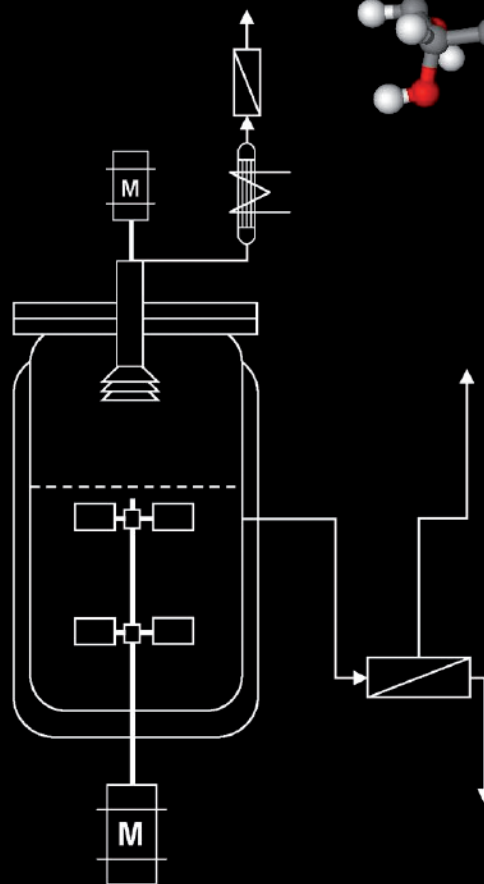
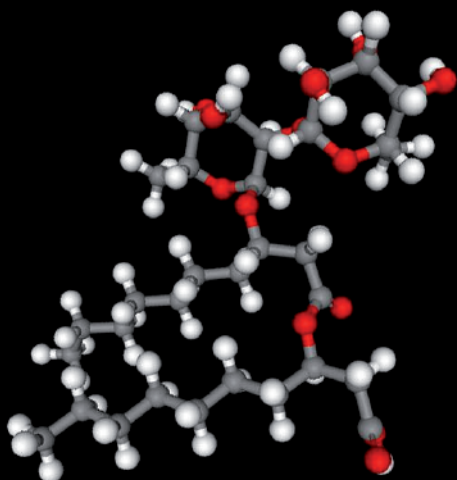
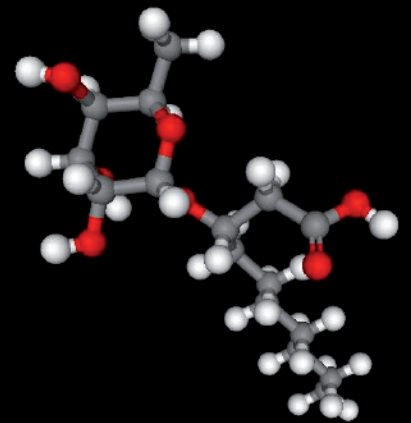
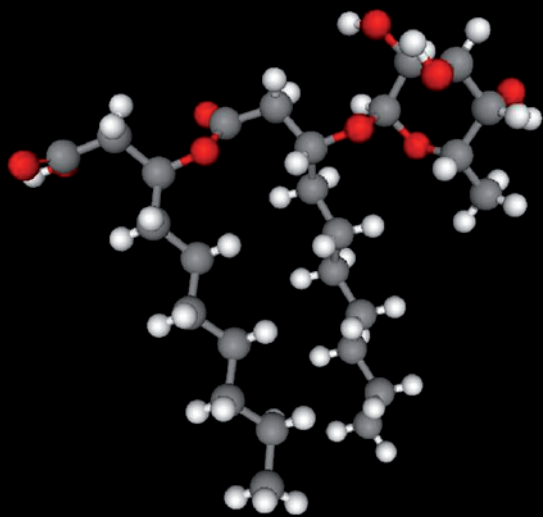


Frank Leitermann

Biotechnologische Herstellung mikrobieller Rhamnolipide



Frank Leitermann

**Entwicklung und Optimierung eines biotechnologischen
Prozesses zur Herstellung mikrobieller Rhamnolipide
auf Basis nachwachsender Rohstoffe**

Entwicklung und Optimierung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung mikrobieller Rhamnolipide auf Basis nachwachsender Rohstoffe

von
Frank Leitermann



universitätsverlag karlsruhe

Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)

Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, 2008

Impressum

Universitätsverlag Karlsruhe
c/o Universitätsbibliothek
Straße am Forum 2
D-76131 Karlsruhe
www.uvka.de



Dieses Werk ist unter folgender Creative Commons-Lizenz
lizenziert: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/>

Universitätsverlag Karlsruhe 2008
Print on Demand

ISBN: 978-3-86644-277-1

Entwicklung und Optimierung eines biotechnologischen
Prozesses zur Herstellung mikrobieller Rhamnolipide auf
Basis nachwachsender Rohstoffe

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik der
Universität Fridericiana Karlsruhe (TH)

vorgelegte

genehmigte
DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. (t.o.) Frank Paul Leitermann
aus Albstadt-Ebingen

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk

Korreferent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2008

Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk danke ich für die sehr interessante Themenstellung, für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die konstruktive Diskussionsbereitschaft. Für die Einräumung großer experimenteller Freiheit und die „offene Bürotüre“ beim Auftreten von Problemen bin ich besonders dankbar.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik Universität Karlsruhe (TH), danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Dr.-Ing. Rudolf Hausmann möchte ich mich für die engagierte Betreuung, die konstruktiven und anregenden Diskussionen und die freundschaftliche Unterstützung seit meiner Diplomarbeitszeit in Stuttgart und der Promotionszeit hier in Karlsruhe bedanken.

Bei den Studienarbeitern Ina Sandig und Nico Fischer, sowie bei den Diplomanden Veronika Holderied und Benjamin Maiser für ihre engagierte Mitarbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für technische Biologie möchte ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Atmosphäre bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Liste der Publikationen	3
3	Einleitung & Zielsetzung	5
3.1	Einleitung	5
3.2	Zielsetzung	8
4	Grundlagen & Theorie	9
4.1	Der Mikroorganismus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
4.2	Tenside und Biotenside	11
4.2.1	Biotenside	14
4.3	Rhamnolipide: Eigenschaften, Biosynthese und Regulation	15
4.3.1	Biosynthese der Rhamnolipide in <i>Pseudomonas species</i>	16
4.3.2	Genetische Regulation der Rhamnolipidbiosynthese	20
4.3.3	Prozessführungsstrategien & Stand der Technik	22
4.3.4	Wirtschaftliche Aspekte und Anwendungsbereiche der Rhamnolipide	24
4.4	Schaum und Schaumzerstörung	28
4.5	ATR-FTIR Spektroskopie	34
4.5.1	Multivariate Kalibrierung und PLS-Regression	36
5	Zusammenfassungen der Ergebniskapitel I-V	39
5.1	Zusammenfassung Kapitel I: Stammvergleich	40
5.2	Zusammenfassung Kapitel II: Produktspektrum	44
5.3	Zusammenfassung Kapitel III: Substratscreening	45
5.4	Zusammenfassung Kapitel IV: ATR-FTIR Analytik	48
5.5	Zusammenfassung Kapitel V: Patentanmeldeschrift	50
6	Ergebniskapitel	53
6.1	Kapitel I	55
6.1.1	Abstract	56
6.1.2	Background	57

Inhaltsverzeichnis

6.1.3	Results	58
6.1.4	Discussion	63
6.1.5	Conclusions	64
6.1.6	Methods	64
6.1.7	Authors' contributions & Acknowledgements	67
6.2	Kapitel II	69
6.2.1	Abstract	70
6.2.2	Introduction	71
6.2.3	Results and Discussion	71
6.2.4	Material & Methods	74
6.2.5	Acknowledgement	74
6.3	Kapitel III	75
6.3.1	Abstract	76
6.3.2	Introduction	77
6.3.3	Results	79
6.3.4	Discussion	84
6.3.5	Conclusions	85
6.3.6	Methods	86
6.3.7	Authors' contributions & Acknowledgements	89
6.4	Kapitel IV	91
6.4.1	Abstract	92
6.4.2	Background	93
6.4.3	Results	95
6.4.4	Discussion	100
6.4.5	Conclusions	101
6.4.6	Materials & Methods	101
6.4.7	Authors' contributions & Acknowledgement	105
6.5	Kapitel V	107
6.5.1	Beschreibung	108
6.5.2	Zusammenfassung	123
6.6	Kapitel VI	127
6.6.1	Lösungen für ein fernsteuerbares Biotechnikum	128
6.6.2	Automatisierte Prozesssteuerung über Rezepte	130
6.6.3	Fällung und Aufreinigung von Rhamnolipiden	131
7	Ausblick	135
8	Literatur	137

9	Anhang	145
9.1	Abbildungen und Tabellenverzeichnis	145
9.2	Abkürzungen	148
9.3	Formelsammlung	150
9.4	Prozessrezept Rhamnolipid-Produktionsprozess	154

1 Zusammenfassung

Rhamnolipide sind mikrobielle Biotenside, welche aus hydrophilen L-Rhamnose- und hydrophoben β -Hydroxydecansäureuntereinheiten bestehen. Bevorzugt werden diese Glykolipide von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere der Art *Pseudomonas aeruginosa*, auf hydrophoben C-Quellen unter wachstums-limitierenden Bedingungen gebildet. Sie weisen sehr gute oberflächenaktive Eigenschaften auf und sind vollständig biologisch abbaubar. Ihr Einsatzgebiet reicht von Haushaltsreinigungsprodukten bis hin zu Kosmetik und Pharmaapplikationen.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Entwicklung und Optimierung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Rhamnolipiden auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen. Ein Schwerpunkt lag hierbei auf der Entwicklung und Evaluierung einer Standardprozessführung, sowie eines effizienten Screening-Systems auf Basis eines Parallelbioreaktorsystems. Es galt zwei verschiedene Produktionsstämme auf ihr Rhamnolipidbildungspotenzial und auf die von ihnen gebildeten Rhamnolipid 1 : Rhamnolipid 3 Verhältnisse hin zu untersuchen. Zur schnellen Produktanalyse sollte FTIR-Spektroskopie als alternative Analyseverfahren bezüglich ihrer Eignung zur quantitativen Rhamnolipidbestimmung aus Kultivierungsbrühen untersucht und bis zur Anwendungsreife weiterentwickelt werden.

Als wesentliches prozessimmanentes Problem konnte die exzessive Schaumbildung identifiziert und durch Implementierung mechanischer Schaumzerstörung gelöst werden. In Kombination mit einer geeigneten Prozessführungsstrategie war es hierdurch möglich Rhamnolipidmengen in Konzentrationen von über 53 g/l bioverfahrenstechnisch herzustellen. Hierbei zeigte der Produktionstamm DSM 2874 tendenziell bessere Produktivitäten als der Referenzstamm DSM 7108. Im Verlauf dieser Untersuchungen kamen jedoch auch neue Fragestellungen bezüglich der Induktion der Rhamnolipidbildung auf. Eine zukünftige Betrachtung der genauen Regulation der Rhamnolipidbildung unter molekularbiologischen Gesichtspunkten erscheint daher erstrebenswert.

Ein durchgeführtes Substratscreening mit verschiedenen pflanzlichen Ölen ergab, dass die Fettsäurezusammensetzung des Substrates einen Einfluss auf die gebildeten Produktmengen hat, jedoch das Produktspektrum hiervon unbeeinflusst bleibt. Im Unterschied hierzu ergab ein direkter Vergleich der beiden

Produktionsstämme mit demselben Substrat deutliche Unterschiede bezüglich des gebildeten Produktspektrums, woraus geschlossen werden kann, dass das jeweilige Produktspektrum stamm- und nicht substratabhängig ist. Als alternative „*in time*“ Prozessanalytik erwies sich ATR-FTIR Spektroskopie als geeignet. Die notwendigen Analysezeiten von 36 h der herkömmlichen HPLC-Analytik konnten durch Einsatz von ATR-FTIR Spektroskopie auf 20 Minuten reduziert werden. Auf Basis der im Verlauf der Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse folgte die weiterführende Entwicklung eines zweistufigen, ruhenden Zell Prozesses unter Anwendung mechanischer Schaumzerstörung, zu welchem eine Patentmeldeschrift eingereicht wurde.

2 Liste der Publikationen

Die vorliegende Dissertationsarbeit basiert auf den folgenden Publikationen und Manuskripten:

Kapitel I*:

Leitermann F, Dhariwal A, Syldatk C, Hausmann R. 2008. **Production of microbial rhamnolipids by *Pseudomonas* strains DSM 7108 and DSM 2874, utilizing mechanical foam destruction.** BMC Journal of Biological Engineering

Kapitel II*:

Leitermann F, Syldatk C, Hausmann R. 2008. **Proportion of Di- and Mono-Rhamnolipid production by *Pseudomonas* strains DSM 7108 and DSM 2874.** BMC Research Notes

Kapitel III*:

Leitermann F, Sandig I, Syldatk C, Hausmann R. 2008. **Screening of hydrophobic Substrates for the Production of Rhamnolipids by Shaking Flask and Bioreactor Cultivations of *Pseudomonas aeruginosa* DSM 7108.**

BMC Biotechnology

Kapitel IV*:

Leitermann F, Syldatk C, Hausmann R. 2008. **Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR spectroscopy.** BMC Journal of Biological Engineering

Kapitel V*:

Leitermann F, Hausmann R, Syldatk C; Assignat Universität Karlsruhe (TH). 2007. **Biotenside und deren Herstellung.** Deutsches Patent- und Markenamt. DE 10 2007 028 030.2. Einreichungsdatum 14.06.2007:23.

* laufendes Veröffentlichungsverfahren

Weitere Publikationen

Wissenschaftliche Artikel:

Dhariwal A, Mohrdieck M, Leitermann F, Arjol IM, Manresa A, Sylatk C, Janke HD, Chmiel H. 2007. **Effect of emulsified feeding of oily substrate via submerged ceramic membranes on surfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* fermentation.** Bioprocess Biosyst Eng (online first) voraussichtlich 32.

Hausmann R, Vitello MP, Leitermann F, Sylatk C. 2006. **Advances in the production of sponge biomass *Aplysina aerophoba* - A model sponge for ex situ sponge biomass production.** Journal of Biotechnology 124(1):117-127.

Brümmer F, Calcinaï B, Götz M, Leitermann F, Nickel M, Sidri M, Zucht W. 2004. **Overview on the sponge fauna of the Limski Kanal, Croatia, Northern Adriatic Sea.** Boll. Mus. Ist. biol. Univ. Genova. 68:219-227.

Vortrag

Leitermann F. 2005. **New Approaches for a Sustainable Production of Microbial Rhamnolipids.** BioPerspectives 10.-12. Mai 2005. Wiesbaden.

Posterpräsentationen

Leitermann F, Fischer N, Hausmann R, Sylatk C. 2006. **Advances on the Production of Microbial Rhamnolipids based on Vegetable Oils.** VAAM Jahrestagung 19.-22. März 2006. Jena.

Leitermann F, Magario I, Janke T, Neumann A, Develter D, Chmiel H, Radel S, Sylatk C. 2004a. **New approaches for the production of rhamnolipids with *Pseudomonas sp.* from renewable sources.** 3rd Euro Fed Lipid Congress 05.-08. September 2004. Edinburgh.

Leitermann F, Magario I, Neumann A, Radel S, Sylatk C. 2004b. **New approaches for the production of rhamnolipids with *Pseudomonas sp.* from renewable sources.** VAAM Jahrestagung 28.-31. März 2004. Braunschweig.

3 Einleitung & Zielsetzung

3.1 Einleitung

Nachwachsende Rohstoffe bildeten seit altersher die Grundlage vieler Produkte des menschlichen Bedarfs. Erst der Wandel von der Agrar- zur Industriegesellschaft Mitte des 19. Jahrhunderts, in Verbindung mit großen wissenschaftlichen Erkenntniszugewinnen, änderte dies. Kohle, Erdöl und Erdgas wurden für die chemische Synthese entdeckt und synthetische Produkte ersetzten rasch die ursprünglichen [1]. Bei Abschätzung der weltweit gegebenen geologischen Verfügbarkeit wird jedoch deutlich, dass eine Nutzung fossiler Rohstoffe zeitlich begrenzt sein wird. Eine deutliche Verteuerung, zumindest von Erdöl und Erdgas, ist bzw. wird hiervon die Folge sein [2]. Unabhängig davon, ob bald oder erst in fernerer Zukunft ein „peak oil“ droht, sollten heute schon intelligente Zukunftsstrategien entwickelt werden die Versorgungssicherheit gewährleisten. Die Weiße (oder industrielle) Biotechnologie hat das Potenzial, einen substanziellen Beitrag zur Bewältigung dieser grundlegenden Herausforderungen für unsere industrielle Gesellschaft zu leisten. Weiße Biotechnologie kann entsprechend einer sehr allgemeinen Definition wie folgt definiert werden:

„White Biotechnology is the application of nature’s toolset to industrial production”

Der Focus der Weißen Biotechnologie liegt demnach in der Herstellung von Produkten mit biotechnischen Verfahren. Zu diesen Produkten zählen Bulk- und Feinchemikalien, Lebensmittel sowie Lebensmittelzusatzstoffe und Futtermitteladditive, Agrar- und Pharmavorprodukte ebenso wie auch Hilfsstoffe für verarbeitende Industrien wie technische Enzyme und Biokraftstoffe [3]. Die in sie gesetzten mittelfristigen Erwartungen sind hierbei, die notwendige Verbesserung der industriellen Produktion zu ermöglichen, sowie langfristig die Erschließung nachwachsender Rohstoffe als primäre, erdölunabhängige Basis der industriellen Produktion und der Energiewirtschaft zu gewährleisten. Das Potenzial der Weißen Biotechnologie liegt darin, sowohl klassisch-chemische Produktionsverfahren

ersetzen bzw. ergänzen zu können als auch die Herstellung neuer Produkte zu ermöglichen [4]. Einige Studien schätzen den Anteil biotechnischer Verfahren in der Produktion verschiedener chemischer Produkte zurzeit auf ca. 5 % (Stand 2003). Bis zum Jahre 2010 wird eine Steigerung auf bis zu 20 % vorhergesagt [5]; [6]. Besonders im Bereich Grund- und Feinchemikalienproduktion könnte der Einsatz biotechnologischer Verfahren sinnvoll sein da [4]:

- Biotechnische Verfahren sich gewöhnlich durch hohe Spezifität und Selektivität bezüglich der Umsetzung von Substraten und des gebildeten Produktspektrums auszeichnen.
- Biotechnische Verfahren unter milden Reaktionsbedingungen bezogen auf Druck, Temperatur und pH-Wert durchgeführt werden können.
- Häufig nachwachsende Rohstoffe als Ausgangsstoffe verwendet werden und damit zur viel diskutierten Nachhaltigkeit von Verfahren und Produkten beitragen können.

Der Einsatz nachwachsender Rohstoffe im chemisch-technischen Produktionssektor ist nicht neu, wobei pflanzliche Öle mengenmäßig an erster Stelle stehen. Das internationale Marktvolumen für natürliche Fette und Öle betrug 2003 124,6 Tonnen. Ca. 14 % wurden als Ausgangsstoffe für chemische und technische Anwendungen verwendet. Die eine Hälfte hiervon fand Einsatz in der Seifenherstellung, die andere Hälfte für unterschiedliche Fett- und oleochemischen Anwendungen [7]. Tenside stellen die wichtigste Produktgruppe der Oleochemie dar. Als Beispiel kann die deutsche chemische Industrie angeführt werden, die mehr als ein Drittel der verwendeten natürlichen Fette und Öle (430000 t/a) zu diesem Zweck einsetzt. Die Hauptanwendungsbereiche liegen bei Wasch- und Reinigungsmitteln (64 %), Kosmetik- und Pharmaprodukten (9 %), Textil- und Lederadditive (8 %), sowie eine Vielzahl anderer Anwendungsbereiche (19 %) [1]. Von 2000 bis 2005 stieg die Produktion von Tensiden in Westeuropa von 2,5 auf 2,9 Millionen Tonnen pro Jahr [8]. 2004 erreichte der europäische Markt (EU 27 + Norwegen + Schweiz) für Seifen, Reinigungs- und Pflegeprodukte ein Marktvolumen von 29,4 Mrd. € [9]. Der

wachsende Markt, hohe Rohölpreise, Produzierbarkeit aus nachwachsenden Rohstoffen, sowie gute biologische Abbaubarkeit lassen eine Steigerung des Marktanteils biotechnologisch erzeugter Tenside erwarten [10]. Einige Prognose sagen sogar einen Marktanteil der Biotenside von bis zu 10 % des Tensidmarktes in naher Zukunft voraus [11].

3.2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Herstellung von mikrobiellen Rhamnolipiden, welche die überwiegend von der Gattung *Pseudomonas* produzierten Biotenside sind.

Ein Schwerpunkt hierbei lag auf der Entwicklung und Evaluierung einer Standardprozessführung, welche es ermöglichen soll, diese Glykolipide in hohen Konzentrationen auf nachwachsenden Rohstoffen herzustellen. Es galt für die grundsätzlichen, prozessimmanenten Schwierigkeiten bei der biotechnologischen Herstellung von Rhamnolipiden, wie z.B. der exzessiven Schaumbildung, Lösungsstrategien zu finden und umzusetzen.

Eine weitere Kernaufgabe bestand darin, ein effizientes Screening-System auf Basis eines Parallelbioreaktorsystems zu entwickeln. Hiermit sollte der Einfluss verschiedener Pflanzenöle auf die gebildeten Produktmengen, als auch auf das gebildete Produktspektrum untersucht werden.

Weiterhin sollten zwei Produktionsstämmen, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 7108 und *Pseudomonas species* DSM 2874, in Hinblick auf ihr Produktbildungspotenzial und das gebildete Produktverhältnis an Rhamnolipid 1 & 3 verglichen werden.

Zusätzlich sollte eine neue Analytik zur Detektion von Rhamnolipiden in Kulturbrühen entwickelt und evaluiert werden. Als schnelle Prozessanalytik sollte hierzu FTIR-Spektroskopie auf die prinzipielle Anwendbarkeit getestet und anschließend eine quantitative Analyseverfahren aufgebaut werden.

Letztlich sollte auch im Verlauf der Arbeiten das neue Biotechnikum des hiesigen Lehrstuhls aufgebaut und erweitert werden.

4 Grundlagen & Theorie

4.1 Der Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa („falscher Monade, grüspanig“) ist ein monopolare und monotrich begeißeltes, gram-negatives, gerades oder leicht gekrümmtes bewegliches Stäbchenbakterium (0,5 – 0,8 µm x 1 – 3 µm), welches ubiquitär verbreitetet, und bevorzugt in terrestrischen und aquatischen Lebensräumen auftritt [12].

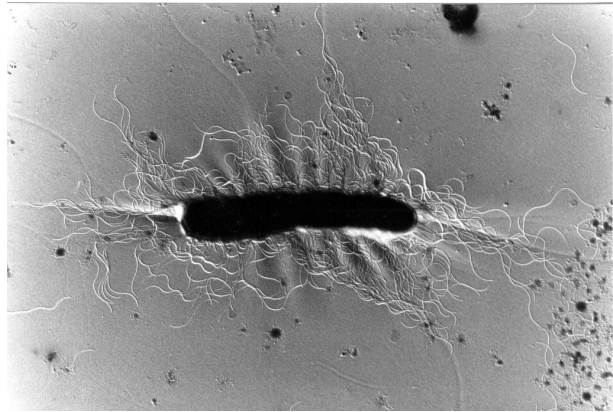


Abb. 4.1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *Pseudomonas species* DSM 2874.

Abb. 4.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2874. Die fädigen Strukturen zeigen Pili. Zur rechten unteren Ecke hin verlaufend, kann das Flagellum vermutete werden. (Aufnahme C. Syldatk)

Entsprechend der phylogenetischen Zuordnung in Tab. 4.1, gehört es zur Abteilung der Proteobakterien (= Purpurbakterien) und hier zur Klasse der gamma-Proteobakterien. Es gehört zur Ordnung der *Pseudomonadales*, und wurde der Familie *Pseudomonadaceae* zugeordnet [12].

Tab. 4.1 Phylogenetische Zuordnung *Pseudomonas aeruginosa*

Domäne	Bacteria
Abteilung	Proteobacteria
Klasse	Gammaproteobacteria
Ordnung	Pseudomonadales
Familie	Pseudomonadaceae
Gattung	Pseudomonas
Art	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Migula, 1900)

Pseudomonas aeruginosa bildet Fluorescein und Pyocyanin als fluoreszierende Farbstoffe. Es gehört zu den sogenannten „Krankenhauskeimen“, ist opportunistisch pathogen und infiziert v.a. Patienten mit Immundefiziten, wie z.B.

Transplantationspatienten nach Behandlung mit Immunsuppressiva, sowie HIV-Patienten. Des Weiteren zeigt es sich verantwortlich für die Infektion von Verbrennungs- und Operationswunden. *Pseudomonas aeruginosa* ist von Natur aus resistent gegen eine Vielzahl von Antibiotika (R-Plasmid) [13]. Es bildet unterschiedliche zellassoziierte und extrazelluläre Virulenzfaktoren aus [14]. Ein schematischer Überblick dieser Faktoren ist in Abb. 4.2 aufgezeigt.

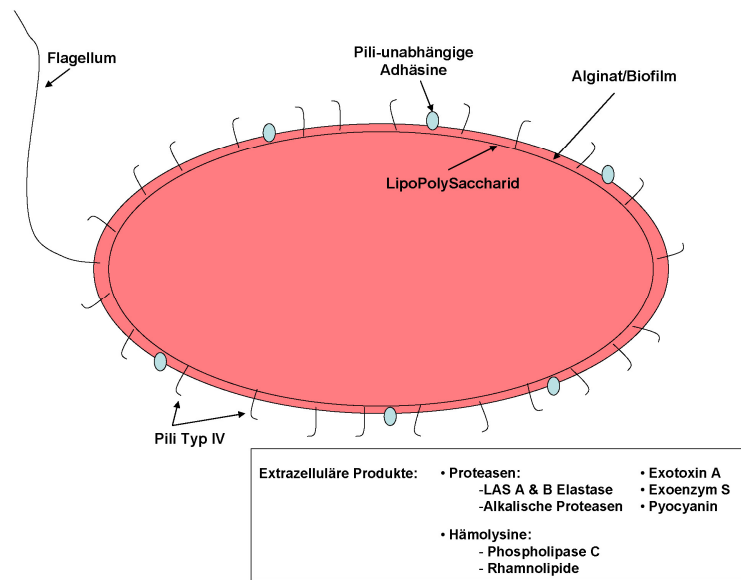


Abb. 4.2 Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* verfügt sowohl über zellassoziierte Virulenzfaktoren (Flagellum, Pili Typ IV, Alginat/Biofilm, Lipopolysaccharid (LPS), Pili-unabhängige Adhesine), als auch über extrazelluläre Virulenzfaktoren (Proteasen, Hämolyse Phospholipase C & Rhamnolipide , Exotoxin A, Exoenzym S, Pyocyanin) [14].

Aufgrund der Ausbildung dieser Faktoren, sowie der potenziellen Humanpathogenität erfolgt eine Zuordnung entsprechend der Biologischensicherheitsstufe L2 [15].

Pseudomonas aeruginosa ist ein fakultativ aerober Organismus und besitzt fünf identifizierte aerobe terminale Oxidasen [16]. Während ein mikroaerobes Milieu das Wachstum dieses Biofilmbildners sogar zu begünstigen scheint [17], findet Energiegewinn und Wachstum unter anaeroben Bedingungen nur in Anwesenheit von Stickstoff-Oxiden, wie z.B. Nitrat, als alternativen, terminalen Elektronenakzeptoren mittels Denitrifikation statt. Wachstum findet bis zu 41°C statt, wobei der optimale Temperaturbereich zwischen 30 -37 °C liegt [12].

Als Kuriosum zeigt *Pseudomonas aeruginosa* die Fähigkeit Natriumlaurylsulfat (SDS), einen Hauptbestandteil vieler schäumender Pflegeartikel und Hygieneprodukte, zu verstoffwechseln. Während viele Bakterien mit dem Tod auf vorbeugenden Hygienemaßnahmen reagieren, lässt sich *P. aeruginosa* von Zahnpasta, Shampoo oder Duschgel nicht beeindrucken [18].





4.2 Tenside und Biotenside

Niedermolekulare Verbindungen, deren Moleküle einen hydrophilen (polaren) und hydrophoben (unpolaren) Teil enthalten werden im Allgemeinen als Tenside (englisch „surfactants“ oder „detergents“) bezeichnet. Als Folge ihres hieraus begründeten amphiphilen Charakters, zeigen Tenside in verschiedensten Lösungsmitteln, insbesondere in Wasser, grenzflächenaktive Eigenschaften und lagern sich an Grenzflächen an. Dieser als Grenzflächenadhäsion bezeichnete Vorgang führt aus thermodynamischen Gründen zu folgenden Effekten:

- a) Absenkung der Grenzflächenspannung zwischen Wasser und der angrenzenden Phase
- b) Veränderung der Benetzungseigenschaften zwischen Wasser und Feststoffen
- c) Ausbildung elektrischer Doppelschichten an den Grenzflächen

Entsprechend Tab. 4.2 können Tenside anhand ihres Molekülbaus und ihrer hydrophilen Gruppen eingeteilt werden [19].

Tab. 4.2 Klassifizierung von Tensiden (modifiziert, nach [19]).

Klassifizierungskriterium hydrophilen Gruppen	Beispiel	hydrophil	hydrophob
I. Nichtionische Tenside	-OH (Alkohol) -O- (Ether)		
II. Anionische Tenside	-COO ⁻ (Carboxylat) -SO ₃ ⁻ (Sulfonat); -SO ₄ ⁻ (Sulfat)		
III. Kationische Tenside	R ₄ -N ⁺ (quartäre Ammoniumsalze) R ₃ -S ⁺ X ⁻ (Sulfoniumsalze)		
IV. Zwitterionische Tenside	Aminoxide R ₃ -N ⁺ -O ⁻ Lecithine (Phospholipide)		

Tenside lagern sich in einem Dispersionsmedium (z.B. Wasser) spontan zu Aggregaten zusammen, wobei sie aufgrund ihres molekularen Aufbaus zur Phasentrennung neigen. Schematisch ist dieser Vorgang in Abb. 4.3 dargestellt. Schon bei niedrigen Konzentrationen bewirkt das Bestreben der Tensidmoleküle, mit ihrem hydrophoben Molekülteil möglichst wenig Kontakt zur wässrigen Umgebung zu haben, eine Anreicherung an den Grenzflächen und eine Änderung der physikalischen Eigenschaften des Lösungsmittels, wie z.B. die Oberflächenspannung. Wird die Tensidkonzentration weiter erhöht, kommt es ab einer bestimmten Konzentration (der sog. cmc, „critical micelle concentration“) zu einer vollständigen Belegung der Grenzflächen. Mit dem Erreichen der Sättigungskonzentration beginnen die Tensidmoleküle sich in der Lösung zu Mikrostrukturen (z.B. Mizellen von lat. mica = Klümpchen, kleiner Bissen) zusammenzulagern, und zwar derart, dass die unpolaren Molekülteile zum Inneren der Struktur hin orientiert und damit dem Kontakt mit Wasser entzogen sind. Die Oberflächenspannung, die zunächst durch die Einlagerung der Tensidmoleküle zwischen die Wassermoleküle verringert wurde, verändert sich oberhalb der cmc

praktisch nicht mehr. Über die cmc hinaus zugesetztes Tensid vermehrt zunächst lediglich die Zahl der Mikrostrukturen [20].

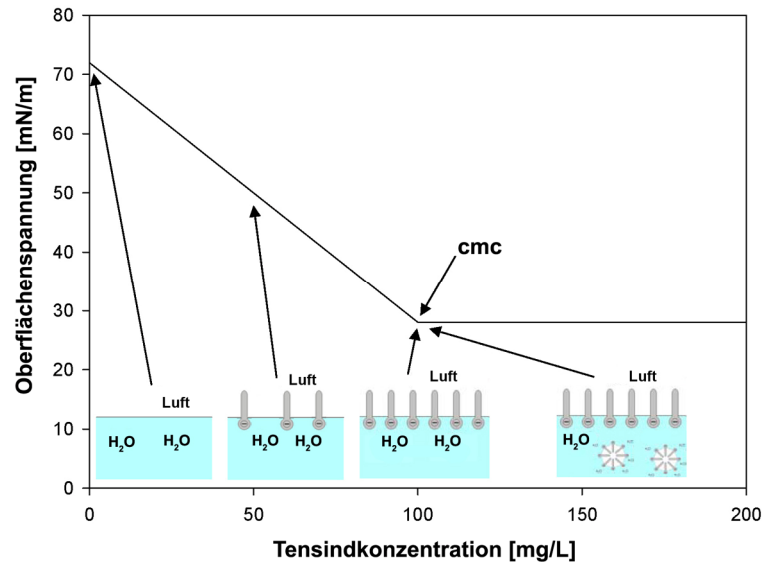


Abb. 4.3 Schematische Darstellung von Tensiden in wässriger Lösung, sowie die Beeinflussung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit der Tensidkonzentration.

Tenside sind in der Lage eine Vielzahl unterschiedlicher Mikrostrukturen zu bilden. Kugelförmige, zylindrische Mizellen aber auch unregelmäßige Bilayer und Vesikel, sowie lamellenartige Zusammenlagerungen wurden beschrieben. Die Ausbildung dieser Strukturen wird beeinflusst vom pH-Wert, der Tensidkonzentration, Temperatur und der Ionenstärke der Lösung [21]. In der folgenden Abbildung sind drei für Tenside typische Mikrostrukturen schematisch dargestellt.

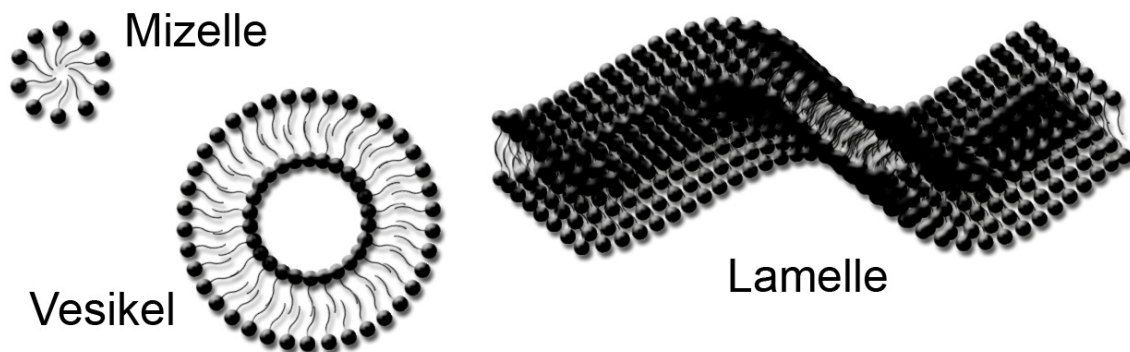


Abb. 4.4 Von Tensiden oberhalb der cmc ausgebildete typische Mikrostrukturen (nach [21]).

4.2.1 Biotenside

Tenside biologischen Ursprungs werden als Biotenside bezeichnet und sind eine strukturell sehr heterogene Gruppe von oberflächenaktiven Substanzen, die sowohl von Eukaryonten als auch von Prokaryonten synthetisiert werden. Biotenside besitzen wie auch die synthetischen Tenside eine amphiphile Molekülstruktur. Während letztere meist nach den Eigenschaften ihrer polaren Gruppe eingeteilt werden, erfolgt die Einordnung der Biotenside nach ihrem biochemischen Charakter. Der hydrophile Molekülteil kann aus Mono-, Oligo- oder Polysacchariden, Aminosäuren bzw. Peptiden oder aus Carboxylat- oder Phosphatgruppe bestehen. Der hydrophobe Teil zeigt meist eine Zusammensetzung aus gesättigten, ungesättigten (Hydroxy-) Fettsäuren oder Fettalkoholen. Typischer Weise werden die Biotenside dabei in folgende Klassen unterteilt [22]:

- **Phospholipide, Mono- und Diglyceride, Fettsäuren**

Bsp.: Phospholipide der Zellmembran, Corynomycolsäure aus *Corynebacterium lepus*

- **Lipopeptide und Lipoaminosäuren**

Bsp.: Surfactin aus *Bacillus subtilis*; Lysinlipid aus *Agrobacterium tumefaciens*

- **Polymere:** Lipoproteine, Lipopolysaccharide u.a.

Bsp.: Emulsan aus *Acinobacter calcoaceticus*

- **Glykolipide**

Bsp.: Sophoroselipide aus *Candida bombicola*; Rhamnoselipide aus *Pseudomonas aeruginosa*

Auf die Rhamnoselipide (Rhamnolipide), die der größten Biotensidstoffklasse der Glykolipide angehören und mit denen sich diese Arbeit befasst wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

4.3 Rhamnolipide: Eigenschaften, Biosynthese und Regulation

Biotenside welche aus L-Rhamnose und überwiegend β -Hydroxydecan säure-Untereinheiten aufgebaut sind, werden als Rhamnolipide bezeichnet. *Pseudomonas sp.*, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, sind bekannt dafür Rhamnolipide unter wachstumslimitierenden Bedingungen auf Kohlenwasserstoffen oder anderen hydrophoben Substraten, wie z.B. Pflanzenölen oder n-Hexan, zu bilden [22]. Der molekulare Aufbau der bisher am häufigsten untersuchten Rhamnolipide ist in Abb. 4.5 dargestellt.

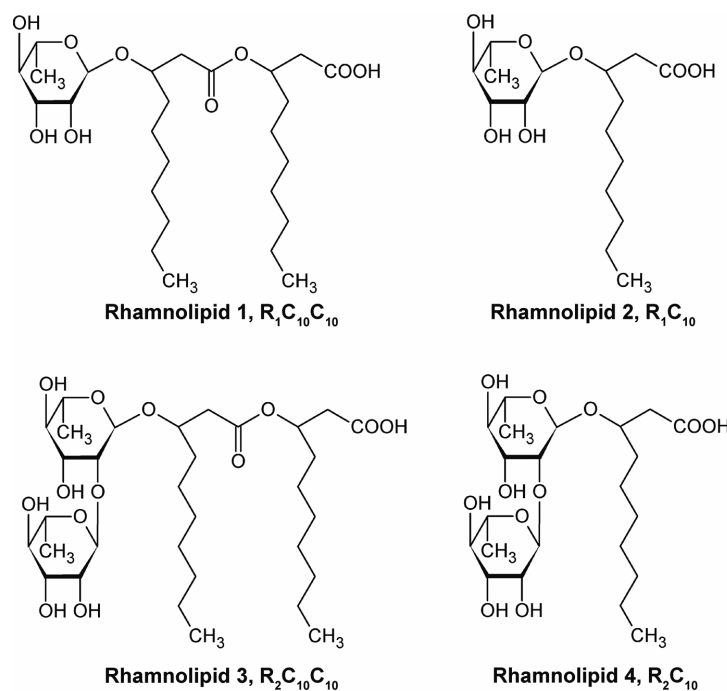


Abb. 4.5 Typische Rhamnolipide (nach [23]).

1949 beschrieben Jarvis und Johnson Rhamnolipid 3 (RL 3: L-rhamnosylrhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoat; Schmelzpunkt $M_p = 86 \text{ }^\circ\text{C}$) als erstes Glykolipid aus *P. aeruginosa* [24]. Dieses zusammen mit Rhamnolipid 1 (RL 1: L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoat) stellen die am häufigsten auftretende Form der Rhamnolipide dar [23]. Das Auftreten zweier weitere Rhamnolipide, Rhamnolipid 2 und 4, wurden bei Versuchen mit ruhenden Zellen von *Pseudomonas species* DSM 2874 beobachtet [25, 26]. Yamaguchi et al. (1976) berichteten von Rhamnolipiden, ähnlich RL 1 und RL 3, welche zusätzlich an ihren

terminalen Rhamnoseeinheiten mit einer α -Decensäurekette acyliert sind (Rhamnolipid A und B; RL A $M_p = -3,2$ °C bzw. RL B $M_p = 84,7$ °C) [27, 28]. Bis heute wurde eine Vielzahl weiterer Rhamnolipid gefunden, welche sich v.a. in der Art ihrer Fettsäureuntereinheiten ($R_2C_{10}C_{10}$; $R_1C_{10}C_{10}$; $R_2C_{10}C_{12}$; $R_1C_{10}C_{12}$; $R_1C_{12:1}C_{10}$; $R_1C_{12:2}$; $R_1C_{8:2}$; $R_1C_{10}C_{12:1}$) unterscheiden [29, 30].

Alle Rhamnolipide zeigen sehr gute oberflächenaktive Eigenschaften. Stellvertretend sind die Werte von Rhamnolipid 1 - 4 aus *Pseudomonas species* DSM 2874, bezüglich Oberflächen-, Grenzflächenspannung und cmc in Tab. 4.3 aufgeführt.

Tab. 4.3 Grenzflächenaktive Eigenschaften von Rhamnolipiden in Wasser aus *Pseudomonas species* DSM 2874 [26]. * gegen n-C16.

Stamm	Rhamnolipid	σ_{\min} (mN/m)	γ_{\min} (mN/m)	cmc (mg/l)
<i>Pseudomonas sp.</i> DSM 2874	RL 1: $R_1C_{10}C_{10}$	26,0	4*	20
	RL 3: $R_2C_{10}C_{10}$	27,0	< 1*	10
	RL 2: R_1C_{10}	25,0	< 1*	200
	RL 4: R_2C_{10}	30,0	< 1*	200
	RL 1 + RL 3 mix	26,0	< 1*	20

Rhamnolipide sind durch ihre terminale Fettsäure schwache Säuren. Die Säuredissoziationskonstante von Rhamnolipiden kann durch ihre starken oberflächenaktiven Eigenschaften, sowie der pH- und konzentrationsabhängigen Ausbildung verschiedener Mikrostrukturen nur schwer präzise ermittelt werden. So ergaben sich z.B. für Rhamnolipid 1 pK_s -Werte von $4,28 \pm 0,16$ (unterhalb der cmc) bis hin zu $5,50 \pm 0,06$ (oberhalb der cmc) [31].

4.3.1 Biosynthese der Rhamnolipide in *Pseudomonas species*

Die Biosynthese der hydrophilen Zuckergruppen als auch der hydrophoben Fettsäuregruppen der Rhamnolipide erfolgt *de novo* [32, 33]. Ausgehend von einem Pflanzenöl (Triglycerid) als C-Quelle, wie es in dieser Arbeit hauptsächlich zur Anwendung kam, soll exemplarisch der Biosyntheseweg der Rhamnolipide dargestellt werden. Eine schematische Darstellung des Rhamnolipidanabolismus ist in Abb. 4.6 dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsstoffe, in Form von

Fettsäuren und Glycerol, gibt es verschiedene Biosynthesewege der Rhamnolipidbildung. Es kann zwischen der hydrophilen Rhamnosegruppe und der hydrophoben Hydroxydecanoylgruppe unterschieden werden. An erster Stelle steht die Hydrolyse der Triacylglyceride mittels zelloberflächengebundener oder ins Medium ausgeschiedener Lipasen, da diese nicht membrangängig sind. Lipasen sind Esterasen (Acylhydrolasen), die oftmals Serin im aktiven Zentrum haben und erst an der Wasser-Lipid-Grenzschicht aktiv werden. Die entstehenden langkettigen Fettsäuren werden durch Permeasen in die Zelle transportiert, kurzkettige Fettsäuren (vermutlich in der ungeladenen und protonierten Form) und das entstandene Glycerol diffundieren passiv durch die Membran [13].

Der Abbau der Fettsäuren erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst erfolgt eine ATP-abhängige Aktivierung der Säure mittels der Fettsäure-Coenzym-A-Ligase. Die so aktivierte Fettsäure durchläuft nun mehrmals den so genannten β -Oxidationszyklus, wobei in jedem Durchlauf die Fettsäurekette um 2 C-Einheiten verkürzt und ein Acetyl-CoA Molekül gebildet wird. Dies geschieht bis zum vollständigen Abbau der Fettsäure [34].

Zur Fettsäuresynthese des hydrophoben Teils, erfolgt nun eine Carboxylierung des Acetyl-CoAs, mittels eines biotinabhängigen Enzymkomplexes (Acetyl-CoA-Carboxylase), zu Malonyl-CoA. Die Biosynthese der langkettigen Fettsäuren erfolgt an einem Acyl-Carrier-Protein (ACP), welches ähnlich wie Coenzym A eine reaktive SH-Gruppe besitzt. Die aus CO_2 eingebaute Carboxygruppe wird in den nachfolgenden Kondensationsreaktionen wieder als CO_2 abgespalten. In drei Schritten und unter Aufwendung von zwei NADPH, erfolgt dann die Reduktion der β -C=O-Gruppe über 3-Hydroxyacyl- und die Enoyl-ACP-Stufe zur Acyl(CH_2)-Gruppe. Dabei verbleibt die wachsende Fettsäure als reaktiver Thioester an die Thiolgruppe des ACP gebunden. Dies wiederholt sich bis sich ein C_{10} -Körper gebildet wurde. Dieser wird nun nicht vollständig zum Decanoyl-ACP umgewandelt, sondern verbleibt in der β -hydroxylierten Form als β -Hydroxydecanoyl-ACP. Durch Veresterung zweier β -Hydroxydecanoyl-ACP-Moleküle entsteht die Vorstufe des hydrophoben Molekülteils der Rhamnolipide, β -Hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoyl-ACP bzw. CoA, wobei noch ungeklärt ist welche Form gebildet wird [32-35].

Die Zuckersynthese des hydrophilen Rhamnoseteils kann auf zwei Arten erfolgen. Zum einen kann das bei der Triglyceridspaltung entstandene Glycerol, nach

Aktivierung mittels ATP, auf Stufe des Glycerinaldehyd-3-phosphat in die Gluconeogenese eintreten. Zum anderen können die in der β -Oxidation gewonnenen Acetyl-CoA Einheiten mit Hilfe des Glyoxylatzyklus in C_4 -Dicarbonsäuren umgewandelt werden. Die so gebildete Oxalsäure wird unter Energieverbrauch mittels einer PEP-Carboxylase zu Phosphoenolpyruvat umgewandelt, und in die Gluconeogenese eingeschleust. Am Ende entsteht Glucose-1-phosphat. In der Regel erfolgt die Umwandlung der Zuckerbausteine auf der Stufe der nukleosidaktivierten Zucker. Ausgehend von einer Desoxy-Thymidindiphospho-D-Glucose erfolgt schließlich die Bildung einer aktivierten Thymidin-diphospho-Rhamnose [35, 36].

Die Bildung von Rhamnolipid 1 erfolgt nun durch glykosidische Verknüpfung von β -Hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoyl-ACP bzw. CoA mit einer Thymidin-diphospho-Rhamnose durch die Rhamnosyltransferase A, wobei TDP sowie ACP/CoA abgespalten wird. Wird durch die Rhamnosyltransferase B eine weitere Thymidin-diphospho-Rhamnose-Einheit angehängt, entsteht Rhamnolipid 3 [37]. Über die Synthese von Rhamnolipid 2 und Rhamnolipid 4 ist bisher wenig bekannt. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird ihre Synthese ähnlich der von RL 1 + 3 verlaufen, wobei jedoch von einer β -Hydroxydecanoyl-Einheit ausgegangen wird. Ob die Verknüpfung der Rhamnoseeinheiten ebenfalls von den Rhamnosyltransferase A + B katalysiert wird, oder ob andere Rhamnosyltransferasen diese Reaktionen vermitteln, ist bisher nicht bekannt. Eine Bildung aus RL 1 bzw. RL 3 durch enzymatische Abspaltung der peripheren β -Hydroxydecanoyl-Einheit ist prinzipiell denkbar, jedoch unter energetischen Gesichtspunkten unwahrscheinlich.

Die physiologische Funktion der Rhamnolipide ist noch nicht vollständig geklärt, und verschiedene Ursachen für ihre Synthetisierung sind denkbar. Eine offensichtliche Funktion der Rhamnolipide scheint die Verbesserung der biologischen Verfügbarkeit von hydrophoben Substraten zu sein [38, 39]. Gleichfalls scheinen sie eine wichtige Rolle für *Pseudomonas aeruginosa* bei der Ausbildung von Biofilmen und bei der Anhaftung/Ablösung von Oberflächen zu spielen [40]. Eine weitere Funktion der Rhamnolipide kann in ihren bakteriostatischen Eigenschaften begründet sein, die *Pseudomonas aeruginosa* einen ökologischen Selektionsvorteil gegenüber Nahrungskonkurrenten verschaffen kann [41].

4.3.2 Genetische Regulation der Rhamnolipidbiosynthese

Die Expression von Virulenzfaktoren, zu denen auch die Rhamnolipide gehören, sowie die Ausbildung von Biofilmen unterliegen in *P. aeruginosa* der Kontrolle eines zell-dichteabhängigen, interzellulärem Kommunikationssystems, welches als „Quorum Sensing System“ (QS) bezeichnet wird [42].

Pseudomonas aeruginosa verfügt über zwei hierarchisch angeordnete QS-Systeme, das übergeordnete Las-System, sowie das dem ersteren untergeordneten Rhl-System. Eine grafische Darstellung der beiden Systeme ist in Abb. 4.7 wiedergegeben.

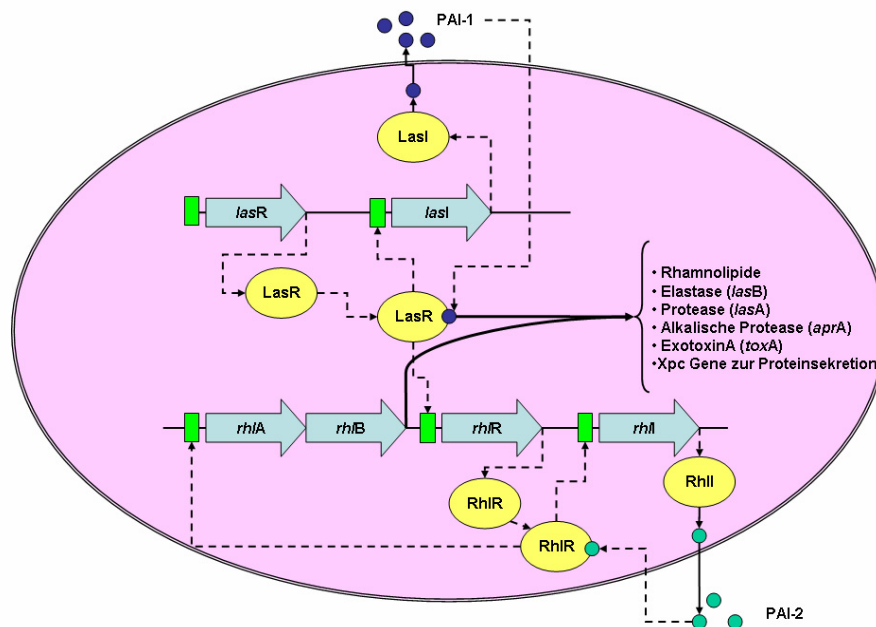


Abb. 4.7 Quorum Sensing Systeme von *P. aeruginosa* und deren Interaktion (nach [43]).

Das Enzym LasI (kodiert durch das *lasI* Gen) bildet den Autoinducer N-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton (auch PAI-1, 3OC₁₂-HSL oder OdDHL genannt). PAI-1 wird aktiv (MexAB-OprM Pumpe) aus der Zelle ausgeschleust. Bei Erreichen eines extrazellulären Konzentrationsschwellenwertes kommt es zu einer Bindung von PAI-1 an LasR, welches anschließend zu einer positiven Regulierung der *lasI* Promotorregion und damit zu einer stärkeren Expression von *lasI*, sowie einer verstärkten Bildung von PAI-1 führt. Zusätzlich kommt es zu einer positiven Regulation des *rhlR* Promotors. Wird das RhlR Protein nun durch den zweiten

Autoinducer N-butanoyl-L-Homoserinlacton (auch PAI-2, C₄-HSL oder BHL genannt) aktiviert, kommt es in Folge dessen zu einer Expressionsaktivierung des für die Bildung von PAI-II zuständigen *rhII* Gens, sowie zur Hochregulierung der für die Bildung der Rhamnosyltransferasen zuständigen Gene (*rhIA* und *rhIB*). Interessanterweise ist PAI-I in der Lage RhlR zu inhibieren, was bedeutet das die Interaktion der beiden QS-Systeme nicht nur auf Transkriptionsebene, sondern auch auf posttranskriptionaler Ebene stattfindet [44]. Versuche von Pearson et al. zeigten, dass das Las-System deutlich träger als das Rhl-System auf die Aktivierung durch ihre jeweiligen Autoinducer reagiert [45]. Dies ist in ihrer Membrangängigkeit begründet. Während PAI-II frei über die Zellmembran diffundieren kann, und sich innerhalb von 30s einen Konzentrationsgleichgewicht einstellt, scheint bei PAI-I aktive Transportvorgänge für den Membrantransport zuständig zu sein, welche sich in einer Gleichgewichtseinstellung von bis zu 5 min und einem Konzentrationsunterschied von 3:1 über der Membran zeigen.

Rhamnolipide sind spezielle Metabolite. Ihre Bildung geht einher mit dem Einsetzen der stationären Wachstumsphase. Der aufwärts von *rhIA* gelegene Promotorbereich verfügt mutmaßlich über einen Typ σ^{70} bzw. σ^{54} Promotor, welcher durch Umweltsignale, wie z.B. Stickstoffverfügbarkeit reguliert wird [46]. Bei Versuchen mit ruhenden Zellen von *Pseudomonas species* DSM 2874 verursachte die Zugabe einer Stickstoffquelle eine Inhibierung der Rhamnolipidbildung [25]. Einen weiteren positiven Effekt auf die Bildung von Rhamnolipiden konnte auch durch die Limitierung von Mg-, Ca-, K-, Na-, Fe-Ionen erreicht werden [47].

4.3.3 Prozessführungsstrategien & Stand der Technik

Im Wesentlichen kommen vier Prozessführungsstrategien für die biotechnologische Rhamnolipidproduktion in Frage. Die gebildete Produktmenge als auch die Produktzusammensetzung hängen dabei von verschiedenen Faktoren, wie z.B. dem verwendeten Stamm, dem Substrat, sowie den Kultivierungsbedingungen ab. Was die Prozessführung betrifft, kommen absatzweise (batch) bzw. absatzweise Fermentationen mit Zufütterung (fed-batch) am häufigsten zur Anwendung für die Rhamnolipidproduktion [22]. Allen Prozessführungsstrategien ist gemein, dass sie eine stationäre Wachstumsphase erreichen und unter wachstumslimitierenden Bedingungen ablaufen. Des Weiteren ist eine besser Produktbildung zu erwarten, wenn es im Prozessverlauf zu einer Limitierung von zumindest einer Nährsalzkomponente (z.B. der N-Quelle) kommt [26].

Eine ebenfalls gut untersuchte Methode zur Rhamnolipidherstellung beruht auf einer zweistufigen Prozessführung und Verwendung von ruhenden Zellen [25]. Hierbei dient die erste Prozessstufe der Biomassebildung. In der zweiten Prozessstufe erfolgt unter wachstumslimitierten Bedingungen die eigentliche Rhamnolipidproduktion. Die höchsten mit dieser Prozessführung erreichten Rhamnolipidkonzentrationen lagen bei 45 g/l Rhamnolipid [23]. Eine zweistufige Prozessführung kombiniert aus den beiden oben beschriebenen Methoden, bei der sowohl in der 1. als auch in der 2. Prozessstufe Produkt gebildet wird, ist ebenfalls funktionell (Publikation V). Gleichfalls beschrieben sind kontinuierliche Fermentationsverfahren, mit volumetrischen Produktivitäten zwischen 0,007 - 2 g/l·h Rhamnolipid [48, 49]. Immobilisierte Zellen in einer semi-kontinuierlichen Prozessführung zeigten Produktbildungsraten von 43 mg/lh [22]. Eine umfangreiche Übersicht unterschiedlichster Verfahren zur mikrobiellen Rhamnolipidherstellung ist in Tab. 4.4 aufgezeigt.

Tab. 4.4 Verfahrensübersicht zur mikrobiellen Herstellung von Rhamnolipiden.

* aus [22]. Abkürzung n.b. = nicht bekannt.

Prozesstyp	Stamm	C-Quelle [g/l]	RL [g/l]	$Y_{p/s}$	X [g/l]	$Y_{p/x}$	t [h]	P_v [g/lh]	Referenz
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i>	Glycerol [30]	2,50	0,08	n.b.	n.b.	96,00	0,03	Jarvis & Johnson 1949
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i>	Glycerol [30]	2,00	0,07	n.b.	n.b.	120,00	0,02	Hauser & Karnovsky 1954
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i>	Glycerol [10]	1,00	0,10	1,47	0,68	192,00	0,01	Santa Anna et al., 2002
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> KY 4025	n-Paraffin [90]	8,50	0,09	n.b.	n.b.	144,00	0,06	Itoh et al., 1971; Itoh & Suzuki, 1972
S/Batch/Fed-batch	<i>P. sp.</i>	n-Paraffin [50]	14,00	0,28	n.b.	n.b.	120,00	0,12	Yamaguchi et al. 1976
S/Batch/Fed-batch	<i>P. sp.</i> MUB	n-C14/15 [20]	2,90	0,15	3,40	0,85	48,00	0,06	Wagner et al., 1983 [*]
S/Batch/Fed-batch	<i>P. sp.</i> DSM 2874	n-C14/15 [80]	12,80	0,16	21,0	0,61	180,00	0,07	Wagner et al., 1984 [*] ; Syldatk et al., 1985a
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> UI 29791	Maisöl [75]	46,00	0,61	12,0	3,83	192,00	0,24	Linhardt et al., 1989; Daniels et al., 1988 [*]
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> UG 2	Maisöl [12,75]	2,10	0,17	n.b.	n.b.	384,00	0,01	Mata-Sandoval et al., 2001 [*]
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> PTCC1637	Maisöl [250]	12,50	0,05	n.b.	n.b.	120,00	0,10	Tahzibi et al, 2004
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> 44T1	Olivenöl [20]	7,65	0,38	6,00	1,28	72,00	0,11	Robert et al. 1989
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> 44T1	Olivenöl [20]	9,00	0,45	n.b.	n.b.	120,00	0,08	Parra et al. 1990 [*]
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> J4	Olivenöl [100]	3,60	0,04	n.b.	n.b.	138,50	0,03	Wei et al, 2005
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> DSM 7107 & 7108	Sojaöl [125]	78,00	0,62	n.b.	n.b.	167,00	0,47	Giani et al. 1997
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> DSM 7107 & 7108	Sojaöl [163]	112,00	0,69	n.b.	n.b.	264,00	0,42	Giani et al. 1997
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> LBI	Sojaöl (Abfall) [10]	11,72	1,17	1,48	7,91	144,00	0,08	Nitschke et al., 2005a
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> DS10-129	Sojaöl [6]	4,31	0,72	8,00	0,53	288,00	0,01	Rahman et al, 2002
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> BYK-2 KCTC 18012P	Fischöl [25]	17,00	1,47	5,30	3,20	216,00	0,08	Lee et al., 2004
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> BYK-2 KCTC 18012P	Fischöl [30,2]	22,70	0,75	6,10	3,72	264,00	0,09	Lee et al., 2004
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> IFO 3924	Ethanol [55]	32,00	0,58	3,40	9,41	168,00	0,19	Matsufuji et al. 1997 [*]
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> IFO 3924	Ethanol [65]	32,00	0,49	n.b.	n.b.	192,00	0,17	Nakata et al. 1998
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> S2	Glucose [40]	6,06	0,15	2,62	2,31	480,00	0,01	Chen et al., 2007a
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> S2	Glucose [40]	2,40	0,06	n.b.	n.b.	141,20	0,02	Chen et al., 2007b
S/Batch/Fed-batch	<i>P. a.</i> S2	Glucose [40]	5,30	0,13	n.b.	n.b.	53,00	0,10	Chen et al., 2007b
Prozesstyp	Stamm	C-Quelle [g/l]	RL [g/l]	$Y_{p/s}$	X [g/l]	$Y_{p/x}$	t [h]	P_v [g/lh]	Referenz
Batch ruhende Zellen	<i>P. sp.</i> DSM 2874	n-C14 [80]	18,50	0,23	5,00	3,30	280,00	0,07	Syldatk et al. 1984 [*]
Batch ruhende Zellen	<i>P. sp.</i> DSM 2874	n-C14/15 [40]	10,00	0,25	5,00	2,00	168,00	0,06	Syldatk et al. 1985b
Batch ruhende Zellen	<i>P. sp.</i> DSM 2874	Sojaöl [40]	7,50	0,18	5,00	1,50	168,00	0,04	Syldatk et al. 1985b
Batch ruhende Zellen	<i>P. sp.</i> DSM 2874	Glycerol [40]	8,50	0,21	5,00	1,70	168,00	0,05	Syldatk et al. 1985b
Batch ruhende Zellen	<i>P. sp.</i> DSM 2874	Glucose [20]	4,50	0,11	5,00	0,90	168,00	0,03	Syldatk et al. 1985b
Fed-batch ruhende Zellen	<i>P. sp.</i> DSM 2874	Ölsäure [198]	45,00	0,23	10,08	4,46	1080,00	0,04	Trummer et al., 2003
Prozesstyp	Stamm	C-Quelle [g/l]	D[1/h]	$Y_{p/s}$	X [g/l]	P_s [g/g*h]	P_v [g/lh]		
Konti	<i>P. a.</i> DSM 2659	Glucose [20]	0,14	0,05	2,40	0,06	0,13		Gruber et al., 1993
Konti	<i>P. a.</i> DSM 2659	Glucose [20]	0,05	0,08	2,50	0,03	0,007		Gruber et al., 1993
Konti	<i>P. a.</i> DSM 2659	Glucose [20]	0,18	0,15	13,3	0,04	0,55		Gruber et al., 1993
Konti	<i>P. a.</i> DSM 2659	Glucose [20]	0,10	0,15	7,70	0,04	0,29		Gruber et al., 1993
Konti	<i>P. a.</i> DSM 2659	Maisöl [40]	0,10	0,48	0,80	0,06	2,00		Ochsner et al, 1996 [*]
Semi-Konti immobilisiert	<i>P. sp.</i> DSM 2874	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,02	0,04		Siemann & Wagner, 1993 [*]

4.3.4 Wirtschaftliche Aspekte und Anwendungsbereiche der Rhamnolipide

Qualitativ lassen sich die in Kapitel 3.1 erwähnten wirtschaftlichen Prognosen durch eine Sichtung der Patent- und Publikationslage der vergangenen 20 Jahre verifizieren.

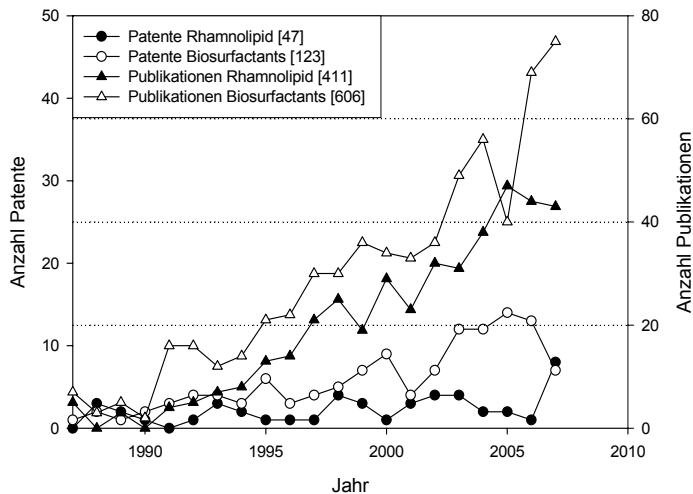


Abb. 4.8 Anzahl an neueren Patente und Publikationen zu den Stichworten „Rhamnolipid“ und „Biosurfactants“. Stand November 2007. (Quellen: European Patent Office (EPO) (<http://ep.espacenet.com>); ISI web of knowledge (<http://portal.isiknowledge.com>)).

Abb. 4.8 gibt exemplarisch die Ergebnisse einer Patent- und Publikationssuche über 20 Jahre nach den Stichworten „Rhamnolipid“ und „Biosurfactants“ in den Datenbanken der European Patent Office und der Literaturechercheplattform ISI web of knowledge, wieder (<http://ep.espacenet.com>; <http://portal.isiknowledge.com>). Geht man davon aus, dass Rhamnolipide auch dem Stichwort der „Biosurfactants“ zuzuordnen sind, wird weiter deutlich, dass Rhamnolipide die am meisten publizierten und patentierten Biotenside zu sein scheinen.

Lang und Wullbrandt bestimmten die Produktionskosten biotechnologisch hergestellter Rhamnolipide im Fermentationsmaßstab von 20 – 100 m³ zu 20 – 5 US \$/kg [50]. Im Gegensatz hierzu liegen die Herstellungskosten synthetischer Tenside wie Ethyloxylat oder Alkylpolyglucosid bei 1 – 3 US \$/kg. Eine weitere Kostensenkung bei der Herstellung von Rhamnolipiden in Kombination mit einem weiter steigenden Erdölpreis, könnte deshalb zu einer Ausweitung ihrer Nutzung führen.

Zurzeit scheint es nur zwei Firmen zu geben, die Rhamnolipide kommerziell herstellen. Dabei handelt es sich um die Firma Jeneil Biosurfactant Co.,LLC (400 N. Dekora Woods Blvd. August, Saukville, WI 53080, USA), sowie die Rhamnolipid Inc.(25 Second Street Suite 340,St. Petersburg, Fl 33701,USA). Über die genauen

Herstellungsverfahren ist nichts bekannt, außer dass sie biotechnologisch mit Hilfe von *Pseudomonas species* Stämmen produziert werden.

Der aktuelle Marktpreis rangiert von 200 US \$/kg für eine 20 % Rhamnolipidformulierung technischer Qualität (Jeneil JBR 425) bis hin zu 6000 US \$/kg für ein >99% reines Gemisch aus Rhamnolipid 1 & 3 (Jeneil JBR 599) (persönliche Kommunikation D. Develter, Leiter F & E, Ecover N.V., Belgien).

Im größten bekannten Maßstab von 17 m³ wurden Rhamnolipide von der Hoechst AG hergestellt, bis diese 1999 mit dem französischen Chemiekonzern Rhône-Poulencin fusionierte und hierauf die Rhamnolipidproduktion eingestellt wurde [51].

Die potenziellen Applikationenbereiche von Rhamnolipiden sind vielseitig. Einen groben Überblick versucht die folgende Aufstellung zu geben:

- Umweltsanierung

In der biologischen Bodensanierung, v.a. in Böden die mit organischen Stoffen wie z.B. Mineralölprodukten kontaminiert sind, führt die Zugabe von Rhamnolipiden zu einem verbesserten Abbau, da sie die biologische Verfügbarkeit dieser meist hydrophoben Substanzen deutlich verbessern [52]. Beispielsweise erhöhen Rhamnolipide die Mobilisierung von Hexadecan und Phenantren in kontaminierten Böden besser als chemische Tenside wie SDS oder Tween 80 [53].

- Tertiäre Erdölförderung

Die für die Bodensanierung beschriebenen Eigenschaften der Rhamnolipide lassen sich prinzipiell auch für die Erdölförderung nutzen. Diese vor allem in den 1970er und 1980er erdachte Anwendung zur tertiären Erdölförderung wurde aber bisher, vermutlich aus Kostengründen, noch nicht im großindustriellen Maßstab umgesetzt. Publikationen zu diesem Thema in den letzten Jahren zeigen jedoch, dass diese Art der potenziellen Anwendung immer noch von Relevanz ist [54, 55].

- Haushalts- und Reinigungsprodukte

Rhamnolipide werden bereits heute in Haushaltsreinigern eingesetzt. Als Beispiel sei der Glas- und Flächenreiniger der belgischen Firma Ecover N.V. (Industrieweg 3, 2390 Malle, Belgien) genannt, welcher vergleichbare Reinigungswirkung wie konventionelle Reiniger erzielt. Das Produkt ist umweltfreundlich, sowie rasch und vollständig biologisch abbaubar. Rhamnolipid wirkt hierbei synergetisch in Kombination mit weiteren Tensiden (persönliche Kommunikation D. Develter, Leiter F & E Ecover N.V.)

- Kosmetik

Inzwischen werden Rhamnolipide ebenfalls in Kosmetikprodukten eingesetzt. Als Anwendungen sind zu nennen sogenannte „Anti-aging“-Produkte, Augencremes, Körperlotionen, Wund- und Heilsalben wie auch Duschgels und Babyreinigungstücher. Hauptgründe hierin Rhamnolipide einzusetzen sind die guten Tensideigenschaften, z.B. für die Emulsionsbildung in Cremes, sowie ihre antibakteriellen/fungizide Wirksamkeit in Kombination mit einer guten Verträglichkeit (<http://www.aurorabeautylabs.com>; [27, 56]).

- Medizin

Auch für pharmazeutische Präparate finden sich Einsatzbereiche für Rhamnolipide aufgrund ihrer antimykotischen/antibakteriellen/bakteriostatischen Eigenschaften [57, 58]. Beispielsweise konnte eine antimikrobielle und antiadhesive Wirkung gegen *Mycobacterium tuberculosis* nachgewiesen werden [59]. Untersuchungen von Stipcevic et al. zeigten, dass Rhamnolipide auch zu einer beschleunigten Abheilung von Brandwunden führen [60].

- Lebensmittelverfahrenstechnik

Die eben genannten Eigenschaften, können auch bei der Beschichtung von Lebensmittel bzw. Lebensmittelverpackungen Verwendung finden. Auch für die Verbesserung der Eigenschaften von Backerzeugnissen, in Bezug auf Stabilität, Textur, Härte, Form, Volumen etc., können Rhamnolipide eingesetzt werden [61]. Die Verwendung als Emulgator ist ebenfalls denkbar [62]. Weiterhin kann aus Rhamnolipiden durch Biotransformation oder chemische Hydrolyse L-Rhamnose gewonnen werden [63]. Diese wiederum dient als Ausgangssubstanz für 2,5-Di-methyl-4-hydroxyfuran-3-on, eines der süßesten Aromen das bekannt ist, und eine natürliche Aromakomponente von Ananas- und Erdbeeraroma ist [64].

- Landwirtschaft

Auf ihren antimykotischen Eigenschaften beruht der Einsatz von Rhamnolipiden als Bestandteil des Biofungizids ZONIX™™ (Jeneil Biosurfactant Company, 400 N. Dekora woods Blvd. Saukville, WI 53080, USA). Die Zulassung erfolgte 2004. Der Anwendungsbereich ist die Kontrolle und Vermeidung von pflanzenpathogenen Pilzen im Gartenbau und der Landwirtschaft. (Quelle: US Environmental Protection Agency; http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/product/prod_110029.htm).

4.4 Schaum und Schaumzerstörung

Eines der Hauptprobleme bei der biotechnologischen Produktion von Rhamnolipiden, stellt im Allgemeinen die exzessive Schaumbildung dar. Die Ursache hierfür liegt in der Notwendigkeit einer aeroben Prozessführung, welche meist durch Begasung mit Luft oder O₂ standardmäßig erfolgt, in Kombination mit der Bildung eines sehr oberflächenaktiven Produktes.

Als Schaum wird ein disperses System aus Gas und Flüssigkeit bzw. Gas und Feststoff bezeichnet, wobei der Volumenanteil der Gasphase überwiegt. Wird eine reine Flüssigkeit begast, bildet sich eine aus Blasen aufgebaute Sprudelschicht, die in sich zusammenfällt sobald die Begasung aufhört. In Anwesenheit grenzflächenaktiver Substanzen, welche die Grenzflächenspannung verringern und

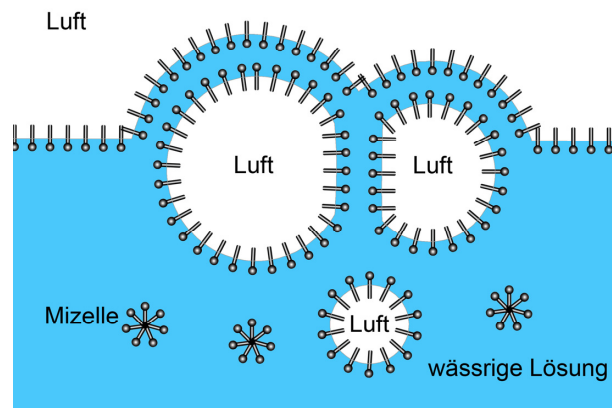


Abb. 4.9 Schematische Darstellung der Schaumbildung durch eingebrachte Luft in eine tensidhaltige, wässrige Lösung.

der Oberfläche viskoelastisches Verhalten verleihen, kommt es zur Ausbildung von stabilen Schaumlamellen (siehe Abb. 4.9). Die Stabilität des gesamten Schaumes wird dabei von der Beschaffenheit des Oberflächenfilms der die Gasblase umgibt entsprechend der Stabilität der Einzellamelle bestimmt. Tenside reichern sich aufgrund ihres amphiphilen Charakters in der Oberfläche an. Dabei ändert sich die Grenzflächenspannung σ mit der Raumphasenkonzentration c in Abhängigkeit der Grenzflächenbelegung Γ . Dies lässt sich mit einem thermodynamischen Gibbs-Ansatz beschreiben (2.1):

$$(1.1) \quad \left(\frac{d\sigma}{R \cdot T \cdot d \ln c} \right)_T = -\Gamma$$

Mit R die allgemeine Gaskonstante
 T die Absoluttemperatur

Als Gibbs-Effekt wird der Sachverhalt bezeichnet, dass die Tensidgesamtmenge je Lamellenabschnitt auch bei vergrößerter Oberfläche konstant bleibt, und das hierbei die Spannung auch nach der Einstellung des stofflichen Gleichgewichts höher ist als im ungedehnten Zustand. Die Tenside verleihen der Lamelle somit elastische Eigenschaften [65].

Als kennzeichnende Größe von Gas/Flüssigkeitssystemen kann der Gasanteil herangezogen werden (1.2):

$$(1.2) \quad \varphi = \frac{V_G}{(V_G + V_{FL})}$$

Mit V_G = Gasvolumen
 V_{FL} = Flüssigkeitsvolumen

Wie in Abb. 4.10 gezeigt, lassen sich zwei Schaumarten unterscheiden. Direkt über der Flüssigkeit liegt Kugelschaum mit einem hohen Flüssigkeitsanteil vor ($(1 - \varphi) = 0,54 \leq \varphi \leq 0,74$), wobei φ für den Gasanteil steht). Die Schwerkraft sowie Verdunstung führen zu einer Drainage des Schaums, so dass sich der anfängliche Kugelschaum zu Polyederschaum wandelt. Schaumzerstörung resultiert aus Lamellenzerstörung und lässt auf folgende Grundprinzipien zurückführen [65]:

- Beschleunigung der Drainage
- Minimierung der Lamellendicke
- Minimierung der Tensidgrenzflächenbelegung
- Reduktion der gesamten Tensidmenge im Schaum

Grundsätzlich lässt sich Schaum auf chemische, thermische und mechanische Weise bekämpfen. Ein detaillierter Überblick hierzu ist in Tab. 4.5 aufgeführt.

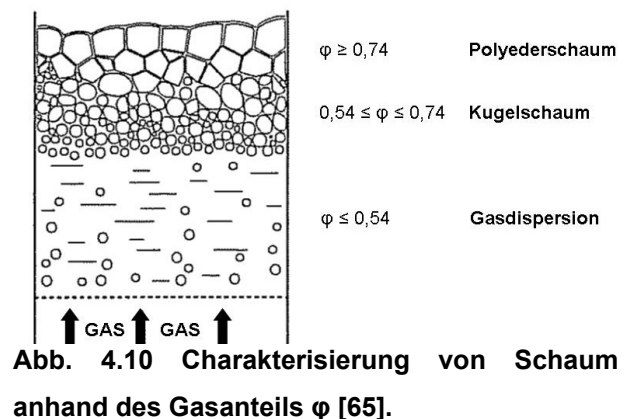


Abb. 4.10 Charakterisierung von Schaum anhand des Gasanteils φ [65].

Tab. 4.5 Unterschiedliche Schaumzerstörungsmethoden im Überblick nach [65].

	Verfahren	Wirkprinzip	Anwendungsgebiet	Vorteile/Nachteile
Chemische Schaumzerstörung	Zugabe von Chemikalien zum Reaktormedium	Lokale Verminderung der Grenzflächen- spannung Beschleunigtes Ausdünnen der Lamellen durch Spreitung der Schaumbrecher auf der Lamellengrenzfläche und Mitreißen grenzflächen-naher Flüssigkeit.	Problemschäume, d.h. hohe Gasdurchsätze, geringe Blasengrößen, hohe Tensidkonzentration	+ sehr wirkungsvoll + geringer apparativer Aufwand + Verhinderung der Schaumbildung
	Aufsprühen der Chemikalien nach Bedarf	Verdrängen schaumstabilisierender Substanzen aus der Grenzfläche Beschleunigte Drainage Verminderung der Grenzflächenelastizität Ausbildung von starren Mischfilmen Herabsetzen elektrostatischer Abstoßung		- Rückgang des Stoffübergangs um bis zu 50% - Kontamination des Produktes, aufwendige Reinigung - Umweltprobleme bei der Entsorgung - teuer
Thermische Schaumzerstörung	Gefrieren	Abkühlen der Schäumerlösung unter die Schmelztemperatur		- hoher Energiebedarf
	Erwärmen durch Kontakt mit Heizflächen oder Dampf Mikrowellen Infrarotstrahlung Warmluftapplikationen	Verdampfen von Lamellenflüssigkeit Beschleunigte Drainage durch Viskositäts- erniedrigung Direkter Bruch von Schaumlamellen Mikrowellen erhitzen den ganzen Schaum auf einmal, v.a. die Plateauränder	Schaumfraktionierung, Destillation, thermisch stabile Medien	+ universell - Verkrustung an den Wärmetauschern - Verunreinigung des Mediums - hoher Energiebedarf - nur begrenzt in der Biotechnologie einsetzbar
Mechanische Schaumzerstörung	Rotierende Einbauten	Aufbringen von Scherkräften, Beschleunigungskräften, Zentrifugalkräften, Corioliskräften Schaumverdichtung durch Trennung in Gasphase und Sekundärschaum Abgeschleuderte Flüssigkeit zerstört Lamellen	Schäume Viskosität	niedriger + universell + erzeugt häufig fließfähigen Sekundärschaum - hohe Investitionskosten - schnell bewegte Teile - Erzeugung von Sekundärschaum kann zum Fluten führen
	Zyklone	Beschleunigung der Drainage in den Lamellen durch Zentrifugalkräfte, Scherbeanspruchung	Flotationsschäume	+ Hoher Mengendurchsatz - Hoher Energieverbrauch zur Vakuumherzeugung
	Zentrifugen, Vakuumentrifugen mit Zwangsführung	Beschleunigung der Lamellenaustrocknung Stoßvorgänge	Hochviskose, feinblasige Schäume; Lebensmitteltechnik	- schwierige Reinigung - hohe Investitionskosten
	Ultraschall	Starke Druckwechsel, Kavitation	Höherviskose Schäume, Filmemulsionen, flüssigkeitsreiche Kugelschäume	- geringe Wirksamkeit
	Schaumsirenen, Pfeifen, Hörner	„periodische Zerstörungskräfte“ Induzierte Resonanzschwingungen Rayleighscher Strahlungsdruck Schallwind erzeugt Turbulenzen Oberflächenwellen		- hohe Lärmbelastung - hoher Energieverbrauch
	Ejektor mit Prallplatte	Beschleunigungskräfte		
	Düsen und Membrane	Druckwechsel im Schaum beim Pressen durch die Düse oder Membrane		
	Flüssigkeitssprays Dispergieren mit rotierender Scheibe Tropfenberegnung mit Brausen	Zerschlagen von Lamellen Störung von Adsorptionsschichten durch schnell aufgesogene Flüssigkeit		+geringe Investitionskosten + wenig bewegliche Teile - Flüssigkeitsanteil im Schaum wird erhöht - für grobblasige Schäume
Poröse Materialien	Koaleszenzförderung durch ruhende Einbauten Mechanische Energie wird durch Druckverlust erbracht	Niedrigviskose Schäume	+ geringe Investitionskosten + auch für kleinblasige Schäume + keine beweglichen Teile + weitgehend Wartungsfrei - für geringen Schaumanfall	

Chemische Antischaummittel sind im Allgemeinen extrem oberflächenaktive Substanzen mit begrenzter Wasserlöslichkeit, wie z.B. Silikonöl. Sie lassen sich dann einsetzen, wenn hierdurch die Produktqualität, bzw. in der Biotechnologie zusätzlich der Produktionsorganismus, nicht negativ beeinflusst werden. Aus letzterem Grund scheidet auch die thermische Schaumzerstörung für die Anwendung bei biotechnologischen Produktionsprozessen weitestgehend aus, zudem sie sich auch im Vergleich zu den anderen Methoden als ineffektiv erwiesen hat. Im industriellen Maßstab kommt am häufigsten die mechanische Form der Schaumzerstörung zur Anwendung. Sie basiert auf der Scherbeanspruchung oder Zentrifugalbeschleunigung der Schaumlamellen, Druckwechselwirkungen innerhalb des Schaumzerstörers, sowie der Aufprallwirkung des gebildeten, verdichteten Sekundärschaums gegen den Primärschaum bzw. die Behälterwand [66].

Eine Vielzahl von Methoden zur mechanischen Schaumkontrolle wurde bisher entwickelt. Hierzu zählen:

- Injektoren, Ejektoren, Blenden – hier wird der Scherbeanspruchung eine plötzliche Druckentspannung überlagert, damit die Blase zerbersten.
- Zentrifugen, Zykclone – es wird der Zentrifugalkraft eine Scherbeanspruchung überlagert.
- Zerstörung des Primärschaums durch Beregnen mit arteigener Flüssigkeit.
- Rotierende Scheiben, Schaufelräder, Rührer – die Scherbeanspruchung wird durch schnelle Druckwechsel unterstützt.

Rotierenden, mechanischen Schaumzerstörern ist gemein, dass sie eine Mindestgeschwindigkeit benötigen um wirksam zu werden. Zu hohe Drehzahlen bewirken hingegen eine verstärkte Bildung von kleinblasigem Sekundärschaum, welcher wiederum zu einer Schaumstabilisierung im System führt [67]. Eine exemplarische Übersicht verschiedener mechanischer Schaumzerstörungssysteme geben die Abb. 4.11 und Abb. 4.12 wieder:

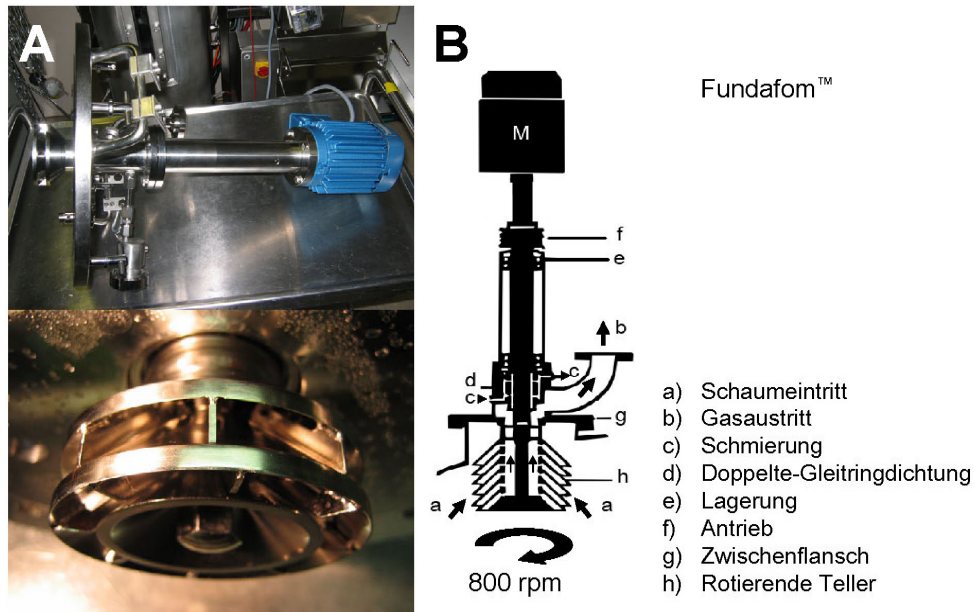


Abb. 4.11 Fundafom™ - Systems (Sartorius Stedim Systems GmbH, Schwarzenberger Weg 73 – 79, 34212 Melsungen, Deutschland) zur Schaum/Gasseparation wie es am Lehrstuhl für Technische Biologie der Universität Karlsruhe (TH) eingesetzt wird. A: Reaktordeckel Biostat Cplus mit integriertem Fundafom-System. B: Funktionsprinzip.

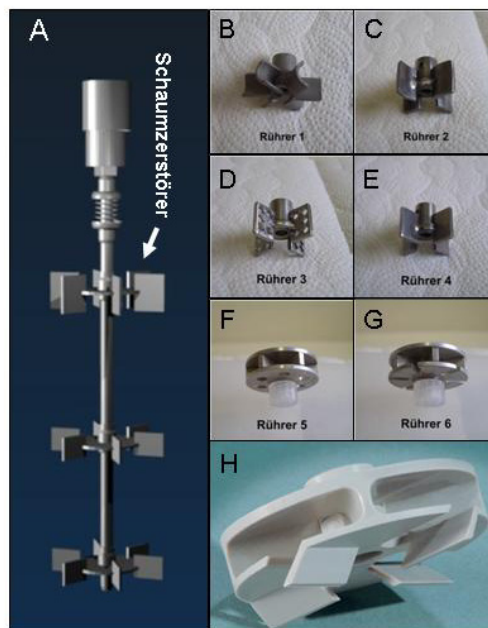


Abb. 4.12 Einfache Schaumerstörungsrührer wie sie am Lehrstuhl für Technische Biologie der Universität Karlsruhe (TH) eingesetzt werden. A: Installationsprinzip auf der Rührerachse. B & C: Hohlblattrührer. D: 4-Blatt-Lochrührer. E: 4-Blatt-Rührer. F & G: Scheibenrührer mit unterschiedlichen Schaumeinlässen. H: Kommerziell erhältlicher Schaumerstörer FoamDisk™ (Sartorius Stedim Systems GmbH, Schwarzenberger Weg 73 – 79, 34212 Melsungen, Deutschland).

Die Vorteile des in Abb. 4.11 gezeigten Fundafom-Systems liegen in den guten Maßstabsvergrößerungsmöglichkeiten, sowie der von der Rührerdrehzahl des Reaktorrührers unabhängigen Drehzahleinstellung. Als Nachteil können die Investitionskosten als auch die mangelnde Maßstabsverkleinerungsmöglichkeiten gesehen werden. In der Größenordnung von Klein- und Laborreaktoren stellen daher die Schaumzerstörungsrührer, wie sie in Abb. 4.12 gezeigt sind, eine Alternative dar. Sie sind kostengünstig und lassen sich ohne Probleme in bestehende Reaktorsysteme integrieren. Als Nachteil ist anzusehen, dass die Drehzahl nicht unabhängig vom Reaktorrührer eingestellt werden kann.

4.5 ATR-FTIR Spektroskopie

Zur Kontrolle von Bioprozessen werden üblicherweise nur wenige Prozessparameter, wie z.B. pH, pO_2 , Temperatur, CO_2 und O_2 kontinuierlich gemessen und geregelt. Zusätzliche Informationen die zur Prozessführung benötigt werden, basieren auf Daten die aus diskontinuierlichen Probenahmen gewonnen werden. Die endgültigen Analyseergebnisse weisen meist eine erhebliche Zeitverzögerung zur Probennahme auf. Alternativen, zu den meist angewendeten langsamen, naßchemischen Analysemethoden, welche oft auf enzymatischen Reaktionen oder Trenntechniken wie HPLC beruhen, sind daher wünschenswert [68].

Eine Alternative hierzu können verschiedene spektroskopische Methoden darstellen. Sie haben das Potenzial rasche und befriedigende Lösungen für Routineanalysen zu liefern. Eine Vielzahl von Substanzen können mittels spektroskopischer Methoden identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden [69].

Eine weit verbreitete und gut etablierte spektroskopische Methode ist die „Fourier Transformations Infrarot Spektroskopie“, kurz FTIR-Spektroskopie. Für die quantitative Analyse von komplexen Analyt/Matrix Kombinationen verlangt diese Methode jedoch einiges an Erfahrung und Zeit. Nach Etablierung einer quantitative Analysemethode, liefert diese Ergebnisse mit geringen Analysezeiten und kann als Ersatz, z.B. für langwierige HPLC Methoden, angewendet werden [70].

Ein allgemeines Problem der Anwendung der IR-Spektroskopie liegt in der starken IR-Absorption des Wassers. Da biologische Prozesse in wässrigen Systemen ablaufen, kann dies teilweise problematisch für die Analyse sein, v.a. wenn die IR-Messung in Transmission durchgeführt wird. Um auch in wässrigen Systemen Messungen durchzuführen zu können, ist es notwendig, die Absorption des Wassers so gering als möglich zu halten, was durch eine Trocknung der Probe oder Verringerung der Probenstrecke erreichbar ist.

Eine elegante Lösung hierzu liefert die ATR-FTIR-Spektroskopie (Abgeschwächte Totalreflexions – FTIR – Spektroskopie). Der schematische Aufbau eines ATR-FTIR-Spektrometers ist in Abb. 4.13 wiedergegeben.

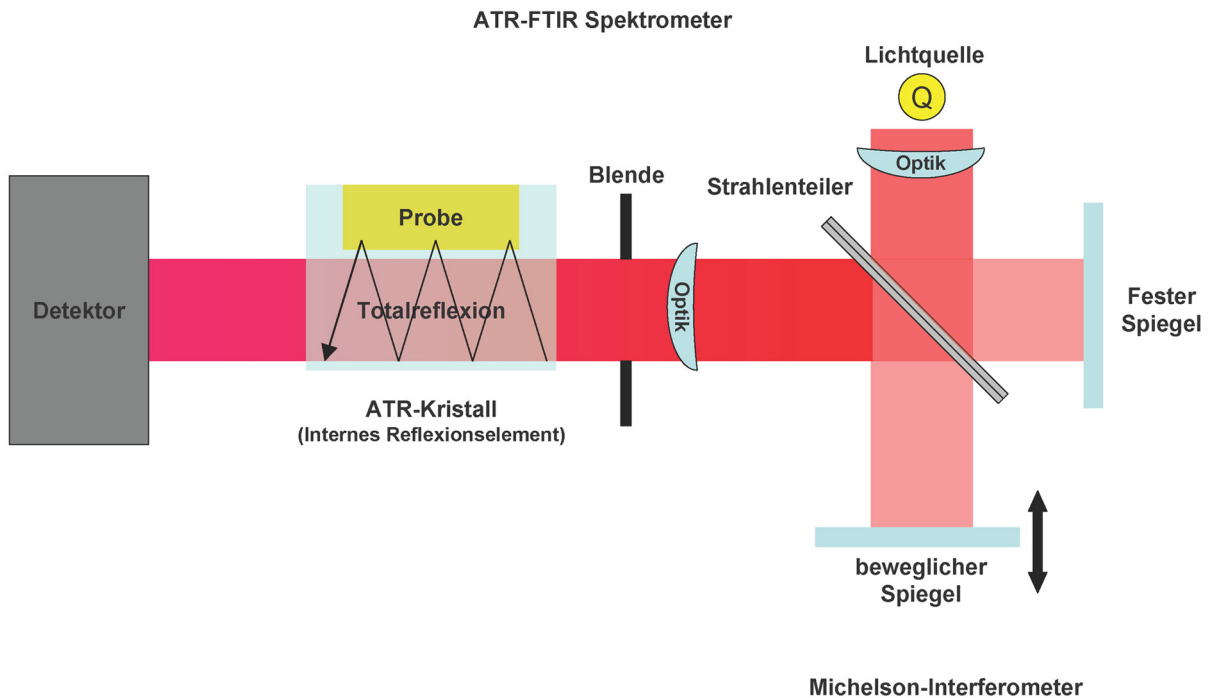


Abb. 4.13 Schematische Darstellung eines FTIR-Spektrometers mit ATR-Probenkammer.

Ein ATR-FTIR-Spektrometer besteht aus folgenden Komponenten:

Einer thermischen Strahlungsquelle die eine Strahlungscharakteristik vergleichbar einem planckschen Strahler hat. In der IR-Spektroskopie kommen heute hierfür erhitzte Siliziumcarbid-Stäbe, sogenannte Globare, zum Einsatz.

Der Strahlengang besteht aus einer Anordnung von parabolischen und planen Spiegeln, die die Strahlung der Quelle auf das Interferometer fokussiert. Dieses besteht aus einem Strahlenteiler, und erzeugt aus dem einen von der Strahlungsquelle kommenden Strahl zwei Strahlen. Ein Strahl wird hierbei auf einen fixen Spiegel gelenkt, der andere trifft auf einen beweglichen Spiegel, bevor die beiden Strahlen wieder vereinigt werden. Infolgedessen weisen die beiden Strahlenhälften beim Rekombinieren auf dem Strahlenteiler eine Wegdifferenz auf. Konstruktive Interferenz, d.h. maximalen Strahlungsfluss am Interferometerausgang wird nun für eine bestimmte Wellenlänge genau dann erhalten, wenn die Wegdifferenz des Strahls der auf den beweglichen Spiegel trifft, ein ganzzahliges Vielfaches des ersten Strahls ist. Für alle anderen Wellenlängen aus dem breitbandigen IR-Spektrum der IR-Quelle, erhält man eine destruktive Interferenz, d.h. eine Abnahme des Detektorsignals. Dieses wird minimal bei einer Wellenlängenverschiebung um ein ungerades Vielfaches einer halben Wellenlänge. Als Referenzstrahlungsquelle, zur

Bestimmung des Ortes des beweglichen Interferometerspiegels, kommt meist ein HeNe-Laser mit definierter Wellenlänge ($\lambda = 633 \text{ nm}$) zum Einsatz.

Der sich in seinen Intensitätswellenlängenmaxima kontinuierlich verändernde Strahl wird nun in einem Winkel größer seinem Totalreflexionswinkel, in das interne Reflexionselement (ATR-Kristall) geleitet. Hinter der reflektierenden Grenzfläche bilden sich nun evaneszente (dahinschwingende) Lichtwellen aus. Diese dringen hierbei einige Wellenlängen tief in das optisch dünnere Medium (wässrige Probe) ein. Die einfache Eindringtiefe des IR-Strahls beträgt in Abhängigkeit der verwendeten Wellenlänge nur $1 - 5 \text{ }\mu\text{m}$. Hierbei kommt es zu wellenlängenspezifischen Absorptionserscheinungen an den Probenmolekülen, die charakteristischen chemischen Gruppen zugeordnet werden können. Die so veränderte Strahlungsenergie wird anschließend von einem Strahlungsdetektor in elektrische Signale umgewandelt. Das so vom Detektor erfasste Signal (Interferogramm), ist somit die Intensität der IR-Strahlung in Abhängigkeit von der Auslenkung des beweglichen Interferometerspiegels. Das so gemessene elektrische Signal wird anschließend mittels eines Computers einer Fourier-Transformation unterzogen. Die Grundidee hinter dieser Transformation ist, dass jedes Signal als Summe einer Folge von sinusförmigen Signalen gesehen werden kann, wobei jeder Sinus eine unterschiedliche Amplitude und Phase besitzt. Jeder dieser Sinusse repräsentiert eine einzelne Frequenz bzw. ein Frequenzband. Aus der Summe der Sinusse kann aus dem über die Zeit erfassten Detektorsignal das entsprechende Frequenzspektrum rekonstruiert werden. Man erhält das sogenannte Einkanalspektrum der Probe, in welchem nun dargestellt wird, mit welcher Intensität die einzelnen Frequenzen vertreten sind.

4.5.1 Multivariate Kalibrierung und PLS-Regression

Im Unterschied zur univariaten Kalibration, bei welcher die maximale Absorption einer Probe bei einer einzelnen, definierten Wellenlänge als Korrelationskriterium für die Kalibrierung herangezogen wird, findet bei der multivariaten Kalibration eine Vielzahl von spektralen Informationen aus einem Wellenlängenbereich Eingang in die Kalibration. In der Praxis hat sich als Kalibrationsmethode hierfür die sogenannte „**P**artial **L**east **S**quare (PLS-Regression) bewährt, welche dazu dient große

Datenmengen zu reduzieren und durch möglichst wenige Faktoren zu beschreiben. Zur Durchführung einer PLS-Regression für eine bestimmte Substanz müssen die Substanzspektren mit den entsprechenden Konzentrationswerten einer Referenzanalytik verglichen werden. Änderungen die in beiden Datensätzen auftreten, müssen erkannt und miteinander verknüpft werden. Hierfür werden zunächst beide Datensätze in Form einer Datenpunktmatrix niedergeschrieben (Abb. 4.14).

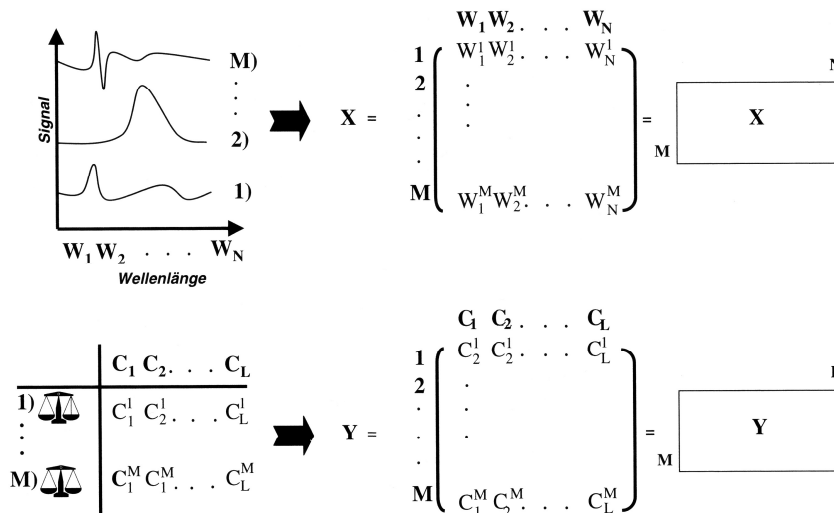


Abb. 4.14 Umwandlung von Spektral- und Konzentrationsdaten in Matrixschreibweise. In diesem Beispiel wurden zunächst M Kalibrationsproben vermessen. In einem weiteren Schritt wurden alle N Wellenzahlen der gemessenen Spektren zeilenweise in eine (M, N)-Matrix geschrieben. Diese Matrix entspricht der spektralen Datenmatrix X. Analog wurden alle L Komponentenwerte in eine (M, L)-Konzentrationsdatenmatrix Y geschrieben. [71]

Die so erhaltene Spektraldatenmatrix X und die Konzentrationsdatenmatrix Y werden anschließend in ihre Eigenvektoren faktorisiert, d.h. es findet eine Zerlegung der jeweiligen Datenmatrix in eine Faktorenmatrix (Loading-Matrix) und eine Matrix der Faktorengewichte (Score-Matrix) statt

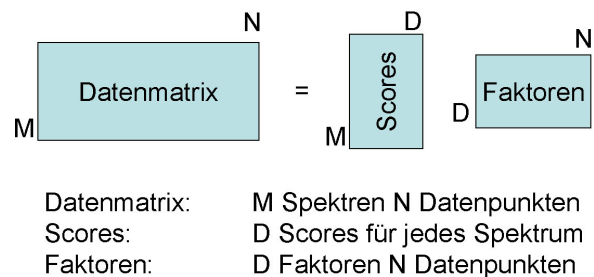


Abb. 4.15 Faktorisierung einer Spektral-datenmatrix. [71]

(Abb. 4.15). Die nun folgende Faktorenanalyse ist eine Varianzanalyse, bei der die Unterschiede der Datensätze betrachtet und in Faktoren wiedergegeben werden. Der erste Faktor spiegelt einen möglichst großen Teil der Gesamtvarianz wider, der

zweite Faktor einen möglichst großen Teil der verbleibenden Varianz usw. Mit zunehmender Faktorenzahl werden immer geringere Veränderungen in der Datenstruktur erklärt. Die Anzahl an verwendeten Faktoren (Rang) ist von zentraler Bedeutung für die Qualität eines PLS-Modells. Niedere Faktoren charakterisieren daher zumeist die für die spätere Auswertung wichtigen Veränderungen der spektralen Strukturen.

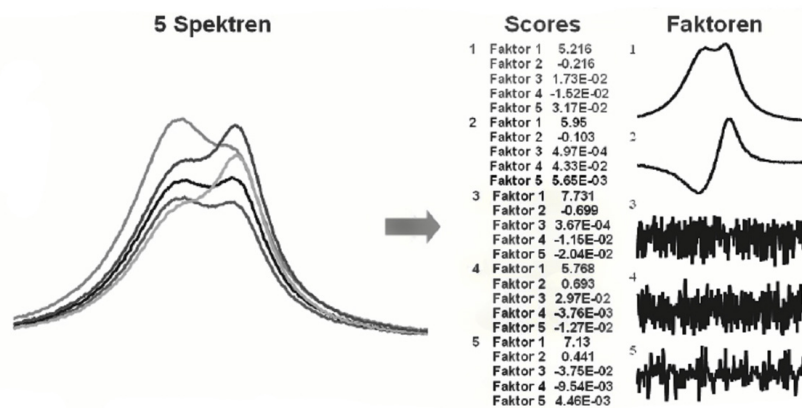


Abb. 4.16 Schematische Darstellung des Ergebnisses einer Faktorisierung. [72]

Bei einer zu geringen Zahl an ausgewählten Faktoren wird die spektrale Struktur nur ungenügend repräsentiert und man spricht von einem sogenannten „underfitting“. Auch die Auswahl einer zu großen Anzahl an Faktoren führt zu einer Verschlechterung der PLS-Modells, da hierbei die störenden Anteile des spektralen Rauschens mit in die Regression aufgenommen werden. Dies wird als „overfitting“ bezeichnet. Bei Erstellung einer Kalibration wird nun mittels des PLS-Algorithmus X- und Y-Matrix in Korrelation zueinander zu setzen. In einem nächsten Schritt werden die Scores der X- und Y-Matrix iterativ so verändert, dass sie möglichst identische Werte aufweisen und gleichzeitig möglichst geringe Abweichungen von den ursprünglichen Werten aufweisen. Die optimale Anzahl an Faktoren bzw. des verwendeten Ranges wird anschließend empirisch mittels einer Kreuzvalidierung bestimmt, wobei das PLS-Modell mit dem kleinsten PRESS (**P**redictive **R**esidual **E**rror **S**um of **S**quares: Summe über die Quadrate aller Vorhersagefehler) als das „beste“ Modell angesehen werden kann.

Für detaillierte Erläuterungen zur multivariaten Kalibration und PLS-Regression sei auf die für dieses Unterkapitel verwendete Originalliteratur verwiesen [71, 73].

5 Zusammenfassungen der Ergebniskapitel I-V

5.1 Zusammenfassung Kapitel I: Stammvergleich

Originaltitel:

Production of microbial rhamnolipids by *Pseudomonas* strains DSM 7108 and DSM 2874, utilizing mechanical foam destruction.

Verschiedene Spezies der Gattung *Pseudomonas* sind bekannt dafür unter wachstumslimitierten Bedingungen auf hydrophoben C-Quellen Rhamnolipide zu produzieren. Als erschwerender Faktor bei der biotechnologischen Herstellung dieser Biotenside ist an erster Stellen das exzessive Schaumbildungsvermögen der Kulturbrühe in Kombination mit der Notwendigkeit aerober Prozessbedingungen aufzuführen. Die folgende Abb. 5.1 zeigt das Ausmaß der Schaumbildung bei einer Fermentation nach einsetzender Rhamnolipidbildung und konventioneller Begasung mittels eines Begasungsringes.



Abb. 5.1 Schaumbildung während einer konventionell begasten Fermentation in einem 5 L Glasreaktor mit *Pseudomonas species* DSM 2874 auf Sonnenblumenöl nach ca. 72 h.

Zielsetzung war die Implementierungsmöglichkeiten und Eignung mechanischer Schaumzerstörung bei der biotechnologischen Herstellung von Rhamnolipiden zu untersuchen. Des Weiteren wurde eine vergleichende Studie zweier bekannter Rhamnolipidproduktionsstämme, DSM 7108 und DSM 2874, durchgeführt. Ausgehend von klassischer Schüttelkolbenkultivierung erfolgte eine Maßstabsvergrößerung von 500 ml Kleinst- bis hin zu 5 L Laborbioreaktoren.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Einsatz mechanischer Schaumzerstörung bei der mikrobiellen Herstellung von Rhamnolipiden eine deutlichen Reduzierung bzw. einen vollständigen Verzicht von chemischen Antischaummitteln zur Prozesskontrolle ermöglicht. Gleichzeitig ergab sich, dass das verwendete chemische Antischaummittel sich hemmend auf die Rhamnolipidbildung auswirken kann. Eine Vermeidung führte zu einer deutlichen Steigerung der Produktivität an Rhamnolipid.

Vorversuche mit den beiden Stämmen zeigten, dass zwei *Pseudomonas species* stark unterschiedlich auf gleiche Umgebungsbedingungen reagieren können. Während DSM 7108 hohe Mengen an Rhamnolipid produzierte, zeigte DSM 2874 auf demselben Medium eine drastisch reduzierte Rhamnolipidbildung, dafür eine verstärkte Polysaccharid/Alginat-Bildung, die mit einer starken Viskositätszunahme der Kulturbrühe einherging und zum Prozessabbruch führte (Abb. 5.2).

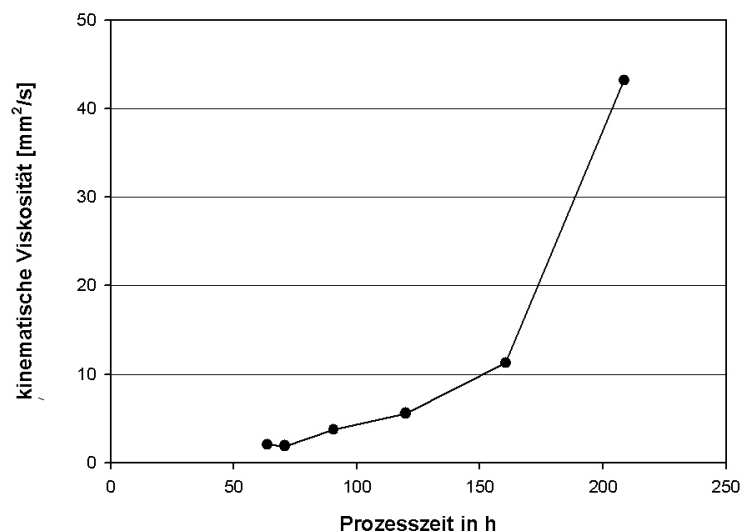


Abb. 5.2 Viskosität über den Prozessverlauf bei einer Bioreaktorkultivierung mit DSM 2874 auf dem Ausgangsmedium.

In vergleichenden Schüttelkolbenversuchen ergaben sich Rhamnolipidkonzentrationen von durchschnittlich 400 mg/l für DSM 7108 bzw. 50 mg/l für DSM 2874. Diese Werte lagen um das 100 – 1000 fache unter den in den Bioreaktorversuchen erhaltenen Produktkonzentrationen. Eine Viskositätszunahme des Mediums bei DSM 2874 konnte nur in den Versuchen im Reaktor beobachtet werden.

Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich eine Regulationsänderung von der durch Umgebungsbedingungen beeinflussten „Quorum Sensing“ regulierten Induktion der Rhamnolipidbildung hin zur vom selben System kontrollierten Polysaccharid-/Alginatebildung. Zukünftige Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene sind daher für ein besseres Verständnis der Induktion der Rhamnolipidbildung notwendig und inzwischen im Rahmen eines Folgeprojektes beantragt. Nach einer Halbierung der Puffer- und Makronährsalzkonzentration erreichte der im Schüttelkolben schlechtere Stamm DSM 2874 im 5 L Bioreaktor 53,6 g/l Rhamnolipid. Eine Viskositätszunahme des Mediums wurde nicht mehr beobachtet. Mit maximal 41 g/l Rhamnolipid im Bioreaktor lag die gebildete Rhamnolipidmenge des im Schüttelkolben um das 8-fache besseren Stammes DSM 7108 um mehr als 20% niedriger. Zusammenfassend könne aus den Experimenten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Der Einsatz von *Pseudomonas species* DSM 2874 als Produktionsstamm zur Rhamnolipidherstellung macht eine Anpassung der Medienzusammensetzung erforderlich, obwohl dieser Stamm derselben Spezies angehört und gleiche Kultivierungsanforderungen zu erwarten wären.
2. Abhängig von der Medienkonzentration wechselt *Pseudomonas species* DSM 2874 entweder zu einer Induktion der Rhamnolipidbildung oder zu einer Polysaccharid-/Alginatebildung.
3. Schüttelkolbenversuche sind nur bedingt für ein Screening auf Hochleistungsstämme zur Rhamnolipidherstellung geeignet. Qualitative Aussagen sind zwar möglich, quantitative Aussagen über zu erreichende Maximalkonzentrationen sind jedoch nur durch Versuche im Bioreaktor zu erreichen. Ursache hierfür ist die Regulation der Rhamnolipidbildung über zwei „Quorum Sensing“-Systeme.

4. Die mit dem Stamm DSM 7108 in einer Patentschrift beschriebenen Höchstmengen an Rhamnolipid von 78 g/l bzw. 112 g/l konnten im Labormaßstab nicht reproduziert werden.
5. Der Stamm DSM 2874 zeigte nach Anpassung der Medienzusammensetzung im Labormaßstab das Potenzial höhere Rhamnolipidmengen als DSM 7108 zu bilden.

5.2 Zusammenfassung Kapitel II: Produktspektrum

Originaltitel:

Proportion of Di- and Mono-Rhamnolipid production by *Pseudomonas* strains DSM 7108 and DSM 2874.

Bei einer typischen Kultivierung ist das Einsetzen der Bildung von Rhamnolipiden in der Regel mit dem Übergang von der Wachstumsphase zur stationären Phase zu beobachten. Ergänzend zu der ersten Publikation wurde bei dieser Studie detailliert auf das von den beiden *Pseudomonas*-Stämmen DSM 7108 und DSM 2874 gebildete Produktspektrum an Mono- (RL 1) und Di-Rhamnolipid (RL 3) eingegangen. Im direkten Vergleich zeigten die beiden Stämme bezüglich der gebildeten Rhamnolipidspezies deutliche Unterschiede. Während das gebildete Produktspektrum des Stammes DSM 2874 nahezu äquivalente Mengen an Mono- und Di-Rhamnolipid enthielt, zeigte DSM 7108 die Tendenz, Di-Rhamnolipid bevorzugt zu bilden. Auch bei näherer Betrachtung des gebildeten Produktspektrums über den Prozessverlauf konnten deutliche Unterschiede bezüglich der Produktbildung der beiden Stämme aufgedeckt werden. Nach anfänglich bevorzugter Mono-Rhamnolipidbildung bei DSM 7108 in Verhältnissen von 1 : 1,2 bzw. 1 : 1,5 (w/w) RL3 zu RL1, konnte im Verlauf 250 h eine signifikante Änderung bei der Produktbildungskinetik hin zu Di-Rhamnolipid beobachtet werden. RL3:RL1-Verhältnisse von bis zu 3,4 : 1 (w/w) konnten bestimmt werden. Hingegen zeigte der Stamm DSM 2874 über die Kultivierungszeit betrachtet keine deutlichen Änderungen bezüglich des gebildeten Produktspektrums. Die anfänglichen RL3:RL1-Verhältnisse von 1,2 : 1 bis 1,3 : 1 (w/w) änderten sich nur tendenziell zum Ende der Kultivierung hin zu Verhältnissen von 1 : 1 – 1 : 1,3 (w/w).

Hieraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das gebildete Produktspektrum unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen stammspezifisch ist. Neben der maximal gebildeten Gesamtmenge an Rhamnolipid, könnte für eine potenzielle industrielle Applikation je nach gewünschtem Endprodukt die Produktionsstammselektion auch in Hinblick auf das gebildete Produktspektrum von hoher Relevanz sein.

5.3 Zusammenfassung Kapitel III: Substratscreening

Originaltitel:

Screening of hydrophobic Substrates for the Production of Rhamnolipids by Shaking Flask and Bioreactor Cultivations of *Pseudomonas aeruginosa* DSM 7108.

Im Fokus dieser Untersuchungen stand die Entwicklung eines auf einem Parallelbioreaktor mit integrierter mechanischer Schaumzerstörung basierenden Screening-Systems zur Optimierung eines Prozesses zur Herstellung mikrobieller Rhamnolipide. Abb. 5.3 zeigt das verwendete Bioreaktorsystem sowie die Positionierung des mechanischen Schaumzerstörungsrührer.

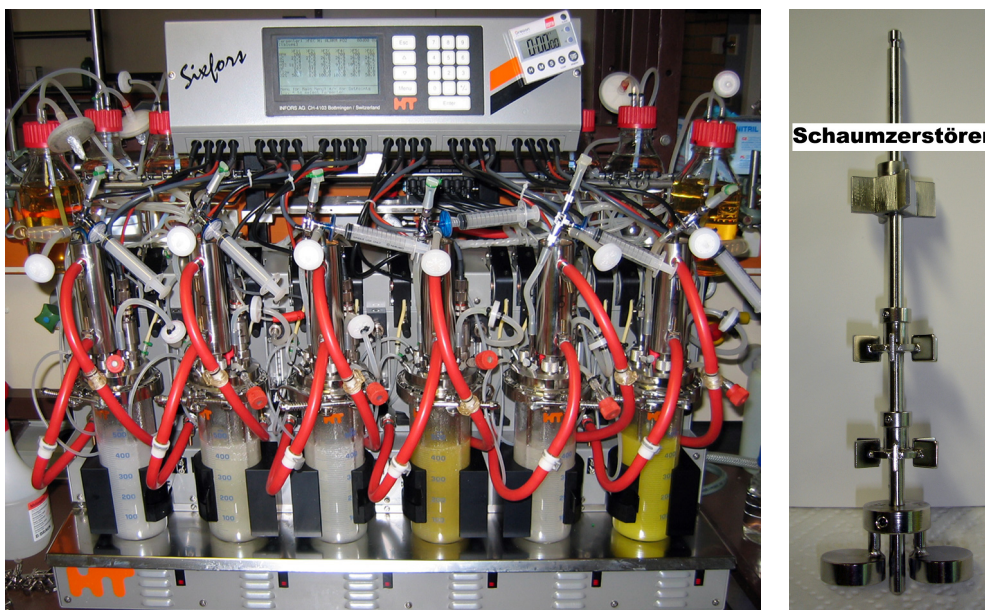


Abb. 5.3 Links: Für das Screening verwendetes Parallelreaktorsystem während eines Versuchslaufs. Rechts: Rührerachse mit montiertem mechanischen Schaumzerstörer sowie den zwei konventionellen 6-Blatt Rushton-Rührern zur Reaktordurchmischung.

Des Weiteren wurde ein „klassisches“ Schüttelkolben- einem Bioreaktor-Screening-Konzept gegenüber gestellt, um qualitative als auch quantitative Aussagen über die jeweilige Methode treffen zu können. Im Rahmen dieser Experimente sollten sieben

Pflanzenöle und ein Fischöl auf ihre Eignung als Substrat in einem Rhamnolipidproduktionsprozess, sowie ihr Einfluss auf das gebildete Produktspektrum untersucht werden.

Es stellte sich heraus, dass der Stamm DSM 7108 in der Lage ist, alle Substrate zu nutzen und induziert wird, Rhamnolipide zu bilden. Die einzige Ausnahme stellte das Fischöl dar, welches in den Bioreaktorversuchen, nicht jedoch in den Schüttelkolbenversuchen, umgesetzt werden konnte. Generell wurden mit den Substraten der ersten und zweiten Gruppe (hoher Ölsäure bzw. Linolsäureanteil im Triglycerid) die höchsten Endkonzentrationen an Rhamnolipid von durchschnittlich 25,4 g/l bzw. 30,6 g/l erreicht. Eine Maximalmenge an Rhamnolipid, bezogen auf das gesamte Screening, von 39,8 g/l wurde in einer Bioreaktorkultivierung mit Sonnenblumenöl (Gruppe 2) erreicht. Ein direkter Vergleich der Schüttelkolbenkultivierungen mit den Bioreaktorkultivierungen ergab, dass bei letzteren mit Pflanzenölen durchschnittlich die 52 – 68-fache Mengen an Rhamnolipid gebildet wurden. Auch die spezifischen Produktivitäten zeigten um das 5,5 -10-fache höhere Werte. Dies kann als Indiz für eine deutlich gesteigerte Induktion der Rhamnolipidsynthese unter den Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor angesehen werden. Ursache hierfür könnte das Erreichen höhere Biomassekonzentrationen sein, welche wiederum direkten Einfluss auf die „Quorum Sensing“ regulierte Rhamnolipidsynthese haben. Zusätzliche Faktoren wie z.B. bessere Sauerstoffversorgung, Reaktor-Durchmischung sowie pH-Regulation könnte ebenfalls zu einer gesteigerten Produktion bei tragen. Ein Einfluss auf das gebildete Produktspektrum durch die verschiedenen Substrate konnte hingegen nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend könne aus den Experimenten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Die Etablierung eines Screening-Systems zur Herstellung mikrobieller Rhamnolipide auf Basis eines Parallelbioreaktorsystems konnte erfolgreich umgesetzt werden.
2. Der Einsatz mechanischer Schaumzerstörungsrührer in Kleinstreaktoren erwies sich als erfolgreich.

3. Qualitativ sind die Ergebnisse aus Schüttelkolben- und Bioreaktor-Screeningansätzen weitestgehend vergleichbar. Quantitativ sind jedoch deutliche Unterschiede erkennbar.
4. Bezogen auf eine Maßstabsvergrößerung sind Aussagen über zu erwartende Produktkonzentrationen mittels eines Screenings in Kleinstreaktoren deutlich besser zu treffen als über einen Schüttelkolbenansatz (vgl. Publikation I).
5. Bezüglich der getesteten Substrate kann generell die Aussage getroffen werden, dass pflanzliche Öle mit einem hohen Anteil an ein- und zweifach ungesättigten C-18 Fettsäuren im verwendeten Triglycerid am besten für die Herstellung von Rhamnolipiden geeignet sind. Pflanzenöle mit einem hohen Linolsäureanteil zeigen hierbei tendenziell leicht höhere Produktbildungsmengen als solche mit einem hohen Ölsäureanteil.
6. Ein Einfluss der Substrate auf das gebildete Produktspektrum konnte nicht nachgewiesen werden.

5.4 Zusammenfassung Kapitel IV: ATR-FTIR Analytik

Originaltitel:

Fast Quantitative Determination of Microbial Rhamnolipids from Cultivation Broths by ATR-FTIR Spectroscopy.

Im Fokus dieser Untersuchungen stand die Entwicklung einer alternativen Analyseverfahrens mittels ATR-FTIR Spektroskopie zur quantitativen Bestimmung von Rhamnolipiden aus Kultivierungsbrühen. Als wesentlicher Vorteil dieser Analyseverfahrens gegenüber einer konventionellen Analytik mittels HPLC wurde eine deutliche Reduktion der Analysenzeiten erwartet. Durch die Notwendigkeit bei der HPLC-Analyse mehrere Extraktions-, Evaporations- und Derivatisierungsschritte vor der eigentlichen Messung durchzuführen, liegen zwischen der Probenahme und dem Analyseergebnis mitunter 24 – 36 h. Erste Experimente zur Quantifizierung mittels ATR-FTIR zeigten, dass nur ein Extraktionsschritt zur Entfernung der hydrophoben Substrate (Pflanzenöle) mittels Hexan notwendig ist, um verwertbare Analysenspektren zu erhalten. Der Zeitbedarf von der Probenahme bis hin zum Analyseergebnis konnte hierdurch auf 20 Minuten reduziert werden. Generell zeigten sich sehr gute Reproduzierbarkeiten bei der wiederholten Aufnahme einzelner Probenspektren. Korrelationen von mehr als 99,9 % Genauigkeit wurden erreicht. Absorptionsintensitätsänderungen des Gesamtspektrums bzw. einzelner Gruppenabsorptionsfrequenzen, wie sie z.B. durch Grenzflächenanlagerung der Analyten oder Evaporation eintreten können, konnten nicht beobachtet werden. Ein standardisiertes Probenaufarbeitung und Auftragungsprotokoll wurde erstellt. Zum Aufbau einer Spektrendatenbank wurden 80 Referenzspektren aus neun verschiedenen Rhamnolipidfermentationen erfasst. Anschließend wurden mittels multivariater Kalibration Kalibrationsmodelle zur quantitativen Rhamnolipidbestimmung entwickelt und mittels Kreuz- bzw. Testset-Validierung auf ihre Belastbarkeit hin getestet. Die stabilsten Vorhersageergebnisse lieferte hierbei die charakteristische, jedoch nicht spezifischen Gruppen zuordenbare „fingerprint“-Region im Wellenzahlbereich $900 - 1200 \text{ cm}^{-1}$. Die für Rhamnolipide typischen Gruppenabsorptionsbanden der C-H Streckerschwingungen (2921 cm^{-1} , 2855 cm^{-1})

und der Esterbindungen (1730 cm^{-1}) zeigten dagegen schlechtere Resultate. Verglichen mit der HPLC-Referenzanalytik ergaben sich für Rhamnolipid 1, Rhamnolipid 3 und Rhamnolipid gesamt (RL 1 + RL 3) für die Wurzel der mittleren Fehlerquadrate der Kreuzvalidierung (RMSECV: Root Mean Square Error of Cross Validation) Werte von 0,496 g/l (RL1), 1,49 g/l (RL 3) sowie 2,06 g/l (RL gesamt) ermittelt. Die Bestimmungskoeffizienten R^2 lagen hierbei in einem Bereich von 95,6 – 96,1. Testsetvalidierungen gegen unabhängige Probenspektren einer weiteren Kultivierung ergaben durchschnittliche Vorhersagefehler im Bereich von 0,28 g/l – 0,59 g/l (RMSEP: Root Mean Square Error of Prediction).

Verglichen mit der konventionellen HPLC-Analytik sind die Messgenauigkeiten, sowie die messtechnisch bedingten Nachweisgrenzen der ATR-FTIR Methode schlechter. Diese Nachteile werden jedoch durch die deutlich kürzeren Analysezeiten als auch durch den größeren Konzentrationsmessbereich kompensiert. Potenzielle Verbesserungen der Vorhersagegenauigkeiten sind bei einer Ausweitung der Referenzspektrendatenbank zu erwarten. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die erstellte ATR-FTIR Methode zur quantitativen, „*in time*“ Bestimmung von Rhamnolipiden aus Kultivierungsbrühen sehr gut geeignet ist.

5.5 Zusammenfassung Kapitel V: Patentanmeldeschrift

Original Titel:

Biotenside und deren Herstellung.

Im Verlauf der zuvor beschriebenen experimentellen Arbeiten wurde die Idee einer neuartigen mehrstufigen Prozessführung zur biotechnologischen Herstellung von Rhamnolipiden unter Einsatz von mechanischer Schaumzerstörung entwickelt. Diese basiert auf der Kombination des beschriebenen „Fed-batch“-Prozesses mit einem Ruhenden-Zell-Kultivierungsansatz. Im Unterschied zum klassischen ruhenden Zellverfahren, bei welchem die erste Prozessstufe nur der Biomassebildung dient und erst in der folgenden stark wachstumslimitierten Prozessstufe die eigentliche Produktbildung stattfindet, verfolgt der hier beschriebene Verfahrensansatz die Strategie, dass sowohl in der ersten als auch in den folgenden Prozessstufen hohe Mengen an Produkt gebildet werden. Abb. 5.4 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung dieses Prozesses.

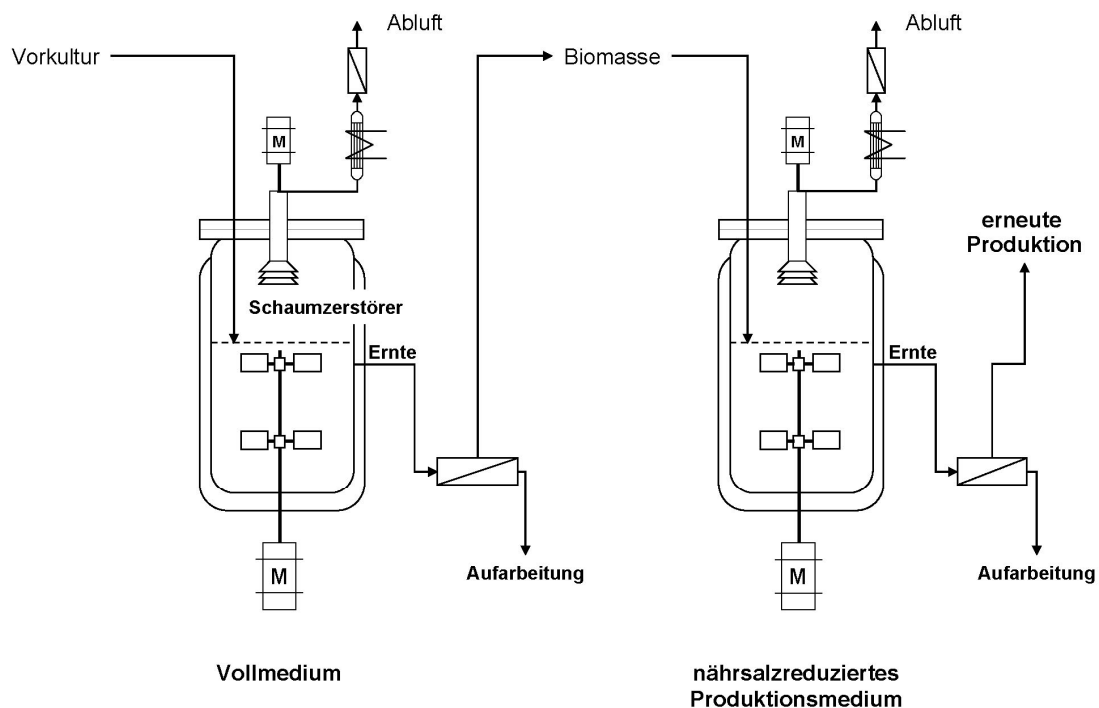


Abb. 5.4 Vereinfachte schematische Darstellung eines mehrstufigen Prozesses mit integrierter mechanischer Schaumzerstörung zur Herstellung von Rhamnolipiden.

Dies konnte erreicht werden, indem zwei verschiedene Medienzusammensetzungen eingesetzt wurden. Während in der ersten Prozessstufe ein nährsalzreiches Mineralsalzmedium verwendet wird und sich die limitierenden, rhamnolipidbildungs-induzierenden Bedingungen erst nach Abschluss der Wachstumsphase einstellen, wird in der folgenden Prozessstufe ein, verglichen mit dem ersten Medium, um das zehnfache an Makronährsalzen reduziertes Medium eingesetzt, welches nach einer kurzen regenerativen Phase direkt zu nährstofflimitierenden Produktionsbedingungen führt. Eine durchgeführte Literaturrecherche ergab überraschenderweise keinerlei Hinweise auf biotechnologische Prozesse zur Herstellung von Rhamnolipiden bzw. Biotensiden, die statt chemischer eine mechanische Schaumzerstörung einsetzen. Das hier vorgestellte Verfahren wurde zur weiteren Überprüfung dem Technologie Lizenz Büro der Baden-Württembergischen Hochschulen GmbH (TLB) vorgestellt. Die Erfindungshöhe wurde dort so hoch eingestuft, dass eine Patentanmeldung aussichtsreich erschien. Entsprechend wurde eine Patentanmeldeschrift verfasst und am 14.06.2007 unter dem Aktenzeichen DE 10 2007 028 030.2 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

6 Ergebniskapitel

6.1 Kapitel I

Production of microbial rhamnolipids by *Pseudomonas* strains DSM 7108 and DSM 2874, utilizing mechanical foam destruction.

F. Leitemann¹, A. Dhariwal², C. Syldatk¹, R. Hausmann¹

¹Chair of Technical Biology, Research University Karlsruhe, 76131 Karlsruhe, Germany

²Gesellschaft für umweltkompatible Prozeßtechnik mbH i.L., 66123 Saarbrücken, Germany

Status: running title, BMC Journal of Biological Engineering

6.1.1 Abstract

Background

Several species of the genus *Pseudomonas* are known to produce rhamnolipids under growth limiting conditions on hydrocarbons and other hydrophobic C-sources. However, for the biotechnological production of rhamnolipids, a severely limiting factor is the pronounced foaming of the cultivation broth.

Results

In this work, it could be shown that exclusive mechanical foam destruction led to significantly increased productivities of rhamnolipids as compared to the state-of-the-art, that comprises the application of anti-foaming agents. Starting from shaking flask cultures, a scale-up to 500 ml and to 5 l bioreactor cultivations was carried out. The maximum concentrations obtained were of 41 g/l for *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 7108 and 54 g/l for *Pseudomonas spp.* strain DSM 2874.

Conclusions

Mechanical foam destruction provides several advantages for the production of rhamnolipids. Especially a clear enhancement of the productivity was achieved.

6.1.2 Background

Surface-active compounds are of wide economic interest. Today, bulk quantities of surfactants are chemically synthesized. However, by 2010, surface-active compounds produced by microorganisms, so-called biosurfactants, are predicted to gain 10 % of the surfactant market [11]. Biosurfactants containing L-rhamnose and β -hydroxydecanoic acid units are termed rhamnolipids. *Pseudomonas spp.*, especially *P. aeruginosa*, are known to produce rhamnolipids under growth-limiting conditions on hydrocarbons and other hydrophobic C-sources [22]. This production is dependant on a complex quorum-sensing cell-to-cell signalling system, the rhl system [74, 75].

Several types of rhamnolipids have been described [25, 26, 28-30, 50]. Rhamnolipid 1 (L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate: R1C10C10) and rhamnolipid 3 (L-rhamnosylrhamnosyl-3- \rightarrow hydroxy- \rightarrow decanoyl-3-hydroxydecanoate: R2C10C10) are the most common rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* [23].

The exact type and composition of rhamnolipids produced depend on several factors, like type of substrate, cultivation conditions and the strain used. For biotechnological production purposes of rhamnolipids, four methods have been described [22]. The most widely reported method is the batch, respectively the fed batch cultivation of *Pseudomonas sp.* under growth limiting conditions. The maximum product concentration reported by this mode was 78 - 112 g/l, claimed by Giani et al. [51] in a patent, with insufficient technical details given. A second method applies resting cells in a batch process, with rhamnolipid end concentrations of approximately 18.5 g/l [25]. Continuous cultivation strategies have also been described, with productivities between 0.007 – 2 g/l·h [48, 49]. Immobilized cells in a semi-continuous process displayed a maximum rhamnolipid production rate of 43 mg/l·h [22].

A general problem of rhamnolipid production is the excessive foam formation. Foam reduces the effective working space of a bioreactor, and hence its economic performance. In principle, chemical and mechanical methods of foam destruction are applicable [76]. An advantage of chemical foam destruction is its convenient applicability. However, down stream processing can be negatively affected by the anti-foam agents. Hence, the use of mechanical foam destruction has the advantage of not adding adulterating compounds [65]. However, the current stat-of-the-art in

rhamnolipid production comprises the application of anti-foam agents. The aim of this study was to investigate the applicability of mechanical foam destruction for the production of rhamnolipids. The expected benefit was a higher productivity combined with an enhanced purity of the raw product. For the present studies, the *Pseudomonas spp.* strains DSM 7108 and DSM 2874 have been chosen.

6.1.3 Results

Fatty acid composition of the sunflower oil

The analysis of the fatty acids of the applied sunflower oil resulted in a typical composition for sunflower oil. The twice unsaturated linoleic acid (C18:2) represented the major compound of the fatty acid moiety with 59.7 %, followed by the single unsaturated oleic acid (C18:1) with 28.4 %. The saturated stearic acid (C18) and palmitic acid (C16) represent 3.8 % and 6.4 % of the fatty acid fraction. In amounts below 1 %, other fatty acids were detected.

Shaking flask experiments

Rhamnolipid production with the strains DSM 7108 and DSM 2874 was first examined in shaking flasks, for preliminary characterization of the strains. After 100 h, the bio dry weight contents (BDW), oil contents, and rhamnolipid concentrations were determined. Both strains consumed about 145 g/l of oil in the cultivation time of 100 h. Whereas DSM 7108 produced about 400 mg/l rhamnolipids, DSM 2874 produced only 50 mg/l. Also, the accumulated mean bio dry weight of DSM 2874 of about 9 g/l was lower as compared to DSM 7108, with 16 g/l. Hence, the conversion efficiency of DSM 7108 for the offered substrate was markedly higher, and thus the further process development was focused on that strain.

500 ml scale cultivation with DSM 7108

In a next step, comparative studies regarding the use of anti-foam agents, trace element additions and substrate concentrations were performed in a 500 ml scale in a six-fold parallel bioreactor. Fig. 6.1 shows the oil, bio dry weight, and rhamnolipid concentrations during the optimal cultivation of sunflower oil with DSM 7108.

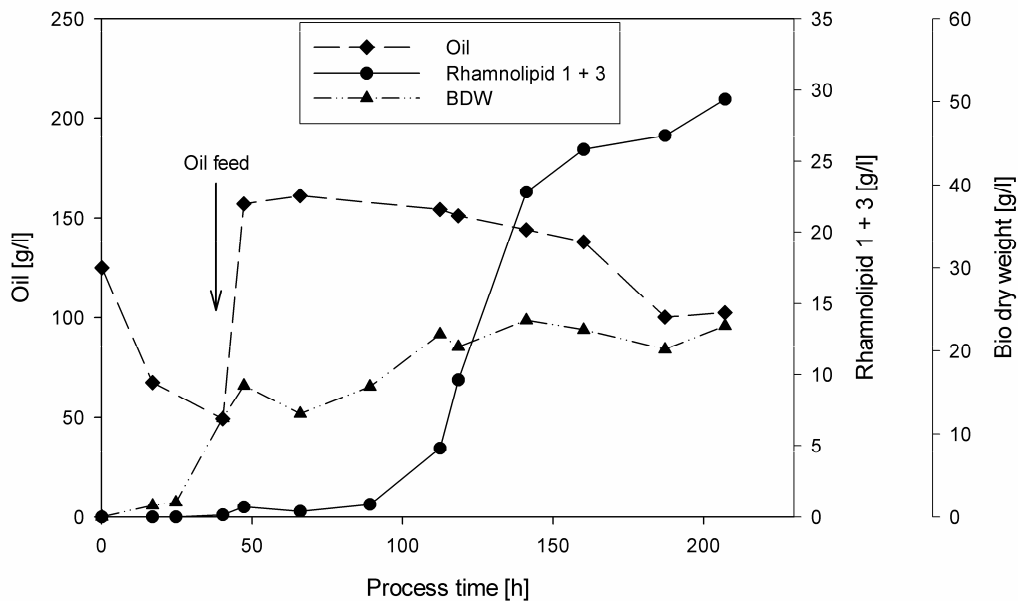


Fig. 6.1 Oil content, bio dry weight and rhamnolipid concentration during a 500 ml scale cultivation of DSM 7108 on sunflower oil with mechanical foam destruction. The arrow indicates the feeding time of additional 125 g/l of substrate.

The increase in bio dry weight shows two distinct phases. An intense growth could be observed until 50 h, a biomass dry weight of 12.5 g was reached. At 40 h of cultivation, 125 g/l sunflower oil were fed. Thereafter, the biomass content increased until 112 h and reached up to 22 g/l BDW. The onset of rhamnolipid production was at 40 h and continued until the termination of the process at 207 h. The total rhamnolipid end concentration was 29.4 g/l. This corresponds to 35.9 g/l if the extraction efficiency is considered.

5 l scale cultivations with DSM 7108

As in the 500 ml scale, the main problem in the cultivation process was to overcome the excessive foam formation. Two mechanical devices for foam destruction were tested. Fig. 6.2 summarizes the anti-foam use and corresponding rhamnolipid productivities of four different cultivations.

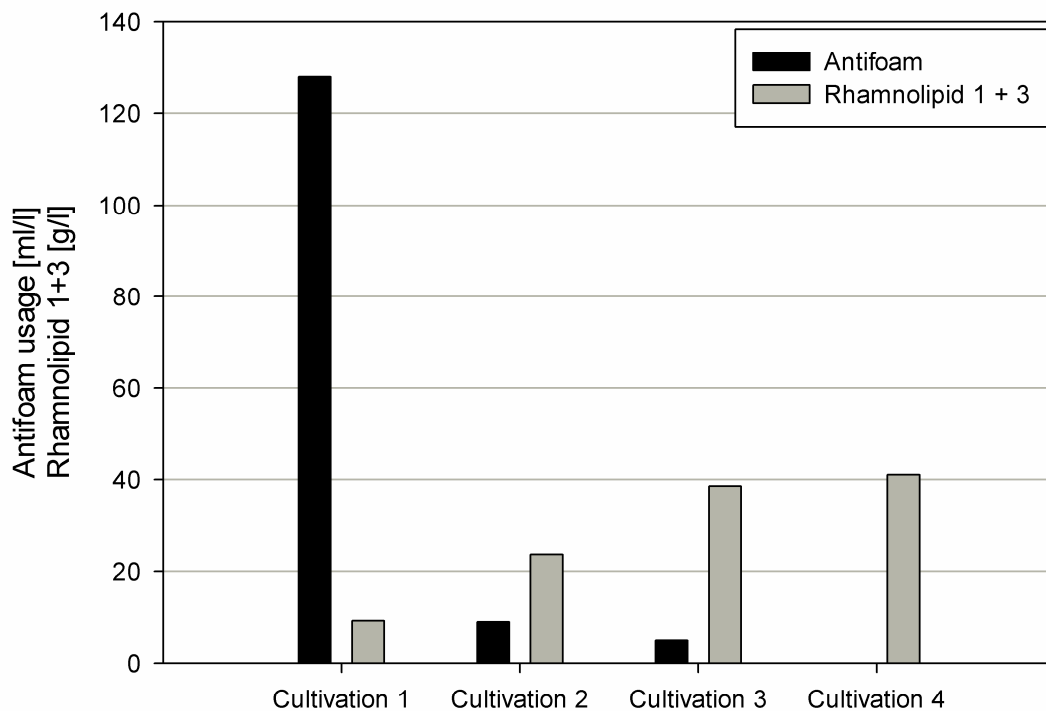


Fig. 6.2 Antifoam utilization and rhamnolipid end concentrations of four cultivations with DSM 7108 in a 5 l scale bioreactor. Cultivation 1 with 4 blade Rushton stirrer for mechanical foam destruction. Cultivation 2 with 4 blade Rushton stirrer and adapted aeration and mixing speed. Cultivation 3 with a commercial foam destruction stirrer (foam disc™) non optimized. Cultivation 4 with commercial foam destruction stirrer (foam disc™) and adapted mixing speed and aeration rate.

First, foam control was performed essentially by addition of anti-foam agents. Additionally, a Rushton stirrer was placed in the headspace of the reactor for mechanical foam destruction. In this cultivation about 128 ml/l defoaming agent had to be applied. A rhamnolipid concentration of 9.3 g/l was achieved. In a next experiment, the aeration rate was reduced and the stirrer rate was manually regulated according to the foam height till the point of foam dwindling. The minimum aeration rate was 0.1 vvm, and the maximum stirrer speed was 950 rpm. These adaptations allowed a reduction of the anti-foam dosage down to 9 ml/l whereas the concentration of rhamnolipids produced increased to 23.7 g/l. In a third run, a commercial mechanical foam destruction device (foam disc) was used. 5 ml/l of anti-foam was required and the rhamnolipid content increased to 38.6 g/l. In a fourth run, after adaptation of the stirrer speed to 650 - 800 rpm while reducing the aeration rate

to 0.036 – 0.045 vvm, no anti-foam was needed. In total, 41.1 g/l rhamnolipid was produced. In all experiments, no deteriorating influence of the anti-foaming agent on the cells was observable. Microscopic investigations showed typical fast moving *Pseudomonas* cells, and, an oxygen demand in the range of 5.8 and 11 mmol/l·h was observed at the end of the processes. This indicated an active culture.

Cultivation of DSM 7108 with a commercial foam destruction stirrer

In Fig. 6.3 a 5 l scale cultivation (cultivation 4) with a commercial foam destruction stirrer is presented exemplarily. The time course profiles of cell growth, rhamnolipid and substrate concentrations are shown in Fig. 6.3 A. It shows that rhamnolipid production commenced essentially at the transition point from the growth to the stationary phase, before 70 h process time. Due to the appearance of rhamnolipid, the foaming of the cultivation broth strongly increased. This was a critical process phase. However, the foam height could be kept stable without adding anti-foam by the use of the mechanical foam destruction device. The rhamnolipid production

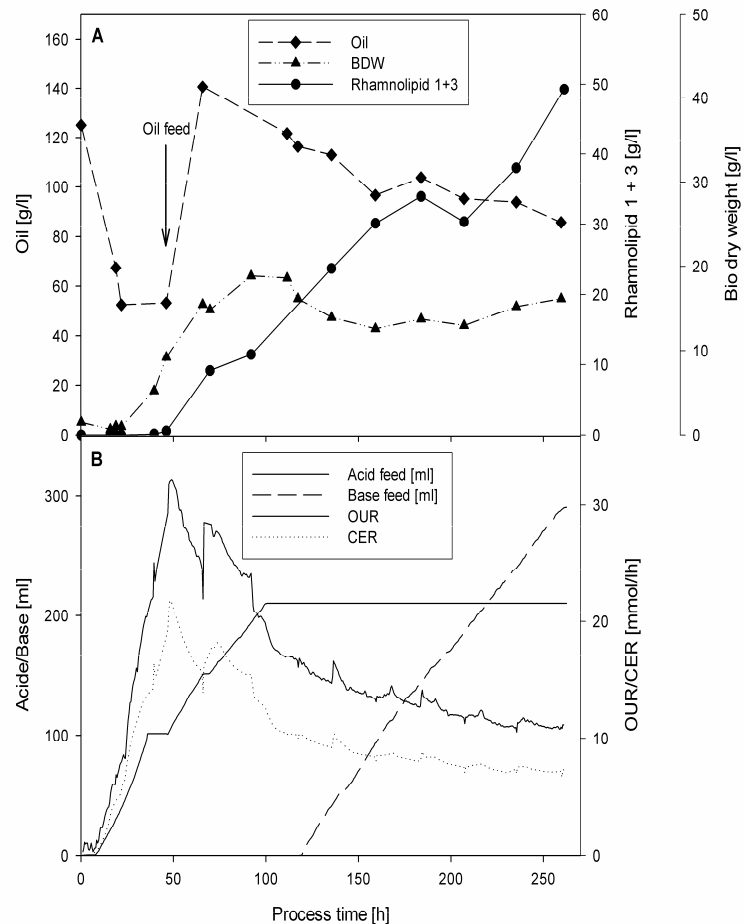


Fig. 6.3 Cultivation 4, a 5 l scale production of rhamnolipids with DSM 7108.

A: Oil content, bio dry weight and rhamnolipid concentration over the process.

B: Acid and base feed and, in addition, the oxygen uptake rate (OUR) and the carbon dioxide evolution rate (CER) over the process is shown. The arrow indicates the feeding time of additional 125 g/l of substrate.

continued until the end of the process at 261 h, at which time a final concentration of 41.1 g/l was achieved. Considering the extraction efficiency, the resulting rhamnolipid concentration was about 50.1 g/l. Cell growth was insignificant during the culture time from 70 to 261 h. In this time interval a mean bio dry weight concentration of about 15 g/l was reached. Sunflower oil was rapidly consumed and 125g/l were replenished after 40 h. At the end of the process, approximately 165 g/l of the substrate were utilized. Fig. 6.3 B displays the oxygen uptake rate (OUR), carbon dioxide evolution rate (CER), acid and base dosage. After 2 h, an increase of the OUR and CER was observed, indicating the end of the lag phase. At about 49 h process time, a maximum OUR and CER value of respectively 32 mmol/l·h, and 22 mmol/l·h, was measured. An adaptation of the process parameters by decreasing the aeration rate from 0.26 – 0.13 vvm, and increasing the stirrer speed up to 930 rpm, in the interval of 46 h to 66 h, without getting oxygen limitation, became necessary. At 5 h, an automatic dosage of acid for pH regulation started and went on for 94 h. After 119 h an addition of base until the end of the process was necessary.

Comparative rhamnolipid production with *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2874

Comparative experiments to those described for the strain DSM 7108 were performed with strain DSM 2874. 500 ml scale cultivations with this strain and medium 1 under similar process conditions used for DSM 7108, showed deviant results to the results achieved with DSM 7108 mainly in two points. First, the overall production of rhamnolipids was lower; second, there was a very pronounced increase in the kinematic viscosity to a value of 45 mm²/s of the medium (normally 2 – 5 mm²/s), severely hindering sample analysis. However, when the salt concentration was halved (medium 2) a total rhamnolipid concentration of 30.1 g/l (500 ml scale) and 53.6 g/l (5 l scale) had accumulated after 279 h of cultivation time. A rhamnolipid concentration of about 36.7 g/l respectively 65.3 g/l resulted, if the extraction efficiency is accounted for. Given that in the shaking flask experiments rhamnolipid production by strain DSM 2874 was only a fraction of that produced by strain DSM 7108, it is remarkable that in the 5 L scale experiment the corresponding productivity was about 25 % higher.

6.1.4 Discussion

According to the process reported by Giani et al., high rhamnolipid end concentrations of up to 112 g/l were expected by using DSM 7108 [51]. In contrast, the maximum rhamnolipid concentration achieved in this study, with this strain, was of about 41 g/l, respectively 50 g/l if the extraction efficiency is accounted for. Considering that rare rhamnolipid species were not detected by the applied analytical method, the total amount of rhamnolipids possibly could have been slightly higher. Nevertheless, the productivities claimed with DSM 7108 by Giani et al. in their patent application could not be confirmed [51].

In all cultivations, no deteriorating influence of the used anti-foam agent on the cells was observable. However, a significant influence on rhamnolipid productivity was evident. A possible explanation is the interfacial active properties of the defoaming agent. Chen and Zhu (2005) report that in the presence of rhamnolipid, *P. aeruginosa* growing on hexadecane had a much smaller half-saturation coefficient, K_s , as compared to that in the absence of rhamnolipid, indicating a higher affinity of *P. aeruginosa* to hexadecane in the presence of rhamnolipid [77]. This was partially attributed to an increase of the cell surface hydrophobicity, owing to the adsorption of rhamnolipid. This would increase the direct physical contact between the cells and the poorly soluble substrate. Hence, the interfacial properties of defoaming agents might also enhance the accessibility of hydrophobic substrates and therefore reduce the stimulus to produce rhamnolipid. As a consequence for the biotechnological production of rhamnolipid the conclusion might be drawn that a low emulsification grade of the substrate could lead to higher rhamnolipid productivities.

The experiments with *P. aeruginosa* DSM 2874 showed that different *Pseudomonas* strains react considerably different to the same environmental conditions. Whereas DSM 7108 was induced to produce rhamnolipids, DSM 2874 switched to excessive polysaccharide secretion, along with an increased medium viscosity and reduced rhamnolipid productivity. The quorum sensing regulatory mechanism, that, depending on the environmental conditions, induces either polysaccharide or rhamnolipid formation, could be an explanation therefore [78]. When these effects were absent, the strain DSM 2874 produced a maximum rhamnolipid concentration of 53.6 g/L, respectively 65.3 g/l. This fact highlights that the quorum sensing regulatory mechanism leading to the induction of the rhamnolipid formation is not understood

well enough to the point that it could be reliably explored in a biotechnological process. Further work on the genetic and regulatory mechanisms for the rhamnolipid production will be necessary to understand these complex interrelations.

6.1.5 Conclusions

The utilization of mechanical foam destruction significantly enhanced the rhamnolipids production in comparison to the utilization of chemical anti-foaming agents. The two *Pseudomonas* strains responded remarkably different to the same cultivation conditions concerning their behaviour of producing rhamnolipids. Hence, the application of a new, even close related production strain, for an established rhamnolipid production process with *Pseudomonas spp.* will made a validation of the process, especially media composition necessary. Further work on the regulatory mechanism leading to the induction of the rhamnolipid formation will be necessary to understand the complex quorum sensing interrelations involved.

6.1.6 Methods

Microorganism

Pseudomonas aeruginosa DSM 7108 and *Pseudomonas sp.* DSM 2874 were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany).

Media

For seed cultures LB medium containing 5 g/l NaCl was used [79]. For the cultivation processes, two Ca-free mineral salt media were used. Medium 1 consisted of 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.5 to which were added 0.5 g MgSO₄ x 7 H₂O, 1 g KCl and 15 g NaNO₃ per liter [51]. Medium 2 was obtained by diluting medium 1 with equal amount of deionized water. A trace elements solution was added to the media as described below. It contained 2 g sodium citrate x 2 H₂O, 0.28 g FeCl₃ x 6 H₂O, 1.4 g ZnSO₄ x 7 H₂O, 1.2 g CoCl₂ x 6H₂O, 1.2 g CuSO₄ x 5 H₂O and 0.8 g MnSO₄ x H₂O per liter.. All chemicals were of analytical grade. As a C-source, food-grade sunflower oil was used.

Cultivation conditions

25 ml seed cultures were prepared in 100 ml shaking flasks. These cultures were incubated for 12 h at 30 °C and 110 rpm in an incubation shaker (HT Infors Multitron II), until an optical density at 580 nm (OD_{580}) of 3.0 - 4.6 was reached (Amersham Biosciences Ultrospec 1100pro). Shaking flask and bioreactor cultures were inoculated with 10 ml/l of the seed cultures. Shaking flask experiments were performed in 500 ml flasks with 100 ml of mineral salt medium 12.5 g sunflower oil, and a single addition of 300 μ L of trace elements solution. These flasks were incubated under the same conditions as the seed cultures. The bioreactor cultivations were performed in a 5 l bioreactor (Biostat B5, Sartorius BBI systems GmbH Melsungen, Germany) with an initial media volume of 2 l and 125 g plant oil. An exhaust air analyzer (EGAS-L, Sartorius BBI systems GmbH Melsungen, Germany) was utilized. Small scale bioreactor cultivations were performed in a 500 ml six fold bioreactor system (Sixfors, INFORS GmbH Einsbach, Germany) with 200 ml initial media volume and 12.5 g plant oil. In all experiments, the temperature was set to 30 °C. Mixing speed for the 500 ml scale system was adjusted in a range of 800 – 1100 rpm and for the 5 l system in a range of 600 – 930 rpm, depending on the pO_2 value. In all bioreactor cultivations 125 g/L substrate additional were added after approximately 40 h of process time and one ml per litre of the trace elements solution was added after 0; 20; 40; 70; 120 h of process time. The reactor systems were equipped with additional self-manufactured 4 blade Rushton stirrers with a height to width blade geometry of 1:1 for mechanical foam destruction.

For the 5 l cultivation system, a commercially available foam destruction stirrer (foam disk; Sartorius BBI systems GmbH Melsungen, Germany) was likewise tested. For chemical defoaming, Contraspum™ A4050 (Zschimmer&Schwarz GmbH & Co KG Chemische Fabriken, Lahnstein, Germany) was used. The processes were controlled and recorded by a personal computer system with the process software's MFCSwin (Sartorius BBI systems GmbH Melsungen, Germany), respectively with Iris (INFORS GmbH Einsbach, Germany).

Sampling protocol

For oil separation and cell washing, 5 ml of cultivation broth were mixed with 5 ml of hexane in a pre-weighed 15 ml screw cup and centrifuged at 7500 g at 15 °C for 15 minutes. 2x 1.5 ml of the upper phase, containing hexane and oil, were transferred in pre-weighed 2 ml cups and the hexane was evaporated at 60 °C in a thermo mixer. Afterwards, the cups were dried for 24 h at 100 °C and the oil content was determined by weighing. 3 ml of the lower phase were transferred and acidified with 85 % H₃PO₄ to pH 2 - 3. Ethyl acetate (4 ml) was added to the aqueous phase for the extraction of the rhamnolipids. After mixing, the suspension was centrifuged at 7500 g at 4 °C for 15 min. 2x 1.5 ml of the upper phase were transferred to 2 ml cups and the ethyl acetate was evaporated at 60 °C in a thermomixer for 24 h. For bio dry weight (BDW) determination, the biomass pellet gained after the first extraction step was dried for 48 h at 100 °C and weighed. All plastic cups were heated for 48 h at 100 °C until their weights were constant. All samples were analyzed in duplicate.

Rhamnolipid determination

The quantitative determination of rhamnolipid 1 and rhamnolipid 3 was carried out by HPLC analysis. A rhamnolipid 1 standard was produced for the calibration of the HPLC device by enzymatic hydrolysis of rhamnolipid 3 [23] and purified by chromatography. As the stationary phase, fine silica gel was used, and as the mobile phase, a chloroform-methanol solution (75:25) was utilized. The RL 3 standard with a purity grade of 97.3 % was purchased from Hoechst AG (Frankfurt, Germany).

For UV-detection, the rhamnolipids were derivatized into esters of bromophenacylbromide. This was done by the use of a 1:1 (v/v) derivatisation solution of 40 mM 4-bromophenacylbromide and 20 mM triethylammonia in acetonitrile [80]. The rhamnolipid contents of the samples were analyzed after redissolving each pellet in 1.5 ml of acetonitrile. A rhamnolipid content in the range of 0.1 - 1 mM was obtained by adequate dilution with acetonitrile. 1 ml of this solution was mixed with 200 µL of the derivatization agent. The derivatisation reaction took place at 60 °C for 90 min. Subsequently, the rhamnolipids were separated in a reverse phase C₁₈ column (Supelcosil LC-18, Supelco/Sigma-Aldriche cooperation Bellefonte, Pennsylvania, USA) on an HPLC device (Agilent 1100 series, Agilent Technologies GmbH, Germany) with a linear gradient of acetonitrile-water, and

monitored by a UV-detector at 265 nm. Solvent A consisted of 95:5 H₂O/acetonitrile (v/v), solvent B was composed of 95:5 acetonitrile/H₂O (v/v). For the evaluation of the single step extraction, the biomass pellet and the hexane phase were extracted twice, while the water phase was extracted three times. This evaluation showed that approximately 82 % of the rhamnolipid were recovered in a single ethyl acetate extraction step.

GC-Fatty acid methyl ester determination

For the characterization of the sunflower oil that was used as substrate, a fatty acid methyl ester (FAME) gas chromatography analysis was performed by use of the TMSH-esterification method according to Butte [81].

Kinematic viscosity

The kinematic viscosity of the cultivation broth was determined by the use of Ubbelohde Viscometers (Schott AG, Mainz, Germany) type 0c and type 1c. Triple measurements of each sample were performed at 30 °C.

6.1.7 Authors' contributions & Acknowledgements

FL, CS & RH coordinated the work in this project, gave intellectual courtesy and were involved in the writing work. AD participated for the 5 L cultivations. FL performed all experiments and made the analysis presented in this publication.

We thank the FNR e.V. (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.) for funding, the industrial project partners Sartorius AG, Ecover Belgium and Henkel AG for technical support, and our academic partners Dr. Rosenau (University of Düsseldorf), Prof. Dr. Chmiel and PD Dr. Janke (UPT, Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH i.L., Saarbrücken) and the group of Dr. Behrensmeier (Forschungszentrum Karlsruhe) for lively discussions.

6.2 Kapitel II

Proportion of Di- and Mono-Rhamnolipid production by *Pseudomonas* strains DSM 7108 and DSM 2874.

F. Leitermann, C. Syldatk, R. Hausmann

Chair of Technical Biology, Research University Karlsruhe, 76131 Karlsruhe, Germany

Status: running title, BMC Research Notes

6.2.1 Abstract

Several species of the genus *Pseudomonas* are known to produce rhamnolipids under growth limiting conditions on hydrocarbons and other hydrophobic C-sources. In this study two *Pseudomonas* strains, DSM 2874 and DSM 7108, have been compared with respect to the production kinetics of mono- and di-rhamnolipid. A shift in the relation of RL3 and RL1 for *P. aeruginosa* DSM 7108 was detected. While it initially produced mainly mono-rhamnolipid, di-rhamnolipid was the dominant species at the end of the processes. In contrast, the strain DSM 2874 tends to produce equal quantities of mono- and di-rhamnolipids.

6.2.2 Introduction

Biosurfactants, including rhamnolipids, are expected to gain an increasing importance in the surfactants market and, up to 10 % of the surfactant market are estimated by Nitschke et al. (2005) for the future [11]. Different strains of *Pseudomonas* produce rhamnolipids under growth-limiting conditions on hydrocarbons and other hydrophobic C-sources, like seed oils or n-hexane [22]. These rhamnolipids are typically composed of one or two L-rhamnose respectively one or two β -hydroxydecanoic acid moieties. Fig. 6.4 shows the structures of mono-rhamnolipid (L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate: $R_1C_{10}C_{10}$) termed RL1 and di-rhamnolipid (L-rhamnosylrhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate: $R_2C_{10}C_{10}$) termed RL3, the most common rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* [23].

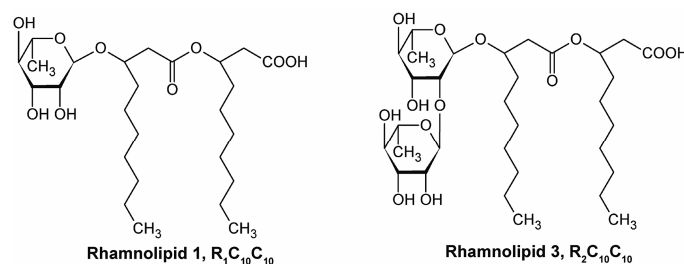


Fig. 6.4 Two common rhamnolipids [23].

In this study two *Pseudomonas* strains, DSM 2874 and DSM 7108, have been compared with respect to the production kinetics of mono- and di-rhamnolipid. The last-mentioned strain was obtained by Giani et al. (1997) via mutagenesis of a *P. aeruginosa* strain isolated from a water sample [51]. It was selected in order to increase the L-rhamnose production. The rhamnose was gained by hydrolysis of the produced rhamnolipids. In contrast, DSM 2874 is a wild type strain isolated by Sylatk et al. [25]. These strains, have been chosen, as DSM 7108 is known to be the best rhamnolipid-producing strain [51] and DSM 2874 was used for comparison.

6.2.3 Results and Discussion

An exemplary rhamnolipid production process in respect of the characteristic time courses of substrate, bio dry weight, and, rhamnolipid concentrations is presented in Fig. 6.5.

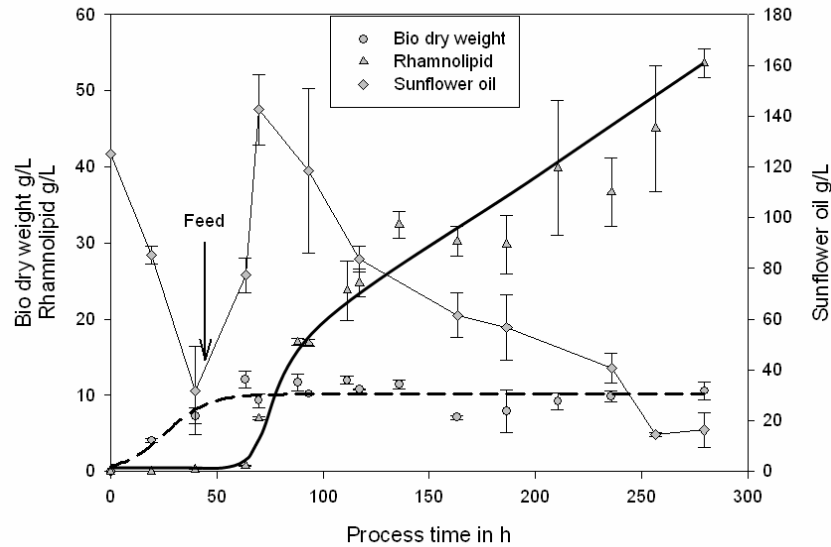


Fig. 6.5 Characteristic time courses of substrate, bio dry weight, and, rhamnolipid concentrations for a 5 l scale production of rhamnolipids with DSM 2874. The arrow indicates the feeding time of additional 125 g/l of substrate.

In a typical cultivation the rhamnolipid production commenced essentially at the transition point from the growth to the stationary phase. Due to the appearance of rhamnolipid, the foaming tendency of the fermentation broth strongly increased. The rhamnolipid production continued until the end of the cultivation at which time a final concentration of about 50 g/l was achieved.

Fig. 6.6 shows the RL 3 to RL 1 ratio (w/w) in dependence of process time. A shift in the relation of RL3 and RL1 occurred during the processes. Surprisingly, the strain *P. aeruginosa* DSM 7108, which was specifically selected for rhamnose production, initially, the dominantly produced rhamnolipid species was mono-rhamnolipid, containing one rhamnose moiety only.

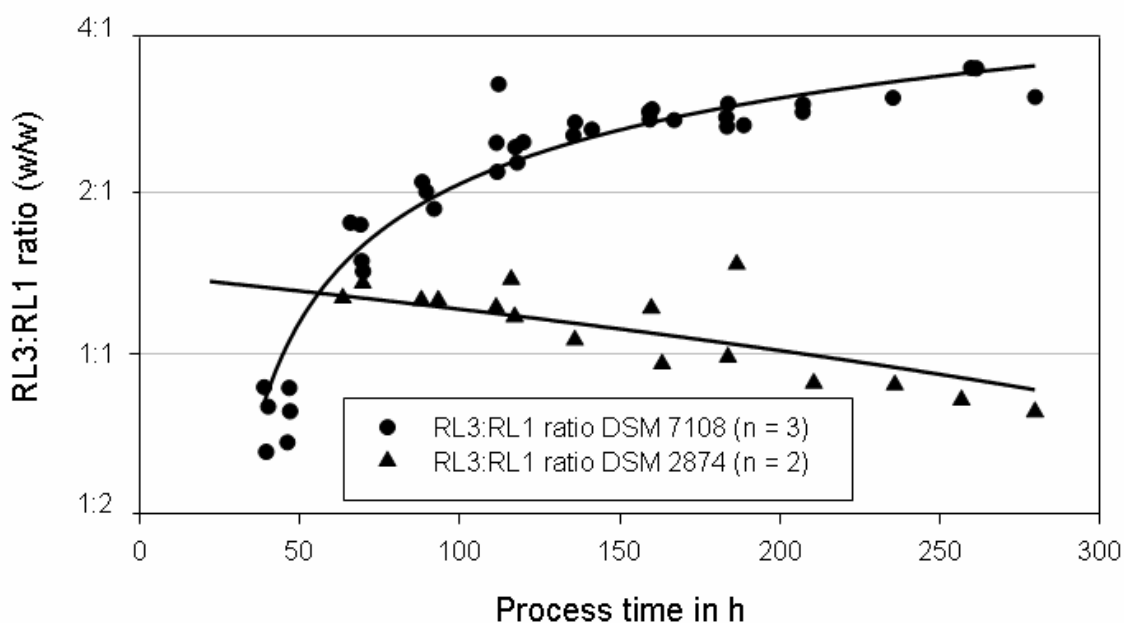


Fig. 6.6 Time course of the ratios of rhamnolipid 3 (RL3) to rhamnolipid 1 (RL1) for *Pseudomonas* spp. DSM 7108 and DSM 2874 cultivations.

The initial RL3:RL1 ratios were between 1:1.2 and 1:1.5. Only in the time course of several days of cultivation this ratio was inverted. Ratios of 3.4:1 to 2.7:1 resulted. To explain these different kinetics two explanations are possible. One is that in strain DSM 7108 much more rhamnose is available for the synthesis of di-rhamnolipide in comparison to DSM 2874. A second possibility is that the enzyme activity of rhamnosyltransferase 2 (RhIC) is higher. This enzyme links an activated rhamnose molecule to a mono-rhamnolipid unit [33]. In contrast, the wild type strain DSM 2874 produced initially more di-rhamnolipid than mono-rhamnolipid. The ratio started at about 1.2:1 to 1.3:1 and slightly decreased to 1:1.3 to 1:1.0 at the end. Concluding, the analysis of the rhamnolipid RL3:RL1 ratios revealed a shift in the predominant product species in the time course of the cultivation. While DSM 7108 showed a tendency to form di-rhamnolipid, DSM 2874 mainly tends to produce equal quantities of mono- and di-rhamnolipids. Therefore the current view that the produced composition of rhamnolipids is specific for each strain for a given medium has to be reviewed.

6.2.4 Material & Methods

Both strains, DSM 7108 and DSM 2874, were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). Incubations of the strains were performed in a in a 5 l bioreactor (Biostat B5, Sartorius BBI systems GmbH Melsungen, Germany) respectively in a 500 ml bioreactor system (Sixfors, IFORS GmbH Einsbach, Germany) according to Giani et al. [51]. However, the medium for the incubation of DSM 2874 was modified by two fold dilution. As C-source food-grade sunflower oil was used. The rhamnolipid analysis was carried out according to Schenk et al. [80].

6.2.5 Acknowledgement

We acknowledge the FNR e.V. (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.) for funding of this work.

6.3 Kapitel III

Screening of hydrophobic Substrates for the Production of Rhamnolipids by Shaking Flask and Bioreactor Cultivations of *Pseudomonas aeruginosa* DSM 7108

Frank Leitermann, Ina Sandig, Christoph Syldatk, Rudolf Hausmann

Chair of Technical Biology, Research University Karlsruhe, 76131 Karlsruhe, Germany

Status: running title, BMC Biotechnology

6.3.1 Abstract

A number of species of the genus *Pseudomonas* are known to produce rhamnolipids under growth limiting conditions on hydrocarbons and other hydrophobic C-sources. Especially the *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 7108 was reported to produce comparatively high amounts of rhamnolipids. For a screening of potential renewable C-sources for the production of microbial rhamnolipids, several different plant oils and fish oil were examined.

Starting from shaking flask cultivations, an adaptation to a 500 ml bioreactor parallel bioreactor system was carried out. The maximum concentrations of rhamnolipid obtained from shaking flask were 0.8 g/l and for the bioreactor experiments up to 40 g/l. Oils with single and twice unsaturated fatty acids were found to be the most suitable substrates. An induction of a variable rhamnolipid spectrum by the different applied substrates could not be identified, but a general shift of the rhamnolipid 3 to rhamnolipid 1 ratio throughout the processes was observed.

Seven widely-used plant oils and fish oil were evaluated for the production of rhamnolipids with *Pseudomonas aeruginosa* DSM 7108. It was found that all plant oils in principle are suitable substrates. However, fish oil proved to be non-suitable. The comparison of bioreactor and shaking flask results showed that qualitative and quantitative limitations of the latter cultivation type proved to be significant.

6.3.2 Introduction

Surfactants of microbial origin are termed biosurfactants in contrast to conventional surfactants. Biosurfactants are characterized by high efficiency and a good biological degradability. Today the industrial utilization of such biosurfactants is rather limited as a result of the insufficient economy of the bioprocesses applied [82]. However, biosurfactants have a remarkable commercial potential as surfactants are the most important products of the industrial oleochemistry. Due to their high efficiency, an increasing market share of microbial produced surfactants can be expected, if the production costs can be reduced. Correspondingly, biosurfactants are expected to gain 10 % of the surfactant market in the near future [83].

Biosurfactants containing L-rhamnose and β -hydroxydecanoic acid moieties are termed rhamnolipids. *Pseudomonas* spp., especially *Pseudomonas aeruginosa*, are known to produce rhamnolipids under growth-limiting conditions on hydrocarbons and other hydrophobic C-sources, like seed oils or n-hexane [22]. Fig. 6.7 shows the most common rhamnolipids produced by *P. aeruginosa*: mono-rhamnolipid or rhamnolipid 1 (L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate: RL 1; Rha:C₁₀:C₁₀) and di-rhamnolipid, also termed rhamnolipid 3 (L-rhamnosylrhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate: RL 3; Rha:C₁₀:C₁₀) [23].

Several approaches for the production of rhamnolipids on different seed oils as substrate have been reported [22][82]. However, various strains and cultivation conditions have been employed. These results can only conditionally be compared with respect to process strategies, production rates and efficiencies.

Therefore, the aim of this study was the comparison of different hydrophobic substrates for the production of rhamnolipids, starting from a classical shaking flasks approach, due to their ease of handling.

Shaking flasks cultivations are generally used in the biotechnological industry as a means to performed bioprocess development and optimization, as a large number of

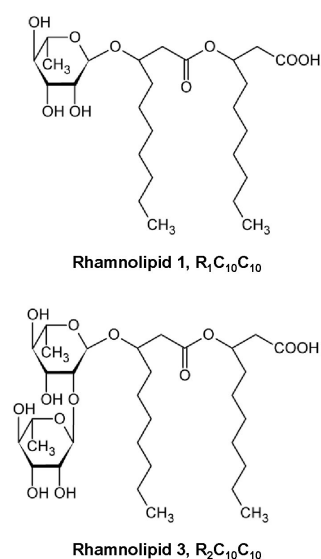


Fig. 6.7 The chemical structure of rhamnolipid 1 and rhamnolipid 3, two common rhamnolipids [23]

parallel experiments is performed to determine optimal medium composition or to find a suitable microbial strain. As outstanding decisions are taken based on the experimental results, suitable and reproducible experimental conditions are crucial. However, screening projects in shaking flasks risk unwanted development if not failure, when operating conditions are not fully comparable. A lack of oxygen supply, irregular pH adjustment and mixing efficiency may cause such conditions. Especially sensitive to the operation conditions is the yields of special bioproducts which depend on the physiological status of the microbial production strains. The production of rhamnolipid by *P. aeruginosa* is a marked example for such a situation. This is a result of the biosynthesis pathway of rhamnolipids being closely interconnected to the central metabolism by the biosyntheses of activated sugars and fatty acids. Equally, a close interconnection to the biosynthesis pathways of various other metabolites exists. Especially, this applies to the biosynthesis of polymers such as lipopolysaccharid (LPS), polyhydroxyalkanoates (PHA), alginate, and possibly also to exopolysaccharides [33, 84]. According to this, the regulation of rhamnolipid biosynthesis at the transcriptional level is very complex. The production of rhamnolipids is regulated by quorum-sensing responses. However, the causal chain on the gene respectively enzyme level is still uncertain. In practice, the rhamnolipid production is induced by growth limiting conditions. As an implication rhamnolipid yields obtained by *P. aeruginosa* vary significantly in dependence of the achieved cell density [37].

Therefore, this study aims at the comparison of the qualitative and quantitative screening results of shaking flasks versus bioreactor screenings of different substrates for the production of rhamnolipids by the strain *P. aeruginosa* DSM 7108.

6.3.3 Results

Characterization and selection of the used substrates

The resulting fatty acid compositions of the used substrates are summarized in Tab. 6.1. All of the substrates have a high proportion of unsaturated fatty acids.

Tab. 6.1 Major fatty acid composition of the used substrates. Measured in equivalent fatty acid methyl esters. * data from supplier.

fatty acids compounds	Group I			Group II			linseed oil w/w [%]	fatty acids compounds*	fish oil w/w [%]
	HOS 90+ w/w [%]	HOS 80+ w/w [%]	rapeseed oil w/w [%]	corn oil w/w [%]	sunflower oil w/w [%]	soy bean oil w/w [%]			
Myristic acid 14:0	0	0	0.1	0	0.1	0.1	0	14:0	3.8
Palmitic acid 16:0	3	3.6	4.6	1.2	6	10.9	4.9	16:1 n7	5.9
Stearic acid 18:0	0	0	0	0	3.5	3.3	3.3	18:0	5.1
Oleic acid 18:1	92.3	83.7	63	32.5	24.4	23.2	16.1	18:1 n9/n7	17.9
Linoleic acid 18:2	3.2	10.4	21	64.3	64.8	55.7	29.1	18:2 n6	1.7
Linolenic acid 18:3	0.1	0.9	10.3	1.3	0.1	5.7	46.1	20:1 n9/n7	2.9
Arachidic acid 20:0	0.2	0.3	0.6	0.5	0.3	0.4	0.1	20:4 n6	2
Behenic acid 22:0	0.8	0.7	0.3	0.2	0.6	0.4	0.1	20:5 n3	7.6
Eruaic acid 22:1	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	22:5 n3	1.6
Lignoceric acid 24:0	0.4	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	22:6 n3	21.3

As expected, four groups of substrates could be differentiated according to their fatty acid compositions. High oleic acid sunflower oils (HOS 90+; HOS 80+) and rapeseed oil were representatives for oils mainly composed of single unsaturated oleic acids (group I). In contrast the major fatty acid compound of conventional sunflower, corn, and, soy bean oil was linoleic acid, a twice unsaturated fatty acid (group II). In linseed oil the dominant fatty acid was the threefold unsaturated linolenic acid. Fish oil with docosahexaenoic acid (C22:6n-3), a omega-3 fatty acid, as major fatty acid compound, was assigned as a fourth type of a substrate.

Screening of different substrates in shaking flasks

Rhamnolipid production on different substrates with *P. aeruginosa* DSM 7108 was initially examined in shaking flask experiments. The accumulated bio dry weights (BDW) ranged from 2.0 to 6.8 g/l, whereas the lowest amounts were found on soy bean oil and the highest amounts on sunflower oil. About 32 g/l (HOS 90+) to 103 g/l (soy bean oil) of substrate were utilized. In these experiments fish oil became solid

and was not emulsified. Therefore, the substrate concentration could not be determined. No rhamnolipid and no bio mass could be detected. The highest rhamnolipid concentrations, about 0.8 g/l, were produced on soy bean oil respectively rapeseed oil, whereas the lowest concentration, about 0.3 g/l, was found with linseed oil as substrate. The total rhamnolipid concentrations and the bio dry weight dependant specific productivities ($P_{p/x}$) are shown in Fig. 6.8.

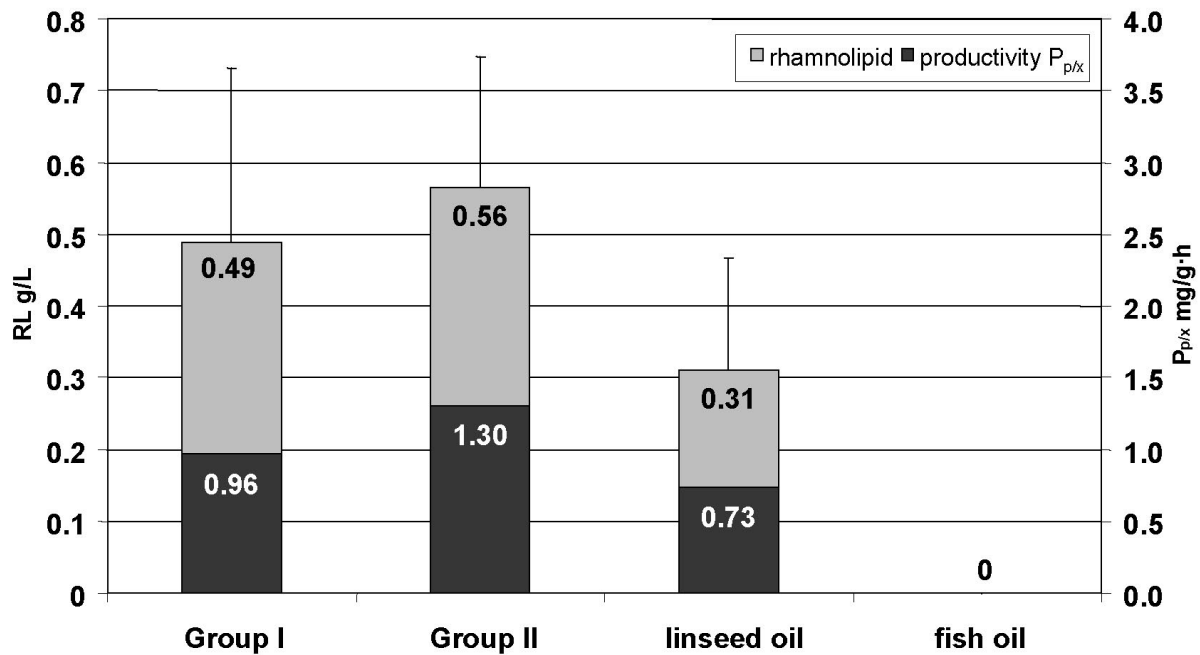


Fig. 6.8 Shaking flask screening with DSM 7108 on seven plant oils and fish oil. Summarized results of total rhamnolipid concentration and the bio dry weight dependant specific productivity after 144 h.

Concentrations of 0.49 and 0.56 g/l were detected for substrate group I respectively group II. With linseed oil 0.31 g/l rhamnolipid resulted. The highest specific productivity ($P_{p/x}$) of about 1.3 mg/g·h was determined when applying substrates of the second group. Substrates of the first group resulted in values of about 0.96 mg/g·h. Linseed oil specific productivities were the lowest of the plant oils tested, about 0.31 mg/g·h.

Screening of different substrates in 200 ml bioreactor cultivations

The results for the achieved concentrations of rhamnolipid in 200 ml bioreactor cultivations and the respective $P_{p/x}$ values in dependence of the substrate type are shown in Fig. 6.9. Further process values are listed in Tab. 6.2 Summarized results

of the bioreactor cultivations with DSM 7108. The results of the bioreactor cultivations for the performance comparison with the respective shaking flask screening are subdivided in the next paragraphs, according to the fatty acid compositions of the substrates as described above.

Tab. 6.2 Summarized results of the bioreactor cultivations with DSM 7108

Process	number of processes	Substrate S consumed (g/l)	BDW X (g/l)	RL (g/l)	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	RL3/RL1 ratio (w/w)	P_v (g/lh)	μ_{max} (h^{-1})
Group I									
HOS 90+	2	183.5 ± 58.8	16.0 ± 1.0	23.3 ± 5.3	0.10 ± 0.01	1.50 ± 0.42	3.4 : 1	0.10 ± 0.03	0.30 ± 0.04
HOS 80+	3	116.9 ± 30.0	16.5 ± 3.0	27.1 ± 10.2	0.25 ± 0.15	1.74 ± 0.9	3.3 : 1	0.11 ± 0.05	0.19 ± 0.09
rapeseed oil	2	146.8 ± 80.7	13.3 ± 0.2	27.4 ± 15.6	0.30 ± 0.25	2.10 ± 1.15	5.5 : 1	0.12 ± 0.08	0.40 ± 0.21
Group II									
corn oil	2	210.9 ± 5.2	17.8 ± 0.2	28.8 ± 3.8	0.10 ± 0.01	1.60 ± 0.19	3.6 : 1	0.11 ± 0.01	0.23 ± 0.02
sunflower oil	2	130.6 ± 24.6	18.0 ± 1.3	34.6 ± 7.4	0.30 ± 0.11	1.90 ± 0.27	2.6 : 1	0.16 ± 0.02	0.22 ± 0.16
soy bean oil	2	203.6 ± 14.3	17.4 ± 0.5	27.8 ± 2.8	0.10 ± 0.01	1.60 ± 0.11	4.2 : 1	0.11 ± 0.01	0.24 ± 0.03
linseed oil									
linseed oil	2	100.6 ± 28.5	12.6 ± 1.6	21.1 ± 1.8	0.2 ± 0.05	1.7 ± 0.06	5.4 : 1	0.1 ± 0.01	0.24 ± 0.04
fish oil									
fish oil	3	121.8 ± 56.5	16.1 ± 1.7	8.1 ± 2.8	0.07 ± 0.05	0.52 ± 0.19	3.3 : 1	0.04 ± 0.02	0.35 ± 0.05

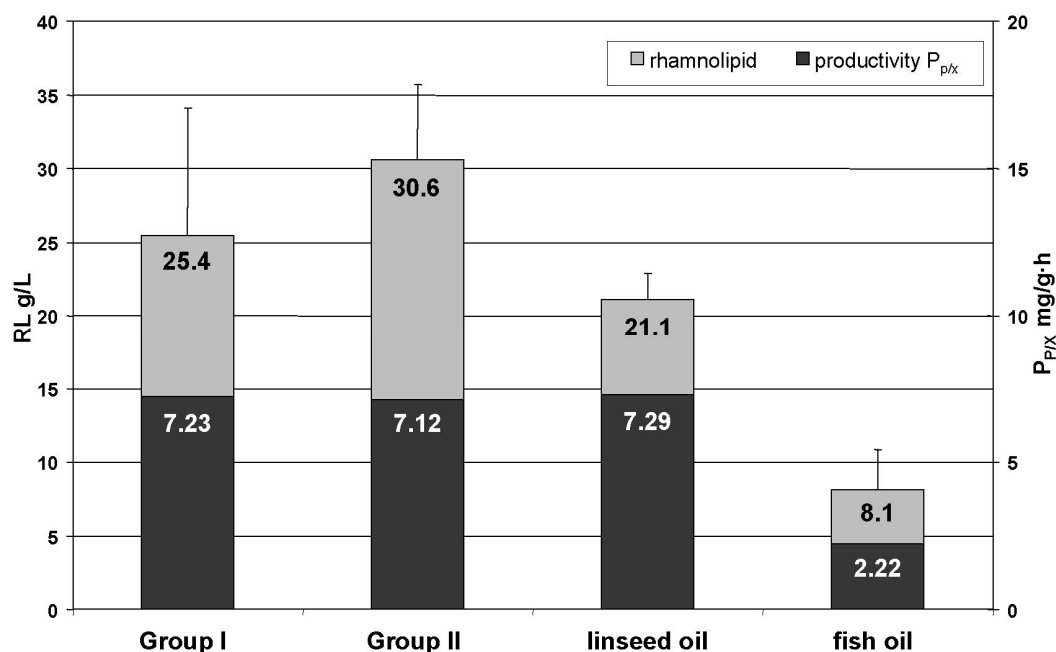


Fig. 6.9 Bioreactor screening with DSM 7108 on seven plant oils and fish oil. Summarized results according to total rhamnolipid concentration and the specific productivity.

Cultivations with plant oils with single unsaturated fatty acids

The bioreactor cultivations on plant oils with single unsaturated fatty acids as major fatty acid compound, were done with high oleic acid sunflower oils HOS 90+, HOS 80+ and rapeseed oil. The maximum specific growth rates lay between $0.19 - 0.4 \text{ h}^{-1}$, whereas the lowest was observed on HOS 80+ and the highest on rapeseed oil. The mean bio dry weights in the stationary phase for rapeseed oil were 13.3 g/l , whereas for the HOS sunflower oils BDW of $16 - 16.5 \text{ g/l}$ were reached. On average 149 g/l of the provided substrates were used. The onset of rhamnolipid production was after a process time of $37.5 - 45 \text{ h}$. Total rhamnolipid concentrations in between $23.3 - 27.4 \text{ g/l}$ were achieved. This corresponds to $28.4 - 33.4 \text{ g/l}$ if the extraction efficiency is considered. The second highest rhamnolipid concentration of the whole screening, with 38.4 g/l was found in a single process with rapeseed oil. On average 25.4 g/l rhamnolipid were produced on these substrates, which was about the 52-fold amount compared to the shaking flask cultivation. A $P_{p/x}$ of $7.23 \text{ mg/g}\cdot\text{h}$ was determined. For this group an average rhamnolipid 3 : rhamnolipid 1 (RL 3 : RL 1) ratio of $4.1 : 1$ (w/w) could be determined, whereas the mean volumetric productivity was $P_v = 0.11 \text{ g/l}\cdot\text{h}$.

Cultivations with plant oils with twice unsaturated fatty acids

Six bioreactor cultivations with sunflower oil, corn oil, and soy bean oil, containing mostly twice unsaturated fatty acid moieties were performed. The mean specific growth rates varied in a range of 0.22 h^{-1} for sunflower oil and 0.24 h^{-1} for soy bean oil. Similar mean BDWs during the stationary phase of about 18 g/l for sunflower oil, 17.8 g/l for corn oil and 17.4 g/l for soy bean oil were detectable. On average 182 g/l substrate were utilized in these processes. On soy bean and corn oil the oil consumptions were very homogenous and were located in a range of $204 - 211 \text{ g/l}$, whereas the mean consumption for sunflower oil was 131 g/l . Rhamnolipids were first detected after a process time of $39 - 65.5 \text{ h}$. In total $27.8 - 34.6 \text{ g/l}$ rhamnolipid were produced. Considering the extraction efficiency, this corresponds to $33.9 - 42.2 \text{ g/l}$. The highest rhamnolipid concentration in the screening, of 39.8 g/l was found in a single process on sunflower oil. On average 30.6 g/l rhamnolipid were produced on these substrates, which was about the 55-fold amount compared to the shaking flask cultivation. A $P_{p/x}$ of $7.12 \text{ mg/g}\cdot\text{h}$ resulted. The average rhamnolipid RL 3 : RL 1 ratio

at the end of the processes was 3.5 : 1 (w/w). With an average production rate of $P_v = 0.13 \text{ g/l}\cdot\text{h}$, these substrates showed the highest rates of this screening.

Cultivations with linseed oil

Linseed oil, with the three fold unsaturated linolenic acid as major fatty acid compound, was applied in two processes. A mean BDW of 12.6 g/l was achieved. The average specific growth rate was determined to 0.24 h^{-1} . At the end of the processes on average 101 g/l linseed oil were consumed. During the processes the first occurrence of rhamnolipid was observed at the 37.5 h. Compared to the shaking flask cultivation a 68-fold higher rhamnolipid concentration of 21.1 g/l was achieved which corresponds to 25.73 g/l, if the extraction efficiency is considered. A $P_{p/x}$ of $7.29 \text{ mg/g}\cdot\text{h}$ was achieved. An average RL 3 : RL 1 ratio of 5.4 : 1 (w/w) at the end of the process was determined. The mean production rate was about $0.1 \text{ g/l}\cdot\text{h}$.

Cultivations with fish oil

Three cultivations were performed with fish oil as substrate. During the processes a mean specific growth rate of 0.35 h^{-1} was achieved. In the stationary phase, an average bio dry weight (BDW) content of 16.1 g/l was determined. 122 g/l substrate were consumed. The onset of rhamnolipid production was after 37.5 – 63 h. In total 8.1 g/l rhamnolipid were accumulated. This corresponds to 9.9 g/l if the extraction efficiency is considered. The average rhamnolipid ratio of RL 3 : RL 1 at the end of the processes was 3.3 : 1 (w/w). A $P_{p/x}$ of $2.22 \text{ mg/g}\cdot\text{h}$ resulted. The mean production rate on this substrate was determined to $P_v = 0.04 \text{ g/l}\cdot\text{h}$.

Rhamnolipid formation and product spectrum

In all bioreactor cultivations the onset of rhamnolipid formation was approximately in the range of 37.5 to 63 hours of the process. This coincided with the transition of the growth to the stationary phase.

Fig. 6.10 shows the relation (w/w) of rhamnolipid 3 and 1. A proportional shift occurred over the processes. At the onset of the rhamnolipid formation in cultivations with *P. aeruginosa* DSM 7108 the dominant produced rhamnolipid species was rhamnolipid 1. The initial RL 3 : RL 1 ratios were distributed between 0.6 – 1.3 : 1

(w/w). During the processes this ratio shifted towards rhamnolipid 3 with ratios of 3.3 – 5.4 : 1 (w/w).

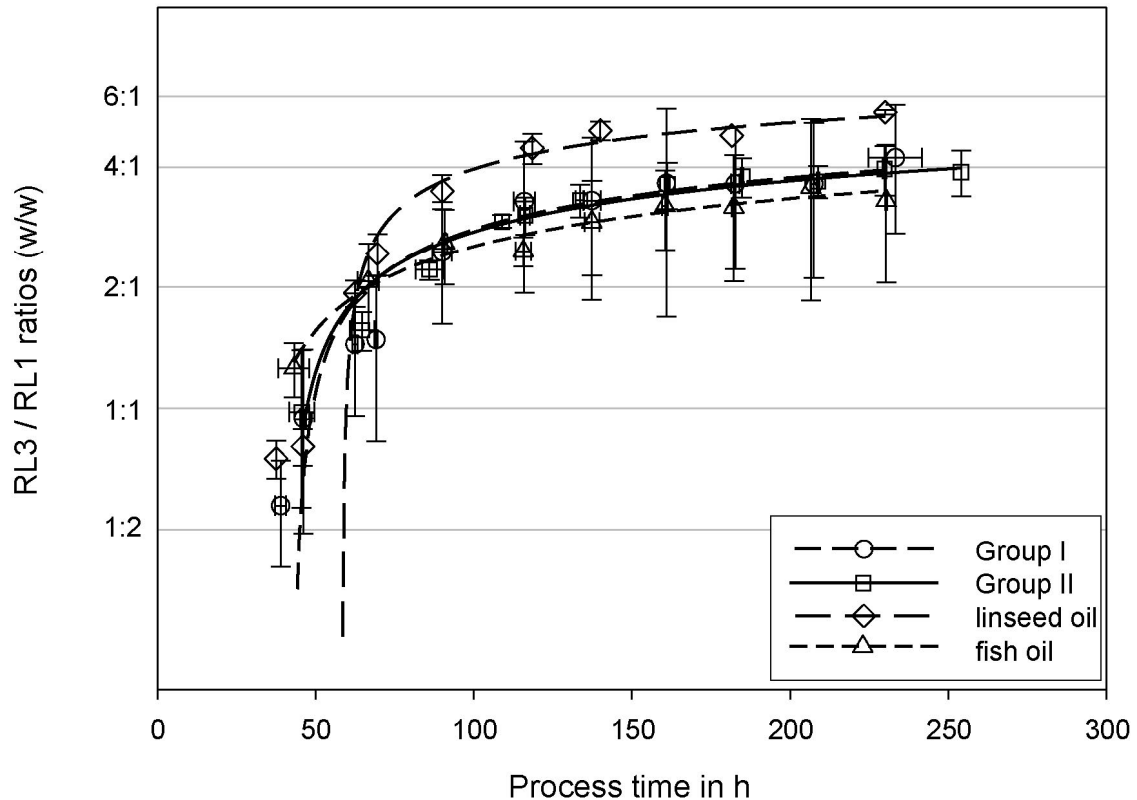


Fig. 6.10 Average rhamnolipid ratios of rhamnolipid 3 (RL 3) to rhamnolipid 1 (RL 1) for all bioreactor cultivations in terms of process time.

6.3.4 Discussion

As a general result it was shown that DSM 7108 utilizes all of the provided substrates, independent of their fatty acid composition. Nevertheless a clear tendency is that oils belonging to group I and II are the most suitable. A possible explanation is the substrate specificities of the lipolytic enzymes, for example of LipA. Hence the availability of the cleavage products might be influenced.

In the bioreactor cultivations more than three times higher biomass concentrations were achieved as compared to the shaking flask cultivations. Quantitatively, rhamnolipid concentrations in the shaking flask experiments, about 0.56 g/l, proved to be only a fraction of the comparable amounts gained in bioreactor cultivations, about 31 g/l. This clearly highlights the limitations of shaking flask screening

experiments for rhamnolipid production. Especially in view of the cell densities, that are probably essential for a quorum sensed strong induction of the rhamnolipid synthesis, a bioreactor screening seems to be the more appropriated approach. The specific productivity of the biomass achieved in the bioreactor cultivations were significantly higher as compared to the shaking flasks. Interestingly, the mean specific productivity was comparably high, about 7 mg/g·h, for all plant oils except the fish oil. This is evidence that the induction of the rhamnolipid biosynthesis is more pronounced under these conditions. Additionally, the *lipA* expression is indirectly quorum sensing regulated [85, 86]. Therefore, the availability of the fatty acids and glycerol is probably cell density dependent.

However, the qualitative conclusions of shaking flask and bioreactor cultivations on the most suitable substrates are similar, except for the fish oil. In this case no rhamnolipid formation was found in the shaking flasks.

The ratios of rhamnolipid 3 and 1 showed a shift towards RL3 at the end of the cultivations. However, they were independent of the substrates. This correlates with the results reported by Passeri et al. [32] and Rehm et al. [33] who found that the fatty acids of rhamnolipids originate from a *de novo* synthesis, not from intermediates of the β – oxidation cycle.

6.3.5 Conclusions

Seven widely-used plant oils and fish oil were evaluated for the production of rhamnolipids with *Pseudomonas aeruginosa* DSM 7108. It was found that all plant oils in principle are suitable substrates. However, fish oil proved to be non-suitable. The comparison of bioreactor and shaking flask results showed that qualitative and quantitative limitations of the latter cultivation type proved to be significant.

In view the quorum sensing signal systems of *P. aeruginosa* [74]; [14], the conclusion might be drawn, that the cell density plays an essential role for maximum induction of rhamnolipid synthesis. This is reflected by the relatively low $P_{P/X}$ values of shaking flasks as compared to bioreactor cultivations.

6.3.6 Methods

Microorganism

Pseudomonas aeruginosa DSM 7108 was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). The strain was stored as glycerol stock culture at -80°C.

Media

For seed cultures a LB medium containing 5 g/l NaCl was used [79].

For the bioreactor cultivations a Ca-free mineral salt media was used. The medium used was according to Giani et al. [51] with 0.5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O, 1 g/l KCl and 15 g/l NaNO₃, except that a 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.5 was applied. The phosphate buffer was separately autoclaved from the other salts. A sterile filtered trace elements solution consisted of 2 g/l sodium citrate x 2 H₂O, 0.28 g/l FeCl₃ x 6 H₂O, 1.4 g/l ZnSO₄ x 7 H₂O, 1.2 g/l CoCl₂ x 6H₂O, 1.2 g/l CuSO₄ x 5 H₂O and 0.8 g/l MnSO₄ x H₂O was added to the media as described below. All chemicals were of analytical grade.

As C-source three types of sunflower oils (HOS 90+, HOS 80+, conventional sunflower oil), linseed oil, rapeseed oil, corn oil, and soy bean oil (all by courtesy of Dr. B. Schlüter, Unternehmensberatung und Dienstleistung im vor- und nachgelagerten Bereich der Landwirtschaft, Bornheim, Germany) of technical/food grade were used. High oleic acid sunflower oils (HOS 90+; HOS 80+) and rapeseed oil are representatives for oils mainly composed of single unsaturated fatty acids. In contrast conventional sunflower, corn and soy bean oil are oils composed of twice unsaturated fatty acids and linseed oil is composed mainly of threefold unsaturated fatty acids. Additionally, a fish oil, DHA20TG (by courtesy of Dr. Krumbholz, KD-Pharma Bexbach GmbH, Bexbach, Germany), with docosahexaenoic acid (C22:6n-3), a omega-3 fatty acid, as major fatty acid compound, was utilized. The substrates were characterized by GC FAME analysis.

Cultivation conditions

For the seed cultures of the bioreactor cultures, 25 ml LB medium was inoculated with 100 µl of a glycerol stock culture in a 100 ml shaking flask. This culture was

incubated for 12 h at 30 °C and 140 rpm in an incubation shaker (HT Infors Multitron II), until an optical density at 580 nm (OD_{580}) of 2.5 – 3.0 was reached (Amersham Biosciences Ultrospec 1100pro).

For shaking flask experiments, 250 ml shaking flasks, without baffles, were supplemented with 100 ml of the formerly described mineral salt medium. The concentration of nutrient salts in this medium was decreased to the tenth part, whereas the buffer concentration of 0.1 M was unchanged. This was essential in order to achieve growth-limiting conditions. 125 g/l of substrate were added. Subsequently, the flasks were seeded by 1 ml of the seed culture and incubated at 30 °C at 150 rpm. 100 µl trace elements solution were added after 0; 20; 40; 70 h. Daily, the pH was checked and adjusted by addition of 4 M NaOH or H_3PO_4 , if necessary. The flask experiments were carried out in duplicates.

The bioreactor cultivations were performed in a 500 ml parallel bioreactor system (Sixfors, IFORS GmbH Einsbach, Germany) with a utilized volume of 228 ml (200 ml medium + 2x 14 ml substrate). The main cultures were inoculated with 2 ml of the seed culture. Temperature was thermostatically maintained at 30 °C. While the processes, the pH was controlled and maintained at 6.5. Additional 14 ml of corresponding substrate were added after approximately 40 h of process time. 200 µl of the trace element solution were added after 0; 20; 40; 70; 120 h of process time. For mechanical foam destruction, the reactors were equipped with additional 4 blade Rushton stirrers with a blade geometry of 1:1. For chemical defoaming Contraspum™ A4050 (Zschimmer&Schwarz GmbH & Co KG Chemische Fabriken, Lahnstein, Germany) was used. Until the onset of foaming, the air flow rate was maintained at 20 l/h and mixing speed was set to 800 rpm. Subsequently, the aeration rate was set to 6 l/h and the mixing speed was increased to 1100 rpm. The processes were controlled and recorded by a personal computer system with the process software Iris (INFORS GmbH Einsbach, Germany).

Sampling protocol

For oil separation and cell washing, 5 ml of the cultivation broth were mixed with 5 ml of hexane in a pre-weighed 15 ml screw cup and centrifuged at 7500 g at 15 °C for 15 minutes. 2 x 1.5 ml of the upper phase, containing hexane and oil, were transferred in pre-weighed 2 ml cups and the hexane was evaporated, at 60 °C in a

thermo mixer. Afterwards, the cups were dried for 24 h at 100 °C and the oil content was determined by weighing. Subsequently, 3 ml of the lower phase were transferred and acidified with 85 % H₃PO₄ to pH = 2 - 3. For the extraction of the rhamnolipids 4 ml of ethyl acetate were added. After mixing, the suspension was centrifuged at 7500 g at 4 °C for 15 minutes. 2 x 1.5 ml of the upper phase were transferred in 2 ml cups and the ethyl acetate was evaporated at 60 °C in a thermo mixer for 24 h. The residue was dissolved in an appropriate amount of acetonitrile, and the rhamnolipid content of the samples were analysed by HPLC. For bio dry weight determination, the biomass pellet gained after the first extraction step was dried for 48 h at 100 °C and weighed. All cups used were previously heated for 48 h at 100 °C until their weights were constant. All samples were analyzed in duplicates.

Rhamnolipid determination

The quantitative determination of rhamnolipid 1 and rhamnolipid 3 was carried out by HPLC analysis according to Schenk et al. [80]. Rhamnolipid 1 standard was produced by enzymatic hydrolysis of rhamnolipid 3 [23], and purified by column chromatography. As the stationary phase, fine silica gel was used, and as the mobile phase chloroform-methanol (75:25) was utilized. The rhamnolipid 3 standard, with a purity grade of 97.3 % was purchased from Hoechst AG (Frankfurt, Germany).

For the evaluation of the applied single step extraction, an extended extraction protocol was used. For that purpose, the biomass pellet and the hexane phase were extracted twice, while the water phase was extracted three times. This evaluation showed that approximately 82 % of the rhamnolipid were gained in a single ethyl acetate extraction step.

GC-Fatty acid methyl ester determination

For the characterization of the used as substrates, a fatty acid methyl ester (FAME) gas chromatography analysis was performed by use of the TMSH-esterification method according to Butte [81].

6.3.7 Authors' contributions & Acknowledgements

F.L., C.S. & R.H. coordinated the work in this project, gave intellectual courtesy and were involved in the writing work. I.S. & F.L. performed the experiments and made the analysis presented in this publication.

We thank the FNR e.V. (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.) for funding, the industrial project partners Sartorius AG, Ecover Belgium and Henkel AG for technical support, and our academic partners Dr. Rosenau (University of Düsseldorf), Prof. Dr. Chmiel and PD Dr. Janke (UPT, Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH i.L., Saarbrücken) and the group of Dr. Behrensmeier (Forschungszentrum Karlsruhe) for lively discussions.

6.4 Kapitel IV

Fast Quantitative Determination of Microbial Rhamnolipids from Cultivation Broths by ATR-FTIR Spectroscopy

Frank Leitermann, Christoph Syldatk, Rudolf Hausmann

Chair of Technical Biology, Research University Karlsruhe, 76131 Karlsruhe, Germany

Status: prepared for publication, BMC Journal of Biological Engineering

6.4.1 Abstract

Background

Vibrational spectroscopic techniques are becoming increasingly important and popular, because they have the potential of providing rapid and convenient solutions to routine analytical problems. A variety of substances can be characterized, identified and also quantified rapidly.

Results

A fast ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy) in time technique has been applied, that is suitable to quantify the concentrations of microbial rhamnolipids in a typical cultivation process. While the usually applied HPLC analysis requires an extensive and time consuming multi step extraction protocol for sample preparation the ATR-FTIR-method allows the quantification of the rhamnolipids within 20 minutes. Accuracies in between 0.5 g/l – 2.1 g/L for the different analytes were determined by cross validation of the calibration set. Even better accuracies in between 0.28 g/l – 0.59 g/l were found for independent test samples of an arbitrarily selected cultivation.

Conclusions

ATR-FTIR was found to be suitable for the rapid analysis of rhamnolipids in a biotechnological process with a good reproducibility in sample determination and a sufficient accuracy. As the accuracy of the calibration algorithm is dependant on the number of known samples involved its accuracy will further increase with time.

6.4.2 Background

Biotechnology production processes are an increasingly important manufacturing route for products, ranging from bulk chemicals like ethanol to high value proteins [87]. The control of these bioprocesses is still suboptimal. Usually only a few parameters, like pH, pO₂ and temperature, are monitored online. All additional information required must be gained by analysis of individual samples. Typical assays, often base upon enzymatic reactions or separation techniques such as high performance liquid chromatography (HPLC) [88]. Therefore, the analysis results often will be available only with a significant time delay.

Hence, vibrational spectroscopic techniques that provide rapid and convenient solutions to routine analytical problems are becoming increasingly adopted. A variety of substances can be characterized, identified and also quantified rapidly in parallel from a single sample spectrum [89]. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) is a reliable and well recognized method [90]. For a complex analyte-matrix combination, like it occurs in fermentations broths, the adaptation of the FTIR technique needs extensive experience and time. Nevertheless, once a method has been established, it allows for relatively fast assays of compounds, where the alternative quantitative analysis (e.g. HPLC methods) can be time consuming. Attenuated total reflection infrared Fourier transform spectroscopy (ATR-FTIR) is a FTIR variety, which allows to determine organic substances in aqueous solutions [91]. ATR-FTIR involves the collection of radiation reflected from the interfacial surface between aqueous solution and a reflection element (ATR crystal). In this crystal evanescent waves penetrate from the crystal to the aqueous solution and are absorbed by substances in this solution [73, 92]. Concerning the analysis of biosurfactants several spectroscopic methods for the characterization, identification and quantification have been reported [31, 93-95].

Biosurfactants are microbial produced surface active compounds [96]. Glycolipid biosurfactants consisting of rhamnose sugars and aliphatic chains moieties are called rhamnolipids. Several variations of these rhamnolipids are known [22]. Rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* strains are often composed of one or two L-rhamnose and respectively one or two β -hydroxydecanoic acid moieties. They are termed

rhamnolipid 1 (L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate) and rhamnolipid 3 (L-rhamnosylrhamnosyl-3-hydroxy-decanoyl-3-hydroxydecanoate) [23].

The objective of the presented work is to highlight the range of application given by utilizing an ATR-FTIR method for the monitoring of a biotechnological process for the production of microbial rhamnolipids. Additionally the potential of this method for achieving structural information and identification purposes concerning rhamnolipids was investigated.

6.4.3 Results

Characterization and interpretation of the absorbance spectrum of rhamnolipid 3

An ATR-FTIR spectrum of pure rhamnolipid 3 in water was recorded, as shown in Fig. 6.11. For a better understanding of the IR spectrum, subsequently the dominant absorbance bands were correlated to the according group absorbance frequencies.

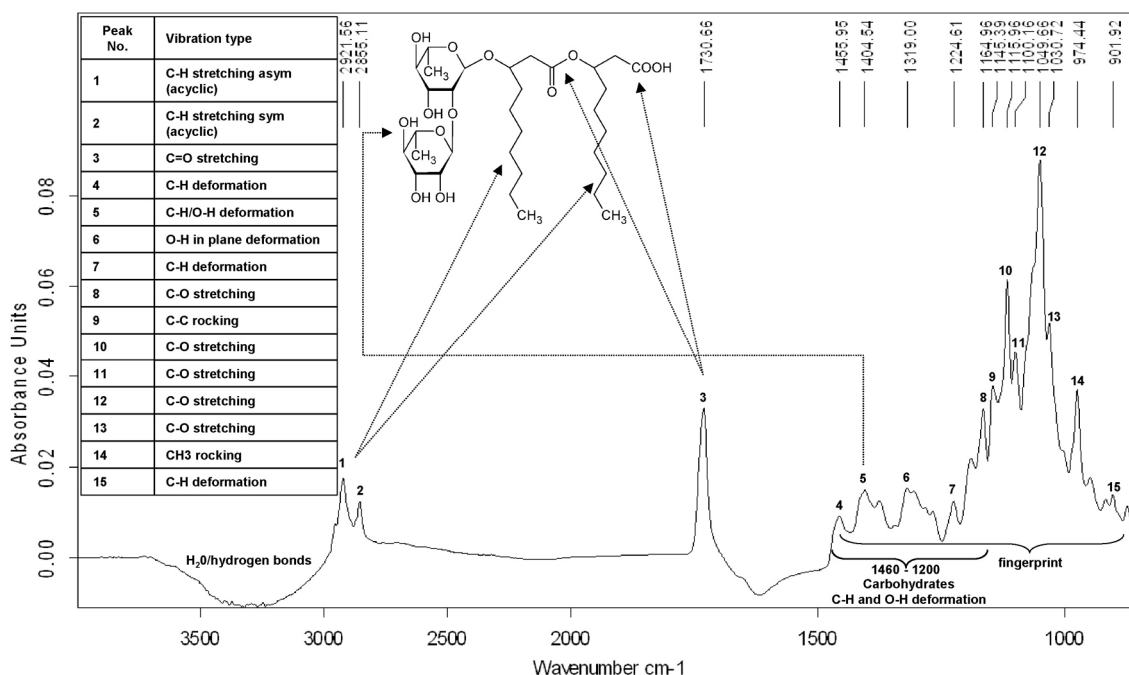


Fig. 6.11 ATR-FTIR spectra of rhamnolipid 3 in water (89 mg/ml). It was tried to allocate conspicuous absorption to corresponding characteristic group absorptions from literature.

The broad negative bands at about 3300 cm^{-1} and 1640 cm^{-1} result from a higher water concentration in the reference spectrum (pure water) relative to the aqueous sample, and are attributed to hydrogen bonding and O-H stretching of water. The double bands at 2921 and 2855 cm^{-1} derive from symmetric C-H stretching vibrations of aliphatic groups, like represented in the hydroxydecanoic acid chain tails of rhamnolipid 3. A C=O stretching band at 1730 cm^{-1} is characteristic for ester bonds and carboxylic acid groups. In the fingerprint region of the spectrum, the area in between $1200 - 1460\text{ cm}^{-1}$ represents C-H and O-H deformation vibrations, typical for carbohydrates as for example in the rhamnose units of the molecule. The lower

range of the fingerprint region below 1200 cm^{-1} represents different kinds of C-H, C-O and CH_3 vibrations, that can't be allocated closer [73].

Basic investigations for the applicability of ATR-FTIR

Rhamnolipids are surface active compounds, and, therefore, absorbance effects at the interfacial surface of the ATR crystal to liquid phase must be expected. In respect of the small volume of the sample, $20\text{ }\mu\text{l}$, even evaporation may affect the absorbance intensity of the spectra and influence the quantification of the analytes. Hence, time dependant spectra, of the samples, were recorded for comparison. Fig. 6.12 shows 4 spectra of the same sample, recorded in time intervals of 2 minutes. Neither intensity changes of single bands nor an overall intensity change of the absorbance spectrum were observed. Therefore evaporation and interfacial absorbance effects were not relevant for all practical purposes.

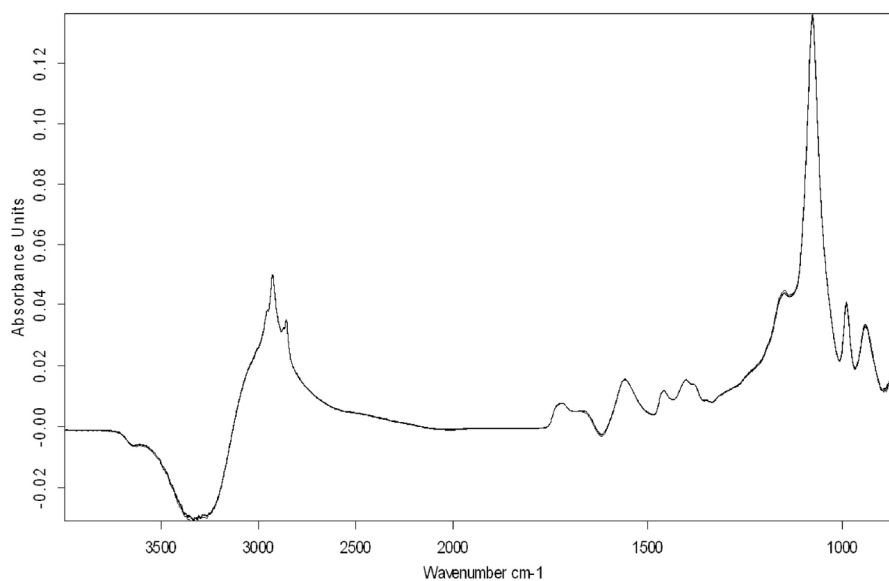


Fig. 6.12 Investigation of adsorption and evaporation effects in the ATR cell in a time range of 8 minutes.

For verification of the reproducibility of the method two samples of the cultivation broth were prepared and measured twice. The corresponding spectra are shown in Fig. 6.13. The comparison of the corresponding spectra only showed minimal diversities, relating to the spectra intensities. For the first sample a correlation above 99.99 %, and for the second sample a correlation of 99.96%, was found.

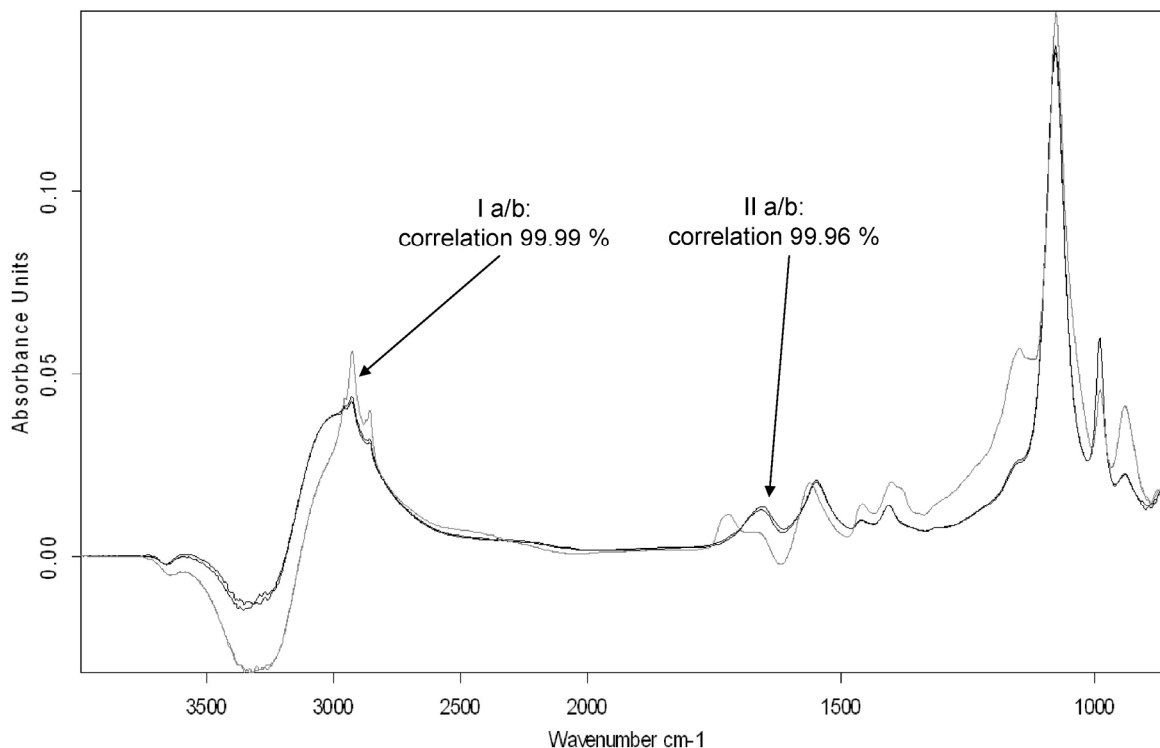


Fig. 6.13 The figure displays four spectra of two fermentation derived samples, after double application. A comparison of the corresponding two spectra of each sample, showed correlations of above 99.9 %.

Quantification of rhamnolipids by ATR-FTIR

For establishing of multivariate calibration methods, a spectra set of about 80 samples, derived from 9 different rhamnolipid fermentations, was recorded. Using this spectra set, in a first step, three independent calibrations for rhamnolipid 1 and rhamnolipid 3, as well as the combined rhamnolipid 1 and 3 content, were set up. All calibrations were evaluated and optimized by cross validation, according to their determination coefficients R^2 , RMSECV and utilized ranks. The results for the reference versus the predicted values are displayed in Figure 4. By an applied rank of five, similar determination coefficients R^2 from 95.56 to 96.07 were calculated for all three analytes. For rhamnolipid 1 and rhamnolipid 3 a RMSECV of 0.496 g/L respectively 1.49 g/L was determined. For the total rhamnolipid 1 and 3 in the samples an error of 2.06 g/L was found. For the calibration purposes of all three analytes, a single frequency area from 900 – 1200 cm^{-1} was selected. As mathematical pre-treatment for rhamnolipid 1 and rhamnolipid 3 the first derivative

with the subtraction of a straight line and for rhamnolipid total the first derivative, results in the highest determination coefficients and lowest prediction errors.

In a second step, the evaluation of the prediction error of the established calibration models versus an independent test samples set, from an arbitrarily selected fermentation process, were investigated by test set validations. The results are displayed in Fig. 6.14. At a rank of 5, for rhamnolipid 1 a determination coefficient R^2 of 87.88 and a RMSEP of 0.278 g/L were calculated. When considering a rank of 5, the optimized correlation for rhamnolipid 3 responds with a R^2 of 99.43 and a RMSEP of 0.441 g/L. For the total rhamnolipid content a R^2 of 99.31 and a RMSEP of 0.586, at a rank of 5, were found. Similar to the cross validated models, the best results were found by restricting of a single frequency area from 900 – 1200 cm^{-1} . Also the similar mathematical pre-treatments, as described above, were responding the best results.

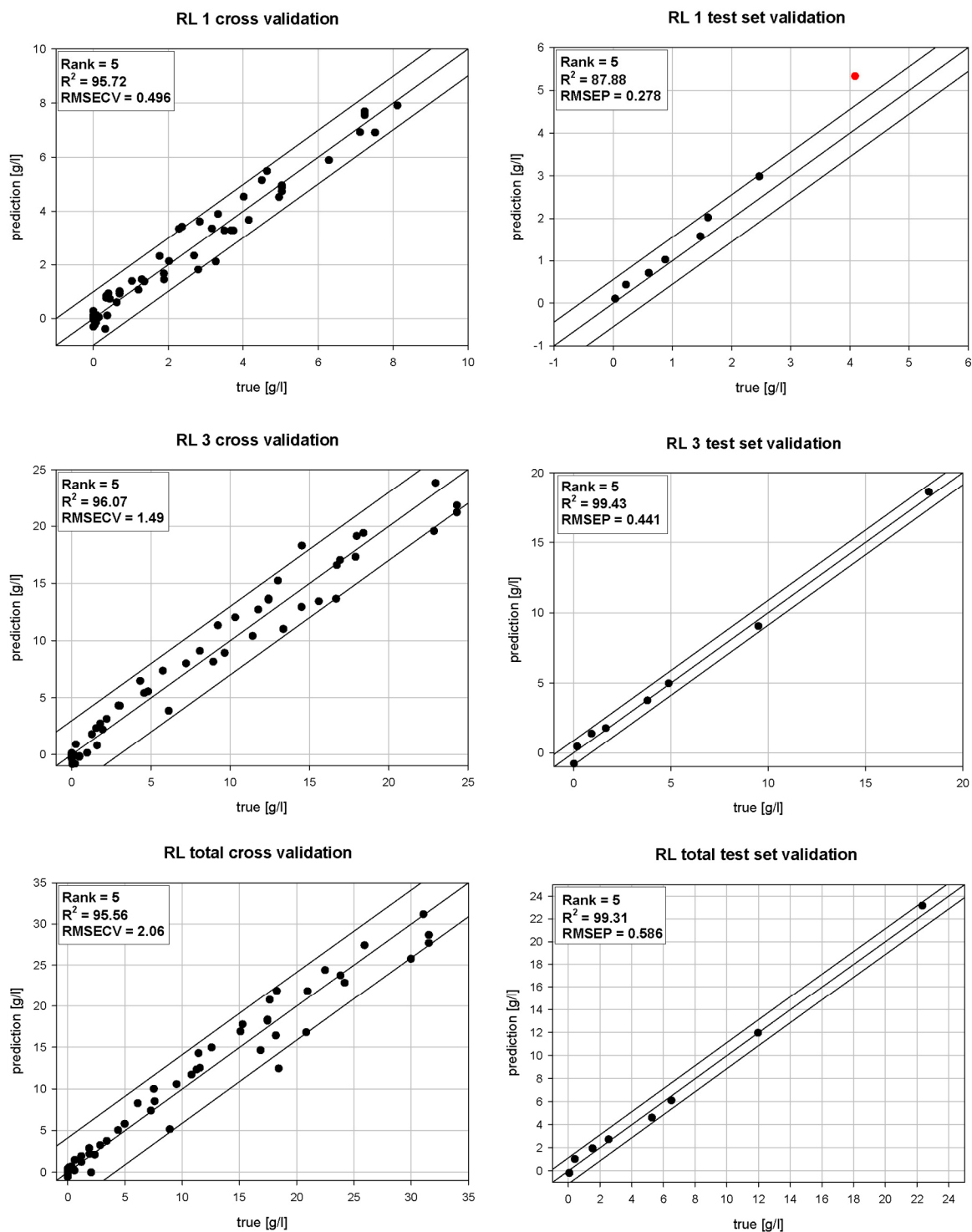


Fig. 6.14 Quantification of rhamnolipids. Cross validation and test set validation results.

6.4.4 Discussion

The spectrum of pure rhamnolipid 3, as shown in Figure 1, indicates characteristic absorption bands at 2921 and 2855 cm^{-1} derived from symmetric C-H and a C=O stretching band at 1730 cm^{-1} . Gartshore et al. [93] suggested the correlation of a single peak area when analysing artificial prepared samples of three biosurfactants, lecithin, cholesterol laurate, and, spiculi sporic acid. The peak utilized in this study was in between 1720 - 1770 cm^{-1} . Unlike these spectroscopic experiments, the calibrations derived from the cultivation samples showed the best correlations for the quantitative determination of rhamnolipids when the fingerprint regions of the spectra were utilized. This could be explained by the complexity of the analyte-matrix of real cultivation samples. Besides rhamnolipids, a great variety of additional substances, like plant oil, fatty acids, buffer salts or ester compounds, were present, which influence the absorption intensities in the spectrum area of the three characteristic bands upon 1700 cm^{-1} . Hence, the unapparent information comprised in the fingerprint area of the spectra, was found to be most suitable for selective, quantitative determinations of rhamnolipids.

Overall the ATR-FTIR assays, showed a good reproducibility. Even suspected interfacial or evaporation effects could not be observed, as can be seen from the consecutive spectra shown in Figures 2 and 3. The differentiation of rhamnolipid 1, rhamnolipid 3 and the total rhamnolipid was possible.

By cross validation, predictive errors in between 0.496 g/l to 2.06 g/l were determined which are adequate for a fast *in time* analysis. Similar or even better results, with predictive errors from 0.278 g/l to 0.586 g/l, were obtained by test set validation of independent cultivation samples. Accounting for the highest rhamnolipid 1 value in Figure 4, resulted from a possible outlier, the derived correlation error seems to be even lower. Besides, it has been shown that reliable correlations could be found, despite different fermentation conditions with respect to the substrates. An improvement of the accuracy and stability of the correlations, by expansion of the calibrations data sets with samples from additional cultivations, is expected. Besides that, the major advantage of an ATR-FTIR compared to a HPLC quantification of rhamnolipids, is the time needed. Whereas HPLC data is available after

approximately 24 h, caused by multiple extractions, evaporation and derivatisation steps, ATR-FTIR provide process values within 20 minutes.

6.4.5 Conclusions

ATR-FTIR was found to be very appropriated for the rapid analysis of rhamnolipids in a biotechnological process with a sufficient accuracy and a good reproducibility. Further improvements of the quantification accuracy can be expected by expansion of the calibration data set with samples from additional cultivations. By opening a “spectroscopic eye” into bioprocesses for the production of microbial rhamnolipids, *in time* ATR-FTIR monitoring makes rapid process characterization and process control much easier. Future objectives for the modifications of the utilized ATR-FTIR technique towards an online *in situ* measurement system, seem to be very promising.

6.4.6 Materials & Methods

Microorganism

Pseudomonas aeruginosa DSM 7108 was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. The strain is stored as glycerol stock culture at -80 °C.

Media

For seed cultures a LB medium containing 5 g/l NaCl was used [97]. For the bioreactor cultivations a Ca-free mineral salt medium was used. The medium is based upon a 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.5 supplemented with 0.5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O, 1 g/l KCl and 15 g/l NaNO₃ (modified, according to [51]). The phosphate buffer was separately autoclaved from the other salts. A sterile filtered trace elements solution consisted of 2 g/l sodium citrate x 2 H₂O, 0.28 g/l FeCl₃ x 6 H₂O, 1.4 g/l ZnSO₄ x 7 H₂O, 1.2 g/l CoCl₂ x 6H₂O, 1.2 g/l CuSO₄ x 5 H₂O and 0.8 g/l MnSO₄ x H₂O was added to the media as described below. All chemicals were of analytical grade. As C-source three types of sunflower oils (HOS 90+, HOS 80+, conventional sunflower oil), linseed oil, rapeseed oil, corn oil soy bean oil (all by courtesy of Dr. B Schlüter, Unternehmensberatung und Dienstleistung im vor- und nachgelagerten Bereich der Landwirtschaft, Bornheim, Germany) and fish oil (by

courtesy of Dr. Krumbholz, KD-Pharma Bexbach GmbH, Bexbach, Germany) of technical/food grade were used.

Cultivation conditions

For the inoculums of the bioreactor cultures, 25 ml LB medium was inoculated with 100 µl of a glycerol stock culture in a 100 ml shaking flask. This culture was incubated for 12 h at 30 °C and 140 rpm in an incubation shaker (HT Infors Multitron II), until an optical density at 580 nm (OD_{580}) of 2.5 – 3.0 was reached (Amersham Biosciences Ultrospec 1100pro). With 2 ml of this seed culture the main cultures were inoculated. The cultivations were performed in a 500 ml parallel bioreactor system (Sixfors, IFORS GmbH Einsbach, Germany) with 214 ml (200 ml media + 14 ml plant oil) initial volume. The temperature was controlled and maintained at 30°C. During the process, the pH was controlled and maintained at 6.5. Additional 14 ml substrate was added after approximately 40 h of process time. One ml per liter of the trace element solution was added at distinct process times ($t = 0; 20; 40; 70; 120$ h). The reactors were equipped with additional 4 blade Rushton stirrers with a blade geometry of 1:1 for mechanical foam destruction. For chemical defoaming Contraspum™ A4050 (Zschimmer&Schwarz GmbH & Co KG Chemische Fabriken, Lahnstein, Germany) was used. The processes were controlled and recorded by a personal computer system with the process software Iris (INFORS GmbH Einsbach, Germany).

Sampling protocol

The quantifications of bio dry weight, oil and rhamnolipid contents, were performed conform the extraction protocol shown in Fig. 6.15.

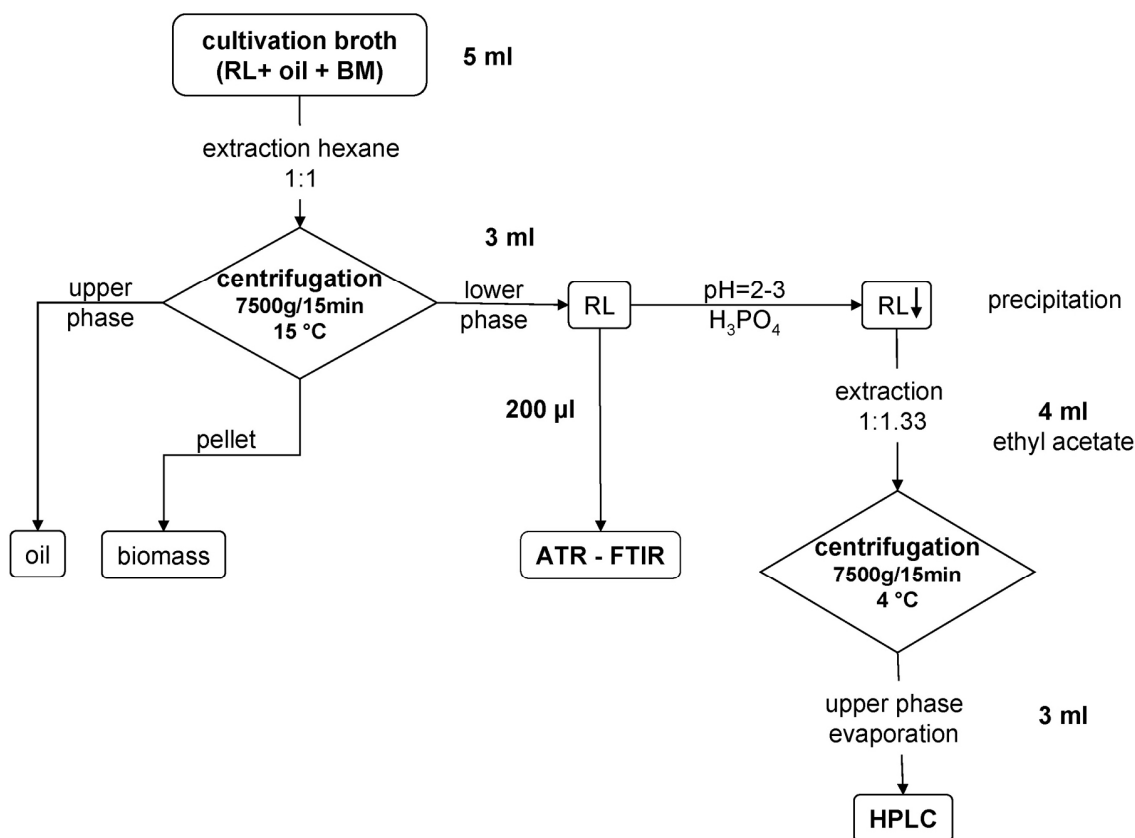


Fig. 6.15 Proceeding for the sample extraction from culture broths.

For oil and cell separation, 5 ml of cultivation broth was mixed with 5 ml of hexane and centrifuged at 7500 g at 15 °C for 15 minutes. 200 µl of the lower phase was used for the ATR – FTIR analysis, as described below. For HPLC reference analysis, 3 ml of the lower phase were transferred and acidified with 85% H₃PO₄ to pH = 2 - 3. 4 ml of ethyl acetate were added for the extraction of the rhamnolipids. After mixing, the suspension was centrifuged at 7500 g at 4°C for 15 minutes. 2x 1.5 ml of the upper phase were transferred in 2 ml cups and the ethyl acetate was evaporated at 60°C in a thermo mixer for 24 h and processed as described in the HPLC section.

ATR FTIR spectroscopy

Attenuated Total Reflectance (ATR) Fourier transform infrared spectra were collected with a bench-top spectrometer (Tensor 27, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany), equipped with a liquid nitrogen cooled, linear LN-MCT-Photovoltaic detector (Kolmar Technologies, Inc., Newburyport, USA) and a BioATR II cell

(Harrick Scientific Products, Inc., Pleasantville, USA). The Bio-ATR II cell was purged by a continuous flow of dried air to minimize water vapour in the IR-beam path. The ATR cell was temperature stabilized at 25 °C by a refrigerated circulator bath (HAAKE DC30-K20, Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Germany) to avoid water signals in the IR-sample spectrum resulting from temperature shifts between reference and sample measurement. Before the measurement the crystal of the ATR cell was washed several times with 20 µl H₂O. Cleanliness of the ATR-crystal was controlled by the measurement of a baseline of the water covered crystal before and after washing.

As reference spectrum water was measured. Then the cell was washed twice with 20 µl sample and the actual sample measurement was performed. Both for reference and sample measurement 64 interferograms were averaged resulting in an overall scanning time of about 1 minute. Spectra were recorded in a range from 850 – 4000 cm⁻¹ at a resolution of 4 cm⁻¹ and with an aperture of 6 mm. Data storage, spectra processing, substance comparison and the quantitative analysis of the spectra were done with the software OPUS 5.5 (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany).

Data analysis

The recorded FT-IR spectra together with the results from HPLC reference analysis were analyzed using partial least-squares (PLS) regression. PLS calibration development, including cross- and test-set validation were performed with the QUANT 2 module of the OPUS 5.5 software, according to the multivariate calibration techniques described by Conzen [71]. Multiple mathematical pre-treatments were iteratively applied and for evaluation of the fits of the correlations to the reference HPLC data, the determination coefficients R^2 were calculated. Additionally, the predictive abilities of the correlation methods were proofed by calculation of two types of prediction errors. For validation within the whole calibration set, cross validations, with one leave out sample, were applied, and the root mean square errors of cross validation (RMSECV) were determined.

The evaluation of the predictive quality of an established calibration model applied on an independent test samples set from an arbitrarily selected fermentation process was done by test set validations and calculation of the root mean square error of prediction (RMSEP). All errors were calculated for different numbers of PLS factors.

During the establishing of the calibration models, spectra were checked for outliers by visual inspection of principal component score plots. The final correlations were selected accordant the lowest prediction errors and used PLS ranks versus highest R^2 values, to obtain confidential and stable calibration models.

Reference rhamnolipid determination by HPLC

The ATR-FTIR analysis was calibrated and validated using HPLC as reference method. A rhamnolipid 1 standard was produced for the calibration of the HPLC device by enzymatic hydrolysis of rhamnolipid 3 [23] and purified by chromatography. As the stationary phase fine silica gel was used and as the mobile phase a chloroform-methanol 75:25 was utilized. The rhamnolipid 3 standard with a purity grade of 97.3 % was purchased from Hoechst AG (Frankfurt, Germany).

For UV-detection, the rhamnolipids were derivatized into esters of bromophenacylbromide. This was done by the use of a 1:1 (v/v) derivatisation solution of 40 mM 4-bromophenacyl bromide and 20 mM triethylammonia in acetonitrile [80]. The rhamnolipid content of the samples was analyzed after redissolving the pellet in 1.5 ml of acetonitrile. A rhamnolipid content of approximately 0.1 - 1 mM was achieved by appropriate dilution. 1 ml of this solution was mixed with 200 μ l of the derivatization agent. The derivatisation reaction took place at 60 °C for 90 min. Subsequently the rhamnolipids were separated in a reverse phase C_{18} column (Supelcosil LC-18, Supelco/Sigma-Aldriche cooperation Bellefonte, Pennsylvania, USA) on an HPLC device (Agilent 1100 series, Agilent Technologies GmbH, Germany) with a linear gradient of acetonitrile-water, and finally detected by a UV-detector at 265 nm. Solvent A consisted of 95:5 H_2O /acetonitrile (v/v), solvent B was composed by 95:5 acetonitrile/ H_2O (v/v).

6.4.7 Authors' contributions & Acknowledgement

F.L., C.S. & R.H. coordinated the work in this project, gave intellectual courtesy and were involved in the writing work. F.L. performed the experiments and made the analysis presented in this publication.

We thank the FNR e.V. (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.) for funding, the industrial project partners Bruker Optics GmbH, Sartorius AG, Ecover Belgium and Henkel AG for technical support, and our academic partners Dr. Rosenau

(University of Düsseldorf), Prof. Dr. Chmiel and PD Dr. Janke (UPT, Gesellschaft für umweltkompatible Prozesstechnik mbH i.L., Saarbrücken) and the group of Dr. Behrensmeier (Forschungszentrum Karlsruhe) for lively discussions.

6.5 Kapitel V

Biotenside und deren Herstellung.

Frank Leitermann, Christoph Syldatk, Rudolf Hausmann

Lehrstuhl für Technische Biologie, Universität Karlsruhe (TH)

Mitverfasser: Patentanwalt Claus Peter Pietruk

Status: Eingereicht, Deutsches Patent- und Markenamt

6.5.1 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft das oberbegrifflich Beanspruchte und befasst sich somit mit der Herstellung von Biotensiden.

Als Tenside werden typisch jene Verbindungen bezeichnet, die einerseits einen hydrophilen und andererseits einen hydrophoben Teil enthalten. Dies macht sie in einer Vielzahl von Anwendungen sehr nützlich; die allgemein bekannteste Anwendung für Tenside dürften Waschmittel sein, bei denen mit Wasser aus Kleidungsstücken und dergleichen fetthaltige Substanzen ausgewaschen werden sollen. Dabei treten typisch Grenzflächen zwischen Wasser- und Öl- bzw. Fettphase auf, an denen die Tenside wirken. Es sei darauf hingewiesen, dass es eine Vielzahl weiterer, z. B. kosmetischer, pharmazeutischer, aber auch generell technischer Anwendungen für Tenside gibt, die neben den Waschmitteln große Bedeutung haben, zum Beispiel das Entfetten von Bauteilen.

Wichtige Biotenside sind die Rhamnolipide. Diese können in geeignet aufgereinigter Form auch bei der Behandlung von Hautkrankheiten wie Verbrennungen, Psoriasis, Ekzemen oder atopischer Dermatitis eingesetzt werden; die Aufbereitung umfasst im Regelfall die teure Entfernung von bei der Biotensidproduktion typisch zugesetzten chemischen Schaumzerstörern wie beispielsweise Silikonölen.

Daneben ist es möglich, Rhamnolipide auch weiterzuverarbeiten, wie etwa zur Produktion von Rhamnose, einer 6-Deoxyhexose, die synthetisch noch nicht ökonomisch herstellbar ist, sondern extrahiert oder auf andere Weise biologisch hergestellt werden muss, um die Rhamnose als wichtigen synthetischen Baustein der Feinchemie herzustellen.

Hinsichtlich der Bezeichnung der Rhamnolipide R1 bis R4 wird nicht nur auf Lang und Trowitzsch-Kienast verwiesen, sondern auch auf die EP 0 575 908. Dass daneben noch weitere, typisch in geringerem Umfang produzierte und/oder auf anderen Wegen und daher seltener erhaltene Derivate existieren, sei erwähnt.

Es ist bekannt, Tenside auf biologischem Wege herzustellen, indem tensidproduzierenden Mikroorganismen Umgebungsbedingungen angeboten werden, unter welchen die Mikroorganismen besonders effizient Tenside produzieren. Die Biotensidproduktion hat den Vorteil, dass die Produktion unter Verwendung nachwachsender Rohstoffe als Mikroorganismen-Nährstoffe durchgeführt werden kann.

Prinzipiell ist es so, dass eine Vielzahl von Tensiden bereits biologisch herstellbar ist, vergleiche insbesondere das Buch „BIOTENSIDE“ von S. Lang und W. Trowitzsch-Kienast, 1. Auflage 2002, Teubner-Verlag; auf die dortigen Literaturzitate insbesondere zu Übersichtszwecken wird explizit hingewiesen. Eine wichtige Gruppe von Biotensiden sind Rhamnolipide.

Aus der US-PS 5,658,793 ist ein Verfahren zur Herstellung von L-Rhamnose bekannt. L-Rhamnose kann durch Hydrolyse des Biotensids Rhamnolipid hergestellt werden. Das bekannte Verfahren verwendet Bakterien des Typus *Pseudomonas aeruginosa*. Es wird dort angegeben, dass mit *Pseudomonas aeruginosa* DSM7107 und *Pseudomonas aeruginosa* DSM7108 Rhamnolipide in einer Konzentration von 70 - 120 g/l Kulturlösung erzeugbar sind. Auf die prioritätsgleiche EP 0 575 908 B1 wird hingewiesen.

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Rhamnose ist bekannt aus dem US-Patent 4,933,281. Dort wird die Verwendung von Kulturmedien, die Pflanzenöle enthalten, beschrieben. Es wird angegeben, wie sich die Rhamnoseproduktion im Laufe eines Ansatzes verhält.

Hingewiesen sei auch auf den Aufsatz „RHAMNOSE AND RHMOLIPIDE BIOSYNTHESIS BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA“ von G. Hauser und M. Karnovsky, The Journal of Biological Chemistry 1957, und auf die DE 196 54 942 B4, betreffend „Rhamnolipid-Alginatpolymer-Komplexe“ deren mikrobielle Herstellung mit dafür geeignete Mikroorganismen und ihre Anwendung“. Dort wird auf ein *Pseudomonas aeruginosa*-Bakterium mit der Hinterlegungsnummer

DSM 10554 verwiesen. Die Kultivierung des Bakteriums soll in Schrägagar-Röhrchen oder auf Agar-Platten in einer Nährbouillon angegebener Zusammensetzung erfolgen. Als Kohlenstoffquelle sollen eine oder mehrere pflanzliche Öle, bevorzugt Rapsöl, verwendet werden oder Abfälle aus der Margarine-Produktion.

Verwiesen sei auch auf den Aufsatz von W. Sabra et al. in „Microbiology“, Band 148, Nr. 10, Seiten 3195-3202 vom Oktober 2002, betreffend „PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA PA01 TO OXIDATIVE STRESS IN CONTROLLED MICRORAEROBIC AND AEROBIC CULTURES“.

Außerdem wird verwiesen auf den Aufsatz „PRODUCTION OF MICROBIALBIOSURFACTANTS FROM SOY MOLASSES“ von D. Solaiman et al., veröffentlicht am 21. August 2005 in „Society of Industrial Microbiology Annual Meeting“, Seite 75.

Auch der Aufsatz „RHAMNOLIPID SURFACTANT PRODUCTION AFFECTS BIOFILM ARCHITECTURE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA PAOI*“ von M.E. Davey et al., J. Bacteriol, Februar 2003, 185 (3): 1027-1036 sei zitiert.

Aus der US-PS 4,628,030 ist ein „PROCESS FOR THE PRODUCTION OF RHAMNOLIPIDS“ bekannt, bei dem *Pseudomonas* in einem wässrigen Medium kultiviert wird. Es soll eine zumindest zweifache Begrenzung von essentiellen Wachstumssubstanzen erfolgen.

Die US-PS 5,077,206 betrifft ein weiteres Verfahren zur Herstellung L-Rhamnose. Ein Verfahren zur biotechnischen Produktion von Rhamnolipiden, die die *Pseudomonas*-Spezies DSM2874 einsetzt, ist aus der US 4,814,272 bekannt.

Es ist prinzipiell wünschenswert, biologische Substanzen mit hoher Ausbeute in hoher Reinheit bei geringem Aufwand mit preiswerten Medien und Nährsubstraten produzieren zu können. Die vorstehend zitierten Dokumente zeigen, dass bei der Produktion von Biotensiden, insbesondere von Rhamnolipiden als besonderen

Biotensiden, noch Verbesserungen möglich sind. Wünschenswert wäre hier, zumindest partiell an wenigstens einem Aspekt Verbesserungen zu gewährleisten.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, Neues für die gewerbliche Anwendung bereitzustellen.

Die Lösung dieser Aufgabe wird in unabhängiger Form beansprucht. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Die vorliegende Erfindung schlägt somit in einem ersten Grundgedanken ein Verfahren zur Biotensidherstellung vor, wobei biotensidherzeugende Mikroorganismen in einem Nährsubstrat bewegt werden, bei welchem vorgesehen ist, dass das Nährsubstrat im Überschuss verwendet und eine mechanische Schaumzerstörung durchgeführt wird.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Nährsubstrat-Überschuss bei Biotensiden die Produktion ohne Zusatz signifikanter Mengen an Entschäumer oder Schaumzerstörungsmittel erlaubt, indem einfach eine mechanische Schaumzerstörung ermöglicht wird, ohne eine hohe Produktion zu gefährden.

Das Biotensidherstellungsverfahren der vorliegenden Erfindung ist besonders geeignet zur Herstellung von Rhamnolipiden. Es werden bevorzugt zumindest die Rhamnolipide R1 und/oder R3 hergestellt; bezüglich der Nomenklatur für die Rhamnolipide wird explizit auf den Aufsatz Trummler, K, Effenberger, F, Syldatk, C.: „An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas sp.* DSM 28742" in European Journal of Lipid Science and Technology 105(10):563-571, 2003 hingewiesen.

Es ist möglich, Rhamnolipide mit einem Verhältnis von R1 zu R3 $< 0,5$, bevorzugt um oder unter $0,3$ herzustellen. Dies kann vorteilhaft sein, wenn es gewünscht ist, das im Übermaß produzierte Rhamnolipid in besonders hoher Konzentration zu gewinnen. Ein Rhamnolipid-Rohprodukt mit einem Verhältnis von R1 / R3 $< 0,5$ kann zum Beispiel unter anderem erzeugt werden mit dem Mikroorganismenstamm DSM 7108

und in der ersten Stufe einem Medium enthaltend 0,1 M NaP04-Puffer, 15 g/l NaN03, 1 g/l KCl und 0,5 g/l MgS04 x 7H20 im Ansatz 1:1, verwendet bei 250 g/l Pflanzenöl und mit einem Medium mit 0,1 M NaP04-Puffer, 1,5 g/l NaN03; 0,1 g/l KC1 und 0,05 g/l MgS04 x 7H20 in einer Verdünnung 1:10 in der zweiten Stufe; diese Bedingungen führen zur bevorzugten Produktion des Rhamnolipides 3. Spurenelemente werden dabei jeweils 0, 20, 40, 70 und 120 Stunden nach Ansatz zugegeben.

Ein Verhältnis von R1 zu R3 < 1,5 kam zum Beispiel unter Verwendung von Pflanzenölen als Nährsubstrat und dem Stamm DSM 2874 erreicht werden. Der Mikroorganismenstamm DSM 2874 kann dabei mit einem Medium aus 0,05 M NaP04-Puffer, 7,5 g/l NaN03, 0,5 g/l KC1 sowie 0,25 g/l MgS04 x 7H20 verwendet werden, das als Medium/Halbe verwendet wird. Eine Spurenelement Zugabe erfolgt hier in den ersten 70 Stunden bedarfsorientiert. Die bisherigen Untersuchungen der Anmeldung weisen darauf hin, daß das Spektrum der gebildeten Produkte weniger stark durch die Wahl des Pflanzenöls oder anderen Nährsubstrates beeinflusst zu sein scheint und stärker durch den geeigneten Mikroorganismenstamm. Die Selektion des gewünschten Rhamnolipides kann demgemäß durch Auswahl des geeigneten Mikrobenstammes erfolgen. Es wird einzuschätzen sein, daß andere Mikrobenstämme zu unterschiedlichen Produktionen verschiedener Biotenside führen werden. Die Medien sind jeweils auf die Anforderungen der Mikrobenstämme in per se bekannter Weise anzupassen. Die Produktion in diesem Verhältnis kann dann vorteilhaft sein, weil eine Aufreinigung signifikant einfacher ausfällt. Die Vereinfachung der Aufreinigung ist dabei ohnehin schon deshalb gegeben, weil eine mechanische, typisch eine rein mechanische Schaumzerstörung ermöglicht wird. Die Rhamnolipidproduktion erfolgt in einem besonderen Verhältnis der produzierten Rhamnolipide zueinander, weil die Verfahrensführung dies ermöglicht.

Als Mikroorganismen können, insbesondere wenn Rhamnolipide produziert werden, *Pseudomonas*-Stämme eingesetzt werden. Die Einsetzbarkeit der Stämme DSM7108, DSM7108 oder DSM2874 sei explizit erwähnt.

Das Nährsubstrat, das heißt die Kohlenstoffquelle für die Mikroorganismen, wird typisch und bevorzugt ein öliges Nährsubstrat sein. Dies kann möglicherweise zwei

Ursachen besitzen, die alleine oder gemeinsam wirken können; das Vorhandensein weiterer oder anderer Ursachen sei durch die nachfolgende Erklärungsvorschläge aber nicht ausgeschlossen. Es wird zum Einen davon ausgegangen, dass gerade in diesem (öligen)Nährsubstrat die Verwendung eines im Überschuss vorhandenen Nährsubstrates die Zerstörung von Mikroorganismen durch die mechanische Bewegung derselben in und mit dem Nährsubstrat bei der Schaumzerstörung verhindert. Mit anderen Worten wird dadurch, dass ein Überschuss und damit ein größeres Volumen an Nährsubstrat vorhanden ist, die zerstörerische Reibung der Mikroorganismen aneinander in den Scherfeldern, wie sie bei mechanischer Schaumzerstörung auftreten, vermutlich genauso verringert wie durch Kavitationseinwirkung. Dies scheint erst recht in öligen Nährsubstraten zu gelten. Wiewohl diese Erklärung keinesfalls als wissenschaftlich abgesichert betrachtet werden kann, spricht Vieles dafür, dass sie zutreffend ist. Insbesondere bei den typisch höher viskosen Nährsubstraten ist die Zerstörung der Mikroorganismen durch mechanische Schaumzerstörung vermutlich von allenfalls marginaler Bedeutung und typisch wohl vollkommen zu vernachlässigen. Als öliges Nährsubstrat können Pflanzenöle in Reinform oder als Gemisch eingesetzt werden, erwähnt sei diesbezüglich insbesondere Sonnenblumenöl, Sojaöl, Maisöl, Olivenöl und/oder Weizenkeimöl und/oder Gemische davon. Der Umstand, dass das Verfahren nicht sonderlich spezifisch für das Nährsubstrat insbesondere hinsichtlich der Wahl eines Pflanzenöls ist, hat dahingehend Vorteile, dass einerseits jeweils sehr günstige Öle eingesetzt werden können, dass aber zugleich auch nichtreine Gemische, Reststoffe aus der Produktion usw. einsetzbar werden. Ein weiterer Grund für den positiven Einfluss eines Substratüberschusses kann darin gesehen werden, dass womöglich gerade in einer großen Ölmenge ein Teil der gebildeten Biotenside, insbesondere Rhamnolipide, abgefangen wird, d.h. dass es zu einer Pseudo-Insitu-Produktentfernung kommt und die Biotenside gegebenenfalls gebunden werden, wodurch die Konzentration an Rhamnolipiden in freier Lösung, die von *Pseudomonas* wahrgenommen wird, reduziert wird, was eine weitere Produktion stimulieren kann.

Es scheint besonders bevorzugt, dass der Überschuss an Nährsubstrat ein Überschuss an öligen Nährsubstrat ist. Es wird davon ausgegangen, dass die

höhere Viskosität öligere Substanzen Scherkräfte auf die Mikroorganismen insgesamt verringert.

In einer bevorzugten Variante wird ein derart großer Überschuss an öligem Nährsubstrat verwendet, dass zumindest 30 g/l öliges Nährsubstrat vorhanden sind.

Die mechanische Schaumzerstörung wird bevorzugt so eingestellt, dass sich ein Gasvolumenanteil über 20 % ergibt. Es wird also ein gewisses Gasrestvolumen in der Produktionsmasse belassen. Diese kann auch über 33 % betragen, bevorzugt liegt der Gasvolumenanteil um oder über 50 %.

Es wird bevorzugt, wenn die Nährsubstanz-Mikroorganismen-Schaummasse in der Produktionsphase fließfähig ist. Typisch können Viskositäten und/oder Schaumblasengrößen etwa von geschlagener Sahne oder dem Schaum von ordnungsgemäß gezapften Guinness Bier eingestellt werden. Die Mediumviskositäten liegen bei 2 bis 8 cST, die Blasengrößen lassen sich auf 1 bis 2 mm Durchmesser abschätzen. Es ist ausreichend, eine Biotrockenmasse um oder unter 10 g/l in dem Nährmittel-Mikroorganismus-Volumen zu halten, entsprechend einer Biofeuchtmasse von etwa 25 um 48 g/l. In der ersten Prozessstufe werden mit DSM 7108 Biotrockenmassen von Ca. 15 g/l entsprechend einer Biofeuchtmasse und 72 g/l erreicht und mit DSM 2874 Ca. 10 g/l Biotrockenmasse, jeweils auf geeigneten Medien.

Die Nährsalzkonzentration und/oder die Pufferkonzentration wird in einer bevorzugten Variante gering gehalten, und zwar typisch so weit reduziert, dass keine oder eine allenfalls geringe Schleimbildung auftritt. Schleimbildung ist für die Biotensidbildung kontraproduktiv, da die Zellen an Stelle von und/oder zusätzlich zu Biotensiden andere Substanzen, die zur Schleimbildung führen, typisch Polysaccharide, produzieren müssen. Durch Reduktion der Puffer- und/oder Nährsalzkonzentration kann dies unterbunden werden. Es ist einsichtig, dass die tatsächlichen Konzentrationen von Puffer- und/oder Nährsalzmedium abhängig von der Nährsubstanz und/oder den Biotensiden und/oder den Mikroorganismen sein

wird; der Fachmann wird aber typisch auf einfache Weise feststellen können, wann die Nährsalz- beziehungsweise Pufferkonzentration so weit verringert ist, dass keine oder nur noch eine nicht störende Schleimbildung auftritt.

Typisch wird ein Ansatz gewählt mit einer auf Medium-Halbe reduzierten Puffer- und/oder Nährsalzkonzentration.

Die mechanische Schaumzerstörung kann unter Verwendung üblicher mechanischer Schaumzerstörer geschehen, die eine schaumzerstörende Platte umfassen werden. Es sei betont, dass diese Scherkräfte in der Flüssigkeit erzeugen, dies aber wider Erwarten insbesondere die Rhamnolipidproduktion bei der Biotensidherstellung nicht beeinträchtigt.

In einer besonders bevorzugten Variante werden die in einem Ansatz verwendeten Mikroorganismen recycelt. Durch den zumindest weitgehenden, typisch vollständigen Verzicht auf chemische Schaumzerstörungsmittel ist dies möglich, ohne dass in nachfolgenden Produktionszyklen die Rhamnolipid- beziehungsweise allgemeiner die Biotensidproduktion durch Entschäumermittelreste gestört wäre.

Bei der Recyclierung werden die Zellen abgeerntet, das heißt von den produzierten Biotensiden, in einer bevorzugten Variante von den produzierten Rhamnolipiden, getrennt und regeneriert. Die Abtrennung der Zellen kann durch Zentrifugieren erfolgen. Es sei darauf hingewiesen, dass die Recyclierung deshalb besonders bevorzugt ist, weil einerseits in erheblichem Maße Kosten für die Entsorgung der Zellen nach einem Produktionsdurchlauf gespart werden und zum anderen Kosten der Neuanzucht; zugleich ist eine Verunreinigung durch fremde Mikroorganismen im Regelfall kaum zu befürchten, da die Produktionsbedingungen so gesteuert werden können, dass kaum fremde Bakterien und dergleichen wachsen können. Die Regenerationsphase für die Zellen erfolgt typisch in einem um Makroelemente reduzierten Mineralsalzmedium. Bevorzugt ist die Reduktion um mindestens einen Faktor 10, besonders bevorzugt einen Faktor 20. Die regenerierten Zellen werden dann typisch einer weiteren Rhamnolipidproduktionsphase zugeführt.

Schutz wird auch für ein nicht aufgereinigtes Rohprodukt mit einem besonders geringen Anteil von RL1 bezogen auf RL3 beansprucht.

Dieses Rhamnolipid-Rohprodukt ist bevorzugt frei von chemischen Antischaummitteln.

Es ist bevorzugt, wenn das Mineralsalzmedium eine Maximalkonzentration von 0,5 bis 1 M Phosphatpuffer bei einem PH-Wert zwischen 6,3 und 6,8 aufweist; höhere Salzkonzentrationen führen, womöglich auf Grund von osmotischem Stress, zu verstärkter Polysaccharid, was im Hinblick auf die schlechtere Biotensidausbeute nicht gewünscht ist.

Es sei erwähnt, dass die abgeernteten Zellen bevorzugt im Minimalsalzmedium resuspendiert werden. Es gelingt mit der Erfindung, obwohl die mikrobielle Biotensid-, insbesondere Rhamnolipidproduktion einen aeroben Fermentationsprozess darstellt, bei dem ein Sauerstoffeintrag durch Begasung notwendig ist, während das gewünschte Produkt, nämlich die Rhamnoselipide, starke grenzflächenaktive Eigenschaften aufweisen, die dadurch bedingte typisch exzessive Schaumbildung des Prozesses signifikant besser als bislang bekannt zu kontrollieren und zugleich die Produktion signifikant zu erhöhen beziehungsweise hochzuhalten. Die Produktionen liegen typisch über den wissenschaftlich maximal abgesicherten 47 g/l Rhamnoselipid; darauf, dass die US 5,658,793 noch höhere Konzentrationen behauptet, sei hingewiesen, obgleich die dort angegebenen Konzentrationen nicht wissenschaftlich fremdverifiziert wurden.

Die Aufbereitung nach der erfindungsgemäßen Produktion ist vereinfacht, da keine oder nur wenige schwer abtrennbare Substanzen zugegeben werden müssen, die eine Vielzahl Extraktionsschritte, wie Kristallisation oder chromatographische Schritte erforderlich machen. Daß Antischaummittel nicht oder nur in geringen Mengen eingesetzt werden, erleichtert die Aufarbeitung, die je nach gewünschtem Reinheitsgrad eine Extraktion, eine Fällung, eine Chromatographie und Kristallisation erfordert, wobei diese Schritte sich aber leichter und besser durchführen lassen, wenn Antischaummittel, die ebenfalls oberflächenaktive Eigenschaften aufweisen, abwesend sind; dies gilt beispielsweise bei Fällung beziehungsweise Kristallisation. Zudem führen bestimmte Antischaummittel zu einer drastisch reduzierten

Rhamnolipidbildung, ohne direkt ein Absterben der Kulturen zu bewirken. Es wird davon ausgegangen, daß dies bedingt sein könnte dadurch, daß ein Antischaummittel zumindest partiell die Rhamnolipidfunktion übernimmt, d.h. die Emulgierung eines hydrophoben Substrates und somit die Notwendigkeit für die Mikroorganismen, insbesondere für *Pseudomonas*, reduziert wird Biotenside, insbesondere Rhamnolipide zu bilden, um an das Substrat zu gelangen. Zudem sind typisch erhältliche Antischaummittel ohnehin nur bedingt einsetzbar.

Die Verwendung einer mechanischen Schaumzerstörung macht es möglich, eine Schaumbildung nicht nur zuzulassen, sondern auch zu kontrollieren, was zu einer stark vergrößerten Austauschfläche zwischen Gas und Flüssigkeit führt und somit sehr kleine Begasungsraten ermöglicht. Die Verwendung eines feinblasigen fließfähigen Schaumes ist besonders bevorzugt.

Die mechanische Schaumzerstörung kann bei sehr hohen Drehzahlen erfolgen. In einem 5 l Kleinfertiger wurde mit einer Drehzahl von 650 bis 850 Umdrehungen pro Minute gearbeitet und einer mechanischen Schaumzerstörung durch eine Foamdisc, d.h. einer Schaumscheibe. Hier sollte eine Mindestdrehzahl von 650 Umdrehungen pro Minute gegeben sein. Es hat sich gezeigt, daß für andere Fermenter andere, auch höhere Drehzahlen nötig und vorteilhaft sind; es ist beispielsweise abzusehen, daß zum Beispiel ein Produktionsfermenter mit einer Schaumzentrifuge, nämlich einer Fundafoam-Schaumzentrifuge verwendet werden kann, wobei die Drehzahl hier 800 Umdrehungen pro Minute vermutlich betragen wird.

In einer besonders bevorzugten Variante wird die Zudosierung von Spurenelementen bedarfsorientiert vorgenommen. Es wird typisch ein Bedarf in dieser Phase anhand eines Abfallens der Sauerstoffaufnahme/Kohlendioxidbildungsrate sowie einer Bestimmung des Anstiegs des Gelöstsauerstoffs ermittelt. Dies kann kontinuierlich oder zu bestimmten Prozesszeiten erfolgen, wobei insbesondere in der eigentlichen Produktionsphase eine Kontrolle zu vorgegebenen Prozesszeiten, beispielsweise alle 50 bis 60 Stunden, erfolgen kann; hier sei insofern darauf hingewiesen, dass der Prozess so geführt werden kann, dass nach einer gegebenenfalls erforderlichen

anfänglichen Adaptionsphase (Lag-Phase) eine exponentielle Wachstumsphase auftritt und danach die eigentliche Produktionsphase, die beiden ersten Phasen, das heißt die Adaptionsphase und die exponentielle Phase werden typisch eine Zeit von 40 bis 60 Stunden nach Ansatz benötigen, während die Ernte nach etwa 270 Stunden erfolgen kann. Diese Zeiten werden bei der Verwendung der bevorzugten Mikroorganismus-Recyclierung gegebenenfalls verkürzt sein. Ein geeignetes Antischaummittel, das, sofern nötig, zugegeben werden kann, ist Contraspum A4050 der Firma Zschimmer & Schwarz GmbH.

Die Erfindung wird im Folgenden nur beispielsweise anhand der Figuren beschrieben. In dieser ist dargestellt durch

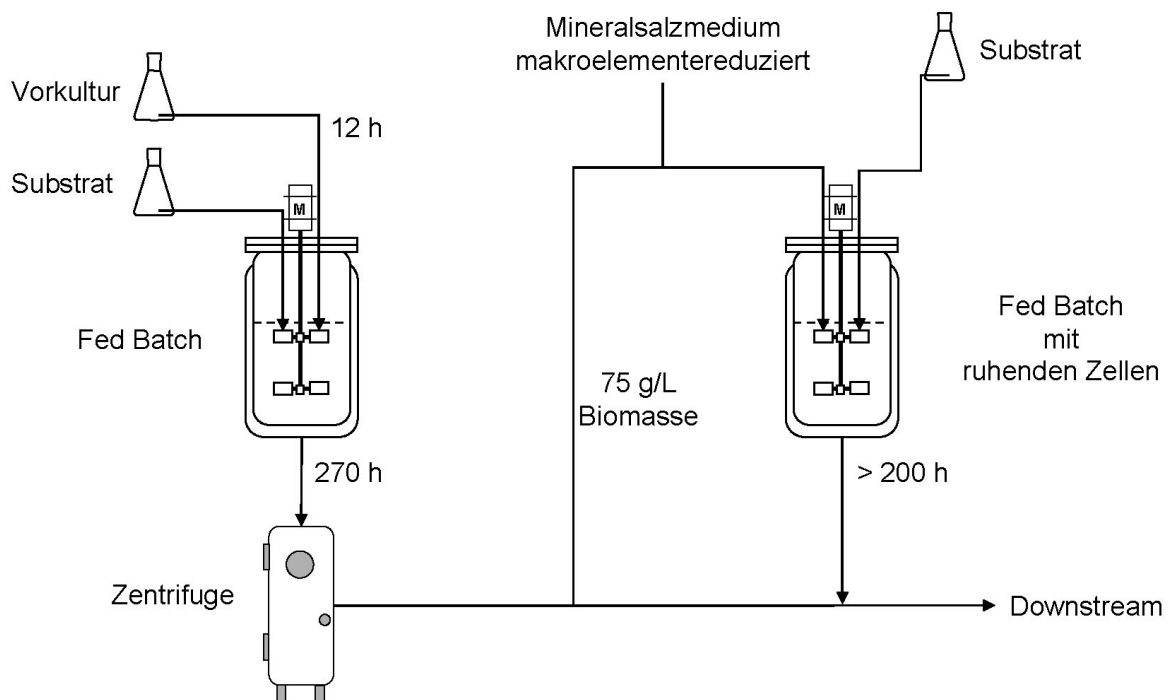


Abb. 6.1 Zweistufiger Prozess zur biotechnologischen Produktion von Rhamnolipiden

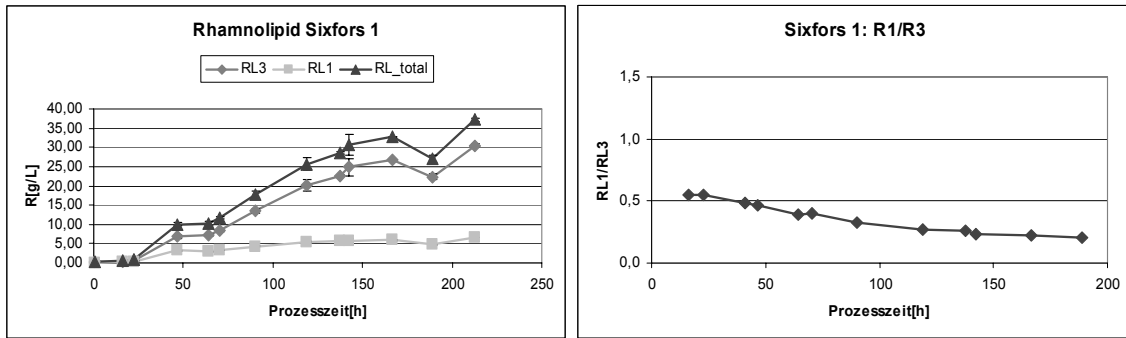


Abb. 6.2 der zeitliche Verlauf der Produktion der Rhamnolipide R1 und R3 mit ruhenden Zellen in frischem Mineralsalzmedium bei Resuspension eingefrorener Zellen zum Zeitpunkt T = 0

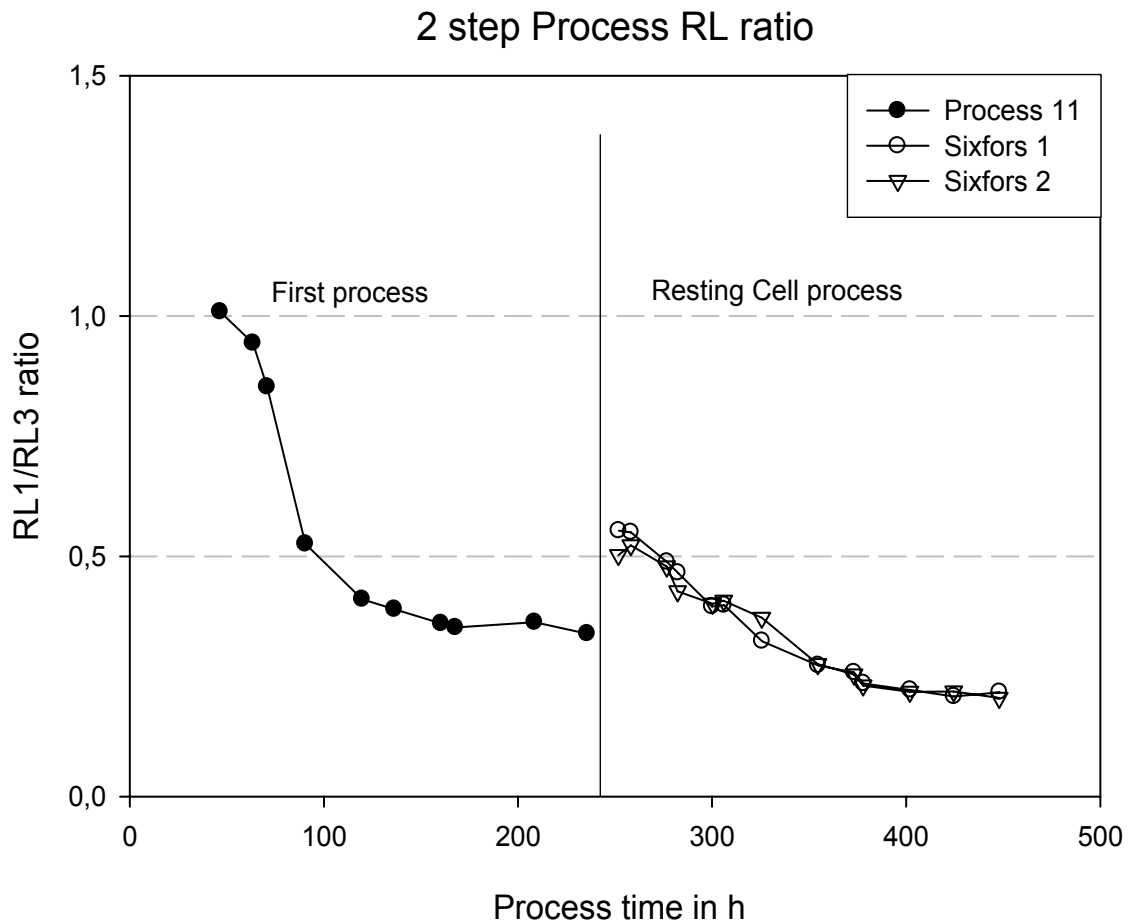


Abb. 6.3 Verlauf des Verhältnisses von R1 zu R3 in einem zweistufigen Verfahren jeweils für die erste Stufe und für die nachfolgende Stufe mit ruhenden Zellen;

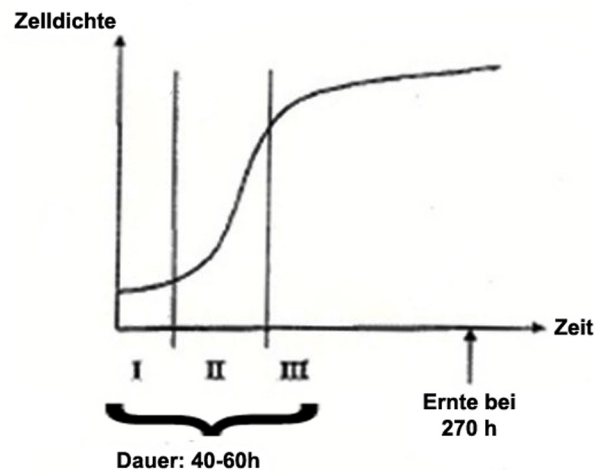


Abb. 6.4 Wachstumsphasen von Zellkulturen in einem Zelldichte-Zeitdiagramm.

Nach Abb. 6.1 wird in einem mehrstufigen Prozess Biotensid mit Mikroorganismen hergestellt, indem in einem geeigneten Produktionsgefäß ein Nährsubstrat mit Mikroorganismen und einem Nährmedium versetzt wird, eine mechanische Entschäumung durchgeführt wird, während die Biotenside produziert werden, die nach Beendigung der Produktionsphase erhaltenen Mikroorganismen abzentrifugiert werden, wobei die produzierten Biotenside im nicht-aufgebrauchten, im Überschuss vorhandenen Nährsubstrat verbleiben, während die Biomasse in einer Menge von bis zu 75 g/l Biofeuchtmasse einer Regenerationsstufe mit ruhenden Zellen in einem makroelementreduzierten Mineralsalzmedium zugeführt wird, um nach der Regenerierung neuerlich für die Produktion eingesetzt zu werden.

Im Einzelnen läuft dabei das Verfahren wie folgt ab:

Als Mikroorganismen werden *Pseudomonas aeruginosa* Mikroorganismen eingesetzt; in Versuchen haben sich als besonders geeignet erwiesen die Stämme DSM7108, DSM7107 sowie DSM2874; es ist aber einzuschätzen, dass andere Stämme und andere Mikroorganismen, die für die Rhamnolipidproduktion bekannt sind, in gleicher Weise vorliegend einsetzbar sind.

Die Mikroorganismen werden mit einem Phosphatpuffer mit maximal 0,05 bis 0,1 M bei einem pH-Wert von 6,3 bis 6,8 im stets deutlichen Überschuss eines Pflanzenölsubstrates angezüchtet. Während einer etwa 40- bis 60stündigen

Anzuchtphase wird dabei zunächst ein exponentielles Wachstum bewirkt, in dem sich die Zellen nach einer anfänglichen stationären Phase sehr schnell teilen und dabei das Nährmedium schnell aufbrauchen. Dies ist in Abb. 6.4 dargestellt. Während dieser Phase erfolgt die Spurenelement-Zudosierung bedarfsorientiert, wobei der Bedarf durch Bestimmung von zumindest einer Größe aus Abfall der Sauerstoffaufnahme, Anstieg der Kohlendioxidbildungsrate und/oder Anstieg des gelösten Sauerstoffs ermittelt wird. Dies geschieht in den ersten 60 Stunden kontinuierlich, während danach entsprechende bedarfskorrelierte Größen zu festen Prozesszeiten bestimmt werden.

Nach der exponentiellen Wachstumsphase folgt die stationäre Produktionsphase, die in etwa bis zu 270 bis zu 280 Stunden nach Ansatz andauert. In dieser Phase erfolgt, wie Abb. 6.2 zeigt, eine besonders intensive Rhamnolipidproduktion. Während der gesamten Prozesszeit, das heißt sowohl bei der eigentlichen Produktionsphase als auch während der Wachstums- beziehungsweise Anzuchtphase erfolgt eine mechanische Entschäumung.

Während dieses ersten Prozesses ändert sich das Verhältnis von R1 zu R3, das heißt der produzierten Rhamnolipide zueinander gemäß Abb. 6.3.

Nach Ablauf der Produktionszeit erfolgt die Abtrennung der Biomasse durch Zentrifugieren. Der verbleibende Überstand enthält ein Rhamnolipid-Gemisch-Rohzustand mit einem Rhamnolipidgemisch, welches kein Antischaummittel enthält. Die Rhamnolipidkonzentration ist zugleich hoch.

Die abgeernteten Zellen werden in einer zweiten Prozessstufe bei einer Konzentration von Ca. 50 g/l Biofeuchtmasse entsprechend ca. 10 g/l Biotrockenmasse in einem reduzierten Medium regeneriert und können dann erneut zur Rhamnolipidproduktion verwendet werden. Dies verringert die Menge an zu entsorgenden organischen Materialien. Die Zellen werden in einem um den Faktor 10 bis 20 makroelementreduzierten Mineralsalzmedium für einige Stunden regeneriert, bevor sie in eine neuerliche Produktionsphase eintreten. Während dieser erneuten Produktionsphase wird in einem Verhältnis Rhamnolipid 1 zu Rhamnolipid

3 gebildet, welches dem Verhältnis am Ende der ersten Prozessstufe vergleichbar und damit zum Teil verringert ist. Die in der ersten Prozessstufe beschriebenen Bildungsverschiebungen von Rhamnolipid 1 zu Rhamnolipid 3 treten nicht mehr auf. Die somit erhaltenen Rhamnolipidkonzentrationsverläufe sind demnach gegenüber nicht-recyclierten Zellen verschieden. Es sei im übrigen darauf hingewiesen, dass schon in der ersten Stufe des vorgeschlagenen zweistufigen Prozesses eine Rhamnolipidproduktion in erheblichen Ausmaß erfolgt, was einen wesentlichen Unterschied zu einer klassischen runden Zellprozess darstellt, bei dem in der Regel nur in der ersten Prozessstufe Biomasse produziert wird.

Es sei betont, dass die Abernte/Regenerierung von Zellen mehrfach wiederholt werden kann und dass dabei kaum eine Kontamination mit fremden Mikroorganismen befürchtet werden muss.

6.5.2 Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Biotensidherstellung, wobei biotensid-erzeugende Mikroorganismen in einem Nährsubstrat bewegt werden. Hierbei ist vorgesehen, dass das Nährsubstrat im Überschuss verwendet und eine mechanische Schaumzerstörung durchgeführt wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Biotensidherstellung, wobei biotensid-erzeugende Mikroorganismen in einem Nährsubstrat bewegt werden, dadurch gekennzeichnet, dass das Nährsubstrat im Überschuss verwendet und eine mechanische Schaumzerstörung durchgeführt wird.
2. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das Biotensidherstellungsverfahren als Rhamnolipidherstellungsverfahren durchgeführt wird.
3. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass als Rhamnolipide zumindest die Rhamnolipide R1 und/oder R3 hergestellt werden.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Rhamnolipide mit einem Verhältnis R1 zu R3 $< 0,5$, bevorzugt $< 0,3$ hergestellt werden.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen *Pseudomonas*-Stämme verwendet werden.
6. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass als *Pseudomonas*-Stämme zumindest einer der Stämme DSM7108 oder DSM 2874 eingesetzt wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein öliges Nährsubstrat verwendet wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Öliges Nährsubstrat auf Pflanzenbasis, insbesondere ein Pflanzenöl, insbesondere zumindest ein Öl ausgewählt aus Sojaöl, Sonnenblumenöl, Maisöl und/oder Weizenkeimöl eingesetzt wird und/oder Gemische davon.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Überschuss aus öligem Substrat eingesetzt wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest 30 g/l öliges Nährsubstrat eingesetzt werden.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Gasvolumenanteil $> 20 \%$, bevorzugt Über 33% , insbesondere bevorzugt um oder größer als 50% gewählt wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nährsubstanz-Mikroorganismen-Schaummasse in der Produktionsphase fließfähig ist.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Nährsubstanz-Mikroorganismen-Schaummasse keine chemischen Schaumzerstörer zugesetzt werden.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es in der ersten Prozessstufe mit wenigstens 15 g/l Biotrockenmasse entsprechend 72 g/l Biofeuchtmasse und/oder in der zweiten Prozessstufe mit wenigstens 10 g/l Biotrockenmasse entsprechend ca. 48 g/l Biofeuchtmasse durchgeführt wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Puffer- und/oder Nährsalzkonzentration so weit reduziert ist, dass eine allenfalls geringe Schleimbildung auftritt.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mit einer auf Medium-halbe reduzierten Puffer- oder Nährsalzkonzentration gearbeitet wird.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die mechanische Schaumzerstörung mit einem scherkrafterzeugenden Rührer durchgeführt wird.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in einem Produktionsdurchlauf verwendeten Mikroorganismen recycelt werden.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen zum Recyclieren von produzierten Biotensiden, insbesondere produzierten Rhamnolipiden getrennt werden und die so geernteten Zellen in einem zumindest um Makroelemente reduzierten Mineralsalzmedium regeneriert werden.
20. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in einem um einen Faktor von zumindest 10, bevorzugt 20 reduzierten Mineralsalzmedium regeneriert werden, bevorzugt ohne signifikantes Zellwachstum auszulösen.
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die regenerierten Zellen einer weiteren Rhamnolipid-produktionsphase zugeführt werden.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein mehrstufig ruhender Zell-Prozess durchgeführt wird, bei dem sowohl in einer ersten als auch in einer zweiten Stufe Rhamnolipide in signifikanter Menge produziert werden.
23. Rhamnolipidhaltiges Rohprodukt mit einem Rhamnolipidverhältnis der Rhamnolipide R1 zu R3 von $\geq 0,25$.
24. Rohprodukt nach dem vorherigen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass es frei von chemischen Antischaummitteln ist.

6.6 Kapitel VI

Zusätzliche Ergebnisse und Konstruktionen

6.6.1 Lösungen für ein fernsteuerbares Biotechnikum

Neben den wissenschaftlichen Fragestellungen galt es im Rahmen dieser Promotion ein neues Biotechnikum am hiesigen Lehrstuhl aufzubauen, welches den lokalen Gegebenheiten entspricht. Im Unterschied zur Industrie verfügen wissenschaftliche Forschungsinstitutionen selten über ausreichend Mitarbeiter oder die Möglichkeiten eines Schichtbetriebes zur dauerhaften Überwachung und Kontrolle von Bioprozessen. Insbesondere bei Prozessen mit einer Laufzeit von mehr als einer Woche kann dies unter Umständen problematisch sein. Betrachtet man die notwendigen Arbeitsvorgänge einer Bioreaktorkultivierung fällt auf, dass lokale Präsenz nur zum Kultivierungsstart, den Probenahmen und der Ernte unumgänglich sind. Während des Prozesslaufs beanspruchen Arbeiten wie Prozesskontrolle und Regulation von Prozessparametern die meiste Zeit. Daher können Optionen zur Fernprozesskontrolle zu einer Verbesserung der Prozessüberwachung als auch zu einer Erleichterung der Mitarbeiter führen. Mit dieser Zielsetzung erfolgte der Technikumsaufbau.

Nahezu alle aktuellen kommerziell erhältlichen Bioreaktorsysteme verfügen inzwischen über digitale Schnittstellen zur Datenaufzeichnung sowie für Steuerungsaufgaben. Verfügbare Softwarelösungen des Herstellers, liefern hinreichende Möglichkeiten zur Reaktorkontrolle und Datenaufzeichnung auf lokaler Ebene. Die Aufgabe bestand nun darin, unterschiedliche Bioreaktorsysteme mit unterschiedlicher Prozessleitsoftware in einem Technikumsnetzwerk zusammenzufassen und einen externen Zugriff, vergleichbar dem lokalen, auf dieses Netzwerk zu ermöglichen. Als Ergebnis dieser Aufgabenstellung entstand das in Abb. 6.5 gezeigte Netzwerk. Das aktuelle Netzwerk erlaubt den gleichzeitigen Zugriff auf zehn Bioreaktoren. Hierdurch können von außen online Prozessdaten abgerufen und Regelparameter angepasst werden. Zusätzlich visuelle Informationen zum Status der Glasreaktoren können durch die Übertragungen zweier Web-Kameras erhalten werden. Dies ermöglicht vor allem bei der Produktion von Biotensiden Schäumungstendenzen frühzeitig zu erkennen und geeignete Anpassungen der Rührerdrehzahl bzw. der Begasungsrate durchzuführen, bevor eine automatische Zudosierung von Antischaummitteln erfolgt.

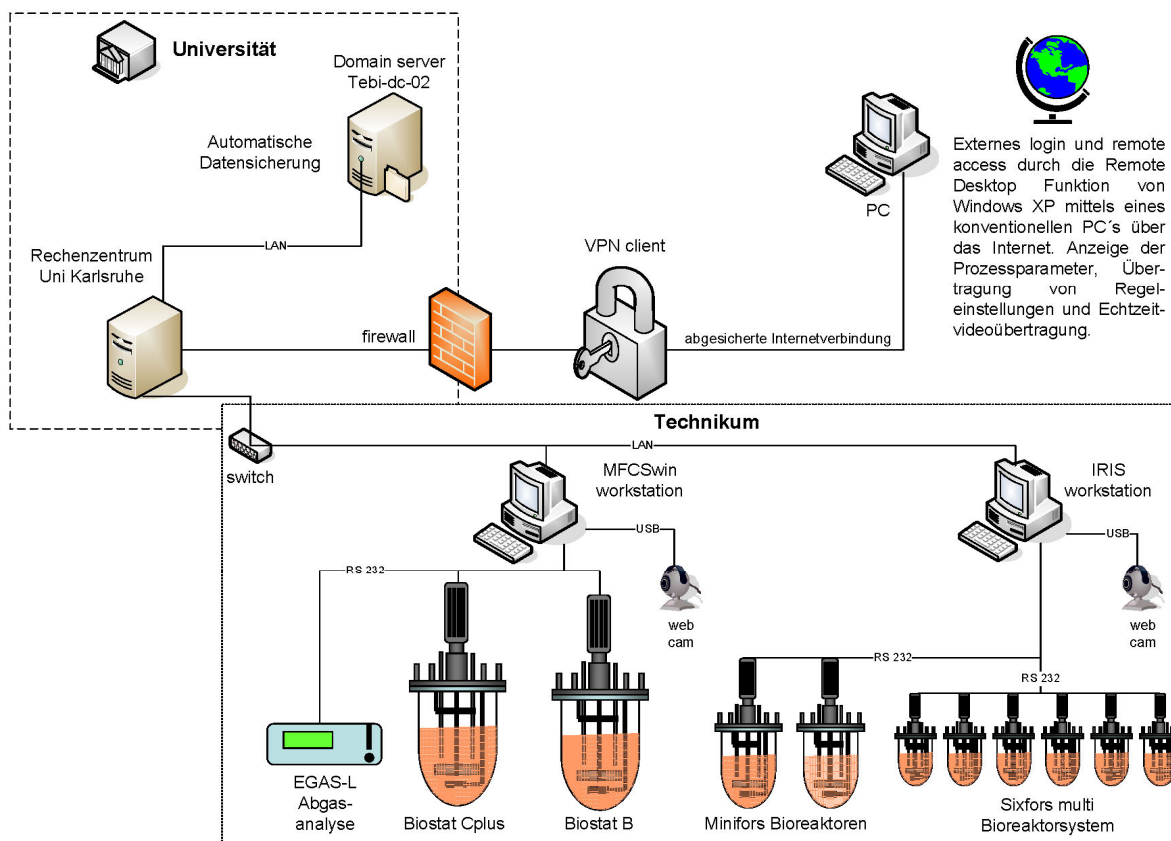


Abb. 6.5 Schematische Darstellung des aufgebauten Technikumsnetzwerkes.

Die Bioreaktoren werden simultan von zwei Prozessleitrechnern gesteuert, welche in die lokale Netzwerkdomeäne des Lehrstuhls eingebunden sind. Automatische Datenbackups auf dem Domainserver sind möglich. Der externe Zugriff auf das Technikumsnetzwerk erfolgt über eine VPN-client abgesicherte Internetverbindung von einem beliebigen PC aus.

6.6.2 Automatisierte Prozesssteuerung über Rezepte

Die kommerziell erhältliche Prozessleitsoftware MFCswin 2.1 SP5 für Sartorius Bioreaktorsysteme bietet die Möglichkeit über verschiedene Programmmodule Prozessabläufe und Onlineberechnungen zu programmieren. Diese werden in sogenannten Rezepten zusammengefasst und ermöglichen es, einen Prozess automatisiert und standardisiert ablaufen zu lassen. Um diese Vorteile auch für die biotechnologische Produktion von Rhamnolipiden nutzen zu können, wurde die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Prozessführung in ein entsprechendes Rezept übertragen. Eine grobe schematische Darstellung des aus 8 Operationsphasen und 15 Unterphasen bestehenden Rezeptes ist rechts in Abb. 6.6 dargestellt. Eine detaillierte Aufstellung der verschiedenen Prozessparameter und der Unterphasen ist dem Anhang zu entnehmen.

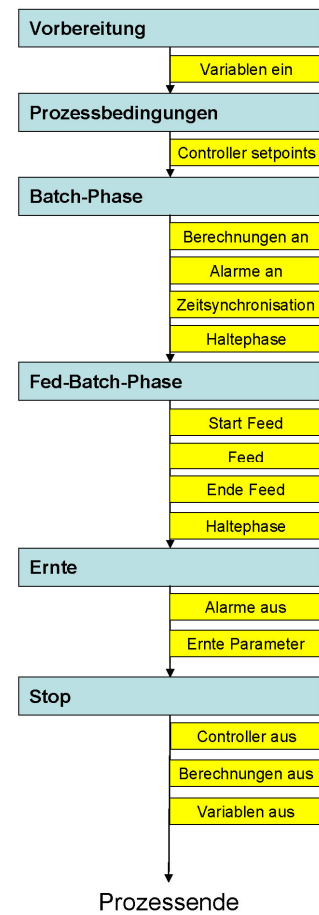


Abb. 6.6
Programmschema der zu
einem Rezept umgesetzten
Prozessführung

6.6.3 Fällung und Aufreinigung von Rhamnolipiden

Im Verlauf dieser Arbeit wurden neue Methoden zur Fällung und Aufreinigung von Rhamnolipiden aus Kultivierungsbrühen entwickelt. Eine Methode, um mikrobiologisch hergestellte Rhamnolipide zu gewinnen, ist ihre Extraktion aus dem Kultivierungsansatz mit organischen Lösungsmitteln entsprechend dem zuvor vorgestellten Probenahmeprotokoll. Ausgehend von diesem in seiner Konsistenz und Aussehen „honigartigen“ Rohextrakt, wurden verschiedene Versuche unternommen um Rhamnolipide in fester Form zu erhalten. Anfängliche Fällungsversuche in wässriger Phase mit Ansäuerung auf $\text{pH} = 2$ und Kühlen auf 4°C führten zwar zu einem Ausfallen der Lösung, nach anschließender Filtration und Trocknung stellte sich jedoch immer wieder der viskose flüssige Zustand ein. Eine Wiederholung der Versuche mit reinem, kommerziell erhältlichem Rhamnolipid 3 in fester Form zeigte dasselbe Ergebnis. Mit der Annahme, dass Wasser die Bildung von Rhamnolipid in fester Form stört, wurde eine umgekehrte Vorgehensweise untersucht, bei der die Fällung in organischer Phase durchgeführt wurde. Eine Übersicht über das hierbei angewandte Fällungs- und Aufreinigungsprotokoll ist in Abb. 6.7 wiedergegeben. Ausgegangen wurde hierbei von dem kommerziellen Rhamnolipidextrakt Jeneil JBR 425. Der Anteil an Rhamnolipid 1 und 3 dieses Produktes liegt bei ca. 20 % (w/w), die anderen 80 % bestehen aus Wasser und einem nicht näher definierbaren Anteil, welcher vermutlich aus organischen Komponenten wie Antischaummittel und Substratrückständen besteht.

In einem ersten Schritt wurde 1 l Ausgangslösung durch eine 1 : 10 (v/v) Verdünnung des Ausgangsextraktes mit VE-Wasser hergestellt. Anschließend wurde die Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure auf $\text{pH} = 2$ angesäuert, was zu einer Protonierung der Carboxylgruppen der Rhamnolipide und zu einer Prezipitation führte. Zum weiteren Herabsetzen der Löslichkeit und zum Absetzen wurde die Lösung auf 4°C abgekühlt und für 24 h bei dieser Temperatur belassen. Das Prezipitat wurde anschließend durch Filtration über einen Cellulose-Faltenfilter abgetrennt, und für weitere 24 h unter dem Abzug getrocknet. Das anfänglich feste Fällungsprodukt ging hierbei wieder in einen hochviskosen, flüssigen Zustand über. Dieser Rückstand wurde mehrfach mit kleinen Mengen an Ethylacetat eluiert (1/200 des Volumens der Ausgangslösung). Das Ethylacetat wurde in einem 2 l Rundkolben gesammelt.

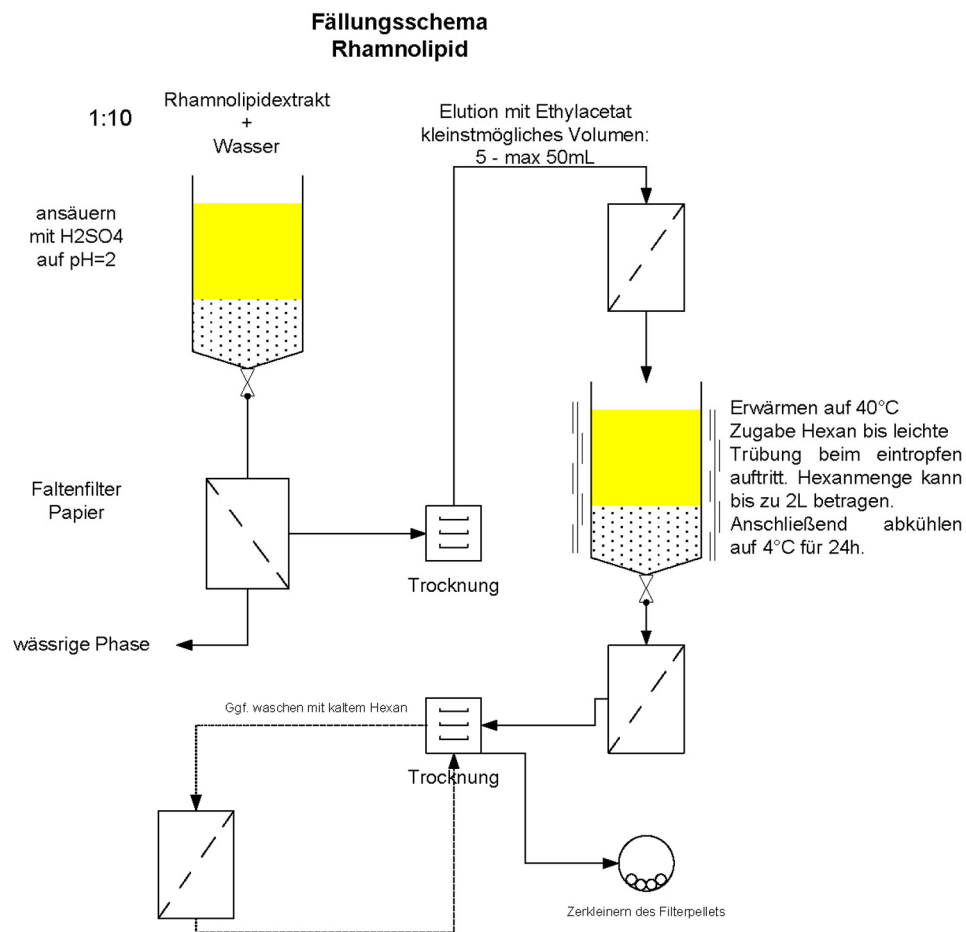


Abb. 6.7 Fällung von Rhamnolipiden in organischer Phase.

Nun wurde so lange Hexan zugegeben bis eine leichte Trübung der Lösung eintrat. Anschließend wurde die Lösung im Wasserbad auf 40° C erhitzt, wodurch die Trübung verschwand. Erneut wurde Hexan bis zum Einsetzen einer Trübung zugegeben, die Lösung langsam auf 4° C abgekühlt und bei dieser Temperatur für 24 h belassen. Das erhaltene Präzipitat wurde erneut filtriert und unter dem Abzug getrocknet. Als Ergebnis wurde ein festes, weißes Filterpellet erhalten, welches jedoch noch einen leichten Gelbstich hatte. Daher wurde das Pellet mit gekühltem Hexan gewaschen und erneut getrocknet. Hierdurch konnte der Gelbstich entfernt werden. Anschließend wurde das Pellet vom Filter gekratzt, zerkleinert und zur weiteren Evaporation von Lösungsmittelresten für 2 h bei 4 mbar und 50° C in einen Rotationsverdampfer verbracht.

Genauere Untersuchungen für das Fällungsprodukt ergaben einen Schmelzpunkt von 86 °C, welcher charakteristisch für Rhamnolipid 3 ist [24]. Wie die in Abb. 6.8 gezeigten Ergebnisse einer qualitativen Dünnschichtchromatographie konnte in der Probe ebenfalls nur Rhamnolipid 3 nachgewiesen werden (Abb. 6.8, Färbemethoden nach [98, 99]). Mittels einer HPLC-Analyse (nach [80]) wurde ebenfalls nachgewiesen, dass die Probe überwiegend aus Rhamnolipid 3, sowie geringen Spuren Rhamnolipid 1 besteht. Mit dem angewendeten Fällungs- und Aufreinigungsprotokoll konnte so Rhamnolipid in fester Form gewonnen werde. Gleichzeitig zeigte sich, dass eine selektive Fällung von Rhamnolipid 3 auftrat. Dieser Effekt könnte zukünftig zur Trennung der beiden Rhamnolipidspezies 1 und 3 eingesetzt werden. Ausgehend von diesen Voruntersuchungen bestehen Entwicklungsmöglichkeit hin zu einer vollständigen Produktaufarbeitung für den in dieser Arbeit vorgestellten Rhamnolipidproduktionsprozess.

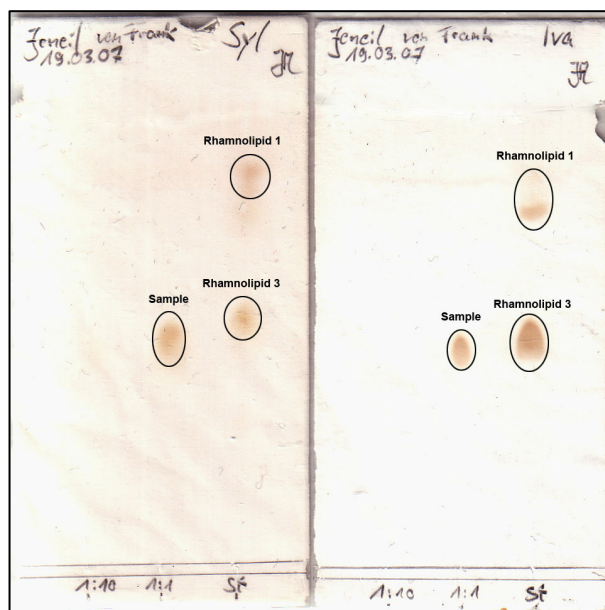


Abb. 6.8 DC einer Lösung des Präzipitats gegen Jeneil JBR 425 als Standard. Links: Mit Anisaldehyd-Reagenz angefärbter Zuckerrest. Rechts: Mit Ammoniummolybdat-Reagenz angefärbter Fettsäurerest.

7 Ausblick

Ein im Verlauf dieser Arbeit als wesentlich identifiziertes Problem ist das genaue Verständnis der Induktion der Rhamnolipidbildung in *Pseudomonas species*. Wichtige Fragestellungen hierbei wären:

- Welche spezielle Faktoren führen zur Rhamnolipidinduktion, welche induzieren Alginate/Polysaccharidbildung/Pigmentbildung und hemmen die Rhamnolipidbildung?
- Ist die Induktion der Alginate/Polysaccharidbildung reversibel?
- Wie ändert sich das Proteinexpressionsmuster im jeweiligen Fall?
- Welcher Einfluss kann hierbei durch die Zugabe der Autoinducer PAI-1/PAI-2 genommen werden?

Die im Rahmen eines Folgeprojektes hierzu beantragte molekularbiologischen/systembiologischen Ansätze sollen die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Screening-Plattform ergänzen und Antworten auf die oben aufgeführten Fragen liefern.

Erst jetzt besteht die Möglichkeit mit vertretbarem zeitlichem Aufwand weitere Produktionsstämme, Mediumskomponenten oder Prozessparameter bezüglich ihres Einflusses auf die Rhamnolipidbildung effektiv zu untersuchen und Proben aus vollwertigen Bioreaktorkultivierungsprozessen zu erhalten. Screening-Versuche mit neuen und genetisch modifizierten Produktionsstämmen werden auf Basis des hier vorgestellten Screening-Systems inzwischen durchgeführt. Auch eine Vergrößerung des Prozessmaßstabs auf einen 30 l Bioreaktor ist aktueller Forschungsgegenstand.

Durch kontinuierliche Erweiterung der IR-Spektrenreferenzdatenbank, ist eine zusätzliche Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit der ATR-FTIR Analytik zu erwarten. Zukünftige Untersuchungen zur Implementierung einer ATR-FTIR-Sonde direkt in den Bioreaktor könnte zur *in vitro* Erfassung von IR-Spektren und eventuell sogar zu einer online ATR-FTIR-Prozessanalytik führen, welche ganz neue

Einsichten zum Rhamnolipidbildungsprozess und Möglichkeiten der Prozesskontrolle liefern könnte.

Auf dem Gebiet der im Anschluss des Bioprozesses folgenden Produktaufarbeitung, v.a. im Bereich scale up und Formulierung der Produkte in Rein- und Festform, besteht noch ein deutlicher Entwicklungsbedarf.

8 Literatur

1. Peters D: **Nachwachsende Rohstoffe in der Industrie.** Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. & Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2006:27.
2. Hollerbach A, Radermacher W, Troge A: **Umweltdaten Deutschland: Nachhaltig wirtschaften - Natürliche Ressourcen und Umwelt schonen.** Umweltbundesamt; Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe; Statistisches Bundesamt; 2007:38-39.
3. EuropaBio: **White Biotechnology: Gateway to a more sustainable future.** Proceedings *EuropaBio*; Lyon. April 2003
4. DECHEMA eV: **Weißer Biotechnologie: Chancen für Deutschland.** Internet:<http://biotechdechemade/Publikationenhtml>; 2004.
5. McKinsey&Company: **Industrial Biotechnology.** Internet: <http://www.mckinsey.co>, 2003.
6. Frost, Sullivan: **Advances in Biotechnology for the Manufacture of Chemicals: Part 1.** Internet: www.technical-insights.frost.com; 2003.
7. Graf von Armanberg M: **Chemie.** In *Marktanalyse Nachwachsende Rohstoffe.* Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. & Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz; 2006: 263-308
8. CESIO: **CESIO surfactants statistics for Western Europe 2005.** Internet: <http://www.cefic.be>, 2006.
9. A.I.S.E: **ANNUAL REVIEW 2005 - Acting responsibly: providing relevant information to consumers.** Association Internationale de la Savonnerie, de la Détergence et des Produits d'Entretien; 2006:28.
10. Georgiou G, Lin SC, Sharma MM: **Surface-Active Compounds from Microorganisms.** *Bio-Technology* 1992, **10**:60-65.
11. Nitschke M, Costa SGVAO, Contiero J: **Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules.** *Biotechnology Progress* 2005, **21**:1593-1600.
12. Palleroni NJ: **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria.** In *Volume 3.* 2 edition. Edited by Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1992: 3071-3085
13. Fuchs G, Schlegel HG: **Allgemeine Mikrobiologie.** 8. Edition. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2006.
14. Van Delden C, Iglewski BH: **Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections.** *Emerging Infectious Diseases* 1998, **4**:551-560.
15. BAuA (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin): **Bundesarbeitsblatt: Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe - Einstufung von Bakterien (Bacteria) und Archaeobakterien (Archaea) in Risikogruppen.** vol. 7-2006. 2005:33-193.
16. Comolli JC, Donohue TJ: **Differences in two Pseudomonas aeruginosa cbb(3) cytochrome oxidases.** *Molecular Microbiology* 2004, **51**:1193-1203.
17. Sabra W, Kim E, Zeng A: **Physiological responses of Pseudomonas aeruginosa PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures.** *Microbiology* 2002, **148**:3195–3202.

18. Hagelueken G, Adams TM, Wiehlmann L, Widow U, Kolmar H, Tummeler B, Heinz DW, Schubert WD: **The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**:7631-7636.
19. Hoffmann H, Ulbricht W: **Physikalische Chemie der Tenside.** In *Die Tenside*. 1. Edition. Edited by Kosswig K, Stache H. München, Wien: Carl Hanser Verlag; 1993
20. Kosswig K: **Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der Tenside.** In *Tensid Taschenbuch*. Edited by Stache H, Kosswig K. München, Wien: Carl Hanser Verlag; 1990
21. Champion JT, Gilkey JC, Lamparski H, Retterer J, Miller RM: **Electron-Microscopy of Rhamnolipid (Biosurfactant) Morphology - Effects of Ph, Cadmium, and Octadecane.** *Journal of Colloid and Interface Science* 1995, **170**:569-574.
22. Lang S, Trowitzsch-Kienast W: **Rhamnoselipide.** In *Biotenside*. 1 edition. Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden: B. G. Teubner; 2002: 66-81
23. Trummeler K, Effenberger F, Syldatk C: **An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp DSM 2874.** *Eur J Lipid Sci Tech* 2003, **105**:563-571.
24. Jarvis FG, Johnson MJ: **A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*.** *J Am Chem Soc* 1949, **71**:4124-4126.
25. Syldatk C, Lang S, Matulovic U, Wagner F: **Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874.** *Z Naturforsch [C]* 1985, **40**:61-67.
26. Syldatk C, Lang S, Wagner F, Wray V, Witte L: **Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on n-alkanes.** *Z Naturforsch [C]* 1985, **40**:51-60.
27. Ishigami Y, Gama Y: **Rhamnolipid liposomes. US4902512.** Patent: *Rhamnolipid liposomes. US4902512.* Agency Ind Science Techn (JP); 1990.
28. Yamaguchi M, Sato A: **Microbial-production of sugar-lipids.** *Chem Ind* 1976:741-742.
29. Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, Garcia F, Manresa A: **Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes.** *Langmuir* 2001, **17**:1367-1371.
30. Chayabutra C, Ju L: **Polyhydroxyalkanoic Acids and Rhamnolipids Are Synthesized Sequentially in Hexadecane Fermentation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.** *Biotechnol Prog* 2001, **17**:419-423.
31. Lébron-Paler A, Pemberton JE, Becker BA, Otto WH, Larive CK, Maier RM: **Determination of the acid dissociation constant of the biosurfactant monorhamnolipid in aqueous solution by potentiometric and spectroscopic methods.** *Anal Chem* 2006, **78**:7649-7658.
32. Passeri A, Schmidt M, Haffner T, Wray V, Lang S, Wagner F: **Marine Biosurfactants.4. Production, Characterization and Biosynthesis of an Anionic Glucose Lipid from the Marine Bacterial Strain Mm1.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992, **37**:281-286.

33. Rehm BHA, Mitsky TA, Steinbuchel A: **Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: Establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in Escherichia coli.** *Appl Environ Microb* 2001, **67**:3102-3109.
34. Stryer L: **Biochemie.** 4. Edition: Spektrum Akademischer Verlag; 1995.
35. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: **Biochemie.** 5. Edition.: Spektrum Akademischer Verlag; 2003.
36. Michal G: **Biochemical pathways.** 3. Edition: Boehringer Mannheim GmbH; 1993.
37. Soberon-Chavez G, Lepine F, Deziel E: **Production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005, **68**:718-725.
38. Haba E, Pinazo A, Jauregui O, Espuny MJ, Infante MR, Manresa A: **Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties of Rhamnolipids Produced by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCBIM 40044.** *Wiley InterScience* 2003.
39. Hommel RK: **Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms.** *Biodegradation* 1990, **1**:107-119.
40. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA: **Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in Pseudomonas aeruginosa PAO1.** *Journal of Bacteriology* 2003, **185**:1027-1036.
41. Ron EZ, Rosenberg E: **Natural roles of biosurfactants.** *Environmental Microbiology* 2001, **3**:229-236.
42. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP: **Quorum Sensing in Bacteria - the Luxr-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators.** *Journal of Bacteriology* 1994, **176**:269-275.
43. Sullivan ER: **Molecular genetics of biosurfactant production.** *Environmental Microbiology* 1998, **9**:263-269.
44. Pesci EC, Iglewski BH: **The chain of command in Pseudomonas quorum sensing.** *Trends in Microbiology* 1997, **5**:132-134.
45. Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH: **Active efflux and diffusion are involved in transport of Pseudomonas aeruginosa cell-to-cell signals.** *Journal of Bacteriology* 1999, **181**:1203-1210.
46. Ochsner UA, Fiechter A, Reiser J: **Isolation, Characterization, and Expression in Escherichia coli of the Pseudomonas aeruginosa rhlAB Genes Encoding a Rhamnosyltransferase Involved in Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis.** *The Journal of Biological Chemistry* 1994, **269**:1-9.
47. Guerra-Santos LH, Käppeli O, Fiechter A: **Dependence of Pseudomonas aeruginosa continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1986, **24**:443-448.
48. Gruber T, Chmiel H, Käppeli O, Sticher P, Fiechter A: **Integrated Process for Continuous Rhamnolipid Biosynthesis.** *Biosurfactants In: Surfactant Science Series* 1993, **48**:157-173.
49. Ochsner UA, Hembach T, Fiechter A: **Production of Rhamnolipid Biosurfactants.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 1995, **53**:89-118.

50. Lang S, Wullbrandt D: **Rhamnose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1999, **51**:22-32.
51. Giani C, Wullbrandt D, Rothert R, Meiwes J: **Pseudomonas aeruginosa and its use in a process for the biotechnological preparation of L-Rhamnose.** Patent: US005658793A. Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main; 1997:10.
52. Rahman KSM, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM: **Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients.** *Bioresource Technology* 2003, **90**:159-168.
53. Kitamoto D, Isoda H, Nakahara T: **Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002, **94**:187-201.
54. Kowalewski E, Rueslatten I, Steen KH, Bodtke G, Torsæter O: **Microbial improved oil recovery - bacterial induced wettability and interfacial tension effects on oil production.** *Journal of Petroleum Science and Engineering* 2006, **52**:275-286.
55. Wang QH, Fang XD, Bai BJ, Liang XL, Shuler PJ, Goddard WA, Tang YC: **Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery.** *Biotechnology and Bioengineering* 2007, **98**:842-853.
56. Ishigami Y, Gama Y: **Emulsified composition. JP63077535.** Patent: JP63077535 Agency Ind Science Techn Toyo, B.; 1989.
57. Gandhi NR, Palmer Skebba V, Takemoto JY, Bensaci MF: **Antimycotic rhamnolipid compositions and related methods of use. WO2007095259.** Patent WO2007095259. Jeneil Biotech Inc (US); 2007.
58. Hwang BG, Kim BS, Mun SS: **Novel Pseudomonas aeruginosa B5 having antifungal activity and process for preparing antibiotic from strain thereof. KR20010038285.** Patent KR20010038285. Korea Chungang Educational Foundation; 2001.
59. Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R: **Biosurfactants: potential applications in medicine.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006, **57**:609-618.
60. Stipcevic T, Piljac A, Piljac G: **Enhanced healing of full-thickness burn wounds using dirhamnolipid.** *Burns* 2006, **32**:24-34.
61. Van Heasendonck IPH, Vanzeveren ECA: **Rhamnolipids in bakery products.** Patent US2006233935; 2006.
62. Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS: **Potential commercial applications of microbial surfactants.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, **53**:495-508.
63. Linhardt RJ, Bakhit R, Daniels L, Mayerl F, Pickenhagen W: **Microbially produced Rhamnolipid as a source of Rhamnose.** *Biotechnology and Bioengineering* 1989, **33**:365-368.
64. Hagedorn S, Kaphammer B: **Microbial Biocatalysis in the Generation of Flavor and Fragrance Chemicals.** *Annual Review of Microbiology* 1994, **48**:773-800.
65. Pahl MH, Franke D: **Schaum und Schaumzerstörung - ein Überblick.** *Chem-Ing-Tech* 1995, **67**:300-312.
66. Zlokarnik M: **Rührtechnik: Theorie und Praxis.** 1. Ed.: Springer-Verlag; 1999.

-
67. Vardar-Sukan F: **Foaming: Consequences, prevention and destruction.** *Biotechnology Advances* 1998, **16**:913-948.
 68. Mazarevica G, Diewok J, Baena JR, Rosenberg E, Lendl B: **On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy.** *Applied Spectroscopy* 2004, **58**:804-810.
 69. Gillie JK, Hochlowski J, Arbuckle-Keil GA: **Infrared spectroscopy.** *Analytical Chemistry* 2000, **72**:71R-79R.
 70. Workman J, Veltkamp DJ, Doherty S, Anderson BB, Creasy KE, Koch M, Tatera JF, Robinson AL, Bond L, Burgess LW, et al: **Process analytical chemistry.** *Analytical Chemistry* 1999, **71**:121R-180R.
 71. Conzen J-P: **Multivariate Kalibration - Ein praktischer Leitfaden zur Methodenentwicklung in der quantitativen Analytik.** 4. Ed.: Bruker Optik GmbH; 2005.
 72. Bruker Optik GmbH: **OPUS Quant V 5.5.** *Orginaldokumentation zur Spektroskopie Software OPUS* 2004:1-136.
 73. Günzler H, Gremlich H-U: **IR-Spektroskopie.** 1 edn: Wiley-VCH; 2003.
 74. Ochsner UA, Reiser J: **Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:6424-6428.
 75. Van Delden C, Iglewski BH: **Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections.** *Emerging Infect Dis* 1998, **4**:551-560.
 76. Junker B: **Foam and its mitigation in fermentation systems.** *Biotechnol Prog* 2007, **23**:767-784.
 77. Chen G, Zhu HL: **lux-Marked *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide production in the presence of rhamnolipid.** *Colloids Surf, B* 2005, **41**:43-48.
 78. Ron EZ, Rosenberg E: **Natural roles of biosurfactants.** *Environ Microbiol* 2001, **3**:229-236.
 79. Bertani G: **Studies on Lysogenesis.1. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia-Coli*.** *J Bacteriol* 1951, **62**:293-300.
 80. Schenk T, Schuphan I, Schmidt B: **High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of the Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas-Aeruginosa*.** *J Chromatogr A* 1995, **693**:7-13.
 81. Butte W: **Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oil using trimethylsulphonium hydroxide for transesterification.** *J Chromatogr* 1983, **261**:142-145.
 82. Mukherjee S, Das P, Sen R: **Towards commercial production of microbial surfactants.** *Trends in Biotechnology* 2006, **24**:509-515.
 83. Nitschke M, Costa SGVAO, Contiero J: **Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules.** *Biotechnol Prog* 2005, **21**:1593-1600.
 84. Pham TH, Webb JS, Rehm BHA: **The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation.** *Microbiology-Sgm* 2004, **150**:3405-3413.
 85. Düfel H: **Untersuchungen zur Regulation der Lipase-Genexpression in *Pseudomonas*.** *Dissertation.* Ruhr-Universität Bochum, Germany, Ruhr-Universität Bochum, Germany; 2000.
-

86. Scheidinger B: **Überexpression und transkriptionelle Regulation des Lipaseoperons von *Pseudomonas aeruginosa* und funktionelle Charakterisierung der Lipase-spezifischen Foldase LipH.** *Dissertation.* Ruhr-Universität Bochum, Germany, 1997.
87. Antranikian G: **Angewandte Mikrobiologie.** 1 Edition. Springer-Verlag; 2006.
88. Mazarevica G, Diewok J, Baena JR, Rosenberg E, Lendl B: **On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy.** *Appl Spectrosc* 2004, **58**:804-810.
89. Gillie JK, Hochlowski J, Arbuckle-Keil GA: **Infrared spectroscopy.** *Anal Chem* 2000, **72**:71-80.
90. Workman J, Veltkamp DJ: **Process analytical chemistry.** *Anal Chem* 1999, **71**:121-180.
91. Tanaka T, Nagao S, Ogawa H: **Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy of Functional Groups of Humic Acid Dissolving in Aqueous Solution.** *Anal Sci* 2001, **17**:i1081-i1084.
92. Otto A: **Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by Method of Frustrated Total Reflection.** *Zeitschrift für Physik* 1968, **216**:398-410.
93. Gartshore J, Lim YC, Cooper DG: **Quantitative analysis of biosurfactants using Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy.** *Biotechnol Lett* 2000, **22**:169-172.
94. Makkar RS, Cameotra SS: **Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45° C.** *JSD* 1999, **2**:367-372.
95. Monteiro SA, Sasaki GL, de Souza LM, Meira JA, de Araujo JM, Mitchell DA, Ramos LP, Krieger N: **Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614.** *Chem Phys Lipids* 2007, **147**:1-13.
96. Nitschke M, Costa SGVAO, Contiero J: **Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules.** *Biotechnol Prog* 2005, **21**:1593-1600.
97. Bertani G: **Studies on Lysogenesis.1. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia-Coli*.** *Journal of Bacteriology* 1951, **62**:293-300.
98. Magario I, Vielhauer O, Neumann A, Hausmann R, Sylatk C: **Kinetic analysis and modeling of the liquid-liquid conversion of emulsified di-rhamnolipids by Naringinase from *Penicillium decumbens*.** *Biotechnology and Bioengineering running titel* 2008.
99. Heyd M, Kohnert A, Tan T, Nusser M, Kirschhöfer F, Brenner-Weiss G, Franzreb M, Berensmeier S: **Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example.** *Anal Bioanal Chem* 2008.

9 Anhang

9.1 Abbildungs und Tabellenverzeichnis

<i>Abb. 4.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Pseudomonas aeruginosa DSM 2874. Die fädigen Strukturen zeigen Pili. Zur rechten unteren Ecke hin verlaufend, kann das Flagellum vermutete werden. (Aufnahme C. Syldatak)</i>	9
<i>Abb. 4.2 Virulenzfaktoren von Pseudomonas aeruginosa. Pseudomonas aeruginosa verfügt sowohl über zellassozierte Virulenzfaktoren (Flagellum, Pili Typ IV, Alginate/Biofilm, Lipopolysaccharid (LPS), Pili-unabhängige Adhesine), als auch über extrazelluläre Virulenzfaktoren (Proteasen, Hämolytase, Phospholipase C & Rhamnolipide, Exotoxin A, Exoenzym S, Pyocyanin) [14].</i>	10
<i>Abb. 4.3 Schematische Darstellung von Tensiden in wässriger Lösung, sowie die Beeinflussung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit der Tensidkonzentration.</i>	13
<i>Abb. 4.4 Von Tensiden oberhalb der cmc ausgebildete typische Mikrostrukturen (nach [21]).</i>	13
<i>Abb. 4.5 Typische Rhamnolipide (nach [23]).</i>	15
<i>Abb. 4.6 Schematische Darstellung der Rhamnolipidbiosynthese auf Pflanzenölen (modifiziert nach [32, 34, 35, 37]).</i>	19
<i>Abb. 4.7 Quorum Sensing Systeme von P. aeruginosa und deren Interaktion (nach [43]).</i>	20
<i>Abb. 4.8 Anzahl an neueren Patente und Publikationen zu den Stichworten „Rhamnolipid“ und „Biosurfactants“. Stand November 2007. (Quellen: European Patent Office (EPO) (http://ep.espacenet.com); ISI web of knowledge (http://portal.isiknowledge.com)).</i>	24
<i>Abb. 4.9 Schematische Darstellung der Schaumbildung durch eingebrachte Luft in eine tensidhaltige, wässrige Lösung.</i>	28
<i>Abb. 4.10 Charakterisierung von Schaum anhand des Gasanteils ϕ [65].</i>	29
<i>Abb. 4.11 Fundafom™ - Systems (Sartorius Stedim Systems GmbH, Schwarzenberger Weg 73 – 79, 34212 Melsungen, Deutschland) zur Schaum/Gasseparation wie es am Lehrstuhl für Technische Biologie der Universität Karlsruhe (TH) eingesetzt wird. A: Reaktordeckel Biostat Cplus mit integriertem Fundafom-System. B: Funktionsprinzip.</i>	32
<i>Abb. 4.12 Einfache Schaumzerstörungsrührer wie sie am Lehrstuhl für Technische Biologie der Universität Karlsruhe (TH) eingesetzt werden. A: Installationsprinzip auf der Rührerachse. B & C: Hohlblattrührer. D: 4-Blatt-Lochrührer. E: 4-Blatt-Rührer. F & G: Scheibenrührer mit unterschiedlichen Schaumeinlässen. H: Kommerziell erhältlicher Schaumzerstörer FoamDisk™ (Sartorius Stedim Systems GmbH, Schwarzenberger Weg 73 – 79, 34212 Melsungen, Deutschland).</i>	32
<i>Abb. 4.13 Schematische Darstellung eines FTIR-Spektrometers mit ATR-Probenkammer.</i>	35
<i>Abb. 4.14 Umwandlung von Spektral- und Konzentrationsdaten in Matrixschreibweise. In diesem Beispiel wurden zunächst M Kalibrationsproben vermessen. In einem weiteren Schritt wurden alle N Wellenzahlen der gemessenen Spektren zeilenweise in eine (M, N)-Matrix geschrieben. Diese Matrix</i>	

<i>entspricht der spektralen Datenmatrix X. Analog wurden alle L Komponentenwerte in eine (M, L)-Konzentrationsdatenmatrix Y geschrieben. [71]</i>	37
<i>Abb. 4.15 Faktorisierung einer Spektraldatenmatrix. [71]</i>	37
<i>Abb. 4.16 Schematische Darstellung des Ergebnisses einer Faktorisierung. [72]</i>	38
<i>Abb. 5.1 Schaumbildung während einer konventionell begasten Fermentation in einem 5 L Glasreaktor mit Pseudomonas species DSM 2874 auf Sonnenblumenöl nach ca. 72 h.</i>	40
<i>Abb. 5.2 Viskosität über den Prozessverlauf bei einer Bioreaktorkultivierung mit DSM 2874 auf dem Ausgangsmedium.</i>	41
<i>Abb. 5.3 Links: Für das Screening verwendetes Parallelreaktorsystem während eines Versuchslaufs. Rechts: Rührerachse mit montiertem mechanischen Schaumzerstörer sowie den zwei konventionellen 6-Blatt Rushton-Rührern zur Reaktordurchmischung.</i>	45
<i>Abb. 5.4 Vereinfachte schematische Darstellung eines mehrstufigen Prozesses mit integrierter mechanischer Schaumzerstörung zur Herstellung von Rhamnolipiden.</i>	50
<i>Abb. 6.1 Zweistufiger Prozess zur biotechnologischen Produktion von Rhamnolipiden</i>	118
<i>Abb. 6.2 der zeitliche Verlauf der Produktion der Rhamnolipide R1 und R3 mit ruhenden Zellen in frischem Mineralsalzmedium bei Resuspension eingefrorener Zellen zum Zeitpunkt $T = 0$</i>	119
<i>Abb. 6.3 Verlauf des Verhältnisses von R1 zu R3 in einem zweistufigen Verfahren jeweils für die erste Stufe und für die nachfolgende Stufe mit ruhenden Zellen;</i>	119
<i>Abb. 6.4 Wachstumsphasen von Zellkulturen in einem Zelldichte-Zeitdiagramm.</i>	120
<i>Abb. 6.5 Schematische Darstellung des aufgebauten Technikumsnetzwerkes.</i>	129
<i>Abb. 6.7 Fällung von Rhamnolipiden in organischer Phase.</i>	132
<i>Abb. 6.8 DC einer Lösung des Prezipitats gegen Jeneil JBR 425 als Standard. Links: Mit Anisaldehyd-Reagenz angefärbter Zuckerrest. Rechts: Mit Ammoniummolybdat-Reagenz angefärbter Fettsäurerest.</i>	133
<i>Fig. 6.1 Oil content, bio dry weight and rhamnolipid concentration during a 500 ml scale cultivation of DSM 7108 on sunflower oil with mechanical foam destruction. The arrow indicates the feeding time of additional 125 g/l of substrate.</i>	59
<i>Fig. 6.2 Antifoam utilization and rhamnolipid end concentrations of four cultivations with DSM 7108 in a 5 l scale bioreactor. Cultivation 1 with 4 blade Rushton stirrer for mechanical foam destruction. Cultivation 2 with 4 blade Rushton stirrer and adapted aeration and mixing speed. Cultivation 3 with a commercial foam destruction stirrer (foam disc™) non optimized. Cultivation 4 with commercial foam destruction stirrer (foam disc™) and adapted mixing speed and aeration rate.</i>	60
<i>Fig. 6.3 Cultivation 4, a 5 l scale production of rhamnolipids with DSM 7108.</i>	61
<i>Fig. 6.4 Two common rhamnolipids [23].</i>	71
<i>Fig. 6.5 Characteristic time courses of substrate, bio dry weight, and, rhamnolipid concentrations for a 5 l scale production of rhamnolipids with DSM 2874. The arrow indicates the feeding time of additional 125 g/l of substrate.</i>	72

Fig. 6.6 Time course of the ratios of rhamnolipid 3 (RL3) to rhamnolipid 1 (RL1) for <i>Pseudomonas</i> spp. DSM 7108 and DSM 2874 cultivations. _____	73
Fig. 6.7 The chemical structure of rhamnolipid 1 and rhamnolipid 3, two common rhamnolipids [23] _____	77
Fig. 6.8 Shaking flask screening with DSM 7108 on seven plant oils and fish oil. Summarized results of total rhamnolipid concentration and the bio dry weight dependant specific productivity after 144 h. _____	80
Fig. 6.9 Bioreactor screening with DSM 7108 on seven plant oils and fish oil. Summarized results according to total rhamnolipid concentration and the specific productivity. _____	81
Fig. 6.10 Average rhamnolipid ratios of rhamnolipid 3 (RL 3) to rhamnolipid 1 (RL 1) for all bioreactor cultivations in terms of process time. _____	84
Fig. 6.11 ATR-FTIR spectra of rhamnolipid 3 in water (89 mg/mL). It was tried to allocate conspicuous absorption to corresponding characteristic group absorptions from literature. _____	95
Fig. 6.12 Investigation of adsorption and evaporation effects in the ATR cell in a time range of 8 minutes. _____	96
Fig. 6.13 The figure displays four spectra of two fermentation derived samples, after double application. A comparison of the corresponding two spectra of each sample, showed correlations of above 99.9 %. _____	97
Fig. 6.14 Quantification of rhamnolipids. Cross validation and test set validation results. _____	99
Fig. 6.15 Proceeding for the sample extraction from culture broths. _____	103
Tab. 4.1 Phylogenetische Zuordnung <i>Pseudomonas aeruginosa</i> _____	9
Tab. 4.2 Klassifizierung von Tensiden (modifiziert, nach [19]). _____	12
Tab. 4.3 Grenzflächenaktive Eigenschaften von Rhamnolipiden in Wasser aus <i>Pseudomonas</i> species DSM 2874 [26]. * gegen n-C16. _____	16
Tab. 4.4 Verfahrensübersicht zur mikrobiellen Herstellung von Rhamnolipiden. _____	23
Tab. 4.5 Unterschiedliche Schaumzerstörungsmethoden im Überblick nach [65]. _____	30
Tab. 6.1 Major fatty acid composition of the used substrates. Measured in equivalent fatty acid methyl esters. * data from supplier. _____	79
Tab. 6.2 Summarized results of the bioreactor cultivations with DSM 7108 _____	81

9.2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
(v/v)	Volumenanteil pro Gesamtvolumen
(w/w)	Gewichtsanteil pro Gesamtgewicht
Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AF	<u>Antifoam</u> (engl. Antischaummittel)
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
BDW	Bio dry weight (engl. Biotrockenmasse)
bzw.	beziehungsweise
cmc	kritische Mizellkonzentration
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DSM	Bezeichnung für Mikroorganismen, die bei der DSMZ hinterlegt sind
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
Fig.	Abbildung (engl. Figure)
FTIR-Spektroskopie	Fourier Transformations Infrarot Spektroskopie
g	Gramm
Gl.	Gleichung
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatografie
IR	Infrarot
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molarität [Mol/l]
mg	10 ⁻³ Gramm
min	Minute
ml	10 ⁻³ Liter
mM	Millimol pro Liter
Mp	Schmelzpunkt (°C)
Mrd.	Milliarden
NL	Normliter Gas
OD 580	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 580 Nanometer
P	Produkt
pks	Säure Dissoziationskonstante
PLS	Partial Least Square
pO ₂	Gelöstsauerstoff
Ps	spezifische Produktivität
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas species</i>
Pv	volumetrische Produktivität
QS	Quorum sensing
RL	Rhamnolipid
rpm	Rotationen pro Minute
R _x	Rhamnoseeinheit
S	verbrauchtes Substrat
t	Zeit
t/a	Tonnen pro Jahr
Tab.	Tabelle
v.a.	vor allem
X	Biomasse
Y _{p/s}	Produktausbeutekoeffizient bezogen auf den Substratverbrauch

$Y_{p/x}$	Produktausbeutekoeffizient bezogen auf die Biomasse
z.B.	zum Beispiel
γ	Grenzflächenspannung (mN/m)
μm	Mikrometer (10^{-6} Meter)
σ	Oberflächenspannung (mN/m)

9.3 Formelsammlung

Bilanzen

Allgemeine Massenbilanzgleichung für einen Bioprozess:

$$\frac{d\left[\int c_i dV\right]}{dt} = F_{ein} \cdot c_{ein} - F_{aus} \cdot c_{aus} + \int r_i \cdot dV$$

mit

c_i = Konzentration einer Komponente i im System oder im Zulauf (Index „*ein*“) oder im Ablauf (Index „*aus*“)

F = Volumenstrom des Zu- oder Ablaufs (Indiziert wenn ungleich)

r_i = Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i

V = Reaktionsvolumen

t = Zeit

für ein Zulaufverfahren (fed-batch) fällt der Ablaufterm weg ($F_{aus} = 0$) und es ergibt sich:

$$\frac{d(c \cdot V)}{dt} = c \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{dc}{dt} = F_{ein} \cdot c_{ein} + r_i \cdot V \quad \text{mit} \quad \frac{dV}{dt} = F_{ein}$$

Da in den Kultivierungen bei dieser Arbeit nur eine diskrete und keine kontinuierliche Zufütterung stattfand, fallen entsprechend einer absatzweise Prozessführung nach diesem Zufütterungszeitpunkt sowohl der Zu- als auch der Ablaufterm weg, es gilt:

$$\frac{d(Vc_i)}{dt} = V \cdot r_i$$

Da V als konstant angenommen wird ergibt sich für die Konzentrationsbilanz:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \left[\frac{g}{lh} \right]$$

Hieraus lassen sich ableiten:

Wachstumsgeschwindigkeit r_x : $\frac{dc_x}{dt} = r_x \left[\frac{g}{lh} \right]$ mit c_x = Biomassekonzentration

Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit (synonym: spezifische Wachstumsrate):

$$\mu = \frac{r_x}{c_x} \left[\frac{1}{h} \right] \text{ oder } r_x = \mu \cdot c_x$$

Mit $c_x = x_i$ der Biomassekonzentration x zum zugehörigen Zeitpunkt t_i ergibt sich für einen Wachstumsverlauf entsprechend einer Monod-Kinetik gilt in einer exponentiellen Wachstumsphase für die maximale spezifische Wachstumsrate:

$$\mu = \mu_{\max} = \frac{\ln x_{t_1} - \ln x_{t_0}}{t_1 - t_0} \Rightarrow \ln \left(\frac{x_{t_1}}{x_{t_0}} \right) = \mu_{\max} \cdot (t_1 - t_0)$$

oder gleichbedeutend:

$$x = x_0 \cdot e^{\mu_{\max} \cdot (t_1 - t_0)}$$

Des Weiteren lässt sich hieraus die **Verdoppelungszeit** t_d bzw. die minimale Verdoppelungszeit $t_{d, \min}$ berechnen:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad \text{bzw.} \quad t_{d, \min} = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}$$

mit $x = 2x_0$

Substrataufnahmerate

$$\frac{dc_s}{dt} = r_s \left[\frac{g}{lh} \right] \text{ mit } c_s = \text{Substratkonzentration}$$

Produktbildungsrate

$$\frac{dc_P}{dt} = r_P \left[\frac{g}{lh} \right] \text{ mit } c_P = \text{Substratkonzentration}$$

Berechnete Ausbeutekoeffizienten Y

Für das Verhältnis von Biomassezuwachs zur Substrataufnahme:

$$Y_{X/S} = \left| \frac{r_X}{r_S} \right| \Rightarrow \left| \frac{\Delta c_X}{\Delta c_S} \right| \left[\frac{g}{g} \right]$$

Für das Verhältnis von Produktbildung zur Substrataufnahme:

$$Y_{P/S} = \left| \frac{r_P}{r_S} \right| \Rightarrow \left| \frac{\Delta c_P}{\Delta c_S} \right| \left[\frac{g}{g} \right]$$

Für das Verhältnis von Produktbildung zur Biomassebildung:

$$Y_{P/X} = \left| \frac{r_P}{r_X} \right| \Rightarrow \left| \frac{\Delta c_P}{\Delta c_X} \right| \left[\frac{g}{g} \right]$$

Volumetrische Produktivität

$$P_v = r_p \left[\frac{g}{lh} \right]$$

spezifische Produktivität bezogen auf die Biomasse

$$P_s = r_p \cdot \frac{1}{c_X} \left[\frac{g}{gh} \right]$$

Abgasberechnungen

$$y_{O_2} = 0,2095$$

$$y_{CO_2} = 0,0003$$

$$R = 8,314 \left[\frac{J}{molK} \right] = 0,08314 \left[\frac{barL}{molK} \right]$$

$$p_{ges} = 1,013 [bar]$$

$$T = T [^{\circ}C] + 273,15$$

Indizes

α = Zuluft

ω = Abluft

y_x = Molenbruch der jeweiligen Gaskomponente x

Volumenbezogene Sauerstoffaufnahme rate $QO_2 = OUR$ (oxygen uptake rate)

$$QO_2 = \frac{\dot{V}_G^{\alpha} \left[\frac{L}{min} \right] \times p_{ges} [bar]}{V_F [L] \times R \left[\frac{barL}{molK} \right] \times T [K]} \times \left(y_{O_2}^{\alpha} - \frac{1 - y_{O_2}^{\alpha} - y_{CO_2}^{\alpha}}{1 - y_{O_2}^{\omega} - y_{CO_2}^{\omega}} \times y_{O_2}^{\omega} \right) \left[\frac{mol}{L min} \right]$$

Volumenbezogene Kohlendioxidbildungsrate $QCO_2 = CER$ (carbondioxide evolution rate)

$$QCO_2 = \frac{\dot{V}_G^{\alpha} \left[\frac{L}{min} \right] \times p_{ges} [bar]}{V_F [L] \times R \left[\frac{barL}{molK} \right] \times T [K]} \times \left(y_{CO_2}^{\omega} \times \frac{1 - y_{O_2}^{\alpha} - y_{CO_2}^{\alpha}}{1 - y_{O_2}^{\omega} - y_{CO_2}^{\omega}} - y_{CO_2}^{\alpha} \right) \left[\frac{mol}{L min} \right]$$

Respiratorischer Quotient:

$$RQ = \frac{QCO_2}{QO_2}$$

9.4 Prozessrezept Rhamnolipid-Produktionsprozess

1. Operation: Vorbereitung

Parameterphase: Variables on

Phase: Variables on		
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
All variables	Var_status	On
All variables	store	On

2. Operation: Fermentationsbedingungen

Parameterphase: Controller

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
PO2	Alarm_low	5
TEMP	Alarm_low	28
TEMP	Alarm_high	32
TEMP	Setpoint	30
TEMP	Ctri_mode	Auto
TEMP	Ctri_status	Remote
STIRR	Ctri_mode	Auto
pH	Ctri_mode	Auto
STIRR	Setpoint	300
PO2	Alarm_high	105
PO2	Setpoint	20
PO2	Ctri_mode	Auto
PO2	Ctri_status	Remote
pH	Setpoint	6,5
pH	Ctri_status	Remote
STIRR	Ctri_status	Remote

3. Operation: Batch-Phase

Parameterphase: Calculations on

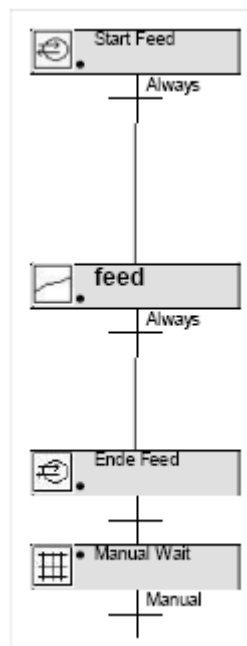
Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Vadd	Var_status	On
Calc_AFOAM	Calculation	On
Calc_Feed	Calculation	On
Calc_BASE	Calculation	On
Calc_ACID	Calculation	On
Calc_RQ	Calculation	On
Calc_OUR_offline	Calculation	On
calcVadd	Calculation	On
Calc_CER_offline	Calculation	On
Calc_Vtotal	Calculation	On
Subsfeed	Var_status	On

Parameterphase: Alarm an

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
PO2	Alarm_mode	MFCS
PO2	Alarm_low	5
PO2	Alarm_high	105
pH	Alarm_high	6,8
pH	Alarm_low	6
pH	Alarm_mode	MFCS
TEMP	Alarm_mode	MFCS
TEMP	Alarm_low	26
TEMP	Alarm_high	32

Parameterphase: Batch-Sync

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
BatchSync	Value	Set

Parameterphase: Manuelle Haltephase**4. Operation: Fed-Batch-Phase****Externe Parameterphase: Feed**

5. Operation: Ernte

Parameterphase: Alarm aus

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
TEMP	Alarm_mode	Inact
PO2	Alarm_mode	Inact
STIRR	Alarm_mode	Inact
pH	Alarm_mode	Inact

Parameterphase: Ernteparameter

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
PO2	Ctrli_mode	Off
STIRR	Ctrli_status	Remote
STIRR	Ctrli_mode	Auto
STIRR	Setpoint	200
pH	Ctrli_status	Remote
PO2	Ctrli_status	Remote
TEMP	Ctrli_status	Remote
TEMP	Ctrli_mode	Auto
TEMP	Setpoint	15
pH	Ctrli_mode	Off

6. Operation: Ende

Parameterphase: Controller off

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
STIRR	Ctrli_status	Remote
PO2	Ctrli_mode	Off

PO2	Ctrli_status	Remote
pH	Ctrli_status	Remote
TEMP	Ctrli_mode	Off
STIRR	Ctrli_mode	Off
TEMP	Ctrli_status	Remote
pH	Ctrli_mode	Off

Parameterphase: Calculations off

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
Calc_Vtotal	Calculation	Off
Calc_RQ	Calculation	Off
Calc_OUR_offline	Calculation	Off
Calc_CER_offline	Calculation	Off

Parameterphase: Variables off

Variable Tag	Variable Property	Variable Value
all variables	Var_status	Off
all variables	store	Off

Im Fokus dieser Arbeit stand die Entwicklung und Optimierung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Rhamnolipiden auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen. Ein Schwerpunkt lag hierbei auf der Entwicklung und Evaluierung einer Standardprozessführung, sowie eines auf einem Parallelbioreaktor basierenden, effizienten Screening-Systems.

Es galt zwei verschiedene Produktionsstämme auf ihr Rhamnolipidbildungspotenzial und auf die von ihnen gebildeten Rhamnolipid 1 : Rhamnolipid 3 Verhältnisse hin zu untersuchen. Zur schnellen Produktanalyse sollte FTIR-Spektroskopie als alternative Analysemethode bezüglich ihrer Eignung zur quantitativen Rhamnolipidbestimmung aus Kultivierungsbrühen untersucht und bis zur Anwendungsreife weiterentwickelt werden.