

Gesamt-Schlussbericht

Vorhaben:

Forschungsverbund **SynRg**[®] - Systembiotechnologie nachwachsender Rohstoffgewinnung;

Zuwendungsempfänger und Förderkennzeichen:

Phytowelt GreenTechnologies (PHY)	FZK 22026507
Forschungszentrum Jülich-IBG2 (FZJ)	FKZ 22022608
Saaten Union BIOTEC GmbH (SUBio)	FKZ 22022708
Technische Universität Kaiserslautern (TUKL)	FKZ 22023008
Clariant Produkte GmbH (zuvor: Süd-Chemie AG; Süd-CH/Clariant)	FKZ 22022908
GEA Westfalia Group GmbH (zuvor: GEA Westfalia Separator Process GmbH; GEA)	FKZ 22022808
Evonik Industries AG (zuvor Evonik Degussa GmbH; EVO)	FKZ 22023108

Laufzeit:

01.07.09 bis 30.06.14

Veröffentlichung:

30.06.2015

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

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

Inhalt

Einleitung.....	4
Ergebnissteil	5
Teilprojekt 1	6
I. Ziele	7
1. Aufgabenstellung	7
2. Stand der Technik.....	8
3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	10
II. Ergebnisse	10
1. Erzielte Ergebnisse	10
Teilbericht Forschungszentrum Jülich IBG2 (FZJ).....	10
Teilbericht Phytowelt GreenTechnologies GmbH (PHY).....	14
Teilbericht Heinrich-Heine-Universität (HHU)	14
Teilbericht Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung (MPIPZ)	16
Teilbericht Saaten Union BIOTEC GmbH (SUBIO)	18
2. Verwertung	23
3. Erkenntnisse von Dritten.....	24
4. Veröffentlichungen	25
Teilprojekt 2	26
I. Ziele	27
1. Aufgabenstellung	27
2. Stand der Technik.....	29
3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	33
II. Ergebnisse	34
1. Erzielte Forschungsergebnisse	34
Teilbericht GEA (WS)	34
Teilbericht Clariant	40
Teilbericht UMSICHT	47
Teilbericht PPM	56
Teilbericht ATB	61
Teilbericht TU KL	66
4. Verwertung	74

5. Erkenntnisse von Dritten.....	76
6. Veröffentlichungen	77
III Literatur.....	78
Teilprojekt 3	79
I. Ziele	80
1. Aufgabenstellung	80
2. Stand der Technik.....	81
3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	82
II. Ergebnisse	82
1. Erzielte Forschungsergebnisse	82
Teilbericht Fraunhofer ICT.....	82
Teilbericht KIT (Karlsruher Institut für Technologie).....	88
Teilbericht TUM (Technische Universität München)	92
Teilbericht Phytowelt Greentechnologies GmbH	97
Teilbericht Evonik (Evonik Industries AG)	103
2. Verwertung	108
3. Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen	108
4. Erkenntnisse von Dritten.....	108
5. Veröffentlichungen	109
Abschlussbetrachtung.....	111

Einleitung

Die Nutzung pflanzlicher Rohstoffe in der chemischen und pharmazeutischen Industrie sowie bei der Kraftstoff- und Energiegewinnung basiert zurzeit meist auf linearen Konzepten, die von einem Substrat zu einem Produkt führen. Für anfallende Nebenprodukte müssen in langjährigen Entwicklungsphasen erst Nutzungsstrategien entwickelt werden, wie wir am Beispiel des Glycerins bei der Biodieselerzeugung sehen können. Heute sind vielfältige Nutzungsstrategien für dieses Abfallprodukt entwickelt und werden auch in die Tat umgesetzt, was auch die Preise für Glycerin wieder steigen lässt. Insbesondere eine energetische Nutzung von Pflanzen ohne eine vorherige stoffliche Nutzung verschwendet das in den Pflanzen vorliegende Potenzial an Rohstoffen für verschiedene Industriezweige.

Vor dem Hintergrund des zunehmenden Einsatzes von nachwachsenden Rohstoffen in der Industrie stellt sich zunehmend die Frage der Landnutzungskonkurrenz zwischen den Wertschöpfungsketten Nahrungsmittel, Industriechemikalien, Kraftstoffe/Energie. Zur Bereitstellung von Energie aus pflanzlichen Materialien gibt es eine Reihe von alternativen regenerativen Energiequellen, außerdem wird sich im Energiebereich selbst bei steigenden Energiepreisen keine vergleichbare Wertschöpfung erreichen lassen wie bei der Produktion von Chemikalien. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die Produktion von Brennstoffen aus Pflanzenmaterial eine Übergangslösung darstellt, mittelfristig vor allem die Co-Nutzung von Biomasse für verschieden Zwecke über Bioraffinerie-Konzepte erfolgen wird, in denen verschieden Wertstoffe und, aus den Reststoffen, Energie gewonnen wird. Dabei wird sich der Gesamtprozess an der Optimierung des Wertschöpfungspotentials über alle Verwertungen orientieren. Als weiter wichtiger Faktor müssen auch veränderte Rahmenbedingungen der Produktion, die sich beispielsweise aus dem Klimawandel und globaler wirtschaftlicher Veränderungen ergeben, berücksichtigt werden. So sagen beispielsweise regionale Klimamodelle für die nächsten Jahrzehnte in Mitteleuropa deutlich wärmere und trockenere aber auch sich verlängernde Vegetationsphasen voraus. Diese Entwicklung muss bei Konzepten für die landwirtschaftliche Biomasseproduktion durch den Einsatz alternativer oder züchterisch optimierter Nutzpflanzen berücksichtigt werden. Darüber hinaus sind diese Fragestellungen nur im Gesamtkontext zu beantworten und erfordern im zunehmenden Maße die interdisziplinäre Zusammenarbeit aller an der Wertschöpfungskette beteiligter Partner und Akteure.

Ziel einer Optimierung der nachhaltigen Produktion pflanzlicher Biomasse für die stoffliche Nutzung kann deshalb nicht nur die Fokussierung auf den Wertstoff selbst sein. Vielmehr muss die Produktionseffizienz relativ zum Ressourceneinsatz (z.B. wertstoffspezifische Wasser- und Nährstoffeffizienz) durch Ganzpflanzenoptimierung erhöht werden. Dieser Ansatz beinhaltet sowohl die Steigerung der Biomasse, der Konzentration des Wertstoffs im Ernteorgan, als auch die Optimierung der pflanzenbezogenen (z.B. Nährstoffaufnahme und pflanzeninternen Stoffverteilung) und agrarischen (z.B. Nutzung veränderter Vegetationsperioden und Produktion unter geänderten Klimabedingungen) Ressourcennutzungseffizienz.

Ganz in diesem Sinne zielt das vorliegende Projekt SynRg auf eine ganzheitliche Optimierung ab, wobei alle Schritte einer Wertschöpfungskette von der Pflanzenzucht, über Anbau, Aufarbeitung bis hin zur Produktsynthese betrachtet werden. Untersucht wird dies anhand einer Kette, die von Ölsaaten ausgeht und mit der Herstellung von Polyestern, Polyamiden und Co-Polymeren endet. Spezielle Ziele umfassen daher die Steigerung der Gewinnung des Primärmetaboliten Fettsäure

und des Sekundärmetaboliten Polyphenol, der Entwicklung geeigneter Technologien zu ihrer optimalen Gewinnung und Aufarbeitung, sowie der Entwicklung hochwertiger Polymere auf Basis dieser Rohstoffe.

Die nachhaltige Gewinnung dieser Rohstoffe wird daher in interdisziplinärer Zusammenarbeit untersucht und modifiziert, um so innovative Methoden und Verfahren zur Wertstoffgewinnung zu ermitteln. Um in einem neuartigen, integrierten Ansatz Systembiologie und Systemchemie zu einem ganzheitlichen Konzept der Systembiotechnologie zu verbinden, zielen die Arbeiten auf die ideale Kombinationen von Wertstoffsynthese, Syntheseort und Verarbeitung für ausgesuchte Stoffklassen. Die Verwertung der Pflanzenausgangsstoffe in Chemie und Energieerzeugung mittels fermentativer, chemischer und physikalischer Methoden wird so optimal aufeinander abgestimmt. Dazu wird die Wertschöpfungskette in die drei Blöcke Wertsteigerung der Pflanze und deren Produkte, Verfahren und Prozesse, sowie Produkte und Anwendungen geteilt, in denen folgende Themenbereiche interdisziplinär behandelt werden:

1. Charakterisierung und Extraktion von Inhaltsstoffen aus existierendem Pflanzenmaterial
2. Ableitung und Anwendung von Züchtungsstrategien zur Erhöhung des Wirkstoffgehalts und besserer Zugänglichkeit der Pflanzeninhaltsstoffe
3. Isolierung und Nutzung von Biokatalysatoren zur Funktionalisierung von nachwachsenden Rohstoffen
4. Entwicklung neuer selektiver Aufschluss-, Extraktions- und Trennverfahren zur Gewinnung von Pflanzeninhaltsstoffen; Downstream Processing
5. Entwicklung von Erntetechnik in Form selektiver Integration neuer verfahrenstechnischer Lösungen für die Aufbereitung sowie Handhabung getrennter Stoffströme und Lagerung
6. Biotechnologische und chemische Transformation der gewonnenen Inhaltsstoffe zu Synthesebausteinen bzw. Produkten in Chemie, Pharmazie, Kosmetik und Pflanzenschutz einschließlich Reststoffverwertung durch Bereitstellung von Biokatalysatoren
7. Anwendungstechnische Untersuchungen der Extrakte/Pflanzeninhaltsstoffe sowie der Folgeprodukte einschließlich Biokonversionsstudien, toxikologischer Untersuchungen sowie ökologische und ökonomische Bewertung der Verfahren und Vergleich verschiedener Prozessvarianten.

Ergebnissteil

Zur besseren Übersicht im Verlauf der Bearbeitung des Projektes wurden die verschiedenen Einzelprozesse entlang der betrachteten Wertschöpfungskette inhaltlich in drei übergeordnete Themengebiete zusammengefasst: I) Wertsteigerung der Pflanze und deren Produkte, II) Verfahren und Prozesse, sowie III) Produkte und Anwendungen. In diese drei Teilprojekte gingen die aus formalen Gründen in sieben Einzelprojekte (sog. Teilvorhaben mit jeweils eigenem Förderkennzeichen) unterteilten, experimentellen Arbeiten ein.

In der Folge sind die im Projekt erzielten Ergebnisse dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind auch sie für die jeweiligen Teilprojekte zusammengefasst worden.

Teilprojekt 1

I. Ziele

1. Aufgabenstellung

Das vom Forschungszentrum Jülich koordinierte TP 1 hat zum Ziel, über die Kombination von genetischen Ansätzen, Struktur/Funktionsänderungen auf der Ebene von Gesamtpflanzen und der Nutzung phänotypischer Technologien zur Selektion und zur Optimierung der Pflanze-Umwelt-Interaktion eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit und Zusammensetzung der Pflanze als Basis für die weiteren Schritte der Wertschöpfungskette zu erzielen.

Ziel vom TV2 war die Produktivitätssteigerung der Ausgangspflanzen durch Modifikation der Pflanzenarchitektur und –Entwicklung, eine Anpassung vorhandener Phänotypisierungssysteme auf SynRg-Zielpflanzen - ggf. Entwicklung neuartiger Verfahren als Proxies für relevante Pflanzenmerkmale -, die Phänotypisierung von Elite-Linien sowie das Screening von genetisch diversifiziertem Material von SynRg-Pflanzen. MPIPZ und HHU nutzen ihr Wissen zur Kontrolle des Blühzeitpunktes und der Samenbildung in *Brassicaceae* zur Identifizierung und dem nachfolgenden Einsatz von Genen und Regulatoren zur Steuerung des Blühzeitpunktes und Samenbildung (Ertragssteigerung) in Raps. In den ersten 3 Jahren dieses Projekt wurden automatisierte, nicht-invasive Phänotypisierungsmethoden angepasst. In den Jahren 4 und 5 erfolgte die Untersuchung der dynamischen Wechselwirkung von Pflanzeigenschaften mit Umweltfaktoren, welche die Biomasseentwicklung und Produktion wichtiger Kulturpflanzen in Deutschland und weltweit nachteilig beeinflussen, z.B. Verfügbarkeit und (toxische) Wirkung mineralischer Nährstoffe. Hierzu wurde eine Methode entwickelt, Mithilfe von digitaler Bildanalyse das Wurzelwachstum von Rapskeimlingen in Abhängigkeit der verfügbaren Aluminiumkonzentration zu quantifizieren. Ziel war, durch nicht-invasive Phänotypisierung des Wurzelsystems, den Aluminium-induzierten Effekt auf Rapspflanzen unter Laborbedingungen zu charakterisieren und neue Screeningsysteme aufzubauen.

Der Forschungsverbund SynRg beabsichtigt, einen interdisziplinären Ansatz zur Optimierung von Wertstoffsynthese, Syntheseort und Weiterverarbeitung für die Nutzung von Pflanzenrohstoffen in Chemie und Energieerzeugung zu starten. Die gesamte Wertschöpfungskette für die Umstellung von petrochemischen auf pflanzliche Grundstoffe soll am Beispiel der Polymere unter dem Aspekt nachhaltigen, d.h. dauerhaften ökonomisch und ökologisch sinnvollen Produktion von Wertstoffen aus nachwachsenden Rohstoffen unter Berücksichtigung der Stoffstromverteilung in Pflanzen in interdisziplinärer Zusammenarbeit untersucht und modifiziert werden, um so neue und innovative Methoden und Verfahren zur Wertstoffgewinnung zu ermitteln. Die inhaltlich abgestimmte Zusammenarbeit von Unternehmen im Verbund mit wissenschaftlichen Instituten garantiert die notwendige Breite, Tiefe und Effizienz. Dabei soll die Optimierung von Pflanzen durch Kontrolle von Zahl und Bildungszeitpunkt der Speicherorgane, die Wertstoffstromverteilung der Polyphenole und Fettsäuren und die Entwicklung und Verbesserung von wirtschaftlichen Verfahren der Züchtung und Biotechnologie zur Bereitstellung von qualitativ hochwertiger und kostengünstiger Biomasse, Inhaltsstoffen und Enzymen im Vordergrund stehen. Bei den Ölpflanzen sollen züchterisch und durch Nutzung der Biodiversität die Gehalte an interessanten Fettsäuren auf möglichst hohe Anteile in den Triglyceriden gebracht werden und die Sequestrierung zwischen Membran und Speicherorganen untersucht werden. Bei den Polyphenolen soll vor allem die Konzentration gesteigert werden bzw. die optimale Kombination aus Gehalt und Aufreinigungsverfahren für diese meist in geringer Menge vorkommenden Stoffe gefunden werden. Eine weitere

Wertsteigerung soll durch Erzeugung von SynRg-Pflanzen erfolgen, die unterschiedliche Nutzungen erlauben (z. B. Energieweizen mit erhöhtem Polyphenolgehalt in der Aleuronschicht). In SynRg sollen von der Saaten-Union Biotec GmbH (SUBIO) sowohl mit einem transgenen als auch mit einem molekularen Ansatz morphologische Ertragsmerkmale bearbeitet werden. Die Entwicklung molekularer Marker und doppelhaploider Linien für die Entwicklung der in SynRg bearbeiteten Zuchtziele ist ebenso neu und ergänzt sich in optimaler Weise mit den biotechnologischen F&E-Programmen von SUBIO.

2. Stand der Technik

Bei zunehmendem Einsatz nachwachsender Rohstoffe in der Industrie stellt sich immer mehr die Frage der Nutzungskonkurrenz zwischen Nahrungsmitteln, Industriechemikalien, Kraftstoffen/Energie. Ferner müssen auch veränderte Rahmenbedingungen der landwirtschaftlichen und industriellen Produktion, die sich beispielsweise aus dem Klimawandel und globaler wirtschaftlicher Veränderungen ergeben, berücksichtigt werden.

Ziel einer Optimierung pflanzlicher Biomasse für die stoffliche Nutzung kann deshalb nicht nur die Fokussierung auf den Wertstoff sein. Vielmehr muss die Produktionseffizienz relativ zum Ressourceneinsatz (z.B. wertstoffspezifische Wasser- und Nährstoffeffizienz) durch Ganzpflanzenoptimierung erhöht werden. Dieser Ansatz beinhaltet sowohl die Steigerung der Konzentration des Wertstoffs im Ernteorgan und der Biomasse insgesamt, als auch die Optimierung der pflanzenbezogenen (z.B. Nährstoffaufnahme und pflanzeninternen Stoffverteilung) und agrarischen (z.B. Nutzung veränderter Vegetationsperioden und Produktion unter geänderten Klimabedingungen) Ressourcennutzungseffizienz. Dabei haben die Pflanzenarchitektur (z.B. Organ- und Fruchtbildung) und ihr Wachstum (z.B. vegetative und reproduktive Phase) großen Einfluss auf die Effizienz der Biosynthesen, der Ernte und den Aufschluss. Architektur, Wachstum und Biosynthesen werden durch die Wirkung von genetischen Regulatoren und Enzymen bestimmt.

Die Untersuchungen zur Regulation der Pflanzenarchitektur bei Arabidopsis als Modellsystem für *Brassicaceen* haben zu einer grundlegenden Kenntnis der molekularen Regulatoren geführt, die Meristemgröße und damit die Organ- und Samenanzahl kontrollieren. So ist bekannt, dass die Stammzellpopulation in Spross- und Blütenmeristemen durch die Interaktionen zwischen den Genen des WUS und CLV Signalwegs kontrolliert wird. Durch Veränderungen der Expressionsstärke dieser Gene, entweder in transgenen Pflanzen oder bei spontan auftretenden oder induzierten Mutationen, lassen sich die Meristementwicklung, Organbildung und Fruchtgröße gezielt verändern. Homologe Regulatorgene wurden aus verschiedenen Spezies isoliert und zum Teil durch Mutanten charakterisiert, d.h. die Funktion dieser Regulatoren ist nicht auf Arabidopsis beschränkt. Methoden zur Genidentifikation, Klonierung, Kartierung und Erzeugung transgener Pflanzen sind im Labor von HHUD, MIPZ und PHY als Routineverfahren etabliert.

In Arabidopsis wird die Transition des vegetativen Wachstums zur Blütenbildung durch viele, zum Teil konservierte, regulatorische Gene kontrolliert, die auch in Brassica-Arten gefunden wurden. Zu diesen Genen zählen die Gene FT und FLC, welche die frühe Blüte als Antwort auf Photoperiode bzw. auf winterliche Temperaturen auslösen. Erhöhte oder verminderte Expression einiger dieser Gene löst eine verfrühte oder verspätete Blüte aus, was wiederum die Zahl der von der Pflanze gebildeten Blätter und typischerweise auch die Zahl der Infloreszenzen und Blüten erhöht. In den letzten fünf Jahren wurden erhebliche Fortschritte bei der Entwicklung und Etablierung von Phänotypisierungs-Methoden, basierend auf nicht-invasiven Sensoren, erzielt. Heute haben meh-

rere Laboratorien Plattformen für die routinemäßige Messung der Pflanzenmerkmale implementiert, die mit erhöhter Biomasse-Produktivität und verbesserter Ressourceneffizienz verbunden sind. Die dynamische Charakterisierung der Spross-Entwicklung und Architektur wird durch digitale Bildbearbeitung (RGB und Chlorophyll Fluoreszenz) erreicht (review Fiorani and Schurr, 2013). Erhebliche Fortschritte sind noch für nicht-invasive (Hochdurchsatz) Messungen der Stamm-Architektur in künstlichen Substraten und im Boden erforderlich. Die vor kurzem erfolgten Entwicklungen der automatisierten Plattformen und speziellen Software für die Analyse von Wurzelarchitektur bieten einzigartige Möglichkeiten, um Pflanzen mit verbesserter Ressourceneffizienz auszuwählen (Postma et al, 2014; Lobet et al., 2013; Nagel et al., 2012).

Die Saaten-Union Biotec GmbH unterstützt die Pflanzenzüchtung bei der Entwicklung von Sorten für die energetische Nutzung (Weizen mit hohem Stärkegehalt, Raps mit hohem Ölgehalt, höhere Erträge, mehr Trockenmasse etc.) durch biotechnologische und molekulare Verfahren. Dazu stehen ausreichend Labor- und Gewächshauskapazitäten und das entsprechende Fachpersonal zur Verfügung. Das Zuchtziel eines hohen Polyphenolgehaltes wurde bei den Gesellschaftern der Saaten-Union Biotec GmbH bei Weizen bisher überhaupt nicht, bei Raps eher in entgegen gesetzter Richtung (Verringerung des Sinapingehaltes im Rapsschrot) beachtet. Die Veränderung des Blühzeitpunkts und der Pflanzenarchitektur mit Genen aus der Modellpflanze *Arabidopsis* in die Nutzpflanze Raps wurde bisher nicht bearbeitet. Die Entwicklung von transgenem Raps wird zurzeit ausschließlich in dem Bereich mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LC-PUFA) und Sinapinverringerng durchgeführt. Die Zusammenarbeit mit der weißen Biotechnologie ist jedoch sehr gering ausgeprägt.

Literatur

- Albani M, Castaings L, Wötzel S, Mateos J, Wunder J, Wang R, Reymond M, Coupland G. 2012. PEP1 of *Arabidopsis* is encoded by two overlapping genes that contribute to natural genetic variation in perennial flowering. *PLoS Genetics* 8:e1003130.
- Allender JA, King GJ. 2010. Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology* 10:54.
- Bäurle, I., and Dean, C. (2006). The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125, 655-664
- Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleissner, R., Wisman, E., Apel, K., and Melzer, S. (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J* 24, 591-599
- Fiorani F, Schurr U (2013). Future scenarios for plant phenotyping. *Annual Review Plant Biology* 64: 267-291.
- Irwin J, et al. (2012) Functional alleles of the flowering time regulator *FRIGIDA* in the *Brassica oleracea* genome. *BMC Plant Biology* 2012, 12:21
- Johanson U, et al. (2000) Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* 290: 344-347.
- Lobet G, Draye X, Périlleux C (2013) An online database for plant image analysis software tools. *Plant Methods* 2013, 9:38 doi:10.1186/1746-4811-9-38
- Lysak MA, Koch MA, Pecinka A, Schubert I. 2005 Chromosome triplication found across the tribe *Brassicaceae*. *Genome Res.* 15:516-525.
- Nagel KA, Putz A, Gilmer F, Heinz K, Fischbach A, Pfeifer J, Faget M, Bloßfeld S, Ernst M, Dimaki C, Kastenholz B, Kleinert AK, Galinski A, Scharr H, Fiorani F, Schurr U (2012) GROWSCREEN-Rhizo is a novel phenotyping robot enabling simultaneous measurements of root and shoot growth for plants grown in soil-filled rhizotrons. *Functional Plant Biology* 39: 891–904.

- Postma J, Schurr U, Fiorani F (2014) Dynamic root growth and architecture responses to limiting nutrient availability: linking physiological models and experimentation. *Biotechnology advances* 32(1), 53–65
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., and Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288, 1613-1616
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Krober, S., Amasino, R.A., and Coupland, G. (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20, 898-912
- Tadege M, Sheldon CC, Helliwell CA, Stoutjesdijk P, Dennis ES, Peacock WJ. 2001. Control of flowering time by FLC orthologues in *Brassica napus*. *Plant J.* 28: 545-53.
- Turck, F., Fornara, F., and Coupland, G. (2008). Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves centre stage. *Annual Review of Plant Biology* 59
- Wang R, Farrona S, Vincent C, Joecker A, Schoof H, Turck F, Alonso-Blanco C, Coupland G, Albani MC. 2009. PEP1 regulates perennial flowering in *Arabidopsis alpina*. *Nature* 459:423-427.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

In TP1 arbeiteten die Projektpartner MPIPZ, HHU, PHY, SU BIO und FZJ in einem aufeinander abgestimmten Verbundprojekt zusammen. MPIPZ und HHU waren dabei finanztechnisch Unterauftragnehmer des Forschungszentrums Jülich. PHY und SU BIO waren eigenständige Projektpartner in TP1. Über den gesamten Projektverlauf wurde zwischen den Partnern sehr eng zusammengearbeitet. Die Partner generierten gemeinsam neue genetische Ansätze und tauschten entsprechende Konstrukte und Pflanzenmaterial miteinander aus, welche dann mit der jeweiligen Expertise des Partners auf seine optimierten Eigenschaften hin untersucht wurden. Alle Partner waren in regelmäßigem Kontakt per E-Mail. Projekttreffen fanden nach Absprache an den Standorten der Partner statt und wurden ausführlich für die Darstellung und Diskussion aller Ergebnisse genutzt. Darüber hinaus hat SUBIO eng mit einem Weizenzüchter kooperiert, um die entwickelten doppelhaploiden gelbmehligen und anthocyanreichen Weizenlinien zu vermehren und weiter charakterisieren zu können.

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

Teilbericht Forschungszentrum Jülich IBG2 (FZJ)

Anpassung / Etablierung von Phänotypisierungssystemen sowie Phänotypisierung und Screening von Kandidaten- und Elitelinien (AP2.2 und 2.3)

1.1. Methodenentwicklung und Optimierung für die nicht-invasive Quantifizierung des Wachstums und der Architektur der wichtigsten Merkmale von SynRG Raps Ziel-genotypen

1.1.1. Wurzelmerkmale: Zur Eignungsprüfung etablierte Verfahren wurden optische Analysen zur Quantifizierung von Architektur von Wurzeln und Wurzelsystemen in Agar mithilfe einer Eigenentwicklung des FZJ (GROWSCREEN-Root) durchgeführt. Die Eignung dieser automatischen Quantifizierung, auch für den Hochdurchsatz, wurde festgestellt. Eine lineare Regression ergab, dass die Wurzellängen mit der automatischen Methode akkurat vermessen werden können ($r^2=0,98$). Die

Gesamtlänge der Primärwurzel, die Gesamtlänge und die Teillängen der Sekundär- und Tertiärwurzeln, Verzweigungsparameter wie die Winkel zwischen Primär – und Sekundärwurzeln und die Dichte der Seitenwurzeln konnten bestimmt werden. Allerdings eignet sich das Verfahren bei größeren Pflanzen wie Raps nur für frühe Wachstumsphasen. Züchter können jedoch auch wichtige Informationen über die Merkmalsausprägung in frühen Entwicklungsphasen nutzen.

1.1.2. Sprossmerkmale: Wachstumsanalysen zur Quantifizierung von Architektur von Blättern, inkl. Blattflächen und Wachstum, sowie Sprossystemen waren auch durch zeitintensive Handvermessungen möglich. Das Funktionsprinzip von sich in der Entwicklung befindenden optischen Methoden und selbstentwickelter Segmentierungssoftware wurde erfolgreich geprüft. Zur Etablierung neuer Verfahren erfolgte die (Weiter)Entwicklung einer neuen optischen Analyse (mit Hard- und Softwareentwicklung) zur Quantifizierung. Die Eignung dieser automatischen Quantifizierung des Sprosswachstums im Hochdurchsatz wurde festgestellt. Das Verfahren eignet sich bei Pflanzen mit einem Größenwachstum wie z.B. Raps nur für frühe Wachstumsphasen (bis etwa 80 cm Pflanzenhöhe). Züchter können jedoch auch wichtige Informationen über die Merkmalsausprägung in frühen Entwicklungsphasen nutzen. In der ersten Phase des Projekts wurde eine der Sommerrapslinien (CH8451/08, Partner SU BIO) mit manuellen und automatischen Messungen umfassend analysiert und dient als Modell sowohl für andere Rapslinien als auch andere zweikeimblättrige Arten (Abb. I.1). Die „Screen-House Spross-Phänotypisierungsplattform“ kombiniert

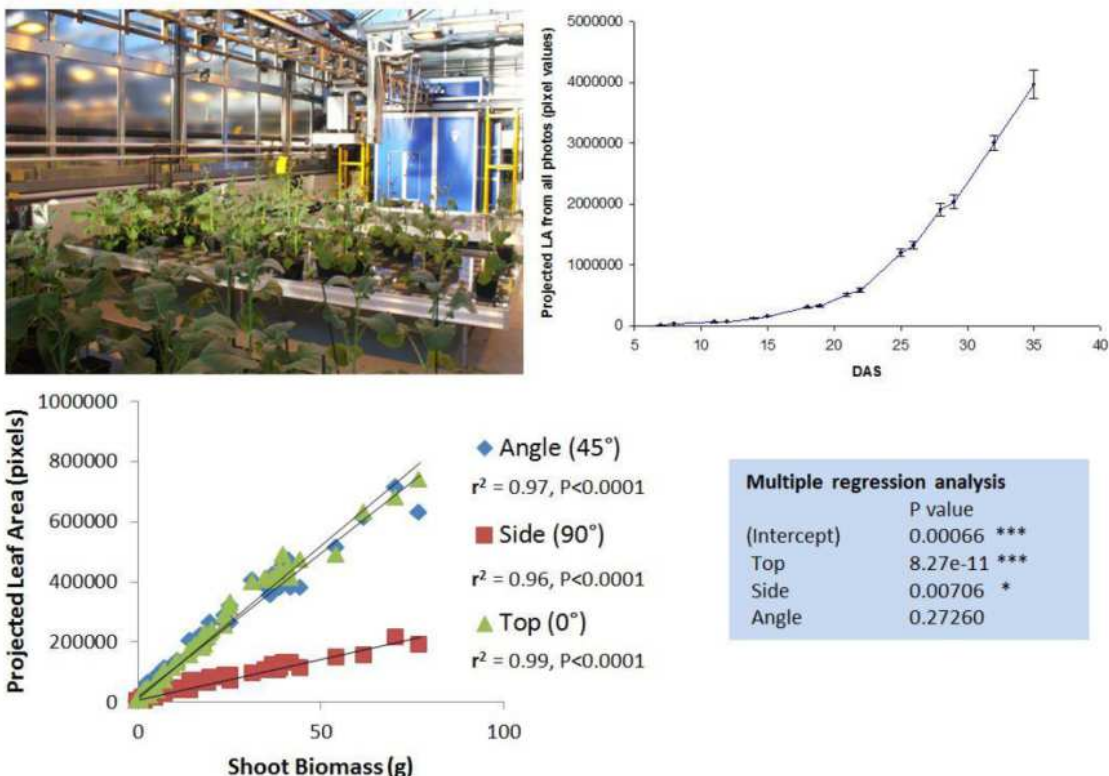


Abbildung I.1. Screen-House Spross-Phänotypisierungsplattform. Pflanzen der SynRg Sommerrapslinie CH8451/08 auf Gewächshaustischen vor der Bildaufnahmestation (oben links). Entwicklung des Spross-Systems während der Wachstumsphase (Tage nach Aussaat/DAS) repräsentiert durch aus den Bildern berechnete projizierte Blattfläche (oben links). Lineare Regression aus Daten zu projizierter Blattfläche von allen drei Kameras und der Sprossbiomasse.

Bildaufnahme- und Verarbeitungstechniken mit einem Pflanzentransportroboter, wodurch die Sproß-Phänotypisierung von in Töpfen wachsenden Pflanzen ermöglicht wird. Die Biomasse-Werte hatten eine signifikante Korrelation (r^2 0,96-0,99) zu den mit den Kameras aufgenommenen Blattflächenwerten (Abb. II.1 unten, links). Die Lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die an der Oberseite (0°) und die im 45° -Winkel angebrachten Kameras für die Analyse von Rapspflanzen am besten geeignet sind. Eine Erfassung der Sprossbiomasse in regelmäßigen Abständen während der Wachstumsphase ist mittels dieser Phänotypisierungsanlage möglich.

Die Dynamik der Raps-Sprossentwicklung konnte auch mit einer Phänotypisierungsplattform, bestehend aus einem Infrarot-Laserscanner mit einer Reflektionskamera (PlantEye, Phenospex N.V.), nicht-invasiv, schnell und automatisiert bestimmt werden. Die SynRg-Rapssorte Lisora (Samen bereitgestellt von SU BIO) und CH8451/08 wurde in kleinen Beständen mit 40 Pflanzen pro m^2 kultiviert, was der Zuchtpraxis in Deutschland entspricht. Eine lineare Regression ergab, dass die Pflanzen mit der automatischen Methode akkurat vermessen werden können ($r^2=0,98$). Die hier vorgestellte, schnell und automatisiert arbeitende Phänotypisierungsmethode kann auch in größeren Pflanzenbeständen eingesetzt werden, so dass sie für die Pflanzenzüchtung geeignet ist.

Als weitere Möglichkeit wurde die nicht-invasive Quantifizierung der Photosyntheseleistung der Pflanzen identifiziert. Hierzu wurde das am FZJ etablierte Mini-PAM Chlorophyll Fluorometer z.B. bei den Rapssorten des Partners SU BIO verwendet, mit welchem 1-Punkt Messungen mit 2-3 Pflanzen pro Minute bzw. Lichtkurven mit 1 Pflanze pro 10-15 Minuten erstellt werden können.

1.2. Screening von Kandidaten- und Elitelinien

1.2.1. *Etablierung einer Screening-Methode zur Charakterisierung der Toleranz von Brassica napus Wurzelwachstum in Reaktion auf hohe Konzentration an Aluminium in der Rhizosphäre:* Im 4. Jahr dieses Projekts wurden dem FZJ *Brassica napus*-Linien durch den TP1-Partner Saaten-Union GmbH zur Verfügung gestellt. Ausgewählt wurden die Genotypen aufgrund ihrer möglichen Toleranz gegenüber hohen Aluminium-Konzentrationen im Boden. Die Raps-Pflanzen wurden in vertikalen Agarplatten kultiviert. Basierend auf Vorversuche mit der Rapssorte Campino wurden Aluminium-

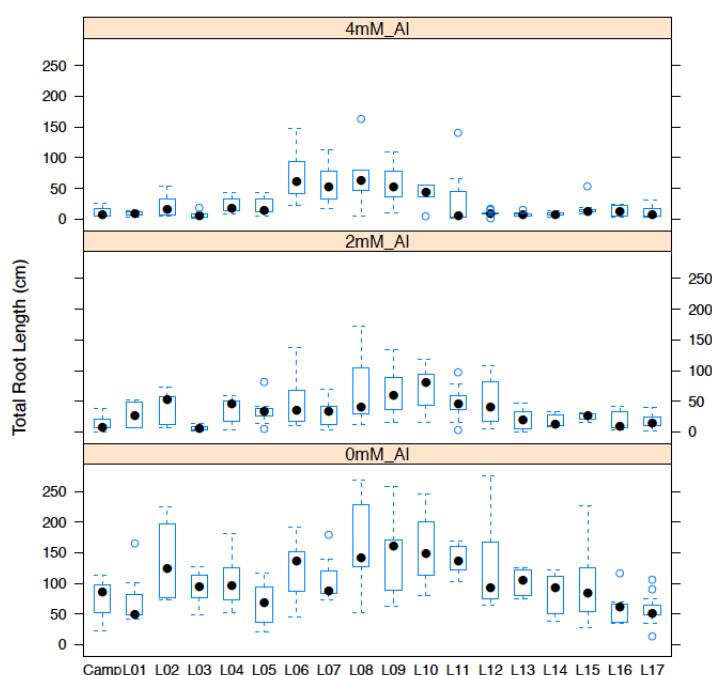


Abbildung I.2. Boxplot: Länge des gesamten Wurzelsystems (cm) von 17 + 1 Raps-Genotypen gemessen 15 Tage nach der Aussaat bei 0, 2 und 4 mM Al ($n>6$).

Konzentrationen von 0, 2 und 4 mM im Agar eingestellt. Die Versuchsanordnung war vollständig randomisiert (4 replizierte Platten mit je 3 Pflanzen pro Genotyp und Behandlung). Die Entwicklung von Rapswurzeln im Agarmedium wurde für 15 Tage verfolgt, wobei in regelmäßigen Abständen Aufnahmen von den Wurzeln gemacht wurden. Aluminiumkonzentrationen (2 und 4 mM) wiesen geringere Wurzellängen verglichen mit der Kontrollgruppe (0 mM) auf (Abb. I.2). Die Architektur des Wurzelsystems wurde ebenfalls beeinflusst: besonders die hohe Aluminiumkonzentration von 4 mM führte nicht nur zu einer Reduktion des Wachstums der Primärwurzel, sondern hemmte auch die Entwicklung der Seitenwurzeln. Die Gesamtwurzellänge der Genotypen L06, L07 und L08, L09 wurde durch 4 mM Aluminium insgesamt weniger stark gehemmt als die Wurzelentwicklung der anderen Rapslinien. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese vier Genotypen tendenziell hohe Aluminiumkonzentrationen im Wachstumsmedium besser tolerieren können.

1.2.2. Phänotypische Analyse des Sprosswachstums der Rapsorte Mozart und der abgeleiteten RNAi-transgenen Linien *Clavata1*, *Clavata2*, *Coryne* und *Erecta*: FZI erhielt transgene Raps-Linien von HHU Düsseldorf, die bezüglich ihres Sprosswachstums phänotypisch analysiert werden sollten. Die Gene *Erecta*, *Clavata1*, *Clavata2* und *Coryne* haben Funktionen in der Morphogenese von Spross und Infloreszenz, so dass zu erwarten ist, dass die RNAi-Linien, in denen die jeweiligen Gene ausgeschaltet sind, Veränderungen im Sprosswachstum aufweisen. Zur phänotypischen Untersuchung der transgenen Rapspflanzen und Referenzen wurden randomisiert die Individuen mit Hilfe der Screenhouse-Phänotypisierungsplattform 2x pro Woche vermessen. Genotyp-abhängig zeigten sich Unterschiede in der Keimrate, wobei insbesondere die *Coryne*-Linie eine niedrige Keimrate (37%) aufwies, während die anderen Transgene nur geringfügig niedrigere Keimraten (88,9 bis 92,6%) hatten als die Hintergrundsorte Mozart (96,3%). Aus den ersten und letzten Größemessungen wurden relative Wachstumsraten für jede Pflanze ermittelt. Diese lagen bei Mozart mit 17,5% d⁻¹ niedriger als bei *Clavata2*-RNAi (18,4% d⁻¹), *Erecta*-RNAi (18,7% d⁻¹), *Clavata1*-RNAi (19,0% d⁻¹) und *Coryne*-RNAi (19,8% d⁻¹). Die Pflanzen wurden 49 Tage nach der Aussaat geerntet und dabei vermessen und gewogen. Zu dieser Zeit hatten alle Genotypen die Hauptinfloreszenz angelegt; diese war bei *Clavata1*-RNAi noch zwischen den obersten Laubblättern verborgen, bei den anderen Genotypen war sie bereits deutlich sichtbar. Übereinstimmend mit den Bild-daten aus der Phänotypisierungsanlage ergaben die Blattflächenmessungen mit dem Leaf Area Meter für *Clavata2* die höchsten Werte (ca. 3000 cm² pro Pflanze), während Mozart und *Coryne*-RNAi mit ca. 2500 cm² pro Pflanze die niedrigsten Werte aufwiesen. *Clavata2*-RNAi hatte das höchste Frisch- und Trockengewicht, *Coryne*-RNAi -Pflanzen waren im Mittel die leichtesten. Wie bei der Blattfläche waren die Unterschiede zwischen den Genotypen im Frisch und Trockengewicht relativ gering; signifikante Unterschiede fanden sich nur zwischen den extremen, d.h. zwischen *Clavata2*-RNAi und *Coryne*-RNAi. Bei *Coryne*-RNAi wurden leicht reduzierte und bei *Erecta*-RNAi erhöhte Blattzahlen festgestellt. Diese phänotypischen Analysen zeigten differentielle Funktionen der untersuchten Gene auf. Die Größe und Biomasse der Pflanzen wurde insbesondere von *Clavata2* beeinflusst. Die Anzahl der Blätter wurde von *Clavata1*, *Coryne* und *Erecta* kontrolliert. Der Zeitpunkt der Knospenbildung wurde von *Clavata1* beeinflusst. Bei allen transgenen Linien war der Anteil der Blattmasse an der Gesamt-Sprossmasse gesteigert, insbesondere bei *Clavata1*.

Teilbericht Phytowelt GreenTechnologies GmbH (PHY)

Entsprechend der Vorhabensbeschreibung umfassen die Aufgaben der Phytowelt (PHY) im Rahmen des TP1 im Wesentlichen die Bereitstellung von molekularbiologischen Dienstleistungen (u.a. Klonierungsarbeiten) für die akademischen Partner. Daneben ist Phytowelt bei SynRg an den Projektteilen Koordination und „Produkte/Anwendungen durch Funktionalisierung/Derivatisierung“ (TP3) beteiligt, deren Ergebnisse in den entsprechenden Zwischenberichten dargestellt werden. Bezüglich TP1 wurden im Berichtszeitraum vom Partner HHU zunächst die Klonierung der regulatorischen Sequenzen der Zielgene *Clavata 1 (CLV1)*, *Clavata 2 (CLV2)*, *Erecta (ER)*, *Coryne (CRN)* und *Jagged Lateral Organs (JLO)* aus *Arabidopsis thaliana* angefordert. Es folgte die Ermittlung der mutmaßlichen Promotorsequenzen der Zielgene. Hierzu wurden die in gängigen Datenbanken vorliegenden Sequenz-Informationen ausgewertet und die vorgelagerten Gene, die intergenischen Regionen sowie evtl. vorliegende untranslatierte Regionen (UTR) der verschiedenen Zielgene bestimmt. Weitere *in silico*-Analysen dienten zur genaueren Eingrenzung der putativen Promotoreregionen. Basierend auf diesen Analysen wurden entsprechende Oligonukleotide (Primer) abgeleitet und, nach Isolierung von genomischer *Arabidopsis*-DNA, erfolgreich zur PCR-Amplifikation und Klonierung der CLV1-, CLV2-, ER- und CRN-Promotorsequenzen eingesetzt. Der JLO-Promotor konnte in wiederholten Experimenten und mit unterschiedlichen Ansätzen nicht erhalten werden. Durchgeführte alternative Ansätze zur Isolation von Teilbereichen des JLO-Promotors blieben ebenfalls erfolglos. Diese Arbeiten wurden eingestellt.

Als Zwischenschritt, und zur Durchführung der Isolierung und Sequenzierung/Analyse, erfolgten die Klonierungen zunächst in bakteriellen Vektoren. Die Verifikation der erhaltenen Konstrukte erfolgte mittels DNA-Sequenzierungen und deren Analyse. Nach Absprache mit HHU wurden Klonierungsarbeiten zur Herstellung von Pflanzenexpressions-Vektoren durchgeführt, in denen die erhaltenen Promotoren transkriptionell mit den Reportergenen Green-Fluorescent-Protein (GFP, Tsien, 1998) bzw. Glucuronidase (GUS) fusioniert sind. Die Klonierungen wurden erfolgreich abgeschlossen und die Konstrukte an HHU übergeben.

Teilbericht Heinrich-Heine-Universität (HHU)

Kontrolle der Samenbildung im Modellsystem *Arabidopsis* und in Raps

Die Anzahl der Samenanlagen (Ovulen) je *Arabidopsis*-Pflanze (ovule number per plant, ONP) hängt von der Anzahl der gebildeten Blüten sowie der Anzahl der Samenanlage je Blüte oder Schote ab (ovule number per silique, ONS) (Abb. II.3). Die ONS wiederum wird durch die maximale Größe der Schote sowie durch den Abstand der Ovulen zueinander kontrolliert.

Um den Mechanismus und die unterliegenden Kontrollgene der Samenbildung bei *Arabidopsis* zu identifizieren, wurde eine Assoziationskartierung durchgeführt. Dabei stand der Abstand der Ovulen (Samenanlagen) im Vordergrund, der letztlich die Anzahl der Samen je Schote und damit einen zentralen Ertragsparameter kontrolliert. Dazu wurden Daten aus verschiedenen Versuchsansätzen miteinander integriert. Untersucht wurden sowohl verschiedene *Arabidopsis* Ökotypen, als auch Mutanten und andere *Arabidopsis*spezies. Eine Voruntersuchung von 96 *Arabidopsis*ökotypen ließ bereits eine starke phänotypische Variation in Bezug auf die Schotenlänge und Ovulenzahl erkennen. Die Ökotypen wurden in einem randomisierten Versuchsansatz mit drei Replikaten bei zwei verschiedenen Temperaturen (bei 16°C und 21°C) in Phytokammern durchgeführt.

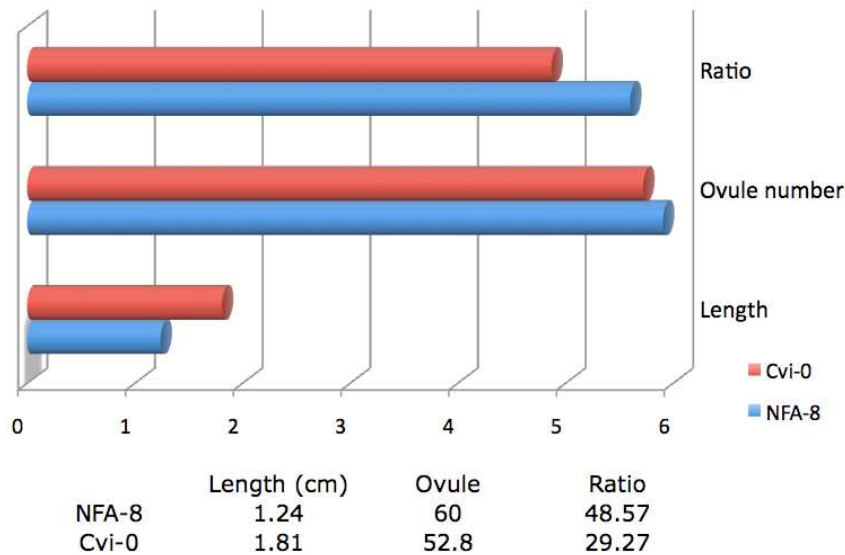


Abbildung I.3. Unterschiede in Samendichte und (Ratio), Samenanzahl (Ovule number) und Schotenlänge zwischen Arabidopsis Ökotypen Cvi und NFA-8. Daten wurden als \log_{10} Werte dargestellt.

Die Phänotypisierung erfolgte an reifen Schoten, wobei für jeden Ökotyp 5 Schoten je Versuchsansatz und Replikat analysiert wurden. Gemessen wurden die Schotenlänge (SL), Ovulenzahl (ON) und die Ovulendichte (ON/SL).

Um die genetische Basis der phänotypischen Variation in der Ovulenzahl aufzudecken, wurden die Phänotypisierungsdaten mit frei verfügbaren Daten zu Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) mittels einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) abgeglichen. Kandidatengene wurden um signifikante SNPs in einer genetischen Region von +/-20 Kilobasen (kB) identifiziert. Diese Untersuchung erbrachte eine erste Liste mit Kandidatengenen, die aufgrund ihrer niedrigen Probabilitätswerte (p-Value) und der ihnen zuzuordnenden Varianz selektiert wurden.

Durch weitere Untersuchungen rekombinanter Inzuchtlinien (RILs) einer Kartierungspopulation von Arabidopsis Cvi x Ler konnten verschiedene chromosomale Regionen eingrenzen werden, in denen Regulatorgene der Samenanzahl, Schotenlänge oder Samendichte (Samenanzahl / cm Schote) kartieren. Den höchsten LOD-Wert zeigte eine Region auf Chromosom 2, wo verschiedene Rezeptorkinase-kodierende Gene kartieren. Durch Untersuchungen an verschiedenen mutanten Arabidopsislinien sowie durch Komplementationsexperimente konnte deren Funktion in der Kontrolle der Samendichte bestätigt werden. Transgene Arabidopsispflanzen, die die entsprechende Rezeptorkinase unter Kontrolle eines plazentaspezifischen Promoters exprimieren, wiesen eine höhere Samendichte bei gleichzeitig geringerer Samengröße auf. Um eventuelle funktionale Effekte dieser Rezeptorkinase auf Wachstum und Entwicklung der Pflanzen speziell im Hinblick auf Meristemgröße zu untersuchen, wurde Pflanzenmaterial an den Projektpartner FZJ zur Validierung und Phänotypisierung weitergegeben. Weiterhin wurden Vektoren zur stabilen Transformation von Raps generiert, die vom Projektpartner SUBIO für Transformationsexperimente eingesetzt wurden. In einem ersten Transformationsansatz wurden dabei gezielt Gene, die die Meristemgröße in Arabidopsis steuern, abreguliert. In transgenen Versuchspflanzen konnten jedoch bei Raps, im Gegensatz zu Arabidopsis, keine starken Wachstumseffekte beobachtet werden. In einem zweiten Versuchsansatz wurden daher transgene Rapspflanzen erzeugt, bei denen Rezeptorkinasefunktionen gezielt in der Plazenta fehlreguliert wurden. Die Evaluation dieser Linien ist zurzeit noch nicht abgeschlossen.

Teilbericht Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung (MPIPZ)

Kandidatengene zur Transformation in *Brassica napus*

Zu Beginn des Projektes wurden interessante Architektur- und Wachstumstypen mit veränderten Blühzeitpunkten festgestellt. Insgesamt wurden fünf Kandidatenlinien in *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis alpina* identifiziert. Der erwünschte Effekt in diesen Linien wurde entweder durch stärkere oder schwächere Expression der Gene *FT* oder *FLC* bzw. *PEP1*, das *A. alpina* Ortholog von *AtFLC*, verursacht. Überexpression des *FT* Gens führt zu früh blühenden Pflanzen, Ausschalten des Gens führt zu verspäteter Blüte bei höherer Biomasse (Kandidatenlinien 2, 3 und 5). Unterdrücken der Expression von *FLC* führt zu früher, Überexpression zu später Blüte bei höherer Biomasse der Pflanze (Kandidatenlinien 1 und 4). Konstrukte mit oben genannten Genen und Funktionen wurden an den Partner SUBIO zur Transformation in Winterraps weitergeleitet (*PEP1* dsRNAi, *SUC2::FT*, genomisches *FT* Konstrukt, *FT* dsRNAi, genomisches *FLC* Konstrukt).

Bei der Pflanzentransformation müssen in einem ersten Schritt homozygote, transgene Linien selektiert werden, welche das Transgen nur einmal in ihr Genom inseriert haben. MPIPZ gab fünf Konstrukte zur Pflanzentransformation an den Partner SUBIO weiter (Tabelle II.1). Nur das *PEP1* dsRNAi sowie das *SUC2::FT* Konstrukt zeigten den erwarteten Effekt (frühe Blüte, Abb. II.4). Die Linien mit den Konstrukten *AtFLC* sowie *AaFT* dsRNAi sollten beide später blühen als die Kontrolle Mozart. Dies konnte jedoch nicht festgestellt werden. Um festzustellen, ob die Pflanzen bei der Blüte größer sind und zahlreichere blühende Seitensprosse besitzen, mussten zunächst homozygote Linien etabliert werden.

Tabelle I.1: An SUBIO weitergegebene Transformationskonstrukte und ihr erwarteter Effekt

Name Konstrukt	Sorte in welche transformiert wurde	erwarteter Effekt
<i>PEP1</i> dsRNAi	Falcon (Winterraps)	frühe Blüte ohne Vernalisierung
<i>SUC2::FT</i>	Falcon (Winterraps)	frühe Blüte ohne Vernalisierung
genomisches <i>FT</i> Konstrukt (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Falcon (Winterraps)	frühe Blüte ohne Vernalisierung
<i>AaFT</i> dsRNAi	Mozart (Sommerraps)	spätere Blüte
genomisches <i>FLC</i> Konstrukt (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Mozart (Sommerraps)	spätere Blüte

Aufgrund des eindeutigen Phänotyps konzentrierte sich die Analyse auf die *PEP1* dsRNAi-Linien. Dieses Konstrukt sollte, eingebracht in die Winterraps-Sorte ‚Falcon‘ (SUBIO), zu einer frühen Blüte ohne Vernalisierung führen. Insgesamt konnten unter den Nachkommen der 3 unabhängigen transgenen Linien 7 homozygote Linien sicher identifiziert werden. Fünf der homozygoten Linien wurden zusammen mit der Sorte ‚Falcon‘ (SUBIO) als Kontrolle weiter kultiviert, um den exakten Blühzeitpunkt anhand von Blattzählungen zu bestimmen. Während die Sorte ‚Falcon‘ ohne Vernalisierung nie zur Blüte kam, blühten die transgenen Linien durchschnittlich mit einer Gesamtzahl von 13 bis 15 Blättern. Dies unterstreicht die Wirksamkeit des Transgens zur Aufhebung der Notwendigkeit zur Vernalisierung und zeigt auch, dass alle 3 unabhängigen transgenen Linien zu ähnlichen Zeitpunkten blühen und es somit keinen merklichen Positionseffekt des Transgens gibt.



Abbildung 1.4: Vergleich Kontrollpflanze Sorte Falcon (mitte) mit Transgenen Rapspflanzen (links und rechts), bei welchen die Notwendigkeit zur Vernalisierung aufgehoben wurde. Links im Bild Sorte Falcon transformiert mit *SUC2::FT*, rechts mit Bild Sorte Falcon transformiert mit *PEP1* dsRNAi.

Erstellung einer BAC-Bank zum Auffinden neuer Gensequenzen

Um Orthologe von bekannten an der Regulation der Blüte beteiligten Genen zu finden, wurde eine BAC Bank der *Brassica napus* Line SynRg 1 (SUBIO) mit dreifacher Genomabdeckung (23,000 Klone mit 140 kB Inserts) sowie Filter erstellt. Hiermit wurden Orthologe von aus *A. thaliana* bekannten Regulatorgenen der Blüte gesucht. In einer ersten Untersuchung der Raps-Transformanten wurde klar, dass das dsRNAi *PEP1* Konstrukt den vermuteten Effekt, nämlich die Ausschaltung der Notwendigkeit zur Überwinterung vor der Blüte, vermittelte. Hierdurch ist es möglich, früher blühenden Raps zu erhalten (frühere Ernte) bzw. durch diese Eigenschaft schneller neue Rapslinien zu züchten. Lange Wartezeiten durch mehrwöchige Kälteperioden fallen weg, so dass eine schnellere Abfolge von Generationen erreicht werden kann. Im Anschluss kann das Transgen durch Kreuzung entfernt, und so wieder ein Winterraps erreicht werden. In *A. thaliana* liegt das *FLC* Gen in einer Kopie im Genom vor. In Raps hingegen sind aufgrund der komplizierteren Evolution des Genoms (Allender und King, 2010) sowie einer ancestralen Triplikation des Genoms (z.B. Lysak et al. 2005) sechs Kopien von *FLC* zu erwarten (zum Vergleich: In der Literatur sind 5 Paraloge für *B. napus* beschrieben (Tadege et al. 2001)). Für den weiteren Verlauf des Projektes war es nun interessant, Sequenzinformationen über die Raps-Orthologe von *FLC* zu erhalten, um auch die Möglichkeit zu besitzen, weiteres Material nach gewünschten Genvarianten zu durchsuchen (z.B. funktional gegenüber nicht funktional). Beim Durchsuchen der BAC Bank mit einer gegen *FLC/PEP1* gerichteten Sonde (Wang et al. 2009) wurden sechs positive Klone identifiziert. Des Weiteren wurden Primer entworfen (basierend auf den von Tadege et al. 2001 publizierten Sequenzen), welche die fünf bekannten *FLC* Paraloge spezifisch amplifizieren können.

Natürliche Variation von *PEP1/FLC* in *A. alpina* und unterschiedlichen Varietäten von *B. napus*
Brassica napus: In *PEP1* ds RNAi Linien kommt es zur frühen Blüte, da die *B. napus* Orthologe von *FLC* nicht mehr exprimiert werden können. In *A. thaliana* sind natürliche Akzessionen bekannt, welche wenig oder kein *FLC* exprimieren und dadurch früher als Akzessionen mit aktivem *FLC* blühen. Unter anderem reguliert *FRIGIDA* (*FRI*) die Expression von *FLC* und ist damit hauptsächlich

verantwortlich für die natürliche Variation des Blühzeitpunktes in *A. thaliana* (Johanson et al. 2000). Auch in *B. napus* und *B. oleracea* scheint *FRI* eine wichtige Rolle in der natürlichen Variation des Blühzeitpunktes zu spielen (Irwin et al. 2012). Daher wurden in Zusammenarbeit mit SUBIO Sequenzen von *FRIGIDA*-Orthologen aus unterschiedlichen Sommer- wie Winterraps-Akzessionen verglichen um festzustellen, ob auch hier die gleichen zuvor beschriebenen (oder neue) mit Unterschieden im Blühzeitpunkt korrelierten Nukleotidpolymorphismen zu finden sind. Für einen Nukleotidpolymorphismus konnte gezeigt werden, dass dieser auch in den 20 bei dem Partner SUBIO verfügbaren *B. napus* Varietäten mit dem Winter- bzw. Sommertyp korreliert. Die für *B. oleracea* beschriebene Deletion (Irwin et al. 2012) konnte in keiner der 20 *B. napus* Akzessionen gefunden werden.

Arabidopsis alpina: *A. alpina* benötigt eine Kälteperiode um zur Blüte zu kommen. Es ist bekannt, dass dieses Verhalten auf die Expression des *FLC* Orthologs *PEP1* zurückzuführen ist (Wang et al. 2009). Weiterhin ist bekannt, dass nicht alle *A. alpina* Akzessionen einen Kältereiz benötigen und dies in Verbindung zu verschiedenen natürlich vorkommenden Allelen von *PEP1* steht (Albani et al. 2012). Das MPIPZ verfügt über eine große Anzahl an Akzessionen von *A. alpina*, welche alle natürlichen Populationen entstammen. Hier wurden Akzessionen identifiziert, welche ohne Kälteperiode blühen können. Kreuzungsversuche mit einem Individuum, welches ein bekanntes mutiertes, nicht-funktionales Allel von *PEP1* trägt (*pep1-1* Mutante, Wang et al. 2009) zeigten, dass in Akzessionen, welche ohne Winter blühen, teilweise ein nicht-funktionales Allel von *PEP1* für den Phänotyp verantwortlich ist. Die Allele wurden sequenziert.

Teilbericht Saaten Union BIOTEC GmbH (SUBIO)

Doppelhaploide gelbmehlige anthocyanreiche Weizenlinien mit verbessertem Ertragspotential

Gelbweizen bzw. gelbes (= β -carotinoid haltiges) Mehl resultiert aus einem höheren Carotinoidgehalt und ist in der Ernährung sehr gefragt. Zusätzlich hat sich ein angenehm aromatischer Geschmack in den Backwaren gezeigt und die Gelbmehle eignen sich zur Herstellung von Ei-freien oder Ei-reduzierten Backwaren (=Diätmehle). Daneben gibt es Purpur-Weizen, der sich durch den hohen Gehalt an Anthocyanen in der Schale des Kornes auszeichnet. Anthocyane wirken als Radikalfänger und die Konzentrationen in Purpurweizen können denen in Rotwein entsprechen. Doppelhaploide Linien aus entsprechendem Kreuzungsmaterial, das im Vorfeld des Projektes erstellt worden war, wurden mittels der Mais-Weizen Methode erstellt. Die Spenderpflanzen der 5 Kreuzungen mit den Sommerweizengenotypen LILA, LUTEUS, SAFRANIA und TYBALT wurden im Oktober 2009 getopft. Während der Kreuzungsphase im Dezember 2009 wurde keine sichtbare Anthocyanfärbung an den Ähren beobachtet. Ende Dezember 2009 bis Mitte Januar 2010 wurden die Embryonen aus den Ähren präpariert und zur Kultivierung in-vitro auf Regenerationsmedium gesetzt. Nach einer guten Regeneration der Keimlinge und anschließender Erdkultur wurde im März 2010 die Colchizinierung durchgeführt. Anschließend konnten 665 Pflänzchen zur weiteren Kultur unter natürlichen Bedingungen ins Versuchsfeld gepflanzt werden (Tab.1). Die restlichen Ähren der Spenderpflanzen wurden geselbstet. Genotyp SUR 328 und SUR 332 zeigten schwarze Körner.

Tabelle I.2: Übersicht über die erzeugten und ausgepflanzten Regenerate

Genotyp	Kreuzung	Anzahl Regenerate	Bemerkung
SUR 328	LILA x TYBALT	142	z.T. anthocyan am in-vitro Regenerat
SUR 329	LUTEUS x TYBALT	120	Teilweise anthocyan am ER-Korn
SUR 330	SAFRANIA x TYBALT	105	Teilweise anthocyan am ER-Korn
SUR 331	LUTEUS x LILA	217	Teilweise anthocyan am Spross
SUR 332	SAFRANIA x LILA	81	z.T. anthocyan am in-vitro Regenerat
SUMME		665	



Abbildung I.5 : Regenerate im Feld

Von den 665 Regeneraten konnten im Sommer 353 doppelhaploide Pflanzen geerntet werden, die im Herbst 2010 als Einzelreihen angelegt wurden. Darüber hinaus wurden parallel 613 F5-Körner über die Single Seed Descent – Methode entwickelt und als Sommerung gesät. Bei beiden Materialgruppen wurde die Aleuronfarbe bonitiert. Für die Kartierung der Gene für Gelbmehligkeit und Luteinbildung wurden im Mai 2010 die Eltern genotypen im Markerlabor angezogen, die DNA isoliert und für das geplante Polymorphismus-Screening vorbereitet. Bei der Auswahl der einzusetzenden Marker konzentrierten wir uns auf publizierte Genorte auf den Chromosomen 1A, 1BS, 2AL, 2AM, 2AS, 3AL, 3BM, 7AL und 7BS. 50 Marker wurden zunächst daraus selektiert, bestellt und auf die Eltern angewendet, um mögliche Polymorphismen zwischen den Eltern identifizieren zu können. 47 der 50 Marker zeigten Fragmente bei den Eltern und es konnten zwischen 5 und 8 polymorphe Marker pro Kreuzung identifiziert werden. Dabei gab es die meisten Polymorphismen auf den Chromosomen 2A und 7A. Bei 3 Markern zeigten die beiden β -Carotinoid - Sorten SAFRANIA und LUTEUS identische Allele, bei 4 Markern zeigte LILA (erhöhter Proanthocyaningehalt) ein anderes Allel als die anderen Sorten.

Tabelle I.3: Finale Populationen, Mehlbonituren und Validation polymorpher SSRs

	Regenerate	Kornfarbe F1	Anzahl DHs	Kornfarbe DH	Mehlbonitur	Poly SSRs
1. Safrania x Tybalt	105	normal	43	normal	21 gelb : 22 weiss	8
2. Luteus x Lila	217	keine über	41	schwarz	2 gelb : 6 inter : 33 weiss	7
3. Safrania x Lila	81	schwarz	6	schwarz	1 gelb : 5 weiss	5
4. Lila x Tybalt	142	schwarz	14	schwarz	0 gelb : 14 weiss	8

Die molekularen Analysen wurden nach Vorliegen der phänotypischen Bonituren der geernteten Pflanzen validiert. Somit liegt SUBIO zum Ende des Projektes 1 Markerassay auf Chromosom 7A zur Vorhersage der Mehlfarbe vor, sofern die Sorte SAFRANIA als Elter eingesetzt wird. Hinsichtlich der Kornfarbe, die zumindest bei den hier eingesetzten Genotypen dominant vererbt wird und somit an alle Nachkommenschaften weitergegeben wurde, ergeben sich erste Hinweise zur molekularen Identifizierung mit einem Markerassay, der auf 7D kartiert, sofern die Sorte LILA einer der Eltern ist. Die generelle Einsatzbarkeit der Marker wird an weiterem Material getestet werden.

Brassica BAC Bank als Ressource für das SynRg Projekt

Beim Partner MPIPZ-Köln liegt eine BAC-Bank der Linie SynRg1 mit dreifacher Genomabdeckung vor (23,000 Klone mit 140 kB Inserts). Es wurden dort auch Filter erstellt, um die Bank durchforschen zu können. Um die Qualität der BAC-Bank abzuschätzen, wurde von SUBIO zusammen mit dem Partner MPIPZ ein Qualitätstest der Bank durchgeführt. SUBIO lieferte zwei Sonden (PCR-Produkte aus Raps) und Primer zu zwei PCR-Markern, die im Raps-Genom dicht beieinander liegen (vermutl. wenige tausend Basen). In Köln wurde die BAC-Bank mit den zwei verschiedenen Sonden beprobt und es konnten 13 positive Klone identifiziert werden, welche durch PCR und anschließende Sequenzierung des Amplikons bestätigt wurden. Die Sequenzen (alle forward) wurden bei uns als einheitlich verifiziert. Die gefundene Anzahl positiver BAC-Klone entspricht etwa der doppelten Anzahl der erwarteten Klone. Die Sonde bindet an einen Bereich, welcher nur einmal im Genom vorhanden ist; bei einer dreifachen Genomabdeckung wurden 3 Kopien aus dem A-Genom und 3 Kopien aus dem C-Genom erwartet. Die Sonden lagen im Genom relativ nah zusammen und hatten beide in 12 von 13 Klonen an die gleichen BACS gebunden; es wären also 6 Klone erwartet worden und nicht 12; 12 Klone wären nur bei sechsfacher Genomabdeckung oder dem Binden der Sonden an unterschiedliche BACs zu erwarten gewesen. Eine weitere Evaluierung und Nutzung der BAC-Bank war zunächst geplant worden. Diese Arbeiten wurden neu in das Projekt aufgenommen und waren eine wichtige Basis für die Erreichung von M 3.7. Die BAC Bank wurde zunächst als eine wichtige genetische Ressource für die weiteren Genkartierungs- und ggf. auch –klonierungsarbeiten mit Bezug auf Ertragsbildung von Raps eingeschätzt. Im Projektverlauf haben wir weitere BAC-Klone vom MPIPZ erhalten, die bei -20°C eingelagert wurden. Eine geplante zweite Screening-Runde wurde jedoch nicht durchgeführt, da zwischenzeitliche Zugang von SUBIO zu proprietären Raps genom Sequenzen möglich wurde. Nun können Genkopien direkt als Sequenz erhalten werden (kein Umweg über BACs mehr notwendig). Eine Evaluierung der BAC-Bank war daher nicht mehr nötig. Mit den proprietären Raps genom sequenzen wurden homologe Gensequenzen für das blührelevante Gen FRI (FRIGIDA homolog zu BnaA.FRI) recherchiert. Positive Sequenzen von 5 Winter- und 5 Sommerrapsen sowie von den Grundartentypen (Rüben, Kohl) wurden aus der nicht-öffentlichen Datenbank gezogen (BLAST) und an den Partner MPIPZ

Köln zur Analyse übergeben. Analoge Arbeiten zu dem Gen FLC (FLOWERING LOCUS C (FLC)) wurden begonnen. Des Weiteren wurden Arbeiten zur Entwicklung eines diagnostischen Markers für die Unterscheidung von Winter- und Sommerraps begonnen. Mittlerweile ist es uns möglich, 90% der genetischen Hintergründe mit dem derzeitigen besten Marker zu unterscheiden. Sowohl ein Mikrosatellitenmarker, als auch ein TaqMan-Assay wurden entwickelt. Die Arbeiten zur weiteren Verbesserung dieser Marker werden fortgesetzt (Zusammenarbeit mit dem MPIPZ). Diese Marker sind sehr nützlich für die beschleunigte Züchtung verbesserter Rapsorten, da „Traits“ im heterozygoten Zustand in SSD Populationen mit Sommerrapsgenotypen „gehalten“ werden können und erst im letzten Schritt wieder in den Winterrapsstyp gekreuzt werden können. Somit kann man mehrere Generationen pro Jahr herstellen und spart Zeit und Kosten, die mit Winterraps grundsätzlich anfallen würden. Des Weiteren kann der Marker für Durchwuchskontrolle verwendet werden.

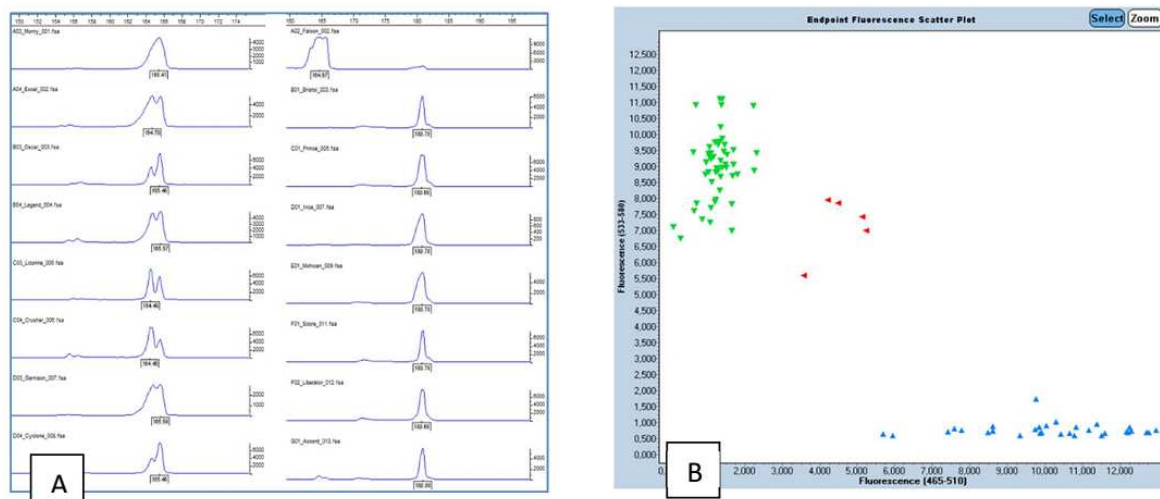


Abbildung. 1.6: Unterscheidung von Winter- Sommerraps durch Längenpolymorphismus (A) und TaqMan Assay (B)

Als dritter Baustein wurden SNP Marker für die Selektion auf hoch oder niedrig ErucaSäure-Gehalt entwickelt. Diese beruhen auf zwei Genen (Fettsäure-Elongasen - FAE). FAE_A08 mit Kopie im A-Genom und FAE_C03 mit Kopie im C-Genom. Ein Marker zur Selektion auf FAE_A08 (auf Kapillarelektrophorese) und zwei Marker zur Selektion auf FAE_C03 (ebenso auf Kapillarelektrophorese) liegen nun vor.

Gene relevant für Regulation der Anzahl von Eizellen/Blüte/Embryogenese:

Vom Projektpartner Uni Düsseldorf wurde eine Liste mit Genen übergeben, die relevant für Regulation der Anzahl von Eizellen/Blüte/Embryogenese bei Arabidopsis sein könnten. Diese Gene könnten auch für die Rapsforschung interessant sein. Für die Identifizierung von zu diesen Sequenzen homologen Genen in Raps wurde die Sequenz-Diversität an Hand von 20 proprietär vorhandenen Shot-Gun Sequenzen (5-10x) von verschiedenen Sommer- und Winterrapslinien untersucht.

```

664_2_73040 → 601 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC·6*C·(2*WOSR)¶
N2_8857902 → 601 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC·10*T¶
8C4_2_222422 → 259 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
8CB_2_287348 → 265 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
8C9_2_304847 → 270 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
8BD_2_55603 → 271 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
6DE_2_97871 → 271 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
A02_9503809 → 601 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
ral_332786 → 271 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
72E_2_260483 → 334 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
8CB_12_3417 → 271 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC·A·iss·ausnahme¶
N12_8_858_53 → 601 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
8CA_12_13527 → 601 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
8C9_12_63989 → 271 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
C2_1465569 → 601 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶
72E_12_22860 → 334 → GAACATCGAGTACTTGAACCTTGTCTGCTACAACTTCCTTGAAGGCCAGCTTC¶

```

Abbildung I.7 : Ein typisches Alignment.

Sichtbar ist der C/T-Polymorphismus auf Chromosom N02 in einem Raps-SequenzAlignment zu einer homologen Arabidopsis-Sequenz zu AT1G65380 (receptor-like protein CLAVATA2). In der Sequenzdatenbank konnte sechsmal das „C“ (davon zweimal bei Winterraps) und in zehn Genotypen das „T“ gefunden werden. Für alle sechs Gene wurde versucht, Alignments für den jeweiligen Genbereich (einige hundert bis wenige tausend Basen) zu erstellen, um SNPs in Raps zu finden. Für YABBY_1 konnten keine sinnvollen SNPs untersucht werden, da es sich hier um eine zu komplexe Genfamilie mit vielen Kopien in Raps handelt. Für alle anderen fünf Gene mit unterschiedlichen Genvarianten (Allelen) mit vielversprechender Allelfrequenz wurden SNP-Marker etabliert und damit ein Diversitätsset untersucht. Die in silico gefundenen SNPs konnten schließlich für die Gene ERECTA, AGL11 und FRIGIDA verifiziert werden (YODA MAPKK monomorph, CLAVATA2 assay failed)

Transformation von Raps

Vom Projektpartner HHU wurden vier Antisense-Konstrukte für die Gene CORYNE, ERECTA, CLAVATA I und II aus *Arabidopsis thaliana* fertig gestellt und im Oktober 2009 übergeben. Die Transformationsarbeiten mit dem Konstrukt SynRg I und II (Coryne und Clavata I) wurden im Herbst 2010 abgeschlossen. Hieraus wurden 51 transgene Linien im Gewächshaus getopft und der Abreife zugeführt. Das Saatgut wurde nach Selbstung der Blütenstände Anfang 2011 geerntet und an den Projektpartner Uni Düsseldorf für weitere Analysen abgegeben. Die Konstrukte SynRg 3 und 4 (Clavata II und Erecta) konnten ebenso erfolgreich in Raps transformiert werden. Eine ausreichend große Zahl putativ transgener Sprosse konnte über Anzucht auf herbizidhaltigem Medium selektiert werden. Diese Sprosse wurden anschließend mittels ELISA auf Transgenität überprüft und zur Selbstung und Abreife in unser Gewächshaus überführt. Von den 76 transgenen Linien konnte Saatgut aus nur 71 Pflanzen geerntet werden, da einige wenige Individuen sich im Gewächshaus nicht weiter entwickelten und abstarben. Das gewonnene Saatgut wird ebenfalls für weitere Analysen an den Projektpartner HHU abgegeben. Von dem Projektpartner MPIPZ (Frau Dr. Kiefer) erhielten wir fünf Konstrukte zur genetischen Transformation in Raps. Es handelte sich dabei um 2 Antisense Konstrukte (PEP1 dsRNAi und FT dsRNAi) und 3 Einfachkonstrukte (SUC2:FT, AaFT und AtFLC). Die Transformationsarbeiten sollten in zwei verschiedenen Rapsformen durchgeführt werden (Sommer oder Winter). Die Arbeiten mit dem Sommergenotyp Mozart und dem Konstrukt AaFT dsRNAi wurden abgeschlossen, und 15 transgene Linien wurden selektiert. Die transgenen Linien reiften im Gewächshaus ab und das Saatgut wurde für weitere Analysen an den Projektpartner abgegeben. Das Konstrukt AtFLC wurde ebenfalls in den Sommergenotyp Mozart transformiert. Die Arbeiten waren nicht so erfolgreich und es konnten nur drei transgene Linien selektiert werden. Diese Pflanzen reiften im Gewächshaus ab und Saatgut steht ebenso zur Verfügung. Das PEP1 dsRNAi Konstrukt sollte die Notwendigkeit der Kälteperiode zur Blühinduktion (Vernalisa-

tion) im Raps aufheben. Dieses Konstrukt konnte erfolgreich in den Wintergenotyp Falcon transformiert werden. Die Anzahl putativ transgener Sprosse nach der Selektion betrug mehr als 70. Diese Sprosse wurden anschließend mittels ELISA überprüft und 45 transgene Linien zur Abreife ins Gewächshaus gebracht. Die restlichen Linien blieben im Labor als Reserve für eine spätere Vernalisation beim Scheitern des transgenen Ansatzes. Der Erfolg des Ansatzes konnte bestätigt werden, als 20% der nicht vernalisierten Pflanzen zu Blühen begannen. Diese bildeten später Schoten und setzten Saatgut an. Weitere fünf Pflanzen zeigten Knospenbildung aber bisher wurde keine offene Blüte beobachtet. Das Konstrukt SUC2:FT wurde ebenfalls in den Wintergenotyp Falcon transformiert. Aus dieser Transformationsserie konnten 20 transgene Linien selektiert werden. Diese Linien wurden im Gewächshaus getopft und anschließend einer Kälteperiode unterzogen. Das FT-Gen sollte zu früherer Blüte von Winterraps führen. Das Experiment ist noch nicht abgeschlossen. Somit konnte der Meilenstein M3.1 erreicht werden. Das gesamte oben beschriebene Material wurde den Partner für weitere Analysen zur Verfügung gestellt. Einzelne positiv charakterisierte Linien könnten bei SUBIO weiter vermehrt werden. Dazu sind jedoch zunächst die weiteren Untersuchungen der Partner an dem Material abzuwarten.

2. Verwertung

Die von FZJ bereitgestellten Technologien haben das Potential, in Zucht- und Forschungsaktivitäten von Unternehmen wie SUBIO und anderen eingegliedert zu werden. Jegliches konventionelles Material bei Raps und Weizen wird unmittelbar in die Sortenentwicklung einfließen können. Dabei sind insbesondere die Zuchtziele Kombination von Fettsäuregehalten mit verbesserten agronomischen Merkmalen und die Veränderung des Wuchstypes (Idiotyp) bei Raps von besonderer Bedeutung. Eine wissenschaftliche Anschlussfähigkeit ist dann jederzeit gegeben (auch für F&E-Ansätze bei anderen Kulturarten).

Die vom FZJ weiterentwickelten und optimierten Phänotypisierungstechnologien werden in wissenschaftlichen und industriellen Forschungsprojekten, gemeinsam mit externen Partnern, verwendet. Daten und Gene (erzeugte Transformationskonstrukte) zur möglichen Ertragssteigerung oder Verkürzung von Produktions- oder Züchtungszeiträumen werden durch den Partner SUBIO hinsichtlich einer (kommerziellen) Nutzung in Agrarpflanzen z.B. in Raps analysiert. Die aus *B. napus* DNA (Linie SynRg1, SUBIO) erstellte BAC-Bank wurde auch SUBIO und HHU für ihre Forschung sowohl innerhalb als auch teilweise außerhalb des Projektes zur Verfügung gestellt. Die erhaltenen Sequenzdaten zu den Orthologen des Arabidopsis Blührepressors FLC aus der Brassica Linien SynRg 1 (Sommerraps) und Falcon (Winterraps) wurden nach Punktmutationen durchsucht, welche die Unterschiede in Bezug auf die Notwendigkeit zur Vernalisierung erklären könnten. Die Auswertung wurde an SUBIO weitergereicht, um bereits bestehendes Material zu durchsuchen und feststellen zu können, ob dies ein generelles Muster zur Unterscheidung von Sommer- und Winterraps ist. Die im Rahmen des Projektes erhaltenen Gensequenzen und transgenen Pflanzen sowie die aus Material von SUBIO erstellte BAC-Bank werden weiterhin als Ressource eingesetzt. Die Aussichten für eine erfolgreiche Fortführung und/ oder Implementierung der gewonnenen Daten und Technologien wird als hoch eingeschätzt. Interessierte Anfragen aus Akademie und Wirtschaft liegen bereits vor.

Mit einer Erfindung oder Schutzrechtsanmeldung der von SUBIO etablierten molekularen Markerassays ist nicht zu rechnen, da diese als Betriebsgeheimnisse von SUBIO geführt werden. Die drei funktionierenden SNP-Marker für die Gene ERECTA, AGL11 und FRIGIDA sind sehr gut für

die Erweiterung des SUBIO Raps-Marker-Portfolios zu gebrauchen. Diese Marker werden zukünftig in Kombination mit einigen SSR-Markern für Studien zur genetischen Distanz, Sortenidentität und marker-assisted Backcrossing eingesetzt. Der Nachweis konkreter Markerallele auf Ertrag oder Ertragsstabilität konnte im Rahmen von SynRG nicht geleistet werden, jedoch können diese Daten/Marker in zukünftige Studien zur Genetik des Merkmals Ertrag einfließen. Die neuen Raps-Ölqualitäten werden eine ganze Reihe von positiven Effekten haben. Ein solches Öl kann als Grundlage zur Entwicklung von speziellen Präparaten dienen oder als Bestandteil weiter verarbeiteter Lebensmittel vermarktet werden. Der Nutzen einer heimischen und nachwachsenden Quelle für hochwertiges pflanzliches Fett stellt für den Standort Deutschland einen entscheidenden Vorteil dar. Mittlerweile ist es den SUBIO angeschlossenen Rapszüchtern gelungen, verbesserte Hocherucasre.-Rapsorten zu züchten. Des Weiteren stehen für die markergestützte Selektion geeignete Marker für Erucasre. Allele zur Verfügung, so dass sich die Züchtung hier schneller und effizienter durchführen lässt. Der Erucasre.-Rapsmarkt ist ein stabiler aber kleiner zusätzlicher Markt. Zusätzliche Nutzungsschienen für Erucasre. in der Polymerherstellung wären dringend erforderlich. Die Saaten-Union BIOTEC GmbH schätzt die Erfolgsaussichten nach Projektende im Bereich der genetischen Transformation und der Produktion neuer homozygoten Linien (sowohl bei Raps, als auch bei Weizen) als sehr aussichtsreich ein. Die in SynRG durchgeführten Markerentwicklungen und die Arbeiten an der SYNRG-BAC-Bibliothek sind für SUBIO wichtige genetische Ressourcen und genomische Werkzeuge, um die sprunghaft ansteigenden Markeranwendungen in der Rapszüchtung noch weiter zu steigern und um diese dann in nützliche Markerapplikationen für die Züchtungsprozesse der angeschlossenen Rapszüchter umzuwandeln. Als Perspektive für eine Markteinführung der neu erzeugten Ölqualitäten ergibt sich ein Zeitraum von etwa 10 Jahren nach Projektbeginn. Die Techniken zur Transformation werden durch internationale Forschungstätigkeit immer präziser, sicherer und effizienter. Durch die Etablierung dieser Techniken besteht für die Saaten-Union Biotec GmbH die Aussicht, als Dienstleister im Bereich der genetischen Transformation aufzutreten. Die Erstellung neuer DHs bei Weizen (auch Spezialitäten wie Gelbmehligkeit und Buntweizen) werden zunehmen. Neue aus Arabidopsis klonierte Gene sollen in einer neuen Phase in Raps transformiert werden und deren Effekte auf ertragsrelevante Merkmale bei Raps untersucht werden.

3. Erkenntnisse von Dritten

Während des Projektes wurden neue Erkenntnisse zur Variabilität und Evolution des Zielgens *BnFLC* und seiner Paraloge gewonnen (Zou et al. 2012). Auch wurden neue Erkenntnisse bezüglich des *B. napus* Orthologs *FRIGIDA* gewonnen, welches an der Regulation von *FLC* beteiligt ist (Irwin et al. 2012). Des Weiteren wurden ausserhalb des Projektes weitere nicht-funktionale Allele des *FLC* Orthologs *PEP1* in wilden Akzessionen von *A. alpina* beschrieben (Albani et al. 2012). Khlestkina et. al. (2014) hat das Gen Pp3 auf dem Chromosom 2A in Weizen isoliert und hinsichtlich der Funktion untersucht. Es trägt wesentlich zur Aktivierung der Anthocyan-Biosynthese zusammen mit dem Gen Pp-1 bei. Dabei ist davon auszugehen, dass in diesen beiden Genen eine allelische Diversität vorhanden ist, was bei weiterführenden Arbeiten berücksichtigt werden soll. Im Wesentlichen könnte es sich bei den bei SUBIO gefundenen polymorphen Markern um eng mit diesen Genen gekoppelte Marker handeln.

- Albani M, Castaings L, Wötzel S, Mateos J, Wunder J, Wang R, Reymond M, Coupland G. 2012. *PEP1* of *Arabidopsis thaliana* Is Encoded by Two Overlapping Genes That Contribute to Natural Genetic Variation in Perennial Flowering *PLoS Genetics* 8:e1003130.
- Irwin J, et al. (2012) Functional alleles of the flowering time regulator *FRIGIDA* in the *Brassica oleracea* genome. *BMC Plant Biology* 2012, 12:21
- Zou X, Suppanz I, Raman H, Hou J, Wang J, et al. (2012) Comparative Analysis of *FLC* Homologues in Brassicaceae Provides Insight into Their Role in the Evolution of Oilseed Rape. *PLoS ONE* 7(9): e45751. doi: 10.1371/journal.pone.0045751
- Khlestkina et al (2014): Purple-grained wheat: Genetic control, molecular mechanisms and practical value; EUCARPIA Cereal Section ITMI Conference, Wernigerode, Germany

4. Veröffentlichungen

Publikationen

- Dimaki C, Jansen M, Nagel KA, Fiorani F, Schurr U (2011) Imaging based Cereals Shoot and Root Phenotyping Research at the Jülich Plant Phenotyping Centre (JPPC). Paper presented at the EWAC-EUCARPIA Cereals Section Conference, Novi Sad,
- Jansen M, Gilmer F, Biskup B, Nagel KA, Rascher U, Fischbach A, Briem S, Dreissen G, Tittmann S, Braun S, De Jaeger I, Metzlauff M, Schurr U, Scharr H, Walter A (2009) Simultaneous phenotyping of leaf growth and chlorophyll fluorescence via GROWSCREEN FLUORO allows detection of stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* and other rosette plants. *Functional Plant Biology* 36 (11):902-914. doi:doi:10.1071/FP09095
- Jansen M, Pinto F, Nagel KA, Dusschoten D, Fiorani F, Rascher U, Schneider HU, Walter A, Schurr U (2014) Non-invasive Phenotyping Methodologies Enable the Accurate Characterization of Growth and Performance of Shoots and Roots. In: Tuberosa R, Graner A, Frison E (eds) *Genomics of Plant Genetic Resources*. Springer Netherlands, pp 173-206. doi:10.1007/978-94-007-7572-5_8
- Nagel KA, Putz A, Gilmer F, Heinz K, Fischbach A, Pfeifer J, Faget M, Blossfeld S, Ernst M, Dimaki C, Kastenholz B, Kleinert AK, Galinski A, Scharr H, Fiorani F, Schurr U (2012) GROWSCREEN-Rhizo is a novel phenotyping robot enabling simultaneous measurements of root and shoot growth for plants grown in soil-filled rhizotrons. *Functional Plant Biology* 39 (10-11):891-904. doi:10.1071/fp12023
- P. Welters et al. (2012) *Forschungsverbund SynRg: Hochwertige Kunststoffe aus nachwachsenden Rohstoffen*, *BIOspektrum* 5/2012; S. 550ff

Vorträge

- Prof. Dr. u. Schurr, Dr. A.Müller, Dr. K. Suck, SynRg– Biotechnologisch unterstützte Steigerung von Ertrag und Ertragsstabilität von Kulturpflanzen zur Bereitstellung nachwachsender Rohstoffe
Jahrestagung ProcessNet und Dechema Biotechnologie, Eurogress Aachen, 23.09.2010
- Dr. J. Weyen SynRg - Wertsteigerung der Pflanze, IHK, Detmold, 02.09.2013

Internet

- Forschungsverbund: SynRg, Teilvorhaben3: <http://www.synrgcluster.de/teilv3.html>

Teilprojekt 2

I. Ziele

1. Aufgabenstellung

Mittlere Teil der Wertschöpfungskette – Verfahren und Prozesse zur Ernte, zum Aufschluss und zur Aufreinigung

Projektpartner: Technische Universität Kaiserslautern (TUKL), Clariant Produkte (Deutschland) GmbH (vormals Süd-Chemie AG) (Süd-CH), GEA Westfalia Group GmbH (vormals GEA Westfalia Separator Process GmbH) (GEA), ATB; CLAAS (beratend), ICT, PPM, KLEE, UMSICHT

Um Pflanzenbiomasse differenziell und komplett (Ganzpflanzennutzung) verwerten zu können, ist es nach optimaler Ernte notwendig, innovative Aufschluss- und Trennverfahren zur verbesserten Biomassebereitstellung/-konditionierung zu entwickeln. Bei der Thematik Ernte erscheint eine Neukonzipierung von Erntegeräten nicht erforderlich, wird jedoch für die zweite Hälfte des Projektes in Betracht gezogen, wenn die ersten Ergebnisse bzgl. des Wertstoffstroms vorliegen. Um jedoch die Wertschöpfungskette nicht nur von akademischer Seite, sondern auch auf Industrieseite durchgängig darstellen zu können, hat sich CLAAS bereit erklärt die Projekte beratend zu begleiten.

Für die Fettsäuren setzt sich SynRg zum Ziel, im Bereich der Wertstoffgewinnung und Aufreinigung Verfahren zu untersuchen und zu optimieren, die die ganzheitliche Nutzung der Pflanzen berücksichtigen. Hierzu müssen sämtliche Nutzungspfade für Produkte und Nebenprodukte einschließlich der erforderlichen Prozesse definiert und anschließend unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten bewertet werden. Zunächst werden die Partner (ATB, UMSICHT, PPM, CLARIANT/Süd-CH, GEA (WS)) das bereit gestellte Pflanzenmaterial (Raps, Sonnenblumen z.B. von SURL) aufarbeiten und daraus die benötigten Öle und Polyphenole gewinnen. In diesem Zusammenhang soll nicht nur die Wertstoffgewinnung aus den wertstoffreichen Pflanzenteilen, sondern insbesondere auch aus der bei der Ernte anfallenden „Restfraktion“ erfolgen. Die hierzu erforderlichen Aufschluss- und Extraktionsverfahren sollen fortentwickelt und die verschiedenen Verfahren der einzelnen Partner miteinander verglichen werden, um die ökologisch und ökonomisch sinnvollste Methode zu finden. Hierbei kann die Bereitstellung neuartiger Extraktionsmethoden auf Basis des Einsatzes von natürlichen und synthetischen Tönen (CLARIANT/Süd-CH) oder mit überkritischen Fluiden (UMSICHT) einen innovativen Beitrag leisten. Informationen über Verbesserungen der Pflanzenmaterialien zur Optimierung der Aufschluss- und Extraktionsverfahren werden an die Partner des ersten Teils übermittelt. Auch die bei der Ölgewinnung anfallenden Feststofffraktionen sollen hinsichtlich ihres Wertstoffgehaltes untersucht und aufgearbeitet werden, da sie immer noch einen erheblichen Anteil an interessanten Inhaltsstoffen aufweisen. Mit Hilfe von Extraktionstechniken (Wasser, organische Lösemittel (PPM, GEA (WS)), mit überkritischen Fluiden (UMSICHT) und Adsorption (CLARIANT/Süd-Chemie) ist es möglich, auch diese Wertstoffe zu gewinnen und einer weiteren Nutzung zu zuführen. Größere Mengen von Ölen und Feststoffen können von KLEE/GEA (WS) für großtechnische Versuche in Pilotanlagen zur Verfügung gestellt werden.

Aus den gewonnenen Ölen sollen die freien Fettsäuren oder die entsprechenden Fettsäureester durch chemische oder enzymatische Konversion (PPM, TUKL, CLARIANT/Süd-Ch) gewonnen werden. Im Bereich der Ölhydrolyse soll die Möglichkeit des Einsatzes immobilisierter Enzyme untersucht, die möglichen Enzyme hierfür gescreent und die Verfahren bewertet werden (TUKL). Anschließend erfolgt die Aufreinigung und Fraktionierung der aus der Fettspaltung von Rapsöl bzw. auch Sonnenblumenöl stammenden Gemische. Hierbei soll nicht nur die Trennung der Ester- von

der Restölphase sondern im Wesentlichen die Fraktionierung der Esterphase durchgeführt werden (UMSICHT). PPM untersucht das Verfahren der Kristallisation der Fettsäuresalze. Dabei soll das bekannte Verfahren dahingehend verbessert werden, dass anstelle von Schwermetallsalzen preiswerte und unbedenklich verwendbare Leichtmetallsalze eingesetzt werden. Ziel ist es, EVONIK, TUM und ICT (und der FH-OOW), die sich mit der Weiterverarbeitung insbesondere der Ölsäureester befassen, Produkte in entsprechender Reinheit zur Verfügung zu stellen. Für eine erfolgreiche Bearbeitung verfügt UMSICHT neben dem erforderlichen Know-how auch über entsprechende Labor- und Technikumsanlagen der mechanischen und thermischen Verfahrenstechnik sowie der Reaktionstechnik. Analog wird CLARIANT/Süd-CH im Themenbereich „Polyphenole“ neue Prozesse zur Aufreinigung und Separation von Polyphenolen aus Trauben und Weizen einbringen. Die Auftrennung und/oder Aufreinigung der Polyphenole soll in Zusammenarbeit mit der TUKL erfolgen. Diese Prozesse sollen u.a. auf einem Einsatz von Adsorbentien der CLARIANT/Süd-CH basieren und mit den anderen untersuchten Prozessen kombiniert und verglichen werden (UMSICHT). Hierzu sollen einerseits natürliche Tonminerale, andererseits synthetische Hydrotalcite (kationische Tone) auf ihre Eignung untersucht werden. Falls erforderlich, sollen diese Materialien noch oberflächenmodifiziert werden. Der Einsatz von natürlichen Tonmaterialien ist sowohl unter dem Gesichtspunkt der Nachhaltigkeit als auch der Kosten interessant.

Ein Schwerpunkt soll die Anpassung vielversprechender Adsorbentien an die von den Partnern favorisierten industriellen Prozesse wie z. B. Säulenpackungen oder Ultrafiltrationsverfahren darstellen. Hierzu gehören auch die Herstellung der Adsorbentien im Technikumsmaßstab und im industriellen Maßstab sowie eine Beteiligung an Produktionsversuchen.

Ein ebenfalls übergreifender Ansatz nutzt Phytowelts (PHY) Expertise in molekularer Pflanzenbiotechnologie und Biodiversität. Hier erfolgt die Entwicklung genereller Verfahren, um unerwünschte Produkte (Gifte oder Seitenprodukte) zu entfernen oder während der Lagerung in den Pflanzen ablaufender unerwünschter Reaktionen zu unterbinden. Hier sollen Verfahren entwickelt werden, um z.B. Enzyme wie im Rohmaterial unerwünschte Polyphenoxidasen (PPOs) zu hemmen und dadurch den vorzeitigen/ungewollten Abbau von Polyphenolen und Fettsäuren zu unterbinden, oder während der Aufreinigung freigesetzte Nebenprodukte und Giftstoffe über geeignete enzymatische Reaktionen abzubauen (TUKL). Hierdurch entstehen Querverbindungen zu SUBIO, zu TUM (Recherche und Expression von neuartigen Enzymen transient in Pflanzen) und zu den für Aufschluss und Aufreinigung zuständigen Projektpartnern (TUKL, PPM, UMSICHT, ICT, ATB), aber auch zu Aktivitäten bei bei PHY.

Die sich anschließenden (Bio)Konversionsprozesse inklusive der nachfolgenden Produkt-aufarbeitung müssen im Einklang mit den Verarbeitungseigenschaften als Gesamttechnologie optimiert und in den technischen Maßstab (scale-up) überführt werden. Die ersten Schritte der Aufbereitung sollten so robust sein, dass sie möglichst feldnah in modularen Systemen eingesetzt werden können und erste Primärprodukte liefern, die kosteneffizient zur jeweils weiteren Verarbeitung transportiert werden können. ATB bietet die Möglichkeit, eine Reihe der Prozesse des Vorhabens im Maßstab einer Pilotanlage durchzuführen, um Daten für die Maßstabsübertragung zu erfassen und die praktische Bestätigung von Modelllösungen für nachhaltige Gesamtkonzepte zur stofflichen und energetischen Nutzung von landwirtschaftlichen Rohstoffen zu liefern. Diese und andere in diesem Teilprojekt erhobenen Daten fließen in das geplante Steuerungstool (Datenbank) ein (AP1).

2. Stand der Technik

Wie eingangs dargestellt zielt das Projekt SynRg auf eine Ganzpflanzenoptimierung ab mit den speziellen Zielen der Steigerung der Gewinnung des Primärmetaboliten Fettsäure und des Sekundärmetaboliten Polyphenol, der Entwicklung geeigneter Technologien zu ihrer optimalen Gewinnung und Aufarbeitung sowie der Entwicklung hochwertiger Polymere auf Basis dieser Rohstoffe.

Fettsäuren sind langkettige Carbonsäuren, deren C-Zahl bei einheimischen Pflanzen in der Regel oberhalb 10 liegt und eine gerade Anzahl von C-Atomen aufweist. Sie werden in der Zelle aus einem C2-Baustein, aktivierter Essigsäure, gebildet. Gespeichert werden sie in Form von Fetten und Ölen. Fette und Öle sind sog. Triglyzeride oder Triacylglyzeride (TAG), bei denen drei Fettsäuren mit Propantriol (Glycerin) verestert sind. In Abhängigkeit vom biogenen Rohstoff variieren die Fettsäuren hinsichtlich Kettenlänge, Anzahl von Doppelbindungen und ggf. Anwesenheit spezieller funktioneller Gruppen. Fette und Öle können relativ leicht aus Pflanzenmaterial extrahiert werden und können/werden zur Gewinnung freier Fettsäuren eingesetzt, aus denen sich wiederum ein vielversprechendes Monomerangebot ableiten lässt. Dabei sind u.a. α,ω -bifunktionale Monomere von Interesse, um z.B. Polymere aufzubauen. α,ω -Dicarbonsäuren sind vielseitige chemische Zwischenprodukte, die als Rohstoffe für die Herstellung von Parfüm, Polymeren, Klebstoffen oder Macrolid-Antibiotika dienen. Die Synthese von α,ω -Dicarbonsäuren aus Fettsäuren kann sowohl biotechnologisch mittels Hefen als auch chemisch z.B. mittels Metathese oder Ozonolyse erfolgen [1]. Dabei stehen zwei Aspekte im Mittelpunkt des Nutzungskonzeptes. Am Beispiel Polyamide konnte gezeigt werden, dass bereits der Zusatz kleiner Mengen an linear langkettiger Dicarbonsäuren das Eigenschaftsspektrum wesentlich verändert, wobei eine ausgeprägtere Hydrophobie und Änderungen der thermischen Parameter in erster Linie zu nennen sind. Aufgrund der geringeren Wasseraufnahme im Vergleich zu kurzkettigen Polyamiden verändert sich die Dichte nur geringfügig, so dass sich das Volumen der Bauteile nur wenig ändert. Diese Eigenschaft hat eine hohe Maßhaltigkeit der Bauteile zur Folge, was Anwendungen über extreme Feuchtigkeitsbereiche erschließt. Dies ist ein wichtiges Alleinstellungsmerkmal der im Projekt behandelten langkettigen Spezialpolyamide. Derartige Eigenschaftsverbesserungen können z. B. durch die Herstellung von Co-Polymeren oder durch Blenden unterschiedlicher Polyamide erzielt werden.

Polyphenole sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die zwei oder mehrfach hydroxylierte aromatische Ringstrukturen enthalten. Sie werden in der Regel über den Phenylpropanstoffwechsel von der Pflanze synthetisiert. Innerhalb der Pflanze ist ihre Funktion bislang nicht abschließend geklärt. Sie kommen in Pflanzen als Farbstoffe, Geschmacksstoffe und Tannine vor. Daneben weisen sie antioxidative und antimikrobielle Eigenschaften auf und sorgen in der Pflanze für eine erhöhte Stabilität, indem sie die ebenfalls (ganz oder teilweise) aus Polyphenolen aufgebauten Biopolymere Lignin und Suberin mit den Polysacchariden der Zellwand verknüpfen (Abbildung II. 1). Eben diese Fähigkeit zur Vernetzung von zwei Molekülen kann für die Funktionalisierung von Polymeren auf Fettsäurebasis genutzt werden.

[1] M. A. R. Meier, J. O. Metzger, U. S. Schubert, Chem. Soc. Rev. 2007, 36, 1788-1802

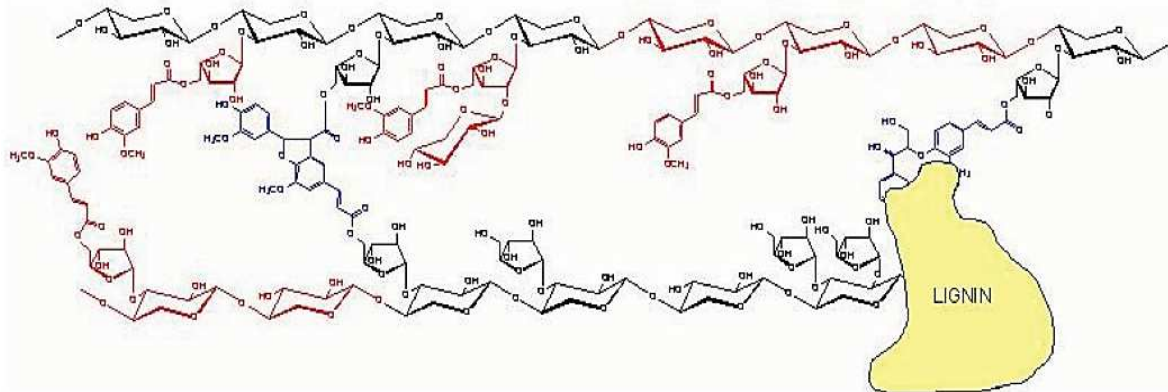


Abbildung II. 1: Zellwand Roggen: das Polyphenol Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure Einheit in den rot und blau dargestellten Bereichen) verknüpft die Polysaccharide (schwarz) mit dem Lignin (gelb).

Die Aufarbeitung der Rohstoffe ist ein weiterer wesentlicher Teil der Wertschöpfungskette. Deshalb beschäftigt sich das Teilprojekt 2 mit Verfahren und Prozessen zum Aufschluss und zur Extraktion des Pflanzenmaterials und zur Aufreinigung der Rohstoffe. Die ersten Schritte der Aufbereitung sollten so robust sein, dass sie möglichst feldnah in modularen Systemen eingesetzt werden können und erste Primärprodukte liefern, die kosteneffizient zur jeweils weiteren Verarbeitung transportiert werden können. Ausgehend von unterschiedlichen Komponenten der Pflanzen (Lignocellulose, Zucker, Stärke, Fasern, Proteine etc.) kann mittels geeigneter biotechnologischer Verfahren eine breite Palette an Sekundärprodukten bereitgestellt werden. In Abhängigkeit vom mengenmäßigen Aufkommen an Biomasse können entweder dezentrale Konzepte oder aber clusterartige Industriestrukturen entwickelt werden. Neben dem Aspekt der Ganzpflanzenverwertung spielt die nahezu rückstandsfreie und vollständige Verwertung aller anfallenden Rest- sowie Abfallstoffe eine entscheidende Rolle, um über möglichst hochwertige Koppelprodukte eine zusätzliche Wertschöpfung zu erzielen.

Um Fettsäuren zu gewinnen, müssen zunächst die Fette und Öle aus dem biogenen Rohstoff extrahiert werden. In der Regel erfolgt die Ölgewinnung dabei über die Verfahren Konditionierung mit anschließender mechanischer Pressung, Lösungsmittelextraktion des Presskuchens und Raffination der Press- und Extraktionsrohöle. Diese Verfahren stellen Standardverfahren bei der Ölgewinnung u. a. auch zur Biodieselherstellung dar. Die dabei anfallenden Reststofffraktionen (Presskuchen bzw. Extraktionsschrote) werden in der Regel als Futtermittel weiterverwendet. Durch den Einsatz von Enzymen in den wässrigen, mechanisch teilaufgeschlossenen Pflanzenbestandteilen kann eine Verbesserung der Extraktionseigenschaften erreicht werden. So können nach aktuellem Stand der Technik neben dem Einsatz von Cellulasen und Glucosidasen zur Destabilisierung der Zellwände

auch Amylasen zur Auflösung der Stärkematrix innerhalb eines Saatkorns und somit einer Steigerung des extrahierbaren Öls verwendet werden [2, 3]. Die Immobilisierung von Enzymen auf unterschiedlichen Trägern für deren Rückgewinnung kann als Stand der Technik angesehen werden [4, 5, 6, 7].

Bei der anschließenden Fettsäuregewinnung sind die Fettsäuren aus den Triglyceriden abzuspalten und zu isolieren. Die Fettspaltung kann sowohl durch chemische Hydrolyse (unspezifisch) als auch enzymatisch (unspezifisch und spezifisch) durch Lipasen erfolgen. Für die enzymatische Fettspaltung sind eine Vielzahl an Lipasen mit sehr unterschiedlichen Substrat- und Spaltungsspezifitäten bekannt und zum Teil kommerziell oder als molekularbiologische Präparate verfügbar. Die Spaltungsspezifität der Enzyme bezieht sich dabei auf die Position der Esterbindung im Triglycerid. Grundsätzlich wird unterschieden in

- unspezifische Hydrolasen, die jede der drei Fettsäuren vom Glycerin abspalten und
- regiospezifische Hydrolasen, die jeweils einzelne der Esterbindungen spalten können, so dass neben Fettsäuren auch Partialglyzeride (Mono-/Diglyzeride) erzeugt werden, die als Emulgatoren Verwendung finden. Im Falle einer vollständigen Hydrolyse der Fette ist die Ganzzelltransformation des Glycerins in Lösungsmitteln möglich. In Vorstudien zum Abbau von Fetten und fetthaltigen Tonmineralien wurden bereits verschiedene anaerobe, teils lipolytisch aktive, teils Rohglycerin verwertende, Stämme eingesetzt [8, 9].

Zum Stand der Technik der Fettsäurefraktionierung lassen sich prinzipiell zwei Verfahren unterscheiden. Erstens die Fraktionierung über gesteuerte Kristallisation. Dieser Weg wird beschränkt, um ungesättigte von gesättigten Fettsäuren zu trennen. Varianten, die dabei zur Anwendung gelangen, sind u. a. die sog. Tankkristallisation, das Tirtiaux-Verfahren und der Panning and Pressing - Prozess. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Lösungsmittelsystemen. Hier wären der Emersol-Prozess, der Armour/Texaco-Prozess, der Rau-Prozess, der Henkel-Prozess, das Lipofrac-Verfahren sowie der Solexol-Prozess zu nennen. Auch über Molsiebe ist eine Fraktionierung möglich (Sorbex-Verfahren). Die zweite große Gruppe beinhaltet die Methoden der destillativen Trennung, wobei sowohl freie Fettsäuren als auch derivatisierte Produkte eingesetzt werden. Die Fettsäuregewinnung und -fraktionierung über den Weg der Kristallisation der Fettsäuresalze hat

-
- [2] Pinelo M, Arnous A, Meyer AS, Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release, *Trends In Food Science & Technology* 2006 17(11), 579-590
- [3] Sharma A, Khare SK, Gupta MN, Enzyme-assisted aqueous extraction of rice bran oil, *Journal Of The American Oil Chemists Society* 2001, 78(9), 949-951
- [4] Muffler K, Ulber R, Fed-batch cultivation of the marine bacterium *Sulfitobacter pontiacus* using immobilized substrate and purification of sulfite oxidase by application of membrane adsorber technology (2008), *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 99 (4), 870-875
- [5] Harkensee D, Kokpinar O, Walter J, Kasper C, Beutel S, Reif OW, Scheper T, Ulber R, Fast screening for the purification of proteins using membrane adsorber technology, (2007) *ENGINEERING IN LIFE SCIENCES*, 7 (4), 388-394
- [6] Sosnitzer P, Farooqui M, Saleemuddin M, Ulber R, Scheper T, Application of reversible immobilization techniques for biosensors (1998) *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, 368 (3), 197-203
- [7] Farooqi M, Saleemuddin M, Ulber R, Sosnitzer P, Scheper T, Bioaffinity layering: A novel strategy for the immobilization of large quantities of glycoenzymes (1997) *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 55 (3), 171-179
- [8] lipolytic bacterium on anaerobic digestion of lipid-rich waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2006, 81, (11), 1745-1752
- [9] Biebl H, Sproer C, Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp nov., *SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY* (2002), 25 (4), 491-497

bislang keine wirtschaftliche Relevanz erlangt. Die destillativen Verfahren sind bislang den fraktionierten Kristallisationen hinsichtlich der Reinheit der dargestellten Produkte überlegen, bedürfen aber auch einer wesentlich kostenintensiveren Apparatechnik.

Die Aufreinigung von Pflanzenölen und Fettsäuren kann aber auch über adsorptive Verfahren mittels sog. Bleicherden erfolgen, die durch ein Kochen von Bentoniten mit Säuren gewonnen werden [10]. Die Funktion der Bleicherde besteht darin, Verunreinigungen von den Pflanzenölen zu entfernen, die die Lagerstabilität verringern, indem sie die hydrolytische und oxidative Fettspaltung begünstigen. Die Art der Bleicherde muss an das jeweilige Pflanzenöl angepasst werden, um diese besonders gut zu entfärben und zu entschleimen. Der Einsatz von maßgeschneiderten Tonmineralen und Hydrotalciten zur Aufreinigung und/oder Auftrennung von Fettsäuren ist bislang nicht bekannt. Bleicherden wurden für diese Anwendung schon untersucht, sind jedoch nicht geeignet.

Ausgereifte technische Verfahren zur Gewinnung von Polyphenolen (vor allem Sinapinsäuren) aus Ölsaaten sind bislang nicht bekannt. Es dürfte aber wahrscheinlich sein, dass fast ausschließlich extraktive und adsorptive Prozesse zur Anwendung gelangen werden. Die Extraktion der Polyphenole aus dem Pflanzenmaterial kann nach dem Literaturstand u. a. mit einem Ethylacetat-Wasser-Gemisch durchgeführt werden³⁸. Eine anschließende präparative Auftrennung über einer RP-C18-Matrix mit einem Methanol-Wasser-Gemisch unter Abtrennung von Lipiden, Carotinoiden und Chlorophyll ist beschrieben [11].

Neben der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln kann auch die Extraktion mit überkritischen Fluiden (scF) erfolgen. Der Einsatz überkritischer Fluide wie beispielsweise CO₂ (scCO₂) bietet den Vorteil, dass keine Rückstände im Produkt verbleiben sowie bei moderaten Temperatur- und Druckverhältnissen (31 °C, 7,3 MPa) und unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff gearbeitet wird. Das Potenzial scF zur Stofftrennung reicht von der Aufbereitung von Kohle-/Erdölprodukten über die Gewinnung hochsiedender Substanzen aus Pflanzen (Aromaten, Alkaloiden, Fetten und Ölen) bis zu speziellen Anwendungen, wie Entsalzung von Meerwasser oder Trennung von Alkohol-Wasser-Mischungen. Bei Naturstoffen konnte sich CO₂ als Lösungsmittel im technischen Maßstab bisher zur Entkoffeinierung von Kaffee und zur Gewinnung von Hopfenextrakten durchsetzen. Auf dem Gebiet der Aromen, Gewürze und ätherischen Öle spielt die Extraktion mit verdichteten Gasen eine wachsende Rolle. Durch die außergewöhnliche Kombination von Lösungs- und Transporteigenschaften, die sich durch Druck- und Temperaturänderungen in weiten Grenzen variieren lassen, sind sie ein wichtiges Hilfsmittel bei schwierigen Trennproblemen und hohen Qualitätsanforderungen an das Produkt. Innovationspotenzial bietet die scF-Extraktion in der Kombination von Zellaufschluss bei gleichzeitiger Extraktion und Fraktionierung von Wertstoffen an.

Die Isolierung und Auftrennung der Polyphenole soll im Rahmen des Projektes adsorptiv vorgenommen werden. Nach dem Stand der Technik sind als Adsorbentien für Polyphenole im Wesentlichen organische Polymere, insbesondere Polyvinylpolypyrrolidon bekannt. Diese werden in der Regel zur Abtrennung von Polyphenolen in Bier, Wein und Fruchtsaft eingesetzt [12]. Aufgrund des hohen

[10] W. Zschau, Was ist Bleicherde? Fette, Seifen, Anstrichmittel, 87. Jahrgang, Mai 1985, S. 506 – 508

[11] Rodrigues CM, Rinaldo D, Sannomiya M., Dos Santos LC, Montoro P, Piacente S, Pizza C, Vilegas W, High-performance Liquid Chromatographic Separation and Identification of Polyphenolic Compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill, *Phytochemical Analysis* 2008 19(1), 17-24

[12] Alyson E. Mitchell, Yun-Jeong Hong, J. Cale May, Christine A. Wright and Charles W. Bamforth, A Comparison of Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), Silica Xerogel and a Polyvinylpyrrolidone (PVP)- Silica Co-Product for Their Ability to Remove Polyphenols from Beer, *Journal of the Institute of Brewing, Publication No. G-2005-0318-270*, Vol. 111, No. 1, 2005, S. 20 – 25

Preises für diese Materialien sind sie für den Einsatz in technischen Prozessen zu teuer. Zum Einsatz von anorganischen Adsorbentien, insbesondere Tonen, sind den Antragstellern bisher keine Arbeiten bekannt. Zum Einsatz von Tonmineralien zur Trägerung von Polyphenoloxidasen sind in der Literatur erste Arbeiten beschrieben [13, 14]. Nicht untersucht wurde hier jedoch eine gezielte Modifikation von technisch einsetzbaren Polyphenolen mit den geträgerten Enzymen.

Erfahrungen im Bereich der Quantifizierung der in Trauben enthaltenen und der beim Ligninabbau entstehenden Polyphenole liegen vor. Hierfür stehen Protokolle für HPLC und ein enzymatisches Assay zur Verfügung und sind in der Literatur beschrieben [15].

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Teilprojektes 2 arbeiteten:

ATB, CLAAS (beratend), GEA (WS), PPM, KLEE, UMSICHT, TUKL, CLARIANT

und im Teilprojekt 3:

KIT, TUKL, EVONIK, PHY, TUM, ICT

zusammen.

[13] Christoph Buttersack, Konstantin Nowikow, Albrecht Schaper und Klaus Buchholz, Gewinnung von Enzymen aus Zuckerrüben, Zuckerind. 119 (1994) nr. 4, S. 284 – 291

[14] K. Buchholz, Bioreactors Downstream Processing, Process and Reactor Modelling Bioprocesses, DECHEMA Biotechnology Conferences 2 - VCH Verlagsgesellschaft 1988, Vol. 2

[15] D. Harkensee, S. Beutel, M. Young, R. Ulber; Development of a fast spectroscopic enzyme assay for the on-site measurement of total polyphenol content in grapes and wine; Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 1013-1018

II. Ergebnisse

1. Erzielte Forschungsergebnisse

Im von der TU Kaiserslautern koordinierten Teilprojekt 2 werden insbesondere neue Verfahren und Prozesse zur Aufarbeitung von Ölen und Fettsäuren sowie sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (Polyphenole, Phytinsäure) aus Raps entwickelt. Dies findet in enger Kooperation der beteiligten Projektpartner GEA (WS), PPM, ATB, Clariant (vormals Süd-CH), UMSICHT und TU KL statt. Sowohl das ICT als auch die TUM nehmen an den Projekttreffen des TP2 teil und beteiligen sich an der wissenschaftlichen Gestaltung des Teilprojekts.

Im Berichtszeitraum wurden die Forschungsergebnisse der Projektpartner im Rahmen mehrerer gemeinsamer Projekttreffen (siehe nachfolgende Auflistung) der Teilprojekte TP2 und TP3 präsentiert und diskutiert.

- 06. Mai 2010 : in Oelde bei der GEA Westfalia Separator Process GmbH
- 29. März 2011 : an der Technischen Universität Kaiserslautern
- 31. Mai 2012 : am Fraunhofer-Institut ICT
- 01. März 2013 : bei der DECHEMA e.V., Frankfurt
- 02. April 2014 : bei der DECHEMA e.V., Frankfurt

Teilbericht GEA (WS)

GEA Westfalia Separator Group GmbH als Nachfolgerin der GEA Westfalia Separator Process GmbH (GEA (WS)) hat die Aufgabe, die Herstellung der Produkte aus dem Labormaßstab in den industriellen Maßstab zu übertragen. Die genaue Definition der Produkte erfolgte dem Antrag entsprechend erst im Laufe des Projektes in Abhängigkeit von den Ergebnissen der zahlreichen Vorversuche.

Lag zu Beginn in der ersten Projektphase die Aufgabe noch in der Entwicklung und in der Bereitstellung geeigneter mechanischer Verfahren (Dekanter, Separatoren, UF oder Mikrofilter-anlagen) zur Aufreinigung, Trennung oder Isolation niedermolekularer Zwischen- oder Endprodukte wie Öle, Fettsäuren, Polyphenole (aus Weintrauben-trestern), verblieb als besonderes Ziel für den zweiten Teil darüber hinaus die Anpassung von Dekantern zur Separation phenolhaltiger, d.h. sinapinsäurehaltiger Phasen aus Raps; ausgehend von den Laboruntersuchungen der ersten Phase. Es sollen wirtschaftliche Alternativen zu den gängigen Verfahren der kostenintensiven superkritischen Extraktion bzw. der bisher ineffizienten wässrig-alkoholischen Extraktion geprüft werden.

Die schematische Darstellung in Abbildung II. 2 verdeutlicht die schon im Antrag dargelegte Problematik. Es geht im Meilenstein 4.2. um die Optimierung der Verfahren in der Stufe 3.

1. Die enzymatische – katalytische Entschleimung in Verbindung mit einer Neutralisation als das favorisierte, zukunftsweisende Verfahren zur Raffination.
2. Überführung der phenolischen Substanzen in eine leicht zugängliche Form (vorzugsweise durch Entfernung der Schalen, um diese Polyphenole im ölfreien Koyledon anzureichern (Abbildung II. 2, Stufe 4).

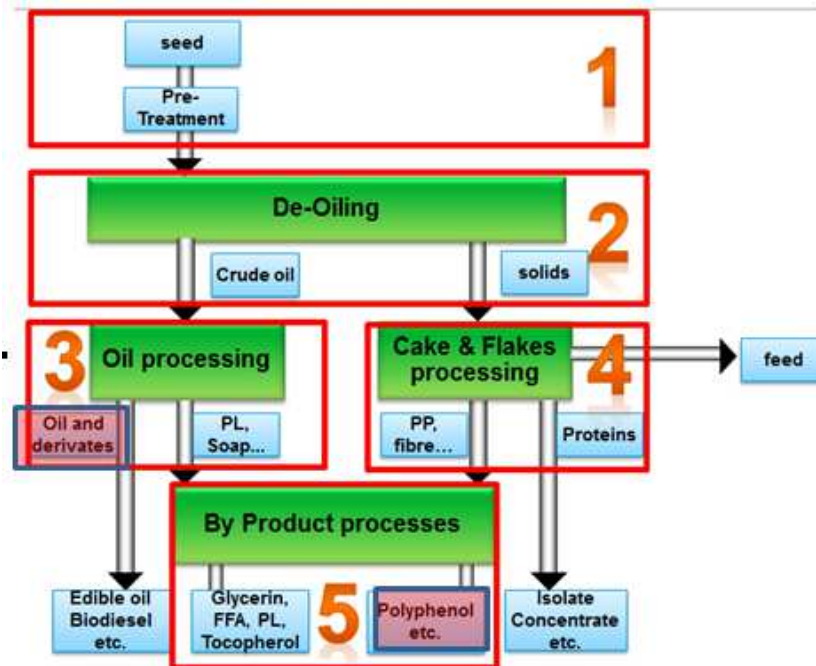


Abbildung II. 2: Vereinfachte Prozessdarstellung

Die vielversprechenden Ergebnisse zur Raffination der gewonnenen Öle waren in den Pilotmaßstab zu überführen. Dabei liegt eine besondere Gewichtung auf der Reproduzierbarkeit der Verfahren. Dies geht nur durch die Ermittlung relevanter Prozessparameter für die zu gewinnenden geforderten Wertstoffe.

Den Partnern sind Öle mit speziellem Fettsäureprofil, das sich aus den Arbeiten der Partner resultiert, zur Verfügung zu stellen (High Oleic und High Eruca Oil =HO und HE Öle) sowie sinapinhaltige Phasen, die aus der Nicht-Öl Fraktion zu gewinnen sind. Die rohen Rapsöle vom Typ HO („high oleic“) und HE („high erucic“) sind nach der Gewinnung durch Pressung der Saat nach verschiedenen Verfahren raffiniert worden.

Entschleimungsverfahren

Das Verfahren der Spezialentschleimung ist speziell auf die Entfernung von Phospholipiden aus Saatölen angepasst. Es besteht aus einer Säurekonditionierung zur Umwandlung nicht hydratisierbarer Phospholipide in hydratisierbarer durch Aufbrechen von Ca- und Mg-Komplexen vermittelt einer starken Säure.

Das neuere Verfahren der enzymatischen Entschleimung ist aufgrund der höheren Ausbeuten von besonderem Interesses. Die reduzierten Ölverluste entstehen durch die geringeren emulgierenden Eigenschaften der enzymatisch modifizierten Phospholipide. Es wurden Untersuchungen zur Entschleimung von konventionellem Pressöl mit diversen Phospholipasen, PLA1 (Novozymes) und PLA2 (Danisco), im Labor durchgeführt.

Angewendet wurde dieses Verfahren im Technikum für HE und HO-Pressöle mit einer Waschung mit saurem Washwasser. Nachdem die Maschinenparameter im Technikum angepasst worden sind, war somit das erzielte Öl perfekt sauber. Letztlich konnten die Wasserwerte im Öl auf unter 0,12 % und sämtliche Spurenelemente wie P, S, K, Ca, Kg etc. unter die Nachweisgrenze von 0,5 ppm

gesenkt werden.

Die enzymatische – katalytische Entschleimung wird in Verbindung mit einer Neutralisation als das favorisierte, zukunftsweisende Verfahren zur Raffination angesehen.

Die Laborergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit denen im Technikum. Jedoch zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Phosphorgehalte in der Ölphase als Funktion des Durchsatzes. Es ist jedoch nicht grundsätzlich davon auszugehen, dass HE- oder HO-Raps-Rohöle derartig geringe Phosphor- oder Fettsäuregehalte aufweisen, zumal die Wirtschaftlichkeit mit der erzielbaren Ausbeute bei der Ölgewinnung korreliert. Damit erübrigte sich die Anwendung des im Labormaßstab erprobten Verfahrens der alkoholischen Neutralisation im Technikum. Nach der Optimierung der Parameter bei der o.g. alkalische Neutralisation lag bereits ein gemäß den Anforderungen mehr als hinreichendes Endprodukt vor.

Aus der Praxis ist bekannt, dass die Ausbeute zwar erhöht durch eine thermische Vorbehandlung der Saat oder durch eine Pressung bei höheren Temperaturen wird, dies führt aber auch zu erhöhten Verunreinigungen im Öl. Dies darf nicht zu Beeinträchtigungen der gewünschten Eigenschaften der finalen Ölphase, d.h. der Triglyceride führen. Infolgedessen wird in der enzymatischen oder im weiteren Sinne einer katalytischen Behandlung eine wachsende Bedeutung gesehen. An verschiedenen schwierigen Rapsölen wurde versucht, mit biogenen Katalysator-Lösungen Verfahren zu entwickeln, die Verunreinigungen komplex aus dem Öl entfernen

Die Ergebnisse im Technikum unter Verwendung der für das Projekt erstellten Anlagenkomponenten zeigen bei diesem Verfahren eine deutliche Reduzierung der freien Fettsäuren auf ca. 0,15 % FFA zugleich mit der Reduzierung der Phosphorwerte in der Regel auf unter 10 ppm. Also eine erfolgreiche Kombination aus dem Degumming mit der Neutralisation. Die Verwertung der daraus resultierenden „Seifen“-Phase ist noch nicht geklärt.

Neutralisationsverfahren

Das Verfahren der Alkalischen Neutralisation entfernt aus dem rohen Rapsöl unerwünschte Fettbegleitstoffe (Phospholipide, u.a.) und neutralisiert die freien Fettsäuren, hier für die anschließende Methylesterherstellung. Das Verfahren der Alkalischen Neutralisation entfernt aus dem rohen Rapsöl unerwünschte Fettbegleitstoffe (Phospholipide, u.a.) und neutralisiert die freien Fettsäuren, hier für die anschließende Methylesterherstellung. Das Verfahren besteht aus einer Säurekonditionierung mit anschließender Lauge-Wasser-Zugabe zur Hydratation der Phospholipide und zur Neutralisation der freien Fettsäuren zu Seife bei ca. 95 °C. Phospholipide und Seife werden gemeinsam mittels einer Zentrifuge als Seifenstock abgetrennt. Restliche Seifen und Phospholipide werden mit ca. 7 % weichem Waschwasser ausgewaschen und das Öl im Vakuum getrocknet. Die erforderlichen Prozessparameter und die Versuchsdurchführung im Labor und im Technikum sind für Rapsöl bekannt.

Enzymatische Hydrolyse

Mit dem Verfahren der enzymatischen Hydrolyse können Fettsäuren hergestellt werden. Sie ist eine Alternative zu der konventionellen Thermo-Hydrolyse. Basierend auf den Ergebnissen von FhG Um-sicht wurden die einzelnen Trennschritte im Weiteren untersucht. Angewendet wurde für ein 54 %-iges Erucasäurehaltiges Öl ein Lypozym.

Die Beimischung erfolgte im Technikum. Zur Trennung der Phasen wurde eine Vollkammer-zentrifuge eingesetzt. Damit konnte die wässrige enzymhaltige Phase mit ca. 5 % Glycerin von der Fettphase mit 27 % Triglyceriden und 16 % Diglyceriden separiert werden. Die begleitenden Untersuchungen der Projektparten (Umsicht) lassen auf eine gute enzymatische Hydrolyse bei den herausgearbeiteten und angewandten Prozessparametern schließen.

Metallsalze

Für die Trennungen im Bereich der Fraktionierung von Fettsäuren mittels Bleisalzen (PPM) ist die Aufgabenstellung einer möglichen zentrifugalen Trennung entfallen, da dieses Verfahren von der Arbeitsgruppe zur Aufarbeitung zurzeit nicht weiter verfolgt wird (siehe Zwischenbericht PPM).

Polyphenole

Basierend auf diesen Ergebnissen mit dem Weintrestern des Vorjahres und der Literaturlauswertung wurde ein von GEA Westfalia Separator angemeldetes Verfahren zur Fraktionierung von (Raps-)Presskuchen angewandt, um ein polyphenolhaltiges Fluid zu gewinnen, das dann von den Projektpartnern weiter verarbeitet werden kann. Wichtig ist hierbei, dass die Ölgewinnung und die Polyphenolgewinnung nicht getrennt voneinander zu betrachten sind. Es wurde ein Verfahren nach der noch nicht offengelegten Patentschrift DE 10 2013 103 910.3 genutzt, um die Polyphenole in ein Konzentrat zu überführen.

In den Untersuchungen wurde deutlich, dass die Ölgewinnung der Stufe 2 (in Abbildung II. 2) -wie eingangs beschrieben- mit den Parametern Zeit und Temperatur (Druck) nicht nur unterschiedliche Ölqualitäten sondern somit unterschiedliche Kuchenqualitäten hervorbringt. Durch die PPM wurde daher kalt und warm gepresster Kuchen sowie Extraktionsschrot bereitgestellt, die von GEA (WS) in polyphenolreiche Fluidfraktionen und polyphenolarme andere Fraktionen wie z.B. Schalen aufgetrennt wurden.

Es wird ersichtlich, dass die Phospholipide, die phenolischen Verbindungen wie z.B. Sinapin und die Phytinsäure im Kotyledon enthalten sind. Es ist ferner bekannt, dass mit zunehmenden Pressdruck und Temperaturen sowie bei der Hexanextraktion die Phospholipide in das Öl übergehen. So hat typischerweise ein kaltgepresstes Öl nicht selten P-Werte unter 100 ppm, warmgepresstes Öl dagegen zeigen Werte >700 ppm.

Da Polyphenole aufgrund ihrer Polarität mehr wasser- als öllöslich sind, verbleiben sie nach der Pressung im Kuchen, genauer im Kotyledon des Kuchens. Somit führen die Resultate der ersten Projektphase (mit Weintrestern) unter Berücksichtigung der theoretischen Betrachtungen aus der Literatur und Praxis zu folgenden Ansätzen, die im Berichtszeitraum untersucht worden sind:

Zur Polyphenolgewinnung scheint neben der Ölabtrennung eine Entfernung der Schalen sinnvoll, um diese Polyphenole im ölfreien Kotyledon anzureichern. Obwohl immer dasselbe Verfahren zur PP-Extraktion angewendet worden ist, zeigt sich ein differenzierter PP-Gehalt in der Wasserphase für unterschiedliche Öl-Pressverfahren. Somit kann postuliert werden, dass das Ölextraktionsverfahren auch für den PP-Gehalt relevant ist. Basierend auf den Mengenbilanzen bei GEA und den Analysen von TU KL resultiert folgende Verteilung:

Tabelle II. 1: Komposition der Rapsfraktionen unter besonderer Beachtung der Phenolfraktion Sinapin/ Sinapinsäure , Veröffentlicht in „Mitteldeutsche Mitteilungen“ 2/2014

	Saat komplett	Schale	Kotyledon
Gewicht [mg]	3,5 – 5,5	0,5 -0,9	3,0 – 4,6 mg
Farbe, Größe	black, 2,0 – 3,2		yellow
Wasser [%]	6 – 8 %		
Anteil [%]	100	12–17 (15-22) ²	84 – 88
Fraktionen. [%]			
Triglycerides	44,4 ¹	14 ³	39 – 50
Proteins	22,7 ¹	13 ³	20 – 27
Carbohydrates	20,9 ¹ (n-free extract)	22-24 Poly; 1-3 <Oligo ³	3-6 Poly; 5- 6 <Oligo ³
Lignin	4-6 ³	29-35 ³	
Phospho- + Glycolipids			0,5 – 1,5
Sinapin [*]	0,57-0,9 %	0,07-0,23	0,83-1,15
Glycosinalate <25µmol/g ²	6,1 (14 Ukrain)		
Phyticacid	2,4-3,5 ^{*,3}	0,2-1 ³	3-4 ³

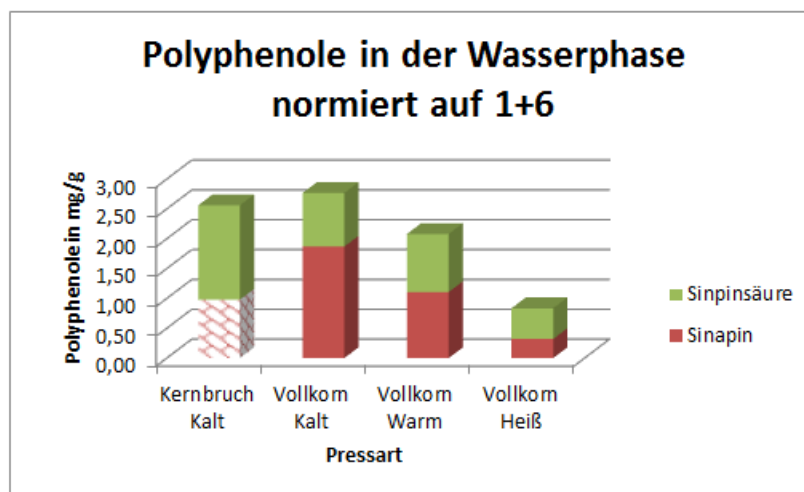


Abbildung II. 3: Phenolgehalt im wässrigen Extrakt für unterschiedliche Pressverfahren

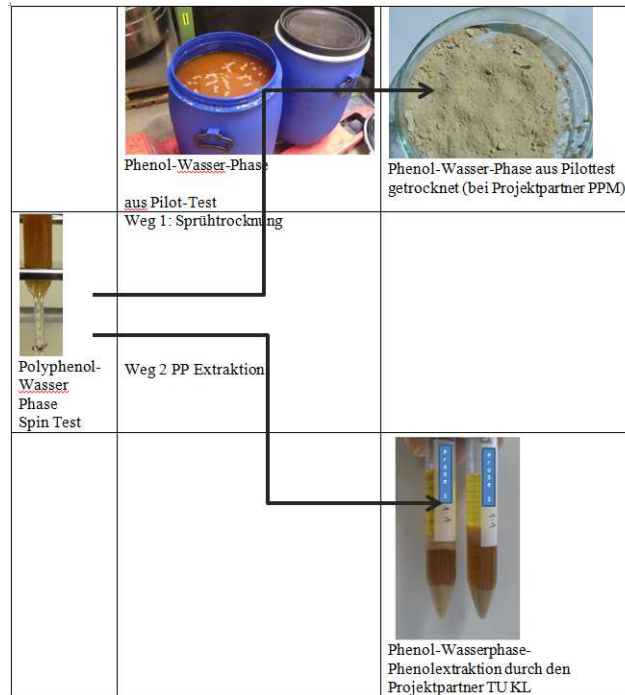


Abbildung II. 4: Schema zur Extraktion der phenolischen Verbindungen

Der zu Vergleichszwecken analysierte Presskuchen ohne Schalen (Kernbruch) enthielt 17 ppm, der komplette heißgepresste Kuchen dagegen nur 8,9 ppm phenolische Verbindungen. Diese Fraktionen wiederum sind vom Projektpartner TU KL analysiert worden.

Der Presskuchen kann somit auf eine Schalenfraktion mit einem Gesamt-Ligninanteil von ca. 40 % reduziert werden.

Tabelle II. 2: Zusammensetzung der abgetrennten Schalenfraktion

		Schalen	
	RES	RPK- Ungeschält	RPK Geschält
Forschungspartner	ATB	ATB	ICT
Öl		1	1
Protein	54	35	35
Glucose	3,8		13,65
Xylose			7,6
Säure-löslichen Lignin			7,4
Lignin	10	18	32
Phytin Säue		4	4
Zellulose	11	20	
Hemicellulose	17,1	17	
Ges.	95,9	95	100,7

Teilbericht Clariant

Aufgabe 5.1: Entwicklung und Bereitstellung von Bleicherden zur Reinigung von Ölen (2009-12)

Zur Entschleimung und Aufreinigung der gewonnenen Öle werden geeignete Adsorbentien benötigt. Üblicherweise werden sog. Bleicherden verwendet, die an das jeweilige Pflanzenöl angepasst werden um Materialien zu entwickeln, die besonders gut dazu geeignet sind, die im Projekt gewonnenen Pflanzenöle zu entfärben und zu entschleimen. Bleicherden werden aus dem Mineral Bentonit durch Kochen in Säure hergestellt. Hierbei wird eine wässrige Kalziumbentonitdispension mit 10 – 25 %iger Salzsäure bzw. 30 – 60 %iger Schwefelsäure umgesetzt. Durch diesen Säureangriff wird die Montmorillonitstruktur, aus der ein Bentonit hauptsächlich aufgebaut ist, partiell zerstört, was sich in einer reduzierten Ionenumtauschfähigkeit manifestiert. Durch die Aktivierungsbedingungen und die eingesetzte Säuremenge kann dieser Prozess sehr genau gesteuert werden. Durch die Säureaktivierung kann die ursprüngliche spezifische Oberfläche von etwa 30 – 70 m² / g auf über 300 m² / g angehoben werden. Der ursprünglich eher alkalische Charakter der Bentonite wird durch die Säurebehandlung in den sauren Bereich verschoben, da es bei der Säureaktivierung zu einer Einlagerung von sauren Aluminium- bzw. Eisenionen in die Zwischenschichten kommt.

Die für das Projekt benötigten Bleicherden, bezogen auf die entsprechenden Öle, wurden von der CLARIANT/Süd-CH entwickelt und optimiert und den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

Aufgabe 5.2 + 5.3: Adsorbentien zur Aufreinigung von Fettsäurefraktionen und zur Trennung von unterschiedlichen Fettsäuren (2009-12)

Die in Aufgabe 5.1 gewonnenen bzw. von Partnern bereitgestellten Pflanzenöle wurden zur Gewinnung und Reinigung der Fettsäurefraktionen verwendet. Dabei wurde eine breite Palette an Adsorbentien getestet, die auf Tonmineralen basieren und aus synthetischen Hydrotalciten bestehen. Des Weiteren war ein Ziel die Auftrennung der im Rahmen des Projektes gewonnenen rohen Fettsäuren in Einzelkomponenten oder in Gemische mit speziellen Anforderungen.

Die Fettsäurekonzentration wurde quantitativ durch Titration bestimmt. Zur Bestimmung der Adsorption von Fettsäuren wurden von PPM verschiedene Muster Fettsäuregemische zur Verfügung gestellt: Die Zusammensetzung dieser Muster wurde mittels Gaschromatographie bei UMSICHT bestimmt (siehe Bericht 2010). Die Fettsäuremuster wurden konzentriert oder verdünnt in den jeweiligen Ölen für Inkubationszeiten von 3-16 h bei 50 °C mit verschiedenen Adsorbentien inkubiert. Anschließend wurde die Suspension abzentrifugiert und im Überstand die Konzentration an Fettsäuren im Vergleich zum Ausgangsöl bestimmt. Es wurde nun ein Material gefunden, welches Fettsäuren in einer Höhe von 0,5-0,6 g/ g binden kann (siehe Abbildung II. 5). Dieses Adsorbens ist ein synthetischer Hydrotalcit. Auch das Material EXM 2195, ein Zeolith, bindet Fettsäuren mit einer Kapazität von 0,1 g/g. Dabei ist die Adsorptionskapazität unabhängig von der eingesetzten Adsorbensmenge.

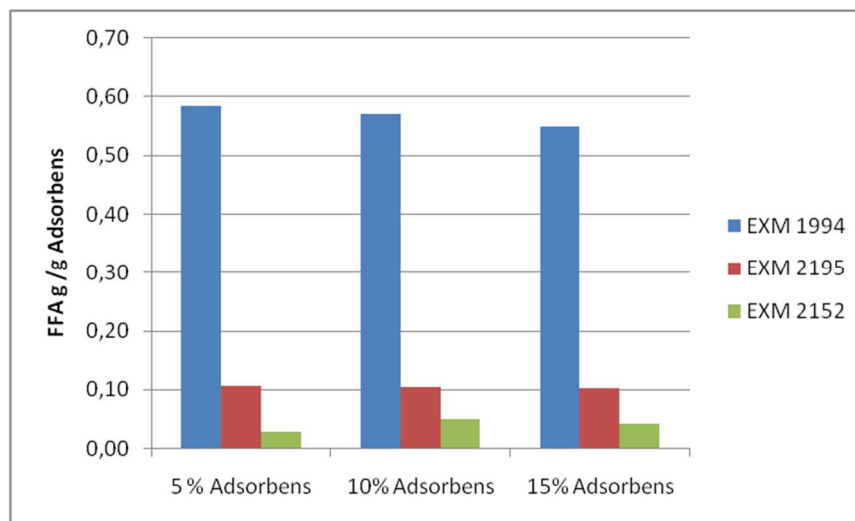


Abbildung II. 5: Fettsäureadsorption an verschiedenen Adsorbentien

Des Weiteren wurde festgestellt, dass durch Adsorption keine selektive Bindung von einzelnen Fettsäuren erfolgte. Diese Aufgabenstellung wurde dahingehend verändert, die störenden Fettsäuren in der Glycerinfraktion bei der Ganzzelltransformation zu entfernen. Dabei sollten störende Fettsäuren durch Adsorption aus der Glycerinfraktion entfernt werden (siehe auch TUKL).

Bei den Untersuchungen der TU KL zur mikrobiellen Umsetzung von Glycerin in 1,3-Propandiol konnte gezeigt werden, dass die Hydrotalcite der Clariant dazu geeignet sind, Verunreinigungen aus Fettsäuren, die inhibierend auf die Mikroorganismen wirken, aus rohem Glycerin effizient zu adsorbieren. Dort wurde auch gezeigt, dass sich die Hydrotalcite wieder regenerieren lassen. Zuletzt wurde die TU KL noch von der Clariant mit einer Reihe von Hydrotalciten und verwandten Verbindungen bemustert, um für die oben angeführte Anwendung eine Struktur-Eigenschaftsbeziehung auszuarbeiten.

Aufgabe 5.4: Identifizierung von Materialien zur adsorptiven Aufreinigung und/oder Isolierung von Polyphenolen (2009-2012)

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurde die Entwicklung von Materialien zur adsorptiven Aufreinigung und/oder Isolierung von Polyphenolen in Zusammenarbeit mit der TU KL bearbeitet, die im Projekt eine entsprechende Polyphenolanalytik aufgebaut hatten. In der Getränkeindustrie werden Polyvinylpolypyrrolidone zur Entfernung von Polyphenolen eingesetzt. Für diese existieren jedoch keine Regenerationsprozesse zur Wiedergewinnung der Polyphenole.

Im Rahmen dieses Teilprojekts wurden Spezialzeolithe als Adsorbentien zur Aufarbeitung von Polyphenolen identifiziert, die auch erfolgreich regeneriert und wiederverwendet werden konnten.

Es wurde der Rapsextraktionsschrot von PPM, der bei der Herstellung des Rapsöles anfällt, zur Isolierung der Polyphenolen verwendet. Der Extraktionsschrot wurde mit Wasser behandelt. Die Extraktion lieferte Polyphenolgehalte von 15-20 mg/g Extrakt. Der wässrige Überstand wurde zur Adsorption der Polyphenole verwendet. Dazu wurden 7,5 % Adsorbens eingesetzt und die Suspension für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension abzentrifugiert und im

Überstand der Polyphenolgehalt bestimmt. Die Elution erfolgte auch hier für 1 h bei Raumtemperatur mit 70%igem Isopropanol. Exemplarisch sind die Ergebnisse in Abbildung II. 6 dargestellt. Der Zeolith EXM 2202 hat die höchste Menge an Polyphenol aus dem wässrigen Extrakt adsorbiert. Weitere Daten siehe Ergebnisse TUKL.

Eine Hauptphenolsäure-Komponente des Raps-Extraktionsschrotes ist die Sinapinsäure, die jedoch nur in weniger als 10 % in Form der freien Säure vorliegt. Mehr als 90 % der Sinapinsäure liegen in Form von Sinapin, ihrem Cholinester, vor. Die untersuchten Zeolithe zeigten zwar hohe Adsorptionskapazitäten für Sinapin, eine Wiedergewinnung des adsorbierten Sinapins gelang jedoch bisher nicht mit vertretbarem Aufwand. Im Rahmen von TP 3 wurde zur Herstellung von neuen Polymeren der Methylester der Sinapinsäure eingesetzt, der entweder durch Veresterung der Sinapinsäure oder durch Umesterung von Sinapin hergestellt werden kann. Um die Phenolsäureaufarbeitung dahingehend zu vereinfachen, dass nur eine Phenolsäure-Komponente abgetrennt werden muss, wurde an der TU KL das Sinapin enzymatisch mit Hilfe von Esterasen komplett in Sinapinsäure umzuwandeln. Dadurch waren die bisher eingesetzten Zeolithe für die Abtrennung der Sinapinsäure aus dem wässrigen Extrakt des Rapsextraktionsschrots einsetzbar. Siehe hierzu den Bericht der TU KL.

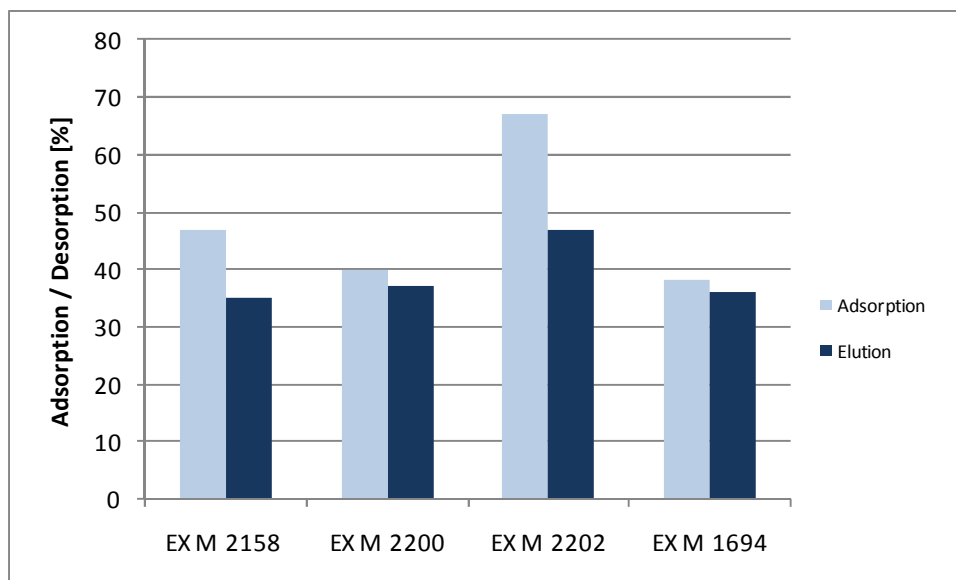


Abbildung II. 6: Adsorption/Desorption des Polyphenolgehaltes aus Rapsextraktionsschrot an verschiedene Adsorbentien

Für ein Upscaling des Prozesses zur Gewinnung der Phenolsäuren aus dem Rapsextraktionsschrot wurden zwei Fragestellungen im 3. Projektjahr bearbeitet:

- Teilchenvergrößerung für die Adsorbentien (Zeolithe) zum Packen von großen Säulen.
- Untersuchung/Verhinderung der Adsorption von störenden Komponenten aus dem wässrigen Rapsextrakt

Die Teilchenvergrößerung der Adsorbentien ist für größere Chromatographiesäulen erforderlich, um die dort auftretenden Druckabfälle zu minimieren. Von den beiden β -Zeolithen, die zum Abtrennen der Phenolsäuren am besten geeignet waren, wurden der TUKL Granulate/Formkörper zur Verfügung gestellt. Diese zeigten die gewünschten Effekte, allerdings ist die massenbezogene Adsorptionskapazität gegenüber den entsprechenden Pulvern stark abgesunken (siehe Bericht der TU

KL).

Aufgabe 5.5: Trägermaterialien für Polyphenoloxidasen (2009-2012)

Da die Polyphenole gezielt mit ausgesuchten Polyphenoloxidasen modifiziert werden sollten (Bearbeitung TUKL), war eine Entwicklung von Trägern für diese Enzyme erforderlich. Dieses Arbeitsgebiet war für die Clariant neu, es gibt jedoch in der Literatur Indikationen, dass Tonminerale gut geeignet sind, Polyphenoloxidasen unter Erhalt ihrer Funktion aufzureinigen bzw. zu adsorbieren.

Dabei wurden vor allem Silikat-haltige Granulate entwickelt. Besonders geeignet waren die Granulate EXM 1907 und EXM 1911 zur Beladung von Polyphenoloxidasen bei pH 6. Die Ergebnisse dazu siehe Berichtsteil TU KL.

Aufgabe 5.6: Entwicklung maßgeschneiderter Enzymformulierungen zur Erhöhung der Ölausbeute (2009-2012)

Im Rahmen dieses Teilprojektes sollten maßgeschneiderte Enzymmischungen für die im Projekt zur Ölgewinnung eingesetzten Pflanzen entwickelt werden. Diese Arbeiten wurden im Unterauftrag der Clariant bei ASA Spezialenzyme in Wolfenbüttel durchgeführt.

Es wurden neben Xylanasen die Enzyme Pektinase, Phytase, Protease sowie Kombinationen dieser Enzyme zum Aufschluss der Rapssaat im Labormaßstab getestet. Das Enzympräparat Xylanase 2x zeigte die besten Ergebnisse. Diese Enzymmischung enthält neben Xylanase auch noch Cellulase, Mannanase und andere Hemicellulasen.

Es wurde nach neuen Enzymen gesucht, die in Kombination mit dem Xylanase-Präparat eine weitere Verbesserung der Rapsölausbeute erbringen sollten. Ein sehr interessantes Enzym war in diesem Zusammenhang die Phospholipase C, die in der Lage ist, Phosphatgruppen in Lecithin bzw. von Phosphatidylcholin abzuspalten. Sie soll bei der Ölentstleimung einen positiven Effekt ausüben. Lecithine sind Phospholipide und wichtige Bestandteile pflanzlicher Zellmembranen. Lecithine erlauben das Emulgieren (Vermischen) von Fetten und Wasser und sind somit wichtige natürliche Tenside. Eine enzymatische Spaltung von Phosphatidylcholinen hätte somit zwei Effekte: Destabilisierung der pflanzlichen Zellmembranen und Trennung der Öl-Wasser-Emulsionen. Somit könnte der Ölaustritt aus den Rapssamen erhöht sowie eine bessere Ölabtrennbarkeit erzielt werden. Da nur wenige Phospholipasen kommerziell verfügbar sind, wurde im Rahmen des SynRg Projektes im dritten Projektjahr nach geeigneten mikrobiellen Phospholipasen gescreent und ein Hochleistungstamm hergestellt.

Um eine größere Anzahl von Enzymen sowie Parametern zu untersuchen, wurde ein Pressverfahren im Labormaßstab entwickelt. Kernpunkt des neuen Verfahrens war der Einsatz eines Metallstempels zur Erzielung eines recht hohen Anpressdrucks. Somit konnten Ölsaaten mit Wassergehalten um die 10 % verwendet werden, was den industriellen Bedingungen recht nahekommt. Zunächst wurde mit gemahlenden *Jatropha*-Nüssen gearbeitet, die aus einem anderen Projekt zur Verfügung standen. Insgesamt waren die erzielten Ölausbeuten mit maximal ca. 7% (Phytase) allerdings noch sehr gering. Anschließend wurde versucht, das Verfahren auf Rapsölsaaten zu übertragen. Hier war die Ausbeute mit 3,2 % Öl mit Xylanase 2x am besten.

Anschluss Projekt Jahre 2012-2014

Aufgabe 5.10: Verbesserte Materialien zur adsorptiven Aufreinigung und/oder Isolierung von Polyphenolen (2012-2014)

In der ersten Projektlaufzeit wurden Spezialzeolithe, sogenannte Beta-Zeolithe zur Aufreinigung der Polyphenole als geeignet identifiziert. Im Vergleich zu herkömmlichen Materialien wie z.B. Polyvinylpyrrolidon (PVPP) war die Beladung auf Zeolithen mit Polyphenolen deutlich höher. Aus Rapsextraktionsschrot wurden bis zu 100 % der Polyphenole aufgearbeitet (siehe Ergebnisse TUKL). In der zweiten Förderphase wurde an die Ergebnisse der ersten Förderphase angeknüpft. Es wurde insbesondere an der Maßstabsvergrößerung an der TUKL gearbeitet. Am Ende sollten dem Teilprojekt 3 möglichst reine Polyphenolfractionen für die Synthese zur Verfügung gestellt werden. Die ersten Muster Sinapinsäure wurden von der TUKL an das Teilprojekt 3 übergeben.

Aufgabe 5.11: Trägermaterialien für Polyphenoloxidasen geändert in Trägermaterialien für Ferulasäureesterase (2012-2014)

Die Phenolsäureaufarbeitung aus dem Rapsextraktionsschrot funktioniert deutlich besser als die Aufreinigung des entsprechenden Esters. Daher wurden Esterasen eingesetzt, die z. B. Sinapin in Sinapinsäure umsetzen (siehe TUKL). Die anschließende Aufarbeitung der Sinapinsäure mittels der zeolithischen Adsorber ist deutlich besser als die Aufreinigung des Sinapins. Um die Esterase, hier

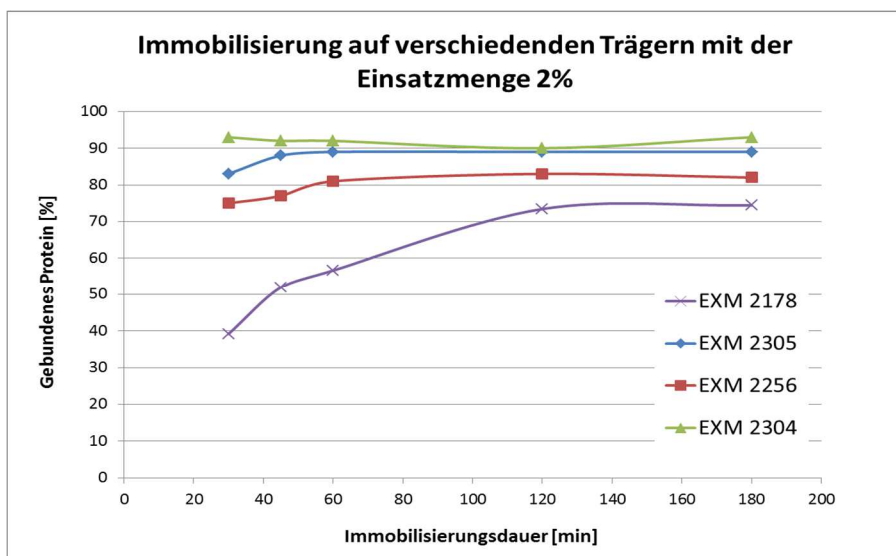


Abbildung II. 7: Immobilisierung der Ferulasäureesterase in Abhängigkeit von der Zeit

untersucht die Ferulasäureesterase (FSE) Depol 740 L der Firma Biocatalysts, möglichst effizient einzusetzen wurde diese immobilisiert. Dabei wurden sowohl Granulate als auch Pulver organischen und anorganischen Ursprungs untersucht. Die Immobilisierung wurde adsorptiv durchgeführt, bei unterschiedlichen pH-Werten und Zeiten. Dabei zeigte sich, dass die Beladung mit Ferulasäureesterase bei allen verwendeten Trägern bei pH 5 in 50 mM Kaliumacetatpuffer am höchsten war.

Des Weiteren zeigte sich, dass eine Trägermenge von 2 % optimal war, um ausreichend FSE zu binden. Die Ergebnisse der besten Träger bei 2 % in Abhängigkeit von der Immobilisierungsdauer sind in Abbildung II. 7 dargestellt. Die Träger EXM 2304 (Tonerde) und EXM 2305 (Spezialkieselsäure) hatten bereits nach ca. 30 min. 90 % der FSE gebunden.

Bei den beiden genannten Trägern handelt es sich zum einen um ein Tonerdegranulat (EXM 2304) und eine Kieselsäuregranulat (2305). In den folgenden Experimenten wurde die Aktivität der immobilisierten Ferulasäureesterase exemplarisch mit dem Substrat Ethylferulat untersucht. Es wurde bei keinem Träger eine Aktivität der Ferulasäureesterase festgestellt. Wahrscheinlich ist das Substrat Ethylferulat für längere Zeit nicht in K-Ac-Puffer bei pH 5 stabil oder fällt aus. Die immobilisierte Ferulasäureesterase hat hingegen bei der Umsetzung der Realproben Sinapin in Sinapinsäure funktioniert (siehe Berichtsteil TUKL).



Abbildung II. 8: links: Kieselsäuregranulat EXM 2305; rechts: Tonmineralgranulat 2304

Aufgabe 5.12: Weiterentwicklung von maßgeschneiderten Enzymformulierungen zur Erhöhung der Ölausbeute (2012-2014)

In diesem Teilprojekt sollten die Enzymmischungen aus dem ersten Projektteil weiter verbessert und optimiert werden. Wie in der Vorhabenbeschreibung für die zweite Projektphase bereits angeführt wurde, sollten in einem neuen Ansatz die bisher besten Enzympräparate aus der ersten Projektphase mit Enzymen kombiniert werden, die biologische Tenside, wie z. B. Phospholipide, in den Rapssamen spalten können. Dabei sollten vor allem Phospholipasen (Phospholipase A1, A2 und C) getestet werden.

Es wurde ein eigenes Laborsystem zur Verarbeitung der Rapssaat entwickelt. Dabei wurde in einer eigenen Ölpresse (Monfort CA59G) die Rapssaat verarbeitet. Die vorgemahlene Saat wurde mit Enzym besprüht und bei verschiedenen Verweilzeiten und Temperaturen inkubiert und anschließend gepresst. Es wurde dann das Volumen des ausgetretenen Öles bestimmt. Die Ergebnisse sind in

Tabelle II. 3 zusammengefasst.

Die Enzyme Pektinase L40, Xylanase und Phospholipase A erhöhen die Ölausbeute um 5-6% im Vergleich zur Kontrolle ohne Enzym. Die Kombinationen aus je 2 der oben gezeigten Enzyme bringt keine Verbesserung in der Ölausbeute (Daten nicht gezeigt).

Tabelle II. 3: Einfluss verschiedener Enzyme auf die Rapsölausbeute

Enzym	T [°C]	pH	VZÜS [ml]	Ausbeute [%]
Kontrolle (1% Wasser+1% Citronens.)	50	4,9	39,5	100
1,0 % Pektinase L 40		4,9	42,0	106
Kontrolle (1% Wasser+1% Citronens.)		5,3	38,1	100
1% Xylanase		5,2	40,5	106
Kontrolle (1% Wasser+1% Citronens.)		5,3	38,9	100
Phospholipase A		5,4	41,0	105
Phospholipase C		5,4	39,3	101
Phytase		5,3	39,8	103

Aufgabe 5.13: Entfernung von störenden Fettsäuren bei der Fermentation von Glycerin durch den Einsatz von Adsorbentien (2012-2014)

Das von PPM gelieferte Rohglycerin aus der Umesterung an die TUKL enthält neben 75 % Glycerin, Salze, Wasser, Natronlauge, freie Fettsäuren und den Katalysator Natrium-Methylat. Bei der mikrobiellen Herstellung von 1,3 Propandiol aus Rohglycerin mit dem Bakterium *Clostridium diolis* wurde nachgewiesen, dass die freien Fettsäuren das Wachstum von *Clostridium diolis* inhibieren (siehe Berichtsteil TUKL). In der ersten Projektphase wurde gezeigt, dass Hydrotalcite geeignet sind, Fettsäuren während des Prozesses zu binden und damit deren inhibierende Wirkung zu verringern. Im Rahmen der zweiten Projektphase wurde die Maßstabsvergrößerung der Ganzzellbiotransformation der Glycerinfraktion sowie die Steuerung der Fermentationsprozesse hinsichtlich der Produktbildung weiter an der TUKL untersucht. Die Clariant hat die entsprechenden Adsorbentien zur Verfügung gestellt und unterstützte die TUKL bei der Prozessentwicklung.

Aufgabe 5.14: Adsorption und Wiedergewinnung von Phytinsäure aus Rapsextrakt (2012-2014)

Phytinsäure, ein myo-Inositol-Hexahydroxycyclohexan, ist als weiterer sekundärer Pflanzeninhaltsstoff mit ca. 5-6 % im Rapspresskuchen enthalten. In erster Linie dient diese Verbindung den Pflanzen als Phosphatspeicher und liegt in den Speichergeweben der Samen vorzugsweise in Form kleiner Kristalle aus schwerlöslichem Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -Phytat vor.

Diese Salze der Phytinsäure sind die Hauptspeicherform des Phosphors und repräsentieren in Getreide, Leguminosen und Ölsaaten mehr als 80 % des Gesamtphosphors. Phytinsäure ist als Phosphatquelle in der Tiernahrung wertvoll. Sie ist Chelatbildner und Antioxidanz und wird im Kosmetikbereich eingesetzt.

Die Reindarstellung der Phytinsäure ist daher von großem Interesse. Nicht nur die vielfältigen Einsatzfelder, sondern auch ein erheblicher Marktwert machen sie zu einer wertvollen Fraktion, deren Gewinnung und Aufarbeitung lohnenswert ist.

In einem vorangegangenen Projekt (Fraktionierung von Raps-Presskuchen aus dezentralen Ölmühen) wurde die Phytinsäure erfolgreich über den Einsatz von organischen Harzen (Purolite Materialien) isoliert. Dabei wurden bei einem Einsatz von 3,5 % Adsorbens ca. 90 % der Phytinsäure aus Rapsextrakt gebunden und diese anschließend mit 1 M NaCl in HCL wieder isoliert (DE 102011105.914.1). In dem Projekt wurden jedoch nicht die Aufreinigungsschritte mit den im SynRg-Projekt gefundenen zeolithischen Adsorbentien zur Isolierung der Polyphenolfractionen kombiniert und optimiert. Dies erfolgt in diesem Arbeitspaket zusammen mit der TUKL. Die entsprechenden Materialien wurden an die TUKL geliefert und die Prozessschritte zusammen geplant.

Teilbericht UMSICHT

Vor dem Hintergrund der Ganzpflanzennutzung zur Gewinnung der ausgewählten Zielprodukte (Fettsäuren, Polyphenole) sollten im Rahmen des Projektes innovative Aufschluss- und Trennverfahren zur verbesserten Biomassebereitstellung/-konditionierung untersucht und entwickelt werden. Hierzu wurden Nutzungspfade für Produkte und Nebenprodukte einschließlich der erforderlichen Prozesse definiert und anschließend unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten bewertet.

Die Gewinnung von Fettsäuren (FA) setzt sich aus verschiedenen Schritten der Edukt- und Produktaufarbeitung und der eigentlichen Reaktion zur Gewinnung der Fettsäuren zusammen. Kernschritt dabei ist die Hydrolyse der Pflanzenöle mit den Produkten Glycerin und Fettsäuren. Die Hydrolyse kann chemisch, thermisch oder enzymatisch erfolgen. Oft wird die Hydrolyse der Triglyceride auch als Spaltung bezeichnet. Zurzeit wird technisch der chemische bzw. thermische Weg bevorzugt. Entlang der Prozesskette fallen neben den Zielprodukten auch weitere, verwertbare Nebenprodukte an. So befinden sich im Rapspresskuchen weitere, verwertbare Stoffe wie bspw. Polyphenole und auch Phytinsäure.

Fraunhofer UMSICHT hat sich zum einen mit der 1,3-regiospezifischen Hydrolyse von HE-Rapsöl einschließlich der wirtschaftlichen Betrachtung des Verfahrens befasst. Zum anderen wurde ein Prozess zur Phytinsäuregewinnung aus Rapspresskuchen entwickelt.

TEIL A: Fettsäuregewinnung am Beispiel Erucasäure

Eine Alternative zu der zum Stand der Technik zählenden chemischen und thermischen Route zur Fettsäuregewinnung stellen enzymatische Verfahren dar, die in der Technik zurzeit noch keinen hohen Stellenwert einnehmen. Dieser sogenannte biokatalysierte Prozess ist aber von besonderem Interesse, da es sich um einen Niedrig-Energie-Prozess handelt. Enzyme weisen bereits bei Temperaturen unter 50 °C eine hohe Effizienz auf. Ein weiterer Vorteil ist die Selektivität der Enzyme und die Möglichkeit Öle zu spalten, die temperaturempfindlich sind oder normalerweise nicht durch Hydrolyse gespalten werden können [16].

Die enzymatische Hydrolyse wird von Lipasen katalysiert, wobei gleichzeitig auch die Rückreaktion (Veresterung) bewirkt wird. Das Gleichgewicht von Hydrolyse und Veresterung hängt dabei vom Wassergehalt ab [2]. Die Reaktion ist eine Grenzflächenreaktion zwischen der Öl-Phase und der Wasser-Phase, in der das Enzym gelöst ist. Nach der Spaltung in Fettsäure und Glycerin gehen die

[16]J. e. a. Anneken, „Fatty Acids,“ in Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim, Wiley-VCH, 2006

Fettsäuren in die Öl-Phase über und das Glycerin verbleibt in der Wasser-Phase. Ein Nachteil der enzymatischen Hydrolyse liegt in den unvollständigen Umsätzen bzw. langen Reaktionszeiten. Verglichen mit dem Vollumsatz bei der chemischen Hydrolyse in etwa 4 h und Raum-Zeit-Ausbeuten von 200 kg / (h m³) läuft die Reaktion mit Enzym-Katalyse nur sehr langsam ab. Ein nahezu vollständiger Umsatz wird nach 8-72 h erreicht, abhängig von Bedingungen und Edukten.

Vorteile bietet die enzymatische Hydrolyse auf Grund ihrer moderateren Prozessbedingungen. Während die chemische Hydrolyse unter hohem Druck und bei über 200 °C stattfindet, liegen die Optimalbedingungen für Lipasen bei unter 50 °C und es muss nicht unter Druck gearbeitet werden. Diese milden Prozessbedingungen sind besonders für empfindliche Fette und Fettsäuren geeignet, die zum Beispiel über eine oder mehrere Doppelbindungen oder Hydroxyl-Gruppen verfügen und dadurch zu ungewollten Nebenreaktionen neigen. Mit diesem Vorteil geht direkt die Einsparung von thermischer Energie einher, da die Edukte und der Reaktor nicht soweit aufgeheizt werden müssen. Allerdings muss ein erhöhter Eintrag von mechanischer Energie durch Rühren berücksichtigt werden, um eine gute Emulsion mit kleinen Tröpfchen und dadurch hohe Oberflächen zu erhalten. Die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. die Aktivität des Enzyms hängt stark von der Oberfläche ab [17] [16].

Neben unspezifischen Lipasen, die ähnlich zur chemischen Hydrolyse alle Fettsäuren abspalten, sind auch selektive Lipasen bekannt. So spalten zum Beispiel 1,3-regioselektive Lipasen nur die äußeren Fettsäuren am Glycerin ab. Als Produkt erhält man Fettsäuren und ein entsprechendes Monoglycerid. Weiterhin gibt es strukturselektive Enzyme, die zum Beispiel gezielt Fettsäuren mit einer cis-9-Doppelbindung abspalten. Je nach gewünschten Produkten und Beschaffenheit der eingesetzten Öle können durch diese selektive Hydrolyse Kosten in den Aufarbeitungsschritten und Trennoperationen eingespart werden, da die gewünschten Produkte bereits in höherer Konzentration in der Öl-Phase vorliegen [16].

Für die Produktion von Erucasäure als industrieller Rohstoff wurden erucasäurereiche, aber glucosinolatarme Sorten gezüchtet. Während der natürliche Erucasäuregehalt lediglich bei 45 – 50 % liegt, was für die industrielle Nutzung zu wenig ist, weisen diese Züchtungen (+0-Raps) Gehalte zwischen 50 – 60 % auf. Die biologische Grenze liegt hier bei 66 % Gehalt Erucasäure am Ölspektrum, da das Erucyl-CoA vom dazugehörigen Enzym nicht in die mittlere Position (2-sn) des Triglycerids eingebaut wird. Unter Verwendung einer 1,3-regiospezifischen Lipase kann dies nun genutzt werden, um bereits bei der Hydrolyse den Gehalt an Erucasäure bezogen auf die freien Fettsäuren zu steigern (vgl. Abbildung II. 9).

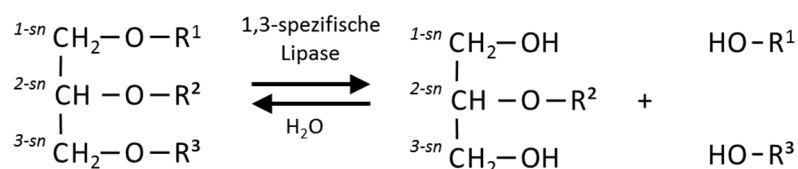


Abbildung II. 9: Regiospezifisch, enzymatisch katalysierte Hydrolyse

Im Rahmen des Vorhabens wurden experimentelle Untersuchungen mit HE-Rapsöl und einer regiospezifischen Lipase durchgeführt. Dabei wurde die Regiospezifität des Enzyms untersucht sowie

[17] K. Saulich, „Reaktionskinetische Experimente zur Lipase-katalysierten Hydrolyse von Rapsöl in Wasser-in-Öl-Emulsionen,“ Cottbus, 2008

die optimalen Prozessparameter ermittelt. In Screening-Versuchen wurden das Volumenverhältnis von Öl zu Wasser, die Enzymmenge sowie die Reaktionsdauer variiert. Die Hydrolysen erfolgten bei einer Temperatur von 40 °C und bei einem pH-Wert von 7,6 in einem 1 l-Fermenter. Anschließend wurden die Proben auf ihre Fettsäurezusammensetzung analysiert sowie der Umsatz an hydrolysierten Fettsäuren bestimmt.

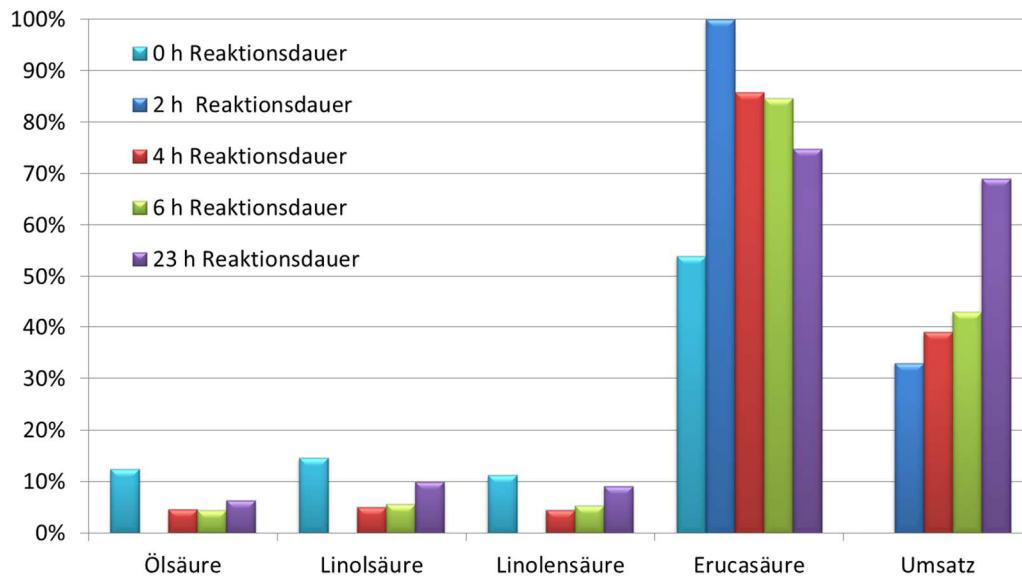


Abbildung II. 10: Fettsäurespektrum freier Fettsäuren und Umsatz zu verschiedenen Zeitpunkten der Hydrolyse

Die in Abbildung II. 10 dargestellten Ergebnisse bestätigten, dass es mit Hilfe der regiospezifischen Hydrolyse möglich ist, den Anteil an Erucasäure im Fettsäurespektrum der freien Fettsäuren zu steigern. In Abhängigkeit von der Reaktionsdauer variiert der Anteil an Erucasäure zwischen 75 % (23 h Reaktionsdauer) und nahezu 100 % (2 h Reaktionsdauer). Der Umsatz steigert sich von 33 % (2 h) auf 68 % (23 h). Darüber hinaus zeigten diese Ergebnisse, dass das Enzym zu Beginn der Hydrolyse vorzugsweise Erucasäure vom Triglycerid abspaltet und somit regiospezifisch das Öl hydrolysiert. Mit fortschreitender Hydrolysedauer werden jedoch auch Fettsäuren, die sich in der mittleren Position am Triglycerid befinden, abgespalten. Unter der Voraussetzung einer rein regiospezifischen Hydrolyse wäre ein theoretischer Umsatz von maximal 66 % möglich. Bezogen auf HE-Rapsöl mit 54 % Erucasäure kann somit ein Erucasäureanteil bei den freien Fettsäuren von 82 % berechnet werden.

In weiteren Untersuchungen erfolgte dann der Vergleich von chemischer und enzymatischer Hydrolyse. Diese zeigten, dass der Anteil der Erucasäure im Spektrum der freien Fettsäuren bei geeigneter Reaktionsführung mit Hilfe der regiospezifischen enzymatischen Hydrolyse auf bis zu 80 % gesteigert werden kann, während er bei der chemischen Hydrolyse nur bei 54 % liegt. Hieraus kann abgeleitet werden, dass eine züchterische Steigerung des Erucasäureanteils im Raps auf nahezu 66 % bereits bei der Hydrolyse zu Reinheiten von theoretisch über 98 % führen könnte.

Nach der Hydrolyse und Phasenseparation erfolgte anschließend die Aufarbeitung der organischen Phase in einer Kurzwegdestillation. Es konnten Reinheiten bzgl. Erucasäure von 75 – 80 % erzielt werden. Mittels mehrstufiger Destillation und Vakuumrektifikation können auch höhere Reinheiten erzielt werden. Für die anschließende Umsetzung der Erucasäure in der Ozonolyse zu Brassylsäure

war jedoch eine Reinheit von 75 % ausreichend.

Abschließend erfolgte eine Kosten- und Wirtschaftlichkeitsrechnung des Verfahrens, mit deren Hilfe die Produktionskosten bei einem Jahresdurchsatz von 10.000 t/a HE-Rapsöl (4.500 t/a 75%ige-Erucasäure) ermittelt wurden. Die Berechnung erfolgte auf Grundlage der zuvor bestimmten Prozessparameter und diente dem Projektpartner Evonik als Basis der von ihm durchgeführten wirtschaftlichen Bewertung des Gesamtverfahrens.

Die Investitionskosten wurden zum Teil unter Einbeziehung notwendiger Expertise aus Industrieunternehmen abgeschätzt. Investitionskosten, welche für MSR, Rohrleitungen, Bauarbeiten, Armaturen u. ä. anfallen, können die Kosten der Hauptkomponenten um ein Vielfaches übersteigen. Hier wurde der Faktor 2,7 angenommen. Ebenso ist ein energetischer Mehrbedarf seitens MSR zu erwarten, so dass nochmals ein Aufschlag von 20 % angenommen wird. Die Investition für die Destillation konnte aufgrund mangelnder Zugänglichkeit von Daten nicht im Detail dargestellt werden. Daraufhin wurde orientierend an einer Anlage der Fa. UIC Alzenau [18], bei der Speiseöle unter vergleichbaren Bedingungen aufbereitet werden, eine Kostenabschätzung für die Kurzwegdestillation durchgeführt. Anschließend wurden sowohl die Fixkosten als auch die variablen Kosten ermittelt. Dabei bleibt festzustellen, dass insbesondere die Kosten für die Enzyme einen erheblichen Anteil an den Produktionskosten aufweisen.

Tabelle II. 4: Kostenaufstellung

Art	Kosten
Investkosten	
Gesamtanlage ohne Destillation	1.900 T€
Investition Destillation	4.000 T€
Gesamtanlage mit Destillation	5.900 T€
Fixkosten	
Abschreibung, Steuern, Versicherung	1.125 T€
Wartung	250 T€
Personal	375 T€
Sonstiges	130 T€
Zwischensumme	1.880 T€
Variable Kosten	
Energie	1.500 T€
Wasser, Abwasser	500 T€
Enzyme	12.000 T€
Raffiniertes Öl	7.500 T€
Zwischensumme	21.500 T€
Produktionskosten	
Ohne Recycling	5,10 €/kg
Einmaliges Recycling	3,80 €/kg
Zweimaliges Recycling	3,30 €/kg

Hier besteht die Möglichkeit, durch Rückgewinnung und Wiederverwertung von Enzymen die Kosten

[18] W. Fischer, „Einsatz der Kurzwegdestillation für Speiseöle und –Fette / Application of Short-Path-Distillation in the Production of Edible Oil and Fat,“ Hausmitteilung der Fa. UIC GmbH, Alzenau-Hörstein: Die Kompetenz in der Kurzweg-Destillation / The First Address in Short Path Distillation

zu senken. Es wurde ermittelt, dass bei einmaliger Wiederverwendung der Enzyme mehr als ein Viertel und bei zweimaliger mehr als ein Drittel der Produktionskosten eingespart werden können. Die ermittelten Produktionskosten sind für die betrachteten Szenarien in der nachfolgenden Tabelle zusammenfassend dargestellt.

TEIL B: Gewinnung von Bioaktiven Substanzen (Polyphenole und Phytinsäure)

B1: scF-Extraktion von Polyphenolen

Einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt des Projektes stellte die scF-Extraktion von Polyphenolen aus Weizen und Rapschrot dar. Hierzu wurde zunächst die für die Auswertung der Experimente erforderliche Analytik entwickelt, etabliert und mit den Projektpartnern abgestimmt.

Die Möglichkeit der Extraktion von Polyphenolen mittels überkritischem Kohlendioxid (scCO₂) wird in der Literatur als eine Verfahrensmöglichkeit beschrieben, ist aber derzeit noch Gegenstand der Forschung. Kennzeichnend hierfür ist, dass die in der Literatur beschriebenen Extraktionsbedingungen sehr stark variieren. So werden Drücke von 350 bis 1.000 bar und Temperaturen von 40 bis 80 °C angegeben. Ziel der Untersuchungen war, anhand von Modellsystemen die jeweiligen optimalen Prozessbedingungen zu definieren.

Im Rahmen des Projektes wurden Proben bei Drücken von 200 bis 400 bar und Temperaturen von 40 bis 70 °C mit einem Ethanolanteil von 5 bis 30 % in einer 5 Liter scF-Extraktionsanlage der Fa. Uhde 120 Minuten extrahiert. Die aus dem Abscheider entnommenen Extrakte wurden auf ihren Polyphenolanteil untersucht. Es wurden zwar für Weizen Extraktmengen von bis zu 20 g und bei Raps Extraktmengen von bis zu 40 g gewonnen, jedoch konnten darin keine Polyphenole nachgewiesen werden.

Auch nach dem Versetzen der Proben mit Wasser vor der Extraktion konnten weder für Raps noch für Weizen Polyphenole in ausreichender Menge im Extrakt nachgewiesen werden. Die extrahierten Mengen lagen unterhalb von 0,2 g pro kg Ausgangsmaterial. Im Extrakt lagen die Polyphenole zudem in einem Stoffgemisch vor, was eine weitere Aufarbeitung erforderlich machen würde.

Da die scF-Extraktion im Vergleich zur Aufreinigung mittels Adsorbentien (Ergebnisse TU-Kaiserslautern) weniger gute Ergebnisse aufwies, wurde sie als Aufbereitungsverfahren nicht weiter verfolgt wird.

B2: Gewinnung von Phytinsäure/Phytat aus Rapspresskuchen

Bei den Produkten der Ölsaatenverarbeitung handelt es sich im Wesentlichen um Massenwaren im Niedrigpreissegment. Daher besitzen alternative Nutzungskonzepte, die zu hochwertigen Produkten führen, ein großes Potential.

Das größte wirtschaftliche Potential geht hier von der enthaltenen Phytinsäure aus. Sie ist bei Pflanzen ein Phosphat- und Mineralienspeicher und dient in der Saat zur Versorgung des Keimlings mit diesen Nährstoffen. Phytinsäure ist auf Grund seiner Komplexbildungseigenschaften technisch zum Beispiel als Korrosionsinhibitor oder aber auch als Medikament gegen Hypercalcämie einsetzbar [19].

[19] Gräber, S.: „Phytinsäure“, RÖMPP-Online, Georg Thieme, Stuttgart, 2012. <http://www.roempp.com/prod/index.html>. [Zugriff am 20 November 2012]

Das im Rahmen dieses Projektes entwickelte Verfahren zur Gewinnung von Phytinsäure basiert auf einer sauren, wässrigen Extraktion des Rapspresskuchens. Im Verlauf der Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass eine mehrfache Extraktion des Rapspresskuchens zu höheren Produktausbeuten führt. Wie aus den Versuchen hervorgeht, konnten durch die zweite saure Extraktion weitere 30 %²⁰ Phytinsäure extrahiert werden. Der Mehrverbrauch an Extraktionsmittel liegt bei rund 70 %. Durch die geringen Kosten für das verwendete Extraktionsmittel Wasser würde diese Steigerung der Produktausbeute wahrscheinlich auch zu einer Steigerung des Gewinns führen.

Für die Gewinnung der Phytinsäure wurden zwei mögliche Routen untersucht. Einmal erfolgte die Aufreinigung mit Hilfe der Kombination aus Membranfiltration und Anionenaustauscher und im zweiten Fall mit Hilfe von Filtration und Präzipitation.

Die Versuche zeigten, dass die Gewinnung der Phytinsäure durch Anionenaustauscher aus den Permeaten der 1 kDa-Ultrafiltration nicht zufriedenstellend verläuft. Die Probleme gehen in erster Linie von den Verunreinigungen aus, die im Permeat der 1 kDa-Filtration immer noch vorhanden sind. Durch die enthaltenen Substanzen kommt es zu einer bleibenden Gelbfärbung des Ionenaustauschers. Unter der Annahme, dass es sich dabei um Proteine oder Peptide handelt, besteht durch die organischen Verbindungen eine hohe Fouling-Gefahr, die den Ionenaustauscher schnell unbrauchbar macht. Des Weiteren reduziert sich die Kapazität des Ionenaustauschers deutlich durch die Bindung der organischen Substanzen. Auch ist die Aufreinigung des Permeats mit hohen Verlusten an Phytinsäure verknüpft, wobei gleichzeitig nur ein Teil der Störkomponenten entfernt wird. Eine mögliche Ursache hierfür kann das verwendete Membranmaterial sein. Für die Versuche wurden Membranen aus Polyethersulfon verwendet, die negativ polarisiert sind und so die Phytinsäure am Membrandurchgang hemmen. Die geringe Aufreinigung begründet sich mit den geringen Molekülmassen, die die Verunreinigungen aufweisen. Bei diesen handelt es sich hauptsächlich um niedermolekulare Faser- oder Proteinfragmente sowie phenolische Verbindungen. Zudem stellen die hohen Salzsäure-Konzentrationen in den Eluat eine weitere Herausforderung an die Aufreinigung dar.

Als Alternativ-Verfahren wurde daher die Fällung der Phytinsäure durch Calcium-Ionen aus dem Permeat der Mikrofiltration untersucht. Dieses Verfahren erwies sich als besser geeignet, da die erste Fraktion des gefällten Phytats nur vergleichsweise geringe Mengen an Verunreinigungen aufwies. Zudem ist eine Abtrennung dieser ersten Fraktion nur mit geringen Verlusten an Phytinsäure verknüpft. Das so gefällte Calcium-Phytat besitzt eine sehr hohe Reinheit. Der Gesamtprozess ist in nachfolgender Abbildung dargestellt und diente auch als Grundlage für die anschließend durchgeführte Kosten- und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung.

²⁰ Menge Phytinsäure der ersten Extraktion entspricht 100 %

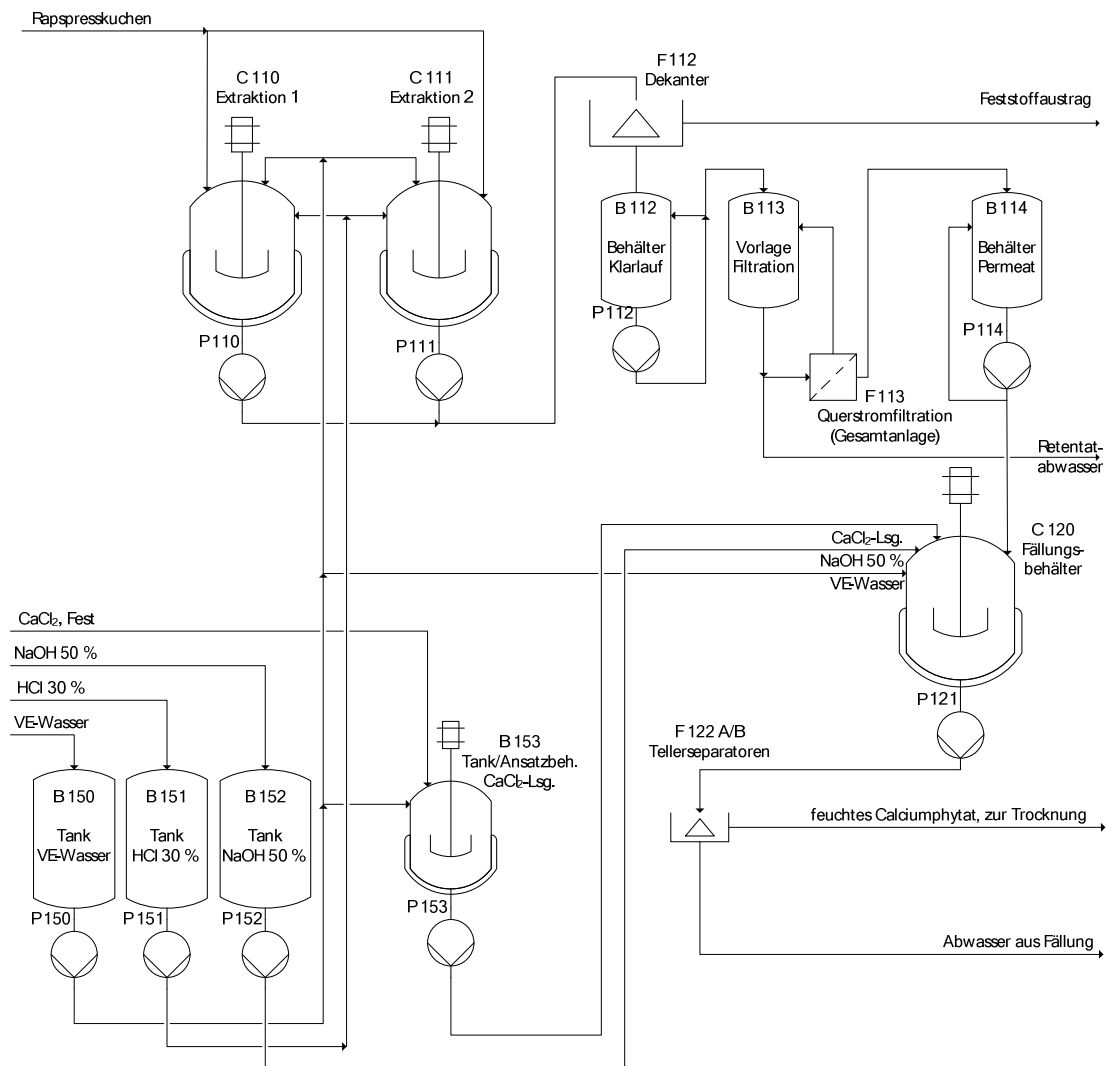


Abbildung II. 11: Vereinfachtes Verfahrensfliessbild zur chemischen Phytat-Gewinnung

Die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung zur Gewinnung von Calcium-Phytat basiert auf dem im vereinfachten Verfahrensfliessbild dargestellten Verfahren. Bei diesem wird zunächst ein großer Teil des Feststoffes aus der Suspension durch einen Dekanter abgetrennt. Im weiteren Verlauf wird der noch trübe Extrakt durch Mikrofiltration im Querstromprinzip geklärt. Das klare Permeat wird dann mit CaCl_2 -Lösung versetzt und unter Rühren langsam auf einen pH-Wert von 6 eingestellt, wodurch Calcium-Phytat ausfällt. Das gefällte Phytat wird in Tellerseparatoren von der Flüssigkeit getrennt und anschließend in einem Trockenofen getrocknet.

Als Kennzahlen für die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung wurde eine Produktionskapazität von 67 t Calcium-Phytat pro Jahr angenommen, was 50 t Phytinsäure entspricht. Die Masse Phytinsäure diente bei der Berechnung als Bezugsgröße. Weiterhin wurde angenommen, dass die Produktion in zwei Schichten an 330 Tagen im Jahr erfolgen soll. Durch die Verwendung von zwei Extraktionsbehältern können so täglich 10 Ansätze und jährlich 3300 Ansätze quasikontinuierlich gefahren werden. Eine weitere Vorgabe war, dass die Extraktion nur in einer 10 %igen Suspension durchgeführt werden kann, damit das Gemisch pumpfähig bleibt.

Zunächst erfolgte eine Bilanzierung des Prozesses auf Grundlage der durchgeführten Untersuchungen und unter Berücksichtigung der zuvor genannten Annahmen bzgl. Produktionskapazität. Für

die Produktion von 50 t/a Phytinsäure werden für jeden Extraktionsansatz 1875 kg Rapspresskuchen verwendet, der in einer 10 %igen Suspension extrahiert wird.

Tabelle II. 5: Massenbilanz der chemischen Phytat-Gewinnung.

Bilanz	pro Ansatz	pro Tag	pro Jahr
Faktor	1	10	3300
Extraktion			
Rapspresskuchen	1.875,0 kg	18,8 t	6.187,5 t
VE-Wasser	16.650,0 L	166,5 m ³	54.945,0 m ³
HCl 30 %	235,0 L	2,4 m ³	775,5 m ³
Fällung			
CaCl ₂ , fest	26,5 kg	265,0 kg	87,5 t
NaOH 50 %	140,0 L	1,4 m ³	462,0 m ³
VE-Wasser	1700,0 L	17,0 m ³	5.610 m ³
Produkt			
Calcium-Phytat	20,9 kg	209,0 kg	69,0 t
gerechnet als Phytinsäure	15,5 kg	155,0 kg	51,2 t

Weiterhin fallen bei jedem Ansatz bei der Feststoffabtrennung im Dekanter etwa 3.570 kg nasser Rapspresskuchen-Brei und etwa 13.125 L trüber Extrakt an, der in der Querstromfiltration geklärt wird. Dort teilen sich die 13.125 L in 10.500 L klares Permeat und 2.625 L Retentat auf. Das Permeat wird zur Fällung verwendet.

Nach dem Aufstellen der Massenbilanz, erfolgte die Ermittlung der Investitionskosten. Ausschlaggebend für die Höhe der Investitionskosten sind in erster Linie die Kenngrößen der Apparate und Maschinen, wie zum Beispiel Volumen oder Leistung. Die benötigten Volumina der Behälter sowie die Leistungen für Pumpen und Rührwerke ergaben sich aus der Bilanzierung und den vorgesehenen Prozesszeiten.

Im vorliegenden Fall hat jedoch auch die Auswahl des Werkstoffes einen hohen Einfluss auf die Preise der ausgewählten Apparate und Maschinen. Für die mit Salzsäure und anderen chloridhaltigen Lösungen in Kontakt kommenden Apparate und Maschinen muss ein korrosionsbeständiger Werkstoff gewählt werden. Im Falle des Lagertanks für die Salzsäure wurde ein GFK-Verbundwerkstoff gewählt. Die übrigen Apparate und Maschinen sollten mindestens aus dem Edelstahl 1.4404 (V4A) gefertigt werden. Das gleiche gilt für Rohrleitungen und Armaturen, die mit dem sauren Extrakt oder anderen chloridhaltigen Lösungen in Kontakt kommen. Durch die Auswahl eines hochwertigen Werkstoffes liegen die Kosten für Apparate und Maschinen deutlich über denen aus Kohlenstoffstahl. Als Multiplikationsfaktor für die Basispreise aus Kohlenstoffstahl wurde hier 2,5 verwendet.

Zur Bestimmung der Investitionskosten wurden zunächst alle Apparate und Maschinen aufgelistet. Die Preise wurden über verschiedene Methoden ermittelt, bspw. per telefonischer Anfrage bei Her-

stellern oder durch Entnahme aus der Fachliteratur. Einige Preise wurden durch konservative Annahmen abgeschätzt. Für Preise von Apparaten und Maschinen wurde die entsprechenden Preisindizes des VCI verwendet [21, 22, 23]. Die Summe der Apparate- und Maschinen-Kosten beläuft sich auf 988.000 Euro.

Die Ermittlung des gesamten Investitionskapitals erfolgte mit Hilfe der Zuschlagskalkulation. Dabei wurden die Kosten für Nebenpositionen durch Zuschlagsfaktoren von den Kosten für die Hauptpositionen (Apparate und Maschinen) abgeleitet. Auf Grund des einfachen Aufbaus der Anlage wurden die Zuschlagsfaktoren der meisten direkten Nebenposition relativ klein gewählt. Lediglich der Faktor für Rohrleitungen und Armaturen wurde aufgrund der teuren Werkstoffe hoch angesetzt. Durch die Zuschlagskalkulation konnte ein benötigtes Investitionskapital von 3.323.200 € ermittelt werden. Die Genauigkeit der Abschätzung liegt bedingt durch die Methode bei $\pm 20\%$ des errechneten Wertes [24].

Zur späteren Ermittlung des Gewinns wurden die Herstellkosten pro kg Phytinsäure berechnet. Die vereinfachte Berechnung teilt sich in fünf verschiedene Kostenarten auf: Material, Energie, Personal- und personalabhängige Kosten, Kapital- und kapitalabhängige Kosten und verschiedene Kosten [24].

Als Rohstoffe wurden Rapspresskuchen, Salzsäure, Natronlauge, Calciumchlorid und VE-Wasser berücksichtigt. Energie wird in diesem Verfahren nur in Form von elektrischem Strom benötigt. Der Jahresverbrauch errechnet sich anhand der Leistungen der einzelnen Maschinen sowie der jährlichen Betriebszeit. Der jährliche Verbrauch an elektrischer Energie beträgt 739.900 kWh. Der spezifische Energieverbrauch beträgt 15,88 kWh/kg Phytinsäure. Die Personal- und personalabhängigen Kosten belaufen sich auf jährlich 584.000 €. Sie setzen sich zusammen aus drei Schichten, jeweils mit Schichtführer (70.000 €/a) und Facharbeiter (64.000 €/a). Dazu kommen noch ein Betriebsführer (110.000 €/a) und ein Techniker (72.000 €/a). Berechnet auf 1 kg Phytinsäure liegen diese Kosten bei 11,68 €/kg Phytinsäure. Die Kapital- und kapitalabhängigen Kosten wurden auf 23 % des Investitionskapitals festgesetzt und betragen 764.336 €/a. Bezogen auf die Produktionsmenge entspricht dies 15,29 €/kg Phytinsäure. Darüber hinaus wurden für die Position „verschiedene Kosten“ 3 % von der Summe der bis hierher ermittelten Kosten eingerechnet. Die Herstellkosten belaufen sich somit auf einen Betrag von insgesamt 73,50 € pro kg Phytinsäure.

Zur Bewertung der Wirtschaftlichkeit muss zunächst der Gewinn ermittelt werden. Da ein Verkaufspreis für Calcium-Phytat in dieser Form nicht bekannt ist, wurde sich an dem Preis für technische Lösungen bei Sigma-Aldrich orientiert. Dieser liegt bezogen auf den Gehalt von Phytinsäure bei etwa 375 €/kg Phytinsäure [25]. Unter der konservativen Annahme eines großen Aufwandes zur Feinreinigung der Phytinsäure, wurde der Erlös für 1 kg Phytinsäure mit ca. 100 € abgeschätzt.

$$\text{ROI [\%/a]} = \frac{(\text{Gewinn pro Jahr}) + (\text{Abschreibungen pro Jahr})}{(\text{Anlagenkapital})} \cdot 100\%$$

[21] Verband der Chemischen Industrie e.V., „Chemiewirtschaft in Zahlen 2013,“ Frankfurt, 2013

[22] Dutch Association of Chemical Engineers, DACE Price Booklet, BIM Media, 2011

[23] Grothe, Konzeption und Wirtschaftlichkeit der industriellen Glycerinvergärung zu 1,3-Propandiol, Düsseldorf: VDI-Verlag, 2000

[24] M. Baerns et al., Technische Chemie, Weinheim: Wiley-VCH, 2006

[25] Sigma-Aldrich, „Phytic acid solution 50 % (w/w) in H₂O,“ Sigma-Aldrich, [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/593648?lang=de®ion=DE>. [15 07 2014]

$$t_R [\text{a}] = \frac{100\%}{\text{ROI}}$$

Vom Erlös müssen neben den Herstellkosten auch Kosten für Verkauf und Generalia abgezogen werden. Der Gewinn beläuft sich damit auf 18,50 € pro kg Phytinsäure. Bei einer angenommenen Jahresproduktion von 50 t ergibt sich ein Gewinn von 925.179 €. Als Kennzahlen für die Wirtschaftlichkeit wurden der Return on Investment (ROI) und die minimale Kapitalrückflusszeit (t_R) herangezogen [24].

Als nominale Abschreibungsdauer wurden 10 Jahre angenommen. Bei linearer Abschreibung betragen die jährlichen Abschreibungen 330.980 €. Mit dem oben genannten jährlichen Gewinn und dem Anlagenkapital ergibt sich ein ROI von 37,8 %/a. Die entsprechende minimale Kapitalrücklaufzeit t_R beträgt 2,7 Jahre.

Der Prozess kann unter Berücksichtigung der getätigten Annahmen und Vorgaben als wirtschaftlich betrachtet werden, da die Kapitalrücklaufzeit von 2,7 Jahren unter den für chemische Anlagen typischen drei Jahren liegt.

Teilbericht PPM

Der PPM e.V. befasste sich mit der Bereitstellung benötigter Pflanzenöle sowie die davon abgeleiteten Fettsäure- bzw. Fettsäuremethylestergemische, die für die Durchführung spezieller Synthesen bei den anderen Projektpartnern benötigt sind. Außerdem sollten Untersuchungen zur Fraktionierung von Fettsäure- bzw. Fettsäuremethylestergemischen durch die fraktionierte Kristallisation geeigneter Metallsalze durchgeführt werden. Weiterhin sollte der Ersatz der Schwermetalle durch geeignete Leichtmetalle untersucht werden. In Zusammenarbeit mit anderen Projektpartnern wurde die Verwertbarkeit der bei der Ölgewinnung bzw. bei den chemischen Modifizierungen der Pflanzenöle anfallenden Nebenprodukte untersucht.

Zur Ölgewinnung in industriellen zentralen Ölmühlen (Verarbeitungskapazität ca. 1.000 - 4.000 t Saat/Tag) wird die Saat durch Dampferhitzung vorkonditioniert und das Öl gut zur Hälfte abgepresst. Anschließend wird das verbleibende Öl aus dem Presskuchen mit Hexan extrahiert und das Lösungsmittel aus dem Öl-/Hexangemisch abdestilliert.

Die Gewinnung von Pflanzenöl ist jedoch auch in dezentralen Ölmühlen (Verarbeitungskapazität ca. 0,5 - 25 t Saat/Tag) möglich. Dabei stehen die Ziele Steigerung der Wertschöpfung in der Landwirtschaft und Verringerung der Umweltbelastung im Vordergrund. Das im Vergleich zur zentralen Ölgewinnung einfachere technische Verfahren ist auf die Schritte Saatreinigung/-trocknung, Pressung und Ölreinigung reduziert. Dabei bleiben einerseits wertvolle Inhaltsstoffe erhalten, andererseits gelangen unerwünschte Begleitstoffe (z.B. Phospholipide) nur in sehr geringem Umfang ins Öl.

Im Rahmen dieses Projektes erfolge die Ölgewinnung analog zur Ölgewinnung in den dezentralen Ölmühlen. Das durch Pressen gewonnene Öl wurde zur Entfernung der Trübstoffe gefiltert. Das so gewonnene Rapsöl wird als Rohöl bezeichnet.

Gewinnung und Aufarbeitung der Pflanzenöle

Insgesamt wurden 3 verschiedene Rapssaatsorten verarbeitet, die in Absprachen mit den anderen Projektpartnern der Teilprojekte 2 und 3 ausgewählt wurden. Die Rapssaaten wurden durch den Projektpartner Saaten-Union zur Verfügung gestellt. Als erstes wurde eine handelsübliche Rapssaatsorte (00 Raps) verarbeitet, wobei der Ölgewinnungsprozess im Technikummaßstab optimiert werden konnte. Außerdem konnte mit der Verarbeitung der Rapssaat der Bedarf der anderen Projektpartner an Rohölen sowie anderen Nebenprodukten (Presskuchen, Extraktionsschrot) gedeckt werden. Später wurden 2 weitere Rapssorten verarbeitet. Es handelte sich dabei um die Sorten High-Erucasäure-Raps (HE-Raps) und High-Oleic-Raps (HO-Raps). Die beiden Rapssaatsorten unterscheiden sich durch ihre Fettsäurezusammensetzung. Während bei der HE-Rapssorte die Erucasäure mit 55 % die überwiegende Fettsäure ist, enthält die HO-Rapssorte bis zu 78 % Ölsäure.

Zunächst wurde der Ölgehalt beider Rapssaatsorten mittels Soxhletextraktion mit Hexan im Labor ermittelt. Er beträgt für die HE-Rapssorte 45,77 % und für die HO-Rapssorte 47,16 %.

Nach der Reinigung der Saaten erfolgte die mechanische Ölgewinnung durch das Pressen an einer Monforts-Pressen Typ S 78 G, wobei die ermittelten optimalen Pressbedingungen verwendet wurden. Eine schematische Darstellung der Gewinnung von HE- bzw. HO-Rapsöl ist in der Abbildung II. 12 dargestellt.

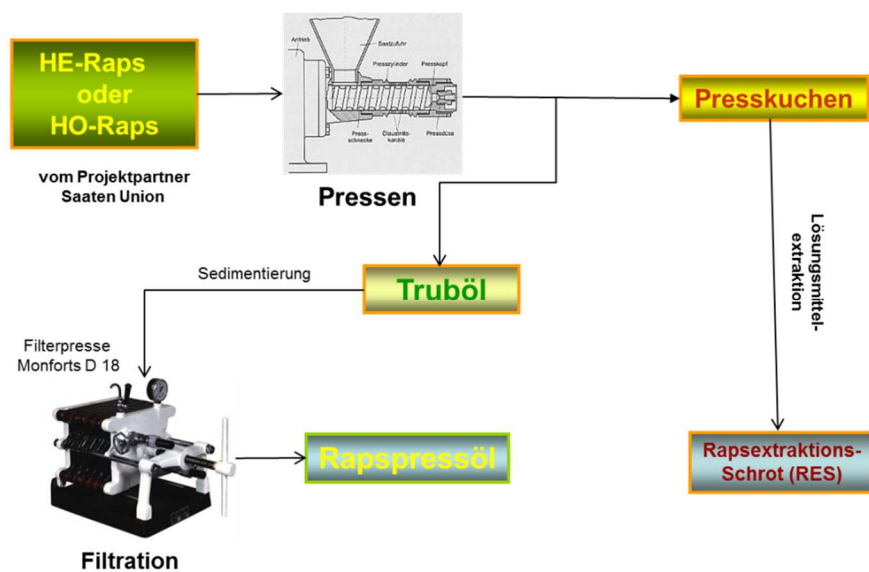


Abbildung II. 12: Schematische Darstellung der Gewinnung von HE- bzw. HO-Rapsöl

Nach Absprachen mit dem Projektpartner GEA wurden die beiden Rapssaatsorten sowohl nach dem Kaltpressverfahren bei ca. 50 °C als auch nach dem Heißpressverfahren bei ca. 90 °C gepresst. Die beiden Rapsölsorten der Kaltpressung wurden hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung sowie Phosphor- und Alkalimetallgehalte analysiert (Tabelle II. 6).

Tabelle II. 6: Einige Kennzahlen von HO- und HE-Rapsöl

Prüfparameter	HO-Rapsöl	HE-Rapsöl	Einheit	Prüfmethode
C12:0/ Laurinsäure	-	-	%	ISO 5508
C14:0/ Myristinsäure	-	-	%	ISO 5508
C16:0/ Palmitinsäure	3,1	3,2	%	ISO 5508
C16:1/ Palmitolein- säure	0,6	0,6	%	ISO 5508
C18:0/ Stearinsäure	1,5	0,8	%	ISO 5508
C18:1/ Ölsäure	77,85	10,5	%	ISO 5508
C18:2/ Linolsäure	11,4	12,9	%	ISO 5508
C18:3/ Linolensäure	2,9	9,5	%	ISO 5508
C20:0/ Arachinsäure	<0,1	0,6	%	ISO 5508
C20:1/ Gadoleinsäure	1,3	4,9	%	ISO 5508
C22:0/ Behensäure	0,3	0,6	%	ISO 5508
C22:1/ Erucasäure	<0,1	54,47	%	ISO 5508
C24:0/Lignocerinsäure	0,1	0,2	%	ISO 5508
C24:1/ Nervonsäure	0,2	1,1	%	ISO 5508
Phosphorgehalt	7,41	2,8	mg/kg	DIN EN 14107
Wassergehalt	768	586	mg/kg	DIN EN 12937
Calciumgehalt	17,1	18,9	mg/kg	DIE EN 14538
Magnesiumgehalt	3,27	0,65	mg/kg	DIN EN 14538

Durch die mechanische Kaltpressung konnte ca. 65 % des gesamten Rohöls gewonnen werden. Durch die Erhöhung der Presstemperatur auf ca. 90 °C konnte die Ölausbeute bei den beiden Rapsaatsorten um ca. 10 % erhöht werden. Als Folge der Heißpressung steigen die Anteile an Trüb-
stoffen sowie an den Phospholipiden an. Die Trübstoffe wurden mittels einer Kammerfilterpresse aus dem Öl entfernt. Ein Teil des Presskuchens aus der Heißpressung sowie aus der Kaltpressung wurde dem Projektpartner GEA zur Gewinnung polyphenolreicher Extrakte bereitgestellt. Die restlichen Mengen vom Presskuchen, dessen Restölgehalt von der Presstemperatur abhängig ist, wurden durch die Extraktion mit der bei PPM vorhandenen Extraktionsanlage entölt. Das angefallene Rapsextraktionsschrott wurde zwecks der Analysen und der Weiterverwertung den Projektpartnern ATB, TU Kaiserslautern, Clariant sowie den Fraunhofinstituten UMSICHT und ICT zu Verfügung gestellt. Die Abbildung II. 13 zeigt eine schematische Darstellung der Gewinnung von HE- bzw. HO-Rapsöl.

Die so gewonnenen Rohöle enthalten neben den Triglyceriden einige Begleitstoffe wie z.B. die Phospholipide, die freien Fettsäuren und die Farbstoffe, die die Ölqualität sowie die Lagerstabilität negativ beeinflussen können. Um die Bereitstellung von Rapsölmustern in der benötigten Ölqualität zu gewährleisten, wurden diese Begleitstoffe aus dem Rohrapsöl entfernt. Das geschieht durch die Teilraffination, wobei die Phospholipide durch die Entschleimung und die freien Fettsäuren durch die Neutralisation entfernt werden. Diese Raffinationsschritte, die in der Abbildung II. 13 schematisch dargestellt sind, wurden sowohl in der Technikumsanlage des PPM e.V. als auch beim Projektpartner GEA durchgeführt.

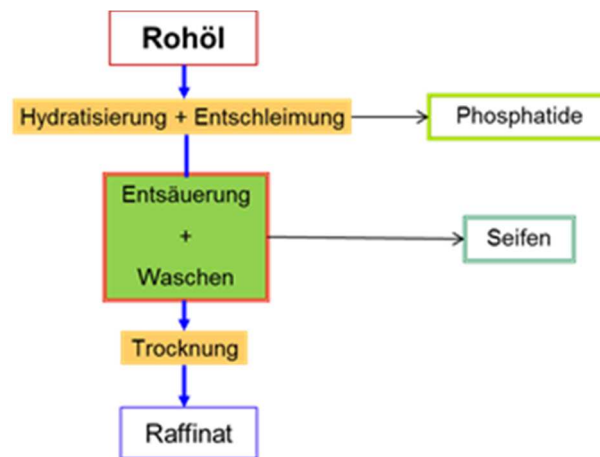


Abbildung II. 13: Schematische Darstellung der Teilraffination von HE- bzw. HO-Rapsöl

Die teilraffinierten Öle wurden entsprechend der in Abbildung II. 14 dargestellten Syntheseschritte chemisch modifiziert. Die Umesterung wurde mit Methanol unter der Verwendung von basischen Katalysatoren durchgeführt. Die freien Fettsäuregemische wurden durch die chemische Hydrolyse vom Rapsöl mit Laugen mit anschließender chemischer Hydrolyse der entstandenen Seifen hergestellt.

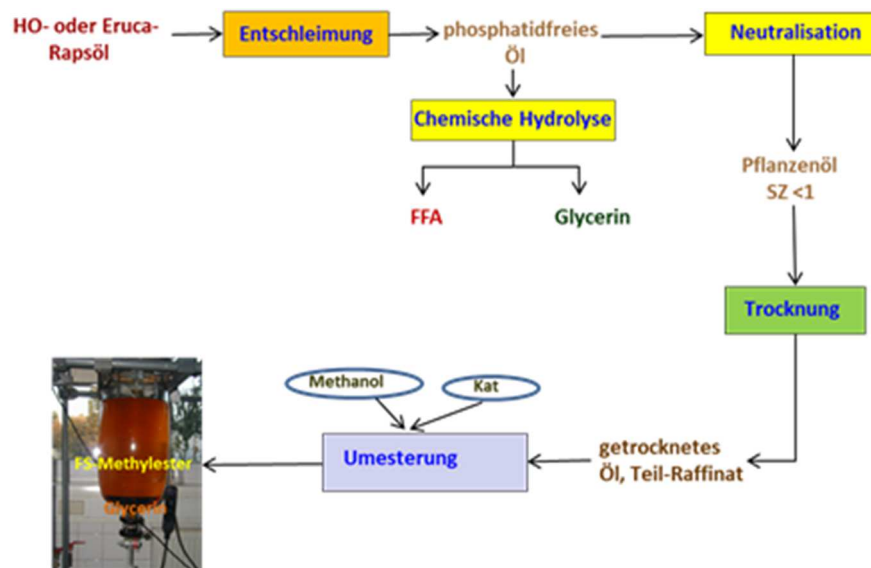


Abbildung II. 14: Schematische Darstellung der Umesterung sowie der chemischen Hydrolyse von HE- und HO-Raps

Die hergestellten Rapsmethylester wurden nach DIN EN 14105 und DIN EN 14103 analysiert. Die Analysenergebnisse der Umesterung der beiden Rapsöle (HO-Rapsöl und HE-Rapsöl) sind in der Tabelle II. 7 dargestellt.

Tabelle II. 7: Analysenwerte der hergestellten Rapsmethylester HO- RME sowie HE-RME

Prüfparameter	HO-RME	HE-RME	Einheit	Prüfmethode
Gehalt an freiem Glycerin	<0,1	<0,01	%	DIN EN 14105
Monoglycerid-Gehalt	0,09	0,2	%	DIN EN 14105
Diglycerid-Gehalt	0,32	0,07	%	DIN EN 14105
Triglycerid-Gehalt	0,63	0,04	%	DIN EN 14105
Gesamtglycerin-Gehalt	0,51	0,06	%	DIN EN 14105
Methylestergehalt	98,6	99,1	%	DIN EN 14103

Die hergestellten Fettsäuremethylester- sowie Fettsäuregemische wurden an die Projektpartner der Teilprojekte (TP2 und TP3) zwecks Aufreinigung mittels physikalischer Trennmethoden bzw. zur weiteren chemischen Modifizierungen geliefert.

Bei der chemischen Umesterung von HE-Rapsöl fällt das Rohglycerin als Nebenprodukt an, welches dem Projektpartner TU KL zur Verfügung gestellt wurde. Das Rohglycerin enthält neben dem Glycerin weitere Nebenprodukte der chemischen Umesterung des HE-Rapsöls wie z. B. Restmengen von Methanol und verwendeten Katalysatoren sowie die Seifen.

Extraktion polyphenolhaltiger Begleitstoffe

Bei der Entölung des Presskuchens fällt das Rapsextraktionsschrot als Nebenprodukt an, dessen Proteingehalt in der Regel bei ca. 35 % liegt. Die anderen Bestandteile des Rapsextraktionsschrots sind hauptsächlich die Fasern und die Kohlenhydrate. Das Rapsextraktionsschrot enthält außerdem in kleinen Mengen polyphenolische Verbindungen, die bis zu 85 % aus Sinapinsäure und deren Estern bestehen. Daneben kommen in geringerer Konzentration freie Phenolsäuren und unlöslich gebundene Phenolsäuren vor. Neben der Sinapinsäure wurden p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Gentisinsäure, Protocatechusäure, Syringinsäure, p-Coumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure und Chlorogensäure in freier bzw. veresterter Form nachgewiesen.

Zur Gewinnung der phenolhaltigen Extrakte aus HE- sowie HO-Rapsextraktionsschrot wurden verschiedene Chargen in Anlehnung an die Patentvorschrift WO/2008/138324 behandelt, wobei das entölte und zerkleinerte phenolhaltige Rapsextraktionsschrot in einem wässrigen, wässrig-alkoholischen oder alkoholischen Lösemittel suspendiert wurde. Durch das Zentrifugieren des Einsatzes entstehen zwei Phasen. Der Überstand der Zentrifugation ist der phenolhaltige Extrakt. Nach der Trocknung konnten Rückstände mit bis zu 17 mg/g polyphenolischen Verbindungen isoliert werden. Es wird hier auch vermutet, dass sich polyphenolreiche Extrakte aus den neuen Rapsorten mit modifizierten Eigenschaften, die durch die Projektpartner des Teilprojekts 1 zur Verfügung gestellt werden, gewinnen lassen werden.

Die Optimierung der Gewinnung phenolreicher Extrakte aus HO- bzw. HE-Rapsextraktionsschrot hat gezeigt, dass das Wasser als Extraktionsmittel aus technischen sowie ökonomischen Aspekten besonders geeignet ist. Unter der Verwendung der ermittelten optimalen Versuchsparameter konnten verschiedene Muster hergestellt werden, die nach der Trocknung an einige Projektpartner geliefert wurden.

Bei der Gewinnung der polyphenolreichen Extrakte werden die Proteine auch zum größten Teil aus dem Rapsextraktionsschrot entfernt. Die protein- und polyphenolarmen Rückstände der wässrigen Extraktion wurden dem Projektpartner ATB zur Verfügung gestellt, um den Einfluss dieser Behandlung auf die fermentative Gewinnung der Milchsäure zu untersuchen.

Teilbericht ATB

Entsprechend der Vorhabenbeschreibung war das Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim (ATB) im Rahmen des TP2 (Verfahren und Prozesse zur Ernte, zum Aufschluss und zur Aufreinigung) für die Erfassung und Charakterisierung sowie den Aufschluss und die Weiterverarbeitung von Rückständen aus der Ölsaatenverarbeitung verantwortlich. Aus Sicht der Schließung von Stoffkreisläufen bzw. der Entwicklung möglichst rückstandsfreier Technologien wurde hier die Verwendung der o.g. Reststoffe in geeigneten Fermentationsverfahren zur Herstellung von Milchsäure untersucht. Dabei wurden verschiedene Zielrichtungen verfolgt, indem mittels geeigneter Vorbehandlungsprozesse sowohl fermentierbare Zucker (C-Quelle) als auch ergänzende Nährstoffe (Mineralien, Aminosäuren, Proteine, Vitamine etc.) aus den abgepressten Rückständen der verwendeten Ölsaaten mobilisiert werden sollen. Je nach Ausbeute dieser Aufschlussverfahren können die daraus gewonnenen Extrakte/Konzentrate einzeln oder im Gemisch mit weiteren Substraten für die (Milchsäure-)Fermentation eingesetzt werden.

Zu Beginn der Arbeiten standen verschiedene Chargen von Rapspresskuchen (RPK), Rapsextraktionsschrot (RES) sowie Faserkonzentrat (FK) zur Verfügung, die durch den Kooperationspartner PPM Magdeburg bereitgestellt wurden. Dabei handelte es sich sowohl um Rückstände aus der ölsaatenverarbeitenden Industrie, die gewissermaßen als „Standard“ anzusehen sind, als auch spezielle Materialien, die aus den bei PPM durchgeführten Untersuchungen (z.B. Lösungsmittelextraktion, Proteinabtrennung) stammten. Es konnte festgestellt werden, dass es Parameter/Inhaltsstoffe gibt, die relativ eng beieinander liegen (z.B. Pges), während andererseits z.T. große Unterschiede (z.B. NH₄-N, ADL/Lignin) bestehen. Es war nun u.a. zu bewerten, welchen Einfluss die Zusammensetzung und Beschaffenheit der verschiedenen Rückstandsfraktionen auf die nachfolgenden Untersuchungen (Aufschluss und Vorbehandlung, Stammscreening, Fermentation) haben. Hinsichtlich der Vorbehandlungsmethoden incl. nachfolgendem enzymatischen Aufschluss wurden verschiedene Versuchseinstellungen (pH-Wert, Temperatur, Zeit, Feststoffanteil der Pressrückstände, Art und Dosierung der Enzyme) erprobt, um im Vergleich der Zuckerausbeuten zu einer vorläufigen Vorzugsvariante für die weiteren Arbeiten zu gelangen. Die beste Gesamtzuckerausbeute konnte mit dem Enzym CellicCTec2 (Novozymes) erzielt werden: 30,76 g/L Gesamtzucker aus 160 g/L Substrat: 0,192 g/g. Weitere Versuche erfolgten mit CellicCTec, Accellerase und „Novozymes Enzyme Kit“ mit und ohne zusätzlichem chemischen Aufschluss (pH=1,7) bei 120 g/L RES Konzentration. Die beste Gesamtzuckerausbeute konnte mit CellicCTec und vorherigem chemischem Aufschluss erzielt werden: 23,83 g/L Gesamtzucker aus 120 g/L Substrat: 0,199 g/g.

Auf der Basis eines nach dieser ausgewählten Parameterkombination hergestellten Hydrolysates aus Rapsextraktionsschrot wurden 92 Milchsäurebildner (ATB-eigene Stammsammlung sowie bisher nicht vollständig charakterisierte Isolate) getestet, um die leistungsfähigsten Stämme (im vorliegenden Fall wurden 7 näher betrachtet) für weiterführende Fermentationsversuche auszuwählen. Während das Stammscreening zur Suche neuer/anderer Kulturen parallel weitergeführt wird, erfolgte die vorläufige Auswahl eines Stammes (ATB-Eigenisolat A32) für die Laborfermentationen

zur Bewertung der Eignung vorbehandelter Pressrückstände. In den ersten Monaten der Projektbearbeitung wurden insgesamt 45 Fermentationsversuche im 1-Liter- bzw. 3-Liter-Maßstab durchgeführt, wobei u.a. ein Vergleich der Materialproben dahingehend vorgenommen wurde, inwieweit diese geeignet sind, einen vergleichsweise preisintensiven Standard-Nährmedienbestandteil wie Hefeextrakt (HE) zu ersetzen. Erwartungsgemäß konnten die Ergebnisse des Vergleichsversuchs (HE/Standard) nicht ganz erreicht werden, da Hefeextrakt für Milchsäurebakterien ein etabliertes Substrat für nahezu optimale Nährstoffversorgung darstellt. Ungeachtet dessen sind die erzielten Ausbeuten durchaus respektabel und erreichen in den besten Fällen bis zu 80% der Standardvariante.

Neben der eigentlichen Prozessperformance (z.B. Aufschluss- u/o Umsetzungsgrad) ist auch die Frage von Interesse, ob bzw. welche Art von Rückstand nach der Verwendung als Fermentationssubstrat zu erwarten ist. Die nachfolgende Abbildung II. 15 verdeutlicht, dass je nach Vorbehandlung verschiedene Anteile nicht umgesetzten Substrates in der Fermentationsbrühe zurückbleiben und nach Feststoffabtrennung zusammen mit der bakteriellen Biomasse als potentielle Energiequelle u/o Futtermittel zur Verfügung stehen.

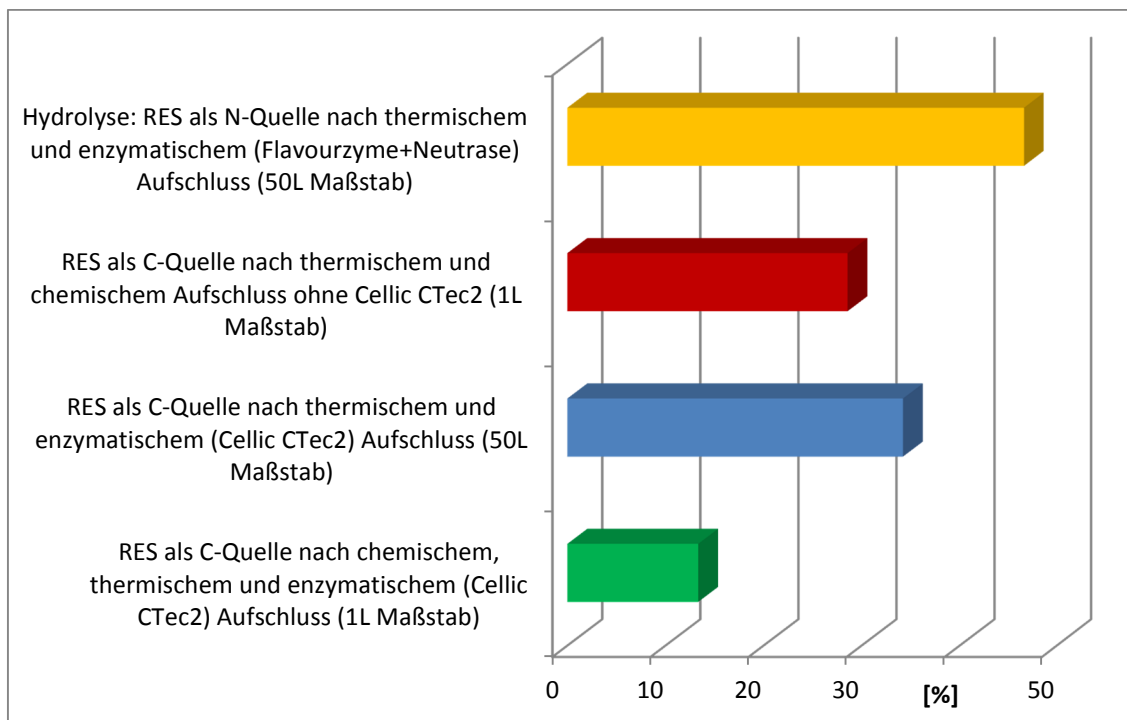


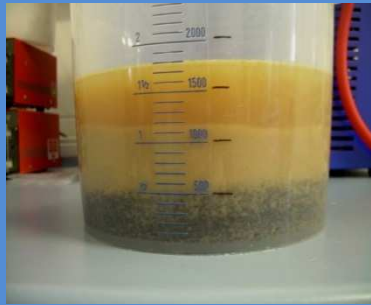
Abbildung II. 15: Nicht umgesetzter Anteil an Cellulose und Hemicellulose nach der Fermentation bzw. Hydrolyse

Neben diesen durch den Kooperationspartner PPM Magdeburg bereitgestellten Rückständen lieferte die GEA Westfalia zusätzlich je 25 kg heiß (RES SynRg18) bzw. kalt gepresste Rapsschalen (RES SynRg19). Im Vergleich zum Rapsextraktionsschrot selbst lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Rapsschalen nur noch ca. die Hälfte des ursprünglichen Potentials für die Milchsäurefermentation aufweisen. Eine entsprechende Auflistung dieser spezifischen Ausbeuten (bezogen auf den eingesetzten Rohstoff, TS-bereinigt) ist der folgenden Tabelle II. 8 zu entnehmen. Die hier zusätzlich aufgenommene Variante HE-RES (high eruca) lässt angesichts der wenigen Befunde für die

Eignung als Fermentationssubstrat keine systematische Tendenz erkennen. Bereits in vielen Untersuchungen zuvor gab es weder Unterschiede zwischen Standard-RES, HO- (high oleic) oder aber der HE-Variante.

Tabelle II. 8: Normierte Milchsäureerträge für verschiedene Stämme und Substrate

Stamm	Milchsäure [g/g]			
	SynRg 17, Standard-RES	SynRg18, heiß gepr. Schalen	SynRg 19, kalt gepr. Schalen	SynRg 20, HE-RES
A32	0.213	0.125	0.109	0.189
A162	0.208	0.129	0.098	0.189
A40	0.201	0.127	0.122	0.203
A166	0.192	0.131	0.118	0.185
A211	0.200	0.128	0.101	-



Im Vergleich zur (insgesamt sehr spärlichen) Literatur [26, 27] bezüglich der biotechnologischen Verwertung von Rückständen aus der Ölsaatenverarbeitung lässt sich dennoch feststellen, dass Milchsäurebakterien vergleichsweise gute Substratverwerter sind. In der hier genannten Quelle ist ein einziger Anwendungsfall für ein vergleichbares Fermentationsprodukt (Succinate) dokumentiert, für welches jedoch lediglich ein spezifischer Ertrag von 0,115 g/g erzielt wurde. Im Vergleich dazu liegen sogar die ausgepressten Schalen (Proben 18 & 19) noch mehrheitlich über diesem Wert, wengleich eine wirtschaftliche Verwertung zum gegenwärtigen Zeitpunkt immer noch nicht gegeben sein sollte.

Ein im Anschluss an die Laboruntersuchungen durchgeführter Pilotversuch im 75-Liter-Maßstab baute folgerichtig sowohl auf dem aus dem Stammscreening hervorgegangenen Stamm A32 (*Bacillus coagulans*) als auch den als vorläufig optimal ermittelten Vorbehandlungsprozessen/-parametern für den Material-Typ RES auf. Die in nachfolgender Tabelle bzw. Abbildung II. 16 dargestellte Abfolge der Downstream-Prozessstufen

Tabelle II. 9: Auflistung der Downstream-Prozessstufen

UF:	Ultrafiltration
Soft:	Softening / Enthärtung
ED:	Electrodialyse (m: monopolar; b: bipolar)
IC/K:	Ion exchange/cations (Kationentauscher)
IC/A:	Ion exchange/anions (Anionentauscher)
Decol:	Decolorization / Entfärbung
Evap:	Evaporation / Verdampfung

[26] Chen K, Zhang H, Miao Y, Wei P, and Chen J 2011 Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated rapeseed meal for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*; *Enzyme and Microbial Technology* 48 339-344

[27] Lomascolo, A.; Uzan-Boukhris, E.; Sigoillot, J.-C.; Fine, F.: Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges. - *Appl Microbiol Biotechnol* (2012) 95:1105–1114

schließt entsprechend alle Schritte von der Fermentationsbrühe bis hin zum aufkonzentrierten Produkt ein. Der für die Weiterverarbeitung zu PLA wichtige Parameter der optischen Reinheit hier erzeugter L(+)-Milchsäure lag bei 99,5%. Inwieweit die im vorliegenden Fall verbliebenen Restverunreinigungen durch insb. Sulfat-Ionen eine mögliche Weiterverarbeitung stören, war nicht Gegenstand der hier durchgeführten Untersuchungen, sollte aber weiter verfolgt werden.

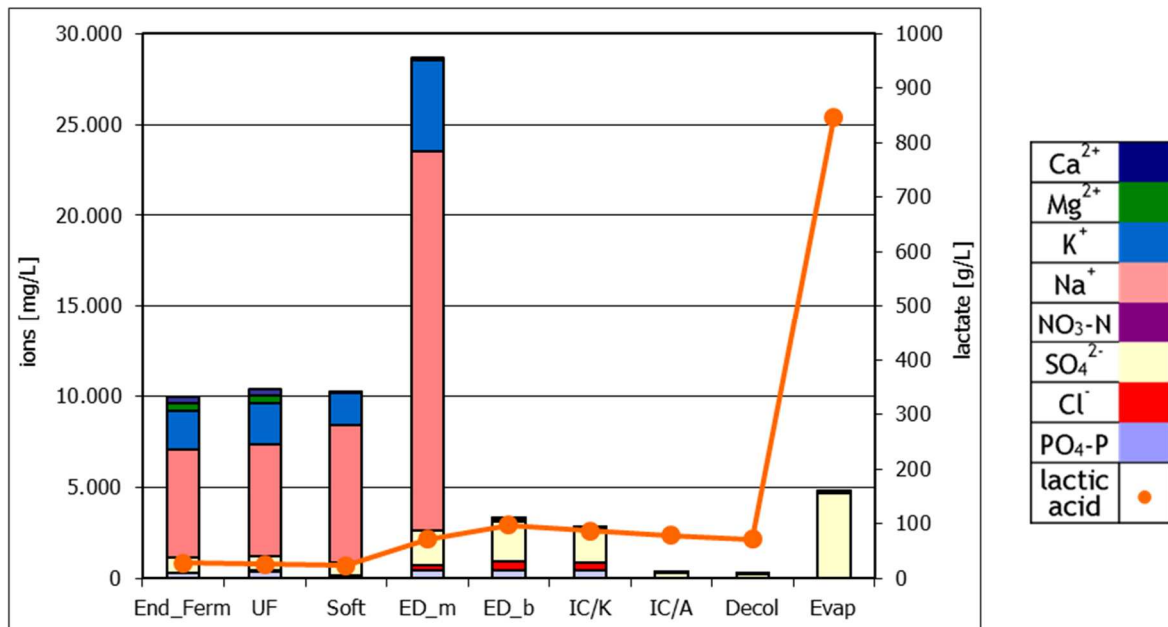


Abbildung II. 16: Downstream Processing (DSP) für Rapsextraktionsschrot im 75-Liter-Maßstab

Im Zuge der weiteren Untersuchungen zu Vorbehandlung/Aufschluss, Hydrolyse sowie nachfolgender Fermentation der verfügbaren C- u/o Nährstoffquellen wurden folgende Untersuchungen im Detail durchgeführt:

- Einsatz verschiedener Enzympräparate/Kombinationen hinsichtlich Freisetzung von verfügbaren Nährstoffen
- Kombination der Ölsaatenrückstände mit weiteren C-Quellen (z.B. Zuckerrüben- und Zuckerrohrmelasse)
- Erprobung von RES als Nährstoffquelle in kontinuierlicher Fermentation mit Melassesupplementierung
- Testung verschiedener RES-Chargen bzw. der abgetrennten Rapsschalen in Fermentationen als HE-Ersatz bzw. „Vollsubstrat“ (C-Quelle)

Im Hinblick auf eine möglichst praxisnahe Verwendung der vorgenannten Ölsaatenrückstände als potentielle Nährstoffadditive in der Milchsäurefermentation wurde die anfangs als C-Quelle eingesetzte Glucose durch Melasse (aus der Verarbeitung von Zuckerrüben & Zuckerrohr) ersetzt. Am Ende der Fermentation wurden in beiden Fällen mit Zuckerrübenmelasse aufgrund der etwas höheren Zuckerstartkonzentrationen (hier nicht dargestellt) auch höhere Endtiter an Milchsäure (80-90 g/L) erreicht. Im direkten Vergleich bedeutet das für die Verwendung von Zuckerrübenmelasse als C-Quelle in der Fermentation, dass für den hier verwendeten Bakterienstamm eine sehr gute Nährstoffversorgung durch RES gewährleistet und Hefeextrakt als teures Supplement ersetzt werden kann. Eine weitere aussichtsreiche und zugleich kostengünstige Option ist die Verwendung von

ausgepresster Grünmasse als Fermentationssupplement, da der Graspresssaft (GPS) eine Reihe von geeigneten Nährstoffen für Milchsäurebildner enthält [28]. Eine GPS-Zugabe wirkte sich auf alle hier untersuchten Stämme positiv aus. Inwieweit eine Optimierung der jeweiligen Zusammensetzung weitere Effekte mit sich bringt bzw. das gesamte Fermentationsmedium auf Basis von Grassaft (statt Wasser) hergestellt werden könnte, müsste genauso noch untersucht werden wie ein möglicher Einfluss auf das abschließende downstream processing.

Als weiterführenden Versuch zu dieser offensichtlich sehr vorteilhaften Kombination aus Zuckerrübenmelasse und RES wurde der gleiche Stamm A40 (ATB-Isolat) in kontinuierlicher Kultur getestet. Es wurden verschiedene Zulaufkonzentrationen an Melasse eingestellt, während ein proteolytisch aufgeschlossenes Rapsextraktionsschrot als Nährstoffsupplement zugefüttert wurde. Die komplette Zellrückführung erfolgte mittels einer Mikrofiltrations-Hohlfaser bei Durchflussraten von 0,11 h⁻¹. Nach dem batch-Start und einer Anfahrphase stellt sich ab der 35.h eine relativ stabile stationäre Milchsäurekonzentration >60 g/L ein. Der mit der Melasse zugefütterte Zucker (Glucose) wurde über die gesamte Fermentationszeit komplett umgesetzt. Trotz dieser noch nicht optimierten Prozessführung kann im Vergleich zu anderen konti-Kultivierungen die Eignung von RES als Nährstoffquelle für die Milchsäurefermentation bestätigt werden.

Unter Berücksichtigung der mit dem vorliegenden Projekt angestrebten Ziele, eine komplette Biomasse-Wertschöpfungskette incl. der Reststoffverwertung im Sinne rückstandsfreier Verfahren zu verfolgen und zu optimieren, lassen sich die Ergebnisse (hier speziell reststofforientiert) wie folgt zusammenfassen:

- alle bisher untersuchten Rapsrückstände (Extraktionsschrot, Presskuchen, Faserkonzentrat, abgepresste Schalen) konnten hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Beschaffenheit reproduzierbar charakterisiert werden, wobei für ausgewählte Vergleichsmessungen eine gute Übereinstimmung der (Analysen-)Ergebnisse vorlag
- die vorgenannten Materialien konnten durchweg, jedoch mit unterschiedlichem Erfolg, als Basis bzw. Zugaben für Fermentationsmedien zur Kultivierung von Milchsäurebildnern verwendet werden
- speziell die Möglichkeit, sehr teure Supplemente wie z.B. Hefeextrakt zu ersetzen, wird nach den bisherigen Ergebnissen als aussichtsreiche Option angesehen
- für den Labormaßstab wurden verschiedene Vorbehandlungsmethoden (chemisch, thermisch u/o enzymatisch) erprobt, um die Inhaltsstoffe der Rapsrückstände zu mobilisieren bzw. für die Mikroorganismen zugänglich zu machen
- je nach gewählter Aufbereitung der untersuchten Materialien kann deren spätere Verwendung als Fermentationssubstrat angepasst werden
- es konnten eine Reihe von (Milchsäurebildner-)Stämmen identifiziert werden, die bereits eine gewisse Affinität zu dem speziellen Substrat aufweisen, was den Schluss zulässt, dass sowohl andere Ölsaaten prinzipiell für ähnliche Zwecke nutzbar sind und auch andere Mikroorganismenspecies (zur Herstellung entsprechend anderer/weiterer Produkte) darauf kultivierbar sein sollten

[28] Vodnar, D.C.; Venus, J.; Schneider, R.; Socaciu, C. Lactic Acid Production by *Lactobacillus paracasei* 168 in Discontinuous Fermentation Using Lucerne Green Juice as Nutrient Substitute. *Chemical Engineering & Technology* 33(2010) No. 3, 468-474

- milchsäurehaltige Fermentationsbrühen auf Basis von verschiedenen Rückständen aus der Ölsaatenverarbeitung konnten mit dem am ATB installierten (Standard-)DSP komplett bis zum 90%-igen Produkt aufgearbeitet werden

Aus den vorgenannten Erkenntnissen und erzielten Fortschritten lässt sich ableiten, dass die hier für das System „Raps/Milchsäurefermentation“ erarbeiteten Grundlagen keine Insellösung sind, sondern stattdessen Modellcharakter haben und auf andere Systeme „Substrat/Bioprozess“ übertragen werden können.

Teilbericht TU KL

Arbeiten im Rahmen des Teilprojektes 2

Das Lehrgebiet für Bioverfahrenstechnik der TU Kaiserslautern beschäftigte sich in der ersten Förderphase des Projektes mit einem Proof of Principle für die Vorbehandlung, Hydrolyse, Extraktion sowie Aufarbeitung von Polyphenolen unter Einsatz von Zeolithen des Projektpartners Clariant aus Traubentrester, Rapsextraktionsschrot (RES) und Weizen. In der zweiten Förderphase wurden zusätzlich die Aufarbeitung der Phytinsäure und Integrationsmöglichkeiten in den bestehenden Prozess sowie Alternativen untersucht. Da sich Rapsextraktionsschrot als vielversprechendste Quelle für die Gewinnung von Polyphenolen und Phytinsäure erwies, wurde die Prozessentwicklung und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung daraufhin ausgelegt. Weiterhin gehörte es zu den Aufgaben der TU Kaiserslautern, das im Projekt anfallende Nebenprodukt Rohglycerin wertsteigernd umzusetzen. Durch *Clostridium diolis* wurde das Glycerin zu 1,3-Propandiol umgesetzt. Hierbei wurden neben dem Fermentationsprozess auch die Vorbehandlung des Rohglycerins (Adsorption der inhibierenden Fettsäuren) und die Aufarbeitung des 1,3-Propandiols untersucht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse bezüglich der Arbeitspakete AP6.1 (Aufarbeitung und Extraktion von Polyphenolen (und Phytinsäure)), AP6.2 (Gewinnung und Aufarbeitung der Pflanzenöle) und AP6.3 (Etablierung einer Polyphenol-Analytik) dargestellt. Details zu den Ergebnissen sind den jeweiligen Zwischenberichten des TP2 von 2010 bis 2014 zu entnehmen.

Aufgaben zu AP 6.1: Aufarbeitung und Extraktion von Polyphenolen (und Phytinsäure)

Als Rohstoffquellen wurden von der TU Kaiserslautern Rapsschrot, Weizen und Traubentrester eingesetzt. Während das Rapsschrot und der Weizen von den SynRg-Projektpartnern bezogen wurden, wurde der Traubentrester extern vom Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (Prof. Fischer) zur Verfügung gestellt.

Aus den Extraktionsversuchen mit Wasser, Methanol, Ethanol und Aceton ging hervor, dass entgegen den Erwartungen Rapsschrot und nicht der Traubentrester als reichhaltigste Quelle für Polyphenole anzusehen ist. Die geringen Ausbeuten beim Traubentrester sind darauf zurückzuführen, dass dieser zum größten Teil nur aus den Traubenkernen und Zweigen bestand und nicht wie angenommen aus reinen Traubenschalen. Da es prozesstechnisch zu aufwendig bzw. zu unwirtschaftlich wäre diese aus dem Trester zu entfernen, wurde sich im weiteren Verlauf der Untersuchungen auf Rapsschrot und Weizen fokussiert.

Es sei hier angemerkt, dass die hier für die Ressource Raps dargestellten Verfahren und Methoden prinzipiell auch auf den Rohstoff Weizen übertragbar sind.

Aus den ermittelten Ergebnissen zur Extraktion und Hydrolyse des Rapsschrots sowie der Aufarbeitung der jeweiligen Wertstofffraktionen konnten verschiedene Verfahrenskonzepte aufgestellt werden. Nachfolgend werden die jeweiligen Grundoperationen, die in den Zwischenberichten des TP2 von 2010 - 2014 detailliert dargestellt sind, nochmals kurz beschrieben.

Allen Verfahren ist dabei eine vorherige chemische Hydrolyse gemein. Eine enzymatische Hydrolyse konnte hier ebenfalls erfolgreich in nativer sowie immobilisierte Form etabliert werden, beide Alternativen stellten sich aber aus wirtschaftlicher Sicht als nicht tragbar heraus (Zwischenbericht TP2 2012 und 2014). Als optimale Bedingungen für die chemische Hydrolyse wurden ein LS-Verhältnis von 20 mL/g, eine Temperatur von 50 °C, eine Reaktionszeit von 30 min und ein pH-Wert von 12 festgelegt. Durch eine Zentrifugation nach der Hydrolyse kann neben der Biomasse bereits eine erste Proteinfraction (überwiegend Globulin) gewonnen werden. Im Anschluss erfolgte eine weitere Proteinfällung (überwiegend Albumin) bei pH 2.

Die Ergebnisse zur Aufarbeitung der Polyphenole mittels Adsorbentien zeigten, dass die vom Projektpartner Clariant zur Verfügung gestellten Zeolithe EXM 2200 und EXM 2202 den kommerziellen Produkten PVPP (Divergan RS, BASF), XAD 16, XAD 7 HP, XAD 4 (Rohm & Haas), SP70 (Sepabeads®) überlegen sind. Die Versuche legten dar, dass eine quantitative Bindung (100 %) sowie Elution (96,3 %) der Sinapinsäure aus den hydrolysierten Rapsschrotextrakten möglich ist (Zwischenbericht TP2 2010 - 2012).

In Hinblick auf die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung wurde für die Aufarbeitung auch ein alternatives Verfahren, die Flüssig-Flüssig-Extraktion, untersucht. Im Rahmen eines Lösemittelscreenings konnte Ethylacetat als Lösungsmittel ermittelt werden, welches für die Prozessführung am besten geeignet ist. Bei einem LL-Verhältnis von 1:1 mL/mL bei 25 °C wurde das Gleichgewicht (97,6 %) in nur 5-10 min erreicht. Mittels darauffolgender Kristallisation der Sinapinsäure konnte ein Reinheitsgrad >98 % erzielt werden (Zwischenbericht TP2 2014).

Zur Gewinnung der Phytinsäure wurde der Anionentauscher Purolite A200 eingesetzt bzw. eine Fällung mit CaCl₂ durchgeführt. Bei der Fällung resultiert eine Ausbeute von 91,5 %, während beim Einsatz des Ionentauschers lediglich eine Ausbeute von 50,5 % erzielt werden kann. Vorteilhaft beim Fällungsverfahren ist zudem, dass hierbei direkt Ca-Phytat mit einer Reinheit von ca. 90 % gewonnen werden kann. Aufgrund der eingesetzten Elutionsmittel für das Ionentauscherverfahren resultiert Na-Phytat, welches einen geringeren Marktpreis aufweist (Zwischenbericht TP2 2013 und 2014).

Des Weiteren konnte ein chromatographisches Verfahren unter Einsatz von Purolite A200 entwickelt werden, welches eine parallele Gewinnung von Phytin- und Sinapinsäure erlaubt. Bislang konnte eine Ausbeute von 58,5 % für Sinapinsäure und 29,8 % für Phytinsäure erreicht werden. Allerdings wird bei diesem Verfahren lediglich eine Unit-Operation angewendet. Über eine entsprechende Optimierung ließe sich dessen Potential gegebenenfalls noch weiter ausschöpfen (Zwischenbericht TP2 2013).

Darüber hinaus wurde eine Wirtschaftlichkeitsbetrachtung in Hinblick auf die Aufarbeitung der Wertstoffe (Sinapinsäure, Proteine, Phytinsäure) mit Hilfe des Software-Tools SuperPro Designer® (Intelligen, Inc.) durchgeführt. Als Grundlage für die Kalkulation wurde angenommen, dass 500 t Brassylsäure (Basismaterial des Polyamids) pro Jahr bereitzustellen sind, womit ein Eingangsstrom in den Prozess von 2.800 t/a Rapsextraktionsschrot resultiert.

Für die innerhalb des Projekts entwickelten Verfahren wurde eine Wirtschaftlichkeitsbetrachtung durchgeführt, wobei im Folgenden lediglich auf jene Verfahren eingegangen wird, die ein entsprechendes Potential aufweisen. Als unwirtschaftlich stellte sich zum einen das im vorangegangenen Bericht beschriebene chromatographische Verfahren sowie jenes Verfahren, das zur Aufreinigung der Phytinsäure einen Ionentauscher einsetzt, dar. Unter bestimmten Voraussetzungen, die nachfolgend skizziert werden, sind zwei Prozesse nach der Extraktion des Rapsextraktionsschrots wirtschaftlich durchführbar:

- a) Fällung der Proteine aus Überstand und Separation → LL-Extraktion der Sinapinsäure (Ethylacetat) → Fällung der Phytinsäure aus wässriger Phase;
- b) Fällung der Proteine aus Überstand und Separation → Adsorber zur Isolierung der Sinapinsäure → Fällung der Phytinsäure aus Überstand.

Tabelle II. 10: Kenndaten des Prozesses (bezogen auf die Prozessierung von 2.800 t Rapsextraktionsschrot pro Jahr)

Wertstoffe	Menge [t]	Anzahl der Batches	Betriebszeit [h]
Protein	1.250	467 (Verfahren a)	7909 (Verfahren a)
Sinapinsäure	24		
Ca-Phytat	137	471 (Verfahren b)	7912 (Verfahren b)

Eine Kostenaufstellung für die eingesetzten Materialien wurde auf Basis der Annahme getroffen, dass diese zu einem Zehntel des günstigsten ermittelten Preises verfügbar sind. Nach Aussagen der Industriepartner des SynRg-Projektes gilt diese Annahme für eine erste Abschätzung als realistisch, aber auch als sehr konservativ gewählt. Noch schwieriger zu beurteilen sind die Annahmen für die Verkaufspreise der gewonnenen Produkte. Hierfür wurden Preise über verschiedene Großhandelsplattformen wie „alibaba.com“ oder „guidechem.com“ ermittelt. Da Rapsprotein gegenwärtig nicht kommerziell verfügbar ist, wurde aufgrund der weitgehenden Analogie der Eigenschaften von Raps- und Sojaprotein der Preis für Sojaprotein angenommen. Zudem wurde für die Abwasserbehandlung bzw. Abfallströme ein Schätzwert von 2 €/m³ Abwasser angenommen.

In

Tabelle II. 11 sind die zu erzielenden Preise dargestellt, welche erforderlich sind, um eine Payback-Time von 10 Jahren zu erhalten. Bei der Darstellung wurde der Preis für die Phytinsäure als variable Größe angenommen. Aus

Tabelle II. 11 ist ersichtlich, dass unter den getroffenen Annahmen das Verfahren (b) bereits mit einem geringfügig erhöhten Preis für das Ca-Phytat wirtschaftlich durchgeführt werden könnte.

Tabelle II. 11 Übersicht der zu erzielenden Preise zum Erreichen der Wirtschaftlichkeit der Prozesse; als variable Größe wurde im Beispiel die Phytinsäure angenommen (bezogen auf eine Payback-Time von 10 Jahren)

Wertstoff	Verfahren a) (LL-Extraktion/Fällung)	Verfahren b) (Adsorber/Fällung)	Höchster Referenzpreis
Protein [€/kg]	2,4	2,4	2,4
Sinapinsäure [€/kg]	177,78	177,78	177,78
Ca-Phytat [€/kg]	209,63	187,41	185,19

Aufgaben zu AP 6.2 Fermentative Verwendung von Glycerin aus der Pflanzenölsplattung

Das im Projekt anfallende Rohglycerin aus Umesterung von high oleic Rapsöl zeigte eine deutliche Inhibierende Wirkung auf den Produktionsorganismus zur 1,3-Propandiol Herstellung, *Clostridium diolis*. In der Literatur werden vermehrt Fettsäuren als wichtigste inhibitorische Substanz in Rohglycerinen beschrieben. Durch Inhibitionsstudien konnten der kritische Effekt der Fettsäuren auf das hier verwendete Fermentationssystem bewiesen werden. Es wurde eine Analytik etabliert, um durch Extraktion, mit anschließender Derivatisierung und gaschromatographischer Analytik die Fettsäurezusammensetzung und Konzentration in Rohglycerinwässern zu bestimmen.

Zur Entfernung der hemmenden Effekte wurden verschiedenen Strategien, wie das Ausfällen durch Ansäuern, flüssig-flüssig Extraktion sowie durch Adsorption untersucht. Durch ein Adsorbereenscreening wurde in einem durch die Kooperationspartner der Clariant AG zur Verfügung gestelltem Hydrotalcit ein vielversprechendes Material zur Adsorption von Fettsäuren aus wässrigen Systemen identifiziert. Durch eine Vorbehandlung mit diesem Material konnte eine drastische Reduktion der Fettsäurekonzentration im Rohglycerin und damit eine Aufhebung des inhibierenden Effektes erreicht werden. Die Eigenschaften des Hydrotalciten konnten weiterhin durch eine Kalzinierung bei 500°C deutlich verbessert werden. Die Untersuchung des Adsorptionsmechanismus der Fettsäurebindung zeigt eine deutliche Abhängigkeit der Fettsäureadsorption von der vorliegenden Fettsäurekonzentration. Durch XRD Analysen (siehe Abbildung II. 17) konnte eine Interkalierung der Fettsäuren in die Hydrotalcit-Struktur nachgewiesen werden. Diese tritt jedoch erst ab einer Umgebungskonzentration von über 25 gL⁻¹ Rohglycerin, was einer Fettsäurekonzentration von über 7 gL⁻¹ entspricht, auf. Diese Beobachtung zeigt, dass verschiedene Mechanismen an der Fettsäurebindung durch Hydrotalcit beteiligt sind, nämlich Oberflächenadsorption durch hydrophobe Wechselwirkungen, sowie Interkalierung.

Aufgrund der Substrathemmung können in einfachen Satzfermentationen lediglich Produkttiter von um die 35 gL⁻¹ erreicht werden. Diese geringe Konzentration zieht erhöhte Aufarbeitungskosten nach sich. Um die Produktkonzentration zu erhöhen, wurden verschiedene Zufütterungs-Strategien mit Hilfe eines modellbasierten Ansatzes untersucht.

Das entwickelte Modell ist in der Lage, den Prozess mit hinreichender Genauigkeit abzubilden. Durch in der Modellierungssoftware integrierte Optimierungs-Algorithmen konnte der Prozess optimiert werden, wobei ein Produkttiter von 47 gL⁻¹ erzielt wurde.

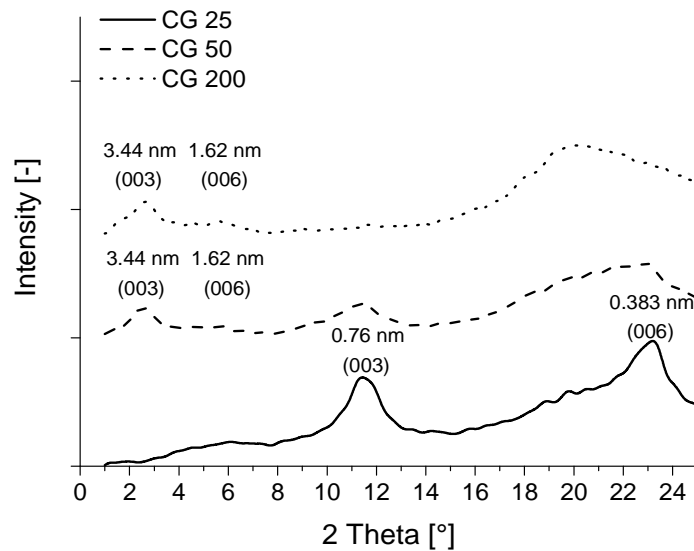


Abbildung II. 17: Röntgen Pulverdiffraktogramme von Hydrotalcit EMX 2152 nach Beladung mit Rohglycerinlösungen der Konzentrationen 25, 50 und 200 gL⁻¹.

Desweiteren wurde innerhalb dieses Projektes die Aufarbeitung des 1,3-Propandiols untersucht. Hierzu wurde wieder eine adsorptive Strategie verfolgt. Durch ein Adsorberscreening konnte ein Zeolith (EXM 2202) mit einer maximalen Beladungskapazität von 165 mgg⁻¹ anhand des Langmuir-Modells ermittelt werden. Eine Elution des gebundenen 1,3-Propandiols konnte mit 75 %igem Ethanol zu fast 90 % realisiert werden. Da dieses Material aufgrund der geringen Partikelgröße für den Einsatz im Festbett nicht geeignet ist, wurde hierfür ein Zeolith mit größeren Partikeln, jedoch ansonsten vergleichbaren Eigenschaften, verwendet (EXM 2310). Im dynamischen System konnten hiermit Beladungen von 94 mgg⁻¹ im Vergleich zu 104 mgg⁻¹ im statischen System bei einer PDO-Konzentration von 50 gL⁻¹ erzielt werden.

Mit Hilfe der Thomasgleichung konnte die Festbettadsorption in guter Näherung beschrieben werden. Durch eine Kombination der Modelle der Festbettadsorption sowie der Fermentation konnte ein Modell zur Beschreibung eines Fermentationsprozesses mit interner Produktabtrennung durch Adsorption entwickelt werden. Das Modell konnte anhand einer 0,5 L batch-Fermentation, bei der eine mit 100 g EXM 2310 bepäckte Säule nach 10 h mit einer Flussrate von 5 mLmin⁻¹ zugeschaltet wurde, validiert werden. Eine Gegenüberstellung der experimentellen Daten mit den Vorhersagen der Simulation ist in Abbildung II. 18 zu sehen.

Durch Simulationsstudien konnte anschließend gezeigt werden, dass eine in situ Produktabtrennung im Falle der 1,3-Propandiol Fermentation mit *C. diolis* nicht wie erwartet zu gesteigerten Produktivitäten durch längere Prozesslaufzeiten führt. Grund hierfür ist die Ansammlung des ebenfalls toxisch auf die Zellen wirkenden Nebenproduktes 1,3-Propandiol, welches nicht effektiv durch den Zeolithen EXM 2310 adsorbiert wird.

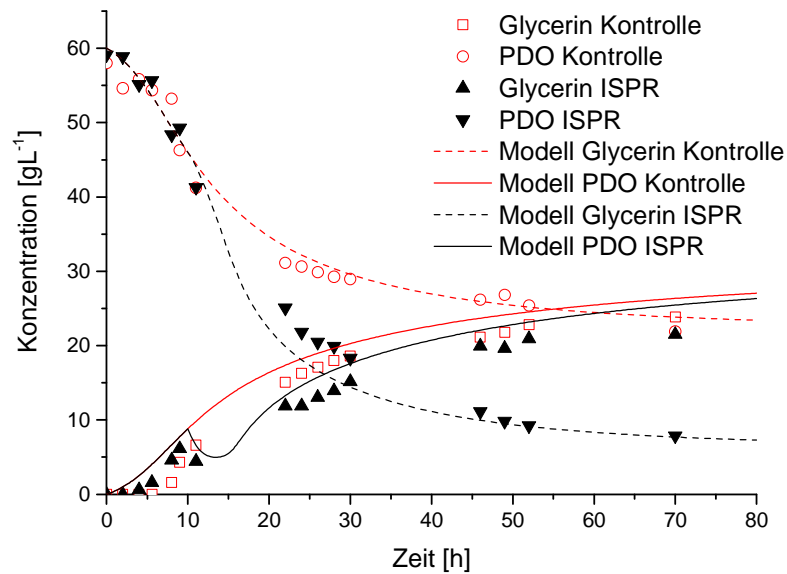


Abbildung II. 18: Gegenüberstellung von Modell und Experiment zur ISPR von 1,3-PDO aus einer *C. diolis* Fermentation.

Der Prozess zur Herstellung von 1,3-Propandiol aus aufgereinigtem Rohglycerin wurde ebenfalls unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten mit Hilfe der Prozessfluss-Simulationssoftware SuperPro Designer betrachtet. Die Produktabtrennung wurde als Festbettadsorption mit zellfreier Fermentationsbrühe, die durch eine batch-Fermentation erhalten wurde, simuliert. Für die Simulation wurde ebenfalls das für AP 6.1 beschriebene Szenario hinsichtlich der Anlagendimensionen betrachtet. Dieses entspricht einer jährlichen Glycerinmenge von 280 t. Da dies ein relativ geringes Volumen darstellt, wurde als Vergleichsszenario die Glycerinmenge angenommen, die bei einer Biodieselanlage von durchschnittlicher Größe anfällt, bei der etwa 5700 t Glycerin pro Jahr anfallen²⁹.

Tabelle II. 12: Wirtschaftliche Schlüsselparameter der Stoffflusssimulation der 1,3-Propandiol Herstellung aus Rohglycerin

	Payback Time [Jahre]	Produktionskosten pro t 1,3-PDO [€t ⁻¹]	Anlagenkosten [10 ⁶ €]
Szenario a (280 t)	-	3001,71	47
Szenario b (5700 t)	10,91	746,64	(537)

Aus den beiden in Tabelle II. 12 dargestellten Szenarien wird der Skaleneffekt der Anlagengröße sehr deutlich. Mit einer Anlagengröße von nur 280 t Glycerin pro Jahr liegen die Produktionskosten von 1,3-Propandiol deutlich über dessen Marktwert, der mit 1100 €t⁻¹ angenommen wurde. Die Produktionskosten werden hierbei zu fast 70 % durch Arbeitskosten verursacht. Im Falle eines Jahresdurchsatzes von 5700 t Glycerin liegen die Produktionskosten deutlich niedriger, bei 746,6 €t⁻¹ 1,3-PDO. Die Produktionskosten werden zu 62 % durch Rohstoffkosten, zu 15 % durch Arbeitslöhne

²⁹ **comparing plant capacities of US ethanol and biodiesel industries**

[biomassmagazine.com/articles/9801/comparing-plant-capacities-of-u-s-ethanol-biodiesel-industries], abgerufen am 21.08.2014

und zu 10,6 % durch Entsorgungskosten (Abwasser) verursacht. Hierbei wird eine Payback Time von 10,9 Jahren angegeben, was für eine Anlage dieses Typs in einem realistischen Bereich liegt. Auffällig sind jedoch die enormen Anlagenkosten von fast 540 Millionen €. Diese setzen sich überwiegend aus den Kosten für die Festbettadsorption zusammen. Die Vorbehandlung des Rohglycerins macht hier 20 % der Anlagenkosten aus, während die Aufreinigung des 1,3-PDO 67 % der Anlagenkosten verursacht. Diese Zahlen sind natürlich nicht realistisch und hängen damit zusammen, dass die verwendeten Adsorber derzeit in den benötigten Mengen kommerziell nicht erhältlich sind.

Aufgaben zu AP6.3: Etablierung der Polyphenolanalytik

Eine Analytik zur qualitativen und quantitativen Bestimmung sämtlicher für das SynRg-Projekt relevanter Polyphenole konnte erfolgreich etabliert werden. Die Analyse wurde mit einer HPLC-Anlage (Alliance Waters 2695) mit integriertem UV/DAD-Detektor (Alliance Waters 2998) durchgeführt (Zwischenbericht TP2 2010).

4. Verwertung

Die deutsche Chemische Industrie liegt weltweit hinter den USA, China und Japan an vierter Stelle. In der chemischen Industrie stellt die Verwendung von Verbindungen auf petrochemischer Basis noch den größten Anteil dar. Bislang dominieren Prozesse der klassischen Chemie, jedoch erlangt in letzter Zeit zunehmend der Einsatz nachwachsender Rohstoffe als interessante Alternative an Bedeutung (Abbildung II. 19).

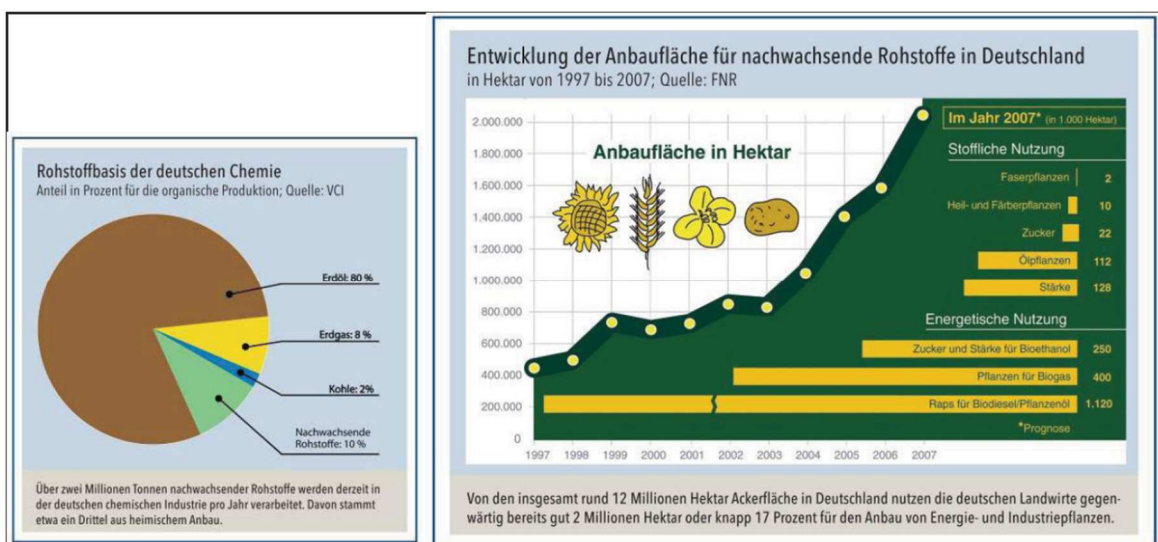


Abbildung II. 19: Basis nachwachsende Rohstoffe (Quelle: FNR)

So wird auch die industrielle Biotechnologie von vielen Unternehmen als Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts gesehen [30]. Etwa 10 % der eingesetzten Rohstoffe, insbesondere Fette und Öle, stammt aus Pflanzen oder Tieren. Es wird erwartet, dass der Anteil nachwachsender Rohstoffe an

[30] Michael Carus: Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe (NaWaRo). In: Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“. Band 30. Nachwachsende Rohstoffe für die Chemie. 10. Symposium 2007

der Chemieproduktion bis 2025 auf 25-30 % wächst. Ölpflanzen für die stoffliche Nutzung liegen mit 112.000 ha in Deutschland mit an der Spitze (Abb. 4), hinzukommen die eingeführten Palm-, Soja- und Spezialöle. Da Öle und Fette schon seit jeher von der chemischen Industrie eingesetzt werden, scheinen sie sich besonders für dortige Anwendungen zu eignen. Aufgrund der Bedeutung von Ölen, Fetten und Polyphenolen werden deshalb im Rahmen eines systembiotechnologischen Ansatzes alle Teile der Wertschöpfungskette betrachtet und aufeinander abgestimmt optimiert. Dies führt zu weiteren Wertschöpfungen bei den Partnern.

Die Nutzung von Fettsäuren und deren Derivaten als Monomere zur Synthese von Polymeren ist in aktuellen Übersichtsartikeln zusammengefasst [1]. Die bislang bekannten Polymere aus diesen nachwachsenden Rohstoffen sind größtenteils Harze und Beschichtungen, also vernetzte Polymere mit relativ geringem Wertschöpfungspotential. Lineare und verzweigte Polymere aus diesen Rohstoffen, die noch verarbeitbar sind, wurden hingegen seltener beschrieben. Detaillierten Studien über Co-Polymere aus Fettsäuren und Polyphenolen als nachwachsende Rohstoffe sind derzeit nicht verfügbar. Das entsprechende SynRg-Teilprojekt hat daher den Stand der Wissenschaft und Technik erweitert und deutlich vorangebracht, was gute Aussichten für die Vermarktung der neuen (Spezial)polymere eröffnet. Polyamide gehören zu den wichtigsten und am meisten produzierten Stoffen überhaupt. Mit fast 60% (4,1 Mio t/a) nahmen dabei Polyamide basierend auf einem C6-Grundgerüst (6-Aminohexansäure, bzw. 1,6-Hexandicarbonsäure und 1,6-Diaminohexan) den Löwenanteil ein. Einen zwar kleinen, aber deutlich zunehmenden Anteil stellen mit 300.000 t/a die sogenannten Spezialpolyamide, wovon wiederum die langkettigen Polyamide die wichtigsten sind. Allein ω -Aminododekansäure bzw. deren zyklische Lactamform (im Weiteren mit den Trivialnamen ω -Aminolaurinsäure bzw. Laurinlactam bezeichnet) und ω -Aminoundekansäure für Polyamid 12 (PA12) und Polyamid 11 (PA11) haben ein Marktvolumen von 60.000 t/a. Polyamide aus diesen langkettigen Monomeren zeichnen sich durch besondere Eigenschaften aus, die Polyamide aus kürzerkettigen Monomeren nicht besitzen. Zu nennen sind hier z.B. die hervorragenden mechanischen Eigenschaften bei gleichzeitig sehr guter Transluzenz, eine hohe Kerbschlagzähigkeit selbst bei Temperaturen von kleiner $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder eine hohe Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln. Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften wächst der Markt für Spezialpolyamide gegenüber den kürzerkettigen Typen (wie z.B. dem PA6) überproportional. Die im Projekt SynRG untersuchten Polyamide gehören ebenfalls zur Klasse der längerkettigen Spezialpolyamide, deren besondere Eigenschaftsprofile Anwendungen ermöglichen, die über kürzerkettigen Polyamiden nicht realisierbar sind. Der Markt von ca. 60.000 t/a wächst je nach Anwendung mit 7 %/a bis 10 %/a. Damit handelt es sich bei diesen Spezialpolyamiden um einen attraktiven, stark wachsenden Markt. Langfristig besteht großes Interesse daran, die Produktion der langkettiger Spezialpolyamide komplett auf eine nachhaltige Basis aus nachwachsenden Rohstoffen umzustellen.

Die Einsatzgebiete pflanzlicher Proteine und Biokatalysatoren umfassen einen großen Marktbereich. Neben der Erzeugung von Wert/Rohstoffen, sind die Verwendung als Tierfutterzusätze (Phytasen, Proteasen), die Papier-Waschmittelindustrie (Stärkeabbau, Lipasen), die Leder- Textilindustrie (Gerbenzyme), sowie bei Haushaltsprodukten (Waschenzyme) oder bei Lebensmitteln (Stabilisatoren) zu nennen. Aufgrund dieser Fakten ist das Marktpotential für pflanzliche Proteine und Enzyme als hoch einzuschätzen. Zudem sind exzellente Voraussetzungen für die patentrechtliche Abdeckung gegeben, da bislang bekannte Patente oder Schutzrechtsanmeldungen aus dem Gebiet der Mikroorganismen kommen. Die Effizienz derzeit verwendeter technischer Lösungen zur Stoff-

/Chemikalienproduktion (insbesondere chiraler Moleküle) weist häufig Defizite auf und viele Prozesse sind aus Sicht der Nachhaltigkeit optimierungsbedürftig. Demgegenüber sind viele (Bio-)Synthese-Enzyme und -Leistungen in der Natur über Jahrmillionen optimiert worden und bezüglich der Effizienz der organisch-chemischen Synthese häufig deutlich überlegen. Der Aufbau neuer Produktionssysteme zur effizienten und kostengünstigen Herstellung von Basischemikalien oder Endprodukten (z.B. Polymere) unter Verwendung von Biokatalysatoren (Enzymen) ist daher ein sehr erfolgsversprechender Ansatz.

Für die Clariant sind die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten hoch, da ein großer Bedarf an kostengünstigen Adsorbentien zum Einsatz in Separationsverfahren für nachwachsende Rohstoffe existiert. Nach dem bisherigen Kenntnisstand sind keine Produkte auf der Basis von Tonmineralien, Zeolithen oder Hydrotalciten zur Auftrennung oder Aufreinigung von Fettsäuren und zur Gewinnung von Polyphenolen auf dem Markt erhältlich. Der Einsatz von Tonmineralien ist zum einen aufgrund der relativ niedrigen Rohstoffkosten im Vergleich zu synthetischen Materialien von Interesse. Andererseits können solche Materialien, im Falle einer Abtrennung von Verunreinigungen, in beladener Form auch problemlos nach Gebrauch entsorgt werden, da es sich um natürliche Mineralien handelt. Eine wirtschaftliche Verwertung der im Rahmen des Projektes entwickelten Adsorbentien ist von der Clariant angestrebt. Clariant hat einem großen Kunden die Ergebnisse zur Entfernung der störenden Fettsäuren durch Hydrotalcite im 1,3-Propandiol-Prozess vorgestellt. Dieser Kunde hat großes Interesse an dem Verfahren bekundet und wurde mit den entsprechenden Hydrotalcit Materialien bemustert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen besonders zwei Produkte interessant für eine mittelbare oder unmittelbare Verwertung erscheinen. Dies ist zum einen die phenolhaltige Fraktion, die aus der wässrigen Zwischenphase gewonnen werden konnte. Hier liegen hohe Reinheiten und Extraktionsraten für Sinapinsäure >90% aus der wässrigen Phase vor.

Ferner ist die gewünschte Qualität der gereinigten Öle so gut, so dass die Hydratation der Triglyceride zur Gewinnung der Fettsäuren, speziell der Eruca- and der Ölsäure möglich ist. Hier können auch enzymatische Verfahren eingesetzt werden.

Besonders ist darauf hinzuweisen, dass es gelungen ist, mit geringen Verdünnungen ein Polyphenolkonzentrat zu separieren. Dies ist jedoch noch weiter aufzureinigen. Dennoch ist damit der erste Schritt getan, die Polyphenole in einem wirtschaftlichen Verfahren aus dem Schrot zu isolieren. Dies forciert das Erreichen der Ziele.

5. Erkenntnisse von Dritten

Lebensmittelzulassung von Protinisolat

Am 5.11.2013 wurde bekannt, dass die Fa. BioExx Speciality Proteins Ltd die Einstufung ihres Proteinisolates „Isolexx“ als Novel Food Ingredient durch die EFSA erhielt. Am Tag nach dem Ende dieses Forschungsprojektes wurde der folgende Beschluss bekannt:

DURCHFÜHRUNGSBESCHLUSS DER [Europäischen] KOMMISSION vom 1. Juli 2014 zur Genehmigung des Inverkehrbringens von Rapssamenprotein als neuartige Lebensmittelzutat gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates

(Bekanntgegeben unter Aktenzeichen C(2014) 4256)

Definition:

Rapssamenprotein ist ein wässriger, proteinreicher Extrakt aus Rapssamen-Presskuchen aus nicht genetisch veränderten Samen von *Brassica napus* L. und *Brassica rapa* L.

Beschreibung: weißes bis cremefarbenes, sprühgetrocknetes Pulver

Gesamtprotein	mindestens 90 %
Lösliches Protein	mindestens 85 %
Feuchte	höchstens 7 %
Kohlenhydrate	höchstens 7 %
Fett	höchstens 2 %
Asche	höchstens 4 %
Ballaststoffe	höchstens 0,5 %
Gesamtglucosinolate	höchstens 1 mmol/l

Reinheit:

Gesamtphytat	höchstens 1,5 %
--------------	-----------------

Dies betrifft die Arbeiten im Projekt nur indirekt, da der Ballaststoffgehalt <1% festgelegt ist, wozu nach AOCs 985.29/991.43 auch Cellulose, Lignin, Pentosane, Retrogradierte Stärke etc. gehören.

6. Veröffentlichungen

Konferenzbeiträge

- TU KL** N.Tippkötter, K. Muffler, S. Wollny, K. Suck, F. Ruf, U. Sohling, R. Ulber; Adsorbed oils as ABE fermentation substrate; 3rd Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry (2010) Emden (Poster)
- A. Thiel, N. Tippkötter, K. Suck, U. Sohling, R. Ulber; Simulative Unterstützung bei der Aufarbeitung von Polyphenolen durch neue Silikatmaterialien; 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen (2010) Aachen (Poster)
- A. Thiel, N. Tippkötter, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, R. Ulber; Downstream processing of polyphenols from wheat by new inorganic adsorbents; 1st European Congress of Applied Biotechnology (2011) Berlin (Poster)
- S. Wiesen, N. Tippkötter, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, R. Ulber; Removal of fatty acids from raw glycerol prior to anaerobic fermentation to 1,3-propanediol; 1st European Congress of Applied Biotechnology (2011) Berlin (Poster)
- S. Wiesen, N. Tippkötter, K. Muffler, R. Ulber, Fermentative utilisation of crude glycerol from rapeseed oil hydrolysis for the production of dihydroxyacetone, Workshop on fats and oils, 4th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry (2011) Karlsruhe (Poster)
- S. Wiesen, N. Tippkötter, K. Muffler, R. Ulber, (2011) Fermentative utilisation of crude glycerol from rapeseed oil hydrolysis for the production of dihydroxyacetone, Workshop on fats and oils, 4th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry, Karlsruhe (Poster)
- S. Wiesen, N. Tippkötter, K. Muffler, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, R. Ulber, Fermentative production and product recovery of 1,3-propanediol from crude glycerol; Industrial use of renewable raw materials (2012) Frankfurt (Poster)
- A. Thiel, N. Tippkötter, K. Muffler, K. Suck, U. Sohling, R. Ulber; Downstream processing of polyphenols from rape groats with zeolite adsorbents including enzymatic hydrolysis; Industrial use of renewable raw materials (2012) Frankfurt (Poster)
- A. Thiel, N. Tippkötter, K. Muffler, K. Suck, U. Sohling, R. Ulber; Isolation and derivatization of sinapic acid from rape groats; NAROSSA (2012) Magdeburg (Poster)
- A. Thiel, N. Tippkötter, K. Muffler, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, R. Ulber, Wertsteigernde Nutzung des Reststoffstroms Rapsextraktionsschrot nach der Ölgewinnung, Himmelfahrtstagung; Effiziente Verfahren und Anlagen in der Bioverfahrenstechnik und Lebensmittelbiotechnologie, (2013) Bad Wildungen (Poster)
- A. Thiel, N. Tippkötter, K. Muffler, R. Ulber, Flüssig-flüssig-Extraktion von Sinapin und Sinapinsäure aus Rapsschrotextrakten; Frühjahrstagung der Biotechnologen (2013), Frankfurt (Poster)

- A. Thiel, N. Tippkötter, K. Muffler, K. Suck, U. Sohling, R. Ulber; Optimierung der Wertschöpfungskette bei der Aufarbeitung von Rapsschrott mit Zeolithen; 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen (2012) Karlsruhe (Vortrag)
- S. Wiesen, N. Tippkötter, K. Muffler, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, R. Ulber, Wertsteigernde Nutzung von Rohglycerin: Aufarbeitung von Rohglycerin, Herstellung von 1,3-Propandiol und Rückgewinnung von Fettsäuren; 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen (2012) Karlsruhe (Vortrag)
- S. Wiesen, N. Tippkötter, R. Ulber, Modellgestützte Optimierung der Fermentation von Glycerin zu 1,3-Propandiol durch *Clostridium diolis* im Fed-batch-Betrieb, Himmelfahrtstagung, (2013) Bad Wildungen (Vortrag)
- A. Thiel, N. Tippkötter, K. Muffler, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, R. Ulber, Isolation of sinapic acid from rapeseed meal as a building block for biobased polymers; 9th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries, (2013) Antwerpen (Vortrag)
- CLARIANT** K.Suck, SynRg® – Wertschöpfung mittels Verfahren und Prozesse zum Aufschluss und zur Aufreinigung; Jahrestagung ProcessNet und DECHEMA-Biotechnologie Eurogress Aachen, 23.09.2010 (Vortrag)
- GEA (WS)** Hruschka, Steffen; Zeldenrust, Robert: Centrifugal processes for polishing and processing of oils. DECHEMA, Frankfurt a.m.; 10:00a.m., 2012-02-15
- Hruschka, Steffen; Zeldenrust, Robert: Breakdown and distribution of substances in mechanical rapeseed processing. 4. Leipziger Symposium, DGF, Leipzig 8:30-9:00, 2013 -03-21
- Hruschka, Steffen: Substances in Rapeseed Press Cake. NAROSSA Conference, Poznan, 14:00-14:20 p.m.; 2014 06 16
- Publikationen**
- TU KL** A. Thiel, N. Tippkötter, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, R. Ulber, New zeolite adsorbents for downstream processing of polyphenols from renewable resources, Engineering in Life Sciences, Volume 13, Issue 3, pp 239–246, Mai 2013
- Wiesen, S., Tippkötter, N., Muffler, K., Suck, K., Sohling, U., Ruf, N., & Ulber, R. (2014). Adsorptive Vorbehandlung von Rohglycerin für die 1,3-Propandiol Fermentation mit *Clostridium diolis*. Chemie Ingenieur Technik, 86(1-2), 129–135
- Wiesen, S., Tippkötter, N., Muffler, K., Suck, K., Sohling, U., Ruf, N., & Ulber, R. Adsorption of fatty acids to layered double hydroxides in aqueous systems, Adsorption, eingereicht (2014)
- A. Thiel, K. Muffler, N. Tippkötter, K. Suck, U. Sohling, F. Ruf, R. Ulber, Aufarbeitung von Polyphenolen aus Weizen mittels Zeolithen am Beispiel der Ferulasäure, Chemie Ingenieur Technik, eingereicht (2014)
- GEA (WS)** Hruschka, Steffen: Wertstoffgewinnung aus Raps. Mitteldeutsche Mitteilungen 2/2014, S. 14-15
- Patentanmeldung**
- GEA (WS)** Verfahren zur Gewinnung von Wertprodukten, insbesondere Proteinen, aus einem nativen Stoffgemenge DE 10 2013 103 910.3 Anmeldung
- GEA/TU KL** Verfahren zur Gewinnung von Sinapinsäure aus einem nativen Stoffgemenge, DE 10 2014 107 607.9, eingereicht

III Literatur

Die angegebene Literatur ist auf den jeweiligen Seiten bereits als Fussnote angegeben.

Teilprojekt 3

I. Ziele

1. Aufgabenstellung

Fraunhofer ICT

Mit dem Ziel petrochemische Produkte durch nachhaltigen Rohstoffen zu ersetzen, hatte das Fraunhofer ICT zur Aufgabe, Monomerbausteine aus ungesättigten Pflanzenölen zu synthetisieren und diese zur Herstellung von Polyestern zu nutzen. Konkret sollte die hydrothermale Spaltung als Verfahren für die chemische Konversion von Ölsäure untersucht und verwendet werden. Durch Prozessoptimierungen sollen möglichst preisgünstige Ausgangsstoffe und keine umweltbedenklichen Lösungsmittel oder Katalysatoren verwendet werden. Für die gewonnenen funktionalisierten Fettsäureprodukte sollten Analytikmethoden evaluiert und Reinigungsmethoden untersucht werden, welche Monomerbausteine liefern zur Herstellung von Polyestern. Des Weiteren sollten Basispolyester aus Azelainsäure und verschiedenen Diolen hergestellt, charakterisiert und miteinander verglichen werden.

Technische Universität München

Funktionalisierte Fettsäuren und deren Abbauprodukte sind innovative Ausgangsstoffe für die Polymersynthese. Die regio- und enantioselektive Einführung von Sauerstofffunktionen erfolgt in hohen Ausbeuten mit pflanzlichen Dioxygenasen. Weitere chemische und enzymatische Folgereaktionen führen zu einer Vielzahl von bifunktionellen Verbindungen. Da die pflanzlichen Enzyme nicht in ausreichender Menge verfügbar sind und die Überexpression in Mikroorganismen nicht immer die aktiven Biokatalysatoren liefert, sollte ein neuartiges transientes Expressionssystem für die Bereitstellung der katalytisch aktiven Proteine eingesetzt werden. Hydroxylierte Fettsäure-Derivate sollten mittels enzymatischer Methoden (Lipoxygenasen mit anschließender Reduktion) und Biotransformationen in g-Mengen für die chemische Polymerisation zur Verfügung gestellt werden. Im zweiten Teil sollten Monooxygenasen aus Pilzen zur Hydroxylierung von Fettsäuren biotechnologisch genutzt werden.

Phytowelt Greentechnologies GmbH

Die Zielsetzung der Phytowelt-Aufgaben im Rahmen von TP3 umfasste die Identifikation, rekombinante Expression und Charakterisierung pflanzlicher Enzyme, die für die Funktionalisierung von Fettsäuren, insbesondere der Omega-Oxidation, geeignet sind sowie die Etablierung neuartiger biokatalytischer Verfahren zur selektiven Synthese von funktionalisierten Fettsäuren.

Karlsruher Institut für Technologie

Für eine umfangreiche stoffliche Nutzung der bearbeiteten nachwachsenden Rohstoffe sollen neben den Fettsäuren auch Polyphenole und verwandte Sekundärmetabolite zur Synthese von Monomeren, also als neue Bausteine für verschiedenste Polymere, verwendet werden. Besonderer Schwerpunkt soll dabei auf eine Kombination dieser beiden Monomerbausteine gelegt werden, um neue einzigartige Polymeren herzustellen und zu untersuchen. Durch diese neuartigen Co-Polymeren wird das potentielle Produktspektrum biobasierter Polymere erweitert.

Evonik Industries AG

Die primäre Aufgaben der Evonik umfassen die Evaluierung der im Projekt generierten Monomerbausteine zur Polymerherstellung, die Untersuchung und Weiterentwicklung eines auf Ozonolyse

basierenden Verfahrens zur Herstellung von Dicarbonsäuren, die Verwendung und vergleichende Untersuchung dieser Produkte zur Herstellung von Polymeren, sowie die Ermittlung der Eigenschaften der so erzeugten, auf nachwachsenden Rohstoffen beruhenden Materialien. Letzteres insbesondere auch im Vergleich zu Petrochemie-basierten Produkten. Zudem soll eine Betrachtung der Wirtschaftlichkeit durchgeführt werden.

2. Stand der Technik

Die Synthese von α,ω -Dicarbonsäuren aus Fettsäuren kann sowohl biotechnologisch mittels Hefen als auch chemisch z.B. mittels Metathese oder Ozonolyse erfolgen. Dabei stehen zwei Aspekte im Mittelpunkt des Nutzungskonzeptes. Am Beispiel von Polyestern und Polyamide konnte gezeigt werden, dass bereits der Zusatz kleiner Mengen an linear langkettiger Dicarbonsäuren das Eigenschaftsspektrum wesentlich verändert, wobei eine ausgeprägtere Hydrophobie und Änderungen der thermischen Parameter in erster Linie zu nennen sind. Aufgrund der geringeren Wasseraufnahme im Vergleich zu kurzkettigen Polyamiden verändert sich die Dichte nur geringfügig, so dass sich das Volumen der Bauteile nur wenig ändert. Diese Eigenschaft hat eine hohe Maßhaltigkeit der Bauteile zur Folge, was Anwendungen über extreme Feuchtigkeitsbereiche erschließt. Dies ist ein wichtiges Alleinstellungsmerkmal der im Projekt behandelten langkettigen Spezialpolyamide. Aus pflanzlichen Fettsäuren sind Monomere als Bausteine für Hochleistungskunststoffe in einer ökologisch nachhaltigen Weise zugänglich. Aus Fettsäuren lässt sich ein vielversprechendes Monomer-Angebot ableiten, wobei insbesondere bifunktionelle Monomere von Interesse sind, um beispielweise Hetero-Kettenpolymere aufzubauen. Die Synthese von Dicarbonsäuren kann sowohl biotechnologisch mittels Hefen als auch chemisch (Metathese und Kreuzmetathese) erfolgen. Darüber hinaus sind bestimmte oxyfunktionalisierte Fettsäuren und deren Abbauprodukte wichtige chirale Ausgangsstoffe für eine Vielzahl bedeutender Produkte, die in der pharmazeutischen Industrie, der Lebensmittel- und Getränkeindustrie, im Pflanzenschutz, in der Kosmetikindustrie usw. verwendet werden. Die regio- und enantioselektive Einführung von Sauerstofffunktionen erfolgt in hohen Ausbeuten mit pflanzlichen Dioxygenasen, die zunächst Hydroperoxyderivate der Fettsäuren bilden, welche in weiteren chemischen und enzymatischen Folgereaktionen zu einer Vielzahl von industriell interessanten Verbindungen umgesetzt werden können. Da die pflanzlichen Enzyme nicht in ausreichender Menge verfügbar sind und die Überexpression in Mikroorganismen nicht immer die aktiven rekombinanten Biokatalysatoren liefert, sollte ein neuartiges transientes pflanzliches Expressionssystem für die Bereitstellung der katalytisch aktiven Proteine eingesetzt werden. Weiterhin produzieren auch Pilze wie *Starmerella bombicola* hydroxylierte langkettige Fettsäuren, die als Monomeren-Bausteine genutzt werden können. Die Nutzung dieser pilzlichen Enzyme zur Produktion von oxy-funktionalisierten Fettsäuren sollte erforscht werden.

Die klassisch chemische Monomersynthese für die Herstellung von aliphatischen Polyestern und Polyamiden basierte ursprünglich fast ausschließlich auf NaWaRo und hier im Wesentlichen auf Rizinusöl. Seit ca. 50 Jahren werden die petrochemischen Wege wegen ihrer deutlich besseren Kostenposition und effizienteren Produktion eindeutig bevorzugt. Die klassischen Wege über nachwachsende Rohstoffe führen zu einer wenig effizienten Nutzung der Fettsäure. Es ist daher ein zentraler Punkt, neue nachhaltige Wege der Monomersynthese auf der Basis nachwachsender Rohstoffe aufzuzeigen.

Noch nicht literaturbekannt ist die Spaltung freier Fettsäuren durch hydrothermale Oxidation in

kurzkettigere bifunktionelle Verbindungen. Dieses Verfahren verspricht im Vergleich zur Ozonolyse technisch sicherer und umweltfreundlicher zu sein, da kein Ozon erzeugt und zur Reaktion gebracht werden muss. Darüber hinaus kann dieses Verfahren kontinuierlich im Strömungsreaktor betrieben werden. Die Weiterverarbeitung und Verwertungsmöglichkeiten des Oxidationsproduktes aus der Hydrothermalen Spaltung sind bisher auch nicht untersucht worden.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Untersuchungen zur hydrothermale Spaltung bzw. Ozonolyse (Evonik) wurden mit Ölsäure bzw. Erucasäure aus Raps untersucht, welche von der Firma PPM zur Verfügung gestellt und vom Fraunhofer Umsicht aufbereitet wurden. Das Rapssaatgut stammt aus dem Anbau 2010, der gezielt für dieses Projekt erfolgte. Vergleichend wurden auch kommerzielle Fettsäure-Präparate ein- durch die Partner bei ihren Untersuchungen gesetzt.

Das KIT stellte dem Fraunhofer ICT ca. 30 g (E) Dimethyl Eicos 10 en 1,20 Dioat zur Verfügung, welches am ICT mittels Lithiumaluminiumhydrid zu 10 Eicosen 1,20 Diol reduziert und zu einem Polyester verarbeitet wurde.

Die TUM übergab jeweils 10 g 9- bzw. 13-Hydroxylinolsäure an das KIT für die Synthese neuartiger Polymere.

Die TUKL arbeitete bei der Immobilisierung von Lipoxygenase mit der TUM zusammen. Des Weiteren erhielt die TUM verschiedene Fettsäuren von PPM für die im Ergebnis-Teil beschriebenen Versuche.

II. Ergebnisse

1. Erzielte Forschungsergebnisse

Teilbericht Fraunhofer ICT

Die Aufgabe bestand in der chemischen Umsetzung von Fettsäuren zu verwertbaren Produkten für die Herstellung von Polyestern. Dabei sollte die Oxidation unter Hochdruck (Hydrothermale Spaltung) als Methode zur Spaltung von Fettsäuren und Azelainsäure als Monomer für die Polyester-synthese untersucht werden.

Aus Ölsäure lässt sich durch oxidative Spaltung Azelainsäure gewinnen. Diese soll nach Reinigung für Polyestersynthese eingesetzt werden. Die Polyestersynthese wurde zunächst mit kommerzieller Azelainsäure untersucht und optimiert.

Zur Untersuchung der hydrothermalen Spaltung wurden Versuchsreihen in einem Reaktor mit kontinuierlichen Strömungsrohr (1,5-12,0 m) durchgeführt, welcher Verweilzeiten zwischen 2 und 60 Minuten ermöglicht und bei einem Druck von 250 bar arbeitet. Zunächst wurden Vorversuche bei unterschiedlichen Bedingungen zur oxidativen Spaltung von kommerziell erhältlicher Ölsäure durchgeführt bei Versuchstemperaturen von 100 bis 350 °C. Manganchlorid und Kupfersulfat wurden als Katalysatoren getestet. Außerdem wurden Versuche mit und ohne Kaliumhydroxid (KOH) im System bei 5 und 10% Ölsäuregehalt untersucht. Als Oxidationsmittel diente Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

In der folgenden Abbildung sind die Ausbeuten der Versuche dargestellt. Versuche mit Temperaturen höher als 250 °C zeigten in der GC-MS Analyse niedrigere Ausbeuten und mehr Nebenprodukte.

Die Reaktionslösung wird mit H_2SO_4 auf $\text{pH}=2$ angesäuert. Hierbei erfolgt Ausfällen eines weißlichen Feststoffs, der mit zunehmend saurem pH -Wert wieder in Lösung geht. Die wässrige Lösung wird anschließend mit einer Hexan/Diethylether Mischung (9/1) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird in einen 10 L Kolben gegeben und unter Rückfluss mit 1,5 kg H_2O gekocht. Die wässrige Phase wird daraufhin ohne Abkühlen abgetrennt. Das Aufkochen mit H_2O wird 1x wiederholt und die wässrigen Phasen zusammengeführt. Anschließend werden sowohl die Hexan/Diethylether Phase (ca. 3L) als auch die wässrige Phase (ca. 3L) bis zur Trockene eingengt. Aus allen Schritten wurden Proben entnommen, um mittels GC-MS den Azelainsäureanteil zu bestimmen:

- SynRG-res-01 Wässrige Phase nach Ansäuern
- SynRG-res-02 Braune organische Phase nach Ausschütteln
- SynRG-res-03 Wässrige Phase nach Ausschütteln
- SynRG-res-04 Organische Phase nach Heißwasserextraktion eingengt Feststoff
- SynRG-res-05 Organische Phase nach Heißwasserextraktion eingengt Flüssigkeit
- SynRG-res-06 Wässrige Phase nach Heißwasserextraktion eingengt Feststoff
- SynRG-res-07 Reaktorwasser Edukt
- SynRG-res-09 Filterkuchen aus Fällung
- SynRG-res-10 Rückstand aus Filtrat eingengt Feststoff

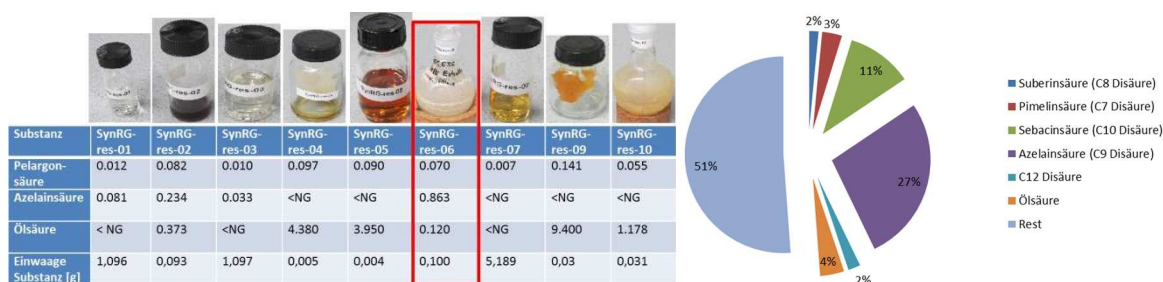


Abbildung III.3: Anteile der Säuren Azelainsäure, Pelargonsäure und Ölsäure (links). Anteile der Säuren im Feststoff nach dem Abtrennungsverfahren (rechts).

Entsprechend diesem Verfahren wurden die restlichen 5,6 kg Reaktionslösung verarbeitet und das Endprodukt mittels GC-MS analysiert. Es wurden 73,54 g Feststoff erhalten mit 19,86 g (7%) Azelainsäure.

Polyestersynthesen

Für die Untersuchung der Polyestersynthese wurden Azelainsäure mit Diolen verschiedener Kettenlänge polymerisiert. Der betrachtete Reaktionsprozess ist eine katalysierte Polykondensation (Abb. III.4). Bei der Reaktion von Azelainsäure mit einem Diol entsteht neben Wasser, welches durch Kondensieren aus dem Reaktionsgemisch entfernt wird, ein Polyester (PES).

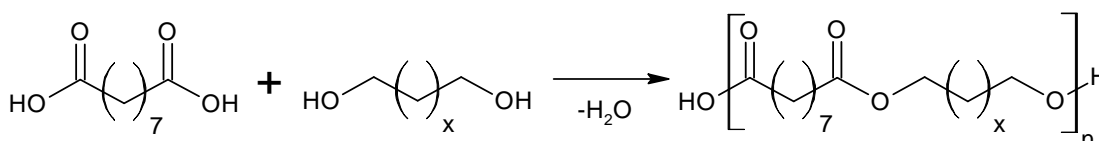


Abbildung III.4: Polykondensation von Azelainsäure mit Diolen; $x = 1, 4, 7, 10, 16, 20$ (letzteres enthält eine Doppelbindung, Eicos-10-en-1,22-diol bzw. Polyeicos-10-enazelat).

Die Polykondensation wird maßgeblich beeinflusst durch die angewendeten Reaktionsbedingungen und die Art sowie auch die Reinheit der Monomere (Polymerbausteine). Die Eigenschaften der erzielten Polyester sind somit über die Polymerisationsbedingungen einstellbar. Dies eröffnet ein breites Potential an Anwendungsmöglichkeiten für Polyester, z.B. als Polyesterharze, welche Bestandteile in Beschichtungen, Klebstoffen und Vergussmassen sind, sowie als Polyesterpolyole für Polyurethanprodukte oder als thermoplastische Werkstoffe.

In Vorversuchen wurde 1,6-Hexandiol, 1,9-Nonandiol und 1,12-Dodecandiol mit Azeläinsäure zu Polypropylmethyleneazelat (PHA), Polyhexamethyleneazelat (PNA), und Polynonamethyleneazelat (PDA) umgesetzt, um das reaktionskinetische Verhalten zu untersuchen und die Umsetzung zu optimieren (Abb. III.5).

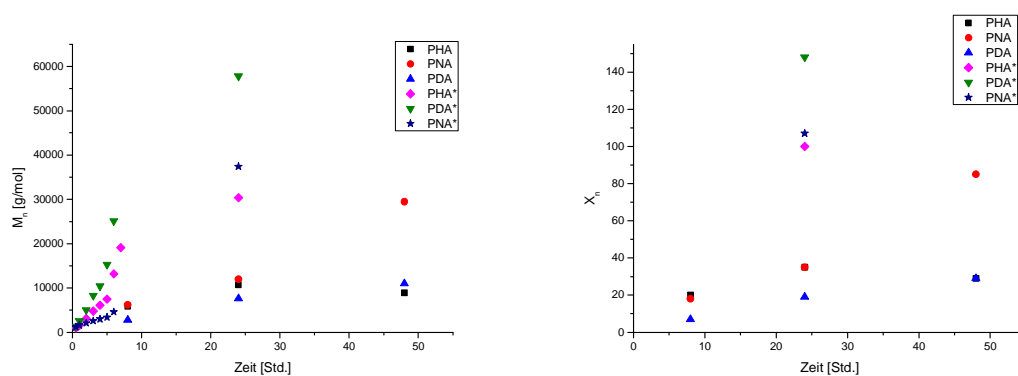


Abbildung III.5: Mittlere Molekulargewichtverteilung (M_n) und mittlerer Polymerisationsgrad (X_n) der ersten Versuche PHA, PNA und PDA im Vergleich zu den M_n bzw. X_n der optimierten Versuche PHA*, PNA* und PDA*.

Durch eine optimierte Anlagentechnik und eine Optimierung der Reaktionsführung konnten Molekulargewichte (M_n) und Polymerisationsgrade (X_n) bei 24 Std. Reaktionszeit um etwa 300 % (bei PHA, PNA) und im Fall PDA um etwa 700 % gesteigert werden. Das bedeutet kürzere Reaktionszeiten und somit Einsparungen in Zeit und Energiekosten.

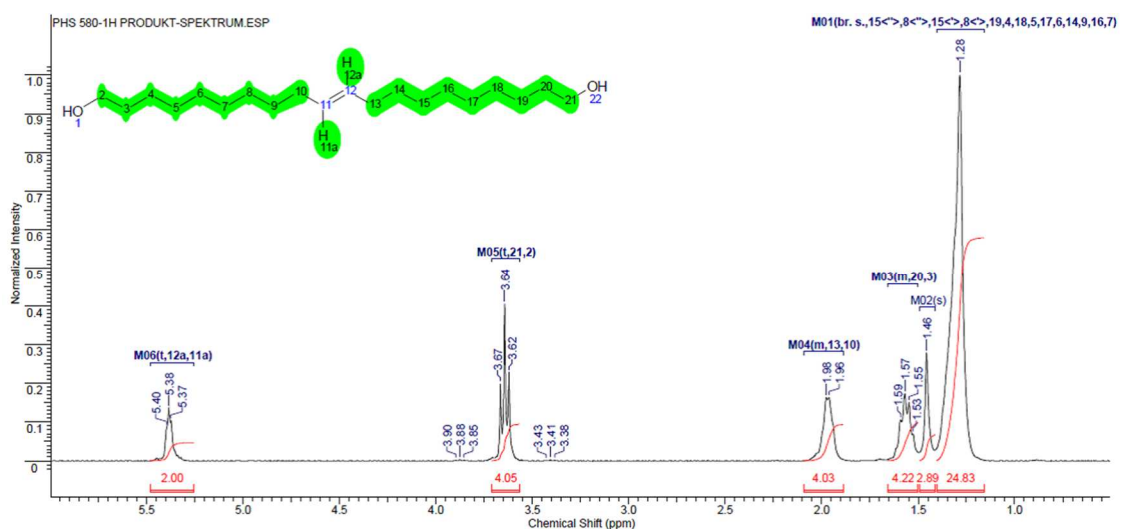


Abbildung III.6: NMR des synthetisierten 10-Eicosen-1,20-diol.

Tabelle III.1: Molekulargewichte und Polymerisationsgrade synthetisierter Polyester.

Polyester	Kürzel	x	M _n [g/mol]	M _w [g/mol]	M _w /M _n	X _n
Polypropylmethylenazelat	PPA	1	36200	63000	1,74	273
Polyhexamethylenazelat	PHA	4	37600	92000	2,44	130
Polynonamethylenazelat	PNA	7	39800	75700	1,90	131
Polydodecamethylenazelat	PDA	10	60400	145300	1,78	168
Polyoctadecanazelat	POA	16	37100	118600	3,20	40
Polyeicos-10-enazelat	PEA	20	53400	328000	6,15	27

Die somit erhaltenen Polyester (PES) wurden chemisch, thermisch und mechanisch getestet und bewertet. Diese PES-Polymermatrix bildet die Grundlage für Einschätzungen potentieller Anwendungsgebiete der Polymere.

Für das langkettige Diol 10-Eicosen-1,20-diol wurden zunächst ca. 30 g (E) Dimethyl Eicos 10 en 1,20 Dioat mittels Lithiumaluminiumhydrid reduziert. Die Ausbeute dieser Reduktion betrug ca. 95 %. Analytische Untersuchungen mittels DSC, TGA und NMR wurden bereits durchgeführt. Das synthetisierte Diol konnte im NMR Spektrum einwandfrei zugeordnet werden (siehe Abbildung III.6).

Der Polymerisationsgrad (X_n in Tabelle III.1) variiert stark und ist für POA und PEA sehr niedrig. Dies liegt daran, dass ein kleinerer Autoklav verwendet werden musste, weil nur geringere Mengen Diol für die Synthese zur Verfügung standen. Anlagenparameter haben einen deutlichen Einfluss auf Reaktionen und somit auch auf die entstehenden Produkte. Zudem kann die Doppelbindung in PEA möglicherweise ungewollte Nebenreaktionen eingehen, was hier nicht näher untersucht wurde. Diese PES wurden mittels dynamischer Differenzkalorimetrie in Ihren thermischen Eigenschaften untersucht (Tabelle III.2).

Tabelle III.2: Thermische Eigenschaften der synthetisierten PES im Vergleich zu ausgewählten kommerziellen PES-Produkten.

Name	Basis	Test Methode	T _s [°C]	T _z [°C]
YGASYN_1	PPA	DSC ISO 11357, TGA	k. A.	401*
Phi52_3	PHA	DSC ISO 11357, TGA	50	403*
Phi58_2	PDA	DSC ISO 11357, TGA	64	405*
Phi53_2	PNA	DSC ISO 11357, TGA	72	406*
Phi 64	POA	DSC ISO 11357, TGA	k. A.	410*
Phi 66	PEA	DSC ISO 11357, TGA	k. A.	410*

* Die TGAs zeigen einen leichten Zersetzungsbeginn schon ab etwa 200°C. Der Angegebene Wert ist das Maximum der Zersetzung.

Auffallend sind die niedrigen Schmelzpunkte der synthetisierten Polyester. Das macht es möglich diese Polymere schon bei niedrigen Temperaturen zu verarbeiten, was zwar einen geringeren Verbrauch an Energie bei einer Verarbeitung bedeutet, allerdings auch eine Einschränkung in den Anwendungen. Es kann keine Materialfestigkeit bei Temperaturen größer 50 °C gewährleistet werden. Die Schmelzbereiche von PDA (69-74°C) liegen etwa 10 °C höher als bei PNA (60-63 °C), welches wiederum einen um etwa 10 °C höheren Schmelzbereich hat als PHA (50-52 °C). Der Schmelzbereich von PHA stimmt mit der Literatur [1] überein.

Die Dichte der synthetisierten PES wurde nach DIN EN ISO 1183-1 A bestimmt (siehe Tabelle III.3). Die Dichten der PES sind relativ niedrig, wodurch Kunststoffprodukte aus diesen Materialien recht leicht sein sollten.

Tabelle III.3: Dichte der synthetisierten PES im Vergleich zu ausgewählten kommerziellen PES-Produkten.

Name	Basis	Testmethode	Dichte [g/cm ³]
YGASYN_1	PPA	DIN EN ISO 1183-1 A	1,16
Phi52_3	PHA	DIN EN ISO 1183-1 A	1,11
Phi58_2	PNA	DIN EN ISO 1183-1 A	1,09
Phi53_2	PDA	DIN EN ISO 1183-1 A	1,06
Phi 64	POA	DIN EN ISO 1183-1 A	1,05
Phi 66	PEA	DIN EN ISO 1183-1 A	1,04

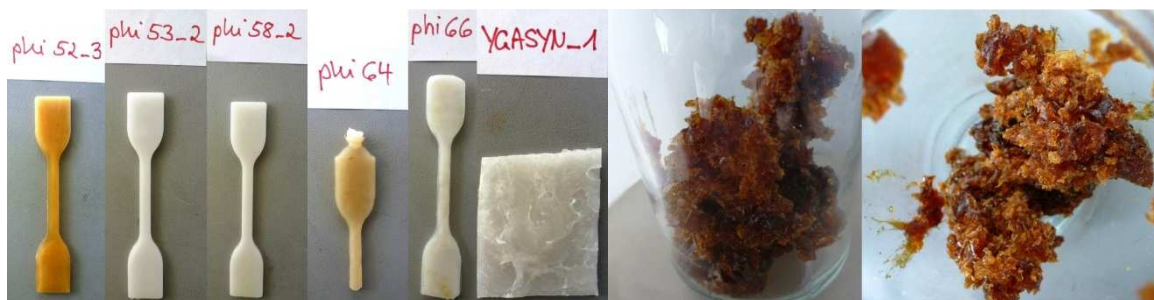


Abbildung III.7: Probekörper aus PES (links) und PES aus den Produkten der hydrothermalen Spaltung (rechts).

Mehrere Zugstäbe werden bei Zugdehnungsprüfung für die Ermittlung von mechanischer Kennwerte (E-Modul, Zugfestigkeit und Dehnung) benötigt. Deshalb konnten nur für PHA, PDA und PNA Kennwerte ermittelt werden (Tabelle III.4).

Die Elastizitätsmodule und Zugfestigkeiten der PES sind für thermoplastische Polyesterprodukte zu niedrig. Die prozentualen Ausdehnungen der Probekörper von PHA und PDA liegen mit 3-7,5% im Bereich thermoplastischer Polyester. PNA sticht mit seiner 267,7 %igen Dehnung deutlich heraus. Dieses PNA mit seiner außerordentlichen Dehnung könnte möglicherweise in Verpackungsmaterialien Anwendung finden.

Tabelle III.4: Kennwerte der PES aus der Zugdehnungsprüfung.

Name	Basis	Testmethode	E-Modul [MPa]	Zugfestigkeit [MPa]	Dehnung [%]
Phi52_3	PHA	ISO 527-1,2 (50 mm/min)	1100	24	3,2
Phi58_2	PDA	ISO 527-1,2 (50 mm/min)	590	18	7,5
Phi53_2	PNA	ISO 527-1,2 (50 mm/min)	540	21	267,7

Für die Herstellung eines Polyesters aus dem vorgereinigten Reaktionsprodukt (auf konzentrierte Azelainsäure) der hydrothermalen oxidativen Spaltung wurde die Säurezahl bestimmt und eine entsprechende Menge an 1,9-Nonandiol addiert, so dass Säurezahl und OH-Zahl im Verhältnis 1:1 vorliegen. Diese Mischung wurde bei 100°C 2 Stunden erhitzt und leichtflüchtige Kondensate abgetrennt. Anschließend wurde im Autoklav nach dem hier untersuchten und optimierten Polymerisations-Verfahren für Azelainsäure polymerisiert (s.o.). Das erhaltene PES-Produkt ist eine wachsartige Masse, welche langsam aushärtet aber nicht zu Zugstäben verarbeitet wurde (Abbildung III.7 rechts). Einsatzmöglichkeiten dieses Produktes können bspw. Polyesterpolyole als bio-basierte Komponenten für Polyurethanprodukte, biobasierte Polyesterharze und Präpolymere für Lacke, Klebstoffe und Folien sein.

Literatur

[1] V.V. Korshak und S.V.Vinogradova, Polyesters (übersetzt von B. J. Hazzard und J. Burdon), Pergamon Press Ltd. Oxford 1965.

Teilbericht KIT (Karlsruher Institut für Technologie)

Ausgehend von Ferulasäure (1) als Modellschubstanz für Hydroxymzimtsäuren (Phenolsäuren), wurden zahlreiche und strukturell diverse Monomere für unterschiedlichste (Co)polymere hergestellt. In zwei Stufen konnte die α,ω -Dienverbindung (3) nach zwei unterschiedlichen Methoden in guter Ausbeute synthetisiert werden, welche für die ADMET-Polymerisation sowie für die Thiol-En-Additionspolymerisation benötigt wird (Abb. III.7). Weiterhin ließ sich in einer Dreistufenreaktion ein Ferulasäureacrylat-Derivat (6) darstellen, das erfolgreich in der Synthese von (Co)polyacrylaten über freie radikalische Polymerisation genutzt werden konnte. Ausgehend vom hydrierten Ferulasäuremethylester (5) konnte nach zwei Methoden – wobei Methode B weitaus nachhaltiger und umweltfreundlicher zu bewerten ist – das AB-Monomer (7) synthetisiert werden, welches für die Darstellung von Copolyestern über Polykondensationsreaktionen benötigt wird. Die säureinduzierte Dimerisierung der Komponenten (4) und (5) lieferte nach vollständiger Methylierung der Phenolgruppen mit Dimethylcarbonat das Monomer (8) in einer hohen Ausbeute, das aufgrund der beiden Methylestergruppen hervorragend für die Synthese von nachwachsenden Polyestern und -amiden geeignet ist. Durch die nachfolgende Reduktion der beiden Esterfunktionalitäten mit Lithiumaluminiumhydrid konnte das Diol (9) ebenfalls in exzellenter Ausbeute erhalten werden, was als Monomer zur Synthese nachwachsender Polycarbonate Verwendung finden kann. Ausgehend von (9) ließ sich in drei Stufen, bestehend aus doppelter Mesylierung des Diols, nachfolgender Umsetzung mit Natriumazid, sowie abschließender Hydrierung des Diazids, das Diamin (10) herstellen. (10) stellt eine interessante Verbindung für die Herstellung von Polyamiden dar. Für die Synthese von Monomeren aus rapsölenthaltenden Fettsäuren wurden die entsprechenden Methylester von Ölsäure (11a) und Erucasäure (11b) verwendet. In einem Zweistufenverfahren aus enzymkatalysierter Epoxidierung mit Wasserstoffperoxid, gefolgt von säurekatalysierter Ringöffnung sowie Umesterung mit Allylalkohol konnten Gemische von Regioisomeren der α,ω -Dienmonomere (12a, 12b) in moderaten Ausbeuten erhalten werden (Abb. III.9). 12a und 12b stellen ebenfalls geeignete Monomere für die ADMET-Polymerisation sowie für die Thiol-En-Additionspolymerisation dar, um in Kombination mit Ferulasäuremonomer (3) Copolymere zu erzeugen. Des Weiteren lässt sich die Thiol-En-Addition auch effizient zur

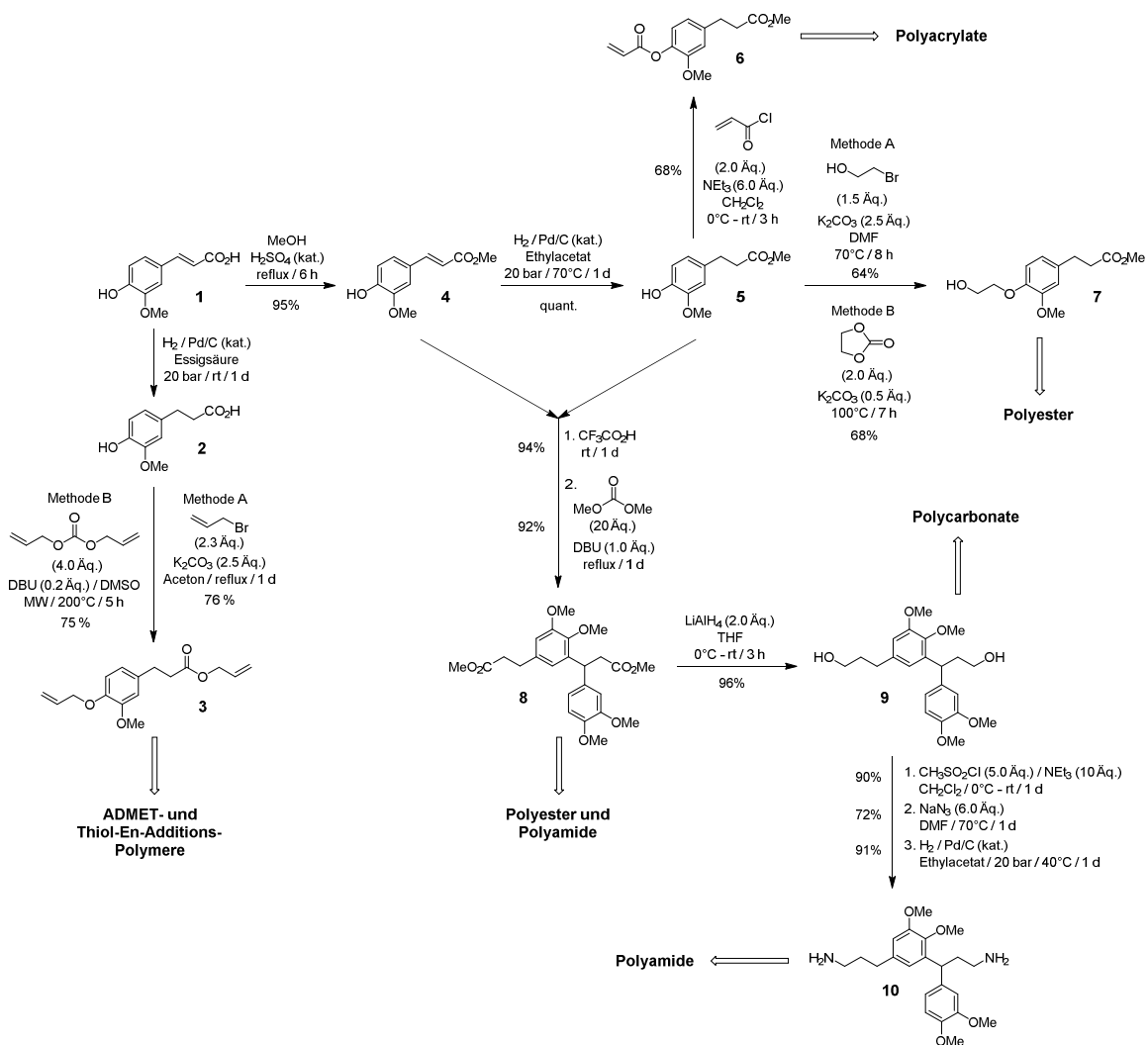


Abbildung III.8: Synthesewege zu Polyphenolmonomeren (Ferulasäurederivate) für die Synthese unterschiedlichster Polymere.

Monomersynthese aus ungesättigten Fettsäuren nutzen. Die Umsetzung von **11a** und **11b** mit 2-Mercaptoethanol lieferte in Additionsreaktionen die AB-Monomere **13a** und **13b** als Gemische von Regioisomeren in relativ guten Ausbeuten, die hervorragend zur Synthese von (Co)polyestern geeignet sind. Dabei konnten zwei verschiedene Methoden angewendet werden; Methode A mit AIBN als Radikalstarter sowie Methode B durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) in Gegenwart geringerer Mengen von DMPA als Photoinitiator. Weiterhin ließen sich durch die Addition von Methyl-3-mercaptopropionat an **11a** und **11b** unter gleichen Bedingungen die Dimethylestermonomere **14a** und **14b** herstellen, die ebenfalls gut geeignet sind für die Herstellung von Polyestern und -amiden.

Ausgehend von den erwähnten rapsölhergeleiteten Monomeren sowie von den Phenolsäuren synthetisierten Monomeren ließen sich zahlreiche Copolymere unterschiedlichster Strukturen und Eigenschaften durch Einsatz in variierenden Verhältnissen erzeugen (Abb. III.9). Die Verhältnisse der fettsäurestämmigen Monomere zu den Ferulasäuremonomeren reichten bei den jeweiligen Polymerisationsmethoden von 0.2 : 0.8 bis hin zu 0.8 : 0.2 Äquivalenten in einer Spanne von je 0.2 Äquivalenten. Ebenso wurden die jeweiligen Homopolymere dargestellt und untersucht. Die ADMET-Polymerisationen (Acyclische Dienmetathese-Polymerisationen) von **3** mit **12a** und **12b** wurden mit 1.0 mol% an unterschiedlichen Ruthenium basierten Katalysatoren (Grubbs-

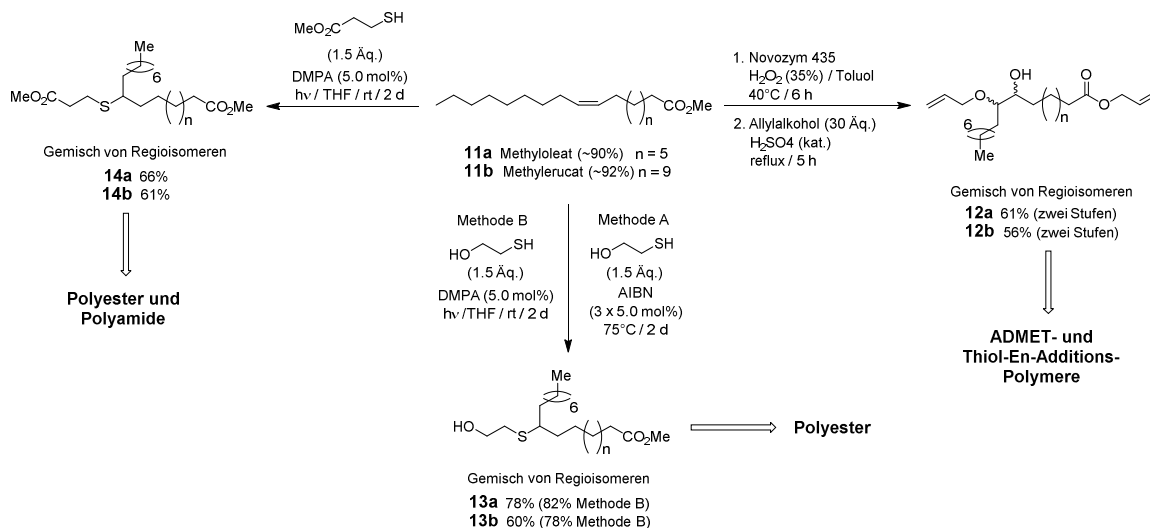


Abbildung III.9: Synthesewege zu fettsäurestämmigen Monomeren für die Synthese unterschiedlichster Polymere.

Katalysatoren) in Gegenwart von 1,4-Benzochinon als Additiv, das die Doppelbindungsisomerie während der Metathese signifikant reduziert, durchgeführt (Abb. III.10a). Dabei konnten die Copolymere P1 - P8 mit Molekulargewichten von bis zu 9 kDa hergestellt werden. Des Weiteren zeigten nachfolgende thermische Analysen, dass die rigide aromatische Struktur der Ferulasäurekomponente in höheren Verhältnissen zu signifikanten Anstiegen der Glasübergangstemperaturen und Schmelzpunkten in den Polymeren führt. Die Thiol-En-Additionspolymerisationen von 3 mit 12a und 12b sowie 1,4-Butandithiol als Dithiolkomponente lieferte in gleichen Verhältnissen die Copolymere P9 - P16 mit Molekulargewichten von bis zu 14 kDa. Auch hierbei zeigten die thermischen Analysen, dass ein hoher aromatischer Anteil im Copolymer zu hohen Glasübergängen und Schmelzpunkten führt.

Die Polykondensationsreaktionen des Phenolsäuremonomers 7 mit variierenden Verhältnissen an den fettsäurestämmigen Monomeren 13a und 13b lieferte unter lösungsmittelfreien Bedingungen die Copolyester P17 - P24 (Abb. III.10). Dabei stellte sich heraus, dass die zyklische Guanidinbase TBD die besten katalytischen Aktivitäten aufweist, um Copolyester mit hohen Molekulargewichten von bis zu 17 kDa zu erzeugen. Nachfolgend wurden die Thioestergruppen in den Copolymeren mit Wasserstoffperoxid zu den korrespondierenden Polysulfonanaloga P25 - P32 oxidiert. Im Gegensatz zu den nichtoxidierten Copolymeren zeigten die Polysulfone stark erhöhte Glasübergangstemperaturen und Schmelzpunkte.

Das durch die Dimerisierung von Ferulasäure (1) mit anschließender Reduktion erhaltene Diolmonomer (9) konnte durch Umsetzung mit Diphenylcarbonat bei Temperaturen von 130 bis 160°C unter Anwendung von Vakuum zum Polycarbonat P33 umgesetzt werden (Abb. III.11a). Es zeigte sich, dass Lewisäuren wie Titan-tetraisopropoxid, Zinn(II)-octanoat sowie Zinksalze hervorragende katalytische Aktivitäten für die Umesterung aufweisen und P33 mit einem Molekulargewicht von über 10 kDa hergestellt werden konnte. Wie typisch für Polycarbonate, zeigt auch P33 transparente Eigenschaften und einen Schmelzpunkt von ~80°C. Damit konnte nach unserem Erkenntnisstand zum ersten Mal die Synthese eines Polycarbonats aus nachwachsenden Phenolsäuren gezeigt werden.

Weiterhin ließen sich auch Copolyamide P34 und P35 durch Umsetzung von Diamin 10 mit den fettsäurestämmigen Dimethylestern 14a und 14b herstellen (Abb. III.11b). Unter lösungsmittel-

Erst kürzlich konnte von uns gezeigt werden, dass die Umsetzung von Carbonsäuren mit jeweils einem Äquivalent Diphenylcarbonat (DPC) in Gegenwart von katalytischen Mengen an der tertiären Aminbase DBU lösungsmittelfrei durch Erhitzen auf 160°C die korrespondierenden Phenylester in moderaten bis sehr guten Ausbeuten liefert (Abb. III.12b). Das bei der Reaktion freiwerdende Phenol konnte anschließend nahezu vollständig und in hoher Reinheit durch Destillation recycelt werden. Zusammen mit dem entstehenden Kohlendioxid könnte es in technischen Prozessen und mit geeigneten Katalysatoren wiederum zu DPC umgesetzt werden, was diese Reaktion sehr nachhaltig gestalten lässt. Phenylester wiederum stellen sogenannte Aktivester dar, die sehr schnell und quantitativ mit Alkoholen unter basischen Bedingungen zu den korrespondierenden Estern sowie mit Aminen zu Amiden umgesetzt werden können. Letzteres sollte auch für Polymersynthesen gute Ergebnisse liefern.

Beide Verfahren wurden auch auf zahlreiche Fettsäuren und Phenolsäurederivaten angewendet und zeigen sich als nützliche, nachhaltige und umweltfreundliche Methoden, um aus nachwachsenden Rohstoffen geeignete Monomere für vielseitigste Polymere herzustellen, die wiederum für eine nachhaltige Materialentwicklung eine wichtige Rolle spielen könnten.

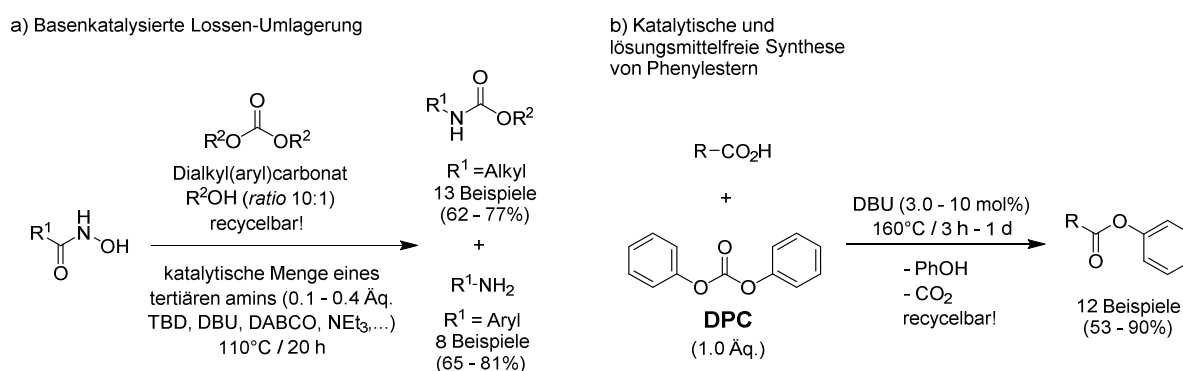


Abbildung III.12: a) Darstellung von Carbamaten und Anilinen aus Hydroxamsäuren über eine neue basenkatalysierte Lossen-Umlagerung. b) Katalytisches und lösungsmittelfreies Verfahren zur Darstellung von Phenylestern.

Teilbericht TUM (Technische Universität München)

Die Klonierung von 9- und 13-Lipoxygenase (LOX) aus Tabak (*Nicotiana benthamiana*) und Soja (*Glycine max*), 13-Hydroperoxid-Lyase (HPL) aus Wassermelone (*Citrullus lanatus*) und 9/13-Hydroperoxid-Lyase aus Melone (*Cucumis melo*), Peroxygenase (PXG)-Gene aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) und *Arabidopsis thaliana* und Epoxidhydrolase (EH) aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*) sowie die Herstellung der Hefe- *Escherichia coli*- und *Agrobacterium tumefaciens*-Expressionsvektoren und anschließende Transformation wurden erfolgreich durchgeführt (Huang et al., 2010; Huang und Schwab, 2011; Aghofack-Nguemezi et al., 2011)

Die Produktion rekombinanter 9- und 13-LOX, 13- und 9/13-HPL und PXG-Enzyme wurde mittels Expression in Hefe und *E. coli* erfolgreich durchgeführt. Alternativ wurde die transiente Expression mittels neuartiger pro-viraler pflanzlicher Expressionssysteme in *N. benthamiana* im geschlosse-

nen Gewächshaus getestet. Es konnte gezeigt werden, dass durch die virale Infektion die Expression der Tabak-eigenen 9-Lipoxygenase induziert, die Expression der transgenen LOX-Enzyme jedoch negativ beeinflusst wurde (Huang et al., 2011 und 2012). Transgene HPL-, PXG- und EH-Proteine konnten im Gegensatz dazu mit Hilfe der viralen Infektion in Tabak hergestellt werden (Aghofack-Nguemezi et al., 2011; Huang und Schwab 2012). Es wurden Expressionsstudien zur Bestimmung der optimalen Proteinsynthese durchgeführt sowie das pH- und Temperaturoptimum bestimmt. So konnten beispielsweise 18 μmol Linolsäure pro ml Zellkulturlösung zum Hydroperoxid umgesetzt werden. Hefezellen erwiesen sich als günstigster Expressionswirt. Durch Isolation der Hefe-Mikrosomen konnte die PXG erheblich gesteigert werden.

Linolsäure wurde mit den beiden LOX-Enzymen (9-LOX, 13-LOX) zu den 9- und 13-Hydroperoxiden und durch Reduktion der Hydroperoxide mit Cystein zu den entsprechenden sekundären Alkoholen umgesetzt. Es wurden mehrere g der Fettsäure-Hydroxide hergestellt und an die Arbeitsgruppe Prof. Meier zur Testung verschickt. Die Ausbeuten betragen jeweils ca. 71% bezogen auf die Linolsäure-Ausgangsmenge. Weiterhin wurde Linolsäure-13-Hydroperoxid mit den PXG-Enzymen zu 9,10-Epoxy-13-hydroxyoctadec-11-ensäure und Linolsäure-9-Hydroperoxid zu 12,13-Epoxy-9-hydroxyoctadeca-10-ensäure umgesetzt. Die Methode wurde für die Herstellung von 1 g der Epoxysäuren optimiert. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die PXG-Reaktion für die Epoxidation verschiedener Fettsäuren (Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, konjugierte (10E, 12Z) Linolsäure, (11Z)-Eicosensäure) und Derivate der Ölsäure (Methyloleat, Oleylalkohol) eingesetzt werden kann, wobei Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel dient und auf die Verwendung der Linolsäurehydroperoxide verzichtet werden kann. Ebenso konnten verschiedene Terpene mit cis-Doppelbindungen enzymatisch epoxidiert werden. Weiterhin wurde 9,12,13-Trihydroxy-10(E)-octadecensäure durch die kombinierte Umsetzung von Linolsäure mit 9-LOX, PXG und EH im mg-Maßstab produziert.

Entwicklung von Biotransformationen zur Herstellung weiterer (oxy-) funktionalisierter Fettsäuren

Nach Absprache mit den Projektteilnehmern wurde die Herstellung von 3-Hydroxyfettsäuren zurückgestellt. Für die Synthese von Polymeren sind nach Auskunft der beteiligten Gruppen die

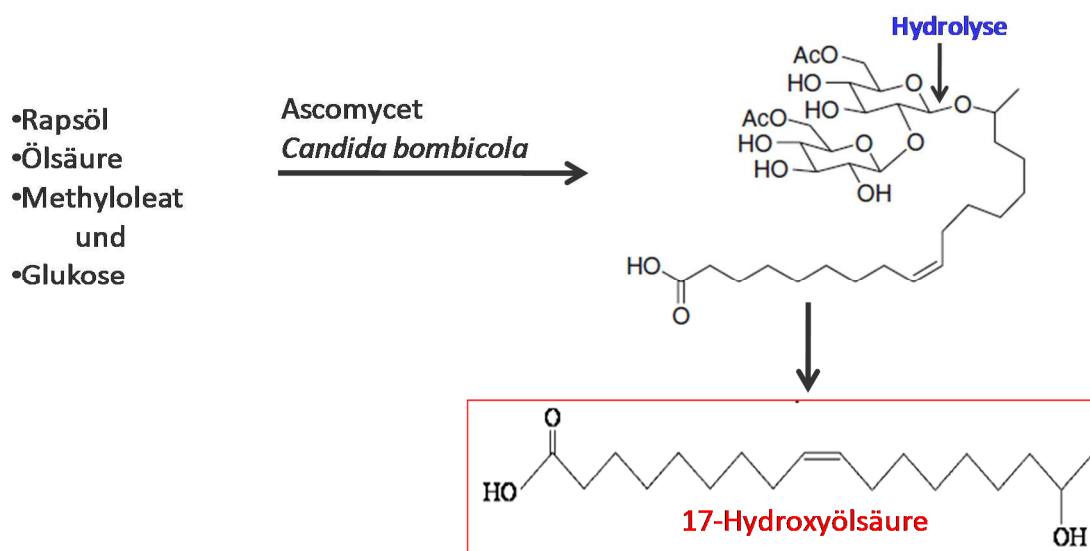


Abbildung III.13: Biotechnologische Herstellung von 17-Hydroxyölsäure

17-Hydroxyfettsäuren interessanter. Ölsäure wurde deshalb mit unterschiedlichem Erfolg mit verschiedenen Stämmen der Hefe *Candida bombicola* = *Starmerella bombicola* zu Sophorolipiden transformiert. Nach alkalischer Hydrolyse der Biotenside konnte 17-Hydroxyölsäure im mg-Maßstab nachgewiesen werden (Abb. III.13).

Die Syntheseleistungen der Stämme unterschieden sich deutlich. Es wurden die Biotransformationsbedingungen und die Isolierung der funktionalisierten Fettsäure optimiert. Auf Empfehlung der Projektteilnehmer wurden verschiedene 17-Hydroxyfettsäuren anstelle von 3-Hydroxyfettsäuren biosynthetisiert. Allerdings ist die Ausbeute von 17-Hydroxyölsäure in den Biotransformationsstudien gering und die Umsetzung der Ölsäure unvollständig. Deswegen wurde dieser Versuch nicht weiter verfolgt.

Alternativ wurde, basierend auf drei publizierten Gensequenzen von P450 Monooxygenasen, die an der Bildung von 17-Hydroxyölsäure in *S. bombicola* beteiligt sein sollen, CYP52M1, CYP52E3 und CYP52N1 aus *S. bombicola* kloniert, entsprechende Hefe-Expressionsvektoren hergestellt, die rekombinanten CYP52M1, CYP52E3 und CYP52N1 Proteine produziert und ein Substrat-Screening für CYP52M1, CYP52E3 und CYP52N1 durchgeführt. Als Enzymquelle diente hierbei zum einen die aus Hefezellen präparierte mikrosomale Proteinfraction (in vitro Ansatz), zweitens ganze Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden (resting cells) und drittens ganze Zellen in der exponentiellen Phase (Biotransformation). Die Untersuchungen zeigten, dass Ölsäure und auch Linolsäure in allen drei Testansätzen mit rekombinanten CYP52M1 zu oxidierten

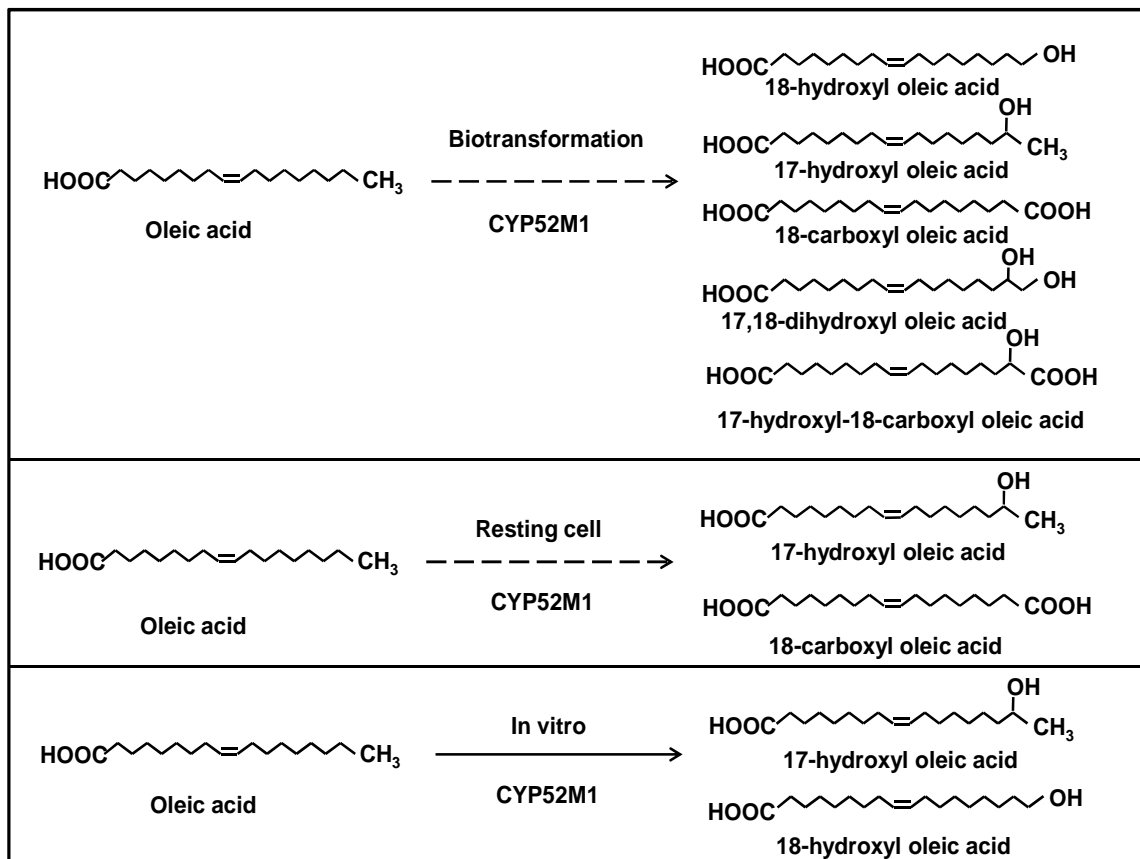


Abbildung III.14: Biotechnologische Herstellung von Ölsäurederivaten mit Hilfe rekombinanter Hefestämme, die CYP52M1 aus *S. bombicola* exprimieren (Huang, 2013)

Fettsäurederivaten umgesetzt wurden (Abb. III.14). Während zum Beispiel im *in vitro* System ausschließlich 17- und 18-Hydroxyölsäure gebildet wurde, konnte im Ansatz mit resting cells 18-Carboxyölsäure detektiert werden. Diese entstand vermutlich durch Oxidation der primär gebildeten 18-Hydroxyölsäure. Die Biotransformation von Ölsäure mit Hefestämmen, die CYP52M1 exprimierten, lieferte ein heterogenes Gemisch verschiedener an der 17- und 18-Position oxidiertes Fettsäurederivate. Die Ergebnisse zeigen, dass CYP52M1 sowohl ω als auch $\omega-1$ Hydroxylierungen katalysieren kann.

Tabelle III.4: Katalytische Aktivität von rekombinanten Monooxygenasen (CYP52E3, CYP52M1 und CYP52N1) gegenüber Alkanen und Fettsäuren (Huang, 2013)

Substrates	CYP52E3		CYP52M1		CYP52N1	
	Micro-some (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Resting cell (pmol min ⁻¹ ml ⁻¹)	Micro-some (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Resting cell (pmol min ⁻¹ ml ⁻¹)	Micro-some (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Resting cell (pmol min ⁻¹ ml ⁻¹)
Hexadecane (C16)	-	-	-	-	-	-
Octadecane (C18)	-	-	-	-	-	-
Capric acid (10:0)	-	-	-	-	-	-
Lauric acid (C12:0)	-	-	-	-	-	-
Myristic acid (C14:0)	-	11 ± 1	-	9 ± 0.2	-	97 ± 21
Palmitic acid (C16:0)	-	4 ± 0.4	220 ± 30	231 ± 26	-	642 ± 79
Palmitoleic acid (C16:1)	-	1 ± 0.2	195 ± 27	119 ± 25	-	177 ± 45
Stearic acid (C18:0)	-	-	311 ± 36	26 ± 3	-	22 ± 4
Oleic acid (C18:1)	-	6 ± 0.7	501 ± 22	508 ± 54	-	621 ± 11
Linoleic acid (C18:2)	-	-	343 ± 44	396 ± 19	-	740 ± 2
α -Linolenic acid (C18:3)	-	-	-	47 ± 1	-	99 ± 7
<i>cis</i> -9,10-Epoxystearic acid	-	NA*	309 ± 63	NA*	-	NA*
<i>trans</i> -9,10-Epoxystearic acid	-	NA*	301 ± 48	NA*	-	NA*
<i>cis</i> -11-Eicosenoic acid (C20:1)	-	-	-	-	-	-
Arachidonic acid (C20:4)	-	-	254 ± 13	85 ± 3	-	27 ± 2

Entsprechende Derivate wurden auch bei der Umsetzung weiterer Fettsäuren gefunden (Tab. III.4). Wenn Fettsäuren mit den rekombinanten CYP52E3 und CYP52N1 Enzymen inkubiert wurden, zeigte nur das letztere Enzym signifikante Katalyse-Aktivität, aber nur im resting cell System (Tab. III.4). Interessanterweise war keines der untersuchten P450 Enzyme in der Lage, Alkane zu oxidieren, obwohl die Genexpressionen von CYP52E3 und CYP52N1 nach Zugabe von Kohlenwasserstoffen zu Nährmedien von *S. bombicola* stark anstiegen. Die Cytochrom P450 Monooxygenasen wurden weiterhin in verschiedenen Hefe-Stämmen (Wat 11 und INVSc1) exprimiert und Biotransformationsstudien durchgeführt. Es war aber kein Unterschied bezüglich Aktivität oder Spezifität festzustellen.

Der anschließende Schritt in der Sophorolipid-Biosynthese wird von einer Glukosyltransferase katalysiert. Es wurde deshalb das Kandidatengen UGTA1 kloniert und ebenfalls in Hefe exprimiert. Die rekombinante Glukosyltransferase war in der Lage, sowohl 18- als auch 17-Hydroxyölsäure zu glucosylieren, und bildete Monoglucose-Fettsäure-Ester bei der Inkubation mit 18-Carboxyölsäure. Aufgrund der hervorragenden Aktivität von UGTA1 wurde das entsprechende Gen in Hefezellen co-transformiert, die bereits eines der Monooxygenase-Gene enthielten. Resting cells, die sowohl UGTA1 und CYP52M1 exprimierten waren in der Lage eine Reihe von Fettsäuren zu den entsprechenden Glukolipiden umzusetzen (Abb. III.15). Es wurde jeweils das Glukosid der ω und

ω -1 hydroxylierten Fettsäure detektiert. Bei Umsetzungen von Hefezellen, die UGTA1 und CYP52E3 oder CYP52N1 exprimierten wurde nur das Glukosid der 18-Hydroxyfettsäure gefunden (Abb. III.16).

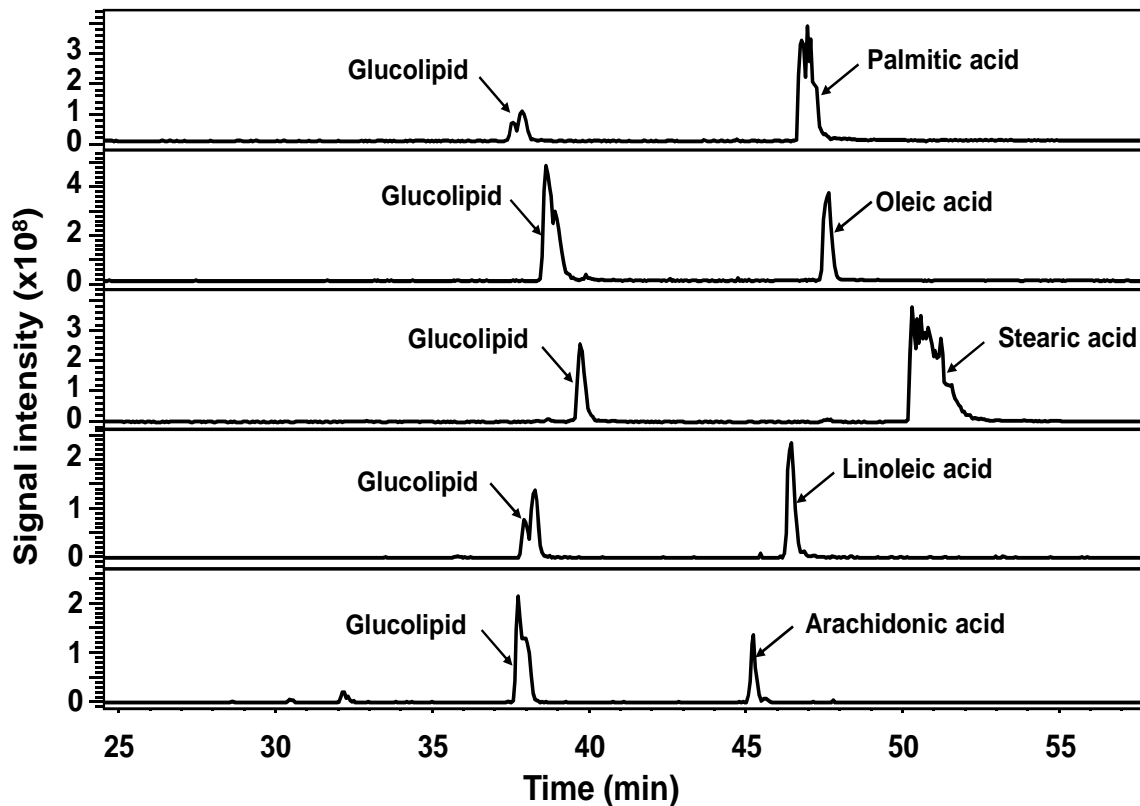


Abbildung III.15: Biotechnologische Herstellung von Glukolipiden mittels Hefezellen, die UGTA1 und CYP52M1 exprimieren. Produkte wurden mittels LC-MS Untersuchung bestätigt (Huang, 2013).

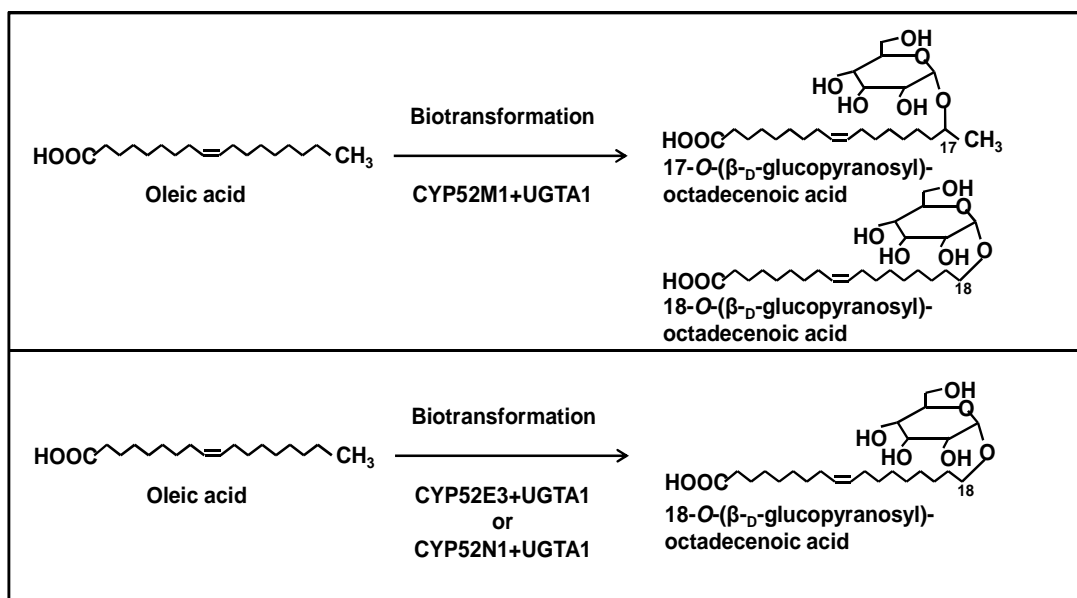


Abbildung III.16: Bildung von Glukolipiden aus Ölsäure mittels Co-Expression von Mono-oxygenasen und der Glukosyltransferase UGTA1 in Hefezellen

Teilbericht Phytowelt Greentechnologies GmbH

Die Zielsetzung der Phytowelt-Aufgaben im Rahmen von TP3 (AP6b) umfasst zunächst die Etablierung neuartiger biokatalytischer Verfahren zur selektiven Synthese von funktionalisierten Fettsäuren sowie die Funktionalisierung spezieller Fettsäure-Derivate, die einer einfacher enzymatischen Reaktion nicht zugänglich sind. Dementsprechend waren im Berichtszeitraum die Aufgaben zur Klonierung der Gene pflanzlicher Biokatalysatoren und zur Synthese und Aktivitätsbestimmung der Biokatalysatoren zu bearbeiten.

In Abstimmung mit TUM und TUKL erfolgte die Auswahl der relevanten Enzymklasse(n) bzw. der angestrebten Fettsäure-Funktionalisierung (Abb. III.17). Als Fokus der Arbeiten wurde die Omega-Oxidation von Fettsäuren festgelegt, da diese Reaktion chemisch nicht oder nur sehr aufwändig zu realisieren ist, entsprechende biotechnologische Lösungen ein hohes Innovationspotential und die Reaktionsprodukte (Dicarbonsäuren) aufgrund des wirtschaftlichen Potentials ausgewiesene Zielmoleküle des SynRg-Projektes sind.

Enzyme zur Omega Oxidation

Mittels Phytowelt's Phytomining-Ansatz sind pflanzliche Fettsäure-Oxidasen sowie Fettalkohol- und Fettaldehyd-Dehydrogenasen identifiziert worden, die als Biokatalysatoren für die erwünschte Reaktion in Betracht kommen (u.a. Vanhanen et al., 2000; Kandel et al., 2007). In der ersten Runde sind 9 Kandidatengene bestimmt, genomischer Pflanzen-DNA bzw. cDNA kloniert und mittels DNA-Sequenzierung verifiziert worden. Drei Gensequenzen wiesen geringe Abweichungen (einzelne Basenaustausche) auf, die in weiteren rekombinanten DNA-Arbeiten entfernt wurden, ebenso wie vorhandene Intronsequenzen bei genomischen Klonen. Eventuell vorhandene N-terminale Signalpeptide/Membranankerdomänen der Zielenzyme wurden *in silico analysiert* und konnten für 6 von 9 Proteinen ermittelt werden. Zur Herstellung der

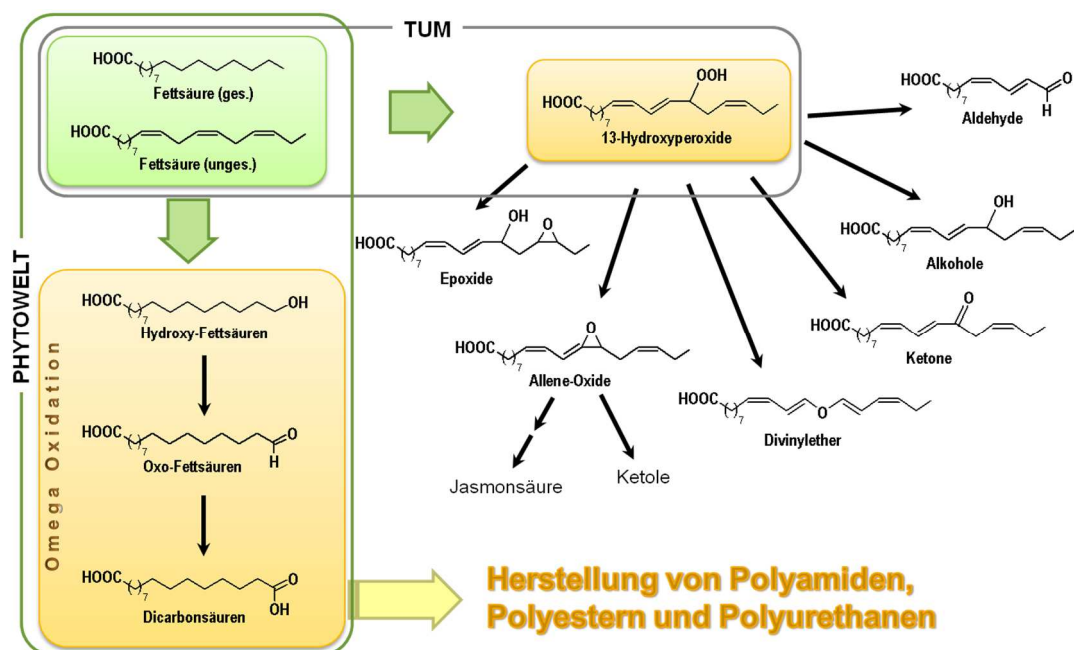


Abbildung III.17: Modifikation/Funktionalisierung von Fettsäuren. Die Darstellung illustriert die von PHY bzw. TUM bislang ausgewählten und bearbeiteten Enzymklassen. Die als unmittelbare Produkte angestrebten Metabolite/Strukturen sind angeführt, ebenso wie der deren mögliche Verwendung.

bakteriellen Expressionsvektoren der Zielgene/proteine sind die so identifizierten jeweiligen kodierenden Regionen der reifen Proteine subkloniert worden. Bei den entsprechenden Hefe-Expressionsvektoren wurden in einigen Fällen auch die Vollängenproteine (inkl. Membranankerdomäne) verwendet, um vergleichende Untersuchungen zum Einfluß dieser Domänen zu ermöglichen.

Im bakteriellen System konnten 7 der 9 Kandidatengene erfolgreich exprimiert werden (Abb. III. 18), die Löslichkeit der entsprechenden rekombinanten Genprodukte erwies sich in allen Fällen als problematisch, so dass keine ausreichenden Mengen der Proteine für Immobilisierungsexperimente bereitgestellt werden konnten. Zur Lösung dieses Problems wurden umfangreiche weitere Arbeiten durchgeführt, wobei auf die besonders interessante Enzymklasse der Fettsäure-Oxidase fokussiert wurde.

Die Kandidaten wurden mit proteolytisch abspaltbaren Proteindomänen fusioniert, deren Löslichkeitsverbessernde Wirkungen auf einer Reihe unterschiedlicher Wirkmechanismen beruhen. Im Anschluss sind sie im bakteriellen System näher untersucht worden. Zusätzlich sind jeweils verschiedene Kultivierungsbedingungen (i.a. Medien und Temperatur) in diesen Expressionsstudien betrachtet worden. Eine entscheidende Steigerung der löslichen Proteinausbeute konnte allerdings nicht erzielt werden. In der Folge zielten die Arbeiten daher weniger auf die Ausbeuteoptimierung als vielmehr auf die funktionale Charakterisierung der Enzyme.

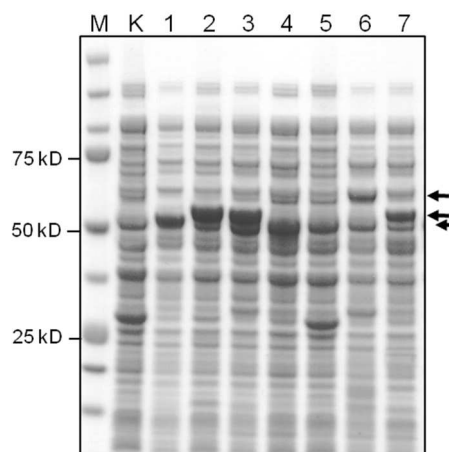


Abbildung III.18: SDS-PAGE-Analyse der rekombinanten Expression verschiedener Enzyme der Fettsäure omega-Oxidation. Gesamtproteinextrakte der verschiedenen Expressionskulturen wurden auf 4-12%-Gradientengelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassiefärbung detektiert. M = Markerproteine bekannter Größe; K = Negativ-Kontrolle (Expressionsstamm mit nicht funktionalem Expressionsplasmid); 1 – 7 = Proben der verschiedenen Fettsäure-Oxidase-transgenen Expressionsstämme. Pfeile markieren die Positionen der erfolgreich rekombinant exprimierten Proteine. Die Größen (MW) einiger Referenzproteine sind angegeben.

Die Expressionskonstrukte der P450-Zielenzyme sind in die erzeugten ATR2-transgenen Hefestämmen eingebracht und getestet worden. Es konnte keine signifikante Aktivität nachgewiesen werden. Um Alternativen zu schaffen, wurden weitere Kandidatengene der Klasse CYP86A kloniert.

Zur Verifikation und Optimierung des experimentellen Ansatzes wurde, als Modellsystem, das Gen des P450-Enzyms Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) kloniert und im ATR2-transgenen Stamm exprimiert (Abb. III.19a). Das Enzym katalysiert die Umsetzung von Zimtsäure zu p-Coumarsäure. Per HPLC-Analyse konnte die Produktbildung und damit die Enzymaktivität eindeutig nachgewiesen

werden, was zudem die Eignung des gewählten Systems belegt.

Weitere Arbeiten zielten auf die Evaluierung neuer Ansätze zur Verbesserung der rekombinanten CYP-Expression, insbesondere der Verwendung von P450-CPR-Fusionsproteinen an Stelle der bisher verwendeten Ko-Expressionsansätze. Als Modellsystem wurden C4H-ATR2-Fusionen erzeugt, exprimiert und getestet. Die enzymatische Aktivität des Fusionsproteins (p-Coumarsäure-Bildung) konnte eindeutig nachgewiesen werden (Abb. III.20a). Zudem zeigte sich ein positiver Einfluss der ATR2-Domäne auf die Löslichkeit des P450-Enzyms.

Als weiteres Referenzenzym wurde die bakterielle Fettsäure-Hydroxylase P450-BM3 kloniert, exprimiert und biochemisch charakterisiert (Abb. III.19b). Das Enzym katalysiert die Hydroxylierung von Fettsäuren an den Positionen Omega und Omega-1 bzw. Omega-2 und dient der Verifikation und Optimierung der für die pflanzlichen Zielenzyme eingesetzten Analytik. Mit Hilfe des zeitgleich etablierten pNCA-Assays konnte die BM3-Aktivität eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem konnten nach Biotransformationsexperimenten mit BM3-transgenen *E. coli*-Zellen de novo gebildete Hydroxyfettsäuren in Lipidextrakten per Dünnschichtchromatographie eindeutig nachgewiesen werden, was die Eignung dieser Methodik belegt.

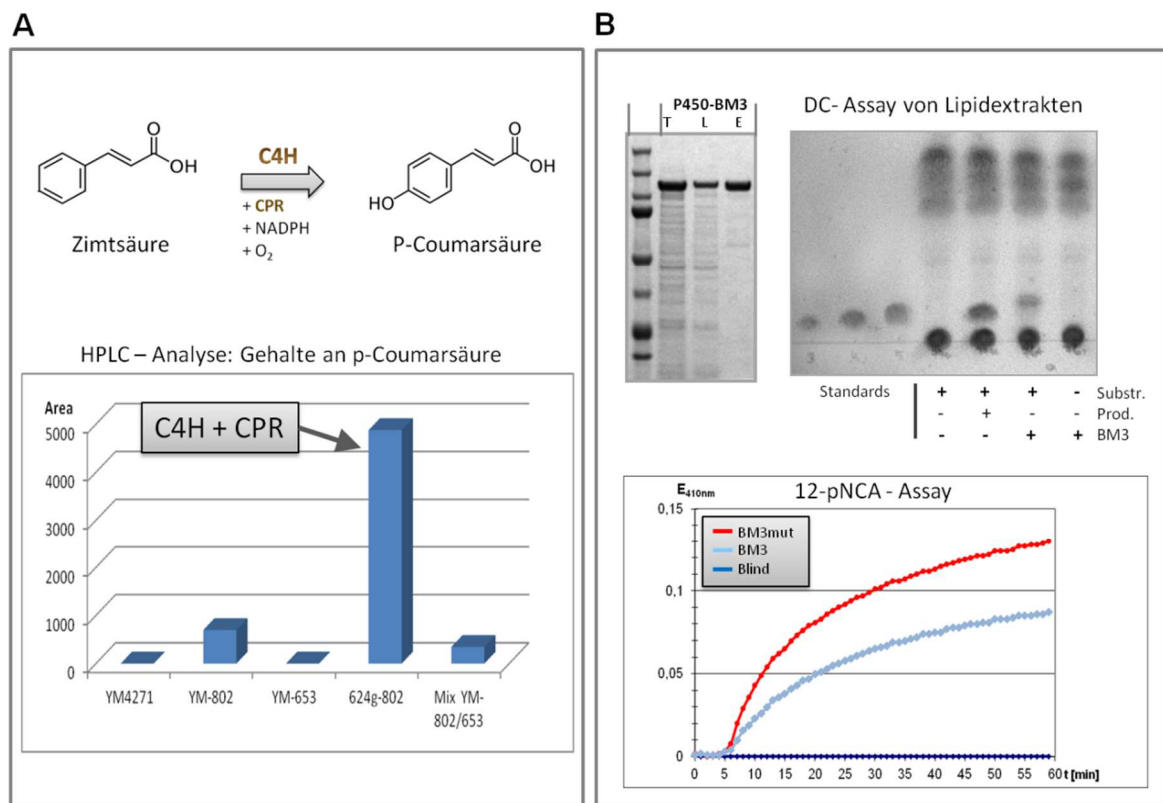


Abbildung III.19: Etablierte und verwendete Modellreaktionen. A: Zimtsäure-4-Hydroxylase als pflanzliches P450-Modellenzym. Oben: katalysierte Reaktion; unten: Aktivitätsnachweis im rekombinanten System. B: Expression und Assay des bakteriellen Modellenzym BM3. Oben: rekombinante Expression (links; T = Totalprotein, L = Lysat, E = Eluat) und Nachweis der Bildung von Hydroxyfettsäuren (rechts). Unten: Aktivitätsnachweis mit Hilfe des etablierten 12-pNCA-Assays.

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurden verschiedene Fusionsproteinkonstrukte der Zielprotein CYP86A1, CYP86A8 und CYP94A5 mit der optimierten Reduktase ATR2m3 erzeugt. Neben der direkten Fusion der beiden Proteine wurden auch drei Fusionsprotein-Varianten erzeugt, in denen die Fusionspartner über verschiedene linker-Peptide miteinander verknüpft sind, was eine günstige

gere sterische Anordnung der Fusionspartner und damit eine höhere enzymatische Aktivität bewirken könnte. Als neue Kandidaten sind die Enzyme CYP86A33 und CYP52M1 identifiziert und die entsprechenden codon-optimierten kodierenden Sequenzen über synthetische DNA-Fragmente erfolgreich erzeugt und subkloniert worden. Auch für diese Kandidaten sind Fusionsproteinkonstrukte mit ATR2m3 fertiggestellt worden.

Alle erzeugten Konstrukte sind in Expressionsstudien und Aktivitätstest eingesetzt worden, wobei neben Ganzzellansätzen (Biotransformationen) auch Zelllysate mit Fettsäuren verschiedener Länge als Substrat verwendet wurden. Das Referenzenzym BM3 diente als Positivkontrolle. Nur für Fusions CYP86A1-ATR2 ergaben sich Hinweise auf eine sehr geringe Hydroxylase-Aktivität. Die Verwendung von linker-Peptiden führte zu keiner höheren Aktivität.

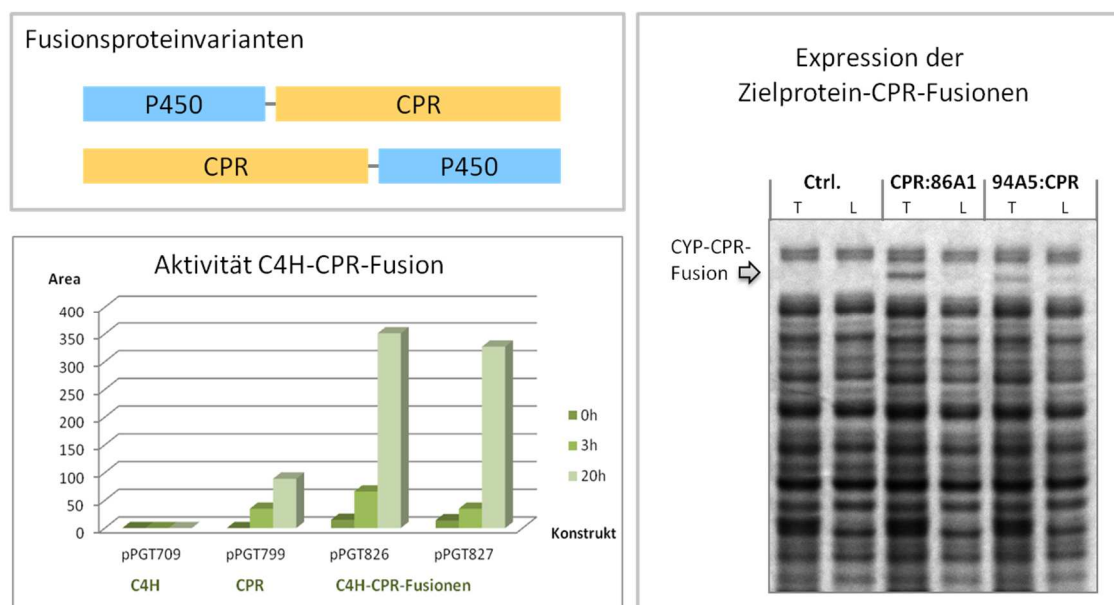


Abbildung III.20: P450-CPR-Fusionen sind aktiv. Links (oben): Schematische Darstellung der erzeugten und verwendeten Fusionsproteinkonstrukte. Links (unten): Messung der Zimtsäure-Hydroxylase-Aktivität bei Koexpression mit dem CPR-Enzym ATR2 (pPGT779), sowie für zwei der erzeugten Fusionsproteine. Die Fusionsproteine sind funktional und zeigen deutlich höhere Aktivität gegenüber dem Koexpressionsansatz (pGT709 = Leervektorkontrolle; ohne ATR2-Aktivität). Rechts: Positiver Nachweis der Expression für die Fusionsproteine der Zielproteine CYP86A1 und CYP94A5 mit ATR2 (CPR).

Cytochrom-NADPH-Reduktase (CPR)

Pflanzliche Cytochrome-P450-Monooxygenasen (P450-Enzyme) benötigen für ihre Aktivität eine geeignete Cytochrom-NADPH-Reduktase (CPR) als Partnerenzym, mit dessen Hilfe Elektronen vom Kofaktor NADPH auf das P450-Enzym übertragen werden (Abb. III.21a). Das Gen für die Reduktase2 aus *A. thaliana* (ATR2) wurde erfolgreich aus cDNA kloniert, verifiziert und bakterielle Expressionsvektoren hierfür erzeugt. Basierend auf durchgeführten *in-silico*-Analysen sind zudem modifizierte ATR2-Varianten designed und erzeugt worden. Experimente zur rekombinanten Expression dieser Reduktasevarianten im heterologen Wirt Hefe waren erfolgreich. Es konnte gezeigt werden, dass die erzeugten Proteinvarianten nicht nur bis zu ca. 14-fach besser exprimierbar sind, sondern auch drastisch höhere spezifische Aktivitäten aufweisen, die für die besten Varianten 50- bzw. 70-fach höher sind als bei dem Wildtyp-Volllängenprotein (Abb. III.21.b). Gegenüber der ATR2-Variante, die in dem bekannten WAT21-Hefestamm zum Einsatz kommt, beträgt

die Steigerung 7- bis 10-fach. Es wurden 10 weitere ATR2-Varianten mit sukzessiv weiter verkürztem N-Terminus erzeugt und getestet. Diese Enzymvarianten sind ebenfalls aktiv, zeigen aber keine weitere Aktivitätssteigerung. Um neue Basis-Hefestämme für die weiteren Monoxygenase-Untersuchungen zu schaffen, sind weitere genetische Konstrukte erzeugt und zur Integration von Expressionskassetten der verbesserten Reduktasevarianten in das Hefegenom eingesetzt worden. Die Integration und Transkription der übertragenen Gene ist mittels PCR-basierten Ansätzen und Sequenzierung erfolgreich nachgewiesen worden. In der Folge wurde die aktivste ATR2-Variante (ATR2m3) auch zur Konstruktion von Fusionsproteinen mit verschiedenen P450-Domänen eingesetzt (s.o.)

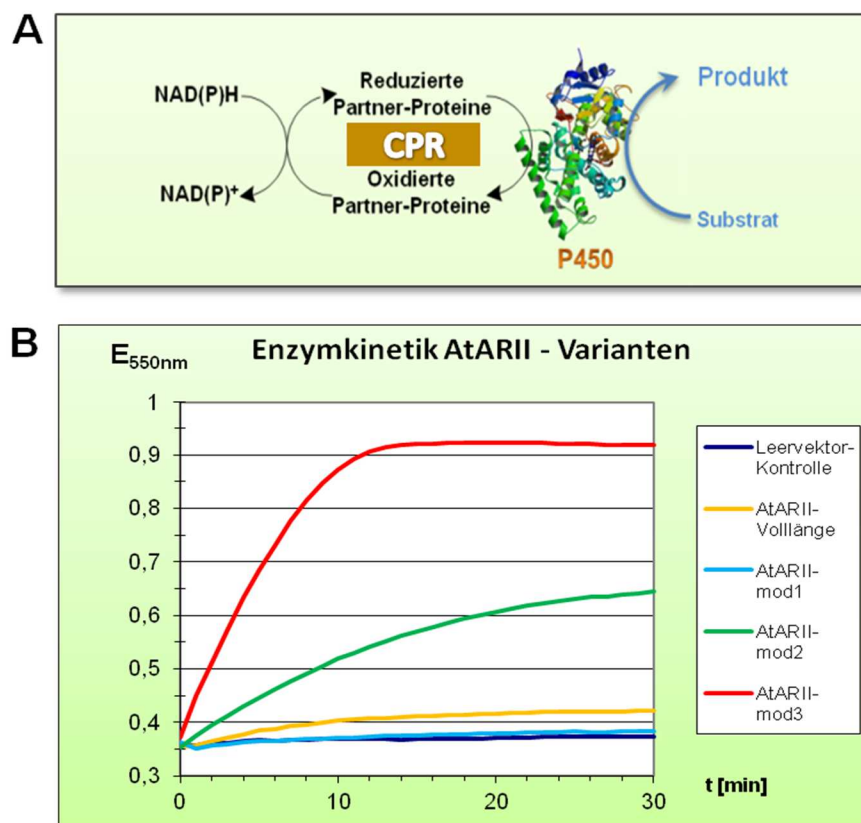


Abbildung III.21: Aktivitätsnachweis für optimierter ATR2-Varianten. A: Schema der Elektronenübertragungskaskade zu pfl. P450-Enzymen und der zentralen Rolle der Cytochrom-Reduktase (CPR). B: Nachweis der Aktivität der rekombinant exprimierten, modifizierten ATR2-Enzyme mit Cytochrom C als Elektronenempfänger/Substrat und mit unterschiedlich eingesetzten Mengen an ATR2-Enzym. Die beste Variante (ATR2m3) zeigt 14fach höher Volumenaktivität aufgrund der besseren Exprimierbarkeit und 70fach höhere spez. Aktivität

Lipasen

Zur Schaffung weiterer Alternativen sind die Arbeiten parallel hierzu auf zwei weitere Enzymklassen ausgeweitet worden: Lipasen und Phospholipase-C – Enzyme. Mittels phytomining wurden entsprechende Kandidaten identifiziert und insgesamt 5 Vertreter für die weiteren Arbeiten ausgewählt. Die Gene wurden erfolgreich kloniert, verifiziert und dann in bakterielle Expressionsvektoren eingeführt. Auch in diesen Fällen ergaben die durchgeführten Expressionsstudien eine deutliche Proteinexpression, aber nur sehr geringe Ausbeuten an löslichem Protein. Die Verwendung verschiedener Löslichkeitsvermittler der Protein-Tags (s.o.) brachte erneut keine Besserung der

Ausbeuten. Als neuer Ansatz wurde hiernach die sekretorische Expression in *Bacillus subtilis*-Zellen angegangen, wozu neue genetische Konstrukte und entsprechende transgene Stämme erzeugt wurden. In Expressionsstudien konnte die Lipase1 aus *Arabidopsis thaliana* erfolgreich und mit guten Ausbeuten im Medien-Überstand der transgenen Zellen erfolgreich nachgewiesen werden. Die funktionelle Charakterisierung der zuvor klonierten und in *B. subtilis* sekretorisch exprimierten Lipasen und Phospholipase-C – Enzyme verlief negativ. Die erfolgreich ausgeprägte Lipase 1 ist nicht aktiv, was vermutlich auf fehlende Glycosylierung des Proteins zurückzuführen ist. Die Phospholipase-C-Kandidatenproteine konnten nicht erfolgreich erhalten werden. Diese Arbeiten wurden daher gestoppt.

Zellfreie Proteinsynthese

Zur Untersuchung der zellfreien Proteinsynthese als alternative Expressionsplattform für P450-Enzyme wurden erste Expressionskonstrukte mit dem Reporterprotein RFP erzeugt. Zur Konstruktoptimierung wurden verschiedene Modifikationen des in diesen Konstrukten integrierten und benötigten Translations-Enhancers erzeugt und ebenfalls mit dem RFP-Gen kombiniert. Zur Etablierung und Evaluierung der zellfreien Proteinsynthese sind kommerzielle Systeme basierend auf Weizenkeim-, Retikulozyten und Insektenzell – Lysaten anhand von Reporterexpression (RFP) vergleichend analysiert und quantifiziert worden. Zudem wurden die Expressionskonstrukte mit modifizierten Translationsenhancer-Sequenzen untersucht. Die RFP-Expression war in allen System erfolgreich, wobei das Weizenkeimsystem die größten Proteinausbeuten erzielte und für die weiteren Arbeiten verwendet wurde. Für die Konstrukte mit modifizierten Enhancersequenzen konnten keine signifikanten Ausbeutesteigerungen festgestellt werden. In anschließenden Expressionsversuchen mit P450-ATR2m3 Fusionsproteinen konnten nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden, die weitere Analysen hinsichtlich Funktionalität und Aktivität nicht erlaubten. Dieser Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt.

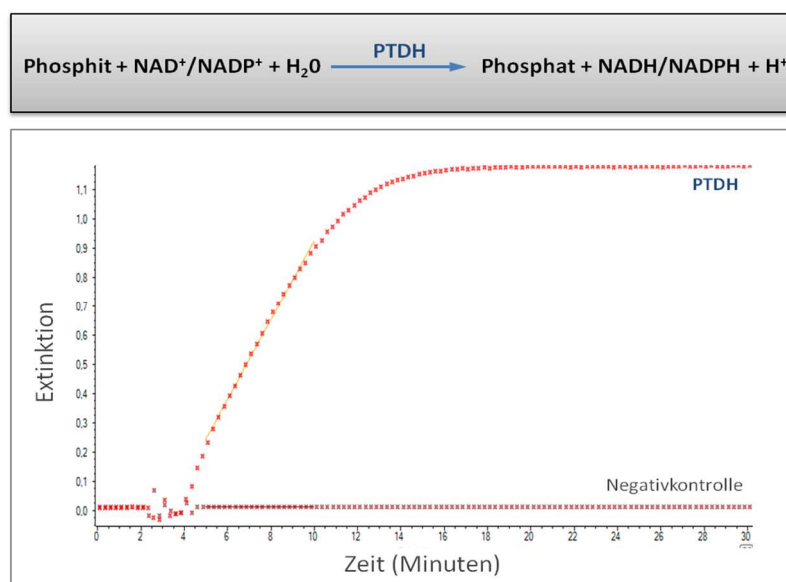


Abbildung III.22: Nachweis der Aktivität der klonierten Phosphitdehydrogenase (PTDH).

Gezeigt ist die Messung des Extinktionsanstiegs aufgrund der Umsetzung von NAD zu NADH. Das Enzym kann ebenfalls NADP regenerieren, die Aktivität hierfür ist ca. 35% geringer.

Kofaktorregeneration

Neben dem „Helferenzym“ Cytochrom-Reduktase benötigen P450-Enzyme den Kofaktor NADPH, um biokatalytisch aktiv sein zu können. Insbesondere in zellfreien Systemen/Zellaufschlüssen ist daher ein effizientes System zur Kofaktor-Regeneration erforderlich. Die durch das Enzym Phosphit-Dehydrogenase (PTDH) katalysierte Reaktion ist hier besonders interessant, da sie thermodynamisch günstig verläuft, keine schädlichen Produkte erzeugt und ein sehr kostengünstiges Substrat verwendet. Zur experimentellen Evaluierung dieses Ansatzes wurde nach detaillierter Literaturrecherche eine neue mutierte Version des Proteins designed, das entsprechende Gen synthetisch erzeugt und in bakterielle Expressionsvektoren subkloniert. Weitere Arbeiten zeigten, dass das Protein löslich und mit hohen Ausbeuten rekombinant hergestellt werden kann und sowohl NADP als auch NAD effizient umsetzt (Abb. III.22).

Dioxygenasen

Durchgeführte Recherchen und bioinformatische Analysen fokussierten auf die Kollektion und Auswertung von Daten zur Identifikation von Dioxygenasen, die als mögliche Kandidaten für die angestrebte omega-Hydroxylierung von Fettsäuren darstellen. Die Kandidatensuche gestaltet sich allerdings aufgrund der geringen Datenlage schwierig und konnte nicht abgeschlossen werden.

Referenzen

Mizutani, M. et al. (1998) Two Isoforms of NADPH: Cytochrome P450 Reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116, 357–367

Vanhanen, S. et al. (2000) A Consensus Sequence for Long-chain Fatty-acid Alcohol Oxidases from *Candida* Identifies a Family of Genes Involved in Lipid ω -Oxidation in Yeast with Homologues in Plants and Bacteria. *J. Biol. Chem.* 275 (6), 4445 – 4452

Kandel, S. et al. (2007) Characterization of a methyl jasmonate and wounding responsive cytochrome P450 of *Arabidopsis thaliana* catalyzing dicarboxylic fatty acid formation in vitro. *FEBS Journal* 274, 5116–5127

Teilbericht Evonik

In diesem Teilvorhaben sollten zuerst die Fettsäuren bzw. deren Ester zu Monomeren umgesetzt werden. Im Wesentlichen kamen Ölsäuremethylester und Erucasäuremethylester zum Einsatz, aus denen C-9, C-13 und C-18 Monomerbausteine zur Herstellung von Polyamiden gewonnen werden können. Es war beabsichtigt die Funktionalisierung zum einen über eine Metathese-Reaktion und zum anderen über Ozonolyse zu erreichen.

Im ersten Schritt wurden zehn verschiedene Metathese-Katalysatoren auf ihre Aktivität in der Selbstmetathese von Ölsäure- bzw. Erucasäure-methylester untersucht (Abbildung VII.1). Ein wichtiger Hinweis auf die Aktivität des entsprechenden Katalysators ist die Geschwindigkeit, mit der das chemische Gleichgewicht eingestellt wird. Ein weiterer wichtiger Punkt ist das Ausmaß an Isomerisierung als Nebenreaktion, die letztendlich zu einer verminderten Ausbeute an gewünschtem Produkt führt und vor allem meist mit einer niedrigeren ‚turn over number‘ (TON) des Katalysators bzgl. des produktiven Reaktionsweges einhergeht.

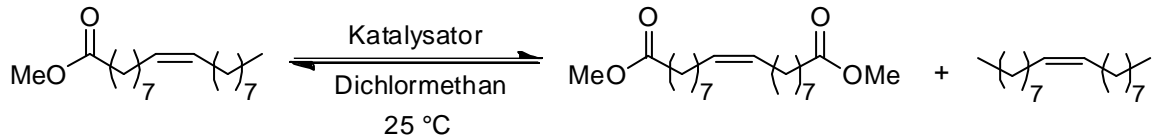


Abbildung III.23: Selbstmetathese am Beispiel des Ölsäuremethylesters. Das gewünschte Produkt ist der C18-Disäuredimethylester.

Von den zehn Katalysatoren zeigten acht eine gute Aktivität. Allerdings wurde bei allen Versuchen ein erhöhtes Ausmaß an Isomerisierung festgestellt.

Das Recycling der Metathese-Katalysatoren wurde anhand kommerziell erhältlicher Verbindungen des Grubbs-II-Typs untersucht. Die Selbstmetathese wurde mit Ölsäuremethylester als Substrat ohne Lösungsmittel durchgeführt. Mit den hieraus gewonnenen Reaktionsmischungen bzw. Aliquoten (Katalysator, Substrat und Produkte) wurden dann diverse Filtrations- bzw. Chromatographie-Methoden gescreent. Hierbei wurden teilweise gute Recycling-Raten erhalten (>90% wieder verwertbarer Katalysator). Die Ergebnisse können als Basis für Recycling-Strategien in der komplexeren, da mehr Reaktanden enthaltenden Kreuzmetathese dienen.

Die Ozonolyse stellt eine sehr selektive Methode dar, ungesättigte Fettsäuren an der C,C-Doppelbindung zu funktionalisieren. Im Wesentlichen kamen Öl- bzw. Erucasäure und deren Ester zum Einsatz. Die funktionalisierende Spaltung der C=C-Doppelbindung von diesen natürlichen Fettsäuren bzw. deren Estern in der Anwesenheit von Ozon kann verschiedene Monomerbausteine erzeugen. Durch Variation der Reaktionsbedingungen lässt sich dieser modulare Weg selektiv zu AB- bzw. AABB-Polyamiden steuern (Abb. VII.2).

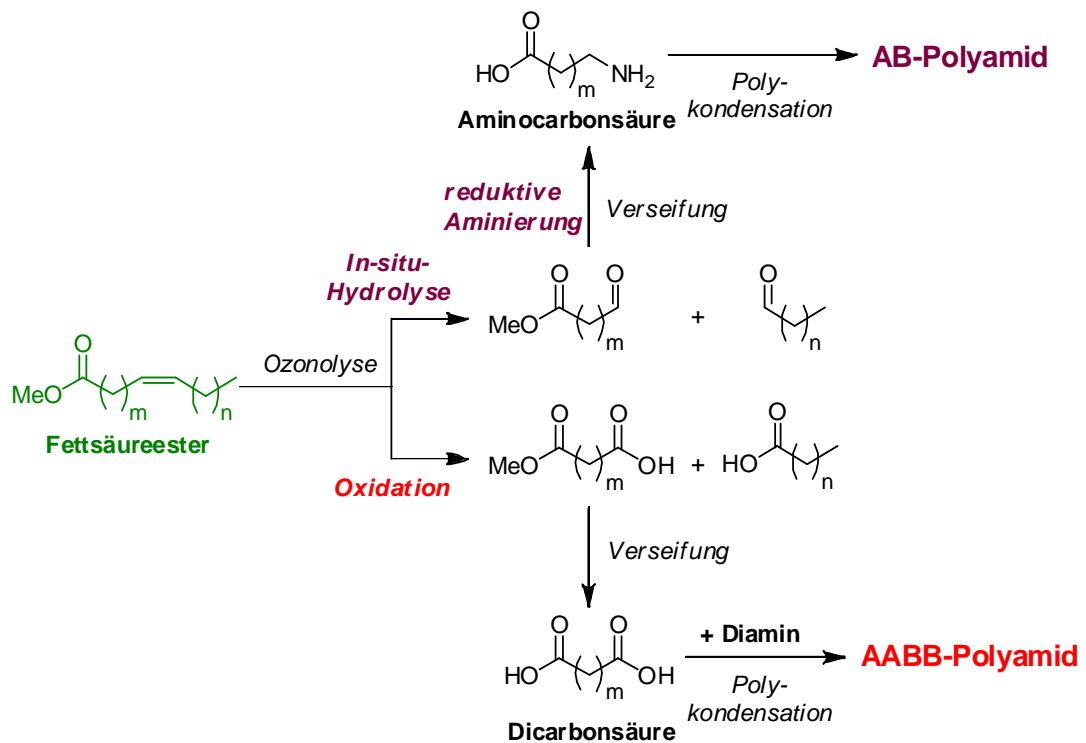


Abbildung III.24: Modulare Herstellung von Polyamiden aus Fettsäuren

Für eine technische Umsetzung ist es ausschlaggebend, dass die Bedingungen der Oxidation in einem reaktionstechnisch sicheren Bereich erfolgt. Durch Optimierung der Reaktionsführung ist

dies erreicht worden. So werden die Ozonide *in situ* zersetzt und nicht wie bei herkömmlichen Methoden angereichert. Daher kommt es auch nicht zur Bildung polymerer Ozonide, die unter anderen Bedingungen häufig beobachtet wird!

Die Reaktionsführung mit Zersetzung der Ozonide *in situ* (Verhinderung einer gefährlichen Anreicherung) wurde auf ein kontinuierliches Verfahren in Form eines Rieselbett-Reaktors umgestellt. Es wurden geeignete Lösungsmittelsysteme und Reaktionsparameter gefunden, mit denen sich die Ozonolyse der Fettsäureester entweder selektiv auf der Stufe der als primäre Oxidationsprodukte entstehenden Aldehyde anhalten lässt, oder die es erlauben, oxidativ zu den entsprechenden Dicarbonsäuremonoestern zu gelangen (Abbildung VII.1 bzw. letzter Zwischenbericht. Außerdem wurde die direkte Synthese von Dicarbonsäuren aus Fettsäuren an Hand der Ozonolyse von Erucasäure untersucht. Es wurde Erucasäure aus dem Teilprojekt 2 von SynRg (Fraunhofer Um-sicht) und kommerziell erhältliche Erucasäure verwendet.

In einer Mischung aus Perlargonsäure und Wasser wird die Erucasäure mit Ozon umgesetzt. Nach oxidativer Aufarbeitung mit Wasserstoffperoxid oder Sauerstoff wird Brassylsäure als Hauptprodukt erhalten. Das einzige Nebenprodukt aus der Ozonolyse ist Perlargonsäure, die auch als Lösungsmittel für die Reaktion verwendet wird. Durch dieses neue Verfahren kann aus der Fettsäure in einer einzigen Stufe das gewünschte Dicarbonsäuremonomer erhalten werden (Abb. VII.3), da keine Verseifung mehr notwendig ist.

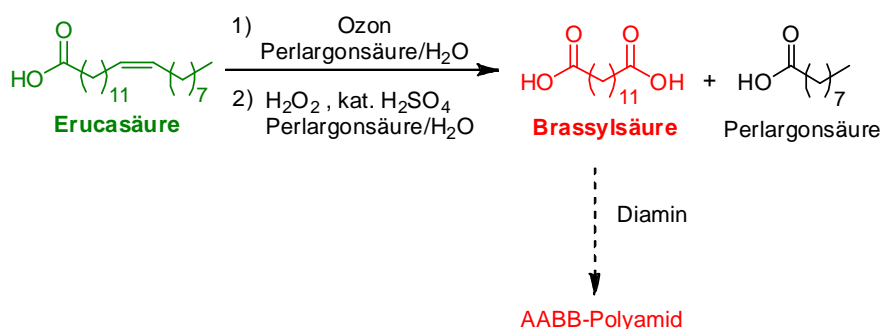


Abbildung III.25: Einstufige Herstellung von Brassylsäure aus Erucasäure

Der Reinheitsanspruch eines Monomers für die Herstellung eines Hochleistungspolyamids ist sehr hoch. Deshalb wurden die Aufarbeitung der Reaktion und die Reinigung der Brassylsäure sehr intensiv bearbeitet. Das entwickelte Verfahren ist so robust, dass ein hochreines Monomer (> 98%) auch aus einem mäßig reinen Rohstoff (< 90%) hergestellt werden kann.

Die erfolgreich durchgeführten Untersuchungen ermöglichen es jetzt, einfach ungesättigte Fettsäuren in zwei Schritten (oxidative Ozonolyse und Polymerisation) in AABB-Polyamide zu überführen. Das nächste Ziel war, genug Monomer mit diesem Verfahren herzustellen, um einen Polymerisationsversuch im Technikumsmaßstab durchzuführen. Dafür reichte die zur Verfügung gestellte Menge Erucasäure aus dem Teilprojekt 2 von SynRg nicht aus. Aus diesem Grund haben wir kommerzielle Erucasäure (auch aus nachwachsenden Rohstoffen) von Croda GmbH und Emery Oleochemicals mittels Ozonolyse für diesen Zweck umgesetzt. Nach 40 Laborversuchen hatten wir über 2 kg reine Brassylsäure hergestellt.

Dieses Monomer kann mit Hexamethyldiamin reagieren, um Polyamid 613 zu bilden. Dieses Polymer, dessen mechanische Eigenschaften zwischen den kommerziellen Polyamiden 12 und 612 liegen, ist ein besonders interessantes Produkt. Üblicherweise wird Brassylsäure aus petrochemischen Rohstoffen verwendet und unser Ziel war, das Polymer aus der SynRg-Brassylsäure mit diesem herkömmlichen Polyamid 613 zu vergleichen.

Da die Herstellung der 2 kg SynRg-Brassylsäure sehr ressourcenintensiv war, wurde zuerst die Polymerisation im Labor untersucht. Anschließend wurde die Polymerisation in einem 10L-Reaktor zuerst mit petrochemischer Brassylsäure untersucht und die Parameter wurden optimiert (ca. 20 Versuche notwendig). Schließlich wurde die Polymerisation mit der SynRg-Brassylsäure im 10L-Reaktor erfolgreich durchgeführt. 1,4 kg Granulat eines Polyamids 613 wurden erhalten, dessen chemischen Eigenschaften mit herkömmlichem PA613 vergleichbar sind (Abb. VII.4).



Abbildung III.26: Polyamid 613 aus Brassylsäure des SynRg Projekts

Diese erfolgreich durchgeführten Untersuchungen ermöglichen es jetzt, einfach ungesättigte Fettsäuren in zwei Schritten (oxidative Ozonolyse und Polymerisation) in ABB-Polyamide zu überführen und diese Machbarkeit wurde bis zum Technikumsmaßstab bewiesen.

Anschließend wurde der Fokus auf die Verarbeitung der entsprechenden Polymere und die Prüfung der Qualität gesetzt. Außerdem wurde eine Simulation des Verfahrens im industriellen Maßstab entwickelt, mit dem Ziel eine wirtschaftliche und ökologische Bewertung der Produkte durchzuführen.

Zunächst wurden die Polymergranulate zu Prüfkörpern verarbeitet, indem durch Spritzgießen > 30 Zugstäbe hergestellt wurden (siehe Abb. 4). An Hand der Zugstäbe sollten wichtige mechanische Eigenschaften des SynRG-Polyamids bestimmt und mit herkömmlichen Polyamiden verglichen werden. Aufgrund der begrenzten verfügbaren Materialmenge war auch hier nur ein Versuch möglich, der nach entsprechender Übung mit herkömmlichem PA613 erfreulicherweise sehr erfolgreich gelaufen ist.

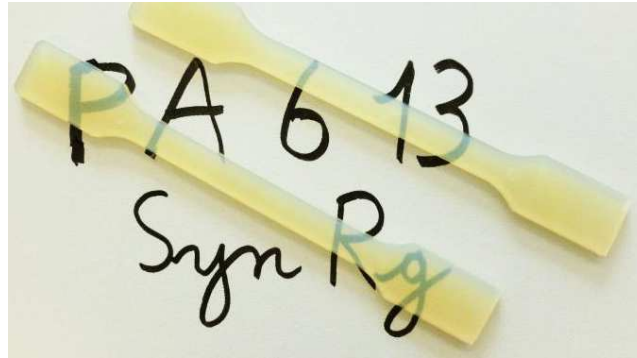


Abbildung III.27: Zugstäbe von SynRg-Polyamid

Dann wurden übliche mechanische Testungen mit diesen Stäben durchgeführt, um die Eigenschaften dieses Polymers mit herkömmlichen Polyamiden zu vergleichen.

Die Eigenschaften des Biopolyamids aus dem SynRg-Verfahren waren vergleichbar mit herkömmlichem Polyamid 613. Diese Eigenschaften liegen wie erwartet zwischen denen von PA 12 und PA 612. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Herstellung von hochqualitativen Polyamiden aus Rapsöl in wenigen Schritten möglich ist.

Um die Erfolgchancen dieses Verfahrens im industriellen Maßstab bewerten zu können, wurde ein möglicher industrieller Prozess an Hand der Daten der Laborexperimente im Computer simuliert. Diese Simulation ist erfolgreich verlaufen und hat in Hinsicht auf die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung des Projekts wertvolle Ergebnisse geliefert.

Die wirtschaftliche Bewertung der ganzen Wertschöpfungskette von Rapsöl bis zum Polyamid wurde durchgeführt.

In einem ersten Teil wurde die Gewinnung von Erucasäure aus Rapsrohöl betrachtet. Im Rahmen des SynRg Projekts wurde vom Projektpartner Fraunhofer Umsicht eine enzymatische Hydrolyse des Rohöls entwickelt, welchen wir mit der herkömmlichen thermischen Spaltung verglichen haben. Die Kalkulation zeigt, dass die Rohstoffkosten sehr stark dominant gegenüber Energie- oder Investitionskosten sind. Da die enzymatische Hydrolyse eine deutlich niedrigere Ausbeute hat und preisintensive Enzyme benötigt, bleibt die thermische Spaltung deutlich wirtschaftlicher im industriellen Maßstab.

In einem zweiten Teil wurde die Ozonolyse von Erucasäure zu Brassylsäure simuliert und die Kosten gerechnet. In dieser Kalkulation sind die Rohstoffkosten immer noch dominant aber die Investitionskosten haben auch einen signifikanten Anteil. Das Fazit ist, dass eine rückintegrierte Herstellung von Erucasäure einen großen Wettbewerbsvorteil bringt gegenüber dem Ankauf von kommerzieller Erucasäure.

2. Verwertung

Dieses Projekt hat gezeigt, dass die Herstellung von Hochleistungspolyamiden aus Rapsöl technisch möglich ist. Wertvolle Informationen über die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Polymere wurden gesammelt sowie eine umfangreiche Kenntnis des Ozonolyseverfahrens und dessen Vor- und Nachteile. Die Untersuchungen zur hydrothermalen oxidativen Spaltung und die Verarbeitungsuntersuchungen zu Polyesterprodukten lieferten wertvolle Ergebnisse für die potentielle industrielle Verwertung der erzielten Oxidationsprodukte. U. a. können dafür Polyesterpolyole als biobasierte Komponenten für Polyurethanprodukte, biobasierte Polyesterharze und Präpolymere für Lacke, Klebstoffe und Folien in Frage kommen. Die gewonnenen Erkenntnisse sind somit von großer Bedeutung, sowohl für eine eventuelle zukünftige Investition in ein Ozonolyseverfahren als auch für die Herstellung von Polymeren aus Monomeren hervorgehend aus einem Ozonolysenschritt. Die Monomere könnten selbst hergestellt oder auch zugeliefert werden. Dies könnte insbesondere im Falle eines zukünftig sinkenden Rohstoffpreises sehr interessant werden.

Eine weitere Ergebnisverwertung stellt die Nutzung der Metatheserergebnisse (Selbstmetathese) als Basis für Recycling-Strategien in der komplexeren, da mehr Reaktanden enthaltenden Kreuzmetathese dar.

Verwertungsmöglichkeiten ergeben sich bei der industriellen Nutzung der Enzyme, wodurch ein großer Wachstumsmarkt adressiert wird. Bereits heute sind Enzyme an der Erzeugung von Wertstoffen in der Papier- und Waschmittelindustrie, der Leder- und Textilindustrie oder bei Haushaltsprodukte und Lebensmittel von Bedeutung. Da der Bedarf steigt, klassische ressourcenbelastende (Chemikalien-)Produktion durch nachhaltige zu ersetzen, sind die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten für die Vermarktung der im Rahmen des SynRg-Projektes isolierten pflanzlichen und pilzlichen Biokatalysatoren, bzw. darauf aufbauender biotechnologischer Produktionsprozesse als sehr gut einzustufen. Dies bestätigt sich auch dadurch, dass bereits heute Unternehmen aus so unterschiedlichen Bereichen wie der Chemie, der Nahrungsergänzungstoffe oder Pharmazie an der Nutzung von Enzymen interessiert sind.

3. Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen

Die Arbeiten am KIT resultierten in folgender Anmeldung;

- O. Kreye, M.A.R. Meier, Herstellung von Carbamaten über eine basenkatalysierte Lossen-Umlagerung, DE 10 2012 100 127.8

Die folgenden Patentanmeldungen der Evonik basieren auf der erfolgreichen Untersuchung der Ozonolyse von Fettsäuren im Rahmen des SynRg Projekts:

- WO 2011160730: Synthese von ω -Aminocarbonsäuren und deren Estern aus ungesättigten Fettsäurederivaten.
- EP 2502899: Synthese von α,ω -Dicarbonsäuren und deren Estern aus ungesättigten Fettsäurederivaten.

4. Erkenntnisse von Dritten

Dicarbonsäuren werden seit wenigen Jahren durch biotechnologische Verfahren hergestellt und auch vermarktet (z.B. Cathay Biotech). In wie weit die im Projekt SynRG untersuchten Syntheserouten dazu wettbewerbsfähig und effizienter sein können, war offen. Nach unserer Einschätzung

auf Basis der Projektergebnisse kann die Metathesereaktion für diese Umsetzung mit der biotechnologischen Variante mittelfristig wirtschaftlich schwer konkurrieren. Die Ozonolyse hat ein deutlich besseres wirtschaftliches Potential gezeigt.

Die Firma Elevance Renewable Sciences hat ein industrielles Verfahren für die Synthese von langkettigen Dicarbonsäuren mittels Metathese von Fettsäuren entwickelt. Sie hat eine Patentanmeldung eingereicht³¹ und hat während der Laufzeit dieses Projekts angefangen, C18-Dicarbonsäure aus diesem Verfahren zu kommerzialisieren. Die Metatheseaktivitäten im Projekt (Selbstmetathese) zielten auf eine Effizienzsteigerung durch neue Katalysatorsysteme. Die Aktivitäten der Firma Elevance beeinträchtigten somit nicht das Projektziel. Zudem waren unsere Metatheseaktivitäten zum Zeitpunkt des Bekanntwerdens der Aktivitäten der Fa. Elevance bereits weitgehend abgeschlossen. Wie bereits erwähnt, zeigte sich die Ozonolyse ohnehin als der Synthesepfad mit deutlich höherem Wirtschaftlichkeitspotential.

Diese Aktivitäten Dritter beziehen sich alle auf die Herstellung von Dicarbonsäuren aus natürlichen Fettsäuren, nicht auf die Polymerproduktion aus den Dicarbonsäuren. Sie könnten durchaus eine zukünftige industrielle Verwertung der Projektergebnisse durch Evonik in Abhängigkeit von Markt- und Rohstoffsituation ermöglichen. Diese könnte entweder in einer Polymerproduktion auf Basis zugekaufter Brassylsäure bestehen oder zusätzlich auch die Herstellung von Brassylsäure aus Erucasäure per Ozonolyse beinhalten. Hinzu kommt die wissenschaftliche Verwertung der Metatheseergebnisse für weitere Forschungsarbeiten zur Kreuzmetathese.

5. Veröffentlichungen

Publikationen

1. "Copolymers derived from Rapeseed Derivatives via ADMET and Thiol-Ene Addition" Oliver Kreye, Tommy Tóth, Michael A. R. Meier, *Eur. Polym. J.* 2011, 47, 1804-1816.
2. "Introducing Catalytic Lossen Rearrangements: Sustainable Access to Carbamates and Amines" Oliver Kreye, Sarah Wald, Michael A. R. Meier, *Adv. Synth. Catal.* 2013, 355, 81-86.
3. "Renewable Aromatic-Aliphatic Copolyesters Derived from Rapeseed" Oliver Kreye, Stefan Oelmann, Michael A. R. Meier, *Macromol. Chem. Phys.* 2013, 214, 1452-1464.
4. "Base catalyzed sustainable synthesis of phenyl esters from carboxylic acids using diphenyl carbonate under neat conditions" Oliver Kreye, Michael A. R. Meier, in Vorbereitung für *Green Chemistry*.
5. "Renewable Polyamides derived from Rapeseed" Oliver Kreye, David Marschner, Christian Riedinger, Michael A. R. Meier, in Vorbereitung.
6. "Renewable Polycarbonates derived from Rapeseed" Oliver Kreye, Markus Lankau, Michael A. R. Meier, in Vorbereitung.
7. „Untersuchung und Optimierung des hydrothermalen Spaltprozesses von Ölsäure zur Produktion von Azelainsäure und Perlagonsäure“ M. Schluppenberger, S. Böringer, T. Adrian, 2011, Bachelorarbeit, Hochschule Mannheim, <http://www.che.hs-mannheim.de/adrian/>.
8. F.-C. Huang, C. Studart-Witkowski, W. Schwab, Overexpression of hydroperoxide lyase gene in *Nicotiana benthamiana* using a viral vector system. *Plant Biotechnology Journal* 8 (2010), 783-795.
9. F.-C. Huang, W. Schwab, Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene induced by pathogen attack from *Nicotiana benthamiana* for biotechnological application. *BMC Biotechnology* (2011), 11-30.
10. F.-C. Huang, W. Schwab, Overexpression of hydroperoxide lyase, peroxygenase and epoxide hydrolase in tobacco for the biotechnological production of flavours and polymer precursors. *Plant Biotechnology Journal* 10 (2012), 1099-1109.

³¹ US Patent 2009/0264672

11. F.C. Huang, W. Schwab, Molecular characterization of NbEH1 and NbEH2, two epoxide hydrolases from *Nicotiana benthamiana*. *Phytochemistry* 90 (2013), 6-15
12. C. Fuchs, W. Schwab, Epoxidation, hydroxylatin and aromatization is catalyzed by a peroxygenase from *Solanum lycopersicum*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 96 (2013), 52-60.
13. W. Schwab, C. Fuchs, F.-C. Huang, Transformation of terpenes into fine chemicals. *European Journal of Lipid Science and Technology* 115 (2013), 3-8.
14. F.-C. Huang, A. Peter, W. Schwab, Expression and characterization of CYP52 genes involved in the biosynthesis of sophorolipid and alkane metabolism from *Starmerella bombicola*. *Applied Environmental Microbiology* (2013) doi: 10.1128/AEM.02886-13.
15. J. Aghofack-Nguemezi, C. Fuchs, S.-Y. Yeh, F.-C. Huang, T. Hoffmann, W. Schwab, An oxygenase inhibitor study in *Solanum lycopersicum* combined with metabolite profiling analysis revealed a potent peroxygenase inactivator. *Journal of Experimental Botany* 62(3) (2011), 1313-1323.
16. W. Schwab, C. Fuchs, F.-C. Huang, Transformation of terpenes into fine chemicals. *European Journal of Lipid Science and Technology* 115 (2013), 3-8.
17. J. Vogt, D. Schiller, W. Schwab, F. Dunemann, Characterization of Apple lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in the formation of fruit flavour volatiles. *Acta Horticulturae (ISHS)* 976 (2013), 369-376
18. J. Vogt, D. Schiller, D. Ulrich, W. Schwab, F. Dunemann, Identification of lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in fruit flavour formation in apple (*Malus x domestica*). *Tree Genetics & Genomes* (2013) doi 10.1007/s11295-013-0653-5.

Poster

1. "The First Catalytic Lossen Rearrangement: Sustainable Access to Carbamates and Amines" Oliver Kreye, Sarah Wald, Michael A. R. Meier.
2. Nachhaltige 2012, Vortragstagung der GDCh – Jahrestagung der Fachgruppe Nachhaltige Chemie, Kaiserslautern, 16. – 18. September 2012.
3. "Renewable aromatic aliphatic copolyesters derived from rapeseed" Stefan Oelmann, Oliver Kreye, Michael A. R. Meier.
4. 6th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry, Karlsruhe, 17. – 19. März 2013.

Vorträge

1. "The first catalytic Lossen rearrangement: Sustainable access to fatty acid derived nitrogen containing monomers and polymers"
2. 6th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry, Karlsruhe, 17. – 19. März 2013.
3. "Organic carbonates and renewable resources: A promising alliance for the sustainable synthesis of monomers and polymers"
4. 7th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry, Karlsruhe, 23. – 25. März 2014.

Abschlussbetrachtung

Wie Eingangs dargestellt, zielte die in SynRg realisierte interdisziplinäre Zusammenarbeit auf eine ganzheitliche Optimierung bei nachhaltiger Gewinnung und Nutzung von pflanzlichen Rohstoffen ab, wobei alle Schritte einer Wertschöpfungskette von der Pflanzenzucht über Anbau, Aufarbeitung bis hin zur Produktsynthese betrachtet werden sollten. Dies konnte im Projektverlauf anhand der Nutzpflanze Raps, dem daraus extrahierten Öl und dessen Aufarbeitung und schließlich erfolgreicher Polymersynthesen mit pflanzlichen Rohstoffen eindrucksvoll und beispielhaft gezeigt werden.

In jedem der Teilprojekte sind signifikante wissenschaftliche Fortschritte erzielt worden.

So hat das Teilprojekt 1 neue Erkenntnisse zur genetischen Kontrolle von pflanzlichem Wachstum und Entwicklung erbracht, die Nutzung von Phänotypisierungstechnologien vorangetrieben und neue Pflanzensorten bereitgestellt.

Im zweiten Teilprojekt hat die Untersuchung und Evaluierung verschiedenster Extraktions- und Aufarbeitungsmethoden eine große Zahl neuer, interessanter Ansätze ergeben, beispielsweise eine verbesserte Polyphenolextraktion und enzymatische Verfahren zur Fettsäuregewinnung und zur Glycerinverwertung. Besonders interessant und wichtig ist hier die Vielzahl der aus den Rohstoffen Fettsäure und Polyphenol neu gewonnenen Polymer-Grundbausteine und deren erfolgreiche erste Nutzung für erste Polymersynthesen bis hin zu Prüfmustern. Das hat neue Produkt- und Verwertungsmöglichkeiten eröffnet.

Im dritten Teilprojekt sind neue biotechnologische Wege zur Oxo-Funktionalisierung von Fettsäuren erarbeitet und ein auf Ozonolyse von Fettsäuren beruhender chemischer Prozess entwickelt worden, der eine prinzipielle Eignung für den großtechnischen Einsatz aufweist. Herausragend ist die Herstellung von Brassylsäure aus nachwachsenden Rohstoffen, dessen Verwendung zur Produktion von Nylon 613 sowie der Nachweis, dass die Produkteigenschaften mit aus petrochemischen Rohstoffen hergestelltem Nylon 613 deckungsgleich sind und das bei annähernd vergleichbarer Wirtschaftlichkeit. Einer wirtschaftlichen Verwertung stehen hier nur der noch verhältnismäßig kleine Markt und die Investitionskosten entgegen.

Aus Sicht der Koordination konnte die Durchführung und Abwicklung des Gesamtprojekts erfreulich reibungslos realisiert werden und das trotz des sehr heterogen aufgebauten Konsortiums und der hohen Zahl von 18 Partnern. Dennoch muss festgehalten werden, dass die doch recht unterschiedlichen zeitlichen Erfordernisse im Bereich der akademischen Grundlagenforschung und Pflanzenzüchtung im Vergleich zu den technischen, chemischen und biotechnologischen Arbeiten für die Koordination der Gesamtabläufe durchaus eine klare Herausforderung darstellen. Letztlich gab es aber keine ernsthaften Probleme. Nicht zuletzt, weil sich die für die Projektdurchführung etablierten und eingesetzten Instrumente wie Lenkungsausschuss und die Organisation in mehreren Teilprojekten eindeutig bewährten.