einer unbegasteten Kultivierung, welche bei aeroben Bedingungen startet, oder einer unsterilen Kultivierung sind jedoch bisher nicht veröffentlicht worden.

4.2 Materialien und Methoden

4.2.1 Ausgangsmaterialien und Mediovorbereitung

Soweit nicht anders genannt, wurden alle Medienkomponenten und Chemikalien bei Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) in einer mindestens dem europäischen Arzneibuch entsprechenden Qualität (Ph. Eur.) erworben. Aufgrund der längeren Lagerfähigkeit wurde neben Dünnschlempe und Süßmaische fast ausschließlich Sirup als Ersatz für Schlempe aus der Bioethanolherstellung verwendet (siehe Abbildung 2.1). Diese drei Produkte stammen aus einer Bioethanolanlage, welche Weizen als Rohstoff nutzt und vor der Verzuckerung Kleie und Gluten abtrennt. Die Süßmaische, welche 260 g/l Glukose enthält, die Dünnschlempe welche 11 g/l Glycerin enthält und der Sirup, welcher ca. 45 g/l Glycerin enthält, wurden uns freundlicher Weise von N.prior (Stade, Deutschland) am 13.04.2010 zur Verfügung gestellt und bei 4°C gelagert. Der verwendete Hefesatz aus einem Bierbrauprozess wurde freundlicher Weise von der universitätsinternen Bierbrau AG zur Verfügung gestellt und bei 4°C gelagert. Lysierte Bierhefe und lysierter Sirup wurden hergestellt, indem sie bei 55°C und pH 7 für 23 Stunden mit 100 μ l des Enzyms Alcalase 2.4 L FG (Novozymes, Deutschland) inkubiert und anschließend die Enzyme durch 20 Minuten Autoklavieren bei 121°C inaktiviert wurden. Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Medien ohne Glukose bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert und anschließend die separat autoklavierte Glukose als Stocklösung (600 g/l) steril dazugegeben, um die Maillard-Reaktion zu vermeiden.

4.2.2 Stamm und Stammhaltung

L. reuteri ATCC 53608 wurde 2007 bei LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland) erworben. Bis zu seiner Verwendung wurde der Stamm als Gefrierkultur in MRS Medium ([DMRS60]), bestehend aus 20 g Glucose, 10 g Pepton (Difco, U.S.A.), 8 g Fleischextrakt, 4 g Hefeextrakt, 5 g Natriumacetat, 2 g K_2HPO_4 , 2,15 g di-Ammoniumhydrogencitrat (Fluka, Schweiz), 0,5 g Tween 80, 410 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ und 56 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Riedel-de Haen, Germany) pro Liter, supplementiert mit 15% Glycerin bei -80°C gehalten. Als Vorkultur für die Versuche diente eine ruhend bei 37°C inkubierte und mit 1ml Gefrierkultur

inokulierte Übernachtskultur (16 h) in MRS+ Medium (supplementiert mit 20 mM Glycerin), wenn nicht anders beschrieben.

4.2.3 Kultivierung in Anaerobflaschen

Die Versuche in Kapitel 4.3.1 und 4.3.3, ausgenommen die Batch-Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 in Dünnschlempe mit Süßmais, wurden in 15 ml Hungate-Röhrchen mit 5 ml Medium oder in 100 ml Serumflaschen mit 50 ml Medium durchgeführt. Der pH Wert wurde mit 2 M NaOH und 2 M HCl auf pH 6,5 eingestellt (Multi-Kalimatic, Knick Elektronische Messgeräte, Deutschland). Vor dem Autoklavieren wurden die Medien ca. 10 Minuten mit Stickstoff begast um anaerobe Bedingungen herzustellen. Die Hungate-Röhrchen wurden mit 0,1 ml und die Serumflaschen mit 1 ml aus einer *L. reuteri* ATCC 53608 Vorkultur angeimpft und ruhend bei 37°C übernacht kultiviert (16 h). Für die Versuche zur Dauer der GDHt Induktion (Abbildung 4.4) und die Versuche mit nur einem Extrakt (Abbildung 4.2) wurde eine Vorkultur ohne Glycerin verwendet. Proben wurden vor dem Animpfen und am Ende der Kultivierung genommen.

4.2.4 Kultivierung im Fermenter

Neben der Batch-Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 in Dünnschlempe mit Süßmais wurden die Kultivierungen in Kapitel 4.3.5 und 4.3.6 in Bioreaktoren durchgeführt. Für die Batch- und Fedbatch-Kultivierungen wurden 1250 ml Medium in einem VSF2000 Bioreaktor (2l Gesamtvolumen, Bioengineering, Schweiz) mit 50 ml Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung wurde bei 37°C und 500 U/min durchgeführt. Je nach Versuch wurde die Fermentation bei anaeroben Bedingungen, sichergestellt durch eine Stickstoffbegasung mit 3 l/h, oder in einem mit Luft gesättigtem Medium gestartet. Nach einer Stunde waren auch hier komplett anaerobe Bedingungen vorhanden. Sobald der pH Wert auf 5,5 gesunken ist wurde er bei diesem Wert, wenn nicht anders beschrieben, mit 5 M NaOH konstant gehalten. Beim Glukose Fed-Batch wurde die Zufütterung an den Laugenverbrauch gekoppelt. Sobald der pH Wert auf 5,5 gefallen war, wurde ein Feed mit 600 g/l Glukose in den Reaktor gefüttert und die Glukosekonzentration bei ca. 10 g/l konstant gehalten.

Die kontinuierlichen Kultivierungen wurden in einem Reaktor mit 100 ml Medium (250 ml Gesamtvolumen, Glasgerätebau Ochs, Deutschland) durchgeführt. Der Reaktor wurde unbegast mit aeroben Startbedingungen und bei 37°C verwendet. Nach Inokulation (100%) wurde der pH Wert, sobald er auf 5,5 gefallen war, durch Titration von Ammoniakwasser (25% NH_3) konstant gehalten. Das Medium wurde mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,42$ zugefüttert. Die Fermentationsbrühe wurde über eine Pumpe aus dem Reaktor gesaugt, die minimal schneller war als die Feedpumpe. Der Flüssigkeitslevel im Reaktor wurde über die Position des Absaugrohrs konstant gehalten. Nach 24 Stunden war ein stationärer Betrieb zu beobachten.

4.2.5 Metabolitenquantifizierung

Die Konzentrationen von Glycerin, Glukose, 1,3-PDO, Laktat, Acetat und Ethanol wurden mittels HPLC (Kontron Instruments) mit RI Detektor (Erma, Tokio) bestimmt. Hierfür wurde eine gefilterte Probe (0,2 μm , PVDF Membran) 1:10 mit MilliQ Wasser verdünnt und über eine Aminex HPX-87H Säule (300 X 7,8 mm, Bio-Rad, U.S.A.) bei 60°C mit 0,6 ml/min 5 mM H_2SO_4 eluiert. Das Injektionsvolumen betrug 20 μm .

Die 3-HPA Konzentration wurde mit einer Methode bestimmt, welche von Lüthi-Peng et al. adaptiert wurde und auf der Methode von Circle et al. basiert ([LPSP02], [CSB45]). Für die 3-HPA Quantifizierung wurden 250 μl einer zentrifugierten Probe (13.300 U/min bei 4°C für 5 min, Heraeus Fresco 17, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) in ein in Eiswasser gekühltes Reagenzglas gegeben. Anschließend wurden 500 μl HCl (rauchend 37%, 4°C) und 125 μl Tryptophanlösung (dunkel gelagert, 4°C, 10 mM DL-Tryptophan (Fluka), 0,05 N HCl, 24 mM Toluol) hinzugefügt und nach einer 40 minütigen Inkubation bei 37°C wurde sofort die Absorbtion bei 560 nm gemessen (Genesys 10 UV Photometer, Thermo Fisher Scientific, Deutschland). Dabei wurde die Probe vor der Quantifizierung so verdünnt, dass eine Absorption zwischen Null und Eins gemessen werden konnte. Die Kalibrierung der Quantifizierung wurde nach Lüthi-Peng et al. mit Acrolein (Fluka, wasserfrei $\geq 95\%$) durchgeführt ([LPSP02]). Um den Polymerisationsinhibitor möglichst schonend aus dem Acrolein zu entfernen, wurde dieser bei -20°C ausgefroren und das Acrolein vorsichtig abdekantiert. Die Kalibrierung ergab folgende Beziehung zwischen

3-HPA Konzentration und Optischer Dichte (OD) bei 560 nm mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,997:

$$3 - HPA[mM] = \frac{OD[AU] + 0,0026}{0,3141} \quad (4.1)$$

4.2.6 Quantifizierung der Biomasse

Die Biomasse wurde auf drei verschiedene Arten quantifiziert. In feststofffreien Medien wurde sie mit einem Genesys 10 UV Photometer (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) über die optische Dichte bei 650 nm bestimmt. Die Proben wurden dafür so verdünnt, dass die Absorption unterhalb von 0,6 AU lag. Zur Erhöhung der Vergleichbarkeit wurde die Beziehung zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse (BTM) mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,983 ermittelt.

$$BTM[g/l] = \frac{OD[AU] - 0,0496}{2,5003} \quad (4.2)$$

In feststoffhaltigen Medien wurde die Bestimmung der Biomasse über die kolonienbildenden Einheiten (CFU) durchgeführt. Dafür wurde die Probe so verdünnt, dass nach einem Ausplattieren auf MRS+ Agar (MRS+ Medium mit 15 g/l Agar Kobe I) und einer 24 stündigen Inkubation bei 37°C zwischen 50 und 500 Kolonien auf einem Kolonienzähler (Schütt Labortechnik, Deutschland) gezählt werden konnten. Zur Erhöhung der Vergleichbarkeit wurde die Beziehung zwischen optischer Dichte und kolonienbildenden Einheiten mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,987 ermittelt.

$$OD[AU] = 0,01154 \cdot CFU[10^7 \text{ Zellen}] - 0,01936 \quad (4.3)$$

Somit ergibt sich zwischen der Biotrockenmasse und den kolonienbildenden Einheiten folgende Korrelation.

$$BTM[g/l] = 0,0046 \cdot CFU[10^7 \text{ Zellen}] - 0,0276 \quad (4.4)$$

Die Biotrockenmasse wurde basierend auf der DIN 38409-1 bestimmt ([DIN87]). Dazu wurden 5 ml Probe mit einem 50 mm Cellulose-Acetat-Filter (0,2 µm, Satorius AG, Deutschland) vakuumfiltriert und anschließend die Zellen mit 10 ml MilliQ Wasser bei laufender Vakuumpumpe gewaschen. Die verwendeten Filter wurden vor der Messung bei 110 °C im Trockenschrank für 24 Stunden

getrocknet, im Exikator abgekühlt und gewogen (Mettler AE200, Deutschland). Nach dem Zellauftrag wurden die Filter wieder für 24 Stunden bei 110 °C im Trockenschrank getrocknet, im Exikator abgekühlt und gewogen. Die Biotrockenmasse wurde als Differenzgewicht ermittelt.

4.2.7 GDHt Aktivitäts-Assay

Die Glycerindehydratase (GDHt) in *L. reuteri* ATCC 53608 katalysiert die Reaktion von Glycerin zu 3-HPA. Zur Bestimmung ihrer Aktivität wurde ein Assay auf Basis der Überlegungen von Németh et al. etabliert ([NBS08]). Dieser wird nicht in der Anaerobbank durchgeführt, da der höhere Zeitaufwand zu stärkeren Verfälschungen der Ergebnisse führt als ein kurzer Luftkontakt. Zur Bestimmung der GDHt Aktivität wurde 1 ml Probe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Deutschland) abzentrifugiert (13.300 U/min bei 4°C für 5 min, Heraeus Fresco 17, Thermo Fisher Scientific, Deutschland), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Assay Medium (4°C, 0,1 M Phosphatpuffer pH 7, 10 g/l Glycerin) resuspendiert. Danach wurde das Reaktionsgefäß sofort verschlossen. Wenige Sekunden nach dem Start der Inkubation stellten sich anaerobe Bedingungen (detektiert durch Resazurinfärbung) ein. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C und erneutem Abzentrifugieren wurde im Überstand mit der oben beschriebenen colorimetrischen Methode die 3-HPA Konzentration bestimmt (siehe Kapitel 4.2.5). Um die Inkubationszeit reproduzierbar zu halten, wurde der Assay vor und nach der Inkubation auf Eis gelagert. Die Proben für den GDHt Assay wurden bei den Serumflaschenexperimenten am Ende der Kultivierung genommen und bei den Kultivierungen im Fermenter bei Erreichen der maximalen optischen Dichte.

4.3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse zu den Untersuchungen der Biokatalysatorproduktion beschrieben. Wenn nicht anders erwähnt, beschreiben alle angegebenen Fehler die Standardabweichung der Ergebnisse aus drei Kultivierungen.

4.3.1 Nährstoffreduktion

Da das MRS Medium so konzipiert wurde, dass möglichst alle Lactobacillen in der Lage sind darauf zu wachsen ([DMRS60]), kann man vermuten, dass es mehr Komponenten enthält als für die Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 notwendig sind. Um zu überprüfen welche Mediumkomponente des MRS+ Mediums essentiell für das Wachstum von *L. reuteri* ATCC 53608 ist, wurde er in Medien kultiviert in denen jeweils eine MRS+ Komponente fehlt (siehe Abbildung 4.1). Nur ohne Mangansulfat, Tween 80 oder Glycerin wurde

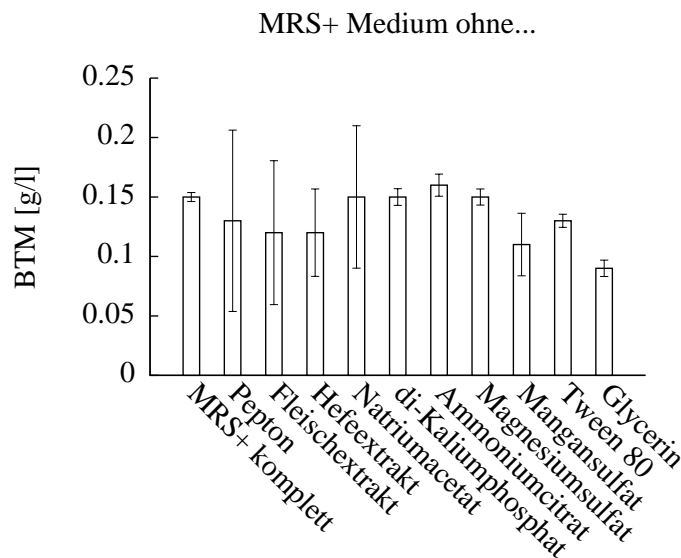


Abbildung 4.1: Biotrockenmasse von *L. reuteri* ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS+ Medium, wobei jeweils eine Medienkomponente weggelassen wurde.

eine signifikant geringere Biotrockenmasse (berechnet aus der optischen Dichte bei 650 nm) beobachtet, aber auch ohne Pepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt oder Natriumacetat streut die erreichte Biotrockenmasse stark. Auffallend ist auch, dass Glycerin, welches auch in Schlempe enthalten ist, den stärksten Einfluss auf die Biotrockenmasse hat.

Die drei Extrakte in MRS+ haben alle eine unterschiedliche Zusammensetzung an Aminosäuren, Spurenelementen und Vitaminen. Da Schlempe jedoch nur Hefezellen enthält und nur ein entsprechendes Spektrum an Substraten darstellen kann, wurde untersucht, wie der Einfluss der einzelnen Extrakte im

MRS Medium auf die erreichte Biotrockenmasse und die GDHt Aktivität bei der Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 ist (siehe Abbildung 4.2). Es

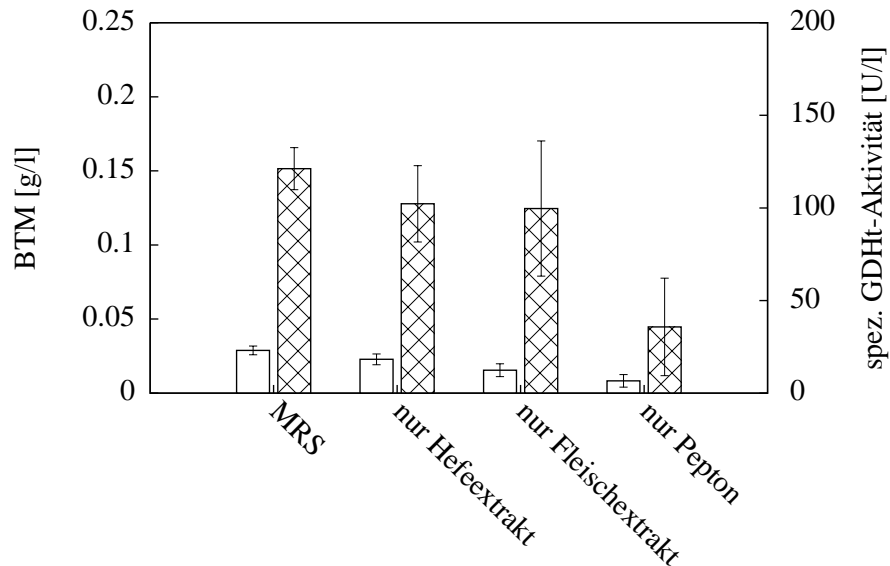


Abbildung 4.2: Biotrockenmasse (\square) und spezifische GDHt-Aktivität (\boxtimes) von *L. reuteri* ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS Medium. Die Medien enthalten statt aller drei Extraktkomponenten nur 4 g/l Hefeextrakt, 8 g/l Fleischextrakt oder 10 g/l Pepton.

zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Werten, wenn anstelle aller Extrakte nur der Hefeextraktanteil oder nur der Fleischextraktanteil vorhanden ist. 4 g/l Hefeextrakt im Medium und 8 g/l Fleischextrakt im Medium führen zu einer vergleichbaren Biotrockenmasse und zu einer vergleichbaren spezifischen GDHt Aktivität. Ist jedoch nur 10 g/l Pepton und kein Hefeextrakt oder Fleischextrakt im Medium vorhanden, so werden deutlich geringere Werte für die Biotrockenmasse und die spezifische GDHt Aktivität erreicht.

4.3.2 Glycerineinfluss

Der Einfluss von Glycerin während der Biokatalyse ist nicht nur entscheidend weil er sich signifikant auf die erreichte Biotrockenmasse auswirkt. Falls die im Medium enthaltenen Extrakte Pepton, Fleischextrakt und Hefeextrakt ganz oder teilweise durch die glycerinenthaltende Schlempe aus der Bioethanolproduktion ersetzt werden sollen, ist der Einfluss des Glycerins auf das Wachstum

und vor allem auf die GDHt Aktivität relevant. Deshalb wurde das Wachstum und die Fähigkeit 3-HPA zu produzieren (GDHt Aktivität) von *L. reuteri* ATCC 53608 in MRS+ Medium bei verschiedenen Glycerinkonzentrationen untersucht (siehe Abbildung 4.3). Im Bereich von 0 g/l bis 3 g/l Glycerin im

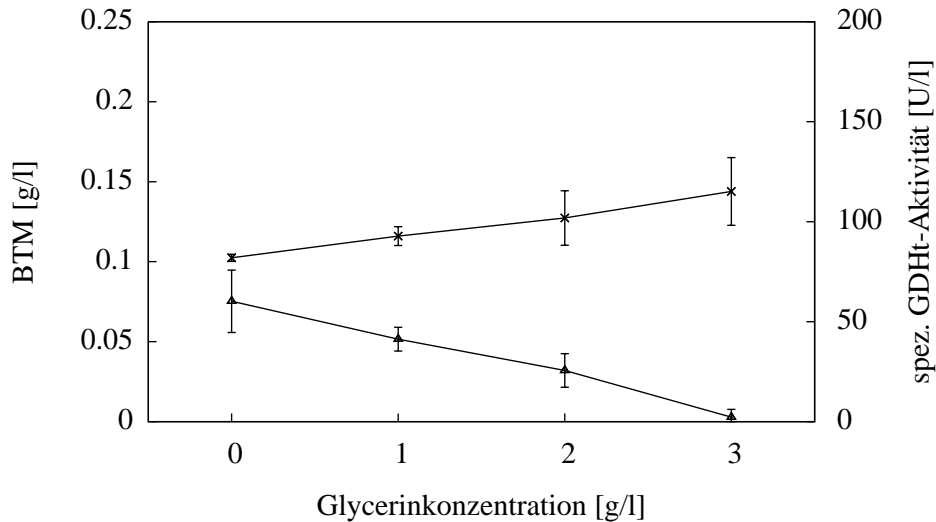


Abbildung 4.3: Biotrockenmasse (×) und spezifische GDHt-Aktivität (Δ) von *L. reuteri* ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in MRS+ Medium mit verschiedenen Glycerinkonzentrationen.

Medium nimmt zwar die erreichte Biotrockenmasse (berechnet aus der optischen Dichte bei 650 nm) mit steigender Glycerinkonzentration zu, jedoch sinkt die Fähigkeit 3-HPA zu produzieren von 60 U/l Fermentationsbrühe auf 2 U/l ab. Kein Glycerin im Wachstumsmedium scheint also vorteilhaft für die Fähigkeit von *L. reuteri* ATCC 53608 3-HPA produzieren zu können. Es stellt sich nun die Frage, wie lange eine hohe GDHt Aktivität erhalten bleibt, wenn dem Medium kein Glycerin zugesetzt wird. Deshalb wurde eine MRS Vorkultur (ohne Glycerin) mit 2% glycerinhaltiger Gefrierkultur inokuliert und diese nach 16 stündiger Kultivierung genutzt um Serumflaschen mit 2% zu inokulieren. Diese Kulturen wurden dann jeweils nach 24 Stunden mit 2% auf frisches MRS Medium übergeimpft (siehe Abbildung 4.4). Es zeigt sich, dass nach der Kultivierung in der Vorkultur und der ersten 24 stündigen Kultivierung die spezifische GDHt Aktivität immer noch hoch ist, nach weiteren 24 Stunden fällt sie jedoch stark ab.

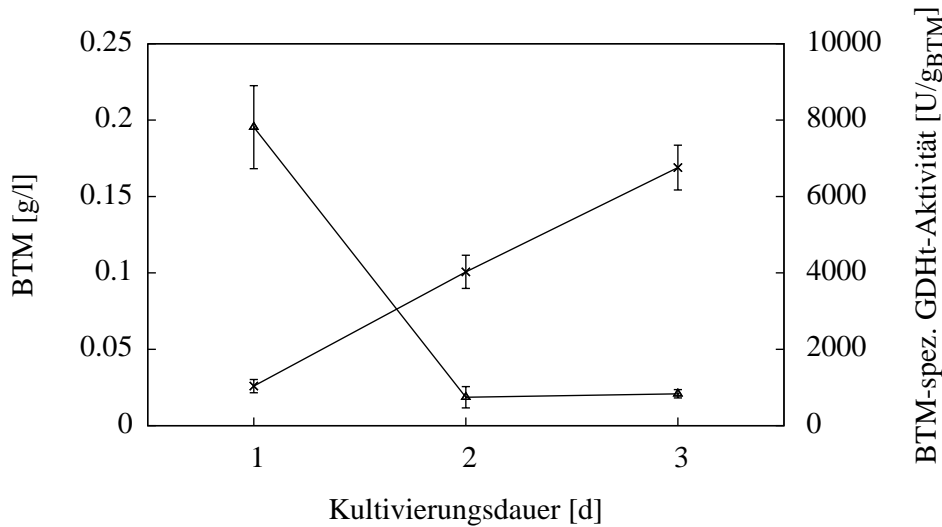


Abbildung 4.4: Biotrockenmasse (x) und BTM-spezifische GDHt-Aktivität (Δ) von *L. reuteri* ATCC 53608 Kulturen nach Kultivierung bei 37°C in MRS Medium. Die Kulturen wurden täglich mit der Vorherigen inokuliert (2%), die erste mit einer MRS Vorkultur.

4.3.3 Ersetzen von Extrakten durch Schlempe

Da es Lactobacillen gibt, welche in der Lage sind 3-HPA zu exkretieren und in Schlempe zu wachsen, stellt sich die Frage, ob der als sehr produktiv und 3-HPA resistent bekannte *L. reuteri* ATCC 53608 dies auch kann. Deshalb wurde das Verhalten von *L. reuteri* ATCC 53608 in Dünnschlempe supplementiert mit 115 g/l Süßmais (entspricht 30 g/l Glukose im Medium) im Batch-Reaktor untersucht (siehe Abbildung 4.5). In den ersten vier Stunden akkumulierte sich 3-HPA bei geringem Anstieg der optischen Dichte, welche der Indikator für das Bakterienwachstum ist. Anschließend stieg die 1,3-Propandiol Konzentration stark an, woraufhin die 3-HPA Konzentration wieder fiel und die optische Dichte nicht weiter stieg. Nach ca. 8,5 Stunden gab es einen kurzzeitigen Anstieg der optischen Dichte.

In unverdünnter Schlempe und ohne die Zugabe von weiteren MRS Komponenten scheint ein Wachstum vergleichbar mit dem in MRS Medium nicht möglich. Deshalb wurde *L. reuteri* ATCC 53608 in MRS Medien kultiviert, in denen die Konzentration aller drei Extrakte (Pepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt) um 12,5% reduziert war und dafür verschiedene Mengen Sirup (als Ersatz

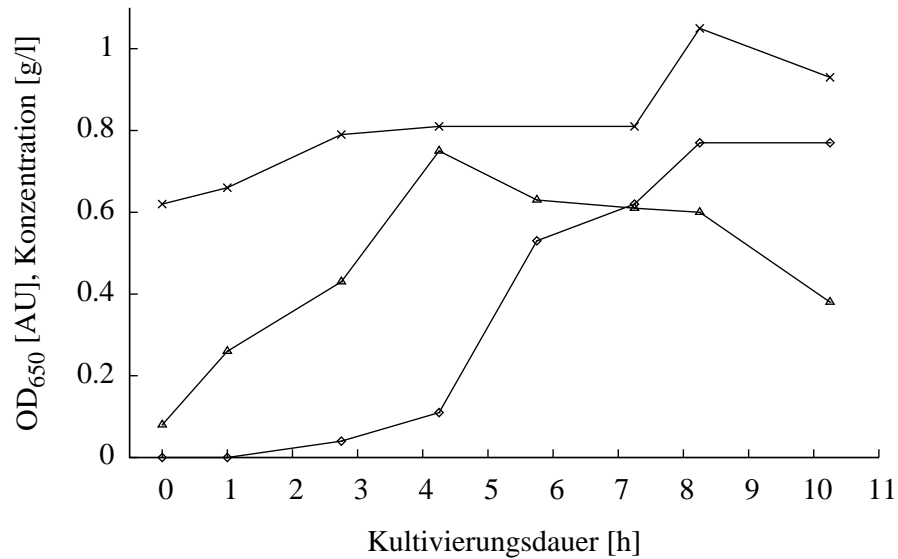


Abbildung 4.5: Verlauf der 3-HPA Konzentration (Δ), der optischen Dichte (\times) und der 1,3-PDO Konzentration (\diamond) bei einer Batch-Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 in Dünnschlempe mit Süßmais (entsprechend 30 g/l Glukose) bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 mit NaOH geregeltem pH.

für Schlempe) beziehungsweise Bierhefe zugegeben wurden (siehe Abbildung 4.6). Die Zugabe einer geringen Menge Sirup oder Bierhefe (6 ml/l) erhöht die Wachstumsindikatoren Glukoseverbrauch und pH Reduktion während der Kultivierung. Eine höhere Schlempekonzentration steigert die Wachstumsindikatoren weiter, während bei einer höheren Bierhefezugabe die Wachstumsindikatoren einbrechen. Wenn das Wachstum durch Schlempezugabe gesteigert werden kann, sollte es möglich sein, durch Schlempezugabe das Wachstum auch bei verringerten Extraktkonzentrationen aufrecht zu erhalten. Deshalb wurden Kultivierungen von *L. reuteri* ATCC 53608 in verschiedenen MRS Medien durchgeführt, welche 50 ml/l Sirup beziehungsweise 50 ml/l mit Alcalase lysierten Sirup als Ersatz für Schlempe enthalten und bei denen die Konzentrationen der drei MRS Extrakte gleichmäßig verringert war (siehe Abbildung 4.7). Erst bei einer Verringerung der ursprünglichen Extraktmengen im MRS Medium um mehr als 81% tritt eine signifikante Verkleinerung der pH Reduktion als Wachstumsindikator auf. Bei Extraktmengen oberhalb von 81% zeigt sich hier kein Unterschied zwischen der Verwendung von nicht lysiertem und lysiertem Sirup. Im MRS Medium ohne Extrakte ist die pH Redukti-

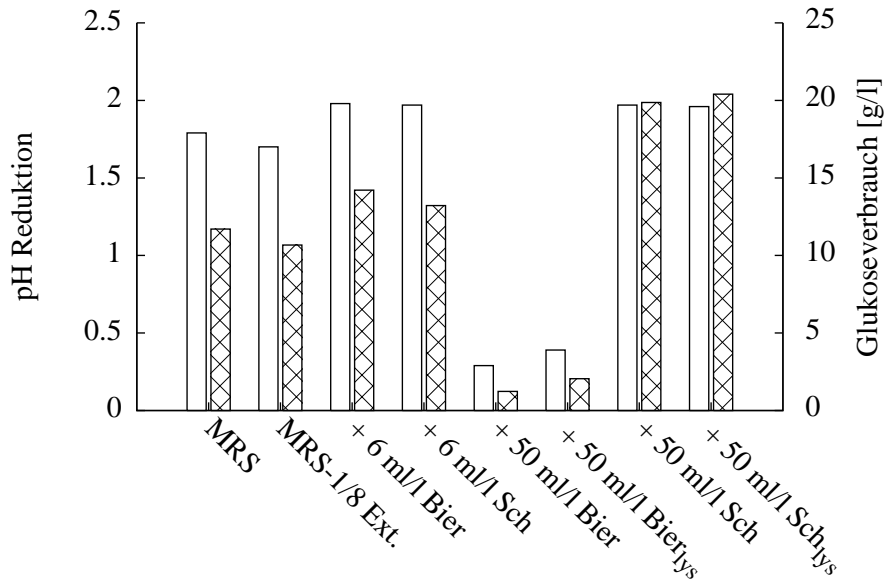


Abbildung 4.6: Durch Säureproduktion erzielte pH Reduktion (□) und Glukoseverbrauch (▨) von *L. reuteri* ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS Medium. Die Konzentration der Extrakte wurde um 1/8 gesenkt und mit 6ml/l bzw. 50ml/l Sirup (resultiert in 0,24 bzw. 2 g/l Glycerin) oder Bierhefe ersetzt.

on merklich größer wenn der Sirup lysiert ist, als wenn nicht lysierter Sirup dem ansonsten extraktfreien MRS Medium zugegeben wird. Jedoch ist die pH Reduktion als Wachstumsindikator immer noch deutlich geringer als bei einer Kultivierung, bei der das Medium 13% der ursprünglichen Extrakte enthält (87% Extraktreduktion). Das Verhältnis von Extrakten zu Sirup scheint einen Einfluss auf das Wachstum von *L. reuteri* ATCC 53608 zu haben. Deshalb wurden Kultivierungen bei verschiedenen Extrakt-Sirup Kombinationen durchgeführt und deren Einfluss auf die *L. reuteri* Biotrockenmasse (berechnet aus den kolonienbildenden Einheiten) sowie deren Fähigkeit 3-HPA zu produzieren (spezifische GDHt Aktivität) untersucht (siehe Abbildung 4.8). Wie bei den Kultivierungen mit unterschiedlichen Glycerinkonzentrationen (siehe Abbildung 4.3) verringert sich die spezifische GDHt Aktivität mit zunehmender Menge des glycerinhaltigen Sirups. Hierbei ist die spezifische GDHt Aktivität bei gleicher Sirupkonzentration umso kleiner, je geringer die Menge der Extrakte Pepton, Fleischextrakt und Hefeextrakt im Medium ist. Bei der erreichten *L. reuteri* Biotrockenmasse zeigt sich mit 100% der MRS Extrakte im

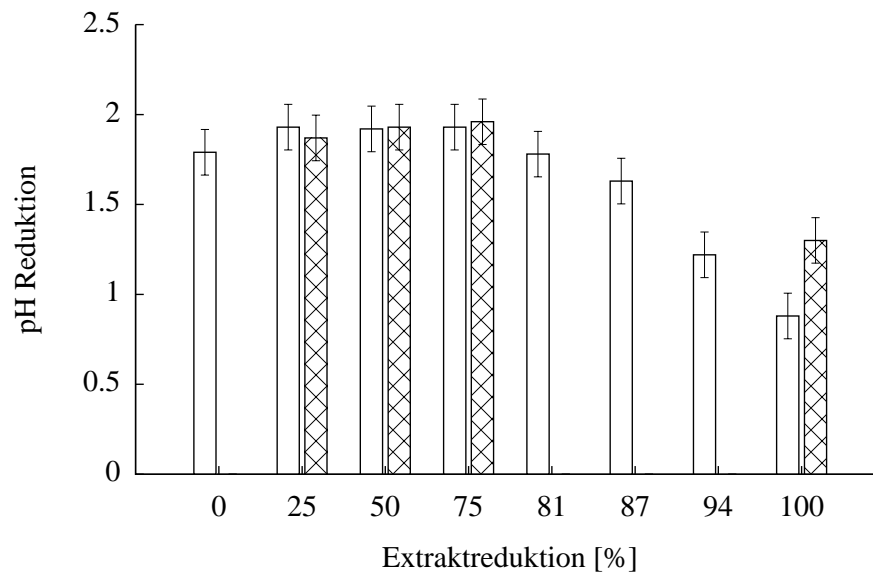


Abbildung 4.7: Durch Säureproduktion erzielte pH Reduktion von *L. reuteri* ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS Medium. Die Konzentration der Extrakte wurde bei gleichzeitiger Zugabe von Sirup (resultiert in 2 g/l Glycerin, unbehandelt □, lysiert ☒) und Süßmais (resultiert in 20 g/l Glukose) gesenkt.

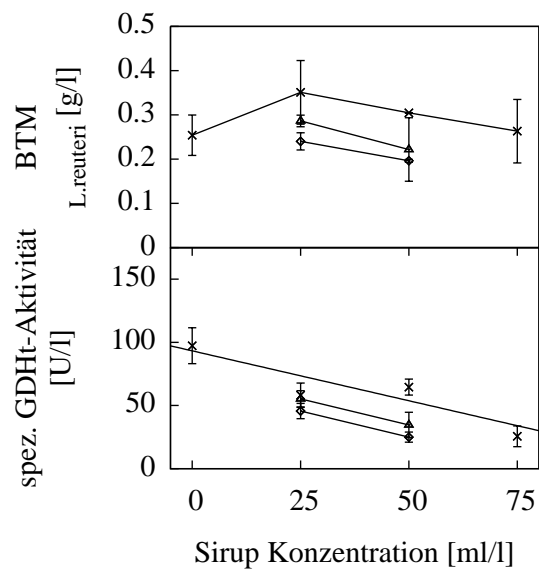


Abbildung 4.8: *L. reuteri* Biotrockenmasse und spezifische GDHt-Aktivität von *L. reuteri* ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS Medium mit unterschiedlichem Extraktgehalt (100% (×), 75% (Δ), 50% (◇)).

Medium ein Maximum bei 25 ml/l Sirup (führt zu 1 g/l Glycerin im Medium). Bei einer Zugabe von bis zu 3 g/l Glycerin zu MRS Medium wurde kein Maximum beobachtet (siehe Abbildung 4.3). Auch bei der erreichten *L. reuteri* Biotrockenmasse führt eine geringere Extraktmenge bei gleicher Sirupkonzentration zwischen 25 ml/l und 50 ml/l zu einem niedrigeren Ergebnis. Um zu überprüfen, welche Komponente des Sirups den entscheidenden Einfluss auf das Wachstum von *L. reuteri* ATCC 53608 und dessen Fähigkeit 3-HPA zu produzieren hat, wurde die erreichte *L. reuteri* Biotrockenmasse (berechnet aus den kolonienbildenden Einheiten) und die spezifische GDHt Aktivität bei Kultivierungen in MRS Medium, MRS+ Medium (enthält 2 g/l Glycerin) und MRS Medium supplementiert mit 50 ml/l Sirup (resultiert in eine Glycerinkonzentration von 2 g/l) verglichen (siehe Abbildung 4.9). Es zeigt sich, dass

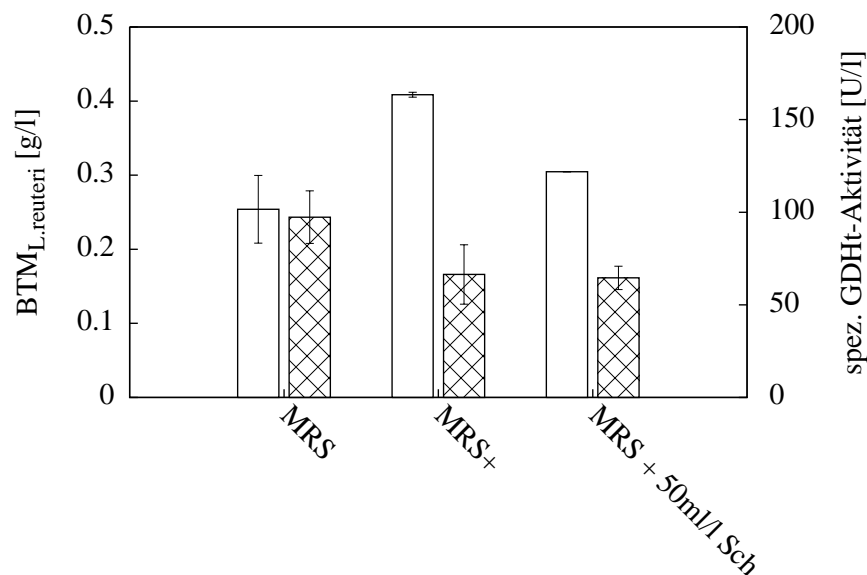


Abbildung 4.9: *L. reuteri* Biotrockenmasse (□) und spezifische GDHt-Aktivität (⊠) von *L. reuteri* ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in verschiedenen Medien basierend auf dem MRS Medium. „MRS+“ enthält 2 g/l Glycerin und „MRS + 50 ml/l Sch“ Sirup (resultiert in 2 g/l Glycerin).

es für die Fähigkeit 3-HPA zu produzieren keinen Unterschied macht, ob *L. reuteri* ATCC 53608 in einem mit Glycerin supplementierten MRS Medium oder in einem mit glycerinhaltigem Sirup supplementierten MRS Medium kultiviert wird. Das Wachstum ist in dem siruphaltigen MRS Medium schlechter als in dem glycerinhaltigen MRS Medium.

4.3.4 Wachstum mit Ethanol

Im Bioethanol-Prozess treten die Infektionen mit Lactobacillen teilweise während der alkoholischen Gärung auf. Es stellt sich die Frage, ob *L. reuteri* ATCC 53608 auch in der Lage wäre, in der Maische während der Endphase der alkoholischen Gärung zu wachsen. Falls dies möglich wäre und auch die Transformation von Glycerin zu 3-HPA bei diesen Ethanolkonzentrationen durchgeführt würde, bestünde die Möglichkeit, *L. reuteri* ATCC 53608 direkt im Anschluss an die alkoholische Gärung im selben Ansatz zu kultivieren und das gebildete Acrolein zusammen mit dem Ethanol abzutrennen.

Bis zu einer Konzentration von 40 g/l Ethanol im Wachstumsmedium wird die erreichte Biotrockenmasse (berechnet aus der optischen Dichte bei 650 nm) kaum negativ beeinflusst, die spezifische GDHt Aktivität steigt sogar leicht an. Zwischen 38 g/l und 72 g/l Ethanol im Wachstumsmedium fallen die erreichte Biotrockenmasse und die spezifische GDHt Aktivität auf nahezu null ab (siehe Abbildung 4.10).

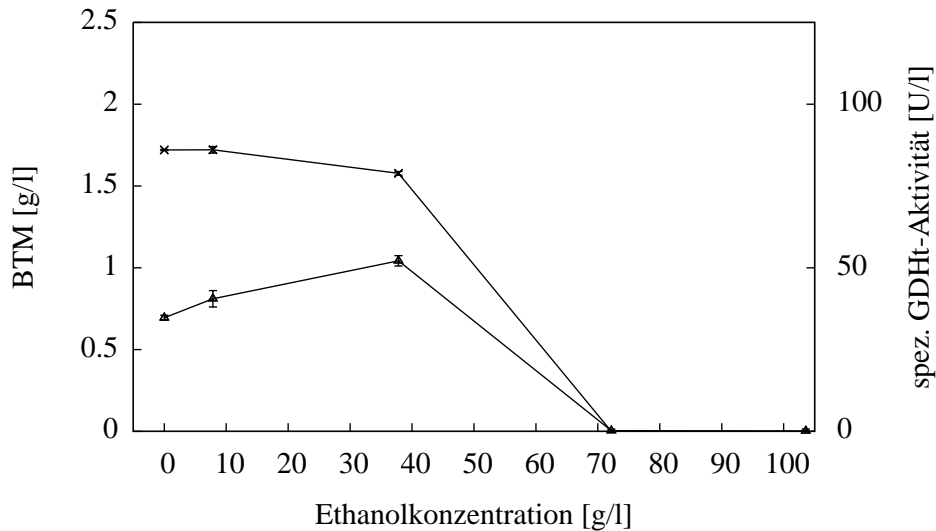


Abbildung 4.10: Biotrockenmasse (×) und spezifische GDHt-Aktivität (Δ) von *L. reuteri* ATCC 53608 Kulturen nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C in MRS+ Medium mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen.

4.3.5 Vereinfachung des Produktionsprozesses

Die Kosten der Biokatalysatorbereitstellung können nicht nur durch ein günstiges Wachstumsmedium erreicht werden. Auch der Prozessaufwand spielt eine entscheidende Rolle. Da Lactobacillen meist aerotolerant sind ([Krä11]) kann man vermuten, dass *L. reuteri* ATCC 53608 in der Lage ist, aerobe Bedingungen so lange zu tolerieren, bis er sich durch CO_2 Produktion selbst eine anaerobe Umgebung geschaffen hat sowie durch Produktion von 3-HPA in der Lage ist, Konkurrenten und Feinde zu bekämpfen, soll sein Verhalten unter anfänglich aeroben und unsterilen Bedingungen mit Batch-Kultivierungen im Bioreaktor überprüft werden (siehe Abbildungen 4.11 bis 4.14). Bei den

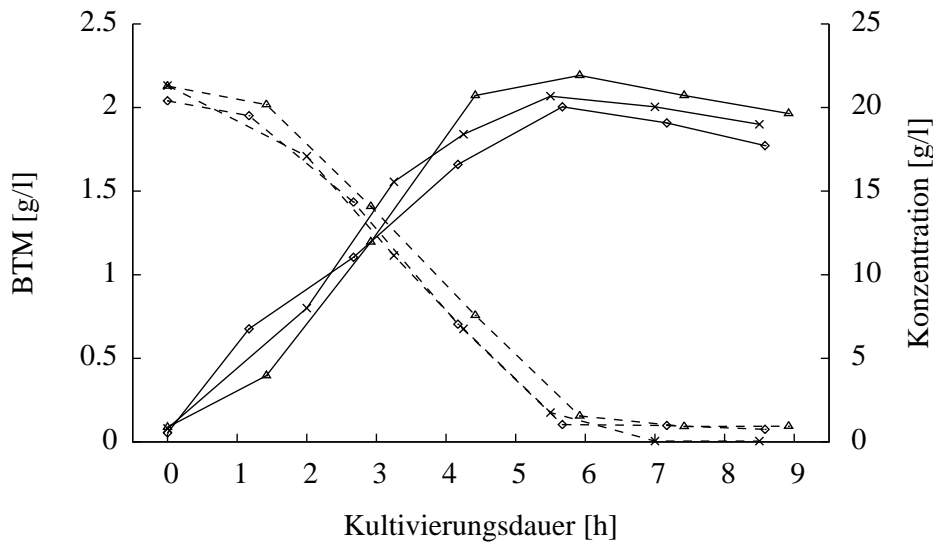


Abbildung 4.11: Biotrockenmasse (–) und Glukosekonzentration (– –) bei steriler (×), steriler unbegaster (Δ) und unsteriler unbegaster (◇) Batch-Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 in MRS+ bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 mit NaOH geregeltem pH.

Batch-Kultivierungen in MRS Medium im sterilen anaerob begasten Betrieb, im sterilen unbegasten Betrieb und im unsterilen unbegasten Betrieb zeigen sich keine relevanten Unterschiede in den Verläufen der Glukosekonzentration, der optischen Dichte als Wachstumsindikator, der Glycerinkonzentration, der 3-HPA Konzentration, der 1,3-Propandiolkonzentration, der Lactatkonzentration, der Acetatkonzentration und der Ethanolkonzentration. Die maximal erreichte Biotrockenmasse (berechnet aus der optischen Dichte bei 650 nm)

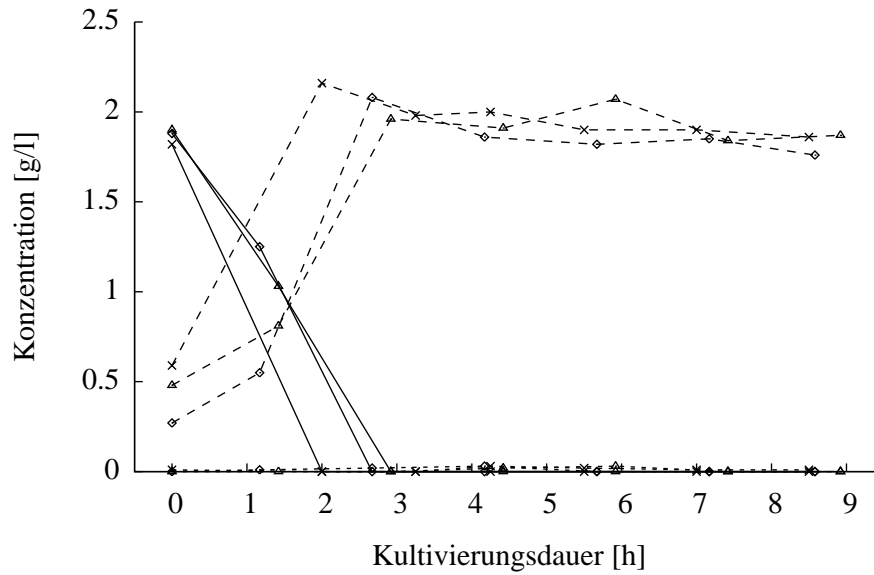


Abbildung 4.12: Glycerinkonzentration (—), 1,3-PDO Konzentration (---) und 3-HPA Konzentration (···) bei steriler (×), steriler unbegaster (Δ) und unsteriler unbegaster (◊) Batch-Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 in MRS+ bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 mit NaOH geregeltem pH.

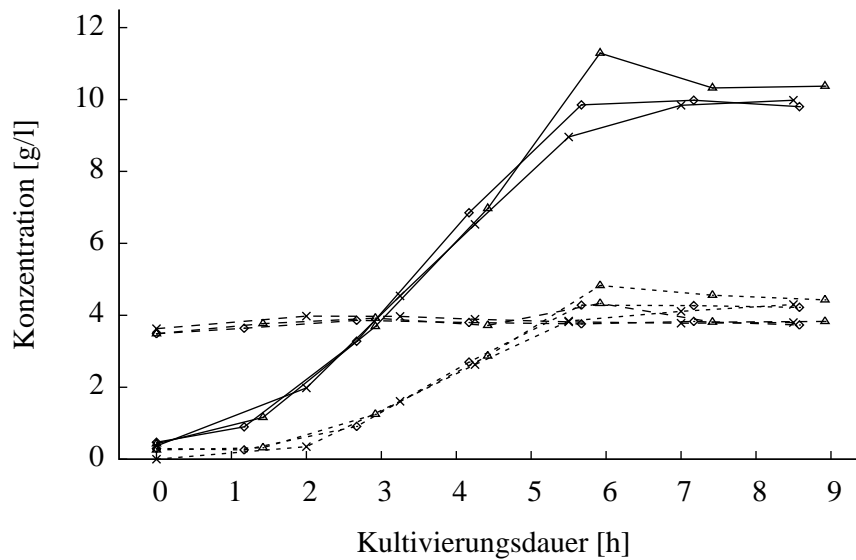


Abbildung 4.13: Laktatkonzentration (—), Acetatkonzentration (---) und Ethanolkonzentration (···) bei steriler (×), steriler unbegaster (Δ) und unsteriler unbegaster (◊) Batch-Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 in MRS+ bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 mit NaOH geregeltem pH.

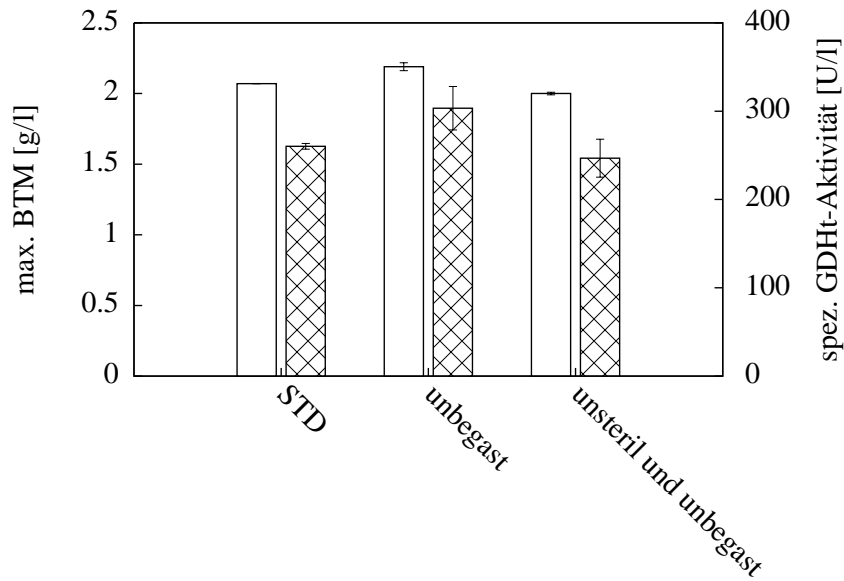


Abbildung 4.14: Maximale BTM (\square) und spezifische GDHt-Aktivität (\boxtimes) bei steriler, steriler unbegaster und unsteriler unbegaster Kultivierung Batch-Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 in MRS+ bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 mit NaOH geregeltem pH.

unterscheidet sich in den drei Fällen steriler anaerob begaster Betrieb, steriler unbegaster Betrieb und unsteriler unbegaster Betrieb nicht wesentlich (siehe Abbildung 4.14). Im unbegasteten sterilen Betrieb wird eine leicht höhere maximale Biotrockenmasse und eine leicht erhöhte Fähigkeit zur Produktion von 3-HPA, ausgedrückt durch die spezifische GDHt Aktivität, als im anaerob begasteten sterilen Betrieb beobachtet. Jedoch verschwindet diese Steigerung, wenn die Batch-Kultivierung unsteril durchgeführt wird.

4.3.6 Steigerung der Ausbeute

Durch eine Vereinfachung des Prozesses hin zu einem unsterilen und unbegasteten Betrieb können vor allem Betriebskosten reduziert werden. Entscheidend für die Investitionskosten zur Biokatalysatorherstellung ist jedoch die Raum-Zeit-Ausbeute (Produktivität) der Biokatalysatorproduktion. Deshalb wurde die Ausbeute bei verschiedenen Kultivierungsverfahren untersucht. Die angegebenen Fehler beschreiben die Standardabweichung der Ergebnisse aus drei Messungen. Die Titration mit Ammoniakwasser (25%), welches auch als Stickstoffquelle genutzt werden kann, führt bei der unsterilen unbegasteten Kultivie-

zung zu einer deutlich erhöhten spezifischen GDHt Aktivität, wohingegen sich die maximal erreichte Biotrockenmasse (berechnet aus der optischen Dichte bei 650 nm) kaum verändert (siehe Abbildung 4.15). Die höhere spezifische GDHt

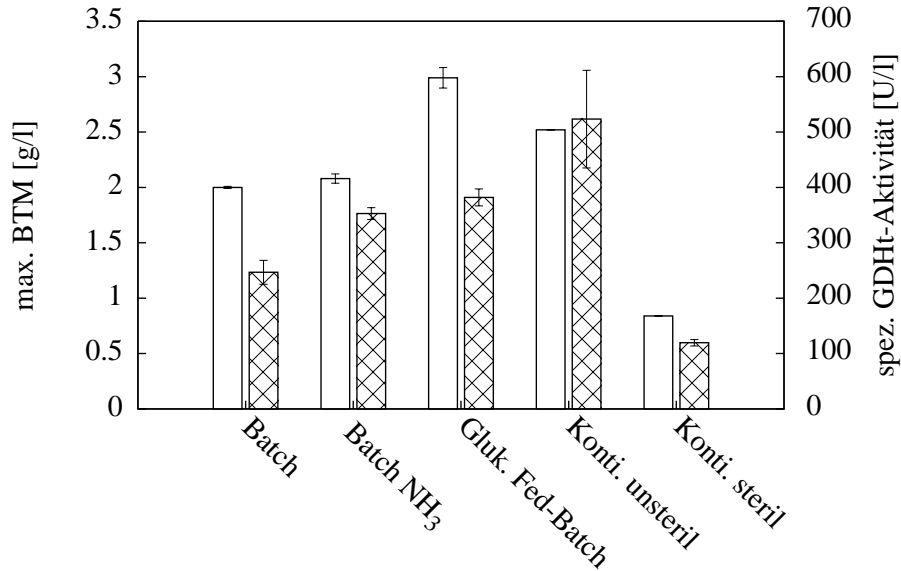


Abbildung 4.15: Die maximale BTM (□) und die spezifische GDHt-Aktivität (⊠) bei verschiedenen Kultivierungsmethoden von *L. reuteri* ATCC 53608 in MRS+ bei anaeroben Bedingungen, 37°C und auf 5,5 geregeltem pH.

Aktivität, welche sogar 40 Minuten früher gemessen wurde, führt zu einer Produktivität von 71 ± 2 Units pro Liter Reaktorvolumen und Stunde gegenüber $44 \pm 4 \frac{U}{l \cdot h}$ bei der Titration mit 5 M NaOH (siehe Tabelle 4.1). Wird dem Re-

Tabelle 4.1: Produktivitäten verschiedener Verfahren zur Biokatalysatorproduktion in MRS+ Medium bei 37°C und pH 5,5. Rüstzeiten wurden nicht berücksichtigt.

Experiment	Produktivität $\frac{U}{l \cdot h}$
Batch-Fermentation	44 ± 4
Batch-Fermentation/ NH_3 Titration	71 ± 2
Glukose Fed-Batch	44 ± 2
Kontinuierliche Fermentation/ NH_3 Titration	218 ± 37
Kontinuierliche Fermentation/ steril/ NH_3 Titration	50 ± 2

aktor Glukose zugefüttert und nicht mit Ammoniak titriert, erreicht man eine vergleichbare Steigerung der spez. GDHt Aktivität. Die Produktivität erhöht

sich jedoch nicht, da es länger dauert bis diese erreicht ist. Eine kontinuierliche Kultivierung verspricht eine deutliche Steigerung der Produktivität gegenüber der Batch-Kultivierung. Jedoch zeigt sich, dass bei einer sterilen unbegasteten Kultivierung mit einer Verdünnungsrate von 0,42 nur eine deutlich niedrigere Biotrockenmasse und spezifische GDHt Aktivität erreicht wurde, was in eine etwa gleichwertige Produktivität resultiert. In der unsterilen unbegasteten kontinuierlichen Kultivierung wurden sehr hohe spezifische GDHt Aktivitäten gemessen und dementsprechend eine um ein Vielfaches höhere Produktivität von $218 \pm 37 \frac{U}{l \cdot h}$ erreicht. Jedoch musste die Kultivierung nach 72 Stunden abgebrochen werden, da das Feedmedium in der Vorlage stark kontaminiert war und somit eine reproduzierbare Zufütterung nicht mehr gewährleistet werden konnte.

4.4 Diskussion

4.4.1 Nährstoffreduktion

Die Aufgabe der Versuche war es zu überprüfen, ob das MRS+ Medium mehr Nährstoffe enthält als *L. reuteri* ATCC 53608 benötigt. Aus der Literatur ist bekannt, dass MRS+ unter anderem für Lactobacillen wichtige Komponenten wie Tween 80, Mg^+ und Mn^+ sowie Acetat, welches das Wachstum von vielen anderen Organismen inhibiert, enthält ([LRHO+77]). Darüber hinaus ist MRS+ sehr reichhaltig an Extrakten, um selbst anspruchsvollen Lactobacillen ein gutes Wachstum zu ermöglichen ([Bri53],[DMRS60], [SH03]). Aus Untersuchungen zu einem definierten Medium für *L. reuteri* ist bekannt, dass dieser im Vergleich zu anderen Lactobacillen eher anspruchsvoll gegenüber den Medienbestandteilen ist ([SSPV06]). Bezüglich der Extraktbestandteile (siehe Tabelle 4.2) ist bekannt, dass sich bei *L. reuteri* JCM1112 die Konzentrationen einzelner Aminosäuren teilweise stark positiv oder negativ auf das Wachstum, die Produktion von Co-Enzym B_{12} und damit auch auf die resultierende GDHt Aktivität auswirken ([STM+09]).

Jedoch zeigen die Versuche eindeutig, dass mehrere Komponenten des MRS+ Mediums für das Wachstum von *L. reuteri* ATCC 53608 nicht essentiell sind oder ihre Bestandteile in einem solchen Überschuss in anderen Komponen-

Tabelle 4.2: Enthaltene Aminosäuren des verwendeten Peptons, Fleischextrakts und Hefeextrakts ([Car12c], [Car12a], [Car12b])

Aminosäure	Pepton	Fleischextrakt	Hefeextrakt
Anteil [Gew.-%]			
Alanin	2,6	3,3	4,3
Arginin	3,0	3,2	3,2
Aspariginsäure	8,5	6,6	6,4
Cystin	0,3	0,4	7,0
Glutaminsäure	20,7	15,9	10,7
Glycin	1,5	2,3	2,8
Histidin	2,0	2,1	1,4
Isoleucin	4,6	3,9	3,0
Leucin	7,6	6,5	4,4
Lysin	6,8	6,0	5,0
Methionin	2,3	1,6	9,0
Phenylalanin	3,7	3,6	2,6
Prolin	9,3	6,9	2,2
Serin	4,4	4,4	2,9
Threonin	3,2	3,6	3,0
Tryptophan	0,5	1,0	6,0
Tyrosin	1,8	1,7	2,3
Valin	5,6	4,9	3,4

ten vorhanden sind, dass ein Weglassen einzelner Komponenten keinen signifikant negativen Einfluss hat. So gab es keine signifikante Abnahme der Biotrockenmasse, wenn Pepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt, Natriumacetat, di-Kaliumhydrogenphosphat, di-Ammoniumcitrat oder Magnesiumsulfat einzeln weggelassen wurden. Die Versuchsergebnisse lassen aber keine Rückschlüsse darauf zu, dass Komponenten auch kombiniert weggelassen werden können. Es zeigt sich jedoch, dass bereits in 4 g/l Hefeextrakt alle Extraktbestandteile enthalten sind, die zu einem mit MRS fast vergleichbaren Wachstum und vergleichbarer GDHt Aktivität führen. Die großen Schwankungen der erreichten Biotrockenmasse, wenn einer der drei Extrakte weggelassen wird, könnten allerdings darauf hindeuten, dass in diesen Fällen mindestens ein Bestandteil der Extrakte auf einem minimalen Niveau ist oder sich bereits kleine Schwankungen in der Zusammensetzung der Extrakte stark auf die erreichte Biotrockenmasse auswirken. Für weiterführende Versuche zur Mediumoptimierung könnte die statistische Versuchsplanung, welche mit kontinuierlichen Fermentationen validiert wird, verwendet werden ([PBWKW⁺10]).

4.4.2 Glycerineinfluss

Die Aufgabe der Versuche war es zu überprüfen, welchen Effekt Glycerin auf das Wachstum und die GDHt Aktivität von *L. reuteri* ATCC 53608 hat. Mit zunehmendem Glyceringehalt zwischen 0 - 3 g/l steigt die erreichte Biotrockenmasse. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen von El-Ziney et al. ([EZAU⁺98]). Jedoch ist die spezifische GDHt Aktivität bei den Versuchen in der vorliegenden Arbeit ohne Glycerin am höchsten und sinkt mit zunehmender Glycerinkonzentration im Wachstumsmedium. Auch Lüthi-Peng et al. hatten festgestellt, dass eine Induktion des Enzyms GDHt stattfindet ohne dass Glycerin im MRS Medium notwendig ist. Sie ermittelte jedoch die höchste spezifische GDHt Aktivität bei *L. reuteri* ATCC 53608, gezeigt durch Transformationsexperimente, bei 60 mM Glycerin im MRS Wachstumsmedium ([LPSP02]). Es gibt zwei Ansätze die sinkende GDHt Aktivität mit steigender Glycerinkonzentration im Wachstumsmedium zu erklären. Lüthi-Peng et al. gingen davon aus, dass höhere Glycerinkonzentrationen im Wachstumsmedium eine Akkumulation von 3-HPA bis in einen Bereich verursachen, der die Bakterien schädigt und sie deshalb untauglich für eine anschließende Trans-

formation macht. Eine andere Möglichkeit, ohne dass die Bakterien bereits geschädigt sein müssen, wäre, dass die Produktion des Co-Enzyms B_{12} , zu der *L. reuteri* in der Lage ist, durch höhere Glycerinkonzentrationen weniger gesteigert wird als dieses bei der Produktion von 3-HPA durch die Co-Enzym B_{12} abhängige GDHt verbraucht wird ([STM⁺09]). Somit stünde im Transformationsmedium weniger Co-Enzym B_{12} zur Verfügung, was auch in eine geringere 3-HPA Konzentration resultieren würde. Da in dieser Arbeit bereits bei minimalen Glycerinkonzentrationen im Wachstumsmedium eine Verschlechterung der GDHt Aktivität auftritt, kann man vermuten, dass die langjährige Lagerung der Bakterien in einer glycerinhaltigen Gefrierkultur diese geschädigt oder zumindest die Co-Enzym B_{12} Synthese beeinträchtigt hat. Für eine Beeinträchtigung der Bakterien spricht, dass beim wiederholten Überimpfen in frisches MRS Medium die erreichte Biotrockenmasse stetig steigt anstatt auf dem selben Niveau zu bleiben (siehe Abbildung 4.4). Hier zeigt sich auch, dass in Abwesenheit von Glycerin die Induktion der GDHt Aktivität bald abnimmt. Nach 64 Stunden ist die biomassespezifische GDHt Aktivität stark abgesunken. Dies spricht gegen die Theorie von Lüthi-Peng et al. nach der die GDHt bereits ohne Glycerin in hohem Maße induziert wird. Das Glycerin in der Gefrierkultur könnte eine Rolle bei der GDHt Induktion in glycerinfreien Medien spielen.

4.4.3 Ersetzen von Extrakten durch Schlempe

Aufgabe dieser Versuche war es zu überprüfen, ob *L. reuteri* ATCC 53608 Nebenprodukte der Bioethanolherstellung für das Wachstum nutzen kann. Das Wachstum von *L. reuteri* ATCC 53608 in purer Dünnschlempe supplementiert mit Süßmaische scheint kaum möglich (siehe Abbildung 4.5). Die anfängliche Akkumulation von 3-HPA lässt vermuten, dass nicht genügend Reduktionsäquivalente für die Reaktion von 3-HPA zu 1,3-Propandiol gebildet werden, was auf eine sehr eingeschränkte Fähigkeit von *L. reuteri* zur Glycolyse oder Nutzung derer hindeutet (siehe Abbildung 2.2). Entweder werden vorrangig Pentosen verstoffwechselt oder es werden weitere MRS Komponenten für eine gute Glycolyse benötigt. In weiteren Versuchen scheint es sogar so, als wenn nicht nur weitere MRS Komponenten fehlen, sondern ausschließlich das Glycerin in der Schlempe/ dem Sirup einen positiven Effekt auf das Wachstum von

L. reuteri ATCC 53608 hat. Dafür spricht, dass die Zugabe von einer entsprechenden Menge Glycerin einen vergleichbaren Effekt auf die GDHt Aktivität hat. Jedoch führt reines Glycerin zu einer noch stärkeren Wachstumssteigerung als die Zugabe von Sirup. Die Bestandteile der Hefen im Sirup scheinen keinen positiven Effekt auf das Wachstum zu haben. Zwar wurde, wenn 25% der MRS Extrakte dem Medium zugesetzt wurden, mit lysiertem Sirup kein besseres Ergebnis erzielt als mit dem unlysierten Sirup. Dies scheint aber daran zu liegen, dass bereits die maximale pH Reduktion erreicht ist ([KSK80]). Ohne zusätzliche Extrakte zeigt sich ein signifikanter, wenn auch kleiner Unterschied. Es ist zwar bekannt, dass manche Lactobacillen Hefezellen als Stickstoffquelle nutzen können ([BMCD04]). Der aus Sauerteig isolierte *L. reuteri* CRL 1098 hat ein sehr gutes proteolytisches System, wohingegen die aus dem Darm von Menschen isolierten *L. reuteri* NRRL 14171 und F275 ein eher schwaches System haben ([RFV01], [LBR⁺10], [HMROG05]). Die proteolytischen Fähigkeiten des aus dem Darm von Schweinen isolierten und hier verwendeten *L. reuteri* ATCC 53608 sind nicht bekannt, scheinen aber zumindest nicht so leistungsfähig wie eine Lysierung mit Alcalase zu sein. Dass der Unterschied zwischen lysiertem und unlysiertem Sirup so klein ist könnte daran liegen, dass entweder die Hefekonzentration nicht ausreichend war, die Hefezellen bereits schon größtenteils durch Autolyse im lysierten Zustand vorlagen oder die Lysierung nicht effektiv war. Gegen die letzten beiden Argumente spricht der Nachteil der Verwendung von Sirup gegenüber Glycerin und dass die Lysierung mit Alcalase strikt nach den Vorgaben des Enzymherstellers durchgeführt wurde ([Nov04]).

Eine andere Erklärung, warum durch die Hefen in dem Sirup kein positiver Effekt sichtbar war, könnte sein, dass dieser durch inhibierende Stoffe überdeckt wurde. Weitere Versuche sollten nur DDGS als Ausgangsstoff nutzen, da dies im Gegensatz zu Sirup trocken gelagert wird und somit Kontaminationen, welche in der Lage sind Bakteriozide zu produzieren, besser ausgeschlossen werden können. Auch Bestandteile wie Hopfen können offensichtlich das Wachstum von *L. reuteri* ATCC 53608 beeinträchtigen. Die Bitterstoffe des Hopfens hemmen das Wachstum vieler Milchsäurebakterien, einige zeichnen sich jedoch auch durch Resistenzen aus ([SIS⁺06]). *L. reuteri* ATCC 53608 gehört vermutlich nicht dazu, was bei der Auswahl der Schlempe, die im Wachstumsmedium verwendet wird, berücksichtigt werden sollte. Auch der Vergleich der Verwen-

derung von unlysiertem und lysiertem Sirup spricht eher dafür, dass *L. reuteri* ATCC 53608 nur das Glycerin aus dem Sirup nutzen kann.

Eine weitere interessante Erkenntnis der Versuche ist, dass das Wachstum und die GDHt Aktivität von dem Zusammenspiel der Extraktkonzentration und Glycerinkonzentration abhängt. Die Ursache dafür könnte auf das Verhältnis von verfügbaren Aminosäuren zu dem Glycerin im Sirup zurückzuführen sein. Bei nicht ausreichender Versorgung mit Aminosäuren verlangsamt sich das Wachstum von *L. reuteri* und somit auch die NADH Generation ([STM+09]). Dies könnte zu einer 3-HPA Akkumulation führen, welche die Bakterien beeinträchtigt. Eine mangelnde Versorgung mit Aminosäuren kann auch die Co-Enzym B12 Regeneration und Produktion beeinträchtigen, was die verminderte GDHt Aktivität erklären könnte ([STM+09]). Co-Enzym B12 wird während der Umwandlung von Glycerin in 3-HPA von der GDHt verbraucht. Jedoch ist verwunderlich, dass sich mit 100% der MRS Extrakte im Medium ein Maximum der erreichten *L. reuteri* Biotrockenmasse bereits bei 25 ml/l Sirup (führt zu 1 g/l Glycerin im Medium) zeigt. Bei einer Zugabe von bis zu 3 g/l Glycerin zum MRS Medium wurde kein Maximum beobachtet (siehe Abbildung 4.3). Hier wurde jedoch die Vorkultur ohne Glycerin kultiviert, wodurch die Bakterien bereits zu Beginn der Kultivierung in besserer Verfassung waren. Auch eine Hemmung des Wachstums durch Kontaminationen im Sirup, die während der Lagerung entstanden sind, kann als Ursache für das schlechte Wachstum bei höheren Sirupkonzentrationen nicht ausgeschlossen werden.

4.4.4 Wachstum mit Ethanol

Die Aufgabe dieser Versuche war es zu überprüfen, ob *L. reuteri* ATCC 53608 in der Lage ist in der Anwesenheit von Ethanol zu wachsen und GDHt zu produzieren. Lactobacillen gelten im Vergleich zu anderen Organismen als recht ethanol tolerant. Die Fähigkeit Ethanol zu tolerieren kann aber von Stamm zu Stamm und je nach Substrat stark schwanken ([GMHC92]). Bei *L. reuteri* ATCC 53608 in MRS+ kommt das Wachstum zwischen 40 g/l und 70 g/l zum Erliegen. Somit ist *L. reuteri* ATCC 53608 offensichtlich nicht in der Lage, bei einer in der Sauermische üblichen Ethanolkonzentrationen zu wachsen. Bemerkenswert ist aber, dass Ethanol bei Konzentrationen, bei denen noch ein Wachstum möglich ist, die GDHt Aktivität erhöht. Eventuell ist dies eine

Abwehrreaktion, die durch den Stress, welche Ethanol auf die Zellen ausübt, verursacht wird. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass Ethanol unter den Fermentationsbedingungen als Aldehydfänger wirkt und somit eine Beeinträchtigung der GDHt durch produziertes 3-HPA minimiert (Siehe Kapitel 5.4.3).

4.4.5 Vereinfachung des Produktionsprozesses

Aufgabe der Versuche war es zu überprüfen, ob eine unsterile und unbegaste Kultivierung ohne Nachteile möglich ist. Es ist bekannt das Lactobacillen häufig aerotolerant sind ([Krä11]). Bisher wurde jedoch noch nie untersucht, welchen Einfluss eine unbegaste und mit Luft gesättigte Atmosphäre auf das Wachstum von *L. reuteri* ATCC 53608 und dessen Fähigkeit 3-HPA zu produzieren hat. Wie erwartet hat die anfänglich aerobe Atmosphäre und die fehlende Begasung keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum von *L. reuteri* ATCC 53608. Die erreichte Biotrockenmasse ist sogar leicht höher als bei der durchgehend anaeroben Kultivierung. (siehe Abbildungen 4.11 bis 4.14). Es ist bekannt, dass bei *Citrobacter Freundii* die Gene der Glycerindehydratase, welche für die Umwandlung von Glycerin in 3-HPA sorgen, nur unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Glycerin oder Dihydroxyaceton expremiert werden ([DBG98]). In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass es keine signifikanten Auswirkungen auf die Fähigkeit von *L. reuteri* ATCC 53608 3-HPA zu produzieren hat, wenn das im Medium vorhandene Glycerin bereits unter nicht anaeroben Bedingungen verbraucht wird. Weiterhin kann vermutet werden, dass zumindest im nichtkontinuierlichen Betrieb ein unsteriler Betrieb möglich ist, da 3-HPA auf eine Vielzahl von gram-positiven Bakterien, gram-negativen Bakterien, Protozoen, Hefen, Pilzen, Bakteriophagen und Viren toxisch wirkt und von *L. reuteri* aktiv zur Verteidigung eingesetzt werden kann, wenn Glycerin vorhanden ist ([CLV⁺07], [Rüt10], [DL97]). Tatsächlich wurden in wiederholten unsterilen Batch-Kultivierungen keine signifikanten Beeinträchtigungen festgestellt. Jedoch wurde *L. reuteri* ATCC 53608 in der unsterilen Batch-Kultivierung auch nicht zu einer erhöhten GDHt Aktivität stimuliert, wie es durch Dobrogosz et al. für die Anwesenheit eines heterologen Organismus beschrieben wurde ([DL97]). Vermutlich war die Anzahl der Fremdorganismen in der Anfangsphase der Kultivierung, in der noch Glycerin im Medium vorhanden war, so gering, dass kein messbarer stimulierender

Effekt auftrat.

4.4.6 Steigerung der Ausbeute

Die Aufgabe der Versuche war es zu überprüfen, ob durch eine Veränderung der Prozessführung eine höhere spezifische GDHt Aktivität erreicht werden kann. Eine Titration mit Ammoniak anstatt mit Natronlauge steigert wie erwartet die erreichte Biotrockenmasse und die spezifische GDHt Aktivität. Ammoniak kann als zusätzliche Stickstoffquelle für das Wachstum genutzt werden und das Ammoniumion erhöht die Aktivität der GDHt ([SS62]). Eine Zufütterung von Glukose steigert die erreichte Biotrockenmasse um 50%. Offenbar war Glukose die limitierende Mediumkomponente für das Wachstum. Die spezifische GDHt Aktivität bleibt jedoch von der zusätzlichen Glukose nahezu unbeeinflusst. Für die GDHt Produktion scheinen andere Medienkomponenten wie Aminosäuren oder Vitamine limitierend zu sein. Krauter et al. haben Fed-Batch Kultivierungen durchgeführt, bei denen neben Glukose auch Glycerin und die Extrakte Fleischextrakt, Hefeextrakt sowie Pepton zugefüttert wurden. Sie konnten die Zelldichte damit um ca. 230% steigern. Zudem erhielten sie eine maximale GDHt Aktivität von ca. 5 U/ml, welche aber mit den hier ermittelten Ergebnissen nicht verglichen werden kann, da ein komplett anderer GDHt Aktivitäts-Assay durchgeführt wurde ([KWV12]). Obwohl eine deutliche Steigerung der Biomasse erreicht wurde und eine Steigerung der spezifischen GDHt Aktivität erwartet werden kann, ist es fraglich, ob sich dies aufgrund der sehr hohen Kosten für die zugefütterten Extrakte wirtschaftlich lohnt.

Eine weitere Steigerung der Produktivität kann durch eine kontinuierliche Betriebsweise erreicht werden, da hier die Rüstzeiten entfallen. Die Rüstzeiten wurden jedoch in den in Tabelle 4.1 dargestellten Ergebnissen nicht berücksichtigt. Trotzdem werden im unsterilen kontinuierlichen Betrieb mit NH_3 Titration und einer Verdünnungsrate von 0,42 sehr hohe Produktivitäten erreicht. Dies scheint darauf zurückzuführen zu sein, dass *L. reuteri* ATCC 53608 durch fremde Organismen zur GDHt Produktion stimuliert wurde ([DL97]). Es waren deutlich kokkenförmige Bakterien neben *L. reuteri* im Reaktor zu erkennen, wodurch auch die hohe Biotrockenmasse zu erklären ist. Jedoch wurde aufgrund der Kontamination die kontinuierliche Fermentation nach 72 Stunden instabil. Hauptursache war jedoch nicht eine Kontamination im Reaktor, in

dem *L. reuteri* fremde Organismen durch 3-HPA Produktion bekämpfen kann, sondern die Kontamination der Mediumvorlagen. Im sterilen kontinuierlichen Betrieb wurde nur eine sehr geringe GDHt Aktivität gemessen, was in eine mäßige Produktivität resultiert. Eine verringerte spezifische Aktivität wurde bisher nur beobachtet, wenn es zu einem ungünstigen Verhältnis zwischen Extrakten und Glycerin gekommen war, was vermutlich in eine übermäßige 3-HPA Akkumulation resultierte (siehe Abbildung 4.3 und 4.8). Schwankungen in der Zufütterung können nicht ausgeschlossen werden, die eindeutige Ursache bleibt jedoch unklar. Bei weiteren Versuchen sollte überprüft werden, ob eine Kombination aus steriler Mediumvorlage und unsterilem Reaktorbetrieb zu einem stabilen Verhalten mit hohen Produktivitäten bei gleichzeitig mäßigem Sterilisationsaufwand führt.

Kapitel 5

Biotransformation

5.1 Einleitung

Bei der Biotransformation ist die optimale Ausnutzung des Substrates und des Biokatalysators entscheidend für die Kosten des Prozesses. Während der Transformation sollten die Temperatur, der pH Wert und die Biokatalysatorkonzentration neben anderen Faktoren so eingestellt werden, dass das im Transformationsmedium vorhandene Glycerin möglichst vollständig und möglichst schnell mit minimalem Katalysatoreinsatz in 3-HPA umgewandelt wird. Diese Parameter hängen auch stark von der Zusammensetzung des Transformationsmediums ab ([LPDP02], [LPSP02]). Für die Transformation in Nebenprodukten der Bioethanolproduktion wurden die Auswirkungen der verschiedenen möglichen Parametervariationen bisher nicht ermittelt.

Darüber hinaus ist es für die Katalysatorstandzeit entscheidend das produzierte 3-HPA möglichst schnell zu entfernen, um dessen Konzentration im Transformationsmedium unterhalb einer bakterioziden oder besser unterhalb einer inhibierenden Konzentration zu halten. Die Entfernung des 3-HPA wird in Kapitel 6 behandelt. Vorbereitend darauf sollte jedoch untersucht werden, welchen Einfluss Unterdruck auf die Biotransformation hat. Auch sollte die Auswirkung von Ethanol im Transformationsmedium überprüft werden, um abschätzen zu können, ob es eventuell wirtschaftlich sinnvoller ist die Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA in der Sauermaische vor der Ethanoldestillation, anstatt in der Schlempe nach der Abtrennung des Ethanols, durchzuführen.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Ausgangsmaterialien und Mediovorbereitung

Soweit nicht anders genannt, wurden alle Medienkomponenten und Chemikalien wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben erworben und verwendet. Die darüber hinaus verwendeten DDGS stammen aus einer Bioethanolanlage, welche Weizen als Rohstoff nutzt, und enthalten ca. 60 g/kg Glycerin. Sie wurden uns freundlicher Weise von CropEnergies (Zeitzi, Deutschland) Anfang 2010 zur Verfügung gestellt und bei Raumtemperatur trocken gelagert. Für die Versuche wurden der Sirup und die DDGS bis zu einer der Schlempe entsprechenden Glycerinkonzentration von 15 g/l in MilliQ Wasser gelöst. Zur besseren Handhabung wurde die DDGS-Lösung vor der Verwendung gesiebt (0,4 mm Maschenweite).

5.2.2 Stamm und Stammhaltung

Der Stamm und die Stammhaltung waren identisch zu den Versuchen zur Biokatalysatorproduktion (siehe Kapitel 4.2.2).

5.2.3 Biokatalysatorproduktion

Die Kultivierung von *L. reuteri* ATCC 53608 wurde in 1l Serumflaschen mit 600 ml MRS+ Medium durchgeführt. Vor dem Autoklavieren wurden die Medien ca. eine Stunde mit Stickstoff begast, um anaerobe Bedingungen herzustellen. Die Serumflaschen wurden mit 1 ml aus einer *L. reuteri* ATCC 53608 Vorkultur angeimpft und ruhend bei 37°C über Nacht kultiviert (16 h). Nach der Bestimmung der spezifischen GDHt Aktivität wurde die Fermentationsbrühe bei 4°C und 5000 U/min für 20 Minuten abzentrifugiert (J2-HS, Beckmann, U.S.A.). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 800 ml anaeroben 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 (PP) für eine mindestens 45 minütige Wasch- und Hungerphase resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen wieder bei 4°C und 5000 U/min für 20 Minuten abzentrifugiert (J2-HS, Beckmann, U.S.A.) und nach Verwerfen des Überstands sofort für die Transformationsexperimente verwendet.

5.2.4 Biotransformation

Vor dem Autoklavieren wurden die pH Werte der Transformationsmedien mit 5M NaOH und Phosphorsäure (85 Gew.-%) eingestellt (Multi-Kalimatic, Knick Elektronische Messgeräte, Deutschland). Anschließend wurden die Transformationsmedien 10 Minuten mit Stickstoff begast, um ein anaerobes Milieu herzustellen. Wenn die Transformation im zentrifugierten oder gefilterten Medium durchgeführt werden sollte, wurde das Medium 20 Minuten bei 4°C und 10.000 U/min zentrifugiert (J2-HS, Beckmann, U.S.A.) und eventuell anschließend sterilfiltriert (0,22 μ m, PVDF Membran, Rotilabo, Carl Roth, Deutschland). Die Transformationen wurden dann unsteril durchgeführt.

Mit Ausnahme der Versuche zur Transformation bei Unterdruck wurde dann der Ganzzellbiokatalysator entsprechend der gewünschten spezifischen GDHt Aktivität mit einer Spritze in 20 ml des jeweiligen vortemperierten Transformationsmediums resuspendiert. Während der Resuspension wurde mit Stickstoff eine anaerobe Umgebung sichergestellt. Die Transformation fand dann in gerührten oder geschüttelten unbegasteten 50 ml Serumflaschen mit je 20 ml Transformationsmedium bei 20°C oder 37°C statt.

Um die Transformationen bei Unterdruck durchführen zu können, fanden diese mit 100 ml Transformationsmedium in einem 250 ml Kolben mit Destillationsaufsatz statt. Der Kolben wurde gerührt und über ein Wasserbad auf 37°C geheizt. Hinter dem mit Leitungswasser gekühlten Destillationsaufsatz befand sich die durch eine in Eiswasser gekühlte Kühlfalle geschützte Vakuumpumpe. Vor dem Einspritzen des unter anaeroben Bedingungen im Transformationsmedium resuspendierten Ganzzellkatalysators in den unter dem entsprechenden Druck stehenden Versuchsaufbau wurde dieser zur Etablierung anaerober Verhältnisse 30 Minuten mit Stickstoff gespült.

5.2.5 Metabolitenquantifizierung

Die Metabolitenquantifizierung wurde analog zu den Versuchen zur Biokatalysatorproduktion (siehe Kapitel 4.2.5) durchgeführt.

5.2.6 GDHt Aktivitäts-Assay

Auch der GDHt Aktivitäts-Assay wurde analog zu den Versuchen zur Biokatalysatorproduktion (siehe Kapitel 4.2.7) durchgeführt.

5.3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse zu den Untersuchungen der Biotransformation beschrieben. Wenn nicht anders erwähnt, beschreiben alle angegebenen Fehler die Standardabweichung der Ergebnisse aus drei Transformationen.

5.3.1 Transformation in verschiedenen Medien

Die Transformation von Glycerin zu 3-HPA wird von den Inhaltsstoffen des Transformationsmediums beeinflusst. Diese unterscheiden sich je nach Ursprung der Glycerinquelle, wenn Nebenprodukte der Bioethanolherstellung verwendet werden auch je nach ursprünglicher Rohstoffpflanze. Diese Arbeit beschränkt sich jedoch auf Nebenprodukte der Bioethanolproduktion, bei der Weizen als Rohstoff dient. Deshalb wurde die Verwendung von DDGS aus Zeitz, bei denen das komplette Weizenkorn eingemaischt wird, mit Sirup aus Stade verglichen, wo vor der Einmischung Kleie und Gluten entfernt wurde (siehe Abbildung 5.1). Im Vergleich zum Standardtransformationsmedium mit Reinstglycerin wurde in dem siruphaltigen Medium eine etwas geringere 3-HPA Konzentration erreicht, in dem DDGS-haltigen Transformationsmedium jedoch eine deutlich höhere. Es zeigt sich, dass im Gegensatz zur gepufferten Glycerinlösung in den Medien aus der Bioethanolherstellung Laktat akkumuliert wird, während die Akkumulation von 1,3-Propan diol in allen drei Medien vergleichbar ist (siehe Abbildung 5.2).

5.3.2 Transformation bei verschiedenen Bedingungen

Da 3-HPA sehr reaktiv ist, besteht die Möglichkeit dass es unter Transformationsbedingungen mit Fest- und Schwebstoffen reagiert und sich somit die erreichbare 3-HPA Konzentration verringert. Deshalb wurden die Transformationen in komplettem, zentrifugiertem und filtriertem Sirup verglichen (siehe Abbildung 5.3). In Transformationen bei pH 6,5 und 37°C zeigte sich kein si-

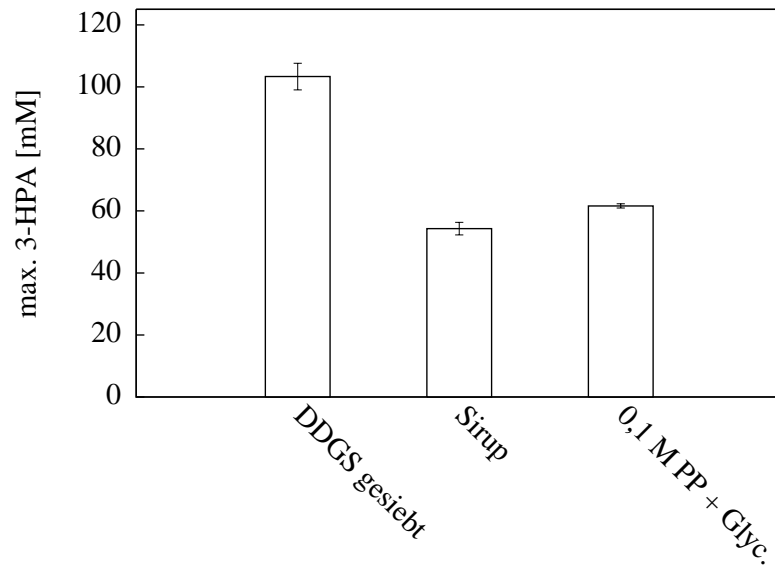


Abbildung 5.1: Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in gesiebttem DDGS, Sirup und 0,1 M Phosphatpuffer + Glycerin. Die Startbedingungen waren 1,3 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 20°C und pH 6,5.

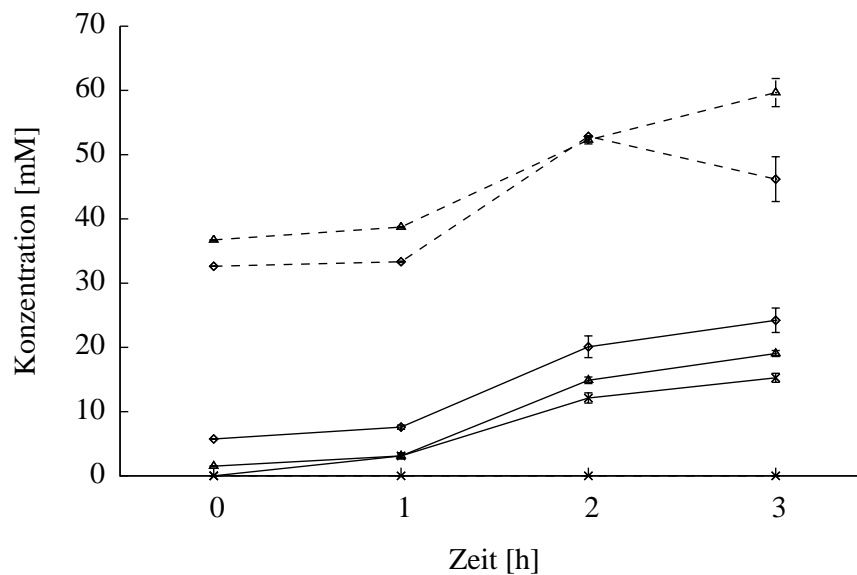


Abbildung 5.2: 1,3-Propandiolkonzentrationen (–) und Laktatkonzentrationen (– –) während der anaeroben Biotransformation in gesiebttem DDGS (\diamond), Sirup (Δ) und 0,1 M Phosphatpuffer + Glycerin (\times). Die Startbedingungen waren 1,3 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 20°C und pH 6,5.

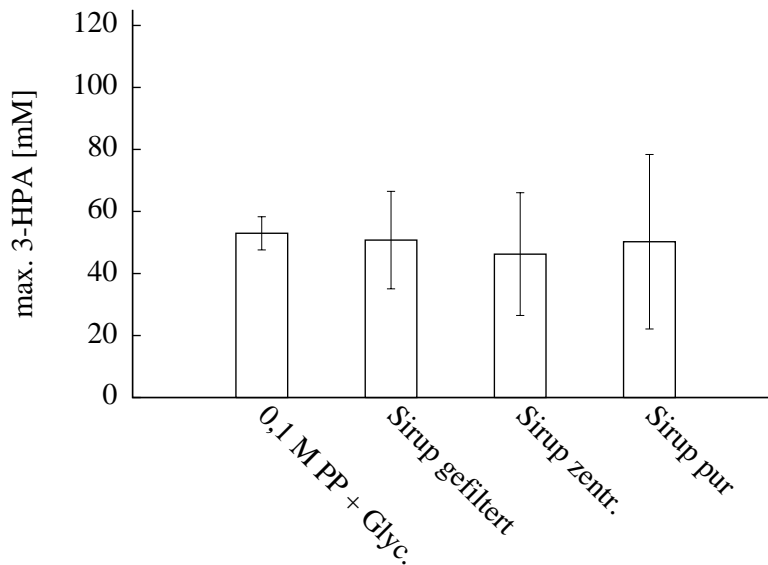


Abbildung 5.3: Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in 0,1 M PP, gefiltertem, zentrifugiertem und purem Sirup. Die Startbedingungen waren 1,5 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.

gnifikanter Unterschied in der erreichten 3-HPA Konzentration zwischen den Transformationen. Jedoch nimmt die Schwankung der Ergebnisse mit zunehmenden Feststoffanteil zu. Die 3-HPA Konzentration fällt in siruphaltigen Medien im Mittel etwas schneller ab als in der gepufferten Glycerinlösung, jedoch unabhängig vom Feststoffanteil (siehe Abbildung 5.4).

Auch wenn sich bei konstanter Temperatur und konstantem pH Wert kein Einfluss der Feststoffkonzentration auf die erzielte 3-HPA Konzentration zeigt, kann eine Änderung der Reaktionstemperatur dazu führen, dass die Reaktionen von Glycerin zu 3-HPA und von 3-HPA mit den Feststoffen unterschiedlich beeinflusst werden. Vergleicht man jedoch die Transformation bei 20°C und bei 37°C so zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der erreichten 3-HPA Konzentration im feststoffhaltigen Wasser-Sirup Medium (ohne Abbildung, die Startbedingungen waren 1,3 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin und pH 6,5). In diesem Experiment und in den in diesem Kapitel folgenden Experimenten beschreiben alle angegebenen Fehler die Standardabweichungen der Ergebnisse aus zwei Transformationen und je drei Messungen. Die erreichte 3-HPA Konzentration im feststofffreien gepufferten Wasser-Glycerin Medium (enthält nur den Biokatalysator als Feststoff während der Transformation) bei

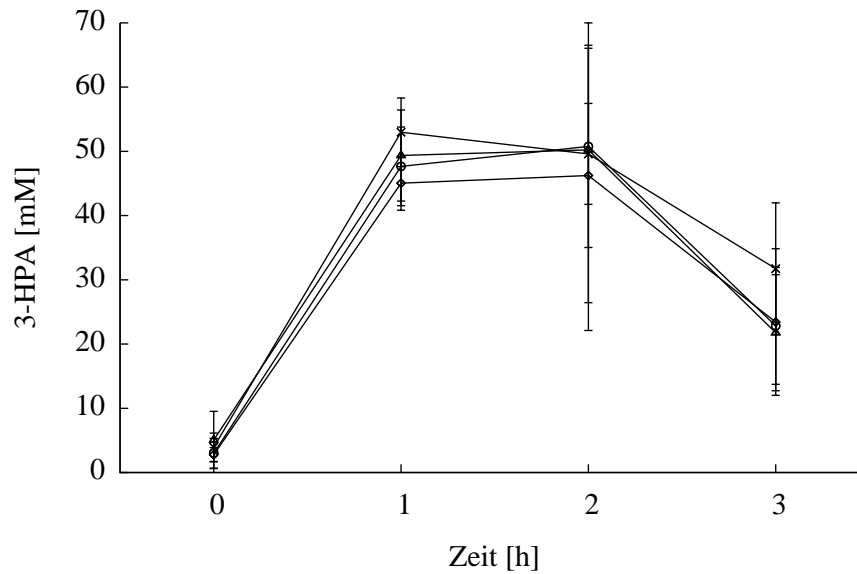


Abbildung 5.4: 3-HPA Konzentrationen während der anaeroben Biotransformation in 0,1 M PP (×), gefilterten (○), zentrifugierten (◇) und puren Sirup (△) enthaltenden Medium. Die Startbedingungen waren 1,5 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.

37°C ist leicht geringer als bei 20°C. Es gibt unter den gegebenen Bedingungen bei 37°C und pH 6,5 keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen der erreichten 3-HPA Konzentration mit Sirup und mit Reinstglycerin.

Die pH Abhängigkeit der erreichten 3-HPA Konzentration unterscheidet sich deutlich von der Temperaturabhängigkeit (siehe Abbildungen 5.5 und 5.6).

Während der pH Wert kaum einen Einfluss auf die erreichte 3-HPA Konzentration bei einer Transformation in glycerinhaltigem Wasser hat, fällt die erreichte 3-HPA Konzentration im siruphaltigen Medium stark ab (siehe Abbildung 5.5). Dies geschieht obwohl vor der Transformation alle Feststoffe durch Filtration entfernt wurden (das Medium enthält nur den Biokatalysator als Feststoff während der Transformation). Bei pH 2,5 wurde nahezu keine 3-HPA Akkumulation festgestellt. Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei der Biotransformation in gesiebttem DDGS (siehe Abbildung 5.6). Auch hier nimmt die erreichte 3-HPA Konzentration bei niedrigeren pH Werten stark ab. Bei pH 3,5 wurde nahezu keine 3-HPA Akkumulation festgestellt. Es zeigt sich, dass im Gegensatz zur wässrigen Glycerinlösung in den DDGS oder siruphaltigen Medien die Glycerinkonversion bei niedrigen pH Werten stark inhibiert ist (siehe Abbildung 5.7).

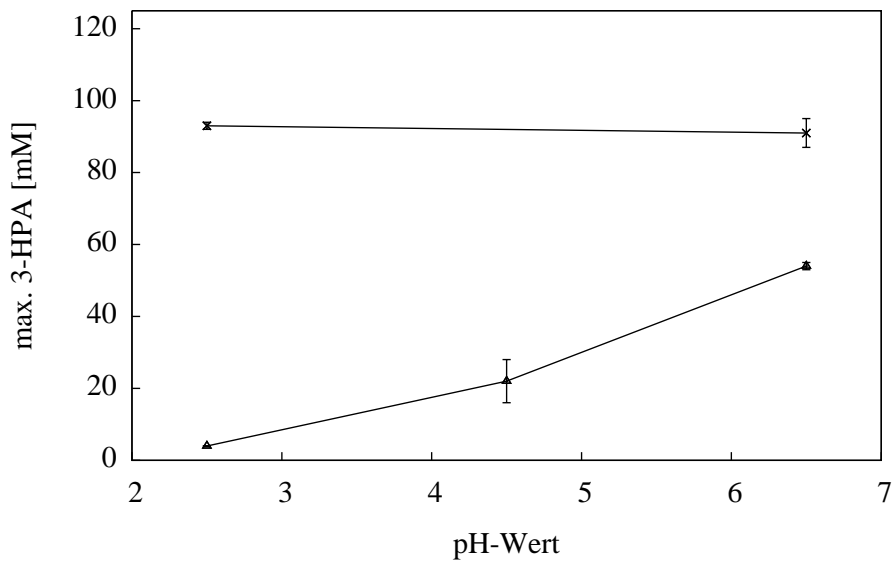


Abbildung 5.5: Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in Wasser (×) und gefiltertem Sirup (Δ) bei verschiedenen pH Werten. Die Startbedingungen waren 1,6 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l bzw. 10 g/l Glycerin und 20°C.

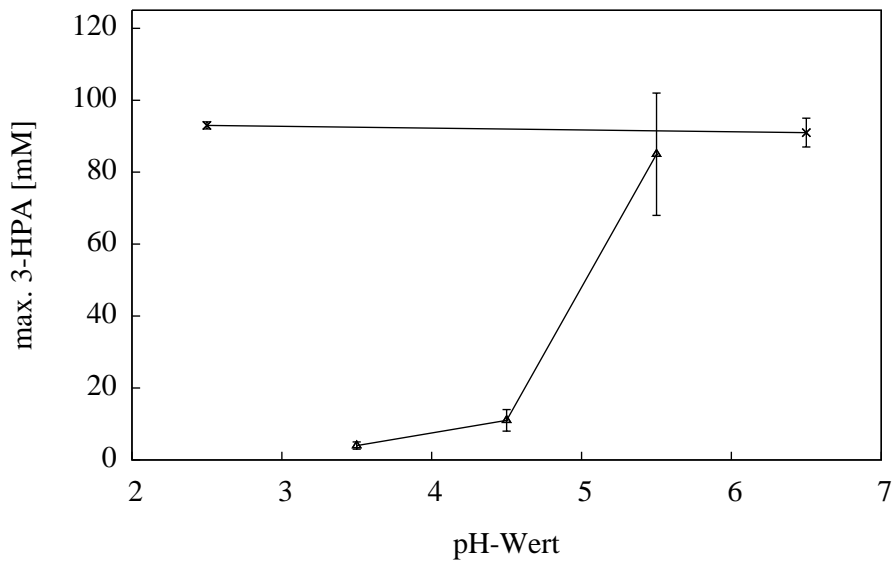


Abbildung 5.6: Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in Wasser (×) und gesiebtem DDGS (Δ) bei verschiedenen pH Werten. Die Startbedingungen waren 1,7 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin und 20°C.

Die Menge des notwendigen Ganzzellbiokatalysators, um die Reaktion von

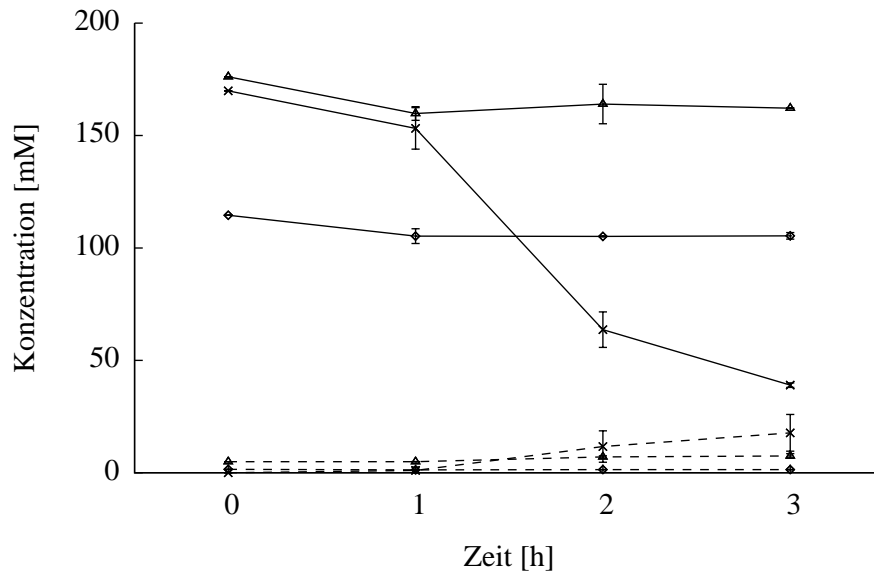


Abbildung 5.7: Glycerinkonzentrationen (–) und 1,3-Propandiolkonzentrationen (– –) während der anaeroben Biotransformation in gefiltertem Sirup bei pH 2,5 (\diamond), gesiebtem DDGS bei pH 3,5 (\triangle) und wässriger Glycerinlösung bei pH 2,5 (\times). Die Startbedingungen waren 1,7 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 10 g/l bzw. 15 g/l Glycerin und 20°C.

Glycerin zu 3-HPA zu katalysieren, bestimmt stark die Kosten des Endprodukts. Es sollte deshalb nicht mehr Katalysator eingesetzt werden als notwendig ist. Darüber hinaus kann der Biokatalysator nicht nur die Reaktion von Glycerin zu 3-HPA katalysieren, sondern auch mit dem 3-HPA unter bestimmten Bedingungen reagieren und somit die erreichbare 3-HPA Konzentration minimieren. Der Ganzzellbiokatalysator besitzt auch aktive Enzyme, welche die Reaktion von 3-HPA zu 1,3-Propanediol katalysieren können, sofern der dafür nötige Wasserstoff in Form von Reduktionsäquivalenten vorhanden ist. Deshalb wurden Transformationen mit Reinstglycerin oder mit Sirup bei verschiedenen Enzymkonzentrationen verglichen (siehe Abbildung 5.8). Während im gepufferten Glycerin-Wasser Medium die erreichte 3-HPA Konzentration mit zunehmender Katalysatorkonzentration ansteigt, nimmt in dem siruphaltigen Medium die erreichte 3-HPA Konzentration bei geringeren Enzymkonzentrationen zu. Weniger Ganzzellbiokatalysator im Transformationsmedium führt also in diesem Falle zu einer höheren 3-HPA Produktion. Es zeigt sich, dass bei geringerer Katalysatorkonzentration in gefiltertem Sirup die 3-HPA Ak-

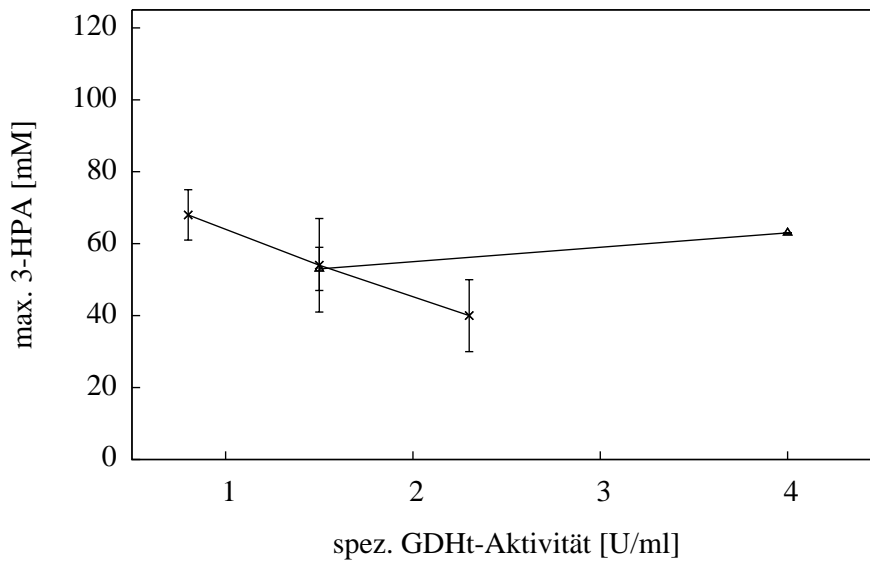


Abbildung 5.8: Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in gefiltertem Sirup (×) und 0,1 M PP (Δ) bei verschiedenen GDHt-Aktivitäten. Die Startbedingungen waren 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.

kumulation stimuliert wird, während der Glycerinverbrauch und die Propandiolakkumulation bei verschiedenen Katalysatorkonzentrationen unverändert bleiben (siehe Abbildung 5.9).

Es ist bekannt, dass eine CO_2 Atmosphäre das Wachstum von *L. reuteri* stimuliert. Es ist jedoch nicht bekannt, ob CO_2 auch einen Einfluss auf die Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA hat. Molekularer Wasserstoff kann in Anwesenheit eines Katalysators 3-HPA zu 1,3-PDO hydrieren. So gibt es Mikroorganismen welche molekularen Wasserstoff zum Aufbau von Reduktionsäquivalenten nutzen können. Deshalb wurde untersucht, welchen Einfluss unterschiedliche Gasatmosphären während der Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA mit dem Ganzzellbiokatalysator *L. reuteri* ATCC 53608 auf die erreichte 3-HPA Konzentration haben (siehe Abbildung 5.10). Es zeigt sich, dass immer vergleichbare 3-HPA Konzentration zu beobachten sind, egal ob die Transformation unter einer reinen Stickstoffatmosphäre, einer 20% CO_2 enthaltenen Stickstoffatmosphäre, einer 5% H_2 enthaltenen Stickstoffatmosphäre oder einer 80% H_2 enthaltenen Stickstoffatmosphäre durchgeführt wurde.

Hohe 3-HPA Konzentrationen führen zum Tod des Ganzzellbiokatalysators und zu einem Stopp der Biotransformation. Um dies zu vermeiden sollte die 3-HPA

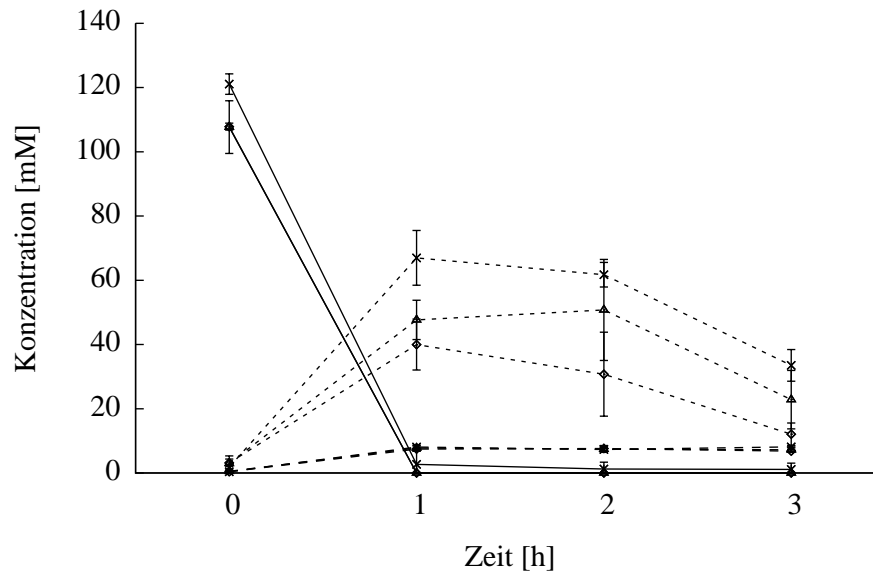


Abbildung 5.9: Glycerinkonzentrationen (-), 1,3-Propandiolkonzentrationen (--) und 3-HPA Konzentrationen (...) während der anaeroben Biotransformation in gefilterten Sirup bei 0,8 u/ml (×), 1,5 U/ml (Δ) und 2,3 U/ml (◇). Die Startbedingungen waren 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.

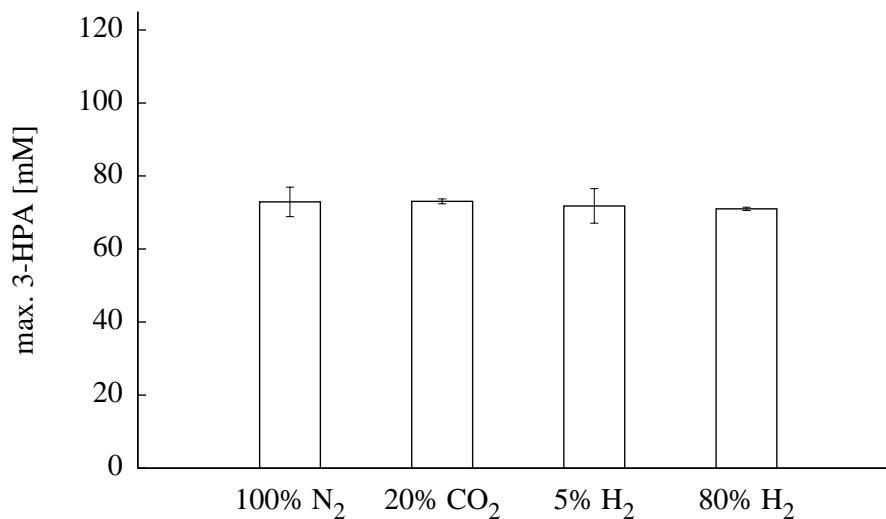


Abbildung 5.10: Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in 0,1 M PP unter verschiedenen Gasatmosphären. Die Startbedingungen waren 1,5 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 20°C und pH 6.

Konzentration mit einem geeigneten *in-situ* Abtrennungsverfahren möglichst klein gehalten werden. Wenn man die Dehydratisierung und Destillation zur *in-situ* Produktentfernung nutzen möchte, wie es im kontaminierten Bioethanolprozess auftritt, muss dies bei reduziertem Druck geschehen, um den Siedepunkt des Transformationsmediums in einem Bereich zu halten, bei dem die Transformation stattfinden kann. Bei einigen Varianten der sogenannten Vakuumfermentation wird der Druck direkt im Bioreaktor reduziert. Deshalb wurde der Einfluss von Unterdruck auf die Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA untersucht (siehe Abbildung 5.11). Es zeigt sich, dass die erreichte 3-

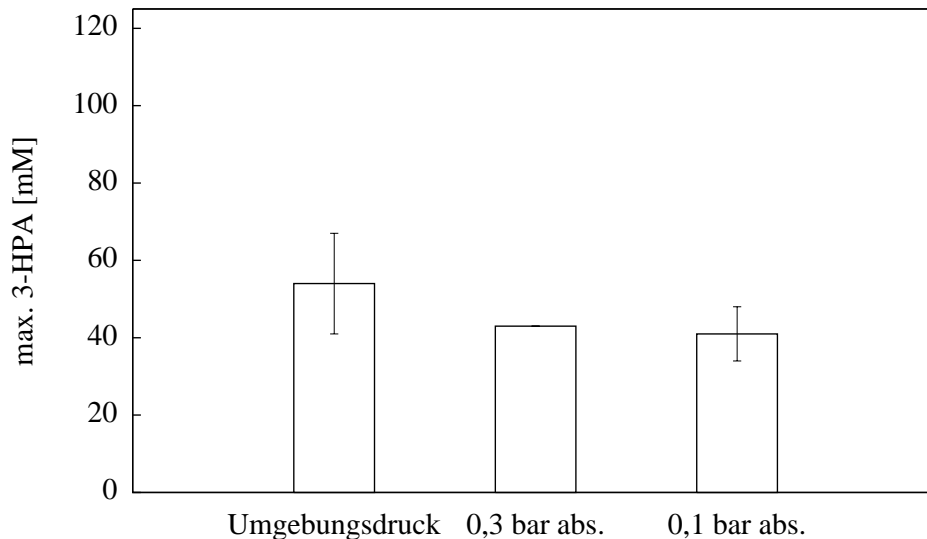


Abbildung 5.11: Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in gefiltertem Sirup. Die Startbedingungen waren 1,5 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.

HPA Konzentration bei Unterdruck leicht abnimmt. Jedoch ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Transformation bei 300 mbar Absolutdruck und 100 mbar Absolutdruck zu erkennen. Der Druck zeigt keinen Einfluss auf den Glycerinverbrauch und die Propandiolakkumulation (siehe Abbildung 5.12).

5.3.3 Transformation in Anwesenheit von Ethanol

Wenn die Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA in Nebenprodukten der Bioethanolherstellung durchgeführt werden soll, stellt sich die Frage wo die

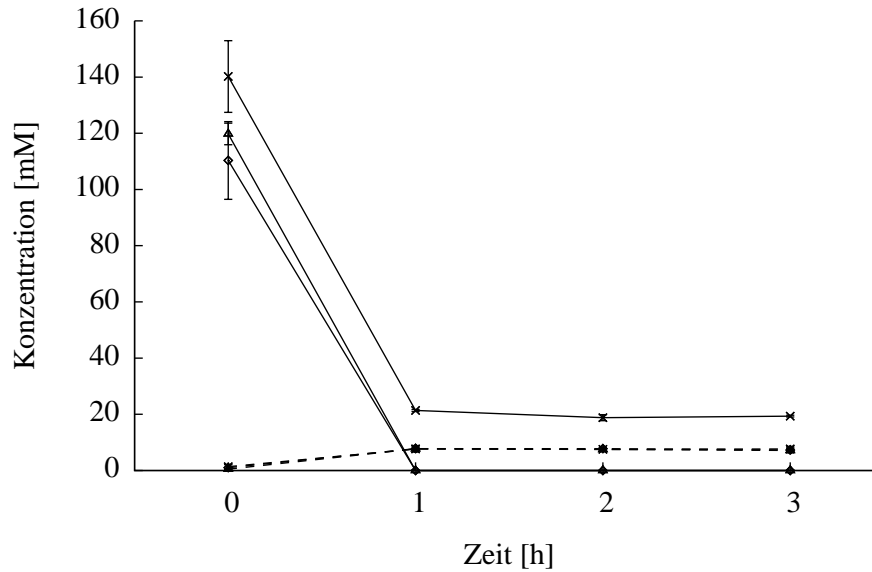


Abbildung 5.12: Glycerinkonzentrationen (–) und 1,3-Propandiolkonzentrationen (– –) während der anaeroben Biotransformation in gefiltertem Sirup bei 1 bar (×), 0,3 bar (Δ) und 0,1 bar (◇). Die Startbedingungen waren 1,5 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.

Biotransformation am besten in den Ethanolprozess integriert wird. Bei einer direkten Biotransformation in der Sauermaische nach der alkoholischen Gärung würde man keinen weiteren Reaktor benötigen und das Acrolein könnte mit dem Ethanol zusammen in derselben Destillationskolonne abgetrennt werden. Um überprüfen zu können, ob sich aus dieser Idee eine wirtschaftliche Lösung ergeben könnte, wurde die Biotransformation von Glycerin zu Schlempe in einem ethanolhaltigen Medium durchgeführt und die erreichte 3-HPA Konzentration mit den Ergebnissen aus Transformationen ohne Ethanol verglichen (siehe Abbildung 5.13). Bei den Transformationen in Anwesenheit von 80 g/l Ethanol wurde eine deutlich niedrigere 3-HPA Konzentration erreicht. Trotzdem fand durch die 80 g/l Ethanol keine Inhibierung der Glycerinumwandlung statt (siehe Abbildung 5.14). Es war auch zu beobachten, dass sich die Transformationsmedien mit Ethanol im Gegensatz zu den Transformationsmedien ohne Ethanol während der Transformation von Glycerin zu 3-HPA bei pH 6,5 und 37°C gelblich verfärben.

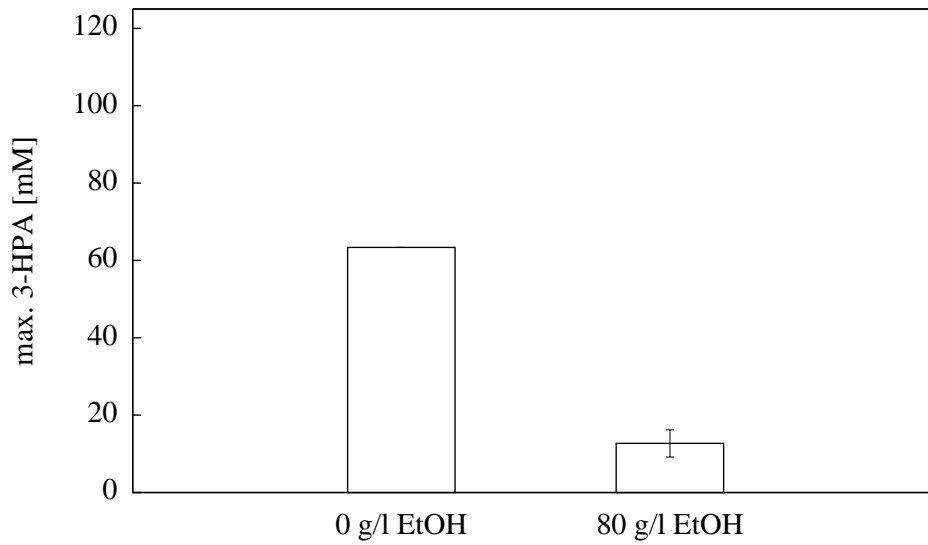


Abbildung 5.13: Maximal erreichte 3-HPA Konzentration während der anaeroben Biotransformation in 0,1 M PP ohne Ethanol und mit 80 g/l Ethanol. Die Startbedingungen waren 4 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.

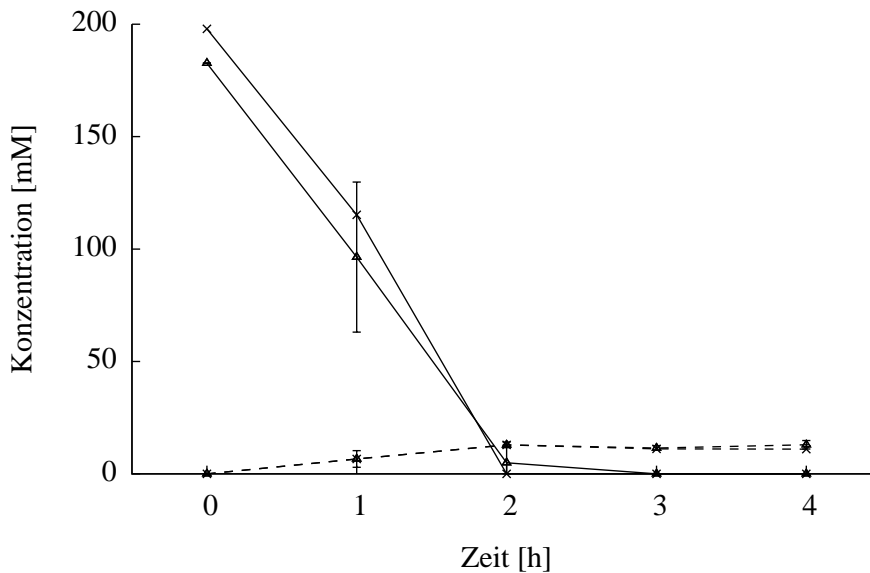


Abbildung 5.14: Glycerinkonzentrationen (—) und 1,3-Propandiolkonzentrationen (---) während der anaeroben Biotransformation in 0,1 M PP ohne Ethanol (×) und mit 80 g/l Ethanol (Δ). Die Startbedingungen waren 4 U/ml spez. GDHt-Aktivität, 15 g/l Glycerin, 37°C und pH 6,5.

5.4 Diskussion

5.4.1 Transformation in verschiedenen Medien

Aufgabe dieser Versuche war es die Biotransformation in Nebenprodukten der Bioraffinerie mit denen in einer Glycerinlösung zu vergleichen. Das hier aus einer Charge von Anfang 2010 verwendete, von CropEnergies in Zeitz produzierte, DDGS enthält das komplette Material aus der Sauermaische, nur mit dem Unterschied, dass leicht flüchtige Komponenten abgedampft und der Rest getrocknet wurde. Wenn man DDGS entsprechend mit Wasser verdünnt, enthält man ein der Schlempe sehr ähnliches Substrat, welche ja eigentlich zur Verwendung als Substrat für die Transformation von Glycerin zu 3-HPA gedacht ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch den Eindampfungs- und Trocknungsprozess auf dem Weg von der Schlempe zu DDGS Vitamine, Proteine und andere Nährstoffe aufgrund der hohen Temperaturen zerstört wurden. Eine direkte Verwendung von Schlempe für die Versuche ist jedoch aufgrund der geringen Lagerfähigkeit und den bereits erwähnten möglichen Unterschieden zwischen verschiedenen Chargen nicht zielführend. Der mit dem DDGS verglichene Sirup ist im Prinzip vierfach konzentrierte Schlempe aus der vorher ein großer Teil der Feststoffe, vor allem Hefezellen, entfernt wurde. Verdünnt man den Sirup entsprechend enthält man ein der Schlempe ähnliches Substrat, jedoch mit einem reduzierten Feststoffanteil und somit einer geringeren Hefezellenkonzentration. Aufgrund der Eindampfung ist es auch hier möglich, dass Vitamine, Proteine und andere Nährstoffe durch die hohen Temperaturen zerstört wurden. Eine Transformation in frischer Schlempe sollte also eher zu höheren oder gleichwertigen 3-HPA Konzentrationen führen. Im Vergleich zu DDGS kommt bei dem verwendeten Sirup noch hinzu, dass er aus einer Bioethanolanlage stammt, welche vor der Einmischung Kleie und Gluten entfernt. Somit ist der Sirup im Vergleich zu dem verwendeten DDGS arm an diesen Bestandteilen. Dies kann die höhere maximale 3-HPA Konzentration bei der Transformation im DDGS-haltigen Medium gegenüber der Transformation im siruphaltigen Medium oder im gepufferten Glycerin-Wasser Medium erklären (Steigerung um 68%). Es zeigt sich, dass bei der Transformation im DDGS-haltigen oder siruphaltigen Medium im Gegensatz zur Transformation in der gepufferten Glycerinlösung Laktat in das Transformationsmedium abgegeben

wird (siehe Abbildung 5.2). Laut Lüthi-Peng et al. deutet dies auf eine aktive Glycolyse und das Vorhandensein einer Zuckerquelle hin ([LPDP02]). Jedoch enthalten DDGS und Sirup keine Glukose mehr, da diese durch die Hefen während der alkoholischen Gärung vollständig verbraucht wurde. Jedoch müssten im DDGS noch die Pentosen vorhanden sein, welche die Hefen nicht nutzen können ([Kal01]). *L. reuteri* hingegen ist in der Lage einige Pentosen wie Arabinose und Ribose zu nutzen und damit die Glycolyse durchzuführen ([KSK80]). Ein weiterer Vorteil ist, dass bei der Verstoffwechslung von Pentosen kein überschüssiges NADH produziert wird, welches die 3-HPA Ausbeute durch Ermöglichung der Reaktion zu 1,3-Propandiol reduziert ([ZERU06], [Kan83]). Dies erklärt die gesteigerte 3-HPA Akkumulation in dem DDGS Transformationsmedium ohne eine gesteigerte 1,3-Propandiolakkumulation. Der positive Effekt von kleinen Mengen Zucker auf die 3-HPA Akkumulation, vermutlich verursacht durch eine Steigerung der Co-Faktorregeneration und der Selbstentgiftung von 3-HPA sowie einer Verschiebung der Stoffflüsse durch das gebildete Laktat, wurde bereits von Lüthi-Peng et al. und Rütli beschrieben ([LPDP02], [Rüt10]).

5.4.2 Transformation bei verschiedenen Bedingungen

Ziel der Versuche war es zu ermitteln, wie sich die Transformation unter verschiedenen Bedingungen verhält. Eine variierte Feststoffkonzentration bedeutet eine variierte Hefezellen- und damit Aminosäurekonzentration. Lüthi-Peng et al. konnten zeigen, dass 3-HPA bei pH 6,25 und 37°C mit freien Aminosäuren reagiert. Nach vier Stunden waren nur noch ca. 80% der ursprünglichen 3-HPA Menge im MRS+ Medium vorhanden ([LPSP02]). In der hier vorliegenden Arbeit zeigt sich jedoch während der Transformationen bei pH 6,5 und 37°C kein signifikanter Unterschied in der erreichten 3-HPA Konzentration zwischen den Transformationen in Sirup mit unterschiedlichem Feststoffanteil (siehe Abbildung 5.3). Dies scheint daran zu liegen, dass bei allen Versuchen nach bereits 60 Minuten die Transformation von 15 g/l Glycerin zu 3-HPA nahezu abgeschlossen ist. Die Reaktion des 3-HPAs mit den festen Sirupbestandteilen ist also zu langsam um sich signifikant auf die erreichte 3-HPA Konzentration auszuwirken. Nach dem Erreichen der maximalen 3-HPA Konzentration sinkt diese jedoch schneller in einem Medium aus Nebenprodukten

der Bioraffinerie als in einem Wasser-Glycerin Medium (siehe Abbildung 5.4). Deshalb ist eine schnelle Weiterverarbeitung der 3-HPA-haltigen Transformationsbrühe geboten. Hierbei ist es unerheblich ob die Feststoffe entfernt werden. 3-HPA scheint hauptsächlich mit gelösten Stoffen in dem Sirup zu reagieren. Die stärkere Schwankung der Messwerte bei höheren Feststoffkonzentrationen lässt sich auf das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Reaktionen zur Stimulation der 3-HPA Akkumulation und Abreaktion von 3-HPA zurückführen.

Bei höheren Temperaturen steigt die Reaktionsgeschwindigkeit, doch bei der Transformation im siruphaltigen Medium scheint eine Temperaturänderung auf alle Reaktionen den gleichen Einfluss zu haben, was dazu führt, dass die maximal erreichte 3-HPA Konzentration bei 20°C und 37°C nahezu identisch ist. Eigentlich ist die Toxizität von 3-HPA temperaturabhängig und steigt mit höheren Temperaturen, was zu einer Verminderung der 3-HPA Produktion führen müsste ([SEZ77]). Jedoch liegen die gemessenen 3-HPA Konzentrationen vermutlich unterhalb der minimalen bakterioziden Konzentration, welche von Cleusix et al. für *L. reuteri* ATCC 55730 mit 60-120 mM angegeben wird ([CLV+07]). Bei der Transformation im Glycerin-Wasser Medium fehlen jegliche Mediumbestandteile, welche es *L. reuteri* ermöglichen könnten sich gegen das toxische 3-HPA zu schützen, was den leicht negativen Einfluss auf die 3-HPA Konzentration bei höheren Temperaturen erklären kann. Aufgrund des komplexen Zusammenspiels der Reaktionen, welche zur Bildung von 3-HPA und zu der Abreaktion von 3-HPA führen, ist es auch schlüssig, dass bei niedrigeren Temperaturen die Schwankungen der Messwerte geringer sind, da hier die Reaktionsgeschwindigkeiten kleiner sind und sich kleine Veränderungen nicht so stark auswirken.

Die pH Abhängigkeit der erreichten 3-HPA Konzentration unterscheidet sich deutlich von der Temperaturabhängigkeit (siehe Abbildungen 5.5 und 5.6). Während der pH Wert kaum einen Einfluss auf die erreichte 3-HPA Konzentration bei einer Transformation in glycerinhaltigem Wasser hat, fällt die erreichte 3-HPA Konzentration im siruphaltigen Medium stark ab (siehe Abbildung 5.5). Eine stärkere Abreaktion des 3-HPA bei niedrigen pH werten scheidet aus drei Gründen aus. Die Feststoffe wurden bereits durch Filtration entfernt und die Reaktion von 3-HPA mit Proteinen nimmt mit niedrigeren pH

Werten ab ([SCLH03]). Außerdem stagniert auch die Menge des verbrauchten Glycerins in DDGS und siruphaltigen Medien bei niedrigeren pH Werten, was auf eine Inhibierung der Transformation statt auf ein Abreagieren des 3-HPAs hindeutet (siehe Abbildung 5.7). Rütli hat unter bestimmten Bedingungen beobachtet, dass im ungepufferten Glycerin-Wasser Medium die erreichte 3-HPA Konzentration bei niedrigeren pH Werten steigt und wenn Glukose und Citrat-Phosphat Puffer im Medium vorhanden sind bei niedrigeren pH werten fällt. Mit Citrat-Phosphat Puffer und ohne Glukose lag der optimale pH wert bei ca. pH 5 ([Rüt10]). Aufgrund ihrer Zusammensetzungen haben die siruphaltigen und DDGS-haltigen Transformationsmedien eine puffernde Wirkung. Hinzu kommt, dass der pH Wert mit Phosphorsäure eingestellt wurde. Die Ergebnisse von Rütli und der hier vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass undissoziiertes Phosphat die Transformation von Glycerin zu 3-HPA mit *L. reuteri* inhibieren könnte. Falls Phosphat keinen direkten Einfluss auf die Transformation hat, könnte eine Erklärung in den Ergebnissen von Arntz et al. gefunden werden ([AHMW91]). Sie beschreiben, dass zur Katalyse der Gleichgewichtsreaktion zwischen Acrolein und 3-HPA anstatt Säuren auch Salze verwendet werden können. Sie katalysierten die Dehydratisierung von 2,86 M Acrolein zu 3-HPA mit 5 g/l Natriumphosphat. Höhere Phosphatkonzentrationen können das Reaktionsgleichgewicht zu Acrolein verschieben. Bisher wurde davon ausgegangen, dass sich die Toxizität stark verdünnter wässriger Acroleinlösungen mit der von 3-HPA vergleichen lässt, da diese sehr schnell zu 3-HPA Lösungen dehydratisieren. Diese Annahme muss nicht stimmen und sollte noch genauer untersucht werden.

Bei zunehmender Katalysatormenge steigt die erreichte 3-HPA Konzentration im gepufferten Wasser-Glycerin Medium. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Lüthi-Peng et al.. Sie stellten im Wasser-Glycerin und MRS+ Transformationsmedium einen Anstieg der erreichten 3-HPA Konzentration mit höherer Katalysatormenge bei 37°C im Bereich bis 15 g/l Biotrockenmasse fest ([LPSP02]). In der hier vorliegenden Arbeit steigt jedoch die erreichte 3-HPA Konzentration mit geringeren Katalysatormengen im siruphaltigen Medium in einem mit Lüthi-Peng et al. vergleichbaren Bereich der *L. reuteri* Biotrockenmasse. Doleyres et al. haben für sehr hohe Ganzzellkatalysatorkonzentrationen beobachtet, dass hier die erreichte 3-HPA Konzentration wieder sinkt.

Dies wird unter anderem damit erklärt, dass durch eine sehr schnelle 3-HPA Produktion sich die Zellen bereits in einem früheren Stadium selbst vergiften ([DBVL05]). Falls *L. reuteri* Zellen mit aktiver Glycolyse eine deutlich geringere Toleranzschwelle bezüglich 3-HPA hätten, würde dies die Beobachtungen der sinkenden maximalen 3-HPA Konzentration mit höheren Ganzzellkatalysatorkonzentrationen erklären. Wie jedoch bereits erwähnt konnten Lüthi-Peng et al. im MRS+ Transformationsmedium, welches Glukose enthält und somit die Glycolyse aktiviert, einen Anstieg der erreichten 3-HPA Konzentration mit steigender Katalysatormenge bei 37°C im vergleichbaren Bereich bis 15 g/l Biotrockenmasse feststellen, was gegen diese Theorie spricht ([LPSP02]). Eine andere Erklärung könnten die Beobachtungen von Dobrogosz et al. liefern. Die Autoren wiesen eine gesteigerte 3-HPA Exkretion durch *L. reuteri* in Anwesenheit von Fremdorganismen nach und vermuteten, dass dies ein Verteidigungsmechanismus von *L. reuteri* ist. Sie konnten zeigen, dass die 3-HPA Produktion umso mehr gesteigert wird je größer das Verhältnis von Fremdorganismen zu *L. reuteri* ist. Allerdings funktionierte dies mit *E. coli* K12 nur bei Zellkontakt ([DL97]). In den Versuchen zur Abhängigkeit der 3-HPA Produktion von der Ganzzellkatalysatorkonzentration wurden zwar durch Sterilfiltration die im Sirup enthaltenen Organismen abgetrennt, wodurch kein Zellkontakt zwischen *L. reuteri* und anderen Organismen möglich war, aber das Transformationsmedium kann Zellwandbruchstücke oder Botenstoffe enthalten haben. Diese können durch die starke und lange Erhitzung des Sirups während seiner Herstellung freigesetzt worden sein. Wenn also im Verhältnis zu den stimulierenden Faktoren weniger *L. reuteri* Zellen vorhanden sind, werden letztere stärker zur Produktion von 3-HPA angeregt. In weiteren Versuchen sollte die optimale Ganzzellkatalysatorkonzentration zur Erreichung einer möglichst hohen 3-HPA Konzentration in Nebenprodukten der Bioethanolherstellung ermittelt werden. Auch die Entschlüsselung des stimulierenden Effekts wäre von wissenschaftlichem Interesse.

Das die Gasatmosphäre, unter der Mikroorganismen kultiviert werden, einen Einfluss auf das Wachstum hat, ist bekannt. So konnte zum Beispiel für *L. Plantarum* gezeigt werden, dass CO_2 das Wachstum stimuliert ([SWV+08]). Es ist jedoch bisher noch nicht untersucht worden, ob die Transformation von Glycerin zu 3-HPA durch *L. reuteri* von CO_2 beeinflusst wird. Einige Organismen

wie *E. Coli* oder *P. furiosus* können molekularen Wasserstoff nutzen, um Reduktionsäquivalente zu bilden ([RAP⁺08a], [MGB⁺03]). Falls *L. reuteri* dazu in der Lage wäre könnte in Anwesenheit von Wasserstoff vermehrt 3-HPA zu 1,3-Propandiol hydriert werden. Dies würde die 3-HPA Ausbeute minimieren und könnte zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse führen, wenn man mit einer Anaerobbank arbeitet, dessen Atmosphäre Wasserstoff enthält. Die Versuchsergebnisse geben aber keinen Hinweis darauf, dass CO_2 oder H_2 einen Einfluss auf die Transformation von Glycerin zu 3-HPA haben (Siehe Abbildung 5.10).

Die Vakuumfermentation wurde bereits im Zusammenhang mit der Bioethanolherstellung untersucht ([CW77], [LWPR81], [RBW84]). Trotz gesteigerter Produktivitäten hat sie sich nicht durchgesetzt, da durch die mit dem Ethanol simultane CO_2 Produktion und dem relativ hohen Siedepunkt von Ethanol nicht vertretbare Kosten für die Vakuumerzeugung entstehen. Bei der Transformation von Glycerin zu 3-HPA entsteht jedoch kein CO_2 und der Siedepunkt bei Umgebungsdruck von Acrolein liegt mit $53^\circ C$ deutlich niedriger als der Siedepunkt von Ethanol bei $78^\circ C$ ([Eur00a], [Eur00b]). Bevor die hier vorliegende Untersuchung durchgeführt wurde, war jedoch nicht bekannt, ob *L. reuteri* in der Lage ist im Vakuum die Transformation von Glycerin zu 3-HPA durchzuführen. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass *L. reuteri* dazu in der Lage ist. Da sich weder der Glycerinverbrauch noch die 1,3-Propandiolproduktion bei unterschiedlichem Unterdruck verändert, ist die wahrscheinlichste Erklärung für die geringere 3-HPA Konzentration dass Luft durch einen undichten Versuchsaufbau in das Transformationsmedium geraten ist und 3-HPA oxidiert hat (Siehe Abbildung 5.11 und 5.12). Auch das häufige Nachregulieren des Drucks durch die Vakuumpumpe spricht dafür.

5.4.3 Transformation in Anwesenheit von Ethanol

Aufgabe dieser Versuche war es zu überprüfen, ob eine Transformation in Anwesenheit von hohen Ethanolkonzentrationen möglich ist. Zwar wird mit 80 g/l Ethanol im Transformationsmedium eine deutlich niedrigere 3-HPA Konzentration als ohne erreicht, dennoch deutet der jeweilige Glycerinverbrauch darauf hin, dass nicht weniger 3-HPA gebildet wird, sondern dieses abreagiert (siehe Abbildung 5.14). Auch die gelbliche Verfärbung, welche bei der Trans-

formation in Anwesenheit von Ethanol auftritt, und die Abnahme der Ethanolkonzentration deuten auf eine Reaktion des 3-HPA hin. Falls sich jedoch ein Acetal aus 3-HPA und Ethanol gebildet hätte, wäre zu vermuten gewesen, dass sich dieses unter den stark sauren Bedingungen der 3-HPA Quantifizierung wieder zu Aldehyd und Alkohol gespalten hätte und das 3-HPA hätte quantifiziert werden können ([WGG07]). Dies war jedoch nicht der Fall. Vermutlich trat mindestens eine weitere irreversible Reaktion auf.

Zusammenfassend scheint eine Transformation von Glycerin zu 3-HPA direkt in der Sauermaische in Anwesenheit von Ethanol nicht sinnvoll, wenn das Abreagieren des 3-HPAs welches bei pH 6,5 auftritt, bei dem üblichen pH Wert der Sauermaische von ca. 4,5 nicht verhindert werden kann.

Kapitel 6

Aufreinigung

6.1 Einleitung

Eine kostengünstige Aufreinigung, die im industriellen Maßstab anwendbar ist, ist eine Grundvoraussetzung für eine wirtschaftlich konkurrenzfähige Produktion von 3-HPA. Dafür sollte eine reaktive Aufreinigung in der Lage sein 3-HPA bereits in geringen Konzentrationen selektiv *in-situ* zu binden, ohne die 3-HPA Produktion zu inhibieren sowie unter anderen Bedingungen 3-HPA und den Hilfsstoff unverändert wieder zu trennen. Darüber hinaus wäre es von Vorteil wenn die Reaktion es ermöglichen würde, dass sich 3-HPA oder ein Reaktionsprodukt in einer anderen gasförmigen, flüssigen oder festen Phase anreichert. Hier bietet sich die Kombination aus Dehydratisierung und Destillation, wie sie zufällig während der Bioethanolproduktion auftritt an. Die Dehydratisierung ist eine reversible Reaktion, bei der nur Wasser abgespalten wird und die Destillation beziehungsweise Rektifikation ist ein im industriellen Maßstab etabliertes Verfahren. Trotzdem wurde dieser Ansatz zur Abtrennung von 3-HPA bisher kaum untersucht, obwohl keine Chemikalien sondern nur ein saurer Katalysator benötigt wird. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob es möglich ist 3-HPA bei Transformationsbedingungen zu dehydratisieren und unter Vakuum destillativ zu entfernen (siehe Abbildung 6.1 E). Die Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein wurde bei diesen niedrigen Temperaturen noch nicht bei hohen Säurekonzentrationen $H_0 < -0,52$ und geringen 3-HPA Konzentrationen beziehungsweise an sauren Feststoffkatalysatoren untersucht. Eine aus der biotechnologischen Produktion von Aldehyden bekannt-

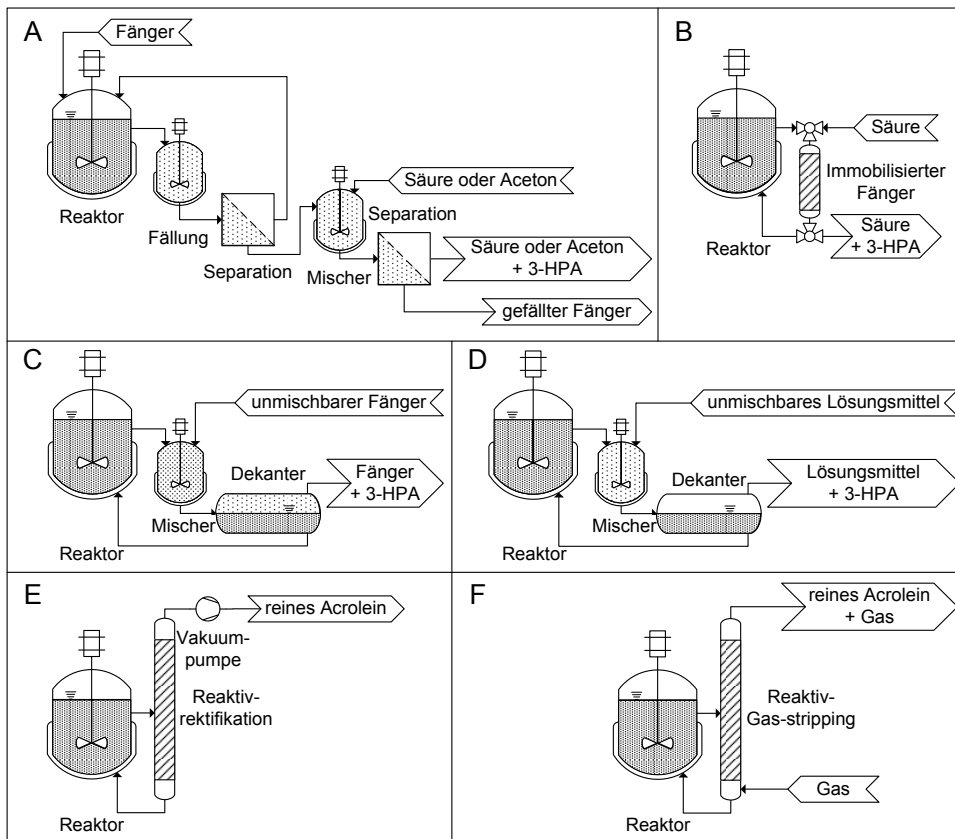


Abbildung 6.1: Verschiedene Ansätze zur in-situ Abtrennung von Aldehyden: (A) Fangen mit präzipitierenden Aldehydfängern und Abtrennung durch Fällung; (B) Fangen und Abtrennen mit immobilisierten Aldehydfängern; (C) Fangen mit unmischbaren Aldehydfängern und Abtrennung durch Phasentrennung; (D) Lösung in unmischbaren Lösungsmitteln und Abtrennung durch Phasentrennung; (E) Reaktion zur Siedepunktsreduktion und Abtrennung durch Destillation; (F) Reaktion zur Flüchtigkeitserhöhung und Abtrennung durch Lösung in einer Gasphase.

te Alternative zur Reaktivdestillation, die ohne Unterdruck auskommt, ist die Lösung des durch Dehydratisierung entstandenen Acroleins in einem inerten Gas, das sogenannte Stripping ([MVMA95], [SR98], [WZ87])(siehe Abbildung 6.1 F).

Alternative vielversprechende Verfahren zur Aufreinigung von 3-HPA haben sich als ungeeignet herausgestellt oder sie wurden nicht vollständig untersucht (siehe Kapitel 2.7). Zu den bisher nicht ausreichend untersuchten Verfahren gehört die Nutzung von Aziden als Aldehydfänger. Diese können 3-HPA unter biotechnologischen Produktionsbedingungen sehr gut binden und das Addukt kann gefällt werden. Jedoch wurde bisher nicht untersucht, ob die Rückgewinnung des 3-HPA nach der Fällung und Separation noch möglich ist (siehe Abbildung 6.1 A). Die Aufreinigung von 3-HPA mit immobilisierten Aldehydfängern war bei Versuchen von Rütli et al. erfolgreich ([RLJ+11]). Jedoch leidet dieser Ansatz unter Problemen mit der Ablösung der funktionellen Gruppen und generell an sehr geringen volumenbezogenen Kapazitäten (siehe Abbildung 6.1 B). Weitere vielversprechende Ansätze wurden bisher noch nicht untersucht. Thiole können aliphatische Aldehyde reversibel binden und sind nicht so umweltunverträglich wie Amine. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob der aus der Acrylsäureproduktion bekannte und mit Wasser unmischnbare Aldehydfänger Tert-Dodekanthiol 3-HPA binden kann und das Addukt sich in eine zweite flüssige Phase abtrennt (siehe Abbildung 6.1 C). Auch hydrophile Lösungsmittel, die trotzdem mit Wasser eine zweite flüssige Phase bilden, wurden noch nicht auf ihre Fähigkeit 3-HPA zu extrahieren hin untersucht (siehe Abbildung 6.1 D).

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Ausgangsmaterialien und Medienvorbereitung

Soweit nicht anders genannt wurden alle Medienkomponenten und Chemikalien wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben erworben und verwendet.

6.2.2 Stamm und Stammhaltung

Der Stamm und die Stammhaltung waren identisch zu den Versuchen zur Biokatalysatorproduktion (siehe Kapitel 4.2.2).

6.2.3 3-HPA Produktion mit Semicarbazid

3-HPA wurde mit dem von Lüthi-Peng et al. bereits beschriebenen Zweischrittverfahren produziert ([LPSP02]). Für die Produktion des Ganzzellbiokatalysators *L. reuteri* ATCC 53608 (erster Schritt) wurden 1,5 l MRS+ mit einer Vorkultur inokuliert (3,3 vol.-%) und in einem VSF 2000 Bioreaktor (Bioengineering AG, Schweiz) für 10 Stunden bei 37°C und 500 U/min kultiviert. Der Reaktor wurde mit Stickstoff begast, um anaerobe Bedingungen sicherzustellen. Es wurde mit NaOH titriert, um den pH Wert nicht unter 5,5 sinken zu lassen, wie von Doleyres et al. beschrieben ([DBVL05]). Der Ganzzellbiokatalysator wurde durch Zentrifugation bei 5000 u/min und 4°C für 20 Minuten in einer Beckman Zentrifuge (J2-HS) geerntet und in 1,5 l anaerobisiertem Biotransformationsmedium, bestehend aus 27 g/l K_2HPO_4 , 27 g/l Glycerin und 60 g/l Semicarbazid-HCl (Alfa Aesar, U.S.A.) in MilliQ Wasser, resuspendiert. Die Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA (zweiter Schritt) wurde in einem VSF 2000 Bioreaktor (Bioengineering, Schweiz) bei 37°C und 500 U/min für zwei Stunden durchgeführt. Es wurde mit NaOH titriert um den pH Wert nicht unter 6 sinken zu lassen, wie von Ulmer beschrieben ([Ulm08]). Der Biokatalysator wurde durch Zentrifugation bei 5000 u/min und 4°C für 20 Minuten in einer Beckman Zentrifuge (J2-HS) entfernt und der Überstand (SC-Bio-HPA) wurde sofort für die Aufreinigungsexperimente genutzt oder bei 4°C gelagert.

6.2.4 Spaltung des 3-HPA-Semicarbazid Addukts

Die Trennung des 3-HPA-Semicarbazid Addukts in SC-Bio-HPA wurde vor und nach der Fällung des Addukts getestet. Zur Trennung des Addukts unter sauren Bedingungen vor der Fällung wurden 250 μ l SC-Bio-HPA gekühlt in Eiswasser mit 500 μ l 4°C kalter 37% HCL (rauchend) und 125 μ l 4°C kalter Tryptophanlösung (siehe Kapitel 6.2.10) vermischt. Nach 40 minütiger inkubation bei 37°C wurde die optische Dichte bei 560 nm gemessen (kombinierte

saure Spaltung des Addukts und 3-HPA Quantifizierung). Für die Verdrängung des 3-HPA aus dem Addukt mit Aceton vor der Fällung wurden 100 ml SC-Bio-HPA mit 100 ml Aceton bei 25°C für eine Stunde vermischt. Zur Fällung des 3-HPA-Semicarbazid Addukts wurde SC-Bio-HPA für eine Stunde auf 50°C bei pH 4,5 (eingestellt mit 2M HCl) in einem Wasserbad erhitzt. Das Präzipitat wurde durch Vakuumfiltration separiert. Zur Trennung des Addukts unter sauren Bedingungen nach der Fällung wurde der Filterkuchen, resultierend aus 750 ml SC-Bio-HPA, in 100 ml 1 M HCl resuspendiert. Zur Verdrängung des 3-HPA aus dem 3-HPA-Semicarbazid Addukt mit Aceton nach der Fällung wurde der Filterkuchen resultierend aus 750 ml SC-Bio-HPA in 100 ml MilliQ Wasser mit 100 ml Aceton resuspendiert.

Die Rate des mit Semicarbazid gebundenen 3-HPA wurde mit der Menge 3-HPA, welches bei einer angenommenen Ausbeute von 100% aus dem konsumierten Glycerin entsteht (X_0), und der restlichen 3-HPA Menge in SC-Bio-HPA nach der Fällung und Filtration (X_{rem}) berechnet (siehe Gleichung 6.1).

$$\text{3-HPA gebunden} = \frac{X_0 - X_{rem}}{X_0} \quad (6.1)$$

Die Rate der 3-HPA Rückgewinnung wurde mit der Menge 3-HPA welches bei einer angenommenen Ausbeute von 100% aus dem konsumierten Glycerin entsteht (X_0) und mit der Menge 3-HPA nach der Spaltung mit Säure oder der Verdrängung mit Aceton (X_{rec}) berechnet (siehe Gleichung 6.2).

$$\text{3-HPA Rückgewinnung} = \frac{X_{rec}}{X_0} \quad (6.2)$$

6.2.5 3-HPA Produktion ohne Aldehydfänger

3-HPA wurde mit dem von Lüthi-Peng et al. bereits beschriebenen Zweischrittverfahren produziert ([LPSP02]). Für die Produktion des Ganzzellbiokatalysators *L. reuteri* ATCC 53608 (erster Schritt) wurden 1,5 l unsteriles MRS+ mit einer Vorkultur inokuliert (3,3 vol.-%) und in einem VSF 2000 Bioreaktor (Bioengineering AG, Schweiz) für 8 Stunden bei 37°C und 500 U/min kultiviert. Der Reaktor war anfänglich aerob und wurde nicht begast, anaerobe Bedingungen stellten sich selbstständig ein. Es wurde mit 25% Ammoniakwasser titriert, um den pH Wert nicht unter 5,5 sinken zu lassen. Der Ganzzellbiokatalysator wurde durch Zentrifugation bei 5000 u/min und 4°C für 20

Minuten in einer Beckman Zentrifuge (J2-HS) geerntet und in 1,5 l anaerobisiertem Biotransformationsmedium, bestehend aus 10 g/l Glycerin in MilliQ Wasser, resuspendiert. Die Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA (zweiter Schritt) wurde in einem VSF 2000 Bioreaktor (Bioengineering, Schweiz) bei 22°C und 500 U/min für 90 Minuten durchgeführt. Der Biokatalysator wurde durch Zentrifugation bei 5000 u/min und 4°C für 20 Minuten in einer Beckman Zentrifuge (J2-HS) entfernt und der Überstand (Bio-HPA) wurde sofort für die Aufreinigungsexperimente genutzt oder bei 4°C gelagert.

6.2.6 Bindung von 3-HPA in einer zweiten fl. Phase

Die Experimente basieren auf der “Shake flask“ Methode, wie sie in der OECD Guideline 107 beschrieben ist ([OECD95]). 5,5 ml Bio-HPA und 5,5 ml des Aldehydfängers Tert-Dodekanthiol (Fluka, Isomerenmischung 98.5%) beziehungsweise eines der Extraktionsmittel Chloroform, Toluol (Fluka), p-Xylen (Merck, Deutschland), Cyclohexan (Merck) oder n-Hexan wurden in ein 10 ml Probenfläschchen (Rotilabo) gefüllt und luftdicht verschlossen. Als Referenz diente ein 10 ml Probenfläschchen mit 11 ml Bio-HPA. Mit einer Nadel wurde Normaldruck in den Probenfläschchen sichergestellt. Die Fläschchen wurden für 5 Minuten geschüttelt und anschließend für 20 Stunden bei 25°C unbewegt inkubiert. Die Bindung und Extraktion des 3-HPA wurde mit der 3-HPA Konzentration in der wässrigen Phase (C_{Wph}), der Konzentration im Referenzfläschchen (C_{ref}) und der Konzentration vor Versuchsbeginn berechnet (siehe Gleichung 6.3).

$$\text{3-HPA gebunden} = \frac{C_{ref} - C_{Wph}}{C_0} \quad (6.3)$$

Die Ergebnisse der Extraktion mit den organischen Lösungsmitteln wurden mit Aspen plus (Version 2006, Aspen technologies, U.S.A.) geschätzt. Dafür wurde das Flash3 Modell und UNIFAC für die Abschätzung der Aktivitätskoeffizienten verwendet.

6.2.7 Bestimmung der Dehydratisierungskinetik

Zur Bestimmung der Reaktionsart und der Kinetik bei verschiedenen Temperaturen und Säurekonzentrationen wurde ein auf der Jodzähl basierender colorimetrischer Test zur Detektion der in Acrolein enthaltenen Doppelbindung

durchgeführt, um eine Onlinebeobachtung zu ermöglichen ([BB09]). In einer verschließbaren Glasküvette (110-OS, Schichtdicke 10 mm, Hellma Analytics, Deutschland) wurden 812 μl einer die gewünschte Menge des Katalysators Phosphorsäure (85 Gew.-%) enthaltenen wässrigen Lösung mit 100 μl 50 mM Lugol'sche Lösung (10 g/l Kaliumiodid p. a., Merck, 6,35 g/l Iod p. a., Merck, Deutschland) vermischt und im Photometer (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Deutschland) temperiert bis sich eine konstante Absorption bei 490 nm eingestellt hatte. Es wurden 88,2 μl Bio-HPA dazugegeben (resultiert in 5 mM 3-HPA) und die Reaktion durch Vermischung gestartet. Zur Aufnahme der Reaktion von 3-HPA zu Acrolein, welches mit dem Iod reagiert und dadurch die Absorption bei 490 nm verringert, wurde die Absorption bei 490 nm in verschiedenen Zeitintervallen über einen Zeitraum von 12 Stunden gemessen. Für die Bestimmung der Reaktionsart mit der Integralmethode wurden die in Tabelle 6.1 dargestellten Zusammenhänge verwendet. Die Hammettsche

Tabelle 6.1: Lösungen der Integralmethode zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für ausgewählte Reaktionstypen ([Lev99], [APL08], [Ham73])

Typ	Lösung
0. Ordnung	$F(C_A) = k$
1. Ordnung	$F(C_A) = \text{Ln} \frac{C_A}{C_{A,0}} = -k \cdot t$
2. Ordnung	$F(C_A) = \frac{1}{C_A} - \frac{1}{C_{A,0}} = -k \cdot t$
GGW-Reaktion	$F(C_A) = \text{Ln} \frac{C_{A,e} - C_{A,0}}{C_{A,e} - C_A} = -k \cdot t$

Acidität H_0 , bei der die Dehydratisierung stattfand, wurde gemäß Arnett et al. berechnet (siehe Abbildung 6.2). Die Gleichgewichtskonstante K wurde gemäß Gleichung 6.4 und die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k gemäß Gleichung 6.5 ermittelt.

$$K = \frac{C_{Acr,e}}{C_{HPA,e}} = \frac{C_{HPA,0} - C_{HPA,e}}{C_{HPA,e}} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (6.4)$$

$$k = k_1 + k_{-1} \quad (6.5)$$

Zur Bestimmung der Dehydratisierungskinetik an verschiedenen Feststoffkatalysatoren wurde ein 250 mm Liebig-Kühler (Glasgerätebau Ochs, Deutschland) als Reaktor verwendet. Dieser war unten mit einer Fritte verschlossen durch die der Reaktor begast, befüllt und Proben genommen werden konnten. Die

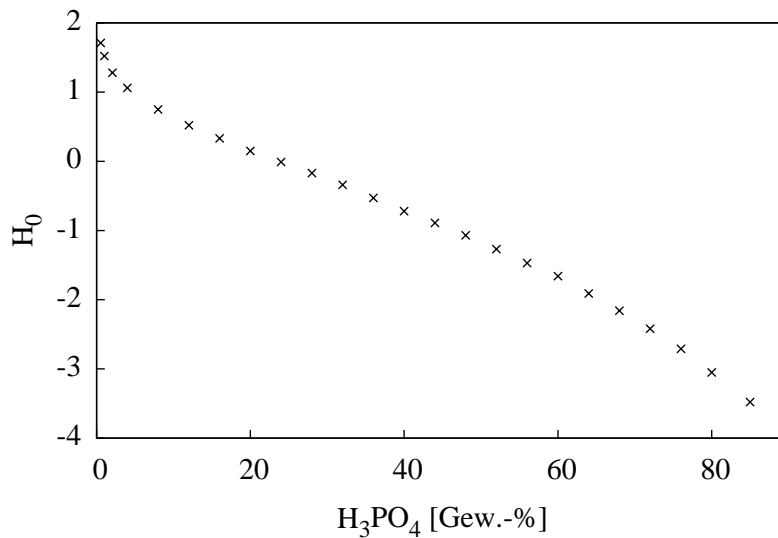


Abbildung 6.2: Hammett Aciditätsfunktion H_0 bei verschiedenen Phosphorsäurekonzentrationen ([AM66])

Abluft wurde über eine Kühlfalle geleitet und mit einem Sterilfilter ($0,2 \mu\text{m}$) gegenüber der Umgebung abgedichtet. 10 ml des Feststoffkatalysators wurden in den Reaktor gefüllt und dieser mit Stickstoff anaerobisiert. Anschließend wurden 10 ml Bio-HPA über die Probennahme zugeführt und der Reaktor für 5 Minuten mit 1 l/h Stickstoff begast. Anschließend wurde soviel Bio-HPA entnommen, dass das Flüssigkeitsniveau 2 cm oberhalb des Feststoffkatalysators lag. Der Doppelmantel des Reaktors wurde mit vortemperiertem Wasser eines Heizbades gefüllt, um eine Temperatur von 37°C im Reaktor zu gewährleisten. Proben wurden sofort gefiltert ($0,2 \mu\text{m}$, PVDF Membran), in auf 0°C gekühlte HPLC Röhrchen gefüllt und die Konzentrationsbestimmung von 3-HPA und Acrolein mit der HPLC gestartet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass zwischen der Probennahme und dem Start der HPLC Messung nicht mehr als zwei Minuten vergehen. Die 3-HPA- und Acroleinkonzentrationen wurden mit einer HPLC (Kontron Instruments) mit RI Detektor (Erma, Tokio) bestimmt. Hierfür wurde die Probe über eine Aminex HPX-87H Säule ($300 \times 7,8 \text{ mm}$, Bio-Rad, U.S.A.) bei 40°C mit $0,6 \text{ ml/min}$ $5 \text{ mM } H_2SO_4$ eluiert. Das Injektionsvolumen betrug $20 \mu\text{m}$. Die 3-HPA Kalibration der HPLC wurde mit Bio-HPA in verschiedenen Verdünnungen durchgeführt und die 3-HPA Kon-

zentration in den Verdünnungsstufen colorimetrisch bestimmt (siehe Kapitel 6.2.10).

Die Dehydratisierungskinetik wurde an zwei Feststoffkatalysatoren bestimmt und mit der Dehydratisierungskinetik mit 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) verglichen. Die untersuchten Feststoffkatalysatoren waren Amberlyst 36 (1,95 eq/l, Aldrich, Deutschland) und eine nach Neher et al. präparierte feste Phosphorsäure ([NHA⁺94]). Hierfür wurden 25 g α -Aluminiumoxid (Alpha-Phase, Katalysatorträger, geringe Oberfläche, Trimodal, Alfa Aesar, Deutschland) mit 10 ml MilliQ Wasser und 10 ml Ortho-Phosphorsäure (85 Gew.-%) im Rotationsverdampfer (Labo-Rota 300, Resona Technics, Schweiz) bei Umgebungstemperatur für eine Stunde gemischt. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit bei 80°C und 100 mbar entfernt. Der trockene Feststoffkatalysator wurde noch bei 450°C in einem Muffelofen (Ströhlein Instruments, Deutschland) für eine Stunde temperiert und anschließend bei Umgebungstemperatur abgekühlt.

6.2.8 Reaktivdestillation

777 ml Bio-HPA wurden mit 500 ml Ortho-Phosphorsäure (85 Gew.-%) vermischt, um saure Bedingungen herzustellen (Hammet Acidität $H_0 = -0,9$, [HW49]). Die Destillation wurde bei 37°C und 62 mbar durchgeführt. Der Teilkondensator hatte eine Temperatur von 25°C. Die Destillatvorlage wurde mit flüssigen Stickstoff gekühlt, um zu verhindern, dass unkondensiertes Acrolein in die Vakuumpumpe gelangt. Die Destillation wurde beendet, als das Destillatvolumen (V_{dest}) 12 ml betrug.

Zur Abschätzung idealer Ergebnisse wurde unter Annahme eines Phasengleichgewichts mit Aspen plus (Version 2006) Berechnungen durchgeführt. Hierbei wurden die NRTL Gleichungen für die Aktivitätskoeffizienten, die Redlich-Kwong Gleichung für den Dampfphasenzustand und das RadFrac Modell verwendet. Es wurde angenommen, dass die Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat und in der Destillatvorlage bereits Acrolein vorliegt.

Mit der 3-HPA Menge in der Vorlage vor der Destillation (M_0) und nach der Destillation (M_{rem}) sowie der Acroleinmenge im Destillat (M_{dest}) wurden fol-

gende Parameter der Destillation bestimmt:

$$\text{3-HPA gebunden} = \frac{M_0 - M_{rem}}{M_0} \quad (6.6)$$

$$\text{3-HPA Rückgewinnung} = \frac{M_{dest}}{M_0} \quad (6.7)$$

$$\text{3-HPA Wirkungsgrad} = \frac{M_{dest} + M_{rem}}{M_0} \quad (6.8)$$

$$C_F = \frac{C_{dest}}{C_0} \quad (6.9)$$

6.2.9 Reaktivstripping

Zur Prüfung ob das Konzept des Reaktivstripings mit Gas funktioniert wurde derselbe Versuchsaufbau wie zur Kinetikbestimmung der Feststoffsäuren verwendet. Der anaerobisierte und auf 37°C temperierte Reaktor wurde mit 10 ml Ortho-Phosphorsäure (85 Gew.-%) und 10 ml Bio-HPA befüllt ($H_0 = -1,4$) und mit 100 l/h Stickstoff für 1,5 Stunden begast. Der flüssigkeitsbeladene Gasstrom wurde in der Kühlfalle gekühlt und mit flüssigem Stickstoff auskondensiert. Mit der 3-HPA Menge in der Vorlage vor der Begasung (M_0) und nach dem Gas Stripping (M_{rem}) sowie der Acroleinmenge in der Kühlfalle (M_{dest}) wurden folgende Parameter des Gasstripings bestimmt:

$$\text{3-HPA gebunden} = \frac{M_0 - M_{rem}}{M_0} \quad (6.10)$$

$$\text{3-HPA Rückgewinnung} = \frac{M_{trap}}{M_0} \quad (6.11)$$

$$\text{3-HPA Wirkungsgrad} = \frac{M_{trap} + M_{rem}}{M_0} \quad (6.12)$$

$$C_F = \frac{C_{trap}}{C_0} \quad (6.13)$$

6.2.10 Quantifizierung

Die Quantifizierungen wurden analog zu den Versuchen zur Biokatalysatorproduktion (siehe Kapitel 4.2.5) durchgeführt. Jedoch wurden die HPLC Messungen bei einer Säulentemperatur von 40°C durchgeführt, sodass mittels HPLC zusätzlich die 3-HPA Konzentration quantifiziert werden konnte.

6.3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse zu den Untersuchungen der Aufreinigung beschrieben. Wenn nicht anders erwähnt, beschreiben alle angegebenen Fehler die Standardabweichung der Ergebnisse aus drei Messungen.

6.3.1 Alternative Verfahren

Die Kombination aus Dehydratisierung und Destillation ist nicht der einzige vielversprechende Ansatz zur *in-situ* Aufreinigung von 3-HPA aus dem Transformationsmedium. Deshalb sollten die Konzepte alternativer vielversprechender Verfahren überprüft werden, um abwägen zu können, welcher Ansatz das größte Potential hat. Ein Ansatz nutzt die Eigenschaft von Aziden aus schnell mit Aldehyden zu reagieren und leicht zu präzipitieren. Es ist bekannt, dass es sich bei der Reaktion zwischen Azid und Aldehyd um eine reversible Gleichgewichtsreaktion handelt, deren Gleichgewichtslage zum Beispiel durch den pH Wert beeinflusst wird. Jedoch ist nicht bekannt, ob sich Azid und Aldehyd nach der Präzipitation des Addukts, welche zur Produktseparation verwendet werden soll, noch trennen lassen. In Tabelle 6.2 sind die Ergebnisse dazu für zwei verschiedene Arten der Trennung des 3-HPA-Semicarbazid Addukts dargestellt. 97% des 3-HPA konnten mit Semicarbazid gebunden und durch Fällung aus dem Transformationsmedium entfernt werden. Jedoch war eine Rückgewinnung des 3-HPA nach der Fällung weder durch Zugabe von Säure, um das Reaktionsgleichgewicht zu verschieben, noch durch Zugabe von Aceton, um 3-HPA aus dem Addukt zu verdrängen, erfolgreich. Im Gegensatz dazu funktioniert die Rückgewinnung von 3-HPA vor der Präzipitation mit beiden Hilfsstoffen, jedoch deutlich besser durch die Verdrängung mit Aceton als durch die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts mit Säure. Weitere vielverspre-

Tabelle 6.2: Ergebnisse des Fangens von 3-HPA mit Semicarbazid und der Spaltung des 3-HPA-semicarbazons durch Aceton oder Säure vor oder nach der Fällung.

Spaltnittel	3-HPA gebunden [%]	Zugabe des Spaltnittels	
		vor Fällung	nach Fällung
		3-HPA rückgewinnung [%]	
HCl	97 ± 0	$19,5 \pm 3,8$	$0,0 \pm 0,0$
Aceton		$74,5 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

chende Ansätze nutzen eine zweite flüssige Phase zur Abtrennung von 3-HPA. Dies kann durch direkte Lösung des 3-HPAs in der zweiten Phase geschehen oder durch Reaktion von 3-HPA mit einem Hilfsstoff, der in der zweiten Phase die Löslichkeit des Reaktionsproduktes gegenüber der Löslichkeit von 3-HPA verbessert. In Abbildung 6.3 sind die Ergebnisse mit verschiedenen Lösungsmitteln und dem reaktiven Hilfsstoff Tert-Dodecanthiol, welche gleichzeitig die zweite Phase bilden, dargestellt. Keiner der Stoffe schafft es mehr als 10% des

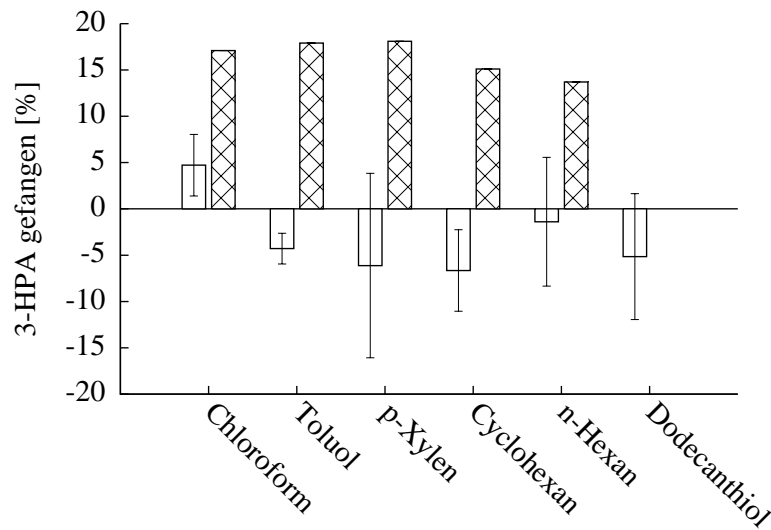


Abbildung 6.3: Experimentelle Ergebnisse (□) verglichen mit berechneten idealen Ergebnissen (⊠) für das Lösen bzw. reaktive Fangen von 3-HPA aus Transformationsmedium in einer zweiten Phase in verschiedenen unmischbaren Lösungsmitteln bei 25°C und einem 1:1 Mischungsverhältnis.

3-HPAs in Bio-HPA zu binden. Die Verwendung aller Stoffe außer Chloroform resultiert in einem negativen Wert für die 3-HPA Bindung, was bedeutet, dass die 3-HPA Konzentration im Referenzversuch ohne Hilfsstoff stärker gesunken ist als in den Versuchen mit den Hilfsstoffen. Die rechnerische Abschätzung der Phasenverteilung von 3-HPA mit Hilfe der UNIFAC Modelle führt zu Werten für das Fangen und die Abtrennung von 3-HPA in die zweite Phase von unter 20%.

6.3.2 Dehydratisierung

Die Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein ermöglicht die Bildung einer Dampfphase, in der das Acrolein konzentriert ist und die sich leicht von der flüssigen Phase, dem Transformationsmedium, abtrennen lässt. Um die Dehydratisierung gezielt einzusetzen, muss jedoch die Kinetik und der Einfluss verschiedener Prozessparameter bekannt sein. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass bei der Anwendung des auf der Iodzahl basierenden Verfahrens die Absorption bei 490 nm im Bereich zwischen 0,3 mM und 12,5 mM linear zur Iodkonzentration ist und Säurekonzentrationen bis 65 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -2,0$) keinen Einfluss auf den Test haben (Ergebnisse nicht dargestellt). Zur Überprüfung der Reaktionsart der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein wurde die Integralmethode verwendet ([APL08], [Lev99]). Hierbei ergibt sich bei entsprechender Auftragung eine Gerade, falls die angenommene Kinetik zutrifft. In Abbildung 6.4 ist zu erkennen, dass die 3-HPA Konzentration, berechnet aus der Absorptionsabnahme durch Reaktion des gebildeten Acroleins mit dem Iod, nicht linear abnimmt und somit eine Reaktion 0. Ordnung ausgeschlossen werden kann. Auch die Auftragungen zur Reaktionstypbestimmung mit der Integralmethode gemäß Tabelle 6.1 ergeben keinen linearen Zusammenhang, wodurch sich ein Reaktionsverhalten 1. Ordnung und 2. Ordnung ausschließen lässt (siehe Abbildung 6.5 und 6.6). Eine Auftragung, welche im Falle einer Gleichgewichtsreaktion zu einer Geraden führt, resultiert in einem linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,991 (siehe Abbildung 6.7)). Bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C entspricht die Steigung der Geraden einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k = 0,0291$ 1/min. Mit der 3-HPA Gleichgewichtskonzentration von 0,156 mM, die sich in Abbildung 6.4 ablesen lässt, kann

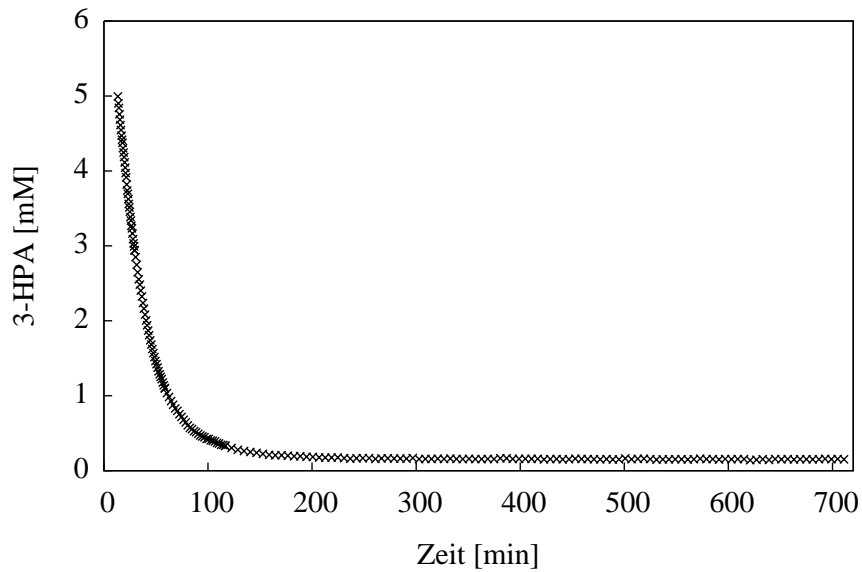


Abbildung 6.4: Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C .

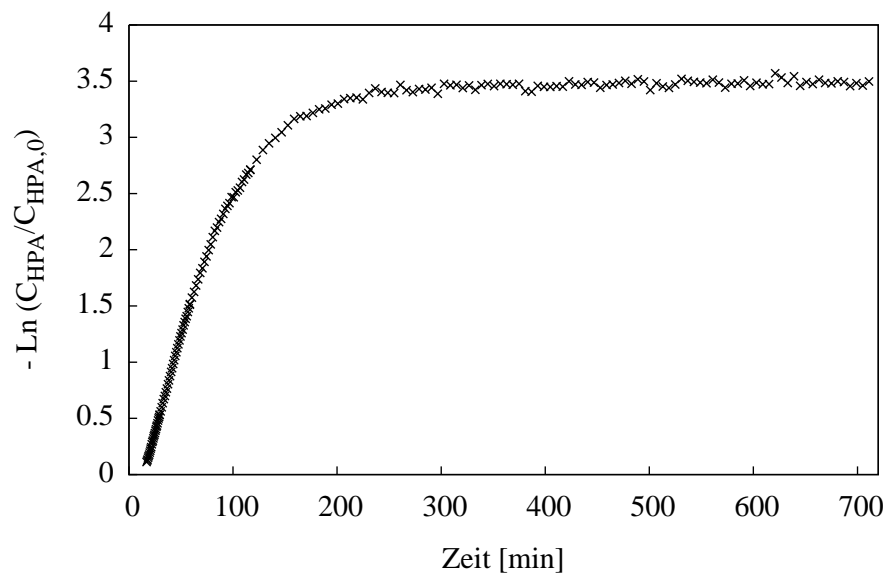


Abbildung 6.5: Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C . Integralmethode für die Reaktion 1. Ordnung.

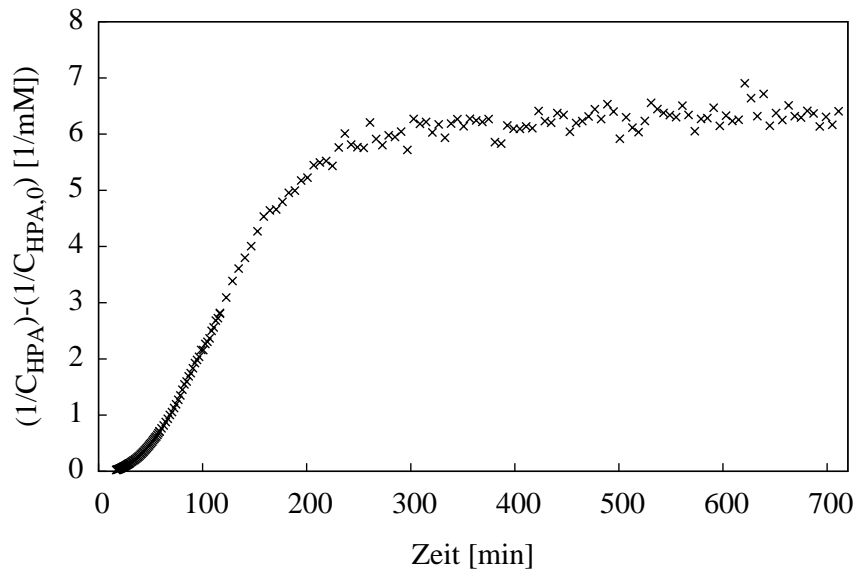


Abbildung 6.6: Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C. Integralmethode für die Reaktion 2. Ordnung.

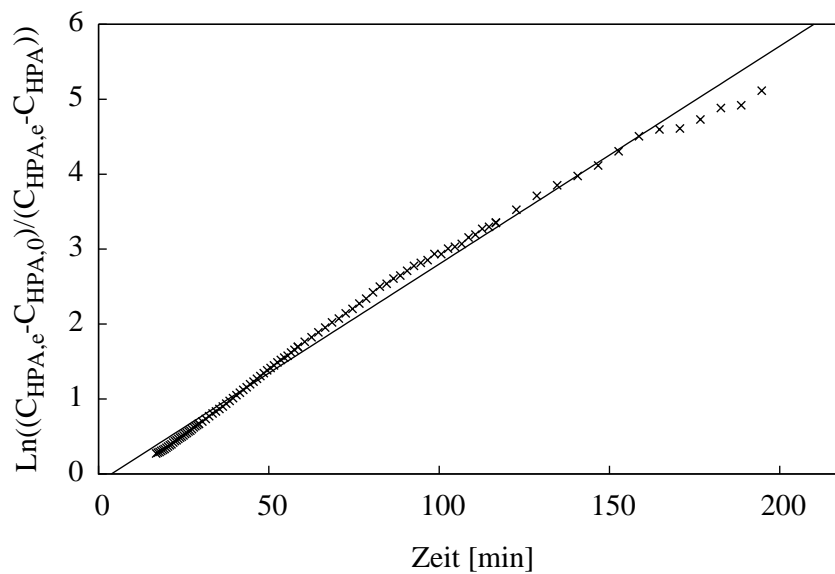


Abbildung 6.7: Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C. Integralmethode für eine Gleichgewichtsreaktion.

die Gleichgewichtskonstante zu $K = 31$ bestimmt werden. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Dehydratisierungskinetik von der Konzentration des Katalysators (Phosphorsäure) wurde diese auch bei 65 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -2,0$) statt 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) untersucht. Mit der 3-HPA Gleichgewichtskonzentration von 0,202 mM, die sich in Abbildung 6.8 ablesen lässt, kann die Gleichgewichtskonstante zu $K = 25$ bestimmt werden. Eine Auftragung welche im Falle einer Gleichgewichtsreaktion zu einer Geraden

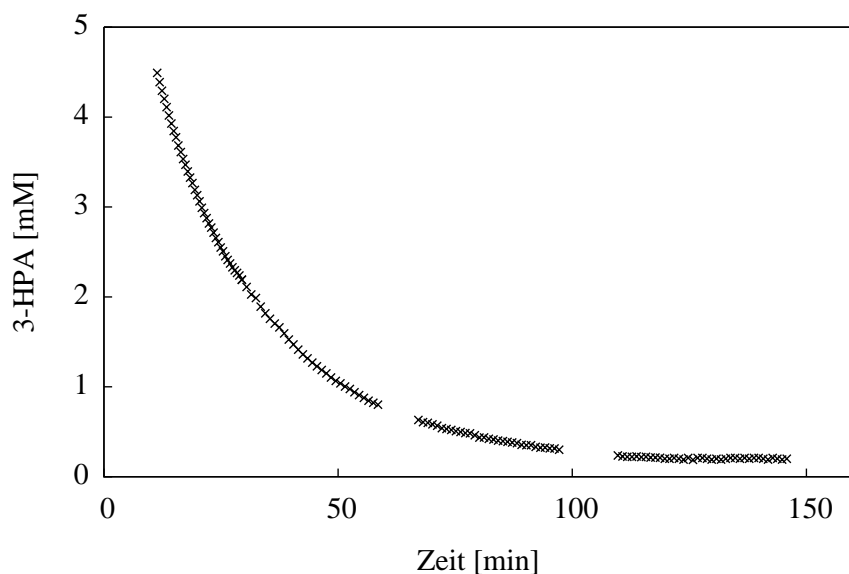


Abbildung 6.8: Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 65 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -2,0$) und 37°C .

führt, resultiert in einen linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,998 (siehe Abbildung 6.9). Die Steigung der Geraden entspricht einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k = 0,0403 \text{ 1/min}$. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Dehydratisierungskinetik von der Temperatur wurde diese auch bei 25°C statt 37°C untersucht. Eine 3-HPA Gleichgewichtskonzentration wurde während der Messung über 12 Stunden nicht erreicht (siehe Abbildung 6.10). Dementsprechend lässt sich keine Gleichgewichtskonstante bei 25°C berechnen. Eine Auftragung, welche im Falle einer Gleichgewichtsreaktion zu einer Geraden führt, resultiert in einen linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,977 (siehe Abbildung 6.11). Die Steigung der Geraden entspricht einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k = 0,0057$

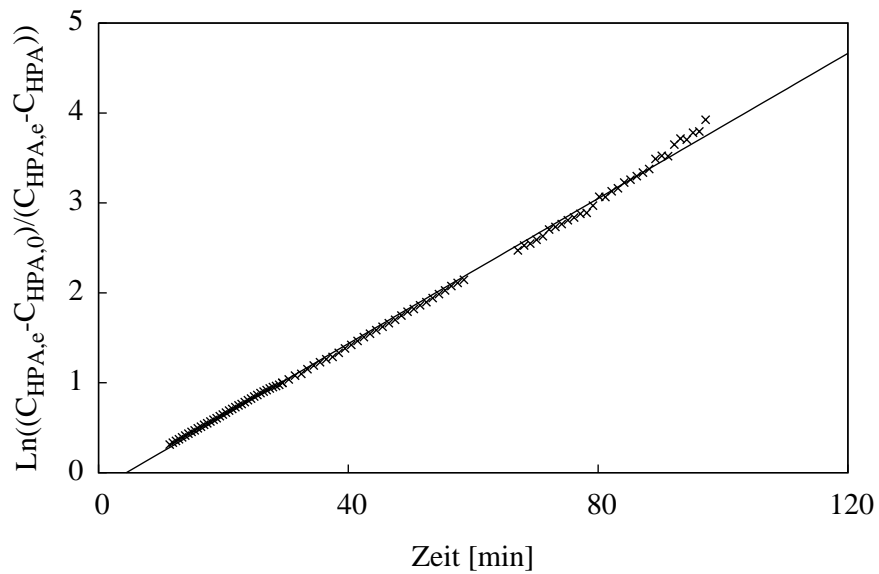


Abbildung 6.9: Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 65 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -2,0$) und 37°C. Integralmethode für eine Gleichgewichtsreaktion.

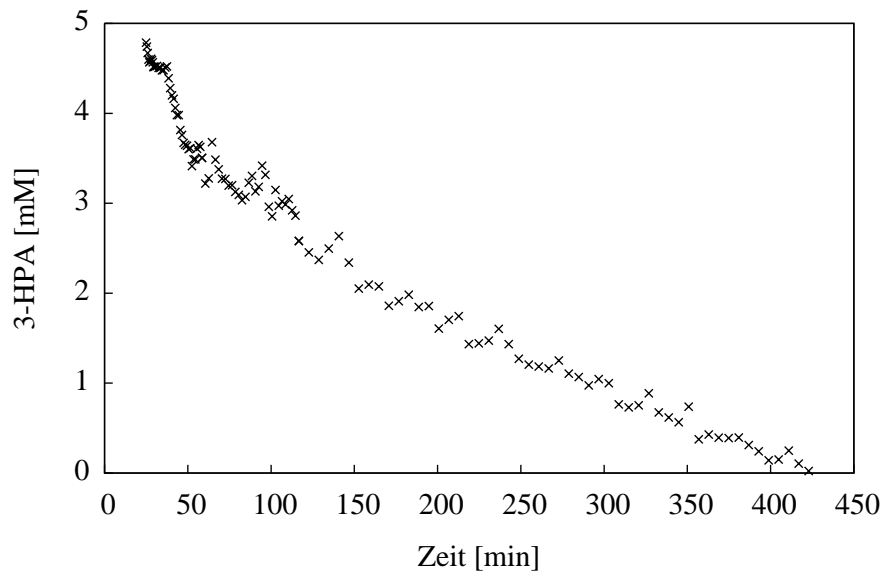


Abbildung 6.10: Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 25°C.

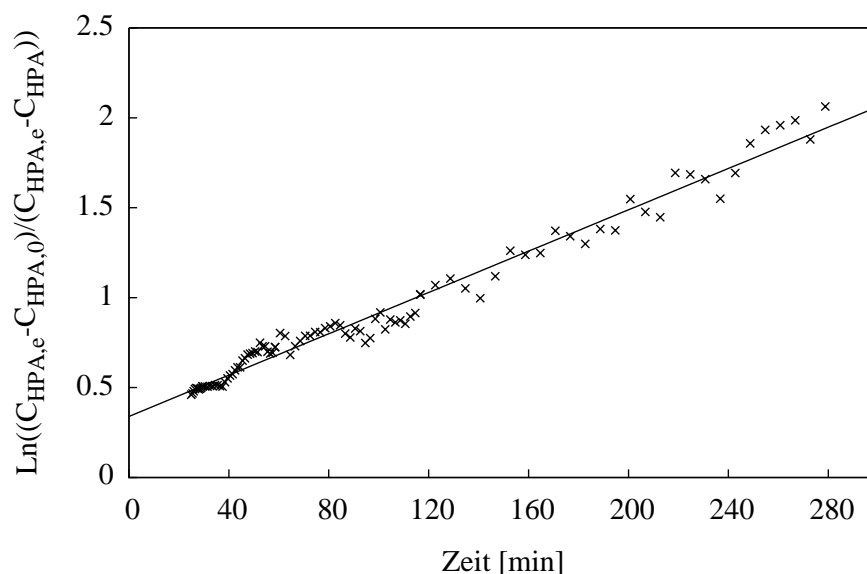


Abbildung 6.11: Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei 5 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 25°C. Integralmethode für eine Gleichgewichtsreaktion.

1/min. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Dehydratisierungskinetik und der Gleichgewichtskonstante von der 3-HPA Konzentration wurde diese auch bei 38 mM 3-HPA Anfangskonzentration statt 5 mM Anfangskonzentration untersucht. Bei diesen Versuchen wurden, wie auch bei den Versuchen zur Kinetikbestimmung mit Feststoffsäuren als Katalysator, die 3-HPA Konzentrationen und die Acroleinkonzentrationen mittels HPLC bestimmt. Mit der 3-HPA Gleichgewichtskonzentration von 19,3 mM, die sich in Abbildung 6.12 nach 70 Minuten zum Zeitpunkt der maximalen Acroleinkonzentration ablesen lässt, kann die Gleichgewichtskonstante zu $K = 1$ bestimmt werden. Eine Auftragung, welche im Falle einer Gleichgewichtsreaktion zu einer Geraden führt, resultiert in einen linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,995 bei der Verwendung der 3-HPA Konzentration und in einen linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,951 bei der Verwendung der Acroleinkonzentration (siehe Abbildung 6.13). Die Steigungen der Geraden entsprechen einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k = 0,0813$ 1/min bezogen auf die 3-HPA Konzentration beziehungsweise $k = 0,0839$ 1/min bezogen auf die Acroleinkonzentration. Zur Untersuchung, ob die Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein auch mit Feststoffkatalysatoren durchgeführt werden

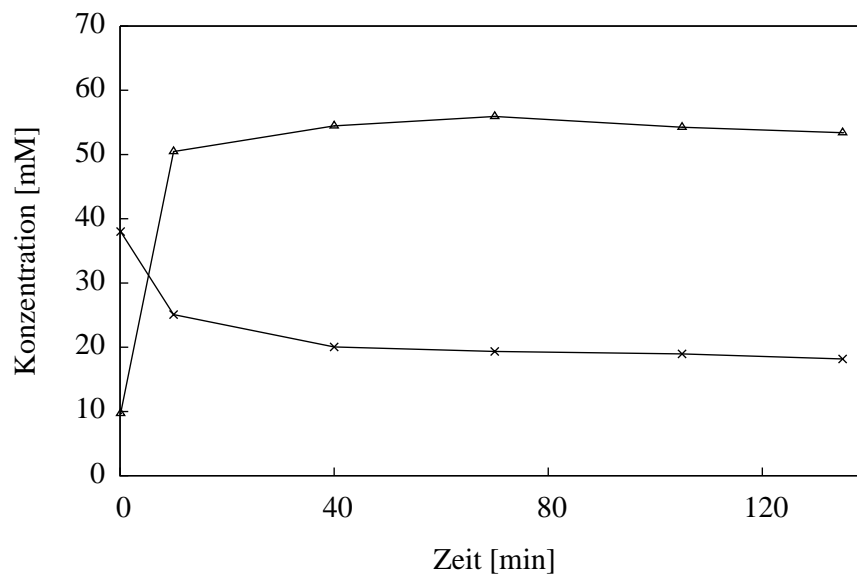


Abbildung 6.12: Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA (x) zu Acrolein (Δ) bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C.

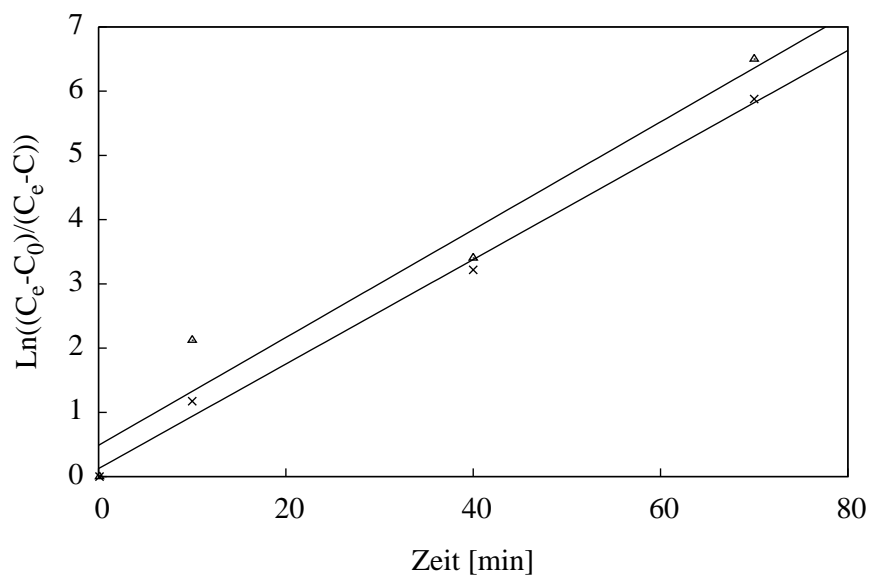


Abbildung 6.13: Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA (x) zu Acrolein (Δ) bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration, 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) und 37°C. Integralmethode für eine Gleichgewichtsreaktion.

kann, wurde diese auch mit Amberlyst 36 untersucht. Mit der 3-HPA Gleichgewichtskonzentration von 25,8 mM, die sich in Abbildung 6.14 nach 130 Minuten zum Zeitpunkt der maximalen Acroleinkonzentration ablesen lässt, kann die Gleichgewichtskonstante zu $K = 0,3$ bestimmt werden. Eine Auftragung, wel-

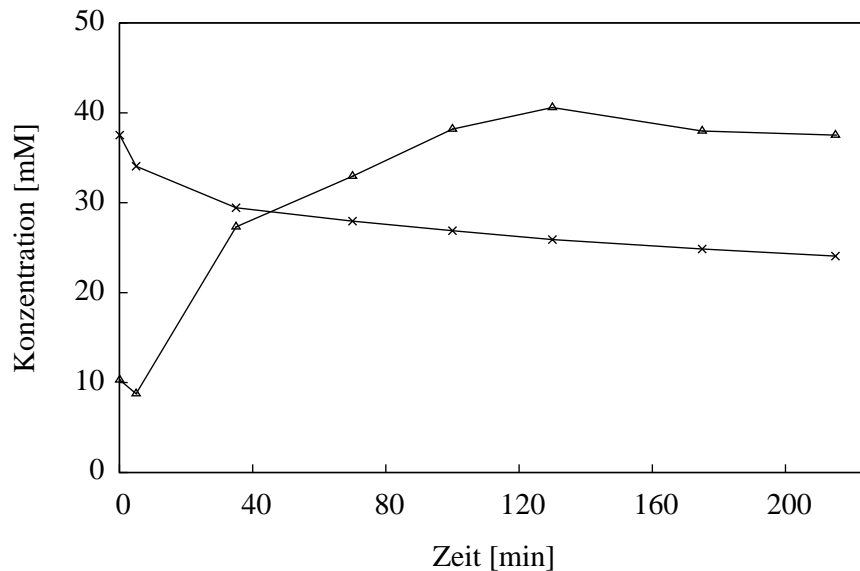


Abbildung 6.14: Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA (x) zu Acrolein (Δ) bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration, Amberlyst 36 Katalysator und 37°C.

che im Falle einer Gleichgewichtsreaktion zu einer Geraden führt, resultiert in einen linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,908 bei der Verwendung der 3-HPA Konzentration und in einen linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,864 bei der Verwendung der Acroleinkonzentration (siehe Abbildung 6.15). Die Steigungen der Geraden entsprechen einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k = 0,0315$ 1/min bezogen auf die 3-HPA Konzentration beziehungsweise $k = 0,0382$ 1/min bezogen auf die Acroleinkonzentration. Zur Untersuchung der Dehydratisierungskinetik an fester Phosphorsäure wurde auch diese bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration und 37°C untersucht. Eine katalytische Aktivität der eingesetzten Phosphorsäure ist nicht zu beobachten (siehe Abbildung 6.16). Die 3-HPA Konzentration fällt über 75 Minuten nicht ab und es ist keine Acroleinakkumulation zu beobachten.

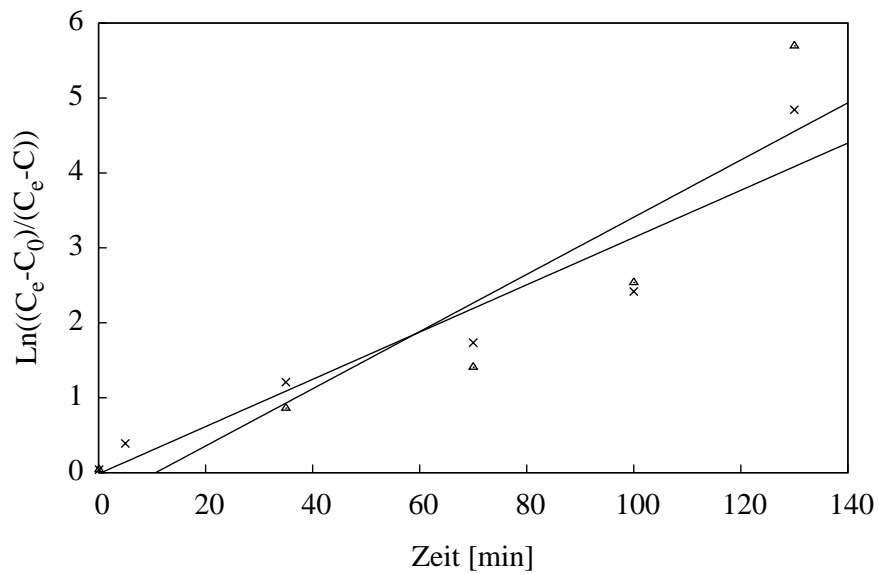


Abbildung 6.15: Kinetikbestimmung der Dehydratisierung von 3-HPA (x) zu Acrolein (Δ) bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration, Amberlyst 36 Katalysator und 37°C. Integralmethode für eine Gleichgewichtsreaktion.

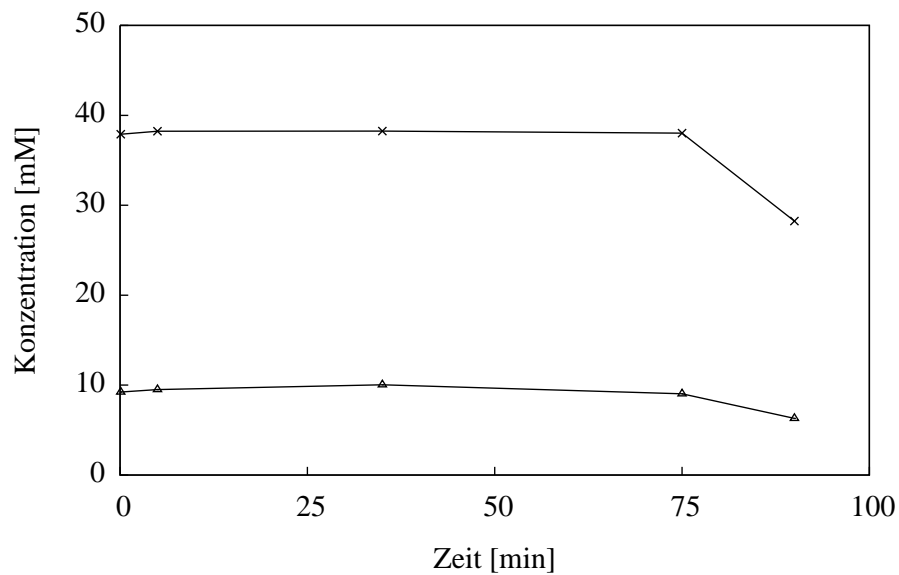


Abbildung 6.16: Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA (x) zu Acrolein (Δ) bei 38 mM 3-HPA Startkonzentration, feste Phosphorsäure als Katalysator und 37°C.

6.3.3 Destillation

Die Kombination aus Dehydratisierung und Destillation ist ein vielversprechender Ansatz zur *in-situ* Aufreinigung von 3-HPA. Jedoch ist nicht klar, ob bei 37°C die simultane Dehydratisierung die Destillation beeinflusst und somit Auswirkungen auf das Ergebnis hat. In Tabelle 6.3 ist zu erkennen, dass die Versuchsergebnisse nahezu den idealen Berechnungen entsprechen. Die 3-HPA

Tabelle 6.3: Experimentelle Ergebnisse verglichen mit berechneten idealen Gleichgewichtsergebnissen für die säurekatalysierte Reaktiv-Batchdestillation von Transformationsmedium bei $H_0 = -1$, 37° C, 62 mbar und einer Dephlegmatortemperatur von 25°C.

	Experiment	Id. Kalkulation
3-HPA gefangen [%]	76 ± 18	80
3-HPA rückgewinnung [%]	72 ± 7	80
Wirkungsgrad [%]	96 ± 8	100
C_F	77 ± 7	86

Konzentration konnte im Transformationsmedium von 24 ± 1 mM auf 6 ± 1 mM gesenkt werden, wobei eine Acroleinkonzentration im Destillat von 1866 ± 146 mM (105 ± 8 g/l) erzielt wurde. Es wurde ein Wirkungsgrad von 96 ± 8 % erreicht, was auf eine sehr geringe Bildung von Nebenprodukten schließen lässt. Auch im Chromatogram des Destillats sind neben dem Acrolein keine weiteren Komponenten zu sehen (siehe Abbildung 6.17).

6.3.4 Stripping

Soll der Unterdruck und die Verdampfung vermieden werden, kann das gebildete Acrolein mit dem Inertgas Stickstoff aus dem Transformationsmedium entfernt werden. In Tabelle 6.4 ist zu erkennen, dass die Reduktion der 3-HPA Konzentration im Transformationsmedium mit der bei der Reaktivdestillation vergleichbar ist. Die 3-HPA Konzentration konnte im Transformationsmedium von 29 ± 1 mM auf 10 ± 1 mM gesenkt werden, wobei eine Acroleinkonzentration in der Kühlfalle von 144 ± 5 mM erzielt wurde. Der Wirkungsgrad lag bei nur 58 ± 3 %. Es konnte deutlich weniger des Aldehyds als im berechneten idealen Fall wiedergefunden werden.

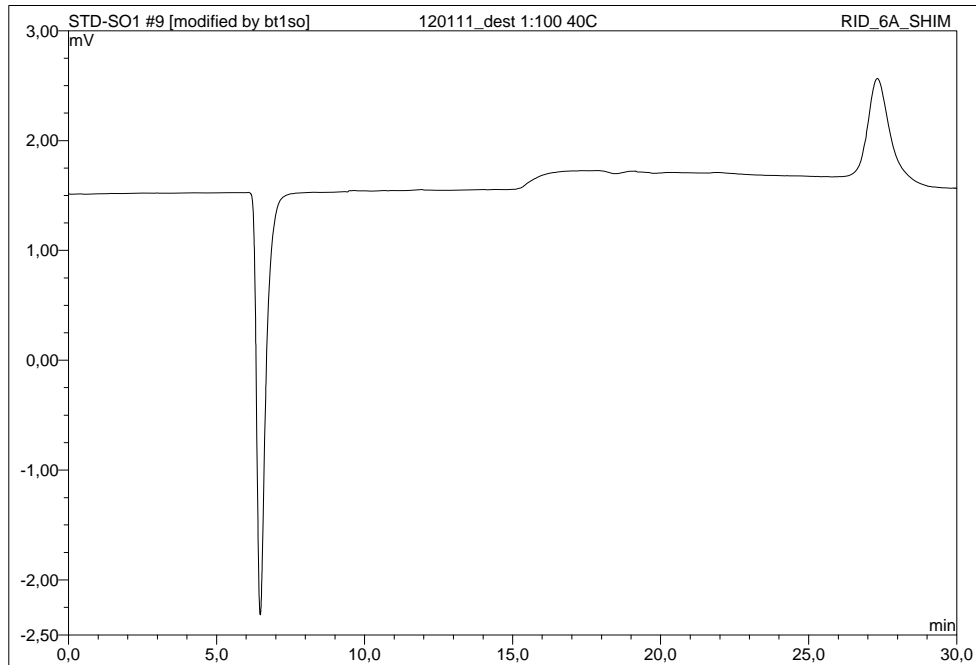


Abbildung 6.17: Chromatogramm des Destillats. Der einzige Peak ist Acrolein bei 27,5 Minuten.

Tabelle 6.4: Experimentelle Ergebnisse verglichen mit berechneten idealen Gleichgewichtsergebnissen für das säurekatalysierte Reaktiv-Stripping mit N_2 von Transformationsmedium bei $H_0 = -1$, 37°C und Umgebungsdruck.

	Experiment	Id. Kalkulation
3-HPA gefangen [%]	67 ± 5	66
3-HPA rückgewinnung [%]	25 ± 1	66
Wirkungsgrad [%]	58 ± 3	100
C_F	5 ± 0	72

6.4 Diskussion

6.4.1 Alternative Verfahren

Aufgabe der Versuche war es, alternative Verfahren zur reaktiven Aufreinigung auf ihre Eignung 3-HPA aus dem Transformationsmedium zu entfernen zu prüfen. Ein Ansatz nutzt die Eigenschaft von Aziden aus, schnell mit Aldehyden zu reagieren und leicht zu präzipitieren. Wie bereits bekannt, liegt unter Transformationsbedingungen (37°C, pH 6) das Gleichgewicht der Reaktion sehr weit auf der Seite des 3-HPA-Azid Addukts, wodurch großen Mengen 3-HPA produziert werden können, bevor eine inhibierende Konzentration an freiem 3-HPA erreicht ist ([CLV⁺07], [Jen59]). 97% des 3-HPA konnten mit Semicarbazid gebunden und bei 50°C und pH 4,5 gefällt werden, jedoch war es nach der Fällung des 3-HPA-Azid Addukts nicht mehr möglich, das Addukt mit Säure oder mit Aceton zu trennen. Vermutlich ist in der Fällungsreaktion ein nichtreversibler Schritt involviert, der die Spaltung unmöglich macht ([CH95]). Die Annahme von Ulmer, dass sich das Addukt nach der Fällung spalten lässt, beruht auf den Angaben in dem Buch "Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl)"([Ulm08]). Jedoch ist dort nicht eindeutig beschrieben, ob das Addukt aus Semicarbazid und 3-HPA vor oder nach einer Fällung erfolgreich unter sauren Bedingungen gespalten wurde ([BHM⁺54]).

Eine Spaltung des Addukts vor der Fällung ist aber möglich, wie die Versuche gezeigt haben. Da Aceton eine reaktivere Carbonylgruppe als 3-HPA hat, kann es dieses aus dem Addukt verdrängen ([BHM⁺54]). 74,5% 3-HPA wurden mit dieser Methode zurückgewonnen. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den Werten von Ulmer, der mit einer fast doppelt so hohen Acetonkonzentration 71,3% 3-HPA zurückgewonnen hat ([Ulm08]). Vor der Fällung des Addukts ist auch die Spaltung des Addukts mit Säure möglich. Jedoch wurden nur $19,5 \pm 3,8\%$ 3-HPA mit diesem Ansatz zurückgewonnen. Dies ist verwunderlich, da Ulmer et al. und Krauter et al. mit demselben Ansatz mindestens 97% beziehungsweise 93% des 3-HPAs aus dem 3-HPA-Azid Addukt zurückgewinnen konnten ([Ulm07], [KWV12]).

Die Nutzung der Fällung des 3-HPA-Azid Addukts zur Aufreinigung des 3-HPAs aus dem Transformationsmedium scheint nicht möglich, wie es von Ulmer vorgeschlagen wurde. Darüber hinaus zersetzt sich auch freies Azid unter

Fällungsbedingungen, was zu hohen Kosten und eventuell auch zu Entsorgungsproblemen geführt hätte, wenn das Azid im Überschuss eingesetzt worden wäre ([CH95]). Azide sind trotz ihrer guten Bindung von 3-HPA nur für eine Aufreinigung von 3-HPA geeignet, wenn die Fällung vermieden wird und andere Effekte zur Abtrennung, wie zum Beispiel die Immobilisierung, genutzt werden.

Weitere vielversprechende Ansätze zur Aufreinigung von Aldehyden nutzen eine zweite flüssige Phase zur Abtrennung. Dies kann durch direkte Lösung des 3-HPAs in der zweiten Phase geschehen oder durch Reaktion von 3-HPA mit einem Hilfsstoff, der die Löslichkeit des Reaktionsproduktes gegenüber der Löslichkeit von 3-HPA in der zweiten Phase verbessert. In Abbildung 6.3 sind die Ergebnisse mit verschiedenen Lösungsmitteln und dem reaktiven Hilfsstoff Tert-Dodekanthiol, welche gleichzeitig die zweite Phase bilden, dargestellt. Bei den Hilfsstoffen ist es wichtig solche zu finden, die sich nicht in einer inhibierenden Konzentration im Transformationsmedium lösen, und trotzdem hydrophil beziehungsweise reaktiv genug sind, um 3-HPA in ausreichender Menge bei Transformationsbedingungen zu extrahieren. Fünf verschiedene Lösungsmittel mit unterschiedlichen Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten, welcher ein Maß für die Hydrophilität ist, wurden untersucht. Hierbei war Chloroform das hydrophilste und n-Hexan das hydrophobeste Lösungsmittel ([Eur00d]). Mit Ausnahme von n-Hexan wird wie erwartet mit zunehmender Hydrophilität mehr 3-HPA extrahiert. Jedoch zeigen alle Lösungsmittel außer Chloroform einen negativen Faktor für das gefangene 3-HPA. Eine mögliche Erklärung ist, dass diese Lösungsmittel eine geringere Dichte als Wasser haben und somit den Kontakt der kleinen Luftblase im Reaktionsgefäß mit dem Transformationsmedium verhindern. Dies führt dazu, dass sich das 3-HPA im Referenzversuch stärker zersetzt, als es extrahiert wird, was in einen negativen Faktor resultiert. Die berechneten Phasenverteilungen lassen auf eine höhere Extraktionsfähigkeit schließen als sie die Versuche zeigen, jedoch liegen die Faktoren immer noch unter 20% und sind damit weit von wirtschaftlich vertretbaren Größen entfernt. Da die UNIFAC Methode zur Abschätzung der Aktivitätskoeffizienten recht ungenau ist, wäre es möglich, dass diese die Hydrophilität von 3-HPA unterschätzt ([GK92]). Soll die Phasenverteilung genauer untersucht werden, wäre es ratsam, auch Rückextraktionsexperimente durchzuführen. Dennoch kann

bestätigt werden, dass 3-HPA sehr hydrophil ist und sich selbst mit hydrophilen Lösungsmitteln nur schlecht aus dem Transformationsmedium extrahieren lässt.

Die Reaktivität von 3-HPA bietet aber die Möglichkeit, es an einen Reaktanten zu binden, der sich besser extrahieren lässt. Aus der Acrylsäureproduktion ist bekannt, dass Aldehyde mit dem Aldehydfänger Tert-Dodecanthiol gebunden werden können und dieser mit Wasser eine zweite Phase bildet ([BSNL06]). Jedoch war die Reaktivextraktion von 3-HPA aus dem Transformationsmedium mit Tert-Dodecanthiol nicht erfolgreich. Entweder ist 3-HPA nicht reaktiv genug und damit die Reaktion zu langsam oder es werden saurere Bedingungen, wie sie in der Anwesenheit von Acrylsäure vorliegen, benötigt, um die Polarität der Aldehydgruppe zu verschieben und dadurch die Reaktion zwischen Aldehyd und Thiol zu ermöglichen ([BSNL06]).

Auch Tert-Dodecanthiol hat aufgrund seiner geringen Dichte einen konservierenden Effekt auf das 3-HPA im Transformationsmedium. Tert-Dodecanthiol ist also für die Reaktivextraktion von 3-HPA ungeeignet. Weitere Nachteile von Thiolen sind ihr unangenehmer Geruch bereits bei minimalen Konzentrationen und die aufwendige Abspaltung von Aldehyden ([LKK05]).

Trotz der ansprechenden Vorteile einer *in-situ* Extraktion von 3-HPA, wie eine einfache und etablierte Prozessführung sowie eine hohe Kapazität, löst sich immer eine gewisse Menge des Hilfsstoffs im Transformationsmedium. Selbst wenn dadurch keine Inhibierung der 3-HPA Produktion auftritt, kann dies die Entsorgung des Transformationsmediums erschweren und verteuern. Deshalb scheint ein extraktives Verfahren zur Aufreinigung von 3-HPA nur geeignet, wenn ein umweltverträgliches, nicht störendes und effektives Extraktionsmittel gefunden werden kann.

6.4.2 Dehydratisierung

Die Aufgabe dieser Versuche war es, die Dehydratisierungskinetik von 3-HPA zu Acrolein zu untersuchen und verschiedene Feststoffsäuren auf ihre Eignung zur Katalyse zu prüfen. Mit der Integralmethode konnte gezeigt werden, dass sich die Kinetik am besten als Gleichgewichtsreaktion beschreiben lässt (siehe Abbildung 6.4 bis Abbildung 6.7). Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Pressman et al. und Hall et al., die die Kinetik der Hydratisierung von Acrolein

zu 3-HPA auch als Gleichgewichtsreaktion zweier Reaktionen erster Ordnung beschrieben haben ([PL42], [HS50]). Dies scheint also auch bei höheren Säurekonzentrationen, bei denen das Reaktionsgleichgewicht mehr auf der Seite von Acrolein liegt, der Fall zu sein. In den Versuchen führte eine Erhöhung der Säurekonzentration zu einer höheren Reaktionsgeschwindigkeitskonstante. Auch Hall et al. beobachteten dies, jedoch beschleunigten sich bei ihren Versuchen bis zu einer Säurekonzentration von $H_0 = -0,52$ die Hinreaktion und die Rückreaktion gleichmäßig, so dass sich im Endeffekt die Reaktion in Richtung 3-HPA beschleunigte. Darüber hinaus beobachteten sie eine Unabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante von der Säurekonzentration ([HS50]). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass bei Katalysatorkonzentrationen zwischen $H_0 = -0,52$ und $H_0 = -1,4$ das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite von Acrolein liegt und sich die Reaktion dann mit zunehmender Katalysatorkonzentration in Richtung Acrolein statt in Richtung 3-HPA beschleunigt. Die niedrigere Gleichgewichtskonstante bei $H_0 = -2,0$ im Vergleich zu jener bei $H_0 = -1,4$ muss nicht bedeuten, dass bei hoher Katalysatorkonzentration die Gleichgewichtskonstante von dieser abhängig ist und sich mit zunehmender Konzentration verringert. Dies kann auch an Ungenauigkeiten der Kalibrierung des colorimetrischen Tests liegen.

Bei der Reduktion der Reaktionstemperatur reduzierte sich die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (siehe Abbildung 6.11). Dies ist vereinbar mit der Untersuchung von Hall et al., die auch einen vergleichbaren Effekt beobachteten. Bei geringeren Säurekonzentrationen, bei denen die Reaktion in Richtung 3-HPA dominierte, war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt. So reduzierte sich zum Beispiel die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $k = 0,0350$ 1/min auf $k = 0,0152$ 1/min bei einer Temperaturverringering von 30°C auf 20°C , einer Katalysatorkonzentration von $H_0 = -0,52$ und einer Acroleinstartkonzentration von 690 mM ([HS50]). Eine Gleichgewichtskonstante konnte bei 25°C nicht bestimmt werden, da innerhalb von 12 Stunden kein Reaktionsgleichgewicht erreicht wurde und die 3-HPA Konzentration auf negative Werte abfiel. Dies könnte damit erklärt werden, dass während der Kalibrierung des Messverfahrens bei 25°C aufgrund der niedrigen Temperatur die Reaktion zwischen Acrolein und Iod nicht vollständig war.

Wenn die Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein mit einer höheren Start-

konzentration durchgeführt wird, sinkt die Gleichgewichtskonstante und die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante erhöht sich (siehe Abbildung 6.12 und Abbildung 6.13). Auch Hall et al. beobachteten eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts zu mehr 3-HPA bei höheren Aldehydkonzentrationen ([HS50]). Die Acroleinkonzentration wurde nicht zur Berechnung der Gleichgewichtskonstante herangezogen, da die Acroleinkonzentrationen im Gleichgewicht höher waren als die ursprüngliche Aldehydmenge. Dies könnte durch die ungenaue Konzentrationsbestimmung, bedingt durch die aufgrund der hohen Phosphorsäurekonzentration notwendige starke Verdünnung, die zu großen Multiplikationsfaktoren und schwer zu definierenden kleinen Acroleinpeaks führt, verursacht worden sein. Während Hall et al. eine Unabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von der Aldehydkonzentration beschrieben haben, wurde hier eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante mit der 3-HPA Konzentration beobachtet ([HS50]). Dies kann jedoch auch an den unterschiedlichen Versuchsaufbauten oder der schwierigen Abschätzung der Gleichgewichtskonzentration liegen. Wird zum Beispiel eine 3-HPA Gleichgewichtskonzentration von 17 mM statt 19,3 mM angenommen, so sinkt die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $k = 0,0813$ 1/min auf $k = 0,0293$ 1/min.

Zur Untersuchung, ob die Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein auch mit Feststoffkatalysatoren durchgeführt werden kann, wurde diese auch mit Amberlyst 36 untersucht. Amberlyst 36 hat mindestens 1,95 eq/l, was 1,95 mol/l H^+ Ionen entspricht ($H_0 = 0,1$, [HD32]). Im Vergleich zur Dehydratisierung mit $H_0 = -1,4$ lag die Gleichgewichtskonstante und die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei einem niedrigeren Wert (siehe Abbildung 6.14 und Abbildung 6.15). Amberlyst 36 ist definitiv in der Lage 3-HPA zu Acrolein zu dehydratisieren, jedoch scheint es als Katalysator weniger aktiv zu sein als 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$). Die Unterschiede könnten aber auch teilweise darin begründet sein, dass mit Amberlyst 36 keine Verdünnung der Proben notwendig war und sich somit Fehler in der Auswertung der HPLC Ergebnisse nicht so verstärkten. Nichtsdestotrotz lassen sich die Ergebnisse mit denen von Hall et al. vergleichen. Hall et al. erzielten mit 2 N Schwefelsäure ($H_0 = 0,12$) bei 40°C und einer Acroleinanfangskonzentration von 690 mM statt dem 1,95 N schwefelsaure Verbindungen enthaltenen Amberlyst 36 ($H_0 = 0,1$) bei 37°C und 30 mM 3-HPA Anfangskonzentration eine Gleichgewichtskonstante von $K = 0,1$

statt $K = 0,3$ und eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $k = 0,0312$ statt $k = 0,0315$ 1/min bezogen auf die 3-HPA Konzentration beziehungsweise $k = 0,0382$ 1/min bezogen auf die Acroleinkonzentration ([HS50]). Der deutlichste Unterschied ist in der Anfangskonzentration zu finden und scheint sich wie bekannt auf die Gleichgewichtskonstante auszuwirken, jedoch nicht, wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante.

Auch die in der Dehydratisierung von Glycerin über 3-HPA zu Acrolein erfolgreiche feste Phosphorsäure ($H_0 = -5,6$ bis -3) wurde gemäß Neher et al. hergestellt und auf ihre Eignung zur Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein getestet ([NHA⁺94]). Jedoch konnte hier bei Verwendung von 54 Gew.-% Phosphorsäure ($H_0 = -1,4$) zur Herstellung der festen Phosphorsäure im Gegensatz zur Verwendung in flüssiger Form keine katalytische Aktivität festgestellt werden (siehe Abbildung 6.16). Auch mit anderen Säurekonzentrationen zwischen 15 Gew.-% und 85 Gew.-% zeigte die nach den Vorgaben von Neher et al. hergestellte feste Phosphorsäure keine katalytische Aktivität (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Produktion einer aktiven festen Phosphorsäure konnte nicht nachvollzogen werden.

6.4.3 Destillation

Aufgabe der Versuche war es, die Effektivität der Reaktivdestillation von 3-HPA zu überprüfen. In Tabelle 6.3 ist zu erkennen, dass die Versuchsergebnisse nahezu den idealen Berechnungen entsprechen. Der Einfluss der simultanen Reaktion auf die Destillation scheint also gering und die Dehydratisierung nahezu vollständig sowie das Phasengleichgewicht fast vollständig erreicht zu sein. Es wurden bei den Destillationsversuchen $76 \pm 18\%$ des 3-HPAs aus dem Transformationsmedium entfernt und damit dessen Konzentration auf 6 ± 1 mM gesenkt. Diese Konzentration liegt weit unter der minimalen inhibierenden Konzentration und hätte noch weiter gesenkt werden können, wenn mehr Destillat entfernt worden wäre ([CLV⁺07]). Jedoch wäre dann auch der Konzentrationsfaktor C_F und somit die Destillatkonzentration von 1866 ± 146 mM gesunken. Dies lässt sich vermeiden, wenn wie im kontinuierlichen Betrieb üblich mehrere Trennstufen verwendet werden. Dadurch kann gleichzeitig 3-HPA bis unterhalb der Nachweisgrenze aus dem Transformationsmedium entfernt werden und im De-

stillat eine Acroleinkonzentrationen von 97,4%, (Azeotropkonzentration mit Wasser) erreicht werden ([KSF+00], [SDS03]). Selbst bei der in dieser Arbeit realisierten Aufreinigung auf 1866 ± 146 mM Acrolein im Destillat konnten keine störenden Verunreinigungen mittels HPLC ermittelt werden (siehe Abbildung 6.17). Ein weiterer Vorteil der Reaktivdestillation bei 37°C und hohen Säurekonzentrationen neben der Möglichkeit zur *in-situ* Anwendung mit der Transformation ist, dass weniger Nebenreaktionen auftreten. Bei der Dehydratisierung bei niedrigen Temperaturen und hohen Säurekonzentrationen kann im Gegensatz zur Reaktion bei hohen Temperaturen der Zerfall von 3-HPA zu Formaldehyd und Acetaldehyd statt der Reaktion zu Acrolein vermieden werden ([Lon11]).

Ein weiterer Vorteil des Konzepts aus Dehydratisierung und Destillation ist, dass auf dem Weg zu den acroleinbasierten Chemikalien wie Acrylsäure oder Acrylnitril keine Wasserabtrennung nach der Aufreinigung notwendig ist, da die Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bereits im Transformationsmedium durchgeführt wurde. Für die 3-HPA basierten Anwendungen kann aufgereinigtes Acrolein in wässriger Lösung leicht wieder hydratisiert werden ([HS50]). Der wohl größte Vorteil gegenüber anderen Aufreinigungskonzepten ist der, dass kein bedenklicher Hilfsstoff, sondern nur ein saurer Katalysator benötigt wird, was die Entsorgung des Transformationsmediums deutlich vereinfachen kann. Die Reaktivdestillation beziehungsweise Reaktivrektifikation sind im industriellen Maßstab gut etablierte Verfahrensschritte mit moderaten Kosten und hoher Kapazität. Deshalb scheint dieser Ansatz der bisher beste zur *in-situ* Aufreinigung von 3-HPA zu sein.

6.4.4 Stripping

Aufgabe der Versuche war es, die Effektivität des reaktiven Gasstrippings von 3-HPA zu überprüfen. Vorteile dieses Verfahrens sind der relativ einfache Aufbau und die geringe Beeinflussung der biologischen Vorgänge, da Unterdruck nicht notwendig ist ([EQB04], [XZ08]). In Tabelle 6.4 ist zu erkennen, dass die Reduktion der 3-HPA Konzentration im Transformationsmedium durch Strippen mit Stickstoff mit der bei der Reaktivdestillation vergleichbar ist. Eine Schwierigkeit des Strippens von Acrolein ist sein niedriger Siedepunkt. Um es nahezu vollständig aus dem Gasstrom zu entfernen, sind sehr niedrige Tempe-

raturen nötig. Deshalb wurde die Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff auf -196 °C gekühlt. Dies hatte jedoch den Nachteil, dass das ausgetragene Acrolein und Wasser in der Kühlfalle gefroren sind und auch vermutlich Stickstoff aus dem Gasstrom kondensierte. Beim Auftauen des Destillats in der Kühlfalle entstand so ein Überdruck, der abgelassen werden musste. Die teilweise Verdampfung und Austragung des Destillats ist eine mögliche Erklärung für die geringe Ausbeute und Acroleinkonzentration im Destillat im Vergleich zu den berechneten Werten. Findet stattdessen nur eine Teilkondensation des Gasstroms statt und wird dieser dann in den Transformationsreaktor zurückgeführt, so ist nachteilig dass, im Kondensat die Acroleinkonzentration deutlich niedriger ist als im Gasstrom, da das Wasser aufgrund seines höheren Siedepunktes besser kondensiert als das Acrolein. Ein Ansatz um diesen Nachteil zu umgehen wäre das Stripgas unkondensiert weiterzuverwenden. Nach einer Reaktion des Acroleins zu zum Beispiel Acrylsäure wäre diese aufgrund ihres höheren Siedepunktes deutlich leichter zu kondensieren. Jedoch müsste darauf geachtet werden, dass der für die Reaktion benötigte Sauerstoff vollständig abreagiert und nicht in den Transformationsreaktor zurückgeführt wird. In diesem Fall wäre das Gassstripping eine interessante Alternative zur Vakuumdestillation und sollte noch weiter berücksichtigt werden.

Kapitel 7

Kostenschätzung

7.1 Einleitung

Eine Kostenschätzung dient dazu zu beurteilen, ob ein entwickelter Prozess in der Lage ist, die gewünschten Produktkosten zu realisieren und in welchen Bereichen die größten Kosten verursacht werden. Die anwendbaren Methoden zur Kostenschätzung und damit deren Genauigkeit hängen von den verfügbaren Informationen ab. Je weiter die Planung einer Anlage fortgeschritten ist, desto detaillierter und genauer kann eine Kostenschätzung ausgeführt werden. Die Genauigkeiten von Kostenschätzungen reichen von $\pm 50\%$ bei der Abschätzung mittels Kosten-Kapazitäts-Raten (Kapazitätsmethode), welche vornehmlich für Machbarkeitsstudien genutzt werden, über $\pm 30\%$ bei der Abschätzung mit Hilfe der Kosten der Haupt- und Nebenkosten zuzüglich Zuschlagsfaktoren (Strukturmethode), welche meistens während des Basic-Engineerings angewendet wird, bis zur detaillierten Schätzung mit einer Genauigkeit von $\pm 15\%$ wenn Informationen des Detail-Engineerings vorliegen ([HE93], [Gut69]). Da sich die Prozessentwicklung in dieser Arbeit noch in einem frühen Stadium befindet, wird eine Mischung aus den ersten beiden Ansätzen verwendet werden. Die Auslegung der Anlage wird mit rigorosen Ansätzen verfolgt, was zwar zu konservativen Ergebnissen führt, jedoch eine spätere Optimierung der Prozessparameter ohne Zuhilfenahme von Simulationssoftware bei maximaler Transparenz ermöglicht.

Die Anlage, für die die Kosten abgeschätzt werden sollen, ist in Abbildung 7.1 dargestellt. Transformationsbereich, Dehydratisierungsbereich und Destillati-

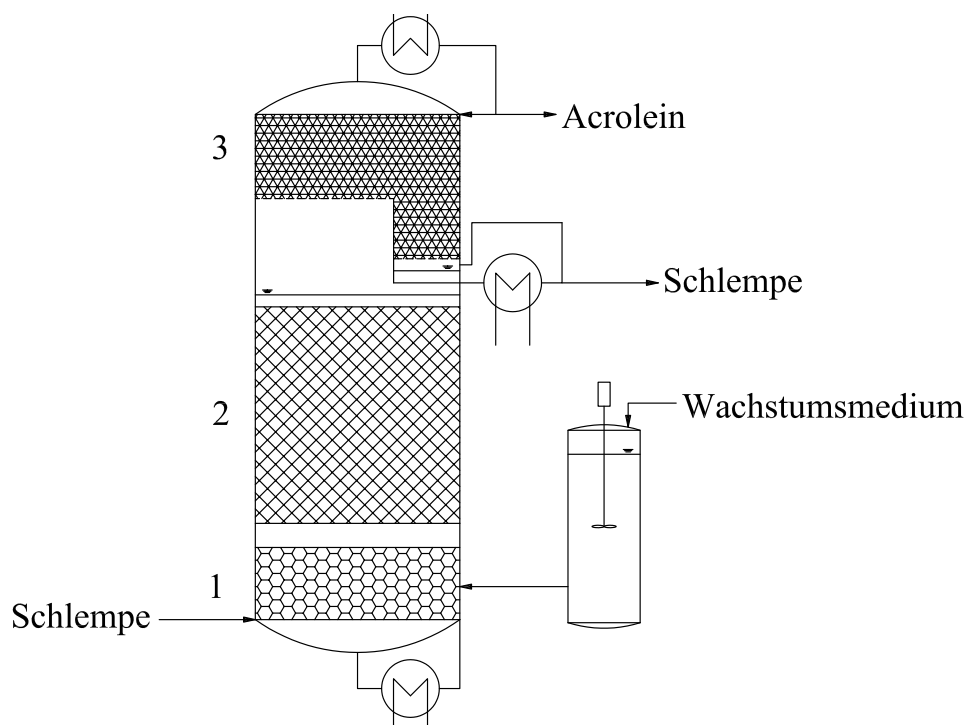


Abbildung 7.1: Potentieller schematische Aufbau einer Anlage zur in-situ Produktion von Acrolein aus Schlempe: Transformationsbereich (1), Dehydratisierungsbereich (2), Destillationsbereich (3).

onsbereich sind in einem Apparat angeordnet, um eine *in-situ* Entfernung des aus Glycerin produzierten 3-HPA zu ermöglichen.

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Auslegung

Die einzelnen Bereiche der Anlage werden nacheinander ausgelegt.

Auslegung des Transformationsbereichs

Als Substrat ist die bereits geklärte Dünnschlempe vorgesehen (siehe Abbildung 2.1). Als Basis für die Berechnung des glycerinhaltigen Substratstroms (\dot{V}_{sub}) dient die Schlempeproduktion einer mittelgroßen Bioethanolanlage (\dot{V}_{cap}). Es werden die üblichen Betriebsstunden (t_{betr}) einer kontinuierlichen Anlage berücksichtigt ([PTW04]).

$$\dot{V}_{sub} = \frac{\dot{V}_{cap}}{t_{betr}} \quad (7.1)$$

Da ein niedriger pH Wert in der Schlempe zu einer starken Inhibierung der 3-HPA Produktion führt (siehe Kapitel 5.3.2), wird dieser angehoben. Die notwendige Laugenkonzentration (C_{NaOH}) zur Berechnung des erforderlichen Laugenmassenstroms (\dot{M}_{NaOH}) wurde experimentell ermittelt.

$$\dot{M}_{NaOH} = C_{NaOH} \cdot \dot{V}_{sub} \quad (7.2)$$

Berechnung des zu verarbeitenden Glycerinmengenstroms (\dot{X}_{glyc}) aus dem Substratstrom (\dot{V}_{sub}) und dessen Glycerinkonzentration (C_{sub}).

$$\dot{X}_{glyc} = \dot{V}_{sub} \cdot C_{sub} \quad (7.3)$$

Berechnung des zu verarbeitenden Glycerinmassenstroms (\dot{M}_{glyc}) mit Hilfe seiner Molmasse (MM_{glyc}).

$$\dot{M}_{glyc} = \dot{X}_{glyc} \cdot MM_{glyc} \quad (7.4)$$

Die Verweilzeit im Transformationsbereich (τ_{trans}) wird mit Hilfe einer kontinuierlichen Bilanz berechnet. Es wird angenommen, dass der Biokatalysator immobilisiert ist und zu Reaktionsgeschwindigkeiten ($r_{reuteri}$) führt, wie sie von

Krauter et al. und Rütli et al. mit immobilisierten *L. reuteri* Zellen erreicht wurden ([Rüt10], [KWV12]). Es wird weiterhin angenommen, dass das Glycerin komplett verbraucht wird, wie es eigene Versuche gezeigt haben (siehe Kapitel 5.3.2). Es wurde davon ausgegangen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit von Glycerin zu 3-HPA nicht von der Glycerinkonzentration (C_{sub}) und nicht von der Temperatur abhängig ist, was auch mit den Ergebnissen von Krauter et al., Rütli et al. und eigenen Beobachtungen vereinbar ist.

$$\tau_{trans} = \frac{C_{sub}}{r_{reuteri}} \quad (7.5)$$

Berechnung des Volumens des Transformationsbereichs (V_{trans}) mit Hilfe des Substratstroms (\dot{V}_{sub}).

$$V_{trans} = \tau_{trans} \cdot \dot{V}_{sub} \quad (7.6)$$

Für die Berechnung des produzierten 3-HPA Mengenstroms (\dot{X}_{HPA}) wird angenommen, dass der selbe Wirkungsgrad (Y_{trans}) erreicht wird, wie er von Krauter et al. bei der *in-situ* Entfernung des 3-HPAs erreicht wurde ([KWV12]). Dieser berechnet sich mit Hilfe des Glycerinmengenstroms (\dot{X}_{glyc}) wie folgt:

$$\dot{X}_{HPA} = \dot{X}_{glyc} \cdot Y_{trans} \quad (7.7)$$

Berechnung des produzierten 3-HPA Massenstroms (\dot{M}_{HPA}) mit Hilfe seiner Molmasse (MM_{HPA}).

$$\dot{M}_{HPA} = \dot{X}_{HPA} \cdot MM_{HPA} \quad (7.8)$$

Die benötigte Katalysatormenge ($G_{reuteri}$) wird aus den Ergebnissen aus Kapitel 5.3.2 (Katalysatorkonzentration $g_{reuteri}$) und dem Volumen des Transformationsbereichs (V_{trans}) abgeleitet.

$$G_{reuteri} = g_{reuteri} \cdot V_{trans} \quad (7.9)$$

Zur Bestimmung des Biokatalysatorverbrauchs ($\dot{G}_{reuteri}$) mit Hilfe eines Recyclingfaktors (f_{recyc}) und der Verweilzeit im Transformationsbereich (τ_{trans}) wird angenommen, dass der Biokatalysator genauso oft wiederverwendet werden kann, wie es Krauter et al. bei der *in-situ* Entfernung des 3-HPAs möglich war ([KWV12]).

$$\dot{G}_{reuteri} = \frac{G_{reuteri}}{f_{recyc} \cdot \tau_{trans}} \quad (7.10)$$

Auslegung des Dehydratisierungsbereichs

Es wird angenommen, dass sich der Temperatureinflussfaktor ($f_{T,kat}$) auf den Einflussfaktor der Katalysatorkonzentration (f_{kat}) nach dem gleichen Schema bestimmen lässt, wie er von Hall et al. für geringere Katalysatorkonzentrationen gefunden wurde ([HS50]). Mit der Reaktortemperatur (T_R) ergibt sich:

$$f_{kat} = f_{T,kat} \cdot T_R + 1, 2999 \quad (7.11)$$

Es wird auch angenommen, dass der Einfluss der Katalysatorkonzentration (f_{kat}) auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (k_{deh}) - wobei die Katalysatorkonzentration durch die Hammett'sche Azidität (H_0) beschrieben wird - der gleichen Beziehung folgt, wie sie von Hall et al. für geringere Katalysatorkonzentrationen beschrieben wurde ([HS50]).

$$k_{deh}[1/min] = \frac{10^{f_{kat}-H_0}}{10^4} \quad (7.12)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Dehydratisierung (r_{deh}) wird mit der in Kapitel 6.3.2 ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (k_{deh}) für Amberlyst 36 und der von Hall et al. bekannten Temperaturabhängigkeit beschrieben ([HS50]). Es wird angenommen, dass die Reaktion ein Verhalten erster Ordnung zeigt, statt ein Gleichgewicht auszubilden, da das Produkt Acrolein kontinuierlich entfernt wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist somit von der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, der 3-HPA Konzentration im Reaktor ($C_{HPA,R}$), der Arrhenius Energie (E_0), der Reaktortemperatur (T_R) und der Bezugstemperatur, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt wurde (T_0), abhängig.

$$r_{deh} = k_{deh} \cdot C_{HPA,R} \cdot \exp\left(\frac{E_0}{4,574 \frac{cal}{mol}} \cdot \frac{T_R[K] - T_0[K]}{T_R[K] \cdot T_0[K]}\right) \quad (7.13)$$

Die Verweilzeit im Dehydratisierungsbereich (τ_{deh}) wird mit Hilfe einer kontinuierlichen Bilanz aus dem Wirkungsgrad der Transformation (Y_{trans}), der Glycerinkonzentration im Substrat (C_{sub}), der 3-HPA Konzentration im Reaktor ($C_{HPA,R}$) und der Dehydrierungsreaktionsgeschwindigkeit berechnet. Es wird angenommen, dass im Reaktor eine 3-HPA Konzentration etabliert wird, die unterhalb der minimalen inhibierenden Konzentration liegt ([CLV⁺07]).

$$\tau_{deh} = \frac{Y_{trans} \cdot C_{sub} - C_{HPA,R}}{r_{deh}} \quad (7.14)$$

Berechnung des Reaktionsvolumens im Dehydratisierungsteil ($V_{x,deh}$) unter Verwendung des Substratstroms (\dot{V}_{sub}).

$$V_{x,deh} = \tau_{deh} \cdot \dot{V}_{sub} \quad (7.15)$$

Zur Bestimmung des notwendigen Katalysatorvolumens (V_{kat}) wird der Wert für die verwendete spezifische Katalysatormasse (m_{kat}) aus Kapitel 6.2.7 sowie dessen Dichte (ρ_{kat}) verwendet.

$$V_{kat} = \frac{V_{x,deh} \cdot m_{kat}}{\rho_{kat}} \quad (7.16)$$

Berechnung der notwendigen Katalysatormasse (M_{kat}).

$$M_{kat} = V_{kat} \cdot \rho_{kat} \quad (7.17)$$

Berechnung des Volumens des Dehydratisierungsbereichs (V_{deh}) aus dem Reaktionsvolumen ($V_{x,deh}$) und dem Katalysatorvolumen (V_{kat}).

$$V_{deh} = V_{x,deh} + V_{kat} \quad (7.18)$$

Für die Berechnung des im Dehydratisierungsbereich produzierten Acroleinmengenstroms (\dot{X}_A) aus dem eintretenden 3-HPA Mengenstrom (\dot{X}_{HPA}) wird der in Kapitel 6.3.3 für die Reaktivdestillation ermittelte Wirkungsgrad (Y_{deh}) verwendet und der Wirkungsgrad der Destillation mit 100% angenommen.

$$\dot{X}_A = \dot{X}_{HPA} \cdot Y_{deh} \quad (7.19)$$

Berechnung des produzierten Acroleinmassenstroms (\dot{M}_A) mit Hilfe seiner Molmasse (MM_A).

$$\dot{M}_A = \dot{X}_A \cdot MM_A \quad (7.20)$$

Auslegung des Destillationsbereichs

Zur Auslegung des Destillationsbereichs wird vereinfachend von einem binären Gemisch ausgegangen. Der aus dem Reaktor aufsteigende Dampf wird als eine Mischung aus Wasser und Acrolein betrachtet.

Der im Reaktionsbereich notwendige Druck (P_R) für die Verdampfung bei Reaktortemperatur (T_R) wird mit der Antoine Gleichung unter der vereinfachenden Annahme, dass das Medium im Reaktionsbereich nur aus Wasser besteht

berechnet. Die Parameter ($A_{a,W}, B_{a,W}, C_{a,W}$) wurden dem NIST Webbook entnommen ([BA64]).

$$\log P_R[\text{bar}] = A_{a,W} - \frac{B_{a,W}}{T_R[K] + C_{a,W}} \quad (7.21)$$

Die Siedetemperatur von reinem Acrolein ($T_{sied,A}$) bei Reaktordruck (P_R) wird mit der Antoine Gleichung bestimmt. Die Parameter ($A_{a,A}, B_{a,A}, C_{a,A}$) wurden dem NIST Webbook entnommen ([Stu47]).

$$T_{sied,A}[K] = \frac{B_{a,A}}{A_{a,A} - \log P_R[\text{bar}]} - C_{a,A} \quad (7.22)$$

Auch die Siedetemperatur von reinem Wasser ($T_{sied,W}$) bei Reaktordruck (P_R) wird mit der Antoine Gleichung bestimmt. Die Parameter ($A_{a,W}, B_{a,W}, C_{a,W}$) wurden wiederum dem NIST Webbook entnommen ([BA64]).

$$T_{sied,W}[K] = \frac{B_{a,W}}{A_{a,W} - \log P_R[\text{bar}]} - C_{a,W} \quad (7.23)$$

Die relative Flüchtigkeit (α) wurde nach Skogestad et al. aus den Verdampfungsenthalpien ($H_{vap,A}, H_{vap,W}$) und den Siedetemperaturen ($T_{sied,A}, T_{sied,W}$) von Acrolein und Wasser bestimmt ([WACP07]).

$$\ln \alpha = \frac{\sqrt{H_{vap,A}[J/mol] \cdot H_{vap,W}[J/mol]}}{R \cdot \sqrt{T_{sied,A}[K] \cdot T_{sied,W}[K]}} \cdot \frac{T_{sied,W}[K] - T_{sied,A}[K]}{\sqrt{T_{sied,A}[K] \cdot T_{sied,W}[K]}} \quad (7.24)$$

Auch der Trennfaktor (S) wurde gemäß Skogestad et al. aus den gewünschten Acroleinmolenbrüchen im Destillat ($x_{dest,A}$) und im Sumpf ($x_{sumpf,A}$) der Kolonne bestimmt ([WACP07]).

$$S = \frac{x_{dest,A} \cdot (1 - x_{sumpf,A})}{x_{sumpf,A} \cdot (1 - x_{dest,A})} \quad (7.25)$$

Daraus lässt sich nach Skogestad et al. die minimale Trennstufenzahl (N_{min}) ableiten ([WACP07]).

$$N_{min} = \frac{\ln S}{\ln \alpha} \quad (7.26)$$

Für die Bestimmung der realen Trennstufenzahl (N) wird ein nach Skogestad et al. üblicher Sicherheitsfaktor (f_N) gewählt. Ein größerer Sicherheitsfaktor und damit mehr Trennstufen ermöglichen ein kleineres Rücklaufverhältnis und damit einen geringeren Energiebedarf für die Verdampfung ([WACP07]).

$$N = N_{min} \cdot f_N \quad (7.27)$$

Der Druck am Kolonnenkopf (P_{dest}) kann über die von der Pall Ring Company, dem Hersteller der Füllkörper, zur Verfügung gestellten Daten zum Druckverlust (ΔP) und einer nach Skogestad et al. abgeschätzten Höhe einer Trennstufe (HTU) berechnet werden ([The12], [WACP07]).

$$P_{dest} = P_R - N \cdot HTU \cdot \Delta P \quad (7.28)$$

Die Berechnung der Kolonnenhöhe (H_K) erfolgt mit einem Aufschlag (H_{int}) für die Einbauten nach den Empfehlungen von Kister ([Kis06]).

$$H_K = N \cdot HTU + H_{int} \quad (7.29)$$

Der Dampfdruck des Acroleins (P_A) im Dampf über dem Reaktionsbereich kann vereinfachend mit der Antoine Gleichung, in Abhängigkeit von der Reaktortemperatur (T_R), berechnet werden. Die Parameter ($A_{a,A}$, $B_{a,A}$, $C_{a,A}$) wurden dem NIST Webbook entnommen ([Stu47]).

$$\log P_A[\text{bar}] = A_{a,A} - \frac{B_{a,A}}{T_R[K] + C_{a,A}} \quad (7.30)$$

Die Dichte des aus dem Reaktionsbereich aufsteigenden Dampfes ($\rho_{y,R}$) berechnet sich unter der Vereinfachung, dass es Wasserdampf ist, der sich wie ein ideales Gas verhält, aus dem Reaktordruck (P_R), der Molmasse des Dampfes ($MM_{y,R}$) und der Reaktortemperatur (T_R) wie folgt:

$$\rho_{y,R} = \frac{P_R \cdot MM_{y,R}}{R \cdot T_R} \quad (7.31)$$

Berechnung des molaren Acroleinanteils im Reaktionsmedium ($x_{A,R}$) aus der Acroleinkonzentration im Reaktor ($C_{A,R}$) sowie der Molmasse (MM_R) und Dichte (ρ_R) des Reaktionsmediums.

$$x_{A,R} = C_{A,R} \cdot \frac{MM_R}{\rho_R} \quad (7.32)$$

Der Acroleinanteil im Dampf über dem Reaktionsbereich ($x_{y,A,R}$) wird unter der Annahme einer idealen Mischung mit dem Raoultischen Gesetz aus dem Verhältnis des Acroleindampfdruckes (P_A) zum Gesamtdruck im Reaktionsbereich (P_R) berechnet.

$$x_{y,A,R} = x_{A,R} \cdot \frac{P_A}{P_R} \quad (7.33)$$

Somit ergibt sich der folgende zu destillierende Dampfstrom ($\dot{X}_{y,R}$), um das gesamte Acrolein (\dot{X}_A), welches im Dehydratisierungsbereich produziert wird, aus dem Reaktionsmedium zu entfernen.

$$\dot{X}_{y,R} = \frac{\dot{X}_A}{x_{y,A,R}} \quad (7.34)$$

Daraus ergibt sich mit Hilfe der Molmasse des Dampfes ($MM_{y,R}$) der folgende zu destillierende Dampfmassenstrom ($\dot{M}_{y,R}$), um das gesamte Acrolein aus dem Reaktionsmedium zu entfernen.

$$\dot{M}_{y,R} = \dot{X}_{y,R} \cdot MM_{y,R} \quad (7.35)$$

Über eine Massenbilanz in der Kolonne lässt sich der Destillatmengenstrom (\dot{M}_{dest}) aus dem zu destillierenden Dampfmassenstrom ($\dot{M}_{y,R}$), den Molmassen des Destillats, Sumpfproduktes und des Dampfes ($MM_A, MM_W, MM_{y,R}$) sowie den Acroleinmolenbrüchen im Destillat, im Sumpf und im zu destillierenden Dampf ($x_{dest,A}, x_{sumpf,A}, x_{y,A,R}$) berechnen ([WACP07]).

$$\dot{M}_{dest} = \dot{M}_{y,R} \cdot \frac{x_{dest,A} \cdot MM_A + (1 - x_{dest,A}) \cdot MM_W}{MM_{y,R}} \cdot \frac{x_{y,A,R} - x_{sumpf,A}}{x_{dest,A} - x_{sumpf,A}} \quad (7.36)$$

Der minimale Dampfstrom ($\dot{M}_{y,K}$), der im Sumpf der Kolonne zur Erreichung der Trennleistung verdampft werden muss, berechnet sich aus dem zu destillierenden Dampfmassenstrom ($\dot{M}_{y,R}$), den Molmassen des zu destillierenden Dampfes und des Dampfes in der Kolonne ($MM_{y,R}, MM_{y,K}$) sowie der relativen Flüchtigkeit (α) nach Skogestad et al. wie folgt ([WACP07]).

$$\dot{M}_{y,K} = \dot{M}_{y,R} \cdot \frac{MM_{y,K}}{MM_{y,R}} \cdot \frac{1}{\alpha - 1} \quad (7.37)$$

Die Dichte des in der Kolonne aufsteigenden Dampfes ($\rho_{y,K}$) wird vereinfachend unter der Annahme berechnet, dass es sich um Wasserdampf handelt, der sich wie ein ideales Gas verhält. Zur Berechnung wurden die Molmasse des Dampfes in der Kolonne ($MM_{y,K}$) sowie die Temperatur (T_R) und der Druck (P_R) auf der Feedstufe verwendet.

$$\rho_{y,K} = \frac{P_R \cdot MM_{y,K}}{R \cdot T_R} \quad (7.38)$$

Die zulässige Gasgeschwindigkeit in der Kolonne ($v_{y,K}$) berechnet sich mit einem nach Goedicke et al. abgeschätzten F-Faktor für Destillationen bei Unterdruck wie folgt ([Goe06]):

$$v_{y,K} = \frac{F}{\sqrt{\rho_{y,K}}} \quad (7.39)$$

Abschätzung der notwendigen freien Kolonnenquerschnittsfläche ($A_{\varphi,K}$) mit Hilfe der aufsteigenden Dampfströme ($\dot{M}_{y,R}, \dot{M}_{y,K}$) und deren Dichte ($\rho_{y,K}$).

$$A_{\varphi,K} = \frac{\dot{M}_{y,R} + \dot{M}_{y,K}}{\rho_{y,K} \cdot v_{y,K}} \quad (7.40)$$

Zur Abschätzung der notwendigen Kolonnenfläche (A_K) muss der Lückengrad der Kolonne (φ) berücksichtigt werden ([PT91]).

$$A_K = \frac{A_{\varphi,K}}{\varphi} \quad (7.41)$$

Damit ergibt sich der folgende Kolonnendurchmesser (D_K).

$$D_K = \sqrt{\frac{4 \cdot A_K}{\pi}} \quad (7.42)$$

Die minimale Wanddicke der Kolonne (d_K) lässt sich nach Annaratone et al. mit Hilfe des externen Druckes und des Kolonnendurchmessers (D_K) abschätzen ([Ann07]). Es wurden die Parameter f_{wld} und f_{st} für Stahl AISI 304 nach Peters et al. gewählt ([PT91]).

$$d_K = \frac{(1,013bar - P_{dest}) \cdot D_K}{2 \cdot f_{wld} \cdot f_{st} + (1,013bar - P_{dest})} \quad (7.43)$$

Mit der nun bekannten Querschnittsfläche (A_K) und der Kolonnenhöhe (H_K) lässt sich das Kolonnenvolumen (V_K) berechnen.

$$V_K = A_K \cdot H_K \quad (7.44)$$

Berechnung des Packungsvolumens (V_{pack}) über die Höhe einer Trennstufe (HTU) und deren Anzahl (N).

$$V_{pack} = A_K \cdot N \cdot HTU \quad (7.45)$$

Die im optimalen Fall auf dem Feedboden kondensierende Acroleinmenge ($x_{F,A}$) im aus dem Reaktor aufsteigenden Dampf berechnet sich mit Hilfe der relativen Flüchtigkeit (α) und dem Acroleinanteil ($x_{y,A,R}$) im Dampf über dem Reaktionsbereich (Feed) nach Skogestad et al. wie folgt ([WACP07]).

$$x_{F,A} = \frac{x_{y,A,R}}{\alpha - (\alpha - 1) \cdot x_{y,A,R}} \quad (7.46)$$

Damit lässt sich die Größe $N_T - N_B$ unter Zuhilfenahme der relativen Flüchtigkeit (α) und den Acroleinanteilen im Feed, Sumpf und Destillat ($x_{y,A,R}, x_{sumpf,A}, x_{dest,A}$) nach Skogestad bestimmen ([WACP07]).

$$N_T - N_B = \ln \left(\frac{1 - x_{y,A,R}}{x_{F,A}} \cdot \frac{x_{sumpf,A}}{1 - x_{dest,A}} \right) / \ln \alpha \quad (7.47)$$

Somit ergibt sich folgende Feedstufe (N_F) in Abhängigkeit von der Gesamtstufenzahl (N) nach Skogestad et al. (gezählt von unten) ([WACP07]).

$$N_F = \frac{N + 1 - (N_T - N_B)}{2} \quad (7.48)$$

Auslegung der Gesamtdimensionen

Das Volumen des gesamten Reaktionsbereichs (V_R) lässt sich mit den beiden Reaktionsbereichen für die Transformation (V_{trans}) und Dehydratisierung (V_{deh}) sowie einem Aufschlag ($f_{HS,R}$) für den Platz einer Zone, in der der Dampf gebildet wird, berechnen. Es wird darüber hinaus angenommen, dass die Dampfbildung im Reaktionsbereich bestehend aus Transformationsbereich und Dehydratisierungsbereich ausreicht, um die Flüssigkeit in diesem ideal zu durchmischen.

$$V_R = V_{trans} + V_{deh} + f_{HS,R} \cdot (V_{trans} + V_{deh}) \quad (7.49)$$

Das Gesamtvolumen (V_{R+K}) des Reaktionsbereichs (V_R) und des Kolonnenbereichs (V_K), welche alle in einen Apparat integriert werden sollen, berechnet sich wie folgt.

$$V_{R+K} = V_R + V_K \quad (7.50)$$

Um einen einheitlichen Apparat zu erhalten, sollte der Durchmesser des Reaktionsbereichs (D_R) dem der Kolonne (D_K) entsprechen.

$$D_R = D_K \quad (7.51)$$

Daraus ergibt sich das Folgende Höhe zu Durchmesser Verhältnis ($f_{HD,R}$) des Reaktionsbereichs abhängig von dessen Volumen (V_R).

$$f_{HD,R} = \frac{4 \cdot V_R}{\pi \cdot D_R^3} \quad (7.52)$$

Daraus ergibt sich die Höhe des Reaktionsbereichs (H_R):

$$H_R = \sqrt[3]{\frac{4 \cdot V_R \cdot f_{HD,R}^2}{\pi}} \quad (7.53)$$

Maßgeblich für die Wanddicke in dem den Reaktionsbereich umfassenden Apparat ist der statische Druck ($P_{stat,R}$), der größer als der externe Druck ist und von der Höhe der Flüssigkeit im Reaktionsbereich (H_R) abhängt.

$$P_{stat,R} = \rho_R \cdot g \cdot H_R \quad (7.54)$$

Somit berechnet sich die minimale Wanddicke des Reaktionsbereichs (d_R) mit Hilfe des Durchmessers (D_R) und unter Verwendung von Stahl (AISI 304) mit den von Peters et al. gegebenen Parametern f_{wld} und f_{st} nach Annaratone et al. wie folgt ([PT91], [Ann07]).

$$d_R = \frac{P_{stat,R} \cdot D_R}{2 \cdot f_{wld} \cdot f_{st} + P_{stat,R}} \quad (7.55)$$

Auslegung der Wärmeübertrager

Für die Auslegung der Verdampfer wird davon ausgegangen, dass Heizdampf mit 100 bar Druck (P_{PS}) für die Beheizung verwendet wird, da hierfür eine relativ aktuelle Literaturquelle mit den Kosten vorliegt ([Dut09]). Die Temperatur des Dampfes ($T_{PS,in}$) bei 100 bar kann mit der Antoine-Gleichung abgeschätzt werden. Die Parameter ($A_{a,W}$, $B_{a,W}$, $C_{a,W}$) wurden dem NIST Webbook entnommen ([BA64]).

$$T_{PS,in}[K] = \frac{B_{a,W}}{A_{a,W} - \log P_{PS}[\text{bar}]} - C_{a,W} \quad (7.56)$$

Die im Heizdampf enthaltene Energiemenge (q_{PS}) wird bei Entspannung auf Umgebungsdruck, bei Kondensation bei 100°C und bei Abkühlung des Kondensats frei. Dadurch lässt sich diese mit Hilfe der Wärmekapazität des Dampfes ($c_{p,y,PS}$) und des Kondensats ($c_{p,x,PS}$), der Verdampfungsenthalpie ($H_{vap,W}$), der Molmasse des Dampfes (MM_{PS}) sowie dessen Austrittstemperatur ($T_{PS,out}$) berechnen.

$$q_{PS} = \frac{c_{p,y,PS} \cdot (T_{PS,in} - 100^\circ\text{C}) + H_{vap,W} + c_{p,x,PS} \cdot (100^\circ\text{C} - T_{PS,out})}{MM_{PS}} \quad (7.57)$$

Da das Substrat Schlempe fast direkt aus der Ethanoldestillation kommt hat es eine noch recht hohe Temperatur. Die Wärmekapazität des Substrats ($c_{p,sub}$)

wird vereinfachend mit der von Wasser bei entsprechender Temperatur (T_{sub}) nach Shoemate abgeschätzt. Dazu wurden die Parameter ($A_{c,W}, B_{c,W}, C_{c,W}, D_{c,W}, E_{c,W}$) dem NIST Webbook entnommen ([Cha98]).

$$c_{p,sub}[kJ/mol] = A_{c,W} + B_{c,W} \cdot \frac{T_{sub}[K]}{1000} + C_{c,W} \cdot \left(\frac{T_{sub}[K]}{1000}\right)^2 + D_{c,W} \cdot \left(\frac{T_{sub}[K]}{1000}\right)^3 + E_{c,W} / \left(\frac{T_{sub}[K]}{1000}\right)^2 \quad (7.58)$$

Die Wärmemenge, welche durch den Substratstrom eingetragen wird, kann zur Verdampfung in Reaktionsbereich genutzt werden. Der eingetragene Wärmestrom (\dot{Q}_{sub}) berechnet sich aus dem Substratvolumenstrom (\dot{V}_{sub}), der Dichte des Substrats (ρ_{sub}), seiner Molmasse (MM_{sub}), seiner Wärmekapazität ($c_{p,sub}$) sowie der Temperaturdifferenz zwischen Substrat (T_{sub}) und Reaktionsbereich (T_R).

$$\dot{Q}_{sub} = \frac{\dot{V}_{sub} \cdot \rho_{sub}}{MM_{sub}} \cdot c_{p,sub} \cdot (T_{sub} - T_R) \quad (7.59)$$

Dieser eingetragene Wärmestrom reicht jedoch nicht aus, die notwendige Menge Medium im Reaktor zu verdampfen, um das gesamte Acrolein zu entfernen. Der dafür notwendige Wärmestrom (\dot{Q}_R) wird vereinfachend mit der Verdampfungsenthalpie von reinem Wasser ($H_{vap,W}$), der Molmasse des Reaktionsmediums (MM_R) und dem zu produzierenden Dampfmassenstrom ($\dot{M}_{y,R}$) berechnet.

$$\dot{Q}_R = \frac{\dot{M}_{y,R} \cdot H_{vap,W}}{MM_R} - \dot{Q}_{sub} \quad (7.60)$$

Die für die Verdampfung im Reaktor notwendige Heizdampfmenge ($\dot{M}_{PS,R}$) ergibt sich mit der im Heizdampf enthaltenen Energiemenge (q_{PS}).

$$\dot{M}_{PS,R} = \frac{\dot{Q}_R}{q_{PS}} \quad (7.61)$$

Die Wärmeaustauscherfläche zur Beheizung des Reaktors ($A_{evap,R}$) wird gemäß Backhurst et al. mit der mittleren logarithmischen Temperaturdifferenz zwischen der Dampfeintrittstemperatur ($T_{PS,in}$), der Reaktortemperatur (T_R) und der Dampfaustrittstemperatur ($T_{PS,out}$) sowie einem nach Wozny abgeschätzten Wärmedurchgangskoeffizienten (U_{evap}) berechnet ([BH73], [WT06]).

$$A_{evap,R} = \frac{\dot{Q}_R}{U_{evap}} \cdot \frac{\ln[(T_{PS,in} - T_R) / (T_{PS,out} - T_R)]}{(T_{PS,in} - T_R) - (T_{PS,out} - T_R)} \quad (7.62)$$

Berechnung des minimalen Energiebedarfs für die Verdampfung im Kolonnensumpf ($\dot{Q}_{min,K}$) mit Hilfe der Verdampfungsenthalpie ($H_{vap,W}$), des in der Kolonne erzeugten Damfmassenstroms ($\dot{M}_{y,K}$) und dessen Molmasse ($MM_{y,K}$) unter der vereinfachenden Annahme, dass es sich um reines Wasser handelt.

$$\dot{Q}_{min,K} = \frac{\dot{M}_{y,K} \cdot H_{vap,W}}{MM_{y,K}} \quad (7.63)$$

Daraus ergibt sich über einen Faktor ($f_{Q,K}$) folgender realer Energiebedarf (\dot{Q}_K) für die Verdampfung im Kolonnensumpf nach Skogestad ([WACP07]).

$$\dot{Q}_K = f_{Q,K} \cdot \dot{Q}_{min,K} \quad (7.64)$$

Die für die Verdampfung im Kolonnensumpf notwendige Heizdampfmenge ($\dot{M}_{PS,K}$) lässt sich mit der im Heizdampf enthaltenen Wärmeübertragungsleistung (q_{PS}) bestimmen.

$$\dot{M}_{PS,K} = \frac{\dot{Q}_K}{q_{PS}} \quad (7.65)$$

Die Wärmeaustauscherfläche zur Beheizung des Kolonnensumpfes ($A_{evap,K}$) wird gemäß Backhurst et al. mit der mittleren logarithmischen Temperaturdifferenz zwischen der Dampfeintrittstemperatur ($T_{PS,in}$), der Reaktortemperatur (T_R), welche der Kolonnensumpftemperatur entspricht, und der Dampfaustrittstemperatur ($T_{PS,out}$) sowie einem nach Wozny abgeschätzten Wärmedurchgangskoeffizienten (U_{evap}) berechnet ([BH73], [WT06]).

$$A_{evap,K} = \frac{\dot{Q}_K}{U_{evap}} \cdot \frac{\ln [(T_{PS,in} - T_R) / (T_{PS,out} - T_R)]}{(T_{PS,in} - T_R) - (T_{PS,out} - T_R)} \quad (7.66)$$

Die Destillattemperatur (T_{dest}), welche zur Kondensation des Gemisches am Kolonnenkopf notwendig ist, wird vereinfachend mit dem Ansatz nach Antoine iterativ berechnet ([Stu47], [BA64]). Dazu wird sie in Abhängigkeit von dem Acroleinmolanteil im Destillat ($x_{dest,A}$) und dem Druck am Kolonnenkopf (P_{dest}), sowie mit Hilfe der Antoineparameter für Wasser ($A_{a,W}, B_{a,W}, C_{a,W}$) und Acrolein ($A_{a,A}, B_{a,A}, C_{a,A}$) berechnet.

$$P_{dest}[bar] = x_{dest,A} \cdot \exp\left(A_{a,A} - \frac{B_{a,A}}{T_{dest}[K] + C_{a,A}}\right) + (1 - x_{dest,A}) \cdot \exp\left(A_{a,W} - \frac{B_{a,W}}{T_{dest}[K] + C_{a,W}}\right) \quad (7.67)$$

Der im Kondensator abzuführende Wärmestrom ($\dot{Q}_{cond,K}$) ergibt sich aus der Kondensation des aus dem Reaktionsbereich aufsteigenden Dampfes ($\dot{M}_{y,R}$) und dem aus dem Kolonnensumpf aufsteigendem Dampf ($\dot{M}_{y,K}$). Hierbei wird vereinfachend mit der Molmasse ($MM_{y,K}$) und der Verdampfungsenthalpie ($H_{vap,W}$) von Wasserdampf gerechnet.

$$\dot{Q}_{cond,K} = \frac{(\dot{M}_{y,K} + \dot{M}_{y,R}) \cdot H_{vap,W}}{MM_{y,K}} \quad (7.68)$$

Berechnung der für die Kondensation notwendigen Kühlmittelmenge ($\dot{M}_{cw,K}$). Für die Stoffeigenschaften Molmasse (MM_{cw}) und Wärmekapazität ($c_{p,cw}$) werden vereinfachend die von Wasser angenommen.

$$\dot{M}_{cw,K} = \frac{\dot{Q}_{cond,K} \cdot MM_{cw}}{c_{p,cw} \cdot (T_{cw,out} - T_{cw,in})} \quad (7.69)$$

Die Wärmeaustauscherfläche zur Kondensation des Dampfes ($A_{cond,K}$) wird gemäß Backhurst et al. mit der mittleren logarithmischen Temperaturdifferenz zwischen der Kühlmiteleintrittstemperatur ($T_{cw,in}$), der Destillattemperatur (T_{dest}) und der Kühlmittelaussrittstemperatur ($T_{cw,out}$) sowie einem nach Wozny abgeschätzten Wärmedurchgangskoeffizienten (U_{cond}) berechnet ([BH73], [WT06]).

$$A_{cond,K} = \frac{\dot{Q}_{cond,K}}{U_{cond}} \cdot \frac{\ln[(T_{dest} - T_{cw,in}) / (T_{dest} - T_{cw,out})]}{(T_{dest} - T_{cw,in}) - (T_{dest} - T_{cw,out})} \quad (7.70)$$

Auslegung des Ejektors zur Vakuumerzeugung

Die Entrainmentrate des dampfbetriebenen Ejektors (e_{ejec}) wird mit der nach Backhurst et al. bestimmten allgemeinen Entrainmentrate $e_{ejec,min}$, korrigiert mit den Molmassen des Dampfes (MM_{PS}) und der zu entfernenden nicht kondensierbaren Stoffe (MM_{inert}) sowie deren Temperaturen ($T_{PS,in}$, T_{dest}), berechnet ([BH73]).

$$e_{ejec} = e_{ejec,min} \cdot \sqrt{\frac{T_{PS,in}[K] \cdot MM_{inert}}{T_{dest}[K] \cdot MM_{PS}}} \quad (7.71)$$

Der vom Ejektor zu fördernde Inertgasstrom (\dot{M}_{inert}), welcher in den Reaktor eindringt, wird mit einem Sicherheitsfaktor (f_{inert}) beaufschlagt und mit dem zulässigen Druckabfall (ΔP_{leak}) nach Weber et al. als ideales Gas bestimmt

([Web06]). Der Druckabfall bezieht sich auf das Gesamtvolumen des Apparates ($V_R + V_K$) bei der Betriebstemperatur (T_R).

$$\dot{M}_{inert} = \frac{f_{inert} \cdot \Delta P_{leak} \cdot MM_{inert} \cdot (V_R + V_K)}{R \cdot T_R} \quad (7.72)$$

Berechnung der notwendigen Heizdampfmenge ($\dot{M}_{PS,ejec}$), um den Inertgassstrom mit Hilfe der Entrainmentrate (e_{ejec}) zu entfernen.

$$\dot{M}_{PS,ejec} = \frac{\dot{M}_{inert}}{e_{ejec}} \quad (7.73)$$

Auslegung der Biokatalysatorproduktion

Bei der Biokatalysatorproduktion wird davon ausgegangen, dass sich eine unsterile, unbegaste kontinuierliche Produktion gemäß Kapitel 4.3.6 realisieren lässt. Es wird angenommen, dass die Reaktortemperatur durch das zugeführte Medium ausreichend konstant gehalten werden kann, ohne dass eine zusätzliche Kühlung oder Beheizung des Reaktors notwendig ist. Es wird eine Immobilisierung des Ganzzellkatalysators gemäß Rütli et al. und Krauter et al. angestrebt ([Rüt10], [HKK⁺10]). Das Arbeitsvolumen des kontinuierlichen Produktionsreaktors ($V_{prod,min}$) ergibt sich aus dem Bedarf an Biokatalysator für die Transformation ($\dot{G}_{reuteri}$) und der für die unsterile kontinuierliche Fahrweise ermittelten Produktivität (p_{prod}).

$$V_{prod,min} = \frac{\dot{G}_{reuteri}}{p_{prod}} \quad (7.74)$$

Das Gesamtvolumen des Biokatalysatorproduktionsreaktors (V_{prod}) wird mit einem Aufschlag ($f_{HS,prod}$) für das Kopfvolumen berechnet.

$$V_{prod} = V_{prod,min} + f_{HS,prod} \cdot V_{prod,min} \quad (7.75)$$

Die Höhe des Biokatalysatorproduktionsreaktors (H_{prod}) ergibt sich aus einem üblichen Höhen- zu Breitenverhältnis ($f_{HD,prod}$, [Kra03]). Eine hohe und schlanke Form, wie sie sonst bei Bioreaktoren verwendet wird, um einen lang andauernden Gasübergang in die Flüssigkeit zu gewährleisten, ist nicht notwendig, da dieser Reaktor nicht begast wird.

$$H_{prod} = \sqrt[3]{\frac{4 \cdot V_{prod} \cdot f_{HD,prod}^2}{\pi}} \quad (7.76)$$

Da der Biokatalysatorproduktionsreaktor bei Umgebungsdruck betrieben wird, ist der statische Druck ($P_{stat,prod}$) maßgebend für die erforderliche Wanddicke.

$$P_{stat,prod} = \rho_{prod} \cdot g \cdot H_{prod} \quad (7.77)$$

Der Durchmesser des Biokatalysatorproduktionsreaktors (D_{prod}) ergibt sich wieder aus dem Höhen- zu Breitenverhältnis ($f_{HD,prod}$) und dem Volumen des Reaktors (V_{prod}).

$$D_{prod} = \sqrt[3]{\frac{4 \cdot V_{prod}}{\pi \cdot f_{HD,prod}}} \quad (7.78)$$

Die minimale Wanddicke des Biokatalysatorproduktionsreaktors (d_{prod}) unter Verwendung von Stahl (AISI 304) mit den entsprechenden Parametern ergibt sich gemäß Annaratone et al. aus den von Peters et al. gegebenen Parametern f_{wld} und f_{st} ([Ann07], [PT91]).

$$d_{prod} = \frac{P_{stat,prod} \cdot D_{prod}}{2 \cdot f_{wld} \cdot f_{st} + P_{stat,prod}} \quad (7.79)$$

Die benötigte Menge Wachstumsmedium (\dot{V}_{medium}) ergibt sich aus der in Kapitel 4.3.6 verwendeten Verweilzeit (τ_{prod}) und dem Arbeitsvolumen des Reaktors ($V_{prod,min}$). Es wird angenommen, dass eine Lösung gefunden wird, um die Hefezellen aus der Schlempe als Quelle für Aminosäuren, Vitamine und Spurenelemente zu nutzen. Bei anschließender gleichwertiger Weiterverwendung des Fermentationsrückstands ergeben sich neben den Kosten für die Kohlenstoffquelle keine Kosten für das Medium.

$$\dot{V}_{medium} = \frac{V_{prod,min}}{\tau_{prod}} \quad (7.80)$$

Berechnung der benötigten Glukosemenge (\dot{M}_{gluc}) mit Hilfe der erforderlichen Glukosekonzentration (C_{gluc}).

$$\dot{M}_{gluc} = \dot{V}_{medium} \cdot C_{gluc} \quad (7.81)$$

Die benötigte Menge Ammoniakwasser (25%) (\dot{M}_{NH3}) wird aus den Versuchsbedingungen in Kapitel 4.3.6 in Abhängigkeit von der geforderten Biokatalysatorproduktionsmenge ($\dot{G}_{reuteri}$) bestimmt.

$$\dot{M}_{NH3} = y_{NH3} \cdot \dot{G}_{reuteri} \quad (7.82)$$

Zur Berechnung der notwendigen Rührerleistung für eine Durchmischung des Biokatalysatorproduktionsreaktors wird der Rührerdurchmesser (rd_{prod}) gemäß Kraume über ein Reaktordurchmesser zu Rührer Verhältnis (f_{Dd}) abgeschätzt ([Kra03]).

$$rd_{prod} = \frac{D_{prod}}{f_{Dd}} \quad (7.83)$$

Die benötigte Rührerdrehzahl (n_{prod}) wird vereinfachend für die Dichte (ρ_{prod}) und die Viskosität (η_{prod}) von Wasser abgeschätzt.

$$n_{prod} = \frac{Re \cdot \eta_{prod}}{\rho_{prod} \cdot rd_{prod}^2} \quad (7.84)$$

Die benötigte Rührerleistung (W_{prod}) für einen Propellerrührer ergibt sich somit gemäß Kraume ([Kra03]).

$$W_{prod} = Ne \cdot \rho_{prod} \cdot n_{prod}^3 \cdot rd_{prod}^5 \quad (7.85)$$

7.2.2 Kostenermittlung

Die in Literaturquellen gefundenen Equipmentkosten wurden mit der Exponentenmethode und den entsprechenden Exponenten f_s an die benötigte Größe angepasst (siehe Tabelle 7.1 und Gleichung 7.86). Falls die Exponenten nicht explizit angegeben waren, wurden sie aus den Kosten bei verschiedenen Größen berechnet.

Tabelle 7.1: Exponenten verschiedener Bauteile zur Größenanpassung der Kosten

Equipment	f_s	Quelle
Reaktoren	0,56	[PT91]
Wärmeübertrager	0,44	[PT91]
Pallringe	0,11	[Dut09]
Ejektor	0,41	[Nav95]
Rührwerk	0,49	[Nav95]

$$CC_i = CC_{ref} \cdot \left(\frac{\text{Größe}_i}{\text{Größe}_{ref}} \right)^{f_s} \quad (7.86)$$

Um die heutigen Kosten (2011) des Equipments (Material) und der Hilfsstoffe zu ermitteln wurde der Chemical Engineering Plant Cost Index (CEPCI) verwendet (siehe Tabelle 7.2 und Gleichung 7.87).

Tabelle 7.2: Chemical Engineering Plant Cost Index des Chemical Engineering Magazins. Mittlerer Wert in verschiedenen Jahren.

Jahr	Wert	Quelle
1990	358	[Nav95]
1995	381	[Nav95]
2009	539,6	[Acc10]
2011	585,7	[Acc12]

$$CC_i = CC_{ref} \cdot \left(\frac{CEPCI_i}{CEPCI_{ref}} \right) \quad (7.87)$$

Gegebenenfalls mussten die Materialkosten noch von US Dollar in Euro umgerechnet werden. Dazu wurde der aktuelle Kurs (22.07.2012) verwendet. 1 USD entsprach 0,822436056 EUR.

Für den Katalysator Amberlyst 36 konnten keine Großhandelspreise ermittelt werden. Deshalb wurde das Verhältnis der Kosten pro Gewicht für 250 g bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) von verschiedenen Substanzen zu den Großhandelspreisen auf www.alibaba.com ermittelt. Es wurde ein mittlerer Faktor von 41,75 berechnet, um den die Kosten für den Katalysator Amberlyst 36, ermittelt aus den Kosten für 250 g bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH, reduziert.

Die gesamten Investitionskosten für den Bau eines Equipments beziehungsweise dessen Hilfsstoffkosten wurden mit einer faktoriellen Beaufschlagung nach Lang aus den Materialkosten ermittelt ([HE93]).

Für den Bau der Anlage wurde mit einer Bauzeit t_b von einem Jahr und einem Kreditzinssatz z von 3% kalkuliert. Die Anfangsinvestitionen wurden mit Gleichung 7.88 berechnet.

$$IC_0 = IC \cdot (1 + z)^{t_b} \quad (7.88)$$

Die Investitionskosten pro Betriebsstunde (ic) wurden für einen Abschreibungszeitraum t_a von zehn Jahren und einem Kreditzinssatz z von 3% berechnet.

$$IC = \frac{IC_0}{t_{betr}} \cdot \frac{z \cdot (1 + z)^{t_a}}{(1 + z)^{t_a} - 1} \quad (7.89)$$

Die Betriebskosten ergeben sich aus den Kosten für die Hilfsstoffe und weiteren mit der Faktorenmethode gemäß Humphreys et al. bestimmten Punkten

([HE93]). Die benötigten Arbeitsstunden pro Tonne Produkt (t_{arb}) zum Betrieb der Anlage wurden nach Wessell gemäß Gleichung 7.90 inklusive des Faktors für Personalaufsicht, Urlaub/Krankheit, Laboruntersuchungen usw. abgeschätzt ([HE93]).

$$t_{arb}[h/t] = 10 \cdot \frac{4}{(\dot{M}_{dest}[t/d])^{0,76}} \cdot 1,575 \quad (7.90)$$

Die Gesamtkosten pro kg Produkt (gc) können als Summe der Betriebskosten pro kg Produkt (bc) und Investmentkosten pro kg Produkt (ic) berechnet werden.

$$gc = \frac{\dot{I}C}{\dot{M}_{dest}} + \frac{\dot{B}C}{\dot{M}_{dest}} = ic + bc \quad (7.91)$$

7.2.3 Sensitivitätsanalyse

Für die Sensitivitätsanalyse wurden die Werte ausgewählter Variablen um 10% reduziert und die Auswirkungen auf die produktmengenbezogenen Investitionskosten (ic), Betriebskosten (bc) und Gesamtkosten (gc) beobachtet. Die Sensitivität des Modells wird als Verstärkung (Ω) beschrieben.

$$\text{Verstärkung}[\%] = \frac{\Delta \text{Kosten}[\%]}{\Delta \text{Variable}[\%]} \cdot 100 \quad (7.92)$$

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Auslegung

Für die Auslegung der Anlage wurden die in Tabelle 7.3 zusammengefassten und im Kapitel 7.2 auf Seite 119 begründeten Parameter gewählt.

Tabelle 7.3: Parameter der Auslegung der Anlage zur biotechnologischen Produktion von Acrolein aus Schlempe

Name	Einheit	Wert	Name	Einheit	Wert
$A_{a,A}$		4.12	m_{kat}	t/m^3_{medium}	0.5
$A_{a,W}$		5.40	MM_A	g/mol	56
$A_{c,W}$		-203.61	MM_{cw}	g/mol	18
$B_{a,A}$		1167.89	MM_{glyc}	g/mol	92
$B_{a,W}$		1838.68	MM_{HPA}	g/mol	74

KAPITEL 7. KOSTENSCHÄTZUNG

Name	Einheit	Wert	Name	Einheit	Wert
$B_{c,W}$		1523.29	MM_{inert}	g/mol	44
$C_{a,A}$		-41.56	MM_{PS}	g/mol	18
$C_{A,R}$	mM	15	MM_R	g/mol	18
$C_{a,W}$		-31.74	MM_{sub}	g/mol	18
$C_{c,W}$		-3196.41	MM_W	g/mol	18
C_{gluc}	g/l	20	$MM_{y,K}$	g/mol	18
$C_{HPA,R}$	mM	15	$MM_{y,R}$	g/mol	18
C_{NaOH}	kg/m^3	3.16	N_{ejec}		2
$C_{P,cw}$	$\frac{J}{mol \cdot k}$	76	Ne		0.4
$C_{P,x,PS}$	$\frac{J}{mol \cdot k}$	76	η_{prod}	$Pa \cdot s$	8.00E-04
$C_{P,y,PS}$	$\frac{J}{mol \cdot k}$	36	p_{prod}	$\frac{kU}{m^3_{reaktor} \cdot h}$	218
C_{sub}	mM	110	P_{PS}	bar	100
$D_{c,W}$		2474.46	φ		0.96
ΔP	$mbar/m$	6	R	$\frac{J}{mol \cdot k}$	8.314
ΔP_{leak}	bar/h	0.017	$r_{reuteri}$	mM/h	270
E_0	$kcal/mol$	16	Re		3000000
$E_{c,W}$		3.86	ρ_{kat}	t/m^3	1.2
$e_{ejec,min}$	kg/kg	0.006	ρ_{prod}	kg/l	1
F	$m/s \cdot \sqrt{kg/m^3}$	3	ρ_R	kg/l	1
f_{Dd}		3	ρ_{sub}	kg/l	1
$f_{HD,prod}$		3	T_0	$^\circ C$	37
$f_{HS,prod}$		0.1	t_{betr}	h/a	8000
$f_{HS,R}$		0.1	$T_{cw,in}$	$^\circ C$	-24
f_{inert}	kg/kg	10	$T_{cw,out}$	$^\circ C$	-7
f_N		3	$T_{PS,out}$	$^\circ C$	47
$f_{Q,K}$		1.25	T_R	$^\circ C$	37
f_{recyc}		10	T_{sub}	$^\circ C$	90
f_{st}	bar	1230	τ_{prod}	h	2.4
$f_{T,kat}$		0.0373	U_{cond}	$\frac{W}{m^2 \cdot k}$	1600
f_{wld}		0.8	U_{evap}	$\frac{W}{m^2 \cdot k}$	1400
$g_{reuteri}$	kU/l	0.8	\dot{V}_{cap}	m^3/a	1200000
H_0		0.14	$x_{dest,A}$	$mol - \%$	0.289
H_{int}	m	2	$x_{sumpf,A}$	$mol - \%$	6.4286E-05

Name	Einheit	Wert	Name	Einheit	Wert
$H_{vap,A}$	J/mol	28784	Y_{deh}		0.95
$H_{vap,W}$	J/mol	40800	y_{NH_3}	kg/MU	29.38
HTU	m	0.5	Y_{trans}		0.95

Auslegung des Transformationsbereichs

Während der Auslegung des Transformationsbereichs wurden die in Tabelle 7.4 beschriebenen Werte berechnet. Die notwendige Menge NaOH, um den pH Wert der Schlempe auf 6,5 anzuheben, ist im Vergleich zum Substratstrom klein.

Tabelle 7.4: Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung des Transformationsbereichs. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.

Name	Einheit	Wert
\dot{X}_{glyc}	$kmol/h$	1.65E+01
\dot{M}_{glyc}	t/h	1.52E+00
τ_{trans}	h	4.07E-01
V_{trans}	m^3	6.11E+01
\dot{X}_{HPA}	$kmol/h$	1.57E+01
\dot{M}_{HPA}	t/h	1.16E+00
$G_{reuteri}$	MU	4.89E+01
$\dot{G}_{reuteri}$	MU/h	1.20E+01
\dot{V}_{sub}	m^3/h	1.50E+02
\dot{M}_{NaOH}	t/h	4.74E-01

Auslegung des Dehydratisierungsbereichs

Während der Auslegung des Dehydratisierungsbereichs wurden die in Tabelle 7.5 beschriebenen Werte berechnet. Aufgrund der langsamen Reaktion durch die geringe 3-HPA Konzentration ist der Dehydratisierungsbereich zehn mal so groß wie der Transformationsbereich.

Tabelle 7.5: Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung des Dehydratisierungsbereichs. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.

Name	Einheit	Wert
f_{kat}		2.68E+00
k_{deh}	1/h	2.08E+00
r_{deh}	mM/h	3.12E+01
τ_{deh}	h	2.87E+00
$V_{x,deh}$	m^3	4.30E+02
V_{kat}	m^3	1.79E+02
V_{deh}	m^3	6.09E+02
\dot{X}_A	kmol/h	1.49E+01
\dot{M}_A	t/h	8.34E-01
M_{kat}	t	2.15E+02

Auslegung des Destillationsbereichs

Während der Auslegung des Destillationsbereichs wurden die in Tabelle 7.6 beschriebenen Werte berechnet. Zehn Trennstufen reichen aus, um das Destillat auf 90 Gew.-% Acrolein aufzukonzentrieren und den Sumpfstrom auf 0,0002 Gew.-% Acrolein abzureichern.

Auslegung der Gesamtdimensionen

Während der Auslegung der Gesamtdimensionen des Reaktors inklusive Kolonnenbereich wurden die in Tabelle 7.7 beschriebenen Werte berechnet. Mit einer Höhe von ca. 21 m (ca. 14 m Reaktionsbereich, ca. 7 m Destillationsbereich) und einem Durchmesser von ca. 8 m hat der Apparat ein Volumen von ca. 1100 m^3 .

Auslegung der Wärmeübertrager

Während der Auslegung der Wärmeübertrager wurden die in Tabelle 7.8 beschriebenen Werte berechnet. Im Reaktionsteil wird ca. siebeneinhalb Mal so viel Energie für die Verdampfung benötigt wie im Destillationsteil.

Tabelle 7.6: Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung des Destillationsbereichs. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.

Name	Einheit	Wert	Name	Einheit	Wert
P_R	<i>bar</i>	6.23E-02	$\dot{X}_{y,R}$	kmol/h	5.90E+03
$T_{sied,A}$	<i>K</i>	2.61E+02	$\dot{M}_{y,R}$	<i>t/h</i>	1.06E+02
$T_{sied,W}$	<i>K</i>	3.10E+02	$\dot{M}_{y,K}$	<i>t/h</i>	9.56E+00
α		1.21E+01	$\rho_{y,K}$	<i>kg/m³</i>	4.35E-02
S		6.33E+03	$v_{y,K}$	<i>m/s</i>	1.44E+01
N_{min}		3.51E+00	$A_{K,\varphi}$	<i>m²</i>	5.14E+01
N		1.05E+01	A_K	<i>m²</i>	5.35E+01
H_K	<i>m</i>	7.26E+00	D_K	<i>m</i>	8.26E+00
P_A	<i>bar</i>	5.82E-01	V_K	<i>m³</i>	3.89E+02
$\rho_{y,R}$	<i>kg/m³</i>	4.35E-02	$x_{F,A}$	<i>mol - %</i>	2.09E-04
$x_{A,R}$	<i>mol - %</i>	2.70E-04	$N_T - N_B$		-3.36E-01
$x_{y,A,R}$	<i>mol - %</i>	2.52E-03	N_F		7.27E+00
P_{dest}	<i>bar</i>	3.07E-02	d_K	<i>mm</i>	4.07E+00
\dot{M}_{dest}	<i>t/h</i>	1.45E+00	V_{pack}	<i>m³</i>	2.82E+02

Tabelle 7.7: Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung der Gesamtdimensionen des Reaktors inklusive Kolonnenbereich. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.

Name	Einheit	Wert
V_R	<i>m³</i>	7.38E+02
D_R	<i>m</i>	8.26E+00
$f_{HD,R}$		1.67E+00
H_R	<i>m</i>	1.38E+01
$P_{stat,R}$	<i>bar</i>	1.35E+00
d_R	<i>mm</i>	5.67E+00
V_{R+K}	<i>m³</i>	1.13E+03

Tabelle 7.8: Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung der Wärmeübertrager. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.

Name	Einheit	Wert
$T_{PS,in}$	$^{\circ}\text{C}$	2.99E+02
q_{PS}	MJ/t	2.89E+03
$c_{p,sub}$	$\frac{\text{J}}{\text{mol}\cdot\text{k}}$	7.58E+01
\dot{Q}_{sub}	MJ/h	3.35E+04
\dot{Q}_R	MJ/h	2.07E+05
$\dot{Q}_{min,K}$	MJ/h	2.17E+04
\dot{Q}_K	MJ/h	2.71E+04
T_{dest}	$^{\circ}\text{C}$	-4.00E+00
$\dot{Q}_{cond,K}$	MJ/h	2.62E+05
$A_{evap,R}$	m^2	5.33E+02
$A_{evap,K}$	m^2	4.00E+01
$A_{cond,K}$	m^2	5.08E+03
$\dot{M}_{PS,R}$	t/h	7.18E+01
$\dot{M}_{PS,K}$	t/h	9.37E+00
$\dot{M}_{cw,K}$	t/h	3.66E+03

Auslegung des Dampfjektors zur Vakuumerzeugung

Während der Auslegung des Dampfjektors zur Vakuumerzeugung wurden die in Tabelle 7.9 beschriebenen Werte berechnet. Es wird 133 Mal so viel Dampf benötigt, wie Inertgas gefördert werden soll.

Tabelle 7.9: Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung des Dampfjektors zur Vakuumerzeugung. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.

Name	Einheit	Wert
e_{jec}	kg/kg	1.33E-02
\dot{M}_{inert}	t/h	3.20E-06
$\dot{M}_{PS,ejec}$	t/h	2.40E-04

Auslegung der Biokatalysatorproduktion

Während der Auslegung des Reaktors zur Biokatalysatorproduktion wurden die in Tabelle 7.10 beschriebenen Werte berechnet. 23 m^3 Wachstumsmedium werden benötigt, um die Biokatalysatormenge herzustellen, die das Glycerin, das sich in 150 m^3 Schlempe befindet, in 3-HPA umwandelt.

7.3.2 Kostenermittlung

Zur Bestimmung der benötigten Equipmentkosten wurden die in Tabelle 7.11 zusammengefassten Preise als Referenz gewählt. Mit diesen Referenzkosten ergeben sich die in Tabelle 7.12 aufgeführten Equipmentkosten. Um die weiteren Kostenpunkte der Investitionskosten zu ermitteln wurden die in Tabelle 7.12 angegebenen Faktoren verwendet. Somit ergeben sich Gesamtinvestitionskosten von ca. 12 Millionen Euro. Hierbei sind die gesamten Investitionskosten durch die Kosten für Baulanderschließung, Betonierung, Baustahl, Gebäude, Rohrleitungen, Elektrik, Instrumentierung, Isolierung, Lackierung, Brandschutz, Bauleitung und Engineering sechs Mal so hoch wie die reinen Equipmentkosten. Zur Bestimmung der Kosten für die benötigten Hilfsstoffe wurden die in Tabelle 7.13 zusammengefassten Preise als Referenz genutzt. Die die daraus ermittelten Hilfsstoffkosten setzen sich gemäß Tabelle 7.14 zusammen. Weitere Betriebskosten wie die Kosten für die Sicherheit, Wartung und

Tabelle 7.10: Berechnete Werte und Ergebnisse der Auslegung der Biokatalysatorproduktion. Die Werte unterhalb des Teilungsstrichs sind relevant für die Bestimmung der Investitionskosten oder Betriebskosten.

Name	Einheit	Wert
$V_{prod,min}$	m^3	5.50E+01
H_{prod}	m	8.85E+00
$P_{stat,prod}$	bar	8.68E-01
D_{prod}	m	2.95E+00
rd_{prod}	m	9.84E-01
n_{prod}	$1/s$	2.48E+00
V_{prod}	m^3	6.06E+01
d_{prod}	mm	1.30E+00
W_{prod}	kW	5.62E+00
\dot{V}_{medium}	m^3/h	2.29E+01
\dot{M}_{gluc}	t/h	4.59E-01
\dot{M}_{NH3}	t/h	3.53E-01

Tabelle 7.11: Referenzkosten zur Ermittlung Investitionskosten für die einzelnen Apparate. Es handelt sich nur um Materialkosten.

Equipment	Größe	Jahr	Preis	Quelle
Behälter Kunststoff	$60m^2$	2009	31.3 kEUR	[Dut09]
Rührwerk AISI 316	$7.36kW$	1995	15 kUSD	[Nav95]
Behälter AISI 304	$100m^2$	2009	101 kEUR	[Dut09]
Ejektor	$9.07kg/h$	1995	8 kUSD	[Nav95]
Wärmetauscher AISI 304	$500m^2$	2009	205 kEUR	[Dut09]
Wärmetauscher AISI 304	$40m^2$	2009	32 kEUR	[Dut09]
Wärmetauscher AISI 304	$1000m^2$	2009	400 kEUR	[Dut09]
Amberlyst 36	$250g$	2012	34.5 EUR	[Sig12c]
Raschig Ringe	$10m^3$	2009	18.5 kEUR	[Dut09]

Tabelle 7.12: Investitionskosten der Produktion von Acrolein aus nachwachsenden Rohstoffen mit dem gewählten Ansatz.

Investitionskosten	Faktor	Kosten [x1000 EUR]
Biokatalysatorproduktion		51
Reaktor inkl. Kolonne		425
Ejektor		2
Verdampfer Reaktor		229
Verdampfer Kolonne		35
Kondensator Kolonne		888
Equipment Gesamt	1.2	1956
Dehydratisierungskatalysator		711
Füllkörper		29
Baulanderschließung	0.06	98
Betonierung	0.3	489
Baustahl	0.35	571
Gebäude	0.1	163
Rohrleitungen	1.6	2608
Elektrik	0.32	522
Instrumentierung	0.45	734
Isolierung	0.1	163
Lackierung	0.04	65
Brandschutz	0.1	163
Bauleitung	0.45	734
Engineering	0.93	1516
Gesamtkosten		12150

Tabelle 7.13: Referenzkosten zur Ermittlung der Hilfsstoffkosten für die Berechnung der Betriebskosten.

Stoff	Einheit	Jahr	Preis	Quelle
Strom	kWh	1990	0.05 USD	[HE93]
Schlempe	t		0 EUR	Kap. 1
Glukose	t	2012	40 USD	[Ali12]
Ammoniak	t	2012	170 USD	[Ali12]
NaOH	t	2012	400 USD	[Ali12]
Prozessdampf (100 bar)	t	2009	30 EUR	[Dut09]
Kühlwasser	t	1990	0.05 USD	[HE93]
Arbeiter	h	1990	35 USD	[HE93]

Versicherung wurden über die in Tabelle 7.14 angegebenen Faktoren bestimmt. Die meisten Betriebskosten fallen für den Heißdampf an, in großem Abstand gefolgt von den Kosten für Kühlmedium, Personalkosten und den Kosten für NaOH zur Anhebung des pH Wertes der zugefütterten Schlempe. Somit ergeben sich für die Produktion von Acrolein aus nachwachsenden Rohstoffen mit dieser rigorosen Abschätzung spezifische Produktionskosten von 2,45 EUR/kg, die sich aus 0,12 EUR/kg spezifischen Investitionskosten (ic) und 2,33 EUR/kg spezifischen Betriebskosten (bc) zusammensetzen.

7.3.3 Sensitivitätsanalyse

Die mit der Sensitivitätsanalyse ermittelten Verstärkungen (Ω) sind für die Variablen, bei denen Verstärkungen über 0,1 % erreicht wurden, in Tabelle 7.15 zusammengefasst. Den größten Einfluss auf die Gesamtkosten haben eine Veränderung der Reaktortemperatur, der Acroleinkonzentration im Reaktor und der Acroleinkonzentration im Destillat. Die Verstärkungen, welche durch die Variation der Equipmentkosten oder Hilfsstoffkosten erzielt wurden, sind in Tabelle 7.16 dargestellt. Hier hat nur die Veränderung der Prozessdampfkosten einen deutlichen Einfluss auf die Gesamtkosten.

Tabelle 7.14: Betriebskosten der Produktion von Acrolein aus nachwachsenden Rohstoffen mit dem gewählten Ansatz.

Direkte Kosten (DC)	Einheit	Wert	Kosten [EUR/t]
Rührerleistung W_{prod}	kW	5.62	0.26
Wachstumsmedium \dot{V}_{medium}	m^3/h	22.94	0.00
Glukose \dot{M}_{gluc}	t/h	0.46	10.37
Ammoniakwasser 25% \dot{M}_{NH_3}	t/h	0.35	33.88
Substrat \dot{V}_{sub}	m^3/h	150	0.00
NaOH \dot{M}_{NaOH}	t/h	0.47	107.19
Heizdampf Reaktor $\dot{M}_{PS,R}$	t/h	71.76	1606.18
Heizdampf Kolonne $\dot{M}_{PS,K}$	t/h	9.37	209.84
Heizdampf Ejektor $\dot{M}_{PS,ejec}$	t/h	2.40E-04	0.01
Kühlwasser $\dot{M}_{cw,K}$	t/h	3655.68	169.06
Personalkosten			121.85
Wartung		$0.05 \cdot IC/h$	0.04
Indirekte Kosten			
Sicherheit		$0.03 \cdot DC$	67.76
Versicherung		$0.0075 \cdot IC/h$	0.01
Gesamt			2326.45

Tabelle 7.15: Sensitivitätsanalyse. Ermittelte Verstärkungen (Ω) für die Variation aus-
gesuchter Variablen, bei denen eine Verstärkung $> 0,1$ auftritt.

Variable	Ω_{ic} [%]	Ω_{bc} [%]	Ω_{gc} [%]	Variable	Ω_{ic} [%]	Ω_{bc} [%]	Ω_{gc} [%]
$C_{A,R}$	-40.7	-113.6	-110.0	η_{prod}	1.4	0.0	0.1
C_{gluc}	0.0	0.5	0.4	p_{prod}	-1.0	-0.5	-0.5
$C_{HPA,R}$	-18.1	0.0	-0.9	$r_{reuteri}$	-0.9	0.0	0.0
C_{NaOH}	0.0	4.7	4.5	Re	1.4	0.0	0.1
$c_{P,cw}$	0.0	-8.3	-7.9	t_{betr}	-54.0	4.2	1.3
C_{sub}	-51.7	0.8	-1.8	$T_{cw,in}$	7.1	4.2	4.3
F	-5.3	0.0	-0.3	$T_{cw,out}$	16.6	-3.2	-2.2
f_{Dd}	0.2	0.0	0.0	$T_{PS,out}$	-9.9	5.5	4.7
$f_{HD,prod}$	0.2	0.0	0.0	T_R	-233.5	68.7	53.6
$f_{HS,R}$	0.8	0.0	0.0	T_{sub}	-1.6	-19.7	-18.8
f_N	3.5	0.0	0.2	τ_{prod}	0.0	-0.5	-0.5
$f_{Q,K}$	0.9	9.3	8.9	U_{cond}	-24.3	0.0	-1.2
f_{recyc}	-1.0	-2.2	-2.1	U_{evap}	-7.2	0.0	-0.4
$f_{T,kat}$	-51.2	0.0	-2.6	\dot{V}_{cap}	-54.5	-4.5	-7.0
$g_{reuteri}$	1.0	2.0	1.9	$x_{dest,A}$	104.1	63.7	65.8
H_0	4.5	0.0	0.2	$x_{sumpf,A}$	2.2	2.6	2.5
H_{int}	1.3	0.0	0.1	Y_{deh}	-71.3	0.8	-2.8
HTU	3.5	0.0	0.2	y_{NH3}	0.0	1.5	1.4
m_{kat}	8.3	0.0	0.4	Y_{trans}	-52.7	0.8	-1.9
MM_{cw}	0.0	7.5	7.1				

Tabelle 7.16: Sensitivitätsanalyse. Ermittelte Verstärkungen (Ω) für die Variation der Equipmentkosten und Hilfsstoffkosten.

CC	Ω_{ic} [%]	Ω_{bc} [%]	Ω_{gc} [%]
Behälter Polyester	2.0	0.0	0.1
Rührwerk	1.0	0.0	0.0
Behälter für Kolonne und Reaktor AISI 304	24.5	0.0	1.2
Katalysator	5.9	0.0	0.3
Füllkörper Pall Ring 2 inch AISI 304	0.2	0.0	0.0
Dampf Ejektor 2-stufig	0.1	0.0	0.0
Wärmetauscher	66.3	0.0	3.3
Strom	0.0	0.0	0.0
Glukose	0.0	0.5	0.4
Ammoniak	0.0	1.5	1.4
NaOH	0.0	4.7	4.5
Prozessdampf (100 bar)	0.0	80.4	76.4
Kühlwasser	0.0	7.5	7.1
Arbeiter	0.0	5.4	5.1

7.4 Diskussion

7.4.1 Auslegung

Die Aufgabe der Berechnungen war eine rigorose Auslegung einer potentiellen Anlage, welche die Erkenntnisse aus dieser Arbeit nutzt. Hierbei wurden zur Vereinfachung und Beschreibbarkeit des Problems einige Annahmen getroffen. Die Annahme, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Umwandlung von Glycerin zu 3-HPA unabhängig von der Glycerinkonzentration ist scheint belastbar, da Doleyres et al., Rütli et al. und Krauter et al. bei verschiedenen Glycerinkonzentrationen vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeiten beobachtet haben ([DBVL05], [Rüt10], [KWV12]). Die Unabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur erscheint eigentlich unwahrscheinlich, jedoch haben Doleyres et al. (23,2 $\frac{g}{l \cdot h}$ bei 30 °C), Rütli et al. (18,3 $\frac{g}{l \cdot h}$ bei 30 °C) und Krauter et al. (21,6 $\frac{g}{l \cdot h}$ bei 45 °C) bei verschiedenen Temperaturen vergleichbare Ergebnisse erzielt. Im Temperaturbereich von 30°C bis 45°C scheint die Annahme einer Unabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur legitim. Das Volumen der Katalysatorträger wurde vernachlässigt, da hier keine ausreichenden Informationen vorlagen. Die Menge des benötigten Natriumhydroxids (NaOH), um den pH Wert der Schlempe von 4,3 auf 6,5 anzuheben, wurde in Versuchen im 40 ml Maßstab durchgeführt und ist in Falle des Scale-up dementsprechend fehlerbehaftet. Jedoch ist die benötigte Menge NaOH um den Faktor 300 kleiner als die Menge der Schlempe, weshalb ein Fehler nur begrenzte Auswirkungen auf die Produktkosten hat. Dies wird auch von der Sensitivitätsanalyse bestätigt (siehe Tabelle 7.15).

Es wurde angenommen, dass für den Feststoffkatalysator Amberlyst 36 ($H_0 = 0,14$) ein exponentieller Zusammenhang zwischen der Hammett Acidität des Katalysators und der Reaktionsgeschwindigkeit besteht, wie ihn Hall et al. für Phosphorsäure bei Hammett Aciditäten $H_0 > 0$ gefunden haben ([HS50]). Die Konstanten dieser Beziehung wurden mit den Messwerten aus den Versuchen mit Amberlyst 36 angepasst. Jedoch hatten Hall et al. auch Messwerte erhalten, die darauf hindeuten könnten, dass bei noch niedrigeren Hammett Aciditäten die Konstanten nicht mehr unabhängig von diesen sind. Eventuelle Ungenauigkeiten in der Beziehung zwischen Hammett Acidität und Reaktionsgeschwindigkeit wirken sich jedoch nicht auf die berechneten Kosten aus, da

hier die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Referenzacidität berechnet wurde. Die Sensitivitätsanalyse könnte jedoch fehlerbehaftete Werte für eine Variation der Hammett Acidität des Katalysators liefern.

Auch die exponentielle Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur wurde gemäß Hall et al. gestaltet ([HS50]). Diese hat ebenfalls keinen Einfluss auf die berechneten Kosten, da die Berechnung bei der Referenztemperatur von 37°C durchgeführt wurde. Die Sensitivitätsanalyse könnte jedoch wieder fehlerbehaftete Werte für eine Variation der Temperatur liefern. Es wurde angenommen, dass der Dampf, welcher aus dem Reaktor aufsteigt, nur Wasser und Acrolein enthält. Diese Annahme beruht darauf, dass weitere Substanzen im Medium wie Glycerin oder Laktat einen deutlich höheren Siedepunkt als Wasser haben und/oder nur sehr verdünnt im Reaktionsmedium vorliegen. Weiterhin wurde auf die Verwendung von Aktivitätskoeffizienten verzichtet und stattdessen mit der reaktiven Flüchtigkeit gerechnet, um die Komplexität des Modells nicht noch zu vergrößern. Nichtideales Verhalten wird somit vernachlässigt, jedoch konnten Skogestad et al. zeigen, dass mit entsprechenden Sicherheitsfaktoren realistische Dimensionen erhalten werden ([WACP07]).

Weiterhin wurde angenommen, dass der Dampf, welcher aus dem Reaktionsbereich aufsteigt, sowie der Dampf und die Flüssigkeit in der Kolonne die Dichte und die Molmasse von Wasser haben. Darüber hinaus wurde angenommen, dass sich der Dampf wie ein ideales Gas verhält. Dies mag für den Dampf aus dem Reaktionsteil und den Dampf beziehungsweise die Flüssigkeit im Abtriebsteil der Kolonne gültig sein, da diese nahezu nur aus Wasser bestehen, jedoch werden sich die Eigenschaften der Gemische mit zunehmender Acroleinkonzentration verändern. Dies sollte bei einer detaillierten Auslegung der Anlage berücksichtigt werden. Als Destillatkonzentration wurden 90 Gew.-% Acrolein angenommen. Jedoch werden Folgereaktionen in stark wässriger Lösung durchgeführt. So wird zur Produktion von 1,3-Propandiol eine wässrige Lösung mit nur 16 Gew.-% Acrolein verwendet ([BA00]). Wenn die Acroleinkonzentration im Produkt der in diesem Projekt ausgelegten Anlage gesenkt wird, verringern sich die Produktionskosten des Produkts deutlich (siehe Tabelle 7.15). So könnten die Produktionskosten deutlich reduziert werden, da die Reinheit des Produkts auch bei solch geringen Acroleinkonzentrationen

noch sichergestellt werden kann wie in den Destillationsversuchen gezeigt wurde (siehe Abbildung 6.17). Die Kolonnendimensionen und Produktionskosten hängen stark von der zu destillierenden Dampfmenge ab. Diese resultiert direkt aus der angenommenen Acroleinkonzentration im Reaktionsmedium. Je geringer die Acroleinkonzentration ist, umso mehr Medium muss verdampft werden, um das Acrolein zu entfernen (siehe Tabelle 7.15). Für *L. reuteri* liegt die minimale inhibierende 3-HPA Konzentration bei 30 bis 50 mM und die minimale bakteriozide Konzentration bei 60 bis 120 mM. Für Acrolein sind keine Werte bekannt ([CLV⁺07]).

Die Wärmeübergangskoeffizienten sind von vielen Faktoren abhängig und wurden nur grob abgeschätzt. Jedoch wirken sich veränderte Wärmeübergangskoeffizienten kaum auf die Produktkosten aus (siehe Tabelle 7.15). Die Stoffdaten des Kühlmediums wurden mit denen von Wasser abgeschätzt. Andere Stoffdaten würden aber auch nur mit einer Verstärkung von weniger als $\pm 10\%$ in die Gesamtproduktkosten eingehen (siehe Tabelle 7.15).

Es wurde für die Auslegung des Vakuums ein zweistufiger Dampfejektor gewählt, welcher Absolutdrücke im einstelligen mbar Bereich erreichen kann und für die hier geforderten Drücke absolut ausreichend ist ([BH73]). Bei der Bestimmung des zu fördernden Inertstroms wurde auf Vorgaben zur Dichtigkeit von Anlagen zurückgegriffen ([Web06]). Unter der Annahme, dass sich das in den Reaktor eintretende Gas wie ein ideales Gas verhält, wurde der Leckagestrom für den Behälter berechnet. Es wurde zusätzlich ein Sicherheitsfaktor von 10 gewählt. In der Regel werden an die Dichtigkeit von Vakuumanlagen noch höhere Ansprüche gestellt. Die Größe des Inertgasstroms wirkt sich jedoch kaum auf die Produktkosten aus (Alle Verstärkungen $< 0,1\%$, deshalb nicht in Tabelle 7.15 dargestellt).

Die fraglichsten Punkte bei der Biokatalysatorproduktion sind, ob die angenommene Produktivität unter unsterilen Bedingungen dauerhaft gehalten werden kann und wie oft sich der Biokatalysator wiederverwenden lässt. Die Sensitivitätsanalyse zeigt jedoch, dass beide Werte nur einen marginalen Einfluss auf die Gesamtproduktkosten haben. Dies ist nur deshalb der Fall, da angenommen wird, dass faktisch kostenlose Schlempe (aufgrund der Weiterverwendung) alle Mediumkomponenten außer der Kohlenstoffquelle ersetzen kann. Würde das Wachstumsmedium stattdessen 100 EUR/t kosten, würden

sich die Gesamtproduktkosten um 67% erhöhen. Der Bedarf an Ammoniakwasser zur Titration während des Wachstums wurde in diesem Projekt nur bei Versuchen in 1,25 l Medium abgeschätzt, wodurch sich Fehler beim scale-up auf die sehr viel größeren Dimensionen verstärken können. Jedoch zeigt sich, dass ein veränderter Bedarf an Ammoniakwasser nur einen marginalen Einfluss auf die Gesamtproduktkosten hat (siehe Tabelle 7.15).

7.4.2 Kostenermittlung

Aufgabe der Kostenermittlung war es, für einen potentiellen Prozess, der die Erkenntnisse aus dieser Arbeit nutzt, die Produktkosten abzuschätzen. Mit Hilfe der Exponentenmethode wurden basierend auf Referenzpreisen (siehe Tabelle 7.11) die Materialkosten für das Equipment in der benötigten Größe berechnet. Diese Methode ist relativ ungenau, wenn die Größe des Referenzequipments und die Größe des geplanten Equipments weit auseinander liegen ($\pm 50\%$, [HE93]). Die Genauigkeit kann dadurch erhöht werden, dass ein Referenzequipment gewählt wird, welches von der Größe relativ nah an der geplanten Größe liegt. Dies war für alle Equipments außer für den Behälter zur Unterbringung der Reaktionsbereiche und des Destillationsbereichs möglich (100 m^3 Referenz für 1126 m^3 geplant). Auch equipmentspezifische Exponenten, wie sie hier verwendet wurden, können die Genauigkeit der Kostenschätzung erhöhen (siehe Tabelle 7.1). Die Preisentwicklung in den letzten Jahren wurde über den jahresmittleren Chemical Engineering Plant Cost Index (CEPCI) berücksichtigt. Hierbei wurde als aktueller Index der jahresmittlere Index von 2011 verwendet. Die bisherigen Preissteigerungen in den Jahren 2012 und 2013 wurden somit vernachlässigt. Eine höhere Genauigkeit der Kostenschätzung hätte durch die Verwendung von equipmentspezifischen Indizes erreicht werden können, worauf aber aufgrund des mangelnden Zugriffs auf diese Indizes verzichtet werden musste. Die restlichen Investitionskosten, welche bei dem Bau einer Anlage entstehen, wurden über sogenannte Lang Faktoren abgeschätzt. Auch diese Methode ist relativ ungenau ($\pm 50\%$, [HE93]) und musste aufgrund des Anfangsstadiums der Anlagenplanung und dem daraus resultierenden Mangel an Detailinformationen verwendet werden. Die Genauigkeit der Kostenschätzung könnte noch etwas erhöht werden, wenn equipmentspezifische Faktoren verwendet würden. Da die über Faktoren abgeschätzten Kosten fünf

Mal so hoch sind wie die Materialkosten des Equipments, sollte nicht davon ausgegangen werden, dass bei der in diesem Projekt durchgeführten Kostenschätzung der Investitionskosten Genauigkeiten über $\pm 50\%$ erreicht wurden.

Auch die Betriebskosten wurden mit der gleichen Vorgehensweise abgeschätzt, wodurch die Genauigkeit der Schätzung der Betriebskosten im selben Bereich liegen wird. Die Kostenschätzung kann also nur einen ersten Einblick liefern, in welcher Größenordnung sich die Produktionskosten befinden könnten. Die ermittelten Kosten des Produkts von 2,42 EUR/kg $\pm 50\%$ liegen in einer Größenordnung, welche zeigt dass der angedachte Prozess bei entsprechender Optimierung in naher Zukunft zu den Produktionskosten aus Rohölderivaten aufschließen kann (ca. 2 USD/kg, [Ali12]).

7.4.3 Sensitivitätsanalyse

Die Aufgabe der Sensitivitätsanalyse war es zu ermitteln, welche Faktoren den größten Einfluss auf die Kosten haben, um eine zukünftige Optimierung zu unterstützen. Vier Variablen wirken mit einer betragsmäßigen Verstärkung von mehr als 10% auf die Gesamtproduktkosten: die Acroleinkonzentration im Reaktionsbereich, die Temperatur im Reaktionsbereich, die Temperatur des Substrates und die Acroleinkonzentration im Produkt (siehe Tabelle 7.15).

Die Acroleinkonzentration im Reaktor hat einen so starken Einfluss auf die Gesamtkosten, da sie unmittelbar bestimmt, wie viel Medium verdampft werden muss, um das Acrolein aus dem Reaktionsbereich zu entfernen. Wenn im Reaktionsbereich aufgrund geringerer Acroleinkonzentration mehr verdampft werden muss, müssten vor allem der Destillationsbereich und die Wärmeübertrager vergrößert werden. Außerdem wäre mehr Heizdampf und Kühlwasser nötig, wodurch die Kosten gesteigert würden. Die Acroleinresistenz des Biokatalysators sollte also möglichst ausgereizt werden und es sollte ein möglichst resistenter Ganzzellbiokatalysator verwendet werden. Alternativ könnte die Verwendung eines Aldehydfängers wie Carbohydrazid eine höhere Acroleinkonzentration nach saurer Spaltung und Dehydratisierung im Dehydratisierungsbereich bei gleichzeitig geringer Aldehydkonzentration im Transformationsbereich ermöglichen. Jedoch müsste hierfür ein wirtschaftlicher Ansatz des Carbohydrazidrecyclings gefunden werden, um eine Kontamination des Mediums (Schlempe die weiterverwendet werden soll) zu vermeiden und nicht zusätzliche Kosten

für die kontinuierliche Zugabe neuen Aldehydfängers zu generieren.

Eine höhere Temperatur im Reaktionsbereich sorgt dafür, dass mehr Wasser im Reaktionsbereich verdampft und damit für eine niedrigere Acroleinkonzentration im Dampf, der aus dem Reaktionsbereich aufsteigt, was einen größeren Dampfstrom zur Entfernung des Acroleins nötig macht. Dadurch entstehen höhere Investitionskosten für die Wärmetauscher und den Destillationsbereich. Jedoch steigt bei einer höheren Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeit der Dehydratisierung deutlich, was zu geringeren Investitionskosten für den Dehydratisierungsbereich und den Dehydratisierungskatalysator führt. Damit werden die Mehrkosten für die Wärmetauscher und den Destillationsbereich mehr als kompensiert. Die Betriebskosten hingegen werden maßgeblich von dem Heizdampfbedarf bestimmt, der aufgrund des größeren notwendigen Dampfstroms zunimmt und die Betriebskosten deutlich erhöht. Eine niedrige Temperatur im Reaktionsbereich ist aber nur ratsam, wenn sich die Anlagendimensionen in Grenzen halten und sich das Destillat noch wirtschaftlich kondensieren lässt.

Das Substrat dagegen sollte so heiß wie möglich verarbeitet werden, da es die zusätzlich notwendige Wärmemenge zur Verdampfung im Reaktionsbereich reduziert. Die Nutzung eines Substrates (Schlempe) mit mehr als 99°C scheint jedoch unrealistisch, selbst wenn es direkt aus der Ethanoldestillation kommt. Eine Erhöhung der Substrattemperatur auf 99°C würde nur eine Reduktion der Gesamtproduktkosten um 2% bedeuten.

Eine niedrigere Acroleinkonzentration im Destillat führt zu niedrigeren Kosten des Produkts. Dies liegt vor allem daran, dass weniger Trennstufen benötigt werden, um die geforderte Acroleinkonzentration zu erreichen und die Produktmenge zunimmt, wodurch die spezifischen Kosten fallen. Folgereaktionen werden in der Regel in stark wässriger Lösung durchgeführt. So wird zur Produktion von 1,3-Propandiol eine wässrige Lösung mit nur 16 Gew.-% Acrolein verwendet ([BA00]). Die Acroleinkonzentration im Destillat sollte also nicht höher als nötig sein. Eine niedrigere Acroleinkonzentration im Destillat führt auch zu einer höheren Temperatur, bei der das Destillat kondensiert werden kann, wodurch die Kondensation vereinfacht wird.

Bei der Sensitivitätsanalyse der Equipment- und Hilfsstoffkosten stechen nur die Kosten für den Heizdampf heraus. Diese machen einen Großteil der Be-

triebkosten aus und beeinflussen somit die Gesamtproduktkosten stark (siehe Tabelle 7.14). Es sollte versucht werden, den Heizdampf am Standort so günstig wie möglich zur Verfügung zu stellen.

Darüber hinaus wurden die Kosten für das Kühlmittel des Kondensators mit denen von Kühlwasser abgeschätzt. Die tatsächlichen Kosten für die Bereitstellung eines Kühlmittels bei -24°C sollten deutlich höher sein und hätten somit auch einen großen Einfluss auf die Produktgesamtkosten. Wenn keine vertretbaren Kühlmittelkosten erreichbar sind, sollte auf ein anderes Anlagenkonzept ausgewichen werden, bei dem der weniger acroleinhaltige Dampf direkt nach dem Reaktionsbereich mit normalem Kühlwasser kondensiert wird. Anschließend könnte dieses Produkt bei höherem Druck (ca. 300 mbar) destilliert werden, was eine Wärmeintegration des Kolonnenkondensators mit dem Verdampfer des Reaktionsbereichs ermöglichen und somit die Verwendung von sehr kalten Kühlmitteln verhindern würde. Alternativ sollten andere Ansätze zur Abtrennung des Acroleins, welche seine leichte Flüchtigkeit ausnutzen, überprüft werden. Hierzu könnten das Gas-Stripping oder die Pervaporation gehören.

Kapitel 8

Abschließende Zusammenfassung und Ausblick

Bei den Untersuchungen zur Ganzzellbiokatalysatorproduktion für die Transformation von Glycerin zu 3-HPA konnte erstmals gezeigt werden, dass sich das Wachstum von *L. reuteri* ATCC 53608 durch Zugabe von Schlempe aus der Bioethanolherstellung steigern lässt. Dieser Effekt lässt sich auf das in der Schlempe enthaltene Glycerin zurückführen. Eine Beschränkung des MRS Mediums auf Hefeextrakt anstelle von Hefeextrakt, Fleischextrakt und Pepton war bei vergleichbarer Katalysatorausbeute möglich. Jedoch war es nicht möglich, den Hefeextraktbedarf von *L. reuteri* ATCC 53608 durch Zugabe von 50 ml/l Hefezellen enthaltenen Sirup zu befriedigen. Um die Biokatalysatorkonzentration kostengünstig zu gestalten, sollte sich die weitere Forschung auf den Einsatz höherer Hefezellkonzentrationen, welche zum Beispiel durch Zentrifugation von Schlempe erhalten werden können, ausrichten. Darüber hinaus scheinen die Fähigkeiten von *L. reuteri* ATCC 53608 Hefezellen zu lysieren beschränkt. Die Arbeit mit anderen *L. reuteri* Stämmen, welche an mit Schlempe vergleichbare Medien gewöhnt sind und deshalb bessere proteolytische Fähigkeiten besitzen, erscheint auch lohnenswert. Diese Organismen wie *L. reuteri* CRL 1098 oder *Lactobacillus* 208-A wurden bisher noch nicht ausreichend auf ihre Fähigkeit 3-HPA zu produzieren und ihre 3-HPA Resistenz hin untersucht ([RFV01], [SS60]).

Des Weiteren wurde erstmals die unsterile und unbegaste Biokatalysatorproduktion gezeigt, welche sich positiv auf die Betriebskosten und Investitions-

kosten für die Biokatalysatorproduktion auswirkt. Die höchste Produktivität der Biokatalysatorproduktion wurde unsteril und unbegast mit einer Ammoniaktitration bei kontinuierlichem Betrieb erreicht. Hier wäre es sinnvoll, bei weiteren Forschungen den dauerhaften Betrieb zu etablieren.

In dieser Arbeit wurde erstmals die gezielte Biotransformation von Glycerin zu 3-HPA in Sirup und DDGS aus der Bioethanolherstellung mit *L. reuteri* ATCC 53608 durchgeführt und untersucht. Unter den gewählten Bedingungen wird im DDGS-haltigen Medium im Vergleich zu der Biotransformation im reinstglycerinhaltigen Medium eine 68% höhere 3-HPA Konzentration erreicht. Eine noch weiter zu untersuchende Ursache dafür könnte die Nutzung von Pentosen zur Glycolyse sein, ohne Reduktionsequivalente zu bilden.

Außerdem wurde die erreichte 3-HPA Konzentration bei verschiedenen Bedingungen untersucht. Hierbei wurde gefunden, dass im siruphaltigen Medium deutlich weniger Biokatalysator nötig ist, um die gleiche 3-HPA Konzentration zu erreichen. Bei niedrigen pH Werten wird die Biotransformation in Sirup oder DDGS haltigem Medium stark inhibiert. Weitere Forschung sollte die genauen Ursachen der Inhibierung klären.

Die Aufreinigung ist einer der Schüsselfaktoren für einen wirtschaftlichen Prozess. Die untersuchten Alternativverfahren zur Reaktivdestillation oder zum Reaktivstripping haben sich allesamt als nicht effektiv erwiesen. Es wurde erstmals die Kinetik der Dehydratisierung von 3-HPA zu Acrolein bei hohen Säurekonzentrationen und geringen Aldehydkonzentrationen untersucht. Mit Amberlyst 36 wurde ein Feststoffkatalysator gefunden, der in der Lage ist die Dehydratisierung unter den gewünschten Bedingungen zu katalysieren. Weitere Forschung ist nötig, um die optimalen Bedingungen für die Dehydratisierung mit Amberlyst 36 zu finden. Auch die Suche nach effektiveren Katalysatoren kann die Investitionskosten für den Dehydratisierungsbereich weiter reduzieren. Mit Hilfe der Reaktivdestillation konnten erstmals Acroleinkonzentrationen über 100 g/l erreicht werden, ohne Aldehydfänger oder Gefriertrocknung zu verwenden. Auch das Strippen des *in-situ* produzierten Acroleins lieferte vielversprechende Ergebnisse. Jedoch müssen noch die Probleme hinsichtlich der Rückgewinnung des Acroleins aus dem Gasstrom gelöst werden.

Abschließend konnten mit Hilfe einer rigorosen Auslegung sowie einer Kombination aus Faktorenmethode und Indexmethode die Produktkosten einer po-

tentiellen Anlage zur Produktion von Acrolein aus Schlempe aus der Bioethanolproduktion abgeschätzt werden. Diese lagen in einer Größenordnung von 2,45 EUR, welche - bei entsprechender Prozessoptimierung - eine zur Produktion aus Erdölderivaten konkurrenzfähige Produktion von Acrolein in naher Zukunft erwarten lassen kann. Die aufgestellte Auslegungsmethode ist außerdem dazu geeignet die Kosten alternativer Prozesse abzuschätzen. Im Laufe der weiteren Forschung sollte der hier durchgerechnete Prozess optimiert und mit anderen Varianten wie der Produktion ohne Biokatalysatorrecycling (wodurch höhere 3-HPA Konzentrationen und Acroleinkonzentrationen möglich sind) oder der Produktion mit Aldehydfängern verglichen werden. Die Sensitivitätsanalyse hat gezeigt, dass die Acroleinkonzentration den größten Einfluss auf die Produktkosten hat. Deshalb sollte neben der Optimierung des Produktionsprozesses und den anderen genannten Forschungsfeldern die Untersuchung der Acroleinresistenz von *L. reuteri* beziehungsweise die Untersuchung des Einflusses von Phosphaten und Sulfaten auf die Transformation und die Dehydratisierung hohe Forschungspriorität haben.

Die Nutzung des Ansatzes aus dem mit Lactobacillen kontaminierten Bioethanolprozess zur Produktion von Acrolein aus nachwachsenden Rohstoffen wurde intensiv untersucht und liefert neue Denkanstöße für die weitere Forschung an einem Prozess zur Produktion einer Plattformchemikalie für acroleinbasierte Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen im industriellen Maßstab. Zusätzlich konnte das Wissen über die Vorgänge während des kontaminierten Ethanolprozesses und deren Einflussfaktoren erhöht werden, was helfen kann diesen sicherer und stabiler zu machen.

Literaturverzeichnis

- [ABG07] ABG INC. ; U.S. SOYBEAN EXPORT COUNCIL INC. (Hrsg.): *Glycerin Market Analysis*. 2007
- [ABR60] ABELES, R. H. ; BROWNSTEIN, A. M. ; RANGLES, C. H.: β -hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by aerobacter aerogenes. In: *Biochimica et biophysica acta* 41 (1960), S. 530–531
- [Acc10] *Chemical Engineering*. Bd. 117. 1. Access Intelligence Inc., 2010
- [Acc12] *Chemical Engineering*. Bd. 119. 1. Access Intelligence Inc., 2012
- [ACDL89] AXELSSON, L. T. ; CHUNG, T. C. ; DOBROGOSZ, W. J. ; LINDGREN, S. E.: Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*: Microbial Ecology in Health and Disease. In: *Microb Ecol Health Dis* 2 (1989), Nr. 2, S. 131–136
- [AFH+00] ARNTZ, Dietrich ; FISCHER, Achim ; HÖPP, Mathias ; JACOBI, Sylvia ; SAUER, Jörg ; OHARA, Takashi ; SATO, Takahisa ; SHIMIZU, Noboru ; SCHWIND, Helmut: Acrolein and Methacrolein. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000
- [AHM65] ANNAN, W. D. ; HIRST, Edmund ; MANNERS, D. J.: 34. The constitution of laminarin. Part IV. The minor component sugars. In: *J. Chem. Soc* (1965), S. 220–226

- [AHMW91] ARNTZ, D. ; HAAS, Th ; MÜLLER, A. ; WIEGAND, N.: Kinetische Untersuchung zur Hydratisierung von Acrolein. In: *Chemie Ingenieur Technik* 63 (1991), Nr. 7, S. 733–735
- [AKP+05] ALLEN, Dale K. ; KNIFTON, Frederick J. ; POWELL, Broun J. ; SLAUGH, Henry L. ; JAMES, Tallmadge G. ; WEIDER, Richard P. ; WILLIAMS, Scott T.: *Einstufiges Verfahren zur Herstellung von 1,3-diol*. 2005 (DE000060103263T2)
- [Ali12] ALIBABA.COM HONG KONG LIMITED:
<http://www.alibaba.com>. 23.07.2012
- [AM66] ARNETT, Edward M. ; MACH, George W.: Solvent Effects in Organic Chemistry. VIII. Acidity Function Failure in Different Aqueous Acids: Journal of the American Chemical Society. In: *J. Am. Chem. Soc* 88 (1966), Nr. 6, S. 1177–1183
- [Ann07] ANNARATONE, Donatello: *Pressure vessel design*. Berlin and London : Springer, 2007
- [APL08] ATKINS, Peter W. ; PAULA, Julio d. ; LUDWIG, Ralf: *Kurzlehrbuch physikalische Chemie*. 4. Weinheim : Wiley-VCH, 2008 (Bachelor)
- [AS94] ARHANCET, Juan P. ; SLAUGH, Lynn H.: *Process for making 1,3-propanediol and 3-hydroxypropanal*. 1994 (US000005304691A)
- [AW93] ARNTZ, Dietrich ; WIEGAND, Norbert: *Method for the production of 1,3-propanediol*. 1993 (EP000000412337B1)
- [BA64] BRIDGEMAN, O. C. ; ALDRICH, E. W.: Vapor Pressure Tables for Water. In: *Journal of Heat Transfer* 86 (1964), Nr. 2, S. 279–286
- [BA00] BROSSMER, Christoph ; ARNTZ, Dietrich: *Process for the production of 1,3-propanediol*. 2000 (US000006140543A)
- [BAS09] BASF SE ; BASF SE COMMUNICATION PLASTICS (Hrsg.): *Competence in Plastics*. 2009

- [BB09] BECKER, H. G. O. ; BECKERT, R.: *Organikum: Organisch-chemisches Grundpraktikum*. 23. Weinheim : Wiley-VCH, 2009
- [Ber09] BERGH, Gustaf F.: Über die Darstellung des Acroleins. In: *Journal für Praktische Chemie* 79 (1909), Nr. 1, S. 351–357
- [Bes00] BESSON, M.: Selective oxidation of alcohols and aldehydes on metal catalysts. In: *Catalysis today* (2000), S. Vol. 57, No. 1–2 (2000),127–141
- [BH73] BACKHURST, J. R. ; HARKER, J. H.: *Process plant design*. London : Heinemann Educational, 1973
- [BHM+54] BAYER, Otto ; HOUBEN, Josef ; MÜLLER, Eugen ; WEYL, Theodor ; KROPF, Heinz ; BÜCHEL, Karl H.: *Methoden der organischen Chemie / (Houben-Weyl)*. Hrsg. von Eugen Müller Bd. Bd. 7,1: *Sauerstoffverbindungen 2 ; Teil 1, Aldehyde*. 4., völlig neu gestaltete Aufl. Stuttgart : Thieme, 1954
- [Bio09] BIOGAIA AB: <http://www.biogaia.com/>. 25.06.2009
- [BMCD04] BUSTOS, Guadalupe ; MOLDES, Ana B. ; CRUZ, José M. ; DOMIÂNGUEZ, José M.: Formulation of Low-Cost Fermentative Media for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus* Using Vinification Lees as Nutrients. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004), Nr. 4, S. 801–808
- [BMM+03] BUB, Günther ; MOSLER, Jürgen ; MASCHMEYER, Dietrich ; SABBAGH, Andreas ; FORNIKA, Roland ; PEUCKERT, Matthias: *Process for the production of acrylic acid*. 2003 (WO002003051809A1)
- [BMS+06] BUB, Günther ; MOSLER, Jürgen ; SABBAGH, Andreas ; KUPPINGER, Franz-Felix ; STOCHNOIL, Guido ; SAUER, Jörg ; LEISTNER, Jörg ; LATOSCHINSKI, Günter ; SCHWAETZKE, Thorsten: *Herstellung von Acrolein, Acrylsäure und wasserabsorbierenden Polymergebilden aus Glycerin*. 2006 (WO002006136336A2)

- [Bra82] BRAUN, Rudolf: *Biogas - Methangärung organischer Abfallstoffe: Grundlagen und Anwendungsbeispiele*. Wien : Springer-Verlag, 1982
- [Bri53] BRIGGS, Mary: 497. An improved medium for lactobacilli. In: *Journal of Dairy Research* 20 (1953), Nr. 01, S. 36–40
- [BSNL06] BALDUF, Torsten ; SABBAGH, Andreas ; NEHRKORN, Thomas ; LUCAS, Manfred: *Verfahren zur Rückgewinnung organischer Verbindungen von (Meth)Acrylsäurehaltigen gemischen durch Extraktion mit einem protischen Lösungsmittel*. 2006 (WO002006084667A1)
- [BTM75] BORREL, Marcel ; THEVENON, Marcel ; MATHAIS, Henri: *Process for the purification of crude acrolein by extractive distillation*. 1975 (3860495)
- [Bud91] BUDAVARI, Susan: *The Merck-index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. Bd. 4681. 11. ed., 3. print., centennial ed. Rahway and NJ, 1991
- [Car12a] CARL ROTH GMBH + CO. KG: *Analysezertifikat: Fleischextrakt pulv., für Nährböden: Charge: 420162964*. 2012
- [Car12b] CARL ROTH GMBH + CO. KG: *Analysezertifikat: Hefeextrakt pulv., für die Bakteriologie: Charge: 071167072*. 2012
- [Car12c] CARL ROTH GMBH + CO. KG: *Analysezertifikat: Pepton aus Casein tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie: Charge: 381175575*. 2012
- [Car12d] CARL ROTH GMBH + CO. KG: *Sicherheitsdatenblatt: Glycerin ≥ 98 %, Ph.Eur., wasserfrei*. 2012
- [CH95] CURTIUS, Th ; HEIDENREICH, K.: Hydrazide und Azide organischer Säuren. XI Abhandlung. 36. Die Hydrazide und Azide der Kohlensäure. In: *Journal für Praktische Chemie* 52 (1895), Nr. 1, S. 454–489

- [Cha98] CHASE, M. W.: *NIST-JANAF thermochemical tables 1-2*. 4. Washington D.C., 1998
- [CLV⁺07] CLEUSIX, Valentine ; LACROIX, Christophe ; VOLLENWEIDER, Sabine ; DUBOUX, Marc ; LE BLAY, Gwenaëlle: Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. In: *BMC microbiology* 7 (2007), S. 101
- [Cro11a] CROPENERGIES AG: *Schematische Darstellung der Herstellung von Bioethanol, Gluten und CDS*. 2011
- [Cro11b] CROPENERGIES AG: *Schematische Darstellung der Herstellung von Bioethanol und von DDGS aus Getreide und Zuckersirupen*. 2011
- [CSB45] CIRCLE, S. J. ; STONE, L. ; BORUFF, C. S.: Acrolein determination by means of tryptophane: A colorimetric method. In: *Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition* 17 (1945), Nr. 4, S. 259–262
- [CW77] CYSEWSKI, Gerald R. ; WILKE, Charles R.: Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. In: *Biotechnology and Bioengineering* 19 (1977), Nr. 8, S. 1125–1143
- [CWLX09] CHAI, Song-Hai ; WANG, Hao-Peng ; LIANG, Yu ; XU, Bo-Qing: Sustainable production of acrolein: Preparation and characterization of zirconia-supported 12-tungstophosphoric acid catalyst for gas-phase dehydration of glycerol. In: *Applied Catalysis A: General* 353 (2009), Nr. 2, S. 213–222
- [DBG98] DANIEL, Rolf ; BOBIK, Thomas A. ; GOTTSCHALK, Gerhard: Biochemistry of coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. In: *FEMS Microbiology Reviews* 22 (1998), Nr. 5, S. 553–566
- [DBVL05] DOLEYRES, Y. ; BECK, P. ; VOLLENWEIDER, S. ; LACROIX, C.: Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step

- process with *Lactobacillus reuteri*. In: *Applied microbiology and biotechnology* 68 (2005), Nr. 4, S. 467–474
- [DH06] DATTA, Rathin ; HENRY, Michael: Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81 (2006), Nr. 7, S. 1119–1129
- [DIN87] DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V.: *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H); Bestimmung des Gesamttrockenrückstandes, des Filtrat-trockenrückstandes, und des Glührückstandes (H1)*. Berlin, 1987
- [DL97] DOBROGOSZ, Walter J. ; LINDGREN, Sven E.: *Antibiotikum-Reuterin*. 1997 (DE000003855664T2)
- [DLG09] DLG-ARBEITSKREIS FUTTER UND FÜTTERUNG: *Einsatz von Glycerin in der Fütterung*. 2009
- [DMRS60] DE MAN, J C. ; ROGOSA, M ; SHARPE, M E.: A medium for the cultivation of lactobacili. In: *Journal of Applied Microbiology* 23 (1960), Nr. 1, S. 130–135
- [Dut09] DUTCH ASSOCIATION OF COST ENGINEERS: *DACE Prijzenboekje*. 27. Reed Business, 2009
- [ECH09] ECHA: http://echa.europa.eu/home_de.asp. 16.06.2009
- [EQB04] EZEJI, Thaddeus C. ; QURESHI, Nasib ; BLASCHEK, Hans P.: Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. In: *Chemical record (New York, N 4)* (2004), Nr. 5, S. 305–314
- [ESI09] ESIS: <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/>. 16.06.2009
- [Etz00] ETZKORN, William G.: Acrolein and Derivatives. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc, 2000

LITERATURVERZEICHNIS

- [Eur00a] EUROPEAN CHEMICALS BUREAU ; EUROPEAN CHEMICALS BUREAU (Hrsg.): *Acrylaldehyde: IUCLID Dataset*. 18.02.2000
- [Eur00b] EUROPEAN CHEMICALS BUREAU ; EUROPEAN CHEMICALS BUREAU (Hrsg.): *Ethanol: IUCLID Dataset*. 18.02.2000
- [Eur00c] EUROPEAN CHEMICALS BUREAU ; EUROPEAN CHEMICALS BUREAU (Hrsg.): *Glycerol: IUCLID Dataset*. 18.02.2000
- [Eur00d] EUROPEAN CHEMICALS BUREAU ; EUROPEAN CHEMICAL SUBSTANCES INFORMATION SYSTEM (ESIS) (Hrsg.): *IUCLID Dataset*. 2000
- [EZAU+98] EL-ZINEY, M. G. ; ARNEBORG, N. ; UYTTENDAELE, M. ; DEBEVERE, J. ; JAKOBSEN, M.: Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. In: *Biotechnology Letters* 20 (1998), Nr. 10, S. 913–916
- [FBH+83] FALBE, Jürgen ; BACH, H. ; HOUBEN, Josef ; MÜLLER, Eugen ; WEYL, Theodor ; KROPF, Heinz ; BÜCHEL, Karl H. ; BAYER, Otto: *Methoden der organischen Chemie*. 4. Stuttgart [u.a.] : Thieme, 1983
- [Foo06] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS: Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. In: *FAO food and nutrition paper* (2006), Nr. 85
- [FT08] FUKUMOTO, Naohiro ; TANIMOTO, Michio: *Support for gas-phase oxidation catalyst and process for its production, gas-phase oxidation catalyst, and process for producing acrylic acid*. 2008 (US000007456129B2)
- [Gin07] GINSBERG, Judah ; AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (Hrsg.): *The Sohio Acrylonitrile Process*. 2007
- [GK92] GMEHLING, Jürgen ; KOLBE, Bärbel: *Thermodynamik*. 2., überarb. Aufl. Weinheim : VCH, 1992

- [GMHC92] GOLD, R. S. ; MEAGHER, M. M. ; HUTKINS, R. ; CONWAY, T.: Ethanol tolerance and carbohydrate metabolism in lactobacilli. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 10 (1992), Nr. 1, S. 45–54
- [Goe06] GOEDECKE, Ralf: *Fluidverfahrenstechnik: Grundlagen, Methodik, Technik, Praxis*. Weinheim : Wiley-VCH, 2006
- [GSJ+09] GOKARN, Ravir ; SELIFONOVA, Olga V. ; JESSEN, Holly J. ; GORT, Steven J. ; SELMER, Thorsten ; BUCKEL, Wolfgang: *Hydroxypropionic acid and other organic compounds*. 2009 (US020090053783A1)
- [Gut69] GUTHRIE, K. M.: Data and techniques for preliminary cost estimating. In: *CHEMICAL ENGINEERING* 76 (1969), Nr. 6, S. 114–&
- [Ham73] HAMMETT, Louis P.: *Physikalische organische Chemie: Reaktionsgeschwindigkeiten, Gleichgewichte, Mechanismen ; [mit 35 Tab.]*. Weinheim (Bergstr.) : Verlag Chemie, 1973
- [Ham98] HAMMES, W. P.: Bewertung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Milchsäurebakterien und Probiotika (Safety Assessment of Lactic Acid Bacteria and Probiotics). In: *Monatsschrift Kinderheilkunde* 146 (1998), Nr. 0, S. S31–S38
- [Han02] HANSEN, Egon B.: Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. In: *International journal of food microbiology* 78 (2002), Nr. 1-2, S. 119–131
- [HBM+00] HAAS, Thomas ; BROSSMER, Christoph ; MEIER, Martin ; ARNTZ, Dietrich ; FREUND, Andreas: *Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxypropionsäure oder einem Salz derselben*. 2000 (EP000000819670B1)
- [HD32] HAMMETT, Louis P. ; DEYRUP, Alden J.: A series of simple basic indicators. I. The acidity functions of mixtures of sulfuric and perchloric acids with water: Journal of the American Chemical Society. In: *J. Am. Chem. Soc* 54 (1932), Nr. 7, S. 2721–2739

- [HE93] HUMPHREYS, Kenneth K. ; ENGLISH, Lloyd M.: *Project and cost engineers' handbook*. 3. Morgantown and W.Va and New York : AACE International and M. Dekker, 1993
- [HHG+01] HOLZAPFEL, W. H. ; HABERER, P. ; GEISEN, R. ; BJORKROTH, J. ; SCHILLINGER, U.: Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. In: *The American journal of clinical nutrition* 73 (2001), Nr. 2 Suppl, S. 365S–373S
- [HKK+10] HAAS, Thomas ; KLASOVSKY, Florian ; KRAUTER, Hendrik ; SCHAFFER, Steffen ; SCHOEBEL, Rene ; TACKE, Thomas ; VORLOP, Klaus-Dieter ; WILLKE, Thomas ; WESSEL, Mirja: *Enzymatisches Verfahren zur Herstellung von Aldehyden*. 2010 (WO002010127970A2)
- [HMROG05] HIDALGO-MORALES, Madeleine ; ROBLES-OLVERA, Victor ; GARCIA, Hugo S.: Lactobacillus reuteri beta-galactosidase activity and low milk acidification ability. In: *Canadian journal of microbiology* 51 (2005), Nr. 3, S. 261–267
- [HNAME94] HOVE, H. ; NORDGAARD-ANDERSEN, I. ; MORTENSEN, P. B.: Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. In: *The American journal of clinical nutrition* 59 (1994), Nr. 1, S. 74–79
- [HS50] HALL, R. H. ; STERN, E. S.: Acid-catalysed hydration of Acrylaldehyde: kinetics of the reaction and isolation of β -Hydroxypropionaldehyde. In: *J Chem Soc* (1950), S. 490–498
- [HW49] HEIBRONNER, E. ; WEBER, S.: Die Hammett'sche Säurefunktion des Systems Phosphorsäure/Wasser. In: *Helvetica Chimica Acta* 32 (1949), Nr. 5, S. 1513–1517
- [IAR95] IARC: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Dry Cleaning, Some Chlorinated Solvents and Other Industrial Chemicals*. Bd. 63. WHO Press, 1995

- [Int12] INTERNATIONAL ENERGY AGENCY: *End-use petroleum product prices and average crude oil import costs March 2012*. 2012
- [Jen59] JENCKS, William P.: Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation. In: *Journal of the American Chemical Society* 81 (1959), Nr. 2, S. 475–481
- [JLS+10] JIA, Chun-Jiang ; LIU, Yong ; SCHMIDT, Wolfgang ; LU, An-Hui ; SCHÜTH, Ferdi: Small-sized HZSM-5 zeolite as highly active catalyst for gas phase dehydration of glycerol to acrolein. In: *Journal of Catalysis* 269 (2010), Nr. 1, S. 71–79
- [Kal01] KALTSCHMITT, Martin: *Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren ; mit 124 Tabellen*. Berlin : Springer, 2001
- [Kam90] KAMPEN, Willem H.: *Process for manufacturing ethanol and for recovering glycerol, succinic acid, lactic acid, betaine, potassium sulfate, and free flowing distiller's dry grain and solubles or a solid fertilizer therefrom*. 18.06.1990 (US005177008A)
- [Kan83] KANDLER, Otto: Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 49 (1983), Nr. 3, S. 209–224
- [KHS08] KUPPINGER, Franz-Felix ; HENGSTERMANN, Axel ; STOCHNIOL, Guido: *Verfahren zur Herstellung von durch Kristallisation gereinigter Acrylsäure aus Hydroxypropionsäure sowie Vorrichtungen dazu*. 2008 (WO002008023039A1)
- [Kis06] KISTER, Henry Z.: *Distillation troubleshooting*. Hoboken and N.J : AIChE and Wiley-Interscience, 2006
- [KK04] KAMM, B. ; KAMM, M.: Principles of biorefineries. In: *Applied microbiology and biotechnology* 64 (2004), Nr. 2, S. 137–145
- [KKF06] KUSUDOU, Takeshi ; KUMAKI, Yousuke ; FUJIWARA, Naoki: *Polyvinyl acetal and its use*. 2006 (US000006992130B2)

- [Kra03] KRAUME, Matthias: *Mischen und Rühren: Grundlagen und moderne Verfahren*. Weinheim : Wiley-VCH, 2003
- [Krä11] KRÄMER, Johannes: *Lebensmittel-Mikrobiologie: 48 Tabellen*. 6. Stuttgart : Ulmer, 2011
- [KRW+87] KRAUSS, Gerd ; RENNERT, Günter ; WOLFF, Erich ; LANGEN, Hans ; KRAFFT, Werner: *Lichtempfindliches fotografisches Silberhalogenid-Aufzeichnungsmaterial*. 1987 (DE000003545611A1)
- [KSF+00] KOHLPAINNER, Christian ; SCHULTE, Markus ; FALBE, Jürgen ; LAPPE, Peter ; WEBER, Jürgen: Aldehydes, Aliphatic. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000
- [KSK80] KANDLER, Otto ; STETTER, Karl-Otto ; KÖHL, Ruth: *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a New Species of Heterofermentative Lactobacilli. In: *Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* 1 (1980), Nr. 3, S. 264–269
- [KTZ10] KAEDING, T. ; TJAHAJASARI, D. ; ZENG, A.-P.: 1,3-Propanediol and Polytrimethyleneterephthalate. In: MOREINA (Hrsg.) ; BAI (Hrsg.): *Comprehensive Biotechnology* Bd. 3. 2010
- [KWV12] KRAUTER, Hendrik ; WILLKE, Thomas ; VORLOP, Klaus-Dieter: Production of high amounts of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by *Lactobacillus reuteri* with strongly increased biocatalyst lifetime and productivity: Industrial Biotechnology. In: *New Biotechnology* 29 (2012), Nr. 2, S. 211–217
- [LBR+10] LIU, Mengjin ; BAYJANOV, Jumamurat R. ; RENCKENS, Bernadet ; NAUTA, Arjen ; SIEZEN, Roland J.: The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. In: *BMC genomics* 11 (2010), S. 36

- [Lev99] LEVENSPIEL, O.: *Chemical reaction engineering*. 3. New York : Wiley, 1999
- [LKK05] LATSCHA, Hans P. ; KAZMAIER, Uli ; KLEIN, Helmut A.: *Chemie für Biologen: Mit 71 Tabellen*. 2., überarb. Aufl. Berlin : Springer, 2005 (Springer-Lehrbuch)
- [LMWG89] LIDE, David R. ; MILNE, G. W. A. ; WEAST, Robert C. ; GRASELLI, Jeanette G.: *Handbook of data on organic compounds*. 2. ed. Boca Raton and Fla. : CRC Press, 1989
- [Lon11] LONZA LTD.: *Verfahren zur selektiven Herstellung von Acetaldehyd aus Acrolein und einem oder mehreren in Wasser gelösten Ammoniumsalzen*. 2011 (EP000002281797A1)
- [LPDP02] LÜTHI-PENG, Q. ; DILEME, F. B. ; PUHAN, Z.: Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. In: *Applied microbiology and biotechnology* 59 (2002), Nr. 2-3, S. 289–296
- [LPSP02] LÜTHI-PENG, Q. ; SCHÄRER, S. ; PUHAN, Z.: Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. In: *Applied microbiology and biotechnology* 60 (2002), Nr. 1-2, S. 73–80
- [LRHO+77] LEDESMA, O. V. ; RUIZ HOLGADO, Aida P. d. ; OLIVER, G. ; GIORI, Graciela S. d. ; RAIBAUD, P. ; GALPIN, J. V.: A Synthetic Medium for Comparative Nutritional Studies of *Lactobacilli*. In: *Journal of Applied Microbiology* 42 (1977), Nr. 1, S. 123–133
- [LT06] LIN, Yan ; TANAKA, Shuzo: Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. In: *Applied microbiology and biotechnology* 69 (2006), Nr. 6, S. 627–642
- [LWPR81] LEE, J. H. ; WOODARD, J. C. ; PAGAN, R. J. ; ROGERS, P. L.: Vacuum fermentation for ethanol production using strains of *Zymomonas mobilis*. In: *Biotechnology Letters* 3 (1981), Nr. 4, S. 177–182

- [MBC54] MILLS, D. E. ; BAUGH, W. D. ; CONNER, A. H.: Studies on the formation of acrolein in distillery mashes. In: *Applied microbiology* 2 (1954), Nr. 1, S. 9–13
- [MGB+03] MERTENS, Rita ; GREINER, Lasse ; BAN, Eyke C. D. d. ; HAAKER, Huub B. C. M. ; LIESE, Andreas: Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 24–25 (2003), Nr. 0, S. 39–52
- [MSS+06] MONCH, Dietmar ; SCHUHMACHER, Rudolf ; STANGE, Andreas ; DENZINGER, Walter ; RUBENACKER, Martin ; LORENCAK, Primoz ; NILZ, Claudia: *Graft polymers made of alkylene oxide units-containing polymers and ethylenically unsaturated compounds, process for preparing the same and their use.* 2006 (CA000002217295C)
- [MSW+06] MAKAROVA, K. ; SLESAREV, A. ; WOLF, Y. ; SOROKIN, A. ; MIRKIN, B. ; KOONIN, E. ; PAVLOV, A. ; PAVLOVA, N. ; KARAMYCHEV, V. ; POLOUCHINE, N. ; SHAKHOVA, V. ; GRIGORIEV, I. ; LOU, Y. ; ROHKSAR, D. ; LUCAS, S. ; HUANG, K. ; GOODSTEIN, D. M. ; HAWKINS, T. ; PLENGVIDHYA, V. ; WELKER, D. ; HUGHES, J. ; GOH, Y. ; BENSON, A. ; BALDWIN, K. ; LEE, J-H ; DIAZ-MUNIZ, I. ; DOSTI, B. ; SMEIANOV, V. ; WECHTER, W. ; BARABOTE, R. ; LORCA, G. ; ALTERMANN, E. ; BARRANGOU, R. ; GANESAN, B. ; XIE, Y. ; RAWSTHORNE, H. ; TAMIR, D. ; PARKER, C. ; BREIDT, F. ; BROADBENT, J. ; HUTKINS, R. ; O’SULLIVAN, D. ; STEELE, J. ; UNLU, G. ; SAIER, M. ; KLAENHAMMER, T. ; RICHARDSON, P. ; KOZYAVKIN, S. ; WEIMER, B. ; MILLS, D.: Comparative genomics of the lactic acid bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), Nr. 42, S. 15611–15616
- [MVMA95] MOLINARI, F. ; VILLA, R. ; MANZONI, M. ; ARAGOZZINI, F.: Aldehyde production by alcohol oxidation with *Gluconobacter*

- oxydans. In: *Applied microbiology and biotechnology* 43 (1995), Nr. 6, S. 989–994
- [Nav95] NAVARRETE, Pablo F.: *Planning, estimating, and control of chemical construction projects*. New York : M. Dekker, 1995
- [NBS08] NÉMETH, Áron ; BALÁSSY, Andrea ; SEVELLA, Béla: Difficulties and solutions for the assays of the key enzymes of a new enzymatic glycerol bioconversion. In: *Per. Pol. Chem. Eng.* 52 (2008), Nr. 1, S. 17–22
- [Nef04a] NEF, J. U.: Dissociationsvorgänge in der Glycol-Glycerinreihe. In: *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 335 (1904), Nr. 1-2, S. 191–245
- [Nef04b] NEF, J. U.: Dissociationsvorgänge in der Glycol-Glycerinreihe. In: *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 335 (1904), Nr. 3, S. 247–333
- [NHA+94] NEHER, Armin ; HAAS, Thomas ; ARNTZ, Dietrich ; KLENK, Herbert ; GIRKE, Walter: *Verfahren zur Herstellung von Acrolein und dessen Verwendung*. 1994 (DE000004238493C1)
- [Nov04] NOVOZYMES A/S: *Alcalase 2.4 L Application sheet*. 2004
- [OEC95] OECD: *Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*. OECD Publishing, 1995
- [PBWKW+10] POLAK-BERECKA, Magdalena ; WASKO, Adam ; KORDOWSKA-WIATER, Monika ; PODLESNY, Marcin ; TARGONSKI, Zdzislaw ; KUBIK-KOMAR, Agnieszka: Optimization of medium composition for enhancing growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN using response surface methodology. In: *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow* 59 (2010), Nr. 2, S. 113–118
- [PCK+07] PAGLIARO, Mario ; CIRIMINNA, Rosaria ; KIMURA, Hiroshi ; ROSSI, Michele ; DELLA PINA, Cristina: Von Glycerin zu

- höherwertigen Produkten. In: *Angewandte Chemie* 119 (2007), Nr. 24, S. 4516–4522
- [PL42] PRESSMAN, D. ; LUCAS, H. J.: Hydration of Unsaturated Compounds. XI. Acrolein and Acrylic Acid1: Journal of the American Chemical Society. In: *J. Am. Chem. Soc* 64 (1942), Nr. 8, S. 1953–1957
- [PT91] PETERS, Max S. ; TIMMERHAUS, Klaus D.: *Plant design and economics for chemical engineers*. 4. New York : McGraw-Hill, 1991
- [PTW04] PETERS, Max S. ; TIMMERHAUS, Klaus D. ; WEST, Ronald E.: *Plant design and economics for chemical engineers*. 5. ed., internat. ed. Boston : McGraw-Hill, 2004
- [RAP+08a] RANGARAJAN, Erumbi S. ; ASINAS, Abdalin ; PROTEAU, Ariane ; MUNGER, Christine ; BAARDSNES, Jason ; IANNUZZI, Pietro ; MATTE, Allan ; CYGLER, Mirosław: Structure of hydrogenase maturation protein HypE from *Escherichia coli* and its interaction with HypF. In: *Journal of bacteriology* 190 (2008), Nr. 4, S. 1447–1458
- [Rap08b] RAPPERT, Siguma: *Biosynthesis of 3-Hydroxypropionic acid: Proposed ways to be tested in our group*. Hamburg, 2008
- [RBW84] ROFFLER, S. R. ; BLANCH, H. W. ; WILKE, C. R.: In situ recovery of fermentation products. In: *Trends in Biotechnology* 2 (1984), Nr. 5, S. 129–136
- [RC81] RENDINA, Alan R. ; CLELAND, W. W.: Separation of aldehydes and ketones by chromatography on dowex-50 in the ethylenediamine form. In: *Analytical Biochemistry* 117 (1981), Nr. 1, S. 213–218
- [Red43] REDTENBACHER, J.: Über die Zerlegungsprodukte des Glycerinoxydes durch trockene Destillation. In: *Ann Chem Pharm* 47 (1843), S. 113–148

- [RFV01] ROLLÁN, G. ; FONT VALDEZ, G. d.: The peptide hydrolase system of *Lactobacillus reuteri*. In: *International Journal of Food Microbiology* 70 (2001), Nr. 3, S. 303–307
- [RLJ+11] RÜTTI, D. P. ; LACROIX, C. ; JEREMIC, T. ; MATHIS, M. ; DIÂE, A. ; VOLLENWEIDER, S.: Development of a reversible binding process for in situ removal of 3-hydroxypropionaldehyde during biotechnological conversion of glycerol. In: *Biochemical Engineering Journal* 55 (2011), Nr. 3, S. 176–184
- [Roe01] ROEHR, M.: *The biotechnology of ethanol: Classical and future applications*. Weinheim and New York : Wiley-VCH, 2001
- [Rüt10] RÜTTI, David P.: *Biotechnological production of antimicrobial 3-Hydroxypropionaldehyde from glycerol using free and immobilised lactobacillus reuteri cells and its reactive extraction*. Zürich, ETH Zürich, Diss., 2010
- [SASI09] SAXENA, R. K. ; ANAND, Pinki ; SARAN, Saurabh ; ISAR, Jasmine: Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. In: *Biotechnology for the Sustainability of Human Society Invited Papers from IBS 2008 27* (2009), Nr. 6, S. 895–913
- [SBS83] SLININGER, Patricia J. ; BOTHAST, Rodney J. ; SMILEY, Karl L.: Production of 3-Hydroxypropionaldehyde from Glycerol. In: *Applied and environmental microbiology* 46 (1983), Nr. 1, S. 62–67
- [SC05] SUTHERS, Patrick F. ; CAMERON, Douglas C.: *Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms*. 2005 (US000006852517B1)
- [SCLH03] SUNG, Hsing-Wen ; CHEN, Chiun-Nan ; LIANG, Hsiang-Fa ; HONG, Min-Hao: A natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for biological-tissue fixation. In: *Biomaterials* 24 (2003), Nr. 8, S. 1335–1347

- [SDLB54] SERJAK, W. C. ; DAY, W. H. ; LANEN, J. M. ; BORUFF, C. S.: Acrolein production by bacteria found in distillery grain mas-
hes. In: *Applied microbiology* 2 (1954), Nr. 1, S. 14–20
- [SDQ+10] SABRA, Wael ; DAI, Jian-Ying ; QUITMANN, Hendrich ; ZENG,
A.-P. ; XIU, Zhi-Long: Microbial production of 2, 3-butanediol.
In: MOREINA (Hrsg.) ; BAI (Hrsg.): *Comprehensive Biotechno-
logy* Bd. 3. 2010
- [SDS03] SCHON, Steven G. ; DANIEL, Samuel M. ; SANDER, Richard A.:
*Process for recovering acrolein or propionaldehyde from dilute
aqueous streams.* 2003 (US000006515187B1)
- [SEZ77] SCHAUENSTEIN, E. ; ESTERBAUER, H. ; ZOLLNER, Helmward:
*Aldehydes in biological systems: Their natural occurrence and
biological activities.* London : Pion, op. 1977
- [SH03] SCHILLINGER, U. ; HOLZAPFEL, W. H.: Chapter 8 Culture me-
dia for lactic acid bacteria. In: JANET E.L. CORRY, G.D.W.C.
(Hrsg.) ; BAIRD, Rosamund M. (Hrsg.): *Progress in Industrial
Microbiology : Handbook of Culture Media for Food Microbio-
logy* Bd. 37. Elsevier, 2003, S. 127–140
- [SHG08] SIEMERING, Geoffrey S. ; HAYWORTH, Jennifer D. ; GREEN-
FIELD, Ben K.: Assessment of potential aquatic herbicide im-
pacts to California aquatic ecosystems. In: *Archives of envi-
ronmental contamination and toxicology* 55 (2008), Nr. 3, S.
415–431
- [Sig12a] SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH: *Sicherheitsdatenblatt: Car-
bohydrazide.* 2012
- [Sig12b] SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH: *Sicherheitsdatenblatt: Se-
micarbazidhydrochlorid.* 2012
- [Sig12c] SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH: *Amberlyst ® 36: total pore
volume 0.20 mL/g.* 24.07.2012

- [SIS+06] SUZUKI, Koji ; IJIMA, Kazumaru ; SAKAMOTO, Kanta ; SAMI, Manabu ; YAMASHITA, Hiroshi: A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. In: *Journal of the Institute of Brewing* 112 (2006), Nr. 2, S. 173–191
- [Sko07] SKOGESTAD, Sigurd: *Introduction to Distillation: Steady State Design and Operation*. Berlin, 2007 (Distillation Course)
- [SLHR+08] SRIRAMULU, Dinesh D. ; LIANG, Mingzhi ; HERNANDEZ-ROMERO, Diana ; RAUX-DEERY, Evelyne ; LÜNSDORF, Heinrich ; PARSONS, Joshua B. ; WARREN, Martin J. ; PRENTICE, Michael B.: Lactobacillus reuteri DSM 20016 Produces Cobalamin-Dependent Diol Dehydratase in Metabolosomes and Metabolizes 1,2-Propanediol by Disproportionation. In: *Journal of Bacteriology* 190 (2008), Nr. 13, S. 4559–4567
- [Soc02] SOCIETY OF CHEMICAL INDUSTRY: Acrylic acid production 2003. In: *C & I Magazine* 17 (2002), Nr. 2
- [SP87] STEINBERNER, U. ; PREUSS, W.: Glycerin - Ein fettchemischer Grundstoff im Wandel der Zeit. In: *Lipid / Fett* 89 (1987), Nr. 8, S. 297–303
- [SR98] SIMMONDS, J. ; ROBINSON, G. K.: Formation of benzaldehyde by Pseudomonas putida ATCC 12633. In: *Applied microbiology and biotechnology* 50 (1998), Nr. 3, S. 353–358
- [SS60] SOBOLOV, M. ; SMILEY, K. L.: Metabolism of glycerol by an acrolein-forming lactobacillus. In: *Journal of bacteriology* 79 (1960), S. 261–266
- [SS62] SMILEY, K. L. ; SOBOLOV, M.: A cobamide-requiring glycerol dehydrase from an acrolein-forming Lactobacillus. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 97 (1962), S. 538–543
- [SSPV06] SAVIJOKI, K. ; SUOKKO, A. ; PALVA, A. ; VARMANEN, P.: New convenient defined media for methionine labelling and proteomic analyses of probiotic lactobacilli. In: *Letters in applied microbiology* 42 (2006), Nr. 3, S. 202–209

- [SST⁺69] SHIMA, Takesaburo ; SAWAKI, Yoshitsugu ; TOKUNAGA, Katsuyoshi ; SADA, Masao ; TAKIMOTO, Tetuji: *Process for recovering acrolein by quenching, absorption and plural distillation*. 1969 (US000003433840A)
- [Ste05] STEINBÜCHEL, Alexander: *Biotechnology of biopolymers: From synthesis to patents*. Weinheim : Wiley-VCH, 2005
- [STM⁺09] SANTOS, Filipe ; TEUSINK, Bas ; MOLENAAR, Douwe ; HECK, Maurice van ; WELS, Michiel ; SIEUWERTS, Sander ; VOS, Willem M. d. ; HUGENHOLTZ, Jeroen: Effect of Amino Acid Availability on Vitamin B12 Production in *Lactobacillus reuteri*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 75 (2009), Nr. 12, S. 3930–3936
- [Stu47] STULL, Daniel R.: Vapor Pressure of Pure Substances. Organic and Inorganic Compounds: Industrial & Engineering Chemistry. In: *Ind. Eng. Chem* 39 (1947), Nr. 4, S. 517–540
- [SVB90] SLININGER, Patricia J. ; VANCAUWENBERGE, James E. ; BOTHAST, Rodney J.: *Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol by Klebsiella pneumoniae*. 1990 (US000004962027A)
- [SWH08] SCHAFFER, Steffen ; WESSEL, Mirja ; HAAS, Thomas: *Mikrobiologische Herstellung von Aldehyden, insbesondere von 3-Hydroxypropionaldehyd*. 2008 (DE102007027006A1)
- [SWV⁺08] STEVENS, Marc J. A. ; WIERSMA, Anne ; VOS, Willem M. d. ; KUIPERS, Oscar P. ; SMID, Eddy J. ; MOLENAAR, Douwe ; KLEEREBEZEM, Michiel: Improvement of *Lactobacillus plantarum* Aerobic Growth as Directed by Comprehensive Transcriptome Analysis. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2008), Nr. 15, S. 4776–4778
- [SYT⁺10] SUN, Peng ; YU, Dinghua ; TANG, Zhenchen ; LI, Heng ; HUANG, He: NaY Zeolites Catalyze Dehydration of Lactic Acid to Acrylic Acid: Studies on the Effects of Anions in Potassium

- Salts: Industrial & Engineering Chemistry Research. In: *Ind. Eng. Chem. Res* 49 (2010), Nr. 19, S. 9082–9087
- [The12] THE PALL RING COMPANY LTD.: *Pressure drop: 50 mm Metallic Pall Ring*. 2012
- [Tor00] TORAYA, T.: Radical catalysis of B12 enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57 (2000), Nr. 1, S. 106–127
- [TVH+03] TARANTO, Maria P. ; VERA, Jose L. ; HUGENHOLTZ, Jeroen ; VALDEZ, Graciela F. d. ; SESMA, Fernando: Lactobacillus reuteri CRL1098 produces cobalamin. In: *Journal of bacteriology* 185 (2003), Nr. 18, S. 5643–5647
- [TYM+08] TORAYA, Tobimatsu T. ; YAMANISHI, Mamoru ; MORI, Kouichi ; KAJIURA, Hideki ; YAMADA, Seiki ; YUZUKI, Michio ; AZUMA, Muneaki ; HARA, Tetsuya ; YASUDA, Shinzo: *Method For Producing 3-Hydroxypropionaldehyde*. 2008 (US020080131945A1)
- [Uhd09] UHDE INVENTA-FISCHER GMBH ; UHDE INVENTA-FISCHER GMBH (Hrsg.): *Polylactic Acid (PLA): A sustainable Polymer*. 2009
- [Ulm07] ULMER, C.: Microbial Production of 3-Hydroxypropionaldehyde from Glycerol Bioconversion. In: *Chemical and biochemical engineering quarterly* (2007), S. Vol. 21, No. 4 (2007),321–326
- [Ulm08] ULMER, C.: *Mikrobielle Produktion von 3-Hydroxypropionaldehyd: Prozessentwicklung, Optimierung und Aufarbeitung*. Braunschweig, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Diss., 2008
- [VGKP03] VOLLENWEIDER, Sabine ; GRASSI, Guido ; KÖNIG, Iwo ; PUHAN, Zdenko: Purification and structural characterization

- of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 51 (2003), Nr. 11, S. 3287–3293
- [VL04] VOLLENWEIDER, S. ; LACROIX, C.: 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. In: *Applied microbiology and biotechnology* 64 (2004), Nr. 1, S. 16–27
- [Vol09] VOLLMANN, Peter ; NATUREWORKS LLC (Hrsg.): *Wie man Milch in Zucker verpackt: PLA hat Zukunft*. 12.06.2009
- [VSB90] VANCAUWENBERGE, J. E. ; SLININGER, P. J. ; BOTHERST, R. J.: Bacterial conversion of glycerol to beta-hydroxypropionaldehyde. In: *Applied and environmental microbiology* 56 (1990), Nr. 2, S. 329–332
- [WACP07] WILSON, Ian D. ; ADLARD, E. R. ; COOKE, Michael ; POOLE, C. F.: *Encyclopedia of separation science*. San Diego : Academic Press, 2000; zitiert in [Sko07]
- [Web06] WEBER, Klaus H.: *Inbetriebnahme verfahrenstechnischer Anlagen: Praxishandbuch mit Checklisten und Beispielen*. 3. Berlin and New York : Springer, 2006
- [WGG07] WUTS, Peter G. M. ; GREENE, Theodora W. ; GREENE, Theodora W.: *Greene's protective groups in organic synthesis*. 4. Hoboken and N.J : Wiley-Interscience, 2007
- [WH51] WILHARM, G. ; HOLZ, G.: Beitrag zur Kenntnis des Acroleins in Obstbränden, Maischen und Mosten. In: *Archives of Microbiology* 15 (1951), Nr. 3, S. 403–413
- [WP04] WERPY, T. ; PETERSEN, G.: *Top Value Added Chemicals From Biomass: Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*. 2004
- [WT06] WOZNY, G. ; THIELERT, H. ; FACHGEBIET FÜR DYNAMIK UND BETRIEB TECHNISCHER ANLAGEN (Hrsg.): *Computer-gestützte Anlagenplanung: Vorlesungsunterlagen*. 2006

- [WZ87] WECKER, M. S. ; ZALL, R. R.: Production of Acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. In: *Applied and environmental microbiology* 53 (1987), Nr. 12, S. 2815–2820
- [WZFP01] WANG, Zhengxiang ; ZHUGE, Jian ; FANG, Huiying ; PRIOR, Bernard A.: Glycerol production by microbial fermentation: A review. In: *Biotechnology Advances* 19 (2001), Nr. 3, S. 201–223
- [XZ08] XIU, Zhi-Long ; ZENG, An-Ping: Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. In: *Applied microbiology and biotechnology* 78 (2008), Nr. 6, S. 917–926–926
- [YR92] YUNMBAM, M. K. ; ROBERTS, J. F.: The in vitro efficacy of reuterin on the culture and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. In: *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology* 101 (1992), Nr. 2, S. 235–238
- [YST+11] YU, Dinghua ; SUN, Peng ; TANG, Zhenchen ; LI, Zhixian ; HUANG, He: Modification of NAY by LA3+ for the dehydration of lactic acid: The effect of preparation protocol on catalyst microstructure and catalytic performance. In: *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 89 (2011), Nr. 3, S. 484–490
- [ZB02] ZENG, An-Ping ; BIEBL, Hanno: Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 74 (2002), S. 239–259
- [ZERU06] ZAUNMULLER, T. ; EICHERT, M. ; RICHTER, H. ; UNDEN, G.: Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. In: *Applied microbiology and biotechnology* 72 (2006), Nr. 3, S. 421–429

- [ZLC08] ZHANG, J. F. ; LIN, J. P. ; CEN, P. L.: Catalytic dehydration of lactic acid to acrylic acid over sulfate catalyst. In: *Canadian Journal of Chemical Engineering* 86 (2008), Nr. 6, S. 1047–1053