

# Abschlussbericht

**Entwicklung eines modellhaften integrierten Bioprozesses  
zur Produktion natürlicher antimikrobieller Monoterpen-  
Wirkstoffe am Beispiel der Synthese von *R*-(+)-Perillasäure  
mit *Pseudomonas putida***

**Aktenzeichen: AZ 13119**

**Projektpartner: DECHEMA e.V., Karl-Winnacker-Institut,  
AG Bioverfahrenstechnik, Frankfurt/Main  
*Dipl.-Ing. Marco-Antonio Mirata, Dr. Jens Schrader***

**Dr. Rieks Healthcare GmbH, Uetersen  
*Dr. Ulli Kirchner, Dr. Markus Kähler, Dr. André Rieks***

**Projektkoordinator: *Dr. Jens Schrader, DECHEMA e.V.***

**gefördert durch: *Deutsche Bundesstiftung Umwelt***

**Projektbeginn: *01.08.2004***

**Projektende: *31.10.2006***



## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	7
2	Anlass und Zielsetzung des Projekts.....	8
3	Verwendete Methoden .....	9
3.1	Analytik.....	9
3.2	Bestimmung der antimikrobiellen Aktivitäten der <i>R</i> -Perillasäure .....	10
3.3	Biotransformationsstudien .....	11
3.4	Bestimmung der wachstumshemmenden Produktkonzentration .....	12
4	Ergebnisse .....	12
4.1	Bestimmung der antimikrobiellen Aktivitäten der <i>R</i> -Perillasäure .....	12
4.2	Biotransformation mit wachsenden Zellen.....	16
4.2.1	Grundlagenstudien zur Biotransformation mit wachsenden Zellen .....	16
4.2.2	Biotransformation mit wachsenden Zellen im Fed-Batch Bioreaktor ...	18
4.2.3	Optimierung des Fed-Batch Bioprozesses im Parallelfertigersystem .....	18
4.2.4	Bestimmung des wachstumshemmenden Einflusses von <i>R</i> - Perillasäure .....	20
4.3	Hochzelldichte-Kultivierung (Bereitstellung von Biokatalysator).....	22
4.4	Biotransformation mit ruhenden Zellen.....	24
4.4.1	Einfluss der Vorkultivierung.....	24
4.4.2	Aktivität ruhender Zellen .....	25
4.4.3	Induktion der Biotransformation mit ruhenden Zellen.....	26
4.4.4	Weitere Ergebnisse zur Biotransformation mit ruhenden Zellen .....	27
4.4.5	Ruhende Zellen mit kontinuierlicher Cofaktor-Regenerierung / Bioreaktor .....	27
4.5	In situ Produktabtrennung (ISPR).....	29
4.5.1	<i>In situ</i> Extraktion mittels wässrig-organischem Zweiphasensystem ....	29
4.5.1.1	Löslichkeit von Limonen in den ausgewählten Lösungsmitteln ....	30
4.5.1.2	Bestimmung der Biokompatibilität ausgewählter Lösungsmittel... 30	
4.5.1.3	Biotransformationen im 2-Phasen-System.....	31
4.5.2	ISPR durch Ionenaustauscher .....	33
4.5.2.1	Ionenaustauscher Screening .....	34
4.5.2.2	Perillasäurerückgewinnung .....	35
4.5.2.3	Charakterisierung des Eluenten.....	36

4.5.2.4	Bindekapazität und Bindekinetik des Ionenaustauschers bezüglich der Perillasäure.....	37
4.5.2.5	Biokompatibilität von Amberlite IRA 410 Cl gegenüber <i>P. putida</i> .	39
4.5.2.6	IA-ISPR Biotransformation mit wachsenden Zellen - Batch .....	40
4.5.2.7	IA-ISPR Biotransformation mit ruhenden Zellen - Batch .....	42
4.5.2.8	IA-ISPR Fed-Batch Biotransformation im Parallelfementersystem .....	43
4.6	Downstream-Processing .....	45
4.6.1	Variante 1: Alkalische Aufarbeitung .....	46
4.6.1.1.	Arbeitsschritte des Downstream Processings Variante 1 .....	46
4.6.1.2.	Vollständiges Lösen der <i>R</i> -Perillasäure.....	48
4.6.1.3.	Zellabtrennung.....	48
4.6.1.4.	Ausfällen der <i>R</i> -Perillasäure und Aufreinigung .....	49
4.6.1.5.	Arbeitsschritte des Downstream Processings Variante 1 .....	49
4.6.2	Variante 2: Saure Fällung der <i>R</i> -Perillasäure.....	50
4.6.2.1.	Vollständiges Ausfällen der <i>R</i> -Perillasäure.....	50
4.6.2.2.	Filtration der <i>R</i> -Perillasäure und Trocknung .....	50
4.6.2.3.	Lösen der <i>R</i> -Perillasäure in Ethanol .....	51
4.6.2.4.	Arbeitsschritte des Downstream Processings Variante 2 .....	51
4.6.3	Auswirkung der IA-ISPR auf das Downstream-Processing.....	54
5	Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen.....	54
5.1	Vorteile gegenüber herkömmlichen Syntheseverfahren.....	54
5.2	Marktpotenzial der Perillasäure .....	55
5.3	Anforderungen an den Prozess.....	57
6	Ökologische Vorteile in Folge des Projekts .....	79
7	Soll-/Ist-Vergleich .....	80
8	Diskussion und Ausblick.....	81
9	Kooperation innerhalb des Projekts.....	85
10	Literatur/Präsentationen/Patente .....	86
11	Abkürzungsverzeichnis .....	88
	Anhang.....	90

## Abbildungen

<b>Abb. 1:</b> Strukturformeln zur Biotransformation von Limonen mit <i>P. putida</i> DSM 12264 .....	9
<b>Abb. 2:</b> Agar-Diffusionstests mit Perillasäure unter Verwendung von Mikroorganismen .....	13
<b>Abb. 3:</b> Batch-Biotransformation von Limonen mit wachsenden Zellen im Schüttelkolben .....	17
<b>Abb. 4:</b> Bioprozesskinetik einer Fed-batch-Kultivierung von <i>P. putida</i> DSM 12264 im Bioreaktor .....	18
<b>Abb. 5:</b> Perillasäurebildung einer optimierten Fed-batch-Kultivierung von <i>P. putida</i> DSM 12264 .....	19
<b>Abb. 6A:</b> Wachstumskinetiken von <i>P. putida</i> DSM 12264 in Abhängigkeit von der Perillasäurekonzentration .....	21
<b>Abb. 6B:</b> Relative maximale spezifische Wachstumsrate von <i>P. putida</i> DSM 12264 in Abhängigkeit von der Perillasäurekonzentration .....	21
<b>Abb. 7:</b> Hochzelldichtekultivierung von <i>P. putida</i> DSM 12264 .....	23
<b>Abb. 8:</b> Produktausbeute der Biotransformation mit ruhenden <i>P. putida</i> -Zellen .....	25
<b>Abb. 9A:</b> Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Biokatalysatorkonzentration .....	25
<b>Abb. 9B:</b> Abhängigkeit der Produktbildungskinetik von der Biokatalysatorkonzentration .....	25
<b>Abb. 10A:</b> Produktbildungskinetik ruhender Zellen bei unterschiedlichen Perillasäure-Anfangskonzentrationen .....	26
<b>Abb. 10B:</b> Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivität ruhender Zellen in Abhängigkeit von der Perillasäure-Anfangskonzentration .....	26
<b>Abb. 11:</b> Induktionseffekt von Perillasäure auf die Biotransformation von <i>P. putida</i> DSM 12264 .....	27
<b>Abb. 12A:</b> Perillasäure-Produktion mit ruhenden <i>P. putida</i> -Zellen ohne Feed .....	28
<b>Abb. 12B:</b> Perillasäure-Produktion mit ruhenden <i>P. putida</i> -Zellen im Fed-batch (Glycerol-Feed) .....	28
<b>Abb. 13A:</b> Vergleich der Produktbildungskinetik ruhender Zellen von Batch und Fed-Batch (Glycerol-Feed) .....	29
<b>Abb. 13B:</b> Vergleich der zeitabhängigen spezifischen Aktivitäten ruhender Zellen von Batch und Fed-Batch (Glycerol-Feed) .....	29
<b>Abb. 14:</b> Dissoziationsverhalten von Perillasäure in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	33
<b>Abb. 15:</b> Perillasäurerückgewinnung von Amberlite IRA 410 Cl und Lewatit MP 500 mittels ausgewählter Eluenten .....	35
<b>Abb. 16A:</b> Perillasäurelöslichkeit im Eluenten HCl 1M/ EtOH (40:60) .....	36
<b>Abb. 16B:</b> Kinetik der Perillasäureelution aus dem Ionenaustauscher .....	36
<b>Abb. 17:</b> Perillasäurekonzentrationen im Elutionsmittel (HCl 1M/ EtOH (40:60)) in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an Perillasäure-gesättigtem Amberlite IRA 410Cl .....	36
<b>Abb. 18:</b> Gebundene Perillasäure in Abhängigkeit von der Ionenaustauscherkonzentration .....	38
<b>Abb. 19:</b> Perillasäurebindungskinetik .....	38
<b>Abb. 20A:</b> Wachstum von <i>P. putida</i> DSM 12264 während der Biotransformation von Limonen in Gegenwart von ansteigenden Mengen Ionenaustauscher .....	39
<b>Abb. 20B:</b> Perillasäurebildungskinetik während der Biotransformation von Limonen in Gegenwart von ansteigenden Mengen Ionenaustauscher .....	39
<b>Abb. 21:</b> Verteilung der Perillasäure zwischen Kultur-Medium und Ionenaustauscher während der IA-ISPR Batch Biotransformation mit wachsenden Zellen .....	41
<b>Abb. 22:</b> Verteilung der Perillasäure zwischen Kultur-Medium und Ionenaustauscher während der IA-ISPR Batch Biotransformation mit ruhenden Zellen .....	43
<b>Abb. 23:</b> Bioprozesskinetik einer IA-ISPR Fed-batch-Kultivierung von <i>P. putida</i> DSM 12264 im Parallelfementer-system .....	44
<b>Abb. 24:</b> Downstream-Processing Variante 1 .....	47
<b>Abb. 25:</b> Löslichkeit von <i>R</i> -Perillasäure in einem Biotransformationsansatz in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	48
<b>Abb. 26:</b> Downstream-Processing Variante 2 .....	52
<b>Abb. 27:</b> Tabellarischer Soll-Ist-Vergleich .....	80
<b>Abb. 28:</b> Schematische Darstellung der verschiedenen Verfahrensvarianten: off-line DSP bzw. IA-ISPR .....	83

## Tabellen

<b>Tab. 1:</b> Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilutionstests zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC).....	13
<b>Tab. 2:</b> Antibakterielle und antifungale Aktivität der <i>R</i> -Perillasäure in einer Shampoo- und Lotion-Formulierung.....	15
<b>Tab. 3:</b> Exponentielles Modell von Aiba et al (1968) zur Beschreibung der Produktinhibierung.....	21
<b>Tab. 4:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse der Produktion von Perillasäure in 2-Phasen-Biotransformationsansätzen.....	32
<b>Tab. 5:</b> Bindung der Perillasäure an verschiedene Ionenaustauscher-Harze .....	34
<b>Tab. 6:</b> Einzelschritte des Downstream-Processing Variante 1 mit Angabe über Verlust/Ausbeute.....	49
<b>Tab. 7:</b> Einzelschritte des Downstream-Processing Variante 2 mit Angabe über Verlust/Ausbeute.....	53

## 1 Zusammenfassung

Im Rahmen des Forschungsprojekts sollte ein umweltgerechtes biotechnologisches Verfahren unter Einsatz von *Pseudomonas putida* zur Synthese und Gewinnung natürlicher, hochreiner Monoterpensäuren entwickelt werden. Das Forschungsziel wurde am Beispiel der Synthese von *R*-(+)-Perillasäure erreicht.

Die Ergebnisse untermauern, dass die Zielverbindung aufgrund sehr guter Daten zur antimikrobiellen Wirkung sowohl in der Natur- und High-Tech-Kosmetik als auch der pharmazeutischen Industrie als Konservierungsmittel Verwendung finden wird. Auf diese Weise gelingt der Einstieg in die Substitution konventionell eingesetzter, gesundheitlich bedenklicher Konservierungsmittel durch natürliche Wirkstoffe, die mit einem umweltfreundlichen Bioprozess hergestellt werden.

Mit *P. putida* DSM 12264 konnte *R*-(+)-Limonen effizient zu *R*-(+)-Perillasäure umgesetzt werden. Durch eine Intensivierung der Precursor- und Nährstoffzufuhr konnte im Fed-batch Prozess mit wachsenden Zellen eine Produktivität von 27 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (= 4,5 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) erreicht werden; 48 h nach dem Animpfzeitpunkt wurden so mehr als 53 mM Perillasäure (9 g/L) gebildet. Nach 5 d betrug die Produktkonzentration bis zu 65 mM (11 g/L). Mit ruhenden Zellen betrug die Produktivität über einen Zeitraum von einem Tag 31 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (= 5,2 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), entsprechend ca. 1,75 g Perillasäure g<sup>-1</sup> Biotrockenmasse (BTM). *P. putida* DSM 12264 konnte im Fed-batch (ohne Limonen) zu hohen Zelldichten kultiviert werden (> 45 g L<sup>-1</sup>), wodurch eine Zweistufen-Prozessführung (1. Biomassebildung, 2. Biotransformation mit ruhenden Zellen) zu einer interessanten Alternative wird.

Wachstum und Perillasäurebildung von *P. putida* werden bei höheren Produktkonzentrationen (> 8 g L<sup>-1</sup>) deutlich inhibiert. Aus diesem Grund wurde für eine weitere Steigerung des Prozesses eine *in situ* Produktabtrennung (ISPR) essentiell. Die ursprünglich aufgrund der Solvenztoleranz von *Pseudomonas* favorisierte integrierte Produktabtrennung durch wässrig-organische Zweiphasen-Kultivierung wurde in der Frühphase des Projekts intensiv untersucht, stellte sich allerdings als ungeeignete Prozess-Strategie heraus (geringe Produktbildung und Zelltoxizität einerseits, unzureichende Anreicherung in der organischen Phase andererseits). Der Ansatz einer *in situ* Präzipitation der Perillasäure blieb aufgrund der deutlich reduzierten Vitalität der Mikroorganismen bei dem erforderlichen leicht sauren pH-Wert ebenfalls erfolglos. Dagegen stellten sich die Bindung der Perillasäure durch Ionenaustausch (IA) als ideale Strategie für die *in situ*

Produktabtrennung heraus, da beim idealen Biotransformations-pH 7.0 das Produkt nahezu vollständig dissoziiert vorliegt (> 99 % dissoziiert). Mittels Amberlite IRA 410 Cl (stark basischer Ionenaustauscher) wurden die bisher besten aus der Literatur bekannten Werte im Schüttelkolbenmaßstab mit wachsenden Zellen über 100 % auf 43 mM ( $7,2 \text{ g L}^{-1}$ ) verbessert. In vergleichbarer Weise profitierten ruhende Zellen. Im Fed-batch Bioprozess mit wachsenden Zellen im Labormaßstab verhalf die IA-ISPR zu bisher höchsten Produktkonzentrationen von 87 mM ( $14,5 \text{ g L}^{-1}$ ) nach 5 d. Diese zum Ende des Projektes erzielten Ergebnisse sind weiter steigerungsfähig, da entscheidende Limitierungen in der Prozessführung erkannt wurden, die in der sich nun anschließenden Transferphase beim Industriepartner gezielt aufgehoben werden sollen.

Es wurde ein detailliertes Verfahrensprotokoll für ein einfaches, kostengünstiges und umweltschonendes Downstream-Processing erarbeitet, das im Anschluss an einen Fed-batch Bioprozess hochreine *R*-(+)-Perillasäure (> 95 %) liefert. Der Aufwand für das Downstream-Processing wird sich bei Einsatz der IA-ISPR weiter reduzieren lassen. Folglich verringern sich die Kosten des Gesamtprozesses bei gleichzeitig noch einmal verbesserter Ressourcenproduktivität.

Eine ökonomische Evaluierung auf Basis der zum Abschluss der Projektlaufzeit vorliegenden experimentellen Daten ergab, dass die optimierte Fed-Batch Biotransformation von Limonen mit wachsenden Zellen die aktuell wirtschaftlichste Verfahrensvariante vor dem Zweistufen-Prozess mit ruhenden Zellen und dem integrierten Bioprozess (alle jedoch mit deutlich positiven Ergebniskennzahlen unter den beim Industriepartner gegebenen Randbedingungen) darstellt. Mit Blick auf das noch nicht ausgeschöpfte Potential des integrierten Bioprozesses ist zu erwarten, dass dieser Ansatz - nach Aufhebung der erkannten Limitierungen – das sowohl ökonomisch als auch ökologisch günstigste Verfahren darstellen wird.

## **2 Anlass und Zielsetzung des Projekts**

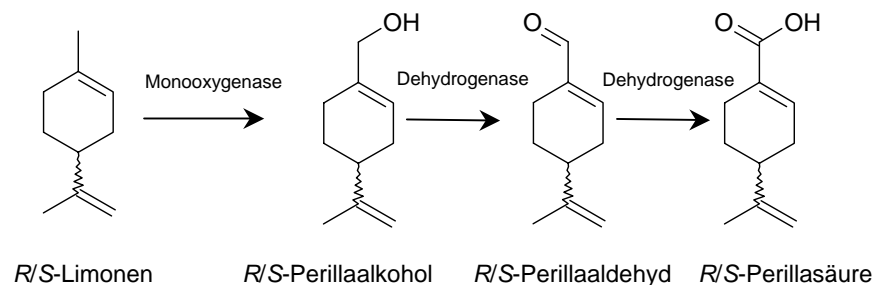
Seit langem ist bekannt, dass Mikroorganismen organische Materialien, insbesondere bei Feuchtigkeits- oder Luftzutritt, in unerwünschter Weise verändern. Gefährdet sind z.B. kosmetische und pharmazeutische Zubereitungen, Lebensmittel oder technische Produkte.

Um durch diese Organismen verursachte, unerwünschte Veränderungen zu verhindern oder zu verzögern, werden den Produkten Konservierungsmittel zugesetzt. Historisch gewachsen und immer noch wichtigste Strategie der



Konservierung ist der Einsatz von Formaldehyd, bzw. sogenannten Formaldehydabspaltern. Diese Substanzen stellen mit einem Anteil von über 60% am Markt für Konservierungsmittel und einem Bedarf von über 70.000 t/a weltweit den wesentlichen Anteil. Der Einsatz insbesondere aldehydischer Verbindungen in Kosmetika oder Pharmazeutika ist jedoch gesundheitlich sehr bedenklich. Aldehyde, insbesondere Formaldehyd, wirken häufig toxisch und stellen bekannte Kontaktallergene dar (Erdmann & Merk 2003). Natürliche Inhaltsstoffe zahlreicher Heil- und Gewürzpflanzen weisen antimikrobielle Eigenschaften auf. Zu diesen Inhaltsstoffen gehören neben phenolischen Verbindungen die in diversen ätherischen Ölen vorkommenden Terpene.

Zur Gruppe der Terpene gehört auch das Monoterpen Limonen sowie Perillaalkohol, Perillaaldehyd und Perillasäure, die Oxidationsprodukte des Limonens sind. Ein bestimmter Stamm des Bakteriums *Pseudomonas putida* zeichnet sich im Gegensatz zu vielen anderen Terpen-aktiven Mikroorganismen dadurch aus, Limonen über die Oxidationszwischenstufen Perillaalkohol und Perillaaldehyd zu Perillasäure zu metabolisieren und diese Monoterpensäure als einziges Produkt zu akkumulieren (Speelmans *et al.* 1998, Mars *et al.* 2001) (Abb. 1).



**Abb. 1:** Strukturformeln von Edukt, Produkt und Intermediaten sowie beteiligte Enzyme der Ganzzell-Biotransformation von Limonen zu Perillasäure mit *Pseudomonas putida* DSM 12264

Aufgrund ihres signifikant geringeren allergenen und hautsensibilisierenden Potenzials im Vergleich zu ihren Oxidationsvorstufen werden Monoterpensäuren oder ihre Derivate insbesondere in kosmetischen, jedoch auch in pharmazeutischen Formulierungen attraktive antimikrobielle Verbindungen darstellen.

### 3 Verwendete Methoden

#### 3.1 Analytik

*R*-Perillasäure (RT: 7,61 min), *R*-Perillaaldehyd (RT: 17,07 min), *R*-Perillaalkohol (RT: 17,44 min), *R*-Limonen (29,2 min) wurden mit Hilfe der HPLC quantifiziert

(Säule: RP-8, 5 µm, 125 x 4.6 mm; Eluent A: Wasser:Ethanol 57:43 v/v, Eluent B 100 % MeOH, Gradient: 0-20 min 100% A, 20-30 min auf 100% B, 30-35 min 100% B; Flussrate: 1 ml/min, Temperatur: 40°C, UV-Detektion: 220 nm). Glycerol und Glucose wurden ebenfalls mittels HPLC analysiert. *p*-Cymol (*R*-Limonen) mittels GC, GC-MS. Glucose/Glycerol z.T. enzymatisch.

### **3.2 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivitäten der *R*-Perillasäure**

#### *Agar-Diffusionstest*

Die Testung erfolgte auf den nach DIN 58940 standardisierten Referenzmedien. Ausplattiert wurden jeweils etwa  $10^5$  Keime von folgenden Teststämmen: *B. subtilis* DSM 347 (gram-positiv), *E. coli* DSM 498 (gram-negativ), *C. kefyri* DSM 70073 (Hefe), *C. albicans* DSM 1665 (Hefe), *A. niger* DSM 1988 (Schimmelpilz). Von *A. niger* wurde eine ausreichende Menge Kultur von einer Stammkulturplatte entnommen und auf YPD ausplattiert. *R*-(+)-Perillasäure sowie als antimikrobielle Referenzen Zimtsäure und Phenylethanol wurden in definierten Konzentrationen in DMSO (+ 0,1% Tween 20) gelöst und jeweils 10 µL auf die Filterpapierblättchen aufgetropft. Als Negativ-Kontrolle wurden 10 µL DMSO (+ 0,1% Tween 20) eingesetzt.

#### *Bouillon-Mikrodilutionsmethode*

Folgende Teststämme wurden eingesetzt: *B. subtilis* DSM 347 (gram-positiv), *Micrococcus luteus* DSM 1790 (gram-positiv), *E. coli* DSM 498 (gram-negativ), *Candida kefyri* DSM 70073 (Hefe). Als Referenz-Substanzen wurden Perillaalkohol sowie die in der Naturkosmetik als antimikrobielle Wirkstoffe gebräuchlichen Verbindungen Zimtsäure und Phenylethanol eingesetzt. Zur Bestimmung der MIC (minimal inhibitory concentration) der Perillasäure wurden jeweils Teströhrchen mit gleichem Volumen (1,98 ml) Müller-Hinton-Bouillon, definiertem Mikroorganismen-Inokulum (etwa  $1 \times 10^5$  CFU/mL) und gleichem Volumen an unterschiedlich konzentriertem, zu testenden Wirkstoff (20 µL) beschickt.

#### *Formulierungs-spezifische Keimbelastungstests*

Die Keimbelastungstest wurden in Anlehnung an die Europäische Pharmacopoeia 4, 5.1.3, mit geringen Modifikationen durchgeführt. Hierbei wurden in zahlreichen Versuchsreihen unkonservierten kosmetischen Formulierungen unterschiedliche Konzentrationen an *R*-Perillasäure beigefügt. Anschließend wurde eine hinsichtlich der Zellzahl definierte Keimbelastung durch Inokulieren mit Vorkulturen von *Staphylococcus aureus* (gram-positiv), *E. coli* (gram-negativ) und *C. albicans* (Hefe)

erreicht. Aus den kontaminierten Formulierungen wurden zu den jeweiligen Inkubationszeitpunkten Aliquots entnommen, verdünnt, auf Nährmedien ausplattiert und die Kolonie-bildenden Einheiten ausgezählt. Ein Konservierungsmittel ist umso wirksamer, je kürzer der Zeitraum bis zur signifikanten Reduktion der Keimzahl ist. Die Bakterienkeimzahl sollte nach 7 d, die Hefekeimzahl nach 14 d mindestens um 2 Zehnerpotenzen herabgesetzt sein.

### 3.3 Biotransformationsstudien

*Pseudomonas putida* DSM 12264 wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, bezogen. Neben den Standard-Komplexmedien LB, NB und TB wurden folgende Medien verwendet:

- E2-Medium (nach Speelmans *et al.* 1998, modifiziert: mit Glycerin; ohne  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ ) je Liter: Glycerin (50 mM) 4,6 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,4 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,91 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5,7 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,7 g,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  (10 mL/L einer 100 mM Lsg. = 1 mM) und 1 mL Spurenelementlösung. Spurenelemente- und Magnesiumsulfat-Lösung werden immer separat autoklaviert (pH 7,1). Spurenelementlösung in HCl 1 M, bestehend aus:  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  2,78 g,  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$  1,98 g,  $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  2,81 g,  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  0,17 g und  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  0,29 g.
- Hochzelldichte-Medium (nach Diniz *et al.* 2004) je Liter: Glucose 20 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3,5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,0 g,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  0,01 g, Ammoniumeisen(III)-citrat 0,06 g und 1 mL Spurenelementlösung (pH 7,0). Spurenelementlösung (nach Kim *et al.* 1996) in HCl 0,1 M, bestehend aus:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,3 g,  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  0,2 g,  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  0,1 g,  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$  30 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  30 mg,  $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  20 mg und  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$  10 mg. Feedlösung (nach Kim *et al.* 1996) in HCl 0,05 M, bestehend aus: Glucose 700 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$  16,6 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4,15 g,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  1,0 g,  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  0,1 g,  $\text{CaCl}_2$  50 mg, Natrium-citrat 2,0 g und 5 mL Spurenelementlösung.
- 0,1 M Phosphat-Puffer (ruhende Zellen) je Liter:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10,71 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5,24 g (pH 7,0).

Bioreaktor-Experimente: BioEngineering KLF 2000 (3,7 L), LPT 381 (42 L) und Dasgip Parallelfermentersystem; pH-Regelung auf 7,0 mit 25%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und 1 M NaOH für ruhende Zellen bzw. 14%  $\text{NH}_4\text{OH}$  für wachsende Zellen.

### **3.4 Bestimmung der wachstumshemmenden Produktkonzentration**

LB-Agarplatten mit 0 bis 30 g/L Perillasäure wurden hergestellt. Wegen der schlechten Löslichkeit bei neutralem pH Wert wurde eine alkalische 50 g/L Perillasäure-Stammlösung (pH 12) verwendet. Der pH der Agarplatten wurde abschließend auf 7,5 eingestellt. Die Platten wurden 36 h bei 30°C inkubiert. Die Grenzkonzentration für Wachstumsinhibierung wurde qualitativ an Hand Anzahl und Größe der Kolonien bestimmt. Zusätzlich wurden Flüssigkulturen untersucht: In 4,8 mL TB (pH 7) je Reagenzglas wurden 20 verschiedene Perillasäurekonzentrationen (0 bis 50 g/L) eingestellt. Die Ansätze wurden mit 200 µL LB Vorkultur angeimpft, 24 h bei 30°C und 260 rpm inkubiert und anschließend über die OD ausgewertet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivitäten der R-(+)-Perillasäure**

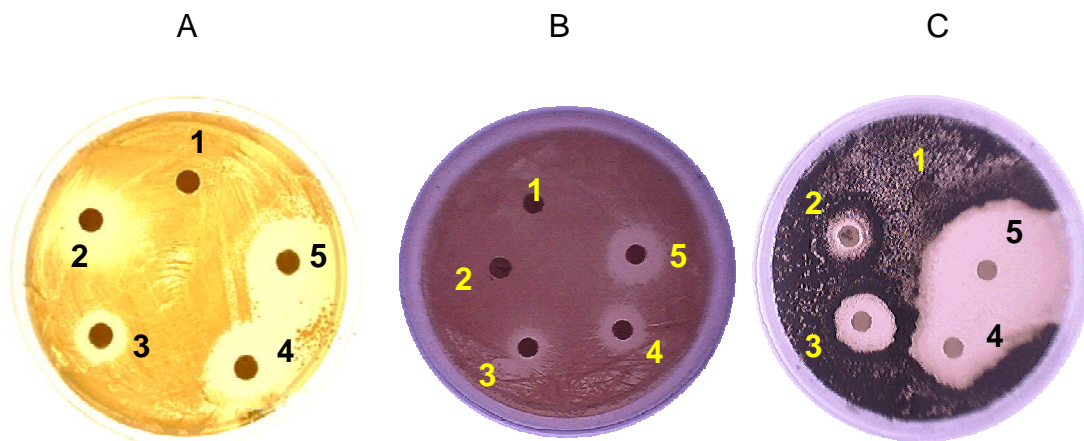
Zahlreiche antimikrobielle Wirkstoffe weisen ein auf bestimmte Mikroorganismen beschränktes Wirkspektrum auf. Infolgedessen werden zur Zeit zur wirksamen Konservierung kosmetischer oder pharmazeutischer Formulierungen stets mehrere antimikrobielle Substanzen eingesetzt. Eine signifikante Reduzierung der erforderlichen Konservierungsmittel erfordert die Bereitstellung neuer Verbindungen, die gleichzeitig gegen Bakterien, Hefen und Schimmelpilze wirken.

Um eine erste Aussage zum Wirkspektrum und zu notwendigen Einsatzkonzentrationen der Perillasäure in zu konservierenden Produkten treffen zu können, wurden 3 verschiedene Assays etabliert und durchgeführt:

1. Agar-Diffusionstest, modifiziert auf Testung lipophiler Substanzen
2. Bouillon-Mikrodilutionsmethode zur Ermittlung minimaler inhibitorischer Konzentrationen
3. Formulierungs-spezifische Keimbelastungstests

#### *Agar-Diffusionstest*

Beim Agar-Diffusionstest werden Filterpapierblättchen auf eine mit dem Testkeim beimpfte Nährmedienoberfläche aufgelegt und mit der antimikrobiellen Testsubstanz getränkt. Infolge der Diffusion der Testsubstanz in den Agar entsteht um das Blättchen ein Hemmhof, dessen Durchmesser ein erstes semi-quantitatives Maß für die antimikrobielle Eigenschaft der Testsubstanz darstellt. Die Testung erfolgte auf den nach DIN 58940 standardisierten Referenzmedien. Abb. 2 illustriert die antimikrobielle Wirkung der eingesetzten Wirkstoffe als wachstumsfreie Hemmhöfe.



**Abb. 2:** Ergebnisse eines Agar-Diffusionstests unter Verwendung von (A) *B. subtilis* (gram-positiv), (B) *E. coli* (gram-negativ) und (C) *A. niger* (Schimmelpilz). Aufgetragen wurden: 1. Kontrolle DMSO, 2. 500 µg Phenylethanol, 3. 500 µg Zimtsäure, 4. 250 µg *R*-Perillasäure und 5. 500 µg *R*-Perillasäure.

### Bouillon-Mikrodilutionsmethode

Ergänzend zum Agar-Diffusionstest wurde zur Bestimmung minimaler Hemmstoffkonzentrationen (MIC, minimal inhibitory concentration) der Perillasäure die Bouillon-Mikrodilutionsmethode eingesetzt (Tab. 1). Dieses Verfahren liefert quantitative Aussagen zu antibakteriellen und antifungalen Eigenschaften in wasserhaltigen Flüssigmedien. Die MIC stellt die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffs dar, die die in-vitro-Vermehrung von Bakterien oder Hefen innerhalb einer festgelegten Zeitspanne von 48 h verhindert (keine Zunahme der OD).

**Tab. 1:** Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilutionstests zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC). Dargestellt ist diejenige Wirkstoffkonzentration (in % w/v), bei der keine Zunahme der OD nach 48 h Inkubation festgestellt wurde.

Wirkstoff	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>R</i> -Perillasäure	0,05%	0,1%	0,3%	0,15%
Ref.: <i>R</i> -Perillaalkohol	0,1%	0,15%	0,3%	0,2%
Ref.: Zimtsäure	0,3%	0,35%	0,5%	0,2%
Ref.: Phenylethanol	0,2%	0,4%	0,5%	0,5%

Erfreulicherweise zeigte im Bouillon-Mikrodilutionstest insbesondere die Zielsubstanz, die *R*-Perillasäure, deutliche inhibitorische Aktivitäten sowohl gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, als auch gegen die Hefe *C. kefyr*. *R*-Perillaalkohol zeigte zwar im Test vergleichbare antimikrobielle Aktivität, ist jedoch wegen seines allergenen Potenzials für eine Anwendung in der Kosmetik nicht geeignet.

Basierend auf diesen vielversprechenden Resultaten wurden nun bei der Dr. Riex Healthcare GmbH Wirkstoff- und Formulierungs-spezifische Keimbelastungstests etabliert.

#### *Formulierungs-spezifische Keimbelastungstests*

Der Keimbelastungstest dient der Bestimmung der Konservierungswirkung in spezifischen Kosmetik-Formulierungen wie Cremes, Lotionen, Shampoos oder Duschbädern. Die antimikrobielle Wirkung einer Verbindung hängt im erheblichen Maße von der Zusammensetzung der zu konservierenden Formulierung ab. So haben insbesondere pH-Wert und Wassergehalt sowie die Präsenz anderer Naturstoffe einen signifikanten Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität. Um eine vorausschauende Aussage über die Einsatzmöglichkeiten für *R*-Perillasäure treffen zu können, wurde die Monoterpensäure in unterschiedliche Testformulierungen im Rahmen der Keimbelastungstests eingebracht.

Getestet wurde die antimikrobielle Wirkung der *R*-Perillasäure in folgenden Formulierungen: Shampoo, Kinder-Duschbad, Lotion, Ringelblumen-Handcreme. Tab. 2 zeigt die Ergebnisse der Keimbelastungstests unter Verwendung einer Lotion und eines Shampoos.

Bereits bei einer Einsatzkonzentration von 0,05% konnte in beiden Formulierungen gemäß Pharmacopoeia eine ausreichende Reduzierung des gram-positiven Keims *S. aureus* erreicht werden. Die potenziell humanpathogene Hefe *C. albicans* sowie der herkömmlich schwer zu inhibierende Schimmelpilz *A. niger* wurden schon in Gegenwart von 0,1% *R*-Perillasäure ausreichend inhibiert. Eine ausreichende Inhibierung des gram-negativen Stammes *E. coli* konnte bereits mit einer vergleichsweise moderaten Konzentration von 0,3% erzielt werden. Aufgrund der hinlänglich bekannten Tatsache, dass gram-negative Bakterien resistenter gegen membranaktive antimikrobielle Wirkstoffe sind, werden aktuell Versuche zur Optimierung der *R*-Perillasäure gegen diese Organismengruppe durchgeführt. Es konnte bereits in ersten Ansätzen gezeigt werden, dass ein Zusatz ausgewählter „Verstärker“ eine signifikante Reduzierung der erforderlichen Einsatzkonzentration bewirkt. Daher kann Formulierungs-übergreifend von einer notwendigen Dosierung der Perillasäure zwischen 0,1 und 0,2% ausgegangen werden.

**Tab. 2:** Antibakterielle und antifungale Aktivität der *R*-Perillasäure, exemplarisch in einer Shampoo-Formulierung (Hauptkomponenten sind Wasser (50%), Ammoniumlaurylsulfat, Laurylglucoside, Polyglyceryl-6-dicaprat und hydrolysierte Proteine) und in einer Lotion-Formulierung (aus Wasser (75%), Cetylstearylalcohol, Paraffin. subliqu., Vaseline. alb. und hydrolysierten Proteinen). Der Keimbelastungstest wurde in Anlehnung an die Europäische Pharmacopoeia 4, 5.1.3 mit geringen Modifikationen durchgeführt. Aus den kontaminierten Formulierungen wurden zu den jeweiligen Inkubationszeitpunkten Aliquots entnommen, verdünnt, auf Nährmedien ausplattiert und die Kolonie-bildenden Einheiten ausgezählt.

<b>Keimbelastungstest: Shampoo, pH 6,5</b>		<b>Kolonie-bildende Einheiten, Zeit (Tage)</b>				
<b>Organismus</b>	<b>Konservierung<sup>1</sup></b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>
<i>Escherichia coli</i>	keine	1.5 x 10 <sup>6</sup>	8.3 x 10 <sup>5</sup>	2.7 x 10 <sup>5</sup>	9.7 x 10 <sup>4</sup>	7.1 x 10 <sup>4</sup>
	0.15% <i>R</i> -Perillasäure	2.1 x 10 <sup>6</sup>	7.9 x 10 <sup>4</sup>	2300	525	< 10
	0.3% <i>R</i> -Perillasäure	1.6 x 10 <sup>6</sup>	7500	210	< 10	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	keine	8.7 x 10 <sup>5</sup>	3.4 x 10 <sup>5</sup>	8.5 x 10 <sup>4</sup>	7.0 x 10 <sup>4</sup>	9800
	0.05% <i>R</i> -Perillasäure	9.3 x 10 <sup>5</sup>	2400	< 10	< 10	< 10
	0.1% <i>R</i> -Perillasäure	1.1 x 10 <sup>6</sup>	110	< 10	< 10	< 10
<i>Candida albicans</i>	keine	7.3 x 10 <sup>5</sup>	2.1 x 10 <sup>5</sup>	7.9 x 10 <sup>4</sup>	8.0 x 10 <sup>4</sup>	6.3 x 10 <sup>4</sup>
	0.1% <i>R</i> -Perillasäure	5.5 x 10 <sup>5</sup>	4.3 x 10 <sup>4</sup>	1200	25	< 10
	0.2% <i>R</i> -Perillasäure	7.6 x 10 <sup>5</sup>	1960	< 10	< 10	< 10
<i>Aspergillus niger</i>	keine	6.6 x 10 <sup>5</sup>	3.0 x 10 <sup>5</sup>	4.9 x 10 <sup>4</sup>	6.1 x 10 <sup>4</sup>	2.1 x 10 <sup>4</sup>
	0.1% <i>R</i> -Perillasäure	7.1 x 10 <sup>5</sup>	6.9 x 10 <sup>4</sup>	1920	< 10	< 10
	0.2% <i>R</i> -Perillasäure	8.1 x 10 <sup>5</sup>	8100	70	< 10	< 10

<b>Keimbelastungstest: Lotion, pH 5,5</b>		<b>Kolonie-bildende Einheiten, Zeit (Tage)</b>				
<b>Organismus</b>	<b>Konservierung<sup>1</sup></b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>
<i>Escherichia coli</i>	keine	5.2 x 10 <sup>6</sup>	6.4 x 10 <sup>6</sup>	3.3 x 10 <sup>6</sup>	3.0 x 10 <sup>6</sup>	7.8 x 10 <sup>5</sup>
	0.15% <i>R</i> -Perillasäure	4.4 x 10 <sup>6</sup>	3.0 x 10 <sup>5</sup>	1.0 x 10 <sup>4</sup>	4000	< 10
	0.3% <i>R</i> -Perillasäure	5.3 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>4</sup>	2320	< 10	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	keine	2.4 x 10 <sup>6</sup>	1.6 x 10 <sup>6</sup>	2.1 x 10 <sup>6</sup>	6.2 x 10 <sup>5</sup>	4.8 x 10 <sup>5</sup>
	0.05% <i>R</i> -Perillasäure	1.1 x 10 <sup>6</sup>	1.9 x 10 <sup>4</sup>	112	< 10	< 10
	0.1% <i>R</i> -Perillasäure	3.3 x 10 <sup>6</sup>	8400	< 10	< 10	< 10
<i>Candida albicans</i>	keine	6.3 x 10 <sup>6</sup>	9.7 x 10 <sup>6</sup>	5.1 x 10 <sup>6</sup>	5.4 x 10 <sup>6</sup>	2.2 x 10 <sup>6</sup>
	0.1% <i>R</i> -Perillasäure	3.6 x 10 <sup>6</sup>	6.9 x 10 <sup>4</sup>	7500	< 10	< 10
	0.2% <i>R</i> -Perillasäure	4.4 x 10 <sup>6</sup>	1100	< 10	< 10	< 10
<i>Aspergillus niger</i>	keine	3.9 x 10 <sup>5</sup>	8.2 x 10 <sup>5</sup>	6.9 x 10 <sup>4</sup>	2.2 x 10 <sup>4</sup>	4.1 x 10 <sup>4</sup>
	0.1% <i>R</i> -Perillasäure	4.2 x 10 <sup>5</sup>	7.2 x 10 <sup>4</sup>	4200	230	< 10
	0.2% <i>R</i> -Perillasäure	5.4 x 10 <sup>5</sup>	1.9 x 10 <sup>4</sup>	658	< 10	< 10

Eine natürliche, sowohl gegen gram-positive und gram-negative Bakterien als auch gegen Hefen und Schimmelpilze wirksame Verbindung steht gegenwärtig der Kosmetikindustrie nicht zur Verfügung. Angesichts der extrem niedrigen notwendigen Dosierung (0,1 – 0,2%) übertrifft das Einsatzpotenzial für *R*-Perillasäure

die zu Projektbeginn formulierten Erwartungen erheblich (siehe Kapitel 5 „Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen“).

## **4.2 Biotransformation mit wachsenden Zellen**

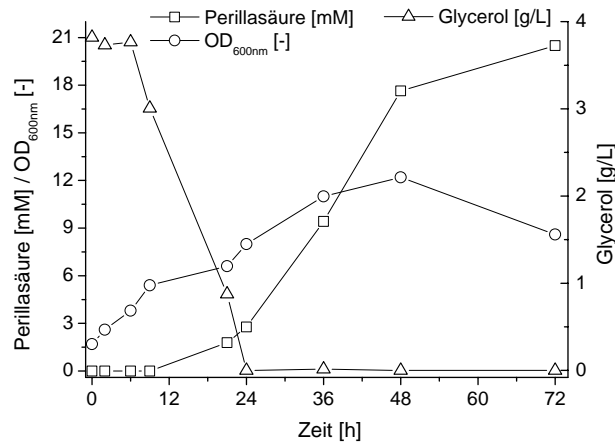
In der bisherigen Literatur zur Biotransformationen von Limonen mit *P. putida* DSM 12264 wurden ausschließlich wachsende Zellen in Mineralmedien und in Gegenwart einer C-Quelle als Cosubstrat beschrieben und als die Methode der Wahl dargestellt (Speelmans *et al.* 1998, Mars *et al.* 2001).

Die beschriebene Leistungsfähigkeit von *P. putida* DSM 12264 wurde für den in diesem Projekt zur Verfügung stehenden, kommerziell erhältlichen Stamm (DSMZ, Braunschweig) zunächst in physiologischen Grundlagenuntersuchungen überprüft.

### **4.2.1 Grundlagenstudien zur Biotransformation mit wachsenden Zellen**

Die Anwesenheit eines Cosubstrats und einer ausreichenden Menge an Stickstoff ist für eine effektive Biotransformation essentiell. Glycerol konnte als das für die angestrebte Biotransformation am besten geeignete Cosubstrat identifiziert werden. 50 mM Glycerol / 150 mM Limonen haben sich als optimale Startkonzentrationen und das beste Cosubstrat-Precursor-Verhältnis im Schüttelkolben herausgestellt. Beachtenswert ist hierbei, dass der Terpenkohlenwasserstoff Limonen damit in einer seine Löslichkeit in Wasser (ca. 0,1 mM) um das ca. 1.500-fache überschreitenden „Konzentration“ und folglich als separate Phase vorliegt, wodurch es im Schüttelkolben zu einer feinen Emulsionsbildung kommt. Dies verdeutlicht die enorme Lösungsmitteltoleranz von *P. putida* DSM 12264 und dessen besondere Eignung für die vorgesehene Terpen-Biotransformation. Auf diese Weise werden nach 3 d im Schüttelkolben 21 mM (3,5 g/L) Perillasäure bei einer End-OD von 12, entsprechend ca. 3,8 g BTM gebildet (Abb. 3). Auffallend ist, dass die Perillasäurebildung erst nach einer Zeitdauer von ca. 18 – 24 h einsetzt und sich fortsetzt, nachdem Glycerol vollständig verbraucht wurde und die Biomassebildung stagniert. Die maximale Produktionsrate betrug  $0,62 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Die Umsetzungen verlaufen hochselektiv, Perillasäure ist das einzig detektierbare Produkt der Limonen-Transformation.



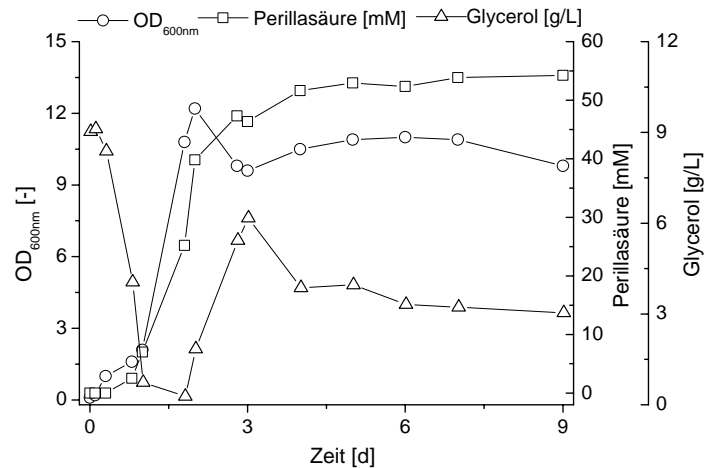


**Abb. 3:** Biotransformation mit wachsenden Zellen, Schikanekolben; pH 7, 30°C, 240 rpm, E2-Medium, 150 mM Limonen, 50 mM Glycerol.

### Weitere Ergebnisse:

- pH 6 – 8 und 30°C sind optimal für die Perillasäurebildung wachsender Zellen
- Höhere Inokulationsmengen (angereicherte Biomasse bis OD 50) führen zu einer beschleunigten Produktbildung. Die lag-Phase der Produktbildung bleibt jedoch erhalten. Die dabei maximal erreichbare Perillasäurekonzentration (ohne Glycerol-Nachdosierung) beträgt ca. 34 mM.
- Die Variation der Zugabe von Limonen (z.B. statt t=0h bei t=24h) führt immer zu einer sich anschließenden ca. 24 stündigen lag-Phase, bevor eine Produktbildung detektiert werden kann, unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe.
- 1 % Triton X100 bewirkt eine Verkürzung der produktbezogenen lag-Phase

## 4.2.2 Biotransformation mit wachsenden Zellen im Fed-Batch Bioreaktor



**Abb. 4:** Bioprozesskinetik einer Fed-batch-Kultivierung von *P. putida* DSM 12264 im 3,7 L Bioreaktor. Inokulation mit 5% LB-Vorkultur in E2 Medium. 100 mM Glycerol (9,3 g/L), 50 mM Limonen, 75 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Glycerolfeed: Start bei  $t=1\text{d}$ , bis  $t=3\text{d}$  mit 9,5 mM/h (0,9 g/L\*h). Zugabe Limonen 50 mM bei  $t=2\text{d}$  und 4d. Zugabe Spurenelementlösung 1 mL/L und  $\text{MgSO}_4$  10 mM bei  $t=1,2\text{d}$  und 7d. Zugabe 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bei  $t=4\text{d}$  und 7d. Regelung des  $\text{pO}_2$  auf 40% mit 1,5 vvm Druckluft. Drehzahl: 500 rpm bis max. 1200 rpm.

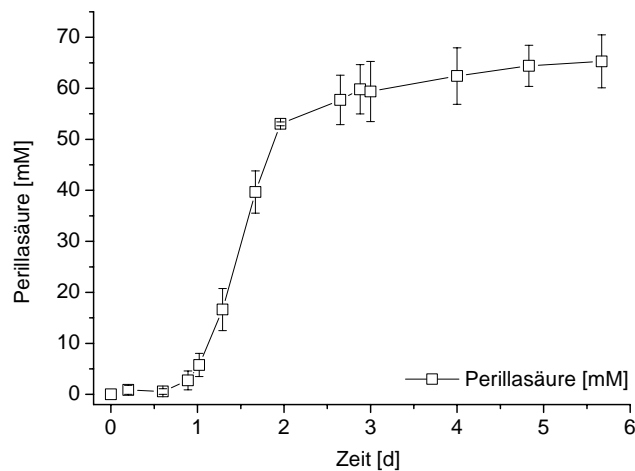
Die Untersuchungen im Fed-batch Bioreaktor hatten zum Ziel, das Potential wachsender Mikroorganismen zur Perillasäurebildung unter nicht-nährstofflimitierten Bedingungen zu bestimmen (Abb. 4). Innerhalb von 2 d hat die Kultur eine OD von 12 (ca. 3 g/L BTM) erreicht und bereits 40 mM Perillasäure (6,7 g/L) wurden gebildet. Dies entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und eine durchschnittlichen spezifischen Produktbildungsrate von ca.  $0,3 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Während der log-Phase sank die Glycerol-Konzentration vorübergehend auf 0 (Feedrate < Substrataufnahmerate), stand danach jedoch bis zum Ende der Kultivierung in ausreichender Menge zur Verfügung. Bereits nach 3 d wurden mehr als 85% der Perillasäure-Endkonzentration von 56 mM (9,4 g/L) nach 9 d erreicht. Ein Scale-up in den 42 Liter Bioreaktor war problemlos möglich und diente in erster Linie der Bereitstellung größerer Mengen Fermentationsbrühe für die Arbeiten zum Downstream-Processing beim Industriepartner (siehe 4.6).

## 4.2.3 Optimierung des Fed-Batch Bioprozesses im Parallelfementersystem

Die Optimierung der Fed-Batch Biotransformationen mit wachsenden Zellen wurde in einem Parallelfementersystem (Dasgip, Julich) durchgeführt.

Durch die Erhöhung des Limonen Volumenanteils auf vier Prozent zu Beginn der Biotransformation sowie einer Intensivierung der Precursor- und Nährstoffzufuhr (Glycerol, Spurenelemente,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Sauerstoff) in den ersten drei Tagen

konnte eine Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute sowie der Endproduktkonzentration im Gegensatz zu dem in 4.2.2 beschriebenen Experiment erreicht werden.



**Abb. 5:** Perillasäurebildung während einer Fed-batch-Kultivierung von *P. putida* DSM 12264 in 450 mL Dargip Bioreaktoren. Inokulation mit 7% LB-Vorkultur in 150 mL E2 Medium. 100 mM Glycerol (9,3 g/L), 240 mM Limonen (4% v/v), 75 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Glycerolfeed: Start bei  $t=0,6\text{d}$  mit 11 mM/h ( $1,0\text{ g/L}\cdot\text{h}$ ) bis  $t=2\text{d}$ , 22 mM/h ( $2,0\text{ g/L}\cdot\text{h}$ ) bis  $t=2,7\text{d}$ . Zugabe von Limonen 50 mM bei  $t=0,6\text{d}$ , 1d, 1,7d, 2d, 2,7d und 3d. Zugabe von Spurenelementlösung 1 mL/L und  $\text{MgSO}_4$  10 mM bei  $t=1\text{d}$ , 2d und 3d. Zugabe von 25 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bei  $t=1\text{d}$  und 2d, 50mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bei  $t=3\text{d}$ . Regelung des  $\text{pO}_2$  über 60% mit 10 L/h Druckluft und Drehzahl: 1500 rpm bis max. 2000 rpm.

In Abb. 5 ist die Produktbildungskinetik als Mittelwert von zwei parallelen Fed-Batch-Kultivierungen dargestellt. Innerhalb von 2 d wurden bereits 53 mM Perillasäure (8,8 g/L) bei einer mittleren OD von 15 (ca. 3,8 g/L) erreicht.

Im Gegensatz zu den Ergebnisse in 4.2.2 stieg die Raum-Zeit-Ausbeute um 25% auf  $27\text{ mmol L}^{-1}\text{ d}^{-1}$  sowie die durchschnittliche spezifische Produktionsrate auf ca.  $0,4\text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}\text{ h}^{-1}$ . Durch den Einsatz eines Glycerol-Feeds nach  $t=0,6\text{ d}$  mit ausreichenden Limonen-Mengen wurde die wachstumsgekoppelte Perillasäurebildung beschleunigt. Bereits nach 3 d wurden mehr als 90% der Perillasäure-Endkonzentration von  $65,3 \pm 5,2\text{ mM}$  ( $10,9 \pm 0,9\text{ g/L}$ ) erreicht.

#### Zwischenfazit:

Mit *P. putida* DSM 12264 konnten unter optimalen Wachstumsbedingungen mehr als 11 g/L Perillasäure erzeugt werden. Aufgrund der Solvenztoleranz kann eine ausreichend hohe Precursorkonzentration vorgelegt werden. Die bereits nach 2 bzw. 3 d einsetzende Sättigungskinetik der Biomasse- bzw. Produktbildung unter nichtlimitierten Nährstoffbedingungen lässt eine Produktinhibierung vermuten.

#### 4.2.4 Bestimmung des wachstumshemmenden Einflusses von R-Perillasäure

In Wachstumsreihen auf Agarplatten und in Flüssigkulturen unterschiedlicher Perillasäure-Anfangskonzentrationen wurde  $\geq 8$  g/L als Grenzkonzentration ermittelt, oberhalb welcher die Inhibition des Wachstums von *P. putida* DSM 12264 deutlich zunimmt.

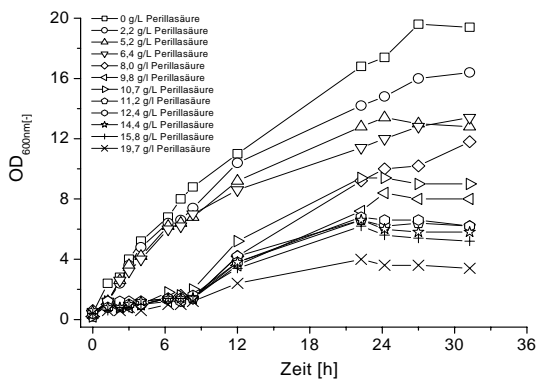
Die genaue Ermittlung wurde durch die Neigung von Perillasäure, bei  $> 8$  g/L in Flüssigmedium mit neutralem pH auszufallen, erschwert. Die Kristallisation konnte allerdings im Agarplattentest bis ca. 15 g/L weitgehend dadurch umgangen werden, indem eine hochkonzentrierte alkalische Stammlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt und Perillasäure durch moderate Gegentitration mit NaOH in Lösung gehalten wurde.

Die Flüssigkulturen wuchsen auch bei Dosierungen  $> 10$  g/L Perillasäure noch deutlich an, was auf die Präzipitation der Perillasäure zurückzuführen ist, wodurch der Anteil inhibierenden Produktes in der Lösung konstant blieb. Auf den Agarplatten zeigten Kulturen bis 5 g/L keinerlei Wachstumseinbußen, ab 8 g/L war eine Reduzierung des Wachstums erkennbar. Im Bereich 11 – 15 g/L konnte noch schwaches Wachstum festgestellt werden.

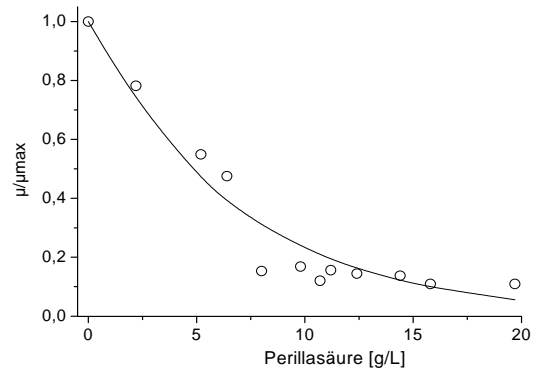
Abb. 6 A zeigt die Wachstumskinetiken von *P. putida* DSM 12264 in Abhängigkeit der vorgelegten Perillasäurekonzentration (0 bis 20 g/L). Die unterschiedlichen Perillasäurekonzentrationen wurden durch Zugabe von Aliquoten einer alkalischen Perillasäure-Stammlösung zu TB-Medium in Schüttelkolben eingestellt. Durch diese Herangehensweise konnten selbst hohe Konzentrationen von 20 g/L Perillasäure in wässriger Lösung bei pH 7 eingestellt werden.

Wie in Abb. 6 A dargestellt, ist bei Kulturen, die in Gegenwart von 8 g/L Perillasäure wuchsen, eine neunstündige Lag-Phase zu beobachten. Ab dieser Konzentration benötigt *P. putida* DSM 12264 eine Adaptationszeit, um sich auf die toxische Wirkung der Perillasäure einzustellen. Nach dieser Adaptationsphase ist trotzdem Wachstum festzustellen. Für alle Experimente wurde die maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu$  bestimmt und normiert auf die maximale spezifische Wachstumsrate in Abwesenheit von Perillasäure  $\mu_{\max}$  dargestellt (Abb. 6 B).

A



B



**Abb. 6:** Wachstumskinetiken von *P. putida* DSM 12264 in TB Medium in Abhängigkeit von verschiedenen Perillasäurekonzentrationen (A). Relative maximale spezifische Wachstumsrate von *P. putida* DSM 12264 in Abhängigkeit von verschiedenen Perillasäurekonzentrationen (B).

Abb. 6 B zeigt die Inhibierungskinetik von Perillasäure gegenüber *P. putida* DSM 12264, wobei die höchste maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  von  $1,43 \text{ h}^{-1}$  in Abwesenheit von Perillasäure erreicht wurde ( $\mu/\mu_{\max}=1$ ).

Auch mit 20 g/L Perillasäure, trotz der stark unterdrückten Wachstumsrate von *P. putida*, war keine komplette Inhibierung festzustellen.

Zur Beschreibung der Inhibierungskinetik wurde das Modell von Aiba *et al.* (1968) ausgewählt, dessen empirische Konstante  $K_2$  von der Kultivierungsmethode abhängt (Luong 1985) und dessen  $P$ -Wert die Perillasäurekonzentration im Medium beschreibt (Tab. 3).

Die Annäherung der relativen Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Perillasäurekonzentration durch eine exponentielle Trendlinie deutet darauf hin, dass nach anfänglich starkem Einfluss der Perillasäure (bis 8 g/L) auf das Wachstum dieser mit höheren Konzentrationen von Perillasäure stark nachlässt. Die Ursache dafür ist die Präzipitation von Perillasäure bei hohen Konzentrationen ab ca. 8 g/L. Die im Medium gelöste Perillasäuremenge bleibt folglich jenseits dieses Sättigungswertes konstant. Geringes Zellwachstum ist daher auch in diesem Bereich möglich (Abb. 6 B).

**Tab. 3:** Exponentielles Modell von Aiba *et al.* (1968), welches zur Beschreibung des inhibitorischen Einflusses der Perillasäure herangezogen wurde (Erläuterungen siehe Text).

$$\mu_{\max} = \mu_{\max}^0 e^{-K_2 P}$$

$$\mu_{\max}^0 = 1,43 \text{ h}^{-1}$$

$$K_2 = 0,147$$

Diese Daten verdeutlichen, dass Perillasäure in höheren Konzentrationen erheblich das Wachstum von *P. putida* DSM 12264 hemmt, ohne es, wegen des Präzipitationseffekts in Flüssigkulturen, komplett zu inhibieren. Aus diesem Grund wurde die Präzipitation auch als alternative ISPR-Maßnahme zur Produktivitätssteigerung untersucht. Der für eine effizientere Abtrennung notwendige niedrigere pH-Wert ( $\text{pH} < 7$ ) zeigte jedoch negative Effekte auf die Vitalität der Mikroorganismen (siehe 4.5).

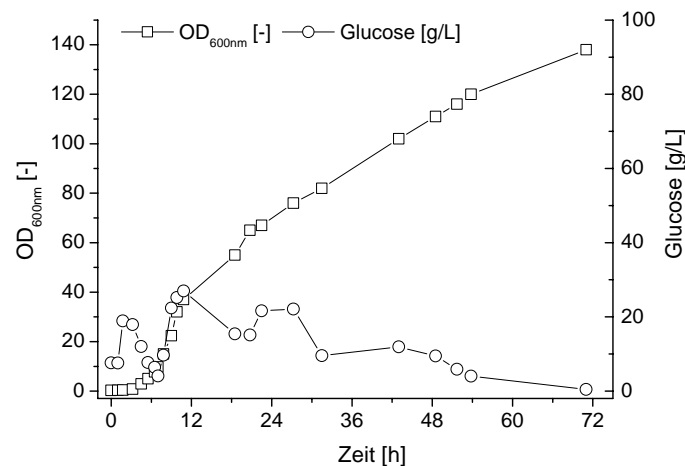
### 4.3 Hochzelldichte-Kultivierung (Bereitstellung von Biokatalysator)

Als alternative Strategie für die Biotransformation wurde das Potenzial einer zweistufigen Prozessführung untersucht. In der ersten Phase soll in möglichst kurzer Zeit möglichst viel Biokatalysator in Form von Zellmasse hergestellt werden. In der zweiten Phase, der eigentlichen Biotransformation, kann dann unter optimalen Bedingungen eine möglichst effektive Produktbildung erfolgen. Voraussetzungen hierfür sind, dass mit dem betreffenden Mikroorganismus Hochzelldichtekulturen etabliert werden können und sich ruhende Zellen als Katalysatoren für die anschließende Biotransformation einsetzen lassen.

Auf Basis einer Literaturrecherche wurden drei typische HZD-Mineralmedien für Pseudomonaden (Kim *et al.* 1996, Lau *et al.* 2004, Diniz *et al.* 2004) auf ihre grundsätzliche Eignung für *P. putida* DSM 12264 untersucht. Die Batch-Kultivierungen wurden mit drei unterschiedlichen C-Quellen durchgeführt:

- Glucose ist das aufgrund diverser zur Auswahl stehender metabolischer Abbauewege vermutlich am besten für ein schnelles Wachstum geeignete Substrat.
- Glycerol ist das für die Biotransformation am besten geeignete Cosubstrat. Eine effiziente HZD-Kultur mit Glycerol wäre vor dem Hintergrund der in 4.2 dargestellten Ergebnisse zur Biotransformation wachsender Zellen ebenfalls sehr interessant.
- p-Cymol wiederum wird in *P. putida* DSM 12264 in den ersten drei Reaktionen über exakt die Enzyme metabolisiert, die auch eine Umsetzung von Limonen zu Perillasäure katalysieren können und folglich für die angestrebte Biotransformation entscheidend sind. Im Unterschied zu Limonen kann *P. putida* auf p-Cymol als einziger C-Quelle sehr gut wachsen. Es ist also durch eine Anzucht auf p-Cymol ein für den Enzymapparat in der anschließenden Biotransformation vorteilhafter Induktionseffekt denkbar.

Vorversuche im Schüttelkolben zeigten, dass *P. putida* DSM 12264 Glucose schneller als Glycerol und *p*-Cymol zur Biomassebildung nutzen kann, aber mit allen C-Quellen vergleichbare Biomassen gebildet wurden. Deshalb wurde mit Glucose ein Fed-batch-Ansatz im 3L Bioreaktor zur Erzielung einer möglichst hohen Zelldichte durchgeführt (Abb. 7).



**Abb. 7:** Hochzelldichtekultivierung von *P. putida* DSM 12264 in Medium nach Diniz *et al.* (2004). Inokulation mit 5% Vorkultur desselben Mediums. Feedlösung mit 600 g/L Glucose (nach Kim *et al.* 1996): 10 g/L\*h von t=6h bis t=22h, 6 g/L\*h von t=32h bis 52h, 12 g/L\*h von t=52h bis t=71h. Drehzahl: 500 rpm bis 1500 rpm. Regelung des pO<sub>2</sub> auf 15%-50%. Beimischung von Sauerstoff zur Zuluft ab OD > 60. 1000-1500 rpm von t=25 h bis t=71h.

Abb. 7 verdeutlicht, dass sich *P. putida* DSM 12264 sehr gut für die Bildung hoher Zelldichten eignet. Es wurde eine Biotrockenmasse von > 45 g/L erreicht (~ OD 140). Die Wachstumskinetik geht nach anfänglicher log-Phase ab t = 12 h in eine lineare Wachstumsphase über, da mit einem konstanten Feed gearbeitet wurde. Offensichtlich wurde ein anderer Nährmedienbestandteil als Glucose limitierend, deren Konzentration in den ersten 48 h immer zwischen 8 und 20 g/L gehalten wurde. Aus dem Kurvenverlauf kann extrapoliert werden, dass mit *P. putida* DSM 12264 BTM-Konzentrationen > 50 g/L in kürzerer Zeit erreichbar sein werden, insbesondere, wenn eine Feeding-Regelung (z.B. DO-stat, Glucose-stat bei optimierter Zusammensetzung der Feed-Lösung) oder eine exponentielle an die Stelle der konstanten Feedingrate tritt. Außerdem kann mit einer höher konzentrierten Feed-Lösung als der bisher eingesetzten der nicht unerhebliche Verdünnungseffekt weiter vermindert werden. Diese Optimierungsarbeiten wurden aufgrund der höheren Priorität der Untersuchungen zur eigentlichen Biotransformation zunächst zurückgestellt.

#### **4.4 Biotransformation mit ruhenden Zellen**

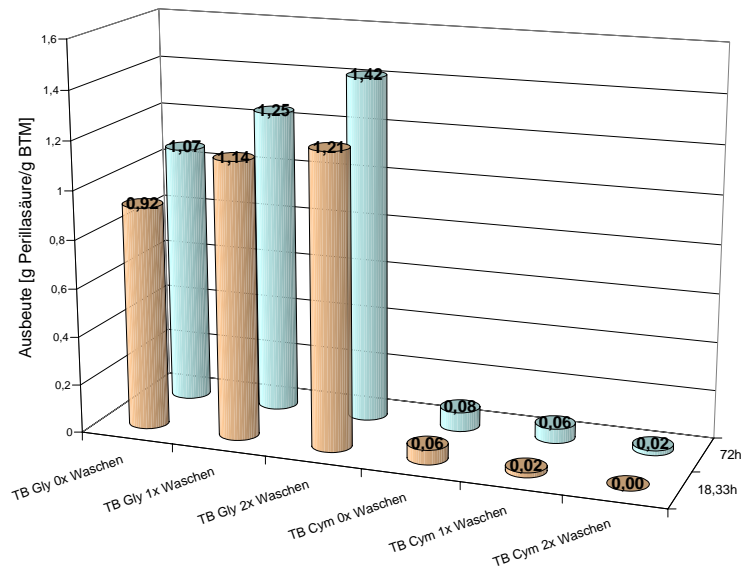
Im Vergleich zu wachsenden weisen ruhende Zellen diverse Vorteile auf:

- Das Medium ist weitgehend frei von störenden Nährstoffen oder Metaboliten und erleichtert Produktabtrennung und folgendes Downstreaming
- Das Biokatalysator-Substrat-Verhältnis ist optimal einstellbar
- Der Biokatalysator kann prinzipiell mehrfach verwendet werden, vorausgesetzt die Zellen sind über einen längeren Zeitraum stabil/aktiv
- Im Idealfall lassen sich einmal hergestellte Zellen durch Einfrieren langzeitlagern und können aufgetaut direkt als Katalysatoren verwendet werden

##### **4.4.1 Einfluss der Vorkultivierung**

Mit p-Cymol als C-Quelle angezogene Zellen zeigten überraschenderweise äußerst geringe Aktivitäten in anschließenden Biotransformationen in Phosphat-Puffer, exemplarisch dargestellt in Abb. 8. Im Vergleich dazu zeigt eine in TB-Medium mit Glycerol anstelle von p-Cymol angezogene Biomasse sehr gute Biotransformationsaktivität, die sich mit der Anzahl an vorangestellten Waschvorgängen noch einmal um bis zu 40% steigern lässt. Offensichtlich können so störende Endprodukte oder Metabolite herausgewaschen werden oder Precursor und/oder Produkt die Zellwand besser passieren. Diese Waschvorgänge zeigen dagegen auf die Aktivität der p-Cymol-Kultur keinen Einfluss. Hier ist zu vermuten, dass der äußerst hydrophobe Kohlenwasserstoff p-Cymol ( $\log P$  4,1), der mit Phosphat-Puffer nicht ausgewaschen wird, in den Zellmembranen verbleibt und die für die initiale Biotransformation zuständigen P450 Monooxygenase sättigt, so dass eine Umsetzung des Nebensubstrates Limonen (geringere Affinität) zunächst ausbleibt. Allerdings waren auch nach 72 h keine Anzeichen für eine zunehmende Limonenumsetzung festzustellen.



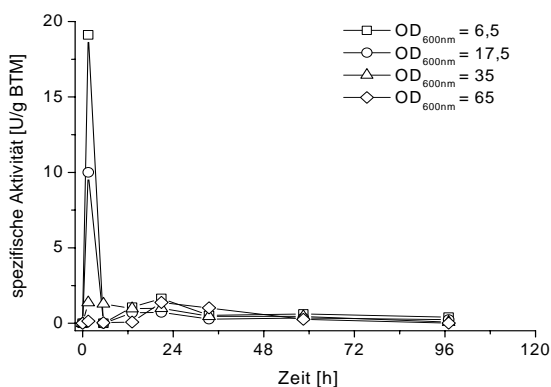


**Abb. 8:** Katalysator-bezogene Produktausbeute ruhender *P. putida*-Zellen für  $t=18,33\text{h}$  und  $t=72\text{h}$  nach vorheriger Anzucht in TB-Medium, dem Glycerol oder p-Cymol als C-Quelle zudosiert wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Anzahl Waschvorgänge (Phosphatpuffer). Resuspension der Zellen ( $OD=12$ ) in Phosphat-Puffer  $0,1\text{M}$  ( $\text{pH } 7,0$ ),  $50\text{ mM}$  Glycerol,  $150\text{ mM}$  Limonen. Schikanekolben bei  $30^\circ\text{C}$  und  $240\text{ rpm}$ .

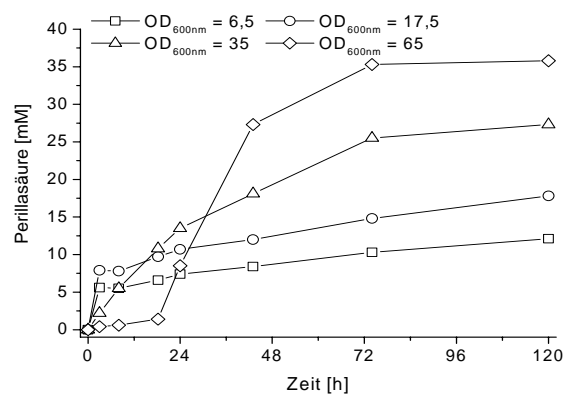
#### 4.4.2 Aktivität ruhender Zellen

Die Biotransformationsaktivität wurde mit vier unterschiedlichen Biokatalysatorkonzentrationen untersucht. Die Abb. 9A zeigt, dass bei Verwendung der Zellen in der geringsten Konzentration ( $OD\ 6,5$ ) die höchste maximale spezifische Aktivität erreichten (nach  $3\text{ h}$ ). Je höher die eingestellte Biokatalysatorkonzentration, desto geringer war die maximale spezifische Aktivität. Dies erklärt, warum bei  $OD\ 65$  nicht die zehnfache, sondern nur ca. dreifache Produktendkonzentration ( $36\text{ mM}$  statt  $12\text{ mM}$ ) erreicht werden konnte (Abb. 9B). Außerdem zeigten höheren Katalysatorkonzentrationen eine deutlich verlangsamte Anfangskinetik.

A

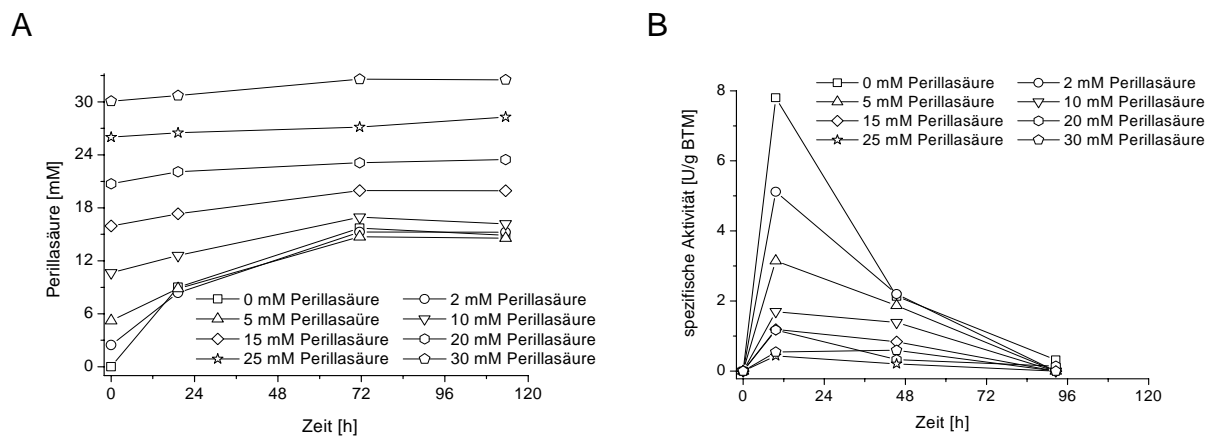


B



**Abb. 9:** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität (A) und Produktbildungskinetik (B) von der Biokatalysatorkonzentration. Ruhende Zellen nach vorheriger Anzucht in TB-Medium, resuspendiert auf angegebene  $OD$  in Phosphat-Puffer  $0,1\text{M}$  ( $\text{pH } 7,0$ ),  $50\text{ mM}$  Glycerol,  $150\text{ mM}$  Limonen. Schikanekolben,  $30^\circ\text{C}$ ,  $240\text{ rpm}$ .

Zur Aufklärung der Frage, ob die in Abb. 9B gezeigte Sättigungskinetik der Biotransformationen auf eine Feedback-Inhibierung durch Perillasäure zurückzuführen ist, wurden die Biotransformation in Gegenwart ansteigender Konzentrationen von Perillasäure (0 bis 30 mM) wiederholt.



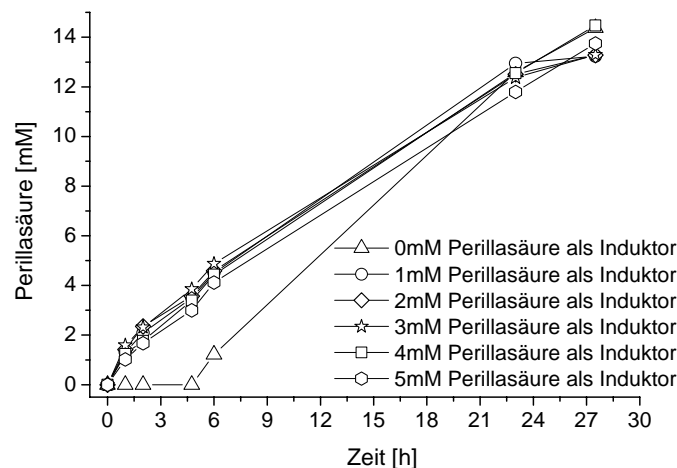
**Abb. 10:** Produktbildungskinetik ruhender Zellen bei unterschiedlichen Perillasäure-Anfangskonzentrationen (A). Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivität ruhender Zellen in Abhängigkeit von der Perillasäure-Anfangskonzentration (B). *P. putida*-Zellen nach vorheriger Anzucht in TB, resuspendiert (OD=4) in Phosphat-Puffer 0,1M (pH 7,0) mit ansteigender Perillasäure-Anfangskonzentration von 0 mM bis 30 mM. 50 mM Glycerol, 150 mM Limonen. Biotransformation in Reagenzgläsern bei 30°C und 240 rpm.

Die stetig abnehmenden Anfangsgeschwindigkeiten bei zunehmender Perillasäure-Anfangskonzentration verdeutlichen, dass bereits die Anwesenheit relativ geringer Produktmengen im Reaktionsmedium inhibierend auf die Biotransformationsleistung wirken (Abb. 10A). Je höher die Perillasäure-Anfangskonzentration, desto geringer ist die maximale spezifische Biotransformationsaktivität (Abb. 10B). Offensichtlich kann mit dem gewählten System – ohne *in situ* Produktabtrennung – die Produktkonzentration nicht über einen Grenzwert von ca. 30 mM (ca. 5 g/L) gesteigert werden.

#### 4.4.3 Induktion der Biotransformation mit ruhenden Zellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Katabolismus von p-Cymol in *P. putida* F1 durch p-Cymolsäure induziert werden kann (Eaton 1997). In Analogie wurde die Hypothese einer möglichen Enzyminduktion durch Perillasäure untersucht. Tatsächlich zeigen ruhende Zellen, die zuvor in TB-Medium in Gegenwart von Perillasäure angezogen wurden, eine deutlich beschleunigte Biotransformationsaktivität. Hierbei sind geringe Mengen Perillasäure von maximal 1 mM ausreichend, wie aus Abb. 11 zu erkennen ist. Die Raum-Zeit-Ausbeute in 24 h ist jedoch bei allen Ansätzen praktisch identisch ( $0,52 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), d.h. auch

die nicht-induzierten Zellen erreichen nach ihrer lag-Phase aufgrund der dann einsetzenden schnelleren Transformationsgeschwindigkeit dieselbe Produktkonzentration. Dies ist wiederum als Indikator für eine bereits in kleinen Konzentrationen einsetzende inhibierende Wirkung des Produktes auf die Aktivität ruhender Zellen zu werten.



**Abb. 11:** Induktionseffekt von Perillaldehyd auf die Biotransformation von *P. putida* DSM 12264. Zellen zuvor kultiviert in TB in Gegenwart von 0 mM bis 5 mM Perillaldehyd, danach resuspendiert (OD=5) in Phosphat-Puffer 0,1M (pH 7,0), 50 mM Glycerol, 150 mM Limonen. Schikanekolben, 30°C, 240 rpm.

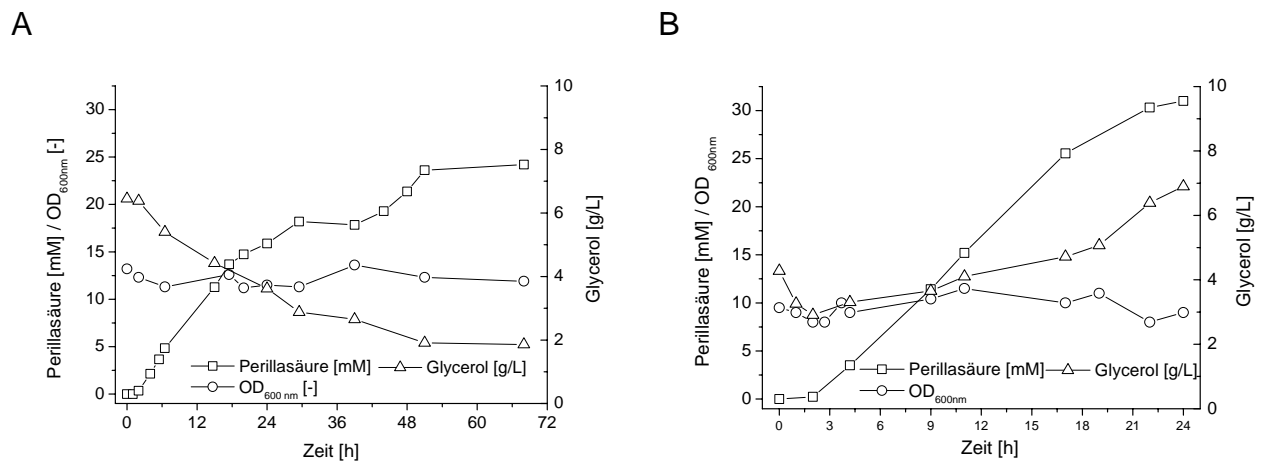
#### 4.4.4 Weitere Ergebnisse zur Biotransformation mit ruhenden Zellen

- Der optimale pH-Bereich der Biotransformation ruhender Zellen liegt bei 6 - 8
- Die optimale Temperatur beträgt 30 °C
- Mit Triton X100 (1%) permeabilisierte Zellen zeigen eine beschleunigte Anfangskinetik
- Nach dem Einfrieren wieder aufgetaute Zellen sind in ihrer Leistungsfähigkeit nicht beeinträchtigt

#### 4.4.5 Ruhende Zellen mit kontinuierlicher Cofaktor-Regenerierung / Bioreaktor

Die bisherigen Erkenntnisse zur Biotransformation ruhender Zellen in Phosphat-Puffer wurden auf den 3 L Bioreaktormaßstab übertragen. Hierbei sollte durch eine kontinuierliche Zufuhr des Cosubstrates Glycerol im Fed-batch-Modus (ohne weitere Nährbestandteile) die nötige Energiequelle für unterstützende Stoffwechselforgänge, insbesondere die zellinterne Regeneration des Cofaktors, ohne Limitierung bereitgestellt werden.

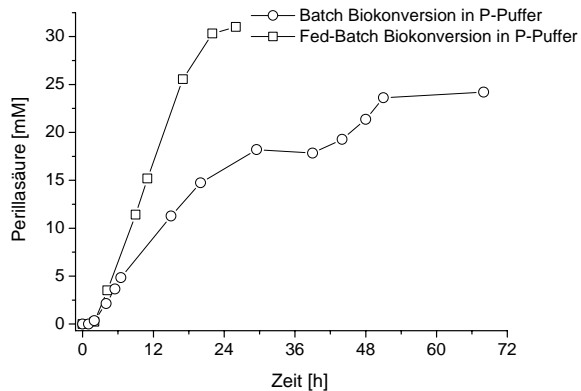
Zu Vergleichszwecken wurde dasselbe Experiment im Batch-Modus, ohne Dosierung der C-Quelle, durchgeführt. Der Verlauf der in Abb. 12A illustrierten Batch-Biotransformation zeigt, dass nach anfänglicher lag-Phase (nicht-induzierte Zellen) die Produktbildung annähernd konstant bis  $t = 27$  h mit einer durchschnittlichen Rate von  $0,7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  verlief. Nach dem Übergang in die stationäre Phase (18 mM) wurden 0,5 % Triton X100 zugegeben, worauf eine erneute Produktakkumulation auf einen Endwert von 25 mM (4,2 g/L) nach 51 h stattfand. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf die verbesserte Löslichkeit von Precursor und Produkt im Medium (besserer Stofftransport) und auf ein teilweises Herauslösen der inhibierenden Perillasäure aus den Zellen (Permeabilisierung) mit Wiederaufnahme der Biotransformationsaktivität (vgl. Abb. 13B) zurückzuführen.



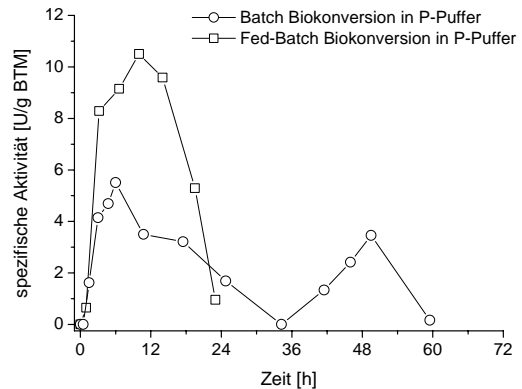
**Abb. 12:** A – Perillasäure-Produktion mit ruhenden *P. putida*-Zellen ohne Feed. *P. putida*-Zellen nach vorheriger Anzucht in TB, resuspendiert (OD=12; ~3,6 g/L BTM) in Phosphat-Puffer 0,1M (pH 7,0), 50 mM Glycerol, 150 mM Limonen. Regelung  $pO_2$  bei 40% mit 1,5 vvm Limonen-gesättigter Zuluft. Zugabe von 0,5% Triton-100X bei  $t=39$ h. Drehzahl: 1000 rpm-1500 rpm. B – Perillasäure-Produktion mit ruhenden *P. putida*-Zellen im Fed-Batch. *P. putida*-Zellen nach vorheriger Anzucht in TB resuspendiert (OD=10; ~ 3,0 g/L BTM) in Phosphat-Puffer 0,1M (pH 7,0), 50 mM Glycerol, 150 mM Limonen. Regelung  $pO_2$  und Drehzahlbereich wie bei A. Glycerol-Feed  $0,3 \text{ g/L}\cdot\text{h}$  von  $t=2$ h bis  $t=24$ h.

Im Gegensatz zur Batch-Biotransformation konnte durch den kontinuierlichen Glycerol-Feed nach 24 h eine höhere Endkonzentration von 31 mM, entsprechend einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $5,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , erzielt werden (Abb. 12B). Die Überlagerung der Kinetiken in Abb. 11A verdeutlicht anschaulich die Steigerung der Produktbildung um annähernd 100% nach 24 h. Der Unterschied in den spezifischen Aktivitäten fällt aufgrund der geringeren Biokatalysatorkonzentration im Fed-batch noch deutlicher aus (Abb. 13B). Das Ergebnis der Biotransformation mit Glycerol-Feed bestätigt die zuvor in Inhibierungsstudien bestimmte Grenzkonzentration der Perillasäure von ca. 30 mM (vgl. Abb. 10A).

A



B



**Abb. 13:** Vergleich der Produktbildungskinetik (A) und der zeitabhängigen spezifischen Aktivität (B) von Batch (ohne Feed) und Fed-Batch (Glycerol-Feed) Perillensäure-Produktion ruhender Zellen.

#### 4.5 *In situ* Produktabtrennung (ISPR)

Die bisher beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen, dass für die weitere Steigerung von Produktivität und Endkonzentration, unabhängig vom Einsatz wachsender oder ruhender Zellen, eine *in situ* Entfernung des inhibierenden Produktes essentiell ist. Aufgrund der bekannten Solvenztoleranz von *Pseudomonas* wurde zunächst die wässrig-organische Zweiphasenkultur als bevorzugte Maßnahme zur *in situ* Produktentfernung intensiv studiert.

##### 4.5.1 *In situ* Extraktion mittels wässrig-organischem Zweiphasensystem

Insgesamt acht organische Lösungsmitteln wurden auf Basis von  $\log P_{o/w}$  Kalkulationen als potenzielle *in situ* Extraktionsmittel ausgewählt, dabei wurde auch Limonen als gleichzeitige Substrat- und Extraktionsphase geprüft. Die ausgewählten Lösungsmittel überspannen einen  $\log P_{o/w}$  –Bereich von 2,5 bis 7,5, um sowohl solche, die ein gutes Extraktionsvermögen für Perillensäure ( $\log P_{o/w} \sim 2,8$ ) erwarten lassen, als auch solche, die Limonen gut lösen und von denen geringere toxische Effekte auf die Zellen zu befürchten sind ( $\log P$ -Werte  $> 4$ ), einzuschließen.

Die entscheidenden Kriterien bei der Auswahl der Lösungsmittel waren:

- Die Ermittlung einer organischen Verbindung, die nicht oder nur sehr schlecht mit Wasser mischbar ist, aber das Edukt Limonen gut lösen kann.
- Die Ermittlung eines biokompatiblen Lösungsmittels, welches in einer Konzentration von 30 vol% das Wachstum von *P. putida* DSM 12264 nicht signifikant inhibiert

- Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten der Perillasäure zwischen Phosphat-Puffer bzw. Medium und den ermittelten organischen Lösungsmitteln
- Die Quantifizierung von Perillasäure in Biotransformationen unter Verwendung von Limonen als Edukt und *P. putida* als Organismus

Folgende Lösungsmittel wurden untersucht (Literatur  $\log P_{o/w}$  in Klammern):

Diethylphthalat (2,5), 1-Octanol (2,9), 2-Octanol (2,9), 1-Decanol (4,0), p-Cymol (4,1), Limonen (4,6), 1-Dodecanol (5,0) und Oleylalkohol (7,5).

#### 4.5.1.1 Löslichkeit von Limonen in den ausgewählten Lösungsmitteln

Die Löslichkeit des Precursors Limonen in den anderen 7 organischen Lösungsmitteln wurde getestet, um deren Eignung als *in situ* Precursor-Reservoir zu überprüfen. Zusätzlich werden in Zweiphasensystemen, ein biokompatibles organisches Lösungsmittel vorausgesetzt, üblicherweise phasentoxische Effekte des Precursors minimiert. Jeweils 200  $\mu\text{L}$  *R*-Limonen wurden mit je 800  $\mu\text{L}$  dem o.g. Lösungsmittel gemischt. Alle 7 Lösungsmittel mischten sich vollständig und klar mit 20 vol% Limonen.

#### 4.5.1.2 Bestimmung der Biokompatibilität ausgewählter Lösungsmittel

Zwingende Voraussetzung für den Einsatz eines organischen Lösungsmittels in einer 2-Phasen-Biotransformation ist, dass das Lösungsmittel in der angestrebten Einsatzkonzentration nicht inhibierend auf das Wachstum von *P. putida* wirkt.

Es wurden Wachstumsversuche von *P. putida* in E2 Medium (Inokulation mit 2 vol% LB-Vorkultur) sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von 30 vol% organischer Phase (bestehend aus 25 vol% org. Lösungsmittel plus 5 vol% Limonen) durchgeführt. Nach drei Tagen Wachstum wurden die Ansätze makroskopisch und mikroskopisch nach 30 min Zentrifugation (4.500 U/min) betrachtet. In allen Ansätzen konnten vor und auch nach dem Zentrifugieren zahlreiche *Pseudomonas*-Zellen in der organischen Phase (an den Öltröpfchen haftend) identifiziert werden. Um während der Zentrifugation die Konzentrierung der Zellen in den sich bildenden Zellpellets weitgehend quantitativ (> 80%) zu gestalten, wurde vor der Zentrifugation jeweils 100  $\mu\text{l}$  (etwa 0,1%) Triton X-100 zum Biotransformationsansatz zugesetzt. Es zeichneten sich folgende Trends ab:

- In Gegenwart von 30% *R*-Limonen und 1-Decanol konnte ein verglichen mit der Kontrolle leicht reduziertes Wachstum beobachtet werden.

- Im Ansatz mit Diethylphthalat konnte auf Grund der geringen Dichteunterschiede Zellen/Lösungsmittel kein Zellpellet abgetrennt werden.
- In Gegenwart von 25% 1-Octanol sowie mit 2-Octanol konnte kein nennenswertes Zellwachstum beobachtet werden.
- Ein Zusatz von jeweils 25% *p*-Cymol, 1-Dodecanol und Oleylalkohol führte zu, verglichen mit der Kontrolle (ohne org. Phase), z.T. verbessertem Wachstum.

Aus Sicht der Biokompatibilität besonders gut geeignete Lösungsmittel sind demnach *p*-Cymol, 1-Dodecanol, und Oleylalkohol.

#### 4.5.1.3 Biotransformationen im 2-Phasen-System

Tab. 4 veranschaulicht, dass selbst nach 5 Tagen Biotransformation in den 2-Phasensystemen mit den organischen Lösungsmitteln 1-Decanol, 1-Dodecanol und Oleylalkohol als Limonenreservoir keine signifikanten Perillasäure-Mengen gebildet wurden. Einzig im Ansatz mit einer reinen Limonen-Phase konnten sowohl in der wässrigen als auch der organischen Phase deutliche Perillasäure-Mengen nachgewiesen werden. In Gegenwart von *p*-Cymol wurde die Biotransformation des Limonens deutlich unterdrückt. Es liegt nahe, dass die Präsenz beispielsweise des *p*-Cymols oder des Dodecanols die Oxyfunktionalisierung des Substrats Limonen und somit die Bildung der Perillasäure verhindern. Insbesondere die Tatsache, dass *P. putida* *p*-Cymol als auch Limonen mit Hilfe ähnlicher, wenn nicht identischer Oxidoreduktasen transformiert, ist offenbar nachteilig für die Verwendung von *p*-Cymol als organische Phase. Aber auch in niedrigen Konzentrationen wirkt *p*-Cymol nicht induzierend (ohne Abbildung), was den zuvor beschriebenen Ergebnissen mit auf *p*-Cymol angezogenen ruhenden Zellen entspricht (vgl. Abb. 8). Im Gegensatz zu 1-Octanol inhibiert 1-Decanol das Wachstum von *P. putida* nur im geringen Maße. 1-Decanol stellt hinsichtlich des Verteilungskoeffizienten ebenfalls ein sinnvolles Lösungsmittel für eine *in situ* Extraktion dar. Leider wird auch in Gegenwart von 1-Decanol signifikant weniger Perillasäure gebildet als beispielweise im Limonen-Ansatz. Tab. 4 fasst außerdem die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen zur *in situ* Extraktion zusammen.

**Tab. 4:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen zur *in situ* Extraktion inkl. der Produktion von Perillasäure in 2-Phasen-Biotransformationsansätzen. Schikanekolben mit 70 vol% E2-Medium (1% Vorkultur) und 5 vol% Limonen. Zugabe der organischen Phasen (25 vol%) nach t=24h. Bestimmung der Perillasäurekonzentrationen in der wässrigen und der organischen Phasen nach t=5d.

Organische Phase	Biokompatibilität	Gute Phasen-Separation <sup>1</sup>	Verteilungskoeffizient von PS (Realsystem)	c(PS) <sub>fin</sub> nach Biotransf.
Diisononylphthalat	+	+ <sup>3</sup>	n.g.	n.g.
1-Octanol (2-Octanol)	-	+	26,0	0 mM
1-Decanol	+	+	28,0	3,3 mM
1-Dodecanol	++	+	20,2	2,8 mM
Oleylalkohol	++ <sup>2</sup>	+/-	14,1	2,1 mM
p-Cymol	++ <sup>2</sup>	-	4,0	0,4 mM
Limonen	+	-	3,2	17,5 mM

<sup>1</sup> Nach 30-minütiger Zentrifugation (4.500 U/min) der 5-Tages-Ansätze zeigten die wässrigen Phasen eine deutliche Trübung. Diese wurde sowohl durch nicht pelletierte Zellen oder Zellbestandteile als auch durch emulgierte Lösungsmittel (insbesondere emulgiertes Limonen) hervorgerufen.

<sup>2</sup> Besseres Wachstum als in Kontrolle ohne Lösungsmittel

n.g. = nicht gemessen

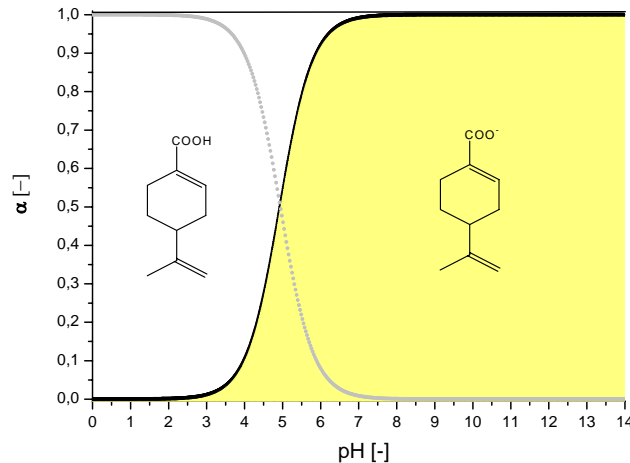
<sup>3</sup> keine Trennung der Zellen von der organischen Phase

Es kann resümiert werden, dass sich die Strategie einer wässrig-organischen 2-Phasenkultivierung zur *in situ* Produktentfernung als äußerst schwierig herausgestellt hat. Als Hauptprobleme wurden dabei die geringe Biotransformationsleistung und erhebliche Aufarbeitungsprobleme identifiziert.



#### 4.5.2 ISPR durch Ionenaustauscher

Abb. 14 zeigt das Dissoziationsverhalten der Perillasäure ( $pK_s = 4,94$ ) in Abhängigkeit vom pH.



**Abb. 14:** Dissoziationsverhalten von Perillasäure in Abhängigkeit vom pH-Wert.  $\alpha = [\text{dissoziierte Perillasäure}] / ([\text{dissoziierte Perillasäure}] + [\text{undissoziierte Perillasäure}])$

In dem für die gewünschte Biotransformation idealen pH-Bereich 6 bis 8 liegt die Perillasäure zwischen > 90% bis vollkommen dissoziiert vor (bei pH 7 bereits > 99%). Deshalb wurde als interessante Alternative zur Extraktion die Bindung an Ionenaustauschern untersucht. Dieses Verfahren hat sich bereits in unterschiedlichen biotechnologischen Prozessen zur Herstellung organischer Säuren als *in situ*-Methode bewährt (z.B. Lactat, Hexansäure).

In einem ersten Screening verschiedener basischer Ionenaustauscher (tertiäre/quaternäre Amine) konnten Ionenaustauschertypen identifiziert werden, die die Perillasäure sehr effizient und in kurzer Zeit in Phosphat-Puffer und E2-Medium binden (z.B. Amberlite IRA 410 Cl). In den weiteren Experimenten wurde die Bindung und die Elution der Perillasäure charakterisiert sowie der Einfluss des Precursors und des Cosubstrates auf die Bindekapazität der Ionenaustauscher untersucht. Danach wurde durch ihren Einsatz in realen Biotransformationen die Biokompatibilität der Ionenaustauscher sowie der Einfluss auf die Produktivität und Endkonzentration ruhender und wachsender Zellen untersucht. Schließlich wurden die gesammelten Erkenntnisse auf einen Fed-Batch Reaktor mit wachsenden Zellen übertragen.

#### 4.5.2.1 Ionenaustauscher Screening

Verschiedene basische Ionenaustauscher (tertiäre / quaternäre Amine) wurden aufgrund ihrer Eigenschaften bezüglich der Perillasäurebindung verglichen (Tab. 5).

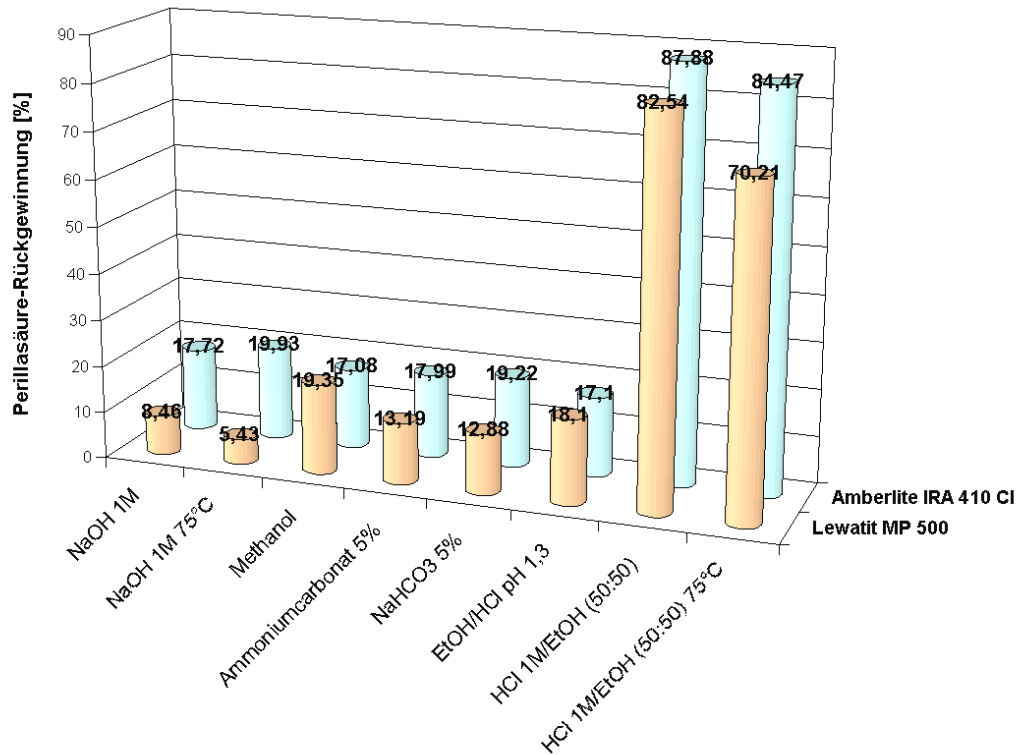
**Tabelle 5:** Bindung der Perillasäure an verschiedene Ionenaustauscher-Harze in Abhängigkeit vom Medium nach 12 Stunden. Zusätzlich wurde der Einfluss auf den pH des Mediums, die Limonen-Affinität der IA und die Glycerol-Bindung bestimmt. Die vorhandene Perillasäurekonzentration (PS) betrug 5 g/L (entsprechend 30 mM = 0,03 eq/L). Die Glycerolkonzentration im Medium betrug 5 g/L und 4 g/L für Limonen. Es wurde die 10-fache Menge an Ionenaustauscher-Äquivalenten (entsprechend 0,3 eq/L) in 25 ml eingesetzt.

Ionenaustauscher	Amberlite IRA 67	Amberlite IRA 458 CI	Amberlite IRA 410 CI	Amberlite IRA 400 OH	Lewatit MonoPlus M500	Lewatit MonoPlus MP64	Duolite A7
<b>Basizität Kapazität</b>	Schwach 1,6 eq/L	Stark 1,25 eq/L	Stark 1,4 eq/L	Stark 1,4 eq/L	Stark 1,3 eq/L	Mittel 1,3 eq/L	Schwach 2,1 eq/L
<b>Perillasäure-Bindung [%] von 30mM Perillasäure durch 0,3eq/L IT</b>							
<b>P-Puffer / E2-Medium</b>	n.b.	34	92	89	96	93	n.b.
<b>pH-Shift</b>	n.b.	< 0,1	< 0,1	> 1	< 0,1	> 1	n.b.
<b>Glycerol-Bindung</b>	n.b.	n.b.	keine	n.b.	keine	keine	n.b.
<b>Limonen-Affinität</b>	n.b.	n.b.	stark	n.b.	sehr stark	sehr stark	n.b.

Aufgrund optimaler Perillasäurebindung und vernachlässigbarer pH-Veränderung gingen Amberlite IRA 410 CI und Lewatit MP500 als die am besten geeigneten Harze mit über 90% Perillasäurebindung aus dem Screening hervor. Obwohl Amberlite IRA 400 OH und Lewatit MP64 auch eine ausreichende Perillasäurebindung zeigten, war die resultierende pH-Variation selbst im gepufferten Medium für die geplante Biotransformation zu groß. Es wurde keine Glycerolbindung mit den untersuchten Harzen beobachtet. Alle Harze zeigten starke Limonen-Affinität.

#### 4.5.2.2 Perillasäurerückgewinnung

Auf Basis einer Literaturrecherche wurden acht Lösungen zur Elution der Perillasäure von den Ionenaustauschern ausgewählt.



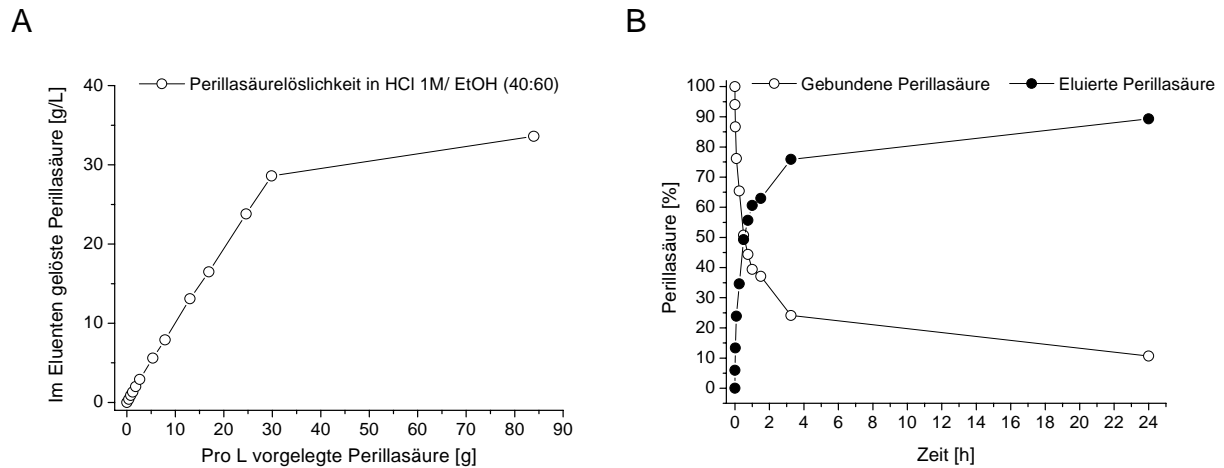
**Abb. 15:** Perillasäurerückgewinnung von Amberlite IRA 410 Cl und Lewatit MP500 mittels ausgewählter Elutionsmittel im 5 mL Maßstab. Erste Stufe: Perillasäureabtrennung aus Phosphat-Puffer-Modell-Lösung mit 30 mM Perillasäure in Gegenwart von Ionenaustauscher (0,44 g Amberlite/ 5 mL bzw. 0,81 g Lewatit/ 5 mL, entsprechend 0,3 Ionenaustauscher-Äquivalente) für 12h. Zweite Stufe: Perillasäurerückgewinnung mittels 5 mL des jeweiligen Eluenten für 12h.

Abb. 15 zeigt, dass HCl 1M/EtOH (50:50) mit einer 83 prozentigen Perillasäurerückgewinnung von Lewatit MP500 bzw. einer 88 prozentigen Perillasäurerückgewinnung von Amberlite IRA 410 Cl das am besten geeignete Elutionsmittel ist.

Die vollständige Perillasäureelution wurde durch den Einsatz eines vierfachen Elutionsvolumens und durch die Anpassung des Eluentes (HCl 1M/ EtOH (40:60)) erreicht. Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften liegt Perillasäure in Gegenwart von HCl vollständig undissoziiert vor, so dass sie sich im Eluenten aufgrund der hohen Lösekraft von Ethanol auflöst. Für die folgenden Experimente wurde Amberlite IRA 410 Cl wegen des günstigeren Preises ausgewählt.

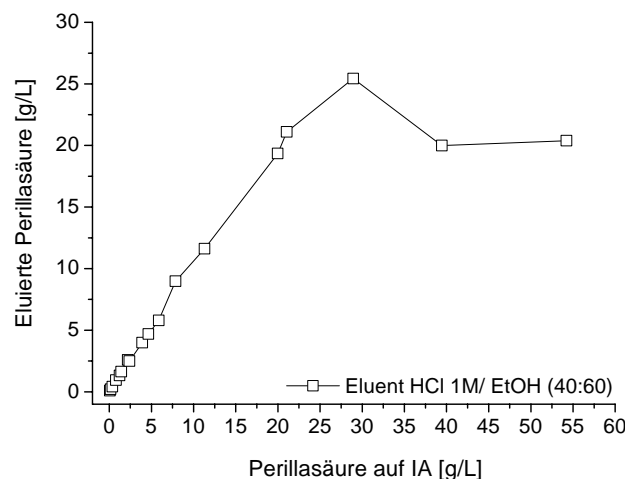
### 4.5.2.3 Charakterisierung des Eluenten

Zur Optimierung der Perillasäurerückgewinnung aus dem Ionenaustauscher Amberlite IRA 410 Cl wurde zunächst die maximale Perillasäurelöslichkeit von 34 g/L im Eluent HCl 1M/ EtOH (40:60) bestimmt (Abb. 16 A).



**Abb. 16:** A: Perillasäurelöslichkeit im Eluenten HCl 1M/ EtOH (40:60). B: Perillasäureelutionskinetik aus dem Ionenaustauscher. Einsatz von 2,7 g Amberlite IRA 410 Cl (mit 0,15 g Perillasäure/g Ionenaustauscher gebunden) in 100 mL Eluent HCl 1M/EtOH (40:60) entsprechend 24 mM Perillasäure. Bestimmung der Perillasäurekonzentration im Eluenten während 24h.

Anschließend zeigte die Bestimmung der Elutionskinetik von Perillasäure aus Amberlite IRA 410 Cl eine Rückgewinnung von mehr als 60% der Perillasäure nach einer Stunde und von mehr als 93 % nach 24 Stunden (Abb. 16 B).



**Abb. 17:** Perillasäurekonzentrationen im Elutionsmittel (HCl 1M/EtOH (40:60)) in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an Perillasäure-gesättigtem Amberlite IRA 410 Cl bei konstantem Elutionsvolumen. Versuchsdurchführung: Sättigung von Amberlite IRA 410 Cl mit einer 85 mM Perillasäurelösung (14,1 g/L). Elution von ansteigenden Konzentrationen von gesättigtem Amberlite IRA 410 Cl mit dem Eluenten HCl 1M/EtOH (40:60) im 5 mL Maßstab, 12 Stunden bei 240 rpm. Chromatographische Bestimmung der eluierten Perillasäure.

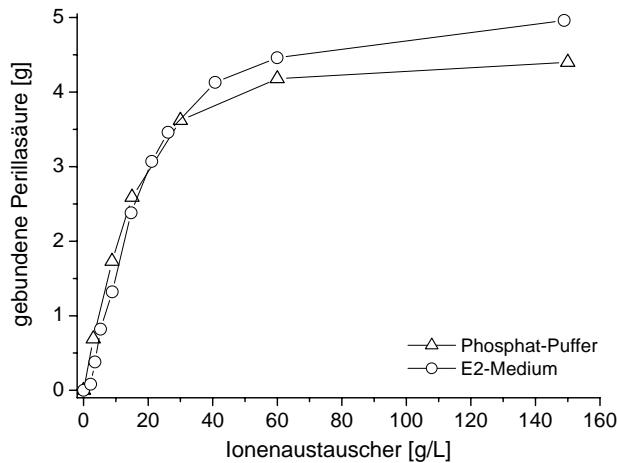
Mit dem Eluenten HCl 1M/ EtOH (40:60) wurde bei Zusatz immer größerer Mengen Perillasäure-gesättigtem Ionenaustauschers eine vollständige Rückgewinnung aus dem Ionenaustauscher bis zu einer maximalen Konzentration von ca. 25 g/L Perillasäure erzielt. Diese Perillasäurekonzentration war an 180 g/L Amberlite IRA 410 Cl gebunden. Aus dieser Experimentalreihe ergab sich eine Bindungskapazität von  $0,154 \pm 0,02$  g Perillasäure pro g Ionenaustauscher (aus den Messwerten des linearen Bereichs in Abb. 17 ermittelt). Die Größenordnung dieses Wertes wurde mit der Untersuchung in 4.5.2.4 bestätigt. Bei Zugabe größerer Ionenaustauschermengen, d.h. größerer Perillasäuremengen, wurde eine Präzipitation der Perillasäure im Eluenten beobachtet (Sättigung überschritten, Abb.17).

#### **4.5.2.4 Bindekapazität und Bindekinetik des Ionenaustauschers bezüglich Perillasäure**

Von erheblicher Bedeutung ist die Bestimmung der Perillasäure-Bindekapazität des Ionenaustauschers in den Biotransformationsmedien „Phosphat-Puffer“ und „E2-Medium“. Die daraus erlangten Erkenntnisse ermöglichen eine Planung der einzustellenden Mindestkonzentration an Ionenaustauscher in Biotransformationsansätzen, um eine effektive Wirkung als ISPR-Methode zu erreichen.

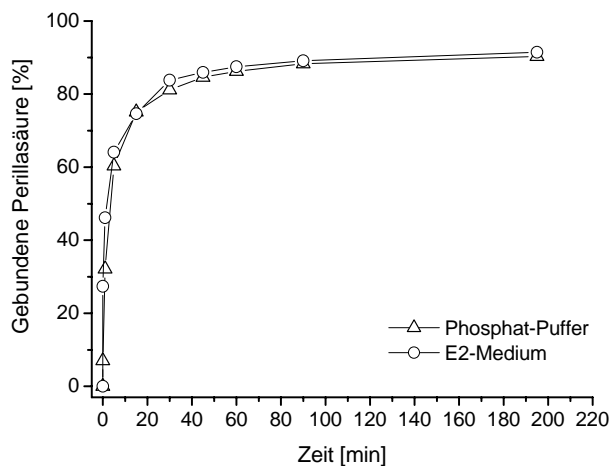
Perillasäurelösungen (mit je 30 mM Perillasäure entsprechend 5 g/L) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Ionenaustauschers versetzt. Diese Suspensionen wurden bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Nach 12 h Reaktionszeit wurde die Perillasäurekonzentration im Überstand chromatographisch bestimmt und die gemessene Konzentration von der Konzentration der Stammlösung abgezogen. Dadurch konnte die Menge an gebundener Perillasäure bestimmt werden. Durch Auftragung der gebundenen Perillasäurekonzentration bei verschiedenen Ionenaustauscherkonzentrationen wurde das Schaubild in Abb. 18 erstellt.

Die Steigung der Geraden, die den linearen Anfangsbereich der Kurven beschreibt, entspricht der empirischen Bindekapazität des Ionenaustauschers für das entsprechende Medium.



**Abbildung 18:** Gebundene Perillasäure in Abhängigkeit von der Ionenaustauscherkonzentration.0 g/L bis 160 g/L Amberlite IRA 410 Cl in Phosphat-Puffer mit 30 mM Perillasäure (5 g/L) bzw. in E2-Medium mit 30 mM Perillasäure im 5 mL Maßstab.

In E2-Medium und Phosphat-Puffer mit jeweils 30 mM (5 g/L) Perillasäure ergaben sich Bindekapazitäten von  $0,15 \pm 0,01$  g Perillasäure pro g Ionenaustauscher bzw.  $0,18 \pm 0,01$  g Perillasäure pro g Ionenaustauscher. Die geringere PS-Bindekapazität in E2-Medium im Vergleich zu Phosphat-Puffer begründet sich vermutlich in der höheren Affinität von Konkurrenzionen.



**Abb. 19:** Perillasäurebindungskinetik. Einsatz von 0,3 Ionenaustauscher-Äquivalenten (entspricht: 2,20 g Amberlite IRA 410 Cl) in 25 mL 30 mM Perillasäure Phosphat-Puffer-Modell-Lösung, 30 mM Perillasäure E2-Medium-Modell-Lösung, bei 20°C und 200 rpm. Bestimmung der Perillasäurekonzentration in Lösung während der ersten 200 Minuten.

Die Bindekinetiken von Amberlite IRA 410 Cl gegenüber Perillasäure zeigten den gleichen, vom Medium unabhängigen Geschwindigkeitsverlauf (Abb. 19). Nach den ersten fünf Minuten wurde mehr als 60% Perillasäure am Ionenaustauscher

gebunden. Innerhalb von drei Stunden stieg der gebundene Anteil auf ca. 90% Perillasäure an.

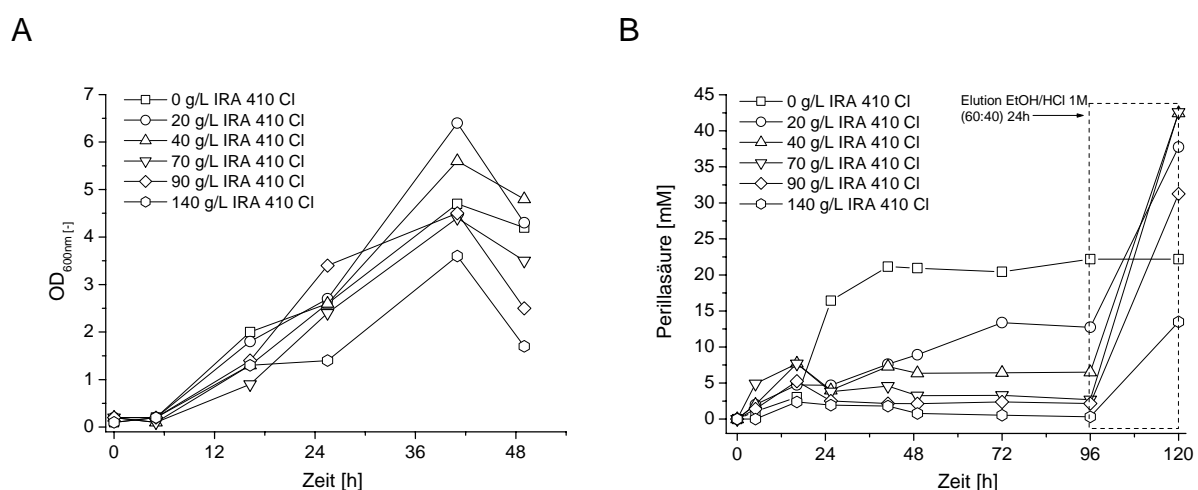
#### 4.5.2.5 Biokompatibilität von Amberlite IRA 410 CI gegenüber *P. putida*

Zur Bestimmung der Biokompatibilität von Amberlite IRA 410 CI gegenüber *P. putida* DSM 12264 wurden Schüttelkolben-Biotransformationen von Limonen in E2-Medium in Anwesenheit von Ionenaustauscher zwischen 0 g/L und 140 g/L durchgeführt (Abb. 20 A).

Es hat sich herausgestellt, dass mit einer End-OD von 6 das Wachstum in Anwesenheit von 20 g/L bzw. 40 g/L Amberlite IRA 410 CI stärker als bei der Kontrolle war, wo die End-OD 4,5 betrug. Dieser positive Effekt des Ionenaustauschers auf das Wachstum von *P. putida* erklärt sich damit, dass der inhibierende Einfluss von Perillasäure auf das Wachstum durch die Bindung am Ionenaustauscher minimiert wurde. Mit der im Kulturmedium vorliegenden Perillasäuremenge fand gleichzeitig eine Enzyminduktion statt, wodurch auch die Biotransformationsaktivität verbessert werden konnte (siehe 4.4.3).

In Anwesenheit von 70 g/L bis 140 g/L Amberlite IRA 410 CI wuchsen die Kulturen zwar gleichartig jedoch schlechter als in der Nullkontrolle.

Die Verschlechterung des Sauerstoff-Eintrags bei Anwesenheit von hohen Mengen Amberlite IRA 410 CI (z. B. Kultivierung mit 140 g/L) in Verbindung mit verstärkten Scherkräften limitiert möglicherweise ebenfalls die Biomassebildung.



**Abbildung 20:** Wachstum von *P. putida* DSM 12264 (A) und Perillasäurebildungskinetik (B) während der Biotransformation von Limonen in Gegenwart von ansteigenden Mengen Ionenaustauscher. Biotransformation in E2-Medium, Schikanenkolben, pH 7,0, 30°C, 240 rpm, 150 mM Limonen, 50 mM Glycerol, Amberlite IRA 410 CI (0 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 70 g/L, 140 g/L). Inokulation mit 2% LB-Vorkultur

(über Nacht kultiviert). Dauer 4 Tage. Elution der Perillasäure durch Elutionslösung (HCl 1M/EtOH (40:60)), 4-faches Volumen des Kultivierungsvolumens, 24 Stunden.

In keinem der Experimente variierte der pH-Wert um mehr als 0,6 Einheiten.

Diesen Untersuchungen haben gezeigt, dass Amberlite IRA 410 Cl in weiten Konzentrationsgrenzen, d.h. auch bei relativ großer Ionenaustauschermenge biokompatibel für *P. putida* DSM 12264 ist.

#### **4.5.2.6 IA-ISPR Biotransformation mit wachsenden Zellen - Batch**

In den bisherigen Batch-Biotransformationen im Schüttelkolbenmaßstab ohne ISPR wurde nie eine Produktendkonzentration von 21 mM (3,5 g/L) Perillasäure überschritten.

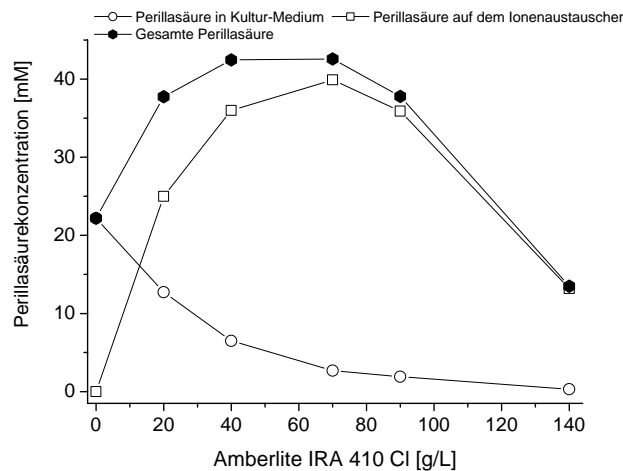
Hier wurde deshalb der Einfluss von Ionenaustauscher auf die Perillasäurebildung durch Zugabe von Amberlite IRA 410 Cl in Konzentrationen zwischen 0 und 140 g/L untersucht. Die Perillasäurebildung für die jeweiligen Biotransformationsansätze wurde analog zu 4.5.2.5 chromatographisch analysiert.

Abb. 20 B zeigt, dass bei 20 bis 90 g/L Amberlite IRA 410 Cl die Perillasäureendkonzentration 72 % bis 95 % höher als bei der Positiv-Kontrolle (22 mM Perillasäure, entspricht 3,7 g/L) war. Mit 70 g/L Amberlite IRA 410 Cl wurde für die Batch-Biotransformation mit wachsenden Zellen die höchste Perillasäureendkonzentration von 43 mM (7,2 g/L) erzielt. Mehr als 94 % (40 mM) davon lagen auf dem Ionenaustauscher gebunden vor und wurden anschließend für 24 Stunden lang bis zur Erreichung einer stabilen Perillasäurekonzentration eluiert. Beachtenswert ist hierbei die Akkumulierung der restlichen 6 % Perillasäure im Kulturmedium, obwohl diese aufgrund der zuvor bestimmten Bindekapazität theoretisch hätte auch gebunden werden können. Im Gegensatz zu den Verhältnissen in einem Bioreaktor, ist der Energieeintrag zur Vermischung beider Phasen im Schüttelkolben zu gering, um eine feine Emulsion zu bilden. Deshalb ist zu vermuten, dass ein Teil der im Schüttelkolbenexperiment gebildeten Perillasäure in die geschlossene Limonen-Phase extrahiert wird und so schlechter oder gar nicht durch den Ionenaustauscher abgetrennt werden kann.

Dieser Effekt wird im weiteren Verlauf wieder aufgehoben (siehe Rückgang der Perillasäurebildung zwischen den Messpunkten bei 12 bzw. 24 h nach Beginn der Biotransformation im Schüttelkolben in Abb. 20 B), weil nach 24 Stunden von *P.*



*putida* ausreichend Biotenside zur Schaffung einer stabilen Emulsion gebildet werden, womit sich die Extraktionswirkung einer separaten Limonenphase aufhebt.



**Abbildung 21:** Verteilung der Perillasäure zwischen Kultur-Medium und Ionenaustauscher während der IA-ISPR Batch Biotransformation mit wachsenden Zellen in Abhängigkeit von der Ionenaustauscherkonzentration im Medium. Alle Konzentrationen sind auf das Medienvolumen bezogen. Biotransformation in E2-Medium, Schikanenkolben, pH 7,0, 30°C, 240 rpm, 150 mM Limonen, 50 mM Glycerol, Amberlite IRA 410 Cl (0 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 70 g/L, 140 g/L). Inokulation mit 2% LB-Vorkultur (über Nacht kultiviert). Dauer 4 Tage. Elution der Perillasäure durch Elutionslösung (HCl 1M/EtOH (40:60)), 4-faches Volumen des Kultivierungsvolumens, 24 Stunden.

Abb. 21 zeigt, dass der Hauptteil der Perillasäure, auch in Gegenwart von geringeren Mengen des Ionenaustauschers, an diesen gebunden wird. Obendrein nimmt der Anteil von an Ionenaustauscher gebundener Perillasäure mit steigender Ionenaustauscherkonzentration im Medium zu (> 66 % mit 20 g/L Amberlite IRA 410 Cl, > 86 % mit 40 g/L Amberlite IRA 410 Cl und > 93 % mit 70 g/L Amberlite IRA 410 Cl). Die Anwendung von 0,5 % Tween 80 Emulgator zur Erhöhung der Precursorlöslichkeit (besserer Stofftransport) sowie zur Abnahme der Limonen-Ionenaustauscher-Harz-Affinität hat insgesamt die Endproduktkonzentrationen verschlechtert. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass in Gegenwart von Tween 80 weniger Biomasse als ohne Emulgator erzeugt wurde.

### Fazit:

Dank der Anwendung des Ionenaustauschers zur *in situ* Produktabtrennung konnte die Biotransformationsleistung von *P. putida* über 100 % verbessert werden. So erzielte die Biotransformation mit 70 g/L Amberlite IRA 410 Cl mit einer maximale OD von 4,4 (ca. 1,3 g/L BTM), die nach 1,75 d erreicht wurde, eine spezifische

Perillasäurekonzentration von 33 mmol  $\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Dieser Wert betrug bei der Kontroll-Biotransformation ohne ISPR nur 16 mmol  $\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ .

Während der ersten vierzehn Stunden wurden bei allen Experimenten der Kultivierungsreihe das Cosubstrat und die Stickstoffquelle völlig aufgebraucht (Daten nicht gezeigt). Somit könnten die Ausbeuten unter nicht-limitierenden Bedingungen prinzipiell noch weiter gesteigert werden.

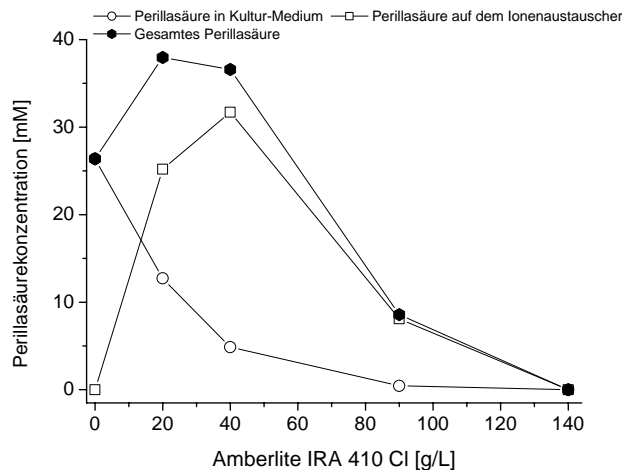
#### **4.5.2.7 IA-ISPR Biotransformation mit ruhenden Zellen - Batch**

Gleichermaßen wie mit wachsenden Zellen ermöglichte die Verwendung von Ionenaustauscher als ISPR-Methode für die Biotransformation mit ruhenden Zellen eine Steigerung der Perillasäureendkonzentration. Im Gegensatz zu wachsenden Zellen konnte durch die Nutzung von 0,5 % Tween 80 die Biotransformationsaktivität leicht verbessert werden (Daten nicht gezeigt). Hierbei lag der Biokatalysator von Anfang an resuspendiert in Phosphat-Puffer vor. Es wird vermutet, dass die oben beschriebenen negative Wirkung des Emulgators nur für wachsende, nicht jedoch für ruhende Zellen zutrifft.

Eine Erhöhung der Produktendkonzentration von ca. 40 % wurde für die Kultivierungen mit 20 g/L bzw. 40 g/L Amberlite beobachtet (Positiv-Kontrolle 26 mM Perillasäure (4,3 g/L), 20 g/L und 40 g/L Amberlite IRA 410 Cl ca. 38 mM (6,3 g/L)). Bei über 90 g/L Amberlite IRA 410 Cl war die Produktivität jedoch schlechter (Abb. 22).

Auch bei der IA-ISPR Schüttelkolben-Biotransformation mit ruhenden Zellen ist zu vermuten, dass die Anwesenheit von großen Mengen des Ionenaustauschers die Stabilität der Biokatalysatoren herabsetzt, indem deren Membranen beschädigt werden (Scherkräfte zwischen Ionenaustauscher-Harz und Mikroorganismen).

Mit 13 mmol  $\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  war die spezifische Perillasäurekonzentration ruhender Zellen niedriger als die wachsender Zellen (33 mmol  $\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ) bei vergleichbarer Ionenaustauschermenge.



**Abbildung 22:** Verteilung der Perillasäure zwischen Kultur-Medium und Ionenaustauscher während der IA-ISPR Batch Biotransformation mit ruhenden Zellen in Abhängigkeit von der Ionenaustauscherkonzentration im Medium. Alle Konzentrationen sind auf das Medienvolumen bezogen. Biotransformation in Phosphat-Puffer mit  $OD_{600nm}$  von 10 (ca. 3,5 g/L BTM), Schikanekolben, pH 7,0, 30°C, 240 rpm, 150 mM Limonen, 50 mM Glycerol, + 0,5 g/L Tween 80, Amberlite IRA 410 Cl (0 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 90 g/L, 140 g/L). Biomasse aus TB-Medium gewonnen, 24 Stunden kultiviert. Dauer: 7 Tage. Elution der Perillasäure durch Elutionslösung (HCl 1M/EtOH (40:60)), 4-faches Volumen des Kultivierungsvolumens, 24 Stunden.

#### Fazit:

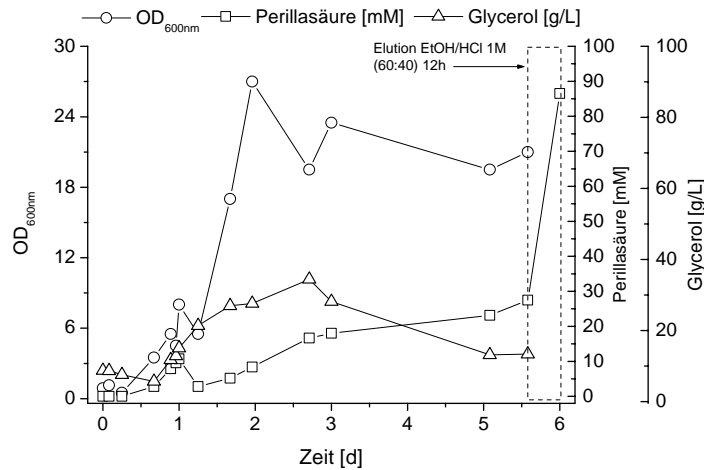
Die Anwendung von Ionenaustauscher zur *in situ* Produktabtrennung bei der Biotransformation von Limonen mit ruhenden Zellen ermöglicht ebenfalls eine Erhöhung der Perillasäureendkonzentration; der Effekt ist geringer ausgeprägt als bei wachsenden Zellen. Hier ist weiteres Optimierungspotential zu vermuten. Die hierzu notwendigen Untersuchungen konnten jedoch aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden, da sie zugunsten der Untersuchungen zur ISPR mit wachsenden Zellen unter Fed-batch Bedingungen zurückgestellt werden mußten.

#### 4.5.2.8 IA-ISPR Fed-Batch Biotransformation im Parallelermentersystem

Die Perillasäurebildung wurde mittels Ionenaustauscher-*in situ* Produktabtrennung unter nicht-nährstofflimitierten Bedingungen im Parallelermentersystem untersucht.

Im Rahmen der Prozessführung wurde erst nach einem Tag Amberlite IRA 410 Cl (70 g/L) zugegeben, um den gewünschten Induktionseffekt durch akkumulierende Perillasäure zu nutzen (vgl. Kapitel 4.4.3). Zu diesem Zeitraum hatte *P. putida* DSM 12264 jedoch bereits ca. 11 mM Perillasäure (ca. 1,8 g/L) im Kulturmedium gebildet, welches gemäß Abb. 6B bereits leicht wachstumsinhibierend wirkt.

Innerhalb von 2 d hat die Kultur eine OD von 27 (6,75 g/L BTM) erreicht. Durch den Beginn des Glycerol-Feeds bei  $t=0,6$  zusammen mit der Bereitstellung ausreichender Limonenmengen bis zum dritten Tag (sequentielles Feeding) wurde eine verlängerte Produktionsphase erreicht (siehe auch 4.2.3).



**Abb. 23:** Bioprozesskinetik einer IA-ISPR Fed-batch-Kultivierung von *P. putida* im 450 mL Parallelförderer. Inokulation mit 7% LB-Vorkultur in 150 mL E2 Medium. 100 mM Glycerol (9,3 g/L), 240 mM Limonen (4% v/v), 75 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Zugabe von 70 g/L Amberlite IRA 410 CI bei  $t=1$  d. Glycerolfeed: Start bei  $t=0,7$  d mit 22 mM/h (2 g/L\*h) bis  $t=2$  d, 33 mM/h (3,0 g/L\*h) bis  $t=2,7$  d. Zugabe von Limonen 50 mM bei  $t=0,7$  d, 1 d, 1,3 d, 1,7 d, 2 d, 2,7 d und 3 d. Zugabe von Spurenelementlösung 1 mL/L und  $\text{MgSO}_4$  10 mM bei  $t=1$  d, 2 d und 3 d. Zugabe 25 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bei  $t=1$  d und 2 d, 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bei  $t=3$  d. Regelung des  $\text{pO}_2$  über 90% mit 10 L/h Druckluft und Drehzahl: 1500 rpm bis max. 2000 rpm. Elution der Perillasäure durch Elutionslösung (HCl 1M/EtOH (40:60)), 1-faches Volumen des Kultivierungsvolumens, 12 Stunden (bis Erreichung einer stabilen Konzentration).

Auf diese Weise wurden in der IA-ISPR-Fed-Batch-Biotransformation von Limonen mit *P. putida* insgesamt 87 mM Perillasäure (14,5 g/L) nach 6 d erzielt (Abb. 23). Ungefähr 70 % (60 mM, 10 g/L) davon wurden am Ionenaustauscher gebunden, der vollständig gesättigt war und konnten anschließend eluiert werden. Die restlichen 30 % Perillasäure (27 mM, 4,5 g/L) fanden sich folglich im Kulturmedium.

### Fazit:

Unter Einsatz des Ionenaustauschers zur *in situ* Produktabtrennung konnte die Perillasäureendkonzentration um über 24 % im Gegensatz zum konventionellen Fed-Batch-Verfahren (von 11 g/L auf 14,5 g/L) erhöht werden.

Mit dem IA-ISPR Prinzip ist jedoch eine weitere deutliche Steigerung der Endkonzentration zu erwarten, da die Limitierungen in den hier durchgeführten Fed-batch-Versuchen erkannt wurden. Hierzu zählt in erster Linie die zu geringe IA-Menge, so dass im Medium inhibierende Perillasäure-Konzentrationen auftraten

sowie die unzureichende Limonen- und Nährstoffversorgung nach dem dritten Tag (siehe Diskussion und Ausblick).

### **4.5.3 ISPR durch Präzipitation**

Im niedrigeren pH-Bereich tendiert die Perillasäure zum Präzipitieren (vgl. Abb. 13), weil mit absteigendem pH ein immer größerer Anteil undissoziiert vorliegt (bei pH 6,0 sind 8,1%, bei pH 5,0 schon 46,6% undissoziiert, siehe Abb. 12). Hier bietet sich deshalb prinzipiell eine elegante *in situ* Produktabtrennung ohne weitere technische Maßnahmen durch Präzipitation an. Allerdings ist ein Kompromiss zu finden zwischen steigender Präzipitationsneigung und abnehmender Zellaktivität bei pH-Werten < 6. Zur Untersuchung der ISPR durch Präzipitation wurde eine Fed-Batch-Biotransformation mit einem Start pH-Wert von 6,5 durchgeführt, da dieser pH-Wert ein noch ausreichendes Wachstum von *P. putida* DSM 12264 zulässt. Nach vier Tagen wurde der pH-Wert von 6,5 auf 6,0 abgesenkt. Der parallele Anstieg des pO<sub>2</sub> auf 100% verdeutlichte klar den vitalitätshemmenden Effekt dieser Maßnahme. So bleibt festzuhalten, dass die Präzipitation für den ausgewählten Produktionsstamm keine geeignete ISPR-Methode darstellt.

### **4.6 Downstream-Processing**

Im Verlauf des Projekts wurden verschiedene Verfahren zur *in situ* Produktabtrennung in Erwägung gezogen (vgl. 4.5.1-4.5.3). Unabhängig von der ISPR-Technik wurde schon frühzeitig mit den Arbeiten zur Aufreinigung des Produktes im Rahmen des Downstream-Processing begonnen.

Alle nachfolgend dargestellten Untersuchungen wurden mit Biotransformationsansätzen durchgeführt, in denen über einen Zeitraum von 5 Tagen im Fed-batch-Verfahren (Feed: *R*-Limonen, Glycerol und Ammoniumsulfat) ca. 10 g/L *R*-Perillasäure gebildet wurden. Die Etablierung des Downstream-Processings erfolgte ausgehend von 100 Liter Biotransformationsansätzen.

Im Rahmen der Biotransformations-Versuche mit wachsenden Zellen stellte sich der Zusatz eines geeigneten Antischaummittels als unverzichtbar heraus. In vergleichenden Fermenteransätzen erwiesen sich mehrere getestete Antischaummittel als ungeeignet, da sie entweder die Schaumbildung auch bei Einsatzkonzentrationen > 0,1% nicht reduzieren konnten oder zu einer schnellen Verblockung von Tiefenfiltern bei der anschließenden Zellabtrennung führten. Folgende Antischaummittel wurden getestet:

Struktol J 650 (Polyalkohol-basiert); Struktol J 673 (alkoxylierte Fettsäureester), Struktol SB 2121 (Polyalkylenglykole), Struktol SB 2289 (Alkylenoxid-Anlagerungsprodukt) und Struktol SB 2068 (Fettsäure-Anlagerungsprodukte). Antischaummittel auf Silikonbasis wurden nicht näher untersucht, da im Vorfeld Filter-Verblockungen festgestellt wurden.

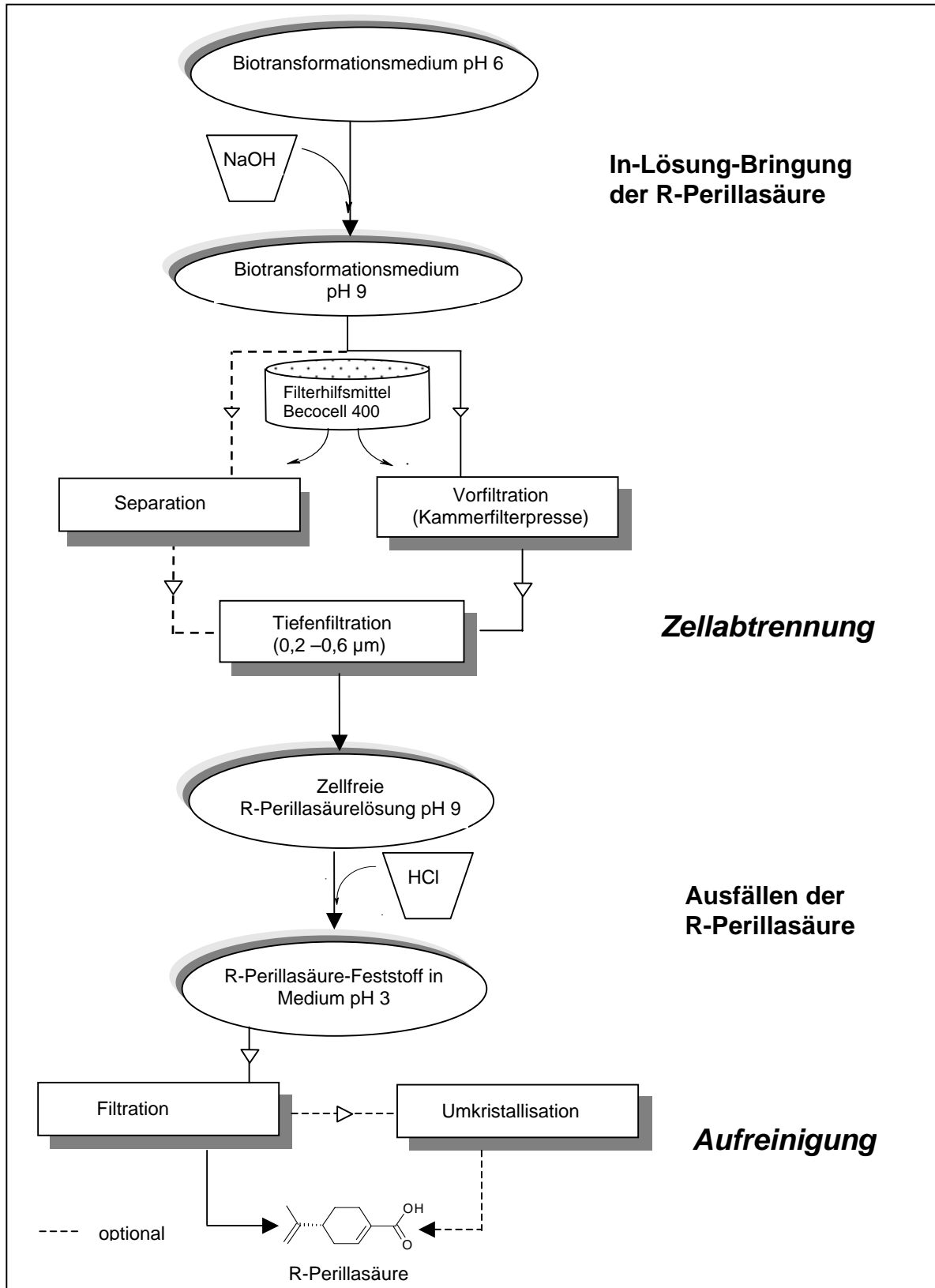
Die Resultate illustrieren deutlich die Notwendigkeit einer kritischen Auswahl des einzusetzenden Antischaummittels. Das Struktol SB 2121 vermochte zwar bei einer Einsatzkonzentration von 0,5% die Schaumbildung zufriedenstellend zu reduzieren, jedoch führte die Anwesenheit signifikanter Mengen hydrophober Antischaummittel zu einer problematischen Verblockung der Filter bei der Zellabtrennung. Das Struktol SB 2068 erwies sich als einziges der o.g. Mittel geeignet, bei < 0,05% die Schaumbildung zu inhibieren und wird aktuell als Antischaummittel eingesetzt.

Unter Berücksichtigung der technischen Umsetzbarkeit wurden im Rahmen des Projekts zwei Verfahren zur Darstellung hochreiner *R*-Perillasäure aus Biotransformationsansätzen etabliert.

#### **4.6.1 Variante 1: Alkalische Aufarbeitung**

##### **4.6.1.1. Arbeitsschritte des Downstream Processings Variante 1**

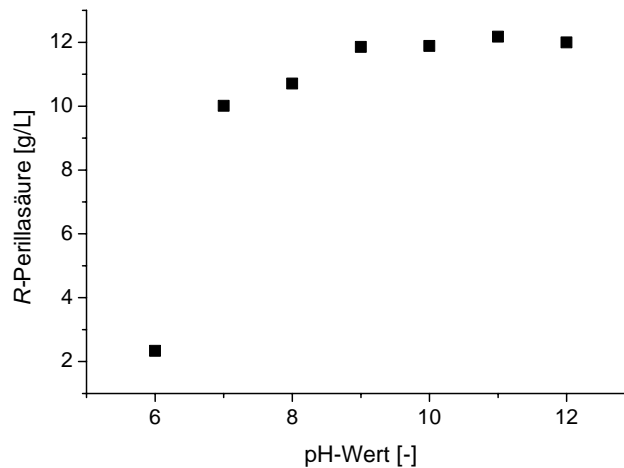
In Abb. 24 sind die aufeinanderfolgenden Schritte des im Rahmen des Projektes etablierten Downstreaming-Prozesses schematisch dargestellt.



**Abb. 24:** Downstream-Processing Variante 1: Alkalische Aufarbeitung, Zellabtrennung, Ausfällung, Filtration und Trocknung

#### 4.6.1.2. Vollständiges Lösen der *R*-Perillasäure

Die erste Aufarbeitungsstrategie nutzt die strukturellen Eigenschaften der *R*-Perillasäure. Gem. Abb. 25 kann das Produkt (hier 12 g/L) zunächst im finalen Biotransformationsansatz vor der Zellabtrennung durch Alkalisierung auf pH 9 vollständig in Lösung gebracht werden. Die Abbildung veranschaulicht auch die bereits bei pH 6 deutlich reduzierte Löslichkeit der *R*-Perillasäure.



**Abb. 25:** Löslichkeit von *R*-Perillasäure (12g/L wurden eingesetzt) in einem Biotransformationsansatz in Abhängigkeit vom pH-Wert.

#### 4.6.1.3. Zellabtrennung

Infolge der Emulsionsbildung während der Biotransformation erwies sich die vollständige Abtrennung der Zellen als Herausforderung. Durch Zugabe eines auf Cellulosefasern basierenden Filterhilfsmittels (Becocell 400) konnte prinzipiell sowohl eine Filtration durch Filtertücher als auch alternativ eine Separation im Separator ermöglicht werden. Aufgrund der zu erwartenden Verluste an *R*-Perillasäure-haltigem Medium bei einer Separation wird im Rahmen des Up-scalings voraussichtlich eine Vorfiltration über Filtertücher in einer Kammerfilterpresse favorisiert. Das Filtrat kann anschließend problemlos durch eine Tiefenfiltration (Rückhalterate 0,1 – 0,4 µm) von verbliebenen Zellen befreit werden.

In einem ersten Up-Scaling stellte sich eine Filtration in der Kammerfilterpresse als sehr zeitaufwendig heraus. Trotz des Zusatzes von Filterhilfsmittel Becocell erschwerte eine Verblockung der Filtertücher die Filtration. Die notwendige Alkalisierung des Biotransformationsmediums führt voraussichtlich zu einer teilweisen Lyse der Zellen sowie zur Verseifung von Membranlipiden, wodurch in Konsequenz die Zellabtrennung deutlich erschwert wird. Daher wurde zur Abtrennung der Zellen eine Separation (im Westfalia-Separator) mit



nachgeschalteter Tiefenfiltration durchgeführt. Die Ausbeute an *R*-Perillasäurehaltigem, zellfreien Überstand betrug hierbei 86 % (siehe auch Tab. 6).

#### 4.6.1.4. Ausfällen der *R*-Perillasäure und Aufreinigung

Aus der nun vorliegenden klaren Lösung (pH 9) wird die *R*-Perillasäure durch Zugabe von HCl nahezu quantitativ ausgefällt. Nach sich anschließender Filtration erhält man das Produkt als separierten Feststoff, welcher bereits in einer Reinheit von etwa 90% pulverförmig vorliegt. Das Ausfällen durch Ansäuerung ist somit eine geeignete Methode, das Produkt selektiv vom Großteil der Medienkomponenten abzutrennen. Dies ist der entscheidende Vorteil gegenüber extraktiven Verfahren, bei dem sich Produkt und Medienkomponenten oftmals gleichermaßen im Extraktionsmittel anreichern. Für eine ausreichende Produktreinheit hat sich die zügige Zellabtrennung am Ende der Biotransformation als maßgeblich herausgestellt, da hierdurch die Freisetzung von weiteren Zellinhaltsstoffen und infolgedessen eine zusätzliche Verunreinigung der *R*-Perillasäure vermieden werden kann. Zur Darstellung einer kristallinen *R*-Perillasäure mit einer Reinheit von > 98% kann das Produkt durch Umkristallisation aus Wasser/Ethanol als Solvensgemisch weiter aufgereinigt werden.

#### 4.6.1.5. Arbeitsschritte des Downstream Processings Variante 1

Tab. 6 illustriert die Produktverluste im Rahmen der durchzuführenden Verfahrensschritte.

**Tab. 6:** Einzelschritte des Downstream-Processing mit Angabe über Verlust/Ausbeute in [%].

<i>Downstream-Prozessschritt</i>	Verlust [%]	Ausbeute [%]
1. Alkalisieren des Biotransformationsansatzes auf pH 9 zur vollständigen In-Lösung-Bringung der <i>R</i> -Perillasäure	-	100
2. Zugabe von Filterhilfsmittel Becocell 400 (0,5%) Separation der Zellen	12	88
3. Sterilfiltration über Tiefenfilter	2	86
4. Ausfällen der <i>R</i> -Perillasäure	2	84
5. Filtration und Trocknung des Produktes (Reinheit > 90%)	2	82
6. ggf. Umkristallisierung in Ethanol/Wasser (nach Reinheitskontrolle: HPLC, DC, olfaktorisch)	10	72

Dieser Weg der Produktisolierung stellt prinzipiell eine einfache, kostengünstige und zugleich umweltschonende Alternative zu anderen, beispielsweise extraktiven Verfahren dar und kann auch im großtechnischen Maßstab realisiert werden.

Als Nachteil erwiesen sich im Zuge des Up-Scalings insbesondere die signifikanten Verluste bei der Zellseparation und anschließenden Tiefenfiltration.

Vor dem Hintergrund dieser aus wirtschaftlicher Sicht problematischen Verluste wurde ein alternatives Verfahren zur Darstellung der *R*-Perillasäure aus Biotransformationsansätzen etabliert.

## **4.6.2 Variante 2: Saure Fällung der *R*-Perillasäure**

### **4.6.2.1. Vollständiges Ausfällen der *R*-Perillasäure**

Während im vorherig dargestellten Aufarbeitsverfahren durch eine Alkalisierung auf pH 9 das Produkt vollständig in Lösung gebracht werden soll, erfolgt bei der zweiten Verfahrensvariante durch eine Ansäuerung des Mediums die Ausfällung der undissoziierten *R*-Perillasäure. Im Rahmen eines Up-Scalings wurde Salzsäure durch Schwefelsäure als Agenz zur Ansäuerung ersetzt, um Korrosionen an Metallteilen zu minimieren. In Folge einer Co-Fällung der *R*-Perillasäure und der *Pseudomonas*-Zellmasse führte die Ansäuerung zur Bildung sedimentierender und gut zu filtrierender Präzipitate.

### **4.6.2.2. Filtration der *R*-Perillasäure und Trocknung**

Insbesondere in diesem kritischen Verfahrensschritt erwies sich diese Variante des Downstream-Processings als vorteilhaft gegenüber der ersten. Das sauer gefällte Präzipitat aus Zellen und *R*-Perillasäure konnte erfolgreich auf Filtertüchern in einer Kammerfilterpresse abgeschieden werden. Eingesetzt wurden hierbei Filtertücher mit einer Porenweite von etwa 100 µm. Alternativ bot sich eine druckarme Beutelfiltration an. Ein Zusatz von Filterhilfsmitteln war nicht erforderlich.

Vor der ethanolischen Elution der *R*-Perillasäure aus dem Präzipitat war es notwendig, das Präzipitat zu trocknen. Die Verwendung einer Kammerfilterpresse erwies sich hierbei als besonders vorteilhaft, da im Anschluss an die Abscheidung des *R*-Perillasäure-/Zell-Präzipitats auf Filtertüchern dieses direkt im Luftstrom getrocknet werden konnte.

Aus einem 100 Liter-Biotransformationsansatz wurde ein Präzipitat von 5 kg auf Filtertüchern abgeschieden. Das Präzipitat bestand aus *R*-Perillasäure (etwa 950 g) und Zellpellet.

#### **4.6.2.3. Lösen der *R*-Perillasäure in Ethanol**

Nach der Trocknung des *R*-Perillasäure-/Zell-Pellets wurde dieses in wasserfreien Ethanol überführt. Hinsichtlich des benötigten Ethanol-Volumens galt es, einerseits die *R*-Perillasäure im Ethanol vollständig zu lösen, andererseits das Volumen vor der anschließenden Ausfällung durch Wasserzugabe möglichst gering zu bemessen, um Verluste im Zuge nicht quantitativer Fällung zu verhindern. Das 5 kg-Präzipitat wurde in 20 Litern Ethanol suspendiert, wobei die *R*-Perillasäure nahezu quantitativ in Lösung ging.

#### **4.6.2.4. Sterilfiltration**

Die ethanolische Suspension wurde durch eine Tiefenfiltration von den Zellen befreit. Auch dieser Filtrationsschritt konnte ohne Verwendung von Filterhilfsmitteln durchgeführt werden.

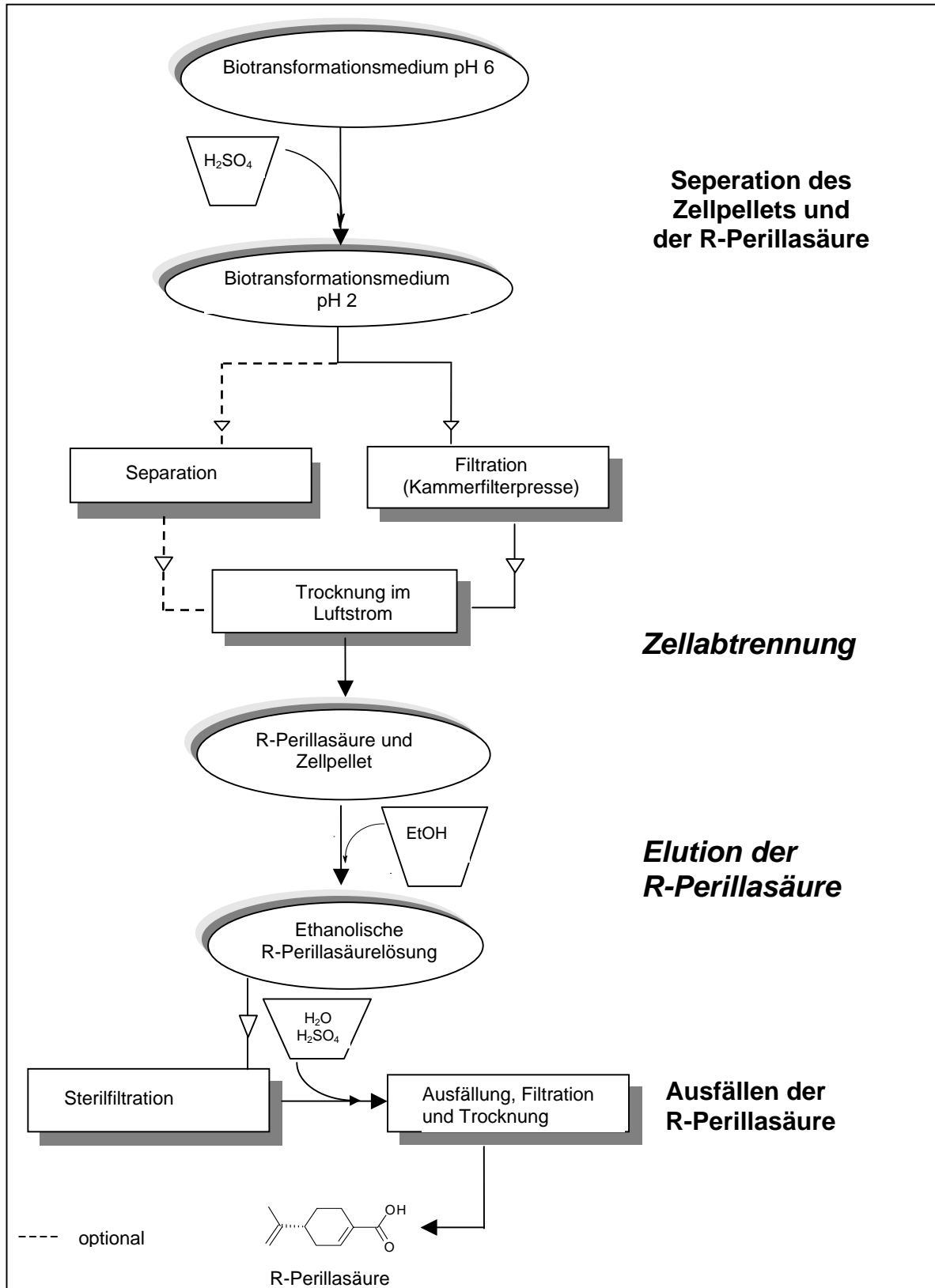
#### **4.6.2.5. Ausfällen der *R*-Perillasäure, Filtration und Trocknung**

Aus der sterilfiltrierten, ethanolischen Lösung wurde anschliessend durch Zugabe von Wasser *R*-Perillasäure gefällt. Um eine nahezu quantitative Fällung der *R*-Perillasäure zu gewährleisten, wurde die ethanolische Lösung mit dem 5-fachen Wasservolumen versetzt. Auf diesem Weg konnten 95% der *R*-Perillasäure ausgefällt werden. Die ausgefällte *R*-Perillasäure wurde auf Filtertüchern (Porenweite ca. 10 µm) in einer Kammerfilterpresse abgeschieden und im Luftstrom getrocknet.

Erfreulicherweise wies die auf diese Weise dargestellte *R*-Perillasäure eine Reinheit von > 95% auf. Das Produkt erfüllt somit die Ansprüche an einen hochreinen, natürlichen antimikrobiellen Wirkstoff zur Verwendung sowohl in kosmetischen leave-on und rinse-off-Produkten als auch in zu konservierenden Pharmazeutika.

#### **4.6.2.4. Arbeitsschritte des Downstream Processings Variante 2**

In Abb. 26 sind die aufeinanderfolgenden Schritte des im Rahmen des Projektes etablierten Downstreaming-Prozesses schematisch dargestellt.



**Abb. 26:** Downstream-Processing Variante 2: Saure Fällung der R-Perillasäure, Zellabtrennung, Ethanol-Elution und Ausfällen.

Tab. 7 illustriert die im Rahmen der einzelnen Verfahrensschritte auftretenden Produktverluste.

**Tab. 7:** Einzelschritte des Downstream-Processing mit Angabe über Verlust/Ausbeute in [%].

<i>Downstream-Prozessschritt</i>	Verlust [%]	Ausbeute [%]
1. Ansäuern des Biotransformationsansatzes auf pH 2 zur vollständigen Ausfällung der <i>R</i> -Perillasäure	-	100
2. Filtration der Zellen und der ausgefällten <i>R</i> -Perillasäure, Trocknung	5	95
3. Lösen der <i>R</i> -Perillasäure in Ethanol	3	92
4. Zellabtrennung durch Sterilfiltration	2	90
5. Ausfällen der <i>R</i> -Perillasäure	5	85
6. Filtration und Trocknung der <i>R</i> -Perillasäure (Reinheit > 95%)	2	83

Das Verfahren zur Darstellung hochreiner *R*-Perillasäure aus Biotransformationsansätzen zeichnet sich durch folgende Vorteile aus:

- im Kontrast zu Zwei-Phasen-Biotransformationen mit *In situ Produktabtrennung* wird bei dem dargestellten Verfahren der Einsatz ökologisch bedenklicher Lösungsmittel vermieden; benötigt werden lediglich Schwefelsäure und Ethanol;
- die Anforderungen an die apparative Ausstattung beschränken sich, abgesehen von ausreichend grossen Behältern, auf eine Kammerfilterpresse, bestückt mit Filtertüchern, sowie Pumpen und einen Kompressor zum Trocknen im Luftstrom;
- die Verfahrensschritte sind problemlos up-scalebar; angestrebte Produktions-Batches sind, bezogen auf das Biotransformationsvolumen, 500 Liter und 8.000 Liter;
- durch das Ausnutzen struktureller Eigenschaften der *R*-Perillasäure (Löslichkeit der dissoziierten und undissoziierten Form) zeichnet sich das Verfahren durch hohe Selektivität hinsichtlich der Produktisolierung aus;
- folglich führt das Verfahren zu hochreiner *R*-Perillasäure (Reinheit > 95%), welche in vielfältigen kosmetischen, pharmazeutischen oder technischen Zubereitungen eingesetzt werden kann;

### 4.6.3 Auswirkung der IA-ISPR auf das Downstream-Processing

Die Durchführung eines Downstream-Processing wird durch Einsatz des Ionenaustauschers zur *in situ* Produktabtrennung deutlich erleichtert, da die Perillasäure auf dem Harz gebunden und direkt aus dem Kultivierungsmedium abgetrennt werden kann. Die Prozessschritte zur Rückgewinnung von Perillasäure reduzieren sich auf eine ethanolische Destillation des Eluenten zur Produktausfällung mit anschließender Produktseparation durch Filtration. Dieser Weg der Produktisolierung mit Ionenaustauscher wird ein hochreines Produkt abliefern (voraussichtlich > 95 %) und die Gesamtausbeuteverluste weiter verringern (voraussichtlich ca. 98 % Rückgewinnung). Aus diesem Grund werden sich die Downstream-Processing-Kosten sowie die damit verbundenen Stoff- und Energieströme bei Einsatz des IA-ISPR Prinzips noch weiter reduzieren lassen (zudem können der Elutionsmittel recycelt und der Ionenaustauscher nach Regenerierung viele Male wiederverwendet werden).

## 5 Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

### 5.1 Vorteile gegenüber herkömmlichen Syntheseverfahren

Die Bereitstellung von *R*-(+)-Perillasäure durch Extraktion aus natürlichen Quellen scheidet aufgrund zu niedriger Konzentrationen (< 1%) genauso aus wie die der direkten Vorstufen *R*-(+)-Perillaaldehyd und *R*-(+)-Perillaalkohol.

Deshalb hat sich die hier angestrebte biotechnologische Synthese von *R*-(+)-Perillasäure allein mit der chemischen Synthese zu messen.

Die chemische Synthese von Terpenoxidationsprodukten verläuft unter Einsatz umwelt- und personengefährdender Einsatzstoffe und Katalysatoren, wie z.B. Chlorit oder dem cancerogenen CrO<sub>3</sub>. Aufgrund der geringen Spezifität chemischer Oxidationsprozesse werden zudem häufig (halogenierte) Nebenprodukte gebildet.

Im Vergleich hierzu birgt der biotechnologische Ansatz einer regioselektiven Oxidation der strukturellen Ausgangsverbindung, des Monoterpenkohlenwasserstoffs *R*-(+)-Limonen, unter Einsatz ganzer Zellen, folgende Vorteile:

- *R*-(+)-Limonen ist in Mengen von ca. 75.000 t/a weltweit verfügbar und stellt eine extrem günstige (US\$ 1-2/kg), natürliche, chirale Ausgangsverbindung dar.

- Im Gegensatz zur chemischen Oxidation ist mit dem geplanten Verfahren ein umweltgerechter, nachhaltiger Bioprozess unter milden, Edukt- und Produktschonenden Reaktionsbedingungen möglich.
- Beim vorgesehenen Prozess entsteht die *R-(+)*-Perillasäure als Hauptprodukt ohne signifikante Nebenproduktbildung.
- Dank der biotechnologischen Gewinnung bleibt der natürliche Charakter (Kennzeichnung „natürlich“) erhalten.

## 5.2 Marktpotenzial der Perillasäure

Die zur Zeit als Konservierungsmittel eingesetzten Verbindungen weisen zahlreiche Applikationsnachteile auf. Die toxische, hautreizende und sensibilisierende Wirkung von Formaldehydabspaltern, Halogenverbindungen, Parabenen oder Isothiazinonen ist hinlänglich bekannt. Allen aktuell im Einsatz befindlichen Verbindungen ist ein auf bestimmte Mikroorganismen eingeschränktes Wirkspektrum gemein. Der deutlich zunehmende Bedarf für natürliche, antimikrobiell wirksame Verbindungen leitet sich zum einen aus dem weltweiten Trend des freiwilligen Verzichts auf chemische Konservierungsmittel ab, zum anderen resultiert er aber auch aus der durch Umwelt- und Gesundheits-relevante Richtlinien und Verkehrsrechte forcierten Notwendigkeit. Ausdrücklich muss betont werden, dass natürliche Wirkstoffe mit einem breiten antimikrobiellen Spektrum zur Zeit am Markt nicht verfügbar sind.

Die im Rahmen des vorliegenden Projekts darzustellende *R*-Perillasäure bietet sich aufgrund folgender Aspekte für eine breite Anwendung als neuer antimikrobieller Wirkstoff an:

1. Die biotechnologisch synthetisierte Verbindung kann als natürlicher Duftstoff mit antimikrobieller Wirkung eingesetzt werden.
2. *R*-Perillasäure weist ein breites antimikrobielles Wirkspektrum gegen gram-negative und –positive Bakterien, Hefen und Schimmelpilze auf.
3. Bereits bei einer vergleichsweise sehr niedrigen Dosierung von 0,1% können gram-positive Bakterien, Hefen und Schimmelpilze ausreichend inhibiert werden.
4. Im Verlauf des Projekts konnte gezeigt werden, dass *R*-Perillasäure in zahlreichen kosmetischen Formulierungen unterschiedlicher Zusammensetzung wirksam ist.
5. Perillasäure ist toxikologisch gut charakterisiert und bereits EINECS-gelistet (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances). Somit gehört

Perillasäure zu den Verbindungen, die im europäischen Wirtschaftsraum bereits in den Verkehr gebracht wurden. Eine kosten- und zeitintensive Anmeldung vor In-Verkehr-Bringung entfällt. Trotz dieser vorteilhaften Ausgangssituation existiert aktuell keine Quelle für natürliche Perillasäure, so dass im Projektanschluss die Dr. Riexs Healthcare GmbH als Alleinanbieter auftreten kann.

6. Dank des gewählten Syntheseprozesses und des neu entwickelten Verfahrens zur Aufarbeitung kann die Perillasäure in einer hohen Reinheit (> 98%) angeboten werden. In Abhängigkeit von den zu konservierenden Formulierungen werden voraussichtlich 2 unterschiedliche Reinheiten angeboten. Für sogenannte rinse-off-Produkte (Shampoo, Duschbäder o.ä.), welche nur wenige Sekunden auf der Haut appliziert werden, wird *R*-Perillasäure in einer Reinheit > 95% bereitgestellt, wobei die Abwesenheit potenziell allergener Verunreinigungen an Limonen, Perillaalkohol und Perillaaldehyd gewährleistet sein muss. Zur Konservierung von leave-on-Produkten (Lotionen, Cremes, Tinkturen) wird umkristallisierte *R*-Perillasäure in einer Reinheit > 98% angeboten.
7. *R*-Perillasäure erwies sich in ersten Untersuchungen bei Dosierungen zwischen 0,1 und 0,3% als hochwirksame antimikrobielle Verbindung gegen *Corynebacterium xerosis* (Schweiß-zersetzendes Bakterium) und *Malassezia furfur* (Schuppen-Erreger). Das potenzielle Applikationsspektrum umfasst daher neben der Konservierung kosmetischer und pharmazeutischer Zubereitungen auch die Verwendung als Deo- und Anti-Schuppen-Wirkstoff. Die antibakterielle Wirkung gegen den Akne-Erreger *Propionibacterium acnes* wird aktuell getestet.

Erste Muster-Chargen an *R*-Perillasäure wurden bereits sowohl Naturkosmetik-Unternehmen als auch Grossunternehmen aus der Kosmetikbranche zur Verfügung gestellt. Basierend auf vorliegenden Informationen bezüglich der für einen natürlichen antimikrobiellen Wirkstoff kalkulierbaren Kosten kann in den kommenden Monaten ein am Markt erzielbarer Preis für *R*-Perillasäure ermittelt werden. Bei einer notwendigen Dosierung von 0,2% können mit 1 kg *R*-Perillasäure 500 kg einer Formulierung konserviert werden. Für die Konservierung mittel- und hochpreisiger Natur- und Hightech-Kosmetika können gemäß vertraulicher Kundeninformationen pro 500 kg Formulierung mindestens 1.000 Euro Kosten kalkuliert werden. Natürliche antimikrobielle Wirkstoffe für Deo- und Anti-Schuppen-Präparate können zu deutlich höheren Preisen angeboten werden. Der weltweite Bedarf für natürliche Perillasäure



liegt schon in der Phase der Markteinführung voraussichtlich bei 1 bis 10 Jahrestonnen.

Vor dem Hintergrund dieser am Markt realisierbaren Preise (vorsichtiger Schätzwert 300 € für Reinheit > 90% und 600 € für > 95%) kann eine erste ökonomische Evaluierung der anvisierten Produktionsvarianten durchgeführt werden (siehe 5.4).

### 5.3 Anforderungen an den Prozess

In 5.2 wurden die sehr günstigen wirtschaftlichen Randbedingungen dargestellt, die sich aufgrund der sehr guten Produkteigenschaften für die Etablierung des angestrebten Bioprozesses ergeben. Der Gesamtprozess, unterteilt in Upstreaming, Downstreaming und den eigentlichen Bioprozess selbst, muss natürlich ebenfalls hohen ökonomischen und ökologischen Anforderungen genügen, damit es zu einem erfolgreichen Transfer in die industrielle Praxis nach Ende des Projekts kommt.

- Upstreaming: Es werden sowohl mit Glycerol/Glucose als auch dem direkten Precursor Limonen kostengünstige nachwachsende Rohstoffe eingesetzt. Limonen stellt ein natürliches Abfallprodukt der citrusverarbeitenden Industrie dar.
- Downstreaming: Es konnte ein ökologisch und ökonomisch attraktiver Prozess zur Aufarbeitung der *R*-Perillasäure entwickelt werden (4.6.). Mit der *in situ* Produktabtrennung über Ionenaustauscher eröffnet sich eine nochmalige Verbesserung der ökonomischen (und ökologischen) Bilanz, sobald dieser integrierte Bioprozess unter Optimalbedingungen im Technikumsmaßstab (Transferphase beim Industriepartner) valide Daten zur Bewertung liefert.
- Aus ökonomischer, aber auch ökologischer Sicht konnte der Bioprozess im letzten Projekthalbjahr weiter optimiert werden, da die Raum-Zeit-Ausbeute des Fed-batch Prozesses und die Endkonzentration noch einmal deutlich verbessert wurden (4.5.2.8).

Hinsichtlich des Downstream-Processing wurden im Verlauf des Projekts mehrere Ansätze verfolgt und bewertet. Das oben illustrierte Verfahren zur Isolierung der *R*-Perillasäure aus dem Biotransformationsansatz zeichnet sich durch folgende Vorteile aus:

- die Vermeidung des Einsatzes toxischer, umweltgefährdender und ggf. die Verwendung von Ex-Schutz-Anlagen erfordernder Lösungsmittel;
- die Verwendung ökologisch verträglicher und kostengünstiger Filterhilfs- und Fällungsmittel (Cellulose, NaOH, HCl);

- die Minimierung des apparativen Aufwands auf einen Bioreaktor, eine Kammerfilterpresse sowie Sammelbehälter und Pumpen;
- die Generierung eines hochreinen, natürlichen Produkts;
- die universelle Übertragbarkeit des Verfahrens auf wässrige, *R*-Perillasäure enthaltende Biotransformationsmedien.

#### 5.4 Gerechnete Szenarien

Ergänzend zu den voranstehenden Erkenntnissen und Informationen, die im Verlauf des Projektes gewonnen und gesammelt wurden und tendenziell qualitativer Art sind, wurden verschiedene mögliche Szenarien für einen Bioprozess zur Herstellung von Perillasäure einer ersten ökonomischen Bewertung unterzogen.

Dabei kamen Daten zum Einsatz, die von den Projektpartnern während der Projektlaufzeit gewonnen wurden bzw. von externen Partnern übermittelt wurden. Zur ökonomischen Bewertung wurde eine Systematik genutzt, die in der Software Sabento (entwickelt unter Koordination der AG Bioverfahrenstechnik der DECHEMA e.V. im Rahmen des BMBF-geförderten Projektes „Simulationsgestützte Bewertung der Nachhaltigkeit biotechnologischer Produktion“, 2002 – 2006) Einsatz findet.

Folgende Szenarien für das Layout des in diesem Projekt beschriebenen Bioprozesses wurden dabei näher betrachtet:

Szenario 1 in zwei Ausprägungen: Optimierte Fed-Batch Biotransformation mit wachsenden Zellen (Preis des Zielproduktes in einer best-case- und einer worst-case-Betrachtung)<sup>1</sup>.

Szenario 2 in zwei Ausprägungen: Biotransformation mit ruhenden Zellen und kontinuierlicher Cofaktor-Regenerierung (Preis des Zielproduktes in einer best-case- und einer worst-case-Betrachtung).

Szenario 3 in zwei Ausprägungen: Optimierte Fed-batch Biotransformation mit wachsenden Zellen und *in situ* Produktabtrennung durch Ionenaustauscher (Preis des Zielproduktes in einer best-case- und einer worst-case-Betrachtung).

---

<sup>1</sup> Für den Preis des Zielproduktes liegen beim Projektpartner Dr. Riex Healthcare GmbH, Uetersen, Informationen vor, die den Preis je Kilogramm Produkt im besten Falle mit 600 Euro/kg, im schlechtesten Fall mit 300 Euro/kg beschreiben.

Beim Industriepartner kann auf vorhandene Anlagen zurückgegriffen werden, es sind deshalb keine Investitionen erforderlich. Alternative Szenarien, bei denen zusätzliche Investitionskosten anfallen, finden sich im Anhang des Abschlussberichts.

## Szenario 1 A

**Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Fed-batch, wachsende Zellen,  
konventionell / Preis 600 €/kg**

### Kostenrechnung

<b>Variable Kosten:</b>	17386,22 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	720000,00 Euro
<b>Deckungsbeitrag:</b>	702613,78 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	40624,00 Euro
<b>Gewinn:</b>	661989,78 Euro
<b>Umsatzrendite:</b>	0,92
<b>Return on Investment:</b>	██████████
<b>Amortisationszeit: (statisch)</b>	██████████ Jahre

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ 1A1

### Kostenrechnung

<b>Produkte:</b>	720000 Euro
<b>Nebenprodukte:</b>	0 Euro
<b>Koppelprodukte:</b>	0 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	720000 Euro

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ 1A1

## Kostenrechnung

Materialkosten:	16355,78 Euro
Energiekosten:	733,44 Euro
Entsorgungskosten:	297,00 Euro
Betriebsstoffkosten:	0,00 Euro
SEK Fertigung/Vertrieb:	0,00 Euro
<b>Variable Kosten:</b>	<b>17386,22 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ1A1

## Kostenrechnung

Investitionsabhängige Kosten:	0,00 Euro
Abschreibung/Finanzierung:	0,00 Euro
Reparatur/Wartung:	0,00 Euro
Fabrikationsgemeinkosten:	0,00 Euro
Personalkosten:	25390,00 Euro
Verwaltungs-/Vertriebs-GK:	15234,00 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	<b>40624,00 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ 1A1

Folgende Annahmen liegen diesem Szenario zugrunde<sup>2</sup>:

- Konventioneller Prozess (optimierte Fed-batch Kultivierung)

<sup>2</sup> Für beide Ausprägungsformen dieses Szenarios gilt, dass Investitionen in die für den Bioprozess notwendigen Anlagen nicht berücksichtigt wurden. Lt. Angaben des Industriepartners sind diese Anlagen bei potentiellen Kooperationspartnern vorhanden.  
Eine vergleichbare Berechnung der Kenngrößen für dieses Szenario unter Einbezug von Investitionen findet sich im Anhang 1 dieses Berichtes.

- Betriebstage p.a.: 50
- Jahresproduktion: 1.200 kg
- Investitionen nicht erforderlich, alle Anlagen vorhanden und bereits vollständig abgeschrieben
- Preis Produkt maximal: 600 Euro
- Kosten für Materialien und Wasser sowie Energie einbezogen (Kühlwasser nicht berücksichtigt)
- Kosten für Filterhilfsstoffe nicht berücksichtigt
- Personalkosten (1 Laborant plus 1 leitender Angestellter plus ein Hilfskraft (Laborant und Hilfskraft anteilig 3 Monate [50 Tage], leitender Angestellter 1 Monat)

Für das Produkt zu einem Preis von ca. 600 Euro/kg wird von einer signifikant höheren Reinheit dieses Produktes ausgegangen. Es wird hier eine Reinheit von größer/gleich 95 % angenommen.

Für das Produkt zu einem Preis von ca. 300 Euro/kg wird von einer geringeren Reinheit dieses Produktes ausgegangen. Es wird hier eine Reinheit von größer/gleich 90 % angenommen.

Für das hochreine Produkt sind die Kosten für das Downstream-Processing (DSP) höher als für DSP von Produkten niedrigerer Reinheit.

Für das DSP hochreiner Produkte (>95 %, 600 €/kg) werden Kosten in Höhe von 50 Prozent aller anderen anfallenden Kosten angerechnet. Damit ergibt sich für dieses Szenario folgende Kalkulation:

Umsatzerlöse:	720.000,00	Euro p.a.
Kosten inkl. DSP:	87.015,33	Euro p.a.
Gewinn:	632.984,67	Euro p.a.

## Szenario 1B

**Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Fed-batch, wachsende Zellen,  
konventionell / Preis 300 €/kg**

### Kostenrechnung

<b>Variable Kosten:</b>	17386,22 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	360000,00 Euro
<b>Deckungsbeitrag:</b>	342613,78 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	40624,00 Euro
<b>Gewinn:</b>	301989,78 Euro
<b>Umsatzrendite:</b>	0,84
<b>Return on Investment:</b>	██████████
<b>Amortisationszeit: (statisch)</b>	██████████ Jahre

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ 1A2

### Kostenrechnung

<b>Produkte:</b>	360000 Euro
<b>Nebenprodukte:</b>	0 Euro
<b>Koppelprodukte:</b>	0 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	360000 Euro

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ 1A2

## Kostenrechnung

Materialkosten:	16355,78 Euro
Energiekosten:	733,44 Euro
Entsorgungskosten:	297,00 Euro
Betriebsstoffkosten:	0,00 Euro
SEK Fertigung/Vertrieb:	0,00 Euro
<b>Variable Kosten:</b>	<b>17386,22 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ1A2

## Kostenrechnung

Investitionsabhängige Kosten:	0,00 Euro
Abschreibung/Finanzierung:	0,00 Euro
Reparatur/Wartung:	0,00 Euro
Fabrikationsgemeinkosten:	0,00 Euro
Personalkosten:	25390,00 Euro
Verwaltungs-/Vertriebs-GK:	15234,00 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	<b>40624,00 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ 1A2

Folgende Annahmen liegen diesem Szenario zugrunde:

- Konventioneller Prozess (optimierte Fed-batch Kultivierung)
- Betriebstage p.a.: 50
- Jahresproduktion: 1.200 kg
- Investitionen nicht erforderlich, alle Anlagen vorhanden und bereits vollständig abgeschrieben



- Preis Produkt minimal: 300 Euro
- Kosten für Materialien und Wasser sowie Energie einbezogen (Kühlwasser nicht berücksichtigt)
- Kosten für Filterhilfsstoffe nicht berücksichtigt
- Personalkosten (1 Laborant plus 1 leitender Angestellter plus ein Hilfskraft (Laborant und Hilfskraft anteilig 3 Monate [50 Tage], leitender Angestellter 1 Monat)

Für das DSP von Produkten geringerer Reinheit (>90 %, 300 €/kg) werden Kosten in Höhe von 35 Prozent aller anderen anfallenden Kosten angerechnet. Damit ergibt sich für dieses Szenario folgende Kalkulation:

Umsatzerlöse:	360.000,00	Euro p.a.
Kosten inkl. DSP:	87.015,33	Euro p.a.
Gewinn:	272.984,67	Euro p.a.

#### **Fazit Szenario 1 (optimierte Fed-batch Kultivierung):**

Es kann festgehalten werden, dass der beschriebene Bioprozess unter den angegebenen Bedingungen wirtschaftlich betrieben werden kann. Dies gilt im Falle des Hochpreisprodukts (600 €/kg) auch, wenn Investitionen in die benötigten Anlagen getätigt werden müssen (siehe Anhang 1).

## Szenario 2A

### Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: ruhenden Zellen / Preis 600 €/kg

#### Kostenrechnung

<b>Variable Kosten:</b>	26652,45 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	678000,00 Euro
<b>Deckungsbeitrag:</b>	651347,55 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	40624,00 Euro
<b>Gewinn:</b>	610723,55 Euro
<b>Umsatzrendite:</b>	0,90
<b>Return on Investment:</b>	██████████
<b>Amortisationszeit:</b> (statisch)	██████████ Jahre

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A1

#### Kostenrechnung

<b>Produkte:</b>	678000 Euro
<b>Nebenprodukte:</b>	0 Euro
<b>Koppelprodukte:</b>	0 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	678000 Euro

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A1

## Kostenrechnung

Materialkosten:	26093,85 Euro
Energiekosten:	45,28 Euro
Entsorgungskosten:	513,33 Euro
Betriebsstoffkosten:	0,00 Euro
SEK Fertigung/Vertrieb:	0,00 Euro
<b>Variable Kosten:</b>	<b>26652,45 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A1

## Kostenrechnung

Investitionsabhängige Kosten:	0 Euro
Abschreibung/Finanzierung:	0 Euro
Reparatur/Wartung:	0 Euro
Fabrikationsgemeinkosten:	0 Euro
Personalkosten:	25390 Euro
Verwaltungs-/Vertriebs-GK:	15234 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	<b>40624 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A1

Folgende Annahmen liegen diesem Szenario zugrunde<sup>3</sup>:

- Prozess mit ruhenden Zellen, d.h. zuvor einmalige Anzucht der Biomasse in einer Hochzelldichte-Fermentation. Die Biomasse wird geerntet und

<sup>3</sup> Für beide Ausprägungsformen dieses Szenarios gilt, dass Investitionen in die für den Bioprozess notwendigen Anlagen nicht berücksichtigt wurden. Lt. Angaben des Industriepartners sind diese Anlagen bei potentiellen Kooperationspartnern vorhanden. Eine vergleichbare Berechnung der Kenngrößen für dieses Szenario unter Einbezug von Investitionen findet sich im Anhang 2 dieses Berichtes.

entsprechende Aliquote bis zum Einsatz als ruhende Zellen in den einzelnen Biotransformationen gefroren gelagert.

- Betriebstage p.a.: 50
- Jahresproduktion: 1130 kg
- Investitionen nicht erforderlich alle Anlagen vorhanden und bereits vollständig abgeschrieben
- Preis Produkt maximal: 600 Euro
- Kosten für Materialien und Wasser sowie Energie einbezogen (Kühlwasser nicht berücksichtigt , Energieverbrauch geschätzt)
- Personalkosten (1 Laborant plus 1 leitender Angestellter plus ein Hilfskraft (Laborant und Hilfskraft anteilig 3 Monate [50 Tage], leitender Angestellter 1 Monat)

Auch hier wird für das Produkt zu einem Preis von ca. 600 Euro/kg von einer signifikant höheren Reinheit dieses Produktes ausgegangen. Es wird hier eine Reinheit von größer/gleich 95 % angenommen.

Für das Produkt zu einem Preis von ca. 300 Euro/kg wird von einer geringeren Reinheit dieses Produktes ausgegangen. Es wird hier eine Reinheit von größer/gleich 90 % angenommen.

Für das hochreine Produkt sind die Kosten für das Downstream-Processing (DSP) höher als für DSP von Produkten niedrigerer Reinheit.

Für das DSP hochreiner Produkte (>95 %, 600 €/kg) werden Kosten in Höhe von 50 Prozent aller anderen anfallenden Kosten angerechnet. Damit ergibt sich für dieses Szenario folgende Kalkulation:

Umsatzerlöse:	678.000,00	Euro p.a.
Kosten inkl. DSP:	100.914,68	Euro p.a.
Gewinn:	577.085,33	Euro p.a.

## Szenario 2B

### Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: ruhenden Zellen / Preis 300 €/kg

#### Kostenrechnung

<b>Variable Kosten:</b>	26652,45 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	339000,00 Euro
<b>Deckungsbeitrag:</b>	312347,55 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	40624,00 Euro
<b>Gewinn:</b>	271723,55 Euro
<b>Umsatzrendite:</b>	0,80
<b>Return on Investment:</b>	██████████
<b>Amortisationszeit:</b> (statisch)	██████████ Jahre

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A2

#### Kostenrechnung

<b>Produkte:</b>	339000 Euro
<b>Nebenprodukte:</b>	0 Euro
<b>Koppelprodukte:</b>	0 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	339000 Euro

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A2

## Kostenrechnung

Materialkosten:	26093,85 Euro
Energiekosten:	45,28 Euro
Entsorgungskosten:	513,33 Euro
Betriebsstoffkosten:	0,00 Euro
SEK Fertigung/Vertrieb:	0,00 Euro
<b>Variable Kosten:</b>	<b>26652,45 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A2

## Kostenrechnung

Investitionsabhängige Kosten:	0 Euro
Abschreibung/Finanzierung:	0 Euro
Reparatur/Wartung:	0 Euro
Fabrikationsgemeinkosten:	0 Euro
Personalkosten:	25390 Euro
Verwaltungs-/Vertriebs-GK:	15234 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	<b>40624 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A2

Folgende Annahmen liegen diesem Szenario zugrunde:

- Prozess mit ruhenden Zellen, d.h. zuvor einmalige Anzucht der Biomasse in einer Hochzelldichte-Fermentation. Die Biomasse wird geerntet und entsprechende Aliquote bis zum Einsatz als ruhende Zellen in den einzelnen Biotransformationen gefroren gelagert.
- Betriebstage p.a.: 50

- Jahresproduktion: 1130 kg
- Investitionen nicht erforderlich alle Anlagen vorhanden und bereits vollständig abgeschrieben
- Preis Produkt minimal: 300 Euro
- Kosten für Materialien und Wasser sowie Energie einbezogen (Kühlwasser nicht berücksichtigt , Energieverbrauch geschätzt)
- Personalkosten (1 Laborant plus 1 leitender Angestellter plus ein Hilfskraft (Laborant und Hilfskraft anteilig 3 Monate [50 Tage], leitender Angestellter 1 Monat)

Für das DSP von Produkten geringerer Reinheit (>90 %, 300 €/kg) werden Kosten in Höhe von 35 Prozent aller anderen anfallenden Kosten angerechnet. Damit ergibt sich für dieses Szenario folgende Kalkulation:

Umsatzerlöse:	339.000,00	Euro p.a.
Kosten inkl. DSP:	90.823,21	Euro p.a.
Gewinn:	248.176,79	Euro p.a.

#### **Fazit Szenario 2 (Hochzelldichte plus ruhende Zellen):**

Es kann festgehalten werden, dass der beschriebene Bioprozess unter den angegebenen Bedingungen wirtschaftlich betrieben werden kann. Dies gilt im Falle des Hochpreisprodukts (600 €/kg) auch, wenn Investitionen in die benötigten Anlagen getätigt werden müssen (siehe Anhang 2).

## Szenario 3A

**Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Fed-batch, wachsende Zellen,  
integrierter Bioprozess mit Ionentauscher zur Produktabtrennung / Preis 600  
€/kg<sup>4</sup>**

Kostenrechnung	
<b>Variable Kosten:</b>	23880,61 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	540000,00 Euro
<b>Deckungsbeitrag:</b>	516119,39 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	40624,00 Euro
<b>Gewinn:</b>	475495,39 Euro
<b>Umsatzrendite:</b>	0,88
<b>Return on Investment:</b>	██████████
<b>Amortisationszeit: (statisch)</b>	██████████ Jahre

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A1

<sup>4</sup> Für den Einsatz des Ionentauschers im Integrierten Bioprozess (IBP) wurden folgende Annahmen zugrunde gelegt:

- Der eingesetzte Ionentauscher ist regenerierbar, Ionentauscher wird in der Konzentration von 100 g/l eingesetzt,
- Die Aktivität des Ionentauschers verringert sich mit jedem Einsatz, die Verringerung der Aktivität wird durch Zugabe von Ionentauscher in Höhe von 5 % der Ausgangsmasse ausgeglichen,
- Ionentauscher wird mit Kosten von 15 Euro/kg angesetzt. Nutzung von Amberlite IRA 410 Cl: stark basischer Ionenaustauscher Typ II in Cl<sup>-</sup> Form.



## Kostenrechnung

Produkte:	540000 Euro
Nebenprodukte:	0 Euro
Koppelprodukte:	0 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	<b>540000 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A1

## Kostenrechnung

Materialkosten:	23365,39 Euro
Energiekosten:	366,72 Euro
Entsorgungskosten:	148,50 Euro
Betriebsstoffkosten:	0,00 Euro
SEK Fertigung/Vertrieb:	0,00 Euro
<b>Variable Kosten:</b>	<b>23880,61 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A1

## Kostenrechnung

Investitionsabhängige Kosten:	0,00 Euro
Abschreibung/Finanzierung:	0,00 Euro
Reparatur/Wartung:	0,00 Euro
Fabrikationsgemeinkosten:	0,00 Euro

Personalkosten: 25390,00 Euro

Verwaltungs-/Vertriebs-GK: 15234,00 Euro

**Fixe Kosten:** 40624,00 Euro

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A1

Folgende Annahmen liegen diesem Szenario zugrunde<sup>5</sup>:

- Integrierter Bioprozess
- Betriebstage p.a.: 50
- Jahresproduktion: 900 kg
- Investitionen nicht erforderlich, alle Anlagen vorhanden und bereits vollständig abgeschrieben
- Preis Produkt maximal: 600 Euro
- Kosten für Materialien und Wasser sowie Energie einbezogen (Kühlwasser nicht berücksichtigt)
- Kosten für Filterhilfsstoffe nicht berücksichtigt
- Personalkosten (1 Laborant plus 1 leitender Angestellter plus ein Hilfskraft (Laborant und Hilfskraft anteilig 3 Monate [50 Tage], leitender Angestellter 1 Monat)

Auch in diesem Szenario wird für das Produkt zu einem Preis von ca. 600 Euro/kg von einer signifikant höheren Reinheit dieses Produktes ausgegangen. Es wird hier eine Reinheit von größer/gleich 95 % angenommen.

<sup>5</sup> Für beide Ausprägungsformen dieses Szenarios gilt, dass Investitionen in die für den Bioprozess notwendigen Anlagen nicht berücksichtigt wurden. Lt. Angaben des Industriepartners sind diese Anlagen bei potentiellen Kooperationspartnern vorhanden. Eine vergleichbare Berechnung der Kenngrößen für dieses Szenario unter Einbezug von Investitionen findet sich im Anhang 3 dieses Berichtes.

Für das Produkt zu einem Preis von ca. 300 Euro/kg wird von einer geringeren Reinheit dieses Produktes ausgegangen. Es wird hier eine Reinheit von größer/gleich 90 % angenommen.

Für das hochreine Produkt sind die Kosten für das Downstream-Processing (DSP) höher als für DSP von Produkten niedrigerer Reinheit.

Für das DSP hochreiner Produkte (>95 %, 600 €/kg) werden Kosten in Höhe von 25 Prozent aller anderen anfallenden Kosten angerechnet<sup>6</sup>. Damit ergibt sich für dieses Szenario folgende Kalkulation:

Umsatzerlöse:	540.000,00	Euro p.a.
Kosten inkl. DSP:	80.630,76	Euro p.a.
Gewinn:	459.369,24	Euro p.a.

---

<sup>6</sup> Im Gegensatz zu den voranstehenden Szenarien wird hier der Aufschlag an Kosten für das DSP mit nur 25 Prozent aller anderen anfallenden Kosten angesetzt, da die Reinheit durch den integrierten Bioprozess unter Nutzung des Ionentauschers zur Produktabtrennung schon deutlich höher an der gewünschten Reinheit des Produktes anzusiedeln ist.

## Szenario 3B

**Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Fed-batch, wachsende Zellen,  
integrierter Bioprozess mit Ionentauscher zur Produktabtrennung / Preis 300  
€/kg**

### Kostenrechnung

<b>Variable Kosten:</b>	23880,61 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	270000,00 Euro
<b>Deckungsbeitrag:</b>	246119,39 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	40624,00 Euro
<b>Gewinn:</b>	205495,39 Euro
<b>Umsatzrendite:</b>	0,76
<b>Return on Investment:</b>	██████████
<b>Amortisationszeit: (statisch)</b>	██████████ Jahre

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A2

### Kostenrechnung

<b>Produkte:</b>	270000 Euro
<b>Nebenprodukte:</b>	0 Euro
<b>Koppelprodukte:</b>	0 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	270000 Euro

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A2

## Kostenrechnung

Materialkosten:	23365,39 Euro
Energiekosten:	366,72 Euro
Entsorgungskosten:	148,50 Euro
Betriebsstoffkosten:	0,00 Euro
SEK Fertigung/Vertrieb:	0,00 Euro
<b>Variable Kosten:</b>	<b>23880,61 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A2

## Kostenrechnung

Investitionsabhängige Kosten:	0,00 Euro
Abschreibung/Finanzierung:	0,00 Euro
Reparatur/Wartung:	0,00 Euro
Fabrikationsgemeinkosten:	0,00 Euro
Personalkosten:	25390,00 Euro
Verwaltungs-/Vertriebs-GK:	15234,00 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	<b>40624,00 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A2

Folgende Annahmen liegen diesem Szenario zugrunde:

- Integrierter Bioprozess
- Betriebstage p.a.: 50
- Jahresproduktion: 900 kg
- Investitionen nicht erforderlich, alle Anlagen vorhanden und bereits vollständig abgeschrieben

- Preis Produkt maximal: 600 Euro
- Kosten für Materialien und Wasser sowie Energie einbezogen (Kühlwasser nicht berücksichtigt)
- Kosten für Filterhilfsstoffe nicht berücksichtigt
- Personalkosten (1 Laborant plus 1 leitender Angestellter plus ein Hilfskraft (Laborant und Hilfskraft anteilig 3 Monate [50 Tage], leitender Angestellter 1 Monat)

Für das DSP von Produkten geringerer Reinheit (>90 %, 300 €/kg) werden Kosten in Höhe von 17,5 Prozent aller anderen anfallenden Kosten angerechnet<sup>7</sup>. Damit ergibt sich für dieses Szenario folgende Kalkulation:

Umsatzerlöse:	270.000,00	Euro p.a.
Kosten inkl. DSP:	75.792,92	Euro p.a.
Gewinn:	194.207,08	Euro p.a.

### **Fazit Szenario 3 (integrierter Bioprozess mit IA):**

Es kann festgehalten werden, dass der beschriebene Bioprozess unter den angegebenen Bedingungen wirtschaftlich betrieben werden kann. Dies gilt im Falle des Hochpreisprodukts (600 €/kg) auch, wenn Investitionen in die benötigten Anlagen getätigt werden müssen (siehe Anhang 3).

---

<sup>7</sup> Im Gegensatz zu den voranstehenden Szenarien wird hier der Aufschlag an Kosten für das DSP mit nur 17,5 Prozent aller anderen anfallenden Kosten angesetzt, da die Reinheit durch den integrierten Bioprozess unter Nutzung des Ionentauschers zur Produktabtrennung schon deutlich höher an der gewünschten Reinheit des Produktes anzusiedeln ist.

## 6 Ökologische Vorteile in Folge des Projekts

Die ökologischen Vorteile in Folge des Projekts bestehen insbesondere:

1. In der Etablierung eines umweltfreundlichen Bioprozesses auf Basis nachwachsender Rohstoffe anstelle einer chemischen Oxidation, die durch die Verwendung umwelt- und personengefährdender Einsatzstoffe und Katalysatoren sowie die Bildung von (halogenierten) Nebenprodukten gekennzeichnet ist.
2. In der Substitution existierender, z.B. halogenorganischer Konservierungsmittel durch das angestrebte, natürliche Produkt. Historisch gewachsen und immer noch wichtigste Strategie der Konservierung ist der Einsatz von Formaldehyd, bzw. sogenannten Formaldehydabspaltern. Diese Substanzen stellen mit einem Anteil von über 60 % am Markt für Konservierungsmittel und einem Jahresbedarf von über 70.000 Tonnen / Jahr weltweit den wesentlichen Anteil (COLIPA Jahresbericht 2002).
3. In der Entwicklung eines nachhaltigen Bioprozesses, der die stoffliche Nutzung von Abfall-Terpenen ermöglicht: Citrusöle, wie die Schalenöle aus der Konzentrierung von Citrussäften, können bis zu 95% der wenig aromawirksamen Monoterpenkohlenwasserstoffe enthalten und werden auch in Deutschland in der citrusverarbeitenden Industrie aufbereitet. Bei dieser Weiterverarbeitung entstehen Reststofffraktionen mit *R-(+)*-Limonen als Hauptkomponente (z.T. > 90%). *R-(+)*-Limonen fällt mit Jahresmengen von 50.000 bis 75.000 t weltweit als „Abfall“ an (Bradock, 1999). Das Monoterpen wird bisher zu Preisen von 1 bis 3 Euro kg<sup>-1</sup> in Form von Lösungsmitteln oder direkt in die Natur „entsorgt“, obwohl Limonen EU-weit als „umweltgefährlich“ und „sehr giftig für Wasserorganismen“ gilt (Richtlinie 98/73/EG der Komm v. 18.09.1998, Amtsbl. EU L 305 v. 16.11.1998). *R-(+)*-Limonen ist das Substrat für den in diesem Projekt beschriebenen Bioprozess. Auf diese Weise soll das biologisch-chemische Potential der von der Natur in aufwendigen Reaktionsfolgen „vorsynthetisierten“ chiralen Naturstoffe zur Gewinnung natürlicher antimikrobieller Wirkstoffe für die Kosmetik- und Pharmaindustrie ausgenutzt werden.

In Analogie zu 5.4 kann unter Einsatz der Software Sabento® ebenfalls eine ökologische Bewertung der Prozesse durchgeführt werden. Für eine quantitative Bewertung ist ein Prozessmodell anzufertigen, das auf den tatsächlichen Stoff- und Energieströmen des jeweiligen Prozesses basiert. Diese realen Zahlen werden erst

in der an das Projekt anschließenden Transferphase beim Industriepartner generiert werden.

Im Rahmen der qualitativen Bewertung auf Basis der zum Abschlussbericht vorliegenden Erkenntnisse kann zusammengefasst werden, dass mit dem optimierten Fed-batch-Verfahren und dem entwickelten Downstream-Processing ein im Vergleich zu potentiellen chemischen Oxidationsprozessen umweltschonenderes Verfahren vorliegt, da auf den Einsatz umwelt- und personengefährdender Reagentien vollständig verzichtet werden kann und die Biokonversion unter ausgesprochen milden Prozessbedingungen abläuft. Der Einsatz der *in situ* Produktabtrennung durch Ionenaustausch wird zu einer weiteren Reduzierung der einzusetzenden Reagenzienmengen im Downstream-Processing bei gleichzeitiger Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute führen. Letzteres verringert den Prozessbedarf an Wasser, Energie und Reaktorvolumen.

## 7 Soll-/Ist-Vergleich

Mit Abschluss der dreimonatigen kostenneutralen Laufzeitverlängerung des Vorhabens wurden die geplanten Arbeitspakete erfolgreich abgeschlossen.

Das Arbeitspaket Stamm-Optimierung wurde zugunsten des in der Gutachteraufgabe geforderten Arbeitspaketes Downstream-Processing zurückgestellt. Im Rahmen des Arbeitspaketes Medienoptimierung wurde auf den ursprünglich für die Optimierung des Fermentationsmediums geplanten Einsatz genetischer Algorithmen zugunsten der Arbeiten zum Ionenaustauscherprinzip, hier insbesondere der Optimierung der für die Ionenaustauschermethode notwendigen Rückelution, verzichtet.

Arbeitspaket		1. QUARTAL			2. QUARTAL			3. QUARTAL			4. QUARTAL		
Aufbau Bioproz. Technik	Soll	■	■	■									
	Ist	■	■	■	✓								
Entwicklung der Analytik	Soll	■	■	■									
	Ist	■	■	■	✓								
Prüfung Produktqualität	Soll				■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Ist				■	■	■	■	■	■	■	■	■
Antimikrobielle Assay-Entwicklung	Soll	■	■	■	■	■	■						
	Ist	■	■	■	■	■	■	✓					
Downstream-Processing <sup>1</sup>	Soll	■	■	■	■	■	■						
	Ist	■	■	■	■	■	■	✓					
Medienoptimierung <sup>2</sup>	Soll				■	■	■	■	■				
	Ist				■	■	■	■	■	■	✓		





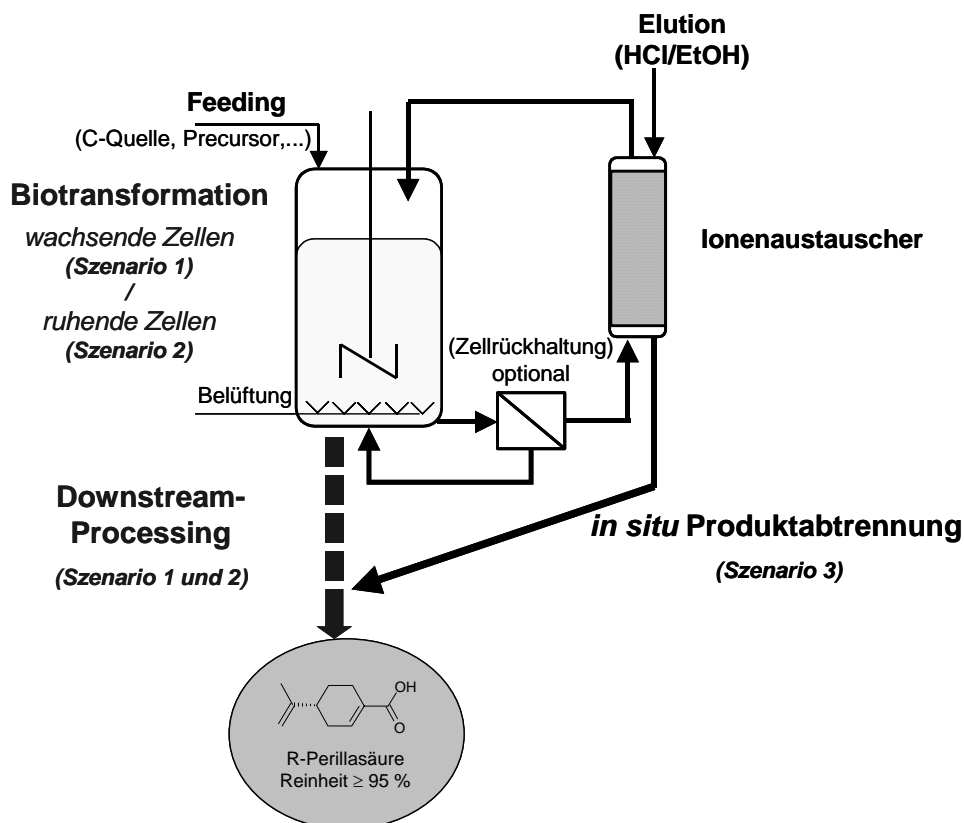
Schüttelkolbenmaßstab in Gegenwart von IA bestimmt wurden ( $33 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ). Diese Feststellung zeigt, dass die hohe Perillasäureendkonzentration im abschließenden IA-ISPR-Fed-batch-Experiment hauptsächlich von der Erhöhung der Biokatalysatormenge herrührt. Hier offenbart sich deshalb Potential zur weiteren Steigerung der Leistungsfähigkeit des integrierten Bioprozesses, da die spezifische Aktivität der Biomasse bei weitem noch nicht ausgeschöpft wurde. Die verantwortlichen Limitierungen wurden erkannt: a) Die Nährstoff- und Limonenzufuhr wurde schon nach 3 d – also zu früh - abgebrochen. Dies verdeutlicht die in diesem Zeitraum einsetzende Verringerung der Produktbildungsrate (Abb. 23). b) Die Menge des Ionenaustauschers (70 g/L) war zu gering, um die gesamte gebildete Perillasäure aus dem Medium abzutrennen, weshalb 30 % des Produktes im Kulturmedium verblieben und zu Produktinhibierung führten.

Folgende Maßnahmen, in Ergänzung zum bisher entwickelten Verfahrenskonzept, werden deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Pilotversuchen in der anschließenden Transferphase beim Industriepartner für noch höhere Ausbeuten sorgen (vermutlich  $> 20 \text{ g/L}$ ):

1. Wegen des hohen Nährstoffbedarfs von *Pseudomonas* während der Fed-batch geführten Biotransformation (mit oder ohne ISPR) werden durch den Einsatz einer kompletten Nahrungstoff-Feed-Lösung (zusammengesetzt aus: Glycerol, Spurenelemente,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und  $\text{MgSO}_4$ ) anstatt einer reinen Glycerol-Feed Lösung die Prozessdaten weiter verbessert werden. Zudem wird Limonen über einen längeren Zeitraum als bisher gefeedet werden, um jegliche Substratlimitierung auszuschließen (siehe auch 2.).
2. Der Ionenaustauscher soll bevorzugt im Bypass in einer periodisch durchströmten Säule (mit vorheriger Zellrückhaltung) bzw. Wirbelbett (Rückhaltung der Ionenaustauscher, keine Zellrückhaltung notwendig) angeordnet werden (integrierter Bioprozess) (Abb. 28, Szenario 3).
  - Im Bypass können größere Mengen von Ionenaustauscher angeordnet werden, bei gleichzeitig verkürzter Dauer direkter Wechselwirkungen mit den Mikroorganismen bzw. ganz ohne direkte Wechselwirkungen. Dadurch wird die Zellvitalität gewahrt (Schüttelkolben-Biotransformationen zeigten

negative Auswirkungen auf das Wachstum, wenn die Konzentration von Amberlite IRA 410 Cl über 70 g/L betrug).

- Um eine Limitierung des Precursors zu vermeiden, kann der Ionenaustauscher vor der Biotransformation dank der hohen Lösungsmitteltoleranz von *P. putida* DSM 12264 mit Limonen gesättigt werden. Diese Limonen-Beladung stört die Bindekapazität für das Zielprodukt nicht.
- Durch die modulare Konzipierung des Bioprozesses (Bioreaktor + ISPR-Säule im Bypass) und periodische Kreislaufführung wird es möglich, die Perillasäurekonzentration auf einen gewünschten Konzentrationsbereich im Medium einzuregeln, der einerseits nicht toxisch, andererseits jedoch enzyminduzierend wirkt.
- Bezüglich der maximalen Menge abtrennbarer Perillasäure gibt es keine Limitierungen, da ggf. mit zwei Säulen im Austausch (wechselweise Beladung – Elution) gearbeitet werden kann.



**Abb. 28:** Schematische Darstellung der verschiedenen Verfahrensvarianten: Das off-line Downstream-Processing schließt sich an die Biotransformation mit wachsenden oder ruhenden Zellen an. Alternativ kann eine *in situ* Produktabtrennung mit Ionenaustauscher im Bypass mit periodisch durchströmter Säule (mit vorheriger Zellrückhaltung, optional) bzw. Wirbelbett (Rückhaltung der Ionenaustauscher, keine Zellrückhaltung, Prinzip nach Held *et al.* 1999) im integrierten Bioprozess realisiert werden. Dadurch verringert sich der Aufwand für das Downstream-Processing. Die angegebenen Szenarien entsprechen der Nummerierung im Kapitel 5.4 „Gerechnete Szenarien“.

Erfreulicherweise wurde der avisierte Meilenstein „ $\geq 15 \text{ g L}^{-1}$  nach maximal 6 Tagen“ hinsichtlich der darin ausgedrückten Produktivität auch unter Verwendung ruhender Zellen ( $5,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) (Abb. 28, Szenario 2) sowie unter Verwendung von wachsenden Zellen ohne ISPR ( $4,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) (Abb. 28, Szenario 1) und damit auch die Daten aus der Literatur (Mars *et al.* 2001) deutlich übertroffen. Bezüglich der Biokonversion von Limonen mit ruhenden Zellen wurde im Schüttelkolbenmaßstab bereits bestätigt, dass eine deutliche Erhöhung der Perillasäurekonzentration durch den positiven Effekt von Ionenaustauscher erreicht werden kann. Folglich stellt der Einsatz ruhender Zellen mit ISPR eine attraktive Alternative für die Transferphase beim Industriepartner dar.

### ***Downstream-Processing:***

Die Arbeiten zum Downstream-Processing (DSP) führten zu zwei einfachen, kostengünstigen und umweltschonenden Aufarbeitungswegen, die hochreine R-(+)-Perillasäure lieferten. Die bevorzugte Variante mit saurer Fällung der Perillasäure gelangt am Ende der DSP zu einem hochreinen Produkt ( $> 95 \%$ ) mit einer Gesamtausbeute von  $83 \%$ . Der Vorteil dieser Variante ist, dass sie sich in die verschiedenen denkbaren Prozessszenarien ohne große Modifikationen einbinden lässt. Das integrierte Verfahren mit dem Ionenaustauscher zur *in situ* Produktabtrennung, das in der Projektlaufzeit nicht mehr in der Bypass-Variante validiert werden konnte, erfüllt voraussichtlich alle Voraussetzungen für einen noch effizienteren Gesamtprozess, da die meisten Schritte des DSP durch das ISPR substituiert werden können (siehe Abb. 28).

### ***Ökonomische und ökologische Bewertung:***

Mit Hilfe der Software Sabento® wurden für die jeweiligen in diesem Projekt entwickelten Prozessvarianten auf Basis der aktuellen Zahlen Wirtschaftlichkeitsberechnungen durchgeführt und Kennzahlen wie Deckungsbeitrag und Gewinn bei vorgegebenen Randbedingungen berechnet. In den unterschiedlichen Szenarien werden zwei Reinheitsstufen der Perillasäure (DSP Variante 1:  $> 90 \%$  bzw. DSP Variante 2:  $> 95 \%$ ) unterschieden, die mit entsprechend unterschiedlichem DSP-Aufwand und Produktpreis korrelieren. Im Vergleich zu dem im März vorgestellten Szenario konnte durch die Optimierung der

Fed-Batch Biotransformation mit wachsenden Zellen über 100 % mehr Gewinn generiert werden, weil die Raum-Zeit-Ausbeute erhöht wurde. Gegenwärtig, d.h. auf Basis der zum Abschluß des Projektes vorliegenden Zahlen (ohne die Daten der ausstehenden Transferphase beim Industriepartner), rangieren der Bioprozess mit ruhenden Zellen sowie der integrierte Bioprozess (IA-ISPR) in derselben Gewinn- und Umsatzregion wie die optimierte Fed-batch Biotransformation mit wachsenden Zellen ohne ISPR. Im Gegensatz zu letzterem konnte der IA-ISPR-Ansatz jedoch in diesem Projekt nicht mehr bioprozesstechnisch optimiert werden und hat demnach noch weit mehr Potential. Hier werden voraussichtlich noch bessere Raum-Zeit-Ausbeuten und insbesondere Produktendkonzentrationen > 15 g/L erreicht werden können, die somit zu einer weiteren Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Verfahrens beitragen.

Es wurde bisher auf eine quantitative ökologische Evaluierung der Szenarien verzichtet, da hierfür die realitätsnahen Zahlen der Energie- und Stoffströme der Prozesse im technischen Maßstab beim Industriepartner abgewartet werden sollen. Es ist zu vermuten, dass hierbei der integrierte Bioprozess aufgrund der bereits unter „Bioprozess-Design“ diskutierten Punkte als die nicht nur ökonomisch, sondern auch ökologisch zu bevorzugende Variante hervorgehen wird.

### ***Transfer:***

Die Projektpartner rechnen damit, dass auf Basis des vorliegenden Verfahrenskonzepts zur biotechnologischen Herstellung von *R*-(+)-Perillasäure im Rahmen einer sich anschließenden technischen Transferphase beim Industriepartner der nach eigenem Kenntnisstand vermutlich erste industrielle Bioprozess einer mikrobiellen Oxyfunktionalisierung von Monoterpenen etabliert werden wird (Schrader und Berger 2001, de Carvalho und da Fonseca 2006).

## **9 Kooperation innerhalb des Projekts**

Das Projekt war von Beginn an sowohl durch den intensiven Austausch der Ergebnisse zwischen den Projektpartnern als auch die produktionsorientierte Vorgehensweise geprägt. In zahlreichen Treffen wurden auch die mögliche Umsetzung der im Labor erzielten Resultate in einen technischen Maßstab sowie notwendige Parameter für eine prozessbegleitende ökologische und ökonomische Evaluation diskutiert. Folgende Treffen der Projektpartner DECHEMA e.V. und Dr. Rieks Healthcare GmbH fanden statt (inkl. Anbahnungsphase):

02.03.2004, Evangelische Akademie, Tutzing  
24.03.2004, DECHEMA e.V., Frankfurt  
04.05.2004, Rhein-Main-Hallen, Wiesbaden  
25.10.2004, Universität Hannover  
30.11.2004, TUHH, Hamburg-Harburg  
24.05.2005, DECHEMA e.V., Frankfurt  
09.06.2005, Universität Stuttgart  
31.01.2006, DECHEMA e.V., Frankfurt  
29./30.03.2006, TU HH, Hamburg-Harburg

Zusätzlich wurde von den Partnern in der Projektplanungsphase und im zurückliegenden Projektzeitraum eine Reihe von Tagungen und Messen, wie beispielsweise die Biocat (2004, Hamburg), die Tagung „Weiße Biotechnologie“ (2005, Berlin) und das Symposium „Gram-to-Ton Biocatalysis“ (2005, Dortmund) besucht.

## **10 Literatur/Präsentationen/Patente**

### **Projektbezogene Patente**

Rieks, A., Kähler, M., Kirchner, U., Wiggenhorn, K., Kinzer, M., Risch, S.  
„Antimicrobial active preparations“, 2005, WO 205/012210

Rieks, A., Kähler, M., Kirchner, U., Wiggenhorn, K., Kinzer, M., Risch, S.  
„Antimicrobial agent against bacteria, yeast and moulds“, 2004, WO 2004076400

Rieks, A., Kähler, M., Kirchner, U., Risch, S., Wiggenhorn, K., Kinzer, M.  
„Antimikrobielle Wirkstoffe“, Anmeldung beim Deutschen Patentamt, 2003, DE  
10335634

Rieks, A., Kähler, M., Kirchner, U., Wiggenhorn, K., Kinzer, M.  
„Antimikrobielle Wirkstoffe gegen Bakterien, Hefen und Schimmelpilze“, 2003, DE  
10308278 A1

### **Projektbezogene Präsentationen**

BioPerspectives, Wiesbaden, 10.-12. Mai 2005

“Whole-cell bioconversion of terpenoids in integrated bioprocesses“, J. Schrader

Jahreskolloquium des Karl-Winnacker-Instituts, DECHEMA e.V., Frankfurt,

24.11.2005, Posterpräsentation

Jahreskolloquium des Karl-Winnacker-Instituts, DECHEMA e.V., Frankfurt,

29.11.2006, Vortrag: „Übersicht über die Forschungsaktivitäten der Arbeitsgruppe  
Bioverfahrenstechnik des Karl-Winnacker-Instituts“, J. Schrader

Erste Projektkonzepte und -resultate wurden erfolgreich auf der Biotechnica 2005 sowie der In-Cosmetics (2004, Mailand; 2005, Berlin) präsentiert.

#### **Literatur zu diesem Statusbericht**

- Aiba S., Shoda M., Nagatani M., *Biotech. and Bioeng.*, 1968, *10*, 845-864
- Braddock R.J., *Handbook of Citrus By-Products and Processing Technology*, 1999, John Wiley & Sons Inc. New York, p. 175.
- De Carvalho C.C.R., da Fonseca M.M., *Biotechnol. Adv.*, 2006, *24*, 134-142
- Diniz S. C., Taciro M. K., Gomes J. G. C., Paradella J. G. da C., *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 2004, *119*, 51-69
- Eaton R.W., *J. Bacteriol.*, 1997, 3171-3180
- Erdmann S. M., Merk H.-F., *Hautarzt*, 2003, *54*, 331-337
- Held M., Schmid A., Kohler H.-P., Suske W., Witholt B., M.G. Wubbolts, *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, *62(6)*, 641-648
- Kim, Jin G., Lee I. Y., Choi D. K., Yoon S. C., Park Y. H., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, *6(3)*, 221-224
- Lau J., Tran C., Licari P., Galazzo J., *J. Biotechnol.*, 2004, *110*, 95-103
- Luon J. H. T., *Biotech. and Bioeng.*, 1984, *27*, 280-285
- Mars A. E., Gorissen J. P. L., van den Beld I., Eggink G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, *56*, 101-107
- Schrader, J.; Berger, R. G. In: *Biotechnology Vol. 10*, 2<sup>nd</sup> ed.; Rehm, H.-J., Reed, G., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2001; pp. 377-383.
- Speelmans G., Bijlsma A., Eggink G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, *50*, 538-54

## 11 Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
A.	<i>Aspergillus</i>
a	Jahr
Abb.	Abbildung
B.	<i>Bacillus</i>
BTM	Biotrockenmasse
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Candida</i>
C	Kohlenstoff
CFU	colony forming units
d	Tag
d.h.	das heißt
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DO	dissolved oxygen (gelöster Sauerstoff), pO <sub>2</sub>
DSM	Deutschen Sammlung für Mikroorganismen
DSMZ	Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DSP	Downstream-Processing
E.	<i>Escherichia</i>
eq/L	Äquivalente pro Liter
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie – Massenspektrometrie
h	Stunde
HZD	Hochzelldichte
IA	Ionenaustauscher
IBP	Integrierter Bioprozess
ISPR	<i>in situ</i> product removal - <i>in situ</i> Produktabtrennung
L	Liter
LB	Luria-Bertani
Log P	Verteilungskoeffizient Octanol/Wasser
lt.	laut



MeOH	Methanol
MIC	minimal inhibitory concentration
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
n.b.	nicht bestimmt
n.g.	nicht gemessen
NB	Nutrient Broth Medium
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
pO <sub>2</sub>	gelöster Sauerstoff (DO)
PS	Perillasäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Retentionszeit
t	Tonne
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth Medium
U/min	Umdrehungen pro Minute
v	Volumen
vvm	Gasvolumen pro Volumen und Minute
YPD	Hefe-Pepton-Dextrose
z.B.	zum Beispiel
$\alpha$	Dissoziationskoeffizient einer Säure

## Anhang 1

### Szenario 1A inkl. Investitionen

**Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Konventionell (im Projekt optimierte Fed-batch Kultivierung) / Preis 600 €/kg**

#### Kostenrechnung

<b>Variable Kosten:</b>	17386,22 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	720000,00 Euro
<b>Deckungsbeitrag:</b>	702613,78 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	510808,72 Euro
<b>Gewinn:</b>	191805,06 Euro
<b>Umsatzrendite:</b>	██████████
<b>Return on Investment:</b>	██████████
<b>Amortisationszeit:</b> (statisch)	██████████ Jahre

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ1A1 Invest

#### Kostenrechnung

<b>Produkte:</b>	720000 Euro
<b>Nebenprodukte:</b>	0 Euro
<b>Koppelprodukte:</b>	0 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	720000 Euro

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ1A1 Invest

## Kostenrechnung

Materialkosten:	16355,78 Euro
Energiekosten:	733,44 Euro
Entsorgungskosten:	297,00 Euro
Betriebsstoffkosten:	0,00 Euro
SEK Fertigung/Vertrieb:	0,00 Euro
<b>Variable Kosten:</b>	<b>17386,22 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ1A1 Invest

## Kostenrechnung

Investitionsabhängige Kosten:	470184,72 Euro
Abschreibung/Finanzierung:	391820,60 Euro
Reparatur/Wartung:	39182,06 Euro
Fabrikationsgemeinkosten:	39182,06 Euro
Personalkosten:	25390,00 Euro
Verwaltungs-/Vertriebs-GK:	15234,00 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	<b>510808,72 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Optimiert-Konventionell SZ1A1 Invest

Folgende Annahmen liegen diesem Szenario zugrunde:

- Konventioneller Prozess (optimierte Fed-batch Kultivierung)
- Betriebstage p.a.: 50
- Jahresproduktion: 1.200 kg
- Investitionen erforderlich (hier Reaktor inkl. Infrastruktur, linear abgeschrieben auf 10 Jahre, keine Kapitalkosten)

- Preis Produkt maximal: 600 Euro
- Kosten für Materialien und Wasser sowie Energie einbezogen (Kühlwasser nicht berücksichtigt)
- Kosten für Filterhilfsstoffe nicht berücksichtigt
- Personalkosten (1 Laborant plus 1 leitender Angestellter plus ein Hilfskraft (Laborant und Hilfskraft anteilig 3 Monate [50 Tage], leitender Angestellter 1 Monat)

## Anhang 2

### Szenario 2A inkl. Investitionen

#### Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells / Preis 600 €/kg

##### Kostenrechnung

<b>Variable Kosten:</b>	26665,03 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	678000,00 Euro
<b>Deckungsbeitrag:</b>	651334,97 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	510808,72 Euro
<b>Gewinn:</b>	140526,25 Euro
<b>Umsatzrendite:</b>	0,21
<b>Return on Investment:</b>	0,04
<b>Amortisationszeit:</b> (statisch)	27,88 Jahre

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A1 Invest

##### Kostenrechnung

<b>Produkte:</b>	678000 Euro
<b>Nebenprodukte:</b>	0 Euro
<b>Koppelprodukte:</b>	0 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	678000 Euro

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A1 Invest

## Kostenrechnung

Materialkosten:	26106,43 Euro
Energiekosten:	45,28 Euro
Entsorgungskosten:	513,33 Euro
Betriebsstoffkosten:	0,00 Euro
SEK Fertigung/Vertrieb:	0,00 Euro
<b>Variable Kosten:</b>	<b>26665,03 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A1 Invest

## Kostenrechnung

Investitionsabhängige Kosten:	470184,72 Euro
Abschreibung/Finanzierung:	391820,6 Euro
Reparatur/Wartung:	39182,06 Euro
Fabrikationsgemeinkosten:	39182,06 Euro
Personalkosten:	25390 Euro
Verwaltungs-/Vertriebs-GK:	15234 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>	<b>510808,72 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Resting Cells SZ2A1 Invest

Folgende Annahmen liegen diesem Szenario zugrunde:

- Prozess mit ruhenden Zellen, d.h. zuvor einmalige Anzucht der Biomasse in einer Hochzelldichte-Fermentation. Die Biomasse wird geerntet und entsprechende Aliquote bis zum Einsatz als ruhende Zellen in den einzelnen Biotransformationen gefroren gelagert.
- Betriebstage p.a.: 50

- Jahresproduktion: 1130 kg
- Investitionen erforderlich (hier Reaktor inkl. Infrastruktur, linear abgeschrieben auf 10 Jahre, keine Kapitalkosten)
- Preis Produkt maximal: 600 Euro
- Kosten für Materialien und Wasser sowie Energie einbezogen (Kühlwasser nicht berücksichtigt , Energieverbrauch geschätzt)
- Personalkosten (1 Laborant plus 1 leitender Angestellter plus ein Hilfskraft (Laborant und Hilfskraft anteilig 3 Monate [50 Tage], leitender Angestellter 1 Monat)

## Anhang 3

### Szenario 3A inkl. Investitionen

Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: Integrierter Bioprozess mit Ionentauscher zur Produktabtrennung / Preis 600 €/kg

Kostenrechnung		
<b>Variable Kosten:</b>		23550,56 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>		540000,00 Euro
<b>Deckungsbeitrag:</b>		516449,44 Euro
<b>Fixe Kosten:</b>		510808,72 Euro
<b>Gewinn:</b>		5640,72 Euro
<b>Umsatzrendite:</b>	██████████	
<b>Return on Investment:</b>	██████████	
<b>Amortisationszeit:</b> (statisch)	██████████	Jahre

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A1 Invest

## Kostenrechnung

Produkte:	540000 Euro
Nebenprodukte:	0 Euro
Koppelprodukte:	0 Euro
<b>Umsatzerlöse:</b>	<b>540000 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A1 Invest

## Kostenrechnung

Materialkosten:	23365,39 Euro
Energiekosten:	36,67 Euro
Entsorgungskosten:	148,50 Euro
Betriebsstoffkosten:	0,00 Euro
SEK Fertigung/Vertrieb:	0,00 Euro
<b>Variable Kosten:</b>	<b>23550,56 Euro</b>

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A1 Invest



## Kostenrechnung

Investitionsabhängige Kosten:	470184,72 Euro
Abschreibung/Finanzierung:	391820,60 Euro
Reparatur/Wartung:	39182,06 Euro
Fabrikationsgemeinkosten:	39182,06 Euro

Personalkosten: 25390,00 Euro

Verwaltungs-/Vertriebs-GK: 15234,00 Euro

**Fixe Kosten:** 510808,72 Euro

Projekt: Biotransformation R-Perillasäure / Szenario: IBP Ionentauscher SZ 3A1 Invest

Folgende Annahmen liegen diesem Szenario zugrunde:

- Integrierter Bioprozess
- Betriebstage p.a.: 50
- Jahresproduktion: 900 kg
- Investitionen erforderlich (hier Reaktor inkl. Infrastruktur, linear abgeschrieben auf 10 Jahre, keine Kapitalkosten)
- Preis Produkt maximal: 600 Euro
- Kosten für Materialien und Wasser sowie Energie einbezogen (Kühlwasser nicht berücksichtigt)
- Kosten für Filterhilfsstoffe nicht berücksichtigt
- Personalkosten (1 Laborant plus 1 leitender Angestellter plus ein Hilfskraft (Laborant und Hilfskraft anteilig 3 Monate [50 Tage], leitender Angestellter 1 Monat)