



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

## Verwendungsnachweis - Schlussbericht

### Projekt:

ERA-MIN 2 - Verbundvorhaben: Siderec - Biobasierte Rückgewinnung von kritischen Technologiemetallen mittels Siderophoren: Gallium (Ga), Germanium (Ge), Indium (In) aus End-of-Life-Produkten,  
Teilprojekt 2: Upscale der Siderophoreproduction.

### Förderkennzeichen:

033RU010B

### Zuwendungsempfänger:

ASA Spezialenzyme GmbH, Am Exer 19c, 38302 Wolfenbüttel

### Projektleiter:

Dr. Arno Cordes

### Projektlaufzeit:

01.11.2019 bis 30.06.2023

*Die Verantwortung für diese Veröffentlichung liegt beim Author.*

## **I. Kurzdarstellung**

### **1. Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher Stand zu Beginn des Vorhabens**

#### **1.1 Projektziele**

In der Photovoltaik, Faseroptik, Flüssigkristallbildschirmen und Leuchtdioden werden Metalle wie Germanium (Ge), Indium (In) und Gallium (Ga) eingesetzt. Die Verfügbarkeit dieser Metalle ist daher essenziell für die Herstellung von High-Tech-Geräten.

Auf Grund der steigenden Nachfrage sowie Lieferengpässen wurden diese Metalle von der EU (Directorate General Enterprise and Industry, 2015) auf die Liste der kritischen oder hochkritischen Elemente gesetzt.

Die Wiederverwendung dieser Metalle aus Altprodukten und geringkonzentrierten Abwasserströmen ist eine Möglichkeit, bestehenden oder drohenden Lieferengpässen entgegenzuwirken.

Allerdings gibt es derzeit keine Technologien zum Recycling dieser Metalle. Gründe hierfür sind die geringen Metallkonzentrationen sowie die große Menge an kontaminierenden Stoffen.

Daher werden zur Aufarbeitung der Metalle hochselektive Methoden benötigt.

Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Siderophore in der Lage sind, Ge, In und Ga selektiv zu komplexieren auch wenn diese Metalle in geringen Konzentrationen vorliegen.

Die Ziele des Vorhabens waren daher die

- Selektion hocheffektiver Siderophore zur Komplexierung von Ga, Ge and In
- Isolierung von Mikroorganismen zur Herstellung dieser Siderophore
- Produktion der ausgewählten Siderophore im Labor- und halbtechnischen Maßstab.

Dabei waren wissenschaftlich/technischen Arbeitsziele von ASA

- Entwicklung und Optimierung eines Fermentationsverfahrens für das Siderophor Desferrioxamin E (DFOE)
- Entwicklung und Optimierung des Aufreinigungsverfahrens für DFOE
- Scale-up des Fermentations- und Aufreinigungsverfahrens in den halbtechnischen Maßstab
- Entwicklung und Optimierung des Fermentationsverfahrens für neu-selektierte Siderophore.

## 1.2 Stand der Technik zu Beginn des Vorhabens

Die EU-Wirtschafts- und Umweltpolitik ist fokussiert auf eine Kreislaufwirtschaft, die energie- und ressourceneffiziente, klimaneutrale und wettbewerbsfähige Prozesse ermöglicht. (Commission, 2015).

Recyclingprozesse sind eine Möglichkeit zum Erreichen dieser Prozesse. Darüber hinaus reduzieren Recyclingprozesse die CO<sub>2</sub>-Emissionen. So emittiert die GeCl<sub>4</sub>-Herstellung aus Schrott im Vergleich zur herkömmlichen Ge-Produktion 100 kg CO<sub>2</sub>-Äquivalente weniger pro kg Ge (Robertz et al., 2015).

Die Metalle Ga, In und Ge können während der Produktionsprozesse der High-Tech-Geräte und aus Altgeräten wiedergewonnen werden. Dabei liegen die Ausbeuten während der Geräteproduktion bei 30 - 50% (Lokanc et al., 2015; Peiro et al., 2013). Nach dem Recycling verbleiben dann pro Jahr immer noch Verluste von etwa 198.5, 59.1 und 483.6 t Ga, Ge and In, (Licht et al., 2015; Lokanc et al., 2015).

Die Wiedergewinnung aus Altprodukten ist mit Ausbeuten von nur 1 - 2% noch weniger effektiv (EU Commission, 2018; Mathieux et al., 2017; Peiro et al., 2013).

Die Verluste werden primär verursacht durch die geringe Effizienz der konventionellen Recyclingtechnologien wie z.B. Lösungsmittlextraktion (Nusen et al., 2016) oder Fällung (Xu et al., 2007), besonders wenn die Zielmetalle in geringer Konzentration und die unerwünschten Metalle im Überschuss vorliegen.

Somit kann gesagt werden, dass eine Wiedergewinnung von Ga, In und Ge aus Altprodukten derzeit Prinzip nicht machbar ist. Kommerzielle Technologien zum Recycling dieser Metalle aus geringkonzentrierten Abwässern sind ebenfalls nicht verfügbar.

Die GaLlophore Technologie, die kürzlich am HZDR (TRL 4) entwickelt wurde, ermöglicht die wirtschaftliche Rückgewinnung von Ga aus gering konzentrierten Abwässern aus der GaAs-Wafer-Produktion (Jain, 2019). Eine entsprechende Technologie zur Rückgewinnung von Ge aus Abwässern konnte allerdings bisher nicht demonstriert werden.

Mikrobielle Komplexbildner wie Siderophore, die auch in der GaLlophore-Technologie eingesetzt werden, sind in der Lage, selektiv an unterschiedliche Metallionen zu binden.

Sie werden von Mikroorganismen gebildet, die sich entweder durch sie Fe<sup>3+</sup> verfügbar machen oder sensitiv dagegen sind (Hider and Kong, 2010).

Diese Selektivität und Spezifität konnte auch auf Ga und Ge erweitert werden, da diese Metalle einen ähnlichen Ionenradius wie Fe haben und auch sechszählige Komplexe bilden können (Jain et al., 2017; Johnstone and Nolan, 2015).

Auch für In konnten entsprechende Wechselwirkungen detektiert werden: Versuche am HZDR zeigten, dass DFOE und DFOB sensitiv und selektiv an Ga, Ge *und* In binden (HZDR, Pollmann, nicht-publizierte Ergebnisse).

Nichtsdestoweniger sind mehr als 500 Arten von Siderophoren bekannt (catecholate, hydroxamate,  $\alpha$ -hydroxycarboxylate,  $\alpha$ -aminocarboxylate, hydroxyphenyloxazolone,  $\alpha$ -hydroxyimidazole), die potenzielle Kandidaten für eine noch effektivere Bindung von Ga, Ge und In sind.

Mit dem Austausch eines Siderophorliganden ändert sich auch der pKa-Wert. Z.B. ist der pKa-Wert für Hydromate (wie DFOE, B) 9,0, während dieser für  $\alpha$ -hydroxycarboxylate 3.0 und 14.5 ist. Diese Unterschiede verändern die Komplexierungsfähigkeit für verschiedene Zielmetalle

(Hider and Kong, 2010).

Leider sind nur einige wenige Siderophore kommerziell verfügbar und keines davon für Preise, die eine kostengünstige industrielle Verwertung für das Recycling von Ga, Ge und In ermöglichen.

Von Jain et al. (2019) wurde die GaLIOphore-Technologie beschrieben, die die Wiedergewinnung von Ga aus gering konzentrierten Abwässern mittels DFOE und DFOB ermöglicht (Di Palma et al., 2003; Gyliene et al., 2004; Schmelter and Standish, 2019, Jain et al., 2018). Diese Methode soll im Rahmen des Projektes vom HZDR auch das Recycling von Ge erweitert werden.

## Literatur

Commission, E., 2015. Closing the loop - An EU action plan for the Circular Economy. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. Brussels, 2.12.2015. COM(2015) 614 final. Com 2.

Di Palma, L., Ferrantelli, P., Merli, C., Biancifiori, F., 2003. Recovery of EDTA and metal precipitation from soil flushing solutions. *J. Hazard. Mater.* 103, 153–168. doi:10.1016/S0304-3894(03)00268-1

EU Commission, 2018. Commission Staff Working Dokument Report on Critical Raw Materials and the Circular Economy. *J. Vis. Lang. Comput.* 11, 287–301. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2013.08.006

Gyliene, O., Aikaite, J., Nivinskiene, O., 2004. Recovery of EDTA from complex solution using Cu(II) as precipitant and Cu(II) subsequent removal by electrolysis. *J. Hazard. Mater.* 116, 119–124. doi:10.1016/j.jhazmat.2004.08.026

Hider, R.C., Kong, X., 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637–657. doi:10.1039/b906679a

Jain, R., Cirina, F., Kaden, P., Pollmann, K., 2017. Investigation of the Ga Complexation Behaviour of the Siderophore Desferrioxamine B. *Solid State Phenom.* 262, 643–646. doi:10.4028/www.scientific.net/SSP.262.643

Jain, R., Fan, S., Kaden, P., Tsushima, S., Foerstendorf, H., Barthen, R., Lehmann, F., Pollmann, K., 2019. Recovery of gallium from wafer fabrication industry wastewaters by Desferrioxamine B and E using reversed-phase chromatography approach. Submitted.

Jain, R., Lehmann, F., Pollmann, K., 2018. Rückgewinnung von metallen aus industrieabwässern geringer metall- konzentration. 10 2018 107 923.0.

Licht, C., Peiró, L.T., Villalba, G., 2015. Global substance flow analysis of gallium, germanium, and indium: Quantification of extraction, uses, and dissipative losses within their anthropogenic cycles. *J. Ind. Ecol.* 19, 890–903. doi:10.1111/jiec.12287

Lokanc, M., Eggert, R., Redlinger, M., Lokanc, M., Eggert, R., 2015. The Availability of Indium : The Present , Medium Term , and Long Term. Colorado.

Mathieux, F., Ardente, F., Bobba, S., Nuss, P., Blengini, G., Alves Dias, P., Blagoeva, D., Torres De Matos, C., Wittmer, D., Pavel, C., Hamor, T., Saveyn, H., Gawlik, B., Orveillon, G., Huygens, D., Garbarino, E., Tzimas, E., Bouraoui, F., Solar, S., 2017. Critical raw materials and the circular economy - Background report. doi:10.2760/378123

Nusen, S., Chairuangri, T., Zhu, Z., Cheng, C.Y., 2016. Recovery of indium and gallium from synthetic leach solution of zinc refinery residues using synergistic solvent extraction with LIX 63 and Versatic 10 acid. Hydrometallurgy 160, 137–146. doi:10.1016/j.hydromet.2016.01.007

Peiro, L.T., Mendez, G.V., Ayres, R.U., 2013. Material flow analysis of scarce metals: Sources, functions, end-uses and aspects for future supply. Environ. Sci. Technol. 47, 2939–2947. doi:10.1021/es301519c

Robertz, B., Verhelle, J., Schurmans, M., 2015. The Primary and Secondary Schmelzer, D., Standish, M., n.d. Comparing common metal precipitating agents : A close look at DTC , TTC , and polymeric Choices. Analyst 24, 10–24.

Xu, K., Deng, T., Liu, J., Peng, W., 2007. Study on the recovery of gallium from phosphorus flue dust by leaching with spent sulfuric acid solution and precipitation. Hydrometallurgy 86, 172–177. doi:10.1016/j.hydromet.2006.11.013

## 2. Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben umfasste 6 technologische Arbeitspakete (AP1-6), die logisch aufeinander aufbauen und gemeinsam von den Projektpartnern UCN, IPGP, HZDR und ASA umgesetzt wurden (Abbildung 1).

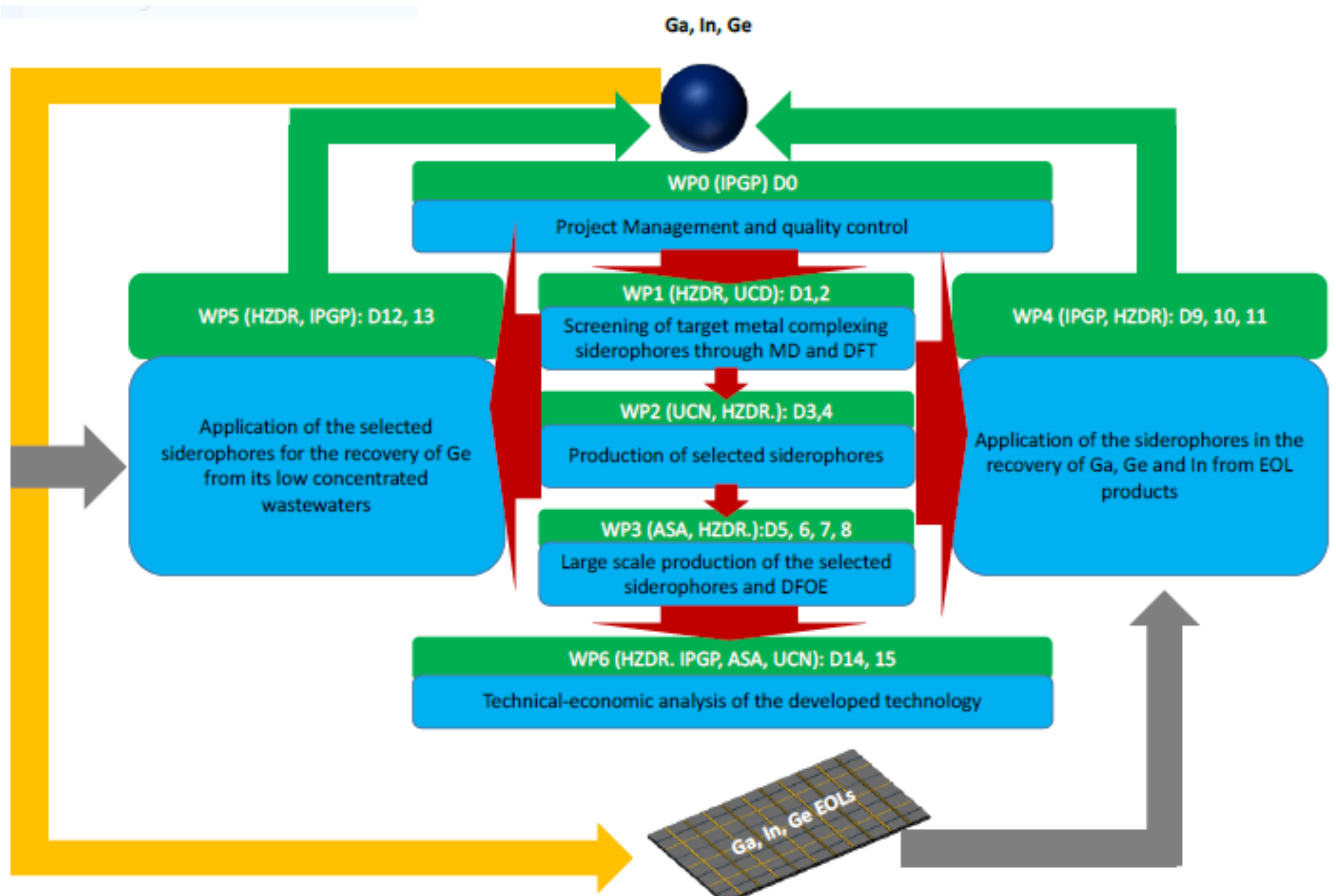


Abbildung 1: Darstellung Vernetzung der Arbeitspakete

Das Projekt verlief entsprechend der im Projektantrag dargestellten Arbeitspakete, wobei ASA nur an WP 3 maßgeblich beteiligt war

### **WP 3: Fermentation und Reinigung ausgewählter Siderophore**

- 3.1 Entwicklung einer HPLC-Methode zum Nachweis von DFOE und DFOB
- 3.2 Optimierung der Siderophorbildung im Labormaßstab
- 3.3 Scale-up des Fermentationsprozesses für DFOE
- 3.4 Optimierung des Aufreinigungsverfahrens
- 3.5 Scale-up der Aufarbeitung (Downstream processing, DSP)
- 3.6 Entwicklung und Optimierung des Fermentationsverfahrens für neu-selektierte Siderophore.

### **3. Wesentliche Ergebnisse**

Es wurde eine HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von DFOE und DFOB entwickelt, die sowohl für den Nachweis in hochgereinigten Lösungen als auch in der Fermentationsbrühe geeignet ist.

Die Arbeiten zur Fermentationsoptimierung, bei denen auch Strategien wie *Repeated Batch* untersucht wurden, ergaben die besten Ergebnisse für ein Fedbatchverfahren, bei dem ausschließlich die Stickstoffquelle zugefüttert wurde. Im Schüttelkolbenmaßstab konnte damit die DFOE-Ausbeute um den Faktor 2,5 erhöht werden.

Weiterhin wurde ein optimales Animpfvolumen von 5% v/v ermittelt, bei dem die DFOE-Konzentration um ca. 30% im Vergleich zu vorherigen Ansätzen erhöht war.

Der Scale-up des Fermentationsverfahren wurde in Bioreaktortotalvolumina von 300 bis 1.000 Liter durchgeführt.

Dabei konnten die höchsten DFOE-Gehalte gemessen werden, wenn der Zuckergehalt im Fermenter während der gesamten Fermentation auf einem sehr geringen Wert um die 2 g/L gehalten werden konnte.

Die DFOE-Ausbeuten schwankten in den Fermentationen, wobei kein Einfluss des Fermentationsmaßstabes sichtbar war. Der höchste und niedrigste Wert (ca. 13 bzw. 6 g/L) wurde im 300 L-Maßstab gemessen, während im 1.000 L-Bioreaktor ein Maximalwert von etwa 9 g/L erzielt wurde.

Der Vergleich der beiden Analysenmethoden zur Bestimmung von DFOE zeigte, dass in Fermentationsbrühen mit dem HPLC-Verfahren Werte von ca. 50% im Vergleich zum

photometrischen Verfahren gemessen wurden.

Bei der Entwicklung des Aufarbeitsverfahrens wurden neben verschiedenen Fällungs- und Adsorptionsansätzen auch chromatographische Methoden untersucht.

Die Fermentationsbrühe sollte vor der Biomasseabtrennung auf  $\geq 80^\circ\text{C}$  erhitzt werden, um eine möglichst gute DFOE-Abtrennung zu gewährleisten.

Die Versuche zur Optimierung der Kältefällung aus der Fermentationsbrühe ergaben, dass der optimale Kristallisationspunkt bei  $8^\circ\text{C}$  nach 4 h Kühlung erreicht wird.

Weiterhin konnte eine zunehmende Präzipitation mit fallendem pH-Wert beobachtet werden.

Allerdings ist der Einfluss recht gering (17% geringere Konzentration im Überstand bei pH 1,0).

Mit einer Kombination aus pH- und Ammoniumsulfatfällung bei pH 4,0 und einer Zugabe von 150 - 200 g/L Ammoniumsulfat wurden die besten Werte erzielt. Es konnten bis zu ca. 90% des DFOE aus dem Überstand gefällt werden.

Der Einsatz von Hydrophober Chromatographie scheint zur weiteren Reinigung von DFOE grundsätzlich geeignet. Nach Bindung an das Säulenmaterial konnte DFOE quantitativ eluiert werden.

Versuchsansätze mit aktivierter Aktivkohle ergaben eine Reduzierung von DFOE im Fermentationsüberstand um bis zu 78 %. Allerdings sind die Aktivkohlemengen sehr hoch (100 mg/mL) und die Ausbeuten nicht ausreichend.

Versuche zur Reinigung über Ni-NTA- oder Fe-NTA-Säulen ergaben keine Bindung von DFOE an das Säulenmaterial.

Bei dem Scale-up des Downstream processing konnten aus 210 L Fermentationsüberstand 500 g DFOE gewonnen werden. Dies sind etwa 68 % Gesamtausbeute.

Die Arbeiten zur Optimierung der Fimsbactin F-Production aus *Acinetobacter baylyi* ADP1 ergaben keine messbare Fimsbactin-Konzentrationen in den Kulturüberständen. Es konnte aber gezeigt werden, dass geringe Siderophormengen an die Zellwände der Biomasse gebunden waren. Somit ist die Anwendung dieses Siderophors zunächst einmal in weite Ferne gerückt.

#### **4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Dieses Projekt wurde ausschließlich mit den Projektpartnern

- Universidad Catolica del Norte (UCN)
- Institut de Physique du Globe de Paris, Environmental Biogeochemistry (IPGP)
- Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e.V. (HZDR)

durchgeführt.

Wolfenbüttel, 29.12.2023  
ASA Spezialenzyme GmbH  
Dr. Arno Cordes/Projektleiter

**Projekt: SIDEREC; FKZ033RU010B;****Schlussbericht Teil II: Ausführliche Darstellung****Inhaltsverzeichnis**

	<b>Seite</b>
1. Darstellung der Arbeiten	2
WP 3: Fermentation und Reinigung ausgewählter Siderophore	2
3.1 Entwicklung einer HPLC-Methode zum Nachweis von Desferrioxamin B und E	2
3.2 Optimierung der Siderophorbildung im Labormaßstab	4
3.3 Scale-up des Fermentationsprozesses für DFOE	5
3.4 Optimierung des Aufreinigungsverfahrens	7
3.5 Scale-up der Aufarbeitung (Downstream processing, DSP)	18
3.6 Entwicklung und Optimierung des Fermentationsverfahrens für neu-selektierte Siderophore	18
2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	24
3. Notwendigkeit und Angemessenheit der Projektarbeiten	24
4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	25
5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	25
6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses	26

## II. Ausführliche Darstellung

### 1. Darstellung der Arbeiten

#### WP 3: Fermentation und Reinigung ausgewählter Siderophore

Ziel dieses Arbeitspaketes ist die Optimierung der Fermentation sowie des Downstream processing für die im Rahmen des Projekt isolierten Siderophor-bildenden Mikroorganismen. Für die effektivsten Stämme wird ein Scale-up vorgenommen.

Als erster Mikroorganismus wurde *Streptomyces olivaceus*, der sich als effektiver Bildner von Desferrioxamin E (DFOE) erwies, für die Untersuchungen ausgewählt.

#### 3.1 Entwicklung einer HPLC-Methode zum Nachweis von Desferrioxamin B und E

Da der photometrische Schnelltest zur Bestimmung von DFOE und B nur bei hochreinen Proben korrekte Werte liefert, wurde eine spezifischere HPLC-Methode entwickelt, die auch für Fermentationsüberstände geeignet ist..

Da der Nachweis von DFOE mittels HPLC aufgrund der vielen Peaks bei Detektionswellenlänge 256 nm schwierig ist, wurden DFOE und DFOB mit  $\text{Fe}^{3+}$  zu Ferrioxamin B und E komplexiert (FOB und FOE), was zu einer Rotfärbung der Lösung führt.

Die Detektion erfolgte dann bei 435 nm.

#### Erstellung einer Standardkurve mit FOB

##### Durchführung

- 5 Punkte, 0-Wert und 4 Einwaagen von DFOB
- 1 mL Standard + 1 ml Farbreagenz

##### Farbreagenz

$\text{Fe(III)Cl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  in HCL (135 mg  $\text{Fe(III)Cl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  in VE-Wasser lösen, 250  $\mu\text{L}$  3M HCl zugeben und mit VE-Wasser auf 250 ml auffüllen. Im Kühlschrank mehrere Wochen haltbar.

##### Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt die HPLC-Bedingungen sowie die Kalibriergerade. Abbildung 2 zeigt das HPLC-Diagramm für verschiedene Konzentrationen von DFOE und B. Somit ist diese HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von DFOE und DFOB sowohl in hochgereinigten Lösungen als auch in der Fermentationsbrühe geeignet.

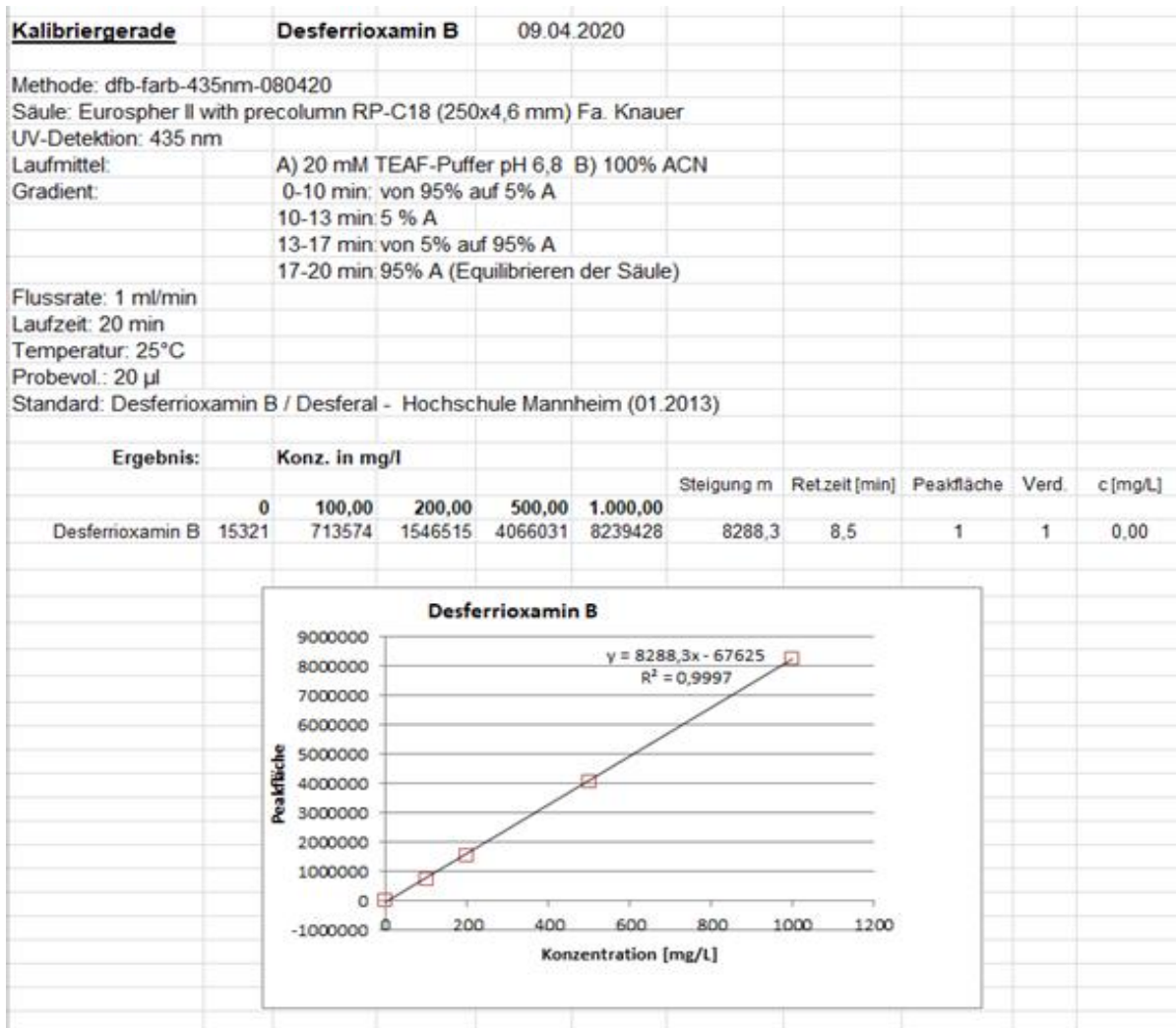


Abbildung 1: Nachweis von DFOB mittels HPLC. Kalibrierkurve Ferrioxamin B

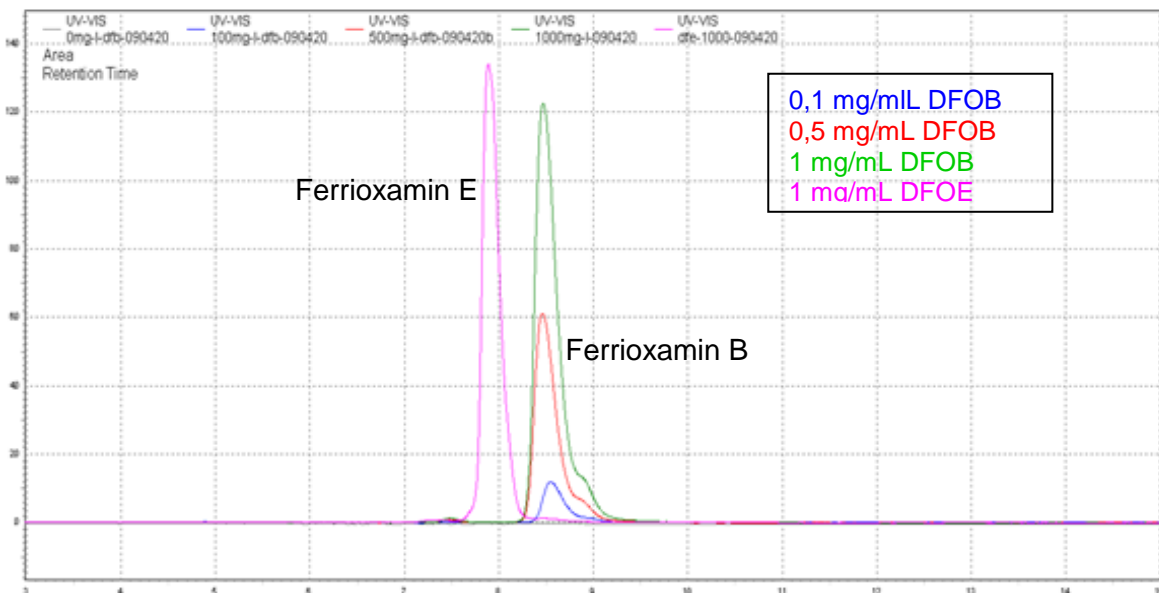


Abbildung 2: Nachweis von Ferrioxamin E und B mittels HPLC

## 3.2 Optimierung der Siderophorbildung im Labormaßstab

### 3.2.1 Vergleich verschiedener Repeated Batch-Verfahren

Neben der Medienoptimierung ist das Repeated Batch-Verfahren eine einfache und effektive Methode, um die Raumzeitausbeuten eines biotechnischen Produktes zu erhöhen. Hierbei wird in bestimmten Zeitabständen ein Teil des Fermentationsmediums durch frisches ersetzt.

#### Durchführung

100 ml Hauptmedium wurden in 500 ml Schüttelkolben mit 5 ml *Streptomyces olivaceus*-Vorkultur angeimpft bei 30°C nach dem Fedbatchverfahren (tägliche Zugabe von C- und N-Quelle) inkubiert. Je nach Strategie wurde der Fermentationsüberstand nach bestimmten Wachstumszeiten durch Zentrifugation entfernt und durch eine Medienkombination aus C-Quelle (A: Saccharose) und N-Quelle (B: Lysin) wie folgt ersetzt:

- Repeated Batch (RP) 1: ab 22 h einmal täglich durch Kombination A/B  
 Repeated Batch (RP) 2: bei Erreichen einer fast max. DFOE-Konzentration einmal täglich (ab 264 h) durch Kombination A/B  
 Repeated Batch (RP) 3: Fedbatch nur mit N-Quelle. Bei Erreichen einer fast max. DFOE-Konzentration einmal täglich (ab 288 h) nur durch B

#### Ergebnisse

Alle Ansätze mit Medienaustausch benötigten sehr viel Zeit, um wieder die DFOE-Bildung in Gang zu setzen (Abbildung 3). Von daher scheint der komplette Medienaustausch nicht vorteilhaft. Die besten maximalen DFOE-Werte lieferte der Ansatz RP 3, bei dem nur die N-Quelle zugefüttert wurde. Hier war DFOE-Ausbeute im Vergleich zum Fedbatchverfahren um den Faktor 2,5 erhöht.

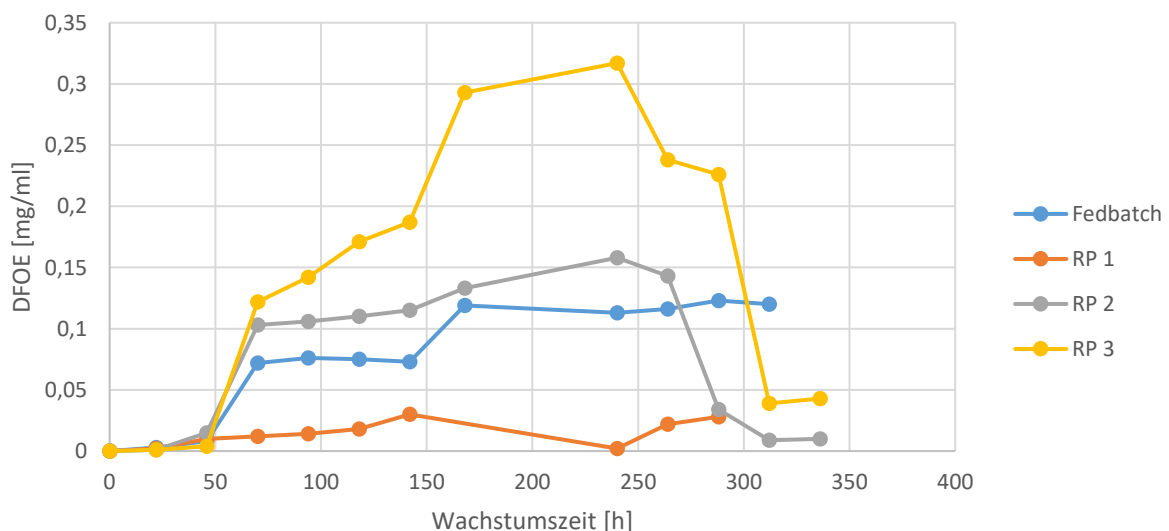


Abbildung 3: DFOE-Bildung von *Streptomyces olivaceus* bei Kultivierung mit verschiedenen Fedbatchverfahren.

RP 1: Medienaustausch nach 22, 46, 70 h

RP 2: Medienaustausch nach 264 h

RP 3: Medienaustausch nach 288 h; Fütterung nur mit N-Quelle

### 3.2.2 Abhängigkeit der DFOE-Bildung von der Animpfmenge

Die Animpfmenge der Hauptkultur kann einen deutlichen Einfluss auf die Siderophor-Bildung haben.

#### Durchführung

##### Vorkulturmedium

Stamm :	Streptomyces olivaceus Tü 2718	
Vorkulturmedium	Mannit	20 g/l
	Sojapepton	20 g/l
	pH-Wert	7,5
Inkubationsdauer	48 h	

100 ml Hauptmedium wurden in 500 ml Schüttelkolben mit 2 bzw. 5 ml *Streptomyces olivaceus*- Vorkultur angeimpft bei 30°C nach dem Fedbatchverfahren (tägliche Zugabe von C- und N-Quelle) inkubiert.

#### Ergebnisse

Abbildung 4 zeigt, dass bei einem Animpfvolumen von 5% die DFOE-Konzentration um ca. 30% erhöht ist. Es wird ein Wert von ca. 1.300 mg/L erreicht.

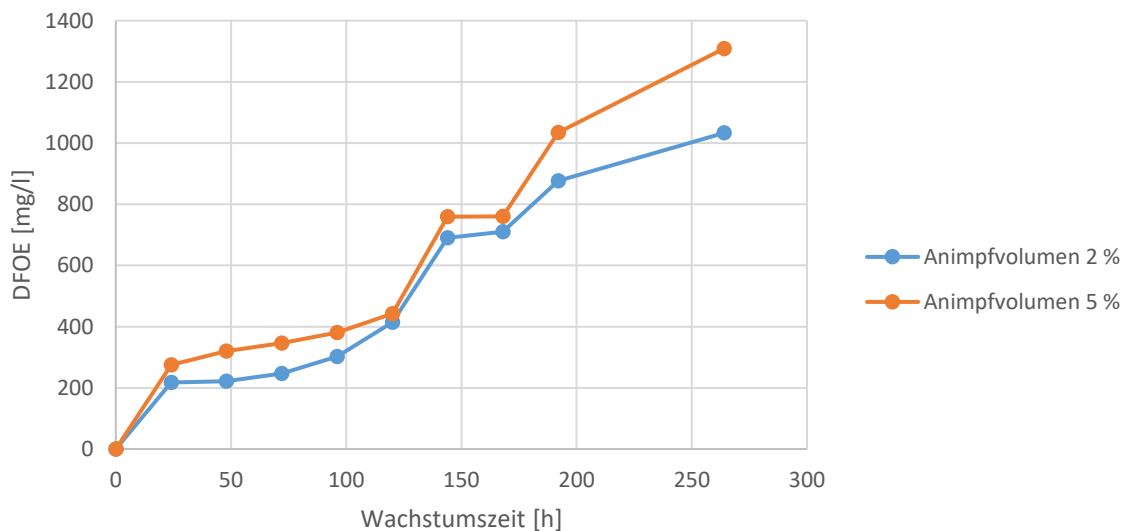


Abbildung 4: DFOE-Bildung von *Streptomyces olivaceus* bei Kultivierung im Fedbatchverfahren bei verschiedenen Animpfvolumina

### 3.3 Scale-up des Fermentationsprozesses für DFOE

#### 3.3.1 Fermentation

Der Scale-up wurde zunächst bis in den 250 L-Maßstab durchgeführt.

### Durchführung

Fermenter: R-250  
 Verfahren: Fedbatch  
 Produktionsstamm : Streptomyces olivaceus, Stamm 117  
 Animpfvolumen : 6 L  
 Startvolumen : 180 L  
 Temperatur : 33°C  
 pH : 6,5  
 Belüftung : 0,5 vvm  
 Rührung : 500 upm

### Ergebnisse

Es konnten 240 L Fermentationsüberstand mit einem DFOE-Gehalt von 12,8 g/L abgeerntet werden. Dieser sehr hohe Siderophorgehalt könnte damit zusammenhängen, dass es gelang, den Parameter „Reduzierende Zucker“ während der gesamten Fermentation auf einem sehr geringen Wert um die 2 g/L zu halten (Abbildung 5).

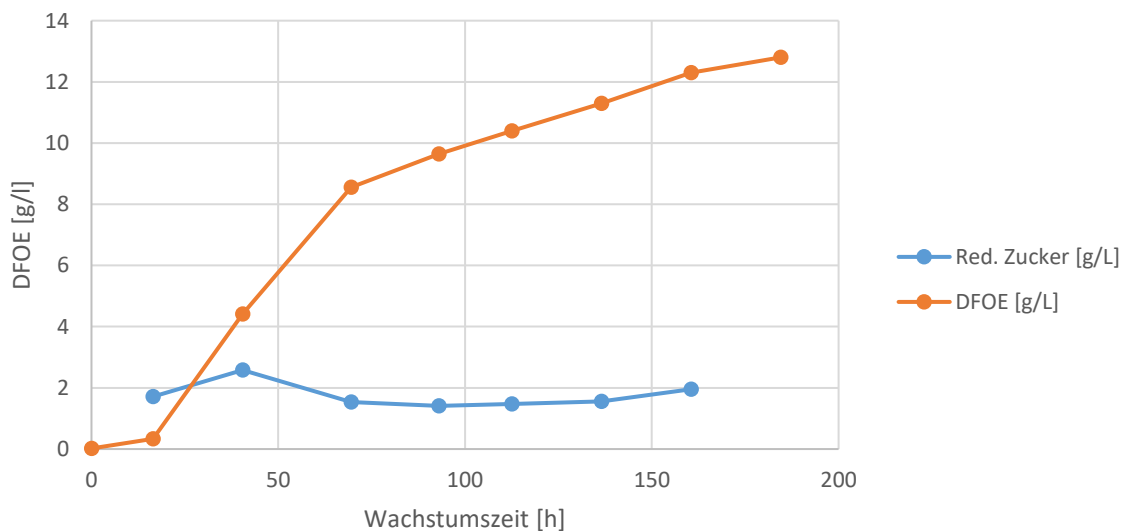


Abbildung 5: DFOE-Bildung von Streptomyces olivaceus bei Kultivierung im 250 L-Maßstab

### 3.3.2 Scale-up in den 1.000 L-Maßstab

#### Durchführung

Es wurden zunächst drei Fermentationen im 250 L-Maßstab durchgeführt und danach der Scale-up in den 1.000 L-Maßstab vollzogen.

Die Fermentationsparameter waren:

Fermenter: R-1.000 L  
 Verfahren: Fedbatch  
 Produktionsstamm : Streptomyces olivaceus, Stamm 117  
 Animpfvolumen : 2,5%

Startvolumen : 600 L  
 Temperatur : 30°C  
 pH : 6,5  
 Belüftung : 0,5 vvm  
 Rührung : 500 upm

### Ergebnisse

Die DFOE-Ausbeuten schwankten in den Fermentationen, wobei kein Einfluss des Fermentationsmaßstabes sichtbar war. Der höchste und niedrigste Wert (ca. 13 bzw. 6 g/L) wurde im 250 L-Maßstab gemessen, während im 1.000 L-Bioreaktor ein Maximalwert von etwa 9 g/L erzielt wurde (Abbildung 6).

Der Vergleich der beiden Analysenmethoden zur Bestimmung von DFOE zeigte, dass in Fermentationsbrühen mit dem HPLC-Verfahren Werte von ca. 50% im Vergleich zum photometrischen Verfahren gemessen wurden.

Insgesamt wurde der Scale-up erfolgreich durchgeführt. Allerdings sollte die Kältefällung des DFOE aus der Fermentationsbrühe noch weiter optimiert werden.

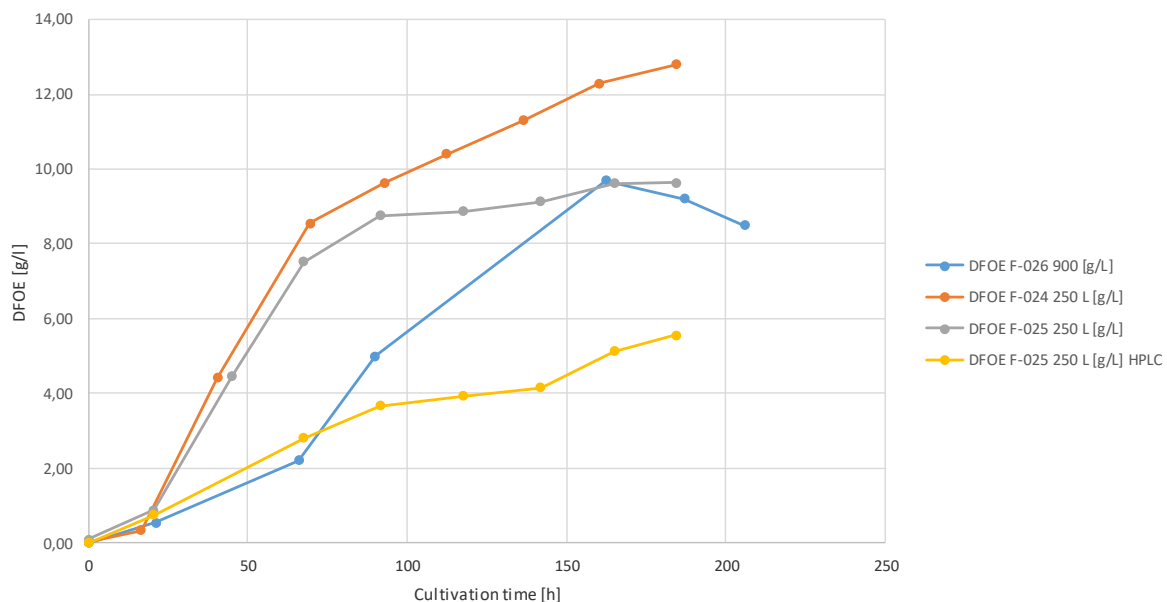


Abbildung 6: Scale-up des Fedbatch-Fermentationsprozesses zur Produktion von DFOE bis zum 1.000 L-Maßstab: Vergleich der Entwicklung der DFOE-Gehalte

### 3.4 Optimierung des Aufreinigungsverfahrens

Das bisherige Aufarbeitsverfahren von DFOE aus dem Fermentationsüberstand besteht aus der Kühlung auf 4°C und Abtrennung des präzipitierten Siderophors durch Separation und führt zu deutlich Produktverlusten. Daher wurde das Downstream processing weiterentwickelt.

### 3.4.1 Fällung von Desferrioxamin E (DFE) mit Salzen

#### Durchführung

Jeweils 50 ml Überstand aus einer Fermentation mit einem Gehalt von 5,7 g/L DFOE wurden mit verschiedenen Mengen der Salze NaCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  sowie  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  versetzt und nach Zentrifugation die DFOE-Konzentration im Überstand gemessen.

#### Ergebnisse

Durch Zugabe der Salze konnte die Konzentration von DFOE im Überstand um maximal 14 % (Tabelle 1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) verringert werden. Somit wurden diese Verfahren als nicht effektiv beurteilt.

Tabelle 1: Fällung von DFOE aus dem Fermentationsüberstand mit verschiedenen Salzen

Salz	Einwaage [mg/ml]	DFOE <sub>ÜS</sub> [mg/ml]
-	0	1,24
NaCl	6,0	1,19
	12,0	1,16
	18,0	1,15
	24,0	1,15
-	0	1,23
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,6	1,17
	13,2	1,14
	19,8	1,11
	26,4	1,06
-	0	3,97
CaOH	10	4,03
	20	4,07
	50	4,34
	100	4,23
-	0	3,97
$\text{CaCl}_2$	50	3,90
	100	3,90
	200	3,81
	500	3,69

Weitere Fällungsversuche mit PEG 400 zeigten ebenfalls nur geringe positive Effekte.

### 3.4.2 Einfluss der Temperatur auf die Löslichkeit von DFOE

Um die Ausbeuteverluste bei der Abtrennung des Fermentationsüberstandes von der Biomasse zu minimieren, wurde die Temperatur ermittelt, bei der das DFOE möglichst vollständig im Überstand gelöst ist.

#### Durchführung

DFOE-Lyophilisat wurde in VE-Wasser gelöst, in 1 ml-Reaktionsgefäße verteilt und dann im Heizblock auf 89°C erhitzt. Beim Runterkühlen wurde bei verschiedenen Temperaturen einzelne Reaktionsgefäße entfernt, sofort zentrifugiert und die DFOE-Konzentration im Überstand gemessen.

#### Ergebnisse

Eine Pelletbildung war schon ab ÜS 2 gut sichtbar. Tabelle 2 zeigt darüberhinaus, dass Die Fermentationsbrühe vor der Biomasseabtrennung auf  $\geq 80^{\circ}\text{C}$  erhitzt werden sollte, um eine möglichst gute DFOE-Abtrennung zu gewährleisten.

Tabelle 2 Löslichkeit von DFOE bei verschiedenen Temperaturen

Bezeichnung	Temperatur	DFOE
	[°C]	[mg/ml]
ÜS 1	89	3,72
ÜS 2	80	3,58
ÜS 3	60	3,36
ÜS 4	40	3,56
ÜS 5	25	3,49

### 3.4.3 Optimierung der Kristallisation von DFOE

Auf Grund der unbefriedigenden Resultate der Fällungsversuche wurde das bisherige Aufarbeitungsverfahren von DFOE aus dem Fermentationsüberstand, bestehend aus Kühlung auf 4°C und Abtrennung des präzipitierten Siderophors durch Separation, beibehalten. Ziel dieses Versuchs war die Ermittlung der Kühlungszeit und -temperatur.

#### Durchführung

200 mg DFOE-Pulver wurde in 20 ml VE-Wasser suspendiert und im Wasserbad auf 90°C erhitzt. Dann wurde die Lösung in den Kühlschrank gestellt, zu verschiedenen Zeiten Proben genommen, diese abzentrifugiert und die DFOE-Gehalte in den Überständen sowie getrockneten Zentrifugationsrückständen gemessen.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Es ist erkennbar, dass der optimale Kristallisationspunkt bei 8°C nach 4 h Kühlung erreicht wird.

Tabelle 3: Ermittlung des optimalen Kristallisationspunktes von DFOE aus dem Fermentationsüberstand

Bezeichnung	Kühlzeit [h]	T [°C]	DFOE ÜS		DFOE ZR		DFOE <sub>ges.</sub> [%]
			[mg/ml]	[%]	[mg/ml]	[%]	
ÜS 1	0	20	2,29	22,9	0,03	0,3	23,2
ÜS 2	0,5	13	3,71	37,1	0,26	2,6	39,7
ÜS 3	1	10	1,99	19,9	5,16	51,6	71,5
ÜS 4	2	9	1,41	14,1	5,76	57,6	71,7
ÜS 5	4	8	1,22	12,2	6,00	60,0	72,2
ÜS 6	6	8	1,16	11,6	5,97	59,7	71,3
ÜS 7	24	7	1,09	10,9	-	-	-

ÜS: Überstand

ZR: Zentrifugationsrückstand

### 3.4.4 Einfluss des pH-Wertes

#### Durchführung

Jeweils 50 ml Überstand aus einer Fermentation mit einem Gehalt von 5,7 g/L DFOE wurden mit 1 M bzw. 6 M HCl auf verschiedene pH-Werte eingestellt und nach Zentrifugation die DFOE-Konzentration im Überstand gemessen.

#### Ergebnisse

Die volumenbereinigten Werte der DFOE-Konzentration im Überstand bestätigen eine zunehmende Präzipitation mit fallendem pH-Wert (Tabelle 4). Allerdings ist der Einfluss zu gering (17% geringere Konzentration im Überstand bei pH 1,0).

Tabelle 4: Fällung von DFOE aus dem Fermentationsüberstand in Abhängigkeit vom pH-Wert

pH-Wert	Zugabe HCl [ $\mu$ l]		DFE <sub>ÜS</sub>	
	1 M	6 M	[mg/ml]	volumenbereinigt
6,3	0	0	5,77	-
6,3	0	0	5,33	-
6,0	25	0	5,70	5,7
5,0	150	0	5,62	5,8
4,0	400	0	4,68	5,1
3,0	0	150	4,93	5,1
2,0	50	200	4,56	4,8
1,0	400	250	4,23	4,8

### 3.4.5 Kombination von pH- und Ammoniumsulfatfällung

Es wurde weiterhin daran gearbeitet, die Aufreinigung von DFOE zu verbessern und dabei vor allem bessere Ausbeuten zu erzielen. Insbesondere wurde der Schritt zur Fällung von DFOE aus dem Fermentationsüberstand weiter optimiert.

#### Durchführung

Die Fermentationsbrühe wurde auf 80°C erhitzt und dann die Biomasse mittels Separator abgetrennt. Der Überstand wurde auf 4°C abgekühlt, der jeweilige pH-Wert eingestellt und mit Ammoniumsulfatkonzentrationen von 0 - 600 g/L versetzt. Nach verschiedenen Absetzzeiten wurden die DFOE-Gehalte im Überstand und resuspendierten Präzipitat (=Pelletsuspension) gemessen.

Weiterhin wurde bei konstanter Ammoniumsulfatkonzentration der pH-Wert variiert.

#### Ergebnisse

Die besten Ergebnisse wurden bei pH 3,0 erzielt (Tabelle 5): Bei einer Zugabe von 200 g/L Ammoniumsulfat konnten ca. 90% des DFOE aus dem Überstand gefällt werden. Bei einer Absetzzeit von 24 h wurde die Ausfällung weiter verbessert, allerdings konnte die ausgefällte DFOE-Menge nicht im Präzipitat wiedergefunden werden.

Tabelle 5: Ammoniumsulfatfällung von DFOE aus dem Fermentationsüberstand bei pH 3,0. ÜS: Überstand; PS: Pelletsuspension (Präzipitat)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	DFOE [mg/ml]			
	Absetzzeit 0 h		Absetzzeit 24 h	
[g/L]	ÜS1	PS1	ÜS2	PS2
0	3,20	0,64	3,01	0,10
20	3,17	0,72	2,90	0,07
100	2,29	1,00	2,20	0,07
200	0,57	2,20	0,31	0,15
600	0,37	2,29	0,12	0,46

Um die notwendige Ammoniumsulfatmenge zu reduzieren, wurde bei einer Konzentration von 100 g/L der pH-Wert variiert. Eine klare Abhängigkeit vom pH-Wert konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ammoniumsulfatfällung von DFOE aus dem Fermentationsüberstand bei verschiedenen pH-Werten. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 100 g/L. Absetzzeit 0 h

ÜS: Überstand; PS: Pelletsuspension (Präzipitat)

pH	DFOE [g/L]	
	SN	PS
2	1.91	0.78
3	2.29	1.00
4	2.03	0.78
6	2.25	0.72
7	2.18	0.74
8	2.10	0.86
9	3.35	0.99
10	2.45	0.80
11	1.97	0.83

Auf Grund der nicht klaren pH-Abhängigkeit wurde ein Versuch bei pH 4,0 mit Ammoniumsulfatkonzentrationen von 0 - 200 g/L durchgeführt. Dabei wurde die Absetzzeit noch auf 120 h ausgedehnt, um zu so eventuell die Ausbeuten zu verbessern.

Tabelle 7 zeigt, dass bei einer Zugabe von 150 - 200 g/L Ammoniumsulfat die besten Werte erzielt wurden. Es konnten bis zu ca. 90% des DFOE aus dem Überstand gefällt werden. Bei einer Absetzzeit von 120 h wurde die Ausfällung weiter verbessert, allerdings konnte wiederum die ausgefällte DFOE-Menge nicht im Präzipitat wiedergefunden werden. Der Grund hierfür könnten eine Adsorption des DFOE an die Gefäßwände sein.

Somit zeigt sich die Ammoniumsulfatkonzentration als grundsätzlich geeignet, die Kältefällung von DFE zu beschleunigen und zu verbessern.

Tabelle 7: Ammoniumsulfatfällung von DFOE aus dem Fermentationsüberstand bei pH 4,0.

ÜS: Überstand; PS: Pelletsuspension (Präzipitat)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	DFOE [g/L]				
	Absetzzeit 0 h			Absetzzeit 120 h	
[g/L]	SN1	PS1	PS1 [%]	SN2	PS2
0	5.11	2.8	35 (35)	1.77	0.30
20	4.79	2.86	36 (37)	4.20	0.20
100	2.33	4.33	55 (65)	1.39	0.58
150	1.25	5.39	68 (81)	0.50	0.34
200	0.68	5.73	72 (89)	0.30	0.20

### 3.4.6 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

#### Durchführung

Eine 10 ml-Säule wurde mit Phenylsepharose FF gepackt. Mit einer Pharmacia-Pumpe wurden mit einem Volumenstrom von 0,5 mL/min folgende Lösungen aufgetragen:

- 2 Säulenvolumen (SV) VE-Wasser
- 2 SV 0,6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7,0
- 2 ml DFE-Lösung (10 mg/mL)+ 8 ml Farbreagenz

Ab dem Auftrag der DFOE-Lösung wurden 1 ml-Fraktionen auffangen. Danach wurde die Säule eluiert mit

- Eluat 1: 10 ml VE-Wasser
- Eluat 2: 10 ml 10% Acetonitril (ACN)/90% VE-Wasser
- Eluat 3: 10 ml 30% Acetonitril (ACN)/70% VE-Wasser

In den am stärksten gefärbten Fraktionen wurde der DFOE-Gehalt mittels  $\text{OD}_{435 \text{ nm}}$  und von HPLC gemessen.

#### Ergebnisse

Abbildung 7 zeigt, dass DFOE zunächst auf der Säule gebunden, aber bereits mit VE-Wasser eluiert wird. Weiterhin ist zu sehen, dass die Messwerte aus der HPLC ziemlich gut mit den photometrisch gemessenen Werten korrespondieren.

Die eluierten DFOE-Fraktionen enthielten etwa 2,6 mg Siderophor, das sind mehr als 100% der aufgegebenen Menge. Gründe hierfür sind wahrscheinlich Fehler beim Auftrag.

Grundsätzlich die HIC jedoch zur Reinigung von Desferrioxamin geeignet.

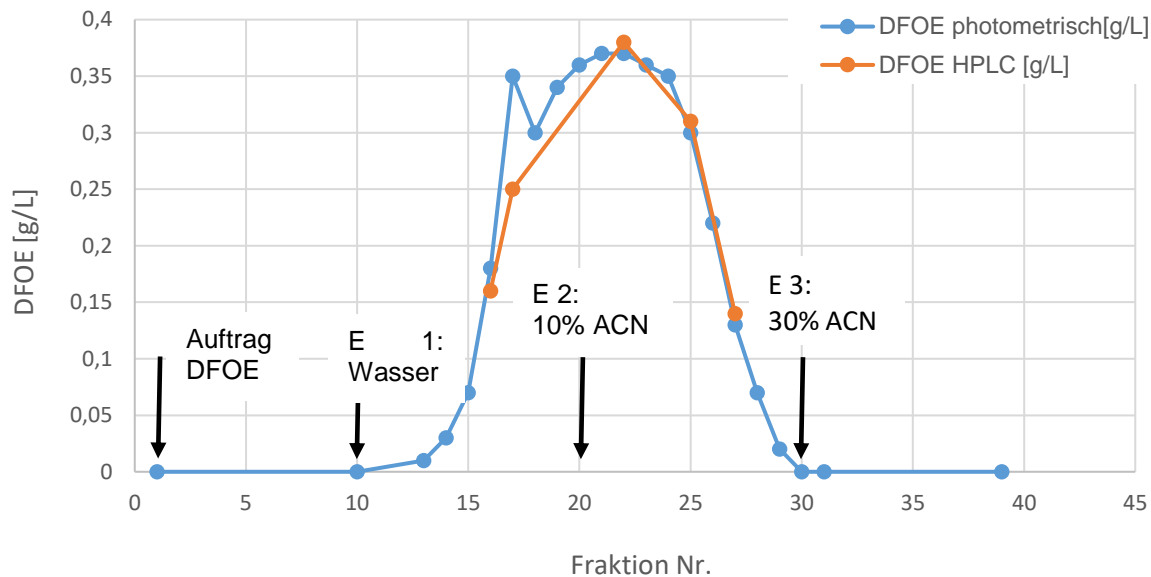


Abbildung 7: Chromatographische Reinigung von DFOE mittels HIC

### 3.4.7 Adsorption an Aktivkohle

Ziel war die möglichst selektive Ausfällung von DFOE aus dem Fermentationsüberstand.

#### Durchführung

Die Versuche wurden sowohl mit DFOE als auch mit Ferrioxamin E (FOE) durchgeführt. DFOE: 5 mL Fermentationsüberstand wurden mit steigenden Mengen Aktivkohle (AK, techn., d=1,2 mm) versetzt und die Siderophorkonzentration in den Überständen photometrisch gemessen. Ausgewählte Proben wurden mittels HPLC analysiert.

FOE: 3 mL Fermentationsüberstand wurden mit 3 mL Eisenreagenz gemischt und analog behandelt.

#### Ergebnisse

Man sieht in Tabelle 8, dass sowohl bei DFOE als FOE die Konzentration im Fermentationsüberstand mit steigender Zugabe von Aktivkohle abnimmt. Die maximal erreichten Werte sind allerdings mit ca. 15% bzw. 27 % zu gering.

Daher wurden einige Versuchsansätze mit aktivierter anstatt technischer Aktivkohle wiederholt. Hiermit wurden Reduzierungen um bis zu 31 % bzw. 78 % erzielt (Tabelle 9).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich FOE besser als DFOE an Aktivkohle adsorbieren lässt. Allerdings sind die Aktivkohlemengen sehr hoch (100 mg/mL) und die Ausbeuten selbst bei FOE nicht ausreichend.

Weiterhin fällt auf, dass die HPLC-Ergebnisse bei Messungen im Fermentationsüberstand deutlich geringer als die photometrisch gemessenen Werte sind. Offensichtlich ist die photometrische Methode für den Einsatz in Fermentationsmedien zu unspezifisch.

Tabelle 8: Adsorption von DFOE / FOE an Aktivkohle

Siderophor	Aktivkohle [mg]	DFOx bzw. FOx <sub>üs1</sub> [g/l]			
		Photom.	HPLC		
			FOE	FOB	FO <sub>x</sub>
Kontrolle DFOE	0	5,51	0,25	0	0,33
DFOE	10	5,56			
DFOE	50	5,53			
DFOE	100	5,40	0,30	0	0,26
DFOE	200	5,28			
DFOE	500	4,66	0,23	0	0,17
Kontrolle FOE	0	1,79	0,39	0	0,43
FOE	10	1,79			
FOE	20	1,81			
FOE	50	1,78	0,4	0	0,48
FOE	200	1,64			
FOE	500	1,3	0,30	0	0,51

Tabelle 9: Adsorption von DFOE / FOE an aktivierter Aktivkohle

Siderophor	Aktivkohle [mg]	DFOx bzw. FOx <sub>üs1</sub> [g/l]			
		Photom.	HPLC		
			FOE	FOB	FO <sub>x</sub>
Kontrolle DFOE	0	5,29			
DFOE	100	3,90			
DFOE	500	3,63	0,20	0	
Kontrolle FOE	0	1,85			
DFOE	100	0,38	0,01	0	0,27
DFOE	500	0,40			

### 3.4.8 Reinigung über Ni-NTA-Säule

#### Durchführung

Eine 10 ml-Säule wurde mit Ni-NTA gepackt. Mit einer Pharmacia-Pumpe wurden mit einem Volumenstrom von 0,6 - 0,8 mL/min folgende Lösungen aufgetragen:

- 2 Säulenvolumen (SV) VE-Wasser
- 2 SV Bindungspuffer
- 10 ml DFOE-Lösung (4,6 mg/mL)

Ab dem Auftrag der DFOE-Lösung wurden 1 ml-Fractionen auffangen. Danach wurde die Säule eluiert mit

- Eluat 1: 20 ml Bindungspuffer + 0,5 M NaCl
- Eluat 2: 20 ml Bindungspuffer + 0,5 M NaCl + 0,1 M Imidazol
- Eluat 3: 20 ml Bindungspuffer + 0,5 M NaCl + 0,5 M Imidazol

In den am stärksten gefärbten Fraktionen wurde der DFOE-Gehalt mittels  $OD_{435\text{ nm}}$  und von HPLC gemessen.

### Ergebnisse

Das Elutionsdiagramm (Abbildung 8) zeigt, dass schon während des Auftrags ein Teil des Siderophors nicht gebunden wird. Schon nach Zugabe von Eluat 1 (20 ml Bindungspuffer + 0,5 M NaCl) kommt es zum Ablösen der Siderophormoleküle. Ein kleinerer Peak entsteht noch bei Fraktion Nr. 33. Die HPLC-Messungen zeigen jedoch, dass es sich hierbei nicht um ein Siderophor handelt.

Somit ist die Ni-NTA-Säule nicht zur Reinigung von DFOE geeignet.

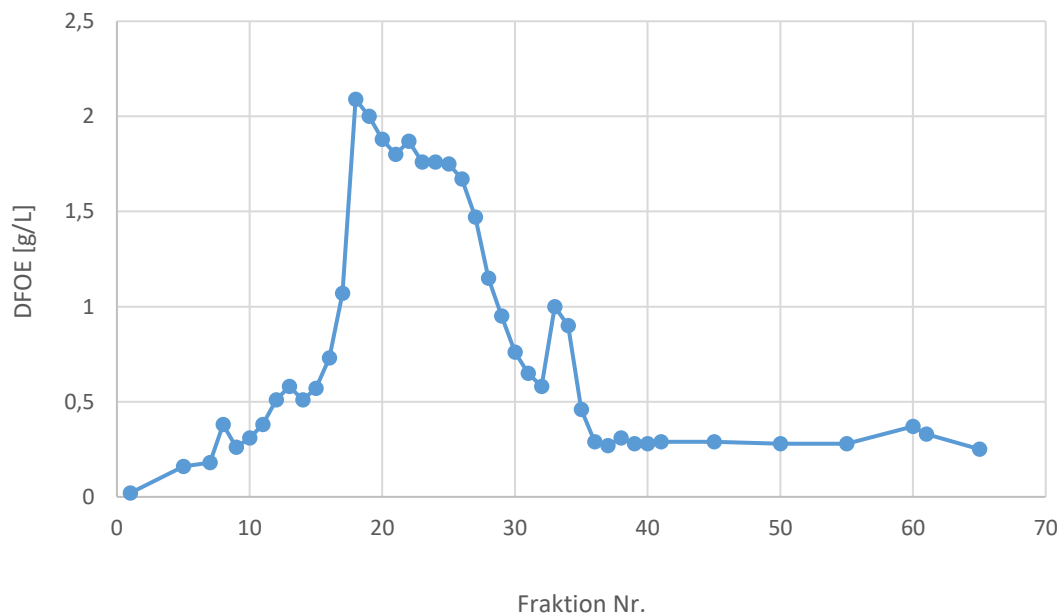


Abbildung 8: Elutionsdiagramm zur Reinigung von DFOE mittels Ni-NTA-Säule

### 3.4.9 Reinigung über Fe-NTA-Säule

#### Durchführung

Die Ni-NTA wurde mit Eisenionen dotiert. Ansonsten war die Vorgehensweise analog 3.4.8.

## Ergebnisse

Die gesamte Siderophormenge wurde schon während des Auftrags auf die Säule eluiert. Somit erfolgte keine Bindung des Siderophors an die Eisenionen der Säule.

### 3.4.10 Fällung mit Fe<sup>3+</sup> und Al<sup>3+</sup>

#### Durchführung

Es wurden neben der Kontrolle (Fermentationsüberstand) folgende Lösungen zur Fällung von DFOE eingesetzt:

- Fe(III)Cl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O: 20 mM (Mw= 270 g) = 5,40 g/L
- Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> x 16 H<sub>2</sub>O: 2 mM (Mw= 630 g) = 1,26 g/L
- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- Amberlit XAD 16

Der siderophorhaltige Überstand wurde auf pH 5,0 eingestellt. Dann wurden zu je 5 mL DFOE-Lösung verschiedene Mengen der Fällungsmittel gemäß Tabelle 10 zugegeben. Der DFOE-Gehalt im Überstand wurde photometrisch und mit HPLC gemessen.

#### Ergebnisse

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse aufgetragen: Nur mit Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> x 16 H<sub>2</sub>O und Amberlit XAD 16 gelang die Fällung einer geringen Menge Siderophor (max. 10 %) aus dem Überstand.

Tabelle 10: Fällung von DFO aus dem Fermentationsüberstand aus F -0024

Bezeichnung	Menge [mg bzw. µl]	DFx bzw. Fx <sub>ÜS1</sub> [g/l]			
		photom. Farbtest 435 nm	HPLC		
			E	B	X
DFE-Lösung	Kontrolle	3,18	0,37	-	0,14
Fe(III)Cl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 20 mM	50 µl	3,22			
	100 µl	3,23			
	500 µl	3,32	0,37	-	0,12
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> x 16 H <sub>2</sub> O, 2 mM	50 µl	3,27			
	100 µl	3,22			
	500 µl	2,93	0,34	-	0,12
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5 mg	3,27			
	10 mg	3,30			
	50 mg	3,33	0,31	-	0,13
Amberlit XAD 16	5 mg	3,33			
	10 mg	3,27			
	50 mg	3,09	0,32	-	0,12

Zusammenfassend muss festgestellt werden dass nur die HIC zur Reinigung der Siderophore geeignet scheint.

### 3.5 Scale-up der Aufarbeitung (Downstream processing, DSP)

Die Aufbereitungsverfahren konnte erfolgreich in den halbtechnischen Maßstab übertragen werden.

#### Durchführung

Das DSP umfasste folgende Prozessschritte:

1. Aufheizen des gesamten Fermenters auf 80°C
2. Abtrennung der Biomasse mittels Separator
3. Kühlung des Fermentationsüberstandes
4. Abtrennung des DFOE-haltigen Präzipitats mittels Separator
5. Trocknung des Präzipitats bei 40°C

#### Ergebnisse

Aus 210 L Fermentationsüberstand konnten insgesamt ca. 500 g DFOE gewonnen werden. Dies sind etwa 53 % Gesamtausbeute (Tabelle 11). Wenn man die Ausbeute im Überstand nach der Kühlung dazu addiert, kommt man auf eine Wiederfindungsrate von ca. 68%.

Tabelle 11: Auffarbeitung von DFOE im halbtechnischen Maßstab

Prozessschritt	V [L]	DFOE		
		[g/l]	[g]	[%]
Fermentationsüberstand	210	4,52	949	100
80°C hochgeheizt	210	4,52	949	100
Kühlung 2°C, Überstand	205	0,7	144	15,2
Trocknung 40°C, Präzipitat	611,8 g	0,82 g/g	501	52,8

### 3.6 Entwicklung und Optimierung des Fermentationsverfahrens für neu-selektierte Siderophore.

#### Optimierung der Fimsbactin F-Production aus *Acinetobacter baylyi* ADP1

Bindungsversuche des Projektpartners HZDR, Christian Hintersatz, mit dem Siderophor Fimsbactin F (s. Abbildung 9), zeigten eine relativ hohe Affinität zu Indium.

Für die Herstellung wurde *Acinetobacter baylyi* ADP1 und das Medium ASBM verwendet. Medienoptimierungen wurden vom HZDR bisher nicht durchgeführt.

Die bisherige Ausbeuten lagen bei nur ca. 40ml 200µM Lösung (= ca. 5 mg) aus 6 L Kulturbrühe.

Daher war das Ziel dieser Arbeiten die Erhöhung der Fimsbactin F-Bildung durch A. baylyi ADP1.

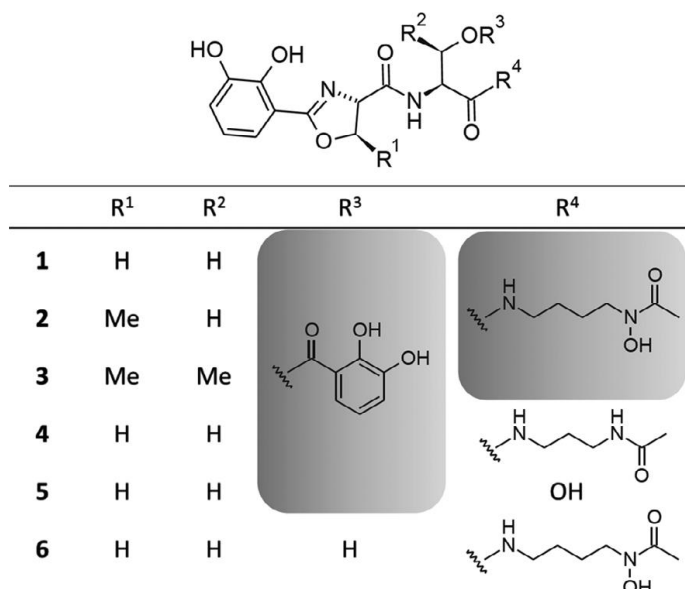


Abbildung 9: Structures of fimsbactin A–F (1–6). Mw = 574,5

### Durchführung

Es wurde versucht, die Ausbeute an Fimsbactin F durch die Zufütterung verschiedener Precursor zu erhöhen.

### Medien

#### Vorkultur

1% Pepton

0.5% Hefeextrakt

pH 7

#### Acinetobacter Minimal Succinate Media (ABMS) (pro L):

880 mL autoclaved diH<sub>2</sub>O; RT

20 mL 1M Sodium Succinate (steril, RT)

50 mL 20x Mineral Solution (steril, RT)

50 mL 20x Phosphate Buffer (steril, RT)

#### AMBS Agarplatten:

16g/L Agar

#### Mineral Solution (20x)

NH<sub>4</sub>Cl 10g

MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 5.9g

KNO<sub>3</sub> 1g

(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>•4H<sub>2</sub>O 20mg

CaCl<sub>2</sub> Solution            931.5µl  
10ml of SL9

Brought up volume to 500ml in graduated cylinder with deionized water.

### Phosphate Buffer (20x)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                    68g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O            132.5g  
400ml deionized water, pH to 6.8  
Volume brought up to 500ml

### SL9 (trace minerals)

800ml dH<sub>2</sub>O  
Nitrotriacetic acid        12.8g  
FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O            2g (note – dissolve first in 2N HCl)  
CoCl<sub>2</sub> (anhydrous)      104mg  
MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O            122mg  
ZnCl<sub>2</sub>                        70mg  
NaMoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O          36mg  
NiCl<sub>2</sub>                        13mg

And 1ml of 10ml 10X solution

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>                      60mg  
CuCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O            20mg

### Kultivierung

- 2 x 50 mL Vorkultur in 250 mL Schüttelkolben mit Schikanen. von Agarplatte animpfen
- 24 h bei 30°C, 120 upm (oder bis Wachstum sichtbar)
- je 8 x 2 ml VE-Wasser mit je 50 mg Brenzkatechin (Mw=110 g), L-Ornithin (Mw=132 g), L-Threonin (Mw=119 g), D,L-Serin (Mw=105 g) herstellen und autoklavieren
- 12 x 100 mL ABMS-Medium ansetzen und autoklavieren
- Ansatz Nr. 2: Zugabe von 5 g/L Glucose
- Ansätze Nr. 3 -6: Zugabe von je 50 mg (bzw. 2 mL) nach 24, 48, 72 und 96 h
- Probenahme: je 5 ml nach 0, 24, 48, 72, 96 h, 120 h

### Analytik

DFOE (FeCl<sub>3</sub>)-Test (photometrisch)  
HPLC mit ausgewählten Proben (DFOE Test)

### HPLC-Methode

Säule:                        Zorbax Eclipse Plus C18, 4,6 x 250 mm, 5 Micron (Agilent)  
Flußrate:                    1 ml/min  
Temperatur:                25°C  
UV-Detektor:              210 nm oder 260 nm  
Probenvolumen:          80 µl

Zeit	100 % Acetonitril	1 mM HCl, pH 3
0	5	95
15	20	80
19	90	10
23	90	10
27	5	95
35	5	95

Die Proben wurden 1:2 mit 25% Acetonitril versetzt, 30 s mittels Vortex vermischt, 3 min zentrifugiert und filtriert.

## Ergebnisse

### Photometrischer Test

Die Ergebnisse des photometrischen Siderophor-Tests zeigten keine signifikante Zunahme der Werte in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (Tabelle 12). Die höchsten Werte lagen bei 200 mg/L, was eine deutliche Erhöhung im Vergleich zu den Ergebnissen des Projektpartners HZDR (ca. 1 mg/L) bedeuten würde. Allerdings ist der photometrische Test bei Messungen in Kulturbrühen nur begrenzt aussagefähig.

Daher wurden HPLC-Untersuchungen mit Proben nach 0 und 432 h sowie ausgewählten Proben (gelb markiert in Tabelle 12) durchgeführt.

Tabelle 12: Optimierung der Fimsbactin F-Bildung durch *Acinetobacter baylyi* ADP1. Ergebnisse der Messungen in den Kulturüberständen mit dem photometrischen Test mit FeCl<sub>3</sub>

Nr.	Zusatz	Fimsbactin F [g/L] nach h									
		0	24	45	93	120	144	191	262	334	432
1	Kontrolle (nur ABMS)	0,14	0,16	0,17	0,10	0,20	0,17	0,13	0,15	0,15	0,15
2	+ Glucose, 5 g/L	0,14	0,16	0,13	0,13	0,13	0,18	0,10	0,15	0,20	0,14
3	+ 4 x 50 mg Brenzkatechin	0,11	0,15	0,14	0,19	0,19	0,14	0,09	0,15	0,15	0,16
4	+ 4 x 50 mg L-Threonin	0,10	0,15	0,15	0,13	0,14	0,10	0,18	0,10	0,12	0,10
5	+ 4 x 50 mg DL-Serin	0,12	0,11	0,16	0,08	0,11	0,13	0,14	0,08	0,15	0,15
6	+ 4 x 50 mg L-Ornithin	0,12	0,12	0,16	0,17	0,17	0,17	0,13	0,12	0,17	0,13

### HPLC-Analysen

Die Methode zur quantitativen Bestimmung mit der DFOE-Methode in den Kulturüberständen ergab keine signifikanten Peaks, die auf ein Siderophor hindeuten könnten.

Daher wurde die Proben mit der oben beschriebenen HPLC-Methode analysiert. Die Detektion erfolgte bei 260 nm.

Dabei zeigte nur die Probe von Ansatz Nr. 4 nach einer Wachstumszeit von 432 h einen deutlichen Peak bei einer Retentionszeit von ca. 11,7 min (Abbildung 10+11). Dieser Peak war zu Beginn der Kultivierung nicht vorhanden (Abbildung 12).

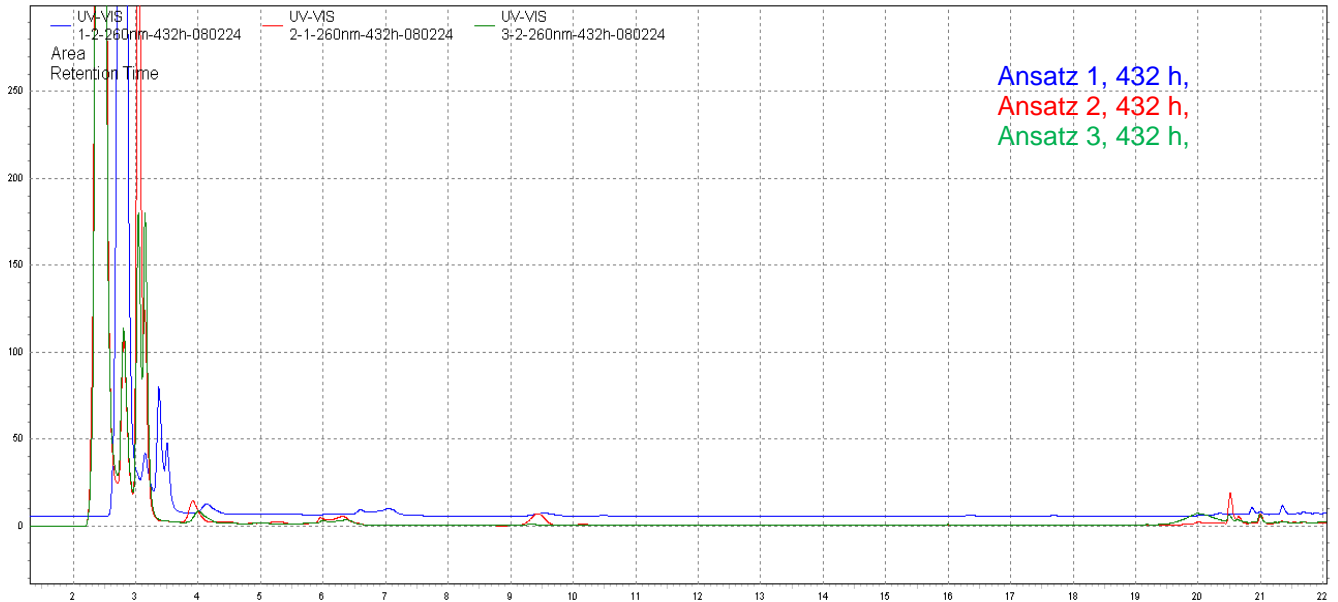


Abbildung 10: HPLC-Diagramm der Kulturüberstände der Ansätze Nr. 1 - 3 nach 432 h Kultivierungsdauer. Detektion bei 260 nm

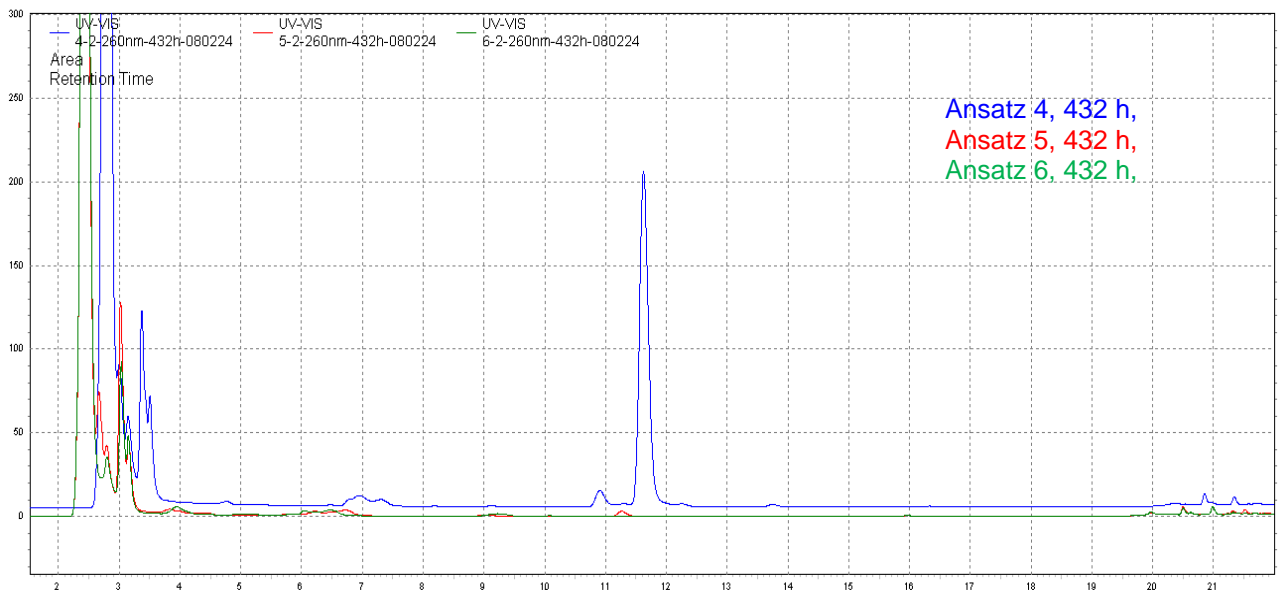


Abbildung 11: HPLC-Diagramm der Kulturüberstände der Ansätze Nr. 4 - 6 nach 432 h Kultivierungsdauer. Detektion bei 260 nm

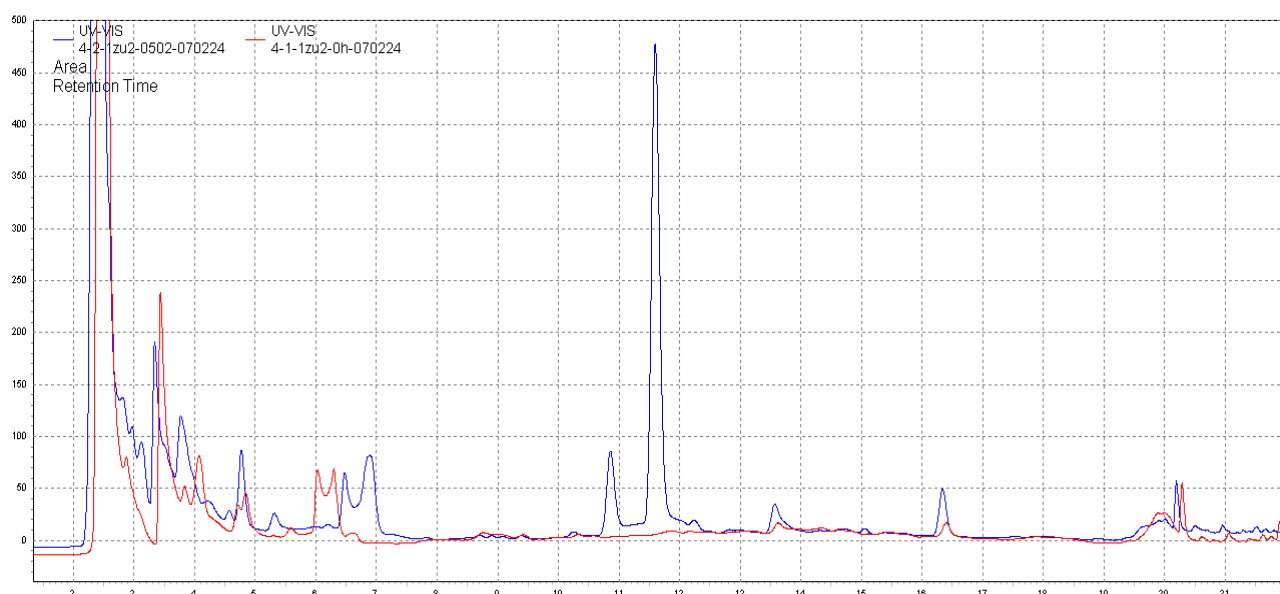


Abbildung 12: HPLC-Diagramm der Kulturüberstände von Ansatz Nr. 4 nach 0 und 432 h Kultivierungsdauer. Detektion bei 210 nm

Um zu untersuchen, ob es sich bei diesem Peak um das Siderophor Fimsbactin handelt, wurde die Peaks von Ansatz Nr. 4 während eines HPLC-Laufs aufgefangen und mit  $\text{FeCl}_3$ -Reagenz versetzt. Bei keiner der aufgefangenen Fraktionen trat eine Gelbfärbung ein. Somit handelt es sich bei keinem der Peaks um ein Siderophor.

### Weitere Untersuchungen

Um zu überprüfen, warum in den Kulturüberständen aller Ansätze keine Gelbfärbung bei Durchführung des photometrischen Test mit  $\text{FeCl}_3$  erfolgte, wurden die Kulturbrühen mit Biomasse mit der  $\text{FeCl}_3$ -Methode untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Gelbfärbung bei allen Ansätzen. Nach Zentrifugation der Ansätze zeigte sich, dass diese Gelbfärbung nur auf die Biomasse beschränkt war (Abbildung 13, 14).

Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Stamm *Acinetobacter baylyi* ADP1 die gebildeten Siderophore nicht in das Medium sekretiert, sondern dass diese an die Zellwände gebunden werden.

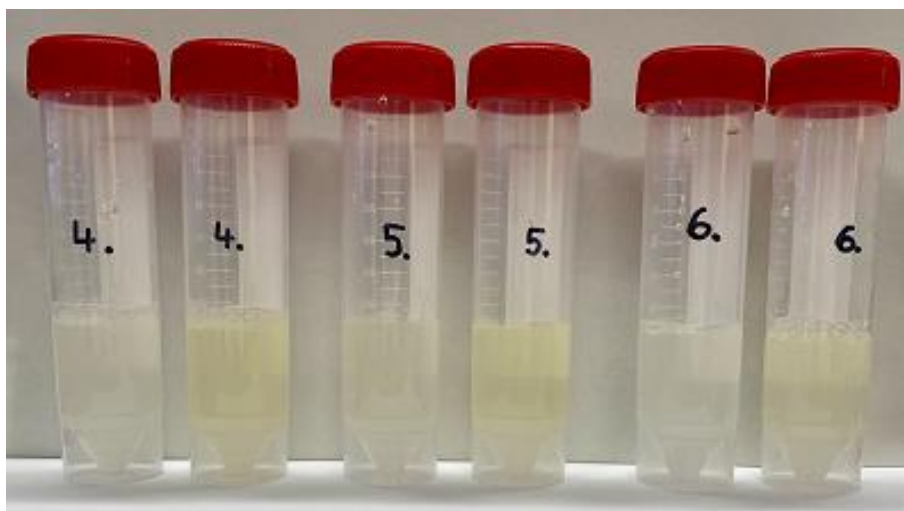


Abbildung 13: Reaktion der Kulturbrühen der Ansätze Nr. 4 - 6 mit der  $\text{FeCl}_3$ -Reagenz



Abbildung 14: Gelbfärbung der Biomassen der Ansätze Nr. 4 - 6 nach Zentrifugation der Kulturbrühen aus Abbildung 13

## 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Gesamtkosten betragen 145.228,65 €. Dabei waren die Personalkosten mit 131.531,70 € der größte Posten.

Der Eigenanteil an den Projektkosten betrug 42,5 %.

## 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der Projektarbeiten

Die Arbeiten wurden entsprechend der Planungen durchgeführt, wie in den Arbeitspaketen beschrieben. Der Projektlauf und die dabei zahlreichen notwendigen detaillierten

Untersuchungen belegen die Notwendigkeit der ursprünglich geplanten Arbeitsaufwendungen. Insbesondere sind hier zu nennen die Arbeiten zur

- Etablierung der Analytik zum HPLC-Nachweis von DFOE und B
- Entwicklung des Aufarbeitsverfahren zur Isolierung von DFOE
- Reduzierung der Ausbeuteverluste.

#### **4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Die im Rahmen des Projektes entwickelten Produktionsverfahren ermöglichen ASA die Aufnahme der Produktion der Siderophore DFOE und B.

Parallel wurde vom HZDR (Rohan Jain) ein Verfahren zur Immobilisierung und Wiederverwendung der beiden Siderophore entwickelt ("GaLlophore" technology). Damit soll Gallium aus industriellen Abwässern isoliert werden. Auf Grund der hohen Zahl an Wiederverwendungszyklen würde der Einsatz dieser Siderophore erstmalig wirtschaftlich. Zwei Jahren nach Projektende wird der nächste Schritt zur Verwertung, die Anwendung dieser Technologie zur Wiedergewinnung von Germanium aus geringkonzentriertem Abwasser, erfolgen. Die Tests werden bei einer der Firmen PPM Pure Metals, iXBlue oder Umicore in einem Maßstab von 2000 – 5000 L pro Tag durchgeführt.

Nach erfolgreichem Abschluss dieser Pilotphase kann die Technologie zur Wiederverwendung in Lizenz vergeben werden.

Die Gesamtmenge an Germanium, die mit Hilfe dieses Verfahrens aus den Abwässern von Umicore, PPM Pure Metals und iXBLUE gewonnen werden kann, liegt bei etwa 1 kg pro Tag.. Bei einem Preis von 1.500 US \$ pro kg Ge würde dies einen Umsatz von 547,500 US \$ pro Jahr bedeuten. Installation und Betrieb der Anlage im Produktionsmaßstab soll 3 Jahre nach Projektende beginnen.

Ein weiterer Schritt des Verwertungsplans (2 Jahre nach Projektende) ist die Lizenzierung der GaLlophore-Technologie an andere Germanium-Produzenten und -Anwendern in der EU, Canada, USA und China. Beispiele für derartige Unternehmen sind u.a. Indium Corporation, AXT Inc, HEFA rare Earth und Yunnan Germanium.

Darüber hinaus können die Siderophore über Laborkatalogfirmen wie z.B. Merck sowie im Bereich Forschung&Entwicklung weltweit vertrieben werden.

#### **5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Siehe Bericht des Koordinators HZDR.

## 6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Siehe auch Bericht des Koordinators HZDR.

### Konferenzbeiträge:

**Hintersatz, C.;** Kutschke, S; Pollmann, K.; Jain, R.; Tsushima S. (2021). Siderophores as agents for the bio-based recovery of indium and gallium from low-concentrated waste waters. *Goldschmidt 2021*

**Hintersatz, C.;** **Tsushima, S.;** **Jain, R.;** **Pollmann, K.** (2022) Modelling based approach for the identification of germanium- and indium - binding siderophores. BioCulnGe Workshop on Waste to Wealth, 25.-26.11.2022, Delhi, Indien (Vortrag, Online)

**Hintersatz, C.;** Kutschke, S; Pollmann, K.; Jain, R.; Tsushima S. (2022). Selection and production of siderophores suitable germanium-, indium and gallium - recovery. ACS Spring 2022 (20.-24.3.2022) (Vortrag, online)

**Hintersatz, C.;** Kutschke, S; Pollmann, K.; Jain, R.; Tsushima S. (2022) Evaluation of siderophores as agents for the bio-based recovery of indium and germanium. Emerging Applications of Microbes 2022, 7.-8.12.2022, KU Leuven, Leuven, Belgien) (Poster, Präsenz)

Geplant und eingereicht für 2023:

**Hintersatz, C.;** **Kutschke, S;** **Pollmann, K.;** **Jain, R.;** **Tsushima S.** (2023) Evaluation of siderophores as compounds for the selective recovery of Indium and Germanium by means of density functional theory. Goldschmidt 2023, 9.-14.06.2023, Lyon, Frankreich

**Hintersatz, C.;** **Kutschke, S;** **Pollmann, K.;** **Jain, R.;** **Tsushima S.** (2023) Assessment of siderophores as agents for the bio-based recovery of Indium and Germanium. International Congress on Metal-microbe applications for circular economy 2023, 19.-21.4.2023, Porto, Portugal (Vortrag)

**Pollmann, Katrin;** **Opara, Chiamaka Belsonia;** **Hintersatz, Christian;** **Chakankar, Mital;** **Kutschke, Sabine** (2023) Microbial transformation of minerals in nature and its use for technical applications, ACS Spring 2023, 26.-30.03.2023 (Vortrag, online)

### Publikationen:

Eingereicht:

Hintersatz, C.; Rojas, L. A.; Wei, S. T.; Sushko, V.; Kutschke, S.; Lehmann, F.; Jain, R.; Pollmann, K. (2022). *Idiomarina aminovorans* sp. nov. isolated from natural saltpans in Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

Hintersatz, C.; Rojas, L. A.; Wei, S. T.; Kutschke, S.; Lehmann, F.; Jain, R.; Pollmann, K. (2022). *Marinobacter atacamae* sp. nov. isolated from Laguna Lejía located in northern Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

Hintersatz, C.; Rojas, L. A.; Wei, S. T.; Kutschke, S.; Lehmann, F.; Jain, R.; Pollmann, K. (2022). *Halomonas geminus* sp. nov. and *Halomonas llamarensis* sp. nov. isolated from high-altitude salars of the Atacama Desert. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

In Vorbereitung (Einreichung 2023):

Hintersatz C., Singh S., Rojas L.A., Kretzschmar J., Wei S. T., Khambati K., Kutschke S., Lehmann F., Singh V., Jain R., Pollmann K. (2023). *Halomonas gemina* sp. nov. and *Halomonas llamarensis* sp. nov.,

two siderophore-producing organisms isolated from high-altitude salars of the Atacama Desert. *Frontiers in Microbiology*

Hintersatz C., Kaufer T., Laube M., Tsushima S., Jain R., Pollmann K. (2023) Density functional theory as tool for the selection of indium- and germanium-binding siderophores. *Nature Communications* (geplant)

Wolfenbüttel, 29.12.2023  
ASA Spezialenzyme GmbH  
Dr. Arno Cordes/Projektleiter