

Technische Aspekte
der natürlichen Darstellung und Aufarbeitung von
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-on (Furaneol)

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFT

-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Edgar Pundsack

geboren am 2. Juli 1970
in Cloppenburg

Hannover, Februar 1999

Tag der Prüfung: 08.02.1999

in memoriam:

Ute Bergermann

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: PD Dr. Gerlinde Kretzmer

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom August 1995 bis Dezember 1998 am Institut für Biochemie der Wilhelms-Universität Münster und dem Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank für seine Anregungen und Tips und seine unkonventionelle Art, durch die er ein einmaliges Arbeitsklima geschaffen hat.

Frau PD Dr. Gerlinde Kretzmer danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Europäischen Union.

Des weiteren gilt mein Dank:

Matthias Arndt und Katja Klockewitz für ihre experimentellen Beiträge, die gute Zusammenarbeit und ihr Engagement und Durchhaltevermögen während ihrer Diplomarbeiten;

Den Mitgliedern des EU-Projektes AIR3 CT942060, Herrn Prof. R.G. Berger, Prof. Didier Combes, Prof. Fragiskos Kolisis und Dr. B. Köhler für die anregende Korrespondenz und familiäre Atmosphäre bei den Projekttreffen, und durch deren internationale Zusammenarbeit viele neue Ideen entstanden sind;

Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs für Naturstoffsynthese für interessante und anregende Aktivitäten und Diskussionen innerhalb und außerhalb der Universität;

Den Mitarbeitern der Werkstätten in Münster und Hannover für ihre Diskussionsbereitschaft und vorzügliche Arbeit.

Persönlich bedanke ich mich bei:

allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern am Institut für Biochemie für das hervorragende Arbeitsklima die freundschaftliche Aufnahme im Institut für Biochemie in Münster; und besonders allen Seglern für die tolle Zeit und wecken meines Interesses für diese herrliche Sportart;

Hedda Elverich und Lydia Klapper für Lebensfreude und Hilfsbereitschaft, Walter Storkebaum für die Abwicklung der Formalien innerhalb und außerhalb des EU-Projektes und Wolfgang Willenbrinck für seine Hilfe elektronischer Art;

Allen Mitarbeitern am Institut für Technische Chemie, besonders allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des IS-Labors und Analysenlabors für die schnelle Eingliederung in Hannover;

Dr. Lars Kreye für seine Ideen und Teilnahme aus dem Hintergrund.

Martina Weiss danke ich für Ihre ständige Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung in Sachen HPLC und ganz besonders Ina Mackenstedt für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft.

Ganz herzlichen Dank an Dr. Markus Tservistas für die stets angenehme Zusammenarbeit während und nach der Doktorarbeit.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen vom Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover, insbesondere Dr. Dietmar Ganßer, Dr. Ulla Richter und Elke Latza, meinen herzlichen Dank für Ihre freundliche Aufnahme und Unterstützung bei der Analytik.

Ganz herzlich danken möchte ich meinen Eltern dafür, daß ich jederzeit auf ihre Unterstützung zählen durfte und sie es mir ermöglicht haben, meinen Weg bis hierhin zu gehen.

Abstract:

Edgar Pundsack

Technische Aspekte der natürlichen Darstellung und Aufarbeitung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-on (Furaneol)

Der biotechnologischen Herstellung von Aromastoffen erwächst immer mehr Bedeutung. Hintergrund ist die Darstellung natürlicher Produkte aus der eine Wertschöpfung resultiert. Dabei wird das Verlangen der Bevölkerung nach immer mehr natürlichen Produkten in der Ernährung gedeckt.

Im Rahmen dieser Arbeit werden Wege zur natürlichen Darstellung und Aufarbeitung von Furaneol[®] untersucht. Furaneol ist wegen seiner Vielseitigkeit ein für die Lebensmittelindustrie wichtiger Aromastoff. In Anlehnung an das Reaktionsschema nach *Wong et al.* wird die Kombination enzymatischer Reaktionsschritte zur Darstellung von Desoxyzucker, der Vorstufe des Furaneol[®] untersucht und beurteilt.

Alternativ wurde die Synthese des Furaneols[®] aus Rhamnose als natürlichen Ausgangskomponente untersucht. In Anwesenheit von Aminosäuren gelingt die Darstellung in hohen Ausbeuten. Die Reaktion wird in Bezug auf Reaktionsdauer, und –Temperatur, pH-Wert und Menge der Aminokomponente optimiert, um Ausbeuteminderung durch die Bildung von Melanoidinen zu minimieren.

Die Menge an gebildeten braunen Farbstoffen und Pigmente (Melanoidinen) behindert in hohem Maße die weitere Aufarbeitung und macht zusätzliche Aufreinigungsschritte erforderlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eingehend die Aufreinigung des natürlich hergestellten Furaneol[®] untersucht. Dabei kamen neben den klassischen Methoden zur Aufreinigung die Extraktion mittels überkritischen Kohlendioxid und die Adsorption mittels Zeolithe zum Einsatz. Furaneol[®] wurde mit Hilfe von überkritischen Kohlendioxid quantitativ extrahiert. Der Stoffübergangskoeffizient des Furaneol[®] in dem System wurde bestimmt.

Die Abtrennung von Furaneol[®] aus Mehrkomponentensystemen mit Hilfe von Zeolithen wurde untersucht. In dieser Arbeit wurden die Sorptionsisotherme des Furaneol[®] auf Zeolithen des Typs ZSM5 und DAY bestimmt. Die Affinität des Furaneols[®] ist dabei abhängig vom Modul. Dieser Zusammenhang ist unabhängig von den untersuchten Typen. Die Desorption des Furaneols[®] gelingt mit Hilfe von Ethanol.

Abstract:

Edgar Pundsack

Technical Aspects of Natural Synthesis and Downstream Processing of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-on (Furaneol)

The biotechnological production of flavour compounds is of ever growing importance. The idea behind is the synthesis of natural compounds resulting in a value added product as well as fulfil the growing demand of the population for natural compounds in food products.

In the frame of this thesis pathways for the natural synthesis and downstream processing of Furaneol[®] was investigated. Furaneol[®] is of growing importance in food technology, due to his potential flavour variety ranging from a pineapple like odour in low concentrations to strawberry flavour in high concentrations and caramel flavour in even higher concentrations.

According to a reaction scheme by *Wong et al.* process step combination of enzymatical reactions for the synthesis of deoxysugars, the precursor of Furaneol[®] was investigated and evaluated.

Additionally, alternative synthesis of Furaneol[®] from Rhamnose, as the starting material from natural resources, in presence of amino acids have been carried out obtaining high yields.

Optimisation of reaction parameters concerning duration, temperature, pH and amount of starting material was achieved to minimise the production of by-products like melanoidines.

The amount of formed brown colouring compounds and pigments (melanoidines) prevent a efficient down stream process and necessitates additional step in downstream processing

In the frame of this dissertation the downstream processing of natural synthesised Furaneol[®] have been investigated thoroughly. Besides classical downstream process techniques, innovative new methods such as supercritical carbondioxide and adsorption on zeolites have been tested. With the use of supercritical carbondioxide Furaneol[®] have been extracted quantitatively from reaction mixture. The transition coefficient of Furaneol[®] in this system have been calculated.

The separation of Furaneol[®] from reaction mixtures using zeolites was investigated. Characteristics such as maximum adsorption, affinity and influence of zeolite polarity was investigated. Adsorption on zeolites is dependent of the polarity (modul). This characteristic is independent of the type of zeolite. Desorption was achieved using Ethanol as eluent.

Schlagwörter: Furaneol[®], natürliche Synthese, Zeolithe

Keywords: Furaneol[®], natural synthesis, zeolites

1	EINLEITUNG	1
2	HINTERGRUND	2
2.1	AROMASTOFFE IN LEBENSMITTELN	2
2.2	2,5-DIMETHYL-4-HYDROXY-3[2H]-FURANON (FURANEOL [®])	3
2.3	SYNTHESEWEGE UND PATENTRECHTLICHE SITUATION UM FURANEOL [®]	4
3	ALTERNATIVE SYNTHESEN VON 4-HYDROXY-2,5-DIMETHYL-3(H)-FURANON (FURANEOL)	7
3.1	DARSTELLUNG VON FURANEOL [®] AUF ENZYMATISCHEN WEGE.....	7
3.1.1	<i>Kombination der enzymatischen Reaktionsschritte</i>	10
3.2	DARSTELLUNG VON FURANEOL [®] AUS 6-DESOXY-L-MANNOSE (RHAMNOSE)	20
3.2.1	<i>Die Maillard-Reaktion</i>	20
3.3	OPTIMIERUNG DER REAKTION	29
3.3.1	<i>Optimierung der Reaktionstemperatur und Dauer</i>	29
3.3.2	<i>Optimierung des pH-Wertes</i>	44
3.3.3	<i>Optimierung der Katalysatormenge</i>	45
3.3.4	<i>Abhängigkeit der Ausbeute vom Reaktionsmedium</i>	47
3.3.5	<i>Zusammenfassung</i>	49
4	AUFARBEITUNGSMETHODEN	50
4.1	KLASSISCHE AUFARBEITUNGSMETHODEN	51
4.1.1	<i>Extraktion mit Hilfe organischer Lösungsmittel</i>	51
4.1.2	<i>Abtrennung der farbigen Verunreinigungen</i>	55
4.1.3	<i>Zusammenfassung</i>	58
4.2	INNOVATIVE AUFARBEITUNGSMETHODEN	59
4.2.1	<i>Aufarbeitung durch Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid</i>	59
4.2.2	<i>Aufarbeitung durch Festphasenextraktion mit Zeolithen</i>	70
5	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION	91
6	AUSBLICK	94

7	ANHANG.....	95
7.1	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....	95
7.2	MATERIAL UND METHODEN.....	95
7.2.1	<i>Materialien</i>	95
7.2.2	<i>Enzyme</i>	96
7.2.3	<i>Komponenten der Hochdruckanlage</i>	96
7.2.4	<i>Aktivitätsbestimmungen der nativen und immobilisierten Enzyme</i>	97
7.2.5	<i>GC-MS Analyse von Furaneol[®]</i>	97
7.2.6	<i>HPLC-Analyse der enzymatischen Reaktionsschritte</i>	98
7.3	VERSUCHSVORSCHRIFTEN	98
7.3.1	<i>Aldolase-Aktivität</i>	98
7.3.2	<i>Native und immobilisierte Saure Phosphatase</i>	99
7.3.3	<i>BCA-Test</i>	99
7.3.4	<i>Darstellung des Lactaldehyds aus Lactaldehyddimethylacetal</i>	100
7.3.5	<i>Versuchsvorschriften zur Synthese von 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat und 6-Desoxy-L-sorbose-1-phosphat</i>	100
7.3.6	<i>Überführung der Desoxyzuckerphosphate in Desoxyzucker</i>	101
7.3.7	<i>Darstellung von Furaneol[®] mit Hilfe von Piperidin/Eisessig nach [PEER, 1968]</i>	101
7.3.8	<i>Darstellung von Furaneol[®] mit Hilfe von Trägermaterialien mit Aminofunktionen</i>	102
7.3.9	<i>Darstellung von Furaneol[®] mit Hilfe von Aminosäuren</i>	102
7.3.10	<i>Optimierung der Reaktionstemperatur und Dauer</i>	102
7.3.11	<i>Optimierung des pH-Wertes</i>	103
7.3.12	<i>Optimierung der Menge an Katalysator (Aminosäure)</i>	103
7.3.13	<i>Festphasenextraktion mit Aktivkohle und makroporösen Substanzen</i>	103
7.3.14	<i>Enzymatische Spaltung der Melanoidine</i>	104
7.3.15	<i>Extraktion in überkritischen Kohlendioxid</i>	105
7.3.16	<i>Standard-Adsorptionsversuche mit Zeolithpulver</i>	106
7.4	ANALYTIK.....	107
7.4.1	<i>HPLC zur Messung der Furaneol[®]-Konzentration</i>	107
7.5	SPEKTREN	109
7.5.1	<i>GC-MS</i>	109
7.5.2	<i>Cytometrie</i>	110
8	LITERATUR.....	116

1 Einleitung

Jedem sind heute traditionelle Biotechnologien zur Herstellung von Bier, Wein, Milch- und Fleischerzeugnissen bekannt. Weniger bekannt ist, daß bereits eine große Zahl von Geschmacksstoffen und Aromaverstärkern biotechnologisch hergestellt wird. Der Gewinnung von flüchtigen Aromastoffen wird erst in jüngerer Zeit verstärkt Interesse entgegengebracht. Dabei ist anzunehmen, daß in Zukunft ein Großteil auf biotechnologisch erzeugte Produkte entfallen wird [BERGER, 1988, 1995]. Die steigende Zahl der Publikationen in diesem Bereich stützen diese Ansicht. Die Ursachen liegen auf der Hand:

Der Wunsch des Verbrauchers nach aromatischen und aromastarken Lebensmitteln hat in der Lebensmittelindustrie zu einem gesteigerten Bedarf an Geruchsstoffen geführt, dem bereits eine spürbare Verknappung verschiedener Ressourcen gegenübersteht. Das gesteigerte Bewußtsein in der Bevölkerung in Bezug auf Ernährung verlangt dabei immer mehr nach natürlichen Produkten. Überdies ist die Wertschöpfung beim Einsatz von natürlichen Aromen größer als bei der Verwendung von nichtnatürlichen Aromastoffen. Der Begriff „natürlicher“ Aromastoff ist in der Aromenverordnung bestimmt und definiert die Anforderungen bezüglich Herkunft und Synthese (siehe Kap. 2).

Geruchsstoffe, die ein bestimmtes Aroma schon im Spurenbereich determinieren können (sog. „character impact compounds“), werden bevorzugte Synthesziele neuer Biotechnologien sein. Der Aromastoff Furaneol[®] (4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-on) ist eine solche Verbindung (siehe Kap. 2.2). Da Furaneol[®] wegen seiner vielseitigen organoleptischen Eigenschaften eine zentrale Stellung in der Aromenchemie einnimmt, hat es bisher nicht an Versuchen zu seiner Darstellung gefehlt (siehe Kap. 2.3).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die natürliche Darstellung dieses potenten Aromastoffes aus natürlichen Rohstoffen mit Hilfe enzymtechnologischer Verfahrensschritte untersucht. Die prinzipielle Darstellung wurde von Whitesides beschrieben [WHITESIDES, 1983]. Die Synthese war noch nicht in Hinblick auf verfahrenstechnische Möglichkeiten (Immobilisierung, Prozeßintegration, integrierte Aufarbeitung) optimiert.

Ziel ist es unter Einsatz neuer, kommerziell erwerblicher Enzyme (thermo- und langzeitstabiler), eine verfahrenstechnisch optimierte Reaktionsführung zu erreichen. Unter Einführung neuer Reaktionswege soll die wirtschaftliche Synthese von Furaneol[®] ermöglicht werden. So wird die biotechnologische Produktion auf der Basis einer Enzymkaskade aufgebaut. Ziel ist es diesen Prozeß zu etablieren und durch „upscaling“ in einen industriellen Maßstab zu führen.

2 Hintergrund

Der Einsatz der Biotechnologie im Bereich der Aromasynthese bietet ein gewaltiges Potential an neuen Darstellungsmöglichkeiten, da die Verwendung zur Darstellung natürlicher Produkte entsprechend der Aromenverordnung erlaubt ist.

Nach Deutschem Lebensmittelrecht werden Verbindungen mit Aromaeigenschaften je nach Herkunft in verschiedene Klassen eingeteilt. So gilt als Definition für natürliche Aromastoffe:

„Bezeichnungen und Begriffsbestimmungen für Aromen

1. Natürliche Aromastoffe: chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, gewonnen durch geeignete physikalische Verfahren (einschließlich Destillation und Extraktion mit Lösungsmitteln), durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die als solche verwendet oder mittels herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren (einschließlich Trocknen, Rösten und Fermentieren) für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden. “[AROMENVERORDNUNG 1993]¹

2.1 Aromastoffe in Lebensmitteln

Aromastoffe sind Verbindungen, die ausschließlich oder im Zusammenspiel mit anderen das Aroma eines Lebensmittels prägen. Es sind mehr oder weniger flüchtige Verbindungen, die in äußerst geringen Konzentrationen (ppm- oder ppb-Bereich) an Rezeptoren im Mund-Nasen-Raum binden und so die entsprechende Sinneswahrnehmung auslösen.

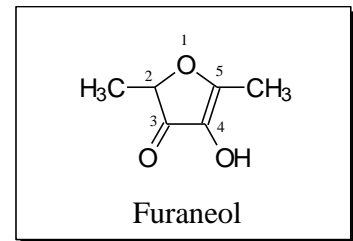
Gewöhnlich setzt sich das Aroma eines Lebensmittels aus mehr als 200 Aromastoffen zusammen. Sogenannte „character impact compounds“ besitzen die Eigenschaft, als einzige Verbindung das Aroma eines Lebensmittels wiederzugeben. Der Geruchseindruck von Aromastoffen ist stark konzentrationsabhängig. Solche Verbindungen mit niedrigem Geruchsschwellenwert² (z. B. Furaneol[®]), werden das Aroma eines Lebensmittels um so stärker beeinflussen, je niedriger deren Geruchsschwellenwert ist [BALTES, 1995].

¹ Anlage 1 (zu § 1 Abs. 1 und § 4 Abs. 1 Nr. 3 Buchstabe a)

² Der Geruchsschwellenwert ist die Konzentration, ab der ein Aromastoff wahrgenommen wird.

2.2 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon (Furaneol^{®3})

Eine interessante Verbindung, die u.a. bei der *Maillard*-Reaktion (siehe Kap. 3.2.1) entsteht, ist das 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon (Furaneol[®]). Sie wurde in Fleischbrühe, geröstetem Kaffee, Wein, Biskuit und anderen Bäckereiprodukten und Popcorn nachgewiesen [BRIGGS *ET AL.* 1985, SCHIEBERLE 1992].



Furaneol[®] wurde als wichtiger Bestandteil des Ananas- und Erdbeeraromas identifiziert [RODIN *ET AL.* 1965, BÜCHI *ET AL.* 1973]. In Erdbeeren sind Furaneol[®]-Konzentration bis zu 11,7 ppm gefunden worden [LARSEN UND POLL 1992]. Aus überreifen Erdbeeren haben *Sanz et al.* sogar 21,68 mg/kg Erdbeeren isolieren können [SANZ, 1994].

Dieser Aromastoff verleiht der Erdbeere sein charakteristisches Aroma und gehört daher zu der Klasse der „character impact compounds“ [BALTES, 1995]. Inzwischen ist Furaneol[®] auch in anderen Früchten (Grapefruit, Mango), sowie in Tomaten nachgewiesen worden. Aus einem Kilogramm Tomaten können bis zu 2 mg Furaneol[®] isoliert werden [BUTTEREY, 1994].

Die Verbindung ist ein oxidations- und wärmeempfindlicher Feststoff (Smp. 78 - 80°C). Sein Aroma ist facettenreich und verändert sich von fruchtig in starker Verdünnung über karamelartig bis hin zu röstartig in höheren Konzentrationen. Seiner niedrigen Geruchsschwelle (nasal: 150 µg/Kg, retronasal: 30 µg/Kg Wasser) [BELITZ UND GROSCH, 1992] verdankt Furaneol[®] seine Verwendung in der Lebensmittelindustrie als Aromakomponente und Geschmacksverstärker für Backerzeugnisse.

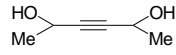
Synthetisches Furaneol[®] wird gegenwärtig in einem Maßstab von 40 bis 100 Jahrestonnen produziert und kostet ca. 200 DM/kg. „Natürliches Furaneol“ aus L-Rhamnose wird zur Zeit mit 2.000 DM/kg veranschlagt [pers. Mitteilung Fa. GREAT LAKES CHEMICAL, KONSTANZ].

³ Registry mark of the company Firmenich S.A., Ch.

2.3 Synthesewege und patentrechtliche Situation um Furaneol®

Verschiedene Darstellungswege zur Zielkomponente sind literaturbekannt. Durch Elektrohalogenierung eines geschützten Hexindiols erhalten *Inokuchi* [INOKUCHI ET AL. 1992] Furaneol in einer dreistufigen Reaktion mit 39%iger Ausbeute. Ausgehend von Weinsäure als natürliches Ausgangsmaterial schlagen *Briggs et al.* eine fünfstufige Synthese vor, die allerdings nur zu geringen Ausbeuten an Furaneol® führt [BRIGGS ET AL. 1985]. Weitere Beispiele sind in Tabelle 1 aufgeführt:

Tabelle 1: Mögliche Synthesewege (repräsentative Beispiele)

Ausgangskomponente	Reaktion
Zyklisierung von Hexadionsystemen: [BÜCHI, 1973]	
Hexan-3,4-dion	Bromierung zum 2,5-dibromid, Hydrolyse zu Furaneol /2 Stufen
Acetylen, z.B. 	Oxidation mit $\text{KClO}_3/\text{OsO}_4$, Aufarbeitung des polymeren Produktes
2,5-Dimethylfuran	Bromierung, Oxidation mit $\text{KClO}_3/\text{OsO}_4$ zum erythro-3,4-Dihydroxyhexan-2,5-dion, basische Aufarbeitung mit Na_2HPO_4 3 Stufen
Aus Kohlenhydraten:	
D-fructose-1,6-diphosphate (FDP)	Spaltung durch co-immobilisierte Aldolase/ Triosephosphat-isomerase (TPI) zum Dihydroxyacetonphosphat (DHAP); Zusatz von Lactaldehyd ergibt 6-Desoxyzuckerphosphat; saure Verseifung und Hydrolyse [WHITESIDES, 1983]
Hexosephosphat	Hydrogenolyse an Pd/C-Katalysator (1983)
Rhamnose	Piperidinacetat in heißem Ethanol [PEER, 1968]
Rhamnose	Hydrolyse in Gegenwart von Aminosäuren mit Aminofunktionen in der Seitenkette (z.B. Lysin, Prolin, Asparagin)
Beim Backprozeß	Reduktiver Abbau von Zuckerphosphaten, ein wichtiges Intermediat ist dabei FDP

Die wichtigsten, industriell interessanten Synthesen sind patentrechtlich geschützt, hauptsächlich durch die Schweizer Firma Firmenich. Ein frühes Verfahren geht von 2,5-Dimethoxy-2,5-dimethyl-dihydrofuran aus und liefert Ausbeuten um 50% [BÜCHI UND DEMOLE, 1973]. Die Reaktion bildet die Grundlage für die bis heute durch die Firma FIRMENICH industriell genutzte Synthese. Im Mittelpunkt steht dabei eine Gewinnung ausgehend von 3-Hexin-2,5-diol durch Ozonolyse nach Re *et al.* [RE ET AL., 1973]:

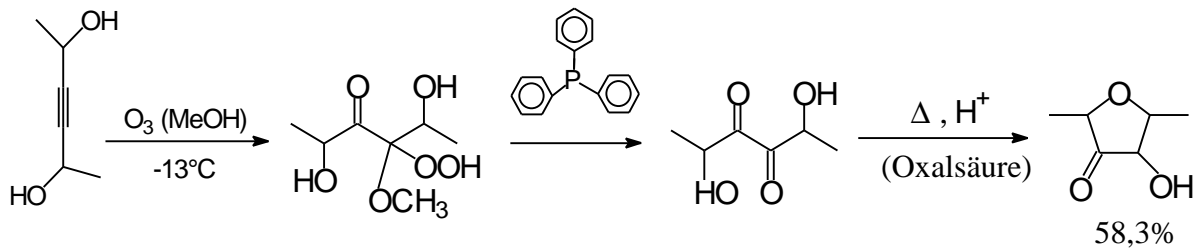


Abbildung 2-1: Synthetische Darstellung von Furaneol [RE ET AL. 1973]

Die Firma Unilever N. V. (Vlaardingen, Niederlande) hat ein europäisches Patent angemeldet, das die Synthese von 5-Methyl- und 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2,3-dihydrofuran-3-on aus Pentosen oder 6-Desoxyhexosen beschreibt. Dabei wird in Gegenwart von Aminosäuren, vornehmlich Lysin, Prolin und Hydroxyprolin, erhitzt und das Produkt direkt aus dem Reaktionsgemisch in Gegenwart von hochsiedenden organischen Lösungsmittel, wie Propylenglycol und Glycerol, unter reduziertem Druck abdestilliert [DECNOP ET AL.].

Bei der Darstellung von Furaneol[®] aus reduzierten Zuckern handelt es sich um eine zweifache Dehydratisierung von Wasser. Dabei wird folgender Mechanismus postuliert:

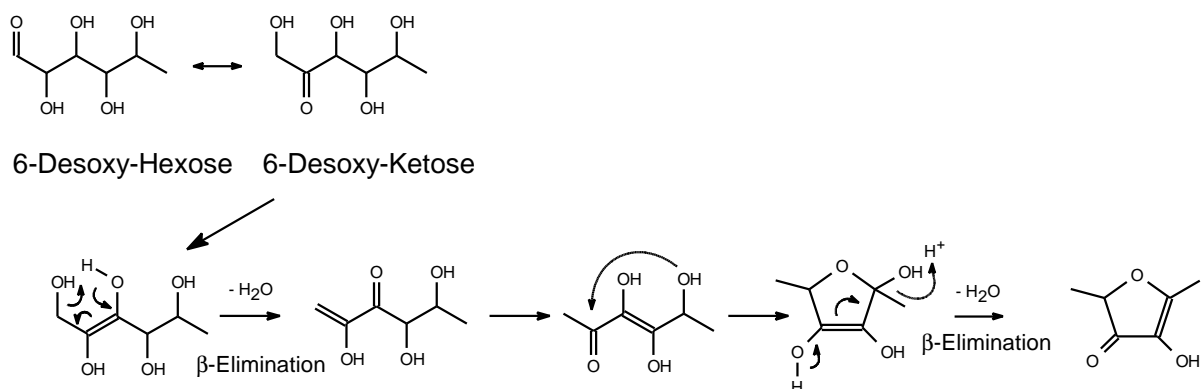


Abbildung 2-2: Mechanismus der Furaneol[®]-Bildung aus 6-Desoxyketosen

In Anwesenheit von stickstoffhaltigen Verbindungen wird diese Reaktion durch den funktionellen Stickstoff katalytisch beschleunigt:

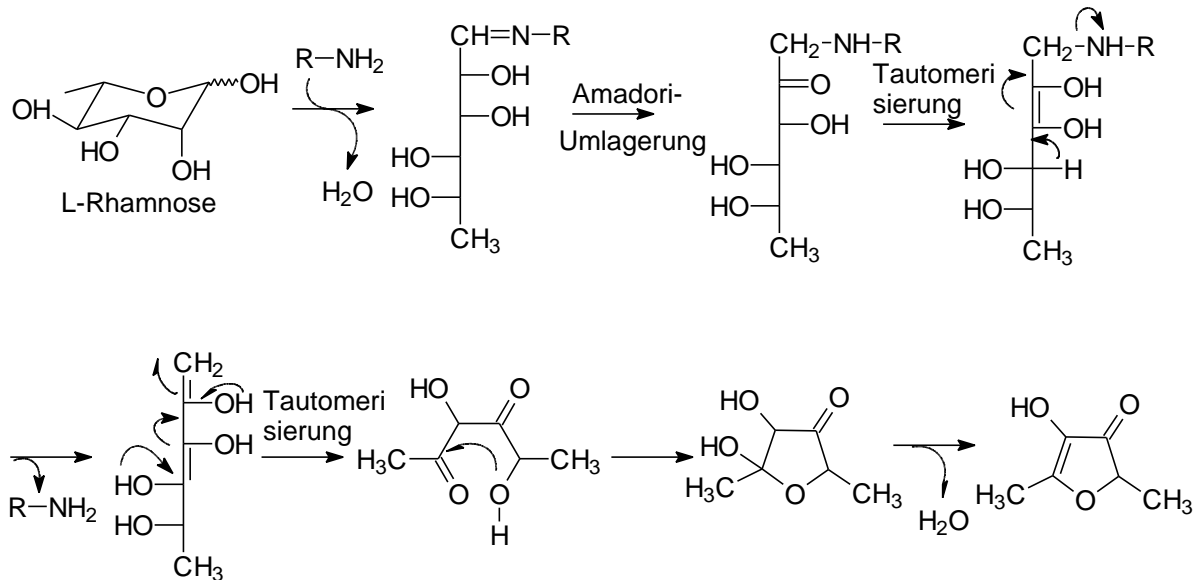


Abbildung 2-3: Bildung des Furaneol® bei der Maillard-Reaktion⁴

Durch seine Hitze- und Oxidationsempfindlichkeit und durch das breite Spektrum an störenden Nebenprodukten ist die Aufreinigung des gewünschten Produktes nur mit erheblichem Mehraufwand möglich. Die Isolierung gestaltet sich oft problematisch und ist sehr oft mit hohen Verlusten verbunden.

Eine klassische Methode zur Darstellung von Furaneol® aus Rhamnose in Gegenwart von Piperidinacetat wurde von Peer [PEER, 1968] vorgestellt. Die Ausbeuten bei dieser Reaktion sind hoch (60%). Jedoch erhält man zunächst ein Öl, das in einem weiteren Schritt über einen Ionenaustauscher von restlichen Enamin und Essigsäure befreit werden muß, um schließlich reines Furaneol® zu erhalten.

Ein gravierender Nachteil ist jedoch die Toxizität des Piperidins, was eine Verwendung des mit dieser Methode hergestellten Furaneols® in Lebensmitteln durch den Gesetzgeber verbietet.

⁴ H.-D. Belitz, W. Grosch „Lehrbuch der Lebensmittelchemie“ Springer Verlag, Berlin, 4.Auflage (1992), 318 ff.

3 Alternative Synthesen von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(H)-furanon (Furaneol)

Ziel dieser Arbeit ist durch Biotransformation eine Feinchemikalie wie Furaneol aus Überschußprodukten und agrarischem Abfall zu synthetisieren. Die Synthese steht unter dem Gesichtspunkt der Darstellung eines natürlichen Aromastoffes, da hier eine höhere Akzeptanz des Verbrauchers gegenüber dem Produkt besteht. Wie schon in der Einleitung erwähnt, gilt auf enzymatische Weise dargestelltes Furaneol lebensmittelrechtlich als „natürliche“ Verbindung und erzielt einen entsprechend höheren Preis, als die „naturidentische“, synthetische Komponente.

So wurde ein Verfahren zur enzymatischen Darstellung von Furaneol[®] vorgestellt, daß im Laufe dieses Projektes untersucht und zur Produktionsreife geführt werden sollte. Es wird nach Möglichkeiten gesucht, um chemosynthetische Wege mit biosynthetischen, stets unter dem Aspekt der natürlichen Synthese, zu kombinieren, um eine verbesserte Produktivität zu erlangen. Im Folgenden werden daher zuerst der Entwurf der Arbeit und dann die Stufen im einzelnen behandelt.

3.1 Darstellung von Furaneol[®] auf enzymatischen Wege

Der biotechnologischen Darstellung von Furaneol[®] liegt ein Reaktionsschema zugrunde, daß stark an die Glykolyse angelehnt ist. Der Prozeß besteht aus folgenden Verfahrensschritten:

- Spaltung und Isomerisierung von Fructose-1,6-bisphosphat durch Aldolase und Triosephosphatisomerase
- Knüpfung des Dihydroxyacetonphosphats mit Lactaldehyd
- Abspaltung der Phosphatgruppe mit Hilfe von saurer Phosphatase oder Kationenaustauscher
- Umsetzung zu Furaneol[®] durch *Maillard*-Reaktion

Die Aspekte der einzelnen enzymtechnologischen Verfahrensschritte wurden von Mackenstedt aufgeklärt und charakterisiert [MACKENSTEDT, 1996]. Es wurde gezeigt, daß die Synthese nach verfahrenstechnischen Gesichtspunkten möglich ist.

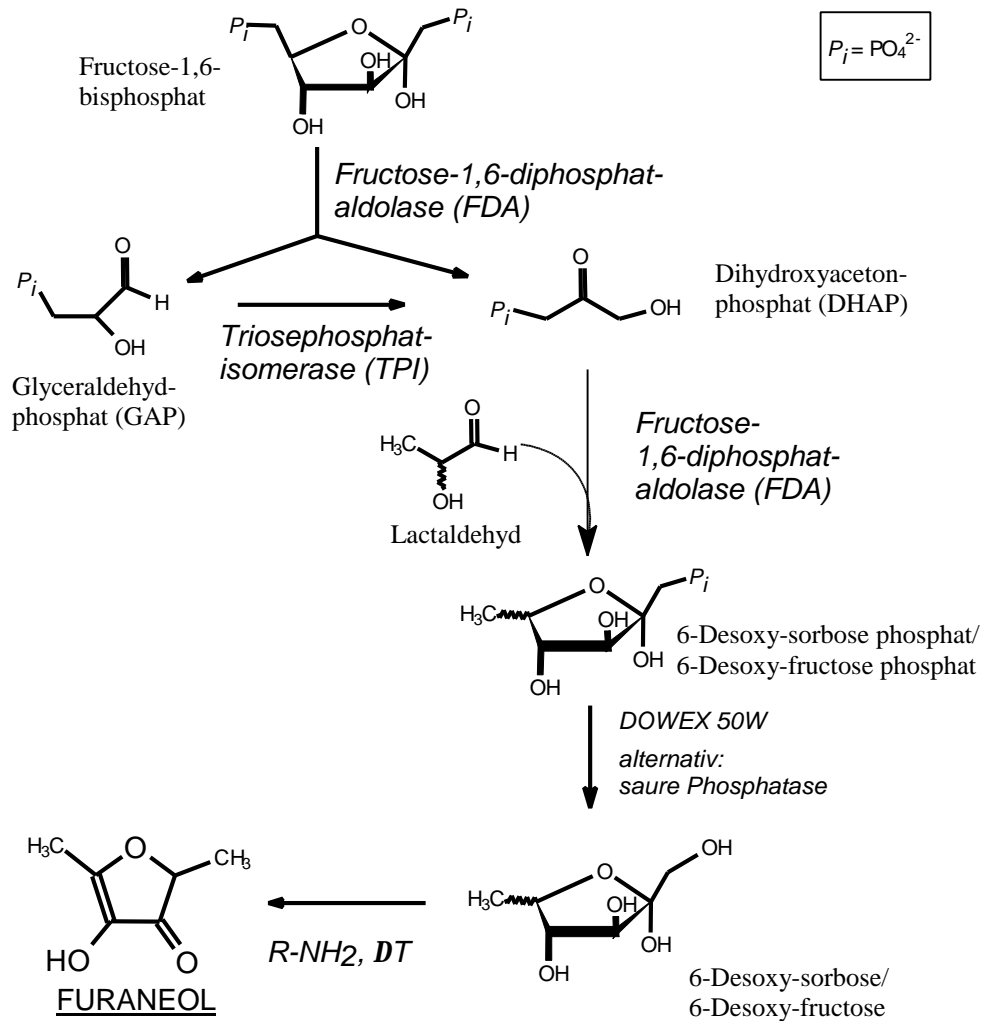


Abbildung 3-1: Enzymatische Furaneol[®]-Synthese in Anlehnung an Whitesides [WHITESIDES, 1983]

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wird die Kombination der einzelnen Prozeßschritte zu einem technischen Prozeß untersucht. Durch die Verknüpfung der einzelnen enzymatischen Schritte werden die Enzyme neuen Einflüssen ausgesetzt, die sich unter anderem auf die Langzeitstabilität, Gleichgewicht der Reaktion und auf den Umsatz zum gewünschten Produkt auswirken. Damit ergeben sich Änderungen in Bezug auf Wirtschaftlichkeit und den Ablauf eines möglichen Prozesses. Zum Verständnis wird zunächst auf die Arbeiten von Mackenstedt kurz eingegangen, um dann mit den daran anschließenden eigenen Arbeiten fortzufahren.

In den ersten Prozeßschritten spielt das Enzym Aldolase (**rabbit muscle aldolase**, RAMA) eine zentrale Rolle (siehe Abbildung 3-1). daß das Molekül Fructose-1,6-bisphosphat in die Bausteine Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) spaltet. Anschließend wandelt ein weiteres Enzym, die Triosephosphatisomerase das entstandene GAP in DHAP um. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt zu 96% auf der Seite des DHAP [Stryer, 1994]. In Experimenten und Berechnungen des Systems Aldolase/TPI wurde bewiesen, daß eine vollständige Umsetzung von Fructose-1,6-bisphosphat zu DHAP nicht möglich ist [MACKENSTEDT, 1996], da bei der Verknüpfung des Aldolase/TPI-Systems keine quantitative Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat erfolgt, wie aus den Berechnungen der DHAP-Gleichgewichtskonzentration mit den aus der Literatur bekannten Gleichgewichtskonstanten hervorgeht.

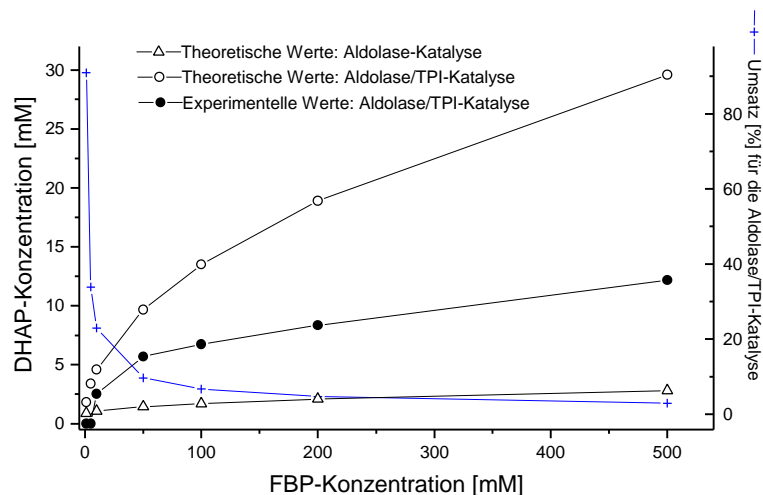


Abbildung 3-2: Berechnete und experimentell gewonnene DHAP-Konzentrationen durch Aldolase/TPI Katalyse [MACKENSTEDT, 1996]

Bei der Umsetzung einer 10 mM FBP-Lösung mit RAMA/TPI beträgt der Umsatz theoretisch nur 23 % und bei 200 mM FBP-Lösung nur 4,7 %. Die experimentell ermittelten DHAP-Konzentrationen bei RAMA/TPI katalysierter Spaltung liegen unterhalb der theoretisch berechneten Konzentrationen. Bei hohen FBP-Konzentrationen (ab 200 mM) dauert die Einstellung des Gleichgewichts bis zu 24 Stunden. In dieser Zeit zerfällt ein Teil des entstehenden DHAPs und es kommt zur Bildung von Nebenprodukten, die das Gleichgewicht beeinflussen.

3.1.1 Kombination der enzymatischen Reaktionsschritte

Aldolasen aus pflanzlichen und tierischen Quellen sind bereits gut charakterisiert [MORSE, 1968, FERNÁNDEZ-SOUSA, 1978, SWAIN, 1986, SYGUSCH, 1987].

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Aldolase aus *Staphylococcus Carnosus* verwendet, die von der Firma Boehringer Mannheim zur Verfügung gestellt wurde. Es handelt sich dabei um eine mikrobielle Aldolase des Typs I; sie benötigt im Gegensatz zu den meisten anderen mikrobiellen Aldolasen keine zweiwertigen Metallionen (im allgemeinen Zn^{2+}) für den Aktivitätserhalt [BROCKAMP, 1990]. Sie ist wesentlich robuster als die Aldolase aus Kaninchenmuskel (RAMA), da sie sehr hitzestabil ist und eine hohe Langzeitstabilität besitzt. Auch die Restaktivität nach einer Immobilisierung ist höher als bei RAMA.

Tabelle 2: E.C.-Nummern und Herkunft der verwendeten Enzyme

Enzyme	EC-No.	Herkunft
Fructose-1,6-Diphosphat-Aldolase	4.1.2.13	<i>Staphylococcus Carnosus</i>
Triosephosphatisomerase	5.3.1.1	Kaninchenmuskel
Saure Phosphatase	3.1.3.2	Kartoffel

Die Kopplung der Reaktion zur Darstellung von DHAP mit dem nächsten Syntheseschritt, der Synthese von Desoxyzuckerphosphat durch aldolasekatalysierte Aldolreaktion mit Lactaldehyd läßt sich im Eintopfverfahren durchführen. Die Enzyme werden dabei ständig der Einwirkung des Lactaldehyds ausgesetzt. Dies kann Auswirkung auf die Aktivität der Enzyme haben. Zunächst wird daher untersucht inwiefern der Zusatz von Lactaldehyd Einfluß auf die Langzeitaktivität der Enzyme nimmt.

3.1.1.1 Einfluß des Lactaldehyds auf die Langzeitaktivität der Aldolase aus *Staphylococcus Carnosus*

Monomerer Lactaldehyd ist eine niederviskose, grünliche Flüssigkeit mit starker Neigung zur Bildung von Halbacetalen, die spontan in ihre kristallinen Dimere übergehen. Diese lösen sich in Wasser nur langsam wieder auf. Der Aldehyd ist kommerziell nicht erhältlich. Wegen seiner Neigung zur Polymerisation erfolgt die Synthese zu Lactaldehyd zumeist über die Vorstufe des Dimethylacetals, das nach Bedarf über Ionenaustauscher hydrolysiert wird.

Für die Auslegung eines technischen Prozesses ist die Langzeitstabilität der Enzyme von Bedeutung. Zunächst wird untersucht, ob die Reaktionsfähigkeit des Lactaldehyds (Substrattoxizität) die in diesem Syntheseschritt verwendeten Enzyme desaktiviert. Dazu wird die Langzeitaktivität von Aldolase (*Staph. Carn.*) in Abhängigkeit von der Lactaldehydkonzentration untersucht. Mehrere Ansätze mit Aldolase werden in dem Puffer zur Aktivitätsbestimmung (siehe Anhang, Kap. 7.3.1) über einen längeren Zeitraum mit verschiedenen Lactaldehydkonzentrationen inkubiert. Die Lactaldehydkonzentrationen sind so gewählt, daß sie, entsprechend später folgenden Untersuchungen zum Einfluß des Lactaldehyds auf das Reaktionsgleichgewicht, zum zugesetzten Fructose-1,6-bisphosphat im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:3 vorliegen. Ebenfalls wird eine Blindprobe ohne Lactaldehyd den gleichen Bedingungen ausgesetzt.

Um jeglichen Einfluß des Lactaldehyds auf die Indikatorenzyme der Aktivitätsbestimmung ausschließen zu können, werden die Reste an Lactaldehyd nach entsprechender Inkubationszeit mittels Ultrazentrifugation entfernt. Die Abtrennung erfolgt mittels Centricon 10 Eppendorff-Hütchen, die über eine YM-Membran alle Teilchen über 10 KDa Molekulargewicht zurückhalten.

Man entnimmt hierzu jeweils 200 µL des Gemisches, zentrifugiert in den Centrion-Ultrazentrifugenhütchen und spült zweimal mit 100 µL TRIS-Lösung. Von den verbleibenden re-eluierten Enzymen wird dann die Aktivität in Doppelbestimmung ermittelt. Die Abbildung 3-3 illustriert die Stabilität der Aldolase (*Staph. carn.*) in Anwesenheit von Lactaldehyd.

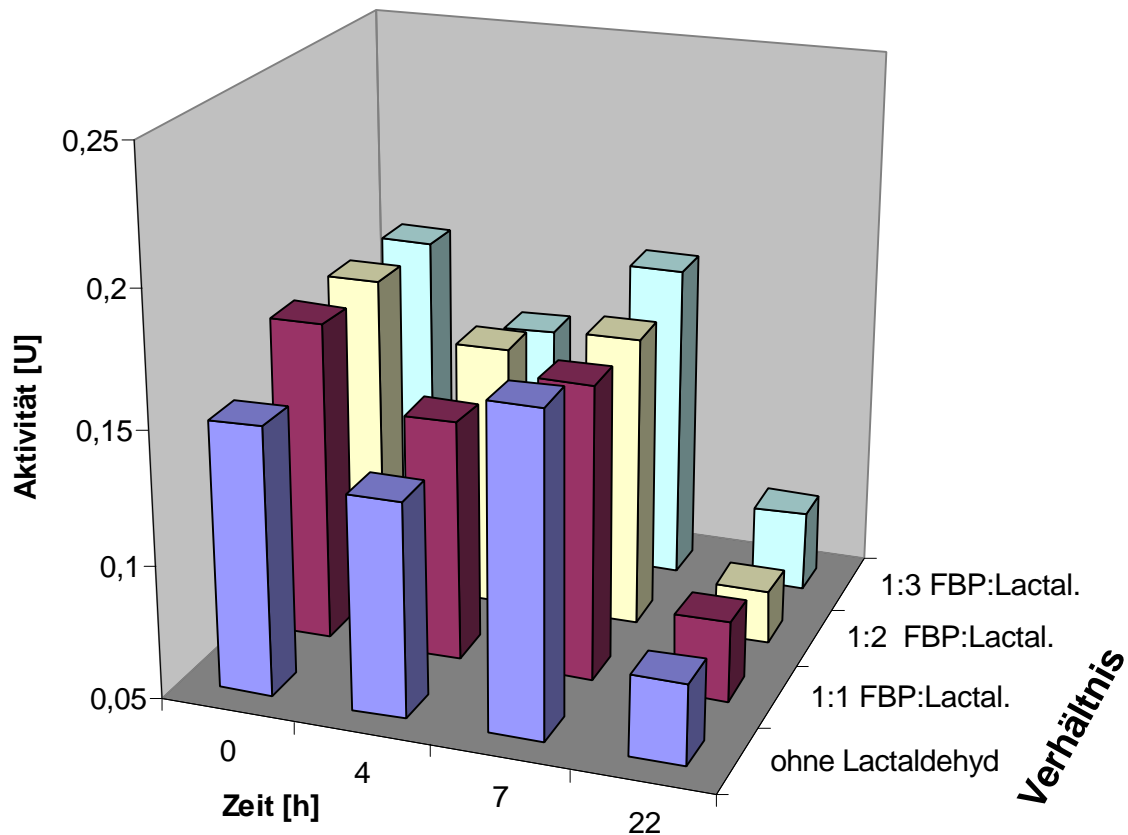


Abbildung 3-3: Aldolase-Aktivität (*Staph. Carn.*) in Anwesenheit von Lactaldehyd

Die geringen Schwankungen der Meßwerte entsprechen der Meßgenauigkeit der Methode. Innerhalb der ersten 7 Stunden ist die Aktivität der Aldolase von der Lactaldehydkonzentration unabhängig. Nach 22 Stunden läßt sich eine Aktivitätsabnahme von 50% feststellen. Da diese Abnahme unabhängig von der Lactaldehydkonzentration (vgl. Blindprobe) erfolgt, scheint die Desaktivierung auf anderen Effekten zu beruhen. Falls Lactaldehyd eine Desaktivierung der Aldolase verursacht, ist dieser Effekt eher untergeordnet und wird durch andere Effekte, die im Rahmen dieser Versuchsreihe nicht untersucht wurden, überlagert.

3.1.1.2 Einfluß des Lactaldehyds auf die Langzeitaktivität der Triosephosphatisomerase (TPI)

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität der Triosephosphatisomerase (TPI) wird ähnlich verfahren wie zuvor bei den Messungen mit Aldolase. Das Enzym wird bei verschiedenen Lactaldehydkonzentrationen inkubiert und die Aktivität nach Abtrennung des Lactaldehyds indirekt gemessen über die Aktivitätsbestimmung der Aldolase, da diese Methode etabliert ist. Dazu werden zu den Proben jeweils definierte Mengen an Aldolase und GDH zupipettiert und dann die Aldolaseaktivität bestimmt. Da Aktivität über eine von den Enzymen TPI und GDH abhängige Reaktionen detektiert wird, ist eine Schädigung der TPI über eine Aktivitätsabnahme leicht erkennbar. Zum Vergleich wird eine Blindprobe ohne Lactaldehyd mitgeführt und gemessen. Die folgende Graphik zeigt die Stabilität der Triosephosphatisomerase (TPI) in Anwesenheit von Lactaldehyd:

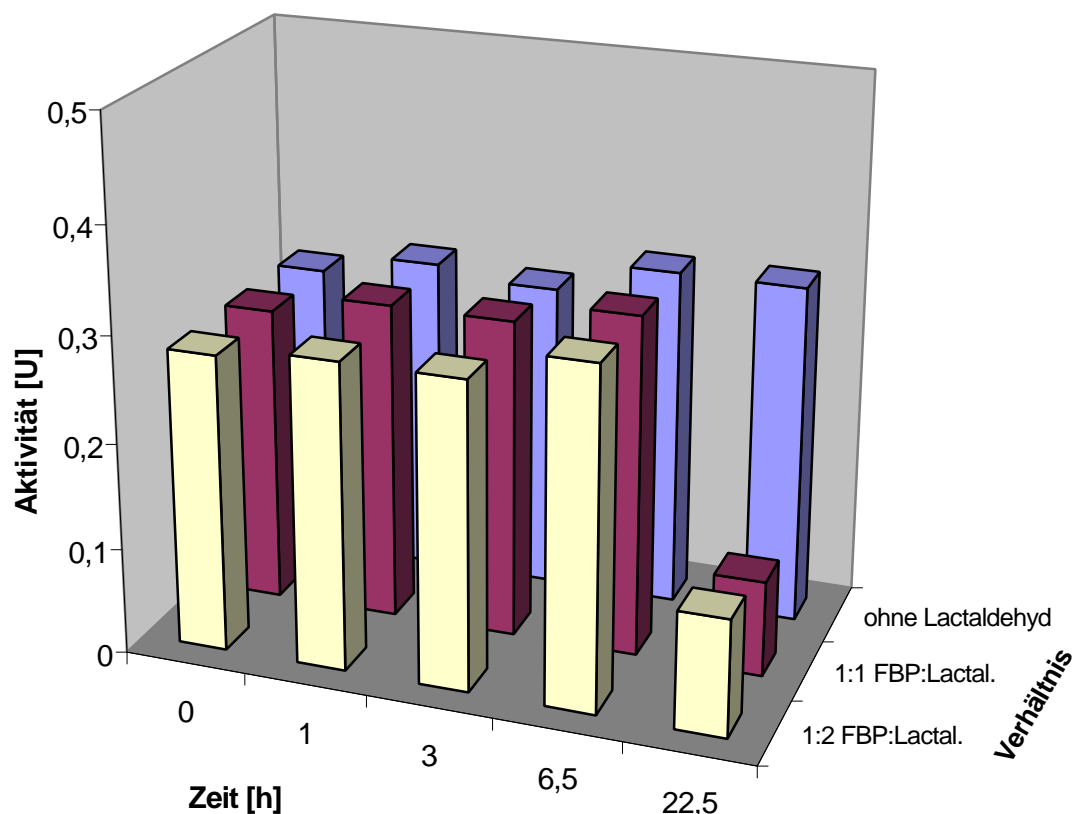


Abbildung 3-4: TPI-Aktivität in Anwesenheit von Lactaldehyd

Abbildung 3-4 zeigt eine gute Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse. Die Schwankungen innerhalb der Meßreihen liegen im Bereich der Meßgenauigkeit. Lactaldehyd hat im untersuchten Konzentrationsbereich innerhalb der ersten 6,5 Stunden keinen Einfluß auf das Enzym. Erst nach 22,5 Stunden ist eine deutliche Abnahme auf 25% der Anfangsaktivität festzustellen. Da die Blindprobe dieses Verhalten nicht zeigt, läßt dies den Schluß zu, daß Lactaldehyd bei TPI über diesem Zeitraum irreversible Schäden hervorruft.

Die Aktivität des Enzymsystems Aldolase/TPI wird durch den Zusatz von Lactaldehyd in den ersten 7h nicht signifikant beeinträchtigt. In einem Zeitraum von 22 Stunden werden keine auf Lactaldehyd zurückführbare Aktivitätsabnahmen bei der Aldolase festgestellt. Triosephosphatisomerase (TPI) zeigt im gleichen Zeitraum eine Desaktivierung von 75% durch Lactaldehyd. Da bei Umsetzungen zu den Desoxyzuckerphosphaten TPI aber in großem Überschuß zugesetzt wird, kann dieser Effekt vernachlässigt werden.

3.1.1.3 Untersuchung zur Darstellung der Desoxyzuckerphosphate durch Kombination der enzymatischen Syntheseschritte

Im Rahmen des Synthesekonzeptes zur Darstellung der Desoxyzuckerphosphate wird die Verbindung der einzelnen Prozeßschritte untersucht. Die Spaltung des FBP und die Verknüpfung des DHAP mit Lactaldehyd wird mit derselben Aldolase erreicht. Die Synthese der Desoxyzuckerphosphate findet daher im Eintopfverfahren statt. Die Überwachung des Verlaufs der Reaktion wird mittels HPLC-Analyse auf Basis der Ionenpaar-Chromatographie (siehe Anhang, Kap 7.2.4) vorgenommen.

Zur Darstellung der Desoxyzuckerphosphate wird als Reaktionsansatz FBP-Lösung (pH 7,4) mit frisch hergestelltem Lactaldehyd⁵ verwendet. Das entstehende DHAP wird in einem weiteren Schritt in einer ebenfalls aldolase-katalysierten Reaktion mit Lactaldehyd zu 6-Desoxyzuckerphosphat umgesetzt (siehe Abbildung 3-1). Aufgrund der verzögerten Bildung („lag-Phase“) läßt sich die Reaktion nur im Batchverfahren praktikabel durchführen. Um einen Vergleich mit den in Abbildung 3-2 gezeigten Ergebnissen zu gestatten, werden die Enzyme nativ eingesetzt. Der zeitliche Verlauf wird über die Bildungsrate des Intermediates DHAP verfolgt. Anhand seiner Konzentrationsänderung wird Aufschluß über den Fortgang der Reaktion erhalten.

⁵ Durch Entschützen von Lactaldehyddimethylacetal in wäßriger Lösung

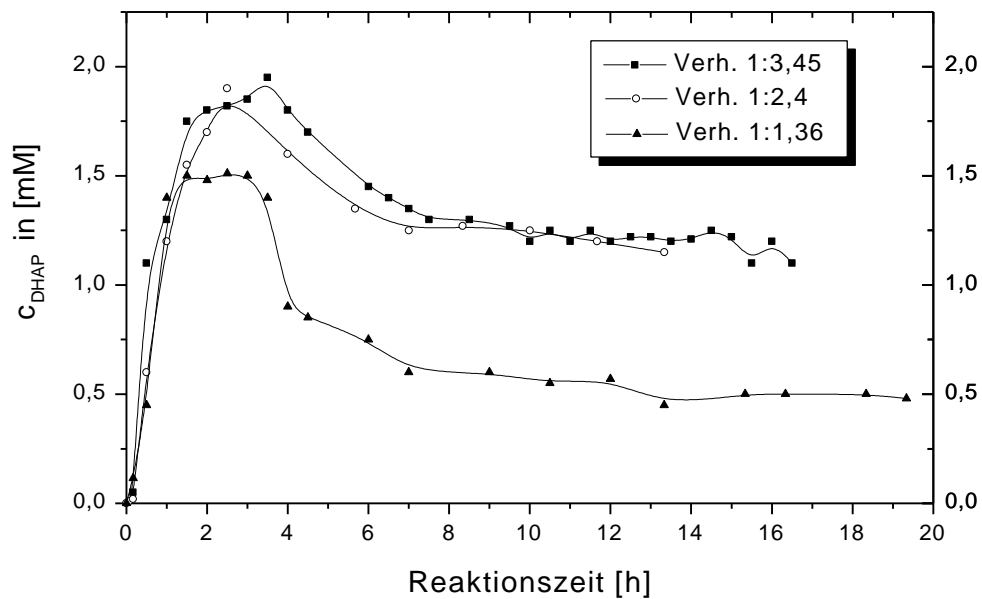


Abbildung 3-5: DHAP-Konzentration/Zeit-Diagramm in Abhängigkeit vom Verhältnis der Lactaldehyd-konzentration zur FBP-Konzentration, 90 mM FBP, pH 7,4, 90 U Aldolase nativ, 230 U TPI nativ, 25°C

Wie aus Abbildung 3-5 ersichtlich durchläuft die DHAP-Konzentration ein Maximum. Dieses beträgt bei einem Verhältnis von 1:1,36 (FBP:Lactaldehyd) 1,5 mM, entsprechend 2,5% bezogen auf die Aldolase/TPI-Katalyse. Erwartet werden 6mM (siehe Abbildung 3-2). Dieses läßt auf eine Gleichgewichtsverschiebung aufgrund der Reaktion mit Lactaldehyd schließen. Zu Beginn der Reaktion wird hauptsächlich nur die Bildung des DHAP katalysiert. Die Reaktion des gebildeten DHAP mit dem Lactaldehyd in einer Aldolase katalysierten Reaktion zum gewünschten Produkt ist zu Anfang gering. Daher akkumuliert zunächst das DHAP. Ab einer Schwellenkonzentration gewinnt die Aldolase katalysierte Reaktion mit Lactaldehyd an Bedeutung. Da das gleiche Enzym nun zum Teil mit dem zweiten Reaktionsschritt beschäftigt ist, wird DHAP schneller verbraucht, als es nachgeliefert wird. Es stellt sich schließlich ein Gleichgewicht ein, in dem die DHAP-Konzentration eine Funktion der beiden Reaktionsschritte ist.

Durch Erhöhung des Verhältnisses FBP zu Lactaldehyd auf 1:2,4 wird das Maximum um 25% auf 1,9 mM erhöht. Man erhält einen Umsatz von 3,3% bezogen auf die Aldolase/TPI-Katalyse. Damit wird maximal nur ein Drittel der Konzentration einer Reaktion zur ausschließlichen Darstellung von DHAP erreicht (Abbildung 3-2). Die Konzentration fällt dann im Laufe der Reaktion auf etwa 1,2 mM.

Die Konzentration wird durch eine Erhöhung des Verhältnisses FBP zu Lactaldehyd nicht mehr erhöht. Bei einem Verhältnis von 1:3,45 wird ein entsprechender Verlauf erhalten. Das

Gleichgewicht läßt sich durch weitere Zugabe an Lactaldehyd nicht weiter in Richtung Produkte verschieben. Um die Produktbildung zu steigern, muß die Abtrennung der Produkte vorgenommen werden.

Einen säulenchromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches und die Identifikation der erhaltenen Produkte wurde bereits von *Mackenstedt* vorgenommen. [MACKENSTEDT, 1996].

Für den Einsatz in einem technischen Prozeß stellt die säulenchromatographische Auftrennung eine erhebliche Mehrbelastung an Ressourcen und Zeit dar. Ebenfalls eignet sich diese Methode nur in Ausnahmefällen als Zwischenschritt in einem semikontinuierlichen Prozeß. Es muß daher nach anderen Möglichkeiten der Aufreinigung gesucht werden.

Die Isolierung der Produkte gestaltete sich als sehr schwierig. Versuche zur Trennung des Reaktionsgemisches mit Hilfe von Anionenaustauscher führen zu keinem Erfolg. Ebenfalls kann die Isolierung der Desoxyzuckerphosphate durch „Herausschneiden“ der Produktfraktion während einer präparativen HPLC nicht erfolgen, da der Eluent Phosphat- und Sulfatsalze enthält. Diese können nicht selektiv von den Desoxyzuckerphosphaten entfernt werden.

Die Desoxyzuckerphosphate lassen sich als Bariumsalz fällen. Der Rückstand enthält jedoch noch Verunreinigungen. Eine vollständige Charakterisierung mit spektroskopischen Methoden ist deshalb nicht möglich. Diese Fällungsmethode hat weiterhin den Nachteil, daß die Bariumsalze der Desoxyzuckerphosphate, die im nächsten Reaktionsschritt benötigt werden, im Anschluß nur schwer wieder in Lösung gehen.

3.1.1.4 Darstellung der Desoxyzucker

Die folgende Abspaltung der Phosphatgruppe muß getrennt von den vorherigen Reaktionsschritten durchgeführt werden, da durch geringe die Selektivität der Phosphatase, bzw. durch den Kationenaustauscher alle Phosphatgruppen, auch die des Edukts, gleichermaßen abgespalten werden würden. Außerdem wäre ein Umpuffern nötig, da diese Reaktion bei einem niedrigen pH-Wert durchgeführt wird.

Die aus den vorangegangenen Experimente erhaltenen Produkte werden mit saurer Phosphatase in 45 mM Citratpuffer pH 4,9 enzymkatalytisch gespalten. Die Messung des Umsatzes gestaltet sich aufgrund der Verunreinigung aus dem Ausgangsprodukt als äußerst schwierig. Die Entstehung des Produktes kann mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (siehe Anhang) verfolgt werden.

Wie im vorangegangenen Schritt, erweist sich auch hier die Aufreinigung mit technisch vertretbarem Aufwand als nicht realisierbar, was wahrscheinlich auf die Verunreinigungen im Ausgangsmaterial zurückgeführt werden kann.

Zur Untersuchung des nächsten Reaktionsschrittes ist jedoch unerlässlich, über reines Edukt zu verfügen. Das erhaltenen Rohprodukt müßte dazu einer aufwendigen und langwierigen Aufreinigung unterzogen werden, in der hohe Verluste zu erwarten sind.

Es ist ebenfalls für die Charakterisierung des letzten Syntheseschrittes wichtig Edukt in ausreichenden Mengen vorrätig zu haben. Diese gegenläufigen Aspekte und im Bezug auf die Kombination der einzelnen Syntheseschritte zum Gesamtprozeß erscheint diese Vorgehensweise als unökonomisch.

3.1.1.5 Zusammenfassung und Beurteilung der Wirtschaftlichkeit

Die Kombination der Prozessschritte zur Darstellung der Desoxyzucker stellt ein komplexes enzymatisches System dar. Die Produktoptimierung erfordert eine aufwendige, kostenintensive Kontrolle verschiedener Prozessparameter.

Die Darstellung der Desoxyzuckerphosphate wird durch die Kombination der einzelnen Syntheseschritte erreicht. Die Durchführbarkeit der Darstellung im Batchverfahren schränkt dabei die Möglichkeiten der Optimierung ein. Die Ausbeute an gewünschtem Produkt ist daher durch die Einstellung des Gleichgewichtes limitiert. Eventuelle Aufreinigungsschritte innerhalb des Prozesses bedeuten erheblichen Mehraufwand und Kosten und sind daher unerwünscht.

Weiterhin sind die Anschaffungskosten und der Aktivitätserhalt der Enzyme zu berücksichtigen, um die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses abzuwägen.

Zur besseren Visualisierung sollen alle bis jetzt diskutierten Syntheseschritte einer Kalkulation unterzogen werden, also die Kosten auf der Basis des Anschaffungspreises der Substrate und der Katalysatoren bis zur Furaneol[®]-Vorstufe Rhamnose.

Tabelle 3: Kostenkalkulation zur Herstellung 1 mol Rhamnose (nur Chemikalienpreise)

Chemikalien	Netto	Mwst.	Brutto	
1,6-FBP ⁶⁾	383 DM	61,25 DM	444,25 DM	
Lactaldehyd	115 DM	17,5 DM	132,5 DM ⁷⁾	576,75 DM

Tabelle 4: Kostenkalkulation zur Herstellung 1 mol Rhamnose, Enzympreise

Enzyme	Netto	Mwst.	Brutto	
Aldolase ⁸⁾	4400 DM	704 DM	5104 DM	
TPI ³⁾	126,6 DM	20,25 DM	146,85 DM	
Phosphatase ⁹⁾	3882 DM	621,1 DM	4503,1 DM	9754 DM
				10907,5 DM

⁶⁾ Monocalcium Salt, Practical Grade 70-80%, Preis für 0,5 mol

⁷⁾ mündliche Mitteilung, Mackenstedt, 1997

⁸⁾ 50000 U

⁹⁾ 20000 U

Die Preise für die Substrate beziehen sich auf die Darstellung von 1mol (164g) Rhamnose. Es wird zur besseren Kalkulation von idealen Verhältnissen ausgegangen, d.h. 100% Umsatz und keine Verluste durch Aufarbeitung u.ä.. Auch die Kosten für Puffer, Immobilisierungsmaterialien und andere Verbrauchsmaterialien werden vernachlässigt. Aufgrund dieser idealisierten Verhältnisse muß für den realen Prozeß von Mehrkosten in gleicher Höhe ausgegangen werden.

Weitaus höher sind jedoch die Kosten für die Enzyme. Dabei ist zu bedenken, daß es sich nicht um reine Investitionskosten handelt, da aufgrund der Inaktivierung der Enzyme im Verlaufe des Einsatzes im Prozeß ständig neuer Katalysator zugeführt werden muß. Dabei werden die Enzymmengen für einen eher bescheidenen Prozeß ausgelegt. So entspricht 50000U Triosephosphatisomerase lediglich 10mg. Für den Prozeß werden lediglich 20000U Phosphatase veranschlagt. Dabei werden die höheren Anschaffungskosten einerseits, aber auch die höhere Langzeitstabilität der Phosphatase berücksichtigt.

1994 betrug der Markpreis für „natürliches“ Furaneol[®] 2000 DM/kg. Demgegenüber stehen Kosten von 3516,76 DM/kg allein in Bezug auf Substrate bis zur Darstellung von Rhamnose, der Vorstufe von Furaneol[®]. Der letzte Syntheseschritt wird bewußt nicht berücksichtigt, da hierauf im nächsten Kapitel näher eingegangen werden soll.

Bei den in der Kalkulation verwendeten Preisen handelt es sich um Katalogpreise (1997). Die in der Industrie üblichen Handelspreise für große Mengen betragen vielleicht ein zehntel dessen. Dennoch verdeutlicht diese Auflistung, daß der Prozeß auf dieser Basis nicht wirtschaftlich geführt werden kann. L-Rhamnose kostete 1994 300 DM/Kg.

Hoechst / Südzucker bietet zur Zeit Rhamnose, hergestellt in einem fermentativen Prozeß, in großen Mengen für 80 DM/Kg an. Aufgrund der Definition in Kapitel 2 kann diese preisgünstige Rhamnose als natürliches Substrat genutzt werden und soll im weiteren als Ausgangsverbindung für den letzten Syntheseschritt dienen.

3.2 Darstellung von Furaneol[®] aus 6-Desoxy-L-mannose (Rhamnose)

In den folgenden Kapiteln wird die Furaneol[®]-Darstellung aus Rhamnose untersucht und optimiert. Besonderes Augenmerk gilt ebenfalls der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches. Grundlage für die Darstellung bildet die *Maillard*-Reaktion. Sie soll daher kurz erläutert werden.

3.2.1 Die *Maillard*-Reaktion

Die in den nächsten Kapiteln beschriebene Reaktion gehört zum Typ der *Maillard*-Reaktion, auch „nichtenzymatische Bräunung“ genannt. Sie wird in der Lebensmittelchemie häufig mit der Zerstörung von essentiellen Aminosäuren in Lebensmitteln in Verbindung gebracht. Unter bestimmten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart reduzierender Zucker treten z.B. Lysinverluste auf, die zur Verminderung der biologischen Wertigkeit von Protein führen. An anderer Stelle ist diese Reaktion jedoch durchaus erwünscht, da die *Maillard*-Produkte zur Aromenbildung beitragen [BELITZ, GROSCH, 1992].

Chemisch gesehen handelt es sich bei der *Maillard*-Reaktion um die Reaktion von Zuckern in Anwesenheit von stickstoffhaltigen Verbindungen. In Lebensmitteln läuft dies in einem pH-Bereich von ca. 4 – 8 ab. Hohe Temperaturen sind zuträglich, jedoch nicht zwingend notwendig. Die dabei möglichen entstehenden Verbindungen werden in ihrer Komplexität kaum von einem anderen Reaktionstyp überboten. Dies spiegelt auch die immense Anzahl von über 10000 Veröffentlichungen seit der Entdeckung im Jahre 1912 wieder. Die meisten dieser Veröffentlichungen beschäftigen sich mit der Analyse und Identifikation der unter *Maillard*-Bedingungen gebildeten Verbindungen und/oder deren Zersetzungsprodukten [SHU, 1985] in Naturprodukten [PONS, 1991, GROSCH 1996], weniger mit den Bedingungen und der möglichen gezielten Beeinflussung der Reaktion.

Bei den Reaktanten sind vorwiegend die Kohlenhydrate Glucose, Maltose, Lactose, sowie reduzierende Pentosen zu nennen. Auf der Seite der Aminokomponente haben laut Literatur primäre Amine aufgrund des höheren Vorkommens größere Bedeutung als sekundäre Amine [BELITZ, GROSCH, 1992].

Aufgrund der bei der *Maillard*-Reaktion entstehenden N-haltigen Zwischenverbindungen, die mit der Stickstofffunktion den Katalysator im Molekül tragen, verlaufen diese Reaktion unter gegebenen Bedingungen mit hoher Geschwindigkeit ab.

Die dabei entstehenden Verbindungen lassen sich grob in folgende Klassen einteilen [BELITZ UND GROSCH, 1992]:

- **Braune Pigmente**, sogenannte *Melanoidine*. Es handelt sich um Kondensationsprodukte, die Stickstoff in variierenden Mengen enthalten und unterschiedliche Molekulargewichte und Polarität besitzen. Sie sind überall dort erwünscht, wo eine Eigenfärbung des Produktes (z.B. braune Brotkrume) erwartet wird. Sie sind nicht erwünscht bei Lebensmitteln, die eine schwache oder andere Eigenfarbe besitzen (z.B. Kondensmilch).
- **Flüchtige, vielfach aromawirksame Verbindungen**. Sie tragen zur Aromabildung bei und sind z.B. bei Koch-, Back-, und Bratprozessen in der Regel erwünscht. Sie sind aber auch verantwortlich für die Entstehung von Fehlparmen z.B. bei der Lagerung von Lebensmitteln.
- **Geschmacksstoffe**, insbesondere Bitterstoffen, die zum Teil erwünscht sind (Kaffee), aber auch einen Fehlgeschmack verursachen können.
- Verbindungen mit stark reduzierenden Eigenschaften (**Reduktone**), die zur Stabilisierung von Lebensmitteln gegen oxidativen Verderb beitragen können.

Im folgenden soll kurz das Anfangsstadium der *Maillard*-Reaktion erläutert werden, da hierauf im Verlauf der Arbeit noch einmal zurückgegriffen wird.

Als erster Schritt wird die Bildung von N-Glykosiden durch Addition von Aminoverbindung an Monosaccharide unter Wasserabspaltung angesehen.

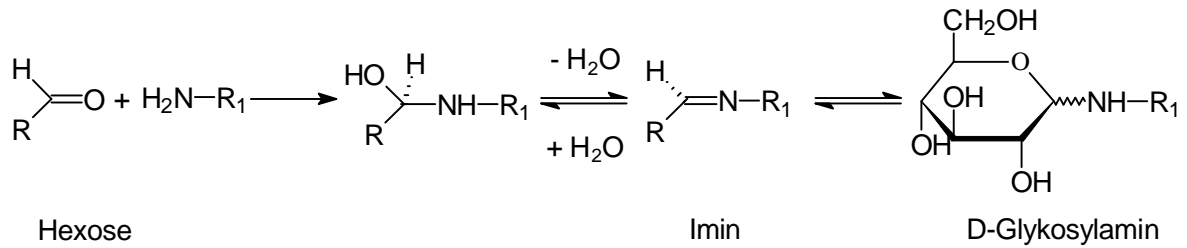


Abbildung 3-6: Bildung des N-Glukosylamins aus Monosaccharid und Aminosäure [BELITZ, GROSCH, 1992].

Die aus Aldosen primär entstehenden Aldosylamine werden zu 1-Amino-1-desoxyketosen umgelagert (*Amadori-Umlagerung*).

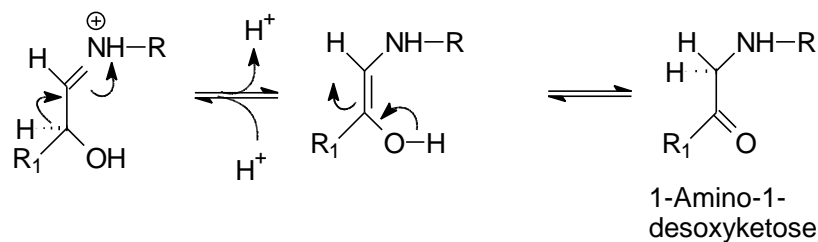


Abbildung 3-7: *Amadori-Umlagerung* [BELITZ, GROSCH, 1992].

Entsprechend können aus Ketosylaminen je zwei Isomere 2-Amino-desoxyaldosen entstehen (*Heyns-Umlagerung*).

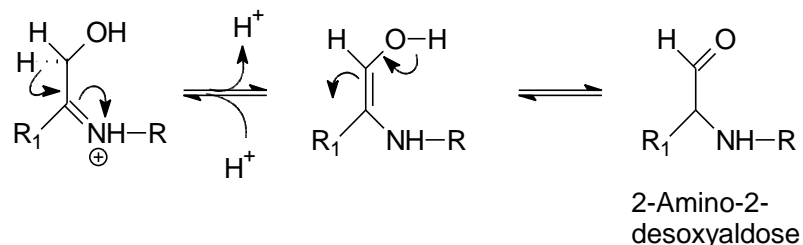


Abbildung 3-8: *Heyns-Umlagerungs* [BELITZ, GROSCH, 1992].

Glykosylamine und *Amadori*-, sowie *Heyns*-Produkte sind nur Zwischenverbindungen im Ablauf der *Maillard*-Reaktion. Es entstehen sogenannte Desoxyosone (1-,3- und 4-Desoxydicarbonylverbindungen), die als α -Dicarbonylverbindungen viele Folgeprodukte liefern. Dabei können sie in stickstofffreier und in stickstoffhaltiger Form weiterreagieren. Aus dem weiten Spektrum der möglichen Folgeprodukte sind erst wenige charakterisiert worden. Jedoch weiß man, daß die Konzentration der *Amadori*-, und *Heyns*-Produkte, ebenso wie die der Desoxyosone, in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen variieren und sich damit das Produktspektrum in Bezug auf Farbe, Geschmack und Geruch beeinflussen läßt.

3.2.1.1 *Furaneol*[®]-Darstellung mit Hilfe von Trägermaterialien mit Aminofunktionen

Es wird untersucht, ob Trägermaterialien, die zur Enzymimmobilisierung, als Ionenaustauscher oder als Chromatographiematerial dienen, bei der Synthese von Furaneol[®] eingesetzt werden können. Der Einsatz von heterogenen Katalysatoren ist sicherlich von Vorteil in Hinblick auf eine einfache Produktisolierung. Gemäß den Anforderungen der *Maillard*-Reaktion (Kap. 3.2.1), werden nur Materialien berücksichtigt, die primäre und sekundäre Aminofunktion tragen. Folgende Materialien standen zur Verfügung: Deloxan, Diaion WA30, Diaion MWA-1, Siran und Basocoll. Obwohl es sich bei Basocoll nicht um ein typisches Trägermaterial handelt, soll es in diesem Kapitel mit behandelt werden. Im folgenden sind die Materialien näher beschrieben:

- **Deloxan:** Ein in Form abriebfester Mikroglasskugeln vorliegendes, modifiziertes Polysiloxan, welches zur Enzymimmobilisierung eingesetzt wird. Dabei wird das Enzym kovalent über Ethylendiaminogruppen an das Trägermaterial gebunden. Das Trägermaterial wird mit einem Wassergehalt von 80% geliefert. Es ist sowohl in wäßrigen als auch in organischen Lösungsmitteln verwendbar. Deloxan kann in einem pH-Bereich von 0-12 eingesetzt werden.
- **Diaion WA30:** Ein schwach basisches Ionenaustauschermaterial auf der Basis von Polystyrol mit primären Alkylaminogruppen. Die maximale Temperatur während des Betriebes ist vom Hersteller mit 100°C angegeben. Diaion WA30 kann in einem pH-Bereich von 0-9 eingesetzt werden. Industriell wird es zur Entfärbung von Sirup und als Katalysator eingesetzt.
- **Diaion MWA-1:** Ein schwach basischer Ionenaustauscher mit Polyaminen als funktionelle Gruppen. Die maximale Betriebstemperatur ist vom Hersteller mit 100°C angegeben. Diaion MWA-1 kann in einem pH-Bereich von 0-7 eingesetzt werden. Es wird industriell zur „Entaschung“ von Zucker eingesetzt.
- **Siran:** Ein relativ neues Trägermaterial auf der Basis von aminierten Polysacchariden. Vom Hersteller wurden keine weiteren Angaben gemacht.
- **Basocoll:** Diese Verbindung als Vertreter der Polyaminpolymere wird in der Papierindustrie als Bindematerial eingesetzt. Es ist eine leicht gelbliche Flüssigkeit, gut löslich in Wasser; in organischen Lösungsmittel, wie z.B. Ethanol, aggregiert dieser Stoff und fällt als Niederschlag in Form von gelartigen Klumpen aus.

Zur Synthese werden die Materialien sowohl in Batch- als auch in kontinuierlichen Prozessen eingesetzt. Basocoll ist als Flüssigkeit hier eine Ausnahme und wird nur im Batchprozeß untersucht. Dazu wurde die Flüssigkeit einer Lösung aus Edukt in Puffer hinzugefügt entsprechend den Mengenverhältnissen bei den anderen Versuchen zur heterogenen Katalyse. Ebenfalls wird die Wiederverwendbarkeit der Materialien untersucht. Im kontinuierlichen Prozeß wird das jeweilige Material in präparative HPLC-Säulen gefüllt, die mit Hilfe eines Säulenofens auf die entsprechende Betriebstemperatur gebracht werden. Bei der Reaktionstemperatur muß auf die maximale Betriebstemperatur des jeweiligen Materials Rücksicht genommen werden. Sie wurde so hoch wie möglich gewählt, lag jedoch immer 5-10°C unter der maximalen Betriebstemperatur. Die Reaktion wird durch Messung mit einem UV-VIS Spektrophotometer bei 270 nm überwacht.

Lediglich in den Batchprozessen wird die Darstellung von Furaneol[®] mit Hilfe der Trägermaterialien beobachtet. Als Ergebnisse der Versuche erreicht man insgesamt nur niedrige Ausbeuten an Furaneol[®]. Die Lösungen sind vor Gebrauch zu entgasen, da sonst durch die Bildung von Gasblasen an der Oberfläche des Trägermaterials bei höheren Reaktionstemperaturen nicht sichergestellt werden kann, ob das Edukt in Kontakt mit dem Material treten kann. Schon während des Prozesses ergeben sich Schwierigkeiten aufgrund von Nebenreaktionen auf der Oberfläche des Materials. Alle Trägermaterialien sind nach dem Prozeß braun gefärbt und können nicht regeneriert werden, da die Oberfläche des Materials durch Polymerisation irreversibel inaktiviert wird.

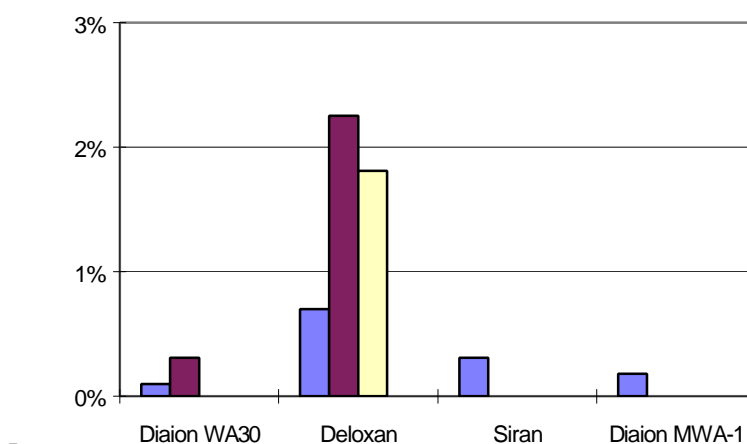


Abbildung 3-9: Heterogene Katalyse in der Furaneol[®]-Synthese,

Das Experiment mit Basocoll als Katalysator zeigt ein deutlich anderes Verhalten. Die Reaktionslösung weist einen deutlichen Geruch nach Furaneol auf. Zur Aufarbeitung wird Basocoll mit Hilfe von Methanol gefällt. Basocoll fällt als gelartiger Klumpen aus und wird abzentrifugiert. Sensorische und HPLC-analytische Untersuchungen detektieren danach im Zentrifugat kein Furaneol[®], so daß zu vermuten ist, daß das Furaneol[®] durch die Fällung adsorbtiv oder durch Einschluß mitgerissen wird. Dieses würde einen erheblichen Mehraufwand bei der Aufarbeitung erfordern.

Die Temperaturbeständigkeit der Diaione scheint unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht ausreichend. Schon unterhalb der maximalen Betriebstemperatur ist ein deutlicher Geruch nach Ammoniak festzustellen, was sich als eine Zersetzung durch Rücksubstitution der funktionellen Gruppen deuten läßt. Da die Furaneol[®]-Synthese bei Temperaturen oberhalb 80°C stattfindet, sind basische Ionenaustauscher, sofern sie nicht eine maximale Betriebstemperatur von min. 150°C haben, nicht für diesen Prozeß geeignet.

Beste Ergebnisse (2,25% Ausbeute, 2. Versuch) wurden erreicht mit dem Trägermaterial Deloxan (Abbildung 3-9). Nach drei Versuchen ist auch dieses Material verbraucht. Die Braunfärbung weist auf eine Schicht aus Melanoidinen an der Oberfläche hin.

Obwohl heterogene Katalyse den Vorteil einer einfacheren Aufarbeitung hat, ist in diesem Prozeß aufgrund der niedrigen Ausbeuten an Furaneol[®] der Einsatz von Trägermaterialien nicht ökonomisch. Durch die Vergiftung des Katalysators während des Prozesses muß zudem ständig neues Trägermaterial hinzugefügt werden, um gleichbleibende Ausbeuten zu gewährleisten. Ständige Erneuerung des Katalysators führt zu erheblichen Mehrkosten und macht ein Verfahren auf der Basis dieser Trägermaterialien unwirtschaftlich.

3.2.1.2 Darstellung von Furaneol[®] mit Hilfe von Aminosäuren

Zur natürlichen Darstellung von Furaneol[®] wurden Aminosäuren verwendet, die Stickstofffunktionen (prim., sek. Amine, Amide etc.) in den Seitenketten tragen. Zusätzlich werden biogene Stoffe untersucht, die ebenfalls Stickstoff in einer der erwähnten Formen tragen und somit in der *Maillard*-Reaktion als Aminokomponente fungieren können. Die ausgewählten Verbindungen finden sich in Tabelle 5.

Vorversuche haben gezeigt, daß ein Überschuß an Katalysator nötig ist, um entsprechend signifikante Ausbeuten an Furaneol[®] zu erhalten. Die Untersuchungen wurden in Natriumphosphatpuffer, 0,1M, pH 7, dem Reaktionsmedium aus den vorhergehenden Schritten, durchgeführt. Die Aminosäuren werden zuerst ins Reaktionsmedium eingetragen und ab einer Reaktionstemperatur von 70°C wird Rhamnose hinzugefügt.

Analysiert wurde mittels HPLC. Die Bedingungen während der Analyse entsprechen denen der verwendeten Anlage aus Kapitel 3.1. Diese HPLC-Analytik wird auf die erhöhten Anforderungen, die sich aus dem komplexen Reaktionsgemisch nach der *Maillard*-Reaktion ergeben, vorbereitet und entsprechend modifiziert.

Tabelle 5 zeigt die verwendeten Aminosäuren und biogenen Stoffen mit den erreichten Ausbeuten an Furaneol[®] nach einer Reaktionszeit von 3,5 Stunden.

Tabelle 5: Ausbeute an Furaneol[®] in Abhängigkeit vom Katalysator

	t [h]	Verhältnis $c_{\text{Kat}}/c_{\text{Edukt}}$	pI (25°C)	pKs Seitenkette	Löslichkeit [g/100g], 25°C	Farbe Reak.Lsg.	Ausbeute [%]
Arginin (ARG)	3,5	2,4	11,15	~12	15	Schwarz	<1
Asparagin (ASN)	3,5	2,4	5,41	-	3	Tiefgelb	40
Histidin (HIS)	3,5	2,4	7,47	6,2	4,19	Schwarz	<1
Lysine (LYS)	3,5	2,4	9,59	10,4	30	Braun	15
Tryptophan (TRP)	3,5	2,4	5,89	-	1,136	Schwarz	<1
Prolin (PRO)	3,5	2,4	6,3	-	162,3	Gelb	35
Glutamin (GLN)	3,5	4,8	5,65		2,5	Braun	<1
Betain	3,5	2,4	/	/		-gelb	<1
d-Biotin	3,5	2,4	/	/		-gelb	<1
Niacinamid	3,5	4,8	/	/		Hellbraun	<1
Nicotinsäure	3,5	4,8	/	/		Braun	<1

Beste Ergebnisse werden mit den Aminosäuren Prolin, Lysin und Asparagin erhalten. Die Ausbeuten betragen 35%, 15% und 40%, bezogen auf eingesetzte Menge an Rhamnose. Alle anderen verwendeten Katalysatoren zeigen keine signifikante katalytische Wirkung in der Darstellung von Furaneol[®] aus Rhamnose. Dies kann im Fall von Tryptophan aufgrund der Schwerlöslichkeit erklärt werden. Arginin und Histidin ergeben ebenfalls keine Ausbeute an Furaneol[®]. Ihre Lösungen sind nach der Reaktion tiefschwarz. Dies weist auf einen hohen Anteil an Melanoidinen in der Lösung hin. Basische Aminosäuren scheinen sich ganz allgemein nicht zur Katalyse dieser Reaktion zu eignen. Interessant ist ebenfalls, daß Glutamin, als zum Asparagin verwandte Aminosäure, keine Furaneol[®]-Bildung katalysiert. Dies kann mit der Bildung der Pyrrolidoncarbonsäure (PCA) bei den herrschenden Reaktionsbedingungen erklärt werden. Die PCA ihrerseits reagiert unter den Versuchsbedingungen zu Glutaminsäure weiter:

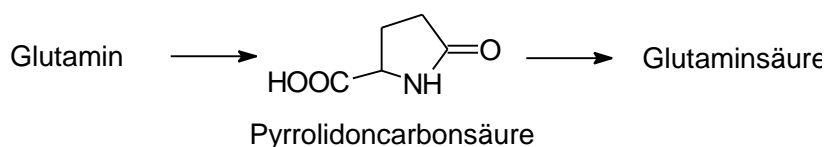


Abbildung 3-10: Zersetzung des Glutamins zu Glutaminsäure

Alle anderen getesteten biogenen Stoffe spielen eine untergeordnete Rolle bei der Synthese von Furaneol[®], die Lösungen sind jedoch auch hier stets gefärbt. Die Färbung der Lösungen nach der Reaktion mit den unterschiedlichen Typen der verwendeten Aminosäuren und biogenen Verbindungen als Katalysator scheint willkürlich und nicht mit deren Eigenschaften korrelierbar zu sein.

Lediglich die Lösungen der erfolgreichen Katalyse (Prolin, Lysin und Asparagin) waren im Gegensatz zu den nicht erfolgreichen Reaktionen schwach gefärbt. Jedoch auch bei diesen drei Aminosäuren konnte keine ausschlaggebende, bei allen drei vorhandene Eigenschaft für deren erfolgreiche Katalyse gefunden werden. Daher kann auf keine vom Katalysatortyp abhängige Bildung der Melanoidine geschlossen werden.

Interessant ist der hohe Umsatz bei der durch Asparagin katalysierten Reaktion. Die Nähe der Amidgruppe zur α -Aminogruppe scheint eine erhöhte Fähigkeit zur Katalyse der *Maillard*-Reaktion hervorzurufen. Unklar ist, ob der Amidstickstoff direkt an der Reaktion beteiligt ist, oder nur am Erreichen eines günstigen Übergangszustandes zur Ausbildung der Schiffsbases der α -Aminogruppe mit dem Desoxyzucker. Interessant wären Untersuchungen zur Rolle des Asparagin als Katalysator der *Maillard*-Reaktion im Organismus. Tatsächlich ist

Asparagin in Speicherzellen von Früchten in großen Mengen vorhanden. Es dient dort als freie Aminosäure zum Ausgleich des osmotischen Drucks in der Zelle über die Membran vom Cytosol zur Vakuole. Daher ist eine wesentliche Beteiligung an der nichtenzymatischen Bräunung denkbar.

Da mit Asparagin und Prolin als Katalysator die besten Ausbeuten erzielt werden, werden sie in den folgenden Versuchen als Katalysator verwendet und die erhaltenen Ergebnisse einander gegenübergestellt.

3.2.1.3 Zusammenfassung

Zu den bereits literaturbekannten Verfahren zur Darstellung von Furaneol[®] wurden andere Möglichkeiten unter dem Aspekt einer natürlichen Synthese untersucht. Die Darstellung von Furaneol[®] auf Basis der *Maillard*-Reaktion stellt eine interessante Alternative zu den zur Zeit wirtschaftlich genutzten Verfahren dar. Der Einsatz von Rhamnose als natürliche Ressource wird als wirtschaftlich angesehen.

Die Verwendung von Piperidinacetat als Aminokomponente ist aufgrund der hohen Toxizität des Piperidins nicht verwendbar zur Darstellung lebensmitteltechnisch relevanter Produkte.

Mit der Verwendung von aminofunktionalisierten Trägermaterialien erzielt man nur geringe Ausbeute an Furaneol[®]. Das Trägermaterial wird im Laufe des Prozesses inhibiert. Zur Aufrechterhaltung eines kontinuierlichen Prozesses müsste das Material daher ständig nachgefüllt werden. Diese Methode erscheint nicht wirtschaftlich.

Aminosäuren aus natürlichen Ressourcen können erfolgreich als Aminokomponente in der Synthese eingesetzt werden. Mit einigen Aminosäuren werden bis zu 40% Ausbeute an Furaneol[®] erreicht. Erfolge erzielte man hierbei, neben Prolin, mit Asparagin. Asparagin hat gegenüber Prolin den Vorteil um ein Vierfaches preisgünstiger zu sein.

Mit Aminosäuren als Aminokomponente kann auf lebensmittelrechtlich bedenkliche Stoffe, wie z.B. Triphenylphosphin bei der Synthese aus 3-Hexin-2,5-diol [RE ET AL., 1973] oder Piperidin [PEER, 1968], verzichtet werden. Dieser Syntheseweg erscheint sinnvoll und wird daher im weiteren verfolgt.

3.3 Optimierung der Reaktion

Im folgenden sollen die Reaktionsparameter bezüglich Ausbeutesteigerung optimiert werden. Dabei werden die Parameter Temperatur, Katalysatormenge, pH-Wert und Reaktionsmedium betrachtet. Zusätzlich wird darauf geachtet eine möglichst einfache Aufarbeitung zu ermöglichen, da sich die Isolierung des Produktes im Laufe der Untersuchungen als „Bottleneck“ des Prozesses erwiesen hat. Was dies im einzelnen bedeutet, wird später im Text näher erläutert.

3.3.1 Optimierung der Reaktionstemperatur und Dauer

Bei vorangegangenen Versuchen wurde jeweils der Reaktionsansatz eine definierte Zeit lang bei 100°C refluxiert, um reproduzierbare, bzw. vergleichbare Bedingungen einzuhalten. Im nächsten Schritt wird untersucht, ob bei eventuell mildereren Temperaturen eine schonende Darstellung des Furaneols[®] erreicht werden kann und wie sich die Furaneol[®]-Bildung im Laufe der Zeit entwickelt.

Es gilt, die Abhängigkeit der Reaktionszeit von Konzentration und Temperatur zu ermitteln und damit die Synthese zu optimieren. Der Verlauf der Konzentration in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer wird bei verschiedenen Reaktionstemperaturen oberhalb 75°C gemessen. Unterhalb dieser Temperatur findet keine signifikante Darstellung von Furaneol[®] innerhalb von 24 Stunden statt. Längere Reaktionszeiten werden als unwirtschaftlich angesehen.

Bei Versuchen mit definierter Reaktionstemperatur zwischen 75°C und 100°C werden die Konzentration/Zeit-Verläufe der Reaktion von Rhamnose in Anwesenheit von Asparagin gemessen. Zusätzlich werden Versuche im wäßrigen Puffersystem oberhalb von 100°C in einem Druckreaktor durchgeführt. In allen Fällen dient Natriumphosphatpuffer, 0,1M, pH 7 als Reaktionsmedium.

Man arbeitet mit einem Überschuß an Katalysator. Bei Asparagin als Katalysator löst sich die eingesetzte Menge erst vollständig in der Hitze. Nach dem Abkühlen kristallisiertes Asparagin wird sodann gravimetrisch bestimmt und mit der Ausgangsmenge verglichen. Über die Differenz können Aussagen bezüglich des Verbrauch und der Bildung von Nebenprodukten gemacht werden. Siehe dazu Kapitel 3.3.3.

Die in bestimmten Intervallen entnommenen Proben werden mit Hilfe der HPLC¹⁰ (siehe Kap. 3.2.1.2) gemessen und ausgewertet.

Die Bestimmung des Umsatzes aufgrund der Konzentration des Zuckers im Reaktionsmedium über die Zeit gestaltet sich als äußerst schwierig. Die Analyse mittels HPLC ist problematisch, da Rhamnose im UV-VIS Bereich kaum Absorptionen ausweist. Die Detektion gelingt mit Hilfe eines RI-Detektors. Dennoch sind die Meßwerte mit einem relativ großen Fehler behaftet, da die Messungen im Grenzbereich stattfinden und daher der Schwankungsbereich der Methode aufgrund der Empfindlichkeit des Gerätes groß ist.

Andere optische Meßmethoden, off-line gemessen, entfallen aufgrund der starken Eigenfärbung der Reaktionslösung bei fortgeschrittener Reaktionszeit. Derivatisierung des Zuckers ist aufgrund der vielen störenden Neben- und Folgeprodukte, die im Laufe der Reaktion entstehen, nicht möglich. Um möglichst genaue Aussagen über den Reaktionsfortschritt zu gewinnen, wird daher auf die Ausbeute an Furaneol[®] Bezug genommen.

Abbildung 3-11 bis Abbildung 3-15 zeigen die Konzentration/Zeit-Verläufe der Reaktion im Temperaturbereich von 75°C bis 100°C. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil der Peakfläche des Furaneol[®] an der Gesamtpeakfläche aufgetragen. Hieraus läßt sich schließen, inwieweit Neben- und Folgereaktionen zur Minderung des Ausbeute beitragen.

- Der Anstieg der Konzentration des Furaneols[®] bei gleichzeitigem Anstieg des Anteils an der Gesamtpeakfläche läßt auf eine bevorzugte Bildung von Furaneol[®] schließen.
- Ein Sinken oder Stagnieren des Anteils an der Gesamtpeakfläche bei gleichzeitigem Anstieg der Furaneol[®]-Konzentration indiziert ein Anstieg von Nebenreaktionen.
- Ein Sinken der Gesamtpeakfläche bei gleichbleibender Furaneol[®]-Konzentration indiziert Folgereaktionen und damit den Verbrauch von vorhandenem Furaneol[®].

Jedoch ist die Aussagekraft dieser Abschätzung nicht überzubewerten, da die Melanoidine sich mit der verwendeten Analysenmethode nicht erfassen lassen. Die Bildung dieser braunen Pigmente läßt sich lediglich aus der Färbung der Lösung abschätzen: Je dunkler gefärbt die Lösung, desto mehr Melanoidine befinden sich in dieser Lösung.

¹⁰ Reverse Phase Chromatographie, Bedingungen siehe Anhang

3.3.1.1 Reaktionstemperatur 75°C

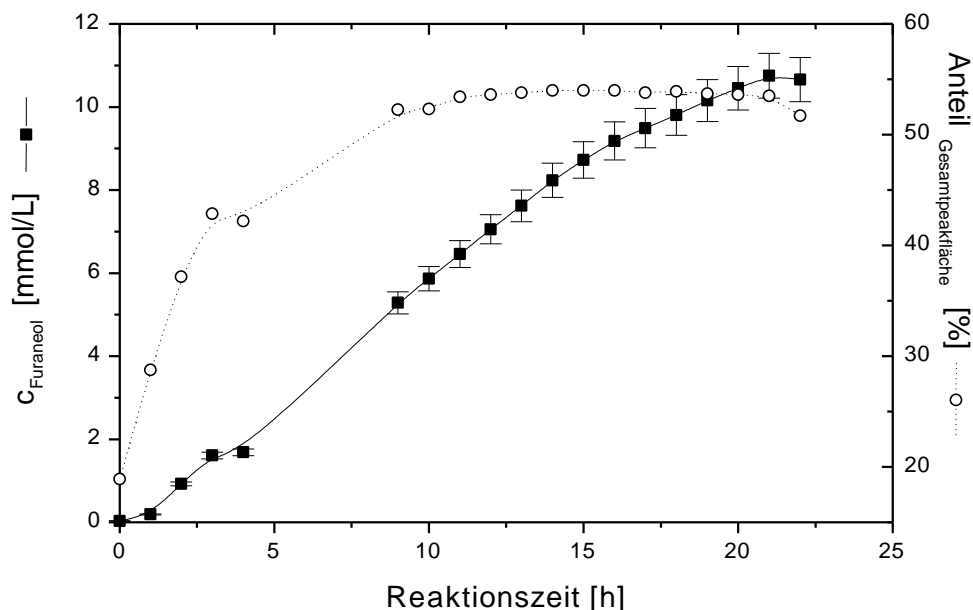


Abbildung 3-11: Reaktion von Rhamnose mit Asparagin als Aminokomponente, T= 75°C; 5g ASN; 2,5g Rhamnose; 50 ml NaH₂PO₄-Puffer, 0,1M, pH 7

Abbildung 3-11 zeigt zunächst einen linearen Anstieg der Furaneol[®]-Konzentration bis 15 Stunden nach Reaktionsbeginn. Nach 22 Stunden befinden sich nur 10mmol/L Furaneol[®] (4%) in der Lösung. Ab der 10. Stunde stagniert der Anteil des Furaneol[®]-Peaks an der Gesamtpeakfläche bei 54%, während die Furaneol[®]-Konzentration stetig steigt.

Dies weist auf Nebenreaktionen trotz der geringen Bildungsrate des Furaneol[®] aufgrund der relativ geringen Energiezufuhr hin. Die Aktivierungsenergien dieser Nebenreaktionen scheinen in der Größenordnung der Aktivierungsenergien der Furaneol[®]-Bildung zu liegen. Dies könnte ein Hinweis auf die Bildung von ähnlichen Furanonen sein.

Zur Bildung dieser Nebenprodukte werden zu Anfang die gleichen Teilreaktionen wie zur Darstellung des Furaneols[®] durchlaufen. Nach der Bildung der Desoxyse differenzieren sich die möglichen Produkte. Da es sich bei den Desoxysonen um aktivierte Verbindungen handelt, wird die Reaktion nicht durch Aktivierungsenergien in Richtung eines Produktes gesteuert.

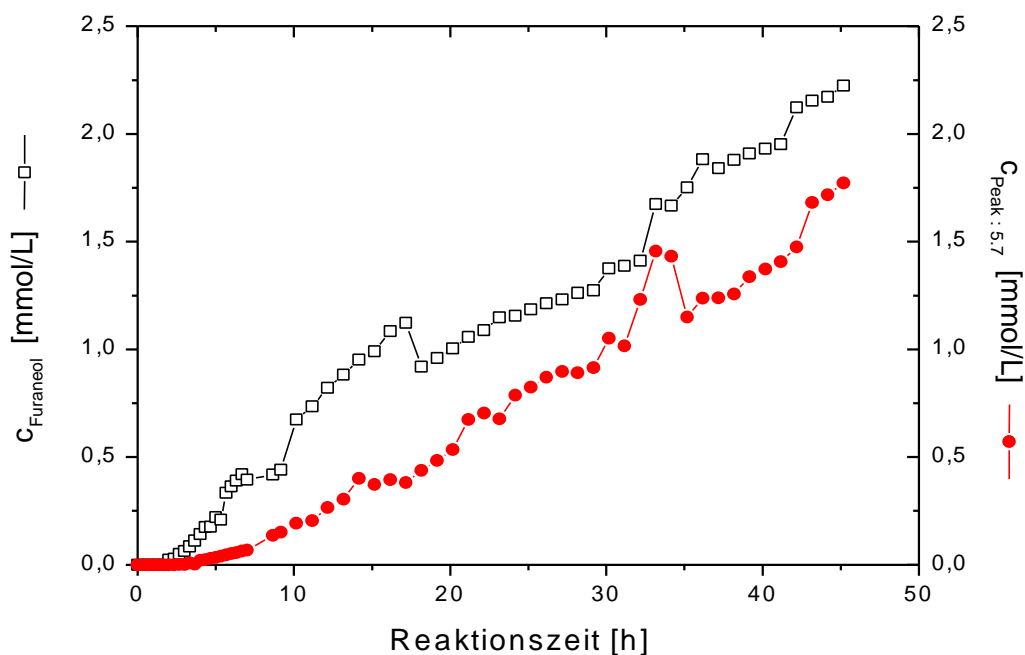


Abbildung 3-12: Reaktion von Rhamnose mit Prolin als Aminokomponente, $T=75^{\circ}\text{C}$; 3,8g PRO; 2,5g Rhamnose, 50 ml NaH_2PO_4 -Puffer, 0,1 M, pH 7

Zum Vergleich zeigt Abbildung 3-12 eine Reaktion unter gleichen Bedingungen mit Prolin als Katalysator. Die Ausbeute an Furaneol[®] ist wesentlich geringer. So sind nach 20 Stunden erst ~ 1 mmol/L Furaneol[®] entstanden (zum Vergleich: 10 mmol/L in ASN katalysierter Reaktion). Außerdem wird die Bildung eines weiteren Produktes beobachtet. Der Peak im HPLC-Chromatogramm verläuft in der Größenordnung der Furaneol[®]-Bildung und stellt somit eine Konkurrenzreaktion dar. Aufgrund der Nähe dieses Peaks zum Furaneol[®]-Peak im Chromatogramm läßt auf eine ähnliche Verbindung schließen. Versuche diesen unbekanntem Stoff zu isolieren und zu identifizieren schlugen fehl. Deshalb wird er in der Abbildung 3-12 nur als „Peak 5,7“ bezeichnet.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß mit Prolin katalysierten Reaktionen wesentlich schlechtere Ausbeuten an Furaneol[®] pro Zeit als mit Asparagin katalysierten Reaktionen erreicht werden. Daher wird im folgenden nur noch auf Asparagin als Katalysator eingegangen. Diese Aminosäure hat zudem gegenüber Prolin den Vorteil bei den hier eingesetzten Mengen nur in der Hitze vollständig löslich zu sein. Nach Abkühlen der Reaktion fällt überschüssiges Asparagin wieder aus. Durch Auswiegen und mit Hilfe der Löslichkeit lassen sich weitere Aufschlüsse über die Reaktion gewinnen. In einem technischen Prozeß lassen sich so Teile des Katalysators wiedergewinnen und erneut einsetzen.

3.3.1.2 Reaktionstemperatur 80°C

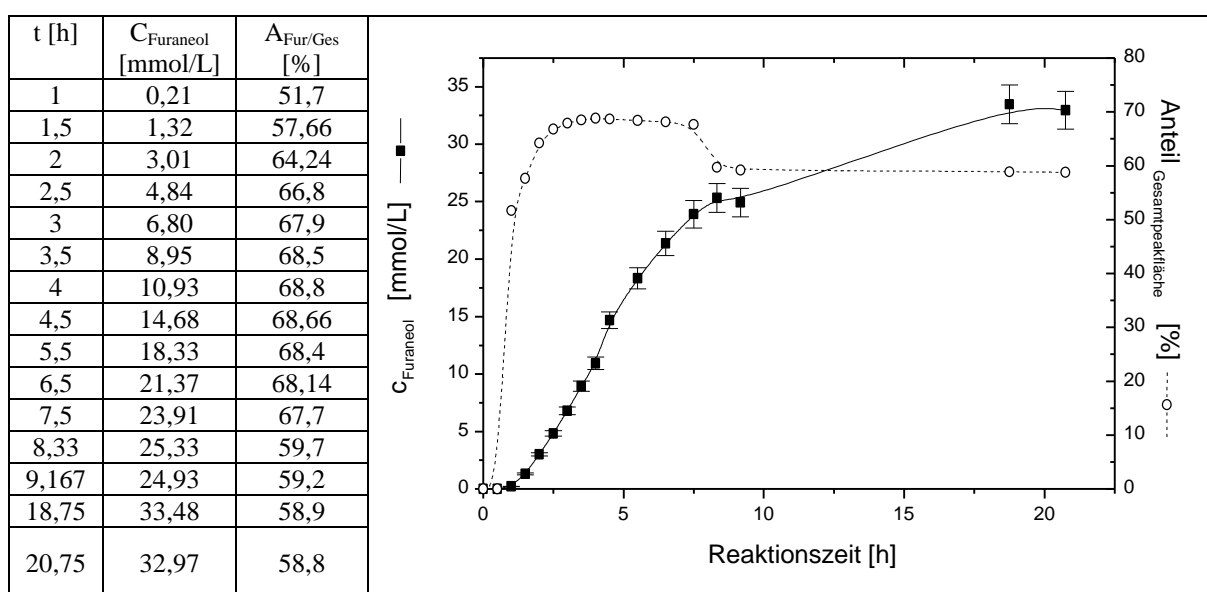


Abbildung 3-13: Reaktion von Rhamnose mit Asparagin als Aminokomponente, T= 80°C; 5g ASN; 2,5g Rhamnose; 50 ml NaH₂PO₄-Puffer, 0,1 M, pH 7

Bei einer Reaktionstemperatur von 80°C wird eine Steigerung des Umsatzes im Vergleich zum Versuch bei einer Reaktionstemperatur von 75°C beobachtet. Nach einer Reaktionszeit von 21 Stunden wird eine Furaneol[®]-Konzentration von 33 mmol/L ± 5 % (12 % Ausbeute) in der Lösung gemessen. Damit liegt das Maximum deutlich höher als bei T= 75°C. Die Reaktionszeit ist erheblich verkürzt. So wird die Konzentration von 10 mmol/L Furaneol[®], die bei einer Reaktionstemperatur von 75°C nach 22 Stunden erreicht wird, schon nach ca. 4 Stunden erreicht.

Der Anteil des Furaneols[®] an der Gesamtpeakfläche steigt schnell auf einen Wert von 68 % an. Das Maximum wird bei ca. 4 Stunden und einer Konzentration von 10-15 mmol/L Furaneol[®] durchlaufen. Dies entspricht einem Anteil von 4 - 6 % am Gesamtumsatz. Nach Erreichen des Maximum fällt er im Laufe von 17 h langsam auf einen Wert von 59 % ab, d.h. Neben- und Folgereaktionen gewinnen im Verlauf der Reaktion an Bedeutung. Die Unstetigkeit im Bereich von 8 Stunden ist auf einen Volumenfehler bei der Messung zurückzuführen

3.3.1.3 Reaktionstemperatur 90°C

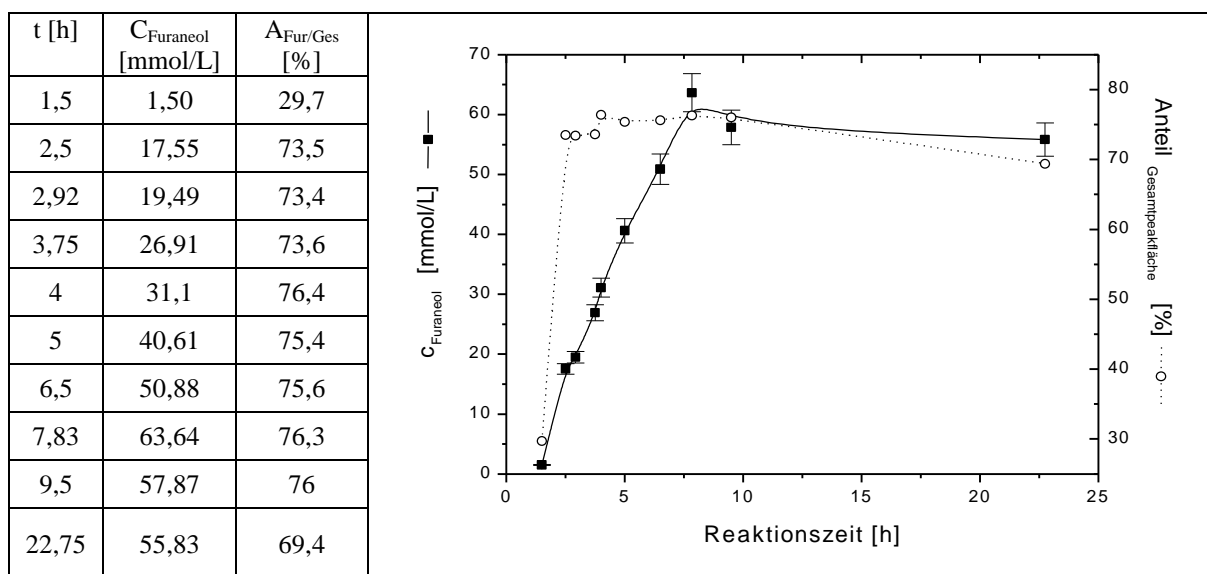


Abbildung 3-14: Reaktion von Rhamnose mit Asparagin als Aminokomponente, T= 90°C; 5g ASN; 2,5g Rhamnose; 50 ml NaH₂PO₄-Puffer, 0,1M, pH 7

Die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 90°C zeigt eine weitere drastische Verkürzung der Reaktionszeit. Bereits nach 10 Stunden wird die maximale Konzentration des Furaneol[®] mit 63mmol/L ± 5 % (23 % Ausbeute) erreicht. Die Konzentration fällt danach auf einen Wert von 56 mmol/L ab.

Der Anteil an der Gesamtpeakfläche beträgt 73 % und fällt dann bis zur 24. Stunde auf 69 % zurück. Es kann auf vermehrte Folgereaktion geschlossen werden. Der maximale Wert des Anteil an der Gesamtpeakfläche wird, wie bei einer Reaktionstemperatur von 80°C, bei einer Furaneol[®]-Konzentration 10 – 15 mmol/L erreicht.

Durch die erhöhte Temperatur wird die Reaktionsdauer bis zum Erreichen der maximalen Konzentration deutlich verkürzt. Ebenfalls wird mehr Furaneol[®] gebildet, dessen Konzentration aber im Laufe der Reaktion wieder abnimmt. Dies zeigt sich auch durch eine vermehrte Bildung von Melanoidinen, was durch eine intensive Schwarzfärbung des Reaktionsgemisches, stärker als bei niedrigeren Reaktionstemperaturen, auffällt. Die Verharzung des Furaneols[®] und damit die Bildung der Melanoidine gewinnt bei Temperaturen oberhalb 90°C zunehmend an Bedeutung.

3.3.1.4 Reaktionstemperatur 100°C

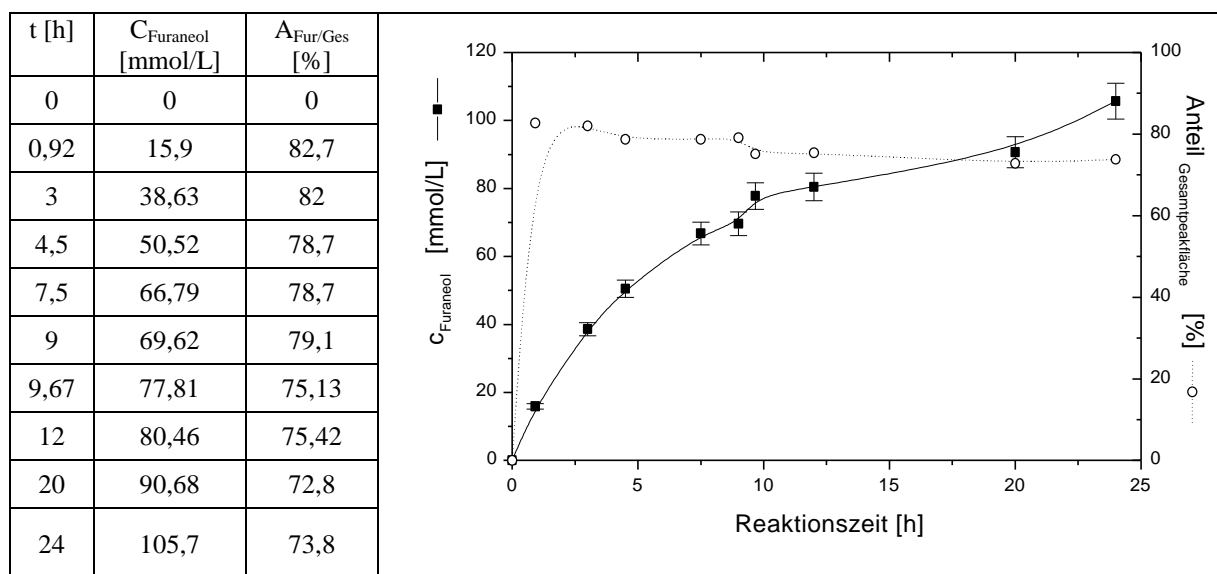


Abbildung 3-15: Reaktion von Rhamnose mit Asparagin als Aminokomponente, T=100°C; 5g ASN; 2,5g Rhamnose; 50 ml NaH₂PO₄-Puffer, 0,1 M, pH 7

Bei einer Reaktionstemperatur von 100°C bestätigt sich der Trend der vorangegangenen Messungen, daß mit erhöhter Temperatur ein erhöhter Umsatz erreicht wird. Bereits nach 13 Stunden werden 100 mmol/L Furaneol[®] überschritten. Die erreichten Konzentrationen bei einer Reaktionstemperatur von 75°C werden hier schon nach wenigen Minuten erhalten.

Es werden Ausbeuten von 40% erreicht, bezogen auf die eingesetzte Menge an Rhamnose. Gleichzeitig steigt aber die Menge an Neben- und Zersetzungsprodukten, da sich gleichzeitig eine signifikante Abnahme des Anteil an Furaneol[®] an der Gesamtkonzentration feststellen läßt. Der prozentuale Anteil sinkt von 82,7% auf 73,9%.

Bei einer Reaktionstemperatur am Siedepunkt des wäßrigen Reaktionsmediums wird somit nicht nur die Bildung von Furaneol[®] forciert, sondern auch Nebenreaktionen und die Bildung seiner Folgeprodukte, Spaltprodukten und Melanoidinen. So verfärbt sich die Reaktionslösung schon nach wenigen Stunden tiefschwarz.

Die Volumenschwankungen aufgrund der starken Verdampfung des Lösungsmittels nahe dem Siedepunkt erschweren die genaue Bestimmung der Konzentration. Der Meßfehler erhöht sich daher auf ca. 10%. Obwohl maximale Produktbildung der Reaktion noch nicht erreicht scheint, wurde die Reaktion deswegen nach 24 Stunden nicht weiter verfolgt.

3.3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Reaktionstemperaturen

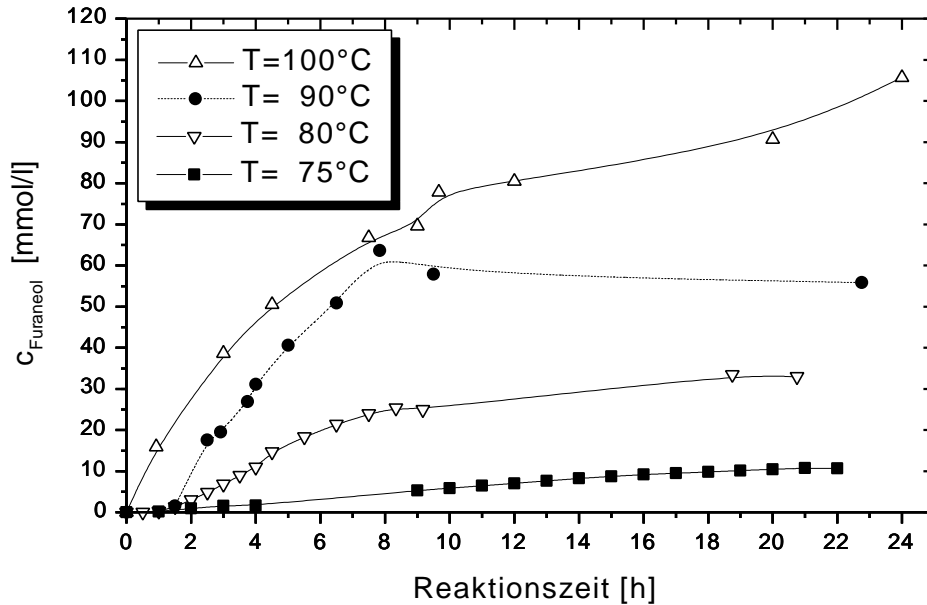


Abbildung 3-16: Vergleich der Reaktion von Rhamnose mit Asparagin als Katalysator bei T=75, 80, 90 und 100°C

Zum Vergleich sind alle Messungen in Abbildung 3-16 aufgetragen. Zusammenfassend lassen sich folgende Trends feststellen: Mit Erhöhung der Temperatur wird die Ausbeute an Furaneol[®] gesteigert. Bei einer Reaktionstemperatur von 100°C wurde eine 10 mal höhere Ausbeute als bei 75°C erreicht. Die Reaktionszeit verkürzt sich dabei auf ca. ein Drittel.

Ab einer Konzentration von 10 – 15 mmol/L Furaneol[®] in der Lösung wird vermehrte Bildung von Folgeprodukten festgestellt. Dies wird bei allen Reaktionstemperaturen gleich beobachtet.

Mit der Erhöhung der Temperatur wird eine starke Zunahme der Melanoidine registriert. Die erhaltenen Lösungen nach Reaktion bei 100°C sind tiefschwarz gefärbt.

3.3.1.6 Umsatz und Ausbeute als Funktion der Ausgangskonzentration

Die Abhängigkeit der Ausbeute an Furaneol[®] bei der Reaktion von Rhamnose durch Aminosäurekatalyse in homogener, wäßriger Lösung in Abhängigkeit der Ausgangskonzentration von Rhamnose soll nun untersucht werden. Eine Korrelation der gemessenen Daten mit entsprechenden kinetischen Modellen erweist sich aufgrund der Komplexität der Reaktion als sehr schwierig. Dieses Kapitel soll Ansätze zur Aufklärung der kinetischen Parameter liefern. Es wird versucht, mit Hilfe kinetischer Modelle die experimentellen Daten zu korrelieren.

Bei einem Vergleich der Ausbeuten an Furaneol[®] von diskontinuierlichen Reaktionen bezogen auf verschiedene Ausgangskonzentration wird eine optimale Edukt/Katalysatorkonzentration (hier 5 – 7,5 %) gefunden (Abbildung 3-17).

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten sind bei allen Reaktionen ähnlich. Jedoch weichen die erreichten Ausbeuten an Furaneol[®] von der erwarteten Konzentration ab. Ein Ausbeutemaximum wird bei Anfangskonzentrationen von 5 % erreicht. Bei einer Anfangskonzentration von 10 % wird nicht wie erwartet eine zweifache Konzentration an Furaneol[®] in Lösung gegenüber der Reaktion bei 5 % gemessen, sondern lediglich ein Drittel dessen. Dies läßt auf vermehrte Nebenreaktionen schließen.

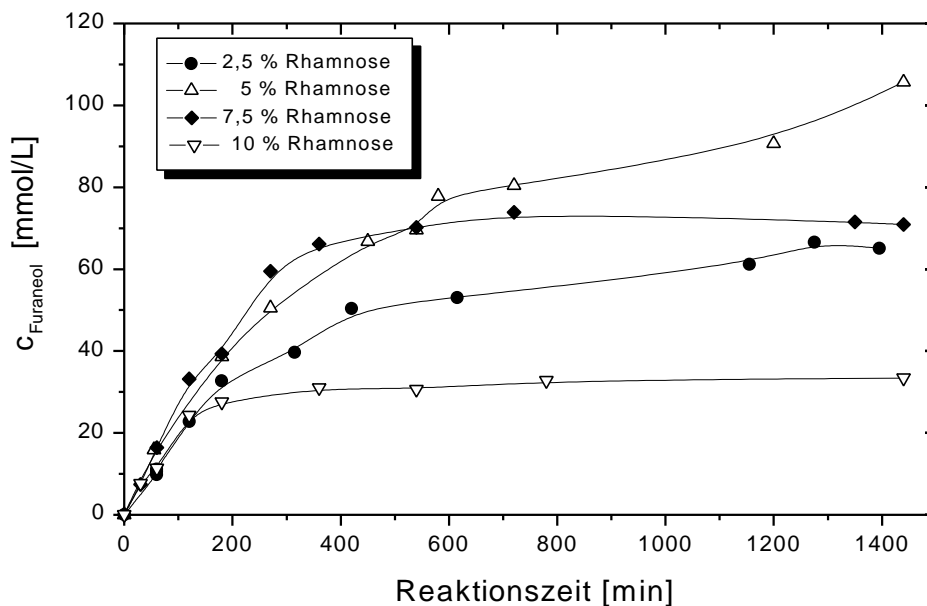


Abbildung 3-17: Konzentration von Furaneol[®] als Funktion der Reaktionsdauer in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration an Rhamnose bei 100°C.

Abbildung 3-18 zeigt die Konzentration des Furaneols[®] und den Umsatz der Rhamnose als Funktion der Zeit, normiert auf Mol Rhamnose (Rhamnose-Äquivalenten). In allen Fällen erreicht die Ausbeute an Furaneol[®] nicht den der Rhamnose-Abnahme entsprechenden theoretischen Wert.

Eine Möglichkeit ergibt sich durch Furaneol[®] verbrauchende Reaktionen. Es handelt sich hierbei um die Verharzung des Furaneols[®], die in der Literatur als Kinetik erster Ordnung beschrieben ist [HIRVI, 1980]. Die gesuchte Gleichung für die Bildungsgeschwindigkeit des Furaneol[®] müßte demnach Gl. 3-1 entsprechen.

$$\frac{dc_3}{dt} = k_1c_1 - k_3c_3 \quad \text{Gl. 3.1}$$

Mit:

dc_3/dt : Änderung der Furaneol[®]-Konzentration

k_1 : Geschwindigkeitskonstante des Rhamnose-Umsatzes,

c_1 : Konzentration der Rhamnose

k_3 : Geschwindigkeitskonstante der Furaneol[®]-Zersetzung,

c_3 : Konzentration des Furaneols[®]

Der Verlauf der Konzentration/Zeit-Kurve entspräche einem linearen Anstieg zu Anfang der Reaktion. Im Verlauf der Reaktion müßte dann mit zunehmender Furaneol[®]-Konzentration die Zersetzung des Furaneol[®] an Bedeutung gewinnen, d.h. nach Durchlaufen eines Maximums müßte ein Abnehmen der Konzentration zu beobachten sein. Dieses Verhalten wird nicht beobachtet. Außerdem kann dies nicht den gesamten Ausbeuteverlust erklären.

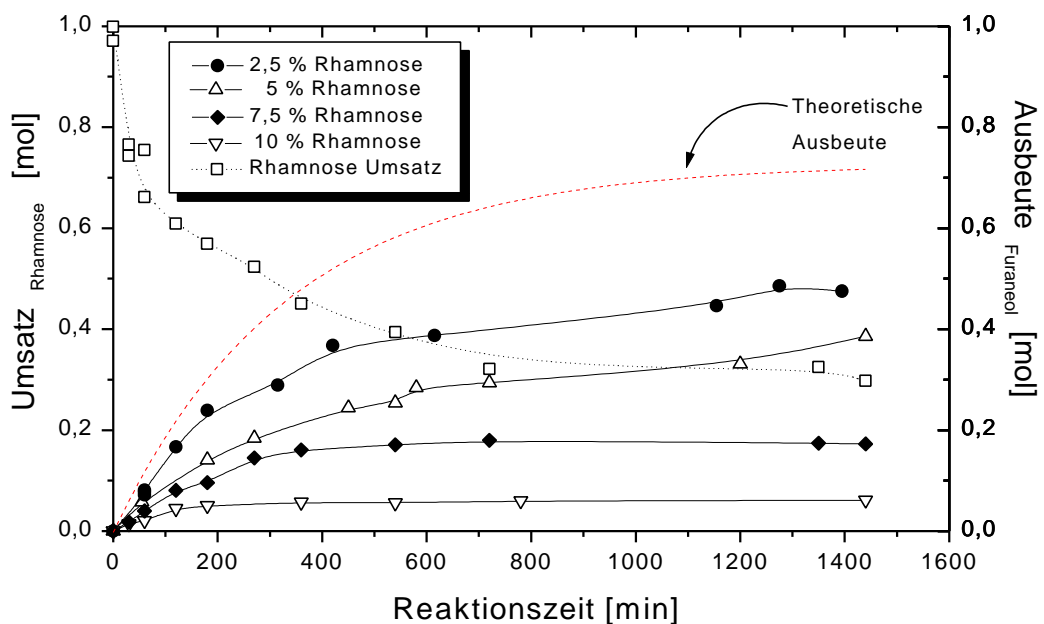


Abbildung 3-18: Umsatz der Rhamnose und Ausbeute an Furaneol[®] als Funktion der Reaktionsdauer und der Anfangskonzentration bei 100°C, Normierung auf [Mol] Rhamnose

Die Beobachtung, daß die Bildung des Furaneols[®] von der Anfangskonzentration der Rhamnose abhängig ist, deutet auf eine Nebenreaktion hin an der Rhamnose beteiligt sein muß. Bei einer Auftragung der Rhamnose-Konzentration im halblogarithmischer Darstellung (Konzentration/Zeit-Diagramm) findet man stets eine Abnahme nach einer Reaktion erster Ordnung, unabhängig von der Anfangskonzentration. Eine Kondensation zwischen Rhamnose und Furaneol[®] ist demnach wenig wahrscheinlich, da diese nach einer Reaktion zweiter Ordnung verlaufen müßte.

Daher wird an dieser Stelle eine andere Hypothese aufgestellt. Denkbar ist eine Nebenreaktion der reaktiven, weil ungesättigten, Zwischenprodukte (Desoxyrone). Diese Desoxyrone reagieren einerseits schnell weiter zum Furaneol[®]. Andererseits können sie mit bereits gebildetem Furaneol[®] kondensieren. Dadurch wäre sowohl die Abhängigkeit der Furaneol[®]-Ausbeute von der Rhamnose-Anfangskonzentration als auch der Rhamnose-Verbrauch nach erster Ordnung erklärbar. Daraus ergibt sich folgendes Reaktionsschema:

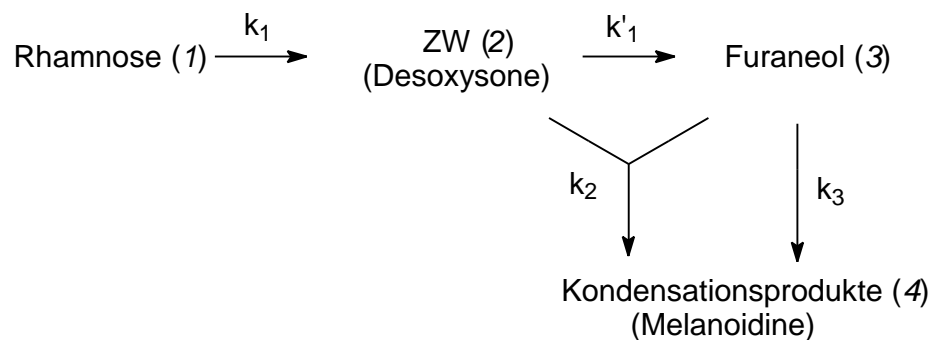


Abbildung 3-19: Reaktionsschema zur Korrelation der Daten zur Furaneol[®]-Synthese

Es wird angenommen, daß alle Reaktionen irreversibel sind. Folgende Bilanzgleichungen werden für die einzelnen Reaktanten aufgestellt, wobei sämtliche Konzentrationen in Rhamnose-Äquivalenten [mol/L] ausgedrückt werden.

$$\text{Rhamnose-Abnahme:} \quad \frac{dc_1}{dt} = -k_1 c_1 \quad \text{Gl. 3.2}$$

$$\text{Zwischenproduktbildung:} \quad \frac{dc_2}{dt} = k_1 c_1 - k_2 c_2 c_3 - k'_1 c_2 \quad \text{Gl. 3.3}$$

$$\text{Furaneol[®]-Bildung} \quad \frac{dc_3}{dt} = k'_1 c_2 - k_2 c_2 c_3 - k_3 c_3 \quad \text{Gl. 3.4}$$

$$\text{Bildung der Kondensationsprodukte:} \quad \frac{dc_4}{dt} = k_3 c_3 + k_2 c_2 c_3 \quad \text{Gl. 3.5}$$

In der Gleichung für die Bildungsgeschwindigkeit der Furaneol[®]-Bildung muß die Konzentration des analytisch nicht faßbaren Zwischenproduktes durch meßbare Konzentrationen ausgedrückt werden. Es werden (hypothetisch) nur sehr geringe Mengen des Zwischenproduktes während des Reaktionsablaufs beobachtet. Damit ist seine Konzentration wie auch seine zeitliche Änderung dc_2/dt im Vergleich zu den anderen Konzentrationen gering (Bodensteinsche Quasi-Stationarität). Damit gilt für die Konzentrationsänderung des Zwischenproduktes $dc_2/dt=0$. Aus Gleichung 3.3 erhält man:

$$c_2 = \frac{k_1 c_1}{k'_1 + k_2 c_3} \quad \text{Gl. 3.6}$$

Gleichung 3.6 wird in Gleichung 3.4 eingesetzt. Nach Umformung erhält man für die zeitliche Änderung der Furaneol[®]-Konzentration:

$$\frac{dc_3}{dt} = \frac{k_1}{1 + (k_2/k'_1)c_3} c_1 - \frac{(k_2/k'_1)k_1}{1 + (k_2/k'_1)c_3} c_1 c_3 - k_3 c_3 \quad \text{Gl. 3.7}$$

Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_3 können einzeln bestimmt werden. k_1 erhält man aus dem Umsatz der Rhamnose. Durch das Ausmessen der Steigung m in einer halblogarithmischen Darstellung erhält man nach der Beziehung $m=k_1/2,3$ bei einer Temperatur von 100°C und z.B. einer Anfangskonzentration von 7,5 % den Wert: $k_1=0,00519 \text{ min}^{-1}$.

Ebenfalls kann die Zersetzung von reinem Furaneol[®] als Funktion der Zeit gemessen werden. Der Literatur entnehmen wir für die Geschwindigkeitskonstante der Furaneol[®]-Zersetzung: $0,00774 \text{ min}^{-1}$ [HIRVI, 1980]. Dieser Wert erscheint sehr hoch. Demnach dürfte Furaneol[®] sich nicht oder nur in geringem Maße bilden. Die Zersetzung wurde in einem reinen Puffersystem untersucht. Zur Kontrolle wird daher die Zersetzung in dem hier verwendeten System untersucht. Die Zersetzung des Furaneols[®] wird in dem verwendeten Puffersystem in Anwesenheit von Asparagin untersucht. Als Geschwindigkeitskonstante erhält man: $k_3=2,8 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. Die Zersetzung des Furaneols[®] ist demnach nicht unabhängig von Anwesenheit anderer Komponenten. Eine Stabilisierung durch die Aminosäure ist denkbar.

k_r wird als relative Geschwindigkeitskonstante definiert: $k_r = k_2/k_1$. Sie gibt das Verhältnis der Bildung von Furaneol[®] zu Nebenreaktionen an. Mit ihrer Hilfe kann der Verlauf abgeschätzt werden. Gleichung 3.7 wird hierzu nach k_r aufgelöst:

$$k_r = \frac{k_1 c_1 - k_3 c_3 - \left(\frac{dc_3}{dt}\right)}{\left(\frac{dc_3}{dt}\right) c_3 + k_3 c_3^2 + k_1 c_1 c_3} \quad \text{Gl. 3.8}$$

Da zu Anfang der Reaktion die Konzentration an Furaneol[®] (c_3) sehr klein ist, können der mittlere Term im Zähler, sowie der rechte und der mittlere Term im Nenner vernachlässigt werden. Zu Anfang der Reaktion würde k_r also lediglich eine Funktion der Konzentrationsänderung dc_3/dt sein (Der Umsatz der Rhamnose wurde normiert!).

Die Konzentrationsänderung der Furaneol[®]-Bildung kann als Steigung der Konzentration/Zeit-Kurve der Abbildung 3-18 entnommen werden. Man erkennt das Bildung von Furaneol[®] in der normierten Auftragung, entgegen den Erwartungen, von der Anfangskonzentration abhängig ist. Eine Berechnung von k_r aus experimentellen ermittelten Wertepaaren und den separat ermittelten Werten für k_1 und k_3 nach Gleichung 3.8 bestätigt die Vermutung. k_r zeigt eine stetige Abhängigkeit von dc_3/dt .

Denkbar ist eine Beteiligung der Aminosäure an der Bildung der Nebenprodukte. Die Aminosäure wurde bei den bisherigen Betrachtungen bewußt außer acht gelassen. Die Bestimmung der kinetischen Parameter gestaltet sich dadurch um ein vielfaches komplexer. Die Ermittlung kann durch komplexe Modellierungen erreicht werden, die jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden.

3.3.1.7 Reaktionstemperatur 150°C im geschlossenen System

Um zu überprüfen inwieweit sich eine weitere Temperaturerhöhung auf das Verhältnis Furaneol[®]/Nebenprodukte und auf die Ausbeute auswirkt wird die Reaktion in einem Autoklaven bei 150°C durchgeführt. Der Reaktor ist mit einem Sichtfenster und Anschlüssen aus der HPLC-Technik versehen. Um Volumenfehler zu vermeiden, muß bei der Probenentnahme auf besondere Vorgehensweise geachtet werden. So wird die Probe zunächst über ein Ventil und eine Kühlschleife in ein Vorkammer entlassen. Nicht benötigtes Reaktionsmedium kann wieder in den Reaktor zurückgepumpt werden. Abbildung 3-20 zeigt den Konzentration/Zeit-Verlauf der Reaktion. Die Chromatogramme der HPLC-Messungen zeigen die Zusammensetzung der Reaktionslösung während einer Reaktion bei 150°C. Dabei werden alle Proben vor der Messung verdünnt.

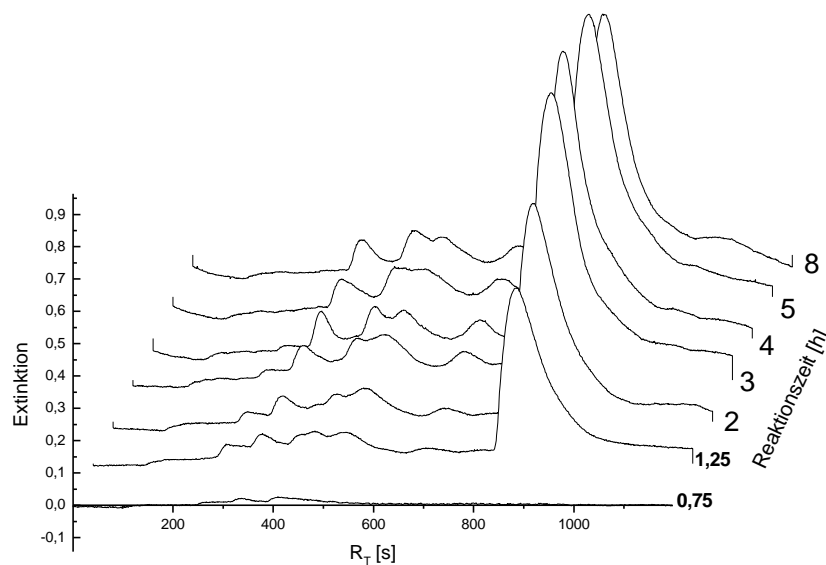


Abbildung 3-20: Änderung der Extinktion bei einer Reaktion von Rhamnose mit Asparagin als Aminokomponente, T=150°C; 2,5g ASN; 2,5g Rhamnose; 50 ml NaH₂PO₄-Puffer, 0,1 M, pH 7, Verdünnung 1:4

Das Chromatogramm entspricht optisch denen, die bei Messungen bei niedrigeren Reaktionstemperaturen erhalten werden. Allerdings ist das Größenverhältnis der Peaks zueinander anders.

Bei einer Retentionszeit von $R_T = 900$ s läßt sich ein deutlicher Furaneol[®]-Peak erkennen. Zwischen 4 und 5 Stunden durchläuft die Ausbeute an Furaneol[®] ein Maximum. Die Peaks bei kürzeren Retentionszeiten werden Zersetzungs- und Nebenprodukten zugeordnet (Bildung von niederen Estern, Aldehyden und Ketonen; detektierte Peaks bei $R_T = 400$ - 600 s und 700 s). Die Zunahme der Peakfläche dieser Peaks ist geringer als bei den Versuchen 3.3.1.1 bis 3.3.1.4. Die Bildung der Zersetzungsprodukte wird unterdrückt. Dies könnte eine Folge der Reaktionsführung im geschlossenen System sein. Obwohl eine Bildung von Ammoniak bei der Zersetzung von Zwischen- und Folgeprodukten wahrscheinlich ist, kann dies in den Experimenten nie nachgewiesen werden. Durch den Druckabschluß scheint der Austrag von flüchtigen niederen Molekülen unterdrückt.

Dagegen ist die Lösung schon nach relativ kurzen Reaktionszeiten stark tiefschwarz gefärbt. Man beobachtet bei fortgeschrittener Reaktionszeit die Bildung eines weiteren Peaks der direkt nach dem Furaneol[®]-Peak detektiert wird. Da keine Basislinientrennung erreicht wird, kann nicht eindeutig bewiesen werden, ob es sich dabei um „Tailing“ des Furaneol[®]-Peaks oder um einen „Response“ eines weiteren Neben- oder Folgeproduktes handelt.

Die Erhöhung der Temperatur bei Reaktionsführung im geschlossenen System wirkt sich positiv auf den Verlauf der Reaktion aus. Das Maximum der Furaneol[®]-Bildung entspricht einer prozentualen Ausbeute von 60%. Damit kann die Ausbeute gegenüber Reaktionen bei 100°C um 20%, bezogen auf eingesetzte Menge Rhamnose, gesteigert werden.

3.3.2 Optimierung des pH-Wertes

Reaktionen unter *Maillard*-Bedingungen laufen in Lebensmitteln hauptsächlich bei pH-Werten zwischen 4 und 8 ab (siehe Kap. 3.2.1). Es wird daher untersucht, inwieweit eine pH-Wertänderung Einfluß auf die Ausbeute an Furaneol[®] hat. Hierzu werden definierte Versuchansätze bei pH-Werten zwischen 5 und 8 in Schritten von 0,5 Einheiten bei festgelegter Reaktionsdauer refluxiert. Es wird dabei weniger auf vollständigen Umsatz als auf die Einhaltung definierter Reaktionsbedingungen geachtet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-21 dargestellt.

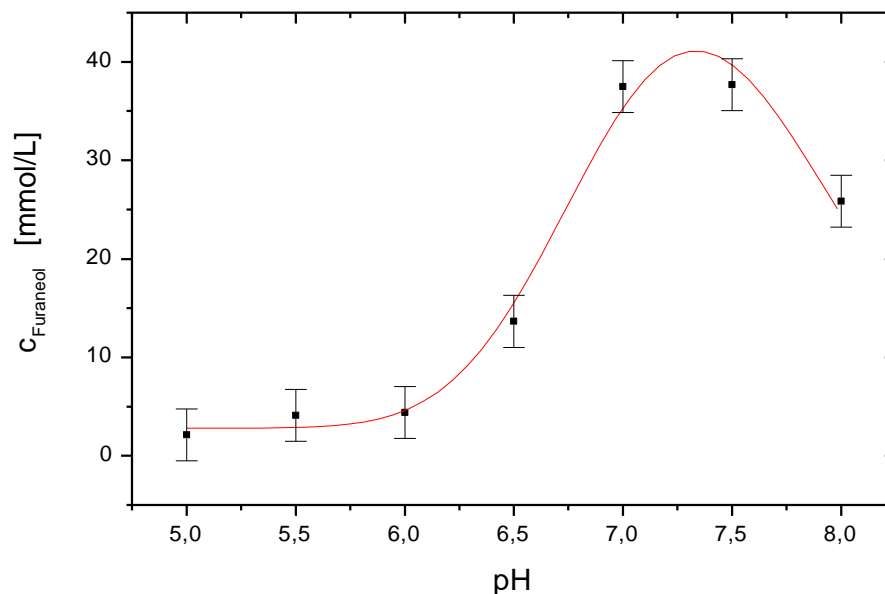


Abbildung 3-21: Konzentration an Furaneol[®] in Abhängigkeit von dem pH-Wert während der Reaktion, T=100°C; 1g ASN; 0,5g Rhamnose; 20 ml NaH₂PO₄-Puffer, 0,1 M, pH 5-7, 8h

Aus der Graphik läßt sich ein Maximum der Ausbeute in Abhängigkeit vom pH-Wert der Reaktion ablesen. Die Auswertung der Ausgleichskurve ergibt für das Maximum einen Wert von 7,3; die Standardabweichung beträgt 7%. Bei niedrigeren pH-Werten läßt sich eine erhöhte Bildung von Spaltprodukten feststellen. Bei höheren pH-Werten erhält man Reaktionslösungen die deutlicher gefärbt sind als Reaktionslösungen beim pH-Maximum. Dies deutet auf vermehrte Bildung von Melanoidinen hin. Es kann keine Messungen oberhalb von pH 8 unternommen werden, da dies außerhalb des Bereiches für dieses Puffersystem liegt.

Das pH-Optimum für die Bildung des Furaneols[®] unterscheidet sich damit erheblich vom pH-Wert an dem die Langzeitstabilität des Furaneols[®] maximal ist (pH 4) [HIRVI, 1980]. Daher ist mit vermehrter Zersetzung des Furaneols[®] zu rechnen.

3.3.3 Optimierung der Katalysatormenge

Asparagin als Aminokomponente wurde bisher im Überschuß eingesetzt. Da es lediglich eine Funktion als Katalysator erfüllt, scheint eine so hohe Menge nicht unbedingt nötig. Da die eingesetzte Katalysatormenge in technischen Prozessen auch ein Kostenfaktor darstellt, ist es sinnvoll die Menge an Aminosäure bis auf ein erforderliches Maß zu senken. Da ein Teil der Aminosäure aber Nebenreaktionen zum Opfer fällt, kann die Menge wohl nicht auf katalytisches Maß beschränkt werden. Durch die Bestimmung der Differenz zwischen zugesetztem und wiedergewonnenen Asparagin (ASN) soll der Verbrauch bestimmt werden. In der Versuchsreihe wird als Ansatz 50 g/L Rhamnose mit definierten Mengen an Katalysator in einem Bereich von 5-100g/L Asparagin verwendet. Es wird 9 Stunden in einen Natriumphosphatpuffer, 0,1M, pH 7 refluxiert. Zu Vergleichszwecken wird dabei weniger auf vollständigen Umsatz als auf die Einhaltung definierter Reaktionsbedingungen geachtet. Abbildung 3-22 zeigt die Abhängigkeit der Ausbeute von der Menge an eingesetzten Katalysator:

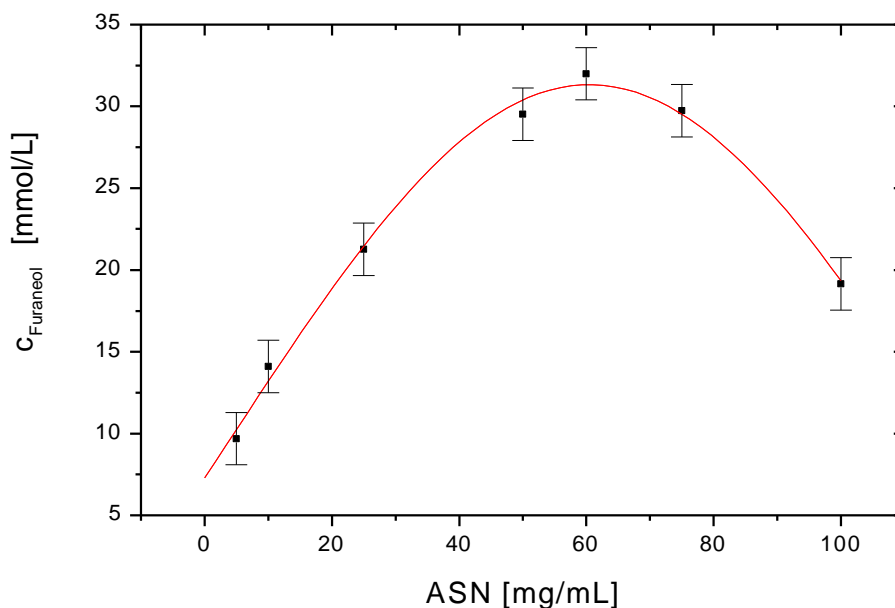


Abbildung 3-22: Konzentration an Furaneol® in Abhängigkeit von der Menge an eingesetzter Aminosäure, 0,5g Rhamnose, 10mL NaH₂PO₄-Puffer, 0,1M, pH 7, 9h

Bei höheren Konzentrationen erreicht die Löslichkeit des Asparagin ihr Limit und begrenzt somit die in Lösung einsetzbare Katalysatormenge. Man kann erkennen, daß bei niedrigen Konzentration die Menge von Katalysator nicht ausreichend war, um die Reaktion zu voranzutreiben.

Das Maximum an Ausbeute wurde bei Mengen von 60 g/L erreicht. Bei der Rückgewinnung der Aminosäure ergibt sich aus der Differenz der Bestimmung der Masse nach der Reaktion und der eingesetzten Menge an Aminosäure, unter Berücksichtigung des Löslichkeitsproduktes, ein Verbrauch von 7 %.

Bei hohen Konzentrationen an Aminosäure sinkt die Ausbeute an Furaneol[®] wieder. Dies deutet auf eine Beteiligung des Asparagins an Nebenreaktionen hin. Tatsächlich waren die Lösungen mit einem hohem Anteil an Aminosäure stärker gefärbt, als die mit einem niedrigen Anteil. Der Verbrauch an Asparagin steigt bei einer Verdoppelung der eingesetzten Aminosäuremenge auf das 1½-Fache.

Das Verhältnis des Katalysators zu Rhamnose ist nicht nur wichtig, um die Wirtschaftlichkeit des Prozesses zu garantieren, sondern es hat ebenfalls Einfluß auf das Gelingen der Reaktion. Eine Optimierung der Katalysatormenge resultiert in einer Reduzierung der eingesetzten Menge von Asparagin und einer Steigerung der Ausbeute. Ein Maximum an Ausbeute wird bei gleichen Mengen an eingesetzten Katalysator zur Ausgangskomponente Rhamnose erreicht. In Bezug auf Katalysatorpreis zur Raum/Zeit-Ausbeute sind niedrigere Konzentrationen an Katalysator evtl. zweckmäßiger.

3.3.4 Abhängigkeit der Ausbeute vom Reaktionsmedium

In den vorangegangenen Versuchen hatte sich Natriumphosphatpuffer als Reaktionsmedium bewährt. Dieser Puffer wird in vielen biotechnologischen Prozessen erfolgreich angewendet. Die Wahl als Reaktionsmedium zur Durchführung eines natürlichen Prozesses erscheint daher zweckmäßig. Es ist zudem recht kostengünstig. Es sollte jedoch auch untersucht werden inwiefern ein anderes Reaktionsmedium die Reaktion beeinflusst.

Die Reaktion in bidestilliertem Wasser verläuft erfolglos. Durch Zugabe des Katalysator wird der pH-Wert in den für die Reaktion ungünstigen sauren Bereich verschoben. Furaneol[®]-Bildung wird nicht nachgewiesen.

Im weiteren Verlauf werden toxikologisch unbedenkliche Puffersysteme in einem Bereich von pH 5 bis pH 7 untersucht. Diese Vorgaben reduzieren die Anzahl der möglichen verwendbaren Puffer erheblich. Schließlich werden zwei Puffer mit dem bisher verwendeten Natriumphosphatpuffer verglichen. Zusätzlich wird Ethanol, welches lebensmittelrechtlichen Anforderungen (GRAS) entspricht wird, auf seine Verwendbarkeit als Reaktionsmedium untersucht.

Folgende Medien werden untersucht:

- N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethanesulfonic acid (BES)-Puffer, 0,1 M
- Citratpuffer, 0,1 M
- NaH₂PO₄-Puffer, 0,1 M
- Ethanol

Zur Reaktion werden die in den Kapiteln 3.3.1 bis 3.3.3 optimierten Bedingungen verwendet, d.h. 0,05 g/l Edukt und Katalysator, 0,1 M Puffer, pH 7, 8 Stunden refluxiert.

Die Ergebnisse, die mit BES, dem Vertreter der auf substituierten Aminoverbindungen basierenden Puffersysteme, erzielt werden, sind unzureichend. In allen Versuchen wird Furaneol[®] nur in geringen Ausbeuten erhalten. Es wird die Bildung von Nebenprodukten in beachtlichen Maße gemessen. Der Anteil des Furaneol[®]-Peaks an der Gesamtpeakfläche beträgt nur 6,5 %. Dieses Reaktionsmedium ist damit nicht geeignet.

Die erzielten Ausbeuten an Furaneol[®] im Reaktionsmedium Citratpuffer entsprechen denen der Reaktion in Natriumphosphatpuffer. Auch der Anteil an weiteren detektierten Verbindungen war entsprechend. Der Anteil des Furaneol[®]-Peaks an der Gesamtpeakfläche

betrug 72%. Allerdings muß angemerkt werden, daß zum Einstellen des Citratpuffers Na_2HPO_4 verwendet wird. Ein Einfluß des Phosphats auf die Reaktion kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Mit Natriumphosphat als Puffer werden die bereits schon bekannten Ausbeuten und Peakverhältnisse erhalten. Dieses Reaktionsmedium scheint daher hervorragend geeignet zur Durchführung der Reaktion. Zudem hat Natriumphosphatpuffer gegenüber den meisten anderen Puffersystemen einen Preisvorteil. Die Wahl als ideales Puffersystem hat sich damit bestätigt.

Reaktion in Ethanol liefern völlig andere Ergebnisse. Als erstes fällt das völlig andere Aroma der erhaltenen Lösung auf; ein Geruch nach Rum wird festgestellt. HPLC-Analysen ergeben, daß Furaneol[®] in der Lösung nur in geringem Maße gebildet wird. Die Analyse mittels GC-MS weist ein breites Spektrum an Pyrazinen und Pyrazinderivaten nach.

Die Wahl eines organischen Lösemittels für die Reaktion beeinflusst die Darstellung des gewünschten Produktes im negativen Sinne. Mögliche Ursache ist der Mangel des für die Reaktion essentiellen Wassers. Umlagerungen am Zucker werden erschwert. Statt dessen scheint die Fusion des Katalysator mit dem Edukt und anschließender innermolekularer Umwandlung begünstigt.

3.3.5 Zusammenfassung

Mit den in den vorangegangenen Kapiteln erhaltenen Ergebnissen läßt sich die Reaktion in Bezug auf Reaktionsdauer, und –Temperatur, pH und Menge der Aminokomponente erfolgreich optimieren.

Zur maximalen Ausbeute in einem bei pH 7 gepufferten, wäßrigen Medium sind gleiche Mengen an Edukt und Katalysator (Asparagin) nötig. Erhöhung der Reaktionstemperatur steigert die Ausbeute und verkürzt die Reaktionszeit. Bei einer Reaktionstemperatur von 100°C wird das Maximum von 40% der Ausbeute bei 8 bis 9 Stunden durchlaufen, bei 150°C in einem Autoklaven ist die Ausbeute nach 4 bis 5 Stunden maximal. Es können 60 % an Ausbeute bezogen auf eingesetzte Menge Rhamnose erreicht werden. Längere Reaktionszeiten führen vermehrt zu Nebenprodukten.

Auch die Wahl des Reaktionsmedium hat entscheidenden Einfluß auf die Reaktion. Natriumphosphatpuffer hat sich als ideales Reaktionsmedium bewährt.

Dennoch muß man kritisch mit den gewonnenen Erkenntnissen umgehen. Wie später noch gezeigt wird, ist es nicht sinnvoll die Reaktion unter optimalen Bedingungen bis zum Schluß durchzuführen. Die Menge an gebildeten braunen Farbstoffen und Pigmenten (Melanoidinen) behindert in hohem Maße die weitere Aufarbeitung und macht zusätzliche Schritte erforderlich. Somit muß abgeschätzt werden, ob eine verkürzte Reaktionszeit und somit eine niedrigere Ausbeute nicht günstiger ist, da sich dadurch auch weniger Melanoidine bilden und unter Umständen eine einfachere Aufarbeitung möglich macht. Die verschiedenen Möglichkeiten zur Aufarbeitung werden im nächsten Kapitel beleuchtet.

4 Aufarbeitungsmethoden

Der Aufarbeitung zur Reingewinnung der synthetisierten Verbindungen wird im allgemeinen einen viel zu geringen Stellenwert in der akademischen Forschung eingeräumt. Während bei biotechnologischen Prozessen zur Darstellung hochwertiger Stoffe der Anteil der Produktionskosten eher gering ist (8-10% bei einem fermentativen Prozeß), haben die Aufarbeitungskosten den Hauptanteil an den Gesamtkosten. Eine intelligente Aufarbeitung, auf die bereits während des Darstellungsprozesses hingearbeitet wird, kann die Produktionskosten erheblich senken und wirkt sich damit entscheidend auf die Ökonomie eines Prozesses aus.

Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches hat sich im Laufe der Forschungsarbeit als ein „Bottleneck“ des Prozesses herausgestellt. Die Empfindlichkeit des Furaneol[®] gegen Hitze und insbesondere Sauerstoff, schränkt die Möglichkeiten der Aufarbeitung in großem Maße ein. Es bedarf zusätzlich besonderer Maßnahmen, um Ausbeuteverluste während der Aufarbeitung zu minimieren.

Betont werden muß, daß selbstverständlich auch bei der Aufarbeitung nur Methoden verwendet werden dürfen, die in Übereinstimmung mit bestehenden Lebensmittelrecht sind, wenn das Produkt als natürlich gelten soll. Dies betrifft z.B. die Verwendung von Lösungsmitteln zur Extraktion. Die von *Decnop* vorgeschlagene Isolierung [DECNOP, 1990] mittels Destillation in Gegenwart von hochsiedenden organischen Lösungsmitteln konnte nicht reproduziert werden. Die Zersetzungstemperatur, die beim Furaneol[®] im Bereich der Schmelztemperatur liegt, ließ alle Unternehmungen mißlingen. Man erhielt stets ein schwarzes Polymer.

4.1 Klassische Aufarbeitungsmethoden

Die bei den Versuchen erhaltene Ausbeute reicht aus, das Furaneol[®] aus der Lösung durch Temperatursenkung zu fällen. Jedoch ist der Niederschlag wachsartig und braun gefärbt. Umkristallisierungsversuche mißlingen. Man erhält stets einen braun gefärbten Niederschlag. Deshalb soll zunächst die Extraktion und Umkristallisation mit Hilfe organischer Lösungsmittel untersucht werden.

4.1.1 Extraktion mit Hilfe organischer Lösungsmittel

Zunächst wird die Flüssig-Flüssig-Extraktion der Reaktionslösung zur Produktisolierung unternommen. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung wird immer als Mischung von Furaneol[®] mit variierenden Mengen an Neben- und Zersetzungsprodukten analysiert. Andere Verbindungen, die leicht optisch erkannt werden können, werden als Melanoidine (siehe Kap. 3.2.1) bezeichnet. Sie verleihen der Lösung eine (hier unerwünschte) charakteristische braune Farbe. Deshalb ist eine selektive Extraktion notwendig um ein reines Produkt zu erhalten.

Es werden Extraktionen des Furaneol[®] aus Modellmischungen und aus Reaktionslösungen durchgeführt. Bei der Wahl des Extraktionsmittel wird neben Verfügbarkeit, Polarität und Preis die EU-guideline 88/344/EEC berücksichtigt, die die Verwendung von Solventien zur Extraktion in Bezug auf Lebensmittel reguliert. Solventien, aufgeführt in dieser Richtlinie, werden betrachtet als „generally regarded as safe (GRAS)“.

Jedoch, zu Vergleichszwecken, werden auch zwei weitere, nicht in dieser Richtlinie aufgeführte, Lösungsmittel in die Untersuchungen mit einbezogen (Chloroform und Dichlormethan). Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der verwendeten Lösungsmittel. Die eingesetzten Reaktionslösungen, sowie alle Proben werden mittels HPLC analysiert.

Tabelle 6: Verwendete Lösungsmittel und deren Eigenschaften

Nr.	Lösungsmittel	Polarität	Löslichkeit in H ₂ O [g/l]	Sdp. [°C]
1	Dichlormethan	↑	20	40
2	Diethylether		12	34
3	Chloroform		8	61
4	iso-Butylacetat		-	97
5	n-Pentan		-	68
6	n-Hexan		-	36

Zum besseren Vergleich werden die Extraktionen jeweils drei mal mit einer aliquoten Menge an Extraktionsmittel durchgeführt. Die organische Phase wird abgetrennt und mit 1 mL H₂O versetzt. Nach Verdampfung des organischen Lösungsmittel im Lyophilisator werden 20 µL der erhaltenen wässrigen Lösung mittels HPLC analysiert.

In den Modellmischungen wird Furaneol[®] von den Edukten quantitativ getrennt. Es ist auch möglich reines Furaneol[®] aus Reaktionslösungen zu isolieren, deren Reaktion bereits nach 2 Stunden beendet wird. Die Analyse im GC-MS zeigt ein einheitliches Produkt (Abbildung 4-1).

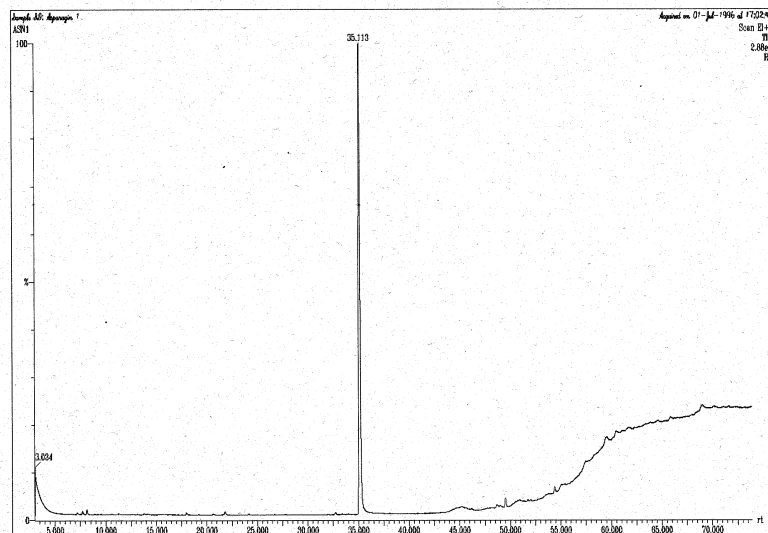


Abbildung 4-1: Analyse der Extraktion aus Reaktionslösungen nach 2 h mittels GC-MS (siehe Text)

Aus Reaktionslösungen mit längerer Reaktionszeit werden gelblich gefärbte organische Phasen bei Extraktion mit Dichlormethan, Chloroform und Iso-Butylacetat erhalten. Die Hauptverunreinigung besteht aus Melanoidinen. Mit diesen Lösungsmitteln werden jedoch

die höchsten Extraktionsraten erhalten (Abbildung 4-2) Bei Extraktion mit den unpolaren Solventien n-Pentan und n-Hexan werden ungefärbte Lösungen erhalten. Die extrahierten Menge sind jedoch sehr gering. Abbildung 4-2 illustriert die Ergebnisse.

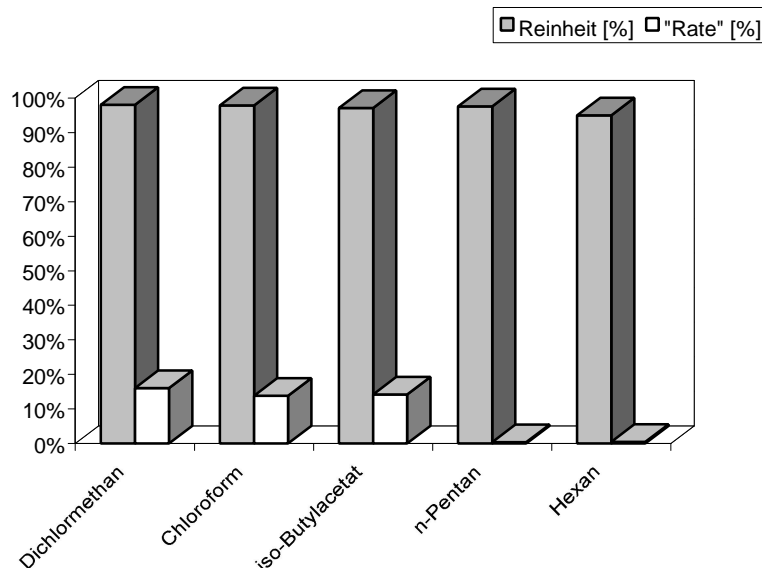


Abbildung 4-2: Ergebnisse der Extraktion mit Hilfe organischer Lösungsmittel. Reinheit bezieht sich auf das Verhältnis gegenüber gleicher Menge an eingewogenem Furaneol^{®11}, Rate bezieht sich auf das Verhältnis von extrahierter Menge zur Gesamtmenge extrahierbaren Furaneols[®].

Mit Chloroform und CH_2Cl_2 werden 13,8 %, bzw. 16 % Furaneol[®] extrahiert. Kalkulationen von Gewicht der eingengten organischen Phase und HPLC-Auswertungen ergaben eine Reinheit von 98 % für beide. Trotz der hohen Reinheit sind beide Extrakte gefärbt.

Mit Iso-Butylacetat wird eine Extraktion von 14,2 % des Furaneols[®] mit einer Reinheit von 97 % erzielt. Die erhaltenen Lösungen sind mehr gefärbt verglichen mit dem Experimenten mit Chloroform, bzw. CH_2Cl_2 als Extraktionsmittel.

Zusätzlich werden kontinuierliche Extraktionen der Reaktionslösungen durchgeführt. Aufgrund der Konstruktion der Anlage kann nur Lösungsmittel mit einer geringeren Dichte als Wasser verwendet werden. Deshalb wird n-Pentan mit Diethylether verglichen. In einer kontinuierlichen Extraktionsanlage wird Reaktionslösung mit beiden Lösungsmitteln 6 Stunden in Kontakt gebracht. Der Extrakt wird aufgearbeitet (siehe oben) und mit Hilfe der HPLC analysiert.

¹¹ bezogen bei Sigma/Aldrich, umkristallisiert bei -25°C

Mit n-Pentan, als Vertreter unpolarer Solventien, werden nur 1 % des Furaneols[®] (nach 6 Stunden) aus der Reaktionslösung extrahiert. Zusätzlich ist der Extrakt gelb gefärbt, was auf Verunreinigungen schließen läßt. Im Raffinat verbleibt kein meßbarer Anteil an Furaneol[®]. Der Verlust des Furaneols[®] aufgrund des niedrigen Siedepunktes und der Leichtflüchtigkeit des n-Pentans, welches gewisse Mengen an Furaneol[®] mitschleppen könnte, ist denkbar.

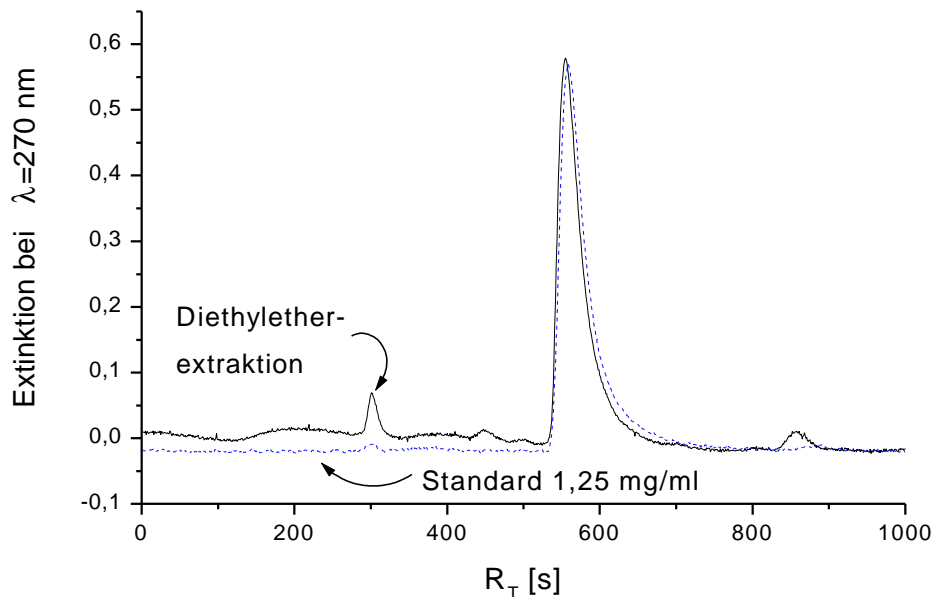


Abbildung 4-3: HPLC-Chromatogramm der kontinuierlichen Extraktion mittels Diethylether, Verdünnung 1:16, Detektion UV-VIS-Spektrometer, $\lambda=270$ nm

Extraktionsexperimente mit Diethylether resultierten in einer tiefschwarz gefärbten Lösung. Es werden 20 % des gewünschten Produkts, bezogen auf eingesetzte Menge im Extrakt, extrahiert. Die HPLC-Analyse zeigt die Anwesenheit einer weiteren Verbindung (Abbildung 4-3, $R_T=300$ s). Ebenfalls wird ein weiterer Peak bei $R_T=860$ s detektiert. Aufgrund der starken Färbung der Lösung könnte es sich hierbei um die sonst schwer detektierbaren Melanoidine handeln. Leider ist eine weitere Charakterisierung nicht möglich.

Die Polarität des Diethylethers und die Eigenschaft bis zu 7 % H_2O zu lösen, führt zu einer unselektiven Extraktion von verschiedenen Verbindungen neben Furaneol[®].

4.1.2 Abtrennung der farbigen Verunreinigungen

4.1.2.1 Festphasenextraktion mit Aktivkohle und makroporösen Materialien

Es hat sich gezeigt das ganz besonders die Melanoidine aufgrund ihrer ähnlichen Polarität vom gewünschten Produkt schwer abzutrennen sind. Deshalb wird zur Entfärbung der Reaktionslösung die Adsorption der Melanoidine an Aktivkohle getestet. In Versuchsreihen werden im Batch 100mL Reaktionslösung (enthält 1 – 25 g Furaneol) mit 10 g Aktivkohle versetzt (Granulat und. Pulver). Alternativ wird die Aktivkohle in eine handelsübliche HPLC-Säule gefüllt und läßt die Reaktionslösung hindurchfließen. Das Elutionsverhalten wird beobachtet.

Es zeigt sich, daß auch erhebliche Mengen an Furaneol[®] von der Aktivkohle adsorbiert werden, während das Permeat gefärbt bleibt. Re-Elutionsversuche des Furaneols[®] mit Hilfe von H₂O und Ethanol verlaufen erfolglos. Alle Lösungen sind ausnahmslos durch Melanoidine gefärbt. Im Permeat noch im Eluat kann in keinem Fall Furaneol[®] nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Aktivkohle kann also keine selektive Abtrennung der braunen Pigmente erreicht werden. Zudem wird die Ausbeute an Furaneol[®] erheblich gemindert.

Ähnlich verhält es sich bei der Verwendung von makroporösen Materialien, wie sie auch bei der Aufreinigung von Melassen eingesetzt werden. Die Materialien werden in einem pH-Bereich von 0 - 7 getestet. Bei pH 0 konnte eine teilweise Trennung erreicht werden, die allerdings stark von dem Verdünnungseffekt überlagert wird.

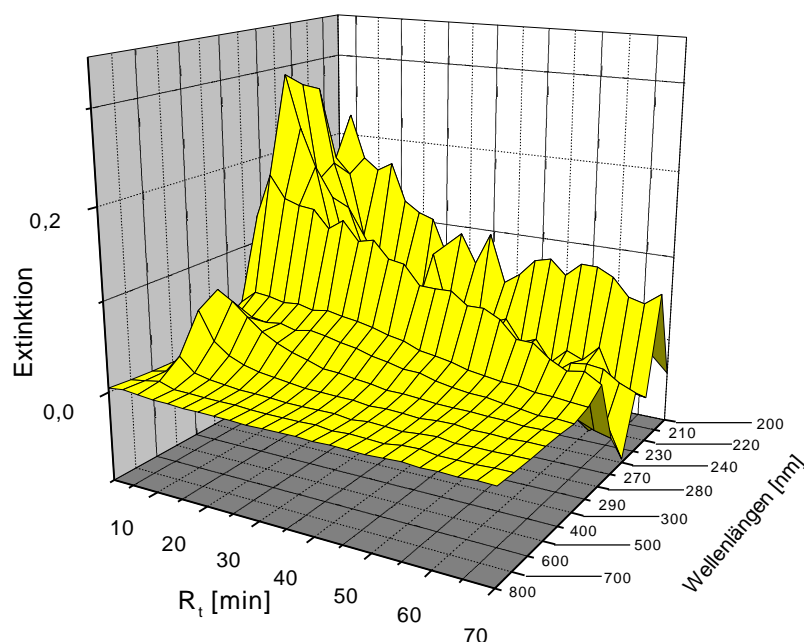


Abbildung 4-4: Entfärbung der Reaktionslösung, Elutionsprofil einer Probe (5 mL) auf Diaion WA30, UV-VIS-Detektion, Flußrate: 1 mL/min, 25°C

Die erhaltenen Lösungen sind jedoch auch hier leicht gelblich gefärbt. Abbildung 4-4 zeigt das Elutionsprofil einer Probe, die über eine Säule (20 cm · 5 cm) gefüllt mit Diaion WA30 bei pH 0 gegeben wird. Furaneol[®] wird auf der Säule nicht zurückgehalten und eluiert bereits nach 5 min. Es besitzt ein langes „Tailing“ bis zur 20. Minute. In dieser Zeit eluieren auch ein Großteil der Melanoidine (ab 10 min). Die Lösung weißt bis ca. 50 Minuten noch eine leichte Gelbfärbung auf. Die Salze des Puffers werden kontinuierlich von der Säule gewaschen. Um einen eventuell störenden Einfluß auszuschließen, muß die Lösung daher zuerst entsalzt werden. Diaion MWA-1 liefert analoge Ergebnisse. Die Adsorption an der Oberfläche der makroporösen Substanzen scheint zu unspezifisch und daher nicht geeignet zu sein, Furaneol[®] von den Melanoidinen selektiv zu trennen

4.1.2.2 Enzymatische Hydrolyse der Melanoidine

Die Abtrennung der Melanoidine erweist sich als äußerst schwierig (siehe. Kap. 4.1.2). Daher werden Untersuchungen zur enzymatischen Spaltung dieser Verbindungen unternommen. Die dabei erhaltenen Spaltprodukte lassen sich evtl. besser von dem gewünschten Produkt abtrennen. Verschiedene hydrolytische Enzyme werden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die in der Reaktionslösung enthaltenen Makromoleküle zu spalten. Da die Struktur dieser Moleküle im Detail nicht bekannt ist, werden Enzyme verschiedener Kategorien dieser Enzymklasse zum Einsatz gebracht.

Dabei werden die Enzyme nativ und immobilisiert eingesetzt. Die einzelnen Enzyme und die Art der Anwendung sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Die Aktivitäten der nativen Enzyme entsprechen den Herstellerangaben. Die Immobilisierung wird mittels Differenzbestimmung durch BCA-Tests vor und nach Immobilisierung überwacht. Die Aktivität beträgt im Mittel ein Viertel der nativen Enzyme.

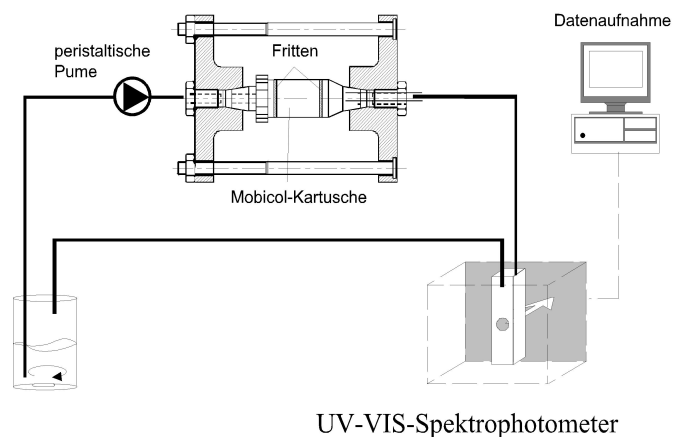


Abbildung 4-5: Enzymatische Spaltung der Melanoidine und Messung der Enzymaktivität

Tabelle 7: Daten der benutzten Enzyme, Immobilisierung und Versuchsbedingungen

	Lieferant	Quelle:	EC	m _{Enzym}	t ¹²	pH ¹³	Träger
Pepsin	Sigma	Schweinebauch	3.4.23.1	500 mg	24 h	2-7	VA-epoxy
Lipase	Sigma	mikrobiell	3.1.1.3	250 mg	24 h	7	VA-epoxy
Lipase PS	Amano	mikrobiell	3.1.1.3	250 mg	24 h	7	VA-epoxy
Esterase		<i>Mucor miehei</i>	N/A.	250 mg	24 h	6-7	VA-epoxy
α-Chymotrypsin	Sigma		3.4.21.1	100 mg	24 h	6-9	VA-epoxy
Trypsin	Fluka	Rinderpankreas		100 mg	24 h	6-9	VA-epoxy
Acylase I	Sigma		3.5.1.14	100 mg	24 h	7	VA-epoxy
α-Amylase	Sigma	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.2.1.1	70 mg	24 h	7	VA-epoxy
Arginase	Sigma	Rinderleber	3.5.3.1	25 mg	24 h	7	VA-epoxy
Lysozyme	Serva	Hühnererei	N/A.	250 mg	24 h	7	VA-epoxy
Calf Rennet extract (Chymosin, Bovine Pepsin)	Wiesby	Kalb	-	1 ml	24 h ¹⁴	7	VA-epoxy

Abbildung 4-5 zeigt den Aufbau, der bei diesen Untersuchungen verwendet wird. Diese Konstruktion wird adaptiert aus Experimenten zur Messung von Enzymaktivität der Immobilisate. Die Reaktionslösung wird mittels einer peristaltischen Pumpe zirkuliert während das immobilisierte Enzym in der Enzymkartusche (Membran-Reaktor bei nativen Enzymen) zurückgehalten wird. Der Fortschritt der enzymatischen Spaltung wird mit Hilfe eines UV-VIS-Spektrophotometers verfolgt. Die Dauer der Experimente beträgt jeweils 24 Stunden.

Die Ergebnisse sind unbefriedigend. Es wurde keine signifikante Spaltung gemessen. Die Lösungen bleiben gefärbt.

Die verwendeten Enzyme zeigen keine Affinität zu den zu spaltenden Melanoidinen. Dies kann einerseits mit der schlechten Zugang zum aktiven Zentrum dieser Makromoleküle und andererseits durch eine schlechtere Erkennung verglichen zum natürlichen Substrat der Enzyme erklärt werden. Das führt im Falle eines Enzym-Substrat-Komplexes zu einer weniger aktiven Konformation im aktiven Zentrum des Enzym, möglicherweise sogar zur Inaktivierung des Enzyms durch deren Spaltprodukte.

¹² Inkubationsdauer mit 2 mL Reaktionslösung

¹³ Eingesetzt im pH-Bereich

¹⁴ Inkubationsdauer mit 1 mL Reaktionslösung

4.1.3 Zusammenfassung

Mit Hilfe organischer Lösungsmittel kann Furaneol[®] aus „jungen“ Reaktionslösungen in großer Reinheit extrahiert werden. Die Extraktion der Reaktionslösung bei fortgeschrittener Reaktion mit organischen Lösungsmittel erzielt eine Aufkonzentrierung an Furaneol[®]. Dabei wird mit den halogenierten Kohlenwasserstoffen, Chloroform und Dichlormethan die größte Menge extrahiert. Von den nach GRAS zertifizierten Lösungsmitteln extrahiert Isobutylacetat die größte Menge an Furaneol[®].

Durch kontinuierliche Extraktion kann mit Diethylether als Extraktionsmittel 20 % der eingesetzten Menge extrahiert werden.

Bei allen Extraktionen ist das erhaltene Produkt durch färbende Substanzen verunreinigt. Dies erfordert eine vorausgehende Aufreinigung durch Abtrennung dieser Substanzen vom gewünschten Produkt. Die Entfernung der färbenden Substanzen mit Hilfe von Aktivkohle kann nicht erreicht werden. Dabei kann das Furaneol[®] im untersuchten Konzentrationsbereich weder im Permeat noch im Eluat (H₂O oder Ethanol) nachgewiesen werden. Dies kann als eine hohe Affinität des Furaneol[®] zu Aktivkohle gedeutet werden; wahrscheinlicher ist jedoch eine Zersetzung des Furaneols[®] an Aktivkohle. Indes werden die Melanoidine unselektiv von der Säule gewaschen.

Eine Trennung des Furaneols[®] von den Melanoidinen durch Retention letzterer auf makroporösen Materialien scheitert ebenso. Die enzymatische Spaltung der Melanoidine mißlingt ebenfalls.

4.2 Innovative Aufarbeitungsmethoden

Im folgenden sollen innovative Aufarbeitungsmethoden behandelt werden, die zum Teil schon in der Lebensmittelindustrie Verwendung finden. So wird überkritisches CO_2 seit einiger Zeit als Extraktionsmittel in der Entkoffeinierung eingesetzt [ZOSEL, 1970] und hat damit die gesundheitlich sehr bedenklichen Verläufer Methylenchlorid und Benzol ersetzt. In der Aromenindustrie werden mit Hilfe des superkritischen CO_2 hauptsächlich ätherische Öle extrahiert [LACK, 1985].

Zeolithe werden erfolgreich als Katalysatoren in der Erdölindustrie eingesetzt [BRECK, 1974]. Ebenfalls werden sie erfolgreich im „downstream processing“ chromatographisch schwer trennbarer Aminosäuren [SCHÄFER-TREFFENFELDT, 1997] und Mehrfachzucker [WACH, 1994, BUTTERSACK, 1993] angewandt. Über Ihre Verwendungsmöglichkeit zur Aufreinigung von Aromastoffen ist wenig bekannt.

4.2.1 Aufarbeitung durch Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid

Überkritische Fluide stellen eine interessante Alternative zu herkömmlichen Lösungsmitteln dar und zeichnen sich durch besondere Solvations- und Fluiditätseigenschaften aus. Weiteren Einsatz finden sie als unkonventionelle Reaktionsphasen für biokatalysierte Reaktionen [MARTY, 1992, TSERVISTAS, 1997, HARTMANN, 1998].

Die Abbildung 4-6 zeigt das Phasendiagramm von Kohlendioxid. Für jeden gegebenen Druck und Temperatur läßt sich der entsprechende Zustand ablesen. Das

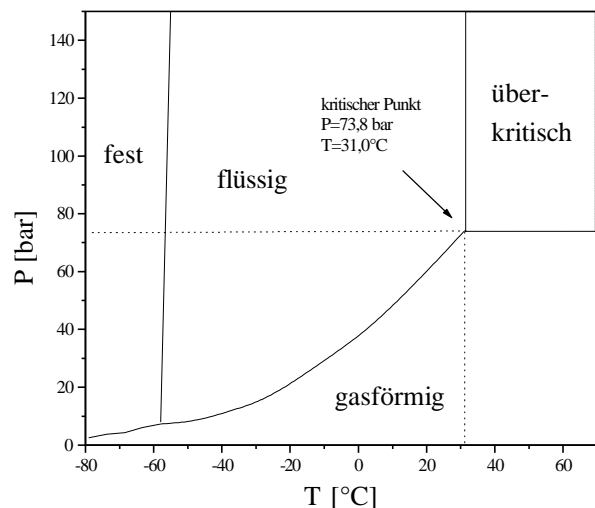


Abbildung 4-6: Phasendiagramm von CO_2 [TSERVISTAS, 1997]

Gebiet des flüssigen und des gasförmigen Zustandes wird von der Liquiduskurve getrennt. Diese endet abrupt am kritischen Punkt. Oberhalb des kritischen Punktes sind Gas und Flüssigkeit nicht mehr zu unterscheiden. Es findet keine Phasentrennung mehr statt. Bewirkt wird dies durch die gleichen Dichten der flüssigen und gasförmigen Phase. Dieser Zustand

wird überkritisch, oder superkritisch genannt. Daß es sich bei diesem Zustand sowohl um eine Flüssigkeit als auch um ein Gas handelt, spiegelt sich in vielen physikalischen Eigenschaften wieder. Tabelle 8 zeigt einige physikalische Größen für CO₂ im flüssigen, gasförmigen und überkritischen Zustand:

Tabelle 8: Physikalische Eigenschaften von Kohlendioxid [Luque de Castro, 1994]

	Flüssig	Gasförmig	Überkritisch
Dichte [g/cm ³]	1	1·10 ⁻³	0,4 - 1,0
Viskosität [g/cm·s]	3·10 ⁻²	1·10 ⁻⁴	3·10 ⁻⁴
Diffusionskoeffizient [cm ² /s]	2·10 ⁻⁶	1·10 ⁻¹	7·10 ⁻³

Aus der Tabelle läßt sich entnehmen, daß das überkritische Fluid etwa die Dichte einer Flüssigkeit besitzt. Die Viskosität ähnelt hingegen der eines Gases, d.h. es besitzt quasi keine Oberflächenspannung. Die Strömungswiderstände in Fließsystemen sind um Größenordnungen geringer und der Stofftransport ist begünstigt. Der Diffusionskoeffizient liegt in seiner Größenordnung zwischen den Werten für Gas und Flüssigkeit.

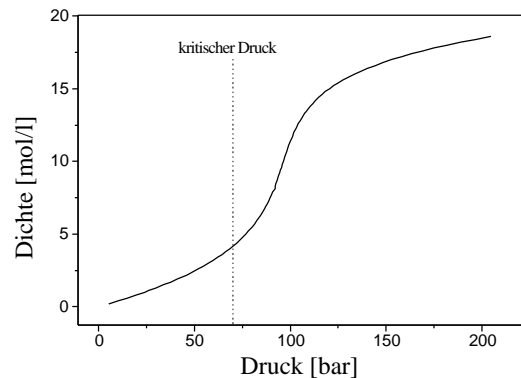


Abbildung 4-7: Druckabhängigkeit der Dichte von CO₂ bei 45 °C [BRUNO, 1989]

Die Dichte eines Fluids ist im wesentlichen bestimmend für seine Solvatationskraft. Bei überkritischen Fluiden variiert sie in der Nähe des kritischen Punktes stark mit dem Druck. Abbildung 4-7 zeigt die Dichte von Kohlendioxid in Abhängigkeit vom Druck oberhalb der kritischen Temperatur [BRUNO, 1989]. So läßt sich über den gewählten Betriebsdruck die Solvatationskraft des Lösungsmittels über einen weiten Bereich stufenlos einstellen. Dabei kann sowohl im überkritischen als auch im Phasengebiet nahe unterhalb des kritischen Punktes gearbeitet werden [KING, 1993]. Für die Solvatationskraft von Kohlendioxid gelten folgende Richtlinien [BORNSCHEUER, 1993]:

- Die Solvatationskraft steigt mit steigender Temperatur bei konstanter Dichte.
- Die Solvatationskraft steigt mit steigender Dichte bei konstanter Temperatur.

Der wesentliche Vorteil für die technische Anwendung ist die toxikologische Unbedenklichkeit von Kohlendioxid. Es ist chemisch relativ inert, nicht brennbar und stellt keine Umweltbelastung dar. Neben Luft, Stickstoff und demineralisiertem Wasser ist es ausdrücklich vom Zusatzstoffverbot für Lebensmittel ausgenommen (§11, Abs. 2, Nr. 2 LMBG) [CAPEWELL, 1994]

Die EG Vorschrift 88/344/EEC zur Verwendung von Extraktionsmitteln in der Lebensmitteltechnologie klassifiziert SCCO₂ als GRAS-Solvens (**Generally Regarded As Safe**) [KING, 1993]. Für den Einsatz auf dem Lebensmittel- und Pharmaziesektor ist CO₂ besonders geeignet, da es sich durch einfache Druckerniedrigung rückstandsfrei entfernen läßt. Darüber hinaus ist CO₂ auch in hoher Reinheit preisgünstiger als die meisten Lösungsmittel entsprechender Qualität.

Der Nachteil von überkritischem Kohlendioxid ist der hohe kritische Druck von 73,8 bar, der einen großen apparativen Aufwand erforderlich macht und die Kontrolle der Prozesse sehr erschwert. Die damit verbundenen hohen Investitionskosten schrecken noch viele Unternehmen von der Anwendung im industriellen Maßstab ab.

Die Extraktion mit Hilfe von SCCO₂ birgt auch Nachteile. So lassen sich z.B. Alkaloide aufgrund der Bildung der unlöslichen Carbonate nicht extrahieren. Ebenfalls sind Extraktionen von leichtflüchtigen Verbindungen in der Literatur kaum beschrieben.

Dennoch gibt es schon Unternehmen, die wirtschaftliche Prozesse mit SCCO₂ im industriellen Maßstab betreiben. Bekannteste Beispiele sind die Entkoffeinierung und die Hopfenextraktion [TAYLOR, 1996]

4.2.1.1 Extraktionen von Furaneol[®] mit überkritischem Kohlendioxid

Für die Extraktion des Furaneols[®] mit überkritischem Kohlendioxid wurde eigens eine Anlage entworfen. Abbildung 4-8 zeigt den schematischen Aufbau der Extraktionsapparatur. Die Bauteile sind der HPLC-Technik entliehen und konzipiert um Drücke bis zu 250 bar zu realisieren. Das modulare System läßt sich vorteilhaft für die Optimierung der Versuchsaufbauten nutzen. So läßt sich relativ kostengünstig eine leistungsfähige Hochdruckapparatur realisieren.

Da das Sicherheitsventil bei etwa 230 bar anspricht, hat man bei 200 bar einen Arbeitsspielraum von 30 bar. Dieser Druck hat sich nach zahlreichen Versuchen als die praktische obere Grenze für einen problemlosen Versuchsbetrieb herausgestellt.

Die Extraktionen werden in einem thermostatisierbaren Ofen durchgeführt, um die Temperatur aller Bauteile über der für überkritische Bedingungen nötigen 31°C zu halten. Um Temperaturschwankungen abzupuffern, die bei manuellen Eingriffen durch Öffnen des Ofens hervorgerufen werden, wird die Betriebstemperatur auf 45°C eingeregelt.

Als Vorlagegefäß diente ein eigens angefertigter Reaktor. Durch die Abmessungen des Restriktors am Auslaßventil wird die Volumenstromgeschwindigkeit innerhalb der Apparatur bestimmt. Die Probe kann sehr einfach durch Expansion des Kohlendioxids entweder in Substanz oder praktikabler durch Einleiten in geeignete Lösungsmittel „getrappt“ und anschließend mittels HPLC analysiert werden.

Die Gewinnung des Furaneol[®] als reine Substanz läßt sich als Abscheidung in Form einer weißen Perle am Restriktorausgang beobachten. Daher müssen bei der Abscheidung des Furaneols[®] zusätzliche Vorrichtungen gegen Probleme, wie z.B. das Verstopfen des Restriktors oder Verblasen des gewünschten Produktes, installiert werden.

Für die Untersuchungen wird aufgrund der höheren Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse die Methode des Einleitens in Lösungsmittel verwendet.

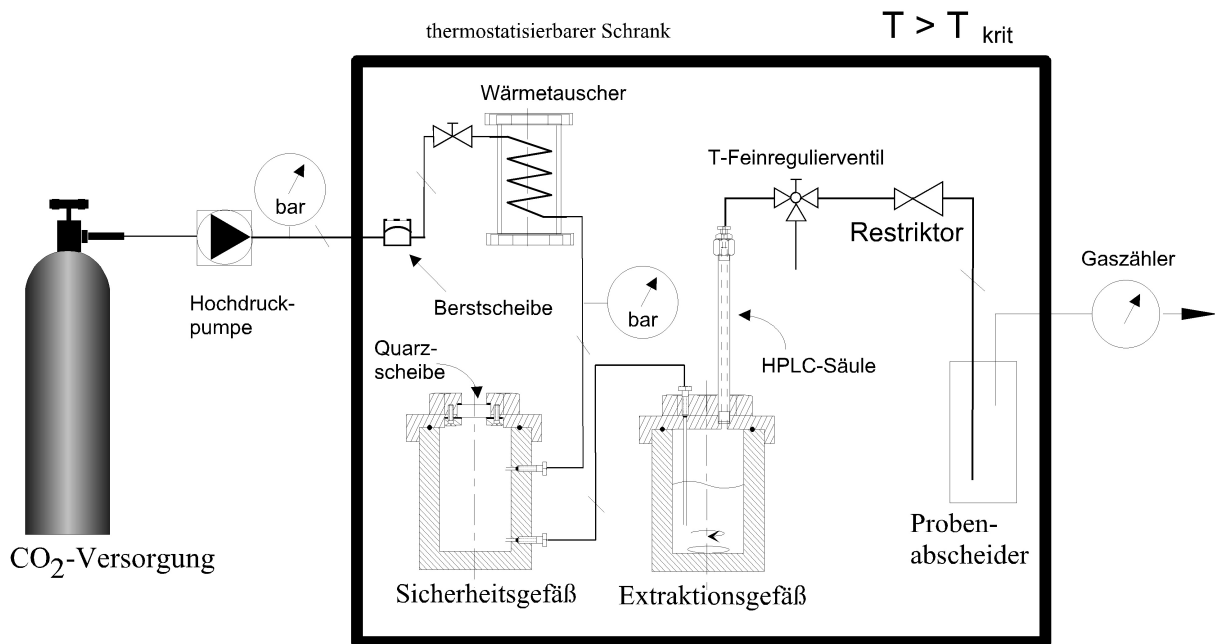


Abbildung 4-8: Versuchsaufbau Extraktion mit SCCO₂ (nicht maßstabsgetreu)

Furaneol[®] hat eine nur geringe Löslichkeit in SCCO₂ (vergleichbar mit der in Hexan). Diese Löslichkeit kann aber erhöht werden durch Spuren von Wasser in der überkritischen Phase, was zu einer Erhöhung der Polarität des SCCO₂ führt.

Dieser Effekt wird ausgenutzt, da die Extraktion stets aus der Reaktionslösung nach durchgeführter Reaktion ohne jede Aufarbeitung und damit aus einer wässrigen Phase erfolgt. Daher kann die überkritische Phase als gesättigt an Wasser angesehen werden.

In Vorversuchen wurde Furaneol[®] erfolgreich aus Modellmischungen extrahiert [TSERVISTAS, 1997]. Extraktionen einer Reaktionsmischung bei 100 bar und 45°C für 6 Stunden mit Ethanol als „trap“, bestätigen diese Ergebnisse. Analysen mittels HPLC zeigen keine weiteren Substanzen neben dem Furaneol[®].

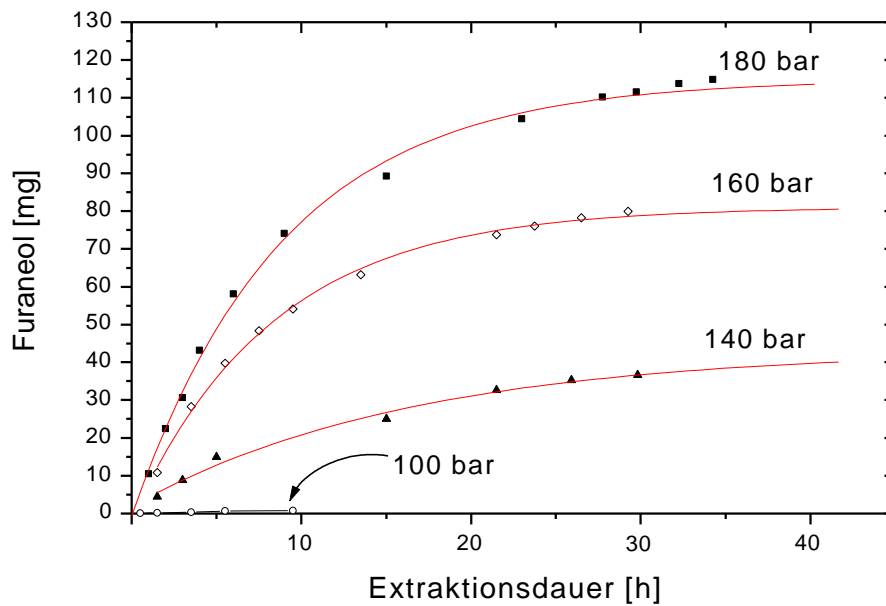


Abbildung 4-9: Extraktion von Furaneol[®] in Abhängigkeit vom Betriebsdruck; $m_i=120\text{mg}$

Abbildung 4-9 zeigt die Extraktionen bei verschiedenen Drücken zwischen 100 bar und 180 bar. Die Temperatur bei diesen Versuchen beträgt 45°C . Es wurden jeweils $V_i = 30\text{ mL}$ vorgelegt. Um Limitierungen durch Konzentrationsgradienten innerhalb der wässrigen Phasen vorzubeugen, wird die wässrige Phase ständig gerührt. Im Diagramm ist die absolut extrahierte Menge gegen die Extraktionszeit aufgetragen.

Durch die Erhöhung des Druckes konnte eine größere Menge an Furaneol[®] extrahiert werden. Dieser Effekt nivelliert ab einem Druck von $\sim 180\text{ bar}$. Bei 160 bar werden bereits 69% der Initialmenge Furaneol[®] extrahiert. Bei einem Druck von 180 bar wird Furaneol[®] fast quantitativ aus der Vorlage innerhalb von 34 Stunden extrahiert (75 % innerhalb 15 Stunden). Die Beladung ist von der Dichte des Kohlendioxids abhängig. Im untersuchten Meßbereich steigt die Extraktionsrate mit dem Druck. Da die Änderung der Dichte ab Drücken oberhalb von $\sim 180\text{ bar}$ abnimmt, verringert sich der Einfluß der Druckänderung auf die Beladung des Extraktes. Die größten Effekte werden daher im untersuchten Meßbereich erhalten.

Es scheint, daß die Kurven einem Grenzwert zustreben. Dies trifft für die ausschließliche Betrachtung der Extraktion nicht zu. Die extrahierbare Menge ist lediglich durch die Menge in der Vorlage begrenzt.

Mit fortgeschrittener Extraktion nimmt die Extraktionsrate ab, d.h. es wird mehr Zeit benötigt um die gleiche Menge an Furaneol[®] zu extrahieren. Durch die Oxidations- und Temperaturempfindlichkeit zersetzt sich während der Extraktion ständig ein Teil des Furaneols[®]. Dadurch verringert sich die Menge an extrahiertem Furaneol[®]. Wenn die

Zersetzungsrate gleich, bzw. größer der Extraktionsrate ist, wird Netto kein Furaneol[®] in der Probe detektiert. Nach circa 30 Stunden ist die Konzentration an Furaneol[®] in der Traplösung zu gering, um mittels HPLC analysiert werden zu können. Die Extraktion wird dann gestoppt. In Abbildung 4-1 ist die extrahierte Menge gegen den CO₂-Durchfluß (total) aufgetragen. Die Verzögerung am Anfang der Extraktion ist auf das Reaktorvolumen, welches sich über der wäßrigen Lösung befindet, zurückzuführen. Dieses Volumen muß zunächst verdrängt werden, bevor eine Extraktion beobachtet wird. Es entspricht damit der Verweilzeit des Kohlendioxids im Extraktionsgefäß.

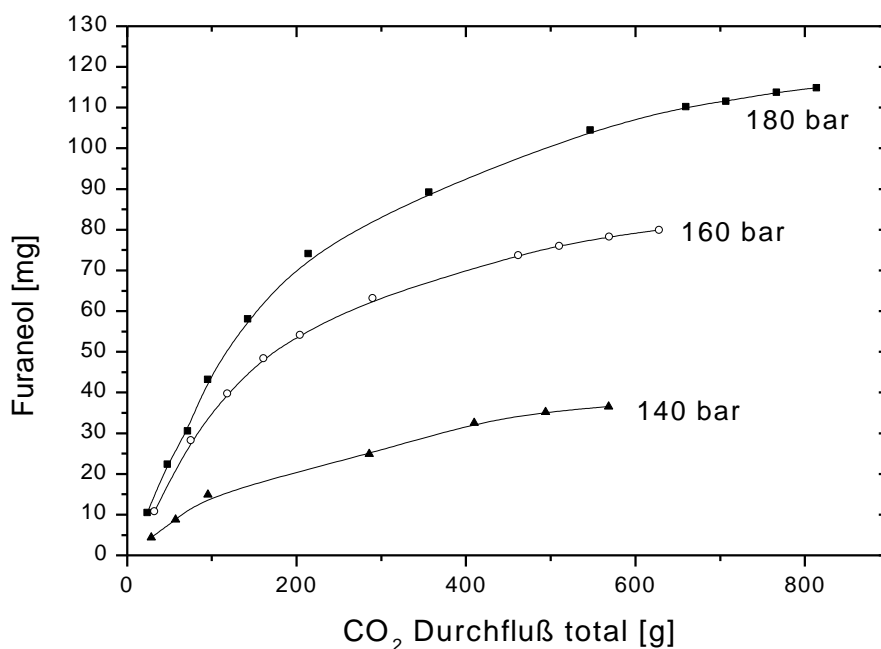


Abbildung 4-10: Extraktion von Furaneol[®] in Abhängigkeit von CO₂-Durchfluß (total)

Die Anfangssteigungen entsprechend im Rahmen der Meßgenauigkeiten den Kurven in der Auftragung gegen die Extraktionszeit (Abbildung 4-9). Das heißt, daß das Kohlendioxid mit der maximalen Beladung den Reaktor verläßt. Zu fortgeschrittener Extraktionszeit verlaufen die Kurven dann flacher als in der Abbildung 4-9. Aufgrund der geringen Restkonzentration des Furaneols[®] im Reaktor ist eine maximale Beladung nicht mehr gewährleistet. Hierzu müßte der Volumenstrom entsprechend verringert werden.

Wie oben bereits erwähnt wurde, ist in diesem Versuchsaufbau der Volumenstrom durch die Abmessungen des Restriktors begrenzt. Da in allen drei Versuchen der gleiche Restriktor verwandt wird, steigt der Volumenstrom proportional mit dem Druck. Daher wird bei 180 bar bei fortgeschrittener Reaktion aufgrund der niedrigen Restkonzentration an Furaneol[®] und des

höheren Volumenstroms ein, im Vergleich zu den anderen Messungen bei niedrigeren Drücken, Mehrverbrauch an Kohlendioxid registriert.

Die erhaltenen Trap-Lösungen bei $p > 140$ bar zeigen eine leichte Färbung. Durch das Anbringen eines handelsüblichen HPLC-Rohres (siehe Abbildung 4-8) konnte die Verfärbung der Trapp-Lösungen herabgesetzt werden. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei diesen Verunreinigungen um begrenzt in überkritischen Kohlendioxid lösliche Melanoidine handelt oder ob Verwirbelungen, durch zum Teil starkes Rühren, bzw. starker Druckabfall innerhalb der Apparatur, ein Austragen von disperser wäßriger Phase hervorrufen.

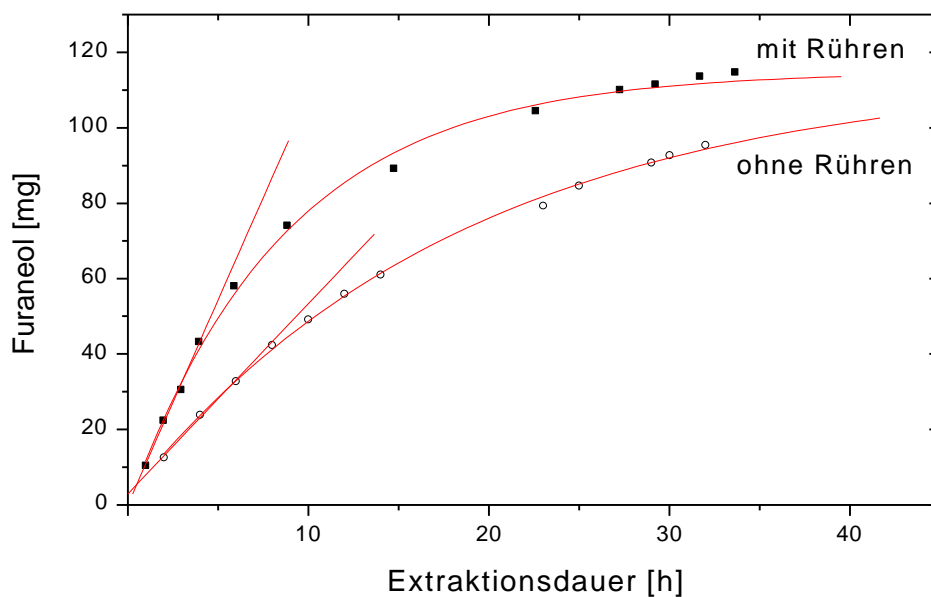


Abbildung 4-11: Extraktion von Furaneol® in Abhängigkeit von der Konvektion; $p=180$ bar; $m_i=120$ mg

Ein Vergleich von Experimenten mit und ohne Rühren während der Extraktion zeigt eine deutliche Limitierung des Transportes durch Diffusion für den Versuch ohne Rühren. Für letzteren wird ein stationäres Konzentrationsprofil innerhalb des Grenzfilms angenommen. Aus dem linearen Anfangsbereich der Extraktion kann der Stoffdurchgangskoeffizient¹⁵ β_0 abgeschätzt werden:

Dazu bedient man sich der Formel für den Stoffübergangskoeffizienten aus dem Filmdiffusionsmodell. Sie geht von einer laminaren Unterströmung und eines Stofftransportes durch Diffusion innerhalb der Grenzschicht aus. Tatsächlich ist diese Konstellation experimentell noch nicht nachgewiesen worden. Jedoch lassen sich einfache Systeme mit

¹⁵ Dieser bezieht sich auf den Stofffluß vom Kernstrom der einen Phase in den Kernstrom der zweiten Phase

dieser Theorie hinreichend genau beschreiben. β_0 ist eine Funktion der Temperatur, der Gesamtkonzentration und der molekularen Eigenschaften.

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = -b_0 \frac{A_i}{V_i} ([Furaneol]_{fl} - [Furaneol]_{CO_2}) \quad \text{Gl. 4.1}$$

Mit:

β_0 : Stoffdurchgangskoeffizient $[Furaneol]_{fl}$: Konzentration an Furaneol[®] in der Flüssigkeit

A_i : Stoffaustauschfläche $[Furaneol]_{CO_2}$: Konzentration an Furaneol[®] in der CO₂-Phase

V_i : Volumen (der Flüssigkeit) $\Delta c/\Delta t$: Konzentrationsänderung in der flüssigen Phase

Überkritisches Kohlendioxid besitzt eine Viskosität in der Größenordnung von Gasen (siehe Kap. 4.2.1), d.h. es besitzt quasi keine Oberflächenspannung. Deshalb ist der Stoffübergangswiderstand der überkritischen Phase zu vernachlässigen und der Stofffluß lediglich proportional zum flüssigkeitsseitigen Stoffübergangskoeffizient, d.h.: $\beta_0 = \beta_L$

Aus dem Volumenstrom, der Analyse des Extraktes und der Kenntnis der Konzentration in der Vorlage zum Zeitpunkt t_1 und t_2 läßt sich nach Gleichung 4.2 eine Abschätzung von β_L vornehmen.

Die Stoffaustauschfläche A_i läßt sich aus dem Versuchsaufbau nicht direkt bestimmen. Daher wird für die Berechnung zur Näherung die ruhende Oberfläche der Lösung gleichgesetzt. Dabei wird die durch den Eintrag von überkritischem CO₂ entstehende Oberfläche des Flüssigkeitstropfens vernachlässigt¹⁶. Mit den vorgenommenen Näherungen errechnet man:

$$b_L = -\frac{V_i}{A_i} \left(\frac{\Delta c}{\Delta t} \right) \frac{1}{([Furaneol]_{H_2O} - [Furaneol]_{CO_2})} = 3,06 \cdot 10^{-8} \text{ m/s} \quad \text{Gl. 4.2}$$

Ebenfalls durchgeführte Berechnungen mit den Meßergebnissen des Versuches mit Konvektion ergeben für $\beta_L = 79,5 \cdot 10^{-8}$ m/s, eine Abweichung um den Faktor 25. Die Meßergebnisse können daher mit dem Modell der Filmdiffusion nicht korreliert werden. Es muß eine Korrelation nach einem erweiterten Modell, z.B. der Penetrationstheorie [Higbie, 1935] ($\beta_L \propto D^{1/2}$) vorgenommen werden. Der hier verwendete Versuchsaufbau liefert allerdings nicht genügend Daten zur Berechnung dieses Koeffizienten.

¹⁶ Iterative Berechnungen bestätigen, daß diese Näherung das System hinreichend genau beschreibt

4.2.1.2 Zusammenfassung und Diskussion

Furaneol[®] kann mit Hilfe von überkritischem Kohlendioxid aus der Lösung nach durchgeführter Reaktion extrahiert werden. Innerhalb des untersuchten Druckbereiches steigt die extrahierte Menge pro Zeit mit der Dichte der überkritische Phase. Bei einem Druck von 180 bar kann das Furaneol[®] fast quantitativ innerhalb von 34 Stunden extrahiert werden. Eine gute Durchmischung ist essentiell, um kurze Extraktionszeiten zu gewährleisten, da eine Zersetzung des instabilen Furaneols[®], wie sie bei den herkömmlichen Aufarbeitungsmethoden beobachtet wird, auch durch überkritisches Kohlendioxid nicht verhindert werden kann.

Zur präparativen Extraktion ist es praktischer, das Furaneol[®] in Reinsubstanz direkt durch Entspannen des Kohlendioxids zu gewinnen. Schlägt das Furaneol[®] dabei wachstartig nieder, können dadurch zusätzliche Probleme entstehen. Bedingt durch zeitweilige Obstruktion des Restriktors und durch teilweises Austragen der Vorlage, können Unregelmäßigkeiten innerhalb des Betriebsablaufs entstehen. Durch einen erhöhten apparativen Aufwand sollten diese Problemen jedoch zu umgehen sein.

In größeren Anlagen wird man versuchen das verwendete Kohlendioxid wiederzugewinnen. Dazu ist es notwendig, daß CO₂ von jeglicher Beladung durch Furaneol[®] zu befreien. Dazu bedient man sich meist einer Kaskade von Abscheidern. Dies hat den Nachteil, daß das gewünschte Produkt auf drei Behälter aufgeteilt ist. Zudem gewährleistet diese Anordnung nicht eine quantitative Abscheidung des Furaneols[®].

Die Abtrennung der Substanz hängt von der Steilheit der Zustandsänderung ab. In den einzelnen Stufen wird daher eine mehr oder minder hohe Anreicherung erzielt. Entsprechend den Gleichgewichtsmessungen wird man versuchen, den Druck und die Temperatur entsprechend zu senken. Dabei muß darauf geachtet werden, daß kein Wasser mit dem Extrakt ausgeschleppt wird, wenn die Temperatur am Punkt der Abscheidung unter 0°C sinkt. Dieses würde sofort nach der Drosselung gefrieren und die Leitungen verlegen. Im Bereich von -20°C und 18 bar beginnt für Kohlendioxid der Bereich des idealen Gases.

In dem Bereich, in dem ein ideales Gas in den nicht idealen Zustand übergeht ist die Beladungskapazität am geringsten. Reicht der Abscheidungsgrad, der bei diesem Minimum erreicht werden kann, nicht aus, so muß die Temperatur weiter gesenkt werden.

Die unterste Grenze für die Temperatursenkung ist der Sublimationspunkt des Kohlendioxids bei $-78,5^{\circ}\text{C}$. Man kann sich vorstellen, daß für großtechnische Anlagen derartige Abscheideverfahren äußerst kostenintensiv sind, d.h. daß man solche Maßnahmen nur bei der Gewinnung von profitablen Produkten, bzw. bei ernsthafter Gefährdung des Produktionsablaufs in Betracht zieht.

Gegenüber den meisten Methoden hat überkritisches Kohlendioxid den Vorteil toxikologisch unbedenklich zu sein und daß daher das erhaltene Produkt uneingeschränkt für Lebensmittel eingesetzt werden kann.

4.2.2 Aufarbeitung durch Festphasenextraktion mit Zeolithen

Als eine weitere Methode zur „natürlichen“ Aufarbeitung werden Zeolithe zur Trennung des komplexen Reaktionsgemisches eingesetzt. Zeolithe sind kristalline, wasserhaltige Alumosilikate. Ihre dreidimensionale Gerüststruktur ist von einem ausgeprägten, regelmäßigen Hohlräumssystem mit Poren im Größenbereich molekularer Abmessungen (\varnothing 0,3 – 1,3 nm) durchzogen. Zeolithe sind dadurch in der Lage, Substanzgemische aufgrund ihrer Molekülgröße zu trennen und werden auch als Molekularsiebe bezeichnet. Das industrielle Potential der Zeolithe ist auf drei Eigenschaften begründet:

- Kapazität zur Sorption von Gasen, Dämpfen und Flüssigkeiten
- Katalyse von chemischen Reaktionen.
- Ionenaustausch

Die Vielzahl der industriellen Einsätze soll hier nicht ausführlich beschrieben werden; dies ist bereits in umfangreichen Übersichten geschehen [PUPPE, 1984, 1986; MENGEL, 1981, 1985]. Die dargestellten Eigenschaften der Zeolithe sind kurz zusammengefaßt:

- Einheitliche Porenweite (Molekularsiebeffekt)
- Hohlraumstruktur mit sehr großer innerer Oberfläche
- Unterschiedliche Gerüststruktur, je nach Kombination der sekundären Baueinheiten
- Frei bewegliche austauschbare Kationen
- Änderung der Polarität durch Variation im Si/Al-Verhältnis.

Neben Porengröße, Porenstruktur und Porenvolumen werden Zeolithe auch durch das Verhältnis von SiO_2 zu Al_2O_3 im Kristallgitter charakterisiert (Modul). Durch spezielle Verfahren bei der Herstellung der Zeolithe kann der Aluminium-Gehalt reduziert werden (dealuminierte Zeolithe) [BEYER, 1980].

Mit sinkendem Al-Gehalt (steigendem Modul) sinkt die Ionenaustauscherkapazität und die Hydrophilie, die Zeolithe werden hydrophober. In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden die Zeolith-Typen ZSM und DAY mit verschiedenen Moduln eingesetzt:

Tabelle 9: Charakteristische Größen der verwendeten Zeolith-Typen [SCHÄFER-TREFFENFELDT, 1997, MEIER, 1992]

	ZSM5	DAY
	$\text{Na}_n\text{Al}_n\text{Si}_{96-n}\text{O}_{192}$	$\text{Na}_n\text{Al}_n\text{Si}_{80-n}\text{O}_{384}$
Porenweite	5,0 – 5,5 Å	8,0 – 8,5 Å
Modul	28 – 1000	15 - 200

Der Einsatz von Zeolithen in der flüssigen Phase ist von besonderem Interesse für die Produktabtrennung und –reinigung im Bereich der Biotechnologie und Lebensmittelindustrie. Hier kommen Zeolithe hauptsächlich im Bereich der Isolation von Zuckern und Aminosäuren, weniger im Bereich der Aromen, zum Einsatz.

Das Hauptaugenmerk in der vorliegenden Arbeit wird auf die Adsorptionseigenschaften und weniger auf das große katalytische Potential der Zeolithe gerichtet. Bei den Untersuchungen sollen als Richtlinie folgende Punkte beachtet werden:

- Verfügbarkeit des Trennmaterials im industriellen Maßstab
- Einsatz in der Lebensmittelindustrie
- Möglichst Verwendung von Wasser als Eluent

Um die erfolgreiche Auftrennung mit Hilfe der Zeolithe quantifizieren zu können, werden zunächst die Sorptionsisothermen der Materialien bestimmt. Sodann wird der Einfluß von Modellösungen und zum Schluß der Einsatz in realen Reaktionsgemischen getestet.

Zur Beschreibung der beobachteten Effekte bedient man sich verschiedener Ansätze aus der Adsorptionstheorie, die in Lehrbüchern eingehend abgehandelt werden [GRASSMANN, 1997, GMEHLING, 1996, ROBEL, 1983]. Zum besseren Verständnis werden die verwendeten Größen hier nochmals kurz erläutert.

Das Adsorptionsgleichgewicht der Adsorption einer Komponente i aus einem flüssigem Gemisch mit N Komponenten ($i=1,2,..N$) wird durch die Exzeßgröße n_i^e beschrieben [SIRCAR, 1986]:

$$n_i^e = n^0(x_{i,0} - x_i) \quad \text{Gl. 4.3}$$

Da die direkte Bestimmung einer Konzentration an der Oberfläche des Adsorbens nicht möglich ist, wird n_i^e durch die Differenz der Konzentration c oder des Molenbruchs (x) der Komponente i , gemessen in der Außenlösung vor dem Kontakt mit dem festen Adsorbens ($c_{i,0}$ oder $x_{i,0}$) und nach der Einstellung des Gleichgewichtes (c_i oder x_i), berechnet.

n^0 gibt die auf die Adsorbensmasse m_{Ad} bezogene Stoffmenge aller Komponenten in mol/g zum Zeitpunkt $t=0$ an. Die Exzeßgröße n_i^e ist die Gleichgewichtsbeladung des Adsorbensmittels mit der Komponente i in mol/g und kann sowohl positive als auch negative Werte aufweisen. Desweiteren ist n_i^e eine Funktion von x_i sowie der Adsorptionstemperatur und nur geringfügig vom Systemdruck abhängig. Für die Adsorption einer reinen Flüssigkeit ($N=1$) kann (definitionsgemäß) keine Exzeßadsorption auftreten:

$$n_i^e = 0 \quad \text{Gl. 4.4}$$

Bei der Adsorption aus einer binären Mischung ($N=2$) ist:

$$n_1^e = n_2^e \quad \text{Gl. 4.5}$$

und

$$\sum n_i^e = n_1^e + n_2^e = 0 \quad \text{Gl. 4.6}$$

Sind die Werte für n_1^e und n_2^e gleich Null, bedeutet dies, daß keine der Komponenten bevorzugt adsorbiert wird und es zu keiner Trennung kommt.

Zur Beschreibung der Adsorption des Aromastoffes wird in dieser Arbeit die dimensionslose Adsorbensbeladung q_i (Gramm oder Milligramm Adsorptiv/Gramm Adsorbens) verwendet.

Durch die Bestimmung der Konzentration der untersuchten Komponente in der Lösung vor der Adsorption ($c_{i,0}$) und nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes ($c_{i,G}$) kann die dimensionslose Adsorbensbeladung q_i (Masse Adsorptiv durch Masse Adsorbens) nach Gl. 4.7 berechnet werden [SIRCAR, 1986]:

$$q_i = \frac{(c_{i,0} - c_{i,G})V_L}{m_{Ad}} M_i \quad \text{Gl. 4.7}$$

Die Größe V_L gibt das zu dem Adsorbens hinzugegebene Flüssigkeitsvolumen an. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird die Konzentration nicht in mol/L angegeben, sondern bereits mit M_i multipliziert als c_i in g/L. Das Adsorptionsgleichgewicht wird sowohl von der Temperatur der Komponenten als auch von dem Adsorptionsmittel beeinflusst, wobei bei den zu erreichenden Adsorptionsmengen auch die Art der Herstellung und die Geschichte (Anzahl der geleisteten Zyklen, Art der Regeneration) eine Rolle spielen kann. Bei Adsorptionen aus Flüssigkeiten spielt der Druck nur eine untergeordnete Rolle.

Zum Vergleich der Adsorptionen auf verschiedenen Materialien werden die Gleichgewichtsdaten einer Adsorptionsmessung mit Hilfe bekannter Adsorptionsmodelle korreliert. Bei der Adsorption an den mikroporösen Zeolithen ist es sinnvoller, statt von einer Adsorptionsoberfläche von einem Adsorptionsvolumen zu sprechen. Mit wachsender Belegung strebt q einem Grenzwert q_s zu. Dies entspricht der vollständigen Füllung der Poren. Die *Langmuirsche* Adsorptionsisotherme [LANGMUIR, 1918] beschreibt diesen Verlauf durch die Gl. 4.8:

$$\Theta = \frac{q_i}{q_{i,s}} = \frac{c_{i,G}}{a_i + c_{i,G}} = \frac{b_i \cdot c_{i,G}}{1 + b_i \cdot c_{i,G}} \quad \text{Gl. 4.8}$$

Mit $a_i=1/b_i$ und $i=1$

Diese Beziehung entspricht der *Langmuirschen* Adsorptionsisotherme für molekulare Adsorption einer Komponente. Sind mehrere Komponenten auf der Oberfläche reversibel adsorbiert, ergibt sich:

$$\Theta = \frac{b_i \cdot c_{i,G}}{1 + \sum b_i \cdot c_{i,G}} \quad \text{Gl. 4.9}$$

Θ ist der Belegungsgrad der Oberfläche. Für kleine Werte von c ($c \ll a$) steigt die Adsorptionsisotherme proportional zu c . Für große Werte von c nähert sie sich asymptotisch der Porenfüllung. In einer Näherung kann man für kleine Konzentrationen das *Henry-Daltonsche-Gesetz* anwenden:

$$q_i = \frac{q_{i,s}}{a} c_{i,G} = K_i c_{i,G} \quad \text{Gl. 4.10}$$

Zur Auswertung von *Langmuirschen* Adsorptionsisothermen und Bestimmung der Koeffizienten wird die Gl. 4.8 linearisiert. Die Gleichungen sind analog der aus dem Bereich der Enzymtechnik bekannten Linearisierungen zur *Michaelis-Menten-Kinetik* [STRYER, 1994] und werden zur Unterscheidung entsprechend benannt:

- Analog zu *Lineweaver-Burk*

$$\frac{1}{q_i} = \frac{a_i}{q_{i,s}} \frac{1}{c_{i,G}} + \frac{1}{q_{i,s}} \quad \text{Gl. 4.11}$$

- Analog zu *Hanes-Wilkinson*

$$\frac{c_{i,G}}{q_i} = \frac{a_i}{q_{i,s}} + \frac{1}{q_{i,s}} c_{i,G} \quad \text{Gl. 4.12}$$

- Analog zu *Eadie-Hofstee*

$$q_i = q_{i,s} - a_i \frac{q_i}{c_{i,G}} \quad \text{Gl. 4.13}$$

Die Werte für c_G und q sind experimentell ermittelt worden. Die berechneten Koeffizienten werden anschließend in die Gl. 4.8 eingesetzt, in denen die Adsorptivkonzentration als variable Größe eingeht. Auf diese Weise gelangt man zu einem graphischen Vergleich mit den experimentellen Werten.

4.2.2.1 Bestimmung der Sorptionsisotherme von Furaneol®

Die zur Verfügung stehenden Zeolithe werden zunächst auf ihre Fähigkeit Furaneol® zu adsorbieren untersucht. Dazu werden die Sorptionsisothermen ermittelt, jeweils von einem Vertreter mit hohem und niedrigem Modul. Definierte Mengen an Zeolithe werden mit Konzentrationen im Bereich 1 - 25 g/L Furaneol® bei 25°C bis zur Gleichgewichtseinstellung geschüttelt.

Während der Untersuchungen stellt sich heraus, daß die Adsorptionsfähigkeit der Zeolithe für Furaneol® nicht vom pH-Wert abhängig ist. Zu Vergleichszwecken wird aber der pH-Wert bei allen Zeolithen gleich eingestellt. Dabei nimmt man den Zeolith mit dem niedrigsten pH als Bezugspunkt. Abbildung 4-12 zeigt die Adsorptionsisotherme der verwendeten Zeolithe DAY200 und DAY15 bei 25°C:

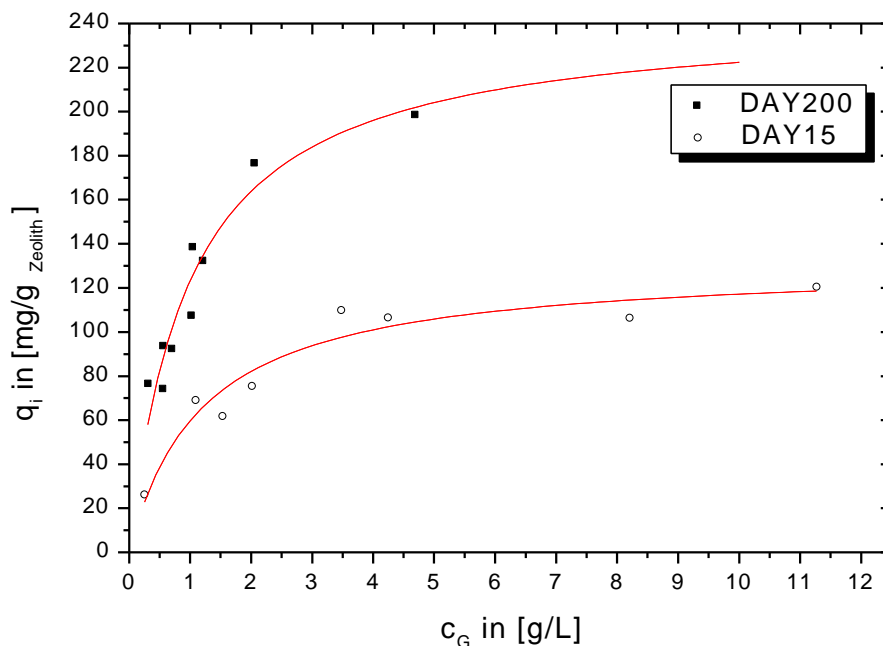


Abbildung 4-12: Adsorptionsisotherme von Furaneol® an Zeolithe vom Typ DAY bei 25°C

Man erkennt, daß der Zeolith DAY200 eine höhere Affinität und Kapazität gegenüber Furaneol® besitzt. Das Maximum der Sorption scheint noch nicht ganz erreicht zu sein. Der Zeolith DAY15 hat als maximale Beladung ungefähr die Hälfte der des Zeolithen DAY200.

Die Ausgleichskurve entspricht der Funktion nach *Langmuir*. Man erkennt, daß sich die erhaltenen Ergebnisse damit hinreichend beschreiben lassen. Die Abweichungen in den einzelnen Messungen sind Folgen der langwierigen Aufarbeitung nach erfolgreicher Adsorption.

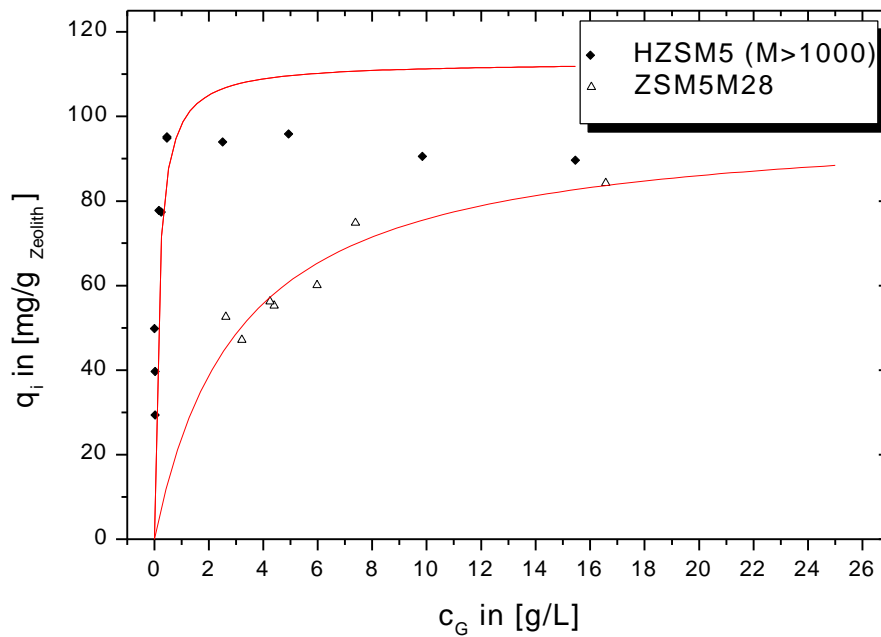


Abbildung 4-13: Adsorption an Zeolithe vom Typ ZSM5 bei 25°C.

Der Zeolith HZSM5 M>1000 zeigt eine sehr hohe Affinität gegenüber Furaneol[®]. Dagegen ist die Kapazität des Zeolithen schnell erschöpft und man erreicht bereits bei geringen Konzentrationen (ca. 10 g/L) die maximale Beladung des Zeolithen. Der ZSM5 mit einem niedrigen Modul zeigt gegenüber Furaneol[®] eine geringere Affinität. Auch hier ist die Kapazität recht schnell erschöpft.

Es ist zu erkennen, daß die Verteilungsgleichgewichte durch die *Langmuirsche* Adsorptionsisotherme nur teilweise beschrieben werden können. Besonders beim Zeolithen HZSM5 M>1000 kann der steile Anstieg durch die Ausgleichskurve nur unzureichend wiedergegeben werden.

Furaneol[®] zeigt eine besonders hohe Affinität zu hydrophoben Zeolithen. Die höchsten Beladungen werden mit DAY200, gefolgt von HZSM5-M>1000 erreicht. Der Grenzwert der Adsorptionsbeladung scheint beim DAY200 außerhalb des gemessenen Bereichs zu liegen.

Die Auswertung und Bestimmung der Parameter $q_{i,s}$ und a_i erfolgt durch Linearisierung der *Langmuirschen* Gleichung. In Tabelle 10 sind die nach den einzelnen Linearisierungsmethoden errechneten Werte eingetragen. Für die Linearisierung nach *Hanes-Wilkinson* erhält man die gleichmäßigste Verteilung der Meßwerte (Abbildung 4-14 und Abbildung 4-15). Die nach dieser Methode berechneten Parameter werden im weiteren verwendet.

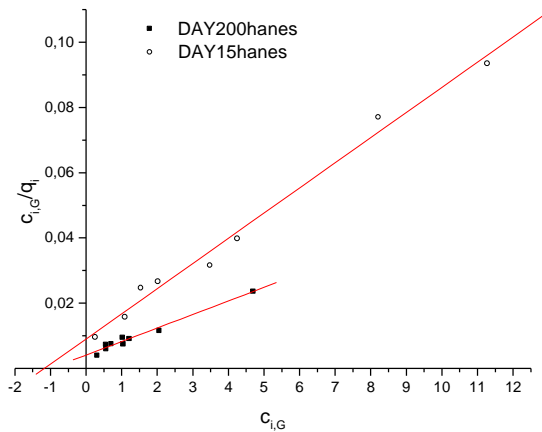


Abbildung 4-14: DAY200 und DAY15, Auftragung nach Hanes-Wilkinson

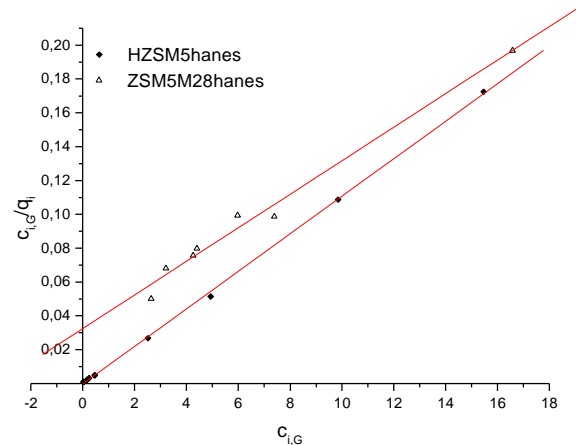


Abbildung 4-15: HZSM5 M>1000 und ZSM5M28, Auftragung nach Hanes-Wilkinson

Tabelle 10: Maximale Beladung $q_{i,s}$ und Affinität a_i , ermittelt durch Linearisierung der Langmuirfunktion

Typ	Lineweaver-Burk				Hanes-Wilkinson				Eadie-Hofstee			
	$q_{i,s}$	SD	a_i	SD	$q_{i,s}$	SD	a_i	SD	$q_{i,s}$	SD	a_i	SD
DAY200	186,57	±27,32	0,547	±0,013	240,96	±12,77	0,959	±0,051	198,11	±25,31	0,594	±0,18
DAY15	119,19	±8,52	0,897	±0,005	129,53	±5,55	1,153	±0,182	123,45	±8,41	0,955	±0,17
HZSM5	98,33	±7,72	0,059	±0,011	90,09	±0,667	-0,023	±0,047	96,41	±3,81	0,052	±0,007
ZSM5M28	90,58	±10,51	2,429	±0,144	100,81	±5,31	3,278	±0,235	90,15	±9,56	2,342	±0,738

Es ist zu beachten, daß man mit Hilfe der *Hanes-Wilkinson*-Linearisierung im Falle des HZSM5 M>1000 eine negative Affinität zum Zeolithen errechnet. Dies ist natürlich physikalisch unsinnig. Es ist jedoch zu bemerken, daß der Wert nahe dem Nullpunkt liegt und dadurch mit einem großen Fehler behaftet ist; die Standardabweichung beträgt 100%.

Für weitere Berechnungen werden deshalb für den Zeolithen HZSM5 M>1000 die Werte der Linearisierung nach *Eadie-Hofstee* verwendet. Sie zeigen für diesen Zeolithen die geringsten Standardabweichungen.

4.2.2.2 Moleküle Furaneol[®] pro Einheitszelle

Aus der maximalen Beladung q_i und der Formelmasse des Zeolithen (siehe Tabelle 9) läßt sich das Verhältnis Molekülanzahl Furaneol[®] pro Einheitszelle berechnen. Für den Typ ZSM5 werden 4,5 (Modul: 28) und 4 (Modul: 1000), für den Typ DAY 8,5 (Modul: 15) und 16 (Modul: 200) Moleküle Furaneol[®] pro Einheitszelle errechnet.

Für Zeolithe des Typs ZSM5 M28 und DAY15 ergeben sich halbzahlige Werte. Zeolithe mit niedrigem Modul besitzen eine etwas größere Porenweite als Zeolithe gleichen Typs mit hohem Modul. Es ist daher anzunehmen, daß ein Molekül Furaneol[®] zwischen zwei Einheitszellen Platz findet.

Aufgrund der größeren Einheitszelle des Typs DAY können mehr als doppelt soviel Moleküle pro Einheitszelle als beim Typ ZSM5 aufgenommen werden. Die Änderung des Moduls wirkt sich daher stärker aus.

4.2.2.3 Partikelgröße der Zeolithe, Einfluß auf die Aufarbeitungsmethoden

Zur weiteren Charakterisierung der verwendeten Zeolithe dient die mittlere Korngröße. Die Partikelgröße wird mit Hilfe des Durchflußcytometers gemessen. Die hier verwendeten Zeolithe besitzen eine Partikelgröße kleiner 2 μm (siehe Anhang). Man kann daher schon eher von Stäuben reden. Dementsprechend besitzt das Material eine hohe Oberfläche. Die geringe Partikelgröße ist ein wesentlicher Nachteil der Zeolithe im Hinblick auf die Abtrennung aus Lösungen.

Ein Filter mit der Porenweite 0,25 μm wird innerhalb von wenigen Minuten verstopft. Mit Filtern der Porenweite 0,1 μm kann eine Abtrennung durch Filtration erreicht werden. Die Aufarbeitung gestaltet sich dementsprechend schwierig und langwierig.

Eine kontinuierliche Aufarbeitung kann aus den oben genannten Gründen nicht verwirklicht werden. „Cross flow“ von Reaktionslösungen nach erfolgreicher *Maillard*-Reaktion führt aufgrund der farbigen Verunreinigungen nur zu Teilerfolgen. So kann eine Aufkonzentration des Furaneol[®] erreicht werden. Die Lösung ist aber durch die Melanoidine stark gefärbt. Der Filter der Anlage ist ebenfalls stark verunreinigt und kann nicht regeneriert werden.

4.2.2.4 Desorption von Furaneol[®]

Zur erfolgreichen Gewinnung muß Furaneol[®] vom Zeolith eluiert werden können. Es werden verschiedenen Methoden untersucht, um Furaneol[®] erfolgreich vom Zeolith zu eluieren und das Material gegebenenfalls zu regenerieren. Die Anhebung oder Absenkung des pH-Wertes hatte keinen Einfluß auf die Affinität des Furaneol[®], anders als z.B. bei Aminosäuren. Furaneol[®] als ungeladenes Molekül bleibt von Änderung des pH-Wertes relativ unbeeinträchtigt.

Versuche mit Salzlösungen zur Desorption des Furaneols[®] werden unternommen. Dazu werden die Zeolithe nach gelungener Adsorption von Furaneol[®] von restlicher Ausgangslösung befreit, kurz gewaschen und sodann mit verschiedenen Salzlösungen in definierter Konzentration 24 Stunden, bzw. 48 Stunden geschüttelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-16 aufgetragen.

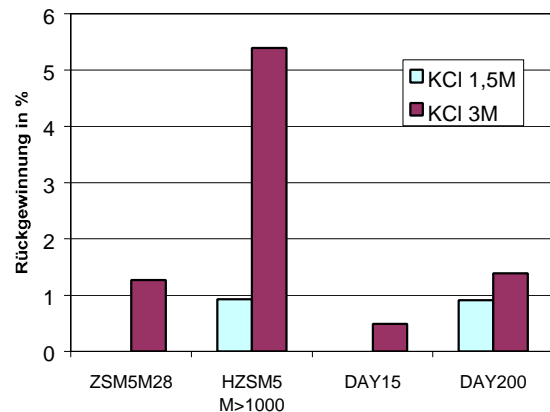


Abbildung 4-16: Desorption von Furaneol[®] mit Hilfe von KCl. Abhängigkeit der Rückgewinnung in [%] von der Salzkonzentration bei 25°C, 48 h.

Gemessen werden nur geringe Mengen an zurückgewonnenem Furaneol[®] bei einigen Zeolithen bei Experimenten mit Kaliumchloridlösung (Abbildung 4-16). Dabei sind die gemessenen Werte nach 24 Stunden und nach 48 Stunden übereinstimmend. Die Affinität des Furaneol[®] zum Zeolith kann durch Salze nicht gebrochen werden.

Durch Zusatz von unpolaren Solvenzien soll der Einfluß auf die Desorption in Abhängigkeit von dem Gehalt untersucht werden. Dazu wird der Zeolith nach erfolgreicher Adsorption von restlicher Lösung durch Zentrifugation, bzw. Filtration getrennt und kurz gewaschen. Der erhaltene Rückstand wird sodann mit einem bekannten Volumen verschiedener Ethanol/Wasser-Lösungen mit definierten Verhältnissen versetzt. Es wird auf möglichst vollständige Abtrennung der Ausgangslösung vom Zeolithen geachtet. Jedoch erhält man einen mehr oder weniger feuchten Zeolithen, den man auf die Gefahr, enthaltenes Furaneol[®] zu zerstören, als solches nicht trocknen kann. Das noch enthaltene Wasser verfälscht das Verhältnis Ethanol/Wasser hin zu geringeren Werten. Um diesen Fehler zu minimieren, wurde ein größeres Volumen des Ethanol/Wasser-Gemisches hinzugegeben. Der positive Effekt der Aufkonzentrierung bei der Aufarbeitung wurde hierbei zunächst bewußt außer acht gelassen.

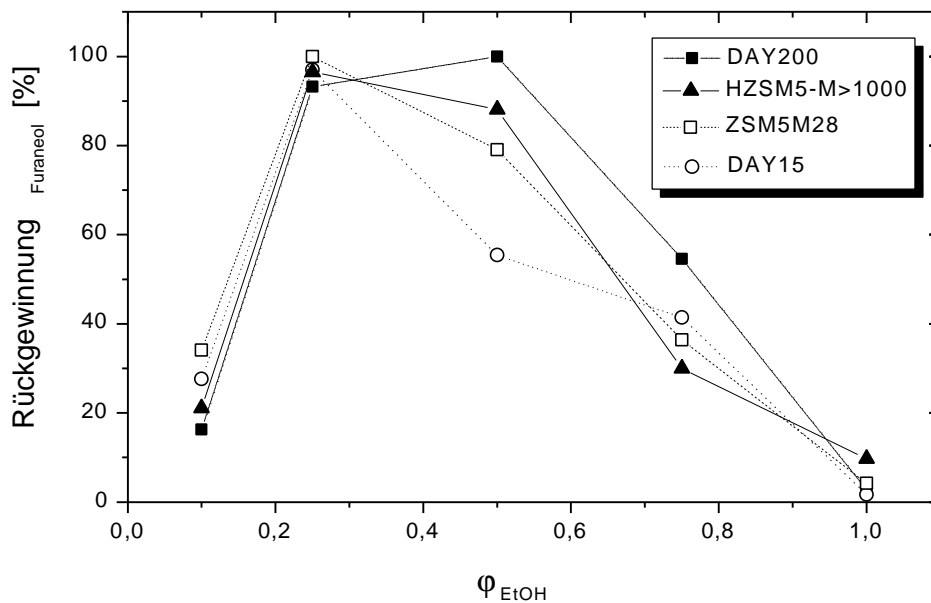


Abbildung 4-17: Desorption in Abhängigkeit vom Ethanol-Gehalt j des Solvens, $V_{\text{Des}} = 20 \text{ mL}$, 25°C , ($j = 0$: reines Wasser; $j = 1$: reines Ethanol)

Bis zu einem Ethanol-Gehalt von 25 % nimmt das Desorptionsvermögen des Lösungsmittelgemisches Ethanol/Wasser stark zu. Eine Bilanzierung ergibt die fast vollständige Desorption des Furaneols[®] von allen Zeolithen bei einem Ethanol-Gehalt von 25 %. DAY200 als hydrophobes Zeolith hat sein Desorptionsmaximum bei 50 % Ethanol-Gehalt.

Mit zunehmenden Ethanol-Gehalten nimmt die Ausbeute an desorbierten Furaneol[®] ab. Dies geschieht bei Zeolithen mit hohem Modul langsamer, als bei Zeolithen mit niedrigem Modul. Dies lässt sich mit der höheren Affinität des, im Gegensatz zu Wasser, unpolaren Ethanols zu dealuminierten Zeolithen (hoher Modul) erklären. Zu Zeolithen mit niedrigem Modul besitzt Ethanol eine niedrigere Affinität.

Bei Ethanol-Gehalten $> 50 \%$ scheint Ethanol immer weniger in der Lage das Furaneol[®] auf dem Zeolith zu verdrängen. Für die Effektivität der Desorption scheint das Verhältnis von Wasser zu Ethanol von Bedeutung zu sein. Die Anwesenheit von Wasser ermöglicht dem Ethanol den Zugang zu Pore, wo es durch seine Affinität zum Zeolithen Furaneol[®] von seinem hydrophoben „Adsorptionsplatz“ verdrängt. Mit steigendem Ethanol-Gehalt überwiegt die elektrostatische Abschirmung¹⁷ des Zeolithen. Ethanol dringt nicht mehr in die Pore und Furaneol[®] verbleibt adsorbiert in der Zeolithpore.

¹⁷ Das Alumosilikatgerüst besitzt stets eine negative Gesamtladung

4.2.2.5 Adsorption und Desorption in Anwesenheit des Katalysators

In Kapitel 4.2.2.1 wurde deutlich, daß die Affinität von Furaneol[®] zu hydrophoben Zeolithen am größten ist. In diesem Kapitel soll untersucht werden inwiefern sich die Beladungen an Furaneol[®] auf den Zeolithen bei Anwesenheit von Aminosäuren verringert. Um diesen Effekt zu untersuchen, werden Modellmischungen aus Furaneol[®] und gleichen Mengen der Aminosäure Asparagin eingesetzt. Aminosäuren zeigen zu Zeolithen eine hohe Affinität, wenn der pH-Wert unterhalb ihres pI-Wertes liegt. Um eine höhere Beladung an Furaneol[®] zu gewährleisten, wird daher der pH-Wert zweckmäßigerweise auf einen pH-Wert $>$ pI-Wert eingestellt. Dies geschieht durch die Verwendung von Puffer. Die Ergebnisse werden mit Adsorptionen bei pH 2 verglichen. Zur Adsorption werden Lösungen mit Ausgangskonzentrationen von $c_0=10$ g/L an Furaneol[®] und Aminosäure bei 25°C eingesetzt. Ansonsten werden die Bedingungen eingehalten, die auch bei den Experimenten zur Bestimmung der Adsorptionsisothermen gelten.

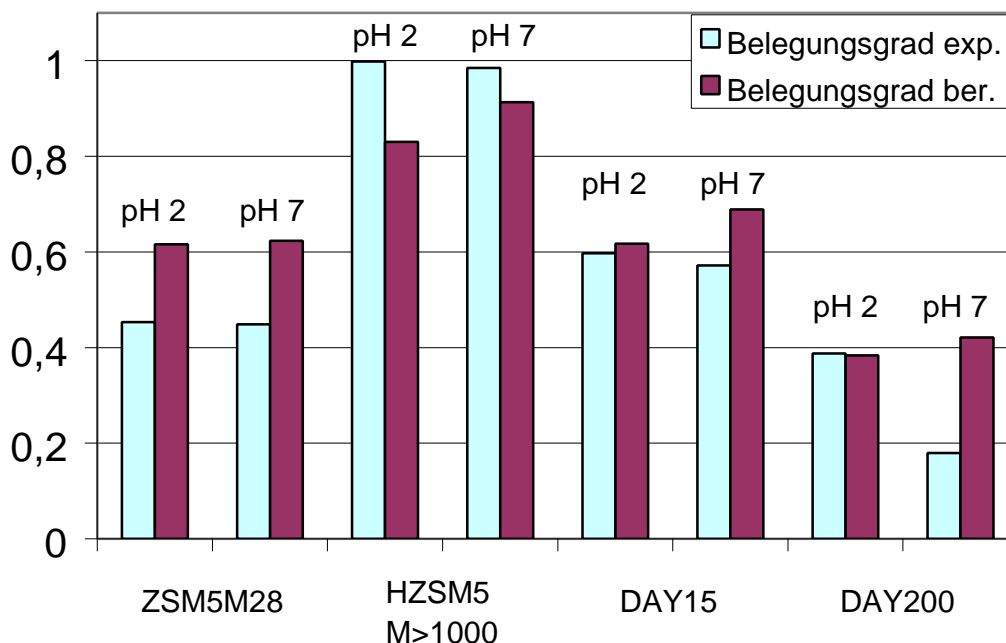


Abbildung 4-18: Adsorption von Furaneol in Anwesenheit von Asparagin und in Abhängigkeit vom pH-Wert, $c_0=10$ g/L, 25°C

Da es sich um die reversible Adsorption mehrerer Komponenten handelt, muß und kann der Belegungsgrad nach Gl. 4.9 für jede Komponente einzeln berechnet werden. Um jedoch Aussagen über den Erfolg der Adsorption von Furaneol[®] zu gewinnen, reicht der Vergleich der mit Gl. 4.8 berechneten Werte mit den experimentell ermittelten Werte.

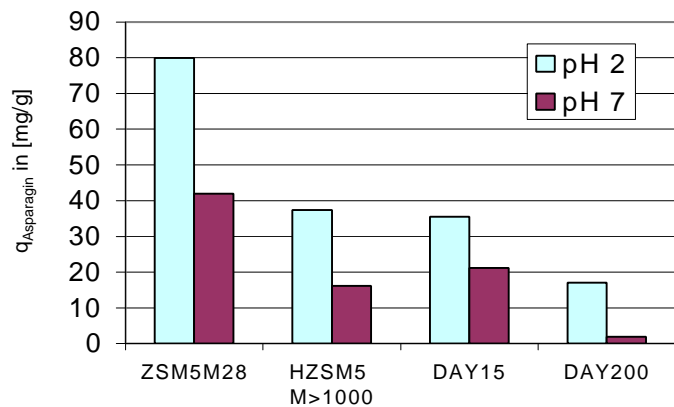


Abbildung 4-19: Adsorption von Asparagin an Zeolithe in Abhängigkeit vom pH-Wert, $c_0 = 10 \text{ g/L}$

In Abbildung 4-18 ist der experimentelle Belegungsgrad neben dem aus den Adsorptionsisothermen berechneten Belegungsgrad aufgetragen. Im Falle der polarerer Zeolithe (niedriger Modul) erreicht der experimentell ermittelte Belegungsgrad nicht den nach der Adsorptionsisotherme erwarteten (berechneten) Grad der Belegung.

Diese Zeolithe werden durch die Anwesenheit der Aminosäure beeinflusst. Abbildung 4-19 zeigt, daß zum Teil große Mengen an Asparagin vom Zeolith adsorbiert werden. Gemäß den Erwartungen wird dabei bei niedrigen pH-Wert mehr adsorbiert als bei einem pH-Wert oberhalb des pI der Aminosäure und Zeolithe mit niedrigem Modul adsorbieren mehr Asparagin als jene mit einem hohem Modul des gleichen Typs.

Bei dem Zeolith HZSM5 M>1000 beobachtet man einen interessanten Effekt (siehe Abbildung 4-18). Die experimentell ermittelte Belegung ist höher als die Berechnete. Durch die polare Aminosäure in der Außenlösung weicht Furaneol[®] auf das unpolare Innere des Zeolithen aus, d.h. die Exzeßgröße n_i^e des Furaneols[®] erhöht sich für das Innere des Zeolithen. Furaneol[®] hat eine große Affinität zu diesem Zeolithen. Durch seine unpolare Natur (hoher Modul) werden auf diesem Zeolith erwartungsgemäß weniger Aminosäure adsorbiert, als auf einem polarerer Vertreter (niedriger Modul) des Typs.

Der experimentelle Belegungsgrad des Zeolithen DAY200 bei pH 2 entspricht tendenziell dem bereits oben erwähnten. $q_{i,S}$ ist bei diesem Zeolithen sehr hoch, deshalb ist der Belegungsgrad entsprechend niedriger als bei den anderen. Auch bei diesem Zeolithen läßt sich der Effekt, der schon bei HZSM5 M>1000 beobachtet wird, ansatzweise erkennen. Durch die geringere Polarität wird das Furaneol[®] in den Zeolithen gedrängt. Deshalb ist der experimentell ermittelte Wert leicht höher als der berechnete Belegungsgrad.

Abweichungen werden bei der Adsorption von Furaneol[®] in Anwesenheit von Asparagin bei pH 7 gemessen. Dabei wird die Adsorption von Furaneol[®], entgegen den Erwartungen, bei einem höheren pH erheblich gestört als bei einem niedrigeren pH-Wert. Dieses Meßergebnis kann mit dem vorhandenen Datenmaterial nicht ausreichend erklärt und begründet werden. Es bedarf dazu weiterer Untersuchungen, die jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit liegen.

Abschließend läßt sich jedoch festhalten, daß bei Anwesenheit der Aminosäure in der Lösung die Adsorption von Furaneol[®] erheblich beeinflußt wird. Dies kann einen positiven Einfluß haben, wenn es sich um Adsorption an einem unpolaren Zeolithen (hoher Modul) handelt. Polarere Zeolithe werden durch die Anwesenheit von Aminosäuren in ihrem Adsorptionsverhalten gegenüber Furaneol[®] gestört. Dabei kommt es vermehrt zur Co-Adsorption der Aminosäure.

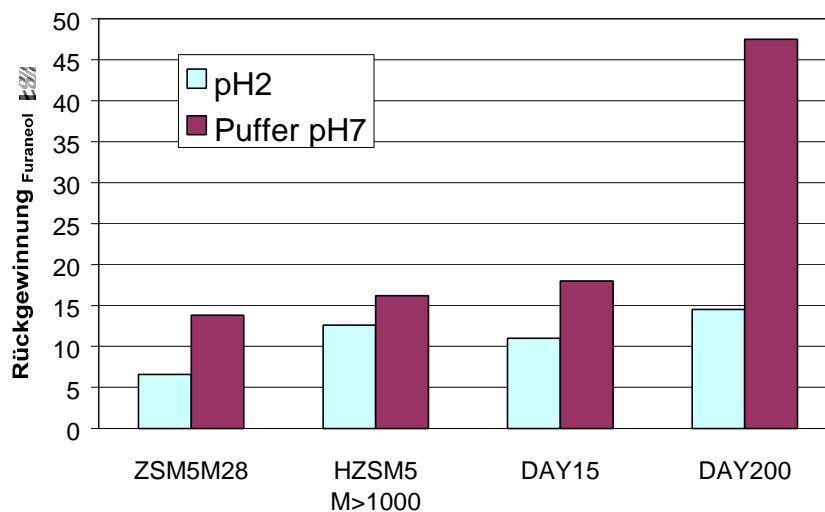


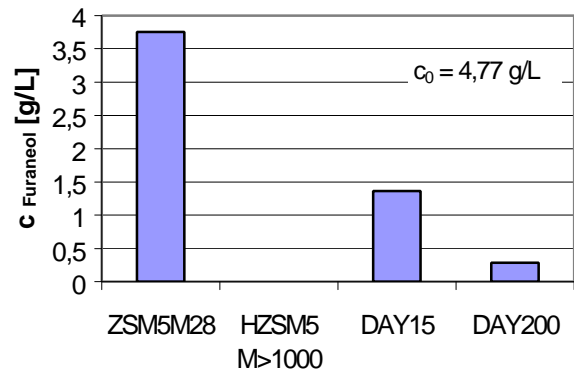
Abbildung 4-20: Adsorption von Furaneol[®] in Anwesenheit von Asparagin in Abhängigkeit vom pH, Rückgewinnung mit Ethanol/Wasser-Gemisch, 50% Ethanol-Gehalt, $V_{Des} = 20$ mL, 25°C

Um die Desorption zu untersuchen, werden die Zeolithe, wie bei den Versuchen zuvor, von restlicher Ausgangslösung durch Zentrifugation oder Filtration befreit und kurz gewaschen. Danach wird mit Ethanol/Wasser-Gemisch, 50 % Ethanol-Gehalt, versetzt.

Durch die Anwesenheit von Asparagin wird ebenfalls die Desorption behindert. Das adsorbierte Furaneol[®] kann in keinem Fall restlos desorbiert werden. Durch die Anwesenheit von Asparagin ist also auf jeden Fall mit Verlusten bei der Adsorption und Desorption zu rechnen. Dadurch wird die Ausbeute erheblich gemindert.

4.2.2.6 Adsorption von realen Reaktionslösungen auf Zeolithe

Untersucht wird die Adsorption von Furaneol[®] aus einer Reaktionslösung nach erfolgreicher Synthese. Dazu wird eine frisch hergestellte Reaktionslösung aufgeteilt und mit definierten Mengen der einzelnen Zeolithe versetzt. Die Lösung wird zunächst verdünnt, um in den linearen Bereich der Adsorption zu gelangen und ein Vergleich der K_i -Werte zu ermöglichen. Aufgrund der niedrigen Ausgangskonzentration (c_0) wird erwartet, daß das gesamte Furaneol[®] auf dem Zeolithen adsorbiert. Dieses Ergebnis wurde jedoch nur bei dem Zeolith HZSM5 M>1000 gemessen. Bei allen anderen Experimenten wurde Furaneol[®] in der Ausgangslösung zurückgehalten (Abbildung 4-21).



Bei diesen Adsorptionen handelt es sich um Multikomponentensysteme.

Abbildung 4-21: Restkonzentration an Furaneol[®] nach der Adsorption auf Zeolith, $c_0=4,77$ g/L.

Die Beschreibung der experimentell erhaltenen Werte gelingt durch einen entsprechenden Satz an Gleichungen zur Beschreibung des Adsorptionsverhaltens jeder einzelnen Komponente. Zu Abschätzung über den Erfolg der Adsorption von Furaneol[®] an den Zeolithen genügt hier jedoch ein Vergleich der experimentellen Werte mit den Werten aus den Adsorptionsisothermen bei gleicher Ausgangskonzentration c_0 (Abbildung 4-22).

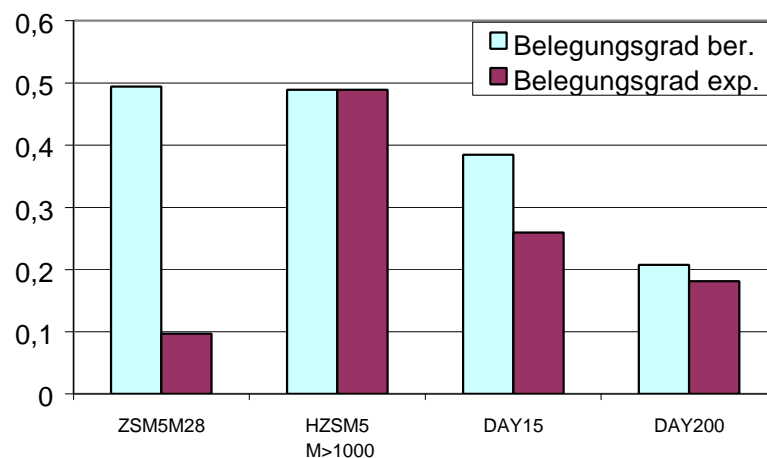


Abbildung 4-22: Vergleich des experimentellen Belegungsgrades mit den Werten aus den Adsorptionsisothermen.

Aufgrund seiner polaren Natur, erfährt der Zeolith ZSM5M28 die größte Beeinflussung. Es werden nur 1/5 der erwarteten Menge adsorbiert. Ebenfalls gestört wird das Adsorptionsverhalten auf dem Zeolithen DAY15. 2/3 der erwarteten Menge an Furaneol[®] werden adsorbiert. Die Zeolithe mit hohem Modul zeigen eine geringe Beeinflussung durch die Anwesenheit der komplexen Lösung. Furaneol[®] wird in dem Maße adsorbiert, wie es aus einer Einkomponentenlösung zu erwarten wäre.

Zur Rückgewinnung werden die Zeolithe jeweils 4 mal mit bidest. H₂O kurz gewaschen und sodann mit Ethanol/Wasser-Gemisch, 50 % Ethanol-Gehalt, versetzt. Nach Einstellung des Gleichgewichtes werden die Lösungen mit Hilfe der HPLC analysiert. Diese Aufarbeitungsmethode trägt zu einer Schwankung der Meßwerte bei, da sich die Abtrennung der Zeolithe nach jedem Waschschrift schwierig und langwierig gestaltet.

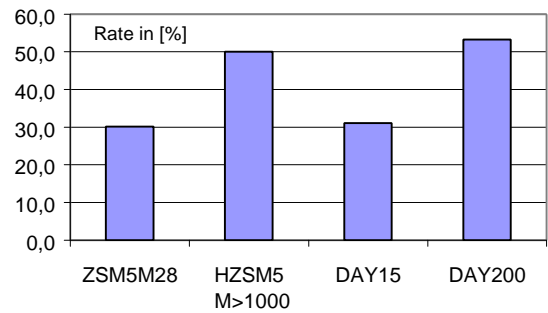


Abbildung 4-23: Desorption von Furaneol[®] 50% Ethanol-Gehalt, 24 h, V_{Des} = 20 mL

In der Abbildung 4-23 sind daher die Mittelwerte mehrerer Versuche zur Desorption von Furaneol[®] mit einem größeren Fehler behaftet als in den vorangegangenen Versuchen zur Desorption (Kapitel 4.2.2.4 und 4.2.2.5). Die prozentuale Angabe bezieht sich dabei auf die desorbierte Menge in Bezug zur experimentell ermittelten Beladung des jeweiligen Zeolithen. In keinem Fall kann die gesamte Menge an adsorbierten Furaneol[®] zurückgewonnen werden. Dies liegt zum Teil sicherlich auch an dem aufwendigen Waschvorgang. Die Tendenz der vorangegangenen Experimente setzt sich auch hier fort. Die Zeolithe mit höherem Modul erweisen sich bei der Adsorption und Desorption von Furaneol[®] am geeignetsten.

4.2.2.7 Desorption in Abhängigkeit von Partikelgröße und Modul

Mit Hilfe der Zeolithe kann eine Aufreinigung des gewünschten Produktes erreicht werden. Jedoch ist die erhaltene Lösung gefärbt. Es ist zu vermuten, daß aufgrund der großen Oberfläche der Zeolithe Melanoidine an der Oberfläche unspezifisch gebunden werden, die bei der Desorption eine störende Gelb- bis Braunfärbung, ähnlich der von handelsüblichen Apfelsaft, im Desorbat hervorrufen. Zudem behindern auch hier die Melanoidine die Reingewinnung des Furaneols[®]. Beim Fällen aus der Ethanolphase erhält man eine braune wachsartige Masse.

Die hochmolekularen Melanoidine werden hauptsächlich, wenn nicht gar ausschließlich, an der großen Oberfläche des feinen Zeolithpulvers unselektiv adsorbieren. Es gilt durch Verringerung der Oberfläche eine Adsorption der Melanoidine zurückzudrängen. Der Einfluß der Korngröße auf das Adsorptionsverhalten der Melanoidine wird durch einen Vergleich der Adsorption an Zeolithen mit Partikelgrößen $\geq 5 \mu\text{m}$ beispielhaft im Fall des Typs ZSM5 untersucht. Dieser steht für die Untersuchungen mit folgenden Modulen und mittleren Partikelgrößen zur Verfügung: ZSM5 M=28, $5\mu\text{m}$ und ZSM5 M=1000, $28\mu\text{m}$.

Für die genannten Zeolithe wird, entsprechend denen mit kleinerer Partikelgröße, ein gleiches Adsorptionsverhalten im Fall vom Furaneol[®] festgestellt. Im Vergleich zu den oben genannten, besitzen diese Zeolithe eine geringere Färbung durch Melanoidine. Die Desorbate zeichnen sich ebenfalls durch geringere farbige Verunreinigungen aus. Jedoch wird auch hier noch eine ausreichende Menge Melanoidine mitdesorbiert, die ein Auskristallisieren des Furaneols[®] verhindert.

In dem gleichen Versuch wird eine weitere Differenzierung des Einflusses des Moduls auf die Adsorption von Furaneol[®] an Zeolithe des Typs ZSM5 untersucht. Bei diesem Typ wird bei hohem Modul die höchste Affinität gefunden. Es ist zu erwarten, daß Änderungen am Modul bei diesem Typ am besten zu beobachten sind. Die Ergebnisse werden in Relation zu den charakterisierten Zeolithen des Typs gesetzt.

Die Ergebnisse der Desorption sind in Abbildung 4-25 dargestellt. Man erkennt, daß sich die Partikelgröße in dem untersuchten Bereich kaum auf die Desorption auswirkt. Beim Zeolith ZSM5 mit dem Modul $M > 1000$ (Partikelgröße $< 2\mu\text{m}$), bzw. ZSM5 M=1000 (Partikelgröße = $28 \mu\text{m}$) wird im Rahmen der Meßgenauigkeit entsprechend gleich viel desorbiert. Ebenfalls wird bei dem Zeolith ZSM5 mit dem Modul M=28 keine Abhängigkeit von der Partikelgröße festgestellt. Die Zugänglichkeit der Poren scheint in jedem Fall gewährleistet.

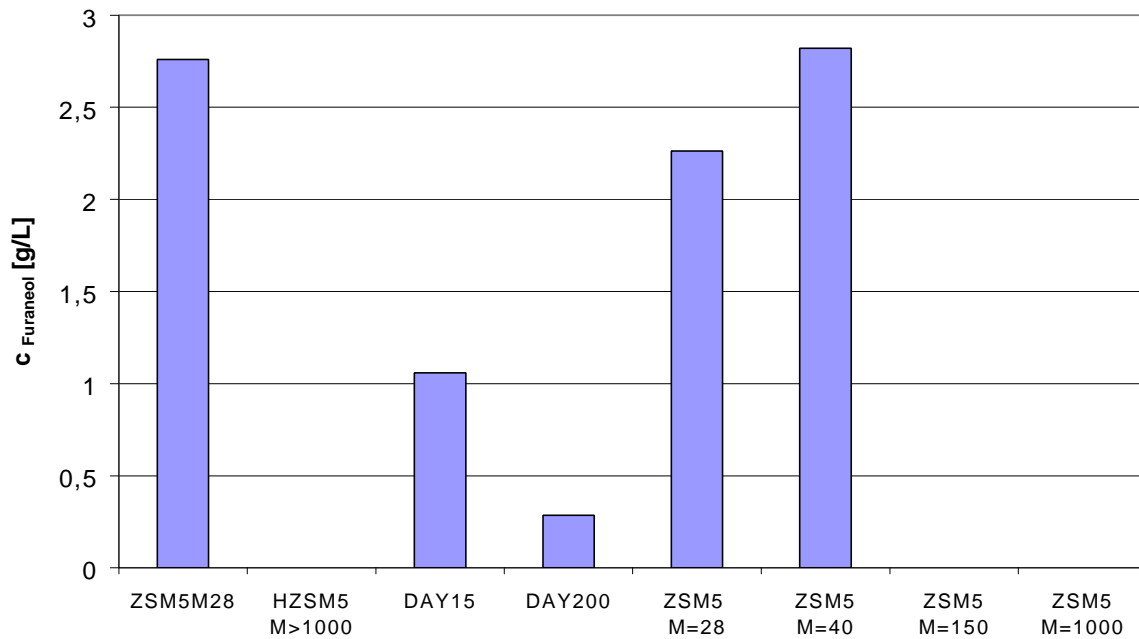


Abbildung 4-24: Vergleich des Adsorptionsverhalten, Einfluß des Moduls und der Partikelgröße, $c_0 = 4,91 \text{ g/L}$

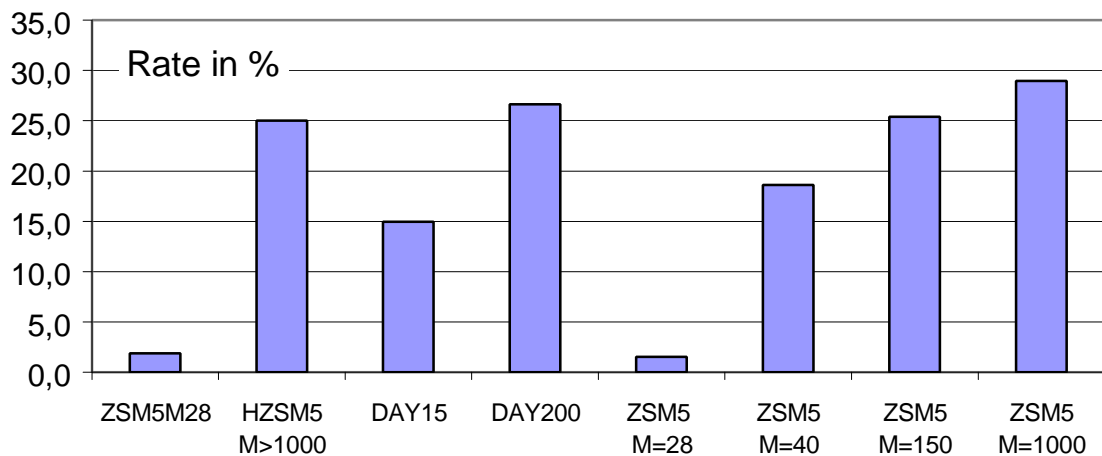


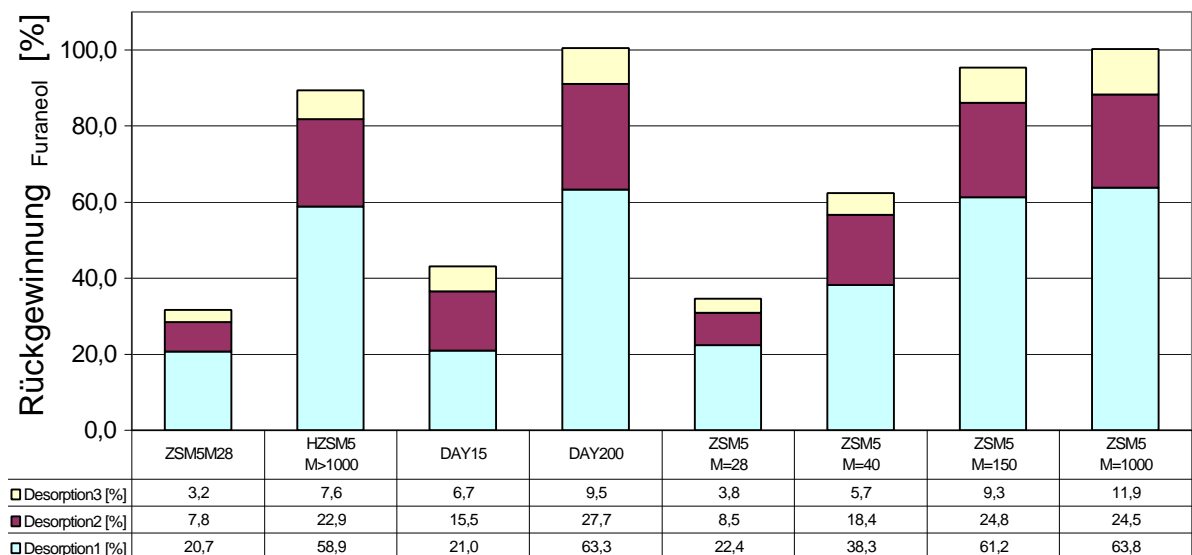
Abbildung 4-25: Desorption in Abhängigkeit von Partikelgröße, Einfluß des Moduls, 50 % Ethanol-Gehalt, 24 h, $V_{\text{Des}}=10 \text{ mL}$, 25°C . Die Angabe „Rate in %“ bezieht sich auch hier auf die prozentuale Rückgewinnung von adsorbiertem Furaneol[®] auf dem jeweiligen Zeolithen.

Eine wesentlich größeren Einfluß hat der Modul auf das Desorptionsverhalten der Zeolithe. Die Desorption steigt mit steigendem Modul. Bereits bei einem Modul von $M = 150$ werden 80 % der maximalen Desorption (beim Modul $M = 1000$) erreicht. Entsprechend dem eingesetzten Desorptionsvolumen wird nur 50 % des in Kap. 4.2.2.6 desorbierten Furaneols[®] erreicht.

4.2.2.8 Fraktionierte Desorption

Aufgrund der für die Säulenchromatographie zu geringen Partikelgröße der Zeolithe, wird die fraktionierte Desorption durchgeführt. Ziel ist die komplette Desorption von dem Zeolithen. Dazu wird nach erfolgreicher Adsorption der gewaschene Zeolith in definierten Mengen Desorptionslösung je 12 Stunden geschüttelt. Die Lösung wird abgetrennt und ersetzt, bis die Desorption als abgeschlossen gilt. Als Maß hierfür gilt die Bestimmung von Furaneol[®] mittels HPLC. Die Ergebnisse sind in

Abbildung 4-26 als gestapeltes Säulendiagramm dargestellt. Mit dem ersten Desorptionsschritt kann eine Aufkonzentrierung des Furaneol[®] erreicht werden. Die prozentuale Rückgewinnung sinkt erwartungsgemäß mit jedem Desorptionsschritt.



**Abbildung 4-26: Fraktionierte Desorption, Ethanol/Wasser-Gemisch, 50% Ethanol-Gehalt, 25°C,
 $V_i = 10$ ml jeweils**

Die Desorption kann bei den Zeolithen DAY200, ZSM5 mit einem Modul >150 nach drei Desorptionsschritten quantitativ erreicht werden. Es zeigt sich eine Abhängigkeit der Desorptionsrate vom Modul beim Typ ZSM5. Die Rate steigt von 35% bei einem Modul=28 auf 100% bei einem Modul=1000.

Die Rückgewinnung von Furaneol[®] von Zeolithen mit niedrigem Modul gelingt nur zu 35 %, bei dem Zeolith ZSM5, und zu ca. 40% beim Typ DAY.

Die Meßwerte sind aufgrund der aufwendigen Aufarbeitung zwischen den Desorptionsschritten mit einem Fehler von mind. 10% behaftet. Aufgrund von Volumenschwankungen werden die Volumina sicherlich als zu klein bemessen. Dies wird besonders deutlich bei der Abweichung der Ergebnisse von HZSM5 M>1000 (90 %) und ZSM5 M=1000 (100 %).

Die Färbung der einzelnen Desorptionslösungen verringert sich entsprechend mit dem Desorptionsschritt. Dennoch weist auch die dritte Desorptionslösung noch eine Restfärbung auf. Die Gewinnung einer farblosen Furaneol[®]-Lösung kann deshalb auch mit dieser Methode nicht erreicht werden. Die Desorption der Melanoidine verläuft entsprechend der des Furaneols[®]. Durch die große Oberfläche der Zeolithe können beträchtliche Mengen an Verunreinigungen anhaften, die sich in der weiteren Aufarbeitung als störend erweisen. Prinzipiell eignen sich die Zeolithe zur Aufreinigung und Gewinnung des Furaneols[®] aus der Reaktionslösung. Die Abtrennung des Furaneols[®] kann aber nur restlos auf chromatographischen Wege erfolgen. Aufgrund der geringen Partikelgrößen eignen sich die zur Verfügung stehenden Zeolithe aus praktischen Gründen nicht zur Chromatographie. Leider kann dieser Punkt hier nicht weiter untersucht werden. Der Erfolg einer solchen Trennung gilt jedoch als wahrscheinlich.

4.2.2.9 Zusammenfassung

Zeolithe bieten eine interessante Alternative zur Aufreinigung von Furaneol[®]. Die Affinität des Furaneols[®] ist dabei abhängig vom Modul. Je höher der Modul, desto größer ist die Affinität. Dieser Zusammenhang ist unabhängig von den untersuchten Typen. Die Desorption des Furaneols[®] gelingt mit Hilfe von Ethanol. Aus Modellösungen kann Furaneol[®] quantitativ zurückgewonnen werden. Die Abtrennung aus Reaktionslösungen kann ebenfalls erreicht werden.

Im Vergleich zur Adsorption von reinem Furaneol[®] (Einkomponentensystem) wirkt sich das tatsächlich vorhandene Mehrkomponentensystem negativ auf die Beladung der Zeolithe mit Furaneol[®] und die Desorption aus. In Abhängigkeit vom Modul ist immer mit Co-Adsorption der als Katalysator verwendeten Aminosäure und von Melanoidinen zu rechnen. Ersteres bedeutet für die weitere Aufreinigung kein Problem, da die Löslichkeit der Aminosäure in der Desortionslösung vernachlässigt werden kann. Bei der Wiederverwendung des Zeolithen ist aber mit Akkumulation zu rechnen. Dies ist bei der Auslegung zu berücksichtigen. Die unspezifische Anlagerung der Melanoidine bereitet indes bei der weiteren Aufarbeitung Schwierigkeiten, da diese Verbindungen bei gleichen Bedingungen von den Zeolithen gewaschen werden und damit die erhaltenen Lösungen färben. Aus einer so verunreinigten Lösung läßt sich Furaneol[®] nur unter erheblichem Mehraufwand isolieren.

Ein Einfluß der Partikelgröße auf das Adsorptionsverhalten wird in dem untersuchten Bereich nicht festgestellt. Die Poren der Zeolithe sind in jedem Fall für Furaneol[®] gut zugänglich.

Die Korngröße ist der größte Nachteil der verwendeten Zeolithe. Aufgrund der geringen Größe ist es nahezu unmöglich ein kontinuierliche Extraktionsverfahren zu entwickeln. Selbst 0,25 µm- Filter werden innerhalb von Minuten verstopft. Der Druckabfall der über eine Säule in einem technischen Prozeß entsteht, wäre enorm. Die Alternative „Cross-flow“ ist für dieses Problem nur zum Teil einsetzbar.

Für die Umsetzung in einen technischen Prozeß ist die Herstellung eines Materials mit einer Korngröße >100 µm wichtig, um eine effektive, einfache Abtrennung zu erreichen. Die Auftragung der Zeolithpartikel auf einen Trägerkörper wäre denkbar. Diese könnten dann evtl. schon während der Reaktion zugegeben werden, um Furaneol[®] direkt zu binden und somit Folgereaktionen zu verhindern. Dabei ist zu gewährleisten, daß keine negative Beeinflussung der Adsorption durch das Trägermaterial stattfindet.

5 Zusammenfassung und Diskussion

Diese Arbeit sollte dazu dienen, die zahlreichen Parameter, die Synthese und Aufreinigung des Furaneols[®] beeinflussen, zu analysieren und ihre Wertigkeit für einen technischen Prozeß festzustellen.

Eine neue enzymatische Synthese der Desoxyzucker aus Fructose-1,6-bisphosphat über Dihydroxyacetonphosphat und Desoxyzuckerphosphaten wurde erfolgreich durchgeführt. Die Kombination der einzelnen enzymatischen Reaktionsschritte gelingt teilweise. Durch selektives Entfernen der Reaktionsprodukte muß ein Fließgleichgewicht erreicht werden, um den vollständigen Umsatz der Edukte zu gewährleisten. Die Abspaltung der Phosphatgruppe der Desoxyzuckerphosphate muß separat durchgeführt werden. Aufreinigungsschritte innerhalb des Prozesses bedeuten erheblichen Mehraufwand und Kosten und sind daher unerwünscht. Dieses läßt in Verbindung mit dem hohen Eduktpreis diesen Syntheseweg für einen technischen Prozeß unwirtschaftlich erscheinen.

Als preiswerte Alternative kann Rhamnose (6-Desoxy-L-mannose) als Ausgangsmaterial für den letzten Syntheseschritt verwendet werden.

Die Synthese des Furaneols[®] aus Rhamnose gelingt in Anwesenheit von Aminosäuren. Durch Einsatz von Rhamnose und Aminosäuren aus natürlichen Ressourcen kann auf lebensmittelrechtlich bedenkliche Stoffe, wie z.B. Triphenylphosphin bei der Synthese aus 3-Hexin-2,5-diol [RE ET AL., 1973] oder Piperidin [PEER, 1968], verzichtet werden. So hergestelltes Furaneol[®] kann als natürlich bezeichnet werden, was den Wert dieses Produktes drastisch erhöht.

Die Reaktion wurde in Bezug auf Reaktionsdauer, und –Temperatur, pH-Wert und Menge der Aminokomponente optimiert. Zur maximalen Ausbeute in einem bei pH 7 gepufferten, wäßrigen Medium sind gleiche Mengen an Edukt und Katalysator (Asparagin) nötig. Auch die Wahl des Reaktionsmediums hat entscheidenden Einfluß auf die Reaktion. Beste Ergebnisse wurden mit Natriumphosphatpuffer als Reaktionsmedium erzielt. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur steigert die Ausbeute und verkürzt die Reaktionszeit. Bei einer Reaktionstemperatur von 100°C wird das Maximum von 40% der Ausbeute bei 8 bis 9 Stunden durchlaufen. Bei einer Reaktionstemperatur von 150°C in einem Autoklaven ist die Ausbeute bereits nach 4 bis 5 Stunden maximal. Die Ausbeute wird damit nochmals gesteigert auf 60 % bezogen auf eingesetzte Menge an Rhamnose.

Längere Reaktionszeiten führen zu Ausbeuteverlusten durch Zersetzung des Furaneol[®] und vermehrter Bildung von Nebenprodukten. Die Menge an gebildeten braunen Farbstoffen und Pigmenten (Melanoidinen) behindert in hohem Maße die weitere Aufarbeitung und macht zusätzliche Aufreinigungsschritte erforderlich, die sich in den Gesamtkosten bemerkbar machen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eingehend die Aufreinigung des natürlich hergestellten Furaneol[®] untersucht. Mit Hilfe organischer Lösungsmittel kann Furaneol[®] erfolgreich aus „jungen“ Reaktionslösungen, d.h. Reaktionszeiten bis zu 2 Stunden, in hoher Reinheit extrahiert werden kann. Die Extraktion der Reaktionslösung bei fortgeschrittener Reaktion mit organischen Lösungsmittel erreicht eine Aufkonzentrierung an Furaneol[®]. Von denen als GRAS (Generally Regarded As Safe) zugelassenen Lösungsmitteln extrahiert Isobutylacetat die größte Menge an Furaneol[®]. Bei allen Extraktionen ist das erhaltene Produkt durch färbende Substanzen verunreinigt. Dies erfordert eine zusätzliche Aufreinigung des gewünschten Produktes. Die Entfernung der färbenden Substanzen mit Hilfe von Aktivkohle und makroporösen Trägermaterialien konnte nicht erreicht werden, da Furaneol[®] ebenfalls und zum Teil irreversibel adsorbierte. Eine Abtrennung der störenden Melanoidine durch enzymatische Spaltung mißlang ebenfalls.

Dagegen gelingt die Extraktion von Furaneol[®] mit Hilfe von überkritischem Kohlendioxid aus der Lösung nach durchgeführter Reaktion. Zur Untersuchung der Extraktion wurde eigens eine Versuchsanlage entworfen, in der bei einem Druck von 180 bar das Furaneol[®] nahezu quantitativ innerhalb von 34 Stunden (75 % nach 15 Stunden) extrahiert werden konnte. Eine gute Durchmischung ist dabei essentiell, um kurze Extraktionszeiten zu gewährleisten, da eine Zersetzung des instabilen Furaneols[®], wie sie bei den herkömmlichen Aufarbeitungsmethoden beobachtet wird, auch durch überkritisches Kohlendioxid nicht verhindert werden kann. Der Stoffübergangskoeffizient wurde bestimmt. Damit kann die Auslegung zukünftiger Anlagen berechnet werden.

Durch einfaches Entspannen des Kohlendioxids kann das reine Furaneol[®] gewonnen werden. Das Furaneol[®] schlägt sich dabei wachsartig nieder. Dadurch können zusätzliche Probleme entstehen, wie z.B. das Verstopfen des Restriktors oder Verblasen des gewünschten Produktes. Durch eine erhöhten apparativen Aufwand sollten diese Problemen jedoch zu umgehen sein.

In einem technischen Prozeß ist es sinnvoll das Kohlendioxid zu recyceln. Dazu ist es notwendig das CO₂ vom jeglicher Beladung durch Furaneol[®] zu befreien. Die Abtrennung der Substanz hängt von der Steilheit der Zustandsänderung ab. In dem Bereich, in dem ein ideales

Gas in den nicht idealen Zustand übergeht ist der Beladungskapazität am geringsten. Gegenüber den meisten Methoden hat überkritisches Kohlendioxid den Vorteil toxikologisch unbedenklich zu sein. Damit kann das erhaltene Produkt uneingeschränkt für Lebensmittel eingesetzt werden.

Zeolithe bieten eine interessante Alternative zur Aufreinigung von Furaneol[®]. In dieser Arbeit wurden die Sorptionsisothermen des Furaneol[®] auf Zeolithen des Typs ZSM5 und DAY bestimmt. Die Affinität des Furaneols[®] ist dabei abhängig vom Modul, d.h. vom Verhältnis Si/Al. Je höher der Modul, desto größer ist die Affinität. Dieser Zusammenhang ist unabhängig von den untersuchten Typen. Die Desorption des Furaneols[®] gelingt mit Hilfe von Ethanol.

Aus Modelllösungen wurde Furaneol[®] erfolgreich quantitativ zurückgewonnen. Die Abtrennung aus Reaktionslösungen gelang ebenfalls. Die Co-Adsorption der Melanoidine bereitet indes bei der weiteren Aufarbeitung Schwierigkeiten, da diese Verbindungen in vergleichbaren Raten von den Zeolithen desorbiert werden und die erhaltenen Lösungen färben. Aus einer so verunreinigten Lösung läßt sich Furaneol[®] nur schwer isolieren. Eine fraktionierte Desorption beseitigt das Problem teilweise. Die Lösungen sind weniger verunreinigt. Ebenfalls konnte eine Aufkonzentrierung des Furaneols[®] erreicht werden.

Sowohl durch Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid als auch der Festphasenextraktion mit Zeolithen konnte eine Aufreinigung des Furaneol[®] erreicht werden. Keine der beiden Methoden bedeuten einen Eingriff, der entsprechend der Aromenverordnung zur Darstellung von natürlichen Produkten nicht erlaubt ist. So gewonnenes Furaneol[®] kann als natürlich bezeichnet werden.

Eine wesentlicher Entscheidungsparameter für die Wahl des Aufreinigungsschrittes ist die Möglichkeit eines „Upscaling“ zum technischen Prozeß. Die diskontinuierliche Aufreinigung erscheint nicht sehr praktikabel. Aufgrund der geringen Partikelgröße der Zeolithe ist der Einsatz in einem kontinuierlichen Verfahren schwer zu realisieren. Die Alternative „Cross-flow“ ist für dieses Problem nur zum Teil einsetzbar.

Daher wird zur Aufreinigung die Extraktion mit Hilfe von überkritischem Kohlendioxid empfohlen. Diese Methode hat zudem den Vorteil, daß Probleme aus dem Labormaßstab, durch „Upscaling“ zum technischen Maßstab wesentlich einfacher lösbar sind. Auch hier ist der kontinuierliche Einsatz schwer zu realisieren. Überkritisches Kohlendioxid hat aber den unbestrittenen Vorteil der leichten Abtrennung und Wiedergewinnung nach erfolgreicher Extraktion. Darüber hinaus ist es auch in hoher Reinheit preisgünstiger als die meisten organischen Lösungsmittel entsprechender Qualität.

6 Ausblick

Bei jeder Arbeit über ein neues Forschungsprojekt tauchen zahlreiche Fragen auf, die in derselben nicht mehr gelöst werden können und daher Ansatzpunkte für weitere Arbeiten liefern. Die für die Experimente verwendeten universitären Anlagen waren universell eingerichtete Versuchsanlagen. Scale-up-Versuche konnten mit diesen Anlagen nicht durchgeführt werden. Aus den hier gewonnenen Ergebnissen kann aber der Aufbau einer solchen Anlage abgeleitet werden.

Zur Aufklärung der kinetischen Parameter der Furaneol[®]-Reaktion wurden im Rahmen dieser Arbeit Ansatzpunkte geliefert. Zur Entschlüsselung dieser komplexen Reaktion wären weitere Untersuchungen sinnvoll. Der Einsatz moderner Datenverarbeitung wird diese Forschung sicherlich hilfreich unterstützen.

Aufgrund der langen Reaktionszeiten ist der Einsatz eines kontinuierlichen Rührkessels sinnvoll. Die Abtrennung des gewünschten Produktes während der Synthese wird die Ausbeuteminderung durch Nebenreaktion reduzieren. Dies könnte z.B. durch eine kontinuierliche Adsorption an Zeolithen geschehen. Dazu müßte das Reaktionsgemisch über eine mit unpolaren Zeolithen gefüllte Säule gegeben werden. Um eine kontinuierliche Abtrennung zu verwirklichen, ist es unbedingt notwendig, Zeolithe mit ausreichend großen Partikeln zu verwenden. Dies kann z.B. durch Aufbringen der Zeolithe auf Trägermaterialien geschehen, die wiederum sich gegenüber der Reaktion und den in der Lösung vorhandenen Substanzen neutral verhalten. Zur Zeit sind solche Materialien jedoch noch nicht verfügbar.

Ebensfalls interessant wären Untersuchungen über die Stabilität von Aromastoffen in Zeolithen. Falls die Stabilität der Verbindungen in Zeolithen erhöht ist, könnte dadurch der Einsatz anderer Aufarbeitungsmethoden ermöglicht werden.

Eine sinnvolle Alternative zur Aufreinigung ist die Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid. Die direkte Kopplung der Extraktion mit der Synthese kann nicht erfolgen, da das Kohlendioxid den pH-Wert der Lösung negativ beeinflusst. Dennoch scheint der Einsatz des überkritischen Mediums am sinnvollsten. Durch ein Scale-up erhöht sich die Wirtschaftlichkeit einer solchen Anlage. Temperatur- und Druckschwankungen können besser kontrolliert und reguliert werden. Zur erfolgreichen Abtrennung des flüchtigen Furaneols[®] ist eine Ergänzung der apparativen Ausrüstung durch Abscheiderkaskaden, bzw. durch eine CO₂-Destillationskolonne mit direkt gekoppelter Analytik denkbar.

7 Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen

β	Stoffübergangskoeffizient
c	Konzentration
DC	Dünnschichtchromatographie
DHAP	Dihydroxyphosphat
D_i	Diffusionskoeffizient
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
GAP	Glycerinaldehydphosphat
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometer
GDH	Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase
GRAS	Generally Regarded As Safe
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
k	Geschwindigkeitskonstante
min	Minute
p	Druck
PCA	Pyrrolidoncarbonsäure
q_i	Beladung
$q_{i,s}$	maximale Beladung
RAMA	Aldolase aus Kaninchenmuskel (rabbit muscle aldolase)
R_T	Retentionszeit
SCCO ₂	überkritisches Kohlendioxid
t	Zeit
T	Temperatur
TBA	Tert-butylammoniumhydrogensulfat
TPI	Triosephosphatisomerase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
x_i	Molenbruch

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Materialien

Wenn nicht anders angezeigt, wurden alle benutzten Chemikalien von SIGMA ALDRICH bezogen.

CO₂, Reinheit 4,5
Diethylether
Na₂HPO₄
NaH₂PO₄
n-Hexan

Linde AG
Riedel-de Haën
Merck
Merck
Fluka

7.2.2 Enzyme

Enzym	E.C.-Nr.	Quelle	Handelsform	Bezug
Aldolase	4.1.2.13	Staphylococcus Carnosus	Suspension	Boehringer Mannheim
Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase	1.1.1.8	Kaninchenmuskel	Suspension	Sigma
Triosephosphatisomerase	5.3.1.1	Kaninchenmuskel	Suspension	Sigma
GDH/TPI		Kaninchenmuskel	Suspension	Sigma
Saure Phosphatase	3.1.3.2	Kartoffel	Pulver	Sigma
Pepsin	3.4.23.1	Schweinebauch	Pulver	Sigma
Lipase	3.1.1.3	Mikrobiell	Pulver	Sigma
Lipase PS	3.1.1.3	Mikrobiell	Pulver	Amano
Esterase	N/A.	Mucor miehei	Pulver	
α -Chymotrypsin	3.4.21.1		Pulver	Sigma
Trypsin		Rinderpankreas	Pulver	Fluka
Acylase I	3.5.1.14		Pulver	Sigma
α -Amylase	3.2.1.1	Bacillus licheniformis	Pulver	Sigma
Arginase	3.5.3.1	Rinderleber	Pulver	Sigma
Calf Rennet extract (Chymosin, Bovine Pepsin)	-	Kalb	Lösung	Wiesby
Lysozyme	N/A.	Hühnerei	Pulver	Serva

7.2.3 Komponenten der Hochdruckanlage

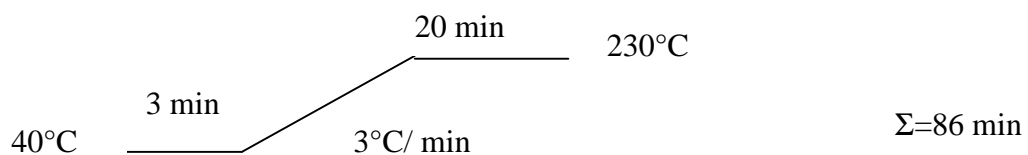
Hochdruckpumpe mini-pump duplex, NSI 33R	Milton-Roy
Zirkulationspumpe PKP P250V 225 BTG	Buddeberg
Thermostat, RM 6 (-15°C - 100°C)	mgw Lauda
Kapillare, Edelstahl, 1/16" AD, 10mm ID	Knauer
Ferrules, Edelstahl	Knauer
Ferrules, PEEK	Upchurch
O-Ringe, Viton 500	Balster
Quarzplatte, Ø 40 mm, d 8 mm	Spindler & Hoyer
Berstscheiben, P17mn170-09 (170 bar)	Schlesinger GmbH
Manometer	Hensinger & Salmon
Brutschrank BE 500	Memmert
Nadelventile, Milli Mite, 1/16"	Hoke
Nadelventile, Two Way	SSI
6-Port/3-Kanal-Injektionsventil	Knauer
7-Port-Verteilerventil	Knauer
Probenschlaufe 200 µl	Knauer

7.2.4 Aktivitätsbestimmungen der nativen und immobilisierten Enzyme

Gerät	Bezeichnung	Firma
Spektrophotometer	Uvikon 869	Kontron
Spektrophotometer	Uvikon 940	Kontron
Durchflußküvette	QS d= 1cm	Hellma
Quarzküvette QS	QS d= 1cm	Hellma
Peristaltische Pumpe	IPS 8	Ismatec
Mobicol-Kartusche	Volumen: 1 ml	MoBiTec

7.2.5 GC-MS Analyse von Furaneol®

GC800	Fison
MS-Selektor: MD800 Quadrupol	Fison
Interface: 320°C	
Ionenquelle: 200°C	
Quadrupol Massenfilter 100°C	
Ionenstoßionisation: 70eV	
Massenbereich 30-300 Da	
Vorsäule: FS-CW-desaktiviert, 3 m x 0.32mm	Macherey & Nagel,
Trennsäule: Permabond CW20M, 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm	Macherey & Nagel,
Helium: 50 kPa	
1 µL on column Injektion	

Temperaturprogramm:

7.2.6 HPLC-Analyse der enzymatischen Reaktionsschritte

HPLC-Anlage:

Pumpe SDS 9404	Schambeck SFD GmbH
Injektionsventil, 20 µl	Valco
UV-Detektor ERC-7215	ERMA
Ventilsteuerung CIM	Autochrom
Datenaufnahme 162 CSI-Box	Autochrom
Datenverarbeitung CAFCA	Autochrom
RP-Säule 250/4 Nucleosil 100-5 C ₁₈	Machery-Nagel

Laufmittel:

wäßriger Phosphatpuffer:	15 mmol/l Tetrabutylammoniumsulfat
	40 mmol/l NaH ₂ PO ₄
	mit NaOH aufpH 6,5

Geräteeinstellungen:

Injektionsvolumen	20 µl
Detektionswellenlänge	270 nm
Flußrate	1 ml/min
Auswertemodus	Peakhöhe, Standardzusatzverfahren

7.3 Versuchsvorschriften

7.3.1 Aldolase-Aktivität

nativ:				
1,5 ml- Ansatz:	1,3 ml	Tris/HCl (0,1 M, pH 7,4)	0,6 ml	0,41 ml
	0,05 ml	NADH-Lösung (2,33 mg/ml)	Ansatz:	0,02 ml
	0,05 ml	GDH/TPI (50 GDH-units/ml)		0,05 ml
	0,05 ml	Probe (maximal 0,5 units!)		0,02 ml
	0,05 ml	FBP-Lösung (26,715 mg/ml)		0,10 ml
	1,5 ml			0,60 ml

immobilisiert (Bypass-Apparatur):	
3,1 ml	Tris/HCl (0,1 M, pH 7,4)
0,2 ml	NADH-Lösung (2,33 mg/ml)
0,3 ml	GDH/TPI (50 GDH-units/ml)
1 ml	FBP-Lösung 58 mM
4,6 ml	Reihenfolge beachten!!

Aktivitätstests für Triosephosphatisomerase und Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase entsprechend.

7.3.2 Native und immobilisierte Saure Phosphatase

Eingesetzte Lösung	Konzentration/Aktivität	Verwendete Menge
Citratpuffer	45 mM pH 4,9	-
4-Nitrophenylphosphat	7,6 mM in Citratpuffer	1 ml
Saure Phosphatase-Lösung oder Immobilisat	ca. 1 U/ml in Citratpuffer	200 µl oder ca. 5 mg
Natronlauge	0,1 M	800 µl

1. 200 µL Enzymlösung + 1 mg Substratlösung, oder 5 mg Immobilisat + 1mL Substratlösung
2. Nach 30 min + 800 µL NaOH
3. Detektion bei 405 nm gegen Blindlösung, $\epsilon_{405}(\text{PNP}) = 18,5 \text{ l}/(\text{mmol} \cdot \text{cm})$

7.3.3 BCA-Test

A: BCA-Lösung:	1 % Bicinchoninsäure	4,3 g
	2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$	15,5 g
	0,16% Na-tartrat	0,8 g
	0,4 % NaOH, 1 mol/l	97 ml
	0,95 % NaHCO_3	4,75 g
	ad 500 ml pH 11,25 (NaOH)	
B: CuSO_4 -Lösung:	4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	

1. Gebrauchslösung.: 50 Teile A + 1 Teil B (A und B kommerziell erhältlich)
2. Protein-Kalibrationslösung: 1mg/ml (E280 = 0,75) Ovalbuminlösung
Kalibration von 0 bis 1 mg/ml (8 Meßpunkte)
3. Durchführung auf Mikrotiterplatten in Doppelbestimmung:
20 µl Probe + 300 µl Gebrauchslösung
4. Inkubation: 30-60 Min bei 37°C
5. Detektion: 560 nm, ELISA-Reader

7.3.4 Darstellung des Lactaldehyds aus Lactaldehyddimethylacetal

Entschützen des Lactaldehyddimethylacetals:

Zur Synthese von Lactaldehyd in wäßriger Lösung wird zunächst eine wäßrige Lactaldehyddimethylacetal-Lösung mit gewünschter Konzentration hergestellt. Diese wird kontinuierlich durch eine mit saurem Dowex 50 WX 8 H⁺ Austauscherharz gefüllte Säule (Durchmesser 1 cm; Füllhöhe 10 cm) gepumpt. Der Ansaugschlauch und der Schlauch des Säulenendes befinden sich im gleichen Gefäß. Die Flußrate beträgt 0,2 ml/min. Der Reaktionsverlauf wird mittels HPLC überwacht (Eluent: 15 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat und 40 mM NaH₂PO₄, pH 6,5, Flußrate: 1 ml/min; C18-Säule, Waters, Resolve 5µ Spherical, 3,9 x 150 mm, UV-Detektion: 200 nm). Die Reaktion wird abgebrochen, wenn sich die Peakfläche des Lactaldehydpeaks nicht mehr ändert. Je nach Ansatzgröße variiert die Umsetzungsdauer. Die Umsetzung von 40 ml 1,2 M Lactaldehyddimethylacetal-Lösung kann nach 16 h beendet werden. Nach der Umsetzung wird der Kationenaustauscher mit 6 N Salzsäure regeneriert.

7.3.5 Versuchsvorschriften zur Synthese von 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat und 6-Desoxy-L-sorbose-1-phosphat

Reaktionsbedingungen für die enzymatische Darstellung von 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat und 6-Desoxy-L-sorbose-1-phosphat in Anlehnung an [HARTMANN 1996]:

100 ml 50 mM Fructose-1,6-bisphosphat-Lösung pH 7,4 werden mit 1,8 ml einer 1,2 M Lactaldehyd-Lösung verrührt. Dazu werden 50 Units native *Staphylococcus carnosus*-Aldolase und 220 U Triosephosphatisomerase gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wird mittels HPLC überwacht (Eluent: 15 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat und 40 mM NaH₂PO₄, pH 6,5; Flußrate: 1 ml/min; C18-Säule, Waters, Resolve 5µ Spherical, 3,9 x 150 mm; UV-Detektion: 200 nm). Die Reaktion wird nach 120 h beendet, wenn die Fläche des Produkt-Peaks (3,4 min.) nicht mehr zunimmt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsgemisch unter Vakuum bis zur Trockene eingeeengt.

Dünnschicht-Chromatographie:

Es werden DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (5 x 7,5) von der Firma Merck, Darmstadt verwendet. Das Laufmittel zur Trennung des Reaktionsgemisches besteht aus einem Ammoniak (25 %ig)-Wasser-Isopropanol-Gemisch = 1 Volumenteil : 3 Volumenteile : 6 Volumenanteile [BOEHRINGER MANNHEIM,1995]

Die Substanzen werden mit DNPH-Reagenz angefärbt. Dies besteht aus folgenden Substanzen:

- 1 g 2,4 Dinitrophenylhydrazin
- 25 ml Ethanol
- 8 ml Wasser
- 5 ml konzentrierte Schwefelsäure

7.3.6 Überführung der Desoxyzuckerphosphate in Desoxyzucker

in Anlehnung an [HARTMANN 1996]:

2,5 mg der trockenen Desoxyzuckerphosphate werden in 500 µl 45 mM Citrat-Puffer pH 4,9 gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,5 U Saure Phosphatase gegeben. Die Überwachung der enzymatischen Phosphatabspaltung erfolgt über Dünnschicht-Chromatographie. Es werden DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (5 x 7,5) von der Firma Merck, Darmstadt verwendet. Das Laufmittel zur Trennung des Reaktionsgemisches besteht aus einem Methanol-Dichlormethan-Gemisch = 1 Volumenteil : 9 Volumenteile. Die Substanzen werden mit DNPH-Reagenz angefärbt.

7.3.7 Darstellung von Furaneol[®] mit Hilfe von Piperidin/Eisessig nach [PEER, 1968]

Reaktion:

500 mg Rhamnose (=2,74 mmol)	in 5 mL abs. Ethanol
+ 0,13 g Piperidin (=1,52 mmol)	in 0,21 g Eisessig (=3,49 mmol)
über Nacht refluxiert	
danach der Ethanol abrotiert	

Aufarbeitung:

(5 x 5 mL) extrahieren mit Diethylether	Etherphasen vereinigen und einengen
H ₃ PO ₄ wird auf pH 2 eingestellt	
Ionenaustauscher Dowex 50W säulen	

7.3.8 Darstellung von Furaneol[®] mit Hilfe von Trägermaterialien mit Aminofunktionen

Batchversuch:

3g Trägermaterial werden in 20 ml 0,1 M NaH₂PO₄, pH 7 eingetragen und erhitzt. Ab einer Temperatur von >70°C wird 1g (5,488 mmol) Rhamnose hinzugegeben und 3,5 h refluxiert. Das erhaltenen Reaktionsgemisch wird nach Abkühlen gegebenenfalls verdünnt und dann mittels HPLC analysiert.

Kontinuierlicher Versuch:

5g, bzw. 10g (Dianion WA30) Trägermaterial werden in eine präparative HPLC-Säule gefüllt und nach Einstellung der Betriebstemperatur (>70°C) im Säulenofen mit einer Lösung von 0,5g (2,744 mmol) Rhamnose in 0,1 M NaH₂PO₄, pH 7 beschickt. Die austretende Lösung wird mittels HPLC analysiert.

7.3.9 Darstellung von Furaneol[®] mit Hilfe von Aminosäuren

6,66 mmol, bzw, 13,32 mmol Aminosäure werden in 10 ml 0,1 M NaH₂PO₄, pH 7 eingetragen und erhitzt. Ab einer Temperatur von >70°C wird 0,5g (2,744 mmol) Rhamnose hinzugegeben und 3,5 h refluxiert. Das erhaltenen Reaktionsgemisch wird nach Abkühlen gegebenenfalls verdünnt und dann mittels HPLC analysiert.

7.3.10 Optimierung der Reaktionstemperatur und Dauer

66,6 mmol, bzw, 133,2 mmol Aminosäure werden in 100 ml 0,1 M NaH₂PO₄, pH 7 eingetragen und erhitzt. Nach Einstellen einer definierten Reaktionstemperatur von >70°C wird 5g (27,44 mmol) Rhamnose hinzugegeben und der Konzentration/Zeit-Verlauf mittels HPLC verfolgt. Das erhaltenen Reaktionsgemisch wird nach Abkühlen gegebenenfalls verdünnt. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung gekühlt und aufgefallenes Asparagin filtriert und bis zur Gewichtskontanz getrocknet und ausgewogen.

7.3.11 Optimierung des pH-Wertes

66,6 mmol Aminosäure werden in 100 ml 0,1 M NaH_2PO_4 , mit definiertem pH zwischen 5 und 8 eingetragen und erhitzt. Ab einer Temperatur von $>70^\circ\text{C}$ wird 0,5g (2,744 mmol) Rhamnose hinzugegeben und 3,5 h refluxiert. Das erhaltenen Reaktionsgemisch wird nach Abkühlen gegebenenfalls verdünnt und dann mittels HPLC analysiert. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung gekühlt und aufgefallenes Asparagin filtriert und bis zur Gewichtskontanz getrocknet und ausgewogen.

7.3.12 Optimierung der Menge an Katalysator (Aminosäure)

Definierte Mengen an Aminosäure (5- 100 g/L) werden in 100 ml 0,1 M NaH_2PO_4 , pH 7 eingetragen und erhitzt. Ab einer Temperatur von $>70^\circ\text{C}$ wird 0,5g (2,744 mmol) Rhamnose hinzugegeben und 3,5 h refluxiert. Das erhaltenen Reaktionsgemisch wird nach Abkühlen gegebenenfalls verdünnt und dann mittels HPLC analysiert. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung gekühlt und aufgefallenes Asparagin filtriert und bis zur Gewichtskontanz getrocknet und ausgewogen.

7.3.13 Festphasenextraktion mit Aktivkohle und makroporösen Substanzen

Batchversuch:

Versuchsreihe: Zu 100 mL Reaktionslösung (enthält 1-25 g Furaneol[®], evtl. dazu verdünnen) wird 10 g des Adsorbens (Aktivkohlepulver oder als Granulat, Diaion WA30, Diaion MWA-1, Siran) werden hinzugegeben und kräftig gerührt. Nach 5 min wird filtriert und die erhaltene Lösung mittels HPLC analysiert.

Desorption: Das beladene Adsorbens wird mehrmals mit 10 mL H_2O , bzw. verschiedenen organischen Lösungsmitteln (Ethanol, Iso-butylacetat, Methanol, Diethylether, Aceton, n-Hexan, n-Pentan, Isopropanol) versetzt. Nach 5 min wird filtriert und alle erhaltenen Lösung mittels HPLC analysiert.

Kontinuierlicher Versuch:

100 mL Reaktionslösung wird über eine mit 10 g des Adsorbers (Aktivkohlepulver oder als Granulat, Diaion WA30, Diaion MWA-1, Siran) gefüllte Säule gegeben. Das Elutionsverhalten wird mit Hilfe eines in Reihe nachgeschalteten UV-VIS-Spektrophotometers über einen Wellenbereich von 190 – 800 nm analysiert.

Danach wird mit H₂O, bzw. verschiedenen organischen Lösungsmitteln (Ethanol, Isobutylacetat, Methanol, Diethylether, Aceton, n-Hexan, n-Pentan, Isopropanol) re-eluiert und das Verhalten ebenfalls mit Hilfe des Spektrophotometers im oben genannten Wellenbereich aufgezeichnet.

7.3.14 Enzymatische Spaltung der Melanoidine

Die eingesetzten Mengen an hydolytischen Enzymen werden entsprechend Tabelle 11 in Mobicolkartuschen (1 mL, MoBiTec GmbH, Göttingen) nativ, bzw immobilisiert (2 g VA-Epoxy-Träger) eingewogen (Calf Rennet extract nur immobilisiert). Die Kartusche wird entsprechend Abbildung 7-1 in den Kreislauf eingebunden. Die Aktivität der Immobilisate wird entsprechend [Bergmeyer, 1983] überprüft.

Eine auf $\frac{1}{4}$ verdünnte Reaktionslösung, erhalten nach erfolgreicher Reaktion, wird sodann 24 h entsprechend

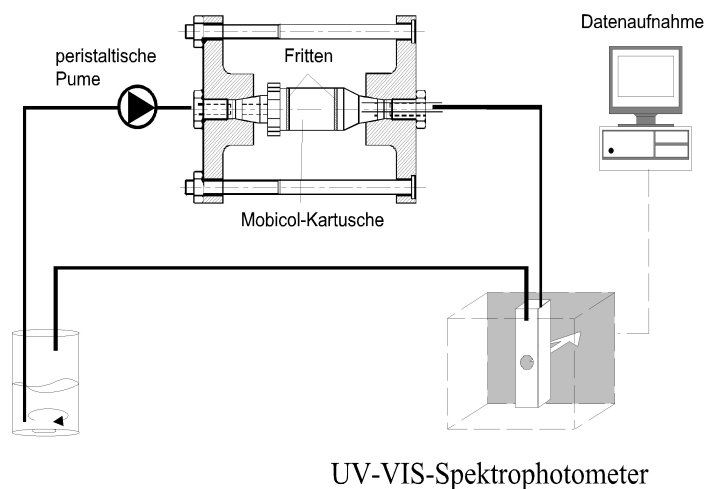


Abbildung 7-1: Enzymatische Spaltung der Melanoidine und Messung der Enzymaktivität

Abbildung 7-1 zirkuliert. Der Verlauf der Extinktion wird mittels UV-VIS-Photometer verfolgt.

Tabelle 11: Daten der benutzten Enzyme, Immobilisation und Versuchsbedingungen

	Lieferant	Quelle:	EC	m _{Enzym}	t ¹⁸	pH ¹⁹	Träger
Pepsin	Sigma	Schweinebauch	3.4.23.1	500 mg	24 h	2-7	VA-epoxy
Lipase	Sigma	mikrobiell	3.1.1.3	250 mg	24 h	7	VA-epoxy
Lipase PS	Amano	mikrobiell	3.1.1.3	250 mg	24 h	7	VA-epoxy
Esterase		<i>Mucor miehei</i>	N/A.	250 mg	24 h	6-7	VA-epoxy
α-Chymotrypsin	Sigma		3.4.21.1	100 mg	24 h	6-9	VA-epoxy
Trypsin	Fluka	Rinderpankreas		100 mg	24 h	6-9	VA-epoxy
Acylase I	Sigma		3.5.1.14	100 mg	24 h	7	VA-epoxy
α-Amylase	Sigma	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.2.1.1	70 mg	24 h	7	VA-epoxy
Arginase	Sigma	Rinderleber	3.5.3.1	25 mg	24 h	7	VA-epoxy
Lysozyme	Serva	Hühnerei	N/A.	250 mg	24 h	7	VA-epoxy
Calf Rennet extract (Chymosin, Bovine Pepsin)	Wiesby	Kalb	-	1 ml	24 h ²⁰	7	VA-epoxy

7.3.15 Extraktion in überkritischen Kohlendioxid

30 – 50 mL einer nach erfolgreicher Reaktion erhaltene Lösung wird in das Extraktionsgefäß der CO₂-Anlage gefüllt (siehe Abb. 4-8) und sorgfältig verschlossen. Die Anlage wird komplett verschraubt und mit Kohlendioxid bis zu einem Druck kurz über dem kritischen Druck beschickt.

Die Anlage wird auf Dichtigkeit überprüft und entsprechend nachgebessert. Bis zur Temperaturkonstanz aller Komponenten wird in diesem Zustand belassen.

Danach wird der Arbeitsdruck eingestellt und nach Öffnen des Restriktors mit Hilfe der Pumpgeschwindigkeit die Einhaltung des Drucks reguliert. Vor Beginn und nach beendeter Extraktion wird zur Kontrolle der Volumenstrom am Ausgang des Restriktors gemessen.

Druck und Temperatur werden während der Extraktion ständig überwacht und reguliert. Die Extraktion gilt als beendete, wenn im Extrakt kein Produkt mehr HPLC-analytisch nachgewiesen werden kann.

¹⁸ Inkubationsdauer mit 2 mL Reaktionslösung

¹⁹ Eingesetzt im pH-Bereich

²⁰ Inkubationsdauer mit 1 mL Reaktionslösung

7.3.16 Standard-Adsorptionsversuche mit Zeolithpulver

- 1) 3 g Zeolithpulver und 30 g Adsorptionslösung werden auf 0,01 g genau in einen 100-ml-Schott-Erlenmeyerkolben eingewogen.
- 2) Die Suspension wird 5 Minuten auf dem Schüttler bei 150 U/min geschüttelt dann wird der pH-Wert gemessen (bei der pH-Wert-Messung muß der Zeolith in Schwebelage gehalten werden). Der Anfangs-pH-Wert wird notiert.
- 3) Je nach den jeweils geforderten Adsorptionsbedingungen kann der pH-Wert im folgenden Arbeitsschritt auf einen anderen Wert eingestellt werden. Zur pH-Wert-Einstellung wird Schwefelsäure verwendet. Je nach pH-Wert der Adsorptionslösung wird Schwefelsäure der Konzentration 0,1 mol/l bzw. 1 mol/l eingesetzt.
- 4) Nun wird die Suspension weiter geschüttelt und nach 2 Stunden der pH-Wert nochmals überprüft und gegebenenfalls wieder eingestellt. Die Volumina der Schwefelsäurezugaben werden notiert.
- 5) Nach 24 Stunden Schüttelzeit wird der pH-Wert gemessen, der Feststoff sedimentieren gelassen und die Lösung dekantiert. Die Suspension wird für die Analyse mittels einer Spritze über Membranfilter (Porenweite 0,2 µm) filtriert.
- 6) Die Konzentration des zu adsorbierenden Stoffes wird in der Ausgangslösung sowie in den Adsorptionslösungen analytisch bestimmt.

Für erste Versuche mit einem neuen zu adsorbierenden Stoff wird eine Ausgangskonzentration von 5 bis 10 g/l eingesetzt.

Sicherheitshinweis:

Arbeiten mit Zeolithpulver sind wegen der Staubentwicklung unter dem Abzug oder mit einer Staubmaske der Klasse P3 (DIN 3181) durchzuführen!

7.4 Analytik

7.4.1 HPLC zur Messung der Furaneol[®]-Konzentration

Der Eluent, der aus 15 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat und 40 mM NaH₂PO₄ (pH 6,5) besteht, wird mit einer Flußrate von 1 mL/min über ein C₁₈Säule (Reversed-Phased-Chromatographie) gepumpt. Die Detektion erfolgt mit einem UV-Detektor bei 270 nm. Die quantitative Bestimmung der Furaneol[®]-Konzentration erfolgt über Integration der Peakflächen und -höhen, denen mit Hilfe von Kalibrationsgeraden Konzentrationen zugewiesen werden.

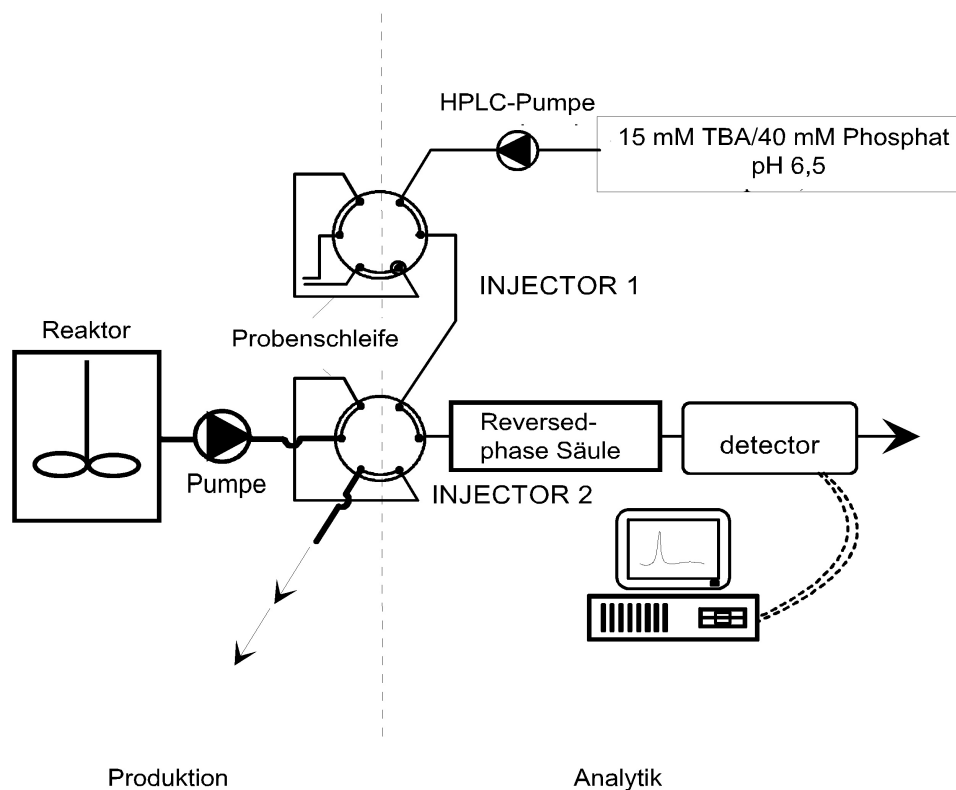


Abbildung 7-2: Aufbau der HPLC-Anlage

7.4.1.1 SPE

Um die Lebenszeit der analytischen Säule zu erhöhen, wird eine direkte Probenvorbereitung mit Hilfe der SPE Technik etabliert. Abbildung 7-3 zeigt ein Schema der SPE-Probenvorbereitung. Die Anlage besteht aus einem Selektor, zwei Schaltventilen und zwei peristaltischen Pumpen. Die Kombination der zwei Schaltventile hat verschiedenen Vorteile. Durch das Schaltventil Nr. 2 (rechts) wird die aufbereitete Probe gesammelt, bevor sie auf die Säule gegeben wird.

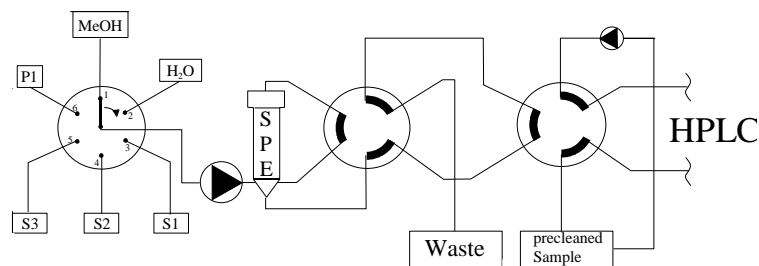


Abbildung 7-3: Schema des SPE- Probenvorbereitungsmodul

Die SPE-Säule arbeitet in zwei Richtungen. Dies ermöglicht die Rückspülung der Säule nach der Probenvorbereitung. Dadurch kann die SPE-Säule immer wiederverwendet werden. Durch kombinierte Schaltzustände wird die Säule gereinigt, während die gesammelte Probe auf die Säule gebracht wird. Dadurch wird die Frequenz der Probenanalyse erhöht.

Um die Effizienz zu erhöhen, ist die Anlage komplett automatisiert und wird, verbunden mit einem Computer, von der Analysensoftware **Computer Assisted Flow Control and Analysis (CAFCA)** kontrolliert. Als Typ wird der Chromafix 200 C₁₈ verwendet, dem Material, welches auch in der HPLC-Säule Anwendungen findet. Durch die Probenvorbereitung wird eine Verdünnung der Probe herbeigeführt. Dies ist zu berücksichtigen.

7.5 Spektren

7.5.1 GC-MS

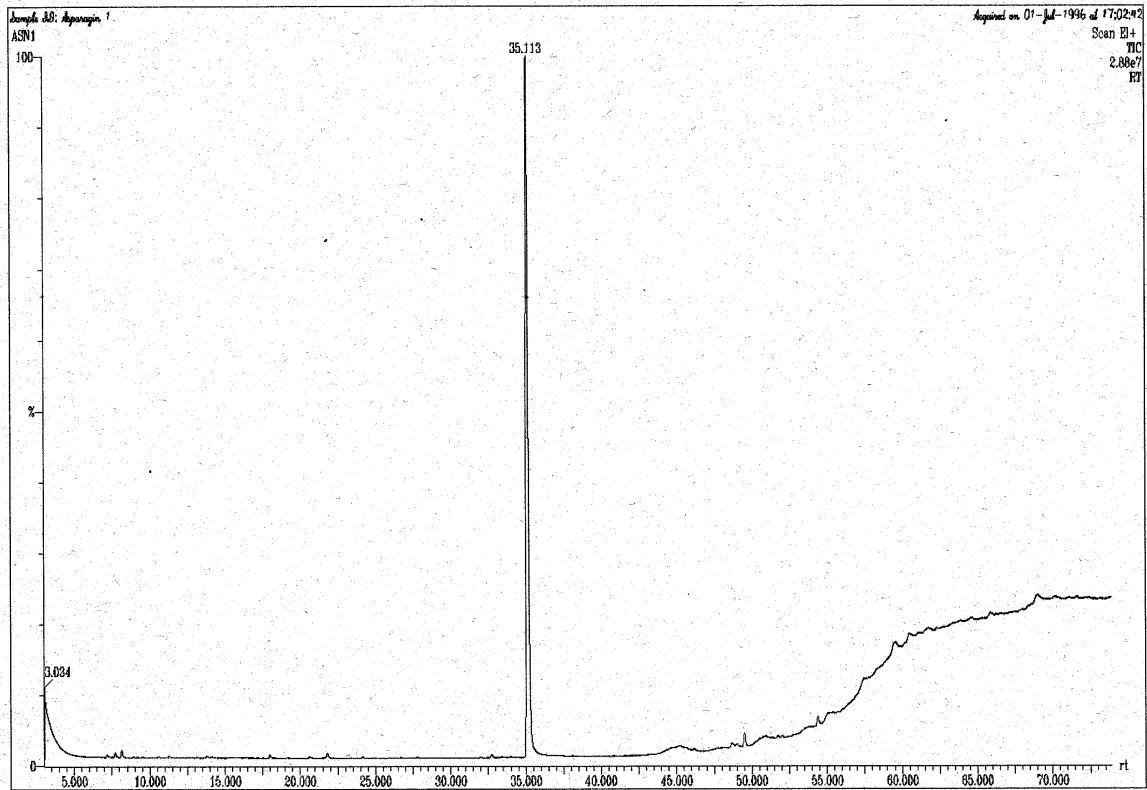


Abbildung 7-4: GC_MS Analyse des aufgereinigten Furaneols®

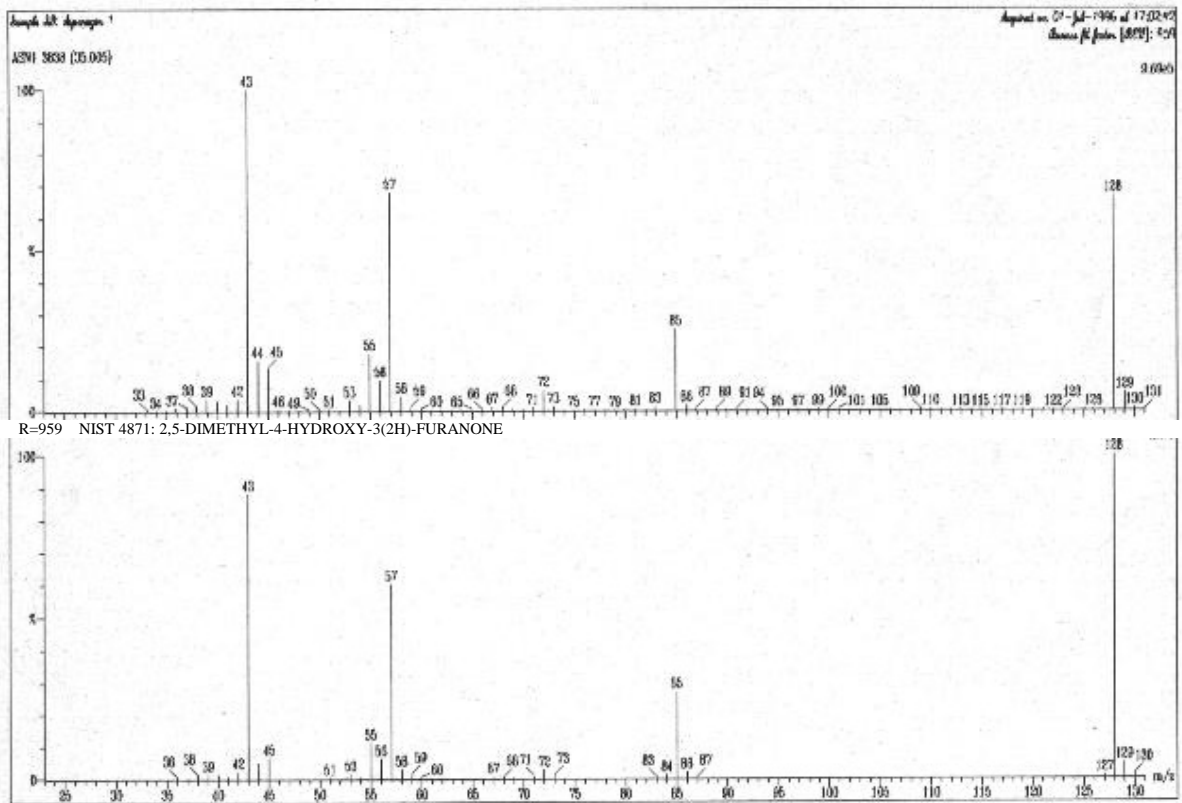


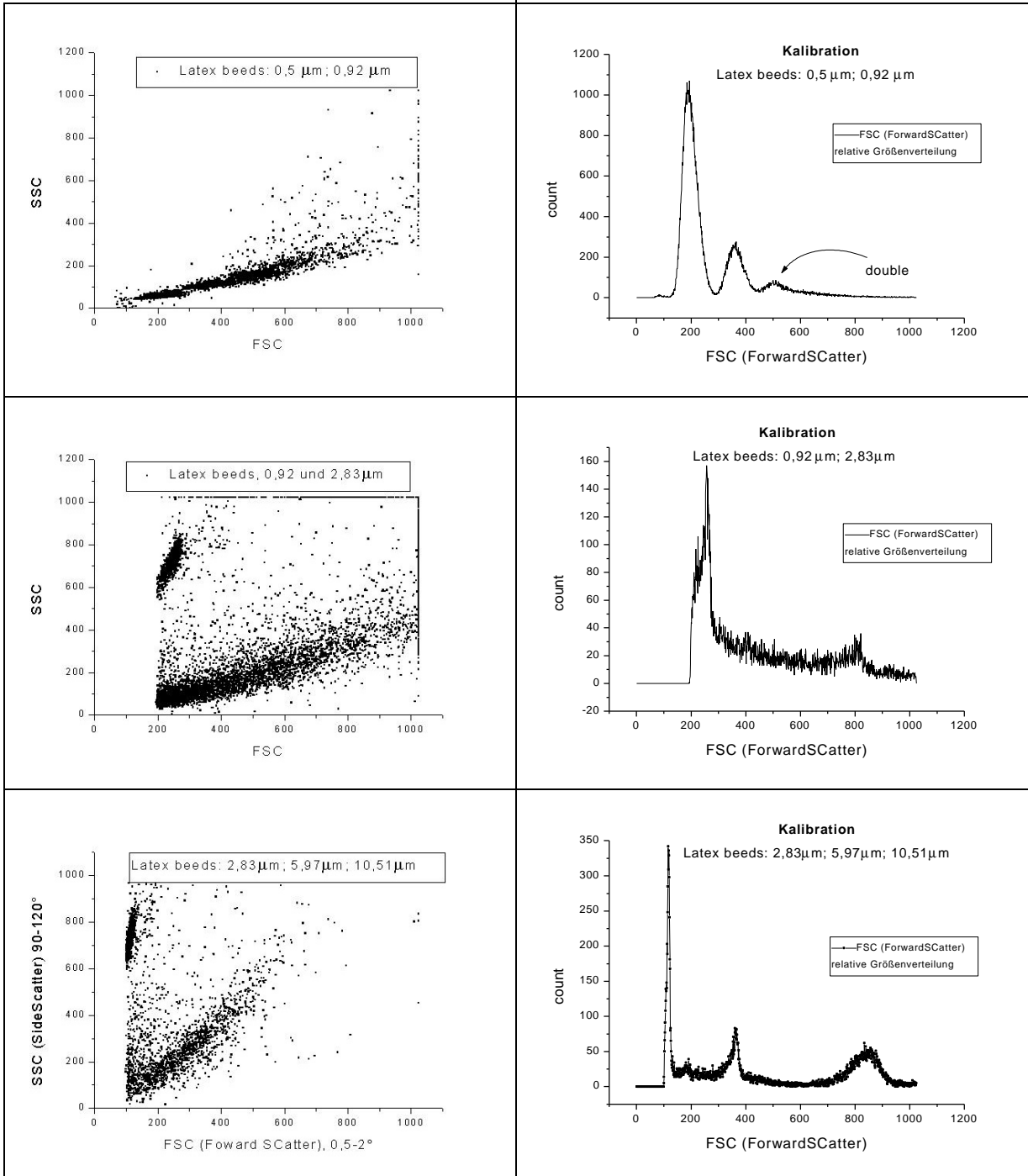
Abbildung 7-5: MS-Spektrum mit Vergleichsspektrum aus NIST-Datenbank, Match: 959.

7.5.2 Cytometrie

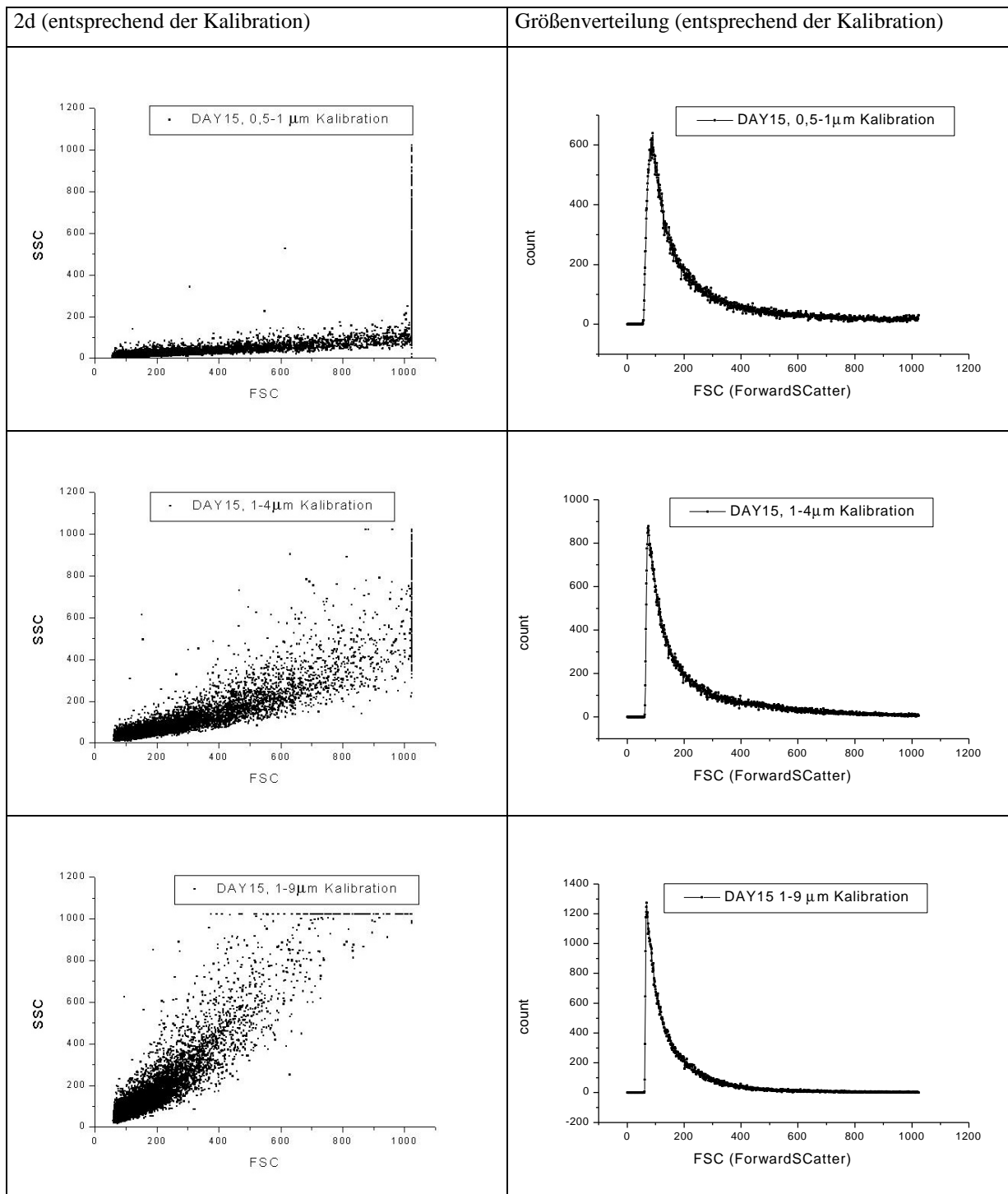
Kalibration:

2d:

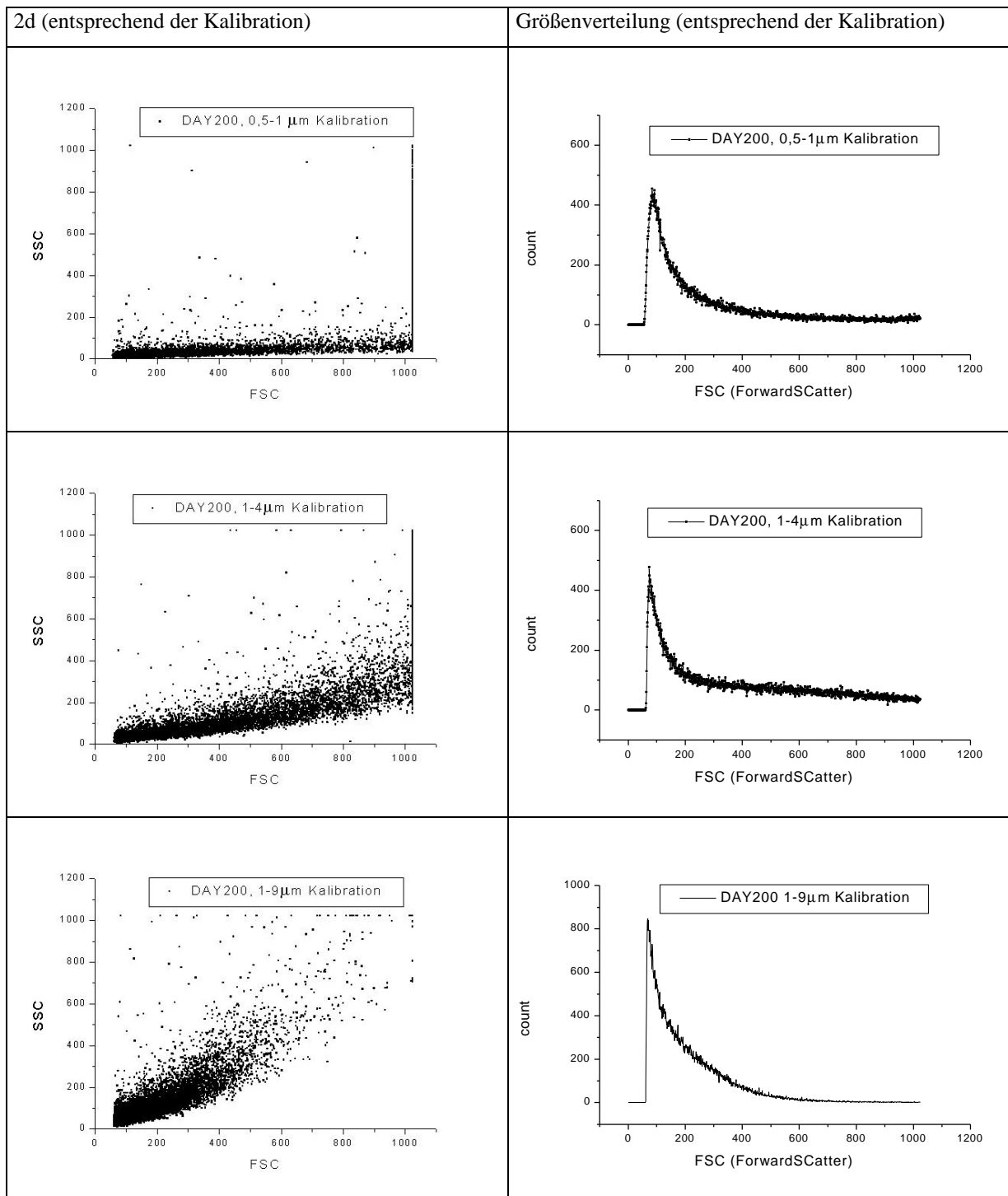
Größenverteilung:



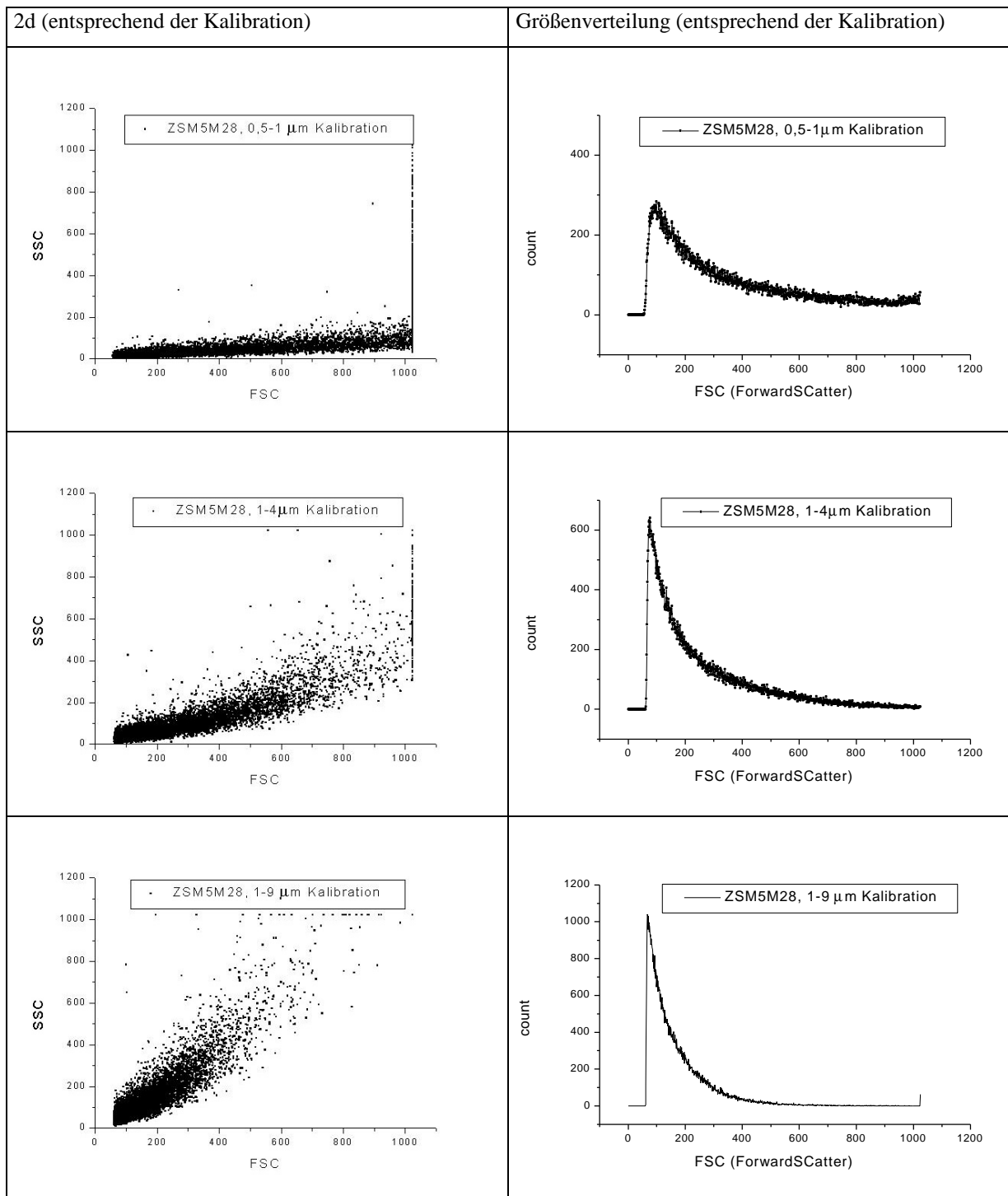
7.5.2.1 DAY15

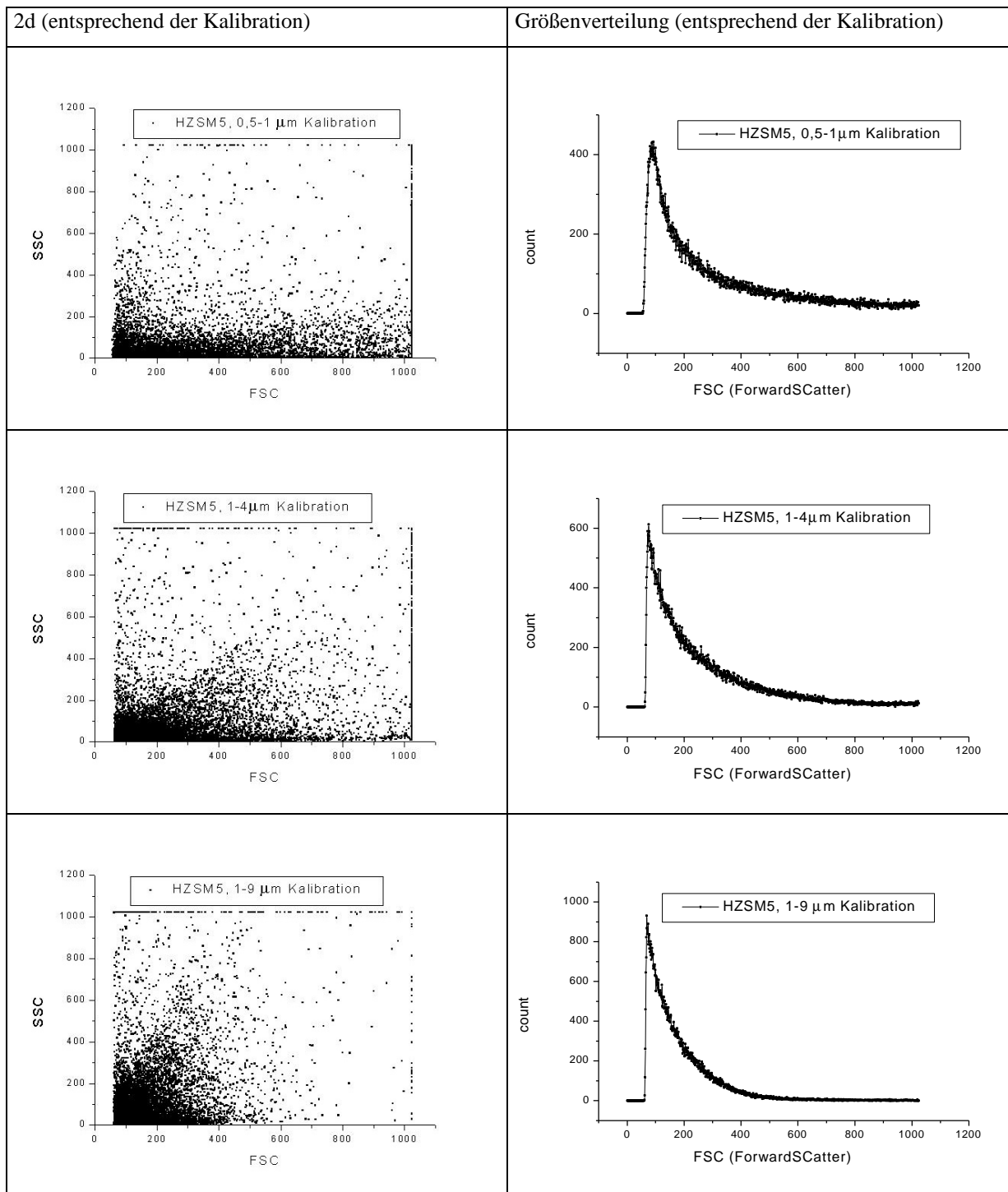


7.5.2.2 DAY200



7.5.2.3 ZSM5 M28



7.5.2.4 HZSM5 $M > 1000$ 

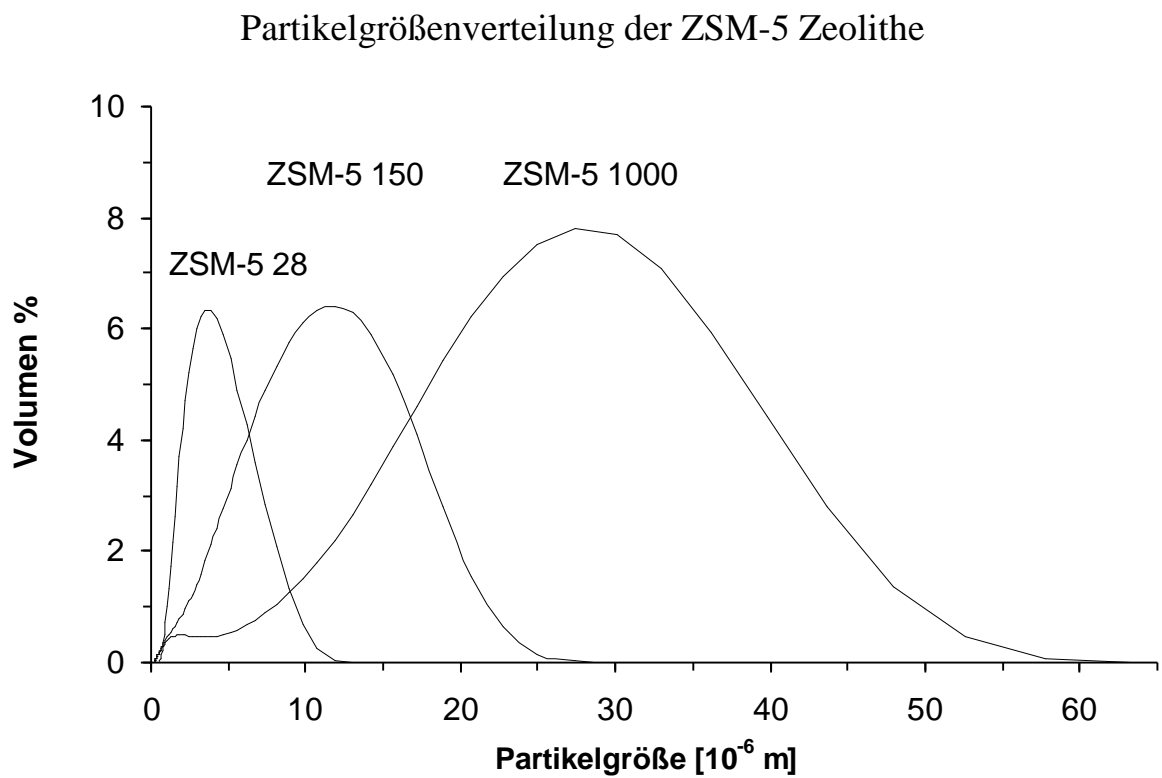


Abbildung 7-6: Partikelgrößen der Zeolithe ZSM5 M=28, ZSM5 M=150, ZSM5 M=1000 [LATZA, 1999]

8 Literatur

- Aromenverordnung; Vom 22. Dezember 1981 (BGBl. I S. 1625/77), geändert durch 1. Änd.-VO vom 10. 5.1983 (BGBl. I S. 601), durch § 7 Abs. 6 der ZusatzstoffverkehrsVO vom 10. 7. 1984 (BGBl. I S. 897), VO vom 2. 4.1985 (BGBl. I S. 631), Art. 1 der VO zur Änderung der AromenVO und anderer lebensmittelrechtlicher Verordnungen vom 29. 10. 1991 (BGBl. IS. 2045); 1), Art. 24 des EWR AusführungsG vom 27. 4. 1993 (BGBl. I S. 512) und Art. 2 der Änd.-VO vom 20. 12. 1993 (BGBl. I S. 2304); 2) 3) 1110 neu AromenVO
- Baltes, W., „Lebensmittelchemie“: Springer Verlag, Berlin (1995)
- Belitz, H.-D.; Grosch, W. „Lehrbuch der Lebensmittelchemie“: 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin (1992)
- Berger, R.G., „Aroma Biotechnology“: Springer Verlag, Berlin, (1995)
- Berger, R.G., „Aromastoffe als Syntheseziele neuer Biotechnologien“: GBF Monogr. Ser. (1989), **11**, 39-47
- Bergmeyer, U. „Methods of Enzymatic Analysis“: Verlag Chemie, Weinheim, 1983
- Beyer, H.K., Belenykaja, I. „A New Method of Dealumination of Faujasite-Type Zeolites“ In: Imelik B. et al. (Hrsg.) „Catalysis by Zeolites“: Elsevier, Amsterdam (1980)
- Bornscheuer, U. „Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen Racematspaltung verschiedener 3-Hydroxyester in unkonventionellen Lösemittelsystemen“: Dissertation, Institut für Technische Chemie, Hannover (1993)
- Boehringer Mannheim, Information zu CHIRAZYME® Aldol Test Kit, (1995)
- Breck, D.W. „Zeolite Molecular Sieves“: John Wiley & Sons, New York (1974)
- Briggs, M.A.; Haines, A.H.; Jones, H.F. „Synthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (Furaneol) from (2R,3R)-tartaric acid“: J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, (1985), 795-8
- Brockamp, H. P., Kula, M. R. „Purification and characterization of class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Staphylococcus carnosus*“: Appl. Microbiol. Biotechnol. (1990), **34**, 287
- Bruno, T.J., Svoronos, P.D.N. „CRC Handbook of Basic Tables for Chemical Analysis“: CRC Press, Boca Raton, Florida (1989)
- Büchi, G.; Demole, E.; Thomas, A.F. „Syntheses of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2,3-dihydrofuran-3-one (Furaneol), a flavor in pineapple and strawberry“: J. Org. Chem. (1973), **38**, 1, 123-5
- Butterey, R. G., Takeoka, G. R., Krammer, G. E., Ling, L. C. „Identification of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone (Furaneol) and 5-Methyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone in Fresh and Processed Tomato“: Lebensm.- Wiss. u.-Technol. (1994) **27**, 592
- Buttersack, C., Wach, W., Buchholz, K. „Specific Adsorption of Saccharides by Dealuminated Y-Zeolites“: J. Phys. Chem. (1993), **97**, 11861-11864

- Capewell, A. „Untersuchungen zu enantioselektiven enzymatischen Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid“: Dissertation, Institut für Technische Chemie, Hannover (1994)
- Decnop, C.; van Dort, J. M.; de Hey, J. Th. „Hydroxyfuranone preparation“: Patent EP 0398417 A1, (1990)
- Fernández-Sousa, J. M., Gavilanes, F. G., Gavilanes, J. G., Paredes, J. A. „D-Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase from Dipteran *Ceratitis capitata*“: Arch. of Biochem. Biophys. (1978) **188**, 456
- Gmehling, J., Brehm, A. „Grundoperationen“: Baerns, M. (Hrsg) „Lehrbuch der Technischen Chemie, Band 2“: Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1996)
- Grassmann, P., Widmer, F., Sinn, H. „Einführung in die thermische Verfahrenstechnik“: Walter de Gruyter, Berlin, New York (1997)
- GREAT LAKES CHEMICA: Konstanz, persönliche Mitteilung (1996)
- Grosch, W. „Warum riecht Kaffee so gut?“: Chemie in unserer Zeit (1996), **30**, 3, 126-133
- Hartmann, Th.: Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover (1996)
- Hartmann, Th.: Laufende Dissertation, Institut für Technische Chemie, Hannover (1998)
- Higbie: Trans. Inst. Of Chem. Engng. (1935), **31**, 365
- Hirvi, T., Honkanen, E., Pyysalo, T. „Stability of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone in aqueous buffer solutions“: Lebensm. Wiss. U. Technol. (1980), **13**, 324-325
- Inokuchi, T., Matsumoto, S., Tsuji, M., Torii, S. „Electrohalogenation of propargyl acetates and amides to form the 1,1-dibromo-2-oxo functionality and a facile synthesis of Furaneol“: J. Org. Chem. (1992), **57**, 18, 5023-7
- King, M.B., Bott, T.R. „Extraktion of Natural Products using Near-critical Solvents“: Blackie Academic & Professional, Glasgow (1993)
- Klockewitz, K.: Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Hannover (1996)
- Lack, E.A. „Kriterien zur Auslegung von Anlagen für die Hochdruckextraktion von Naturstoffen“: dbv-Verlag Graz, (1985)
- Langmuir, I. J.: Am. Chem. Soc. (1918), **40**, 1361
- Larsen, M.; Poll, L. „Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries“: Z. Lebensm. Unters. Forschg. (1992), **195**, 120-3
- Latza, E.: Laufende Dissertation, Institut für Lebensmittelchemie, Hannover (1998)
- Luque de Castro, M.D., Valárcel, M., Tena, M.T. „Analytical Supercritical Fluid Extraction“: Springer-Verlag, Berlin (1994)
- MACKENSTEDT, I. „Reaktionstechnische Aspekte der enzymatischen Darstellung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-on (Furaneol)“: Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, (1996)

- Marty, A., Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Combes, D. „High Pressure and Biotechnology“: Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, P.-Masson, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. (1992), **223**, 461-463
- Meier, W.M., Olson, D.H. „Atlas of Zeolite Structure Types“: Butterworth-Heinemann, 3. rev. ed., London (1992)
- Mengel, M. „Molekularsieb-Zeolithe“: Chemie-Technik (1981), **10**, 1135-1140
- Mengel, M. „Molekularsieb-Zeolithe“: Fortschritte der Verfahrenstechnik“ (1985), **23c**, 271-292
- Morse, D. E., Chan, W., Horecker, B. L. „The Subunit Structure and Carboxy-Terminal Sequence of Rabbit Muscle Aldolase“: Proc. Natl. Acad. Sci. (1967) **58**, 628
- Peer et al.: Recl. Trav. Chim. Pays Bas (1968) **87**, 1011-1016
- Pons, I., Garrault, C., Jaubert, J.-N., Morel, J. „Analysis of Aromatic Caramel“: Food Chemistry, (1991), **39**, 311-320
- Puppe, L. „Zeolithe – Eigenschaften und technische Anwendungen“: Chemie in unserer Zeit, (1986), **20**, 117-127
- Puppe, L., Büchner, W. „Zeolithe – Strukturen, Synthesen, Anwendungen“: Naturwissenschaften, (1984), **71**, 192-198
- Re, L.; Maurer, B.; Ohloff, G. „Ein einfacher Zugang zu 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)furanon (Furaneol), einem Aromabestandteil von Ananas und Erdbeere“: Helv. Chim. Acta, (1973), **56**, 6, 1882-94
- Re, L.; Ohloff, G. „Verfahren zur Herstellung von 2,5-Dimethyl-4,5-dihydrofuranol-(3)-on-(4)“: Auslegeschrift 1 793 661, Dt. Patentamt
- Robel, H. „Lehrbuch der chemischen Verfahrenstechnik“: (Autorenkollektiv) VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 5. bearb. Auflage, Leipzig (1983)
- Rodin, J.O.; Himel, C.; Silverstein, R.M.; Leeper, R.W.; Gortner, W.A. „Volatile flavor and aroma compounds of pineapple. I. Isolation and tentative identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone“: J. Food Sci. (1965), **30**, 280-5
- Sanz, C., Pérez, G., Richardson D. G., „Simultaneous HPLC Determination of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone and Related Flavor Com-pounds in Strawberries“: J. Food Sci. (1994) **59**, 138
- Schäfer-Treffenfeldt, W.; Stockhammer, S.; „Verfahren zur Trennung von Aminosäuren und Peptiden durch Adsorption an Zeolithpulver“: Verfahrentechnische Grundlagen und Modellierung von Bioprozessen, Dechema-Tagung, 5.-6. Mai, (1997)
- Schieberle, P. „Formation of Furaneol in heat-processed foods“: ACS Symp. Series „Flavor Precursors“ Hrsg.: Teranishi, Takeoka, Güntert (1992), **490**, 164-74
- Shu, C.-K., Mookherjee, B. D., Ho, C.-T. „Volatile components of Thermal Degradation of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone“: J. Agric. Food Chem. (1985), **33**, 446-448
- Sircar, S., Myers, A.L. „Liquid Adsorption Operations: Equilibrium, Kinetics, Column Dynamics and Applications“: Sep. Sci. Techn. (1986), **21**, 535-562
- Stryer, L. „Biochemie“: Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg (1994)

-
- Swain, M. S., Lebherz, H. G. „Specific, limited tryptic modification of wheat-germ fructose-bisphosphate aldolase subunits: destruction of catalytic activity but not of ability to establish precise subunit-subunit recognition“: *Biochim. et Biophys. Acta* (1986) **869**, 185
- Sygyusch, J., Beaudry, D., Allaire, M. „Molecular architecture of rabbit muscle aldolase at 2.7-Å resolution“: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1987) **84**, 7846
- Taylor, L.T. „Supercritical Fluid Extraction“: John Wiley & Sons, Inc. New York, (1996)
- Tservistas, M. „Untersuchungen zum Einsatz von überkritischen Kohlendioxid als Medium für biokatalysierte Reaktionen“: Dissertation, Institut für Technische Chemie, Hannover (1997)
- Voet, D.; Voet, J.G. „Biochemie“: VCH-Verlag Weinheim, (1992)
- Wach, W. „Wechselwirkungen von Kohlenhydraten mit Zeolithen vom Faujasit-Typ“: Verlag Mainz, Wissenschaftsverlag, Aachen, (1994)
- Whitesides, G. M.: *J.Org.Chem.* (1983), **48**, 3493-3497
- Wong, C.-H., Mazenod, F. P., Whitesides, G. M. „Chemical and Enzymatic Syntheses of 6-Deoxyhexoses. Conversion to 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2,3-dihydrofuranone (Furaneol) and Analogues“: *J. Org. Chem.* (1983), **48**, 3493
- Zosel, K.: DBP 2 005 293 (Priorität: 5.2.1970), Studiengesellschaft Kohle (1970)

Lebenslauf

Zur Person

Name Edgar Pundsack
Geburtstag, -ort 02. Juli 1970, Cloppenburg

Schulbildung

1976 - 1980 4 Jahre Grundschule Cloppenburg
1980 - 1982 2 Jahre Orientierungsstufe Don Bosco, Cloppenburg
1982 - 1986 4 Jahre Realschule, Pingel Anton, Cloppenburg
1986 - 1989 3 Jahre Technisches Gymnasium, BBS II, Cloppenburg
24. 05. 1989 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung

Oktober 1989 Studium des Faches Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
27. 05. 1992 Diplomvorprüfung,
29. 06. 1994 Diplomhauptprüfung
1994 - 1995 Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Münster unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper; „Grundlegende Untersuchungen zur kontinuierlichen Umesterung von Stearinsäurevinylester mit Isopropylidenglycerin in organischen Lösungsmitteln mit Hilfe von Lipase“
01. 08. 1995 Beginn der Dissertation am Institut für Biochemie, Münster unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper;
AIR-Project PL 942060: „New strategies for the development of integrated processes for the generation of compounds with flavouring and/or other functional properties from natural materials“.
seit 01.09.1995 Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft
01.10.1995 Fortführung der Dissertation an der Universität Hannover, Institut für Technische Chemie
08.02.1999 Promotion