

Projekttitlel:

Umweltentlastung durch den Einsatz mikrobiell hergestellter Biotenside in Körperpflegemitteln sowie Wasch-, Pflege- und Reinigungsmitteln

AZ: 32360/01_32

Projektkoordinatorin: Dr.-Ing. Christina Kohl

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP
Universität Stuttgart

Projektpartner: Sonett GmbH, Börlind Gesellschaft für kosmetische Erzeugnisse mbH
Unterauftrag: Fraunhofer-Institut für Bauphysik, Abt. Ganzheitliche Bilanzierung

**ANNEMARIE
BÖRLIND**
NATURAL BEAUTY



sonett
ÖKOLOGISCH KONSEQUENT



Universität Stuttgart
Institut für
Grenzflächenverfahrenstechnik
und Plasmatechnologie

Förderbeginn: 01.03.2015
Laufzeit: 3 Jahre
Berichtszeitraum: 01.03.2015 – 28.02.2018

Stuttgart 2018

06/02

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	32360/01	Referat	32	Fördersumme	230.025,00 €
-----------	-----------------	----------------	-----------	--------------------	---------------------

Antragstitel **Umweltentlastung durch den Einsatz mikrobiell hergestellter Biotenside in Körperpflegemitteln sowie Wasch-, Pflege- und Reinigungsmitteln**

Stichworte Mannosylerythritollipide (MEL); *Pseudozyma* ssp.

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
3 Jahre	01.03.2015	28.02.2018	1
Abschlussbericht		28.02.2018	

Bewilligungsempfänger	Universität Stuttgart Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie Nobelstr. 12 70569 Stuttgart	Tel 0711 970 4183 Fax 0711 970 4200 Projektleitung Dr.-Ing. Christina Kohl Bearbeiter Alexander Beck Fabian Haitz Christina Kohl Guylaine LeLoarer Michaela Müller Veronika Schönhaar Beate Oberdorfer Susanne Zibek
------------------------------	---	--

Kooperationspartner Börlind Gesellschaft für kosmetische Erzeugnisse mbH
Sonett GmbH

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Die Biotenside aus der Klasse der Mannosylerythritollipide (MEL) werden als komplexe Strukturgemische oberflächenaktiver Glykolipide von *Pseudozyma* sp. und verwandten Organismen gebildet. Im Rahmen des Projektes werden verschiedene MEL-Varianten für ausgewählte Anwendungen in Körperpflegemitteln und Kosmetika (KPM) sowie in Wasch-, Pflege- und Reinigungsmitteln (WPR) untersucht. Dabei stehen die emulgierenden und waschaktiven Eigenschaften der Biotenside im Vordergrund.

Zur Herstellung einer größeren Produktpalette mit unterschiedlicher Löslichkeit der MEL können sowohl unterschiedliche Stämme als auch unterschiedliche Substrate wie pflanzliche Öle oder Fettsäuren eingesetzt werden. Diese variable Vorgehensweise ermöglicht es, Biotenside mit den für die spätere Anwendung gewünschten Eigenschaften herzustellen. Diese Biotenside sollen herkömmliche Tenside aus fossilen Rohstoffen ersetzen. Adressiert wurden hierbei zunächst KPM wie Shampoo sowie WPR. Umfassendere anwendungstechnische Untersuchungen wurden diesbezüglich noch nicht in der Breite durchgeführt, daher ist der Kenntnisstand zu dem Potential der Biotenside auf diesem Gebiet noch begrenzt. Dadurch ist auch noch kein Wissen hinsichtlich der Anforderungen an die Biotenside in diesen Bereichen vorhanden, bzw. noch nicht angepasst worden. Mit diesem Projekt wurden MEL in der Kosmetik- und Reinigungsmittelindustrie erstmalig genauer untersucht und eingesetzt. Erwartete Vorteile gegenüber konventionellen Tensiden waren:

- Herstellung von Biotensiden mit vollständiger biologischer Abbaubarkeit
- Nutzung von heimischen nachwachsenden Rohstoffen wie Öl B zur Biotensidherstellung → Ökoeffiziente Herstellung von Tensiden und Ersatz von erdölbasierten Tensiden
- Einsatz von fermentativen Herstellungsverfahren → Energieeffiziente Herstellung von Tensiden und geringere Umweltbelastung durch toxische Edukte und Nebenprodukte.

- Ersatz von Konservierungsmitteln, da einige Biotenside sowohl tensidspezifische als auch antimikrobielle Eigenschaften besitzen

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Zu Beginn des Projekts wurden zunächst die Anforderungen an MEL in WPR und KPM gemeinsam mit allen Projektpartnern spezifiziert und in einem Anforderungskatalog zusammengefasst. Dies diente als Basis zur späteren Auswahl geeigneter MEL für entsprechende Anwendungen.

Die Kombination von unterschiedlichen *Pseudozyma*-Stämmen mit divergierenden Fermentationssubstraten resultierte in MEL-Gemischen, die sich hinsichtlich Zusammensetzung, Quantität und Struktur der einzelnen MEL-Varianten unterscheiden. Diese wurden mittels präparativer Chromatographie aufgereinigt. Ihre Zusammensetzung und Reinheit wurden mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt.

Die so hergestellten MEL wurden physikalisch-chemisch hinsichtlich des HLB-Wertes, der Oberflächenspannung, ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration und ihrem Schaumverhalten (Schäumvermögen, Schaumstabilität) im Vergleich zum Referenzensid Glucocon® 650EC (Alkylpolyglucoside) untersucht und charakterisiert. Bei der biologischen Charakterisierung wurden die zytotoxische Wirkung auf Fibroblasten und Keratinozyten, die Präsenz von pyrogenen Rückständen, sowie eine allergene, antibakterielle (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *C. acnes*) und antifungale Wirkung (*A. brasiliensis* und *C. albicans*) untersucht. Zum Erhalt möglichst hydrophiler MEL wurden diese mittels Enzymen oder alkalischen Agentien post-process modifiziert.

Ausgewählte MEL-Extrakte wurden in bestehenden Shampoo- und Augenserum-Rezepturen auf ihre Anwendungseignung als Tensid bzw. Emulgator untersucht. Für einen Einsatz in WPR wurden ausgewählte MEL bei unterschiedlichen pH-Werten auf ihre Wasserlöslichkeit und Stabilität untersucht.

Mit Hilfe einer Ökobilanzierung wurde der Lebenszyklus von MEL als Inhaltsstoff von WPR und KPM abgebildet und die assoziierten ökologischen Wirkungen abgeschätzt. Die Produktion von MEL wurde hierbei zunächst im Labormaßstab betrachtet und auf die Größenordnung einer Pilotanlage modelliert.

Ergebnisse und Diskussion

Mit den Kombinationen aus drei ausgewählten *Pseudozyma*-Stämmen, *Stamm 1* - *Stamm 3*, und fünf Pflanzenölen (Öl A – Öl E) als Fermentationssubstrat wurden unterschiedliche MEL-Kompositionen bestehend aus divergierenden Anteilen von MEL-A, MEL-B, MEL-C, MEL-D und MEL-X produziert. Hierbei erzielten *Stamm 1* und *Stamm 3* mit bis zu 28 g/L hohe MEL-Konzentrationen im Schüttelkolben. Mittels präparativer Chromatographie konnten die MEL bis zu einer Reinheit von 97–100 %, bei einem Präparationsverlust von lediglich 1-2 %, aufgereinigt werden.

Die aufgereinigten MEL wurden darauffolgend physikalisch-chemisch und anwendungstechnisch untersucht. Der HLB-Wert lag für alle hergestellten MEL-Kompositionen in einem Bereich zwischen 5,0 und 8,5. Sie sind damit als eher lipophil einzuschätzen und eignen sich als W/O-Emulgatoren. Ihre CMC-Werte lagen zwischen 1,5 und 4,0 mg/L und damit deutlich niedriger als die Referenz Glucocon® 650EC. Damit musste zur Erreichung der minimalen Oberflächenspannung bzw. der maximalen Tensidwirkung eine geringere Menge an Biotensid zugesetzt werden. Die minimalen Oberflächenspannungen der untersuchten MEL lagen zwischen 25–32 mN/m. Bei dem Schaumverhalten variierten die MEL stark von wenig bis stark schäumend mit instabilem bis gut stabilem Schaum, abhängig von Zusammensetzung und Reinheit. MEL aus *Stamm 1* mit Öl C zeigt gleichgute Schaumeigenschaften wie Glucocon® 650EC. Im Vergleich zu Glucocon® 650 EC waren die untersuchten MEL weniger gut zellverträglich bezüglich Fibroblasten. Für Keratinozyten besaßen MEL aus *Stamm 1* mit Öl A und Öl D sowie MEL aus *Stamm 2* mit Öl B eine gleichgute oder sogar bessere Zellverträglichkeit als die Referenz. Weiter wurden weder pyrogene Rückstände noch eine allergene Wirkung der MEL in nicht zytotoxischen Konzentrationen nachgewiesen. Die untersuchten MEL zeigten gegen-

über *E. coli* und *A. brasiliensis* keine antimikrobiellen Eigenschaften. Gegen *P. aeruginosa* wirkten sieben der untersuchten MEL, gegen *S. aureus* wiesen sechs MEL antimikrobielle Eigenschaften auf. Antifungale Wirkung gegen *C. albicans* wurde für ein MEL-Gemisch nachgewiesen. Mit MIC50-Werten von weniger als 0,001 g/L besitzen vier der untersuchten MEL-Gemische antibakterielle Eigenschaften gegen den Akneerreger *C. acnes*. Durch enzymatische Modifizierung mittels Lipasen, eine saure Hydrolyse der Estergruppen sowie eine alkalische Modifizierung mit Natronlauge konnten hydrophilere MEL mit einem erhöhten MEL-C bzw. MEL-D Anteil erzielt werden.

MEL wurden auf ihre Eignung in zwei unterschiedlichen kosmetischen Grundlagen, als Tensid in einem Shampoo und als Emulgator in einem Augenserum, getestet. Im Augenserum besaßen MEL nur sehr geringe emulgierende Eigenschaften. MEL bewirkten in der Shampoo-Rezeptur meist eine niedrigere Viskosität, d.h. das Shampoo wurde dünnflüssig. Wurden in der Shampoo-Rezeptur 3 % MEL von *Stamm 1* mit Öl A in einer Reinheit von 100 % anstelle des Tensids Blanova® 1200 eingesetzt, waren die Parameter des Shampoos wie pH-Wert, Viskosität und Dichte nahezu identisch der Originalrezeptur.

Die Substitution eines kommerziellen Tensids (Blanova® 1200) durch die in dem Projekt hergestellten MEL ist aufgrund der auftretenden Trübung in einem vorher klaren Reinigungsgel nicht zweckmäßig. Demgegenüber zeigt die Anwendung der Biotenside in einer Reinigungsmilch adäquate Ergebnisse zu den gewöhnlich verwendeten Tensiden. Auf der Basis der positiven Ergebnisse sind zukünftig weitere Untersuchungen zur Anwendung der MEL in Haar- und Körperserien geplant. Positiv ist auch die zellproliferierende Wirkung der MEL auf Fibroblasten wohingegen ein analoger Effekt auf Keratinozyten nicht nachgewiesen werden kann. Es wurden daher *in vitro*-Tests durchgeführt, um weitere Gene zu identifizieren, die Hautfunktionen steuern oder regulieren, die nicht die Differenzierung von Keratinozyten beeinflussen.

Zur Auswahl geeigneter MEL-Varianten für eine Anwendung im WPR wurden in einem ersten Schritt unterschiedliche MEL-Varianten bezüglich ihrer Löslichkeit bei verschiedenen pH-Werten charakterisiert. Mit MEL aus *Stamm 3* mit Öl B wurde ein Tensid identifiziert, das gut wasserlöslich und kalkunempfindlich ist und sich für einen Einsatz in WPR eignet. Dieses MEL-Gemisch wurde anschließend zur Formulierung eines Glasreinigers eingesetzt. Es zeigte sich, dass durch Zugabe einer geringen Menge an Ethanol eine zufriedenstellende und langzeitstabile Lösung erhalten werden konnte. Diese Formulierung zeigte im Vergleich mit Glucopon® 650EC zwar eine leicht verringerte Reinigungsleistung jedoch sehr gute Benetzungseigenschaften bei gleichzeitig geringerer Schaumentwicklung. Diese Ergebnisse wurden durch weitergehende Untersuchungen mit definiertem Schmutz bestätigt. Die Glasreiniger-Rezeptur mit MEL zeigte bezüglich des Klartrockenverhaltens gegenüber den Vergleichsrezepten sogar exzellente Ergebnisse

Die biologische Abbaubarkeit ist ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl von Tensiden zum Einsatz in WPR- bzw. KPM-Anwendungen. Aus diesem Grund wurde die Untersuchung der biologische Abbaubarkeit für ein ausgewähltes MEL-Gemische aus der Kombination von *Stamm 3* mit Öl B mittels CO₂-Entwicklungstest nach OECD 301B bei der LAUS GmbH unter GLP-Bedingungen beauftragt. Dabei wurde MEL mit einer Abbaubarkeit von 79 % nach 28 Tage als vollständig biologisch abbaubar eingestuft.

In der Ökobilanzierung des Prozesses im Labormaßstab wurde die Fermentation mit einem hohen Stromverbrauch als Hauptverursacher der Umweltlast identifiziert. Durch eine Verkürzung der Fermentationsdauer von 35 d auf 10 d ist hier ein Einsparpotential der Umweltlasten zwischen 53 und 72 % möglich. Bedingt durch Skaleneffekte ist die Produktion im Pilotmaßstab deutlich effizienter im Vergleich zum Labormaßstab. Hier ist neben der Fermentation auch der Schaumabscheider Hauptverursacher der Umweltlast und birgt großes Einsparpotential.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

In sechs Vorträgen wurden von Dr.-Ing. S. Zibek Teilergebnisse des Projektes der Fachwelt vorgetragen:

- Straßburg 2018; BIOKET
- Orlando 2017; AOCS
- Berlin 2017; SEPAWA
- Fulda 2016; SEPAWA
- Halle 2016; Bioeconomy Conference der BioEconomy e.V.
- Koblenz 2016; Himmelfahrtstagung: New Frontiers for Biotech-Processes der Dechema

Fazit

Die Untersuchungen unterschiedlicher MEL-Varianten, die anhand der Kultivierung mehrerer Biotensidbildender Mikroorganismen mit verschiedenen Substraten erhalten wurden, haben zu insgesamt fünf geeigneten MEL-Mischungen für Anwendungen in KPM und WPR geführt.

Im Bereich der KPM konnten Shampoo-Formulierungen mit MEL hergestellt werden, die im Vergleich zur Originalrezeptur nahezu identische Eigenschaften, z.B. hinsichtlich ihres pH-Werts, der Viskosität und der Dichte aufwiesen. Die Einarbeitung eines ausgewählten MEL-Gemisches in einer Reinigungsmilch der Börlind Gesellschaft für kosmetische Erzeugnisse mbH lieferte ebenfalls gute Ergebnisse.

Im Anwendungsgebiet der WPR wurden die MEL-Varianten vor allem hinsichtlich ihrer Eignung in Glasreinigerformulierung bewertet. In dieser Anwendung spielen unter anderem die Tensidlöslichkeit, die Reinigungsleistung und die Kompatibilität mit anderen Inhaltsstoffen der Endformulierung eine wichtige Rolle. Im Verlauf des Projektes konnte eine vielversprechende Glasreinigerformulierung entwickelt werden, die im Vergleich zu einer Referenzformulierung eine akzeptable Reinigungsleistung zeigte und sogar ein verbessertes Klartrockenverhalten aufwies.

Die Untersuchungen der beteiligten Partner zeigen zusammenfassend, dass der Ersatz von sich bereits in der Anwendung befindenden Tensiden durch MEL je nach Anwendungsgebiet möglich ist. Dieser Ersatz kann je nach Anwendung und etablierter Formulierungsrezeptur Anpassungen in der Zusammensetzung erforderlich machen. Eine gezielte Entwicklung neuer Formulierungsrezepturen auf Basis von MEL als Tensid ist nach Einschätzung der Projektpartner sowohl im Bereich der KPM als auch der WPR möglich.

Deutsche Bundesstiftung Umwelt ● An der Bornau 2 ● 49090 Osnabrück ● Tel 0541/9633-0 ● Fax 0541/9633-190 ● <http://www.dbu.de>

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Zusammenfassung	12
2 Einleitung	16
2.1 Motivation.....	16
2.2 Zielsetzung und Aufgabenstellung.....	17
3 Angewandte Methoden und Arbeitsschritte	19
3.1 Biotechnologische Herstellung und Aufarbeitung der MEL.....	19
3.1.1 Biotechnologische Herstellung der MEL.....	19
3.1.2 Aufarbeitung der MEL.....	19
3.1.3 Modifizierung der MEL.....	20
3.1.4 Bestimmung der Reinheit mittels DC.....	20
3.2 Chemische und Biologische Charakterisierung der MEL.....	21
3.2.1 Physikalisch-chemische Charakterisierung der MEL.....	21
3.2.2 Biologische Charakterisierung der MEL.....	22
3.3 Testung der MEL in kosmetischen Grundlagen.....	32
3.4 Testung der MEL in WPR.....	34
3.5 Ökobilanzierung (Fraunhofer-Institut für Bauphysik, Abt. Ganzheitliche Bilanzierung).....	37
4 Ergebnisse	39
4.1 Anforderungen an MEL.....	39
4.2 Biotechnologische Herstellung der MEL.....	40
4.2.1 Aufarbeitung der MEL.....	42
4.2.2 Modifizierung der MEL.....	43
4.2.3 Bemusterung der Projektpartner.....	45
4.3 Chemische und biologische Charakterisierung der MEL.....	46
4.3.1 Physikalisch-chemische Charakterisierung der MEL.....	46
4.3.2 Biologische Charakterisierung der MEL.....	52
4.4 Testung der MEL in kosmetischen Grundlage.....	70
4.5 Testung der MEL in WPR.....	78
4.6 Ökobilanzierung (Fraunhofer-Institut für Bauphysik, Abt. Ganzheitliche Bilanzierung).....	82

5	Diskussion	88
5.1	Erreichung der definierten Meilensteine	88
5.2	Erfüllung der Arbeiten laut Projektplan bzw. Veränderungen bezüglich des ursprünglichen Projektplans	88
5.3	Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern	90
6	Stellungnahme zu den Bewilligungsaufgaben	91
6.1	Biologische Abbaubarkeit	91
6.2	Reststoffe als Substratgewinnung	92
6.3	Ökobilanzierung	94
6.4	Antimikrobielle Wirkung	96
6.5	Auswahl Endtensid	97
7	Öffentlichkeitsarbeit	99
8	Fazit	100
9	Literaturverzeichnis	103
10	Anhang	106
10.1	Fraunhofer IBP – Ergänzungen zu den Ergebnissen der Bilanzierung bezogen auf je 1 kg MEL Rohextrakt	106
10.1.1	Treibhauspotential (Global Warming Potential, GWP)	106
10.1.2	Versauerungspotential (Acidification Potential, AP)	107
10.1.3	Eutrophierungspotential (Eutrophication Potential, EP)	107
10.1.4	Fossiler Primärenergiebedarf (PE_{fossil})	108
10.1.5	Abiotisches Ressourcenverbrauchspotential (ADP_{elements})	109
10.2	Börlind – Ergänzungen zur Untersuchung auf zellproliferierende Eigenschaften II (Originalbericht: Bioalternatives)	110
10.3	Sonett - Ergänzungen zur Untersuchung der aeroben biologischen Abbaubarkeit einer ausgewählten MEL-Variante Charge 78-41 (Originalbericht der LAUS GmbH)	129

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Repräsentative Bilder der Oberflächenbehandlung der künstlichen Wunde (rot umgrenzt) auf NHEK zu T0 und nach 24-stündiger Inkubation.....	28
Abbildung 2: MEL-Produktion unterschiedlicher Spezies-Substrat-Kombinationen: MEL-Konzentrationen (A), Produktionsraten (B), Reinheit (C) und MEL-Varianten im Gemisch (D) von ausgewählten <i>Pseudozyma</i> -Stamm-Pflanzenöl-Kombination.....	40
Abbildung 3: Bildung von MEL-Beads; Links: <i>Stamm 1</i> mit Öl A; Rechts: <i>Stamm 1</i> mit Öl B.	41
Abbildung 4: Dünnschichtchromatographie der Probe 0112; links: Rohextraktprobe vor Aufreinigung mittels präparativer Chromatographie; rechts: Gesammelte Fraktionen nach Aufreinigung.	42
Abbildung 5: Enzymatische Modifizierung der MEL bei 40 °C; links: 0112 Rohextrakt; Mitte: 6411; rechts: 5541.	43
Abbildung 6: Alkalische Modifizierung der MEL mit NaOH bei pH 11 und 50 °C; links: 0112 Rohextrakt; Mitte: 6411; rechts: 5541.....	44
Abbildung 7: Änderung der MEL-Zusammensetzung in der Probe 0112 (Rohextrakt) nach Langzeit-Lagerung.....	44
Abbildung 8: HLB-Werte der verschiedenen MEL-Chargen, hergestellt im Schüttelkolben ..	48
Abbildung 9: cmc-Werte der verschiedenen MEL-Chargen, hergestellt im Schüttelkolben...	49
Abbildung 10: Minimale Oberflächenspannungen der verschiedenen MEL-Chargen, hergestellt im Schüttelkolben.	49
Abbildung 11: Schäumvermögen der verschiedenen MEL-Chargen, hergestellt im Schüttelkolben.	50
Abbildung 12: Schaumstabilität der verschiedenen MEL-Chargen, hergestellt im Schüttelkolben	51
Abbildung 13: Zytotoxizität von MEL bei (A) Fibroblasten und (B) Keratinozyten.	53
Abbildung 14: Pyrogene Rückstände und allergene Wirkung der MEL.	63
Abbildung 15: Zellproliferierende Eigenschaften ausgewählter MEL.	65
Abbildung 16: Antibakterielle Eigenschaften von MEL.	66
Abbildung 17: Antimikrobielle Aktivität gegenüber <i>C. acnes</i>	67
Abbildung 18: Antifungale Wirkung der untersuchten MEL.	68
Abbildung 19: Activity-Selectivity Assay.....	69
Abbildung 20: Einfluss von MEL auf die Original-Shampoo-Rezeptur.	70
Abbildung 21: Ausfällungen der Shampoo-Rezeptur bei einem MEL-Anteil von 5 %.	70
Abbildung 22: Einfluss von Zitronensäure auf eine Shampoo-Rezeptur mit 3 % MEL.....	71
Abbildung 23: Ausfällungen der Shampoo-Rezeptur mit einem MEL-Anteil von 3 %	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 24: Shampoo-Rezepturen mit 3 % MEL mit und ohne Lösevermittler Plantacare® 810 UP.....	73
Abbildung 25: Shampoo-Rezepturen mit 3 % MEL mit einer Reinheit von 80 % und 100 %.	74
Abbildung 26: Stabilitätsprüfung verschiedener Augenserumrezepturen.....	74
Abbildung 27: Vergleich von Reinigungsmilchvarianten mit unterschiedlich hohem Gehalt an MEL.	76
Abbildung 28: Vergleich von Reinigungsgel-Formulierungen mit unterschiedlich hohem Gehalt an MEL.....	78
Abbildung 29: Wasserlöslichkeit von 0,8 % MEL.....	79
Abbildung 30: Vergleich der Wasserlöslichkeit von 0,8 % MEL.....	79
Abbildung 31: Biologische Abbaubarkeit am Beispiel von MEL der Charge 7841.	81
Abbildung 32: Treibhauspotential von 1 kg MEL Rohextrakt in drei Szenarien.....	83
Abbildung 33: Eutrophierungspotential (EP) von 1 kg MEL Rohextrakt in drei Szenarien. ...	84
Abbildung 34: Fossiler Primärenergiebedarf von 1 kg MEL.....	84
Abbildung 35: Produktion und Entsorgung von MEL, Labormaßstab, Treibhauspotential. ...	85
Abbildung 36: Produktion und Entsorgung von MEL, Pilotmaßstab, Treibhauspotential.....	86
Abbildung 37: Umweltauswirkungen durch Upscaling der MEL-Produktion.....	87
Abbildung 38: DC Auftragung unterschiedlicher MEL-Extrakte aus der Kultivierung mit hydrophilen (zuckerhaltigen) Reststoffen (experimentelle Ergebnisse aus Projekt „O4S“). ...	92
Abbildung 39: Äquivalenzfaktoren für Strom und Transportleistung relativ zum Einsparpotential von lastenfreien Sekundärrohstoffen.	93
Abbildung 40: Umwelteinwirkungen von 1 kg MEL, Vergleich über Labor- und Pilotmaßstab.	94
Abbildung 41: Vergleich des Treibhauspotentials von APG und MEL (funktionelle Einheit: 1 kg).	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bedingungen der Dünnschichtchromatographie	21
Tabelle 2: Zusammenfassung der Testbedingungen zur Untersuchung der Zytotoxizität.....	24
Tabelle 3: Von Bioalternatives vorgeschlagene Klassifizierung der Wirkung bei der Auswertung der relativen Expression.....	30
Tabelle 4: Bemusterungstabelle für die erste Projektphase zur Auswahl geeigneter Biotensidvarianten.	45
Tabelle 5: Bemusterung der Partner mit vielversprechenden Biotensidvarianten für die gewünschte Anwendung.....	46
Tabelle 6: Charakterisierte MEL-Chargen.....	47
Tabelle 7: Wirkung der Verbindungen Biotensid <i>Stamm 2</i> (Öl D) und Biotensid <i>Stamm 3</i> (Öl C) auf die Vitalität der Keratinozyten (K593) nach 24 Stunden der Inkubation.	54
Tabelle 8: Wirkung der Verbindungen Biotensid <i>Stamm 2</i> (Öl D) und Biotensid <i>Stamm 3</i> (Öl C) auf die Vitalität der Keratinozyten (K341) nach 48 Stunden der Inkubation.	55
Tabelle 9: Wirkung der Verbindungen Biotensid <i>Stamm 2</i> (Öl D) und Biotensid <i>Stamm 3</i> (Öl C) auf die Keratinozyten-Migration (K593) nach 0, 14, 18 und 24 Stunden der Inkubation...	57
Tabelle 10: Wirkung des Referenz-Calciumchlorids auf das Genexpressionsprofil in normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (K341).	59
Tabelle 11: Wirkung der Verbindung Biotensid <i>Stamm 2</i> (Öl D) auf das Genexpressionsprofil in normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (K341).	61
Tabelle 12: Wirkung der Verbindung Biotensid <i>Stamm 3</i> (Öl C) auf das Genexpressionsprofil in normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (K341).	62
Tabelle 13: Charakterisierung verschiedener Formulierungsvarianten einer Reinigungsmilch und Einfluss eines teilweisen oder kompletten Ersatzes von Blanova® 1200 durch MEL (Charge 6711).....	75
Tabelle 14: Charakterisierung verschiedener Formulierungsvarianten eines Reinigungsgels für Mischhaut und Einfluss eines teilweisen Ersatzes von Blanova® 1200 und Amisoft® CS 22 bzw. nur Blanova® 1200 durch MEL (Charge 6711).	77
Tabelle 15: Aktualisierter Zeit- und Arbeitsplan.....	102

Abkürzungsverzeichnis

¹ H-NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
<i>A. brasiliensis</i>	<i>Aspergillus Brasiliensis</i>
ADP _{elements}	Abiotischer Ressourcenverbrauch
AP	Versauerungspotentia
APG	Alkylpolyglykosiden
BHI	Brain Heart Infusion Medium
BrDU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
<i>C. acnes</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CC50	Zytotoxische Konzentration, bei der 50 % der Zellen vital sind
CFU	Koloniebildende Einheit
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration
DC	Dünnschichtgromatographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EE	Erneuerbarer Energiemix
EP	Eutrophierungspotential
EU	Europäische Union
FDA	Fluosceindiacetat
GC-FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor
GWP	Treibhauspotential
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes
HK	Hauptkultur
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
HRP	Meerrettichperoxidase
IC50	Inhibitorische Konzentration, bei der 50 % der Mikroorganismen sterben
INCI	Internationale Nomenklatur für kosmetische Inhaltsstoffe
INT	2-(Iodophenyl)-3-(-4-nitrophenyl)-5-phenyltatrazolumchlorid
KPM	Körperpflegemittel
LB	Lysogeny Broth Medium
LPS	Lipopolysaccharid
LUC	Land Use Change
MEL	Mannosylerythritollipide
MIC50	Minimale inhibitorische Konzentration, bei der 50 % der Mikroorganismen sterben
NaOH	Natronlauge
NHEK	Normale humane epidermale Keratinozyten
NIH 3T3	Mausfibroblastenzelllinie
n.b.	Nicht bestimmt
n.i.	Negativkontrolle (nicht induziert)
o. Schaum	Fermentation ohne Schaumabscheider
PE _{fossil}	Fossiler Primärenergiebedarf
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
RPMI	Zellkulturmedium, das am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat

Abkürzungsverzeichnis

TLR	Toll-like Rezeptor
TNFalpha	Tumornekrosefaktor alpha
SI	Selektivitätsindex, Maß für die Selektivität eines Wirkstoffes
VE	vollentsalzt
WPR	Wasch-, Pflege- und Reinigungsmittel
YPD	Yeast Extrakt Potatoe Dextrose Medium

1 Zusammenfassung

Die Biotenside Mannosylerythritolipide (MEL) werden als komplexe Strukturgemische oberflächenaktiver Glykolipide von beispielsweise *Pseudozyma ssp.* gebildet. Im Rahmen des Projektes wurden verschiedene MEL-Varianten für ausgewählte Anwendungen in Körperpflegemitteln und Kosmetika (KPM) sowie in Wasch-, Pflege- und Reinigungsmitteln (WPR) untersucht. Dabei standen die emulgierenden und waschaktiven Eigenschaften der Biotenside im Vordergrund. Des Weiteren wurden Untersuchungen hinsichtlich der biologischen Aktivität unterschiedlicher MEL-Varianten ergänzt, da eine gezielt einsetzbare biologische Aktivität einen deutlichen Mehrwert für verschiedene Anwendungsgebiete darstellen kann.

Zu Beginn des Projekts wurden zunächst die Anforderungen an die MEL in WPR und KPM gemeinsam mit allen Projektpartnern spezifiziert. Dies dient als Basis zur späteren Auswahl geeigneter MEL für die gewünschten Anwendungen. Zur Herstellung einer größeren Produktpalette mit unterschiedlichen Eigenschaften der MEL wurden sowohl unterschiedliche Stämme als auch unterschiedliche Substrate wie pflanzliche Öle oder Fettsäuren eingesetzt. Die Kombination von drei *Pseudozyma*-Stämmen (*Stamm 1* - *Stamm 3*) und fünf Pflanzenölen (Öl A – Öl E) als Substraten resultierte nach Fermentation in unterschiedlichen MEL-Mischungen aus MEL-A, MEL-B, MEL-C, MEL-D und MEL-X mit einer Reinheit > 50 %. Hierbei erzielten zwei Stämme mit bis zu 28 g/L hohe MEL-Konzentrationen und gute Produktionsraten. Mittels präparativer Chromatographie wurden MEL bis zu einer Reinheit von 97–100 %, bei einem Masseverlust von 1-2 %, aufgereinigt.

Die hergestellten MEL wurden physikalisch-chemisch hinsichtlich des HLB-Wertes, der Oberflächenspannung, der kritischen Mizellbildungskonzentration und ihrem Schaumverhalten (Schäumvermögen, Schaumstabilität) im Vergleich zum Referenzensid Glucocon® 650EC untersucht und charakterisiert. Der HLB-Wert liegt für alle untersuchten MEL zwischen 5,0 und 8,5. Sie werden damit als eher lipophil eingestuft und eignen sich damit als W/O-Emulgatoren. Ihre CMC-Werte liegen zwischen 1,5 und 4,0 mg/L und damit deutlich niedriger als das Referenzensid Glucocon® 650EC. Damit muss zur Erreichung der minimalen Oberflächenspannung eine geringere Tensidmenge zugesetzt werden. Die minimalen Oberflächenspannungen der untersuchten MEL liegen zwischen 25–32 mN/m. Bei dem Schaumverhalten variieren die MEL stark von wenig bis stark schäumend mit instabilem bis gut stabilem Schaum. MEL aus *Stamm 1* mit Öl C zeigt Schaumeigenschaften analog dem Glucocon® 650EC.

Bei der biologischen Charakterisierung wurden die Zytotoxizität der MEL auf Fibroblasten und Keratinozyten untersucht, sowie etwaige pyrogene Rückstände analysiert. Untersuchungen zur allergenen, antibakteriellen (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. acnes*) und antifungalen Wirkung (*A. brasiliensis*, *C. albicans*) wurden ebenfalls durchgeführt. Im Vergleich zu Glucocon® 650EC sind die untersuchten MEL weniger gut zellverträglich für Fibroblasten.

Zusammenfassung

Für Keratinozyten besitzen MEL aus *Stamm 1* mit Öl A und Öl D sowie MEL aus *Stamm 2* mit Öl B eine äquivalente oder sogar bessere Zellverträglichkeit wie die Referenz. Weiter wurden weder pyrogene Rückstände noch eine allergene Wirkung der MEL nachgewiesen. Die untersuchten MEL zeigen gegenüber *E. coli* und *A. brasiliensis* keine antimikrobiellen Eigenschaften. Gegen *P. aeruginosa* wirken sieben der untersuchten MEL antibakteriell, gegen *S. aureus* weisen sechs MEL antimikrobielle Eigenschaften auf. Antifungale Wirkung gegen *C. albicans* wurde für ein MEL-Gemisch nachgewiesen. Mit MIC50-Werten von weniger als 0,001 g/L besitzen vier der untersuchten MEL-Gemische antibakterielle Eigenschaften gegen den Akneerreger *C. acnes*,

Eine Verbesserung der physikalisch-chemischen Eigenschaften konnte durch eine postfermentative Modifikation erreicht werden. Durch enzymatische Modifizierung mittels Lipasen, durch eine saure Hydrolyse der Estergruppen sowie durch eine alkalische Modifizierung mit Natronlauge können hydrophilere MEL mit einem erhöhten MEL-C bzw. MEL-D Anteil erzielt werden.

MEL wurden auf ihre Eignung in zwei unterschiedlichen kosmetischen Grundlagen, als Tensid in einem Shampoo und als Emulgator in einem Augenserum, getestet. Im Augenserum besitzt Roh-MEL nur schwache Emulgator-Eigenschaften. Die Anwendung eines MEL-Rohextraktes zum kompletten Ersatz des Tensids in einer typischen Shampoo-Rezeptur bewirkte eine niedrigere Viskosität, führte aber zu Präzipitaten und zu einem geringeren pH-Wert der Rezeptur. Ein partieller Ersatz von Alkylpolyglucosiden hingegen zeigte verbesserte Eigenschaften und ein gleichwertiges Schaumverhalten. Im Gegensatz dazu führte ein teilweiser Ersatz eines aminosäurebasierten Tensids mit MEL in höheren Konzentrationen zu Präzipitaten, durch Zugabe von Lösungsvermittlern wurde jedoch eine klare Lösung erhalten. Weiter haben der Aufreinigungsgrad und die Ölpräsenz einen Einfluss auf die physikalisch-chemischen Parameter des Shampoos. Werden in der Shampoo-Rezeptur 3 % MEL von *Stamm 1* mit Öl A in einer Reinheit von 100 % (Abwesenheit von Ölbestandteilen) anstelle des Tensids eingesetzt, sind die Parameter des Shampoos wie pH-Wert, Viskosität und Dichte nahezu identisch der Originalrezeptur. Eine Einarbeitung des aufgereinigten MEL-Biotensid-Gemisches aus der Kombination von *Stamm 1* mit Öl A und einer Reinheit von 100% ergab somit in einem Shampoo eine gleichbleibende Qualität im Vergleich zur Referenzrezeptur. Des Weiteren zeigte der Ersatz von Plantacare® 1200 durch ein MEL-Biotensid-Gemisches aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge: 6711) in einer Reinigungsmilch von gute Ergebnisse. In eine klare Reinigungsgel-Formulierung für Mischhaut ließ sich dasselbe MEL-Gemisch nur unter Ausbildung einer Trübung einbringen. Auf Basis der Untersuchung verschiedener MEL-Gemische in unterschiedlichen KPM-Anwendungen wird davon ausgegangen, dass eine Einarbeitung dieser MEL-Biotenside in neu formulierte kosmetische Formulierungen problemlos möglich ist. Aufgrund dessen plant die Börlind Gesellschaft für kos-

Zusammenfassung

metische Erzeugnisse mbH eine Einarbeitung in einer Körperserie und einer Haarserie sobald INCI's gemeldet sind und die Dokumentation (z.B. Sicherheitsdatenblatt) verfügbar ist.

Für einen Einsatz in WPR wurden ausgewählte MEL bei unterschiedlichen pH-Werten auf ihre Wasserlöslichkeit und Stabilität untersucht. Alle MEL bilden unabhängig von der Art des verwendeten Öls und des Aufreinigungsgrads eine Trübung. Die Anwendung eines Lösungsvermittlers wirkt sich positiv auf die Löslichkeit aus wie auch teilweise die Erhöhung des pH-Wertes. Mit MEL aus der Umsetzung von Öl B mit *Stamm 3* wurde ein Tensid identifiziert, das gut wasserlöslich und kalkunempfindlich ist und sich für einen Einsatz in WPR eignet. Daher wurde dieses MEL-Gemisch auch zur Formulierung eines Glasreinigers eingesetzt. Es zeigte sich, dass durch Zugabe geringer Mengen EtOH eine zufriedenstellende und langzeitstabile Lösung der MEL-induzierten Trübung erhalten werden konnte. Diese Formulierung zeigte im Vergleich mit Glucocon® 650EC zwar eine leicht verringerte Reinigungsleistung jedoch sehr gute Benetzungseigenschaften bei gleichzeitig geringerer Schaumentwicklung. Diese Ergebnisse wurden durch weitergehende Untersuchungen mit definiertem Schmutz bestätigt. Die Glasreiniger-Rezeptur mit MEL zeigte bezüglich des Klartrockenverhaltens gegenüber den Vergleichsrezepten sogar exzellente Ergebnisse. Die MEL-basierte Rezeptur zeigte sich bei einer Temperatur von 40 °C über einen Zeitraum von 3 Monaten stabil, bei einem pH von 6 waren nach diesem Zeitpunkt Kolloidteilchen zu erkennen. Die biologische Abbaubarkeit wurde ebenfalls in standardisierten Tests untersucht. MEL wurde dahingehend als vollständig biologisch abbaubar eingestuft.

Des Weiteren wurde die biologische Abbaubarkeit eines ausgewählten MEL-Gemisches untersucht, weil die Abbaubarkeit ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl von Tensiden zum Einsatz in WPR- bzw. KPM-Anwendungen ist. Die Untersuchung erfolgte mittels CO₂-Entwicklungstest nach OECD 301B. Sie wurde von Sonett bei der LAUS GmbH beauftragt und unter GLP-Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde MEL aufgrund einer Abbaubarkeit von 64 % nach 10 Tagen und 79 % nach 28 Tage als vollständig biologisch abbaubar eingestuft. Außerdem wurde das ausgewählte MEL-Gemisch bei einer Konzentration von 32,2 mg/L als nicht toxisch gegenüber dem Inokulum bewertet.

Mit Hilfe einer Ökobilanzierung wurde der Lebenszyklus von MEL als Inhaltsstoff von WPR und KPM abgebildet und die assoziierten ökologischen Wirkungen abgeschätzt. Die Produktion von MEL wurde hierbei zunächst auf Labormaßstab betrachtet und auf die Größenordnung einer Pilotanlage modelliert. In der Ökobilanzierung des Prozesses im Labormaßstab wurde die Fermentation mit einem hohen Stromverbrauch als Hauptverursacher der Umweltlast identifiziert. Durch eine Verkürzung der Fermentationsdauer von 35 d auf 10 d ist hier ein Einsparpotential der Umweltlasten zwischen 53 und 72 % möglich. Bedingt durch Skaleneffekte ist die Produktion im Pilotmaßstab deutlich effizienter im Vergleich zum Labormaßstab.

Zusammenfassung

Im Labormaßstab ist neben der Fermentation auch der mechanische Schaumabscheider Hauptverursacher der Umweltlast und birgt großes Einsparpotential.

2 Einleitung

2.1 Motivation

Bei Körperpflegemitteln und Kosmetika (KPM) und Wasch-, Pflege- und Reinigungsmitteln (WPR) in Haushalt und Gewerbe besteht eine vielfältige Produktpalette. Ihre zentralen Inhaltsstoffe sind waschaktive Substanzen Seifen und Tenside. Sie ermöglichen die Bildung von Dispersionen und Emulsionen und wirken als Lösungsvermittler zur Entfernung von Schmutz und Fettpartikeln.

2011 wurden in deutschen Haushalten 197.400 Tonnen und in der Industrie 39.500 Tonnen reine Tenside in WPR verbraucht [1]. Hinzu kamen weitere 122.600 Tonnen Tenside in KPM [1]. Diese Mengen enden meist unverändert im Abwasser und werden von den Kläranlagen nur partiell degradiert. Tenside und die in der Kläranlage entstehenden Spaltprodukte weisen oftmals eine hohe aquatische Toxizität auf, das heißt sie sind giftig für Gewässerorganismen wie Fische, Algen und Krebse. Diese nicht-abbaubaren anthropogenen Stoffe sind auch für den Menschen problematisch, da in Deutschland Oberflächenwasser zur Gewinnung von Trinkwasser verwendet wird und diese Stoffe dann bei der Aufbereitung des Trinkwassers entfernt werden müssen.

WPR werben oft mit „vollständiger biologischer Abbaubarkeit“, die in der EU-Detergenzienrichtlinie festgelegt ist. „Vollständig“ heißt hier aber nicht zu 100 %. Laut Vorschrift müssen die Tenside nach einem Monat nur zu 60 % abgebaut sein. So bleiben bei synthetischen Tensiden wie linearen Alkylbenzolsulfonaten nach dem Abbau noch 5-10 % der Molekülstruktur erhalten, die im Sediment von Flüssen akkumulieren können [2]. Renkin *et al.* belegte hingegen, dass die bereits kommerziell produzierten mikrobiellen Biotenside Sophorolipide und Rhamnolipide vollständig abgebaut werden [3]. Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass Mannosylerythritollipide (MEL) durch Belebtschlamm innerhalb von 5 Tagen vollständig biologisch abgebaut werden können [4].

Durch eine hohe Nachfrage nach umweltfreundlichen Produkten und einem stetig steigenden Ölpreis werden zunehmend biobasierte, synthetische Tenside auf Basis nachwachsender Rohstoffe wie Palmkernöl und Kokosfett hergestellt. Ihre Produktion steht häufig in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion und erfordert einen gesteigerten Flächenbedarf, der zur Zerstörung ökologisch wertvoller Landschaften wie tropischen Urwäldern führt. In diesen Ländern entstehen so sozial-politische Spannungen und Abhängigkeiten von Industrienationen. Zur MEL-Herstellung hingegen können prinzipiell heimische nachwachsende Rohstoffe, biologisch abbaubare Abfälle und Nebenprodukte der Landwirtschaft verwendet werden. Durch Letztere kann potentiell das Abfallaufkommen verringert und der Druck auf Nahrungsmittel wie Raps gesenkt werden.

2.2 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Natürlich mikrobiell hergestellte MEL werden von Hefen und Pilzen wie *Pseudozyma* spp. und *Ustilago* spp. als komplexe Gemische oberflächenaktiver Glykolipide gebildet. In diesem Projekt wurde das Potential von MEL als Tensid, Emulgator und Konservierungsmittel erschlossen. Hierzu wurden verschiedene MEL-Varianten für ausgewählte Anwendungen in KPM sowie in WPR untersucht. Dabei standen ihre emulgierenden und waschaktiven sowie ihre biologischen Eigenschaften wie z.B. ihre antimikrobiellen Aktivitäten im Vordergrund.

Ausschlaggebend für die Zusammensetzung und damit für emulgierende und dispergierende Eigenschaften der MEL sind der Produktionsstamm, die verfahrenstechnischen Fermentationsparameter, die Substrate wie Zucker, Öle oder Fettsäuren sowie der Aufarbeitungsprozess. Diese variable Vorgehensweise ermöglicht es, Biotenside mit den für die spätere Anwendung gewünschten Eigenschaften herzustellen.

Mit diesem Projekt wurden MEL für eine Anwendung in der Kosmetik- und Reinigungsmittelindustrie erstmalig genauer untersucht und in ersten Produktformulierungen eingesetzt. Einige Vorteile, die gegenüber konventionellen Tensiden erwartet wurden, waren:

- Herstellung von Biotensiden mit vollständiger biologischer Abbaubarkeit
- Ökoeffiziente Herstellung von Tensiden und Ersatz von erdölbasierten Tensiden
- Energieeffiziente Herstellung
- Bessere Humanverträglichkeit von KPM und WPR sowie geringere Umweltbelastung durch eine Reduktion von Produktinhaltsstoffen

Zu einem aussagekräftigen Vergleich wurden herkömmliche Tenside in Produktformulierungen (KPM und WPR) durch MEL partiell oder komplett ersetzt. Zudem wurden ihre biologischen Eigenschaften evaluiert, um sie gezielt aufgrund ihrer beispielsweise als zellproliferierenden oder antimikrobiellen Eigenschaften vor allem KPM-Produkten einzusetzen. Die einzelnen Aufgaben hierzu sind:

- Spezifikation der MEL für den unterschiedlichen Einsatz in KPM und WPR
- Biotechnologische Herstellung von MEL mit Variation in drei *Pseudozyma*-Stämmen und unterschiedlichen Ölsubstraten für ein erstes Screening sowie Bereitstellung von größeren Menge ausgewählter Ziel-MEL für die unterschiedlichen Anwendungen
- Physikalisch-chemische und biologische Charakterisierung der MEL im Hinblick von Löslichkeit, minimaler Oberflächenspannung, kritische Mizellbildungskonzentration und Schaumvermögen sowie Zytotoxizität, allergener Wirkung, zellproliferierender und antimikrobieller Eigenschaften
- Gezielte chemische oder enzymatische Modifizierung der Glykolipide zur Verbesserung ihrer hydrophilen Eigenschaften

- Testung der Biotenside in kosmetischen Grundlagen wie Shampoo oder Reinigungsmilch zur Überprüfung in wie weit bisher eingesetzte Tenside ersetzt werden können
- Untersuchung der Eignung von MEL in WPR wie Glasreiniger hinsichtlich Löslichkeit, Kalkstabilität, Reinigungsleistung und biologischer Abbaubarkeit
- Ökobilanzierung im Herstellungsprozess und Vergleich zu Alkylpolyglykosiden (APG)

3 Angewandte Methoden und Arbeitsschritte

In diesem Abschnitt wird die fermentative Herstellung der MEL und die chromatographische Aufarbeitung (Abschnitt 3.1). In dem darauffolgenden Unterkapitel 3.2 werden die Methoden zur chemischen und biologischen Charakterisierung näher erläutert. Der Beschreibung zur Modifikation der MEL-Gemische (Abschnitt 3.1.3) folgen Protokolle zur Testung der MEL in kosmetischen Grundlagen und WPR in Kapitel 3.3 und 3.4. Die Methodik zur Ökobilanzierung ist in 3.5 beschrieben.

3.1 Biotechnologische Herstellung und Aufarbeitung der MEL

Im Folgenden ist die fermentative Herstellung (Kapitel 3.1.1) und die Aufarbeitung verschiedener MEL-Gemische (Abschnitt 3.1.2) erläutert. Um eine Bewertung der MEL-Gemische und der Aufreinigung vornehmen zu können müssen die Verunreinigungen analysiert werden. Die Methode mittels Dünnschichtchromatographie (DC) ist in Abschnitt 3.1.4 erläutert.

3.1.1 Biotechnologische Herstellung der MEL

Die Herstellung von MEL erfolgte mit drei verschiedenen *Pseudozyma*-Stämmen in Doppelbestimmung. Es wurden insgesamt sieben Substrate zur MEL-Produktion untersucht: Öl A, Öl B, Öl C, Öl D, rohes Öl E, Linolsäure mit einer Reinheit von > 99 % und Caprylsäure.

Der jeweilige *Pseudozyma* Stamm wurde zuerst auf einer Agarplatte bei 30°C inkubiert. Mit einer Impföse wurden anschließend Schüttelkolben für die Vorkultur aus den Agarplatten angeimpft. Nach zwei weiteren Tagen Inkubation wurde schließlich die Hauptkultur in 500 bzw. 1000 mL Schüttelkolben mit Komplexnährmedium angeimpft, welches 8 % (v/v) Pflanzenöl beinhaltete. Das Pflanzenöl wurde separat vom Komplexnährmedium für 10 min autoklaviert und erst beim Start der Kultivierung hinzugefügt. Um einen möglichst hohen Umsatz des Pflanzenöls zu MEL zu erreichen und das Langzeitverhalten zu beobachten, wurde die Kultivierung für 20-30 Tage durchgeführt. Um den Verlauf der MEL-Produktion mittels Dünnschichtchromatographie zu überprüfen, wurden regelmäßig Proben der Kultivierung entnommen. Zur Gewinnung der MEL durch Extraktion wird die gesamte Kulturbrühe (Kapitel 3.1.2) verwendet.

3.1.2 Aufarbeitung der MEL

Die Kulturbrühe der Fermentation wurde zunächst mit Salzsäure angesäuert und anschließend mit Lösemittel in einem Schüttelinkubator für 15 min extrahiert. Nach Phasentrennung wurde das MEL-Extrakt mittels Vakuumverdampfer behandelt um die Lösemittelrückstände zu entfernen. Das so gewonnene Rohextrakt wurde mittels Dünnschichtchromatographie

(DC) analysiert und densitometrisch über eine Bildverarbeitungssoftware ausgewertet. Als Kalibrierstandard diente reines MEL mit einem Konzentrationsbereich von 5-20 g/L.

Bei einer MEL-Reinheit <90% wurde das Rohextrakt zusätzlich mittels präparativer Chromatographie (Silica-Gel) aufgereinigt. Pro Aufreinigungsbatch konnten bis zu 50 g Rohextrakt, gelöst in einem organischen Lösemittel, aufgereinigt werden. Verunreinigungen, wie restliches Pflanzenöl und freie Fettsäuren, wurden nach Beladen der Säule mit demselben Lösemittel eluiert. Die nachfolgenden Fraktionen wurden mit einem anderen Lösemittel eluiert und enthielten das aufgereinigte MEL. Das Lösemittel der MEL-Fraktionen wurde mit einem Rotationsverdampfer entfernt und konnte anschließend recycelt werden. Die einzelnen Fraktionen wurden für die Zusammensetzungsanalyse mittels DC untersucht.

3.1.3 Modifizierung der MEL

Die Modifizierung von MEL wurde von Günther [12] adaptiert. Für die enzymatische Modifizierung von MEL wurden Lipasen verwendet. Die in Ethanol gelösten MEL wurden für unterschiedliche Zeiten (24, 48 und 72 h) unter Schütteln bei 40 °C enzymatisch behandelt und anschließend auf ihre Zusammensetzung untersucht. Als Referenz diente unbehandeltes MEL.

Für die alkalische Modifizierung wurde MEL zuerst in VE Wasser gelöst bzw. dispergiert. Danach wurde der pH-Wert mit Natronlauge (NaOH) auf pH 11 eingestellt. Nach Einstellen des pH-Werts wurde zunächst eine Nullprobe entnommen. Die Proben wurden dann bei 50°C für 24h unter Schütteln inkubiert. Nach 24 h wurden 100 µL Probe entnommen und der pH erneut eingestellt. Nach weiteren 24 h erfolgte eine zweite Probenahme sowie eine Analyse aller Proben mittels DC. Für die Modifizierung der MEL wurden die folgenden 3 MEL-Gemische verwendet:

- 0112 (Rohextrakt): MEL von *Stamm 1* mit Öl A, nicht chromatographisch aufgereinigt
- 6411 rein, frisch hergestellt (Fraktion 7): MEL von *Stamm 1* mit Öl A, chromatographisch aufgereinigt
- 5541 rein: MEL von *Stamm 3* mit Öl B, chromatographisch aufgereinigt

3.1.4 Bestimmung der Reinheit mittels DC

Das Rohextrakt und die aufgereinigten Proben wurde mittels DC analysiert und mit Hilfe der Software ImageJ (Tabelle 1) die einzelnen MEL-Varianten sowie die Kontaminanten quantifiziert. Als Standard wurde bei der DC MEL mit 5-20 g/L eingesetzt. Die Proben wurden in reinem Ethanol gelöst und, falls notwendig, verdünnt. Die DC-Platten wurden in eine Färbelösung aus Essigsäure, 4-Anisaldehyd und Schwefelsäure getaucht und mittels heißer Luft entwickelten sich die charakteristischen DC-Banden. Anschließend wurde die DC-Platte so-

fort fotografiert. Mit dem Programm ImageJ wurde ein Chromatogramm der Banden erstellt, bei dem die Flächen der Peaks proportional zur MEL Konzentration waren.

Tabelle 1: Bedingungen der Dünnschichtchromatographie

Bedingung	Spezifikation
Laufmittel	Chloroform, Methanol
Färbemittel	Essigsäure, 4-Anisaldehyd, Schwefelsäure
Kamera Bedingungen	Aufnahmezeit 1/15 s, 8 bit Auflösung
Image J Version	1.49 n, National Institute of Health, Bethesda, USA

3.2 Chemische und Biologische Charakterisierung der MEL

In Kapitel 3.2.1 sind die Methoden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung der MEL erläutert, im Abschnitt 3.2.2 folgen die Protokolle zur Bewertung der biologischen Eigenschaften.

3.2.1 Physikalisch-chemische Charakterisierung der MEL

Von den hergestellten Biotensid-Varianten wurden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung folgende Eigenschaften bestimmt: der HLB-Wert, die kritische Mizellbildungskonzentration (cmc), die minimale Oberflächenspannung, das Aufschäumvermögen, die Schaumstabilität und die Löslichkeit.

HLB-Wert

Die hydrophile-lipophile Balance (HLB) ist ein von Griffin eingeführtes Maß für die Bewertung der Wasser- bzw. Öllöslichkeit von vorwiegend nichtionischen Tensiden und die Stabilität von Emulsionen [6]. Der HLB-Wert kann berechnet werden, sofern die chemische Struktur des Tensids eindeutig bekannt ist. Die MEL-Tenside besitzen eine Strukturvielfalt, weshalb der HLB-Wert experimentell bestimmt werden muss. Hierzu gibt es verschiedene Verfahren, wobei nach einem ersten Screening die ¹H-NMR-Methode ausgewählt wurde. Der HLB wurde aus den Integralen der NMR-Signale für die hydrophilen und die hydrophoben Einheiten nachfolgender Formel berechnet:

$$\text{HLB} = [60 \times (I_{3,5-5}/I_{\text{gesamt}})] / [(I_{3,5-5}/I_{\text{gesamt}}) + 2]$$

mit $I_{3,5-5}$ für die Integrationsamplitude der hydrophilen Bereiche gegenübergestellt der Integrationsamplitude aller Protonen der Moleküle.

Oberflächenspannung und CMC

Die Bestimmung der Oberflächenspannung und CMC erfolgte mit einem Tensiometer der Firma Krüss (K12) nach der Wilhelmy-Platten-Methode. Eine Platin-Platte wurde hierbei in

die Tensidlösung getaucht und die Masse des Flüssigkeitsmeniskus gravimetrisch erfasst. Diese Masse kann bei Kenntnis der Plattengeometrie direkt in die Oberflächenspannung umgerechnet werden. Die CMC ist definiert als die Konzentration, ab der eine weitere Tensidzugabe nicht mehr zu einer Verringerung der Oberflächenspannung führt. Messtechnisch wird sie durch kontrollierte Zugabe einer Tensidlösung ins Vorlagengefäß über einen Dosimat und erneuter Messung der Oberflächenspannung bestimmt. Die Proben wurden bei einem pH-Wert von 10 und bei Raumtemperatur gemessen.

Schaumverhalten

Um das Schaumverhalten zu charakterisieren wurden das Schaumvermögen und die Schaumstabilität der MEL-Varianten bewertet. Hierzu wurden jeweils 200 mL Tensidlösung mit ca. 50-facher Tensidmenge der CMC in einem Standzylinder vorgelegt. Über eine Fritte wurde mit einem definierten Gasfluss Stickstoff durch die Lösung geleitet. Das Schaumvermögen wurde über eine Messung der Zeit bestimmt, die benötigt wurde um die 1000 mL-Marke zu erreichen. Die Schaumstabilität wurde über die benötigte Zeit bis zum Zerfall des Schaumes auf 600 mL gemessen. Als Referenz diente GlucoPON® 650EC, welches derzeit typischerweise bei Formulierungen der beiden Industriepartner verwendet wird.

Löslichkeit

Die Löslichkeit der Tenside wurde gemäß der OECD-Richtlinie 105 [7] durchgeführt. Hierbei wurden die Tenside bei pH 5, 7 und 10 in eine definierte Menge Wasser gegeben und für 24, 48 und 72 Stunden geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die ungelöste Restmenge gravimetrisch bestimmt. Da der Löslichkeitstest nach OECD-Richtlinie aufgrund unzureichender Phasentrennung nicht ausgewertet werden konnte, wurden außerdem Löslichkeitsversuche mit 2 % Ethanol und alkalischem Ethanol (vergällt mit Kaliumhydroxid) als Löslichkeitsvermittler durchgeführt. Hierzu wurde das MEL in Ethanol bzw. alkalischem Ethanol vorgelöst und anschließend die entsprechende Menge Wasser zugegeben. Die Löslichkeit wurde durch eine rein optische Betrachtung beurteilt.

3.2.2 Biologische Charakterisierung der MEL

Bestimmungsgemäß kommen MEL bei ihrer Anwendung in KPM und WPR beispielsweise über die Haut mit menschlichen Zellen und Gewebe in direkten Kontakt. Somit sind zytotoxische und allergene Wirkungen der MEL unerwünscht und sollten vor einem Einsatz in KPM und WPR ausgeschlossen werden. Um eine mögliche schädigende Wirkung der MEL auf Körperzellen auszuschließen, wurden exemplarisch die zytotoxischen Eigenschaften der MEL-Varianten auf zwei Hautzelltypen, Fibroblasten und Keratinozyten, untersucht. Zum Vergleich der zytotoxischen Eigenschaften wurde der CC50-Wert, also die Konzentration, bestimmt, bei der 50 % der vitalen Zellen absterben. Weiter wurden die MEL auch auf eine

potentiell allergene Wirkung mit Hilfe eines zellbasierten Testsystems basierend auf Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, den Toll-like-Rezeptoren, untersucht. Bei einer allergischen Kontaktdermatitis sind vor allem TLR4/CD14 als auch TLR1/2 und TLR2/6 beteiligt.

Der Literatur entsprechend weisen MEL prinzipiell unterschiedliche antimikrobielle Eigenschaften sowie zellproliferierende Eigenschaften bei humanen Zellen auf [8]. Diese Eigenschaften sind für einen Einsatz insbesondere in KPM neben ihrem Tensidverhalten besonders interessant, da ihr Einsatz abhängig von diesen Eigenschaften in unterschiedlichen Produkten beispielsweise in Shampoos, Anti-Akne-Produkten oder hautpflegenden Produkten vorteilhaft sein kann. Dazu wurden ihre zellproliferierenden Eigenschaften auf Hautzellen, Keratinozyten und Fibroblasten, sowie ihre antimikrobiellen Eigenschaften gegenüber Hefen und Pilzen (*Asperillus brasiliensis* und *Candida albicans*) sowie Bakterien (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Cutibacterium acnes*) untersucht. Typischerweise werden zur Beschreibung von antimikrobiellen Eigenschaften der sogenannte MIC-Wert (minimal inhibitory concentration), die Konzentration in deren Gegenwart ein Bakterienstamm vollständig abgetötet wird, herangezogen. Weiter sind MIC90, bei der 90 % einer Bakterienspezies abgetötet werden, und MIC50, bei der 50 % einer Bakterienspezies abgetötet werden, gebräuchliche Werte zur Beschreibung von antimikrobiellen Substanzeigenschaften. In diesem Projekt werden jedoch die MIC50 Werte für den jeweilig untersuchten Stamm verwendet, da Konzentrationen zur Bestimmung des MIC-Wertes bedingt durch die Löseeigenschaften von MEL in wässrigen Kulturmedien nicht erreichbar waren.

Zytotoxizitätsuntersuchungen (Universität Stuttgart)

Hierzu wurden je Well einer 96-Well Platte 100 µL DMEM Medium mit 10 v/v % fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 100 U/mL Penicillin-Streptomycin 1:2 mit einer Verdünnungsreihe der unterschiedlichen MEL-Gemische vorgelegt. In der Vitalkontrolle (100 % vital) waren anstatt der Probe 100 µL DMEM. In der Totkontrolle (0 % vital) wurde jeweils eine 0,1 w/v % Natriumlaurylsulfat (SDS)-Konzentration vorgelegt. Im Anschluss wurden in allen 96 Wells der Platte 15.000 Zellen, entweder NIH 3T3 Fibroblasten oder HaCat Keratinozyten, pro Well in 100 µL DMEM ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ für 2 Tage inkubiert. Danach wurden vitale, nicht vom MEL geschädigte Zellen mit 50 µL/Well des Vitalfarbstoffs Naphtol-Blue Black für 30 min gefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 50 µL/Well 4 w/v % Paraformaldehyd in von 20 min fixiert. Nachdem der überschüssige Farbstoff unter fließendem Wasser ausgespült und die Platte getrocknet wurde, wurde der in den Zellen enthaltene Farbstoff mit 100 µL 0,1 M Natronlauge eluiert und bei einer Wellenlänge von 630 nm quantitativ photometrisch vermessen. Als Referenzensid wurde Glucopon® 650EC

verwendet. Zum Vergleich der zytotoxischen Eigenschaften wurde der CC50-Wert, also die Konzentration, bestimmt, bei der 50 % der vitalen Zellen absterben.

Zytotoxizitätsuntersuchungen II (Börlind)

Vor der Studie „Wirkung der Verbindungen Biotensid *Stamm 2* (Öl D) und Biotensid *Stamm 3* (Öl C) auf normale menschliche Keratinozyten der Epidermis“ wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt.

Die Zytotoxizität einer Substanz kann durch eine Bestimmung der Zellviabilität bei Zugabe des Toxins im Vergleich zu einer Negativkontrolle ohne Toxin bestimmt werden, z.B. mit dem MTT Test.

Zellen werden in vitro mit dem namensgebenden Farbstoff, einem gelben Tetrazoliumsalz behandelt, um ihre Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen zu messen. Nach der Behandlung wurden die Zellen während 24 Stunden und 48 Stunden mit MTT inkubiert, das durch Succinat-Dehydrogenase zu blauen Formazankristallen reduziert wurde (siehe auch Tabelle 2). Diese Umwandlung verhält sich proportional zur Enzymaktivität. Nach dem Zellaufschluss und der Solubilisierung der Formazankristalle mit DMSO wurde die optische Dichte der Auszüge bei 540 nm proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und ihrer metabolischen Aktivität mit einem Spektrometer aufgezeichnet. Morphologische Veränderungen von den Zellen wurden unter dem Mikroskop ebenfalls bewertet.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Testbedingungen zur Untersuchung der Zytotoxizität.

Zelltyp:	NHEK K593 in Testmedium	NHEK K341 in Testmedium
Inkubationszeit:	24 Stunden	48 Stunden
Bewertungsparameter:	<p>MTT-Reduktionstest und morphologische Beobachtungen unter dem Mikroskop</p> <p>Nach der Behandlung wurden die Zellen mit MTT (Tetrazoliumsalz) inkubiert, das durch Succinat-Dehydrogenase (mitochondriales Enzym) zu blauen Formazankristallen reduziert wurde. Diese Umwandlung verhält sich proportional zur Enzymaktivität. Nach dem Zellaufschluss und der Solubilisierung der Formazankristalle mit DMSO wurde die optische Dichte (OD) der Auszüge bei 540 nm proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und ihrer metabolischen Aktivität mit einem Spektrometer (VERSAmax, Molekulargeräte) aufgezeichnet.</p>	

Untersuchung der MEL auf pyrogene Rückstände und allergene Wirkung nach Burger-Kentischer [9]

Je nach Fragestellung wurden NIH 3T3 SEAP TLR1/2, NIH 3T3 SEAP TLR2/6, NIH 3T3 SEAP TLR4/CD14 und NIH 3T3 SEAP Kontrollzellen verwendet. Zunächst wurden je Well einer 96-Well Platte 200.000 Zellen in 100 μ L DMEM Medium mit 10 v/v % fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 100 U/mL Penicillin-Streptomycin ausgesät. Diese adhärten über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂. Am zweiten Tag wurde das Zellmedium gegen 100 μ L/Well DMEM mit nur 0.5 % fetalem Kälberserum ausgetauscht und die MEL, gelöst in DMSO, wurden in einer nicht-zytotoxischen Konzentration von 4 μ g/mL dazu pipettiert. Zu nicht induzierten Negativkontrollen wurde nur Medium zugegeben. Die Induktionskontrollen der Zelllinien waren wie folgt:

- Für NIH 3T3 SEAP: 50 μ g/mL TNFalpha
- Für NIH 3T3 SEAP TLR1/2: 1 mg/mL Pam₂CysSK₄
- Für NIH 3T3 SEAP TLR2/6: 1 mg/mL Pam₂CysSK₄
- Für NIH 3T3 SEAP TLR4/CD14: 1 mg/mL Lipopolysaccharid (LPS)

Zur Induktion des Reportergens wurden die Zellen erneut über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde zur Detektion der sekretierten alkalischen Phosphatase (SEAP) 50 μ L des Überstands mit 50 μ L des Substrats *p*-Nitrophenylphosphat bei RT inkubiert. Der Farbumschlag durch den Substratumsatz wurde nach 40 min photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen. Als Referenzensid wurde GlucoPON® 650EC verwendet. Der Assay trifft qualitative Aussagen über die allergene Wirkung der MEL.

Untersuchung der MEL auf zellproliferierende Eigenschaften I (Universität Stuttgart)

Zur Untersuchung der zellproliferierenden Eigenschaften der MEL wurde der sogenannte BrdU-Assay (Cell Signaling Technologie®, Inc.) verwendet. Hier werden Zellen in Gegenwart von 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdU) inkubiert, welches sich während der Zellproliferation in die Zell-DNA integriert. Entsprechend können neue so markierte Zellen mittels Antikörperfärbung quantifiziert werden. Dazu wurden je Well einer 96-Well Platte 10.000 HaCat Keratinozyten bzw. NIH 3T3 Fibroblasten in 100 μ L DMEM Medium mit 10 v/v % fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 100 U/mL Penicillin-Streptomycin ausgesät und für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ adhären lassen. Nach dieser Adhäsionszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit je 100 μ L / Well 1x PBS gewaschen. Um die Zellproliferierende Wirkung von fetalem Kälberserumalbumin zu minimieren, wurden der Anteil von fetalem Kälberserumalbumin bei HaCat Zellen auf 5 /v % und NIH 3T3 Fibroblasten auf 1 /v % reduziert. Die Zellen wurden in diesen Medien über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 % FCS und 5 μ M Ceramide 6 gelöst in DMSO nach Chen [10] als Positivkontrollen, 0,2 % DMSO als Assaykontrolle sowie MEL aus *Stamm 3* mit Öl C, MEL aus

Stamm 3 mit Öl A und MEL aus *Stamm 2* mit Öl D mit einer 1:2 Verdünnungsreihe beginnend ab 0,033 mg/mL zugegeben. Weiter wurden jeweils 10 µL/Well einer 10 x BrDU-Lösung zugegeben und für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Detektion von in der DNA-eingebautem BrDU gemäß Kit-Protokoll: Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 100 µL/Well der Fixierlösung für 30 min denaturiert und fixiert. Diese Lösung wurde anschließend abgesaugt und die Zellen mit 100 µL/Well der Detection Antibody Lösung für 1 h inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit dem Waschpuffer (100 µL/Well) gewaschen, um anschließend mit 100 µL/Well des HRP-konjugierten zweiten Antikörpers für 30 min inkubiert zu werden. Nicht gebundener Antikörper wurde ebenfalls dreimal mit je 100 µL/Well Waschpuffer gewaschen. Zur Auswertung wurden je 100 µL/Well der Working Solution (1:2 Mischung aus Luminol/Enhancer Solution und Stable Peroxide Buffer) zugegeben und die von der Meerrettichperoxidase (HRP) umgesetzte Chemilumineszenz sofort innerhalb von 10 min im Minutenabstand bei 425 nm vermessen.

Untersuchung auf zellproliferierende Eigenschaften II (Bioalternatives – France, beauftragt von Börlind)

Basierend auf den Ergebnissen des IGVP zu den zellprofilierenden Eigenschaften hat die Börlind GmbH folgenden Biotenside für weitere Tests ausgesucht und Bioalternative (Frankreich) für weitergehende Untersuchungen beauftragt:

- Biotenside *Stamm 2* (Öl D)
- Biotenside *Stamm 3* (Öl C)

Bioalternative (aus Frankreich), ein externes Testinstitut, das auf zelluläre Pharmakologie und Molekularbiologie spezialisiert ist, entwickelt *in vivo* / *in vitro* Testmethoden und führt diese für medizinische, pharmazeutische und kosmetische Industrie durch. Die *in vitro* Evaluierung der Wirksamkeit eines Wirkstoffes auf die Zellregeneration der Haut wird durch Studien zur Migration und Zellproliferation sowie Zelldifferenzierung (Typ Retinoid Wirkung) durchgeführt.

Morphologisch besteht die Hautepidermis aus verschiedenen Schichten, die überwiegend aus Keratinozyten gebildet werden. Die Hautregeneration beruht auf einem homeostatischen Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung von basalen epidermalen Zellen und Eliminierung per Abschuppung der oberflächlich abgestorbenen Zellen, mit dem Ziel die Struktur und die epidermale Funktion aufrechtzuerhalten oder zu reparieren. Das Erbgut, die Umwelt, die Hygiene oder Akne, Entzündungen, Narbenbildung oder Hautalterung sind bekannte Faktoren die einen Einfluss auf die Qualität und Geschwindigkeit der epidermalen Regeneration haben.

In vitro Tests zur Zellmigration von NHEK mittels Bildanalyse und zum Genexpressionsprofil mittels RT-q PCR wurden beauftragt, um die Wirkung der Biotenside auf humane, epidermale Keratinozyten (NHEK) zu prüfen:

Zellmigrationsanalyse von NHEK, mittels Bildanalyse

Kultur und Behandlung

Die Keratinozyten (K341) wurden in 24-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und 24 Stunden lang im Nährmedium kultiviert. Das Medium wurde anschließend durch ein Testmedium ersetzt, das die Testverbindungen oder die Vergleichsverbindung (Kalziumchlorid (CaCl_2) bei 1,5 mM) enthielt oder nicht enthielt (Kontrollmedium). Die Zellen wurden weitere 48 Stunden lang inkubiert. Alle experimentellen Bedingungen wurden in $n = 3$ durchgeführt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und umgehend bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Die Keratinozyten (K593) wurden auf 96-Well-Mikrotiterplatten für die Migrationsanalyse gesät (Ref. Platypus Oris™ Collagen I beschichtete Platte) und 6 Stunden lang in einem Nährmedium inkubiert. Bei dieser Platte wurden die Wells mit einer Kollagen-Lösung beschichtet. Ein Zellstopper wurde in der Mitte des Wells angebracht, um die Zellkeimung auf die äußeren Bereiche des Rings zu begrenzen und dabei eine künstliche Wunde zu schaffen (Migrationsbereich). Nach abgeschlossener Zelladhäsion wurden die Stopper entfernt und die Zellen wurden mit Calcein-AM (T0) markiert. Nach 30-minütiger Inkubation wurde das Medium durch ein Testmedium ersetzt, das die Testverbindungen oder die Vergleichsverbindung (EGF bei 10 ng/ml) enthielt oder nicht enthielt (Kontrollmedium). Die Zellen wurden dann 0, 14, 18 oder 24 Stunden lang inkubiert. Alle experimentellen Bedingungen wurden in $n=3$ durchgeführt.

Eine Zellmigration in den Migrationsbereich wurde zu T0 und nach 14, 18 oder 24 Stunden der Inkubation beobachtet. Die Analyse wurde mit einem NIKON Diaphot 300 Mikroskop (Objektivlinse x 4) durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer NIKON DX-1200 Kamera aufgenommen. Repräsentative Bilder der einzelnen experimentellen Bedingungen wurden in den Bericht aufgenommen und alle Bilder wurden auf der Sharing-Webseite von Bioalternatives bereitgestellt. Zur Bildverschlüsselung siehe Tabelle 9.

Die Oberfläche der künstlichen Wunde (zentraler Bereich ohne Zelle) wurde nach 0, 14, 18 oder 24 Stunden der Inkubation gemessen und mit dem ursprünglichen zu T0 gemessenen Bereich verglichen, um die Wundheilung sichtbar zu machen und zu quantifizieren (vgl. Abbildung 1). Die Wirkung der Verbindungen auf die Migration der NHEK wurde mit der Kontrolle verglichen.

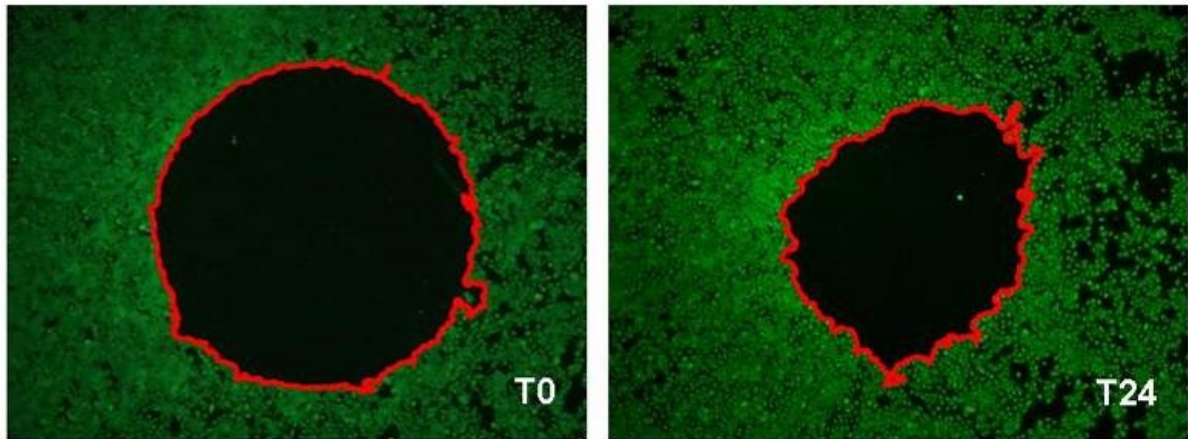


Abbildung 1: Repräsentative Bilder der Oberflächenbehandlung der künstlichen Wunde (rot umgrenzt) auf NHEK zu T0 und nach 24-stündiger Inkubation.

Genexpressionstest mittels RT-qPCR Bioalternative - France (beauftragt von Börlind)

Kultur und Behandlung

Die Keratinozyten (K341) wurden auf 24-Well-Mikrotiterplatten gesät und 24 Stunden lang im Nährmedium gezüchtet. Das Medium wurde anschließend durch ein Testmedium ersetzt, das die Testverbindungen oder die Vergleichsverbindung (Kalziumchlorid (CaCl_2) bei 1,5 mM) enthielt oder nicht enthielt (Kontrollmedium). Die Zellen wurden weitere 48 Stunden lang inkubiert. Alle experimentellen Bedingungen wurden in $n = 3$ durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und umgehend bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Differentialexpressionsanalyse

Die Markerexpression wurde anhand der RT-qPCR-Methode für die gesamte RNA analysiert, die aus den Zellmonolayern für jede einzelne experimentelle Bedingung extrahiert wurde (vor der RNA-Expression wurden die Replikate derselben experimentellen Bedingung vereint).

Die Transkriptanalyse wurde in $n = 2$ mittels eines forschungsspezifischen PCR-Arrays („mQPA-NHEK-16“) durchgeführt und an das „Screening“-Format angepasst (Marker qPCR-Array oder „mQPA“, Design von Bioalternatives). Sie betrifft 16 Gene, die wegen ihrer Bedeutung bei der Keratinozyten-Differenzierung ausgewählt wurden.

RNA-Extraktion und reverse Transkription

Die gesamte RNA wurde unter Verwendung von TriPure Isolation Reagent® gemäß den Anweisungen des Lieferanten aus den einzelnen Proben extrahiert. Menge und Qualität der RNA wurde mittels Kapillarelektrophorese bestimmt (Bioanalyzer 2100, Agilent-Technologien). Die RNA-Qualitätskontrollen werden im Anhang (Abbildung 2) vorgestellt.

Die komplementäre DNS (cDNA) wurde durch reverse Transkription der Gesamt-RNA in Gegenwart von Oligo(dT) und „Transkriptor Reverse Transkriptase“ (Roche) synthetisiert. Die cDNA-Mengen wurden dann vor dem PCR-Schritt angepasst.

Quantitative PCR

Die PCRs (Polymerase-Kettenreaktionen) wurden mit dem „LightCycler®“-System (Roche Molecular System Inc.) gemäß den Anweisungen des Lieferanten durchgeführt. Das Reaktionsgemisch (10 µl endgültig) wurde wie folgt präpariert:

- 2,5 µl cDNA,
- Vorwärts- und Rückwärts-Primer,
- Reagenziengemisch aus Taq DNA Polymerase, SYBR Green I und MgCl₂.

Datenverwaltung der quantitativen PCR

Die Rohdaten wurden mit der Microsoft Excel® Software analysiert. Die Fluoreszenzeinbindung in der amplifizierten DNA wurde während der PCR-Zyklen durchgehend gemessen. Dies führte zu einer Fluoreszenzintensität im Schaubild des PCR-Zyklus, die die Bestimmung eines relativen Expressionswerts (RE) für die einzelnen Marker ermöglichte.

Der ausgewählte Wert für die RE-Berechnungen ist der „Ausgabepunkt“ (Ct) der Fluoreszenzkurve. Für einen bestimmten Marker ist der höchste Wert die Zyklusnummer; der niedrigste ist die mRNA-Menge. Der RE-Wert wurde mit nachfolgender Formel berechnet:

$$(1/2^{\text{Zyklusanzahl}}) \times 10^6.$$

Der in der vorliegenden Studie eingesetzte PCR-Array beinhaltete 2 Referenzgene (RPS28 and GAPDH). Die House-keeping Gene wurden für die Datennormalisierung verwendet, da sie konstitutiv und theoretisch stabil exprimiert sind. Infolgedessen wurde das Expressionslevel der Zielmarker mit dem mittleren Expressionslevel dieser 2 Marker für alle Testbedingungen verglichen.

Klassifizierung der Wirkungen („behandelte“ Bedingungen vs. „Kontrolle“)

Anmerkungen zum verwendeten Protokoll:

Die RT-qPCR-Methode ist hochsensibel, doch diese Sensibilität kann zu einer Schwankungsbreite führen. Zudem kann die mRNA-Menge in der Zelle für einen bestimmten Marker je nach Behandlungsdauer stark schwanken. Daher spiegeln die ermittelten Ergebnisse das Genexpressionsprofil zur ausgewählten Zeit wider. Für eine einheitliche Interpretation empfiehlt Bioalternatives die in Tabelle 3 vorgeschlagene Klassifizierung:

Tabelle 3: Von Bioalternatives vorgeschlagene Klassifizierung der Wirkung bei der Auswertung der relativen Expression.

Relative Expression (% Kontrolle)	Klassifizierung der Wirkungen
> 300%	Starke Stimulierung
> 200% und < 300%	Stimulierung
> 150% und < 200%	Leichte Stimulierung, unbestätigt
> 50% und < 65%	Mittlere Stimulierung, unbestätigt
> 30% und < 50%	Hemmung
< 30%	Starke Hemmung

Dennoch kann es unter Berücksichtigung dieser Anmerkungen interessant sein, die beobachteten Trends für einige Marker zu bestätigen, z.B. unter Verwendung unterschiedlicher Inkubationszeiten (kinetische Studie) oder durch Untersuchung ihrer Expression auf Proteinebene.

Untersuchung der MEL auf antibakterielle Wirkung (Universität Stuttgart)

Je nach Fragestellung wurden folgende Typ- bzw. Qualitätskontrollstämme verwendet: *E. coli* DSM 1576, *P. aeruginosa* DSM 50071, *S. aureus* DSM 346 sowie der anaerobe Akne-Verursacher *C. acnes* DMS 1897 (ehemals *Propionibacterium acnes*). Für die aeroben Stämme *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* wurden je Well einer 96-Well Platte 100 µL LB Medium mit 1:2 einer Verdünnungsreihe der unterschiedlichen MEL-Gemische vorgelegt. In der Vitalkontrolle (100 % vital) waren zusätzlich 100 µL LB. In der Totkontrolle (0 % vital) wurde jeweils eine Antibiotikakontrolle, Ampicillin bei *E. coli*, Ciprofloxacin bei *P. aeruginosa* und *S. aureus* mit der Konzentration 100 µg/mL vorgelegt. Im Anschluss wurden in allen 96 Wells der Platte die entsprechenden Mikroorganismen mit einer Endkonzentration von 2×10^4 CFU/mL zugegeben und bei 37 °C für 16 h inkubiert. Danach wurde der metabolische Umsatz vitaler Mikroorganismen über den Umsatz des Substrats 2-(Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid (INT) nachgewiesen. Hierzu wurden 20 µL/Well einer 0,5 mg/mL INT-Lösung zugeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Der rote-violette Farbumschlag des Substrats wurde bei einer Wellenlänge von 480 nm quantitativ photometrisch vermessen. Als Referenzensid wurde GlucoPON® 650EC verwendet. Zum Vergleich der antimikrobiellen Eigenschaften wurde der MIC50-Wert, also die Konzentration, bestimmt, bei der 50 % der vitalen Mikroorganismen absterben.

Die Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften der MEL auf das anaerobe *C. acnes* erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode mit folgenden Änderungen: Als Medium wurde Brain-Heart-Infusion Medium (Sigma-Aldrich) unter den Inkubationsbedingungen von 5 % CO₂ bei 37°C für 5 Tage verwendet, da es sich hierbei um ein sehr langsam wachsen-

des Bakterium handelt. Als Antibiotika-Kontrolle (Tot-Kontrolle) wurde 100 µg/mL Ampicillin eingesetzt. Nach Testablauf wurden die Bakterien in den jeweiligen Wells mittels photometrischer Messung bei einer Wellenlängen von 600 nm quantifiziert.

Untersuchung der MEL auf antifungale Wirkung (Universität Stuttgart)

Die Antifungalen Eigenschaften von MEL wurden exemplarisch anhand zweier Mikroorganismen untersucht: der Hefe *Candida albicans* Sc1453 und dem Schimmelpilz *Aspergillus brasiliensis* DSM 1957 (ehemals *Aspergillus niger*). Je Well einer 96-Well Platte wurden 100 µL RPMI Medium, 2 mM L-Glutamin und 2 w/v % Glukose mit 1:2 einer Verdünnungsreihe der unterschiedlichen MEL-Gemische vorgelegt. In der Vitalkontrolle (100 % vital) waren 100 µL RPMI. In der Totkontrolle (0 % vital) wurde Amphotericin B mit der Konzentration 100 µg/mL vorgelegt. Im Anschluss wurden in allen 96 Wells der Platte *A. brasiliensis* Sporen mit einer Endkonzentration von 1×10^4 CFU/mL zugegeben und bei 37 °C für 48 h inkubiert. Danach wurde das Wachstum von *A. brasiliensis* bei einer Wellenlänge von 600 nm quantitativ photometrisch vermessen. Als Referenzensid wurde Glucopton® 650EC verwendet. Zum Vergleich der antimikrobiellen Eigenschaften wurde der MIC50-Wert, also die Konzentration, bestimmt, bei der 50 % der vitalen Mikroorganismen absterben.

Activity-Selectivity-Assay nach Burger-Kentischer [11] (Universität Stuttgart)

Je Well einer 96-Well Platte wurden 100 µL DMEM Medium mit 10 v/v % fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin mit 1:2 einer Verdünnungsreihe der unterschiedlichen MEL-Gemische vorgelegt. In der Vitalkontrolle (100 % vital) waren 100 µL DMEM und 100 µg/mL Amphotericin B und in der Infektionskontrolle (0 % vital) waren 100 µL DMEM vorgelegt. Im Anschluss wurden in allen 96 Wells der Platte 10.000 primäre humane Fibroblastenzellen in 50 µL DMEM ausgesät sowie 50 CFU/Well *C. albicans* DSM 1386 zugegeben und bei 37°C und 5 % CO₂ für 5 Tage inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 200 µL/Well PBS gewaschen und 200 µL/Well einer 1 mg/mL Konzentration einer Fluoresceindiactat (FDA)-Lösung aufgegebenen und bei RT 10 min inkubiert. Das von vitalen humanen Zellen gespaltene FDA wird bei einer Anregungswellenlänge von 585 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm quantitativ fluorometrisch vermessen. Als Referenzensid wurde Glucopton® 650EC verwendet. Zum Vergleich der zytotoxischen Eigenschaften wurde der CC50-Wert, also die Konzentration, bestimmt, bei der 50 % der vitalen Zellen aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften der MEL absterben. Weiter wurde der IC50-Wert, also die Konzentration, bestimmt, bei der 50 % der vitalen Zellen aufgrund einer nicht durch MEL verhinderten *C. albicans* Infektion starben. Aus beiden Werten wurde dann der Selektivitätsindex SI als Quotient aus CC50 zu IC50 berechnet. Der SI ist ein Maß für die Wirksamkeit und die Eignung eines Wirkstoffes,

er gibt an wie gut der Wirkstoff zuerst ein Pathogen abtötet bevor er die humanen Zellen absterben lässt.

3.3 Testung der MEL in kosmetischen Grundlagen

Untersuchung der MEL auf tensidische Eigenschaften in einer Shampoo-Rezeptur

Zur Untersuchung und Beurteilung der tensidischen Eigenschaften von MEL in der Anwendung wurden in einer bestehenden Shampoo-Rezeptur von Börlind die bisher enthaltenen Tenside Blanova® 1200 oder Amisoft® teilweise oder ganz durch 1-7 % MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge: 0112) ersetzt. Die INCI des Original-Shampoos lautete:

AQUA [WATER], LAURYL GLUCOSIDE, GLYCERIN, SODIUM CHLORIDE, SODIUM LAURYL SULFOACETATE, DISODIUM COCOYL GLUTAMATE, COCO-GLUCOSIDE, SODIUM LAUROYL GLUTAMATE, INULIN, SODIUM COCOYL GLUTAMATE, CAPRYLYL/CAPRYL GLUCOSIDE, GLYCERYL OLEATE, PCA GLYCERYL OLEATE, CITRIC ACID, AROMA [FRAGRANCE], ACER SACCHARUM EXTRACT [SUGAR MAPLE], SODIUM PCA, POTASSIUM SORBATE, ARGININE, HYDROLYZED WHEAT PROTEIN, LECITHIN, BETAINE, LYSOLECITHIN, ALOE BARBADENSIS LEAF JUICE POWDER, DIPOTASSIUM GLYCYRRHIZATE, LIMONENE, CITRAL, AVENA STRIGOSA SEED EXTRACT, ASCORBYL PALMITATE, TOCOPHERYL ACETATE

Zur Beurteilung der Eignung von MEL wurde der pH-Wert (pH/mV- und Temperatur-Messgerät Modell MP220, Elektrode InLab 425, Mettler Toledo), die Dichte (DMA 4500 Density Meter, Anton Paar) und die Viskosität (Bohlin Gemini Rheometer) des Shampoos gemessen sowie das Schaumverhalten visuell beurteilt. Zur Reduktion von Trübungen und zur Variation der Viskosität der Shampoo-Rezeptur mit MEL wurden weiter Untersuchungen durchgeführt, in denen die Konzentration von Natriumchlorid und Zitronensäure verringert wurde.

Untersuchung der MEL auf emulgierende Eigenschaften in einer Gel-Rezeptur

Um die emulgierende Wirkung von MEL zu untersuchen wurden die Wachsmischungen Acticire® bzw. Acticire® und der Emulgator Amisoft® HS-11 (P) einer bestehenden Gel-Rezeptur von Börlind (ein Augenserum mit einem kleinen Ölanteil) durch 1 % bzw. 1,25 % MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge: 0112) ersetzt. Die INCI der Original-Gel-Rezeptur des Augenserums lautete:

AQUA [WATER], ALCOHOL, GLYCERIN, SIMMONDSIA CHINENSIS SEED OIL [JOJOBA], GLUCOSYL HESPERIDIN, JOJOBA ESTERS, CAFFEINE, DEHYDROXANTHAN GUM, MICA, BENZYL ALCOHOL, POLYGLYCERIN-3, SODIUM STEAROYL GLUTAMATE, AROMA [FRAGRANCE], TIN OXIDE, TREMELLA FUCIFORMIS SPOROCARP EXTRACT [HYALURONIC ACID], XANTHAN GUM, MENTHYL LACTATE, GLYCERYL CAPRYLATE, HELIANTHUS ANNUUS SEED CERA, ACACIA DECURRENS FLOWER CERA, LINALOOL, BENZYL SALICYLATE, LIMONENE, CI 77891 [TITANIUM DIOXIDE]

Zur Beurteilung der Eignung von MEL in der Gel-Rezeptur wurde analog der Untersuchung auf emulgierende Eigenschaften in einer Shampoo-Rezeptur der pH-Wert, die Dichte und die Viskosität der Gel-Rezeptur gemessen. Zudem wurde die Stabilität der Gel-Rezeptur bestimmt, indem sie für 15 bzw. für 2 x 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert und im Falle einer nicht stabilen Emulsion die Höhe des Öl-Überstands in mm gemessen wurde.

Untersuchung der MEL (Stamm 1 mit Öl A - Charge 6711) auf tensidische Eigenschaften in Reinigungsmilch

Um eine reinigende Wirkung von MEL in einer Emulsion zu untersuchen, wurden in einer bestehenden Reinigungsmilch Rezeptur von Börlind das bisher enthaltene Tensid Blanova® 1200 zur Hälfte durch 1,5% und ganz durch 3% MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge: 6711) ersetzt. Die INCI der Original Reinigungsmilch lautete:

AQUA [WATER], CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE, GLYCERIN, POLYGLYCERYL-6 STEARATE, SORBITAN STEARATE, GLYCERYL STEARATE, LAURYL GLUCOSIDE, SORBITOL, PHENOXYETHANOL, GLYCINE SOJA OIL [SOYBEAN], SUCROSE COCOATE, STEARIC ACID, AROMA [FRAGRANCE], PALMITIC ACID, BENZYL ALCOHOL, XANTHAN GUM, ARGININE, ALCOHOL, HYPERICUM PERFORATUM EXTRACT, ECHINACEA ANGUSTIFOLIA EXTRACT, CALENDULA OFFICINALIS FLOWER EXTRACT, LAURYL LACTATE, COUMARIN, LINALOOL, ASCORBYL PALMITATE, LECITHIN, CHAMOMILLA RECUTITA FLOWER EXTRACT [MATRICARIA], CETYL PALMITATE, TOCOPHEROL, PANTHENYL ETHYL ETHER, PHYTANTRIOL, BISABOLOL, HYDROGENATED PALM GLYCERIDES CITRATE, HAMAMELIS VIRGINIANA LEAF EXTRACT, PYRIDOXINE TRIPALMITATE, SALVIA OFFICINALIS LEAF EXTRACT [SAGE], CITRIC ACID

Zur Beurteilung der Eignung von MEL wurde der pH-Wert (pH / mV- und Temperatur Messgerät Modell MP220, Elektrode Inlab 425, Mettler Toledo), die Dichte (DMA 4500 Density Meter, Anton Paar) und die Viskosität (Bohlin Gemini Rheometer) sowie Stabilitätstests bei unterschiedlichen Lagertemperaturen durchgeführt, um die Langzeitstabilität zu prüfen. Das Schaumverhalten wurde visuell beurteilt.

Untersuchung der MEL (Stamm 1 mit Öl A - Charge 6711) auf tensidische Eigenschaften in Reinigungsgel

Um die reinigende Wirkung von MEL in einem Reinigungsgel zu untersuchen, wurde in einer bestehenden Reinigungsgel Rezeptur von Börlind das bisher enthaltene Tensid Blanova® 1200 zur Hälfte mit 1,5% oder ganz mit 3% MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge: 6711) ersetzt. Die INCI des Original Reinigungsgels lautete:

AQUA [WATER], SORBITOL, LAURYL GLUCOSIDE, XANTHAN GUM, BENZYL ALCOHOL, GLYCERYL CAPRYLATE, DISODIUM COCOYL GLUTAMATE, GLYCERIN, SODIUM COCOYL GLUTAMATE, ALCOHOL, AROMA [FRAGRANCE], LACTIC ACID, BENZYL BENZOATE, HAMAMELIS VIRGINIANA LEAF EXTRACT, SALVIA OFFICINALIS LEAF EXTRACT [SAGE]

Zur Beurteilung der Eignung von MEL wurde der pH-Wert (pH / mV- und Temperatur Messgerät Modell MP220, Elektrode Inlab 425, Mettler Toledo), die Dichte (DMA 4500 Density Meter, Anton Paar) und die Viskosität (Bohlin Gemini Rheometer) sowie Stabilitätstests bei unterschiedlichen Lagertemperaturen durchgeführt, um die Langzeitstabilität zu prüfen. Das Schaumverhalten wurde visuell beurteilt.

3.4 Testung der MEL in WPR

Untersuchungen zur Lösungen von MEL in Formulierungen

Bevor die Eignung der MEL für den Reinigungs- und Waschmittelbereich beurteilt werden konnte, war es notwendig folgende Eigenschaften zu untersuchen:

- Stabilität der MEL in Wasser in einem pH-Bereich von 1,5 bis 13,0
- Stabilität der MEL gegenüber weiteren WPR-Inhaltsstoffen

Zunächst wurde die Löslichkeit der MEL in einer Konzentration von 0,8 % in 70 % Ethanol sowie in Wasser mit unterschiedlichem pH-Wert von 4,5 bis 11,0 untersucht. Die Beurteilung der Trübung erfolgte visuell.

Weiter wurde untersucht, ob durch Zugabe des Tensids GlucoPON® 650EC in einer Konzentration von 0,8 % und zusätzlich durch Zugabe des Lösevermittlers Texapon® 842 in einer Konzentration von 3,5 % Ausfällungen gelöst werden können.

Auf ihre Eignung für WPR wurden wie oben angegeben folgende MEL untersucht:

- MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112_A)
- MEL aus *Stamm 3* mit Öl B (Charge 5541)
- MEL aus *Stamm 1* mit Öl E (Charge 4711)

Zur Herstellung einer geeigneten Glasreinigerformulierung wurden basierend auf MEL der Charge 7841 aus *Stamm 3* weitergehende Untersuchungen zum Löseverhalten in wässrigen Lösungen durchgeführt. Hierfür wurden Formulierungen bestehend aus 0,5 g/L MEL (Charge 7841 aus *Stamm 3* mit Öl B) erstellt. Das Löseverhalten von MEL bei unterschiedlichen pH-Werten wurde mittels Zugabe von KOH sowie bei Zugabe von Octylsulfat untersucht. Weiter wurden Untersuchungen zur Löslichkeit und Stabilität von MEL bei unterschiedlichen Temperaturen (40 / 50 / 60 °C) durchgeführt. Abschließend wurde die Eignung von Ethanol als Lösevermittler untersucht.

Untersuchung der Fettlösekraft (Reinigungsleistung) und des Klartrockenverhaltens von MEL im Vergleich zu GlucoPON® 650EC

Die Fettlösekraft einer MEL-Formulierung (0,6 g/l MEL, 7 g/l Ethanol (96 %) in Wasser) wurde mit Hilfe von Öl-benetzten Glasscheiben analysiert. Diese wurden vor der Anschmutzung von Herstellungsrückständen und Schmutz befreit und anschließend mit Alkohol abgerieben und luftgetrocknet. Danach wurden 0,2 g Olivenöl gleichmäßig als Film auf Glasscheiben mit einer Fläche von 150 cm² aufgebracht und diese zur Ermittlung des Ausgangswerts ge-

wogen. Anschließend wurden diese in 0,5 %-ige MEL-Formulierung bzw. als Referenz in 0,5 %ige GlucoPON® 650EC Lösung bei pH 10 und 30 °C für 15 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Glasplatten aus den Lösungen entnommen, die Tensidlösungen unter fließendem Wasser ab gespült und, ohne den restlichen Ölfilm zu beschädigen, luftgetrocknet. Die getrockneten Glasplatten wurden erneut gewogen. Die Differenz der beiden Gewichte, vor und nach Behandlung mit den Glasreinigern, wurde zur Bewertung der Reinigungsleistung bzw. der Fettlösekraft herangezogen.

Vergleichende Untersuchung des etablierten Glasreinigers mit einer Glasreinigerrezeptur basierend auf MEL (Reinigungsleistung und Klartrockenverhalten)

Aufgrund der geringeren Reinigungsleistung im Vergleich zu GlucoPON® 650EC, einer vergleichbaren Benetzbarkeit und dem geringen Schaumvermögen von MEL wird basierend auf MEL der Charge 7841 aus Stamm 3 mit Öl B eine Glasreinigerrezeptur entwickelt. Diese besteht aus 15 % v/v Ethanol, 0,2 % w/v MEL und < 0,5 % w/v Lösevermittler. Zum Vergleich wurde eine Rezeptur bestehend aus 15 % Ethanol, < 0,5 % GlucoPON® 650EC und Fettsäurealkoholsulfat sowie reines Wasser eingesetzt. Die vergleichende Untersuchung hinsichtlich der Reinigungsleistung und des Klartrockenverhaltens in Anlehnung an die IKW-Prüfmethode zur Qualitätsbewertung von Allzweckreiniger [13] wurde im Auftrag von der Sonett GmbH von einem externen Forschungsinstitut durchgeführt.

Untersuchungen zur Langzeitstabilität der Glasreinigerformulierung und Abschätzung der thermischen Alterungsrate

Eine Glasreinigerrezeptur bestehend aus 0,5 % w/v MEL der Charge 7841, 7 % v/v Ethanol wurde hinsichtlich der Lagerstabilität über eine Dauer von 3 Monaten in Abhängigkeit des pH-Wertes von 9-9,5 gegenüber pH 6 bei 4 °C und 40 °C in einem Trockenschrank untersucht. Mit der Annahme, dass eine Normallagertemperatur des Glasreinigerproduktes 20 °C beträgt wurde die thermische Alterungsrate als Maß für die theoretische Haltbarkeit unter Verwendung der Arrhenius-Gleichung abgeschätzt. Der mathematische Zusammenhang von Arrhenius [15] beschreibt bei physikalischen und chemischen Prozessen eine quantitative Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit: In erster Näherung erhöht sich bei einer Temperaturerhöhung um 10 K bei einer chemischen Reaktion die Reaktionsgeschwindigkeit um das 2-4 fache. Dies wird in dem Faktor Q₁₀ in der Formel der thermischen Alterungsrate ausgedrückt. Die thermische Alterungsrate wird wie folgt abgeschätzt:

$$AAF = Q_{10}^{[(TAA - TRT) / 10]}$$

mit AAF = *accelerated ageing factor*, Faktor der beschleunigten thermischen Alterung

Q₁₀ = Faktor, um den sich bei einer Temperaturerhöhung um 10 K die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht

TAA = Versuchstemperatur in °C

TRT = Lagertemperatur in °C

Die theoretische Haltbarkeit errechnet sich mit Hilfe des Faktors der beschleunigten thermischen Alterung wie folgt:

$$\text{theoretische Haltbarkeit} = \text{AAF} \cdot \text{AAT}$$

mit AAT = Versuchszeit des Alterungsversuchs in d

Zur Vermeidung von nichtlinearen Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit wird empfohlen, eine beschleunigte Alterungstemperatur unter 60 °C zu wählen, weshalb für die Temperatur der Alterungsversuche 40 °C gewählt wurden.

Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit von MEL

Die Untersuchungen zur biologischen aeroben Abbaubarkeit von MEL am Beispiel von MEL der Charge 7841 aus *Stamm 3* mit Öl B mittels CO₂-Entwicklungstest nach OECD 301B [16] wurden von der Sonett GmbH bei der LAUS GmbH unter GLP-Bedingungen beauftragt. Hierzu wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1074,8 mg/L mit einem Gehalt an organischen Kohlenstoff von 62,49 % eingestellt. Als leicht biologisch abbaubare Positivkontrolle wurde Anilin in einer Konzentration von 2100,6 mg/L mit einem Gehalt an organischem Kohlenstoff von 74,6 % verwendet. Als Testsystem wurde Belebtschlamm aus der Behandlung von Haushaltsabwässern der Kläranlage der Stadtentsorgung Neustadt verwendet. Dieser wurde hierzu filtriert, gewaschen, im Testmedium (0,085 mg/L KH₂PO₄, 0,2175 mg/L K₂HPO₄, 0,334 mg/L Na₂HPO₄·2H₂O, 0,05 µg/L NH₄Cl, 27,5 µg/L CaCl₂, 22,5 µg/L MgSO₄·7H₂O, 0,25 µg/L FeCl₃·6H₂O und 0,4 µg/L Na₂EDTA·2H₂O) mit einem Feststoffgehalt von 4210 mg Trockenmasse/L resuspendiert und belüftet. In jeweils 1500 mL Flaschen wurden neben den MEL-Proben folgende Kontrollen angesetzt (mit 20 mg /L organische Kohlenstoff):

- Geräteblindwert: Testmedium
- Blindwertkontrolle: Testmedium und 25 mg/L Belebtschlamm
- Positivkontrolle: Anilin, Testmedium und 25 mg/L Belebtschlamm
- Abiotische Kontrolle: MEL, Testmedium und HgCl₂
- Toxizitätskontrolle: MEL, Anilin, Testmedium und 25 mg/L Belebtschlamm

Die Flaschen wurden mit feuchter, CO₂-bereinigter Luft begast und kontinuierlich gerührt. Das emittierte CO₂ wurde in 0,25 M NaOH gefangen und in regelmäßigen Abständen (Tag 0 / 2 / 4 / 7 / 9 / 11 / 14 / 18 / 23 / 29) wurden entsprechende Konzentrationen mittels Ionenchromatographie (TOC multi N/C 2100S, Analytik Jena) bestimmt. An Tag 28 wurde je Flasche 5 mL 2 M HCl zugegeben, um auch gelöstes CO₂ freizusetzen. Freigesetztes CO₂ zu einem Zeitpunkt t in mg/L wurde wie folgt berechnet:

$$\text{emittC} = [(IC(t) - IC(0)) \cdot Vol_{NaOH}(t)] / Vol_{\text{Testgefäß}}$$

mit emittC = freigesetztes CO_2 in mg/L

$\text{IC}(t)$ = vorhandener anorganischer Kohlenstoff in mg/L NaOH je Testflasche zum Zeitpunkt t

$\text{IC}(0)$ = vorhandener anorganischer Kohlenstoff in mg/L NaOH je Testflasche zu Beginn der Untersuchungen

$\text{Vol}_{\text{NaOH}}(t)$ = Volumen des verbleibenden NaOH

$\text{Vol}_{\text{Testgefäß}}$ = Volumen der Testflasche (1,5 L)

Die prozentuale biologische Abbaubarkeit wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Abbau} = [(\text{emittC}(\text{Test}) - \text{MW emittC}(\text{Kontrollen})) / \text{zugegebener C}] * 100 \%$$

Die prozentuale biologische Abbaubarkeit der Positivkontrolle und der Toxizitätsprobe wurden analog berechnet.

Die abiotische Abbaubarkeit wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Abbau} = \text{mg/L freigesetzter C (abiotisch)} / \text{hinzugefügter C} * 100 \%$$

3.5 Ökobilanzierung (Fraunhofer-Institut für Bauphysik, Abt. Ganzheitliche Bilanzierung)

Auf eine allgemeine Darstellung der Methode der Ökobilanz sei an dieser Stelle verzichtet. Eine Einführung bieten etwa Klöpffer und Grahl [17]. Relevante Normen für die Ökobilanz sind ISO 14040 [18] und ISO 14044 [19]. Der Lebenszyklus von MEL als Inhaltsstoff von Kosmetik bzw. Waschmittel wurde in Ökobilanz-Modellen abgebildet und die damit assoziierten ökologischen Wirkungen geschätzt. Zunächst wurde die Produktion von MEL im Labormaßstab auf Basis von Messwerten modelliert. Für die Modellierung der Produktsysteme wurde die Software „GaBi ts“ (Version 7) inkl. der korrespondierenden GaBi-Datenbanken (Version SP28) verwendet [20]. GaBi ist eines der weltweit am meisten verwendeten Softwarepakete für Ökobilanzierung. Die Datenbanken decken die Prozesse des sogenannten Hintergrundsystems ab, also u.a. die Bereitstellung von Strom, Wärme, Logistik und Vorprodukten. Für das sogenannte Vordergrundsystem – also Prozesse, die speziell die Bereitstellung von MEL aus den Vorprodukten abbilden – wurden Daten vom IGVP der Universität Stuttgart, vom Fraunhofer IGB und vom Fraunhofer CBP verwendet. An einigen Punkten wurden die gesammelten Primärdaten um Literaturdaten und Berechnungen ergänzt. Für eine detaillierte Aufstellung der Annahmen und Randbedingungen siehe Schestak [21]. Um repräsentative Zahlen für einen Vergleich von MEL mit konkurrierenden Tensiden zu erhalten, wurde eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt. In Absprache mit dem IGVP wurde eine Klasse von Biotensiden (Alkylpolyglycoside, APG) als Vergleichsprodukt identifiziert.

Grundsätzlich werden MEL in der **Produktionsphase** durch Kombination eines Zuckers und einer Fettsäure hergestellt. Die Synthese erfolgt durch Kultivierung von Mikroorganismen

unter kontrollierten Bedingungen im Fermenter. Vor der eigentlichen Synthese werden die Mikroorganismen in mehreren Schritten vermehrt, bis die Menge der Biomasse für die Synthese ausreicht. Dies schließt im Wesentlichen die aufeinander aufbauenden Vorkulturen, die Hauptkultur und die Abtrennung des Produkts ein. Für Prozesse, die außerhalb des Labors lagen, wurden Ansprechpartner identifiziert und auf Basis von deren Aussagen die entsprechenden Prozesse modelliert. Diese Vorgehensweise wurde beispielsweise für das Kühlwassersystem angewandt, das die Labors mit Kühlwasser versorgt und Teil der Haustechnik des ganzen Gebäudes ist. Nach der Synthese wird der MEL-Rohextrakt aus der Brühe abgetrennt und je nach Einsatzzweck ggf. weiter aufgereinigt.

Der Fokus der Ökobilanz liegt in diesem Fall klar auf der Produktionsphase. Sie umfasst:

- die Bereitstellung von Vorprodukten (Zucker, Öl, Mineralien, Wasser),
- die Kultivierung der Mikroorganismen inkl. Bereitstellung der Energie (Strom) für das Pumpen und Rühren der Brühe,
- die Reinigung der verwendeten Gefäße inkl. Bereitstellung der benötigten Betriebsmittel (NaOH, HCl) und der Energie (Strom, Dampf), sowie
- die Aufreinigung des Produkts MEL inkl. der Bereitstellung der benötigten Energie (Strom, Dampf).

Weiterhin wurde die Produktion von MEL in der Größenordnung einer Pilotanlage auf Basis von Erfahrungswerten und Expertenschätzungen modelliert. Das IGVP stellte dazu den Kontakt zum Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP) in Leuna her. Dort liegen Erfahrungen mit Fermentationsprozessen in größeren Reaktoren vor, deren Volumen im Bereich einiger hundert oder tausend Liter liegt.

Nach der Produktion setzt sich der Lebenszyklus von MEL in der **Nutzungsphase** fort, die hier allerdings nicht betrachtet wird. In dieser Phase wird der MEL-Extrakt in eine Formulierung eines Wasch-, Pflege- oder Reinigungsmittels eingebunden. Wie diese Formulierung eines Produkts für die Nutzung durch Konsumenten konkret aussähe, steht zum Zeitpunkt dieses Berichtsbeitrags nicht fest und kann auch nicht mit der nötigen Tiefe im Rahmen dieses Projektes betrachtet werden.

Auf die Nutzungsphase folgt das **Lebensende**. Für das Lebensende von MEL werden zwei mögliche Pfade abgebildet:

- 1) Der MEL-Anteil des Produkts wird mit diesem über das Abwasser entsorgt. Die Emissionen einer kommunalen Kläranlage, die dem MEL-Anteil angelastet werden können, werden über generische Datensätze abgeschätzt (GaBi-Datenbanken, s.o.).
- 2) Der MEL-Anteil des Produkts wird mit diesem über den Hausmüll entsorgt. Die Emissionen einer kommunalen Müllverbrennungsanlage, die dem MEL-Anteil angelastet werden können, werden über generische Datensätze abgeschätzt (GaBi-Datenbanken, s.o.).

4 Ergebnisse

Zunächst wurden die Anforderungen an die MEL von Seiten der Industriepartner zur Anwendung in den kommerziellen Produkten definiert (siehe Kapitel 4.1). Die Ergebnisse zur Herstellung, Aufreinigung und die Modifikation der MEL sowie die Bemusterung der Projektpartner sind in Abschnitt 4.2 dargestellt. Die Ergebnisse zur chemisch-physikalischen Untersuchung der MEL sind in Kapitel 0 näher erläutert. Mit Hilfe dieser Daten wurden MEL-Chargen ausgewählt, die wiederum anwendungstechnisch in Formulierungen eingesetzt wurden. Die Resultate zu diesen Untersuchungen finden sich in Kapitel 4.4 und Kapitel 4.5. Zum Abschluss werden die Ergebnisse der Ökobilanzierung vorgestellt (Abschnitt 4.6).

4.1 Anforderungen an MEL

Zu Projektbeginn wurden von Sonett GmbH (kurz: Sonett) die Anforderungen an MEL zum Einsatz in WPR, insbesondere in Glas- oder Bodenreiniger, definiert. Börlind Gesellschaft für kosmetische Erzeugnisse mbH (kurz: Börlind) hat die Anforderungen an MEL zur Anwendung in KPM, insbesondere in Shampoo oder einer Reinigungslotion, spezifiziert. Entsprechend der unterschiedlichen Anwendungen erfordert dies MEL mit verschiedenen Eigenschaften.

Für die Anwendung in Reinigungsmitteln sind schaumarme Tenside mit einer guten Fettlösekraft gefordert, die über einen breiten pH-Bereich von pH 2 bis pH 12 stabil und gut wasserlöslich (vergleichbar einem HLB-Wert 13-16), dabei aber kalkstabil sind und vor allem biologisch abbaubar sind. Antimikrobielle Eigenschaften sind nicht erstrangig, ebenso spielen CMC-Wert und die minimale Oberflächenspannung für diese Anwendungen eine untergeordnete Rolle. Für die Mischung von WPR ist eine gute alkoholische Löslichkeit von Vorteil. Große Bedeutung hat jedoch der Geruch. Sonett hat viele Kunden mit *Multiple Chemical Sensitivity Syndrom*, die auf Gerüche sehr sensibel reagieren. Daher ist eine möglichst geruchsfreie MEL-Variante wünschenswert. Angestrebt wird eine (Teil-)Substitution der bisher angewandten Zucker- und anionischen Tensiden.

Für die Anwendung in Shampoo sind Tenside, die eine stabile, nicht zu kompakte Schaumbildung bewirken, wünschenswert. In der Anwendung als Emulgatoren ist hingegen keine Schaumwirkung gewünscht ist. Ein möglichst niedriger CMC-Wert ist erstrebenswert, um die eingesetzten Tensidmengen im Produkt möglichst gering halten zu können. Je nach HLB-Wert können die MEL in unterschiedlicher Funktion im Produkt eingesetzt werden: Als Tensid bei einem HLB-Wert von 13-16, als Emulgator bei HLB-Werten von 16-18, als Öl-in-Wasser-Emulgator bei HLB Werten von 6-16 oder als Wasser-in-Öl-Emulgator bei HLB-Werten von 1-6. In dieser Anwendung spielt der CMC-Wert eine untergeordnete Rolle, wohingegen die Tenside im pH-Bereich 4 – 8 stabil sein sollten. Eine antimikrobielle Wirkung

gegen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* und *Cutibacterium acnes* wäre ideal. Von Vorteil sind verdickende Eigenschaften, eine optimale Hautverträglichkeit (idealerweise mit zellproliferierender Wirkung) und Eigenschaften, die die Kämmbarkeit des Haares fördern. Auch für diese Anwendung sind biologisch abbaubare Tenside gefordert, da sie nach ihrem bestimmungsgemäßen Verbrauch ins Abwasser gelangen. Angestrebt wird eine (Teil-)Substitution der bisher angewandten Tenside wie APG, Disodium Cocoyl Glutamat, Coco Glucoside und Sodium Lauroyl Glutamate. Biotechnologische Herstellung auf Aufarbeitung der MEL

4.2 Biotechnologische Herstellung der MEL

MEL sind aufgrund ihrer strukturellen Besonderheiten und vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten von Interesse für die Kosmetik- und Reinigungsmittelindustrie. MEL aus *P. tsukubensis* mit Olivenöl und Glycerin ist bereits als kosmetisches Produkt kommerziell erhältlich. Die Eigenschaften von MEL hängen dabei stark von dem verwendeten Mikroorganismus sowie von den Substraten ab. Zur biotechnologischen Herstellung der MEL wurden drei *Pseudozyma* Stämme mit fünf Pflanzenölen getestet.

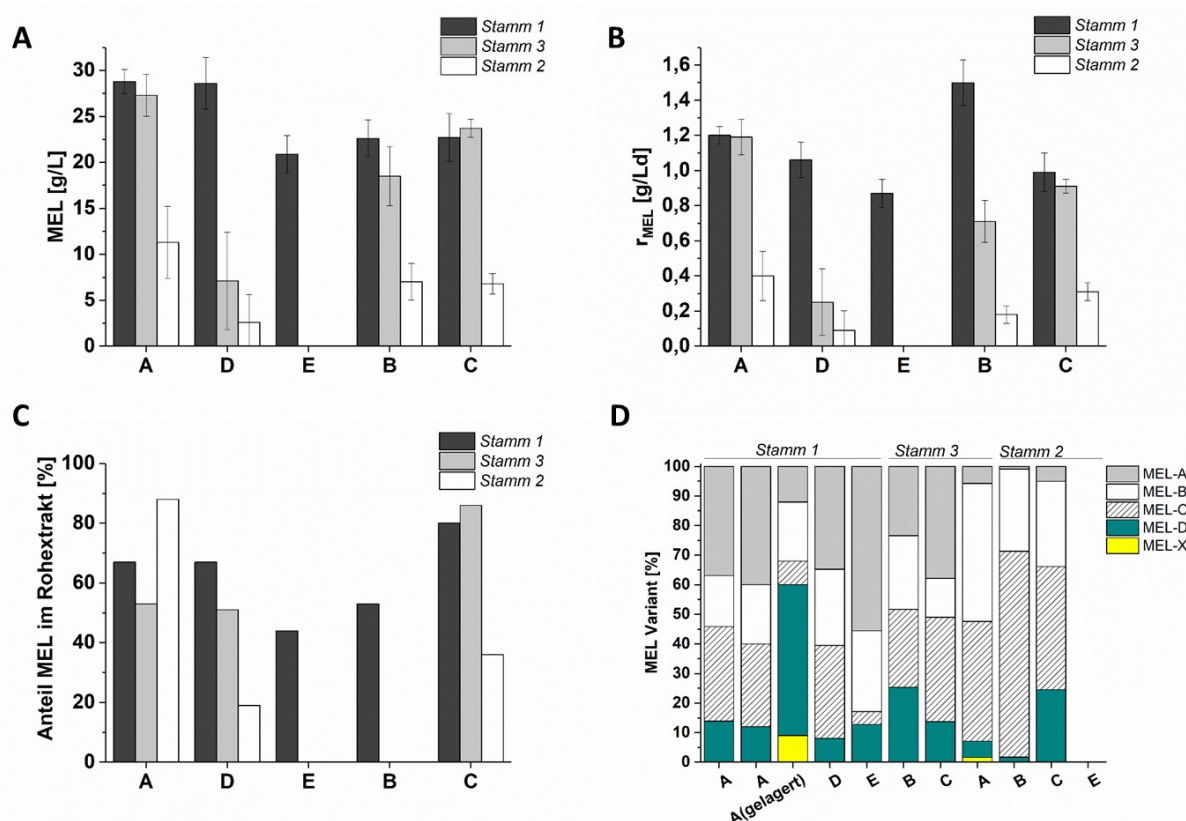


Abbildung 2: MEL-Produktion unterschiedlicher Spezies-Substrat-Kombinationen: MEL-Konzentrationen (A), Produktionsraten (B), Reinheit (C) und MEL-Varianten im Gemisch (D) von ausgewählten *Pseudozyma*-Stamm-Pflanzenöl-Kombination.

Aufgrund der hohen MEL Konzentrationen und Produktionsraten in den Schüttelkolbenversuchen können *Stamm 1* und *Stamm 3* als geeignete MEL-Bildner eingestuft werden (Abbildung 2 oben). Mit beiden Stämmen sind bis zu 28 g/L MEL mit Öl A produzierbar. Die besten Produktionsraten werden mit Öl A, Öl B und Öl C erzielt. *Stamm 2* dagegen erzielte generell niedrige Ausbeuten mit 3-11 g/L. Während *Stamm 2* mit Öl E kein MEL produziert, wurde der Versuch mit *Stamm 3* und Öl E nicht durchgeführt. Bei der Fermentation von *Stamm 1* mit Öl A sowie *Stamm 1* mit Öl B bildeten sich sogenannte MEL *Agglomerate* (Abbildung 3). Diese sind *Agglomerate*, die aus MEL, Fettsäuren und Pflanzenöl bestehen [5]. Diese *Agglomerate* formen sich bei *Stamm 3* und *Stamm 2* bei den hier verwendeten Pflanzenölen und den erzielten MEL Konzentrationen nicht.



Abbildung 3: Bildung von MEL-Beads; Links: *Stamm 1* mit Öl A; Rechts: *Stamm 1* mit Öl B.

Um für eine spätere Charakterisierung der Biotenside Artefakte durch Verunreinigungen der Biotenside zu vermeiden, sollten diese möglichst in reiner Form vorliegen. In den Schüttelkolben-Versuchen wurden MEL-Reinheiten von 20–90 % erzielt (Abbildung 2 links unten). Alle hergestellten Proben erforderten daher eine Aufreinigung mittels präparativer Chromatographie für die spätere Charakterisierung.

Entscheidend für die Eigenschaften des MEL Extrakts ist der Anteil der jeweiligen MEL-Varianten A, B, C, D (Einteilung nach [7]). *Stamm 1* produziert hauptsächlich hydrophobes MEL-A, aber auch MEL-B und MEL-C, wobei *Stamm 3* und *Stamm 2* vor allem MEL-B und MEL-C formen [23] (siehe Abbildung 2 rechts unten). MEL-A hat eine niedrigere Wasserlöslichkeit als die anderen MEL-Varianten und ist daher für eine Anwendung in wässrigen Lösungen weniger interessant. Hier eignen sich vielmehr die gut wasserlöslichen MEL-B bis MEL-D. *Stamm 3* und *Stamm 2* produzieren hauptsächlich MEL-B und MEL-C mit geringem Anteil an MEL-A und MEL-D. Einen Sonderfall stellt das sogenannte MEL-X dar, welches einer mono-acylierten Variante mit nur einer Fettsäure als hydrophobem Rest entspricht. Dieses entsteht vornehmlich durch enzymatische Prozesse in der Kulturbrühe oder durch spontane Hydrolyse.

Den Projektpartnern Börlind und Sonett wurden größere Mengen der Probe 0112 aus *Stamm 1* mit Öl A, bereitgestellt, sowohl in chromatographisch aufgereinigter (0112_A) als auch in Form eines Rohextraktes (0112 Rohextrakt, mit restlichen Fettsäuren und Triglyceriden aus der Kultivierung). Die Lagerung der Probe als nicht vollständig aufgereinigter Extrakt hat dabei die Zusammensetzung der Probe beeinflusst. MEL-A, aber auch ein geringer Anteil

MEL-C ist in hydrophileres MEL-D und MEL-X umgewandelt worden – vermutlich aufgrund des hohen Anteils der Fettsäuren in der unreinen Probe.

Für den weiteren Projektverlauf wurden MEL Mischung aus *Stamm 3* mit Öl B oder Öl C und *Stamm 1* mit Öl B als interessant für eine Anwendung in Kosmetik- und Reinigungsmitteln ausgesucht. *Stamm 2* als MEL Produzent sollte aufgrund der schlechteren Produktionsausbeute nur gewählt werden, wenn sich die Eigenschaften der MEL signifikant unterscheiden sollten.

4.2.1 Aufarbeitung der MEL

Die Aufarbeitung der MEL nach Lösemittlextraktion erfolgte mittels präparativer Chromatographie. Hierfür wurde eine Methode in zwei verschiedenen Skalierungen etabliert. Für große Probenmengen zwischen 20 und 100 g MEL Rohextrakt, wie zum Beispiel bei der Aufreinigung von 0112, wurde mit einer von Hand gepackten Glassäule (BÜCHI, 44 x 8 cm, ~700 g Silicagel, für bis zu 100 g Probe) gearbeitet. Kleinere Probenmengen bis zu 16 g wurden mit einer Silica Fertigkartusche (BÜCHI, 80 g Silicagel, für bis zu 16 g Probe) aufgearbeitet. Die Fraktionsgröße wurde entsprechend der Skalierung angepasst. Während bei einer Aufreinigung im großen Maßstab insgesamt 5 L Lösemittel benötigt werden, sind für die kleinere Säule nur 1,2 L nötig. Insgesamt konnte die Aufarbeitung im Labormaßstab daher dem jeweiligen Probenvolumen angepasst werden und somit die verbrauchte Lösemittelmenge auf einem Minimum gehalten werden. Beispielhaft ist in Abbildung 4 eine DC der verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung dargestellt.

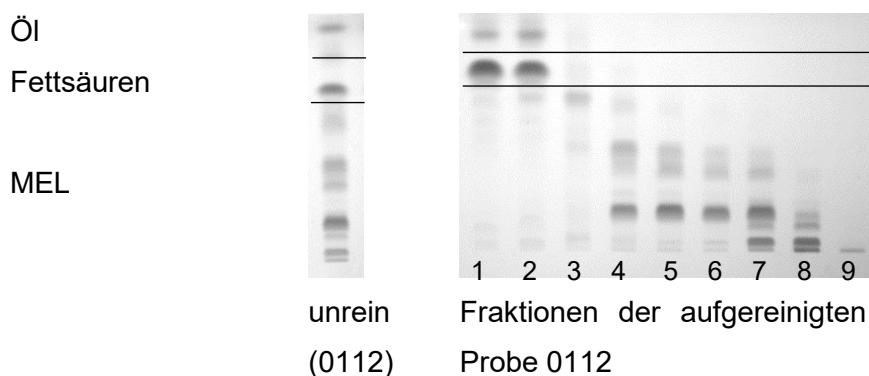


Abbildung 4: Dünnschichtchromatographie der Probe 0112; links: Rohextraktprobe vor Aufreinigung mittels präparativer Chromatographie; rechts: Gesammelte Fraktionen nach Aufreinigung.

Nach der Aufreinigung beträgt die MEL Reinheit 97-100 %. Mit einem Verlust von ca. 1 - 2 % der eingesetzten MEL-Menge ist die präparative Chromatographie eine sehr effiziente Methode der MEL-Aufreinigung. Die ersten zwei Fraktionen enthalten nicht verstoffwechseltes Pflanzenöl, Intermediate und Fettsäuren (Abbildung 4). Je nach eingesetzter Menge und Zusammensetzung des MEL-Rohextraktes befindet sich das reine MEL in den Fraktionen 4-8. Zur Bereitstellung der Rein-Chargen wurden diese Fraktionen daher vereinigt und als au-

thentische Mischung für die jeweilige Stamm-Substrat-Kombination bereitgestellt. Durch effizientes Recycling der Lösemittel und Wiederverwendung in folgenden Trennläufen wird darüber hinaus die Umweltbelastung minimiert.

4.2.2 Modifizierung der MEL

Eine nachträgliche Modifizierung von MEL kann eingesetzt werden, um das Gemisch insgesamt hydrophiler zu machen. Ziel ist dabei die Umwandlung der acetylierten und damit hydrophoberen Varianten MEL-A, -B und -C in die komplett de-acetylierte, hydrophile Variante MEL-D. Hierbei können sowohl Rohextrakte als auch chromatographisch aufgereinigte MEL Chargen verwendet werden.

Die gezielte Modifizierung von MEL wurde mit drei verschiedenen MEL-Proben getestet: 0112 (Rohextrakt) aus *Stamm 1* mit Öl A, 6411 (chromatographisch aufgereinigt) aus *Stamm 1* mit Öl A und 5541 aus *Stamm 3* mit Öl B (chromatographisch aufgereinigt). Charge 0112 wurde ausgewählt, um eine Modifizierung des Rohextrakts zu untersuchen. Die beiden aufgereinigten Chargen 6411 (viel MEL-A) und 5541 (viel MEL-B/C) von zwei verschiedenen Stämmen wurden ausgewählt, um die Modifizierung von Chargen mit unterschiedlichem Gehalt an MEL-A, -B und -C zu evaluieren. Untersucht wurden jeweils eine enzymatische Modifizierung mittels Lipase bei 40 °C und eine alkalische Modifizierung mit Natronlauge bei pH 11 und 50°C.

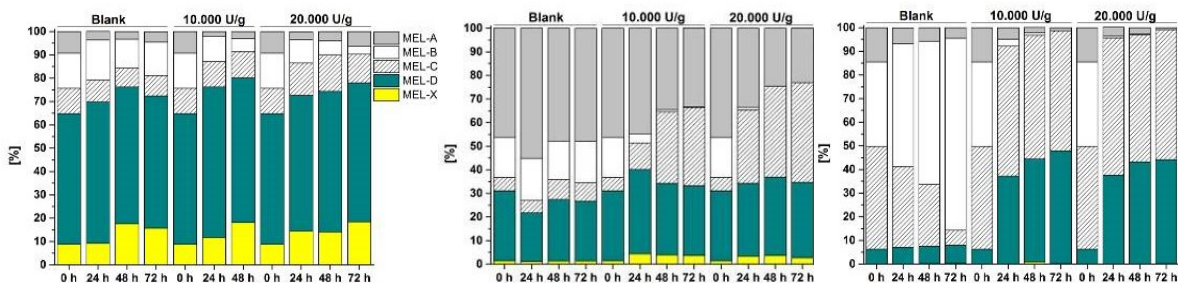


Abbildung 5: Enzymatische Modifizierung der MEL bei 40 °C; links: 0112 Rohextrakt; Mitte: 6411; rechts: 5541.

Eine Enzymzugabe unterschiedlicher Aktivität zu Probe 0112 *Stamm 1* mit Öl A bewirkt lediglich eine geringe Änderung der MEL Zusammensetzung (Abbildung 5 links). Allerdings besaß diese Probe bereits in der unmodifizierten Variante einen hohen MEL-D Anteil. Die Verunreinigungen der Probe, ca. 35 % Fettsäuren und restliches Öl A, verhinderten zusätzlich eine effiziente enzymatische Reaktion. In den Proben 6411 aus *Stamm 1* mit Öl A und 5541 aus *Stamm 3* mit Öl B, nimmt vor allem der Anteil an MEL-B und in geringem Maße MEL-A ab, bei gleichzeitiger Zunahme des MEL-C und MEL-D Anteils (Abbildung 5 Mitte und rechts). Der MEL-X Anteil ist relativ konstant. Die Kontrollen ohne Enzymzugabe ändern sich nicht signifikant mit Ausnahme von 5541 aus *Stamm 3* mit Öl B. Ein Grund hierfür kann eine Umlagerung der Acetylgruppen und daher eine Umwandlung von MEL-C zu MEL-B sein,

welche bereits mit steigender Kultivierungsdauer während der Fermentation beobachtet wurde. Die enzymatische Modifizierung reduziert vor allem den MEL-B Anteil zugunsten von MEL-D, was einer Deacetylierung an Position C6' der Mannose entspricht. Eine enzymatische Modifizierung der MEL von *Stamm 3* führte daher durch die Abnahme von MEL-B und Zunahme an MEL-C und MEL-D zu einer insgesamt hydrophileren MEL-Mischung. Hinsichtlich der eingesetzten Enzymmenge konnte kein Unterschied festgestellt werden, eine Enzymaktivität von 10.000 U/g MEL wurde daher als ausreichend angesehen.

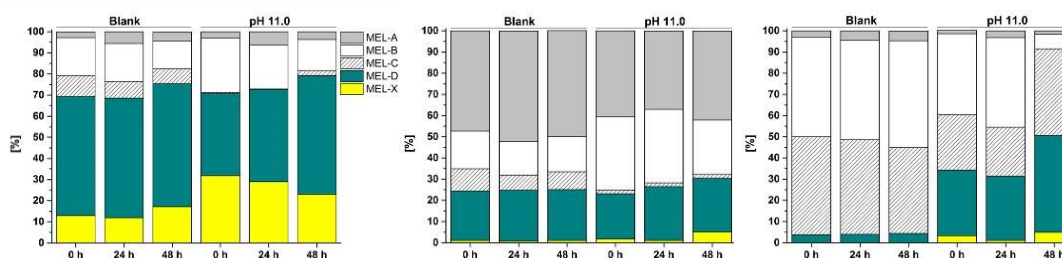


Abbildung 6: Alkalische Modifizierung der MEL mit mit NaOH bei pH 11 und 50 °C; links: 0112 Rohextrakt; Mitte: 6411; rechts: 5541.

MEL ist bei neutralem pH schlecht wasserlöslich, bei alkalischem pH-Wert steigt die Wasserlöslichkeit. Bis zu einem pH von 12 ist MEL stabil, ab einem pH 13 werden jedoch die Esterbindungen des Moleküls gespalten und die MEL-Struktur irreversibel zerstört [12]. Das spezifische Lösungsverhalten einzelner MEL-Varianten bei neutralem und bei pH 11 resultiert in unterschiedlichen Zusammensetzungen der MEL bei diesen pH-Werten. Wasser besitzt keinen Einfluss auf die Modifizierung der MEL Varianten (Blanks in Abbildung 6). Durch die Modifizierung sinkt bei 0112 (Rohextrakt) aus *Stamm 1* mit Öl A der Anteil an MEL-X und MEL-B, wohingegen der Anteil an MEL-D steigt. Der alkalische pH besitzt keine signifikante Wirkung bei Probe 6411. Bei Probe 5541 aus *Stamm 3* mit Öl B (pH 11) sank der MEL-B Anteil, während der Anteil an MEL-C und MEL-D zunahm. Durch eine alkalische Modifizierung erhöht sich bei Probe 5541 folglich der Anteil der hydrophileren MEL-Strukturen MEL-C und MEL-D, wodurch diese Charge insgesamt hydrophiler ist.

2013

2016

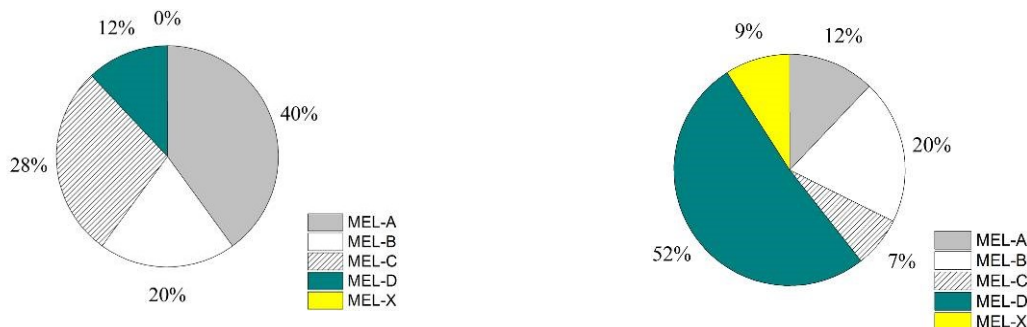


Abbildung 7: Änderung der MEL-Zusammensetzung in der Probe 0112 (Rohextrakt) nach Langzeit-Lagerung.

Ebenso konnte ein Einfluss von langen Lagerungszeiten bei niedrigem pH auf MEL Rohextrakt festgestellt werden. Durch Langzeitlagerung veränderte sich der Anteil der MEL Varianten der Probe 0112 mit einer Reinheit von 80 % (Abbildung 7). Durch die noch vorhandenen freien Fettsäuren im Gemisch ergibt sich ein niedrigerer pH, was eine Hydrolyse der Estergruppen im MEL zur Folge hat. Der Anteil der Verunreinigungen blieb hierbei konstant, der Anteil an MEL-D nahm deutlich zu während MEL-A prozentual gesehen abnahm. Insgesamt ergab sich durch lange Lagerung und spontane Hydrolyse ebenfalls ein hydrophileres Gemisch. Da dieser Prozess unkontrolliert abläuft und darüber hinaus die Produktzusammensetzung beeinflusst, soll dies hier nur am Rande erwähnt und nicht als Methode zur gezielten Modifikation dargestellt werden. Zusätzlich lieferte diese Beobachtung Hinweise zur Langzeitstabilität von MEL Gemischen.

4.2.3 Bemusterung der Projektpartner

Zur Auswahl geeigneter Biotensidvarianten wurden den Projektpartnern in der ersten Projektphase unterschiedliche MEL-Chargen zur Charakterisierung zur Verfügung gestellt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Bemusterungstabelle für die erste Projektphase zur Auswahl geeigneter Biotensidvarianten.

Datum	Biotensid	Menge	Reinheit	Partner
19.05.2014	MEL-Charge: 4431	2 mL	80 %	SONETT
	MEL-Charge: 4532	2 mL	95 %	
	MEL enzymatisch modifiziert Charge:43-13	2 mL	60 %	
	MEL-Charge: 4611	1 mL	95 %	
	MEL-Charge: 4711	1 mL	95 %	
13.07.2015	MEL - Charge: 0112_Rohextrakt	100 g	Rohextrakt, 80 %	Börlind
13.07.2015	MEL - Charge: 0112_Rohextrakt	100 g	Rohextrakt, 80 %	SONETT
25.11.2015	MEL - Charge: 0112_Rohextrakt	53 g	Rohextrakt, 80 %	Börlind
13.05.2016	MEL - Charge: 0112_A	20 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	SONETT
13.05.2016	MEL - Charge: 0112_A	20 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	Börlind
19.07.2016	MEL - Charge: 6711 (entspricht 0112_B), reich an MEL-D	50 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	Börlind
27.09.2016	MEL - Charge: 7841	25 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	SONETT
01.02.2017	MEL - Charge: 6711	25 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	Börlind

	(entspricht 0112_B), reich an MEL-D		> 97 %	
	MEL - Charge: 5911, reich an MEL-A und MEL-B	1 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	
	MEL - Charge: 6011, reich an MEL-A und MEL-B	2 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	
	MEL - Charge: 7841, reich an MEL-B und MEL-C	2 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	
01.02.2017	MEL - Charge: 6841, reich an MEL-D	1 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	SONETT

In der zweiten Phase wurden dann nochmals speziell ausgewählte Tenside für eine genauere Untersuchung hergestellt und an die Projektpartner versendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Bemusterung der Partner mit vielversprechenden Biotensidvarianten für die gewünschte Anwendung.

Datum	Biotensid	Menge	Reinheit	Partner
21.08.2017	MEL - Charge: 7841*	20 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	SONETT
05.02.2018	MEL - Charge: 30-2D1**	5 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	Börlind
05.02.2018	MEL - Charge: 31-3C1**	5 g	chrom. aufgereinigt, > 97 %	Börlind

* für biologische Abbaubarkeit nach OECD 301

** für Zellproliferationstests

Die Ergebnisse der Messungen und Versuche zu den einzelnen Chargen sind jeweils gesondert in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt. Die bereitgestellten Mengen übertreffen insgesamt die im Projektantrag vereinbarte Menge von bis zu 30 g. Insgesamt wurden im Rahmen des Projektes über 400 g an verschiedenen MEL-Chargen an Sonett OHG und Börlind GmbH verteilt.

4.3 Chemische und biologische Charakterisierung der MEL

4.3.1 Physikalisch-chemische Charakterisierung der MEL

HLB-Wert

Die HLB-Werte der analysierten Chargen sind mit Angabe der Reinheit, soweit bekannt, in Tabelle 6 zusammengefasst. Eine grafische Darstellung der berechneten HLB-Werte ist in Abbildung 8 gegeben. Die Werte aller untersuchten MEL-Tenside, die im Schüttelkolben hergestellt wurden, liegen zwischen 5,0 und 8,5. Sie sind damit eher lipophil und werden dementsprechend W/O-Emulgatoren zugeordnet. Für die geplanten Anwendungen wären höhere HLB-Werte wünschenswert. Es ist kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Substrat, produzierendem Organismus, Reinheit und HLB-Wert erkennbar.

Tabelle 6: Charakterisierte MEL-Chargen.

Charge	Organismus	Substrat	Reinheit / %	HLB über NMR
4812	<i>Stamm 1</i>	ÖI C	94	5,9
3012	<i>Stamm 1</i>	ÖI A	100	8,3
0112	<i>Stamm 1</i>	ÖI A	80	8,4
0112_A	<i>Stamm 1</i>	ÖI A	98	12,0
0112_A/6511	<i>Stamm 1</i>	ÖI A	98	8,9
0112_B/6711	<i>Stamm 1</i>	ÖI A	99	9,4
5111	<i>Stamm 1</i>	ÖI B	100	5,3
6111	<i>Stamm 1</i>	ÖI E	99	5,0
6011	<i>Stamm 1</i>	ÖI D	99	8,0
1842	<i>Stamm 3</i>	ÖI C	98	7,8
5741	<i>Stamm 3</i>	ÖI A	99	8,3
5541	<i>Stamm 3</i>	ÖI B	98	8,5
7841	<i>Stamm 3</i>	ÖI B	99	6,0
2023	<i>Stamm 2</i>	ÖI D	93	7,6
5331	<i>Stamm 2</i>	ÖI C	100	5,5
3832	<i>Stamm 2</i>	ÖI A	89	7,2
5431	<i>Stamm 2</i>	ÖI B	98	6,3

Das MEL-Tensid, welches aus dem 42 L-Fermenter Ansatz stammt (Charge 0112) besitzt ohne Aufreinigung einen HLB-Wert von 8,4, welcher vergleichbar mit dem HLB-Wert von 8,3 des gleichen Ansatzes im Schüttelkolben ist. Nach chromatografischer Aufreinigung erhöht sich der HLB-Wert allerdings auf 9,4; 8,9 bzw. 12,0. Auch die erneute Messung des HLB-Wertes nach einer 4-monatigen Lagerung zeigte eine Erhöhung von 12,0 auf 12,8.

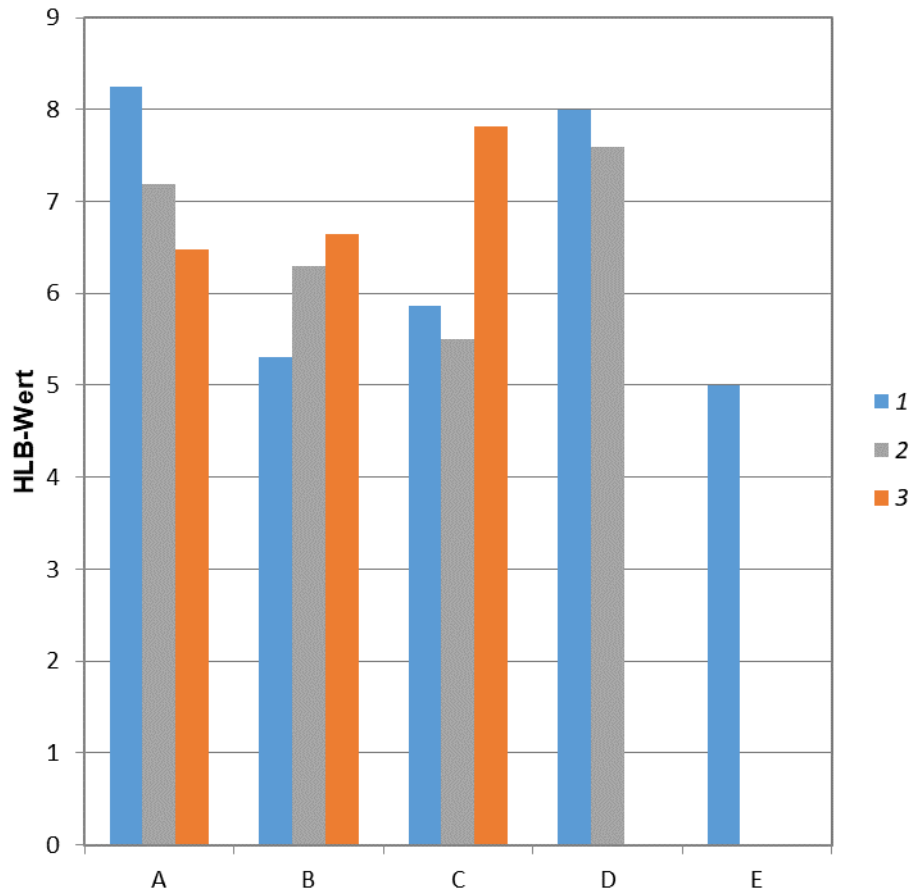


Abbildung 8: HLB-Werte der verschiedenen MEL-Chargen, hergestellt im Schüttelkolben berechnet aus $^1\text{H-NMR}$ -Daten.

Oberflächenspannung und cmc

Die cmc-Werte der untersuchten Chargen liegen zwischen 1,5 und 11,1 mg/L (Abbildung 9). Damit sind die Werte deutlich niedriger als bei dem Referenzmaterial Glucocon® 650EC, welches eine cmc von 44 mg/L besitzt. Die Referenzmaterialien der Firma Sonett, Kaliseifen auf Basis von Oliven- und Sonnenblumenöl, besitzen cmc-Werte von 4,0 -5,0 mg/L. Eine niedrige cmc ist vorteilhaft, da zur Erreichung der minimalen Oberflächenspannung weniger Tensid zugesetzt werden muss.

Das aufgereinigte MEL-Tensid, welches aus dem 42 L-Fermenter Ansatz stammt (Charge 0112_A), besitzt mit einer cmc von 5,42 mg/L eine signifikant höhere cmc, als die im Schüttelkolben hergestellte Charge 3012 mit 1,5 mg/L desselben Organismus und derselben Substratquelle.

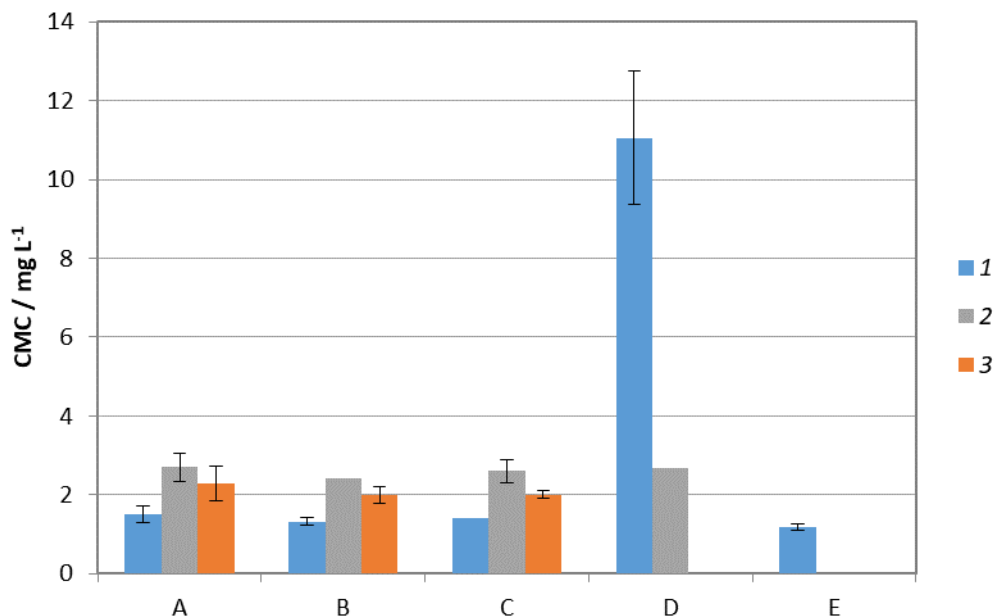


Abbildung 9: cmc-Werte der verschiedenen MEL-Chargen, hergestellt im Schüttelkolben.

Die Oberflächenspannung ist wichtig für die Emulgier- bzw. Reinigungsleistung. Möglichst niedrige Werte sind hier vorteilhaft. Die minimalen Oberflächenspannungen der untersuchten MEL-Chargen liegen zwischen 25 und 33 mN/m (Abbildung 10) und zeigen damit geeignete Werte für die angestrebte Anwendung. Zum Vergleich: die minimalen Oberflächenspannungen der Referenzsubstanzen sind 27,5 mN/m (Glucopon® 650EC), 41 mN/m (Kaliseife auf Olivenölbasis) und 41,9 mN/m (Kaliseife auf Sonnenblumenölbasis).

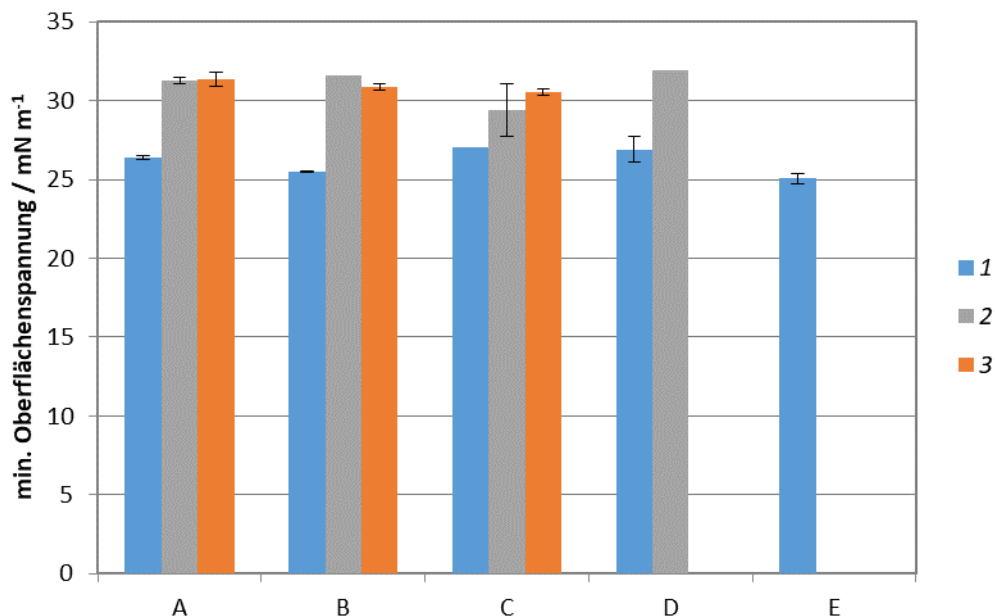


Abbildung 10: Minimale Oberflächenspannungen der verschiedenen MEL-Chargen, hergestellt im Schüttelkolben.

Schaumverhalten

Das Schaumvermögen und die Schaumstabilität von Tensidlösungen sind wichtig für die Anwendung in Produkten. Im Falle von Shampoos sind gutes Schaumvermögen und hohe Schaumstabilität gewünscht, bei Reinigungsmitteln sollte beides möglichst gering sein. Das Schaumvermögen der untersuchten MEL-Chargen ist in Abbildung 11 dargestellt. Je größer die Zeitdauer in s, desto geringer ist das Schaumvermögen. Das bedeutet, die MEL-Proben, welche die Marke von 1000 mL nicht innerhalb von 120 s erreichen, schäumen sehr schlecht. Sie sind damit den Kaliseifen vergleichbar. Sehr gut schäumen hingegen MEL von *Stamm 1* mit Öl A und von *Stamm 3* mit Öl C, sowie Öl A. Sie erreichen mit ca. 40 s den Wert von Glucocon® 650EC.

MEL von *Stamm 3* aus Öl B wurde im Schüttelkolben 2-mal hergestellt und somit ergaben sich 2 Chargen, 5541 und 7841. MEL 7841 zeigte ein komplett anderes Schaumverhalten und konnte im Gegensatz zu MEL 5541, welches schlecht schäumte, in $41 \pm 0,5$ s auf die 1000 mL Marke aufgeschäumt werden und zeigte somit auch eine gute Schäumbarkeit.

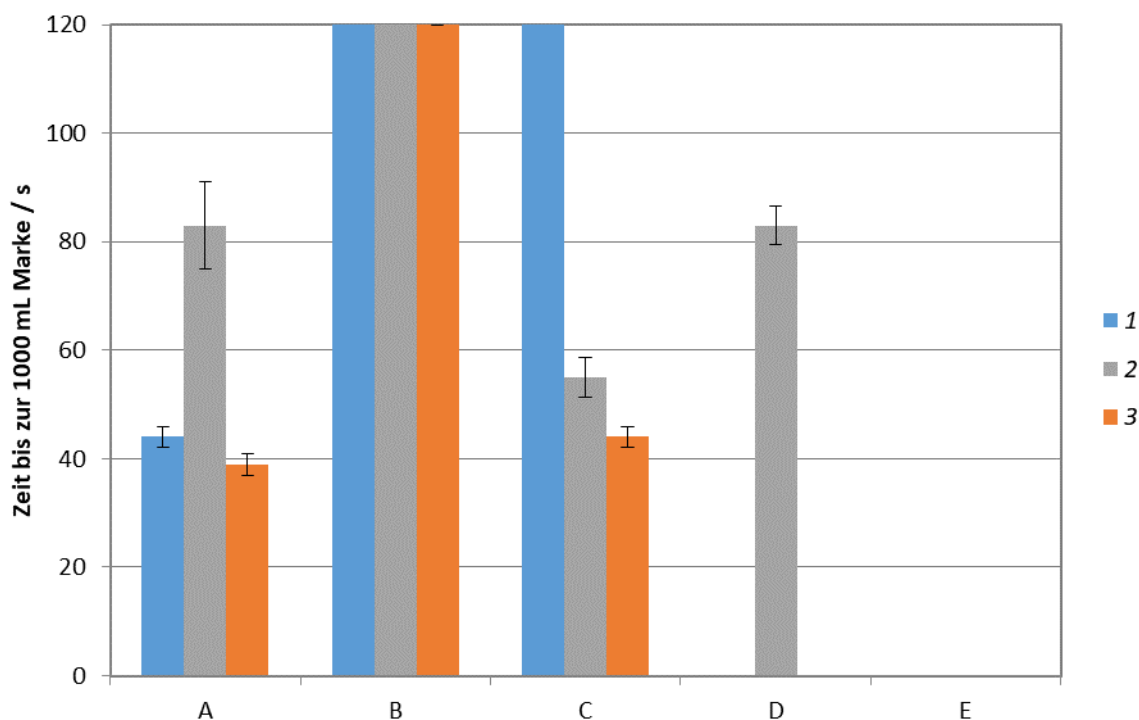


Abbildung 11: Schäumvermögen der verschiedenen MEL-Chargen, hergestellt im Schüttelkolben.

Die Schaumstabilität ist in Abbildung 12 dargestellt. Einen ähnlich stabilen Schaum wie er mit Glucocon® 650EC gebildet wird (> 300 s bis zum Absinken auf die 600 mL-Marke), bildet nur das von *Stamm 3* mit Öl C als Substrat produziertes MEL und Öl B, allerdings nur die reproduzierte Charge 7841 (nicht in Abbildung 12 dargestellt).

Ebenfalls wurden zwei Shampoos vom Partner Börlind auf die Schäumbarkeit untersucht. Eines davon wurde mit einem Anteil aus MEL 0112A hergestellt. Beide Shampoos zeigten

eine sehr gute Schäumbarkeit von $39,7 \pm 1,7$ s (ohne MEL) bzw. $40,3 \pm 0,9$ s (mit MEL) bis zum Erreichen der 1000 mL Marke und eine gute Schaumstabilität von > 300 s ohne dass der Schaum unter die 600 mL Marke fällt.

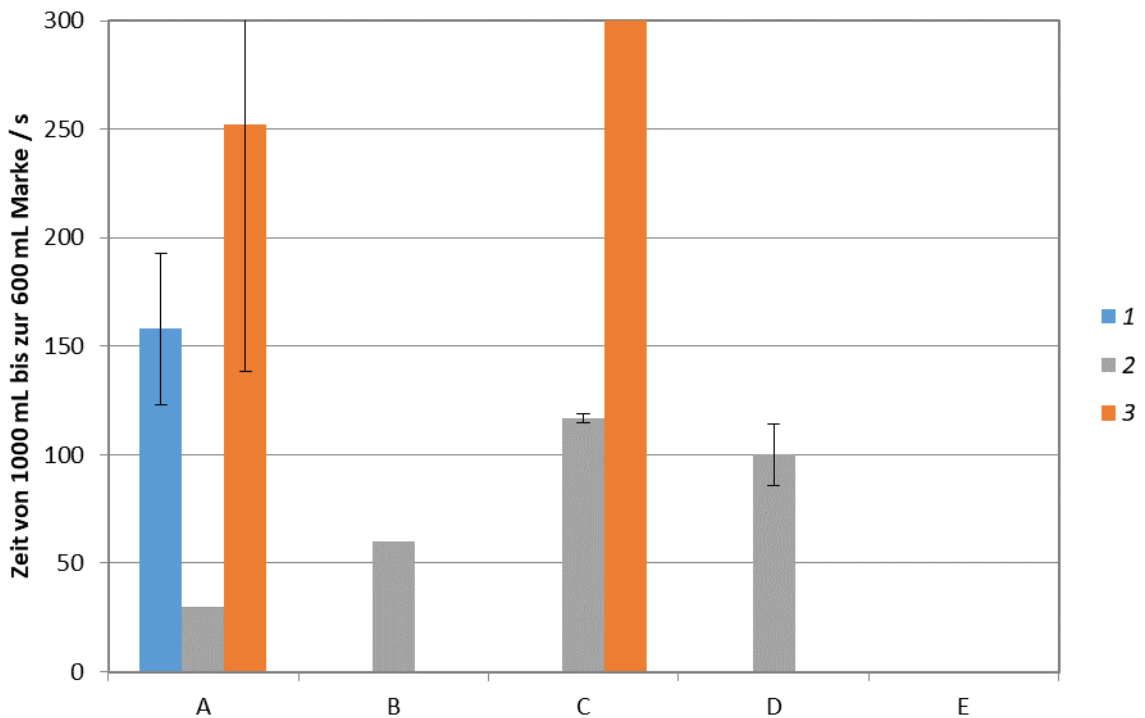


Abbildung 12: Schaumstabilität der verschiedenen MEL-Chargen, hergestellt im Schüttelkolben

Löslichkeit

Die Überprüfung der Löslichkeit nach OECD Richtlinie konnte nicht durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass auch durch Zentrifugieren bei sehr hohen g-Werten und Zeiten bis zu 60 Minuten keine eindeutige Phasentrennung erfolgt. Außerdem haben sich die Proben durch diese Prozedur deutlich erwärmt wodurch es zu fehlerbehafteten Bestimmung der Löslichkeit kommt.

Um höher konzentrierte MEL-Lösungen herzustellen wurde Ethanol und alkalisches Ethanol als Löslichkeitsvermittler getestet. Hierzu wurde MEL 5541 aus *Stamm 3* und Öl B sowie MEL 0112A aus *Stamm 1* und Öl A in Ethanol vorgelöst. Bei MEL 5541 konnte sowohl eine 10 %ige Lösung als auch eine 20 %ige Lösung mit jeweils 2 % alkalischem Ethanol hergestellt werden, sowie eine 10 %ige Lösung mit 2 % Ethanol. Bei MEL 0112A hat sich das MEL nicht in alkalischem Ethanol vorgelöst und auch nach Wasserzugabe konnte keine 10 %ige Lösung mit 2 % alkalischem Ethanol hergestellt werden.

4.3.2 Biologische Charakterisierung der MEL

Tenside für den Einsatz in WPR und KPM kommen bestimmungsgemäß mit der menschlichen Haut in Kontakt und können hier zu unerwünschten Reaktionen wie Allergien oder zytotoxischen Effekten führen. Für Untersuchungen zur Hautverträglichkeit wurden zellbasierte *in vitro* Methoden wie Toxizitätstestungen mit Keratinozyten und Fibroblasten sowie die Testung auf pyrogene und allergene Wirkung eingesetzt. Weiter wurden auch ergänzend zu den für die Kosmetik interessanten Ceramid-ähnlichen Eigenschaften, die in der Literatur beschrieben sind [23] am Beispiel von Keratinozyten und Fibroblasten mögliche zellproliferierende Eigenschaften untersucht. Zur Überprüfung der Eignung der MEL zum Konservierungstoff wurden antimikrobielle Untersuchungen mit den Qualitätskontroll-Referenzstämmen *E. coli* DSM 1576, *P. aeruginosa* DSM 50071, *S. aureus* DSM 346, *A. brasiliensis* DSM 1957 und *C. albicans* Sc1453 durchgeführt. Zudem wurde eine humanzellbasierte antimikrobielle Untersuchung zur Wirkung von MEL bei *C. albicans* DSM 1386 Infektionen durchgeführt. Um die Eignung von MEL in Produkten zur Gesichtspflege bei Akne zu überprüfen wurden abschließend antimikrobielle Untersuchungen zur Wirkung gegen *Cutibacterium acnes* DMS 1897, dem Erreger der Gesichtsakne, durchgeführt. Bei der Darstellung der Ergebnisse der Daten zum Zwischenbericht wurde nicht beachtet, dass es sich bei der Referenz Glucocon® 650EC bereits um eine Vorformulierung mit einem maximalen Glucocon-Anteil von 50 % handelt. Dies wurde jedoch in der hier vorliegenden Darstellung der Ergebnisse zum Endbericht korrigiert.

Zytotoxizitätsuntersuchungen (Universität Stuttgart IGVP)

Für Tensidanwendungen mit direktem Hautkontakt ist die Zytotoxizität ein wichtiges Merkmal. Aus diesem Grund wurde die Wirkung der erzeugten MEL auf Fibroblasten und Keratinozyten als repräsentative Zelltypen der humanen Haut untersucht. Keratinozyten bilden hierbei die äußere Schicht der Haut, die Epidermis, und Fibroblasten befinden sich in der darunterliegenden Hautschicht, der Dermis. Entsprechend sind Keratinozyten im Vergleich zu Fibroblasten äußeren Einflüssen gegenüber im Allgemeinen robuster. Dies wurde in den Zytotoxizitätsuntersuchungen auch bestätigt. Weiter wurde ermittelt, dass alle untersuchten MEL im Vergleich zum Referenzensid für Fibroblasten weniger gut zellverträglich sind, d.h. sie besitzen mit einem CC50 von kleiner 0,02 g/L im Vergleich zu dem CC50 von Glucocon® 650EC mit 0,18 g/L die stärkeren zytotoxischen Eigenschaften bei Fibroblasten, obwohl sie im gleichen Größenordnungsbereich liegen (siehe Abbildung 13 A). Der CC50 für Keratinozyten von 0,08 g/L von MEL von *Stamm 2* und Öl B hat den gleichen Wert wie das Referenzensid Glucocon® 650EC und ist damit für Keratinozyten gleichgut zellverträglich wie Glucocon® 650EC. Mit einem CC50 von 0,04 g/L besitzen die MEL aus *Stamm 1* und Öl D sowie die MEL aus *Stamm 1* und Öl A auf Keratinozyten einen CC50-Wert, der halb so groß

Ergebnisse

ist wie der von Glucopton® 650EC. Alle weiteren untersuchten MEL sind im Vergleich zu Glucopton® 650EC für Keratinozyten weniger gut zellverträglich, liegen jedoch im gleichen Größenordnungsbereich (siehe Abbildung 13 B).

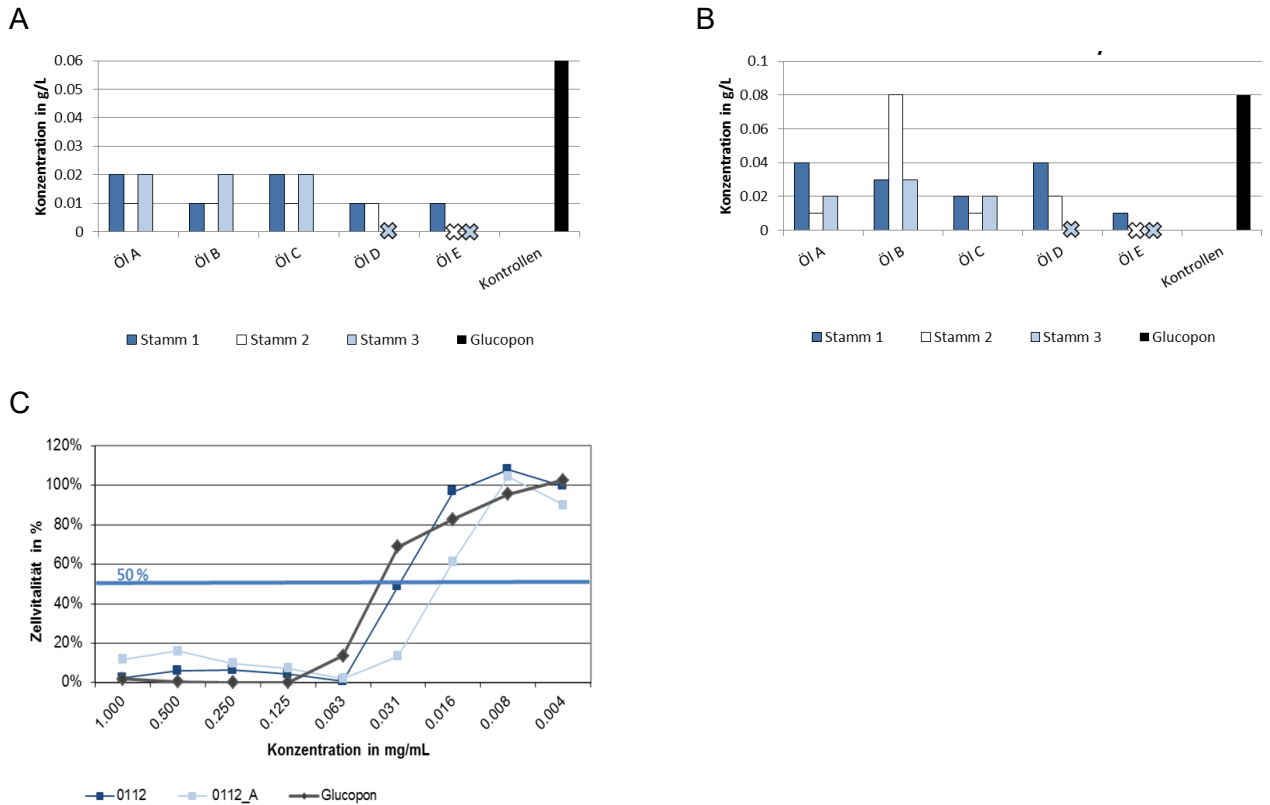


Abbildung 13: Zytotoxizität von MEL bei (A) Fibroblasten und (B) Keratinozyten.

Abbildungen A, für Fibroblasten (hier eine höhere Skalierung gewählt; CC50 des Referenzstensids Glucopton® 650EC ist 0,18 g/L, und B, für Keratinozyten, zeigen die ermittelten CC50-Werte der untersuchten Tenside im direkten Vergleich. Je höher der CC50 Wert ist desto zellverträglicher ist das Tensid. Mit ✂ gekennzeichnete Proben wurden nicht untersucht. Abbildung C zeigt eine typische Kurvenverläufe der untersuchten MEL-Konzentrationen, der Basis der Bestimmung von CC50-Werten ist.

Zytotoxizitätsuntersuchungen II (Börlind)

Die Ergebnisse der Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen (MTT Test), um die Zytotoxizität von Biotensid *Stamm 2* (ÖI D) und Biotensid *Stamm 3* (ÖI C) zu messen, sind in den Tabelle 7 und Tabelle 8 zusammengefasst. Die rotmarkierten Daten zeigen, dass nach 24 Stunden Inkubationszeit bei einer Konzentration von 8 µg/mL bzw. 4 µg/mL eine Vitalität von 100 % der Zellen erzielt wird. Im Gegensatz zur Untersuchung des IGVP, in der die CC50-Werte, d.h. die Konzentrationen der MEL, bei denen 50 % der Zellen überleben, ermittelt wurden, wurden in dieser Untersuchung Konzentrationen ermittelt, die zu einer Vitalität von 100 % der Zellen führt. Daher sind die hier gezeigten Werte im Vergleich zu den gezeigten Werten des IGVP um einen Faktor 10 niedriger. Entsprechende Konzentrationen für 100 % Vitalität wurden in den Untersuchungen des IGVP ebenfalls ermittelt (siehe beispielhaft Abbildung 13 C), sind jedoch nicht gezeigt.

Tabelle 7: Wirkung der Verbindungen Biotensid *Stamm 2* (ÖI D) und Biotensid *Stamm 3* (ÖI C) auf die Vitalität der Keratinozyten (K593) nach 24 Stunden der Inkubation.

	Kontrolle		Biotensid Stamm 2 (ÖI D)							
			Einheit µg/ml							
			Stammlösung präpariert zu 100 mg/ml in Ethanol							
			0,25	0,5	1	2	4	8	40	100
Lebensfähigkeit (%)	95	106	92	95	102	90	89	98	57	5
	97	99	97	90	94	93	96	91	57	3
	97	106	103	97	98	100	100	93	60	4
Mittlerer	100		97	94	98	94	95	94	58	4
sem	2		3	2	2	3	3	2	1	1
Morphologische Anmerkungen	+		+	+	+	+	+	+	-,*	-

	Kontrolle		Biotensid Stamm 3 (ÖI C)							
			Einheit µg/ml							
			Stammlösung präpariert zu 10 mg/ml in ultrareinem Wasser							
			0,25	0,5	1	2	4	8	40	100
Lebensfähigkeit (%)	95	104	97	94	95	94	94	95	50	3
	96	100	93	86	97	99	100	96	52	2
	93	111	95	99	101	98	97	95	53	3
Mittlerer	100		95	93	98	97	97	96	52	3
sem	3		1	4	2	1	2	0	1	0
Morphologische Anmerkungen	+		+	+	+	+	+	+	-,*	-,*

Verschlüsselung

+: normale Population; +/-: Wachstumsreduzierung; 0: Zellmortalität
 g: Verbindungskörner; op: Undurchsichtigkeit der Verbindung; morphologische Veränderung; ag: agglutinierte Zellen

Tabelle 8: Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C) auf die Vitalität der Keratinozyten (K341) nach 48 Stunden der Inkubation.

	Kontrolle		Biotensid Stamm 2 (ÖI D) Stammlösung präpariert zu 100 mg/ml in Ethanol								Einheit: µg/ml	
			0,25	0,5	1	2	4	8	40	100		
Lebensfähigkeit (%)	73	86	74	78	73	69	65	47	0	0		
	104	121	103	104	98	90	87	60	1	0		
	106	111	109	101	103	92	91	64	0	0		
Mittlerer	100		95	94	92	84	81	57	0	0		
sem	7		11	8	9	7	8	5	0	0		
Morphologische Anmerkungen	+		+	+	+	+	+	-, *	0	0		

	Kontrolle		Biotensid Stamm 3 (ÖI C) Stammlösung präpariert zu 10 mg/ml in ultrareinem Wasser								Einheit: µg/ml	
			0,25	0,5	1	2	4	8	40	100		
Lebensfähigkeit (%)	92	98	93	95	91	93	88	65	0	0		
	104	97	93	90	103	91	88	73	0	0		
	102	106	90	91	92	95	85	68	0	0		
Mittlerer	100		92	92	95	93	87	69	0	0		
sem	2		1	2	4	1	1	2	0	0		
Morphologische Anmerkungen	+		+	+	+	+	+	-, *	0	0		

Verschlüsselung

+: normale Population; +/-: Wachstumsreduzierung; op: Opazität; 0: Zellmortalität
g: Verbindungskörner; op: Undurchsichtigkeit der Verbindung; morphologische Veränderung; ag: agglutinierte Zellen

Basierend auf diesen Zytotoxizitäts-Ergebnissen wurden für die weiteren Untersuchungen zur Zellmigration und Gen-Expression folgende Konzentrationen verwendet:

- **Biotensid Stamm 2 (ÖI D)**
K593 Migration-Assays 4 and 8 µg/ml
K341 Gen-Expressions-Assays 2 and 4 µg/ml
- **Biotensid Stamm 3 (ÖI C)**
K593 Migration-Assays 2 and 4 µg/ml
K341 Gen-Expressions-Assays 2 and 4 µg/ml

Wirkung auf die Zellmigration:

Die Zellmigration ist ein zentraler Bestandteil der Homeostase der Haut und damit essenziell zur Wundheilung und bei Entzündungsprozessen. Zur Hautregeneration proliferieren, differenzieren und migrieren epidermale Zellen aus der Basalmembran in entsprechend geschädigte Bereiche, nachdem sie von diesen Bereichen durch mechanische Signale und chemotaktische Moleküle wie pro-inflammatorische Signale angezogen werden. Das Erbgut, die Umwelt, die Hygiene oder Akne, Entzündungen, Narbenbildung oder Hautalterung sind bekannte Faktoren die einen Einfluss auf die Qualität und Geschwindigkeit der epidermalen

Regeneration haben. Zur Bestimmung der Zellmigration wird mit Hilfe eines Zellstoppers eine künstliche Wunde in einem Zellmonolayer nachgebildet. Es wird dann die Migration der umliegenden Zellen in diesen Bereichen zur Ausbildung eines konfluente Zellschicht bestimmt.

Unter den Kontrollbedingungen war die Migration der normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (NHEK) in entsprechend vorgeschädigten Bereichen moderat bei einer durchschnittlichen Heilung des Wundbereichs von 61% nach 14-stündiger Inkubation. In den darauffolgenden Stunden erhöhte sich die NHEK-Migration auf eine durchschnittliche Heilungsrate von 74% nach 18-stündiger Inkubation und erreichte schließlich 85% nach 24-stündiger Inkubation.

Die bei 10 ng/ml getestete Positivkontrolle, der epidermale Wachstumsfaktor EGF, erhöhte die Keratinozytenmigration mit der Zeit deutlich: Nach 14 bzw. 18 Stunden der Inkubation wurde eine durchschnittliche Heilung des Wundbereichs in Höhe von 85 % bzw. 96 % festgestellt, während eine vollständige Heilung (100 %) nach 24 Stunden der Inkubation erzielt wurde. Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen und validieren den Testaufbau.

Unter den experimentellen Bedingungen dieses Tests zeigten die Verbindungen Biotensid *Stamm 2* (Öl D), getestet bei 4 und 8 µg/ml, und Biotensid *Stamm 3* (Öl C), getestet bei 2 und 4 µg/ml, keine klare, deutliche Wirkung auf die NHEK-Migration (vgl. Tabelle 9).

Ergebnisse

Tabelle 9: Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (Öl D) und Biotensid Stamm 3 (Öl C) auf die Keratinozyten-Migration (K593) nach 0, 14, 18 und 24 Stunden der Inkubation.

Behandlung			T0	14 Stunden						18 Stunden						24 Stunden									
Testverbindung	Konzentration	Bilder	Ursprünglicher Bereich (mm ²)	Wundbereich (mm ²)	Wundheilung (%)	Mittlerer (%)	sem (%)	% Kontrolle (%)	sem (%)	p ⁽¹⁾	Wundbereich (mm ²)	Wundheilung (%)	Mittlerer (%)	sem (%)	% Kontrolle (%)	sem (%)	p ⁽¹⁾	Wundbereich (mm ²)	Wundheilung (%)	Mittlerer (%)	sem (%)	% Kontrolle (%)	sem (%)	p ⁽¹⁾	
Kontrolle	-	T 1	3,13	1,20	62						0,75	76						0,41	87						
		T 2	3,22	1,33	59	61	1	100	2	-	0,96	70	74	2	100	3	-	0,55	83	85	1	100	1	-	
		T 3	3,37	1,25	63						0,81	76						0,46	86						
EGF	10 ng/ml	R 1	3,26	0,48	85						0,12	96						0,00	100						
		R 2	3,36	0,55	84	85	1	139	1	***	0,16	95	96	1	130	1	***	0,00	100	100	0	117	0	***	
		R 3	3,27	0,46	86						0,07	98						0,00	100						
Biotensid Stamm 2 (Öl D)	4 µg/ml	12 1	3,08	1,06	66						0,70	77						0,44	86						
		12 2	3,13	1,13	64	64	1	105	2	ns	0,83	73	75	1	102	1	ns	0,56	82	85	1	99	2	ns	
		12 3	3,05	1,15	62						0,74	76						0,42	86						
	8 µg/ml	11 1	3,34	1,32	60						0,93	72						0,57	83						
		11 2	3,07	1,33	57	57	2	94	3	ns	0,96	69	69	2	93	3	ns	0,55	82	80	2	94	2	ns	
		11 3	3,13	1,41	55						1,08	65						0,74	76						
Biotensid Stamm 3 (Öl C)	2 µg/ml	22 1	3,31	1,20	64						0,73	78						0,42	87						
		22 2	3,29	1,20	64	63	1	103	2	ns	0,74	78	77	1	104	1	ns	0,39	88	87	1	102	1	ns	
		22 3	3,20	1,26	61						0,78	76						0,47	85						
4 µg/ml	21 1	3,14	1,20	62						0,85	73						0,46	85							
	21 2	3,23	1,51	53	57	3	93	4	ns	1,09	66	70	2	94	3	ns	0,65	80	83	2	97	2	ns		
	21 3	3,32	1,47	56						0,99	70						0,53	84							

⁽¹⁾ : Schwelle der statistischen Signifikanz

ns: > 0,05, Nicht signifikant

*: 0,01 bis 0,05, Signifikant

** : 0,001 bis 0,01, Sehr signifikant

***: < 0,001, Äußerst signifikant

 Ausgewählte Bilder für den Studienbericht

Wirkung auf die Genexpression:




Die Genexpressionsanalyse misst in Zellen in Abhängigkeit der Umweltbedingungen die Aktivität und die Expression von Genen und gibt damit einen Überblick über zelluläre Funktionen. Es wurden in der beauftragten Analyse exemplarisch Gene von Proteinen untersucht, welche bei der Hautregeneration eine Rolle spielen:

- House-keeping zum Vergleich der Expressionsstärke: *PRS28, GAPD*
- Organisation der extrazellulären Matrix: *COL4A1, COL7A1, LAMC2, MMP3*
- Keratinozytendifferenzierung: *CALML5, FLG, KRT10, LOR, TGM1*
- Inflammatorische Signale: *IL8*
- Apoptoseenzym: *CASP14*
- Antimikrobielle Peptide: *DEFB4A, S100A7*
- Zell-Zellinteraktion von Zellen der Hornschicht: *CDSN*

Als Positivkontrolle für das Zellwachstum wurde 1,5 mM CaCl₂ eingesetzt, da vor allem Kalzium die Keratinozytendifferenzierung reguliert und in vielen Signalwegen der Differenzierung wie der Bildung von Desmosomen oder Adherens und Tight Junctions (z.B. COL4A1, COL7A1, LAMC2, MMP3) beteiligt ist. Die Behandlung der normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (NHEK) mit der Referenz-Verbindung CaCl₂ (1,5 mM) über 48 Stunden führte zu einem Anstieg der Expression der an der Keratinozyten-Differenzierung beteiligten Marker (KRT10 und TGM1) und zu einer Hochregulierung des angeborenen Immunitätsmarkers (DEFB4A) (siehe Tabelle 10). Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen und validieren die Durchführung der Tests.

Tabelle 10: Wirkung des Referenz-Calciumchlorids auf das Genexpressionsprofil in normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (K341).

mQPA-NHEK-16	Gene	Kontrolle	CaCl ₂	
		-	1,5 mM	
		Zyklen	Zyklen	% Kontrolle Mittlere HK
	Abkürzung			
Haushalt	RPS28	18,58	18,64	104
		18,57	18,59	
	GAPDH	16,64	16,75	99
		16,67	16,77	
Dermo-epidermale Junktion	COL4A1	23,65	24,18	76
		23,64	24,07	
	COL7A1	21,12	21,65	69
		21,05	21,77	
	LAMC2	20,73	20,98	90
		20,81	21,05	
Keratinozyten-Differenzierung	CALML5	24,28	24,61	84
		24,26	24,61	
	FLG	26,28	26,03	131
		26,03	25,70	
	KRT10	21,15	17,94	926
	21,05	18,02		
LOR	27,33	27,45	104	
		27,54	27,47	
TGM1	24,62	22,84	358	
	24,57	22,85		
Zytokine / Chemokine	IL8	29,21	29,28	97
		29,46	29,68	
Apoptose	CASP14	25,92	26,61	74
		26,09	26,44	
Antimikrobische Peptide, angeborene Immunität	DEFB4A	30,85	28,93	397
		30,70	28,82	
S100A7	24,74	23,85	188	
	24,67	23,92		
Zell-Zell-Interaktionen	CDSN	26,56	26,64	90
		26,33	26,72	
Extrazelluläre Matrix	MMP3	26,61	27,31	60
		26,51	27,46	

 Hochregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Stimulierung): %200
 Runterregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Hemmung): %50
 Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren,
 hohe Anzahl an Zyklen entspricht einer niedrigen relativen
 Expression, nahe an der Nachweisgrenze > 31
 Nicht nachgewiesen oder atypische Schmelzkurve:

Insgesamt modulierten die Verbindungen Biotensid *Stamm 2* (Öl D) und Biotensid *Stamm 3* (Öl C), getestet bei 2 und 4 µg/ml, das Genprofil nicht signifikant (vgl. Tabelle 11 und Tabelle 12). Tatsächlich zeigte sich mit der Verbindung Biotensid *Stamm 2* (Öl D) in beiden getesteten Konzentrationen nur eine schwache, vergleichbare stimulierende Wirkung auf die IL8-Genexpression zusammen mit einer sehr leichten hemmenden Wirkung der CALML5-Genexpression, wenn die Verbindung in der niedrigsten Konzentration getestet wurde. Zudem tendierte die Verbindung Biotensid *Stamm 3* (Öl C) dazu, die Genexpression des antimikrobiischen Peptids DEFBA4A sehr leicht zu hemmen. Eine entsprechend positive Beeinflussung auf die Genexpression hautregenerierender Genmarker wurde damit für die untersuchten MEL nicht nachgewiesen, dennoch können zum jetzigen Stand keine endgültigen Aussagen über hautregenerierende Eigenschaften der MEL getroffen werden. Die hier durchgeführte Genexpressionsanalyse untersucht RNA (mRNA), welche von den Zellen während der Transkription gebildet werden, um daraus später während der Translation Proteine zu bilden. Da es neben der Veränderung der mRNA auch alternative Mechanismen der Proteinregulierung gibt, kann letztlich ohne eine weiterführende Genexpressionsanalyse auf Proteinebene keine finale Aussage über die Hautregenerierende Wirkung der MEL getroffen werden. Auch die konkreten Auswirkung der in der Genexpression ermittelten Inhibition von DEFBA4A müssen erst weiterführenden Untersuchungen auf das Mikrobiom der Haut ermittelt werden.

Tabelle 11: Wirkung der Verbindung Biotensid Stamm 2 (Öl D) auf das Genexpressionsprofil in normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (K341).

mQPA-NHEK-16	Gene	Kontrolle	Biotensid Stamm 2 (Öl D)			
		-	2 µg/ml		4 µg/ml	
	Abkürzung	Zyklen	Zyklen	% Kontrolle Mittlere HK	Zyklen	% Kontrolle Mittlere HK
Haushalt	RPS28	18,58	18,67	90	18,77	94
		18,57	18,70		18,61	
	GAPDH	16,64	16,72	103	16,72	101
		16,67	16,44		16,61	
Dermo-epidermale Junktion	COL4A1	23,65	23,98	81	24,29	68
		23,64	23,84		24,16	
	COL7A1	21,12	21,15	90	21,85	63
		21,05	21,23		21,70	
	LAMC2	20,73	20,55	107	21,48	63
		20,81	20,72		21,43	
	CALML5	24,28	25,45	48	24,61	80
		24,26	25,15		24,64	
Keratinocyten-Differenzierung	FLG	26,28	26,32	85	26,11	116
		26,03	26,35		25,84	
	KRT10	21,15	21,58	68	21,08	95
		21,05	21,66		21,34	
	LOR	27,33	27,01	124	27,11	131
27,54		27,14	27,04			
TGM1	24,62	25,01	76	24,74	91	
		24,57	24,88		24,79	
Zytokine / Chemokine	IL8	29,21	27,75	279	27,81	276
		29,46	27,86		27,99	
Apoptose	CASP14	25,92	26,31	80	26,57	61
		26,09	26,24		26,94	
Antimikrobische Peptide, angeborene Immunität	DEFB4A	30,85	31,44	61	31,41	57
		30,70	31,45		31,84	
	S100A7	24,74	24,85	86	25,11	75
		24,67	24,91		25,19	
Zell-Zell-Interaktionen	CDSN	26,56	26,83	67	26,56	90
		26,33	27,14		26,68	
Extrazelluläre Matrix	MMP3	26,61	26,59	93	26,81	89
		26,51	26,66		26,70	







 Hochregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Stimulierung): >20%
 Runterregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Hemmung): <50%
 Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren,
 hohe Anzahl an Zyklen entspricht einer niedrigen relativen
 Expression, nahe an der Nachweisgrenze >31
 Nicht nachgewiesen oder atypische Schmelzkurve:

Tabelle 12: Wirkung der Verbindung Biotensid Stamm 3 (Öl C) auf das Genexpressionsprofil in normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (K341).

mQPA-NHEK-16	Gene	Kontrolle	Biotensid Stamm 3 (Öl C)			
		-	2 µg/ml		4 µg/ml	
		Zyklen	Zyklen	% Kontrolle Mittlere HK	Zyklen	% Kontrolle Mittlere HK
	Abkürzung					
Haushalt	RPS28	18,58	18,66	90	18,86	80
		18,57	18,58		18,84	
	GAPDH	16,64	16,47	103	16,52	105
		16,67	16,57		16,54	
Dermo-epidermale Junktion	COL4A1	23,65	23,94	78	23,82	90
		23,64	23,88		23,69	
	COL7A1	21,12	21,24	84	20,76	115
		21,05	21,24		20,92	
LAMC2	20,73	20,97	90	20,20	124	
	20,81	20,69		20,65		
Keratinozyten-Differenzierung	CALML5	24,28	24,69	72	24,49	80
		24,26	24,61		24,61	
	FLG	26,28	25,70	127	25,92	121
		26,03	25,71		25,73	
	KRT10	21,15	20,94	97	21,06	99
		21,05	21,17		21,08	
LOR	27,33	27,01	148	27,03	122	
	27,54	26,56		27,16		
TGM1	24,62	24,70	88	24,62	92	
	24,57	24,65		24,71		
Zytokine / Chemokine	IL8	29,21	29,30	115	28,56	168
		29,46	28,80		28,51	
Apoptose	CASP14	25,92	25,70	119	25,45	141
		26,09	25,60		25,47	
Antimikrobiische Peptide, angeborene Immunität	DEFB4A	30,85	31,93	49	31,85	49
		30,70	31,50		31,64	
	S100A7	24,74	24,72	92	25,06	72
		24,67	24,73		25,19	
Zell-Zell-Interaktionen	CDSN	26,56	26,09	116	26,18	111
		26,33	26,16		26,29	
Extrazelluläre Matrix	MMP3	26,61	26,29	102	26,74	96
		26,51	26,58		26,41	

 Hochregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Stimulierung): >20%
 Runterregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Hemmung): <50%
 Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren,
 hohe Anzahl an Zyklen entspricht einer niedrigen relativen
 Expression, nahe an der Nachweisgrenze >31
 Nicht nachgewiesen oder atypische Schmelzkurve:

Untersuchung der MEL auf pyrogene Rückstände (Universität Stuttgart)

Die Untersuchung der MEL auf pyrogene Rückstände, die im Menschen im schlimmsten Fall zu Sepsis führen können, sowie auf die allergene Wirkung der MEL wird mit dem so genannten PAMP-Assay durchgeführt. Hierbei handelt es sich um zellbasiertes Testsystem, das die Identifizierung pyrogener Rückstände und zudem Rückschlüsse auf das allergene Potential über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, den Toll-like Rezeptoren (TLRs) ermöglicht. Für den Assay wurden entsprechende TLRs in NIH 3T3 Fibroblasten, die bereits das Reportergen enthalten, transfiziert und exprimiert. Die Aktivierung der TLRs durch pyrogene Rückstände oder Allergene führt letztlich zur Expression des Reportergens, einer

sezernierenden embryonalen alkalischen Phosphatase (SEAP). Bei positiven Proben entsteht durch Substratzugabe ein gelber Farbumschlag. Pyrogene aus bakteriellen Verunreinigungen werden über TLR4/CD14 und TLR 1/2 detektiert, wohingegen Rückstände des Produktionsstammes mittels TLR 2/6 detektiert werden können. Bei der allergischen Kontaktdermatitis sind sowohl TLR4/CD14 als auch TLR1/2 und TLR 2/6 beteiligt.

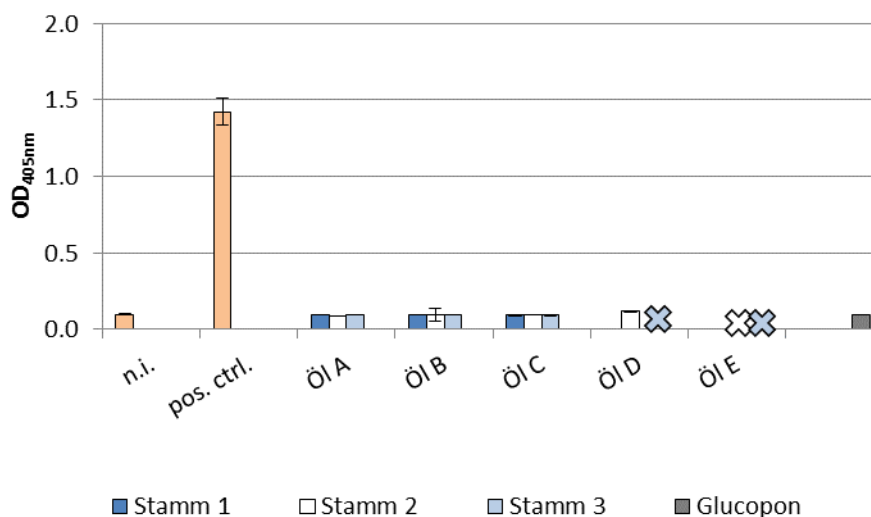


Abbildung 14: Pyrogene Rückstände und allergene Wirkung der MEL.

Untersucht mittels der Zelllinie NIH 3T3 SEAP TLR1/2

Für die untersuchten MEL in einer Konzentration von 4 µg/mL wurde keine TLR1/2 Aktivierung nachgewiesen. n.i. ist die nicht induzierte Kontrolle, pos. ctrl. zeigt das Signal der Rezeptoren, die durch 1 mg/mL Pam₂CysSK₄ aktiviert wurden. Mit ☒ gekennzeichnete MEL wurde nicht analysiert.

Abbildung 14 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Untersuchung der MEL auf pyrogene Rückstände und allergene Wirkung mit der Zelllinie NIH 3T3 SEAP TLR1/2. Es wurde gezeigt, dass alle untersuchten MEL das Reporter-gen in gleichem Maße anschalten wie die Negativkontrolle (n.i.). Bei alle anderen untersuchten Zelllinien NIH 3T3 SEAP TLR2/6 und NIH 3T3 SEAP TLR4 / CD14 (Ergebnisse hier nicht gezeigt) zeigte sich das gleiche Bild: Alle untersuchten MEL führten zu keiner Aktivierung des Rezeptors. MEL besitzen daher weder allergenes Potential noch sind pyrogene Rückstände vorhanden.

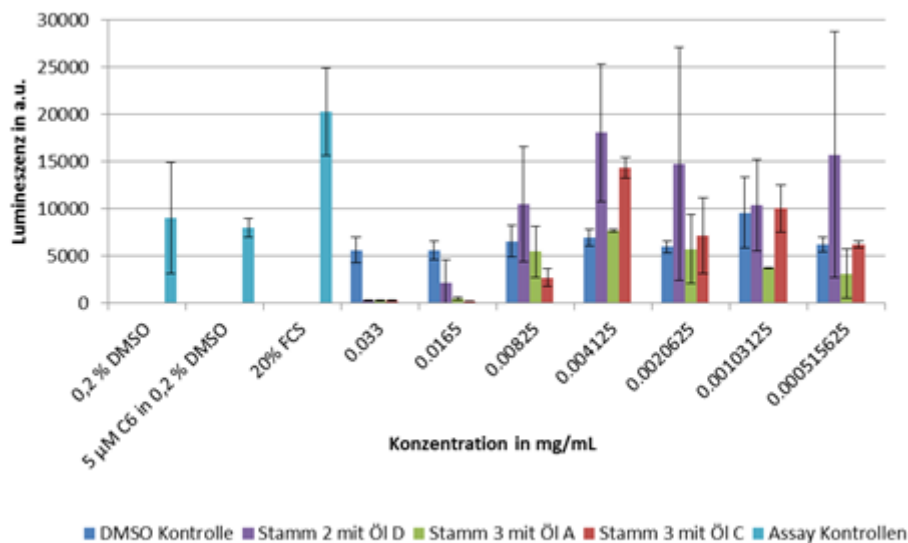
Untersuchung auf zellproliferierende Wirkung

In der Literatur sind Ceramid-ähnliche und Feuchtigkeit-spendende Wirkungen für MEL beschrieben [23, 8], weshalb sie von der japanischen Firma Toyobo Co.LTD unter dem Markennamen SurfMellow® als Bestandteil von Feuchtigkeitscremes vertrieben werden [22]. Ergänzend zu den in der Literatur beschriebenen Haut-regenerierenden Eigenschaften wurde in diesem Projekt die zellproliferierenden Eigenschaften ausgewählter MEL mittels BrdU-Assay untersucht. Die Auswahl erfolgte basierend auf den zytotoxischen Untersuchungen.

Hierbei zeigten MEL von *Stamm 2* mit Öl D, *Stamm 2* mit Öl D und *Stamm 3* mit Öl C in niedrigen Konzentrationsbereichen von wenigen µg/mL Hinweise auf zellproliferierende Eigenschaften bei Keratinozyten und Fibroblasten. Diese wurden nachfolgend mittels BrdU Assay überprüft. Zum Vergleich wurden als Positivkontrollen 20 % fetales Kälberserum Albumin (FCS), das Wachstumsfaktoren wie IGF-1, TGF-Beta1 u.v.m. enthält, sowie 5 µM Ceramide-6 nach Chen [22] verwendet.

Bedingt durch den Assayaufbau, mit unterschiedlichen Waschschritten, in denen auch nicht gut adhätierende Zellen abgewaschen werden und somit verloren gehen, ist die Standardabweichung bei Mehrfachbestimmung verhältnismäßig hoch. Daher sind die Ergebnisse lediglich als richtungsweisend für weitere Untersuchungen zu betrachten. Mit diesem Assay wurde eine Vorauswahl an MEL getroffen, die in weiterführenden Untersuchungen beauftragt von der Börlind GmbH von Bioalternatives S.a.s. auf ihre Zellproliferativen Eigenschaften mittels PCR untersucht wurden. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen zur Zellproliferierenden Eigenschaften von MEL gegenüber Fibroblasten (A) und Keratinozyten (B). Anhand dieser wurden als vielversprechende Kandidaten zur weiteren Untersuchung mit Wirkung auf Fibroblasten MEL aus *Stamm 2* mit Öl D im Konzentrationsbereich 1-8 µg/mL und *Stamm 3* mit Öl C im Konzentrationsbereich 1-4 µg/mL identifiziert. MEL aus *Stamm 3* mit Öl C mit zellproliferierenden Eigenschaften sind ebenfalls für weitergehende Untersuchungen ausgewählt worden.

A



B

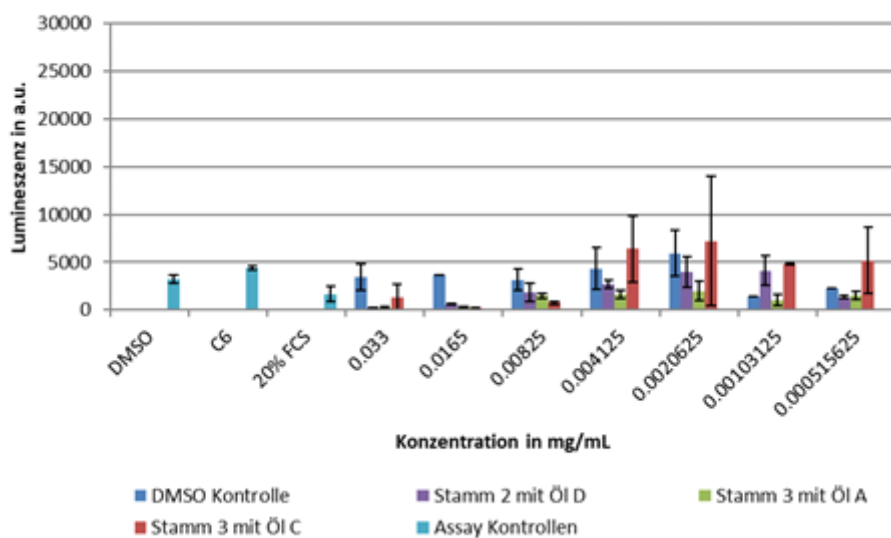


Abbildung 15: Zellproliferierende Eigenschaften ausgewählter MEL.

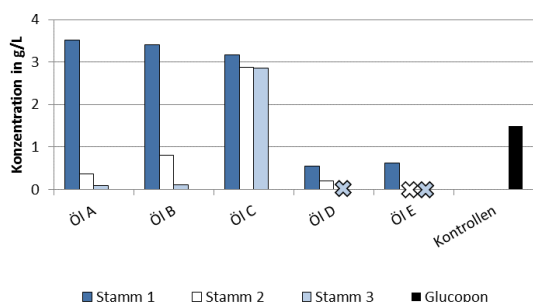
A) Zellproliferierende Wirkung gegenüber Fibroblasten. B) Zellproliferierende Wirkung gegenüber Keratinozyten. Assaykontrolle: DMSO; Positive Wachstumskontrolle: 20 % FCS sowie 5 µM Ceramide 6 (C6).

Untersuchung der MEL auf antibakterielle Wirkung

Tenside haben als membranaktive Substanzen vielfältige Wirkung auf lebende Zellen, sowohl auf mammalische Zellen als auch auf Zellen von Mikroorganismen. In hohen Konzentrationen können sie beispielsweise Kanäle in Zellmembranen erzeugen, wodurch kleine Moleküle wie Ionen und ATP austreten und zum Zelltod führen. Auf diesem Effekt beruht unter

anderem die antimikrobielle Wirkung von Biotensiden wie Surfactin [26]. *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* sind typische Keime, die durch den Verbraucher bei der Anwendung in die Produkte gelangen und diese verunreinigen können. Diese Bakterien werden auch in den Konservierungsbelastungstests der DIN EN ISO 11930:2012 [27] adressiert. Daher wurde die antibakterielle Wirkung der hergestellten MEL-Mischungen gegenüber drei ausgewählten Mikroorganismen, *E. coli* DSM 1576, *P. aeruginosa* DSM 50071 und *S. aureus* DSM 346, untersucht.

A



B

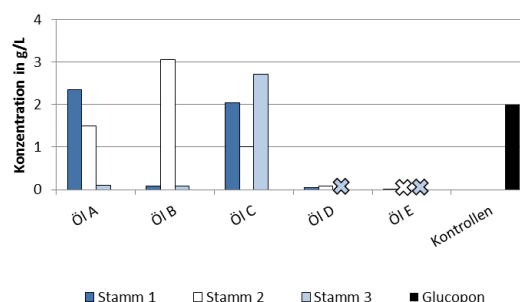


Abbildung 16: Antibakterielle Eigenschaften von MEL.

Abbildungen A zeigt die MIC50 für *P. aeruginosa*, Abbildung B, für *S. aureus*. Als Referenz tensid wurde Glucocon® 650EC verwendet. Je niedriger der MIC50 Wert ist desto antimikrobiell wirksamer ist das Tensid. Mit ☒ gekennzeichnete Proben wurden nicht untersucht.

Für eine Anwendung gegen den Gram-negativen *E. coli* wurde für keine der untersuchten MEL-Mischungen eine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen (Ergebnisse hier nicht gezeigt), wohingegen durchaus MEL-Mischungen sich als antimikrobielle Wirkstoffe gegen *P. aeruginosa* und *S. aureus* eignen. *P. aeruginosa* ist ein biofilmbildendes Bakterium, das zu Infektionen der Haut, der Augen und Pneumonien führen kann. Je niedriger der bestimmte MIC50 ist, desto weniger Wirkstoff genügt zur Bekämpfung des Mikroorganismus, und desto wirksamer ist er. Zur Abtötung des Gram-Negativen *P. aeruginosa* eignen sich daher besonders MEL aus *Stamm 3* mit Öl A mit einem MIC von 0,1 g/L sowie mit Öl B mit einem MIC von 0,11 g/L. Auch MEL aus *Stamm 2* mit Öl D mit einem MIC50 von 0,2 g/L und mit Öl A mit einem MIC50 von 0,36 g/L sind für eine antimikrobielle Anwendung gegen *P. aeruginosa* geeignet. Abbildung 16 A zeigt die MIC50 der untersuchten MEL im Vergleich zu Glucocon® 650 EC.

Der Gram-positive *S. aureus* führt unter anderem zu Infektionen der Haut, Wundinfektionen und Endokarditis. Es ist ein kugelförmiges Bakterium, das häufig in Haufen vorkommt. Es ist damit besser zu bekämpfen als das biofilmbildende Bakterium *P. aeruginosa*. Abbildung 16 B zeigt die MIC50 der untersuchten MEL im Vergleich zum Referenz tensid Glucocon®. MEL aus *Stamm 1* mit Öl E (MIC50 von 0,1 g/L), Öl D (MIC50 von 0,04 g/L) oder Öl B (MIC50 von 0,08 g/L) eignen sich ebenso wie MEL aus *Stamm 3* mit Öl C mit einem MIC50

von 0,11 g/L oder mit Öl B mit einem MIC50 von 0,09 g/L. Auch MEL aus *Stamm 2* mit Öl D besitzt mit einem MIC50 von 0,09 g/L antimikrobielle Eigenschaften gegenüber *S. aureus*.

Cutibacterium acnes (*C. acnes*) ist ein langsam wachsendes grampositives, anaerobes Bakterium und Teil der normalen menschlichen Hautflora. Es ist weiter jedoch auch bei Entstehung von Akne, v.a. der Acne vulgaris, beteiligt. Hierbei führt es zur Entzündungen des Hauttals v.a. von Haarfollikeln, die sich symptomatisch in mit Eiter gefüllten Pusteln manifestieren. Bei den Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von MEL gegenüber *C. acnes* zeigten sich MEL gegenüber dem Referenzensid Glucocon® 650EC mit MIC50 Konzentrationen von 0,004 bis 0,04 g/L als gut wirksam (Abbildung 17). Besonders wirksam sind hierbei mit einer MIC50 < 10 g/L MEL folgender Kombinationen:

- *Stamm 3* mit Öl C:
- *Stamm 3* mit Öl B:
- *Stamm 2* mit Öl D:
- *Stamm 2* mit Öl C:

Vergleicht man diese MEL mit herkömmlichen Antibiotika wie Ampicillin (MIC50 0,006 µg/mL), Imipenem (< 0,03 µg/mL) und Cleocin (< 0,06 µg/mL) sind sie zur Abtötung von *C. acnes* ebenfalls geeignet [28].

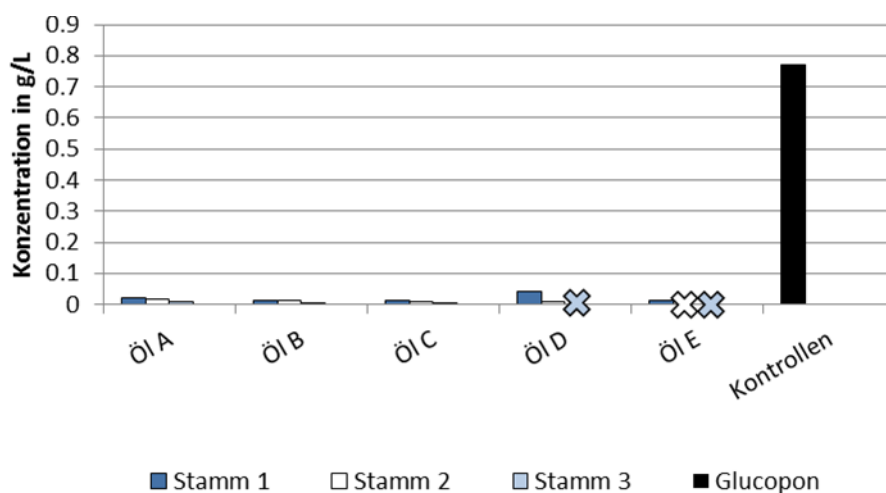


Abbildung 17: Antimikrobielle Aktivität gegenüber *C. acnes*.

Untersuchung der MEL auf antifungale Wirkung

Der Schimmelpilz *A. brasiliensis* ist ein typischer Problemkeim unter den Testorganismen und damit häufig maßgebend für das Ergebnis einer Prüfung von Kosmetika auf ausreichende Konservierung. In den Untersuchungen der MEL auf antifungale Wirkung gegen *A. brasiliensis* zeigten zwei MEL, MEL aus *Stamm 1* mit Öl D mit einem MIC50 von 1,65 g/L und MEL aus *Stamm 2* mit Öl C mit einem MIC50 von 1,63 g/L nur sehr geringe antifungale Wirkung und eignen sich daher nicht als Fungizid gegen *A. brasiliensis*. MEL von *Stamm 3* mit

Öl B mit einem MIC50 von 0,45 g/L zeigen hier eine 4-fach besser antifungale Wirkung gegen *A. brasiliensis*, der MIC50 Wert ist dennoch für eine Anwendung der MEL als Konservierungsmittel zu gering. Alle weiter untersuchten MEL haben auf das Wachstum von *A. brasiliensis* keinen Einfluss. Abbildung 18 gibt den Überblick über die MIC50-Werte der untersuchten MEL-Proben. Hierbei gilt je niedriger der MIC50-Wert desto größer ist die antifungale Wirkung der MEL und desto weniger MEL genügt im Einsatz. Für Proben bei denen kein Wert angegeben ist, wurde auch keine antimikrobielle Wirkung erzielt.

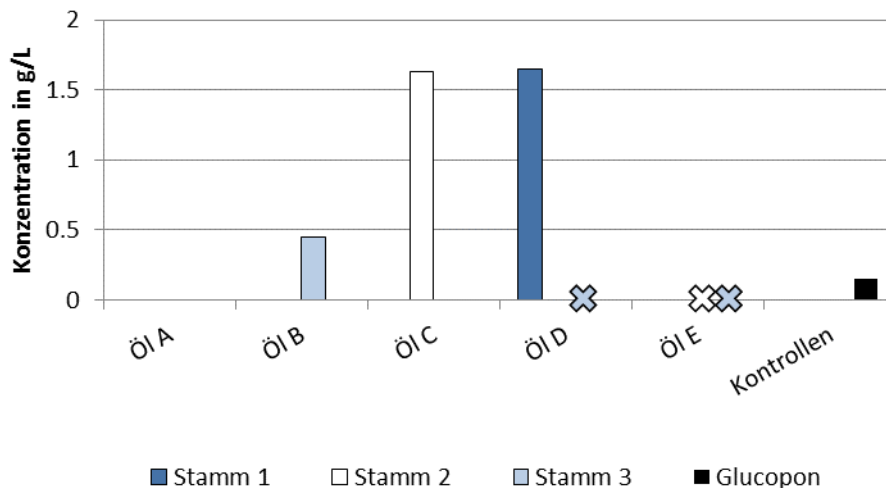


Abbildung 18: Antifungale Wirkung der untersuchten MEL.

Übersicht der MIC50-Werte der untersuchten MEL-Gemische. Ist kein Wert angegeben wurde keine antifungale Wirkung nachgewiesen. Mit ☒ gekennzeichnete MEL wurde nicht analysiert.

Der Hefepilz *Candida albicans* ist ein häufig vorkommender Saprobiot auf der menschlichen Haut, vor allem auf den Schleimhäuten von Mund und Rachen sowie im Genitalbereich. Als fakultativ pathogener Erreger kann er bei einem geschwächten Immunsystem eine Candidose auslösen, die mit Antimykotika zu behandeln ist. Kosmetika, vor allem Cremes, sind häufig mit *C. albicans* verunreinigt, da sie über die Finger des Nutzers in das Produkt eingetragen werden. Im Screening auf antifungale Wirkung der MEL gegenüber *C. albicans* wurde nur für ein MEL, MEL aus *Stamm 2* mit Öl C mit einem MIC50 von 1,56 mg/mL nachgewiesen. Alle weiteren untersuchten MEL zeigen hier keine antifungale Wirkung.

Activity-Selectivity-Assay

Im Activity-Selectivity Assay wird die kleinste Infektionseinheit, bestehend aus den Wirtszellen, hier primäre Fibroblasten, und Pathogenen, hier *C. albicans*, *in vitro* nachgebildet. Für in diesem System untersuchte Wirkstoffe, wie in diesem Fall MEL, können gleichzeitig Aussagen über die Zytotoxizität (CC50) und die antimikrobielle Wirkung (IC50) gegenüber dem

Pathogen sowie eine erste Aussage zur Stabilität des Wirkstoffs innerhalb der Inkubationszeit von zumeist mehreren Tagen getroffen werden. Der Quotient aus CC50 und IC50, der Selektivitätsindex, ist ein Maß für die Wirksamkeit und die Eignung eines Wirkstoffes, er gibt an wie gut der Wirkstoff zuerst ein Pathogen abtötet bevor er die humanen Zellen absterben lässt. Daher wird für einen effektiven Wirkstoff ein möglichst hoher SI-Wert angestrebt.

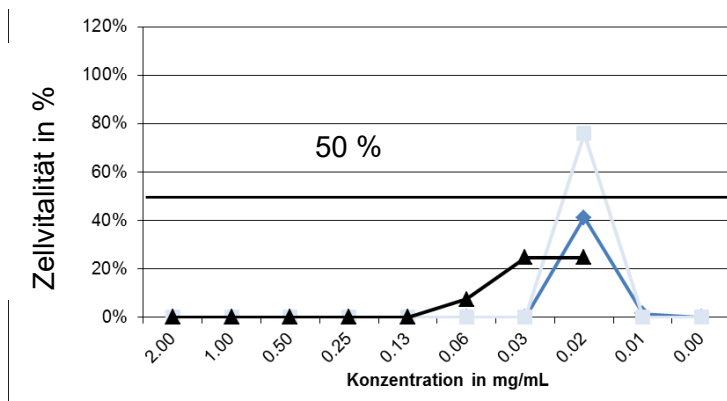


Abbildung 19: Activity-Selectivity Assay.

Kurvenverlauf dreier Tenside, MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (dunkelblaue Karos), MEL aus *Stamm 3* mit Öl B (hellblau Quadrate) und Glucopton® (schwarze Dreiecke), beginnend links im hohen Konzentrationsbereich der zytotoxischen Wirkung der Tenside übergehend in den Wirkungsbereich, in dem die zytotoxische Wirkung nachlässt und die antifungale Wirkung vorhanden ist, bis hin zum niedrigen Konzentrationsbereich, in dem die antifungale Wirkung nachlässt. Hier sterben die Zellen aufgrund der nicht bekämpften *C. albicans* Infektion. Einzig die MEL aus *Stamm 3* mit Öl B besitzen einen sehr engen Wirkungsbereich.

Abbildung 19 zeigt für drei ausgewählte Tenside, MEL aus *Stamm 1* mit Öl A, MEL aus *Stamm 3* mit Öl B und Glucopton, den typischen Kurvenverlauf des Activity-Selectivity Assays: Beginnend bei hohen Konzentrationen, die zytotoxisch sind, übergehend in einen Wirkungsbereich bei gleichzeitig geringen oder keinen zytotoxischen Effekten abschließend in einen Bereich niedriger Konzentrationen, bei denen keine antimikrobielle Wirkung gegen das Pathogen *C. albicans* vorhanden ist. Einzig MEL aus *Stamm 3* mit Öl B überschreitet mit der 0.02 g/L Konzentration die Marke, bei der 50 % der Zellen vital sind und besitzt damit sinnvolle Eigenschaften als Wirkstoff. Jedoch liegen CC50 mit 0,13 g/L und IC50 mit 0,21 g/L von der Konzentration sehr dicht aneinander, der SI Index ist folglich mit 2,27 im Vergleich zu typischen SI-Werten extrem niedrig. Ein Einsatz als Konservierungsmittel ist daher nicht sinnvoll. Alle weiteren MEL besitzen keinerlei Wirkungsbereiche (Ergebnisse hier nicht gezeigt), somit können auch sie nicht als Konservierungsmittel eingesetzt werden.

4.4 Testung der MEL in kosmetischen Grundlage

Untersuchung der MEL von Stamm 1 mit Öl A (Charge 0112) auf tensidische Eigenschaften

Die Ausgangsrezeptur des Shampoos mit einem Originalanteil des Zuckertensids Blanova® 1200 von 10 % hat einen pH-Wert von 5,0-5,1, eine Dichte von 1,08-1,09 g/cm³ sowie eine Viskosität von 1,6-1,9 Pas. Die Substitution von Blanova® 1200 mit MEL von *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112) mit einer Reinheit von 80 % hat keinen maßgeblichen Einfluss auf die Dichte der Rezeptur, die bei allen untersuchten MEL-Substitutionskonzentrationen bei 1,09 g/cm³ liegt, wohingegen der pH-Wert von 5,1 bei 0 % MEL auf 4,7 bei 5 % MEL sinkt (Abbildung 20). Ebenso sinkt mit einem höheren MEL-Anteil die Viskosität von 1,9 Pas bei 0 % MEL auf 0,28 Pas bei 5 % MEL (Abbildung 20), das heißt je höher der MEL-Anteil in der Rezeptur ist, desto dünnflüssiger wird die Rezeptur.

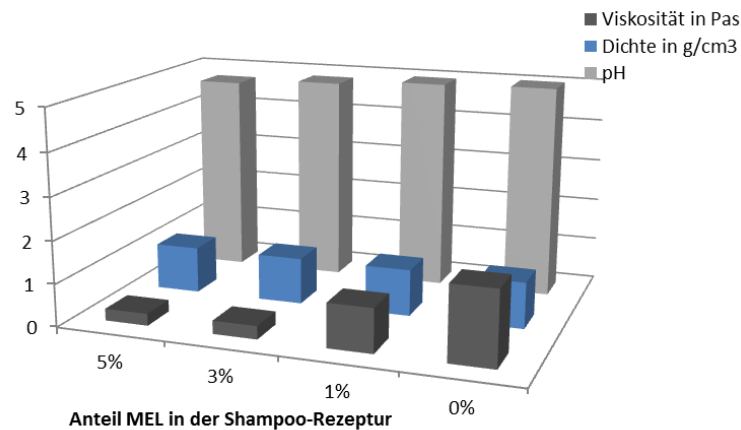


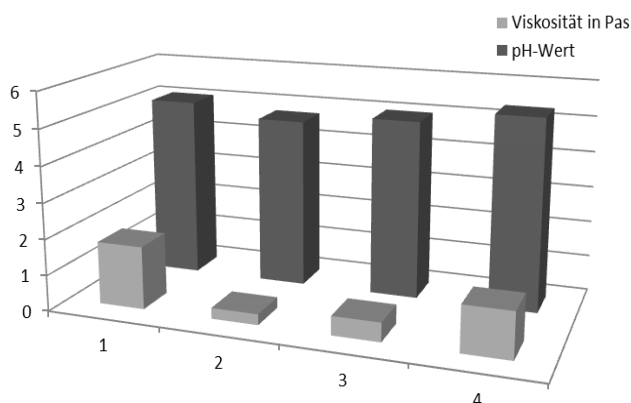
Abbildung 20: Einfluss von MEL auf die Original-Shampoo-Rezeptur.

Bei Zugabe der Rezeptur-Bestandteile Natriumchlorid und Zitronensäure zeigen sich bei den Shampoo-Rezepturen bis 3 % MEL Trübungen bis hin zu Ausfällungen (siehe Abbildung 21). Bei sonst unveränderter Rezeptur kann 1 % des Zuckertensids Blanova® 1200 bei gleichbleibendem gutem Schaumvermögen durch MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112) ersetzt, wobei sowohl die Viskosität und der pH-Wert geringfügig sinken.



Abbildung 21: Ausfällungen der Shampoo-Rezeptur bei einem MEL-Anteil von 5 %.

Weiter wurde der Einfluss von Natriumchlorid und Zitronensäure auf eine Shampoo-Rezeptur, in der Amisoft® CS 22 von 5,1 % auf 2,1 % reduziert und durch 3 % MEL aus Stamm 1 mit Öl A (Charge 0112) mit einer Reinheit von 80 % ersetzt wurde, untersucht. Durch den Austausch von Amisoft® CS 22 durch MEL sinkt der pH-Wert von 5,0 auf 4,73 und die Viskosität von 1,6-1,9 Pas auf 0,30 Pas. Diese Shampoo-Rezeptur ist damit dünnflüssiger als die Originalrezeptur.



- 1 Originalrezeptur:** 0 % MEL, 5,1 % Amisoft CS 22, 3 % Zitronensäure, 0,49 % NaCl
- 2 Einsatz MEL:** 3 % MEL, 2,1 % Amisoft CS 22, 3 % Zitronensäure, 0,49 % NaCl
- 3 Reduktion der Zitronensäure:** 3 % MEL, 2,1 % Amisoft CS 22, 0,35 % Zitronensäure, 1,28 % NaCl
- 4 Verzicht auf Zitronensäure** 3 % MEL, 2,1 % Amisoft CS 22, 0% Zitronensäure, 1,28 % NaCl

Abbildung 22: Einfluss von Zitronensäure auf eine Shampoo-Rezeptur mit 3 % MEL.

Abbildung 22 zeigt, dass durch die Zugabe von Zitronensäure zu einer Shampoo-Rezeptur, die 3 % MEL und 2,1 % Amisoft® CS 22 enthält, sowohl der pH-Wert als auch die Viskosität sinken. Die Zugabe des in der Rezeptur enthaltenen Natriumchlorids von 0,49 % hingegen führt zur Trübung und zu Ausfällungen der Shampoo-Rezeptur (siehe Abbildung 23). Durch eine Reduktion des Natriumchloridgehalts auf 1,283 % werden diese Trübung und die Ausfällungen vermieden und es entsteht ein klares Shampoo. Daher wurde in weiterführenden Versuchen mit reduzierten Salz- und Säurekonzentrationen gearbeitet, um zu überprüfen, ob dadurch größere Mengen an MEL eingesetzt werden können.



Abbildung 23: Ausfällungen der Shampoo-Rezeptur mit einem MEL-Anteil von 3 % hier wurde Amisoft® CS 22 durch 3 % MEL ersetzt.

Neben einer zu hohen Salzkonzentration kann ein weiterer Grund für Trübungen ein zu hoher Ölanteil in der nicht-aufgereinigten MEL Charge z.B. durch freie Fettsäuren sein. Ist der Ölanteil zu groß, ist das Andicken der Shampoo-Rezeptur mittels Salzen nicht mehr möglich, es müssen die Konzentration von anderen Rohstoffen verändert werden wie z.B. eine Erhö-

hung der Konzentration des Lösevermittlers Plantacare® 810 UP (INCI: CAPRYLYL/CAPRYL GLUCOSIDE, AQUA) oder eine Verringerung der Rohstoffe mit Ölanteil wie z.B. Lamesoft® PO 65 (INCI: AQUA, COCO-GLUCOSIDE, GLYCERYL OLEATE, CITRIC ACID).

Zur Untersuchung des Einflusses des Lösevermittlers Plantacare® 810 UP auf die Trübung wurden zunächst bei der Original-Shampoo-Rezeptur 5,1 % Amisoft® CS 22 durch 5,1 % MEL von *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112) mit einer Reinheit von 80 % ausgetauscht und zudem sind weder Natriumchlorid noch Zitronensäure enthalten. Dies führt zu einer starken Trübung des Shampoos. Durch eine Zugabe zu der oben beschriebenen Shampoo-Rezeptur von 4,12 % Plantacare® 810 UP werden ein pH-Wert von 5,3 und eine Viskosität von 0,85 Pas erreicht. Diese Shampoo-Rezeptur ist damit relativ dickflüssig und durch das fehlende Natriumchlorid ist es klar. Zur Erniedrigung des pH-Werts wurde in einer weiteren Shampoo-Rezeptur zu der oben beschriebenen Rezeptur 6,65 % Plantacare® 810 UP sowie 0,28 % Zitronensäure zugegeben. Damit sinkt der pH-Wert auf 5,01, vergleichbar der Original-Rezeptur ohne MEL, und die Viskosität auf 0,65 Pas. Dabei treten zunächst bei der Zugabe von Zitronensäure Ausfällungen auf, die durch die Zugabe von Plantacare® 810 UP wieder aufgelöst werden. Auch bei dem Einsatz von Natriumchlorid kann mittels des Lösevermittlers Plantacare® 810 UP eine Trübung des Shampoos durch Ausfällungen vermieden werden. Bei der Zugabe von 1 % Natriumchlorid und 4 % Plantacare® 810 UP ist der pH-Wert bei 5,20 und die Viskosität bei 0,58 Pas.

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurden die Tenside Lamesoft® PO 65 (INCI: COCO-GLUCOSIDE; GLYCERYL OLEATE, 2,4 %) und Amisoft® CS 22 (5,1 %) durch 7,5 % MEL von *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112) mit einer Reinheit von 80 % ausgetauscht und sowohl auf Natriumchlorid als auch Zitronensäure verzichtet. Hierbei stellen sich ein pH-Wert von 5,31 und eine Viskosität von 0,45 Pas ein. Diese Shampoo-Rezeptur ist trüb und dünnflüssig. Wird der Anteil von Plantacare® 810 UP auf 3 % erhöht, steigt die Viskosität auf 0,56 Pas, das Shampoo wird klar und dickflüssiger. Wird hierzu 0,2 % Zitronensäure gegeben bleibt das Shampoo weiterhin klar, der pH-Wert sinkt auf 5,07 und es wird dünnflüssiger mit einer Viskosität von 0,43 Pas. Ähnliche Ergebnisse resultieren aus einer Zugabe von 0,53 % Natriumchlorid zu einer Rezeptur, die statt 3 % Plantacare® 810 UP 2,14 % enthält. Hier ist bei einem pH-Wert von 5,18 das Shampoo ebenfalls klar und mit einer Viskosität von 0,43 Pas dünnflüssig.

In den ersten Untersuchungen, die zu Anfang des Kapitels beschrieben sind, wurde in einer Shampoo-Rezeptur Blanova® 1200 durch 3 % MEL von *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112) mit einer Reinheit von 80 % teilweise ersetzt. Dies führt zu sichtbaren Ausfällungen, die durch die Zugabe des Lösevermittlers Plantacare® 810 UP (3,75 %) gelöst werden können. Abbildung 24 stellt hier die Viskosität, die Dichte und er pH-Wert der Original-Shampoo-

Rezeptur (0 % MEL), der Rezeptur mit 3 % MEL und einer Rezeptur mit 3 % MEL und 3,75 % Plantacare® 810 UP gegenüber. Sowohl die Dichte als auch der pH-Wert der drei ausgewählten Rezepturen sind annähernd im gleichen Bereich, wohingegen die Viskosität der Rezepturen mit 3 % MEL auf 0,31 Pas und 0,48 Pas mit Plantacare® 810 UP im Vergleich zu 1,095 Pas der Originalrezeptur sinkt. Ein Einsatz von MEL in den untersuchten Rezepturen führt allgemein zu teilweise deutlich niedrigeren Viskosität und damit zu dünnflüssigerem Shampoo, das nur bedingt wieder erhöht werden kann.

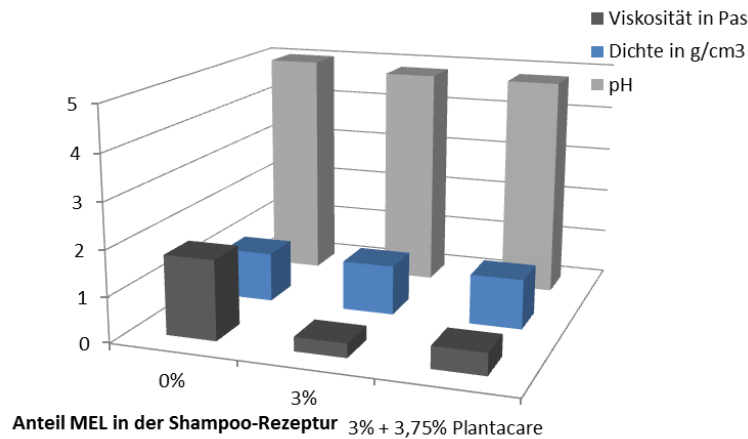


Abbildung 24: Shampoo-Rezepturen mit 3 % MEL mit und ohne Lösevermittler Plantacare® 810 UP.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse basieren auf MEL aus *Stamm 1* aus Öl A mit einer Reinheit von 80 %. Nachfolgend wird eine Shampoo-Rezeptur beschrieben, in der 3 % MEL mit einer Reinheit von 100 % zum Ersatz von Blanova® 1200 verwendet wurde. Das daraus resultierende Shampoo war klar und zufriedenstellend dickflüssig mit einem pH-Wert von 5,13, einer Dichte von 1,084 g/cm³ und einer Viskosität von 1,14 Pas. Diese Werte sind nahezu gleich den Werten der Originalrezeptur mit einem pH-Wert von 5,0-5,1, einer Dichte von 1,085 g/cm³ und einer Viskosität von 1,6-1,9 Pas (siehe Abbildung 25). Das aufgereinigte MEL (Charge 0112 mit einer Reinheit von 100 %) kann mit einer Konzentration von 3 % in die bestehende Shampoo-Rezeptur eingearbeitet werden (bei dementsprechender Reduktion des Tensids Blanova® 1200) ohne größere Abweichungen der Messparameter zu verursachen.

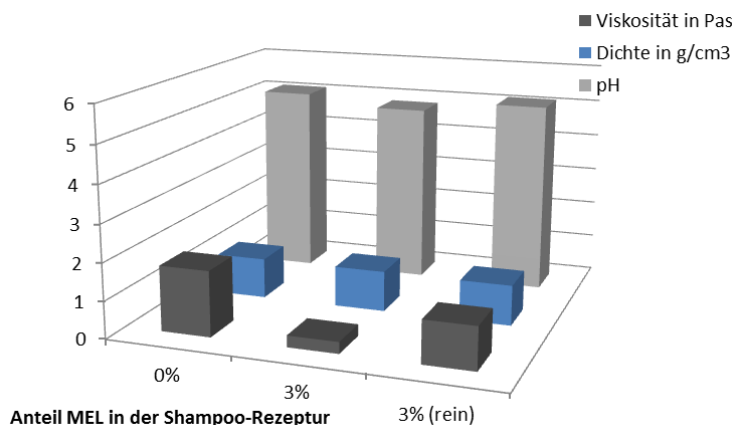


Abbildung 25: Shampoo-Rezepturen mit 3 % MEL mit einer Reinheit von 80 % und 100 %.

Untersuchung der MEL von Stamm 1 mit Öl A (Charge 0112) auf emulgierende Eigenschaften

Die Ausgangsrezeptur des Augenserums, einer Gelrezeptur mit einer kleinen Ölphase, hat einen pH-Wert von 6,4-6,6, eine Viskosität von 1,6-1,9 Pas und ist auch bei zweimaligem Zentrifugieren stabil. Hier wurde zunächst der Rohstoff Acticire® (INCI: JOJOBA ESTERS, ACACIA DECURRENS FLOWER WAX, HELIANTHUS ANNUUS (SUNFLOWER) SEED WAX, POLYGLYCERIN-3) durch MEL von *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112) mit einer Reinheit von 80 % ersetzt. Acticire® ist eine Wachsmischung mit leichten emulgierenden Eigenschaften. Der Ersatz von Acticire® durch 1 % MEL führt zu einem niedrigeren pH-Wert von 4,76 und eine Viskosität von 0,31 Pas und damit zu einer dünnflüssigeren Emulsion, die jedoch bei Zentrifugation eine gute Stabilität aufweist (Abbildung 26 links).

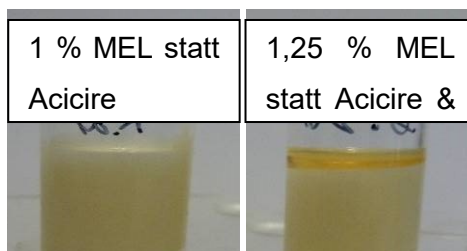


Abbildung 26: Stabilitätsprüfung verschiedener Augenserumrezepturen.

Wird zusätzlich zu Acticire® der Emulgator Amisoft® HS-11 (P) F (INCI: SODIUM STEAROYL GLUTAMATE) durch 1,25 % MEL ersetzt, sinkt der pH-Wert weiter auf 3,95 und die Emulsion ist nicht mehr stabil bei Zentrifugation: nach 15 min bildet sich ein 1 mm Ölüberstand des enthaltenen Jojobaöls aus, nach weiteren 15 min Zentrifugation bildet sich bereits ein 2 mm Ölüberstand des enthaltenen Jojobaöls aus. Damit besitzt MEL von *Stamm 1* aus Öl A (Charge 0112) mit einer Reinheit von 80 % geringe emulgierende Eigenschaften.

Untersuchung der MEL von *Stamm 1* mit Öl A (Charge 6711) auf tensidische Eigenschaften in einer Reinigungsmilch

Die Ausgangsrezeptur der Reinigungsmilch, eine Wasser in Öl Emulsion, mit einem kleinen Anteil an Tensid (Blanova® 1200), hat einen pH Wert von 7,5 – 8,5, eine Viskosität von 0,2 – 0,3 Pas und ist auch bei zweimaligem Zentrifugieren stabil.

Hier wurde zunächst der Rohstoff Blanova® 1200 (INCI: AQUA, LAURYL GLUCOSIDE) durch MEL von *Stamm 1* mit Öl A (Charge: 6711) ersetzt. Eine Übersicht zu den Beobachtungen wird in Tabelle 13 gegeben.

Das zur Hälfte durch 1,5 % MEL ersetzte Blanova® 1200 führt zu einem niedrigeren pH-Wert von 7,36 und einer Viskosität von 0,40 Pas und damit zu einer leicht viskoserem Emulsion, jedoch fließend wie übliche Reinigungsmilche. Lagerungstest im Kühl- und Gefrierschrank zeigen keine Änderung im Vergleich zu der Ausgangsrezeptur. Lagerungstests bei 40 °C zeigen eine leichte Geruchsänderung und eine festere Konsistenz. Bei Lagerung bei Raumtemperatur ist auch der Geruch leicht verändert, die Emulsion erweist sich als stabil nach 12 Wochen Lagerung bei 40°C.

Tabelle 13: Charakterisierung verschiedener Formulierungsvarianten einer Reinigungsmilch und Einfluss eines teilweisen oder kompletten Ersatzes von Blanova® 1200 durch MEL (Charge 6711).

	Reinigungsmilch ohne Biotensid (Referenz)	Reinigungsmilch mit 1,5 % Biotensid (anstatt Blanova® 1200)	Reinigungsmilch mit 3,0 % Biotensid (anstatt Blanova® 1200)
Beobachtung	schäumt sehr leicht	schäumt sehr leicht	schäumt sehr leicht
Kühlschranktest	i.O.	i.O.	wird fester
Gefrierschranktest	wird etwas fester	wird etwas fester	wird deutlich fester
40°C - Test	i.O.	Geruch leicht verändert, etwas fester	dunkel-gelb verfärbt, deutlich veränderter Geruch, trennt sich komplett (nach 9 Wochen)
Raumtemperatur	i.O.	leicht veränderter Geruch akzeptabel	gelblich, veränderter Geruch
Rheologie	0,20 – 0,30 Pas	0,40 Pas	0,48 Pas
Dichte	1,01 g/ml	1,00 g/ml	1,01 g/ml
pH-Wert	7,5 – 8,5	7,36	6,84
Zentrifuge	keine Trennung	keine Trennung	keine Trennung

Der vollständige Ersatz von Blanova® 1200 durch 3 % MEL führt zu einem niedrigeren pH-Wert von 6,84 und einer Viskosität von 0,48 Pas und damit zu einer leicht viskoserem Emulsion. Lagerungstest im Kühl- und Gefrierschrank zeigen eine deutliche Erhöhung der Viskosität bei 3 % MEL. Lagerungstest bei 40°C zeigen auch eine Verfärbung der Reinigungsmilch von weiß auf dunkelgelb (siehe Abbildung 27). Die Emulsion erweise sich instabil nach 9 Wochen bei 40 °C (Standard 12 Wochen bei 40°C). Die Emulsion trennt sich komplett, es bildet sich eine deutlich sichtbare Phasentrennung. Auch bei Raumtemperatur verfärbt sich der Versuch gelblich. Das Schaumverhalten bei dem Versuch ist unverändert und als sehr leicht einzustufen.

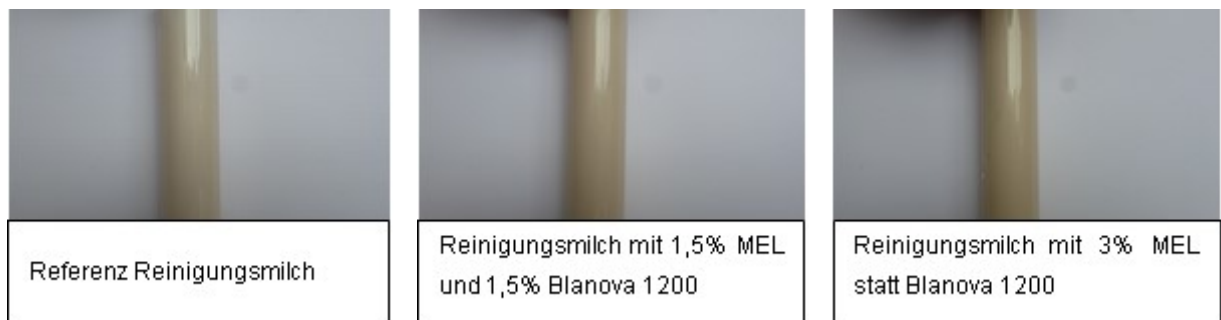


Abbildung 27: Vergleich von Reinigungsmilchvarianten mit unterschiedlich hohem Gehalt an MEL.

Das MEL (Charge: 6711) kann mit einer Konzentration von 1,5 % in die bestehende Reinigungsmilch, in Kombination mit Blanova® 1200, eingearbeitet werden ohne größere Abweichungen der Messparameter zu verursachen. Das MEL (Charge: 6711) kann nicht mit einer Konzentration von 3 % in die bestehende Rezeptur der Reinigungsmilch eingearbeitet werden, es verursacht zu viele Abweichungen der Messparameter und vor allem der Stabilität bei 40 °C.

Untersuchung der MEL von *Stamm 1* mit Öl A (Charge 6711) auf tensidische Eigenschaften in einem Reinigungsgel

Die Ausgangsrezeptur des Reinigungsgels, eine gelige Grundlage, aus Xanthan Gum mit einem kleinen Anteil an Tensiden Blanova® 1200 (AQUA, LAURYL GLUCOSIDE) und Amisoft® CS22 (AQUA, DISODIUM COCOYL GLUTAMATE, SODIUM COCOYL GLUTAMAMTE), hat einen pH-Wert von 6,71, eine Viskosität von 0,31 Pas und eine klare, durchsichtige, gelige Struktur. Hier wurde zunächst die Tensidkombination aus Blanova® 1200 und Amisoft® CS22 ganz durch MEL ersetzt und in einem weiteren Versuch in der Kombination von Amisoft® CS22 und MEL ersetzt. Die Beobachtungen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Charakterisierung verschiedener Formulierungsvarianten eines Reinigungsgels für Mischhaut und Einfluss eines teilweisen Ersatzes von Blanova® 1200 und Amisoft® CS 22 bzw. nur Blanova® 1200 durch MEL (Charge 6711).

	Mischhaut Reinigungsgel (Referenz)	Mischhaut Reinigungsgel mit 3% Biotensid (anstatt Blanova® 1200 und Amisoft® CS 22)	Mischhaut Reinigungsgel mit 1,5% Biotensid (anstatt Blanova® 1200)
Beobachtung	Schaumbildung, klar	sehr leichte Schaumbildung, milchig	Schaumbildung, trüb
Kühlschranktest	i.O.	i.O.	i.O.
Gefrierschranktest	i.O.	i.O.	i.O.
40°C - Test	i.O.	stark veränderter Geruch	stark veränderter Geruch
Raumtemperatur	i.O.	veränderter Geruch	leicht veränderter Geruch
Rheologie	0,31 Pas	0,30 Pas	0,33 Pas
Dichte	1,03 g/ml	1,03 g/ml	1,02 g/ml
pH-Wert	6,71	3,95	3,90

Der Ersatz von Blanova® 1200 durch 1,5 % MEL führt zu einem niedrigeren pH-Wert von 3,90 einer Viskosität von 0,33 Pas und einer milchigen Trübung der Gelstruktur (siehe Abbildung 28). Der Geruch ist bei Raumtemperatur leicht verändert, und bei 40 °C Lagerungstests stark verändert. Das Schaumverhalten ist ähnlich, jedoch nicht klar, sondern milchig.

Der Ersatz von Blanova® 1200 und Amisoft® CS22 durch 3% MEL führt zu einem niedrigeren pH-Wert von 3,95, einer Viskosität von 0,30 Pas und einer starken milchigen Trübung der Gelstruktur (siehe Abbildung 28). Der Geruch ist bei Lagertests bei 40 °C stark verändert. Die Lagertest im Kühl- und Gefrierschrank ergeben eine gute unveränderte Stabilität der Rezeptur.

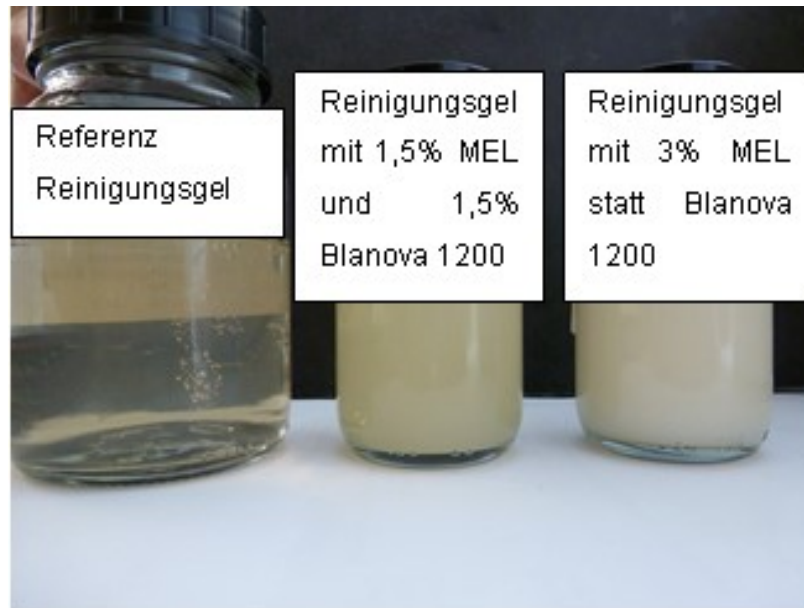


Abbildung 28: Vergleich von Reinigungsgel-Formulierungen mit unterschiedlich hohem Gehalt an MEL.

Das MEL (Charge: 6711) kann weder mit einer Konzentration von 1,5%, in Kombination mit Amisoft® CS22, noch mit 3 % in die bestehende Reinigungsgel-Rezeptur eingearbeitet werden. Die Trübung ist zu stark und Geruchsentwicklung durch MEL unangenehm bemerkbar.

4.5 Testung der MEL in WPR

MEL aus *Stamm 1* mit Öl E (Charge 4711) ist in 70 % Ethanol in einer Konzentration von 0,8 % nicht vollständig löslich. Durch Zugabe der Base Kaliumhydroxid lösen sich die Kolloidteilchen auf und die Lösung wird klar. In Wasser hingegen ist MEL aus *Stamm 1* mit Öl E (Charge 4711) nicht löslich, es bildet sich ein weißer Niederschlag.

0,8 % MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112 A) in einer Reinheit von 100 % ist in Wasser weder bei pH 4,5 noch pH 11,0 vollständig löslich (siehe Abbildung 29 Flasche 1 bzw. Flasche 2). Im direkten Vergleich ist die Löslichkeit von 0,8 % MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112 A) in einer Reinheit von 100 % im alkalischen besser lösliche als im sauren pH-Bereich von 4,5. Als Referenzlösung für die Löslichkeit wird eine 0,8 % Glucocon® 650EC-Lösung verwendet (siehe Abbildung 29 Flasche 4). Eine Zugabe des Zuckertensids Glucocon® 650EC in einer Konzentration von 0,8 % hat keinen Einfluss auf die Löslichkeit von 0,8 % MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112 A) in einer Reinheit von 100 % bei einem pH-Wert von 11, es kommt zu Ausfällungen (siehe Abbildung 29 Flasche 3). Die Zugabe von 3,4 % des Lösevermittlers Texapon® 842 führt zu einer vollständigen Löslichkeit von 0,8 % MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112 A) in einer Reinheit von 100 % bei einem pH-Wert von 11.

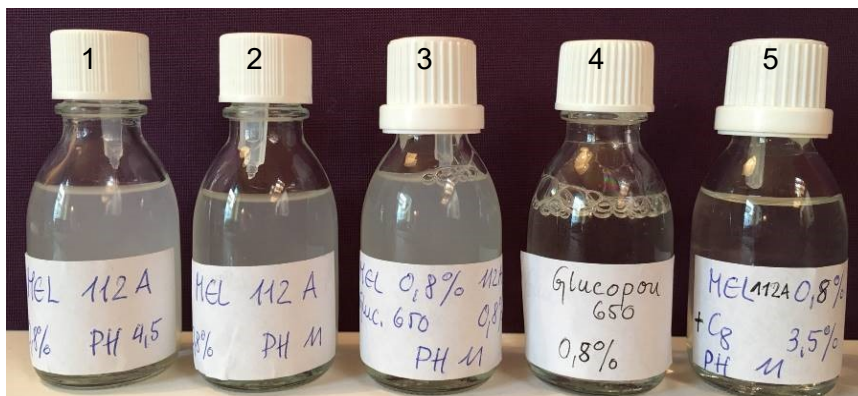


Abbildung 29: Wasserlöslichkeit von 0,8 % MEL.

Eingesetzt wurde MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112A) in unterschiedlicher Zusammensetzung bzw. bei unterschiedlichem pH-Wert

Abbildung 30 zeigt den Vergleich von 0,8 %-igen Lösungen von MEL aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge 0112A) in einer Reinheit von 100 % (Abbildung 30 Flasche 1), MEL aus *Stamm 3* mit Öl B (Abbildung 30 Flasche 2) und eine Glucopton® 650EC Lösung (Abbildung 30 Flasche 3). Hierbei löst sich MEL aus *Stamm 3* mit Öl B vollständig (siehe Abbildung 30 Flasche 2) und weist keinerlei Trübung auf, ebenso wie die Kontrolllösung mit 0,8 % Glucopton® 650EC (siehe Abbildung 30 Flasche 3). Daher wurde in der zweiten Projekthälfte mit MEL aus *Stamm 3* mit Öl B (Charge 7841) weiterführende Untersuchungen zur Reinigungsleistung durchgeführt.

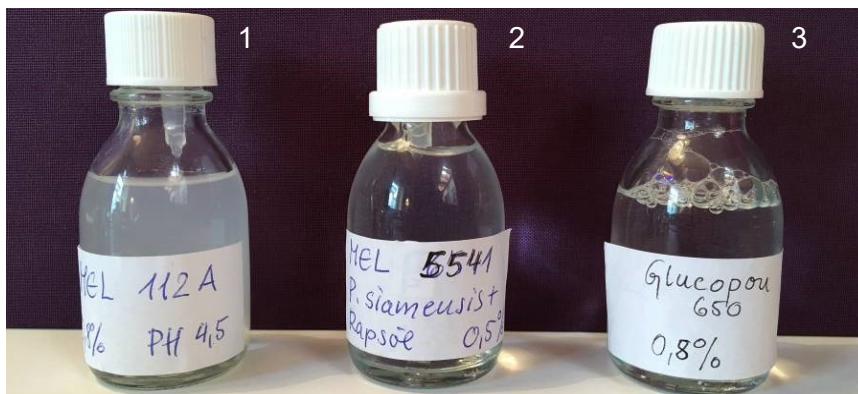


Abbildung 30: Vergleich der Wasserlöslichkeit von 0,8 % MEL.

Charge 0112A und Charge 5541 im Vergleich zu 0,8 % Glucopton® 650EC

Zunächst wurden weiterführende Untersuchungen zur Löslichkeit im Hinblick auf eine Glasreinigerformulierung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass 0,5 g/L MEL in Wasser nicht löslich sind, sondern MEL sich hier zu Tröpfchen zusammenlagerten. Bei Erhöhung des pH-Wertes auf pH 11 durch Zugabe von KOH bildeten sich Kolloidalteilchen, welche die Lösung eintrübten. Erst eine Zugabe des Hydrotops Oktylsulfat im Verhältnis 1:4 verbesserte die Löslichkeit der MEL in Wasser. Dieses Mischungsverhältnis ist jedoch für eine Anwendung nicht geeignet. Mit steigender Temperatur von 40 °C, 50 °C bis 60 °C verbesserte sich die Löslichkeit der 0,5 w/v Lösung. Diese war nicht langzeitstabil, da beim Abkühlen auf Raum-

temperatur wieder jeweils die MEL ausfielen und sich die Lösungen eintrübten. Durch Verwendung von Ethanol (7g/L) als Lösevermittler sind bei einer Konzentration von 0,5 % MEL keine Kolloidalteilchen ausgefallen, MEL war vollständig in Lösung übergegangen und es entstand eine klare Lösung. Diese wurde als Basis einer Glasreinigerrezeptur verwendet.

Wichtigste Eigenschaften eines Glasreinigers sind seine Fettlösekraft z.B. zur Entfernung von Fingerabdrücken und sein Klartrockenverhalten, d.h. nach der Reinigung sollten weder Tropfen noch Streifen auf dem gereinigten Glas zurückbleiben. Daher wurde zunächst die Fettlösekraft einer Glasreinigerrezeptur basierend auf MEL mit Hilfe eines Ölfilms auf einer Glasscheibe untersucht. Zum Vergleich wurde eine Standardrezeptur basierend auf Gluco-
pon® 650EC verwendet. Mit der MEL-basierten Rezeptur wurden 20 % des Ölfilms entfernt, wohingegen mit der Gluco-
pon® 650EC-basierten Rezeptur 45 % des aufgetragenen Ölfilms entfernt wurden. Die MEL-basierte Rezeptur zeigte damit die geringere Reinigungsleistung, besaß jedoch ähnlich gute Benetzungseigenschaften bei gleichzeitig geringerer Schaumentwicklung. Im Zusammenspiel dieser drei Eigenschaften ist die MEL-basierte Glasreinigerrezeptur trotz schlechterer Reinigungsleistung weiter interessant.

Basierend auf obigen vielversprechenden Ergebnissen wurde daher nachfolgend eine vergleichende Untersuchung eines bei der Sonett GmbH etablierten Glasreinigers, bestehend aus <0,5 % Gluco-
pon und Fettalkoholsulfat und 15 % Ethanol, und einer neuen Glasreinigerrezeptur bestehend aus 0,2 % MEL, < 0,5 % Lösevermittler und 15 % Ethanol bei einem externen Forschungsinstitut beauftragt. Hierbei wurde sowohl die Reinigungsleistung gegenüber definiertem Schmutz als auch das Klartrockenverhalten untersucht. Die MEL-enthaltende Rezeptur des Glasreinigers schnitt nach visuell ermittelten Reinigungsergebnissen bei der Reinigungsleistung geringfügig schlechter ab als die bestehende Rezeptur.

Die visuelle Bewertung des Klartrockenverhaltens und der Streifenbildung erfolgte anhand der IKW-Bewertungskriterien Streifenintensität, Streifendichte, Tropfenanzahl und Tropfen-
größe. Hierbei schnitt im Vergleich mit Wasser und dem bestehenden Glasreiniger, die neue Glasreinigerrezeptur basierend auf MEL am besten ab.

Neben den Eigenschaften zur Reinigungsleistung ist für ein WPR auch seine Lagerzeitstabilität von großer Bedeutung, da oftmals große Zeitspannen zwischen Produktion und Kauf durch den Endverbraucher liegen können und auch beim Endverbraucher selbst die Produkte zum Teil mehrere Wochen bis Monate lagern, bis sie vollständig aufgebraucht sind. In Untersuchungen zur Langzeitstabilität im Trockenschrank zeigte sich bei einer Temperatur von 40°C die MEL-basierte Glasreinigerrezeptur bei einem pH-Wert von 9-9,5 über 3 Monate stabil ohne Ausfällungen, wohingegen bei den gleichen Bedingungen und einem pH-Wert von 6 nach 3 Monaten Kolloidalteilchen ausgefallen sind. Mit Hilfe dieser Ergebnisse wurde über den mathematischen Zusammenhang der Arrhenius-Gleichung die beschleunigte thermische Alterungsrate ermittelt. Dabei wurde angenommen, dass bei einer Temperaturerhö-

hung um 10 K bei einer chemischen Reaktion die Reaktionsgeschwindigkeit sich um das 4fache erhöht. Die Abschätzung des Faktors der beschleunigten thermischen Alterung AAF betrug mit $AAF = 4 \left[\frac{40(^{\circ}C) - 20(^{\circ}C)}{10} \right]$ den Wert 8. Damit errechnete sich die theoretische Haltbarkeit mittels $AAF \cdot AAT$ zu einem Wert von 8×3 Monate, also 24 Monate im besten Fall.

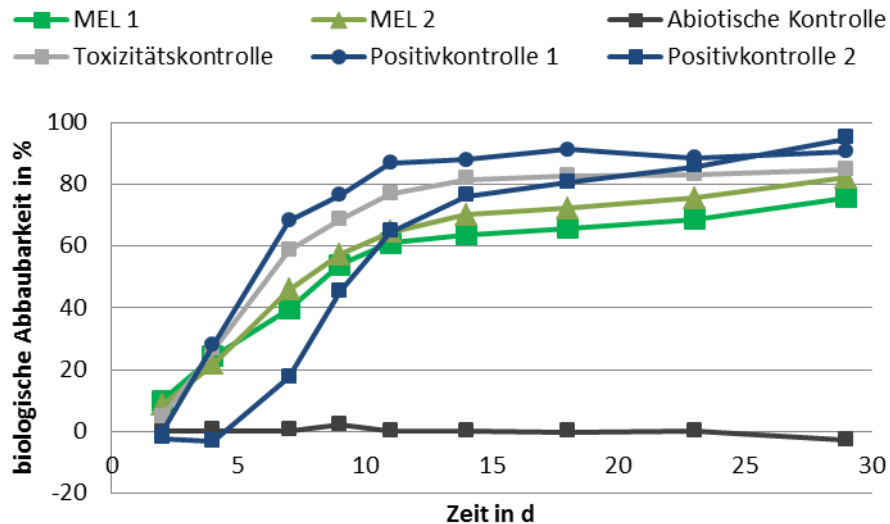


Abbildung 31: Biologische Abbaubarkeit am Beispiel von MEL der Charge 7841.

Positivkontrolle: Anilin, Abiotische Kontrolle: Testmedium und $HgCl_2$; Toxizitätskontrolle: MEL, Anilin, Testmedium und Inokkulum

Die Untersuchungen zur biologischen aeroben Abbaubarkeit von MEL am Beispiel von MEL der Charge 30-2D1 aus *Stamm 3* mit Öl B mittels CO_2 -Entwicklungstest nach OECD 301B [16] wurden von der LAUS GmbH durchgeführt. Abbildung 31 zeigt den zeitlichen Verlauf über 29 Tag der biologischen Abbaubarkeit. Dabei wurde MEL mit einer Abbaubarkeit von 64 % nach 10 Tagen und 79 % nach 28 Tage als vollständig biologisch abbaubar eingestuft. Es wurde keine abiotische Abbaubarkeit beobachtet. Liegt der Abbau in der Toxizitätskontrolle nach 14 Tagen unterhalb von 25 %, wird die Testsubstanz als toxisch gegenüber dem Belebtschlamm-Inokkulum angesehen. Da MEL hier jedoch einen Wert von 82 % aufwies, wurde MEL als nicht toxisch gegenüber dem Inokkulum in einer Konzentration von 32,2 mg/L bewertet.

4.6 Ökobilanzierung (Fraunhofer-Institut für Bauphysik, Abt. Ganzheitliche Bilanzierung)

Für alle Wirkungskategorien wird das jeweilige Wirkungsmodell des Instituts für Umweltwissenschaften der Universität Leiden/Niederlande verwendet (Centrum voor Milieukunde Leiden, CML, siehe Guniée et al. [29]). Es werden die Wirkungskategorien Treibhauspotential, Eutrophierungspotential, Versauerungspotential und abiotischer Ressourcenverbrauch ausgewertet. Zusätzlich wird der fossile Primärenergieeinsatz analysiert.

Treibhauspotential (*Global Warming Potential*, GWP): Unter dem Treibhauseffekt versteht man die globale Erwärmung durch das Zurückhalten langwelliger Strahlung durch die sogenannten Treibhausgase, die durch menschliche Aktivitäten zusätzlich zu den natürlichen Treibhausgasen in die Atmosphäre ausgestoßen werden. Der Treibhauseffekt ist wohl die derzeit am häufigsten berücksichtigte Umweltauswirkung menschlichen Handelns. Seine Ursachen werden seit Jahrzehnten erforscht und das Wirkungsmodell GWP wird standardmäßig für Ökobilanzen verwendet.

Versauerungspotential (*Acidification Potential*, AP): Die Versauerung von Gewässern und von Böden ist eine Folge des Ausstoßes von Säuren und Säure bildenden Substanzen in die Umwelt. Die meisten für dieses Umweltproblem verantwortlichen Stoffe werden bei Verbrennungsprozessen emittiert. Diese Wirkungskategorie ist deshalb für alle Produktsysteme relevant, bei denen Verbrennungsprozesse stattfinden, wie z.B. im Rahmen der Stromerzeugung aus Kohle oder Erdgas.

Eutrophierungspotential (*Eutrophication Potential*, EP): Eutrophierung bezeichnet die Überfrachtung von Ökosystemen durch Nährstoffe mit den Elementen Stickstoff (N) und Phosphor (P), sowie organische Verbindungen mit einem hohen CSB (chemischer Sauerstoffbedarf). Die Nährstoffe werden u.a. durch den Einsatz von Düngemitteln in der Landwirtschaft in die Umwelt eingebracht, weshalb das Eutrophierungspotential eine besonders relevante Kategorie für Produktsysteme ist, in denen pflanzliche Rohstoffe verwendet werden.

Der fossile Primärenergiebedarf (PE_{fossil}) ist eine Inventargröße (und damit keine Wirkungskategorie), wird aber üblicherweise wie eine Wirkungskategorie ausgewertet. Die Inventargröße PE_{fossil} repräsentiert den Verbrauch fossiler Energieträger eines Produktsystems, also dessen Beitrag zur Verknappung der fossilen Energieträger auf der Erde.

Abiotisches Ressourcenverbrauchspotential (ADP_{elements}): Unter dem abiotischem Ressourcenverbrauch versteht man den Verbrauch von anorganischen Ressourcen. Die Wirkungsgröße ADP_{elements} gibt Auskunft über die Knappheit der in einem Produktsystem verwendeten Elemente, die für andere Zwecke nicht mehr zur Verfügung stehen [30].

Hier werden nur die Ergebnisse für die ausgewählten Wirkungen GWP, EP und PE_{fossil} im Detail vorgestellt. Alle weiteren Ergebnisse finden sich im Anhang (Abschnitt 10.1). Diese

drei sind von besonderer Relevanz für das Produktsystem MEL, da sie den Abwägungsbedarf zwischen verschiedenen Nachhaltigkeitszielen aufzeigen. Aus gewertet werden drei Szenarien mit den Bezeichnungen „Basis“, „o. Schaum“ und „EE“. Sie stehen jeweils für die zu erwartende Produktion von MEL im Technikumsmaßstab (Fraunhofer CBP, siehe oben). Im Szenario „o. Schaum“ wird davon ausgegangen, dass die Prozessführung die Schaumbildung verhindert, so dass der Schaumzerstörer eingespart werden kann. Im Szenario „EE“ wird davon ausgegangen, dass für die meisten Prozesse Strom aus erneuerbaren Energien verwendet wird.

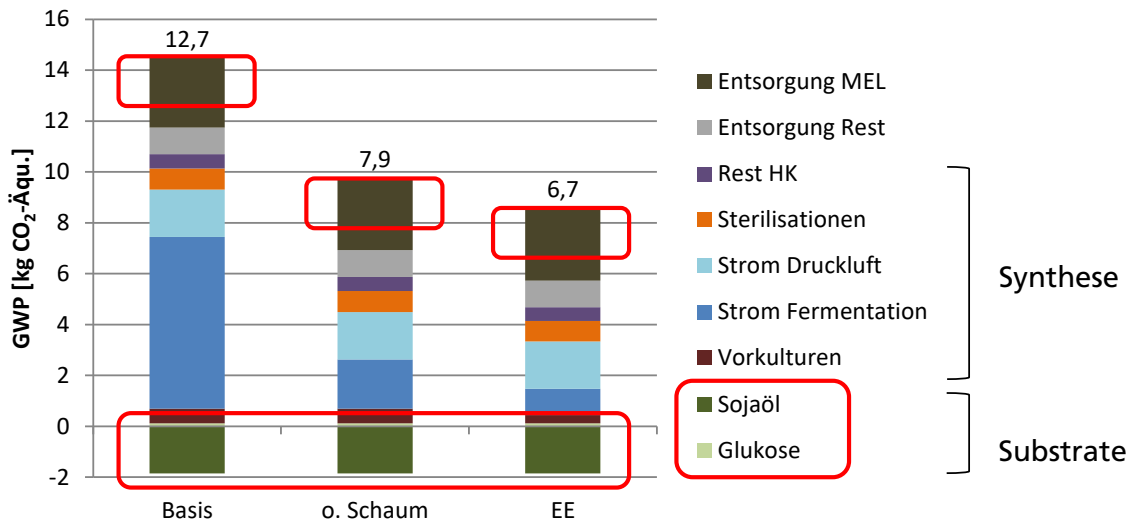


Abbildung 32: Treibhauspotential von 1 kg MEL Rohextrakt in drei Szenarien.

Abbildung 32 zeigt das GWP von 1 kg MEL Rohextrakt in den drei o.g. Szenarien. Die Säulen sind unterteilt nach den einzelnen Beiträgen der Prozesskette. Über den gestapelten Säulen stehen die Summenwerte. Auffällig ist, dass jeder der drei Summenwerte zusammengesetzt ist aus einem größeren positiven Beitrag und einem kleineren negativen Beitrag. Der negative Beitrag (im Diagramm der Teil der Säule unterhalb der Nulllinie) repräsentiert die Einbindung atmosphärischem Kohlenstoff in die Biomasse der Rohstoffe für MEL (Sojaöl, Glukose), d.h. eine Negativemission. Dieselbe Menge Kohlenstoff wird bei der Entsorgung von MEL wieder emittiert (im Diagramm das oberste Segment der Säulen). In Summe ist das GWP im Szenario „EE“ am niedrigsten, weil der EE-Strommix ein sehr geringes GWP pro kWh aufweist. Strom zu sparen (wie im Szenario „o. Schaum“) verringert das GWP gegenüber dem „Basis“-Szenario, aber der Wechsel des Strom-Mix hat den größeren Effekt.

Abbildung 33 zeigt das EP von 1 kg MEL Rohextrakt. Wie bei der Darstellung des GWP ist der Beitrag der biogenen Rohstoffe (Sojaöl, Glukose) hervorgehoben. Das Profil im EP unterscheidet sich deutlich von dem im GWP. Der Beitrag der Rohstoffe ist größer, macht in jedem Szenario mindestens 50 % des gesamten EP aus. Dies ist typisch für Produkte auf Basis nachwachsender Rohstoffe, da die landwirtschaftliche Produktion in aller Regel mit signifikanten Emissionen von Stickstoff und Phosphor verbunden ist. Das EP im „EE“-

Szenario ist höher als das im „o. Schaum“-Szenario, weil der EE-Strom-Mix zum Teil auf Biomasse zurückgeht (z.B. Biogas-KWK), die landwirtschaftlich erzeugt wird. Es ist sogar etwas höher als im „Basis“-Szenario. Eine Stromsparmaßnahme wie der Verzicht auf den Schaumzerstörer wirkt sich auf den Summenwert eher schwach aus, da der Großteil der Wirkung auf die Rohstoffe zurückgeht. Entsprechend nah beieinander liegen die drei Ergebnisse.

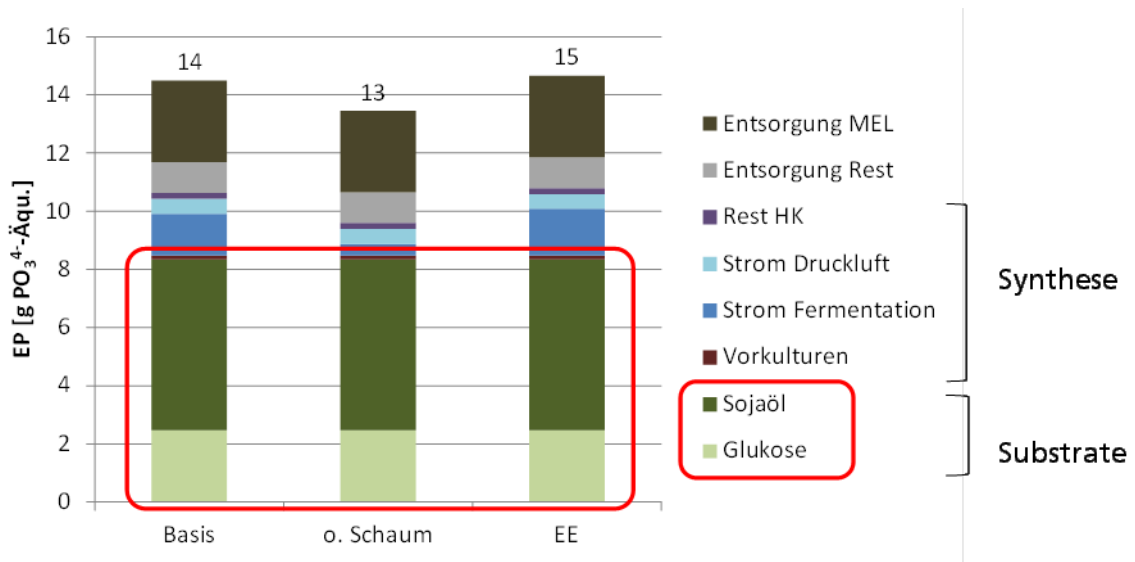


Abbildung 33: Eutrophierungspotential (EP) von 1 kg MEL Rohextrakt in drei Szenarien.

Abbildung 34 zeigt den PE_{fossil} von 1 kg MEL Rohextrakt. Zur besseren Vergleichbarkeit ist auch hier der Beitrag der biogenen Rohstoffe (Sojaöl, Glukose) hervorgehoben. Das Profil ähnelt dem Profil im GWP, allerdings gibt es hier keinen negativen Beitrag. Der Verzicht auf den Schaumzerstörer spart 37 % des fossilen Primärenergiebedarfs, die Verwendung von EE-Strom sogar fast 47 %.

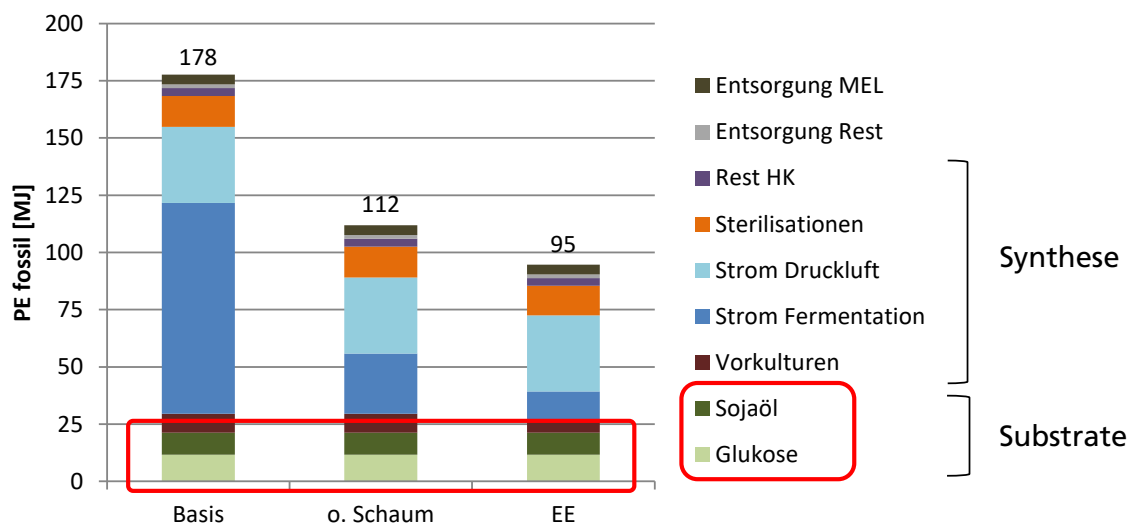


Abbildung 34: Fossiler Primärenergiebedarf von 1 kg MEL.

Labormaßstab

Die Ergebnisse beziehen sich auf die funktionelle Einheit 1 kg MEL-Rohextrakt. Über alle Kategorien ist die Fermentation (Hauptkultur) der dominante Prozess. Dies ist auf den Strombedarf des Prozesses zurückzuführen: Der Prozess läuft über 35 Tage und die Zellsuspension wird ständig gerührt. An zweiter Stelle folgen die verschiedenen Schritte der Aufbereitung. Die Bereitstellung der Substrate und die Entsorgung von MEL fallen dagegen so gut wie nicht ins Gewicht. Laut IGVP lässt sich die Fermentation ohne Weiteres auf 10 Tage verkürzen. Die Variante mit 10 Tagen Fermentationszeit wurde ebenfalls ausgewertet und die Umweltlasten fallen entsprechend geringer aus. Je nach Kategorie wird eine Reduzierung der Umweltlasten zwischen 53 % und 72 % erreicht. Da der Stromverbrauch des Fermentationsprozesses so dominant ist, wurde zusätzlich der zugrunde liegende Strom-Mix variiert: Anstelle des deutschen Strom-Mix über alle Energieträger wurde ein repräsentativer Strom-Mix aus erneuerbaren Energiequellen angenommen. Damit lassen sich GWP, AP und PE_{fossil} senken, aber EP und $ADP_{elements}$ fallen höher aus. Als Beispiel sei hier das Ergebnis für das GWP gezeigt – siehe Abbildung 35.

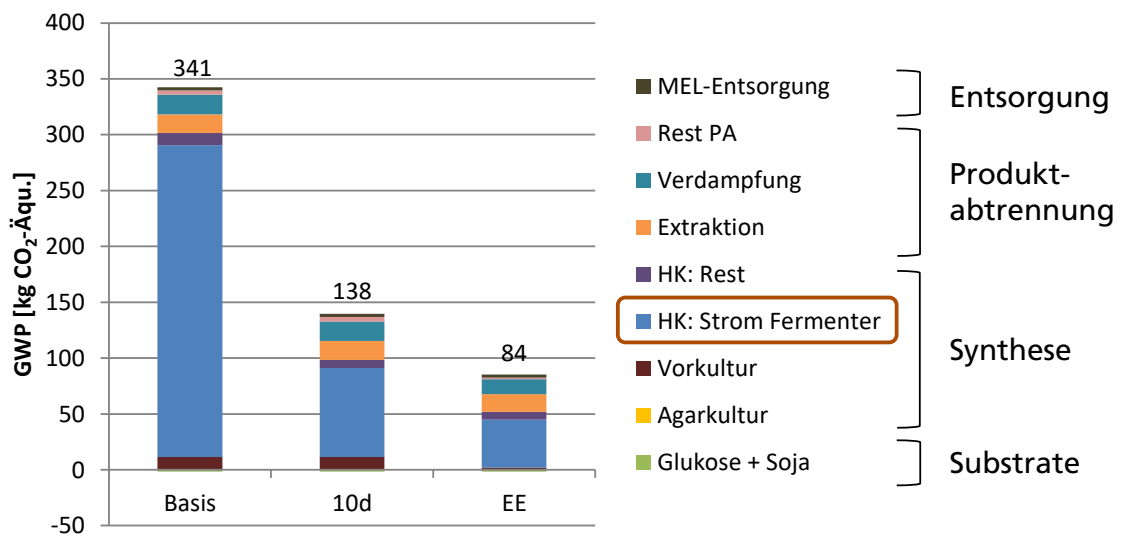


Abbildung 35: Produktion und Entsorgung von MEL, Labormaßstab, Treibhauspotential.

Darin sind die Szenarien mit „Basis“ für die 35-tägige Fermentation, „10 d“ für die 10-tägige Fermentation und „EE“ für die 35-tägige Fermentation mit Strom aus erneuerbaren Energien bezeichnet. „HK“ steht für Hauptkultur, die mit der Strombereitstellung für den Fermenter assoziierte Umweltlast ist hervorgehoben.

Pilotmaßstab

Die Ergebnisse beziehen sich auf die Bereitstellung von 1 kg MEL-Rohextrakt ohne den letzten Schritt der Produktabtrennung. Eventuell. können einige Reste der Fermentation im Produkt verbleiben, daher muss die Abtrennung nicht bis zum reinen MEL-Rohextrakt getrieben

werden. Über alle Kategorien ist die Herstellung von MEL im Pilotmaßstab deutlich effizienter, da erstens Skaleneffekte zum Tragen kommen und zweitens die Kenndaten der Anlagen auf Effizienz ausgelegt sind (im Gegensatz zu Laborgeräten). Der Strombedarf für die Hauptkultur ist ein wichtiger, aber nicht der allein bestimmende Parameter. Er setzt sich zusammen aus dem Bedarf von Flüssigkeitspumpen, einem Schaumabscheider und dem Strombedarf für die Begasung des Fermenters mit Druckluft. Der Strombedarf ist insbesondere für die Größen GWP, AP, $ADP_{elements}$ und PE_{fossil} relevant. Die Größe EP wird von der Bereitstellung der Substrate bestimmt, die auch zu GWP und AP signifikant beitragen. Die Entscheidung über die Entsorgungsrouten (Abwasser/Müllverbrennung) macht einen kleinen Unterschied aus. Um weitere Optimierungsoptionen auszuloten, wurde die Herstellung ohne Schaumabscheider in der Hauptkultur modelliert. Dieser lässt sich laut IGVP bei entsprechender Prozessführung einsparen, auch wenn dazu noch etwas Entwicklungsarbeit nötig ist. Ohne Schaumabscheider wird signifikant weniger Strom für die Fermentation benötigt, so dass sich der Anteil der Strombereitstellung an allen Kategorien im Vergleich zum Basisszenario verringert. Wie im Labormaßstab wurde auch für den Pilotmaßstab die Verwendung von Strom aus erneuerbaren Energiequellen modellhaft angenommen, und wie oben beschrieben wirkt sich diese Annahme auf GWP, AP und PE_{fossil} positiv aus, aber EP und $ADP_{elements}$ negativ. Hier sei beispielhaft das GWP-Ergebnis gezeigt – siehe Abbildung 36.

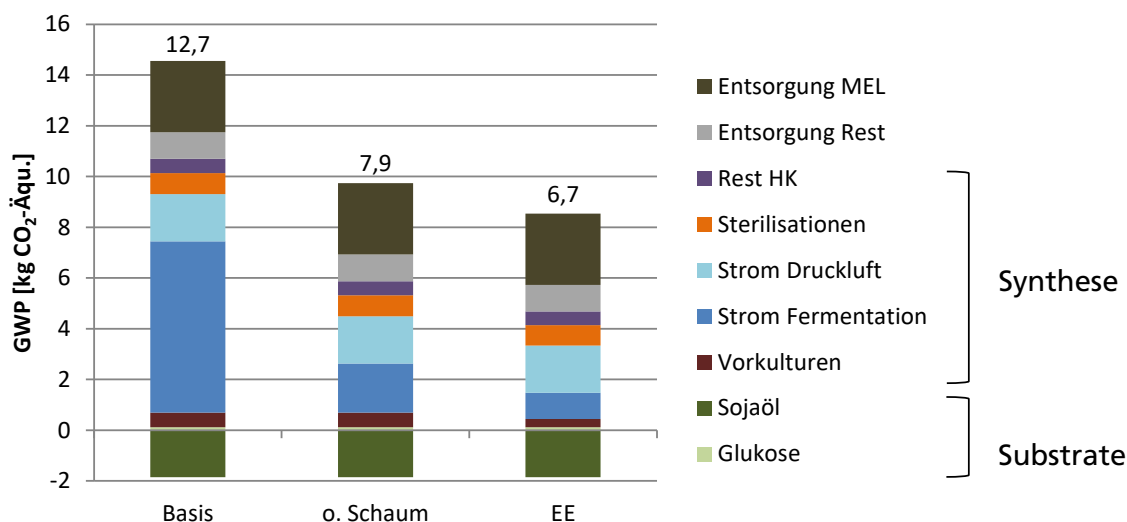


Abbildung 36: Produktion und Entsorgung von MEL, Pilotmaßstab, Treibhauspotential.

Darin sind die Szenarien mit „Basis“ für die (im Pilotmaßstab angenommene) 10-tägige Fermentation, „o. Schaum“ für die Fermentation ohne Schaumabscheider und „EE“ für die 10-tägige Fermentation mit Strom aus erneuerbaren Energien bezeichnet. Die Einbindung von atmosphärischem Kohlenstoff in die Substrate ist als GWP-Beitrag mit negativem Vorzeichen zu sehen. Diese Menge ist als Emission in dem Beitrag „Entsorgung MEL“ enthalten. Der Kohlenstoff wird also durch das Produktsystem durchgeschleust, wie es für Produkte aus nachwachsenden Rohstoffen typisch ist. Der Strombedarf für die Fermentation inkl. Bega-

sung (Druckluft) macht gut $\frac{3}{4}$ der Summe von 12,7 kg CO₂-Äquivalent im Basisszenario aus (deutlich weniger in den anderen Szenarien), ist aber nicht so dominant wie im Pilotmaßstab.

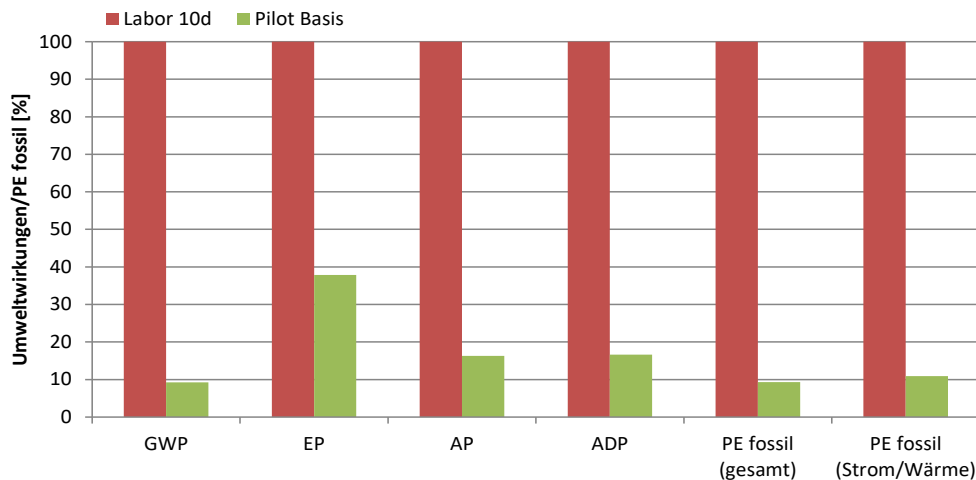


Abbildung 37: Umweltauswirkungen durch Upscaling der MEL-Produktion.

Dass chemische Prozesse mit hohem Durchsatz i.d.R. effizienter sind als solche mit niedrigem Durchsatz gilt auch für die Herstellung von MEL und die Effizienzsteigerung lässt sich anhand der Ergebnisse gut illustrieren. Abbildung 37 zeigt die Verringerung der Umweltauswirkungen (um ca. 60-90 % je nach Größe) durch das Upscaling.

Auch wird der Blick geöffnet für Optionen zur weiteren Optimierung der Prozesskette:

Die Fermentationszeit ist so kurz wie möglich zu halten. Die Verkürzung von 35 auf 10 Tage ist laut IGVP problemlos möglich, darunter sinkt die Ausbeute. Da die MEL-Produktion im Batch-Prozess das Verhalten einer Sättigungskurve zeigt (die Geschwindigkeit der Produktion sinkt mit der Menge des bereits produzierten MEL), gibt es evtl. ein Optimum unterhalb der 10 Tage. Der Verzicht auf den Schaumabscheider lohnt sich, sofern die Prozessführung darunter nicht leidet. Der Prozess wird voraussichtlich nicht völlig ohne Rühren auskommen, aber es lässt sich Strom sparen indem die Drehzahl des Rührers klein gehalten wird. Der Verbrauch an Lösemittel (hier: Ethanol) für die Abtrennung des Produkts schlägt zumindest im Labormaßstab mit relevanten Beiträgen zu den Umweltwirkungen zu Buche. Entweder ist es möglich, das Produkt ohne aufwendige Reinigung zu verwenden (wie im Pilotmaßstab angenommen), oder es kann ggf. recycelt werden.

5 Diskussion

5.1 Erreichung der definierten Meilensteine

Zu Beginn des Projekts wurden arbeitspaketspezifisch Meilensteine definiert, die zur Projekthalbzeit erreicht werden sollten. Für AP 1 wurde definiert, dass die Anforderungen der MEL-Mischungen für den jeweiligen Einsatz in WPR sowie in KPM vorliegen. In Kapitel 4.1 sind entsprechende Anforderungen zusammengefasst. Zur Erreichung des Meilensteins für AP 2 müssen erste MEL-Musterproben vorliegen. Von den 15 ausgewählten verschiedenen MEL-Varianten, variiert durch die Wahl dreier Produktionsstämme und fünf verschiedener Öle als Substrat, liegen 13 Proben vor (siehe Kapitel 4.2.3). Bei den beiden nicht vorliegenden Proben zeigte sich, dass auf Basis des jeweils ausgewählten Öls, Öl E beziehungsweise Öl D, mit Stamm *Stamm 3* keine Produktion möglich ist. Für AP 3 wurde als Meilenstein definiert, dass die MEL-Musterproben aus AP 2 physikalisch-chemisch sowie biologisch charakterisiert sind. In Kapitel 4.3 sind die Ergebnisse dieser Charakterisierung zusammenfassend dargestellt. Erste Testungen von MEL-Musterproben in kosmetischen Grundlagen sind zur Erreichung des Meilensteins für AP 5 durchzuführen. Entsprechende Ergebnisse hierzu sind in Kapitel 4.4 dargestellt. Für AP 6 wurde als Meilenstein definiert, dass erste Charakterisierungen des Verhaltens von MEL-Musterproben in WPR vorliegen. Ergebnisse hierzu sind in Kapitel 4.5 dargestellt. Somit wurden alle definierten Meilensteine fristgerecht erreicht.

5.2 Erfüllung der Arbeiten laut Projektplan bzw. Veränderungen bezüglich des ursprünglichen Projektplans

MEL zur Anwendung in KPM und WPR müssen ihrer Anwendung entsprechend unterschiedliche Eigenschaften z.B. hinsichtlich ihres Schaumverhaltens oder antimikrobieller Wirkung haben. Entsprechend wurden in AP 1 von den beiden Firmen Sonett OHG und Börlind GmbH Spezifikationen der gewünschten MEL erstellt. Als Ergebnis liegt ein Spezifikationsdokument vor.

In AP 2 der Biotechnologischen Herstellung der MEL wurden drei *Pseudozyma*-Stämme sowie fünf unterschiedliche Öle als Substrate variiert, um MEL-Mischungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen von MEL-Molekülvarianten zu erhalten. Es zeigte sich jedoch, dass bei *Stamm 2* niedrige Ausbeuten auf mit 3-11 g/L erzielt wurden. Während *Stamm 2* mit Öl E kein MEL produzierte, wurde der Versuch mit *Stamm 3* und Öl E nicht durchgeführt. Mit Abgleich des Spezifikationsdokuments wurde aus diesen MEL-Varianten mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften für die jeweilige Anwendung in WPR bzw. KPM eine geeignete Variante identifiziert und erste Anwendungsversuche

durchgeführt. Die Herstellung und Aufarbeitung der favorisierten MEL-Varianten wurde optimiert.

Weiter wurden die hergestellten MEL-Varianten hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften (Reinheit, Löslichkeit, minimale Oberflächenspannung, kritische Mizellbildungskonzentration (HBL-Wert) sowie ihres Schaumverhaltens) charakterisiert. Zur Charakterisierung der MEL aus biologischer Sicht wurde zunächst ihre Zytotoxizität gegenüber Fibroblasten und Keratinozyten bestimmt sowie ihre pyrogene und allergene Wirkung untersucht. Ergänzend zum ursprünglichen Arbeitsplan hierzu wurde ihr zellproliferatives Verhalten bestimmt. Ihre antimikrobielle Wirkung wurde hinsichtlich Bakterien (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. acnes*) und ergänzend zum ursprünglichen Arbeitsplan hinsichtlich Fungi (*C. albicans* und *A. brasiliensis*) bewertet. Entgegen dem ursprünglichen Arbeitsplan wurde jedoch die Hautverträglichkeit der Glykolypide nicht mit einem 3D-Hautmodell verifiziert. In dem vorliegenden Haut-Modell ist keine Immunkomponente vorhanden, so dass eine Aussage zur Hautverträglichkeit der MEL damit nur bedingt möglich gewesen wäre. Daher wurde in Absprache mit den Projektpartnern auf diese Untersuchung zugunsten von weiterführenden antimikrobiellen und zellproliferativen Untersuchungen (s.o.) verzichtet.

In AP 5 wurden MEL in Shampoo und Reinigungsmilch eingearbeitet und auf ihre Eignung hierin evaluiert sowie mit bestehenden Rezepturen verglichen z.B. mittels Stabilitätsuntersuchungen oder Akzeptanzuntersuchungen. Da in AP 4 gezeigt wurde, dass die antimikrobiellen Eigenschaften der MEL sich nicht für einen Einsatz als Konservierungsmittel eignen, wurde auf Konservierungsbelastungstests nach DIN 11930 verzichtet. Basierend auf den Ergebnissen der biologischen Charakterisierung wurden anstelle von RBC-Tests und Messungen zum Transepidermalem Wasserverlust Untersuchungen zu Zellproliferierenden Eigenschaften der MEL extern beauftragt. Da die für ein Scale-Up eines KPM-Produktes benötigte Menge an MEL in der Projektlaufzeit nicht bereitgestellt werden konnte, wurde die vielversprechendste kosmetische Grundlage bisher nicht in einer Pilotcharge hergestellt.

Ausgewählte MEL wurden in AP 6 auf ihre Einsetzbarkeit in WPR, insbesondere für einen schaumarmen Glasreiniger, z.B. hinsichtlich ihrer Reinigungsleistung und pH-Stabilität, untersucht. Auf die Untersuchung der Materialverträglichkeit wurde zugunsten einer externen Untersuchung einer Glasreinigerrezeptur mit MEL zur Reinigungsleistung gegenüber standardisierten Anschmutzungen im Vergleich zu einem bestehenden Produkt verzichtet. Die Testung der aeroben biologischen Abbaubarkeit wurde nach OECD-Testmethoden extern beauftragt.

In AP 7 wurde allgemein MEL über eine Ökobilanz (Life Cycle Assessment, LCA), insbesondere die Bereiche Rohstoffeinsatz, Energieeinsatz und Emissionen, insbesondere in Wasser, sowie das Abfallaufkommen evaluiert. Der Beitrag der verursachten Emissionen zum anthropogenen Treibhauseffekt, dem Versauerungspotential, dem Eutrophierungspotential und

zur Knappheit fossiler Ressourcen wurde quantitativ dargestellt. Die LCA wurde sowohl für den Labor- als auch für einen Pilotmaßstab durchgeführt und abgeschätzt. Dabei fokussierte die LCA stärker auf die Verbesserungspotentiale der neuen Prozesse/Produktionsrouten als auf den Vergleich mit existierenden Produkten und die Identifikation von Hauptverursachern von Umweltlasten innerhalb der Wertschöpfungskette. Obwohl bis zum Projektende keine endgültigen Produktformulierungen vorlagen, wurden deren Umweltwirkungen abgeschätzt und modellhaft mit konventionellen Produkten basierend auf APG verglichen.

5.3 Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern

Es fanden halbjährlich Projekttreffen statt, jeweils rotierend bei einem der Projektpartner. In diesen Projekttreffen wurden gemeinsam die jeweils erzielten Ergebnisse diskutiert, das weitere Vorgehen abgestimmt sowie weitere Absprachen zum Projektverlauf getroffen. Zudem fanden mehrmals bilaterale Absprachen per Email oder telefonisch statt. Wie Tabelle 4 und Tabelle 5 zu entnehmen ist, erfolgte eine regelmäßige Bemusterung der Industriepartner durch das IGVP.

6 Stellungnahme zu den Bewilligungsauflagen

6.1 Biologische Abbaubarkeit

Die Untersuchung der aeroben biologischen Abbaubarkeit nach OECD 301B [16] wurde extern bei der Firma LAUS GmbH in Auftrag gegeben. Hierfür wurde eine größere Menge der Charge 78-41 (aus *Stamm 3* mit Öl B), welche vorher von SONETT positiv hinsichtlich eines Einsatzes in WPR getestet wurde, bereitgestellt.

Zur Durchführung wurden die MEL mit Belebtschlamm inokuliert. Anilin mit gleichem Gehalt an organischem Kohlenstoff wurde als Kontrolle verwendet. Der aerobe Abbau unter Lichtausschluss wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen verfolgt. Die Messung des Abbaus erfolgte über die Bestimmung der freigesetzten Menge an CO₂. Die Bedingung für eine vollständige biologische Abbaubarkeit sind 60 % Degradation am Ende der Studie.

Nach 28 Tagen waren bereits 79 % des eingesetzten MEL abgebaut, was den genannten Schwellenwert von 60 % bei weitem übertrifft. Für die ausgewählte MEL-Charge konnte somit eine „vollständige Abbaubarkeit“ (readily biodegradable) bestätigt werden.

Aufgrund der niedrigen Konzentration, die für den Test bei der Firma LAUS verwendet wurde, konnte mit dem verbliebenen Rest nach dem Abbau (d.h. 21 % der ursprünglich eingesetzten Menge) keine experimentelle Untersuchung auf Abbauprodukte durchgeführt werden. Stattdessen wird aber im Folgenden eine theoretische Betrachtung angestellt:

MEL gehören zu den Glykolipiden, bestehen also aus einem Zuckerbaustein (Mannosylerythritol) und einem Lipidteil (Fettsäuren und Acetyl-Gruppen). Die Verbindung von Zucker- und Lipid-Teil basiert ausschließlich über Esterbindungen. Diese werden entweder bei entsprechenden Umweltbedingungen (pH-Wert etc.) spontan gespalten oder können von vielen Mikroorganismen enzymatisch hydrolysiert werden. Damit müssen in der Folge nur noch die beiden Zucker, Mannose und Erythritol, sowie zwei Fettsäuren und Acetat/Essigsäure abgebaut werden. Mannose und Erythritol sind Zucker, die im Stoffwechsel eines jeden Mikroorganismus vorkommen und können daher aufgenommen und über die Glykolyse bzw. den Pentosephosphatweg verstoffwechselt werden. Fettsäuren können ebenfalls von vielen Mikroorganismen aufgenommen und biologisch vollständig abgebaut werden. Essigsäure/Acetat schließlich ist ebenfalls leicht biologisch abbaubar. Insgesamt stellt also keines der Spaltprodukte von MEL eine ökotoxikologisch bedenkliche Substanz dar. Da MEL zu ca. gleichen Teilen aus Zucker und Fettsäuren besteht, deutet die Abbaurate von 79 % zudem darauf hin, dass beide Bestandteile zumindest teilweise abgebaut worden sein müssen.

Das Ergebnis des Abbaubarkeitstests von Charge 78-41 kann aus unserer Sicht auf alle anderen betrachteten MEL Chargen übertragen werden, da sich diese nur in der Anzahl der Acetyl-Gruppen sowie der Fettsäure-Kettenlänge unterscheiden.

6.2 Reststoffe als Substratgewinnung

Vorangegangene Untersuchungen in den Projekten „O4S“ (Project ID: 286859 funded under: FP7-SME) und „BioConSept“ (Project ID: 289194 funded under: FP7-KBBE) haben gezeigt, dass Reststoffe wie Zucker aus Most-Resten, Biomelasse, Glycerin und Lignocellulose oder Öle ohne Lebensmittelqualität bzw. auch Öle als Chemiereststoff für die Biotensidherstellung verwendet werden können. Abbildung 38 zeigt die erfolgreiche MEL Produktion auf den hydrophilen Substraten Glucose (als Referenz), Mostresten, Biomelasse und unterschiedlich behandelten Lignocellulose-Hydrolysaten (LC#1 und LC#228). Da hydrophile Substrate hauptsächlich für das Zellwachstum verwendet werden, ergeben sich unter ansonsten gleichen Bedingungen auch keine Unterschiede in den MEL-Strukturen. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Konzentration und Ausbeute an MEL durch gleichzeitige Zugabe von Zuckern zu dem als Hauptsubstrat verwendeten Öl gesteigert werden kann.

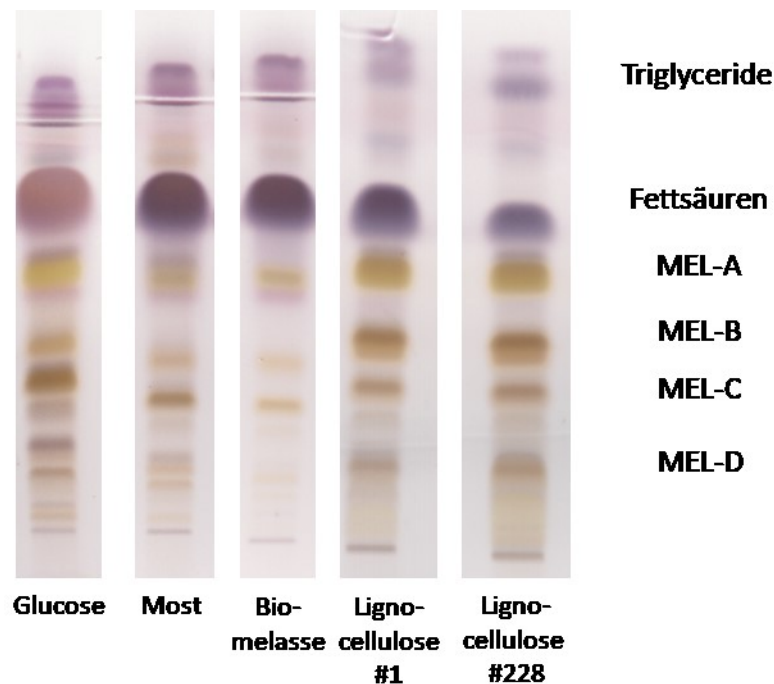


Abbildung 38: DC Auftragung unterschiedlicher MEL-Extrakte aus der Kultivierung mit hydrophilen (zuckerhaltigen) Reststoffen (experimentelle Ergebnisse aus Projekt „O4S“).

basierend auf Reststoffen als Fermentationssubstrat

Eine Herausforderung bei einem Einsatz von hydrophoben Reststoffen als Fermentationssubstrat ist jedoch die Schwankung der Zusammensetzung der Reststoffe, die sich in geringfügig unterschiedlichen MEL-Zusammensetzungen je Charge auswirken kann. Eine gleichbleibende Produktqualität ist auf Basis von Reststoffen daher zum aktuellen Forschungsstand nur bedingt zu gewährleisten. Beide Projektpartner, die Börlind Gesellschaft für kosmetische Erzeugnisse mbH sowie die Sonett GmbH, sind mit dem Ökolabel CSE, Certified Sustainable Economics, ausgezeichnet. Darüber hinaus ist die Sonett GmbH mit dem Label

der ECOGARANTIE® und die Börlind Gesellschaft für kosmetische Erzeugnisse mbH mit dem EcoControl zertifiziert. Basis der Zertifizierungen ist u.a. der Einsatz von Rohstoffen hergestellt aus kontrolliert ökologisch angebauten, zertifizierten landwirtschaftlichen Produkten, die keine Lebensmittel oder Futtermittel darstellen oder in solchen verarbeitet werden. Für reine Öle sind entsprechende zertifizierte Produkte in großen Mengen einfach auf dem Markt erhältlich. Die oben benannten Reststoffe sind ebenfalls in biozertifizierte Qualität erhältlich, jedoch deutlich schwerer zu beziehen und in deutlich geringer Menge auf dem Markt verfügbar. In diesem Projekt bestand seitens der Industrieprojektpartner daher kein Interesse daran, Reststoffe als Fermentationssubstrat zu verwenden, weshalb dieser Weg in dem vorliegenden Projekt nicht weiterverfolgt wurde.

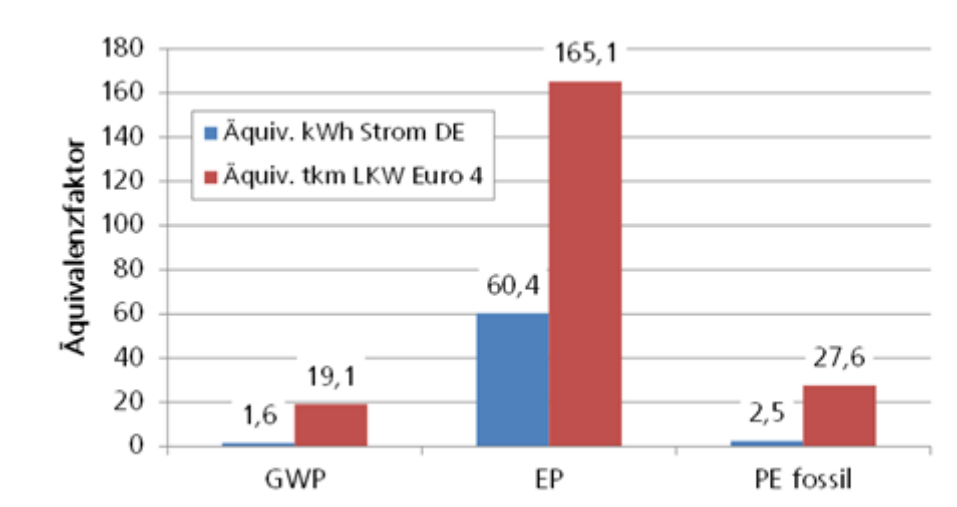


Abbildung 39: Äquivalenzfaktoren für Strom und Transportleistung relativ zum Einsparpotential von lastenfreien Sekundärrohstoffen.

Aus ökobilanzieller Sicht ist bei der Verwendung von Sekundärrohstoffen zu beachten, dass die Umweltlasten von deren Aufbereitung und Transport die Umweltlasten der Bereitstellung von Primärrohstoffen nicht übersteigen sollten. Im besten Fall können Sekundärrohstoffe als lastenfrei (d.h. mit Umweltwirkung null in allen Kategorien) angenommen werden, da sie Abfälle eines anderen Produktsystems sind. Die Umweltlasten der Bereitstellung der (Primär-) Biomasse werden dem ersten Produktsystem zugerechnet, in dem sie verwendet werden. Die Umweltlasten des Transports und der Aufbereitung der (Sekundär-) Rohstoffe werden allerdings dem zweiten Produktsystem zugerechnet, welches die Abfälle des ersten verwertet.

Abbildung 39 zeigt die Äquivalenzfaktoren für Strom (z.B. zur Aufbereitung von Sekundärbiomasse) und Transportleistung relativ zum Einsparpotential von lastenfreien Sekundärrohstoffen. Das Diagramm ist folgendermaßen zu lesen: Wenn die Umweltlast der Rohstoffe Sojaöl und Glukose wegfällt, entspricht dies x kWh Strom bzw. y tkm (Tonnenkilometer) Transportleistung. Würde für die Aufbereitung der Sekundärbiomasse mehr als x kWh Strom

oder mehr als y tkm Transportleistung benötigt, so würde sich der Umstieg nicht lohnen. Je nach Wirkung sind diese Äquivalenzfaktoren höher oder niedriger. Für das EP sind sie besonders hoch, weil das EP der Rohstoffe im Vergleich zum EP von Strom und Transportleistung hoch ist.

6.3 Ökobilanzierung

Im Rahmen des Projekts wurde MEL nur im Labormaßstab synthetisiert. Die Produktion im Technikumsmaßstab wurde in Kooperation mit dem Fraunhofer IGB und CBP abgebildet. Hier sind bereits Effizienzgewinne durch Upscaling sichtbar. In Abbildung 40 sind die Umweltwirkungen von 1 kg MEL Rohextrakt über die verschiedenen Stufen im Vergleich dargestellt. „Basis Labor“ entspricht der Prozessführung im Labor mit 30-tägiger Fermentation. Ohne nennenswerte Verluste bei der Ausbeute lässt sich die Fermentation auf 10 Tage verkürzen („Labor 10d“). Es folgen die Szenarien „Pilotanlage Basis“ und „Pilotanlage o. Schaum“, die oben schon beschrieben wurden. Über diese Stufen werden GWP, AP und PE_{fossil} um mehr als 95 % verringert; EP und ADP_{elements} immerhin um mehr als 80 %.

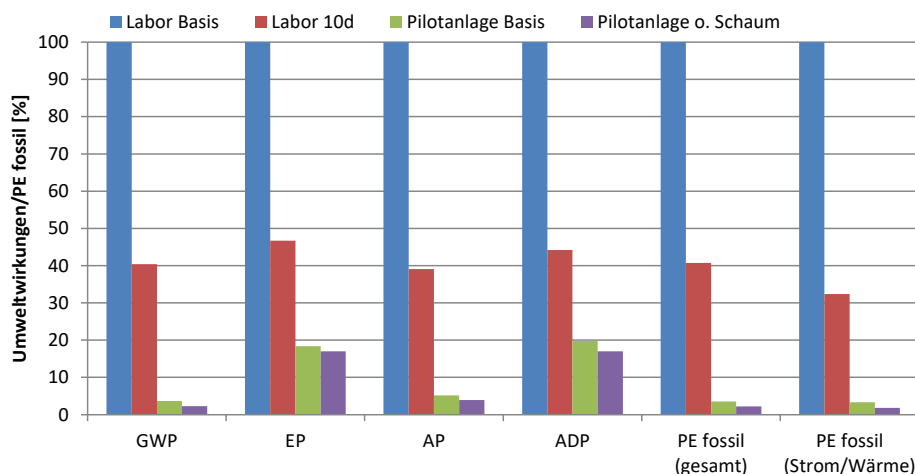


Abbildung 40: Umwelteinwirkungen von 1 kg MEL, Vergleich über Labor- und Pilotmaßstab.

Die wichtigsten Ansatzpunkte für eine weitere Reduzierung der Umweltlasten ergeben sich aus den o.g. Ergebnissen.

- Fermentationszeit: so kurz wie möglich – sofern die Ausbeute darunter nicht leidet
- Verzicht auf Schaumzerstörer – sofern die effiziente Prozessführung nicht gefährdet ist
- Rührerdrehzahl: so gering wie möglich – sofern die O_2 -Versorgung der Kultur gesichert ist
- Stammentwicklung der verwendeten Hefen durch *metabolic engineering*
- Substrate: Vermeidung von Primärrohstoffen, Verwendung von Sekundärrohstoffe – siehe unten

- (ggf. Primärrohstoffe aus ökologischer Landwirtschaft – hier aber nicht weiter diskutiert)
- Aufreinigung: Recycling des Lösemittels Ethanol in Aufreinigung vorsehen

Für die Einordnung der Umweltlasten von MEL wären die Umweltlasten von Produkten interessant, in denen MEL als Komponente eingesetzt werden. Zum Abschluss des Projekts ist allerdings weder die Formulierung für einen Glasreiniger von Sonett mit MEL noch für eine Gesichtsschme von Börlind mit MEL definiert. Auch ohne alle Komponenten der Formulierung qualitativ und quantitativ zu benennen, können beide Unternehmen jedoch schon die Mengenanteile von MEL abschätzen.

- Sonett Glasreiniger: voraussichtlich 0,2 % MEL
- Börlind Gesichtsschme: voraussichtlich 0,02 % MEL

Wie groß der Anteil von MEL an den Umweltlasten des Endkundenprodukts ist, lässt sich nicht quantitativ schätzen. Es ist davon auszugehen, dass beide Produkte zu einem gewissen Anteil aus Wasser bestehen werden. Die Umweltlasten auch von hochreinem Wasser sind vergleichsweise gering. Andere Bestandteile dürften niedrigere Umweltlasten pro Masseneinheit aufweisen (z.B. einfache Seifen, einfache Fette/Öle, Ethanol), machen aber u.U. einen deutlich größeren Massenanteil der Produkte aus (beispielsweise besteht der Glasreiniger aus dem aktuellen Sonett-Katalog zu 15–30 % aus Ethanol).

Im Vergleich mit anderen Biotensiden – hier: Alkylpolyglykoside, APG – zeigt MEL ähnlich hohe Umweltwirkungen je 1 kg Produkt. Im Rahmen dieses Vorhabens wurden keine anderen Tenside untersucht, ein Vergleich mit Literaturdaten ist jedoch möglich. Guilbot et al. [31] berechnen die Umweltwirkungen von APG auf Basis von Palmöl und Weizen, allerdings mit etwas anderen Systemgrenzen. Die Ergebnisse für MEL und APG lassen sich – um die wichtigsten Unterschiede bereinigt – zumindest im GWP vergleichen. Je nach Art der rechnerischen Bereinigung der Ergebnisse liegen die Umweltlasten von MEL 10 % unter oder 37 % über denen von APG. Bei aller verbleibenden Unsicherheit lässt sich daraus schließen, dass MEL zumindest grundsätzlich ökologisch konkurrenzfähig gegenüber anderen Biotensiden sind.

Insgesamt wurden durch die Begleitung des Vorhabens mit Ökobilanz-Expertise drei wesentliche Ziele erreicht: Erstens, die erste Quantifizierung der Umweltwirkungen von MEL. Zweitens, die Aufdeckung von Potentialen zur Effizienzsteigerung bei Ausbau der MEL-Produktionskapazitäten. Drittens, der erste Vergleich von MEL mit den etablierten Biotensiden APG.

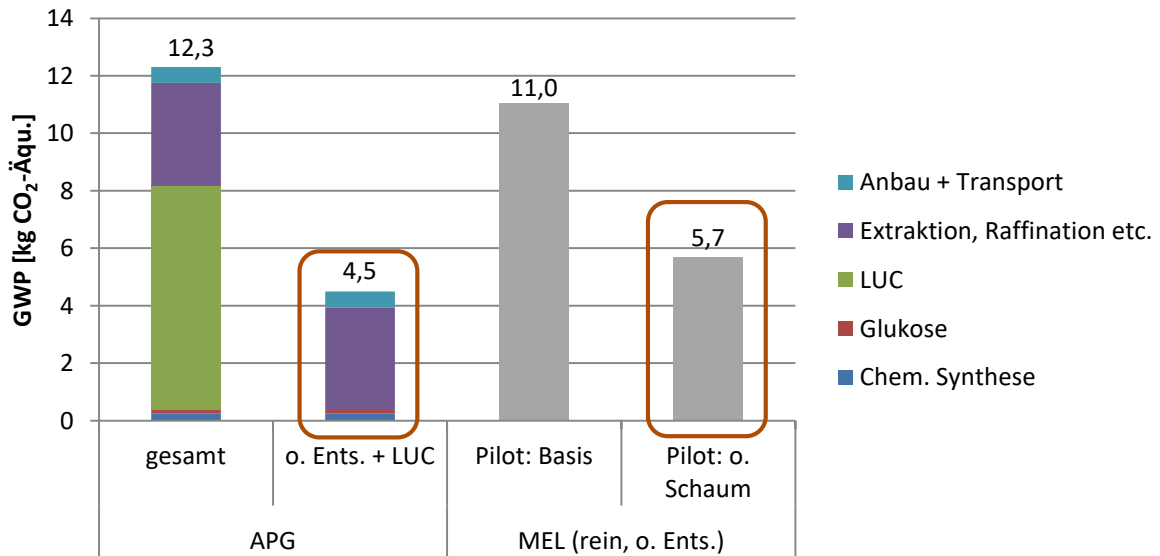


Abbildung 41: Vergleich des Treibhauspotentials von APG und MEL (funktionelle Einheit: 1 kg).

Es wurde ein herkömmliches biobasiertes Tensid mit den neuen Biotensiden verglichen. Konkret wurde MEL im Pilotmaßstab verglichen mit Alkylpolyglucosiden (APG) im Industriemaßstab. Beide werden hergestellt aus Primärrohstoffen. Datenbasis war die Ökobilanz von APG von Guilbot et al. [31]. Die Systemgrenzen dieser Studie sind nicht mit denen im laufenden Projekt identisch, so dass die Ergebnisse von Guilbot et al. für den Vergleich angepasst werden mussten. Wenigstens in der Wirkungskategorie GWP ist ein (vorsichtiger) Vergleich möglich. Mit Hinweis auf die nur teilweise hergestellte Vergleichbarkeit lässt sich sagen, dass MEL mit APG in der ökologischen Wirkung konkurrieren können (siehe Abbildung 41 – die korrigierten Werte für den Vergleich sind hervorgehoben). Ein wichtiger Faktor in der Klimabilanz von APG auf Basis von Palmkernöl (hier: aus Malaysia und Indonesien) ist die Mobilisierung von gebundenem Kohlenstoff durch Landnutzungsänderung (Land Use Change, LUC). Ohne diesen Teil der Treibhausgasbilanz schneiden APG zumindest in der Größe GWP etwas besser ab als MEL. Werden die Emissionen aus LUC in die Bilanz einbezogen, so verschiebt sich der Vergleich deutlich zugunsten von MEL.

Die Option der Herstellung von MEL (oder APG) aus Reststoffen wurde nicht in Betracht gezogen. Guilbot et al. erwähnen die Option nicht. Für APG ist die Verarbeitung aber auch deutlich relevanter als die Produktion der Rohstoffe (es sei denn, LUC-Emissionen werden mitgezählt – siehe Abbildung 41). Im laufenden Projekt nehmen die Industriepartner zumindest aktuell Abstand von der Verwendung von Reststoffen. Insbesondere hochpreisige Kosmetikprodukte lassen sich kaum vermarkten, wenn sie aus „Biomüll“ hergestellt werden.

6.4 Antimikrobielle Wirkung

In den durchgeführten Untersuchungen zur antimikrobiellen Eigenschaften zeigte MEL gegenüber Gram-positiven Bakterien wie *S. aureus* deutlich bessere antimikrobielle Eigen-

schaften als gegenüber Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* oder *P. aeruginosa*, wohingegen keine antifungale Wirkung nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 4.3.2). Untersuchungen von Kitamoto et al. und Deml et al. bestätigen diese Ergebnisse [32,33]. Eine Anwendung der MEL als Konservierungsmittel ist daher nur bedingt möglich. Die Auswahl der MEL zum Einsatz in WPR und KPM zu Ersatz bisher eingesetzter Tenside wird daher primär anhand ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften getroffen. Zusätzliche antimikrobielle Eigenschaften spielen eine untergeordnete Rolle bei der Auswahl. Im weiteren Projektverlauf werden die antimikrobiellen Eigenschaften gegenüber *Malassezia furfur*, dem Verursacher von Kopfschuppen, und *Cutibacterium acnes* (ehemals *Propionibacterium acnes*) dem Erreger von Pickeln, untersucht. Möglicherweise ergibt sich hieraus eine weitere Anwendung der MEL in KPM.

6.5 Auswahl Endtensid

In den bisherigen Produktformulierungen der beiden Industriepartner wird das Zuckertensid Glucocon® 650 EC verwendet, obwohl unterschiedliche Anwendungen in KPM wie Shampoos oder einer Reinigungslotion und WPR wie Glas- oder Bodenreiniger unterschiedliche Anforderungen an die Tensideigenschaften bedingen. In Kapitel 4.1 wurden die jeweiligen Spezifikationen der unterschiedlichen Anwendungsgebiete der MEL definiert. Auf Basis dieser Spezifikationen und der bisherigen Ergebnisse wurden mehrere vielversprechende MEL-Mischungen ausgewählt.

Sonett GmbH

Beide MEL-Mischungen, die für die Sonett GmbH in der Anwendung eines Glas- oder Bodenreinigers am interessantesten sind, sind aus *Stamm 3*, mit Öl B oder Öl C als Substrat. Insbesondere MEL aus *Stamm 3* mit Öl C weisen hinsichtlich der minimalen Oberflächenspannung von 28 mN/m, des Schaumvermögens und der Schaumstabilität nahezu die gleichen Werte auf wie Glucocon® 650EC. Zudem besitzt dieses MEL im Vergleich zu Glucocon® 650EC gute antimikrobielle Eigenschaften sowie gute zellverträgliche Eigenschaften bei Keratinozyten. Ein weiterer Vorteil ist die 20 x niedrigere cmc mit 2 mg/L im Vergleich zu Glucocon, die zu deutlich niedrigeren Einsatzmengen im Produkt führt. Dieses MEL setzt sich aus 5 % MEL-A, 30 % MEL-B, 40 % MEL-C und 25 % MEL-D zusammen und ist damit relativ hydrophil. Ähnlich gute Eigenschaften aufgrund seiner Zusammensetzung von 25 % MEL-B, 70 % MEL C sowie < 5% MEL-A und MEL-D besitzt das MEL aus *Stamm 3* mit Öl B.

Börlind Gesellschaft für kosmetische Erzeugnisse mbH

Für die Anwendung in kosmetischen Erzeugnissen der Börlind Gesellschaft für kosmetische Erzeugnisse mbH zeigten sich drei MEL aus *Stamm 1*, mit Öl D, Öl E und Öl A als Substrate,

am vielversprechendsten. Die Ceramid-ähnliche Haut-regenerierende Wirkung von MEL-Gemischen beruht im Wesentlichen auf den Effekten von MEL-A [34]. Die drei oben gewählten MEL besitzen entsprechend hohe Anteile MEL-A in der Mischung:

- *Stamm 1* mit Öl A: MEL-A 40 %, MEL-B 20 %, MEL-C 30 %, MEL-D 10 %
- *Stamm 1* mit Öl E: MEL-A 55 %, MEL-B 30 %, MEL-C 3 %, MEL-D 12 %
- *Stamm 1* mit Öl D: MEL-A 35 %, MEL-B 25 %, MEL-C 32 %, MEL-D 8 %

Diese drei besitzen mit < 5 mg/L eine deutlich niedrigere cmc als Glucopton® 650EC (44 mg/L), wodurch für vergleichbare Ergebnisse mit Glucopton® 650 EC weniger MEL eingesetzt werden muss. Zudem besitzen MEL aus *Stamm 1* mit Öl D oder Öl E deutlich bessere antimikrobielle Eigenschaften als Glucopton® 650EC bei gleichguter Zellverträglichkeit mit Keratinozyten.

7 Öffentlichkeitsarbeit

Im Rahmen von vier Vorträgen wurden von Dr.-Ing. S. Zibek Teilergebnisse des Projektes der Fachwelt vorgetragen. Diese waren im Einzelnen:

- Dr.-Ing. S. Zibek: *Fermentative synthesis of biosurfactants by Pseudozyma species using renewable feedstock* im Rahmen der BIOKET Konferenz, 6.- 8. März 2018, Strasbourg.
- Dr.-Ing. S. Zibek: *Herstellung von Mannosylerythritollipid-Strukturvarianten durch Kombination verschiedener Pseudozyma sp. und hydrophober Substrate* im Rahmen des SEPAWA Kongresses, 18.- 20. Oktober 2017, Berlin.
- Dr.-Ing. S. Zibek: *Tailoring of Mannosylerythritol Lipids by Pseudozyma Species Using Different Renewable Feedstocks*. Im Rahmen des AOCS Annual Meeting and Industry Showcases, 30. April - 3. Mai 2017, Orlando.
- Dr.-Ing. S. Zibek: *Microbial synthesis of the biosurfactants mannosylerythritol and cellobiose lipids* im Rahmen des 63. SEPAWA Kongresses und der 12. European Detergents Conference, 12. - 14. Oktober 2016, Fulda.
- Dr.-Ing. S. Zibek: *How to convert plant oils into epoxides and biosurfactants with biological systems* im Rahmen der Tagung Bioeconomy Conference der BioEconomy e.V., 01.-02. Juni 2016, Halle.
- Dr.-Ing. S. Zibek: *Tailoring Mannosylerythritol lipid production* im Rahmen der Himmelfahrtstagung: New Frontiers for Biotech-Processes der Dechema, 02.-04. Mai 2016, Koblenz.

8 Fazit

Die Untersuchungen unterschiedlicher MEL-Varianten, die anhand der Kultivierung mehrerer Biotensid-bildenden Mikroorganismen mit verschiedenen Substraten erhalten wurden, haben zu insgesamt fünf geeigneten MEL-Mischungen für Anwendungen in KPM und WPR geführt. Die verschiedenen bereitgestellten MEL-Varianten sind in Tabelle 4 (Auswahl und Charakterisierung unterschiedlicher MELs) und Tabelle 5 (weiterführende Untersuchung vielversprechender MEL-Varianten) zusammengefasst.

Im Verlauf des Projektes wurden den Industriepartner von einzelnen MEL-Chargen Mengen von mehr als 30 g zur Verfügung gestellt, um damit entsprechende Produktentwicklungen durchführen zu können.

Im Bereich der KPM konnten beispielsweise Shampoo-Formulierungen mit MEL hergestellt werden, die im Vergleich zur Originalrezeptur nahezu identische Eigenschaften, z.B. beim pH-Wert, der Viskosität und der Dichte aufwiesen. Die Einarbeitung eines MEL-Gemisches aus *Stamm 1* mit Öl A (Charge: 6711) in einer Reinigungsmilch von ANNEMARIE BÖRLIND lieferte ebenfalls gute Ergebnisse.

Im Anwendungsgebiet der WPR wurden die MEL-Varianten vor allem hinsichtlich ihrer Eignung in Glasreinigerformulierung bewertet. In dieser Anwendung spielen unter anderem die Tensidlöslichkeit, die Reinigungsleistung und die Kompatibilität mit anderen Inhaltsstoffen wie Alkoholen, ätherischen Ölen der Endformulierung eine wichtige Rolle. Im Verlauf des Projektes konnte eine vielversprechende Glasreinigerformulierung entwickelt werden, die im Vergleich zu einer Referenzformulierung eine akzeptable Reinigungsleistung zeigte und sogar ein verbessertes Klartrockenverhalten aufwies.

Die Untersuchungen der beteiligten Partner zeigen zusammenfassend, dass der Ersatz von sich bereits in der Anwendung befindenden Tensiden durch MEL je nach Anwendungsgebiet möglich ist. Dieser Ersatz kann je nach Anwendung und etablierter Formulierungsrezeptur Anpassungen in der Zusammensetzung erforderlich machen. Eine gezielte Entwicklung neuer Formulierungsrezepturen auf Basis von MEL als Tensid ist nach Einschätzung der Projektpartner sowohl im Bereich der KPM als auch der WPR möglich.

Zusammenfassung der wesentlichen erzielten Fortschritte:

- Herstellung von Biotensiden mit vollständiger biologischer Abbaubarkeit
- Vermeidung von Tensid-Rückständen sowie toxischen oder eutrophierenden Tensid-Abbauprodukten in der Umwelt.
- Nutzung von heimischen nachwachsenden Rohstoffen wie zum Beispiel Öl B, Maisquellwasser oder Maische zur Biotensidherstellung als Alternative zu fossilen Roh-

- stoffen oder nachwachsenden Rohstoffen wie Palmkern- oder Kokosnussöl, die überwiegend aus nicht nachhaltigem Anbau stammen
- Ökoeffiziente Herstellung von Tensiden und Ersatz von erdölbasierten Tensiden
- Einsatz von biotechnologischen Herstellungsverfahren, die bei niedrigeren Temperaturen arbeiten als chemische Verfahren, die die Vermeidung von toxischen Edukten der chemischen Tensidsynthese wie Ethylenoxid ermöglichen und spezifischere Produktgemische erzeugen
- Energieeffiziente Herstellung von Biotensiden und geringere Umweltbelastung durch toxische Edukte und Nebenprodukte.
- Ersatz von Konservierungsmitteln, da MEL sowohl tensidspezifische als auch antimikrobielle Eigenschaften besitzen
- Bessere Humanverträglichkeit der KPM und der WPR sowie geringere Umweltbelastung durch eine Reduktion von Produktinhaltsstoffen

Die Verwertung der in diesem Projekt erzielten Ergebnisse erfolgt auf wirtschaftlicher, technologischer und wissenschaftlicher Ebene. Das Konsortium ist überzeugt, dem Verbraucher nach Abschluss des Projekts sehr gut marktgängige, aber vor allem auch nachhaltige Produkte im Bereich der Körperpflegemittel und der Wasch-, Pflege- und Reinigungsmittel anbieten zu können. Die neu entwickelten Verfahren zur fermentativen Herstellung und Aufarbeitung von spezifischen MEL sowie die neu entwickelten Formulierungen sollen auf Patentfähigkeit überprüft werden und, wie im Konsortialvertrag vereinbart, entsprechend geschützt werden. Damit soll die Schnittstelle für einen Transfer der Technologie in eine industrielle Anwendung mit Hilfe der Projektpartner SONETT OHG und Börlind GmbH geschaffen werden. Nach Projektabschluss streben die Unternehmen Börlind GmbH und Sonett OHG jeweils an, diese neuen Biotenside in ihren Produkten einzusetzen, damit auf den Markt zu gehen und die Alleinstellungsmerkmale der MEL als Tenside, Emulgatoren und Konservierungsmittel in KPM und WPR zu nutzen.

Bei erwarteten positiven Ergebnissen wird eine Weiterführung des Projekts im Rahmen eines neuen DBU, BMBF oder auch EU Projektes angestrebt. Die Erkenntnisse und etablierten Verfahren dieses Projektes könnten auf andere wenig untersuchte Glykolipidgruppen (Trehaloselipide, Cellobioselipide) übertragen werden, um eine noch größere Vielfalt mikrobieller Strukturen für die untersuchten Anwendungsbereiche zu erschließen

Die Universität Stuttgart verwertet die Projektergebnisse darüber hinaus in Abstimmung mit den Projektpartnern und nach Prüfung auf Patentfähigkeit in Form von Beiträgen in Fachzeitschriften sowie Postern und Vorträgen auf Konferenzen. Hierdurch werden die Position des IGVP im Bereich der nachhaltigen Produktion der MEL-Glykolipide und Biotensiden im Allgemeinen gestärkt. Das IGVP will mit dem durch dieses Projekt gewonnenen Wissen wei-

tere Anwendungsgebiete sowie Einsatzmöglichkeiten der MEL erschließen und weitere Kooperationen, auch in anderen Industriezweigen wie z.B. im Pflanzenschutz, anstreben. Hier ist der Einsatz maßgeschneiderter Glykoloipide als Benetzungsmitteln und Biozide denkbar. Das IGVP strebt an, sein Know-how über die Herstellung von Glykolipiden und deren Anwendungen über den Stand der Technik hinaus weiterzuentwickeln. Die Ergebnisse fließen außerdem in die Ausbildung von Studenten an der Universität Stuttgart ein.

Das Fraunhofer IBP stärkt durch die Teilnahme in diesem Projekt seine Stellung als LCA-Kompetenzzentrum. Das in der Abteilung Ganzheitliche Bilanzierung vorhandene Know-how in diesem Bereich wird weiter ausgebaut und kann in Zukunft in weiteren Projekten mit akademischen und industriellen Forschungspartnern angewandt werden. Soweit es die Geheimhaltungsvereinbarungen erlauben, sind Veröffentlichungen über die Projektergebnisse geplant.

Zeitplan Projekt <i>Biotenside</i>		1. Jahr				2. Jahr				3. Jahr				
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
AP 0	Projektmanagement	[Gantt bar spanning all 12 quarters]												
AP 1	Spezifikation der MEL-Mischungen	[Gantt bar]												
AP 2	Biotechnologische Herstellung der MEL		[Gantt bar spanning all 12 quarters]											
	2.1	Herstellung erster Musterproben	[Gantt bar]											
AP 3	Charakterisierung der MEL		[Gantt bar spanning all 12 quarters]											
	3.1	Physik.-chem. Charakterisierung	[Gantt bar]											
	3.2	Untersuchung der Toxizität und der allergenen Wirkung	[Gantt bar]											
AP 4	Modifizierung der MEL & Basisformulierung		[Gantt bar spanning all 12 quarters]											
	4.1	Erste Basisformulierung mit MEL	[Gantt bar]											
AP 5	Testung der MEL in kosm. Grundlagen		[Gantt bar spanning all 12 quarters]											
	5.1	Testung der MEL in kosm. Grundlagen (Auswahl des Zieletensids)	[Gantt bar]											
AP 6	Untersuchung der MEL in WPR		[Gantt bar spanning all 12 quarters]											
	6.1	Phys.-chem. Untersuchung	[Gantt bar]											
AP 7	Ökobilanzierung der MEL (Prozessbegleitend)	[Gantt bar]												
Summe														

Meilenstein: MS 1 (18 Monate): Bereitstellung von geeigneten MEL-Varianten für die Anwendung in kosmetischen Grundlagen und in Wasch-, Putz- und Reinigungsmitteln

Tabelle 15: Aktualisierter Zeit- und Arbeitsplan.

9 Literaturverzeichnis

- [1] Meo Carbon Solution GmbH (2014): Vorstellung der Ergebnisse der Marktanalyse nachwachsende Rohstoffe durchgeführt im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft und der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. URL: http://www.meo-carbon.com/e1511/e1553/e1630/e1663/07_Boettger_ger.pdf (15.08.2014).
- [2] Wagner G. (2010): Waschmittel 4. Auflage. Wiley-VCH-Verlag.
- [3] Renkin, M. (2003): Convention Giornate CID No10, Milan, Italy, 80(4): 249-252.
- [4] Kim H.-S., Jeon, J.-W., Kim S.-B., Oh H.-M., Kwon T.-J., Yoon B.-D. (2002): *Biotechnol. Lett.* 24: 1637-1641.
- [5] Rau U.; Nguyen L. A.; Roeper H.; Koch, H., Lang, S. (2005): *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 (5): 607–613.
- [6] Griffin W. C(1949) *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1.
- [7] OECD (1995), Test No. 105: Water Solubility, OECD Publishing, Paris.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069589-en>
- [8] Kitamoto D., Morita T., Fukuoka .T, Konishi M., Imura T. (2009) *Curr Opin Colloid Interface Sci* 14:315–328.
- [9] Burger-Kentischer A., Abele I.S., Finkelmeier, D., Wiesmüller, K.H., Rupp, S. (2010): *J. Immunol. Methods.* 358(1-2):93-103.
- [10] Chen 2008
- [11] Burger-Kentischer A., Finkelmeier D., Keller P., Bauer J., Eickhoff H., Kleymann G., Abu Rayyan W., Singh A., Schröppel K., Lemuth K., Wiesmüller K.H., Rupp S. (2011): *Antimicrob Agents Chemother.* 55(10):4789-801.
- [12] Günther, M. (2014): Mikrobielle Synthese, Aufarbeitung, Modifizierung und Tensideigenschaften von Mannosylerythritollipiden und Cellobioselipiden. Dissertation

[13] SÖFW-Journal, 130 10/2004

[14] DIN 53804

[15] Arrhenius S.Z. (1889) Phys. Chem. 4: 226–248.

[16] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Part 301 B, adopted 17. Jul. 1992 “CO₂-Evolution-Test (Modified STURM Test)“.

[17] Klöpffer W., Grahl B. (2009): Ökobilanz (LCA). Ein Leitfaden für Ausbildung und Beruf. Weinheim: Wiley-VCH.

[18] ISO (2006): International Standard ISO 14040:2006. Environmental management – Life cycle assessment – Principles and framework. Genf, Schweiz: International Organization for Standardization (ISO).

[19] ISO 14044

[20] thinkstep AG (1992-2015): GaBi Software-System and Database for the Life Cycle Engineering. Stuttgart, Echterdingen, Deutschland.

[21] Schestak, I. (2016) Ökobilanzielle Betrachtung von Biotensiden: Herstellung von Mannosylerythritol-Lipiden im Labor- und Pilotmaßstab. Masterarbeit, Universität Stuttgart.

[22] Toyobo (2013) SurfMellow® (Sojzymba tsukubae) URL: <http://www.toyobo-global.com/seihin/cosme/surfmellow.htm>, letzter Zugriff 19.08.2016

[23] Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. (2015): *Journal of Oleo science* 64 (2), 133–141.

[24] Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. (2007a): *Appl. Microbial. Biotechnol.* 74 (2), 307–315.

[25] Arutchelvi J., Irudayaraj B., Sumit U., Parasu V., Doble M. (2008): *J. Industr. Microbial. Biotechnol.* 35 (12): 1559–1570.

[26] Shaligram N.S. and Rekha S. S. (2010): *Food Technol. Biotechnol.* 48(2): 119–134.

[27] DIN EN ISO 11930 2012

[28] TOKU-E Corporation: The Antimicrobial Index URL: http://antibiotics.toku-e.com/microorganism_detail_8559.html Stand: Version 1.8; Letzter Zugriff: 20.05.2018.

[29] Guinée, J.B. (Ed.), Gorrée M., Heijungs R., Huppés G., Kleijn R., de Koning A., van Oers L., Wegener A.; Sleeswijk, Suh S., Udo de Haes H.A., de Bruijn J.A., van Duin R., Huijbregts M.A.J. (2002): Handbook on Life Cycle Assessment: Operational Guide to the ISO Standards. Series: Eco-efficiency in industry and science. Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers.

[30] Van Oers L., Koning A., de Guinée J. B.; Huppés G. (2002): Abiotic resource depletion in LCA. Improving characterisation factors for abiotic resource depletion as recommended in the new Dutch LCA Handbook. Hg. v. Institute of Environmental Sciences (CML) der Universität Leiden für das Road and Hydraulic Engineering Institute des niederländischen Ministeriums für Verkehr, Bau und Wassermanagement. Leiden, NL.

[31] Guilbot J., Kerverdo S., Milius A., Escolac R., Pomrehnd F. (2013): *Green Chem.* 15(12): 3337-3354.

[32] Deml G., Anke T., Oberwinkler F., Max G.B., Steglich W. (1980) *Phytochem.* 191:83–87.

[33] Kitamoto D. Yanagishita H. Shinbo T., Nakane T., Kamisawa C., Nakahara T. (1993) *J. Biotechnol* 29:91-96.

[34] Morita T., Konishi M.; Fukuoka T.; Imura T.; Kitamoto H.K. and Kitamoto D. (2007) *FEMS Yeast Res* 7: 286–292.

10 Anhang

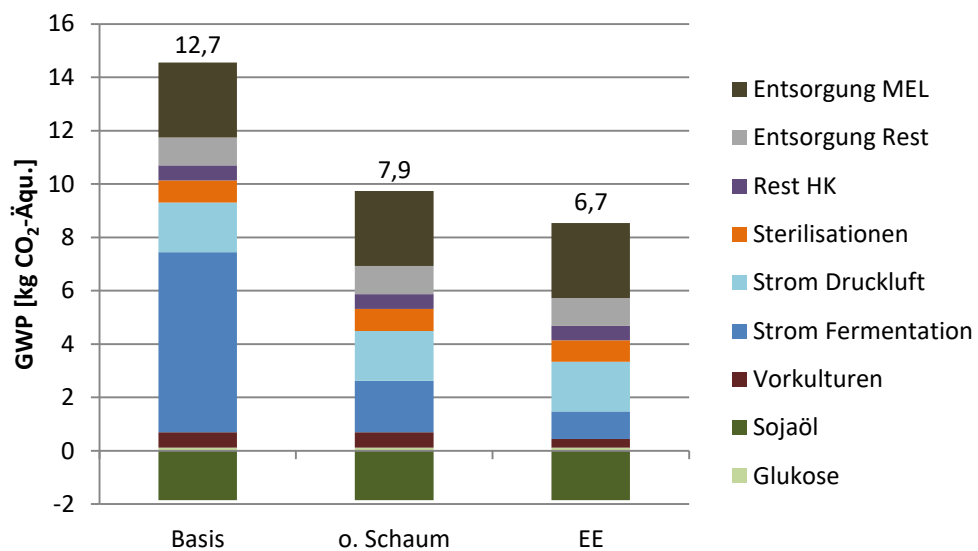
10.1 Fraunhofer IBP – Ergänzungen zu den Ergebnissen der Bilanzierung bezogen auf je 1 kg MEL Rohextrakt

DBU Biotenside | Beitrag Fraunhofer IBP – Anhang | zur Integration in IGVP-Berichte

Autor: Jan Paul Lindner | Stand: Februar 2018

10.1.1 Treibhauspotential (Global Warming Potential, GWP)

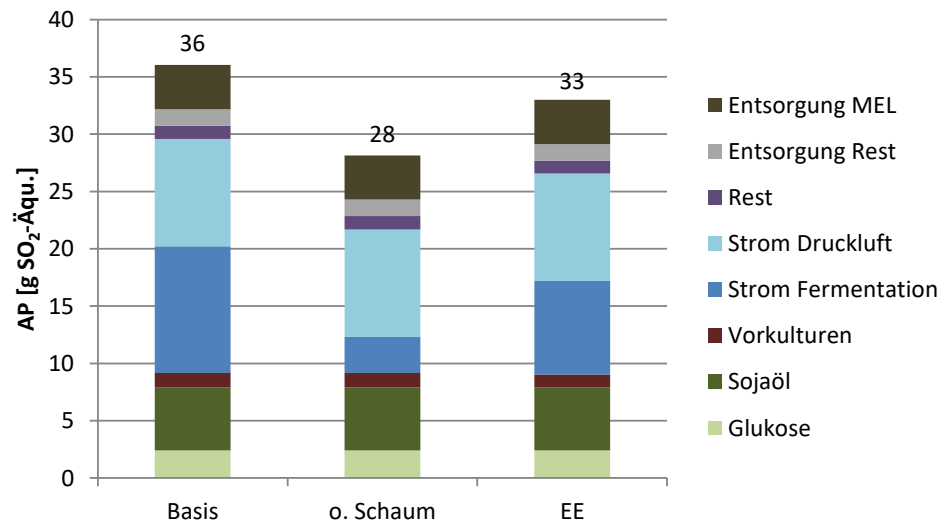
Ergebnisse in Kilogramm Kohlendioxid-Äquivalent je 1 kg MEL Rohextrakt



	Basis	o. Schaum	EE
Glukose	0,12	0,12	0,12
Sojaöl	-1,85	-1,85	-1,85
Vorkulturen	0,57	0,57	0,32
Strom Fermentation	6,75	1,93	1,04
Strom Druckluft	1,86	1,86	1,86
Sterilisationen	0,83	0,83	0,80
Rest HK	0,56	0,56	0,54
Entsorgung Rest	1,05	1,05	1,05
Entsorgung MEL	2,81	2,81	2,81
Summe	12,7	7,9	6,7

10.1.2 Versauerungspotential (Acidification Potential, AP)

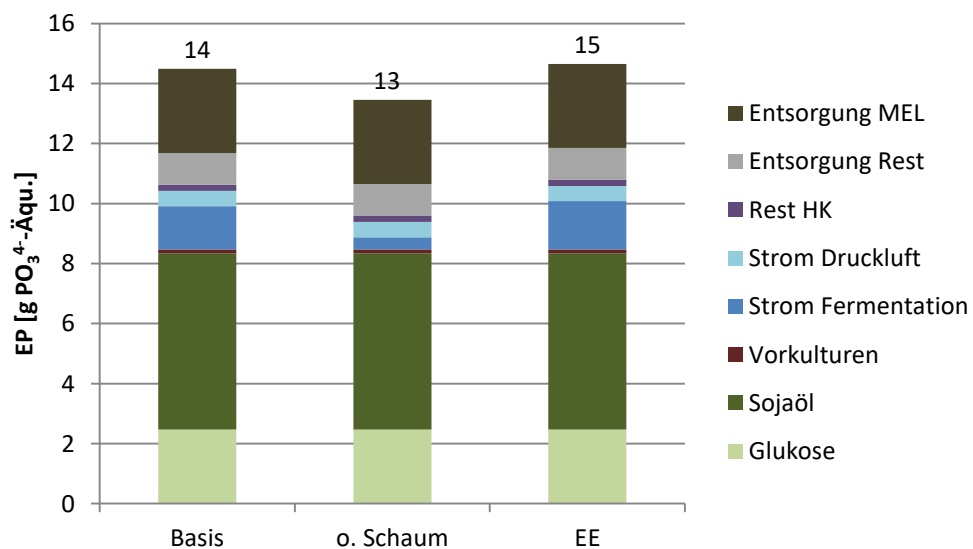
Ergebnisse in Gramm Schwefeldioxid-Äquivalent je 1 kg MEL Rohextrakt



	Basis	o. Schaum	EE
Glukose	2,41	2,41	2,41
Sojaöl	5,49	5,49	5,49
Vorkulturen	1,25	1,25	1,12
Strom Fermentation	11,06	3,16	8,17
Strom Druckluft	9,37	9,37	9,37
Rest	1,16	1,16	1,13
Entsorgung Rest	1,44	1,44	1,44
Entsorgung MEL	3,85	3,85	3,85
Summe	36,03	28,13	32,98

10.1.3 Eutrophierungspotential (Eutrophication Potential, EP)

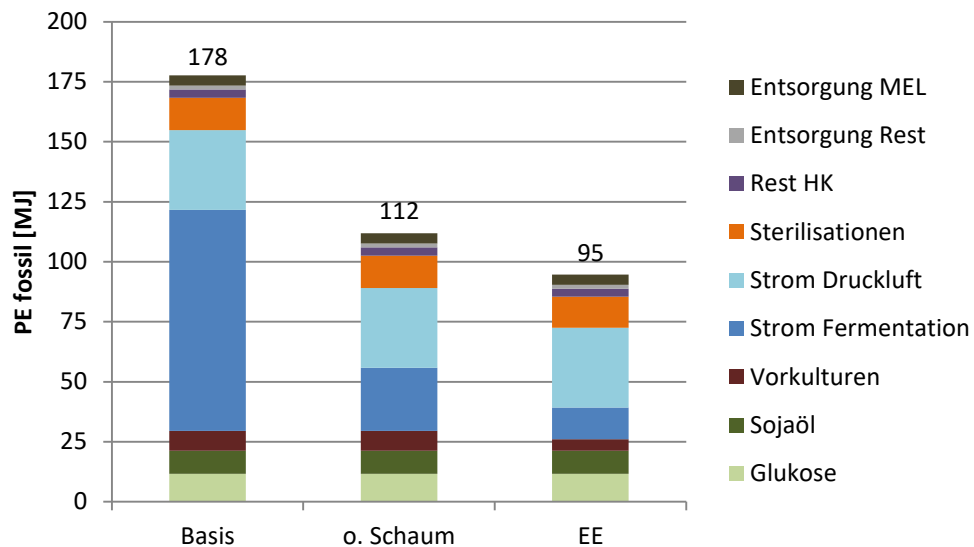
Ergebnisse in Gramm Phosphat-Äquivalent je 1 kg MEL Rohextrakt



	Basis	o. Schaum	EE
Glukose	2,47	2,47	2,47
Sojaöl	5,87	5,87	5,87
Vorkulturen	0,13	0,13	0,13
Strom Fermentation	1,44	0,41	1,60
Strom Druckluft	0,51	0,51	0,51
Rest HK	0,21	0,21	0,21
Entsorgung Rest	1,05	1,05	1,05
Entsorgung MEL	2,81	2,81	2,81
Summe	14,49	13,45	14,65

10.1.4 Fossiler Primärenergiebedarf (PE_{fossil})

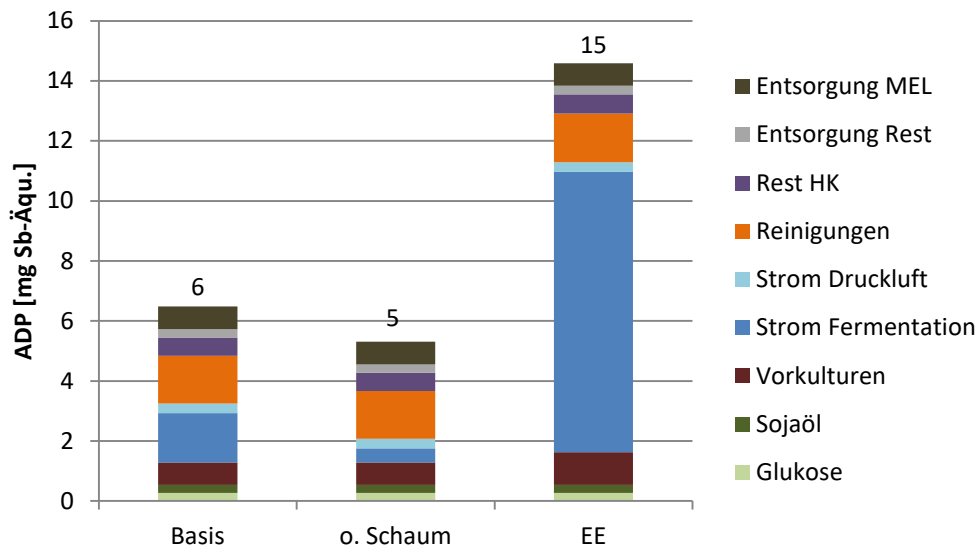
Ergebnisse in Megajoule Primärenergie (Brennwert) je 1 kg MEL Rohextrakt



	Basis	o. Schaum	EE
Glukose	11,6	11,6	11,6
Sojaöl	9,6	9,6	9,6
Vorkulturen	8,3	8,3	4,8
Strom Fermentation	92,1	26,3	13,3
Strom Druckluft	33,2	33,2	33,2
Sterilisationen	13,4	13,4	13,0
Rest HK	3,5	3,5	3,3
Entsorgung Rest	1,6	1,6	1,6
Entsorgung MEL	4,2	4,2	4,2
Summe	177,6	111,9	94,6

10.1.5 Abiotisches Ressourcenverbrauchspotential (ADP_{elements})

Ergebnisse in Milligramm Antimon-Äquivalent je 1 kg MEL Rohextrakt



	Basis	o. Schaum	EE
Glukose	0,27	0,27	0,27
Sojaöl	0,27	0,27	0,27
Vorkulturen	0,74	0,74	1,08
Strom Fermentation	1,65	0,47	9,34
Strom Druckluft	0,33	0,33	0,33
Reinigungen	1,59	1,59	1,62
Rest HK	0,60	0,60	0,65
Entsorgung Rest	0,28	0,28	0,28
Entsorgung MEL	0,75	0,75	0,75
Summe	6,48	5,31	14,59

10.2 Börlind – Ergänzungen zur Untersuchung auf zellproliferierende Eigenschaften II (Originalbericht: Bioalternatives)



www.bioalternatives.com

1 bis rue des plantes - BP 50011 - 86160 Gençay - France

+33 (0)5 49 36 11 37 - contact@bioalternatives.com

Studienbericht: MV180202

Belegstelle: MV180202 Version 2

Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (Öl D) und Biotensid Stamm 3 (Öl C) auf normale menschliche Keratinozyten der Epidermis Zellmigration und Analyse des mRNA-Expressionsprofils durch RT-qPCR

STUDIENSPONSOR

Frau Guylaine LE LOARER
BÖRLIND
Lindenstraße 15
75365 CALW-ALTBURG
DEUTSCHLAND

STUDIENLEITER

Frau Magdalena GACKENHEIMER

BIOALTERNATIVES

MV180202

BÖRLIND

Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C)
auf normale menschliche Keratinozyten der Epidermis

Die Forscher und der Autor dieses Berichts bestätigen hiermit die Gültigkeit der vorgestellten Daten und geben ihre umfassende Zustimmung zu den am Ende des Berichts vorgelegten Schlussfolgerungen.

28. Mai 2018

Studienleiter: Tanesha NAIKEN, PhD
Zell- und Molekularbiologie

Laborleiterin: Nathalie PEDRETTI
Molekularpharmakologie

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG	4
2. MATERIALIEN UND METHODEN	5
2.1. BIOLOGISCHES MODELL	5
2.2. TESTVERBINDUNGEN	5
2.3. VORLÄUFIGE ZYTOTOXIZITÄTSTESTS	5
2.4. MIGRATIONSTEST	6
2.4.1. <i>Kultur und Behandlung</i>	6
2.4.2. <i>Zellmigrationsanalyse</i>	6
2.5. GENEXPRESSIONSTEST	7
2.5.1. <i>Kultur und Behandlung</i>	7
2.5.2. <i>Differentialexpressionsanalyse</i>	7
2.5.2.1. RNA-Extraktion und reverse Transkription	7
2.5.2.2. Quantitative PCR	7
2.5.2.3. Datenverwaltung der quantitativen PCR	8
2.6. DATENVERWALTUNG	9
3. ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNG	10
3.1. VORLÄUFIGE ZYTOTOXIZITÄTSTESTS	10
3.2. WIRKUNG AUF DIE KERATINOZYTENMIGRATION	10
3.3. WIRKUNG AUF DIE GENEXPRESSION	10
4. TABELLEN UND ABBILDUNGEN	12
5. ANHANG	19

1. EINFÜHRUNG

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C) auf normale menschliche Keratinozyten der Epidermis (NHEK) untersucht.

Bewertet wurden grundsätzlich die Wirkungen dieser Verbindungen auf:

- die Migration der NHEK unter Verwendung der Bildanalyse der Wundheilung in einem System, das einen künstlichen Wundbereich für alle Bedingungen schafft (Platypus, Oris™ System), und zwar nach 0, 14, 18 und 24 Stunden der Inkubation,
- das Genexpressionsprofil unter Verwendung der RT-qPCR Technologie.

ABKÜRZUNGEN

cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermalwachstumsfaktor
HK	Haushalt
mQPA	Marker qPCR-Array
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
NHEK	Normale menschliche Keratinozyten der Epidermis
OD	Optische Dichte
PE	Hypophysenextrakt
RE	Relative Expression
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Sd	Standardabweichung
sem	Standardfehler des Mittelwerts
SFM	Serumfreies Medium

BIOALTERNATIVES

MV180202

BÖRLIND

Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C)
auf normale menschliche Keratinozyten der Epidermis

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Biologisches Modell

- Zelltyp: Normale menschliche Keratinozyten der Epidermis (NHEK),
Bioalternatives Referenzen:
- Einsatz von K593 in der 3. Passage (*Zytotoxizitäts- und Migrationstests*)
- Einsatz von K341 in der 3. Passage (*Zytotoxizitäts- und Genexpressionstests*)
- Nährbedingungen: 37 °C, 5% CO₂
- Nährmedium: Serumfreies Keratinozytenmedium, ergänzt mit
Epidermalwachstumsfaktor (EGF) 0,25 ng/ml
Hypophysenextrakt (PE) 25 µg/ml
Gentamicin 25 µg/ml
- Testmedium: Serumfreies Keratinozytenmedium, ergänzt mit
Gentamicin 25 µg/ml

2.2. Testverbindungen

Testverbindung	Aussehen/Lagerung	Stammlösung	Testkonzentrationen	
Biotensid Stamm 2 (ÖI D) Chargenr. 30-2D1 Reinheit: 99% MV180202-1	- Dicke Flüssigkeit - Lagerung: +4°C, vor Feuchtigkeit geschützt	100 mg/ml in Ethanol	K593 <i>Migrationstests</i>	4 und 8 µg/ml
			K341 <i>Genexpressionstests</i>	2 und 4 µg/ml
Biotensid Stamm 3 (ÖI C) Chargenr. 31-3C1 Reinheit: 99% MV180202-2	- Paste - Lagerung: +4°C, vor Feuchtigkeit geschützt	10 mg/ml in ultrareinem Wasser	K593 <i>Migrationstests</i>	2 und 4 µg/ml
			K341 <i>Genexpressionstests</i>	2 und 4 µg/ml

2.3. Vorläufige Zytotoxizitätstests

Zelltyp:	NHEK K593 in Testmedium	NHEK K341 in Testmedium
Inkubationszeit:	24 Stunden	48 Stunden
Bewertungsparameter:	MTT-Reduktionstest und morphologische Beobachtungen unter dem Mikroskop Nach der Behandlung wurden die Zellen mit MTT (Tetrazoliumsalz) inkubiert, das durch Succinat-Dehydrogenase (mitochondriales Enzym) zu blauen Formazankristallen reduziert wurde. Diese Umwandlung verhält sich proportional zur Enzymaktivität. Nach dem Zellaufschluss und der Solubilisierung der Formazankristalle mit DMSO wurde die optische Dichte (OD) der Auszüge bei 540 nm proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und ihrer metabolischen Aktivität mit einem Spektrometer (VERSAmax, Molekulargeräte) aufgezeichnet.	

2.4. Migrationstest

2.4.1. Kultur und Behandlung

Die Keratinozyten (K593) wurden auf 96-Well-Mikrotiterplatten für die Migrationsanalyse gesät (Ref. Platypus Oris™ Collagen I beschichtete Platte) und 6 Stunden lang in einem Nährmedium inkubiert. Bei dieser Platte wurden die Näpfcchen mit einer Kollagen-Lösung beschichtet. Ein Zellstopper wurde in der Mitte des Näpfcchens angebracht, um die Zellkeimung auf die äußeren Bereiche des Rings zu begrenzen und dabei eine künstliche Wunde zu schaffen (Migrationsbereich). Nach abgeschlossener Zelladhäsion wurden die Stopper entfernt und die Zellen wurden mit Calcein-AM (T0) markiert. Nach 30-minütiger Inkubation wurde das Medium durch ein Testmedium ersetzt, das die Testverbindungen oder die Vergleichsverbindung (EGF bei 10 ng/ml) enthielt oder nicht enthielt (Kontrollmedium). Die Zellen wurden dann 0, 14, 18 oder 24 Stunden lang inkubiert.

Alle experimentellen Bedingungen wurden in n=3 durchgeführt.

2.4.2. Zellmigrationsanalyse

Eine Zellmigration in den Migrationsbereich wurde zu T0 und nach 14, 18 oder 24 Stunden der Inkubation beobachtet. Die Analyse wurde mit einem NIKON Diaphot 300 Mikroskop (Objektivlinse x 4) durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer NIKON DX-1200 Kamera aufgenommen. Repräsentative Bilder der einzelnen experimentellen Bedingungen wurden in den Bericht aufgenommen und alle Bilder wurden auf der Sharing-Webseite von Bioalternatives bereitgestellt.

Zur Bildverschlüsselung siehe Tabelle 3.

Die Oberfläche der künstlichen Wunde (zentraler Bereich ohne Zelle) wurde nach 0, 14, 18 oder 24 Stunden der Inkubation gemessen und mit dem ursprünglichen zu T0 gemessenen Bereich verglichen, um die Wundheilung sichtbar zu machen und zu quantifizieren (vgl. Abbildung A). Die Wirkung der Verbindungen auf die Migration der NHEK wurde mit der Kontrolle verglichen.

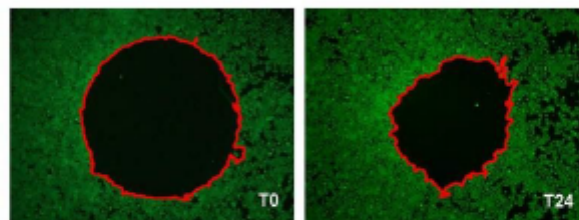


Abbildung A: Repräsentative Bilder der Oberflächenbehandlung der künstlichen Wunde (rot umgrenzt) auf NHEK zu T0 und nach 24-stündiger Inkubation

2.5. Genexpressionstest

2.5.1. Kultur und Behandlung

Die Keratinozyten (K341) wurden auf 24-Well-Mikrotiterplatten gesät und 24 Stunden lang im Nährmedium gezüchtet. Das Medium wurde anschließend durch ein Testmedium ersetzt, das die Testverbindungen oder die Vergleichsverbindung (Kalziumchlorid (CaCl₂) bei 1,5 mM) enthielt oder nicht enthielt (Kontrollmedium). Die Zellen wurden weitere 48 Stunden lang inkubiert. Alle experimentellen Bedingungen wurden in n=3 durchgeführt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und umgehend bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren.

2.5.2. Differentialexpressionsanalyse

Die Markerexpression wurde anhand der RT-qPCR-Methode für die gesamte RNA analysiert, die aus den Zellmonolayern für jede einzelne experimentelle Bedingung extrahiert wurde (vor der RNA-Expression wurden die Nachbildungen derselben experimentellen Bedingung gebündelt).

Die Transkriptanalyse wurde in n=2 mittels eines forschungsspezifischen PCR-Arrays („mQPA-NHEK-16'“) durchgeführt und an das „Screening“-Format angepasst (Marker qPCR-Array oder „mQPA“, Design von Bioalternatives). Sie betrifft 16 Gene, die wegen ihrer Bedeutung bei der Keratinozyten-Differenzierung ausgewählt wurden.

2.5.2.1. RNA-Extraktion und reverse Transkription

Die gesamte RNA wurde unter Verwendung von TriPure Isolation Reagent* gemäß den Anweisungen des Lieferanten aus den einzelnen Proben extrahiert.

Menge und Qualität der RNA wurde mittels Kapillarelektrophorese bestimmt (Bioanalyzer 2100, Agilent-Technologien). Die RNA-Qualitätskontrollen werden im Anhang (Abbildung 2) vorgestellt.

Die komplementäre DNS (cDNA) wurde durch reverse Transkription der Gesamt-RNA in Gegenwart von Oligo(dT) und „Transkriptor Reverse Transkriptase“ (Roche) synthetisiert. Die cDNA-Mengen wurden dann vor dem PCR-Schritt angepasst.

2.5.2.2. Quantitative PCR

Die PCRs (Polymerase-Kettenreaktionen) wurden mit dem „LightCycler“-System (Roche Molecular System Inc.) gemäß den Anweisungen des Lieferanten durchgeführt.

Das Reaktionsgemisch (10 µl endgültig) wurde wie folgt präpariert:

- 2,5 µl cDNA,
- Vorwärts- und Rückwärts-Primer,
- Reagenziengemisch aus Taq DNA Polymerase, SYBR Green I und MgCl₂.

2.5.2.3. Datenverwaltung der quantitativen PCR

Die Rohdaten wurden mit der Microsoft Excel® Software analysiert.

Die Fluoreszenzeinbindung in der amplifizierten DNA wurde während der PCR-Zyklen durchgehend gemessen. Dies führte zu einer Fluoreszenzintensität im Schaubild des PCR-Zyklus, die die Bestimmung eines relativen Expressionswerts (RE) für die einzelnen Marker ermöglichte.

Der ausgewählte Wert für die RE-Berechnungen ist der „Ausgabepunkt“ (Ct) der Fluoreszenzkurve. Für einen bestimmten Marker ist der höchste Wert die Zyklusnummer; der niedrigste ist die mRNA-Menge.

Der RE-Wert wurde mit dieser Formel berechnet: $(1/2^{\text{Zyklusanzahl}}) \times 10^6$.

Der in der vorliegenden Studie eingesetzte PCR-Array beinhaltet 2 Referenzgene (RPS28 und GAPDH). Die Haushaltsgene wurden für die Datennormalisierung verwendet, da sie konstitutiv und theoretisch stabil exprimiert sind. Infolgedessen wurde das Expressionslevel der Zielmarker mit dem mittleren Expressionslevel dieser 2 Marker für alle Testbedingungen verglichen.

Klassifizierung der Wirkungen („behandelte“ Bedingungen vs „Kontrolle“)

Anmerkungen zum verwendeten Protokoll:

Die RT-qPCR-Methode ist hochsensibel, doch diese Sensibilität kann zu einer Schwankungsbreite führen. Zudem kann die mRNA-Menge in der Zelle für einen bestimmten Marker je nach Behandlungsdauer stark schwanken. Daher spiegeln die ermittelten Ergebnisse das Genexpressionsprofil zur ausgewählten Zeit wider.

Für eine einheitliche Interpretation empfiehlt Bioalternatives folgende Tabelle:

Relative Expression (% Kontrolle)	Klassifizierung der Wirkungen
> 300%	Starke Stimulierung
> 200% und < 300%	Stimulierung
> 150% und < 200%	Leichte Stimulierung, unbestätigt
> 50% und < 65%	Mittlere Stimulierung, unbestätigt
> 30% und < 50%	Hemmung
< 30%	Starke Hemmung

Dennoch kann es unter Berücksichtigung dieser Anmerkungen interessant sein, die beobachteten Trends für einige Marker zu bestätigen, z.B. unter Verwendung unterschiedlicher Inkubationszeiten (kinetische Studie) oder durch Untersuchung ihrer Expression auf Proteinebene.

2.6. Datenverwaltung

Die Rohdaten wurden mit der Microsoft Excel® Software analysiert.

Die Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit einem t-test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Die statistische Analyse kann interpretiert werden, wenn $n \geq 5$; für $n < 5$ dienen die statistischen Werte jedoch nur zu Informationszwecken.

In diesem Bericht verwendete Formeln:

Standardfehler
Mittelwerts: des $sem = Sd/\sqrt{n}$

Der Standardfehler des Mittelwerts (sem) ist eine Messung, wie weit der Mittelwert des Samples wahrscheinlich vom tatsächlichen Mittelwert der Population abweicht. Der sem wird berechnet als sd geteilt durch die Quadratwurzel der Samplegröße.

Prozentsatz
Lebensfähigkeit: der Lebensfähigkeit (%) = $(OD_{sample} / OD_{kontrolle}) \times 100$

3. ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNG

3.1. Vorläufige Zytotoxizitätstests

Tabelle 1 und 2

Die Ergebnisse der MTT-Reduktionstests und die Ermittlung der Zellschichten bestimmten, im Einklang mit dem Studiensponsor, die zu testenden Konzentrationen (siehe Abschnitt 2.2).

3.2. Wirkung auf die Keratinozytenmigration

Tabelle 3; Figur 1

Unter den Kontrollbedingungen war die Migration der normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (NHEK) moderat bei einer durchschnittlichen Heilung des Wundbereichs von 61% nach 14-stündiger Inkubation. In den darauffolgenden Stunden erhöhte sich die NHEK-Migration auf eine durchschnittliche Heilungsrate von 74% nach 18-stündiger Inkubation und erreichte schließlich 85% nach 24-stündiger Inkubation.

Das bei 10 ng/ml getestete EGF erhöhte die Keratinozytenmigration mit der Zeit klar und deutlich. In der Tat wurde nach 14 bzw. 18 Stunden der Inkubation eine durchschnittliche Heilung des Wundbereichs in Höhe von 85% bzw. 96% festgestellt, während eine vollständige Heilung (100%) nach 24 Stunden der Inkubation erzielt wurde. Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen und bestätigten die Tests.

Unter den experimentellen Bedingungen dieses Tests zeigten die Verbindungen **Biotensid Stamm 2 (ÖI D)**, getestet bei 4 und 8 µg/ml, und **Biotensid Stamm 3 (ÖI C)**, getestet bei 2 und 4 µg/ml, keine klare, deutliche Wirkung auf die NHEK-Migration.

3.3. Wirkung auf die Genexpression

Tabellen 4 bis 6

Die Ergebnisse liegen auch in der .XLS-Datei „MV180202_Results“ vor.

Die Informationen zum Gen und zum entsprechenden Protein sind über den Link zur internationalen NCBI-Datenbank auf den einzelnen Blättern einsehbar.

Die Behandlung der normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (NHEK) mit der Referenz-Verbindung CaCl₂ (1,5 mM) über 48 Stunden führte zu einem Anstieg der Expression der an der Keratinozyten-Differenzierung beteiligten Marker (KRT10 und TGM1) und zu einer Hochregulierung des angeborenen Immunitätsmarkers (DEFB4A). Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen und bestätigten die Tests.

Insgesamt modulierten die Verbindungen **Biotensid Stamm 2 (ÖI D)** und **Biotensid Stamm 3 (ÖI C)**, getestet bei 2 und 4 µg/ml, das Genprofil nicht signifikant. Tatsächlich zeigte sich mit der Verbindung **Biotensid Stamm 2** in beiden getesteten Konzentrationen nur eine schwache, vergleichbare

BIOALTERNATIVES

MV180202

BÖRLIND

Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C)
auf normale menschliche Keratinozyten der Epidermis

stimulierende Wirkung auf die IL8-Genexpression zusammen mit einer sehr leichten hemmenden Wirkung der CALML5-Genexpression, wenn die Verbindung in der niedrigsten Konzentration getestet wurde. Zudem tendierte die Verbindung **Biotensid Stamm 3** dazu, die Genexpression des antimikrobiischen Peptids DEFB4A nur sehr leicht zu hemmen.

4. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabelle 1: Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C) auf die Lebensfähigkeit der Keratinozyten (K593) nach 24 Stunden der Inkubation

	Kontrolle		Biotensid Stamm 2 (ÖI D)							Einheit: %/ml	
			Stammlösung präpariert zu 100 mg/ml in Ethanol								
			0,25	0,5	1	2	4	8	40	100	
Lebensfähigkeit (%)	95	106	92	95	102	90	89	98	57	5	
	97	99	97	90	94	93	96	91	57	3	
	97	106	103	97	98	100	100	93	60	4	
Mittlerer	100		97	94	98	94	95	94	58	4	
sem	2		3	2	2	3	3	2	1	1	
Morphologische Anmerkungen	+		+	+	+	+	+	+	~ ⁺	-	

	Kontrolle		Biotensid Stamm 3 (ÖI C)							Einheit: %/ml	
			Stammlösung präpariert zu 10 mg/ml in ultrareinem Wasser								
			0,25	0,5	1	2	4	8	40	100	
Lebensfähigkeit (%)	95	104	97	94	95	94	94	95	50	3	
	96	100	93	88	97	99	100	96	52	2	
	93	111	95	99	101	98	97	95	53	3	
Mittlerer	100		95	93	98	97	97	96	52	3	
sem	3		1	4	2	1	2	0	1	0	
Morphologische Anmerkungen	+		+	+	+	+	+	+	~ ⁺	~ ⁺	

Verschlüsselung

+ : normale Population; +/-: Wachstumsreduzierende/poizität 0 : Zellmortalität

⊗: Verbindungskörner; ⊕P: Undurchsichtigkeit der Verbindung; ph: morphologische Veränderung; ⊕: agglutinierte Zellen

BIOALTERNATIVES

MV180202

BÖRLIND

Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C)
auf normale menschliche Keratinozyten der Epidermis

Tabelle 2: Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C) auf die Lebensfähigkeit der Keratinozyten (K341) nach 48 Stunden der Inkubation

	Kontrolle		Biotensid Stamm 2 (ÖI D)							Einheitsgehalt	
			Stammlösung präpariert zu 100 mg/ml in Ethanol							40	100
			0,25	0,5	1	2	4	8			
Lebensfähigkeit (%)	73 104 106	86 121 111	74 103 100	78 104 101	73 98 103	89 90 92	65 87 91	47 60 64	0 1 0	0 0 0	
Mittlerer	100		95	94	92	84	81	57	0	0	
sem	7		11	8	9	7	8	5	0	0	
Morphologische Anmerkungen	+		+	+	+	+	+	~*	0	0	

	Kontrolle		Biotensid Stamm 3 (ÖI C)							Einheitsgehalt	
			Stammlösung präpariert zu 10 mg/ml in ultrareinem Wasser							40	100
			0,25	0,5	1	2	4	8			
Lebensfähigkeit (%)	92 104 102	98 97 106	93 93 90	95 90 91	91 103 92	93 91 95	88 88 85	65 73 68	0 0 0	0 0 0	
Mittlerer	100		92	92	95	93	87	69	0	0	
sem	2		1	2	4	1	1	2	0	0	
Morphologische Anmerkungen	+		+	+	+	+	+	~*	0	0	

Verschösselung

+ : normale Population; +/-: Wachstumsreduzierung; 0 : Zellmortalität

g: Verbindungskörner; op: Undurchsichtigkeit der Verbindung; morphologische Veränderung; ag: agglutinierte Zellen

BIOALTERNATIVES

MV180202

BÖRLIND

Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C) auf normale menschliche Keratinozyten der Epidermis

Tabelle 3: Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C) auf die Keratinozyten-Migration (K593) nach 0, 14, 18 und 24 Stunden der Inkubation

Behandlung	Konzentration	TD	14 Stunden								18 Stunden						24 Stunden									
			MW	Ursprüngliche Bereich	MW	Wund heilung	MW	sem	% Kontrolle	sem	p ¹⁾	MW	Wund heilung	MW	sem	% Kontrolle	sem	p ¹⁾	MW	Wund heilung	MW	sem	% Kontrolle	sem	p ¹⁾	
																										over5
Kontrolle	-	7.1	0,13	1,20	62						0,75	70							0,41	67						
	7.1	0,22	1,33	59	01	1	100	2	-	0,66	70	74	2	100	3	-			0,55	63	65	1	100	1	-	
	7.1	0,37	1,25	63						0,61	76								0,46	66						
BGP	10 ng/ml	8.1	0,26	0,46	65					0,12	96								0,00	100						
	8.2	0,36	0,56	64	05	1	104	1	**	0,16	95	96	1	100	1	**			0,00	100	100	0	107	0	**	
	8.3	0,27	0,46	66						0,07	96								0,00	100						
Biotensid Stamm 2 (ÖI D)	4 µg/ml	10.1	0,08	1,06	66					0,70	77								0,44	66						
		10.2	0,13	1,13	64	64	1	106	2	ns	0,63	73	75	1	100	1	ns			0,56	62	65	1	94	2	ns
		10.3	0,05	1,15	62						0,74	76							0,42	66						
	6 µg/ml	11.1	0,34	1,32	60						0,60	72							0,57	63						
		11.2	0,07	1,30	57	57	2	94	3	ns	0,96	69	69	2	92	3	ns			0,55	62	60	2	94	2	ns
		11.3	0,13	1,47	55						1,08	65							0,74	76						
Biotensid Stamm 3 (ÖI C)	2 µg/ml	12.1	0,21	1,20	64					0,73	76								0,42	67						
		12.2	0,29	1,20	64	63	1	100	2	ns	0,74	76	77	1	104	1	ns			0,39	66	67	1	102	1	ns
		12.3	0,20	1,26	61						0,78	76							0,47	65						
4 µg/ml	13.1	0,14	1,20	62						0,65	73							0,46	65							
	13.2	0,23	1,51	53	57	3	90	4	ns	1,09	66	70	2	94	3	ns			0,65	60	63	2	97	2	ns	
	13.3	0,32	1,47	56						0,99	70							0,53	64							

¹⁾ Schwelle der statistischen Signifikanz
 ns > 0,05, Nicht signifikant
 * 0,01 bis 0,05, signifikant
 ** 0,001 bis 0,01, sehr signifikant
 *** < 0,001, Ausnahmesignifikant

Ausgewählte Werte für den Studienbericht

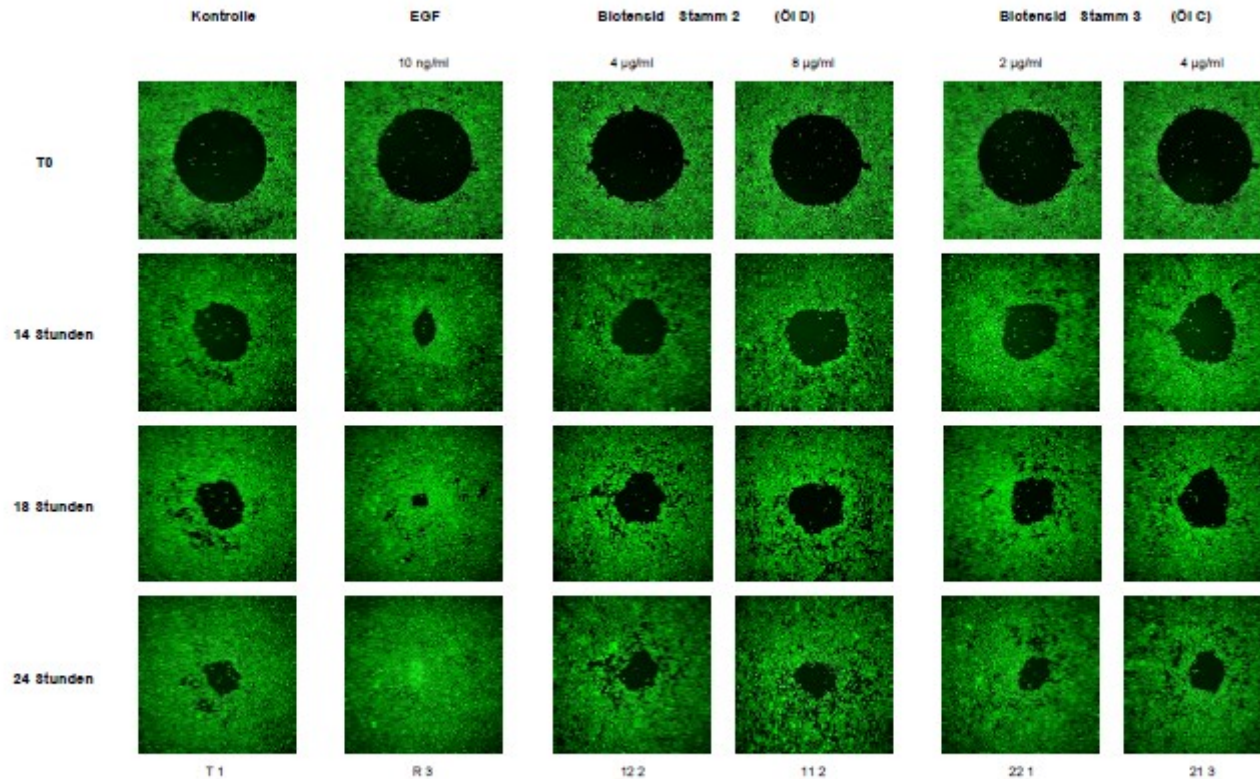


Abbildung 1: Repräsentative Bilder der Wirkung der Verbindungen Biotensid Stamm 2 (Öl D) und Biotensid Stamm 3 (Öl C) auf die Keratinozyten-Migration (K593) nach 0, 14, 18 und 24 Stunden der Inkubation

Tabelle 4: Wirkung des Referenz-Kalziumchlorids auf das Genexpressionsprofil in normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (K341)

mQPA-NHEK-16	Gene	Kontrolle	CaCl ₂	
		-	1,5 mM	
		Zyklen	Zyklen	% Kontrolle Mittlere HK
	Abkürzung			
Haushalt	RP528	18,58 18,57	18,64 18,59	104
	GAPDH	16,64 16,67	16,75 16,77	99
Dermo-epidermale Junction	COL4A1	23,65 23,64	24,18 24,07	76
	COL7A1	21,12 21,05	21,65 21,77	69
	LAMC2	20,73 20,81	20,98 21,05	90
Keratinozyten-Differenzierung	CALML5	24,28 24,26	24,61 24,61	84
	FLG	26,28 26,03	26,03 25,70	131
	KRT10	21,15 21,05	17,94 18,02	926
	LOR	27,33 27,54	27,45 27,47	104
	TGM1	24,62 24,57	22,84 22,85	358
Zytokine / Chemokine	IL8	29,21 29,46	29,28 29,68	97
Apoptose	CASP14	25,92 26,09	26,61 26,44	74
Antimikrobielle Peptide, angeborene Immunität	DEFB4A	30,85 30,70	28,93 28,82	397
	S100A7	24,74 24,67	23,85 23,92	188
Zell-Zell-Interaktionen	CDSN	26,56 26,33	26,64 26,72	90
Extrazelluläre Matrix	MMP3	26,61	27,31	60
		26,51	27,46	



 Hochregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Stimulierung): %200
 Runterregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Hemmung): %50
 Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu Interpretieren,
 hohe Anzahl an Zyklen entspricht einer niedrigen relativen
 Expression, nahe an der Nachweisgrenze > 31
 Nicht nachgewiesen oder atypische Schmelzkurve:

Tabelle 5: Wirkung der Verbindung Biotensid Stamm 2 (Öl D) auf das Genexpressionsprofil in normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (K341)

mQPA-NHEK-16	Gene	Kontrolle	Biotensid Stamm 2 (Öl D)			
		-	2 µg/ml		4 µg/ml	
		Zyklen	Zyklen	% Kontrolle Mittlere HK	Zyklen	% Kontrolle Mittlere HK
	Abkürzung					
Haushalt	RP528	18,58 18,57	18,67 18,70	90	18,77 18,61	94
	GAPDH	16,64 16,67	16,72 16,44	103	16,72 16,61	101
Dermo-epidermale Junction	COL4A1	23,65 23,64	23,98 23,84	81	24,29 24,16	68
	COL7A1	21,12 21,05	21,15 21,23	90	21,85 21,70	63
	LAMC2	20,73 20,81	20,55 20,72	107	21,48 21,43	63
Keratinozyten-Differenzierung	CALML5	24,28 24,26	25,45 25,15	48	24,61 24,64	80
	FLG	26,28 26,03	26,32 26,35	85	26,11 25,84	116
	KRT10	21,15 21,05	21,58 21,66	68	21,08 21,34	95
	LOR	27,33 27,54	27,01 27,14	124	27,11 27,04	131
	TGM1	24,62 24,57	25,01 24,88	76	24,74 24,79	91
Zytokine / Chemokine	IL8	29,21 29,46	27,75 27,86	279	27,81 27,99	276
Apoptose	CASP14	25,92 26,09	26,31 26,24	80	26,57 26,94	61
Antimikrobielle Peptide, angeborene Immunität	DEFB4A	30,85 30,70	31,44 31,45	61	31,41 31,84	57
	S100A7	24,74 24,67	24,85 24,91	86	25,11 25,19	75
Zell-Zell-Interaktionen	CDSN	26,56 26,33	26,83 27,14	67	26,56 26,68	90
Extrazelluläre Matrix	MMP3	26,61 26,51	26,59 26,66	93	26,81 26,70	89







 Hochregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Stimulierung): %380
 Runterregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Hemmung): %99
 Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren,
 hohe Anzahl an Zyklen entspricht einer niedrigen relativen
 Expression, nahe an der Nachweisgrenze > 31
 Nicht nachgewiesen oder atypische Schmelzkurve:

Tabelle 6: Wirkung der Verbindung Biotensid Stamm 3 (Ö C) auf das Genexpressionsprofil in normalen menschlichen Keratinozyten der Epidermis (K341)

mQPA-NHEK-16	Gene	Kontrolle	Biotensid Stamm 3 (Ö C)			
		-	2 µg/ml		4 µg/ml	
	Abkürzung	Zyklen	Zyklen	% Kontrolle Mittlere HK	Zyklen	% Kontrolle Mittlere HK
Haushalt	RPS28	18,58 18,57	18,66 18,58	90	18,86 18,84	80
	GAPDH	16,64 16,67	16,47 16,57	103	16,52 16,54	105
Dermo-epidermale Junction	COL4A1	23,65 23,64	23,94 23,88	78	23,82 23,69	90
	COL7A1	21,12 21,05	21,24 21,24	84	20,76 20,92	115
	LAMC2	20,73 20,81	20,97 20,69	90	20,20 20,65	124
Keratinozyten-Differenzierung	CALML5	24,28 24,26	24,69 24,61	72	24,49 24,61	80
	FLG	26,28 26,03	25,70 25,71	127	25,92 25,73	121
	KRT10	21,15 21,05	20,94 21,17	97	21,06 21,08	99
	LOR	27,33 27,54	27,01 26,56	148	27,03 27,16	122
	TGM1	24,62 24,57	24,70 24,65	88	24,62 24,71	92
	Zytokine / Chemokine	IL8	29,21 29,46	29,30 28,80	115	28,56 28,51
Apoptose	CASP14	25,92 26,09	25,70 25,60	119	25,45 25,47	141
Antimikrobielle Peptide, angeborene Immunität	DEFB4A	30,85 30,70	31,93 31,50	49	31,85 31,64	49
	S100A7	24,74 24,67	24,72 24,73	92	25,06 25,19	72
Zell-Zell-Interaktionen	CDSN	26,56 26,33	26,09 26,16	116	26,18 26,29	111
Extrazelluläre Matrix	MMP3	26,61 26,51	26,29 26,58	102	26,74 26,41	96

 Hochregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Stimulierung): %280
 Runterregulierte Gene
 (willkürliche Auswahl zur Hemmung): %99
 Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren,
 hohe Anzahl an Zyklen entspricht einer niedrigen relativen
 Expression, nahe an der Nachweisgrenze > 31
 Nicht nachgewiesen oder atypische Schmelzkurve:

5. ANHANG

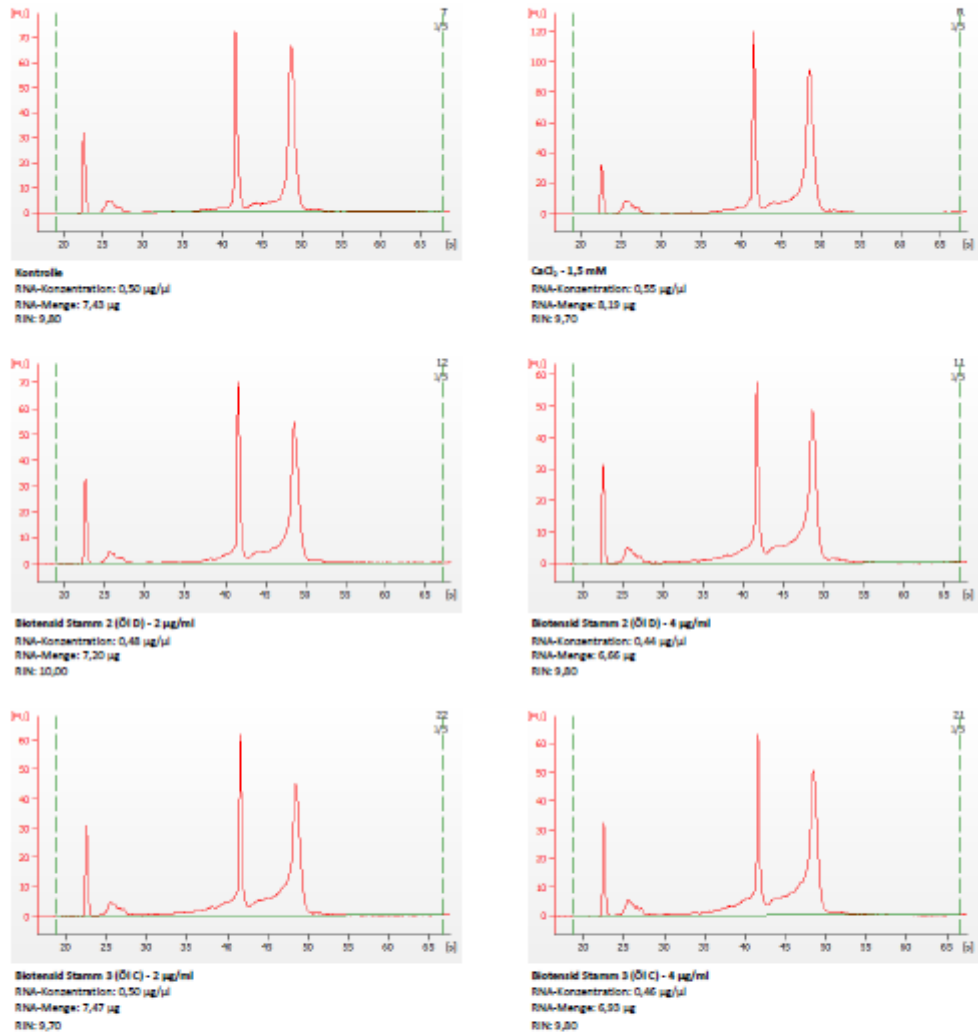


Abbildung 2: Qualitäts- und Mengenkontrollen von RNA, die aus NHEK extrahiert wurde, die mit den Verbindungen Biotensid Stamm 2 (ÖI D) und Biotensid Stamm 3 (ÖI C) behandelt wurden oder nicht behandelt wurden (Kontrolle)

10.3 Sonett - Ergänzungen zur Untersuchung der aeroben biologischen Abbaubarkeit einer ausgewählten MEL-Variante Charge 78-41 (Originalbericht der LAUS GmbH)

Final Report
LAUS GmbH

Study No.: 17082903G605
Test Item: Mannosylerythritolipid MEL

Final Report

Original 2 of 2

Determination of the aerobic ready biodegradability of
Mannosylerythritolipid MEL
in the CO₂ Evolution Test
following OECD 301B resp. EU C.4-C



Study No.: 17082903G605

Sponsor:

Sonett GmbH
Ziegeleiweg 5
D-88693 Deggenhausen
Germany

Monitor:

Beate Oberdorfer

Test Facility:

LAUS GmbH
Auf der Schafweide 20
D-67489 Kirrweiler
Germany

Study Director:

Manfred Muckle

1 GLP-COMPLIANCE STATEMENT

It is hereby declared that all tests were made in accordance with the „Revised OECD Principles of Good Laboratory Practice“ (Paris, 1997) as stated in the following guidelines:

- OECD Principles of Good Laboratory Practice, adopted by Council on 26th November 1997; Environment Directorate, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris 1998
- Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances (codified version)
- Chemicals Act of the Federal Republic of Germany (ChemG) §19a and §19b and annexes 1 and 2 from 28. Aug. 2013, published in Federal Law Gazette, Germany (BGBl) No. 55/2013 as of 06. Sep. 2013, and further revisions.

Responsibility for the accuracy of the information concerning the test item as well as for its authenticity rests with the sponsor.

I herewith accept responsibility for the data presented within this report.

There were no circumstances that may have affected the quality or integrity of the study.



Manfred Muckle
Study Director

05 FEB 2018

Date

Information on Study Organisation:

Deputy Study Director	Elke Klein
Study Plan dated	26. Oct. 2017
Experimental Starting Date	16. Nov. 2017
Experimental Completion Date	20. Dec. 2017

Final Report
LAUS GmbH

Study No.: 17082903G605
Test Item: Mannosylerythritolipid MEL

2 QUALITY ASSURANCE UNIT STATEMENT

This study has been inspected by the quality assurance unit according to the principles of Good Laboratory Practice. Study Plan and Final Report were checked at the dates given below, the Study Director and the management were informed with the corresponding report.

Also, the performance of the study was inspected, and findings were reported to Study Director and management. The inspection of short-term studies (duration less than four weeks) is carried out as audit of process concerning major technical phases of at least one similar test. Frequency is once or more a quarter.

The study was conducted and the reports were written in accordance with the Study Plan and the Standard Operating Procedures of the test facility.

Deviations from the Study Plan were acknowledged and assessed by the Study Director and included in the Final Report.

The reported results reflect the raw data of the study.

Verified Procedure	Inspected on	Findings reported on	Audit report no.
Study plan	13. Oct. 2017	13. Oct. 2017	171013-10
Performance of study	17. Nov. 2017	17. Nov. 2017	171117-11
Draft report	31. Jan. 2018	31. Jan. 2018	180131-08
Final report	05. Feb. 2018	05. Feb. 2018	180205-01



Revina-Rosa Resch
Quality Assurance

05 FEB 2018

Date

Table of Contents

1 GLP-COMPLIANCE STATEMENT	2
2 QUALITY ASSURANCE UNIT STATEMENT	3
3 SUMMARY	6
4 PURPOSE AND PRINCIPLE OF THE STUDY	7
5 LITERATURE	7
6 MATERIALS AND METHODS	8
6.1 Test Item	8
6.1.1 Specification	8
6.1.2 Storage	8
6.1.3 Pre-Treatment	8
6.2 Positive Control	8
6.3 Test System	9
6.3.1 Specification	9
6.3.2 Source and Pre-Treatment of inoculum	9
6.4 Instruments and Devices	9
6.5 Test Vessels	9
6.6 Chemicals	9
6.6.1 Stock Solutions	9
6.6.2 Test Medium	10
6.6.3 Sodium Hydroxide	10
6.6.4 Mercury Chloride	10
6.6.5 Barium Hydroxide	10
6.6.6 Hydrochloric Acid	10
6.6.7 Reference Items for Carbon Determination	10
7 PERFORMANCE OF THE STUDY	11
7.1 Preparations	11
7.2 Experimental Parameters	11
7.3 Apparatus	12
7.4 Sampling	12
7.5 CO ₂ Determination	12
8 FINDINGS	13
8.1 Tables	13
8.1.1 IC-Values	13
8.1.2 Net IC	14
8.1.3 pH	14
8.2 Equations	15
8.2.1 Emitted Carbon in mg/L	15
8.2.2 Degradation in %	15
8.3 Calculation Results	16

8.3.1	Emitted Carbon in mg/L	16
8.3.2	Degradation Values	16
8.3.3	Degradation Graph	17
9	RESULTS AND VALIDITY	17
9.1	Results for the Test Item Mannosylerythritolipid MEL	17
9.2	Validity	17
10	DISCUSSION	18
11	DEVIATIONS	18
11.1	Deviations from the Study Plan	18
11.2	Deviations from the Guideline	18
12	RECORDING AND ARCHIVING	18
13	ANNEX 1: COPY OF GLP-CERTIFICATE	19
14	ANNEX 2: GLOSSARY	20
15	ANNEX 3: CALIBRATION REPORTS CARBON ANALYSER	20

3 SUMMARY

Title of Study: Determination of the aerobic ready biodegradability of Mannosylerythritolipid MEL in the CO₂ Evolution Test following OECD 301B resp. EU C.4-C

Findings and Results:

The test item Mannosylerythritolipid MEL was tested using a concentration of nominally 20 mg organic carbon/L (corresponding to 32.0 mg Mannosylerythritolipid MEL/L) in test medium following OECD 301B and EU-Method C.4-C.

Aniline was chosen as positive control.

Activated sludge was used as inoculum (concentration in the test 25.0 mg dry matter/L). The test was left running for 28 days.

All validity criteria were met. Degradation of the positive control was 61 % after 9 days.

The following data were determined for the test item Mannosylerythritolipid MEL:

10-day-window:	day 2 – 12
degradation at the end of 10-day-window	64%
degradation at the end of the test	79 %
pass level following guideline:	60 % at the end of 10-day-window for pure substances respective 60 % at the end of the test for mixtures

Therefore, when applying the 10-day-window, Mannosylerythritolipid MEL is **readily biodegradable** following OECD 301B and EU C.4-C respectively.

Because the test item is a mixture the 10-day-window has not to be taken into account. Therefore, regardless of the 10-day window, the test item Mannosylerythritolipid MEL is considered as **readily biodegradable**.

4 PURPOSE AND PRINCIPLE OF THE STUDY

This study was performed in order to evaluate aerobic elimination and degradation potential of Mannosylerythritollipid MEL in a test for ready biodegradability, using a test item concentration of nominally 20 mg organic carbon/L (corresponding to 32.0 mg Mannosylerythritollipid MEL/L).

The test item in a mineral medium was inoculated and incubated under aerobic conditions in the dark. The amount of DOC in the test solution due to the inoculum was kept as low as possible compared with the amount of organic carbon due to the test item. Allowance was made for the endogenous activity of the inoculum by running parallel blanks with inoculum but without test item. A positive control was run in parallel to check the operation of the procedures. Degradation was followed by determining the carbon dioxide produced. Measurements were taken at sufficiently frequent intervals to allow the identification of the beginning and end of biodegradation.

The test lasted for 28 days.

5 LITERATURE

The study was conducted in accordance with the following guidelines:

- ◆ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Part 301 B, adopted 17. Jul. 1992 "CO₂-Evolution-Test (Modified STURM Test)"
- ◆ Council Regulation (EC) No. 440/2008, Method C.4-C, adopted 30. May 2008 "CO₂-Evolution-Test"

Corresponding SOP of LAUS GmbH:

- ◆ SOP 118 006 05 edition 10, valid from 25. Apr. 2016 „Abbaubarkeitstest nach OECD 301B / EU C.4-C“

6 MATERIALS AND METHODS

6.1 Test Item

Designation in Test Facility: 17082903G
Date of Receipt: 29. Aug. 2017
Condition at Receipt: Room temperature, in proper conditions

6.1.1 Specification

The following information concerning identity and composition of the test item was provided by the sponsor.

Name	Mannosylerythritollipid MEL
Batch no.	Charge 78-41 (MEL-B+Mel-C)
Appearance	amber-coloured, honey-like viscous fluid
Composition	>90% MEL-B + MEL-C
Molecular formula	mixture
Molecular weight	not applicable mixture
Purity	>90% MEL (TLC)
Homogeneity	homogeneous
Vapour pressure	unknown
Stability	H ₂ O: not stated; EtOH: not stated; acetone: not stated; CH ₃ CN: not stated; DMSO: not stated
Solubility	H ₂ O: >1 g/L; EtOH: >1 g/L; acetone: >1 g/L; CH ₃ CN: unknown; DMSO: unknown
Production date	Aug. 2016
Expiry date	Aug. 2018
Storage	Fridge (2-8°C)

6.1.2 Storage

The test item was stored in a tightly closed vessel in the fridge at 2 – 8 °C.

6.1.3 Pre-Treatment

A stock solution containing 1074.8 mg/L was prepared. Its DOC was determined in order to estimate the amount to be added to the test flasks.

The DOC was 671.6 mg/L, giving an organic carbon content of 62.49 %.

6.2 Positive Control

Aniline (Phenylamine, C₆H₅NH₂, CAS-No. 62-53-3) was used as readily biodegradable positive control. A stock solution containing 2100.6 mg/L in deionised water was prepared and its organic carbon content was measured with 1567.4 mg/L, corresponding to an organic carbon content of the positive control of 74.6 %.

6.3 Test System

6.3.1 Specification

Activated sludge from a biologic sewage treatment plant was used as inoculum. The chosen plant is treating mostly domestic sewage.

6.3.2 Source and Pre-Treatment of inoculum

6.3.2.1 Source

The sludge was taken from the activation basin of the ESN (Stadtentsorgung Neustadt) sewage treatment plant, Im Altenschemel, NW-Lachen-Speyerdorf.

Date of collection: 17. Nov. 2017, batch no: 20171117.

6.3.2.2 Pre-Treatment

The sludge was filtrated, washed with tap water (2x), then washed with and re-suspended in test medium. It was then aerated until use. The dry matter was determined as 4120 mg suspended solids/L.

6.4 Instruments and Devices

The following instruments and devices were used in the performance of the study:

- ◆ Data logger for temperature, ebro
- ◆ Analytical scales Mettler Toledo XS 205 DU
- ◆ Precision scales Mettler Toledo XS 6001S
- ◆ Adjustable pipettes with one-way tips Rainin®
- ◆ Carbon analyser TOC multi N/C 2100S, Analytik Jena
- ◆ Magnetic stirrers
- ◆ pH-meter 3310 wtw
- ◆ Heating chamber Heratherm OGS 60
- ◆ Ultrasonic bath SONOREX RK 510H Bandelin
- ◆ Fridge

Usage and, if applicable, calibration of all instruments followed the corresponding SOP in the current edition. Standard laboratory material was also used.

6.5 Test Vessels

2000 mL-SCHOTT-flasks were used as test vessels, 100 mL scrubber flasks as absorbent vessels.

6.6 Chemicals

All chemicals used in the test were "analytical grade" or otherwise proved suitable.

Note: The weights depend on the final volume which was needed in the test. Actual values are stated in the raw data.

6.6.1 Stock Solutions

6.6.1.1 Solution a

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	8.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	21.75 g
Disodiumhydrogen phosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33.4 g

Final Report

LAUS GmbH

Study No.: 17082903G605

Test Item: Mannosylerythritolipid MEL

Ammonium chloride (NH₄Cl) 0.5 g
 H₂O demin. ad 1000 mL

The pH was 7.4.

6.6.1.2 Solution b

Calcium chloride (CaCl₂) 27.5 g
 H₂O demin. ad 1000 mL

6.6.1.3 Solution c

Magnesium sulphate heptahydrate (MgSO₄*7H₂O) 22.5 g
 H₂O demin. ad 1000 mL

6.6.1.4 Solution d

Iron(III) chloride hexahydrate (FeCl₃*6H₂O) 0.25 g
 Di-sodium-ethylene diaminetetraacetate dihydrate (Na₂EDTA*2H₂O) 0.4 g
 H₂O demin. ad 1000 mL

6.6.2 Test Medium

The medium was freshly prepared (volumes were adapted to final volume needed in the test).

Composition:

Solution a 10 mL
 Solution b 1 mL
 Solution c 1 mL
 Solution d 1 mL
 H₂O demin. ad 1000 mL

6.6.3 Sodium Hydroxide

NaOH, 0.25 M solution, used for trapping of emitted carbon dioxide.

NaOH, 1.5 M solution, used for scrubbing of purified air.

6.6.4 Mercury Chloride

HgCl₂, used for poisoning of abiotic flasks.

6.6.5 Barium Hydroxide

Ba(OH)₂ solution, used for checking the purified air (saturated solution, 1:3 diluted).

6.6.6 Hydrochloric Acid

HCl, 2 M solution, used for driving off dissolved CO₂ on day 28.

6.6.7 Reference Items for Carbon Determination

C₈H₅KO₄ for TC (Batch no. MKBS1485V, p.A., content 99.99 %), Na₂CO₃ (Batch no. BCBP0581V, p.A., content 100.05 %) and NaHCO₃ (Batch no. 217256106, p.A., content ≥ 99.5 %) for IC.

7 PERFORMANCE OF THE STUDY

7.1 Preparations

The medium was prepared from the stock solutions. The stock solution of the positive control was prepared and its DOC was measured. The stock solution of the test item was prepared and its DOC was measured. The inoculum was taken from its source, washed, aerated and the dry matter was determined.

The test vessels were filled with medium and inoculum. Then, all flasks were aerated for 72 hours with purified, CO₂-free, moistened air to purge the system of CO₂.

7.2 Experimental Parameters

Flask volume	1500 mL
Apparatus blanks	2, containing mineral medium only
Blank Controls	2, containing mineral medium and inoculum
Positive control flasks	2, containing positive control, mineral medium and inoculum
Test flasks	2, containing test item, mineral medium and inoculum
Abiotic control	1, containing test item, mineral medium and HgCl ₂
Toxicity control	1, containing test item, positive control, mineral medium and inoculum
Inoculum concentration:	25.0 mg/L
Temperature	19.7 – 21.3 °C
Duration	28 days

The test was performed with a nominal start concentration of 20 mg organic carbon/L.

The following amounts of test item and positive control were added to the flasks:

Table 7.2-a Amounts of test item and positive control in the flasks

Flask	Positive Control 1	Positive Control 2	Test 1	Test 2	Abiotic Control	Toxicity Control
Amount Test item in mg / L	--	--	32.2	32.2	32.2	32.2
Amount Aniline in mg / L	26.7	26.7	--	--	--	26.7
organic C (calculated) in mg / L	20.0	20.0	20.1	20.1	20.1	40.1

Note: All calculations are performed with unrounded values. Therefore, re-calculation with rounded values may lead to slightly different results.

7.3 Apparatus

The test vessels were aerated with purified (by activated charcoal), CO₂-scrubbed, moistened air. The scrubbing of carbon dioxide was achieved by bubbling the purified air through a flask containing 1.5 M NaOH. To control the absence of CO₂, the air was then led through a flask containing a solution of Ba(OH)₂ before reaching the test vessels.

Magnetic stirrers were used to prevent deposition of inoculum.

The emitted CO₂ was trapped in 0.25 M NaOH. Two scrubbers containing 100 mL each were connected in series to the test vessels. The initial IC value of the 0.25 M NaOH was separately determined in each flask.

7.4 Sampling

From each front scrubber flask, 10 samples were taken in order to determine the emitted CO₂ (on day 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 23 and 29). The sample volume was 1 mL. The resulting change in the volume of the front flask was considered in the calculation of emitted CO₂ (see also chapter 8.3.1).

On day 28, 5 mL HCl 2 M was added to each test flask in order to drive off dissolved CO₂. On day 29, samples from both scrubber flasks were taken.

7.5 CO₂ Determination

Analyses of the emitted CO₂ were made by IC measurement using the carbon analyser TOC multi N/C 2100S, Analytik Jena. Each sample was measured in duplicate or triplicate, respectively (depending on the variation between the measured values). The carbon analyser was calibrated with freshly prepared reference solutions containing potassium hydrogen phthalate (TC), sodium hydrogen carbonate and sodium carbonate (IC) every month. After every start, quality control samples were measured.

8 FINDINGS

8.1 Tables

8.1.1 IC-Values

In the following tables, the IC values (given in mg/L) which were measured in the samples of the front scrubber flasks are stated.

Table 8.1-a IC values in mg/L of apparatus blanks, blank controls, front scrubber

Day	Apparatus blank 1	Apparatus blank 2	Blank Control 1	Blank Control 2
0	2.70	3.17	2.01	3.10
2	4.84	5.21	7.98	13.51
4	6.68	6.73	12.23	21.23
7	10.00	9.75	20.03	33.35
9	9.53	0.81	22.65	36.19
11	11.08	13.16	30.11	47.22
14	13.67	15.91	33.45	56.42
18	15.41	16.46	41.23	66.14
23	16.77	18.59	50.22	74.58
29	25.56	27.02	56.18	84.04

Table 8.1-b IC values in mg/L of positive control, test flasks, front scrubber

Day	Positive Control 1	Positive Control 2	Test 1	Test 2	Abiotic Control	Toxicity Control
0	2.37	2.65	2.69	2.72	2.57	3.02
2	8.91	3.82	41.32	36.81	4.89	38.50
4	102.36	6.60	91.57	84.24	7.34	179.12
7	237.20	80.87	150.37	169.88	10.17	390.64
9	268.23	170.83	199.22	209.91	10.97	459.51
11	313.06	242.28	233.12	244.30	11.75	525.27
14	325.47	287.94	250.03	270.47	14.04	567.83
18	347.51	313.36	267.96	288.63	14.89	588.65
23	350.70	341.83	288.20	310.97	17.40	*605.66
29	368.28	382.17	321.82	343.40	19.93	*631.50

* Samples twofold diluted before measurement

In the following tables, the IC values which were measured in the samples of the back scrubber flasks are stated.

Table 8.1-c IC values in mg/L of blank controls, apparatus blanks, back scrubber

Day	Apparatus blank 1	Apparatus blank 2	Blank Control 1	Blank Control 2
0	2.81	2.99	2.50	2.99
29	9.47	4.82	3.75	4.30

Table 8.1-d IC values in mg/L of positive control, test flasks, back scrubber

Day	Positive Control 1	Positive Control 2	Test 1	Test 2	Abiotic Control	Toxicity Control
0	2.79	2.65	2.77	2.87	2.86	2.88
29	4.11	4.16	3.80	3.94	3.74	3.71

8.1.2 Net IC

For each flask, the net IC was calculated by subtracting the mean IC value of the apparatus blanks of the corresponding sampling date from the remaining IC values. Exception: Values of day 0 do not need to be corrected. The value of day 0 of the apparatus blank was subtracted from the apparatus blanks of the corresponding sampling dates.

The net IC values are presented in the following table.

Table 8.1-e Net IC-values in mg/L of front scrubber flasks

Day	Blank Control 1	Blank Control 2	Positive Control 1	Positive Control 2	Test 1	Test 2	Abiotic Control	Toxicity Control
0	2.0	3.1	2.4	2.7	2.7	2.7	2.6	3.0
2	5.9	11.4	6.8	1.7	39.2	34.7	2.8	36.4
4	8.5	17.5	98.6	2.8	87.8	80.5	3.6	175.4
7	13.1	26.4	230.3	73.9	143.4	162.9	3.2	383.7
9	20.4	34.0	266.0	168.6	197.0	207.7	8.7	457.3
11	20.9	38.0	303.9	233.1	223.9	235.1	2.6	516.1
14	21.6	44.6	313.6	276.1	238.2	258.6	2.2	556.0
18	28.2	53.1	334.5	300.4	255.0	275.6	1.9	575.7
23	35.5	59.8	336.0	327.1	273.5	296.2	2.7	590.9
29	32.8	60.7	344.9	358.8	298.5	320.0	-3.4	608.1

Table 8.1-f Net IC-values in mg/L of back scrubber flasks

Day	Blank Control 1	Blank Control 2	Positive Control 1	Positive Control 2	Test 1	Test 2	Abiotic Control	Toxicity Control
0	2.5	3.0	2.8	2.7	2.8	2.9	2.9	2.9
29	-0.5	0.1	-0.1	-0.1	-0.4	-0.3	-0.5	-0.5

Negative values occur, when the apparatus blank value was higher than the respective treatment.

8.1.3 pH

In the following table, the pH at the end of the test (before addition of HCl) is given:

Table 8.1-g pH in Test flasks on day 28

Day	Blank Control 1	Blank Control 2	Positive Control 1	Positive Control 2	Test 1	Test 2	Abiotic Control	Toxicity Control
28	7.6	7.6	7.4	7.8	7.6	7.7	7.1	7.6

8.2 Equations

8.2.1 Emitted Carbon in mg/L

Emitted carbon in mg/L test solution in the respective vessel at time t was calculated using the following equation:

$$emittC = \frac{(IC(t) - IC(0)) * VolNaOH(t)}{VolTestVessel}$$

with

emittC	emitted carbon in mg/L test solution
IC(t)	net inorganic carbon in mg/L NaOH in the respective vessel at time t
IC(0)	net inorganic carbon in mg/L NaOH in the respective vessel at the start of the test
VolNaOH (t)	remaining volume NaOH in L in the scrubber at time t (Volume at t = 0 (here: 0.1 L) - \sum (all sample volumes up to time t))
VolTestVessel	test vessel volume in L (here: 1.5)

For day 29, the IC content of both scrubber flasks was taken into account.

Calculation of emitted carbon is necessary for the assessment of validity. The value obtained with this equation is multiplied with 3.667 (44/12) in order to obtain emitted CO₂.

8.2.2 Degradation in %

The percentage biodegradation in the test flasks was calculated from:

$$\% \text{ degradation} = \frac{\text{emitted C (Test) in mg/L} - \text{Mean emitted C (Controls) in mg/L}}{\text{added C in mg/L}} * 100\%$$

Degradation in positive control and toxicity flasks was calculated analogously.

Abiotic degradation was calculated from:

$$\% \text{ degradation} = \frac{\text{mg/L emitted C (abiotic)}}{\text{added C in mg/L}} * 100\%$$

8.3 Calculation Results

8.3.1 Emitted Carbon in mg/L

In the following table, the calculated emitted carbon (from net IC given in chapter 8.1.2 and equation stated in chapter 8.2.1) is presented.

Table 8.3-a Emitted carbon in mg/L

Day	Blank Control 1	Blank Control 2	Positive Control 1	Positive Control 2	Test 1	Test 2	Abiotic Control	Toxicity Control
2	0.26	0.55	0.29	-0.06	2.41	2.11	0.02	2.20
4	0.42	0.94	6.29	0.01	5.56	5.08	0.07	11.26
7	0.72	1.51	14.74	4.61	9.10	10.36	0.04	24.62
9	1.18	1.97	16.87	10.62	12.43	13.12	0.39	29.07
11	1.20	2.21	19.10	14.59	14.01	14.72	0.00	32.49
14	1.23	2.60	19.50	17.14	14.76	16.04	-0.02	34.65
18	1.63	3.10	20.59	18.46	15.64	16.92	-0.04	35.50
23	2.05	3.48	20.46	19.90	16.61	18.00	0.01	36.06
29	1.67	3.30	20.59	21.43	17.73	19.04	-0.59	36.49

8.3.2 Degradation Values

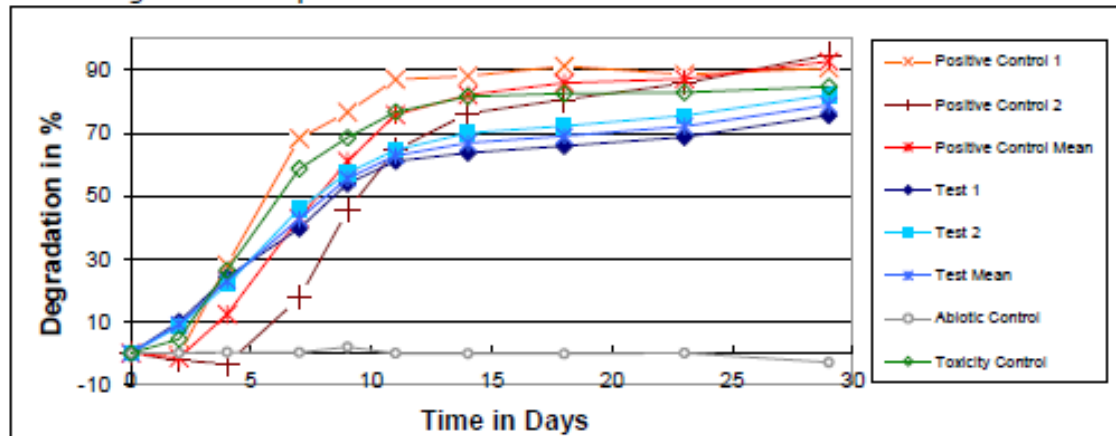
In the following table, the percentage biodegradation is presented:

Table 8.3-b Degradation values in %

Day	Positive Control 1	Positive Control 2	Positive Control Mean	Test 1	Test 2	Test Mean	Abiotic Control	Toxicity Control
2	-0.5	-2.3	-1.4	10.0	8.5	9.2	0.1	4.5
4	28.1	-3.3	12.4	24.2	21.8	23.0	0.3	26.4
7	68.3	17.5	42.9	39.7	45.9	42.8	0.2	58.6
9	76.6	45.3	61.0	53.9	57.3	55.6	2.0	68.6
11	87.1	64.6	75.9	61.1	64.6	62.8	0.0	76.8
14	88.1	76.3	82.2	63.7	70.1	66.9	-0.1	81.6
18	91.3	80.6	86.0	65.9	72.2	69.1	-0.2	82.6
23	88.7	85.8	87.2	68.7	75.6	72.2	0.0	83.0
29	90.7	94.9	92.8	75.7	82.2	78.9	-2.9	84.8

As the measured IC values in the abiotic control and in the positive control on day 4 are very low, measurement uncertainties lead to negative degradation values while in fact no degradation has taken place.

8.3.3 Degradation Graph



9 RESULTS AND VALIDITY

9.1 Results for the Test Item Mannosylerythritolipid MEL

- ◆ The test item Mannosylerythritolipid MEL is considered as "readily biodegradable".
- ◆ The degree of biodegradation reached 79 % after 28 days.
- ◆ The 10-day-window began on day 2, at its end, 64 % degradation were reached, surpassing the pass level of 60 % given in the OECD guideline.
- ◆ Because the test item is a mixture, the 10-day window has not to be taken into account. Therefore, regardless of the 10-day-window, the test item is considered as "readily biodegradable within 28 days".
- ◆ Abiotic degradation was not observed.

9.2 Validity

All validity parameters and values are presented in the following table:

Table 9.2-a Validity

Parameter	Criterion	Found	Assessment
IC content of test item solution in medium	≤ 5% of TC	0 %	valid
CO ₂ emitted by the controls	< 70 mg/L	9.1 mg/L	valid
Difference within replicates	≤ 20%	6.5 %	valid
Degradation of positive control > 60%	≤ 14 days	9 days	valid
Degradation in the toxicity flask on day 14	> 25%	81.6 %	non-toxic

10 DISCUSSION

All validity criteria were met.

Degradation behaviour of positive control and toxicity control was normal. Abiotic degradation was not observed. Both replicates of the test item showed good correspondence.

If degradation in the toxicity flask is below 25 % after 14 days, the test item can be considered as toxic towards the inoculum. As degradation in the toxicity flask was 81.6 % after 14 days, the test item can be stated as "not toxic towards the inoculum in a concentration of 32.2 mg/L".

For pure substances ready biodegradability is defined in the guidelines as degradation surpassing 60 % within 10 days after reaching a level of 10 %.

The 10-day-window began on day 2, at its end, 64 % degradation were reached, surpassing the pass level of 60 % given in the OECD guideline.

Because the test item is a mixture, the 10-day-window has not to be taken into account. Therefore, regardless of the 10-day-window, Mannosylerythritolipid MEL is considered as readily biodegradable.

No observations were made which might cause doubts concerning the validity of the study outcome.

The result of the test can be considered valid.

11 DEVIATIONS

11.1 Deviations from the Study Plan

The following deviation from the study plan was documented:

- ◆ Temperature range was 19.7 – 21.3 °C instead of 20.0 – 24.0 °C. As degradation of the positive control was in the normal range, this is considered as uncritical concerning the outcome of the study.

The deviation was assessed and signed by the study director on 20. Dec. 2017.

11.2 Deviations from the Guideline

The following deviation from the guideline was documented:

- ◆ Temperature range was 19.7 – 21.3 °C instead of 20.0 – 24.0 °C. As degradation of the positive control was in the normal range this is considered as uncritical concerning the outcome of the study.


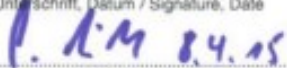


The deviation was assessed and signed by the study director on 20. Dec. 2017.

12 RECORDING AND ARCHIVING

One original of study plan and final report, respectively, all raw data of the study and all documents mentioned or referred to in study plan or final report will be kept in the GLP Document Archive of the test facility for 15 years. After that, the sponsor's instructions will be applied (destruction of documentation). A retain sample of the test item will be kept in the GLP Substance Archive for 15 years; then, the retain sample will be discarded.

Number of originals which will be sent to the sponsor: 1

13 ANNEX 1: COPY OF GLP-CERTIFICATE

		Rheinland-Pfalz LANDESAMT FÜR UMWELT, WASSERWIRTSCHAFT UND GEWERBEAUF SICHT
GUTE LABORPRAXIS – GOOD LABORATORY PRACTICE GLP-BESCHEINIGUNG STATEMENT OF GLP COMPLIANCE gemäß/according to § 19b Abs. 1 Chemikaliengesetz		
Eine GLP-Inspektion zur Überwachung der Einhaltung der GLP-Grundsätze gemäß Chemikaliengesetz bzw. Richtlinie 2004/9/EG wurde durchgeführt in:		Assessment of conformity with GLP according to Chemikaliengesetz and Directive 2004/9/EC at:
Prüfeinrichtung / Test facility LAUS GmbH Auf der Schafweide 20 67489 Kirrweiler		
Prüfung nach Kategorien / Areas of Expertise (gemäß / according ChemVwV-GLP Nr. 5.3/OECD guidance) 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9 (toxikologische in Vitro Prüfungen an Säugerzellen und Bakterien / toxicological in vitro studies on mammalian cells and bacteria)		
Datum der Inspektion / Date of Inspection (Tag.Monat.Jahr / day.month.year) 13.Lund 14.10.2014		
Die genannte Prüfeinrichtung befindet sich im nationalen GLP-Überwachungsverfahren und wird regelmäßig auf Einhaltung der GLP-Grundsätze überwacht.	The above mentioned test facility is included in the national GLP Compliance Programme and is inspected on a regular basis.	
Auf der Grundlage des Inspektionsberichtes wird hiermit bestätigt, dass in dieser Prüfeinrichtung die oben genannten Prüfungen unter Einhaltung der GLP-Grundsätze durchgeführt werden können.	Based on the inspection report it can be confirmed, that the test facility is able to conduct the aforementioned studies in compliance with the Principles of GLP.	
Eine erneute behördliche Überprüfung der Einhaltung der GLP-Grundsätze durch die Prüfeinrichtung ist spätestens drei Jahre nach der letzten Inspektion zu beantragen. Ohne diesen Antrag wird die Prüfeinrichtung nach Ablauf der Frist aus dem deutschen GLP-Überwachungsprogramm genommen und diese GLP-Bescheinigung verliert ihre Gültigkeit.	Verification of the compliance of the test facility with the Principles of the GLP has to be applied for not later than three years after the last inspection. Elapsing this term, the test facility will be taken out of the German GLP-Monitoring Programme and this GLP Certificate becomes invalid.	
Unterschrift, Datum / Signature, Date 		
Dr.-Ing. Stefan Hill - Präsident - (Name und Funktion der verantwortlichen Person / name and function of responsible person)		
		Landesamt für Umwelt, Wasserwirtschaft und Gewerbeaufsicht Kaiser-Friedrich-Straße 7, 55116 Mainz (Name und Adresse der GLP-Überwachungsbehörde / Name and adress of the GLP Monitoring Authority)

14 ANNEX 2: GLOSSARY

IC inorganic carbon
 DOC dissolved organic carbon
 TOC total organic carbon
 TC total carbon

15 ANNEX 3: CALIBRATION REPORTS CARBON ANALYSER

Date 23. Oct. 2017 (exemplarily)

aj-Analysesystem multi N/C 2100 S; multiWin 4.03; Geräte-Nr.: NS-100/G

KalibrierReport

Kalibrierung: Cal_LAUS1_2014_171023_1550
 Kalibrierung vom: 23.10.2017 15:50:37 +0200

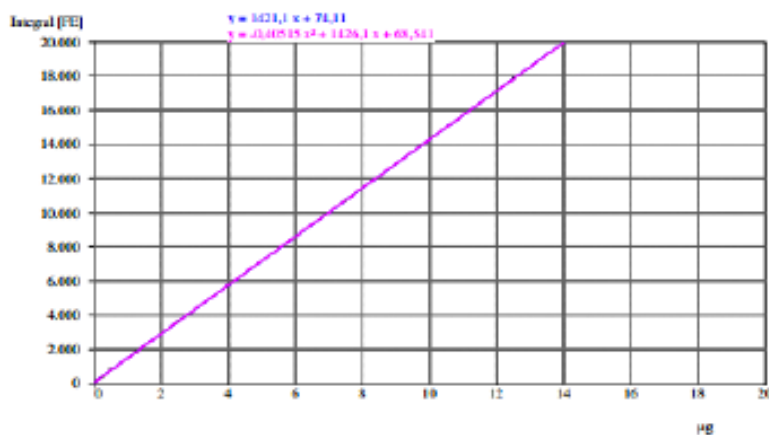
Benutzer: lisa.boeringer
 Kalibrier-Kanal: IC-500ppm
 Lineare Regression [µg]: $c = (k \cdot I + K0) / V$
 $k0 = -0,05203$ $k1 = 7,037E-4$

Rest-Standardabweichung: 42,261 FE Linearität: OK
 Verfahrensstandardabweichung: 0,29739mg/l Varianzhomogenität: OK
 Verfahrensvariationskoeffizient: 0,72831 % Nachweisgrenze: 506,5µg/l
 Korrelationskoeffizient: 0,99999 Erfassungsgrenze: 1,01mg/l
 Bestimmtheitsmaß: 0,99997 Bestimmungsgrenze: 1,96mg/l

Kalibrierung mit konstantem Probenvolumen: 100,00µl

Nr.	Rest.	c-soll	m	I-Netto	c-ist	c-ist
H2O	3-3			792,0FE/ml		
1	3-3	2,50mg/l	0,204µg	364,5FE	2,04mg/l	-18,20%
2	3-3	5,00mg/l	0,535µg	833,6FE	5,35mg/l	6,91%
3	3-3	12,50mg/l	1,25µg	1.852FE	12,51mg/l	0,09%
4	3-3	25,00mg/l	2,52µg	3.649FE	25,16mg/l	0,63%
5	3-3	75,00mg/l	7,50µg	10.725FE	74,95mg/l	-0,06%
6	3-3	125,0mg/l	12,50µg	17.836FE	125,0mg/l	-0,01%

Digitalschreiben von
 lisa.boeringer
 Datum: 23.10.2017
 09:51:26



Final Report
LAUS GmbH

Study No.: 17082903G605
Test Item: Mannosylerythritolipid MEL

iq-Analysesystem multi H/C 2100 S; multiWIN 4.03; Geräte-Nr.: NS-108JG

KalibrierReport

Kalibrierung: Cal_LAUS1_2014_171023_1550
Kalibrierung vom: 23.10.2017 15:50:37 +0200 Methode: LAUS1_2014

Benutzer: lisa.boeringer
Kalibrier-Kanal: TC-500ppm
Lineare Regression [µg]: $c = (k \cdot I + K0) / V$
 $k0 = 0.030904$ $k1 = 6.781E-4$
Rest-Standardabweichung: 35.392 FE Linearität: OK
Verfahrensstandardabweichung: 0.24mg/l Varianzhomogenität: OK
Verfahrensvariationskoeffizient: 0.50526 % Nachweisgrenze: 603.6µg/l
Korrelationskoeffizient: 1 Erfassungsgrenze: 1.21mg/l
Bestimmtheitsmaß: 0.99999 Bestimmungsgrenze: 2.65mg/l

Kalibrierung mit konstantem Probenvolumen: 100.00µl

Nr.	Best.	c-soll	m	I-Netto	c-ist	c-ist
H2O	3-3			1.317FE/ml		
1	3-3	5.00mg/l	0.489µg	676.1FE	4.89mg/l	-2.12%
2	3-3	10.00mg/l	1.03µg	1.469FE	10.27mg/l	2.69%
3	3-3	25.00mg/l	2.48µg	3.615FE	24.82mg/l	-0.71%
5	3-3	150.0mg/l	15.00µg	22.077FE	150.0mg/l	0.01%

