



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Schlussbericht

30.03.2011
GVF/D – A030
BASF SE
Dr. von Abendroth
Tel. 0621- 60 49192

ZE: BASF SE

Förderkennzeichen: 0315239A

Rahmenprogramm: Bioindustrie2021: Biopolymere/Biowerkstoffe
Verbundprojekt: „Biobasierte Polyamide durch Fermentation“

Laufzeit des Vorhabens: 01.03.2008 – 30.09.2010

Kurzfassung

Im Rahmen des Vorhabens „Biobasierte Polyamide durch Fermentation“ gelang den beteiligten Partnern BASF, Bosch, Daimler, Unternehmensgruppe fischer und TU Braunschweig die Herstellung und Untersuchung hochwertiger, innovativer Biopolyamide. Der Fokus der Forschungsarbeit lag dabei auf der effektiven, fermentativen Herstellung des Monomers Diaminopentan und der anschließenden Polymerisation zum Biopolyamid PA5.10. Das Biopolyamid PA5.10 konnte schließlich erfolgreich in zahlreichen Demonstratorbauteilen untersucht werden und zeigte im Vergleich zu PA6.10 und gängigen Serienmaterialien vielversprechende Eigenschaften. Aufgrund der zum aktuellen Zeitpunkt nicht absehbaren wirtschaftlichen Produktion von Diaminopentan für PA5.10 musste das technisch sehr erfolgreiche Projekt vorzeitig beendet werden.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Inhaltsverzeichnis Kapitel II

I. Kurze Darstellung	S. 3-14
1. Aufgabenstellung	3
2. Ausgangsbedingungen	4
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	5
4. Stand Wissenschaft und Technik	9
5. Literatur	10
6. Zusammenarbeit	11
II. Eingehende Darstellung	S. 15-60
7. Erzielte Ergebnisse und Verwendung der Zuwendung	15
8. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	56
9. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	56
10. Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses	56
11. Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen	57
12. Veröffentlichung des Ergebnisses	57
III. Erfolgskontrollbericht	S. 61
IV. Kurzfassung (Berichtsblatt)	separates Dokument

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Es sollten über die biotechnologische Produktion von Diaminopentan (DAP), marktfähige, komplett biobasierte Polyamide produziert werden, die auf den höher veredelten Markt der technischen Polymere abzielen. Als Vergleichs- und Ersatzmaterial wurde das teilweise biobasierte Material PA6.10 herangezogen, welches dem PA5.10 sehr ähnliche Eigenschaften aufweist. Durch die Beteiligung der Partner TU Braunschweig (ibvt), BASF, Bosch, Daimler und fischer sollte die gesamte Wertschöpfungskette vom Rohstoff bis zu neuartigen, marktreifen Produkten in den Beispielanwendungen Automobil und Bau abgebildet und untersucht werden (Abbildung 1.1).

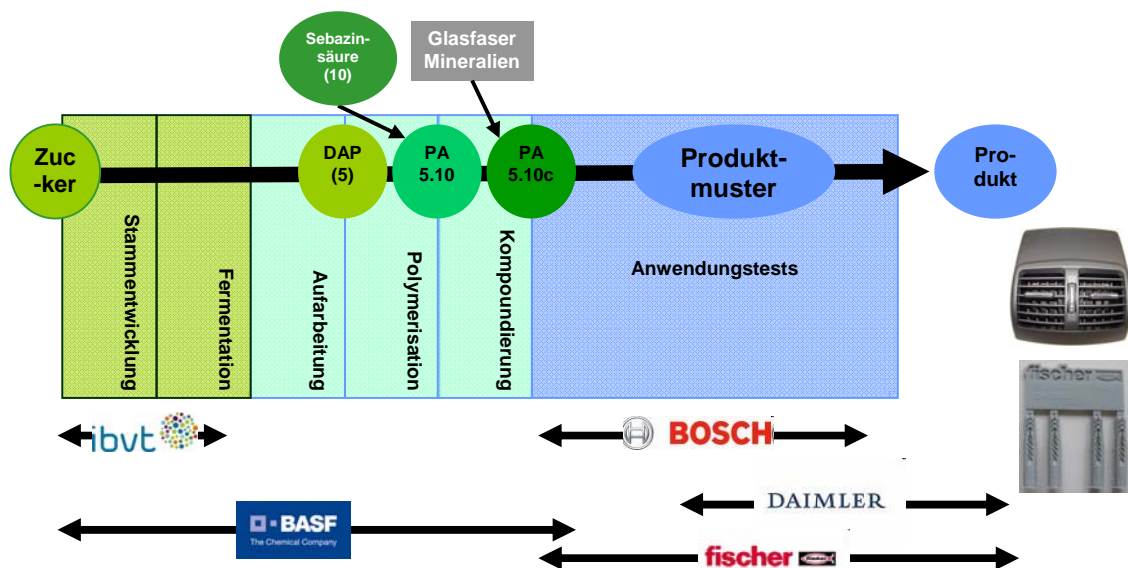


Abbildung 1.1: Graphik der geplanten Wertschöpfungskette mit den beteiligten Partnern

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

2. Ausgangsbedingungen

Die Verknappung von petrochemischen Rohstoffen und der durch die vermehrte Freisetzung von fossilem CO₂ verursachte Klimawandel sind treibende Kräfte der verstärkten Diskussion um die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen u.a. zur Herstellung von biobasierten Industrieprodukten. Polymere stellen einen wesentlichen Anteil der jährlich aus petrochemischen Rohstoffen hergestellten Industrieprodukte dar.

Biotechnologische Innovationen bieten die Möglichkeit, aus nachwachsenden Rohstoffen Monomere zu gewinnen, die sich für die Herstellung von biobasierten Polymeren eignen (Braunegg et al., 1998). Bereits bekannte Beispiele sind Polyhydroxyalkanoate (PHA, Biopol-Monsanto/Metabolix) und Polymilchsäure (PLA, Natureworks/Cargill). Diese biologisch abbaubaren Polymere ähneln in ihrem Anwendungsprofil jedoch den *low cost* Standard-Polymeren Polyethylen (PE) und Polypropylen (PP) und eignen sich deshalb nicht für Anwendungen im Bereich von Materialien mit erhöhten Leistungsanforderungen wie Temperaturbeständigkeit und Stabilität, wie sie zum Beispiel im Automobilbau und für hochwertige Consumer-Products (z. B. Baubereich, Werkzeuge, Spielzeug) benötigt werden.

Aus diesem Grund herrscht im Marktsegment der technischen Polymere mit erhöhtem Anforderungsprofil eine noch nicht befriedigte Nachfrage nach einem rein biobasierten Material dieser Qualität. In einem ersten Beispiel wurde in einem bereits existierenden Polymer aus 1,3 Propandiol und Terephtalsäure der Propandiol-Anteil durch ein biobasiertes Material ersetzt (Sorona, DuPont). Bei diesem Material ist der biobasierte Anteil des Polymers jedoch nur ca. 30%.

Polyamide (PA), als Polymere mit guten bis sehr guten Materialeigenschaften sind bislang biotechnologisch nicht zugänglich, bieten aber aufgrund der hohen industriellen Bedeutung von PA (PCI Nylon Studie, 2005) ein enormes Potential. Die neuen modernen Methoden des Metabolic Engineering und der Systembiotechnologie eröffnen heute völlig neue Möglichkeiten für die fermentative Herstellung von biobasierten Polyamiden bzw. ihrer Bausteine aus nachwachsenden Rohstoffen. Historisch betrachtet konnten sich biotechnologische Verfahren auf Basis nachwachsender Rohstoffe allerdings bisher nur durchsetzen, wenn sie auf Kostenbasis gleichwertig gegenüber petrochemischer Produktion waren (Beispiel: Vitamin B₂-Herstellung der BASF). Deshalb ist auch bei der Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens für die Herstellung von Polyamiden eine ökonomische Betrachtung eine entscheidende Grundbedingung. Hinzu kommt die Erwartung der Kunden, dass biobasierte Produkte eine positive Ökobilanz im Vergleich zu vergleichbaren, herkömmlichen Produkten vorweisen können.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Planung des Vorhabens

Unter der Koordination der BASF arbeiteten ein Universitäts- und drei Industriepartner in diesem Vorhaben gemeinschaftlich an der o.g. Aufgabenstellung und übernahmen dabei die folgenden Aufgaben:

1. BASF SE (Projektkoordination)

Bei BASF sollten aufbauend auf der bereits vorliegenden Methode zur biotechnologischen Produktion von Diaminopentan (WO2007/113127) ein vollständiger Produktionsprozess entwickelt und gemeinsam mit dem ibvt optimiert werden. Eine Produktion des Monomers DAP im Pilotmaßstab sollte die sich anschließende Herstellung biobasierter Polyamide (PA5.10, PA6.10) im ausreichenden Maßstab für weitere Untersuchungen der Polymereigenschaften und Anwendungstests bei den Industriepartnern ermöglichen. Eine Wirtschaftlichkeitsuntersuchung und Betrachtung der Ökoeffizienz für das Material PA5.10 sollten ebenfalls vorgenommen werden.

2. Professor Christoph Wittmann, ibvt / TU Braunschweig

Prof. Wittmann übernahm mit seiner Arbeitsgruppe die Arbeiten im Bereich der systembiotechnologischen Optimierung der biotechnologischen Herstellung von Diaminopentan ganz zu Beginn der zu untersuchenden Wertschöpfungskette. Seine Arbeitsgruppe zog kurz nach Beginn der Arbeiten von der Universität Münster in das Institut für Bioverfahrenstechnik (ibvt) an die TU Braunschweig.

3. Industriepartner

Die folgenden drei Industriepartner übernahmen die Herstellung und Testung von Mustermaterialien auf Basis biobasierter Polyamide sowie deren Überführung in Musteranwendungsteile.

3.1 Robert Bosch GmbH

Da bei der Entwicklung neuer biotechnologisch hergestellter Polymere aus Sicht von Bosch die Verfügbarkeit und mögliche Auswirkungen auf Verarbeitungstechnologien und Bauteileigenschaften von großer Bedeutung sind, wurde eine frühe Kenntnis solcher Materialien als potenzielle neue Werkstoffe für Elektrowerkzeuge, Thermotechnik oder im Automobilsektor auch in diesem Vorhaben als notwendig angesehen. Die Aufgaben von Bosch sollten deshalb die Charakterisierung & Bewertung der in dem Projekt

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

hergestellten Polyamide, die Festlegung eines Demonstratorbauteils (Lüftergehäuse) in Absprache mit dem Projektpartner Daimler (evtl. Serienbauteil), die Erprobung der neu entwickelten Materialien anhand der Demonstratorbauteile (Kurz- und Langzeit-Bauteiltests), die Herstellung von Demonstratorteilen sowie ggf. die Zulassung des neu entwickelten Materials innerhalb der Robert Bosch GmbH umfassen.

3.2 Daimler AG

Die Daimler AG hatte geplant, serienfähige Musterbauteile für den Automobilbereich aus im Projekt erzeugten Polyamidmaterial (PA6.10 und PA5.10) zu untersuchen (z.B. Lüftergehäuse A Klasse, Luftfilter A-Klasse, Dämpferfilter aus Polyamid-GF, Zylinderkopfdeckel, Ansaugkrümmer) und folgende Arbeiten durchzuführen: Begleitung von Bauteiluntersuchungen bei Lieferanten, Bauteile nach der DBL prüfen und bewerten, Funktionsprüfungen durchführen, Einsatz innovativer Herstellverfahren prüfen, Transfer der Ergebnisse in die Entwicklung.

3.3 Unternehmensgruppe fischer

Polyamide stellen den wichtigsten Rohstoff für die Herstellung der Befestigungsprodukte bei den Unternehmensgruppe fischer dar. Polyamide aus dem Clusterprojekt sollen verwendet werden, um bewährte Dübel mit hohen Materialanforderungen (UX8-, S8-Dübel) aus dem bestehenden Polyamid 5.10 und PA6.10 herzustellen und zu untersuchen. Darüber hinaus sollten in Abstimmung mit Daimler und Bosch ebenfalls Bauteile für den Automobilbereich untersucht werden.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Es wurden die folgenden expliziten Arbeitspakete (AP), die im *Antrag auf Gewährung einer Bundeszuwendung an Unternehmen der gewerblichen Wirtschaft* (AZK) genauer erläutert sind, angelegt und unter den Projektpartnern aufgeteilt:

AP1: Etablierung systembiotechnologischer Methoden (ibvt)

AP2: Systembiotechnologie und *Metabolic Engineering* DAP-produzierender Stämme: Target-Identifizierung & gentechnische Stammentwicklung (BASF-Biologie & ibvt)

AP3: Entwicklung eines Produktionsprozesses zur fermentativen Herstellung von DAP (BASF)

AP4: Verwendung alternativer Substrate (ibvt, BASF-Biologie)

AP5: Entwicklung von Methoden zur Aufarbeitung von DAP aus Fermentationsbrühen (BASF)

AP6: Kampagnenweise Herstellung von DAP im Technikumsmaßstab (BASF)

AP7: Polymerisierung von Polyamiden und Bemusterung von Partnern (BASF)

AP8: Herstellung von Musterteilen (Robert Bosch GmbH, Unternehmensgruppe fischer, Daimler AG)

AP9: Testung von Mustermaterialien und Produktion von Demonstrationsteilen (Robert Bosch GmbH, Unternehmensgruppe fischer, Daimler AG)

AP10: Clusternetworking & Projektevaluation (alle Partner)

Ein Meilensteinplan zur Erreichung von Zwischenzielen in den genannten Arbeitspaketen wurde ebenfalls aufgestellt (Abbildung 3.1).

Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde entsprechend der gesetzten Arbeitspakete und Meilensteine bearbeitet und führte termingerecht zu technisch vielversprechenden Ergebnissen für das biotechnologische Verfahren zu Herstellung von DAP, die kampagnenweise Herstellung von DAP und PA5.10 sowie für die Eigenschaften des biobasierten Polyamids PA5.10 in diversen Musteranwendungen.

Im Rahmen des Arbeitspaketes 10 wurde von BASF nach Erhalt der entsprechenden Verfahrensergebnisse auch die Wirtschaftlichkeit der PA5.10 Herstellung und die Ökoeffizienz von PA5.10 in einer bestimmten Anwendung evaluiert. Die Ergebnisse legen nahe, dass im Vergleich zu Standardmaterialien (PA6, PA6.6) und zum ebenfalls biobasierten Polyamid PA6.10 weder die Wirtschaftlichkeit noch die Ökoeffizienz vorteilhaft sein würden. Aus diesen Gründen wurde das Vorhaben vorzeitig im September 2010 beendet.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Projektzeitplan Polyamide	beteiligte Partner	2008				2009				2010			
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
AP1 Etablierung systembiotechnologischer Methoden (Fluxom, Metabolom, metabolische Modellierung) (Postdoc Uni Münster)	Uni Münster	Modelle und experimentelle Tools etabliert	In silico Pathway Modeling etabliert	Analytik Fluxom, Metabolom und Fermentationsdaten etabliert	Verbesserung der Fluierung und Kohlenstoffausbeute 60% der Theorie	Verbesserte Kohlenstoffausbeute 65% der Theorie							
AP2 Systembiotechnologie DAP-produzierender Stämme: Stoffwechselaufklärung und Tagidentifizierung (Postdoc Uni Münster), Metabolic Engineering/Sentech (BASF)	BASF Biologie, Uni Münster	Identifizierung der wichtigsten unbekannteten Nebenprodukte	Optische Pathways der wichtigsten Nebenprodukte, C-Ausbeute 87% der Theorie	Verminderung der Nebenprodukte auf <5% von DAP	Beim-Zell-Ausbeute von 90g/l in 48h erreicht	Beim-Zell-Ausbeute von 105g/l in 48h erreicht							
AP3 Entwicklung eines Produktionsprozesses zur fermentativen Herstellung von DAP (Biotechnologie)	BASF (Biologie/ Biotechnologie/ Chemie/Prozesse/ Biotechnologie)	Umlegung des verfügbaren Verfahrens in den 300l Bioreaktor	Umlegung des verfügbaren Verfahrens in den 300l Bioreaktor	Beim-Zell-Ausbeute von 80g/l in 48h erreicht	Erweiterung des Substratspektrums auf 2 weitere profitable C-Quellen	Veranschaulichung der C-Ausbeute auf >=100% der Glucose-Ausbeute							
AP4 Verwendung alternativer Substrate: Stoffwechselaufklärung und Tagidentifizierung (Postdoc Uni Münster), Metabolic Engineering/Sentech (Uni Münster, BASF)	Uni Münster/ BASF Biologie	Konzept zur Nutzung von alternativen Substraten (Polyole, Hexandiol) etabliert	Konzept zur Nutzung von alternativen Substraten (Polyole, Hexandiol) etabliert	Verfahrenskonzept für die Isolierung von DAP etabliert und getestet	Produktion von 100g DAP in 48h	Produktion von 100g DAP in 48h							
AP5 Entwicklung von Methoden zur Isolierung und Reinigung von DAP	BASF Chemie / BASF	Aufbau einer technischen Pilotanlage	Aufbau einer technischen Pilotanlage	Produktion von 100g DAP in 48h	Produktion von 100g DAP in 48h	Produktion von 100g DAP in 48h							
AP6 Kampagnen-Herstellung von DAP im Technikummaßstab	BASF Biotechnologie	Produktion von 100g DAP in 48h	Produktion von 100g DAP in 48h	Produktion von 100g DAP in 48h	Produktion von 100g DAP in 48h	Produktion von 100g DAP in 48h							
AP7 Polymerisierung von Polyamid 5,10 im Maßstab mehrerer 100kg und Bemusterung	BASF Polymerchemie, Robert Bosch, Fischerwerke, Daimler	Herstellung von >1 Tonne Polyamid 5,10 bzw. 5,9 Material- und Know-how Transfer	Herstellung von >1 Tonne Polyamid 5,10 bzw. 5,9 Material- und Know-how Transfer	Herstellung von >1 Tonne Polyamid 5,10 bzw. 5,9 Material- und Know-how Transfer	Herstellung von >1 Tonne Polyamid 5,10 bzw. 5,9 Material- und Know-how Transfer	Herstellung von >1 Tonne Polyamid 5,10 bzw. 5,9 Material- und Know-how Transfer							
AP8 Herstellung von Musterteilen	BASF/Robert Bosch GmbH	Herstellung von Musterteilen	Herstellung von Musterteilen	Herstellung von Musterteilen	Herstellung von Musterteilen	Herstellung von Musterteilen							
AP9 Testung von Mustermaterialien und Produktion von Demonstrationsteilen	BASF/ Fischerwerke GmbH/ Daimler-AG	Herstellung von Musterteilen	Herstellung von Musterteilen	Herstellung von Musterteilen	Herstellung von Musterteilen	Herstellung von Musterteilen							
AP10 Clusternetzwerk Projektevaluation	Alle	Clusternetzwerk Projektevaluation	Clusternetzwerk Projektevaluation	Clusternetzwerk Projektevaluation	Clusternetzwerk Projektevaluation	Clusternetzwerk Projektevaluation							

Abbildung 3.1: Meilensteinplan

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

4. Stand Wissenschaft und Technik als Ausgangsbasis

Die Nachfrage im Marktsegment der technischen Polymere mit erhöhtem Anforderungsprofil zielt eindeutig auf ein biobasiertes Material mit guten bis sehr guten Materialeigenschaften ab. Biopolymere auf Basis von PHA und PLA können hier nicht eingesetzt werden. Deshalb muss nach anderen besser geeigneten Polymeren gesucht werden. Polyamide (PA) sind als Polymere mit verbesserten Eigenschaften gut charakterisiert und haben deshalb auf Basis von Diaminohexan oder Caprolactam ein großes Umsatzvolumen erreicht. Die Polymere PA 6 und PA 6.6 beispielsweise werden mit einem jährlichen Produktionsvolumen von 3,5 Mio. t und einem Umsatzvolumen von ca. 10 Mrd. € hergestellt (Global Nylon Chain Report, PCI Nylon 2005). Neben den sehr umsatzträchtigen Polyamiden PA6 und PA6.6 werden andere Polyamide (PA4.6, PA11, PA12, PA6.10) bisher nur in Nischen-Anwendungen mit geringer Marktdurchdringung eingesetzt. Grund dafür sind zum einen die spezifischen Eigenschaften dieser Polyamide, zum anderen auch die Kosten der Herstellung, die oft mit den Anwendungen im Massenmarkt nicht kompatibel sind.

In Arbeiten des Instituts für Polymerwerkstoffe und Kunststofftechnik der TU Clausthal wurden Polyamide untersucht, deren Dicarbonsäureanteil (Sebacinsäure, Azelainsäure, Brassylsäure) aus nachwachsenden Quellen stammen (wie z. B. Rizinsäure, Eruca-Säure). Polyamid auf Basis Diaminopentan hingegen wurde in diesen Arbeiten nicht untersucht (Steuernagel 2004). Bereits in frühen Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass Polyamide auch auf der Basis von Diaminopentan (DAP) überzeugende Polymereigenschaften aufweisen, die alle geforderten Kriterien an Polyamide erfüllen (Carothers, 1935, Carothers, 1937).

Allerdings kann DAP, im Vergleich zu Diaminohexan bzw. Caprolactam, selbst chemisch nur schlecht dargestellt werden und hat deshalb trotz guter Material- und Produkteigenschaften bisher keinerlei wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Erst mit Hilfe biotechnologischer Methoden wurde es überhaupt erst absehbar, DAP auch in großen Mengen herstellen zu können. BASF hatte einen Ansatz zur fermentativen Herstellung von DAP entdeckt (Zelder et al 2007), mit dem DAP auf dem Wege der Fermentation aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden kann. Zudem werden durch die Methoden des *Metabolic Engineering* und der Systembiotechnologie heute vollkommen neue Möglichkeiten für die Optimierung der fermentativen Herstellung von DAP als Baustein für biobasierte Polyamide eröffnet. Stoffwechsellenzyme und Syntheserouten von biologischen Molekülen können über Organismuskategorien hinaus miteinander kombiniert

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

werden. Sogar die Synthese von bisher nicht biologisch vorkommenden Molekülen ist mit den Methoden der synthetischen Biologie möglich. Das enorme Potential dieser neuen Technologien wurde bei BASF bereits in einer früheren Kooperation mit Prof. Wittmann (ibvt) am Beispiel der industriellen Lysinproduktion (>100.000 t/a) erfolgreich eingesetzt (Zelder et al., 2006 a, Zelder et al., 2006 b, Zelder et al., 2006 c). Eine Patentanmeldung, die einen *E. coli* Stamm zur fermentativen Herstellung von DAP beschreibt, beschränkt sich auf Japan (Mimizuka and Kazami, 2002).

In der Patentliteratur ist auch die enzymatische Herstellung von DAP aus Lysin beschrieben (Mimizuka and Kazami, 2002, Mimizuka et al., 2004, Sato, 2006). Aus Sicht von BASF ist die einstufige direkte Fermentation von DAP in einem durch seine Effizienz bekannten Lysin-Überproduzenten gegenüber den anderen beschriebenen Verfahren, wie einer mehrstufigen Herstellung von Herstellausgaben und notwendigen Investitionen eindeutig überlegen und stellt die strategisch sinnvollste Basis für die zukünftige Entwicklung dar.

5. Literatur

- Carothers (1935) US Patent 02130523.
Carothers (1937) US Patent 02130948.
Global Nylon Chain Report, PCI Nylon 2005
Mimizuka, T. and Kazami, J. (2002) JP2002223770.
Mimizuka, T., SAWAI, H., YAMADA, M. and KATO, K. (2004) JP2004000114.
Sato, M. (2006) WO2006123778.
Steuernagel, L., und Ziegmann G., Entwicklung und Herstellung neuartiger Polyamid-Hochleistungswerkstoffe auf Basis nachwachsender Rohstoffe. Jahresbericht des Instituts für Polymerwerkstoffe und Kunststofftechnik der Universität Clausthal 2004
Zelder, O., Klopprogge, C., Schroeder, H., Haefner, S., Kroeger, B., Kiefer, P., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2006 a) EP1704241.
Zelder, O., Klopprogge, C., Schroeder, H., Haefner, S., Kroeger, B., Kiefer, P., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2006 b) EP1697518.
Zelder, O., Klopprogge, C., Schroeder, H., Haefner, S., Kroeger, B., Kiefer, P., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2006 c) EP1697532
Zelder, O., Jeong, W.K., Klopprogge, C., Herold, A., Schroeder, H. (2007) WO2007/113127



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

6. Zusammenarbeit

Die folgenden Partner arbeiteten gemeinschaftlich an diesem Vorhaben:

6.1 BASF SE (Projektkoordination)

Die BASF SE als ein globales Chemieunternehmen verfügt über ausgewiesene Expertise auf dem Gebiet der Polymere. Sowohl im Bereich Polyamide, als auch im Bereich der Polyester ist BASF einer der weltweit größten Hersteller, wie auch eines der innovativsten Unternehmen der Branche. Biotechnologische Produkte der BASF umfassen u. a. Vitamin B2 und Phytase. BASF verfügt über umfangreiche Erfahrung in der Entwicklung von fermentativen Prozessen in Bakterien, wie auch in Hefen und Pilzen. Besonders auf dem Gebiet des *Metabolic Engineering* wurden bei BASF alle Methoden zur Konstruktion verbesserter Produktionsstämme etabliert. Am Beispiel der Optimierung des Vitamin B2-Produktionsverfahrens, des Lysin-Produktionsverfahrens, wie auch bei der Entwicklung eines Methionin-Produktionsverfahrens wurden diese Methoden erfolgreich eingesetzt. BASF-Forschungseinrichtungen umfassen neben den beschriebenen Forschungslaboren auch ein Biotechnikum, Chemie-Technika, Polymer-Technika sowie eine Reihe weiterer zentraler Forschungs- und Entwicklungsabteilungen.

Die Aufgabe von BASF in diesem Forschungscluster war die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung von biobasierten Polyamiden. Dazu wurde ein Produktionsprozess für Diaminopentan und die anschließende Herstellung biobasierter Polyamide entwickelt. Polyamid Mustermaterial wurde von BASF produziert und sowohl intern als auch von den Projektpartnern charakterisiert und für die Herstellung von Anwendungsbauteilen verwendet.

6.2 Professor Dr. Christoph Wittmann, ibvt / TU Braunschweig



Institut für Bioverfahrenstechnik
Technische Universität Braunschweig
Gaußstrasse 17
38106 Braunschweig

Die TU Braunschweig verfügt über eine interdisziplinäre und international ausgerichtete Forschung. Biotechnologie wird im Schwerpunkt der Biowissenschaften als Schlüsseltechnologie der Zukunft angesehen. Die Gruppe von Prof. Dr. Christoph Wittmann (Abteilung Biotechnologie am Institut für Bioverfahrenstechnik) ist eine der weltweit führenden Gruppen auf dem Gebiet der systembiotechnologischen Optimierung von Produktionsprozessen der industriellen,

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

insbesondere der weißen Biotechnologie. Sie verfügt über exzellente Einrichtungen für systembiotechnologische Kultivierungen (Laborbioreaktoren im mL bis L-Maßstab und Schüttelbioreaktoren im µL bis L-Maßstab), Analytik (HPLC, GC-MS, Photometer, Plattenreader, Fluoreszenz- und CLS-Mikroskop), rationale Stammoptimierung (Gendeletion, Amplifikation, Modifikation, heterologe Expression) sowie *in silico* Modelling-Hardware und -Software. Prof. Wittmann verfügt über eine umfangreiche, langjährige Expertise für die systembiologische Charakterisierung und Optimierung von *Corynebacterium glutamicum*, die in zahlreichen Forschungsprojekten mit industriellen Partnern, sowie mit Förderung der DFG erfolgreich eingesetzt wurden. Die verfügbaren Methoden umfassen u. a. die metabolische ¹³C-Stoffflussanalyse, die Metabolomanalyse, Enzymassays und die *in silico* Modellierung, sowie eine umfangreiche Erfahrung in der gezielten genetischen Veränderung von *Corynebacterium glutamicum*.

Die Gruppe von Prof. Wittmann (TU Braunschweig) war für die systembiotechnologische Optimierung der biotechnologischen Produktion von Diaminopentan mit dem Produktionsorganismus *Corynebacterium glutamicum* verantwortlich.

6.3 Industriepartner

Die drei folgenden Unternehmen hatten die Herstellung und Testung von Anwendungsbauteilen auf Basis bioasierter Polyamide zum Ziel.

6.3.1 Robert Bosch GmbH

Die prognostizierte Verknappung des Erdölvorkommens bzw. die Erschließung schwerer zugänglicher Förderstellen mit der sich daraus ergebenden Preisentwicklung von Kunststoffen begründen das Interesse der Robert-Bosch GmbH an neuen biotechnologisch hergestellten Polymeren. Der Zentralbereich Forschung und Vorausentwicklung (CR) ist zuständig für die Neuentwicklung von Systemen, Methoden, Technologien und Werkstoffen im Automotive- und Non-Automotive-Bereich. CR/APP ist zuständig für das Kompetenzfeld Plastics Engineering. Dort werden RB-interne, bilaterale und öffentlich geförderte Projekte bearbeitet, die mittel- bis langfristige zukünftige Verarbeitungsverfahren, Simulationsmethoden und Werkstoffe aus der Kunststofftechnik betreffen. Ziel ist es, eigenes *Know-how* zu erwerben und innovative Forschungsthemen außerhalb von Bosch zu erschließen sowie wichtige Trends rechtzeitig zu erkennen, zu bewerten und in die Geschäftsbereiche (Entwicklung) und Werke (Fertigung) zu transferieren.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

6.3.2 Daimler AG

Die Daimler AG mit ihrem Hauptsitz in Stuttgart ist ein weltweit führender Anbieter von Premium-Pkw und der größte Hersteller von Nutzfahrzeugen. Als Pionier des Automobilbaus möchte das Unternehmen die Zukunft der Branche nachhaltig gestalten.

Mit den Geschäftsbereichen Mercedes-Benz Cars, Daimler Trucks, Daimler Financial Services sowie Mercedes-Benz Vans und Daimler Buses vertreibt die Daimler AG ihre Produkte in nahezu allen Ländern der Welt und hat Produktionsstätten auf fünf Kontinenten.

Zum heutigen Markenportfolio von Daimler zählt unter anderem Mercedes-Benz, der wertvollsten Premium-Automobilmarke der Welt, die Marken smart, Mercedes-AMG und Maybach. Im Jahr 2009 hat der Daimler Konzern 1,6 Mio. Fahrzeuge abgesetzt.

Um weiterhin Meilensteine in der Automobilentwicklung zu setzen, investierte der Daimler-Konzern auch im Krisenjahr 2009 4,2 Mrd. Euro in Forschung und Entwicklung. Die Initiative „Der Weg zur emissionsfreien Mobilität“ steht für das Engagement des Konzerns im Bereich nachhaltige Mobilität, mit dem Ziel den Verbrauch und die Emission der Fahrzeuge deutlich zu reduzieren und schließlich ganz zu vermeiden. Hier beschäftigt sich das Unternehmen mit neuen kraftstoffeffizienten und umweltfreundlichen Antriebstechnologien. Doch mit der Verbesserung der Antriebstechnologie ist es nicht getan, denn Prozess- und produktintegrierter Umweltschutz kann bereits in der Entwicklungsphase stattfinden. Die Entwicklungsgruppe Interieur der Daimler-Forschung versucht daher die Fahrzeuge leichter zu machen und nachwachsende Rohstoffe in Fahrzeuge zu integrieren. Der Einsatz von Biopolymeren in Fahrzeugen ermöglicht eine solche nachhaltige Leichtbauweise. Die Ingenieure möchten dabei petrochemische Polyamide durch biobasierten Polyamide substituieren. Dabei sollen in Zusammenarbeit mit den Automobil- und Kunststoffteile-Zulieferer neuartige Polyamid-Polymere evaluiert und Bauteile auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen für einen möglichen Serieneinsatz untersucht werden.

6.3.3 Unternehmensgruppe fischer GmbH & Co. KG

Die Unternehmensgruppe fischer verfügt über umfangreiches Know-how in Gebieten der Befestigungstechnik, insbesondere bei der Entwicklung und Produktion von Hochleistungsprodukten aus Polyamiden. Sie ist gleichzeitig bekannt für fischertechnik, hochwertiges Konstruktionsspielzeug aus Polyamid. Darüber hinaus werden Innenraum-Lösungen aus Kunststoff für den Automotive-Bereich entwickelt und produziert. fischer ist besonders für seine Innovationsbereitschaft bekannt und stellt deshalb einen interessanten Entwicklungspartner für die Herstellung und tief greifende Charakterisierung von neuen

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Produkten aus Polyamid dar. BASF und Fischer sind durch langjährige Lieferbeziehungen miteinander verbunden.

6.4 BIOPRO GmbH

Während der Projektphase wurden die Clusteraktivitäten mit Hilfe der Projektmanagementgesellschaft BIOPRO weiter entwickelt. Kontakte der BIOPRO mit unterschiedlichen Unternehmen und *Know-how* Trägern in Baden-Württemberg und in ganz Deutschland konnten auf diese Weise im Projektverlauf in die Clusterstruktur aufgenommen werden.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

II. Eingehende Darstellung

7. Erzielte Ergebnisse und Verwendung der Zuwendung

Die durch die Zuwendung des BMBF geförderten Mitarbeiter sind im Zusammenhang mit den jeweiligen Arbeitsgebieten explizit genannt.

7.1. Arbeitspakete 1, 2 und 4: Die erfolgreiche Etablierung systembiologischer Methoden für *Corynebacterium glutamicum* erlaubte die gezielte Herstellung optimierter Diaminopentan produzierender Stämme mittels metabolic engineering und Nutzung alternativer Substrate (BASF SE/ ibvt)

Grundlage für die biotechnologische Herstellung von 1,5-Diaminopentan (DAP) bildete das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum*, das in großem Maßstab für die Produktion der Aminosäure L-Lysin eingesetzt wird. Lysin bildet dabei einen unmittelbaren Vorläufermetaboliten für DAP. Bei BASF lagen Technologien zur gentechnischen Veränderung von *C. glutamicum* vor und an das ibvt der TU Braunschweig transferiert. Im engen Austausch wurde an der gezielten Entwicklung eines Diaminopentanproduzenten gearbeitet. Dabei war es das Ziel bei BASF, aufbauend auf einem Lysin-Produktionsstamm möglichst rasch die fermentative DAP-Produktion im Pilotmaßstab zu realisieren. Am ibvt wurden darüber hinaus mit Hilfe systembiologischer Methoden Ansätze entwickelt, um die DAP-Produktion in einem öffentlich verfügbaren, Lysin überproduzierenden *C. glutamicum* Stamm zu etablieren und hinsichtlich hoher Produktivität, Ausbeute und der Nutzung alternativer Substrate zu optimieren.

7.1.1. Arbeiten bei BASF

BASF verfügte bereits zu Beginn der Fördermaßnahme über eine ausgereifte Technologie zur gezielten gentechnischen Veränderung von Aminosäureproduzenten wie *Corynebacterium glutamicum*. Darüber hinaus waren bei BASF Lysin-Produktionsstämme aus dem Engagement in der Lysin-Produktion in Korea vorhanden und deren genomische Sequenz bekannt. Ziel der Stammentwicklungsarbeiten für die Herstellung von Diaminopentan (DAP) bei BASF war ein Stamm, der die wesentlichen Veränderungen eines Lysin-Produktionsstammes enthalten sollte, ohne die Nachteile einer nicht-gerichteten Mutagenese aufzuweisen. Bei dieser Mutagenese kommt es zu einer starken Akkumulation von negativen Mutationen, die Wachstum und Produktionsverhalten auch negativ beeinflussen können. Die Konstruktion eines Diaminopentan-Produktionsstammes gelang schließlich durch die gezielte Einführung von Mutationen aus

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

öffentlich bekannten Lysin-Produktionsstämmen kombiniert mit Wissen der BASF über Lysin-Produktionsstammentwicklung und die genomische Sequenz.

Weol-Kyu Jeong entwickelte den Ansatz zur Überexpression heterologer Lysin-Decarboxylasen aus unterschiedlichen Organismen wie *E. coli* und *Clostridium* mit unterschiedlichen Promotoren und episomaler bzw. chromosomaler Lokalisierung (WO2007/113127). Die beste Aktivität in der Umwandlung erreichte das *ldc* Gen aus *E. coli*. Das Enzym konnte auch kinetisch charakterisiert werden (**Alexandra Corneliessen**). Es zeigte sich, dass das Enzym teilweise durch das Produkt gehemmt wird und dass seine Affinität gegenüber dem Substrat Lysin niedrig ist. Am Ende gelang es, das Gen *ldc* in einer chromosomalen Expression und einer Codon-Optimierung in ausreichender Aktivität zu exprimieren, so dass das Lysin verstärkt zu DAP und zu einem weiteren Nebenprodukt umgesetzt wird (**Hartwig Schröder**).

Eine überraschende Beobachtung war, dass ein wesentliches Nebenprodukt in der Fermentation von LDC produzierenden Lysin-Produzenten gefunden wurde. Die Verbindung wurde durch massenspektroskopische Analysen als N-Acetyl-Diaminopentan identifiziert. Dieses Nebenprodukt wird zwar während der Aufarbeitung von Diaminopentan aus der Fermentationsbrühe abgereinigt, stellt aber einen wesentlichen Produktverlust dar. Durch Proteinreinigung der Acetyltransferase-Aktivität und N-terminale Sequenzierung konnte das Protein identifiziert werden (**Oskar Zelder**). Der genetische Knock-out der Acetyltransferase führte zum gewünschten Ausbleiben der Acetylierung von DAP. Eine weitere Optimierung der DAP Produktivität wurde durch die Deletion des Gens erreicht, das für den Lysin-Exporter kodiert. Dies scheint mit der nicht optimalen Affinität bzw. der nicht ausreichenden Umsatzgeschwindigkeit von Lysin zu DAP zusammenzuhängen. Kann nach Unterbindung des Lysin-Exports der intrazelluläre Lysin-Spiegel in der Zelle hoch gehalten werden, kommt es zu einer vollständigen Umsetzung von Lysin zu DAP. Dieser Stamm war die Grundlage zur erstmaligen Herstellung von Diaminopentan im Pilotmaßstab (Kap 7.4).

An den geschilderten Klonierungen zur Bereitstellung von DAP-Produktionsstämmen waren darüber hinaus **Petra Strobel, Bärbel Kächele und Julia Fink** beteiligt.

7.1.2. Arbeiten an der TU Braunschweig

Im Mittelpunkt der Arbeiten, die am ibvt in enger Partnerschaft mit der BASF durchgeführt wurden, stand die Entwicklung einer maßgeschneiderten Zellfabrik für die fermentative DAP-Herstellung auf der Grundlage eines öffentlich zugänglichen *C. glutamicum* Lysin-Produktionsstammes. Durch schrittweise gezielte genetische Modifikation sollte *C. glutamicum* dabei in einen

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

effizienten DAP-Produzenten umprogrammiert werden. Die zugrunde liegende Strategie sah dabei eine ganzheitliche, systemweite Optimierung des Stammes vor und beinhaltet

- (i) Modifikationen im Zentralstoffwechsel für eine verbesserte Bereitstellung von Kohlenstoffbausteinen und Reduktionsäquivalenten (**Judith Becker**),
- (ii) die Optimierungen des DAP-Biosynthesewegs und des -Exports (**Stefanie Kind**),
- (iii) die Eliminierung der Nebenproduktbildung (**Stefanie Kind**) sowie
- (iv) eine Erweiterung des natürlichen Substratspektrums von *C. glutamicum* auf industriell relevante Hemicellulose-Rohstoffe (**Nele Buschke**).

Die Identifizierung geeigneter Targets für die Stammentwicklung basierte dabei auf detaillierter systembiologischer Analyse auf der Ebene von Fluxom (**Judith Becker**), Metabolom (**Christoph Bolten, Judith Becker**) und Transkriptom (**Christoph Bolten, Stefanie Kind**).

Proof-of-Concept

Den Ausgangspunkt der rationalen Erzeugung eines neuartigen Produktionsstammes für DAP bildete der Lysinproduzent *C. glutamicum* lysC^{T311}, der aufgrund einer feedback-entkoppelten Aspartokinase Lysin überproduziert und ins Medium sekretiert. Durch die heterologe Expression der Lysindecaboxylase aus *E. coli* sollte dieser nun in einen DAP-Produzenten umprogrammiert werden.

Der erste Schritt zur Erzeugung eines DAP-Überproduzenten beinhaltete die Transformation des oben genannten *C. glutamicum* Stammes mit der Lysindecaboxylase aus *E. coli*. Ein Vergleich der beiden Lysindecaboxylase-Varianten LdcC und CadA zeigte bei heterologer Expression in *C. glutamicum* deutlich bessere DAP-Produktionseigenschaften bei Verwendung von LdcC (Basisstamm) (Kind et al. 2010¹). Dieser Basisstamm erzielte eine Kohlenstoffausbeute von 72 mmol mol⁻¹. Abbildung 7.1.2.1 zeigt ein Kultivierungsprofil des Basisstammes und die Sekretion von DAP in den Kulturüberstand.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

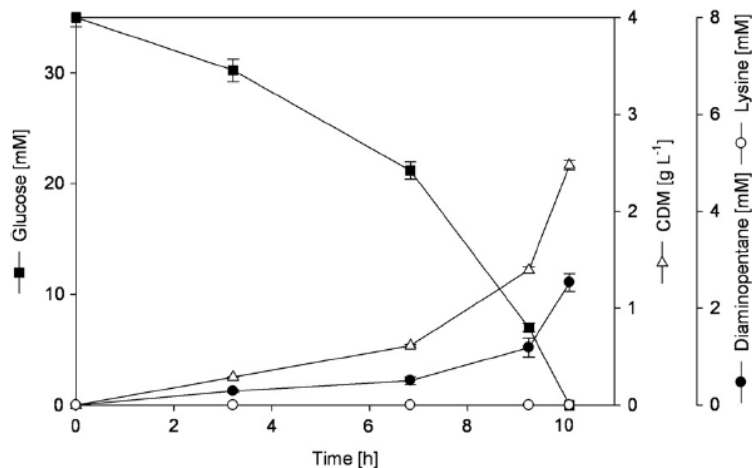


Abbildung 7.1.2.1: Kultivierungsprofil des DAP produzierenden Basisstammes *C. glutamicum LdcC* bei Wachstum in Minimalmedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle.

Optimierung der Biosynthese und der Bereitstellung von Kohlenstoffbausteinen

Die Synthese von DAP erfolgt ausgehend von Oxalacetat, einem Intermediat des Zitratzyklus, und Pyruvat, einem zentralen Metaboliten der Glykolyse. Dabei hat sich insbesondere die effiziente Bereitstellung von Oxalacetat (OAA) als möglicher Engpass für die DAP Biosynthese herausgestellt (Wittmann 2010²). Zur Optimierung der OAA Bereitstellung wurde zum einen eine OAA bildende Reaktion verstärkt indem das Gen der Pyruvatcarboxylase, des wichtigsten anaplerotischen Enzyms, überexprimiert wurde. Des Weiteren wurde diese mit einer Punktmutation versehen, die die regulatorischen Eigenschaften des Enzyms verbesserte und damit eine gesteigerte Bildung von OAA gewährleistete. Zum anderen wurde durch Deletion der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase eine OAA-verbrauchende Reaktion inaktiviert, wodurch in der Summe die OAA-Verfügbarkeit für die DAP-Produktion gesteigert werden konnte. Weitere Optimierungen beinhalteten die Überexpression der Gene *lysC*, *dapB*, *ddh* und *lysA*. Diese codieren für die Enzyme Aspartokinase, Dihydrodipicolinatdehydrogenase, Diaminopimelatdehydrogenase und Diaminopimelat-decarboxylase und sind Bestandteil des DAP-Syntheseweges. Dadurch konnten Engpässe in der Biosynthese selbst aufgehoben werden. Um den Kohlenstoffverbrauch durch konkurrierende Reaktionswege zu drosseln, wurde das Gen der Homoserindehydrogenase (*hom*) mit einer Punktmutation versehen, die die katalytische Effizienz des Enzyms beeinträchtigt, wodurch der Kohlenstoffverbrauch für den Anabolismus reduziert wurde. Dadurch wurde die Ausbeute um über 100 % auf 172 mmol mol⁻¹ gesteigert (Abb. 7.1.2.2).

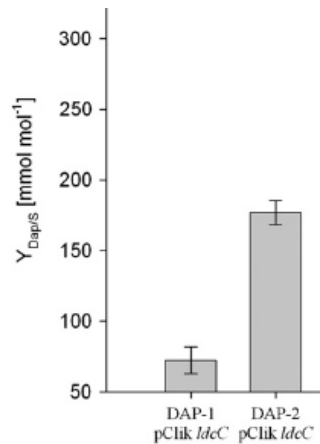
Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Abbildung 7.1.2.2: Einfluss der Modifikation der Biosynthese sowie der Vorläuferbereitstellung auf die Diaminopentanproduktion mit *C. glutamicum*.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten konnte die Expression von *ldcC* durch Optimierung der Codon-usage sowie durch die gezielte Überexpression des Gens durch den starken Promotor des Elongationsfaktors *tu* (*eftu*) weiter verbessert werden und damit die Produktivität des Stammes gesteigert werden (Kind et al 2010¹). Durch diese Modifikationen und eine zusätzliche Optimierung des Mediums in Form der Zugabe von Pyridoxal konnte eine Ausbeute von 300 mmol mol⁻¹ erreicht werden. Verglichen mit dem ursprünglichen Basisstamm entspricht dies einer Verbesserung über 400 %.

Eliminierung der Nebenproduktbildung

Durch die HPLC-Analysen wurde in den Kulturüberstandsproben der DAP-Produzenten ein unbekanntes Nebenprodukt detektiert. Ein Vergleich mit einem entsprechenden Vorläuferstamm, der Lysin produziert, zeigte, dass das Auftreten dieses Metaboliten direkt mit der DAP-Produktion in Verbindung steht. Durch umfangreiche Markierungsstudien mit stabilen Isotopen von Kohlenstoff (¹³C), Stickstoff (¹⁵N) und Schwefel (³⁴S) konnte dieser mittels massenspektrometrischen Methoden potentiell als N-Acetyl-Cadaverin identifiziert werden. Zur Validierung wurde ein entsprechender Standard chemisch synthetisiert und mittels HPLC und GC/MS mit dem unbekanntem Metaboliten abgeglichen. Dadurch war eine eindeutige Identifizierung möglich. Die acetylierte Form des Diaminopentan machte dabei etwa 20 % der gesamten Produktion aus und stellt daher ein erhebliches Problem für einen Produktionsprozess dar. Zur Identifizierung eines möglichen Kandidaten, der diese Reaktion katalysiert, wurden Transkriptomstudien durchgeführt. Dazu wurden zunächst in sehr umfangreichen Arbeiten eine geeignete Methode zur Isolation und Aufreinigung qualitativ hochwertiger RNA etabliert. Des

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Weiteren wurde ein DNA-Chip für die Arrays auf Basis der Genomsequenz von *C. glutamicum* entworfen, der eine fünffache Bestimmung jedes exprimierten Gens erlaubt. Die Expressionsstudie erbrachte allerdings keinen Hinweis auf ein mögliches Enzym, das die Acetylierung katalysiert. Daher wurden im Folgenden sukzessive mögliche Gene, die für Acetyltransferasen codieren, deletiert. Insgesamt wurden dabei 5 Deletionen durchgeführt, bis letztendlich die verantwortliche Acetyltransferase empirisch ermittelt wurde. Durch die Deletion des codierenden Gens NCgl1469 wurde die Umwandlung von DAP in N-Acetyl-DAP unterbunden und die Ausbeute um weitere 11 % gesteigert.

Neben N-Acetyl-DAP trat in Fermentationsprozessen mit Komplexmedium, die in einem parallelen Fermentersystem durchgeführt wurden, auch Lysin als weiteres Nebenprodukt auf. Daher wurde in einer zusätzlichen Stammkonstruktion die Deletion des Lysinexporter *lysE* vorgenommen. Beide Modifikationen führten in Kombination zu einer komplett nebenproduktfreien Diaminopentanproduktion (Kind et al 2010³) auch in den sich anschließenden Fermentationen in Komplexmedium. Das Kultivierungsprofil des optimierten Stammes ist in Abbildung 7.1.2.3 dargestellt.

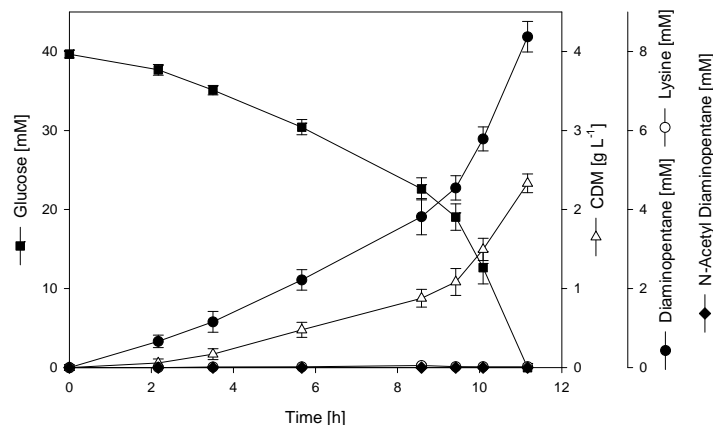


Abbildung 7.1.2.3: Verlauf von Biomasse- und Diaminopentanproduktion bei Kultivierung in Minimalmedium mit Glucose. Durch Deletion der Gene NCgl1469 und *lysE* konnte eine nebenproduktfreie Produktion von Diaminopentan erreicht werden.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Optimierung der Bereitstellung von Co-Faktoren und Kohlenstoffbausteinen

Wie oben beschrieben führten diese ersten Modifikationen zur Optimierung der DAP-Produktion zu einer starken Verbesserung sowohl der Produktivität als auch der Ausbeute (Kind et al 2010^{1,3}). Bis dahin wurden dabei jedoch produktionsrelevante Stoffwechselwege wie der Pentosephosphatweg oder konkurrierende Stoffwechselwege wie der Zitratzyklus noch nicht modifiziert. Im Folgenden wurden diese daher für weitere Optimierungen in Betracht gezogen. Dabei wurden zunächst Experimente durchgeführt, die auch eine Reduktion des Zitratzyklusflusses abzielten. Diese beinhalteten eine Attenuation der Genexpression auf Translationsebene durch gezielte Einführung von Punktmutationen in das Startcodon. Dazu wurde zunächst das Genom auf die Häufigkeit der entsprechenden Basentriplets (ATG, GTG und TTG) hin untersucht (Becker et al 2010⁴). Generell konnte dabei ein Zusammenhang zwischen Häufigkeit und Expressionsstärke gefunden werden. Das häufige Codon ATG führte dabei zu einer höheren Expression als beispielsweise das seltene Codon GTG. Dies wurde dazu genutzt, den Kohlenstofffluss an zentralen Knotenpunkten wie dem Pyruvatknoten und dem Glucose-6-Phosphatknoten in gewünschter Form umzuleiten (Becker et al 2009⁵, Becker et al 2010⁴). Insbesondere die Modifikation der Isocitratdehydrogenase, die zu einer verminderten Enzymaktivität führte, erwies sich dabei als wertvoll im Hinblick auf die Stammoptimierung. Dadurch konnte die Produktion im Vergleich zum Ausgangsstamm um 40 % gesteigert werden (Becker et al 2009⁵). Die entsprechende Modifikation wurde zusammen mit der BASF für eine Patentanmeldung genutzt.

Ein weiterer wichtiger Punkt für eine optimierte DAP-Produktion stellt die Bereitstellung des Reduktionsäquivalents NADPH dar. Wichtigster Lieferant dafür ist der Pentose-Phosphat-Weg (PPP). Folgende Optimierungsansätze befassten sich daher mit einer verbesserten NADPH-Bereitstellung durch Steigerung der PPP Aktivität. Dies wurde durch die Überexpression der Fruktose-1,6-bisphosphatase sowie des Transketolase-Operons erzielt. Beide Modifikationen in Kombination führten dabei zu einer Verbesserung der Produktion um 40 % (Becker 2009⁶).



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Verbesserung des DAP Exports

Eine Charakterisierung kinetischen Eigenschaften der Lysindecaboxylase zeigte eine deutliche Endproduktthemmung bereits bei geringer DAP-Konzentration (Abb 7.1.2.4).

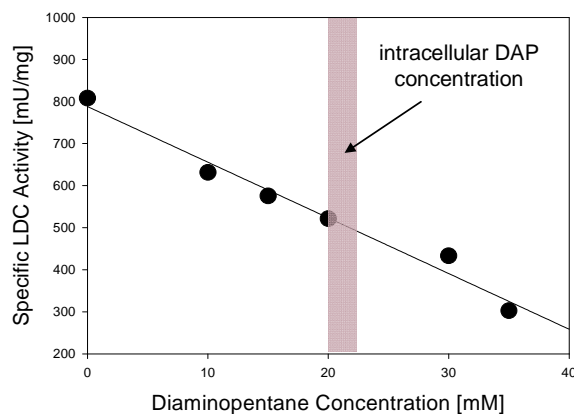


Abbildung 7.1.2.4: Aktivität der Lysindecaboxylase in Abhängigkeit verschiedener DAP-Konzentrationen. Die farbige Markierung stellt die intrazelluläre DAP-Konzentration dar und veranschaulicht die in vivo Bedeutung der Endproduktthemmung.

In einem Produktionsprozess ist der effiziente Export von DAP von großer Bedeutung, um die in vivo Aktivität der Lysindecaboxylase nicht zu beeinflussen. Durch Bestimmung der intrazellulären DAP-Konzentration konnte nachgewiesen werden, dass dies im vorliegenden Fall tatsächlich von großer Bedeutung ist (Abb. 7.1.2.4). Die im Zuge der Identifikation der Acetyltransferase etablierte Methodik der Transkriptomanalyse wurde daher erneut genutzt, um den potentiellen Exporter zu identifizieren. Die dabei ermittelten, für Transportproteine codierenden Kandidaten wurden daraufhin gezielt deletiert. Im Anschluss daran wurde das dabei gefundene Gen genom-basiert unter Verwendung des starken Promotors *sod* überexprimiert und die DAP-Produktion um 20 % gesteigert.

Metabolische Flussanalyse

Die Identifikation geeigneter Gene und Stoffwechselwege zur Stammoptimierung erfolgte zum Großteil mit Hilfe der Flussanalyse sowie mittels in silico Modellierungsstudien. Zur Bestimmung der in vivo Aktivitäten der einzelnen Stoffwechselwege wurden dabei ^{13}C -Markierungsstudien eingesetzt. Der Einbau dieses schweren Kohlenstoff-Massenisotopomers, sowie die Verteilung der ^{13}C -Markierung in den proteinogenen Aminosäuren wurde dabei mittels GC-MS bestimmt. Die metabolische Flussanalyse der einzelnen Zwischenstämme, die im Zuge der Konstruktion

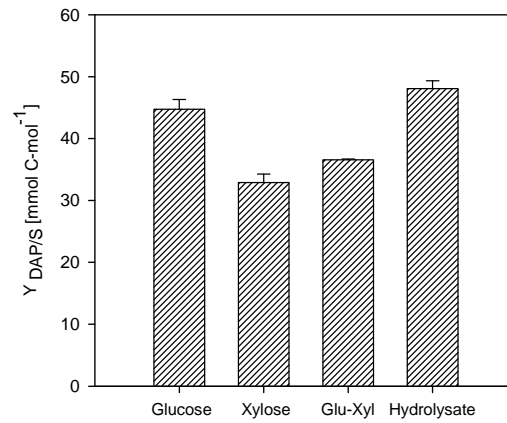
Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

des DAP-Überproduzenten hergestellt wurden, ermöglichten dabei interessante Einblicke in die Zellphysiologie. Dies war insbesondere bei Modifikationen von Vorteil, die nicht den erwarteten Effekt auf die Ausbeute hatten. Mit Hilfe der Flussanalyse konnten allerdings mögliche Ursachen für diese unerwarteten Effekte gefunden werden und in weiteren Schritten der Stammoptimierung in Betracht gezogen werden. Auch für die Erweiterung des Substratspektrums auf Xylose (siehe unten) ist die Flussanalyse sehr vielversprechend zur Identifizierung von Zielgenen. Einige sehr komplexe Reaktionen im Stoffwechsel lassen sich trotz dieser gut etablierten und sehr verlässlichen Methode dennoch nicht ohne Weiters bestimmen. Schwierigkeiten ergeben sich dabei insbesondere bei reversiblen Reaktionen oder parallelen Stoffwechselwegen. Dazu gehören auch die stark reversiblen Reaktionen der Transaldolase und Transketolase, die bei der Verwertung von Xylose eine große Rolle spielen. Um tiefere Einblicke in deren Aktivität zu gewinnen, werden Markierungsinformationen benötigt, die mit der GC-MS Technik nicht gewonnen werden können. Daher wurden tiefergehende Analysen mit GC-MS/MS durchgeführt, die wichtige Einblicke in den Stoffwechsel von *C. glutamicum* liefern. Durch die Kopplung der beiden MS-Detektoren lässt sich der Informationsgehalt der Markierungsverteilung deutlich erhöhen und es können auch sehr geringe Markierungsanreicherungen mit hoher Präzision nachgewiesen werden.

Erweiterung des Substratspektrums

Im Rahmen der Erweiterung des Substratspektrums wurde eine effiziente Hydrolysemethode entwickelt mit der aus Buche-, Birke- und Hafer-Hemicellulose einzelne Zuckerbestandteile (z.B. Xylose) freigesetzt werden, die von *C. glutamicum* effektiv für Wachstum und DAP-Produktion genutzt werden konnten.

Vorraussetzung dafür war die zunächst Konstruktion eines Xylose-verwertenden Stammes von *C. glutamicum*. Dies wurde durch heterologe Expression des entsprechenden Genclusters aus *E. coli* erzielt. Mit den somit erzeugten Stämmen war eine Produktion von DAP unter Verwendung von Xylose als einziger Kohlenstoffquelle möglich. Im Hinblick auf die Nutzung komplexer Rohstoffe, wie oben erwähnte Hemicellulose-Hydrolysate wurde des Weiteren die DAP-Produktion auf Substratgemischen untersucht. Dabei zeigte sich eine sukzessive Verwertung der eingesetzten Kohlenstoffquellen Glucose und Xylose (Buschke et al 2010⁷). Die erzielte Ausbeute auf Xylose war dabei geringfügig kleiner als auf Glucose (Abb 7.1.2.5). Die direkte Verwendung des Hemicellulose-Hydrolysats zeigte dagegen einen positiven Effekt auf die DAP-Ausbeute, was möglicherweise auf weitere komplexe Bestandteile zurückzuführen ist.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)**Abbildung 7.1.2.5:** DAP-Ausbeute bei Verwendung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.2. Arbeitspaket 3: Entwicklung und Optimierung eines Produktionsprozesses zur fermentativen Herstellung von DAP (BASF SE, ibvt)

Die fermentative Herstellung von Diaminopentan erfolgte mit dem in Kap 7.1.1 beschriebenen, optimierten *Corynebacterium glutamicum* Produktionsstamm (WO2007/113127). Diese Arbeiten erfolgten in Abstimmung mit dem Ingenieur **Burkhard Ernst** und in der Gruppe für Fermentationsprozesse von **Oskar Zelder** durch die Personen **Nicola Basta, Alexandra Corneliessen, Julia Fink, Torsten Renz, Annegret Serwe und Gregory von Abendroth** und in enger Zusammenarbeit mit **Judith Becker, Nele Buschke und Stefanie Kind**, TU Braunschweig.

Im Rahmen des BMBF-geförderten Projektes wurden in diesem Team Arbeiten zur Optimierung der Vorkulturschiene, des Fermentationsmediums und des Fermentationsprozesses mit dem zuvor genannten und weiter optimierten Stämmen durchgeführt. Als Medium wurde dabei u.a. ein melassebasiertes Komplexmedium untersucht, das in industriellen Großprozessen routinemäßig für die Lysinfermentation verwendet wird. Es konnten im Labormaßstab zahlreiche optimierte Stämme untersucht und schließlich die Zielgröße für den Produkttiter durch kontinuierliche Optimierung demonstriert werden. Es gelang im Rahmen des Projektes bei BASF die Fermentation wiederholt bis in den Technikumsmaßstab erfolgreich zu demonstrieren und über 800kg Mustermaterial Diaminopentan herzustellen (siehe Kap. 7.4).

Nachdem die Arbeiten zur Prozessoptimierung bei BASF aufgrund der absehbaren, fehlenden Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses eingestellt werden mussten, wurde am ibvt die Fortsetzung der Arbeiten zur Prozessoptimierung übernommen.

Diese Arbeiten wurden durch die Neuanschaffung des Vierfach-Parallelsystems begünstigt. Dadurch konnten in kürzester Zeit sehr wertvolle Ergebnisse gewonnen werden. Um für die Optimierung der DAP-Fermentation eine gute Ausgangslage zu schaffen, wurde am ibvt parallel zu den genetischen Arbeiten mit einem unmittelbaren Vorläuferstamm des DAP-Überproduzenten ein Batch- und Fed-Batch-Verfahren nach dem Vorbild des BASF-Prozesses etabliert. Für einen Lysin produzierenden Vorläuferstamm des DAP-Überproduzenten konnten die Fermentationen sowohl im Batch- als auch im Fed-batch-Betrieb sehr erfolgreich durchgeführt werden. Für das Feedingverfahren wurde eine automatisierte Zufütterung auf Basis des Gelöstsauerstoff entwickelt. Der entsprechend optimierte Prozess lief dabei über mehr als 50 Stunden extrem stabil und es wurde eine Lysin/HCl-Endkonzentration von 120 g/L bei einer Ausbeute von 55 % und einer Produktivität von 4.0 g/L/h erzielt. Im Folgenden sollte dieser Prozess auf den DAP-Produzenten übertragen werden. Anknüpfend an die bei BASF unternommenen Optimierungen der Raumzeitausbeute konnten bereits im Batchbetrieb



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

beachtliche DAP-Konzentrationen von 26 g/L in kurzer Zeit erzielt werden. Im Fed-Batch-Verfahren konnte in nur 27 h eine DAP-Konzentration von 40 g/L erzielt werden. Danach stagnierte allerdings sowohl das Wachstum als auch die DAP-Produktion und es kam zu einer Zuckerakkumulation im Medium. Die Stabilität, die sich im Lysinproduktionsprozess gezeigt hatte, konnte hier nicht erzielt werden. Im Zuge dessen wurde eine Medienumstellung vorgenommen. Statt des bisher eingesetzten Melassemediums wurde ein Hefeextraktmedium entwickelt und für den Fed-Batch-Prozess eingesetzt. Damit konnte über 50 h hinweg ein stabiler Prozess gefahren werden, wobei ein linearer Feed zum Einsatz kam und eine DAP-Konzentration von 75 g/L erzielt wurde. Abbildung 7.2.1 zeigt den Verlauf des optimierten DAP-Produktionsprozesses.

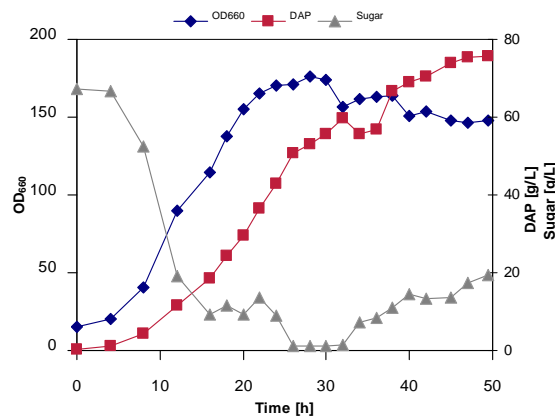


Abbildung 7.2.1: Verlauf des optimierten Fed-Batch-Fermentationsprozesses zur Produktion von DAP mit dem am *ibvt* genetisch optimierten DAP-Überproduzenten.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.3. Arbeitspaket 5: Aufarbeitung von Diaminopentan aus Fermentationsbrühen (BASF SE)

Verschiedene Technologien zur Aufarbeitung von 1,5-Diaminopentan (DAP) aus Fermentationsausträgen wurden untersucht und schließlich das in Abbildung 7.3.1 gezeigte Aufbereitungsverfahren festgelegt. Die Biomasse wird mittels eines Separators von der Fermentationsbrühe abgetrennt. Die Brühe wird dann mit NaOH basisch gestellt und verkocht, um die DAP-Ausbeute zu erhöhen und die Phasentrennungen während der anschließenden Extraktion zu beschleunigen. Danach wird die Brühe dreimal mit n-Butanol extrahiert. Das Extrakt wird in einer ersten Destillation aufkonzentriert, wo auch das im Butanol gelöste Wasser abgetrennt wird. In der zweiten Destillation wird reines DAP über Kopf gewonnen.

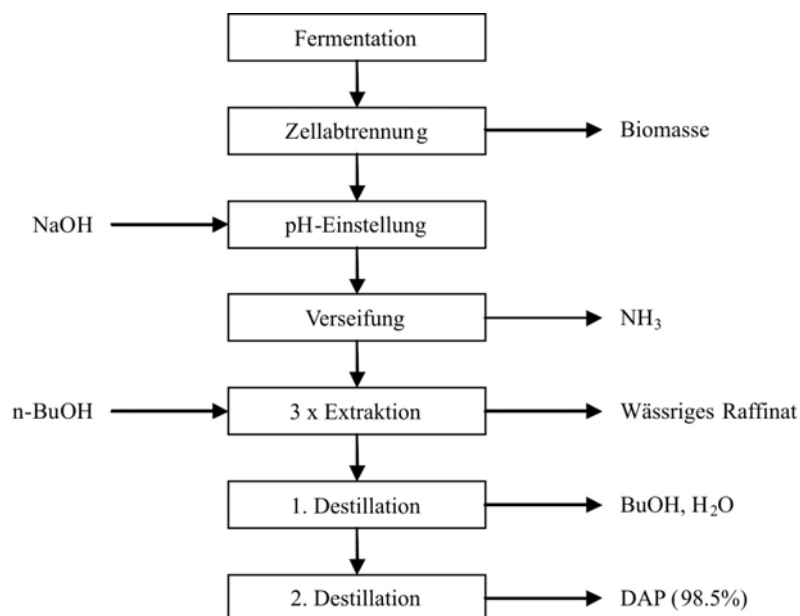


Abbildung 7.3.1: Blockfließbild des Aufbereitungsverfahrens für Diaminopentan aus Fermentationsbrühe.

Es konnte im weiteren Verlauf gezeigt werden, dass während der Zellabtrennung ein erheblicher DAP-Verlust entsteht, wenn die Biomasse nicht vorab mit einer Na₂SO₄-Lösung gewaschen wird. Das Waschmedium wurde anschließend wie die restliche Brühe verseift und extrahiert.

Vor der Extraktion musste die Brühe basisch gestellt werden, da der Äquivalenzpunkt des DAP bei pH 12,5 liegt. Die Brühe wurde dann verkocht, um die Ausbeute zu erhöhen. Es wurde außerdem gefunden, dass diese Vorbehandlung der Brühe einen sehr positiven Einfluss auf die Phasentrennung in den folgenden Extraktionen hatte. Bei der Verseifung wurde gasförmiges NH₃

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

freigesetzt, welches aus dem Reststickstoff des Fermentationsmediums stammt. Das freigesetzte Ammoniak konnte über einen Waschturm mit Wasser aus dem Abgas ausgewaschen werden.

Als Extraktionsmedium wurde ein Lösungsmittel gesucht, das einen günstigen Verteilungskoeffizient aufwies bei begrenzter Wasseraufnahme. Die Wahl fiel auf n-Butanol. Bei der Extraktion wurde beobachtet, dass die Phasentrennungsgeschwindigkeit bei verseiften Brühen deutlich höher war als bei Brühen, die vorher nicht verseift wurden. Außerdem wurde bei nicht verseiften Brühen Mulmbildung beobachtet, was bei der Phasentrennung zu weiteren Problemen führte.

Die erste Destillation diente der Entfernung von Wasser und der Aufkonzentrierung des produkthaltigen Extrakts im Sumpf. Während des Abdestillierens des Wasser-n-Butanol-Heteroazeotrops bildete sich in der Kolonne ein weiß- bis bräunlich gefärbter Belag, der auf Salze des im Butanol gelösten Wassers zurückgeführt wurde. Der Belag führte nicht zu weiteren Problemen und er ließ sich bei der Reinigung der Kolonne leicht entfernen. In der zweiten Destillation wurde zum Schluss spezifikationsgerechtes >98.5% DAP über Kopf gewonnen.

Die Prozessentwicklung wurde ingenieursseitig durch **Burkhard Ernst** begleitet. Die Experimente erfolgten in der Gruppe von **Wolfgang Siegel** unter der jeweiligen Laborleitung von **Martin Völkert** und im weiteren Verlauf des Projekts von **Andreas Krebs**. Die Laborarbeiten wurden von den jeweiligen Laborantinnen und Laboranten, namentlich **Ursula Gotterbarm, Monika Groß, Manuela Gansz, Jürgen Koppenhöfer und Wolfgang Stanich** durchgeführt.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.4. Arbeitspaket 6: Kampagnenweise Herstellung von DAP im Technikumsmaßstab (BASF SE)

Auf Basis des oben beschriebenen Verfahrens wurde eine Kampagne zur Herstellung von DAP-Mustermengen gefahren. Insgesamt wurden fünf Fermentationen im Technikumsmaßstab durchgeführt. Die weitere extraktive und destillative Aufarbeitung der Fermentationsbrühe erfolgte in zwei weiteren Technika der BASF. Insgesamt konnten ca. 800 kg spezifikationsgerechtes DAP gewonnen werden, welches in anschließenden Polymerisationen fast vollständig zu PA5.10 umgesetzt wurde. Die Polymerisationen und die Weiterverarbeitung des Polymers verliefen problemlos, was die hohe Güte des gewonnenen DAPs reflektiert. Mit der Durchführung der Technikumskampagne zur DAP-Mustermengenherstellung konnten außerdem wichtige Erfahrungen gesammelt und die Machbarkeit des Verfahrenskonzeptes gezeigt werden.

Die Technikumskampagne wurde von biologischen, chemischen und verfahrenstechnischen Forschungseinheiten der BASF begleitet. Der fermentative Teil wurde durch das Labor um **Annegret Serwe** mit **Nicola Basta, Julia Fink und Alexandra Corneliessen** unterstützt. Der chemische Teil wurde durch das Labor um **Martin Völkert** mit **Jürgen Koppenhöfer und Monika Groß** begleitet. Verfahrenstechnisch wurde die Kampagne durch **Burkhard Ernst** unterstützt.



Abbildung 7.4.1: Team vor dem BASF Technikumsfermenter während der Diaminopentan-Kampagne.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.5. Arbeitspaket 7: Polymerisation von Polyamiden PA5.10 und PA6.10 und Bemusterung von Partnern (BASF SE)

An den Polymerisationsarbeiten bei BASF wirkten **Motonori Yamamoto (Laborleiter; Polykondensation)**, **Nicole Heid (Labormitarbeiterin Polykondensation)**, **Yiuchi Urano (Laborleiter Polykondensation)**, **Klaus Frambach (Labormitarbeiter Polykondensation)** und **Arnold Schneller (Gruppenleiter Biopolyamide)** mit.

Als Zielpolymer wurde das aus Diaminopentan und Sebazinsäure aufgebaute Biopolyamid PA5.10 in reiner und in komponentierter Form untersucht und in Mustermengen hergestellt. Die Polykondensation (sowohl Festphasen- als auch Schmelzekondensation) von PA5.10 verlief vergleichbar zu den bekannten Polyamiden PA6 und PA6.10. Die Materialeigenschaften von PA5.10 wurden analysiert und mit anderen Polyamiden verglichen (Tabelle 7.5.1, Abbildung 7.5.2-3). Unterschiedliche Compoundierungen konnten vergleichbar zu PA6.10 und damit erfolgreich durchgeführt werden.

Es wurden insgesamt ca. 250kg Mustermengen des komponentierten Polyamids PA5.10 für die Industriepartner bei BASF hergestellt. Darüber hinaus wurde das zu 60% biobasierte Polyamid PA6.10 den Partner als Referenzmaterial zur Verfügung gestellt.

	PA66	PA56	PA6	PA610	PA510	PA11
Bio-Rate (%)	0	46	0	63	100	100
Tm (°C)	260	254	220	220	215	185
Tg (°C) dry	60	60	54	46	50	45
Density (g/cm³)	1,14	1,14	1,14	1,07	1,07	1,03
Water Uptake (23°C/50rF)	2,8	3,6	3	1,4	1,8	0,9

Tabelle 7.5.1: Charakterisierung von PA5.10 und anderen Werkstoffen (Bio-Rate = Gewichtsanteil Material aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen, Tm = Schmelztemperatur, Tg = Glasübergangstemperatur, Density = Dichte, Water Uptake = Wasseraufnahme).

Trotz des 100%igen Bioanteils hat PA5.10 einen vergleichbaren Schmelzpunkt zu PA6 oder PA6.10. PA5.10 hat gegenüber PA6 eine geringere Wasseraufnahme, was für viele Anwendungen vorteilhaft ist (dimensionstabil). Die geringere Dichte von PA5.10 ist auch ein positiver Punkt im Vergleich zu PA6. Von den mechanischen Eigenschaften (Zugfestigkeit und Schlagzähigkeit) ist PA5.10 vergleichbar zu PA6. Die Transluzenz von PA5.10 ist auch für bestimmte Anwendungen vorteilhaft.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

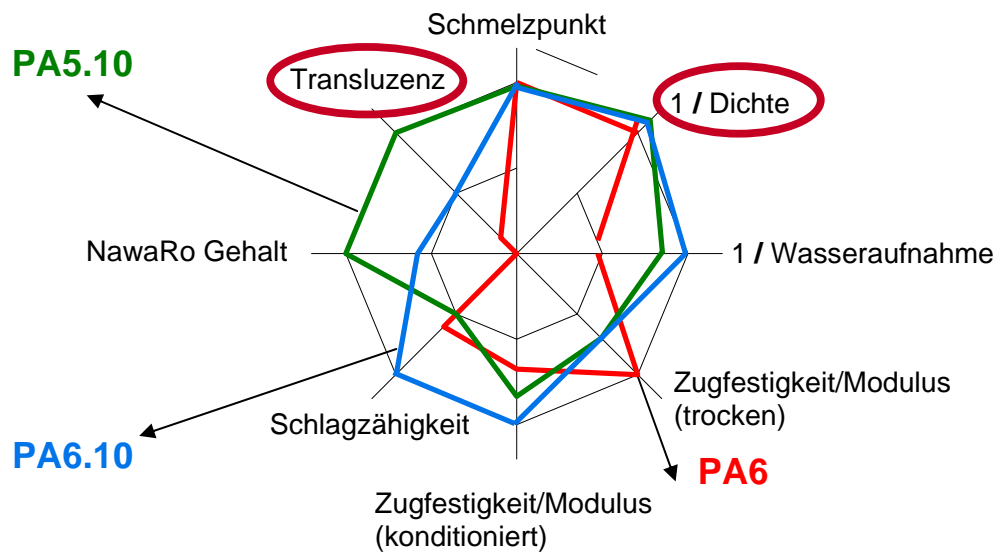


Abbildung 7.5.2: Charakterisierung und Vergleich von PA5.10 zu Standardpolyamiden PA6 und PA6.10.



Abbildung 7.5.3: PA5.10 Mastermaterial.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.6. Arbeitspakete 8 und 9: Herstellung und Testung von Mustermaterialien und Demonstratorteilen aus Polyamid PA5.10 und PA6.10 (Bosch, Daimler, fischer)

Mustermaterial PA5.10 und PA6.10 wurde von BASF hergestellt und entsprechend den Wünschen der Industriepartner Bosch, Daimler und fischer kompondiert. Die Untersuchungen der kompondierten Werkstoffe fanden vor Ort bei den Industriepartnern statt und führten zum Einbau des Materials in verschiedene Demonstratorteile.

7.6.1. Arbeiten von Bosch

7.6.1.1. Werkstoffcharakterisierung

Im Rahmen des Forschungsvorhabens haben im ersten Schritt umfangreiche Materialcharakterisierungen an verschiedenen Compounds aus PA5.10 und PA6.10 stattgefunden. Für die Auswahl von potentiellen Anwendungen wurden diese Werkstoffe mit verschiedenen Serienmaterialien wie PA66 GF30 und PA6 GF30 verglichen (siehe Abbildung 7.6.1.1.1 und 7.6.1.1.2).

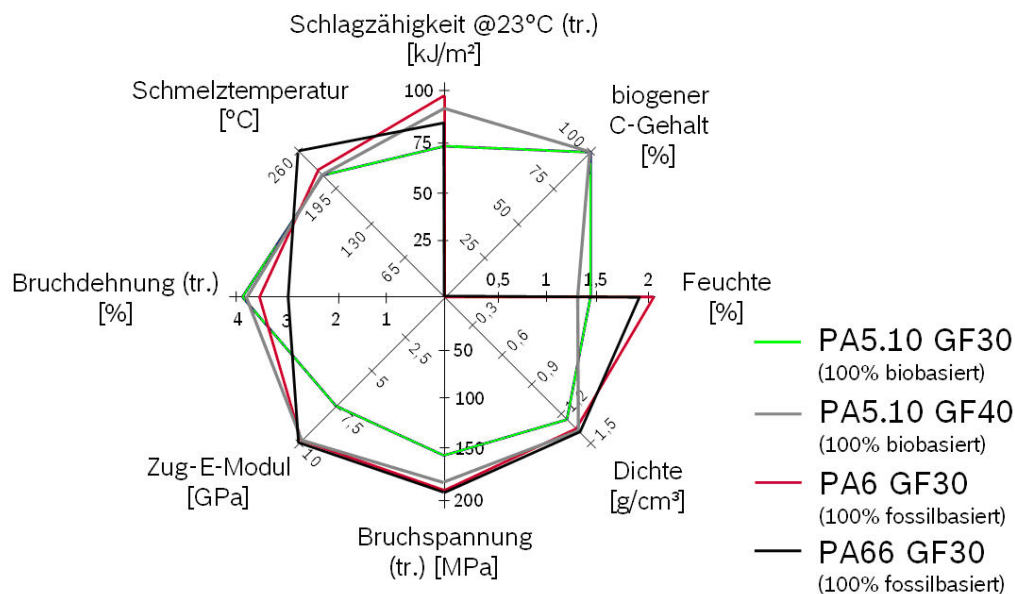


Abbildung 7.6.1.1.1: Werkstoffeigenschaften von PA5.10 vs. PA6 und PA66

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

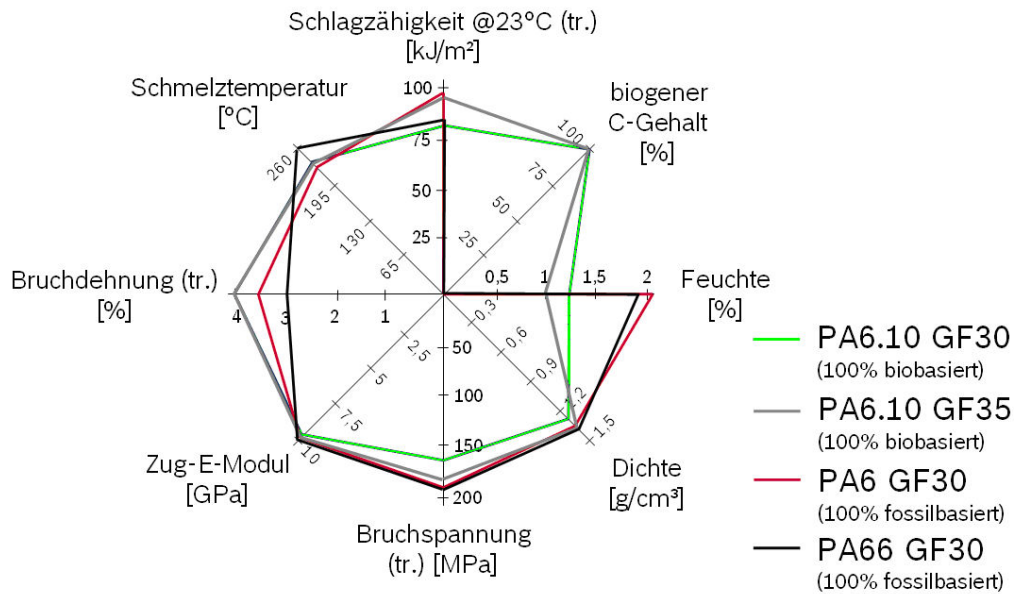


Abbildung 7.6.1.1.2: Werkstoffeigenschaften von PA6.10 vs. PA6 und PA66

Im Vergleich zu den Referenzwerkstoffen besitzen die getesteten Biopolyamide eine um bis zu 50 % geringere Feuchteaufnahme bei einer gleichzeitig höheren Bruchdehnung sowie eine geringere Dichte von ca. 3,5 %. Verbesserungspotenzial besteht im Bereich der Festigkeit und Zähigkeit.

7.6.1.2. Klebverhalten

An den Compounds PA5.10 GF30 und PA6.10 GF30 wurde das Klebverhalten mit zwei Silikon- und zwei Epoxidklebstoffen untersucht und mit einem PA66 GF30 als Referenzwerkstoff verglichen. Als Kennwert für das Klebverhalten wurde die Zugscherfestigkeit ermittelt (siehe Abbildung 7.6.1.2.1).

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

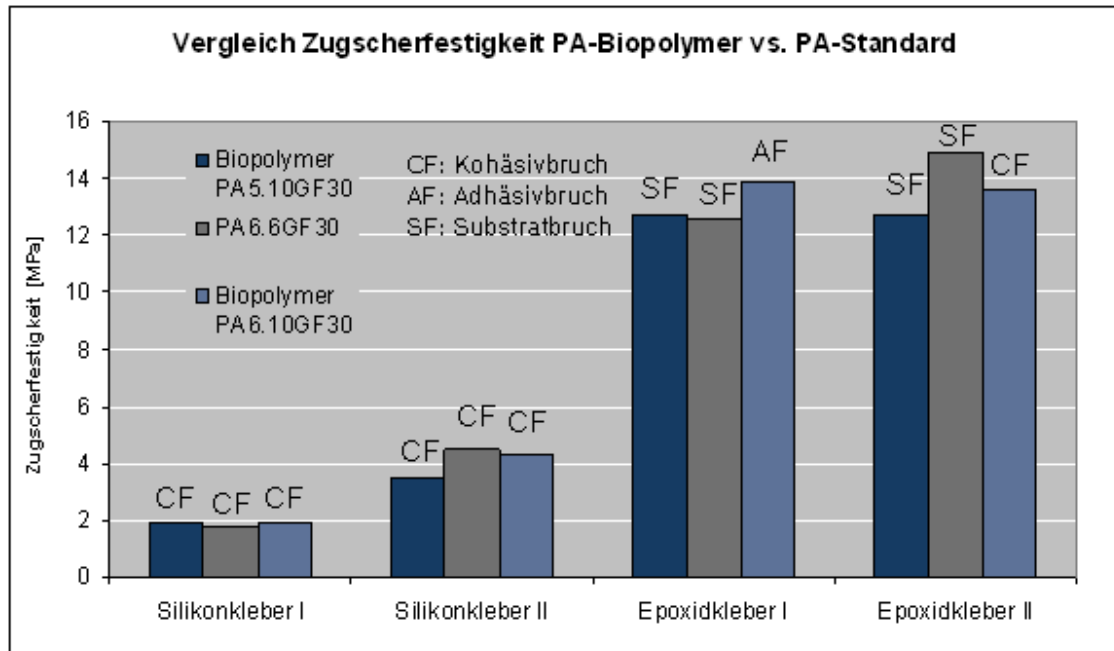


Abbildung 7.6.1.2.1: Zugscherfestigkeit von Biopolyamiden im Vergleich zu PA66

Die ermittelten Ergebnisse zeigen ein mit PA66 vergleichbares Klebverhalten.

7.6.1.3. Schweißbarkeit

Die Untersuchung der Schweißbarkeit erfolgte an spritzgegossenen Probekörpern aus PA5.10 GF30 und PA66 GF30 als Referenzwerkstoff. Neben dem Rotations- und Ultraschallschweißen wurde auch das Laserschweißen untersucht. Zur Bestimmung der Schweißnahtfestigkeit wurde der Berstdruck an den verschweißten Proben ermittelt (siehe Tabelle 7.6.1.3.1).

Tabelle 7.6.1.3.1: Berstdruckvergleich von PA5.10 GF30 im Vergleich zu PA66 GF30

Material	Berstdruck [bar]		
	Laserschweißen	Ultraschallschweißen	Rotationsschweißen
PA5.10 GF30	29,6	29,9	55,96
PA66 GF30	29,7	30,0	37,44

Der Vergleich der Berstdrücke zeigt, dass sich sowohl das Biopolyamid als auch das Referenzmaterial mittels Laser- und Ultraschallschweißen gleich gut verbinden lassen. Höhere Berstdrücke werden mit dem Biopolymer beim Rotationsschweißen erreicht.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.6.1.4. Medienlagerung

Für potentielle Automotivanwendungen mit Medienkontakt wurden umfangreiche Medienlagerungen an PA5.10 GF30 durchgeführt. Die Auswahl der zu prüfenden Medien erfolgt in Anlehnung an die VDA 232 (siehe Tabelle 7.6.1.4.1).

Tabelle 7.6.1.4.1: Übersicht der untersuchten Medien

Medien	Lagertemperatur [°C]
Prüfkraftstoff FAM-B	60
Kühlflüssigkeit (Glysantin G48 1:1 in H ₂ O)	130
Bremsflüssigkeit (DOT 4)	120
Motoröl (OS 206 304 Reference Engine Oil)	140
Automatik-Getriebeöl (Shell Donax TX)	140
Hydrauliköl (Pentosin CHF 202)	125

Zur Bestimmung der Medienbeständigkeit wurden die Charpy-Schlagzähigkeit und die Streckspannung bei 23 °C nach 500h und 1000h Lagerung in den in Tabelle 1 genannten Medien und unter den aufgeführten Temperaturen ermittelt (siehe Abbildung 7.6.1.4.2 und 7. 6.1.4.3).

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

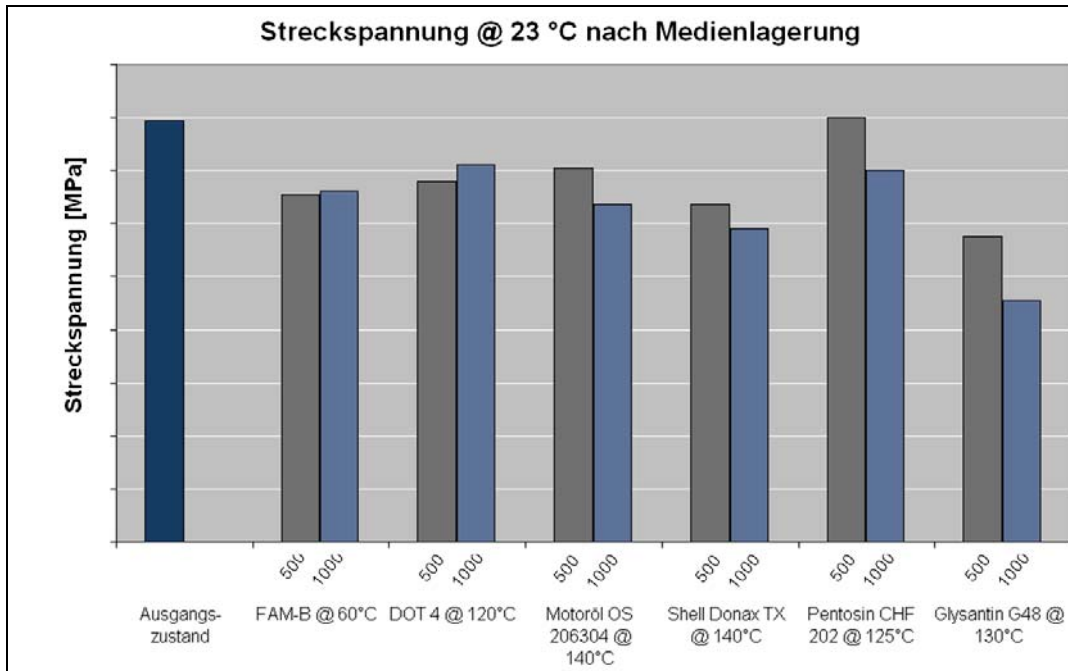


Abbildung 7.6.1.4.2: Streckspannung bei 23 °C nach Medienlagerung

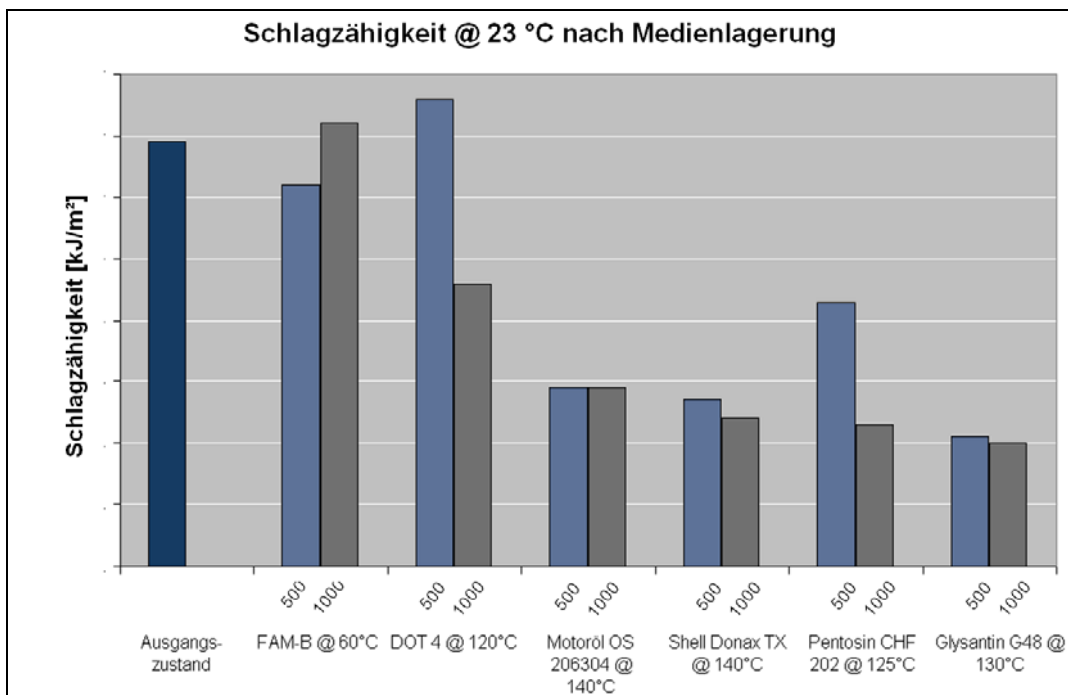


Abbildung 7.6.1.4.3: Schlagzähigkeit bei 23 °C nach Medienlagerung



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.6.1.5. Abmusterung und Bauteilerprobung

Zur Identifikation von geeigneten Bauteilen wurde bei Bosch ein Innovations-Workshop gemeinsam mit Vertretern von BASF und Daimler durchgeführt. Insgesamt konnten über 100 Anwendungen identifiziert werden, wovon > 60 % aus dem Automotivsektor stammen.

Aus den identifizierten Anwendungen wurden potentielle Bauteile ausgewählt und aus PA5.10 bzw. PA6.10 hergestellt sowie im Rahmen von bauteilspezifischen Prüfungen untersucht.

Eine Auswahl von untersuchten Bauteilen zeigen die Abbildungen 7.6.1.5.1-3.



Abbildung 7.6.1.5.1: Fahrpedal



Abbildung 7.6.1.5.2: Motorkühlgebläse



Abbildung 7.6.1.5.3: Zahnrad für Lenkwinkelsensoren



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse ableiten:

- Das Material aus Basis von PA5.10 lässt sich gut verarbeiten.
- Im Vergleich zu den Serienmaterialien aus PA6, PA66 und PA12 werden geringere Fülldrücke benötigt.
- Der Materialabbau durch die Verarbeitung ist unauffällig.
- Die mechanischen Bauteileigenschaften sind mit den Serienwerkstoffen vergleichbar.
- Auftretende Bindenähte sind unauffällig.
- Es sind Gewichtseinsparungen von bis zu 8 % erreichbar.
- Die Maßhaltigkeit ist mit den Serienwerkstoffen vergleichbar.
- Im Vergleich zu den Serienwerkstoffen ist die optische Erscheinung aufgrund von einer glatteren und homogeneren Oberfläche hochwertiger.
- Die Medienbeständigkeit ist mit Serienwerkstoffen vergleichbar, bzw. teilweise besser.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.6.2. Arbeiten von Daimler¹

7.6.2.1. Projektbeschreibung

Im Rahmen der Zusammenarbeit zwischen der Daimler AG und den Industriepartnern wurden aus diesen Werkstoffen einige Prototypen wie ein Fahrpedalmodul, eine Ölwanne und eine Lüfterzarge gefertigt. Material- und Funktionsprüfungen zeigten, dass die konventionellen Serienbauteile durch die biobasierten Bauteile ersetzt werden können. Der Einsatz von PA 5.10 wurde wegen der äußerst kostspieligen biotechnologischen Herstellung von Diaminopentan im Anschluss aber nicht weiter für einen Serieneinsatz untersucht.

Aufgrund der sehr positiven technischen Ergebnisse erweiterte die Daimler AG das Vorhaben, biobasierte Polyamide im Fahrzeug einzusetzen. Als erste mögliche Anwendung wurde aufgrund des Interesses von AMG ein AMG-Luftfiltergehäuse ausgewählt, das standardmäßig aus verstärktem PA 6 und in einer vergleichsweise kleinen Stückzahl von 100.000 Stück hergestellt wird. Zusammen mit dem Hersteller des Luftfilters, der Firma Mann+Hummel im Folgenden M+H genannt, wurden geeignete Bio-Polyamide ausgewählt und geprüft und erste technische Voruntersuchungen gemacht. Der Ablauf ist nachfolgend dargestellt.

7.6.2.2. Luftfiltergehäuse AMG M157 BiTurbo

Bauteil- und Funktionsbeschreibung

Das AMG-Luftfiltergehäuse wird als Teil eines Luftfiltersystems fast identisch gespiegelt im Motorraum zweimal eingesetzt. Das Bauteil wurde für den Einsatz in Mercedes-V8-Motoren wie dem M273 und M278 entwickelt. Von AMG wird es mit einer leichten Design-Modifikation in Form eines AMG-Logos auf der Oberseite für den V8-Otto-Motor M157, einen Direkteinspritzer mit zwei Abgasturboladern und 5,5 l Hubraum eingesetzt. Die Luftfilter sind im Motorraum längs auf den Zylinderkopfhäuben angebracht (s. Abbildung 7.6.2.2.1).

¹ Beschreibung größtenteils aus der Diplomarbeit Ostermann 2011, Hochschule Flensburg übernommen.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

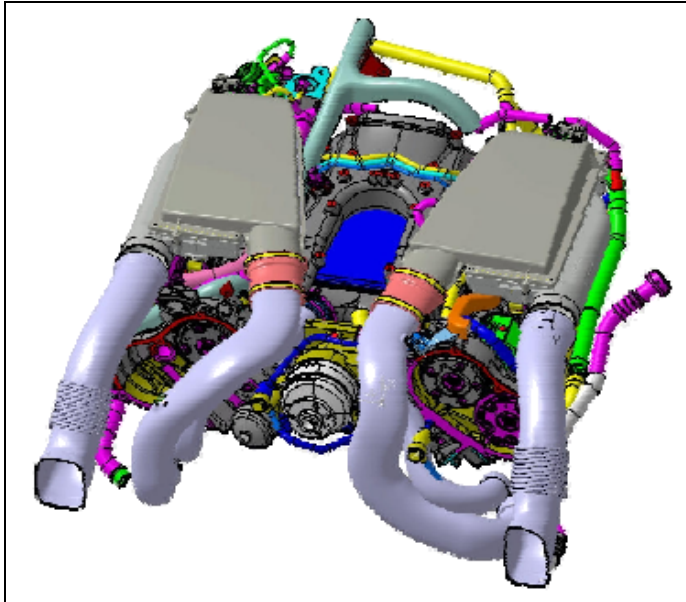


Abbildung 7.6.2.2.1: Luftfilter im Motorraum des M157 DELA55 BiTurbo (Quelle: Daimler)



Abbildung 7.6.2.2.2: Lackiertes linkes
Luftfiltergehäuse aus Akulon
(Quelle: Daimler)



Abbildung 7.6.2.2.3: Links
unlackierte Reinlufthaube, rechts
Rohluftgehäuse (Quelle:
Mann+Hummel)



Abbildung 7.6.2.2.4:
Verschweißter Deckel auf
umgedrehter Reinlufthaube
(Quelle: Mann+Hummel)

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Materialanforderungen und -beschreibung

Das für das Luftfiltergehäuse zu verwendende Serienmaterial ist vom Hersteller entsprechend den spezifischen, im Lastenheft genannten Anforderungen auszuwählen. Anforderungen an den Luftfilter, die Einfluss auf die Werkstoffauswahl haben, sind:

- Minimierung der Geräuschemissionen
- Dauerhaltbarkeit (über 250.000 km bzw. 15 Jahre)
- Funktionstüchtigkeit unter tropischen Bedingungen
- Gewichtsminimierung
- Temperaturbeständigkeit Vibrationsbeständigkeit
- Dichtheit
- Maßhaltigkeit
- Resistenz gegenüber Medien im Motorraum/Fahrzeug
- Korrosionsschutz
- Verschraubbarkeit
- Schweißbarkeit

Für einen AMG-Einsatz zusätzlich:

- Lackierbarkeit oder Einfärbung in Himalaya-Grey
- Bedruckbarkeit

Bei Einsatz synthetischer Kunststoffe haben diese die Vorgaben der DBL 5408 „Thermoplastische Kunststoffteile in der Motorluftführung“ zu erfüllen.

Für den Luftfilter wurde als Serienwerkstoff ein schwarzes PA 6 ausgewählt, das zu zehn Prozent mit Glasfasern und zu zwanzig Prozent mit Mineralien verstärkt ist. PA 6 ist ein technischer Kunststoff, verfügt über sehr gute mechanische Eigenschaften und ist wenig verschleißanfällig. Es besitzt eine hohe Schmelz- und Wärmeformbeständigkeitstemperatur sowie eine gute chemische Beständigkeit und ist schweißbar. Die Zusatzstoffe verbessern noch einmal die Zugfestigkeit, Steifigkeit, Härte, Wärmeformbeständigkeit und chemische Beständigkeit. Zudem verringern sie die Wasseraufnahme und die Mineralien sorgen zusätzlich für eine verringerte Verzugsneigung. M+H entwickelte und produzierte vorher bereits für andere Motorenreihen der Daimler AG Luftfilter und verwendete dort erfolgreich dieselbe Materialart. Die Werkstoffauswahl basierte daher auch auf Erfahrungswerten. Der Luftfilter wurde mit dem aus PA6-(GF10+MD20) bestehenden Luftfiltergehäuse validiert – erfüllte also alle im Lastenheft gestellten Anforderungen – und wurde für die Serienproduktion freigegeben. Aktuell verwendet M+H das Material Akulon K223-HGM24 PA6-(GF+MD)30 der Firma DSM für die Serienproduktion.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Für die Herstellung des Luftfiltergehäuses aus einem biobasierten Polyamid wurden als mögliche Materiallieferanten die Firmen BASF, EMS-Grivory und Evonik für PA 610 und später DSM für PA 410 in Betracht gezogen. EMS-Grivory und Evonik stellten zu diesem Zeitpunkt nur PA 610-Compounds mit einem Glasfaseranteil von 30 Prozent her. Diese wiesen bei von M+H durchgeführten ersten Versuchen zu große Verzugsneigungen auf, so dass sie gegen die Anforderung der Maßhaltigkeit verstießen und für dieses Projekt seitens M+H als nicht tauglich deklariert wurden. Die Materialien Ultramid Balance von BASF und EcoPaXX von DSM waren damals auch bereits mit der gewünschten 10 %-igen Glasfaser- und 20 %-igen Mineralverstärkung erhältlich und wurden bei Vorversuchen mit Berstkörpern positiv vorbewertet. In dieser Ausführung weisen sie laut den Materialdatenblättern der Hersteller ähnliche Eigenschaften wie das Serienmaterial Akulon K223-HGM24 auf, besitzen aber eine geringere Dichte, was aus Leichtbauaspekten positiv zu bewerten ist, und nehmen weniger Feuchtigkeit auf. Das Ultramid S3WGM24 Balance weist zwar ein etwas geringeres Zug-E-Modul auf, verfügt dafür aber über eine höhere Schlagzähigkeit als die anderen Materialien. Das EcoPaXX Q-X07045 zeichnet sich insbesondere durch sein hohes Zug-E-Modul und seine exzellente Wärmeformbeständigkeit aus und ist für die Anwendung im Luftfilter schon fast überqualifiziert. Sowohl EcoPaXX als auch Ultramid Balance sind nur teilweise biobasierte Materialien. Das PA 410 EcoPaXX wird aus Sebacinsäure und Diaminobutan hergestellt und ist unverstärkt zu 70 % biobasiert (K. Tintel, pers. Mitteilung vom 21.09.2010). Das PA 610 Ultramid Balance wird aus Sebacinsäure und Diaminohexan hergestellt und weist einen Bioanteil von 63 % auf (M. Scheibitz, interner Vortrag vom 22.05.2009). Die Sebacinsäure wird aus Rizinusöl gewonnen, Diamine sind bislang erdölbasiert.

7.6.2.3. Technische Betrachtung

Zur Bewertung einer Materialsubstitution des Luftfiltergehäuses sind im technischen Bereich materialspezifische und bauteilbezogene Kennwerte zu untersuchen. Die technischen Anforderungen und die bisherigen Ergebnisse sind zusammengefasst in Tabelle dargestellt. Als untersuchte Varianten sind zum einen alle drei Polyamidtypen in schwarz und mit im Bauteil lackierter Reinlufthaube aufgeführt. Für Ultramid Balance und EcoPaXX wurde zusätzlich die Kombination aus schwarzem Rohluftgehäuse, schwarzem Deckel und in Himalaya-Grey eingefärbter Reinlufthaube aufgenommen.² Diesen Varianten wurde nicht nur für die optischen, sondern für alle Anforderungen eine eigene Spalte zugewiesen, da sich abhängig von den zur

² Die Einfärbung von Akulon in Himalaya-Grey ist prinzipiell ebenfalls möglich, wurde im Rahmen dieses Projektes aber nicht untersucht und wird daher hier nicht aufgeführt.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Einfärbung verwendeten Additiven auch die Werkstoffeigenschaften ändern und somit Einfluss auf das Bauteil und sein Verhalten haben könnten.

Mit Ausnahme der Probleme im Bereich der optischen Anforderungen, die als lösbar einzuschätzen sind, liegt bislang kein Ergebnis vor, das die Biopolyamide für den Einsatz im Luftfiltergehäuse disqualifizieren würde.

Tabelle 7.6.2.3.1: Technische Kriterien der Luftfiltergehäuse und bisherige Prüfergebnisse

Bauteilanforderungen						
Material	Akulon	Ultramid Balance		EcoPaXX		
Ausführung der Haube	lackiert	lackiert	eingefärbt	lackiert	eingefärbt	
Akustik	i. O.	vorl. i. O.	Wird bei Serienentscheid gemäß Lastenheft abgeprüft			
Dauerhaltbarkeit	i. O.	bislang i. O.				
Funktionsstüchtigkeit unter tropischen Bedingungen	i. O.					
Gewichtsminimierung	i. O.	i. O.	i. O.	i. O.	i. O.	
Temperaturbeständigkeit	i. O.	vorl. i. O.	Wird bei Serienentscheid gemäß Lastenheft abgeprüft			
Vibrationsbeständigkeit	i. O.					
Dichtheit	i. O.	vorl. i. O.				
Druckverlust	i. O.					
Maßhaltigkeit	i. O.	vorl. n. i. O. ¹				vorl. b. i. O. ¹
Medienresistenz	i. O.					
Korrosionsschutz	i. O.					
Verschraubbarkeit	i. O.					
Schweißbarkeit	i. O.	vorl. i. O.			vorl. i. O.	
Optik Neuzustand (Haube)	i. O.	vorl. i. O. ¹		vorl. n. i. O. ¹	vorl. b. i. O.	
Optik nach Wärmealterung (Platten)	i. O.	–	i. O.	–	i. O.	
Bedruckbarkeit	i. O.	–		vorl. n. i. O.	vorl. n. i. O.	

¹ bei Motorabdeckungen

7.6.2.4. Materialanforderungen

Das Material Akulon wurde für die Serienanwendung erfolgreich auf die Anforderungen der DBL 5408.36 für PA 6-(GF10+MD20) getestet. Für vergleichbare Bio-Polyamide, die in der DBL 5408 nicht aufgenommen sind, wurde von der PWT eine Liste der wichtigsten Kennwerte zur

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Beschreibung und Bewertung der Materialien erstellt. Diese enthält im Bereich mechanischer Kennwerte – bis auf die Zugfestigkeit und die Schlagzähigkeit bei 23 °C und -30 °C – alle der in der DBL 5408.36 aufgeführten und des Weiteren noch folgende Kennwerte: Streckspannung, Streckdehnung, Zug-Kriechmodul (1h), Zug-Kriechmodul (1.000 h) sowie Zug-E-Modul, Bruchspannung und Bruchdehnung jeweils vor und nach Wärmelagerung. Weitere Kennwerte sind Schmelztemperatur, Längenausdehnungskoeffizient längs und quer, Verarbeitungsschwindigkeit längs und quer, Wasseraufnahme, Feuchtigkeitsaufnahme, Dichte, Glührückstand und Viskositätszahl. Im Projekt wurden zuerst für ein mit 30 Prozent Glasfasern verstärktes PA 610 von BASF die entsprechenden Materialprüfungen durchgeführt. Dessen mechanische Eigenschaften lagen im Vergleich zu mehreren PA 6 GF30 bzw. PA 66 GF30 im unteren Bereich und auf dem Niveau von Rezyklaten. Für das mit Glasfasern und Mineralien verstärkte Ultramid Balance und EcoPaXX wurde von der/für die Daimler AG noch keine eigene Werkstoffcharakterisierung durchgeführt. Es liegen daher keine Ergebnisse für die Materialprüfungen vor. Die PWT hält EcoPaXX und Ultramid Balance aber grundsätzlich für einen automobilen Einsatz geeignet.

7.6.2.5. Bauteilanforderungen

Die Bauteilanforderungen ergeben sich, wie bereits beschrieben, aus den Vorgaben des Lastenheftes und werden auf jene eingeschränkt, die durch die Wahl des Werkstoffes beeinflusst werden. Zusätzlich wurden die durch das Design der Luftfiltergehäuse notwendige Schweißbarkeit und die AMG-Anforderungen zur Optik der Reinlufthauben in Bezug auf Lackierung bzw. Einfärbung und Bedruckbarkeit aufgenommen.

Zum Ende dieser Arbeit wurde das Bio-Polyamid EcoPaXX auf den Serienwerkzeugen abgemustert, Ultramid Balance noch nicht. Ob eine Komplettvalidierung der Luftfilter durchgeführt wird, wird erst zu einem Zeitpunkt nach Ende der Arbeit von der Vorentwicklung entschieden werden. Es sind daher erst wenige der zu untersuchenden Bauteileigenschaften für die Bio-PAs geprüft worden, die Ergebnisse der durchgeführten Tests werden im Folgenden beschrieben. Das Luftfiltergehäuse aus dem Serienmaterial Akulon hat alle Kriterien gemäß Lastenheft erfüllt.

7.6.2.6. Dauerhaltbarkeit

Zur Untersuchung der Dauerhaltbarkeit ist der Luftfilter über eine Strecke von mindestens 150.000 km unter normalen und extremen Bedingungen auf seine Funktion zu prüfen. In der Regel ist dieser Test mit einem Dauerläufer-Fahrzeug durchzuführen, das äußersten Belastungsproben in Hinsicht auf Temperaturen, Umgebungsbedingungen wie z. B. Sand und Tageskilometerleistung ausgesetzt wird.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Bis Anfang Dezember 2010 wurde ein Luftfilterpaar mit in den Prototypenwerkzeugen hergestellten Gehäusen aus Ultramid Balance in einem Erprobungsfahrzeug verbaut und getestet. Laut dem Bauteilverantwortlichen sind die Bauteile bislang nicht auffällig geworden.

7.6.2.7. Massenminimierung

Im Lastenheft des Luftfilters ist unter anderem eine durch die Werkstoffauswahl zu unterstützende Gewichtsminimierung vorgegeben. Da sowohl Ultramid Balance als auch EcoPaXX eine geringere Dichte aufweisen als Akulon, ist von einer Verringerung der Masse der Luftfiltergehäuse und somit der Luftfilter auszugehen. Die theoretische Masseeinsparung anhand der Dichten beträgt 3,65 % bei Verwendung von Ultramid Balance und 2,19 % bei Verwendung von EcoPaXX.

Nach der Abmusterung von Ultramid Balance in den Prototypenwerkzeugen zu Beginn des Projekts wurden für das rechte und das linke Gehäuse jeweils 4 unlackierte Oberteile (Reinlufthaube mit Deckel) und 4 Rohluftgehäuse aus Ultramid Balance und aus dem damals verwendeten PA 6-(GF10+M20) Ultramid B3WGM24HP gewogen und weist mit $1,37 \text{ g/cm}^3$ dieselbe Dichte wie Akulon auf. Die durchschnittliche Masseeinsparung lag hier bei 7,6 %, also deutlich über dem zu erwartenden Wert von 3,65 %.

Von M+H wurden die Gewichte von jeweils sechs komplettierten Luftfilterpaaren aus EcoPaXX (unlackiert) und aus Akulon (lackiert) bereitgestellt. Den Lackbedarf pro Filterpaar gibt M+H mit 50 g an. Wie hoch der auftretende Ausschuss beim Lackieren genau ist, wurde von M+H nicht genannt.

Zudem wurde aus den CAD- Daten unter Einbeziehung der Dichte die Masse für Bauteile aus Ultramid Balance linear extrapoliert. Diese Ergebnisse wurden zu Vergleichszwecken theoretischen Massenwerten gegenübergestellt, die aus Materialdichten und den in den CAD- Daten enthaltenen Volumina ermittelt wurden (s. 7.6.2.7.1).



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Tabelle 7.6.2.7.1: Theoretische, gemessene und errechnete Bauteilpaarmassen

	Theoretische Werte ohne Lackierung			Gemessene* und auf deren Basis linear extrapolierte und errechnete Werte		
	Akulon	Ultramid Balance	EcoPaXX	Akulon	Ultramid Balance	EcoPaXX
Dichte des Materials [g/cm ³]	1,37	1,32	1,34	(1,37)	(1,32)	(1,34)
Anbauteile je Bauteilpaar						
Relative Massen- differenz [%]		3,7	2,2		6,1	3,7

Quelle: Dichten aus Materialdatenblättern, Volumen aus internen CAD-Daten, Masse der theoretischen Werte aus Volumen und Dichte errechnet.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass nicht nur die real gewogene Massendifferenz zwischen den Luftfiltergehäusen aus Ultramid Balance und EcoPaXX mit 74,37 g deutlich größer ist als die durch die CAD-Daten zu erwartenden Werte im Bereich von 48,5 g. Auch die realen Massen und die aus Volumina und Dichten errechneten Massen weichen maßgeblich voneinander ab. Die für die Luftfiltergehäuse aus Ultramid Balance errechnete relative Massenreduktion gegenüber denen aus Akulon liegt mit 6,1 % zwischen den theoretischen Werten und denen, die bei den in Prototypenwerkzeugen hergestellten Luftfiltergehäusen aus Ultramid Balance gegenüber dem mit Akulon vergleichbaren Ultramid B3WGM24HP gemessen wurden.

7.6.2.8. Optik

7.6.2.8.1. Lackhaftung und Einfärbung

Wie bereits erwähnt wurde, wird die Reinlufthaube des Luftfilters in der Serienausführung nach Vorgabe von AMG aus optischen Gründen lackiert und anschließend bedruckt. Kleine Motorabdeckungen aus Ultramid Balance und EcoPaXX wurden auf ihre Lackierfähigkeit hin bereits geprüft. Ultramid Balance lässt sich ähnlich gut mit dem Lack Himalaya-Grey Seidenmatt lackieren wie ein PA 6 und erfüllt die Vorgaben. EcoPaXX besitzt aufgrund des zur Herstellung verwendeten Diaminobutans eine andere Oberflächenspannung als Akulon und Ultramid Balance, die auf Diaminohexan basieren. Das Material weist daher keine ausreichende Lackhaftung für den Lack, der für PA 6 entwickelt wurde, auf, dies wurde auch in den Prüfungen deutlich. Durch

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Additive ließ sich laut DSM die Lackhaftung bislang nicht verbessern, so dass nur eine Anpassung des Lacks dieses Problem beheben kann.

Aufgrund von erwarteten Kostenvorteilen wurde von AMG vorgegeben, die Reinlufthaube nicht aus einem schwarzen, sondern aus einem in der Lackfarbe eingefärbten Material herzustellen. So könnten die Lackierkosten gespart und der zu erwartende Mehrpreis der Luftfilter aus Bio-Polyamid gegenüber dem Luftfilter aus Akulon gesenkt werden. BASF und DSM entwickelten die entsprechenden vorgegebenen Einfärbungen selbst. Zur Untersuchung des optischen Alterungsverhaltens wurden Prüfplatten einer Wärmealterung ausgesetzt. Alle eingefärbten Varianten wurden intern als optisch in Ordnung bewertet.

7.6.2.8.2. Bedruckbarkeit

Das durch die Werkzeugkavität geformte AMG-Logo auf der Reinlufthaube ist zusätzlich noch zu bedrucken. Bei aus EcoPaXX hergestellten Luftfiltern mit eingefärbter Reinlufthaube wurde versuchsweise eine Bedruckung durchgeführt. Da die Bauteile laut M+H nicht richtig in die Vorrichtung passten, also wahrscheinlich eine andere Materialschrumpfung auftrat als bei Akulon, wurde das Logo über den Rand hinaus bedruckt. Zudem hielt die Bedruckung dem dafür vorgesehenen Dampfstrahltest nicht stand und löste sich

Auch hier ist also eventuell eine Anpassung vorzunehmen.

7.6.2.9. Weitere Anforderungen

Von M+H wurden an Luftfiltern aus Ultramid Balance, die in Prototypen-Werkzeugen hergestellt wurden, einige Vortests durchgeführt. Es ist zu beachten, dass die Prüfungen teilweise nicht unter Normbedingungen durchgeführt wurden und somit keine allgemeingültige Aussage besitzen. In diesen vorläufigen Prüfungen zeigten sich die Akustik, die Temperaturbeständigkeit und die Dichtheit vor und nach Temperaturwechsellagerung in Ordnung. Sowohl bei Reinlufthauben aus Ultramid Balance als auch aus EcoPaXX ließen sich die Deckel problemlos unter der Standardeinstellung mit dem Vibrationsschweißgerät aufschweißen.

Die Maßhaltigkeit von Bauteilen aus Ultramid Balance und EcoPaXX wurde bisher nur an Motorabdeckungen getestet. Hier traten bei Ultramid Balance sowohl vor als auch nach der Warmlagerung höhere Abweichungen als die zulässigen ± 3 mm Toleranz auf. Dies kann aber teilweise auch bei dem Serienmaterial auftreten. Die Abdeckungen aus EcoPaXX überschritten lediglich bei einem Messpunkt nach der Warmlagerung die erlaubte Toleranz. Diese Ergebnisse lassen sich allerdings nicht direkt auf die Luftfiltergehäuse übertragen.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.6.3. Arbeiten der Unternehmensgruppe fischer

Bei der Unternehmensgruppe fischer wurde im Rahmen der Entwicklungskooperation Biopolyamid 2021 das Material PA 5.10 auf die Eignung in den Bereichen der Befestigungstechnik und des Automobils getestet und optimiert.

7.6.3.1. PA 5.10 im Befestigungsbereich

Es wurden Tests mit PA 5.10 zur Verarbeitbarkeit während des Herstellungsprozesses gemacht, Tests zur Leistungsfähigkeit des fertigen Dübels und Tests zur Langzeiteignung.

Abschließend wurde eine Marktrecherche durchgeführt um zu erforschen, welche Akzeptanz ein biobasierter Dübel zu einem höheren Preis am Markt hat.

7.6.3.2. Verarbeitbarkeit des Materials

Um grundsätzliche Versuche mit PA 5.10 durchzuführen wurde ein Versuchswerkzeug des UX-Dübels erstellt. Damit konnte unter Serienbedingungen abgemustert werden, ohne aber auf große Granulatmengen angewiesen zu sein.

Bei den Abmusterungen wurde festgestellt, dass das Material PA5.10 ohne Schwierigkeiten unter Serienbedingungen im Versuchswerkzeug verarbeitet werden konnte.

Folgende Auffälligkeiten sind im Verlauf der Abmusterungen im Vergleich zum Serien-material aufgefallen:

- Das Schussgewicht reduzierte sich von 11,86g auf 11,41g
- Die Dosierzeit reduzierte sich von 3,4 sec auf 2,9 sec.
- Der maximale Einspritzdruck reduzierte sich von 754 bar auf 656 bar
- Das Material zeigte Verfärbungen bei längerer Verweildauer im Werkzeug

Insgesamt kann der Produktionsprozess geringfügig kostengünstiger und schneller durchgeführt werden.

7.6.3.3. Leistungsfähigkeit des Dübels aus PA 5.10

Der fischer Universaldübel UX aus herkömmlichem Nylon ist seit Jahren erfolgreich im Markt etabliert. Er gibt Anwendern von Anfang an ein gutes Gefühl bei Verarbeitung und Sicherheit. Mit



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

jeder Schraubendrehung zieht der Dübel immer mehr – so lange, bis er sich am Ende sicher im Bohrloch verspreizt oder im Hohlraum verknotet. Als Multi-Talent bietet er perfekten Halt in jeder Wand, egal ob Gipskarton, Vollmauerwerk, Lochziegel oder Beton.

Der UX-Dübel wurde für die Tests ausgewählt, weil er die höchsten Anforderungen an das Material stellt.

Entscheidende Kriterien für die Qualität eines Dübels sind: Anwenderfreundlichkeit, hoher Haltewert und Dauerstandseigenschaften. Diese Eigenschaften wurden in den folgenden Tests untersucht.

7.6.3.3.1. Anwenderfreundlichkeit

Um dem Anwender ein einfaches Verarbeiten des Dübels zu ermöglichen, muss das Eindrehmoment der Schraube in den Dübel möglichst gering sein, der Drehmomentsprung beim Festdrehen zum Überdrehen muss aber möglichst groß sein. Damit hat der Anwender dann das Gefühl, den Dübel gut verankert zu haben und es besteht nicht die Gefahr, dass der Dübel bei der Montage zerstört wird.

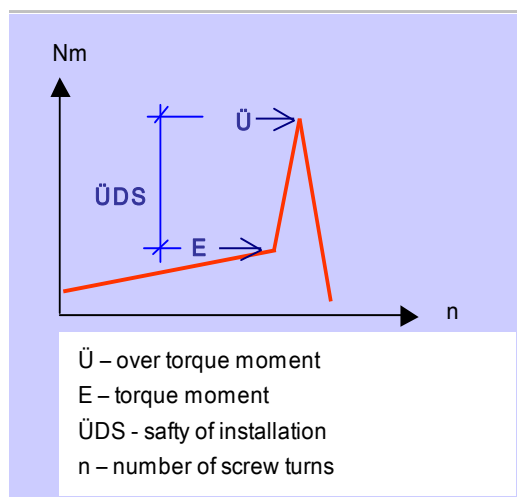


Abbildung 7.6.3.3.1.1: Schematischer Drehmomentverlauf beim Eindrehen einer Schraube in einen Dübel.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

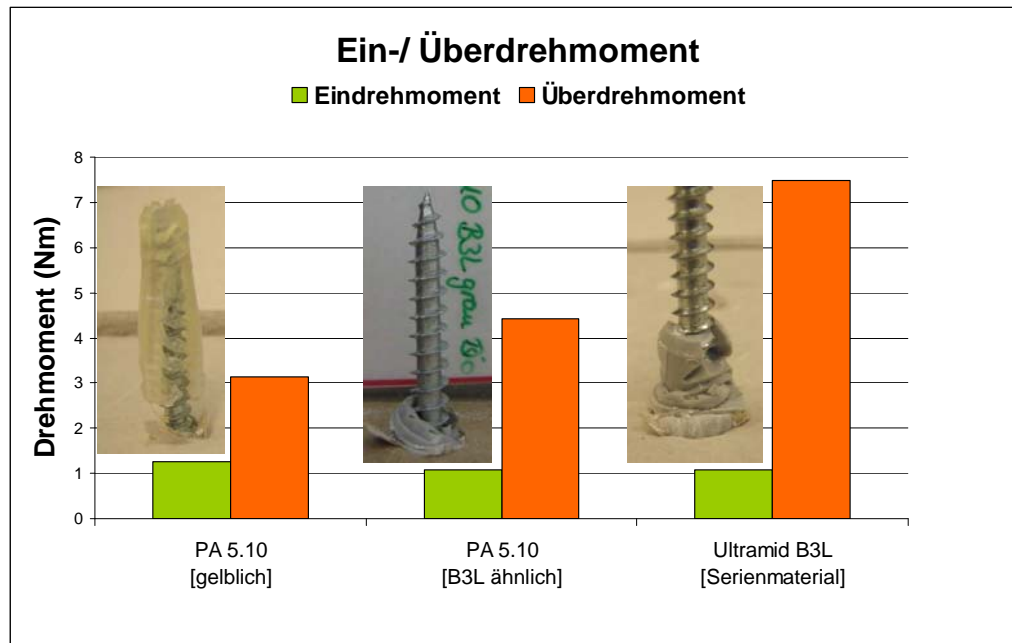


Abbildung 7.6.3.3.1.2: Vergleich der Drehmomente zwischen Dübeln aus unterschiedlichen Polyamidmaterialien (Im Vergleich stehen zwei verschiedene PA5.10 Mustermaterialien [ursprünglich = gelblich; optimiert = B3L ähnlich] und das Serienmaterial).

In Abbildung 7.6.3.3.1.2 sind die Verhältnisse des Eindrehmoments zum Überdrehmoment zu sehen. Die erste Materialvariante des PA 5.10 war spröde. Daher brach die Dübelhülse ohne den gewollten Drehmomentanstieg zu erzeugen. Daraufhin wurde das Material verbessert. Das Ergebnis der Optimierung zeigt das 2. Balkenpaar. Die Drehmomentwerte sind dabei im Vergleich zur ersten Materialvariante deutlich verbessert. Das dritte Balkenpaar zeigt die heute im Serienprodukt erreichten Drehmomentverhältnisse, welche immer als Referenz gelten. Diese Werte wurden nicht erreicht.

7.6.3.3.2. Haltewert

Abbildung 7.6.3.3.2.1 zeigt die Ergebnisse der Auszugsversuche des Dübels aus verschiedenen Materialien bei unterschiedlichen Temperaturen. Dabei ist zu erkennen, dass die erste Materialvariante des PA 5.10 im Kalksand-Vollstein gegenüber dem Serienmaterial immer bessere Haltewerte erzielt. Aber der Schein trügt, im Gipskarton ist der Haltewerte geringer, weil die Dübelhülse zu spröde ist und bricht und nicht „knotet“. Eine Versagensart, die aber nicht auftreten darf.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Die auf Anwenderfreundlichkeit verbesserte Materialvariante erbringt vergleichbare Haltewerte wie das Serienmaterial.

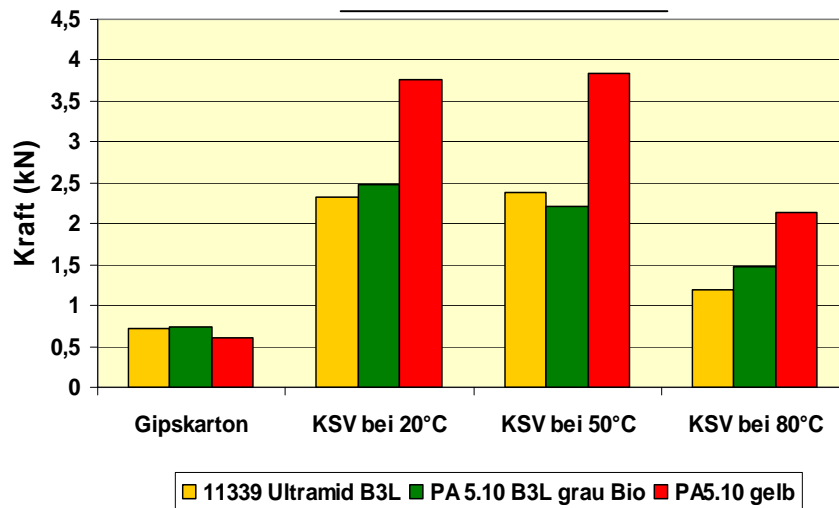


Abbildung 7.6.3.3.2.1: Vergleich der Haltewerte zwischen verschiedenen Dübeln unterschiedlicher Materialien.

7.6.3.3.3. Dauerstandseigenschaften

Damit der Dübel über viele Jahrzehnte seine Funktion erfüllen kann, muss er in Dauertests beweisen, dass er den im Auszugsversuch ermittelten Haltewert auch über lange Zeit aufrecht erhalten kann. Dazu wird der Dübel mit einem Vielfachen des Haltewerts belastet, um die Lebenszeit im Zeitraffer zu simulieren.

Die Dübel aus PA 5.10 hängen bis heute über 6500 Stunden, ohne eine über die Anfangsverschiebung hinausgehende Verschiebung gezeigt zu haben. Die Kriterien für die Dauerstandseigenschaften sind damit erfüllt (Abbildung 7.6.3.3.3.1).

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

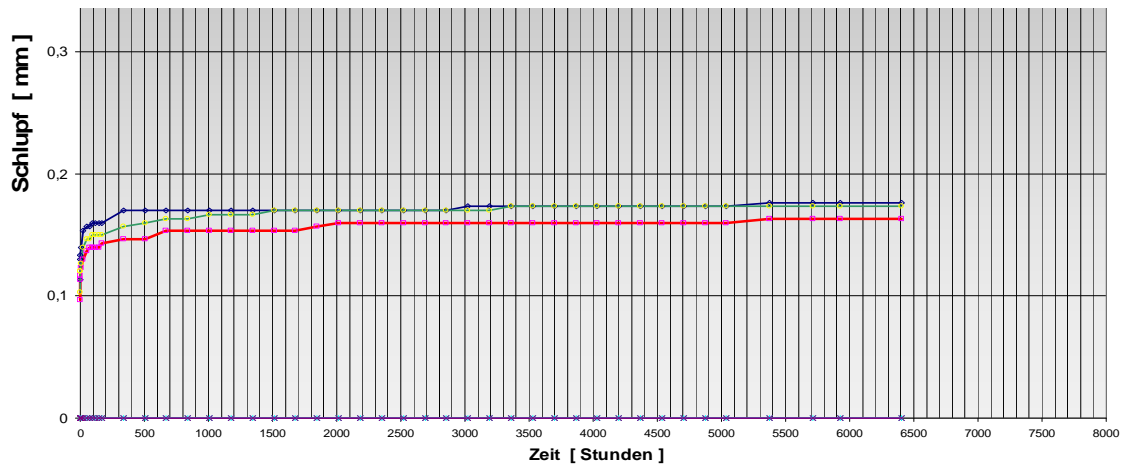


Abbildung 7.6.3.3.3.1: Verlauf der Verschiebung im Dauertest.

7.6.3.3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Dübeltests

"Umfangreiche Versuche und Langzeittests zeigen, dass der UX aus Biopolyamid die selben Werte besitzt wie das seit Jahren bewährte Produkt aus der herkömmlichen Serienfertigung“, sagt Rainer Fischer, Leiter der Kunststoffentwicklung bei fischer. Beim Dauertest weist der „Biodübel“ konstant gleiche Haltewerte auf wie der herkömmliche UX. Auch die Untersuchung des Verhaltens bei hohen Temperaturen zeigen die gleiche Temperaturbeständigkeit bei beiden Dübeln.

	PA 5.10 gelb (1.Abmusterung)	PA 5.10 grau B3L Bio	Ultramid B3L
Verarbeitungsparameter Maschine	im Versuchswerkzeug ohne Probleme, unter Serienbedingungen noch nicht geprüft		
Funktion spritzfrisch	nicht möglich, zu spröde	gegeben	gegeben
Temperaturbeständigkeit	hohe Werte durch die Sprödigkeit bei 20°C und 50°C, jedoch starker Abfall bei 80 °C	Tendenz besser wie B3L	bekanntes Verhalten
FEEL GOOD FACTOR	schlecht	gering	optimal
Dauerstandseigenschaften	nicht geprüft	vergleichbar zu B3L	gegeben

Abbildung 7.6.3.3.4.1: Ergebnisübersicht.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.6.3.4. Versuche mit Sichtteilen aus dem Automobilbereich

In Zusammenarbeit mit der automotive-Sparte der Ugf wurden mehrer Bauteile aus dem Innenraum von Fahrzeugen der Daimler AG bemustert und nach Freigabevorschriften der Automobilindustrie getestet. Bei allen Erkenntnissen ist zu beachten, dass die Prüfungen teilweise nicht unter Normbedingungen durchgeführt wurden und somit keine allgemeingültige Aussage besitzen

Die Teile wurden folgenden Prüfungen unterzogen:

- Beurteilung Verarbeitung / Spritzprozess
- Lackhaftung auf der Kunststoffoberfläche
- Dauerläufe / Langzeittests / Lebenszyklen
- Bedienkräfte
- Tests unter extremen Klimabedingungen
- Oberflächeneigenschaften (mechanisch / optisch)
- Maßhaltigkeit



Grundsätzlich wurden die Test mit Erfolg durchlaufen. Lediglich bei der Maßhaltigkeit und der Verschleißbeständigkeit der Oberfläche traten Probleme auf. Hintergrund für die Maßabweichung ist die Auslegung des Werkzeugs für PC-ABS, was ein anderes Schwindungsverhalten hat. Würde das Werkzeug auf PA abgestimmt werden, würde auch die Maßhaltigkeit erreicht.

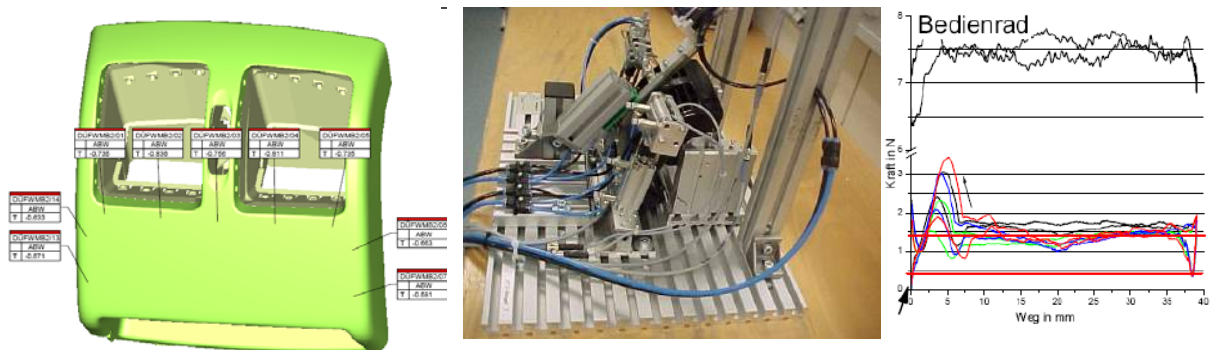


Abbildung 7.6.3.4.1: Bilder von Musterbauteilen, Versuchsaufbauten und Ergebnisse im Automobilbereich

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

7.7. Arbeitspaket 10: Projektevaluation und Clusternetworking (alle Partner)

Es wurden mehrere regelmäßige Clustertreffen durchgeführt, um den Austausch zwischen den im Projekt beteiligten Industrie- und Universitätspartnern zu fördern. Diese Clustertreffen fanden meist in Gegenwart der BioPro GmbH statt.

Um die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung und eine Ökoeffizienzanalyse für PA5.10 durchzuführen wurden Arbeiten von **Burkhard Ernst** in Zusammenarbeit mit dem Unternehmensbereich Kunststoffe und der Gruppe für Ökoeffizienzanalysen innerhalb der BASF mit BMBF-Zuwendungen gefördert.

Die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung führte zu dem Ergebnis, dass eine Wirtschaftlichkeit des technisch erfolgreichen Prozesses zum Betrachtungszeitpunkt für BASF nicht gegeben ist. Die Ursache liegt im Wesentlichen in einem zu großen Investment für die Produktionsanlage zur Herstellung von PA5.10 aus fermentativem DAP, welches einem relativ kleinen Spezialitätenmarkt gegenübersteht. Auch ein zu erwartendes Biopremium wäre nicht groß genug, um die Wirtschaftlichkeit unter BASF-Bedingungen zu gewährleisten.

Die Ökoeffizienzanalyse, welche neben ökologischen Einflussfaktoren ebenfalls die Wirtschaftlichkeit berücksichtigt, wurde für PA5.10 in der Anwendung als Luftsaugkrümmer im Automobil durchgeführt und ergab im Vergleich zu Serienmaterialien Ergebnisse zu Ungunsten des PA5.10 (Abbildungen 7.7.1-2). Durch eine deutliche Optimierung der Fermentations- und Aufarbeitungstechnologie insbesondere hinsichtlich geringerer Herstellkosten und verbesserter Energiebilanz könnte diesem Ergebnis entgegengewirkt werden.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

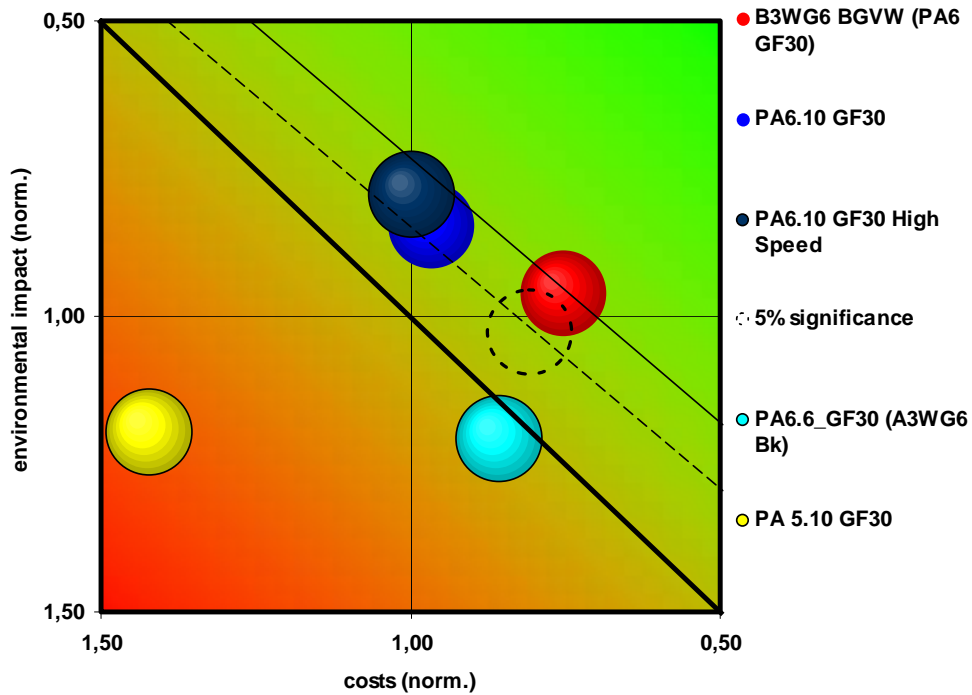


Abbildung 7.7.1: Ökoeffizienzanalyse zu PA5.10 als Ansaugkrümmer im Vergleich zu PA6.10 und Standardpolyamiden.

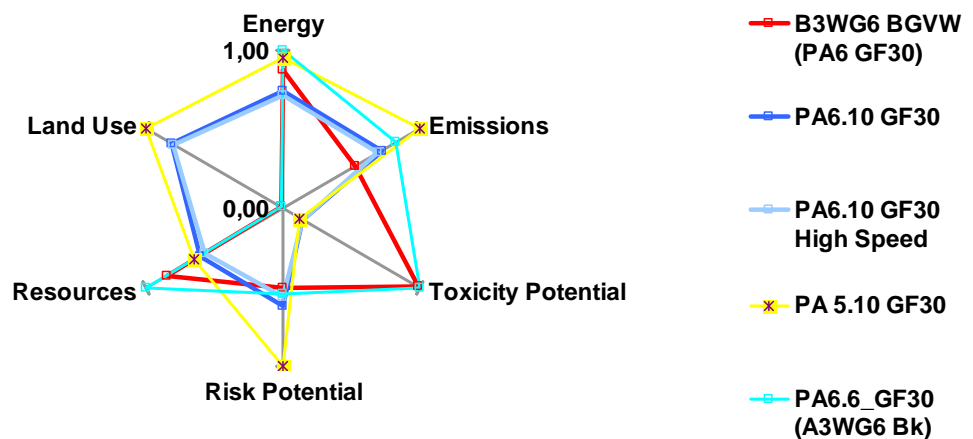


Abbildung 7.7.2: Eigenschaftsprofil aus der Ökoeffizienzanalyse für PA5.10 als Ansaugkrümmer im Vergleich zu PA6.10 und Standardpolyamiden.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

8. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Pos. 0813 Material	46.391,33 €
Pos. 0823 FE-Fremdleistungen	1.101.939,69 €
• Uni Braunschweig	317.424,00 €
• Daimler	371.600,40 €
• Bosch	276.460,67 €
• Unternehmensgruppe fischer	136.454,62 €
Pos. 0837 Personalkosten	648.764,97 €
Pos. 0838 Reisekosten	1.408,48 €
Pos. 0856 Innerbetriebliche Leistungen	829.677,36 €
Pos. 0860 Verwaltungskosten	64.409,00 €
Pos. 0881 Selbstkosten	2.692.590,83 €

9. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die im Rahmen des BMBF-geförderten Projektes „Biobasierte Polyamide durch Fermentation“ durchgeführten Arbeiten waren aus technischer Sicht äußerst erfolgreich und führten sehr rasch zu sehr konkreten Ergebnissen und einer Vielzahl von konkreten Demonstratorteilen aus neuartigem Biopolyamid-Material.

Hohe Ausgaben entstanden im Zusammenhang mit der Entwicklung der Technologie bis zur Realisierung im Technikumsmaßstab und waren nötig, um erstmals ausreichende Mengen biobasierter Monomere für die Herstellung von Biopolyamiden zur Verfügung zu haben und daraus Demonstratorbauteile anfertigen lassen zu können.

10. Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses

Die Ergebnisse aus dem BMBF-geförderten Projekt wurden in zahlreichen Veröffentlichungen zur Verfügung gestellt bzw in einer überschaubaren Anzahl von Patenten gesichert. Die **BASF SE** sieht von einer wirtschaftlichen Verwertung derzeit aufgrund der mangelnden Wirtschaftlichkeit für PA5.10 ab, ist jedoch bereit, das generierte Wissen anderen Interessenten im Rahmen der Möglichkeiten zur Verfügung zu stellen. Gemeinsam mit **BioPro** wird an alternativen Verwertungsmodellen des Verfahrenskonzeptes zur fermentativen Herstellung von Diaminopentan gearbeitet.

Für die **Firma Bosch** bieten die gewonnenen Erfahrungen sowie die guten Ergebnisse mit PA5.10 und PA6.10 eine solide Grundlage für weitere Aktivitäten. Ein Serieneinsatz von PA5.10 bzw. PA6.10 wird weiterhin überprüft.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Für die **Firma Daimler** wird aufgrund der sehr kostspieligen Herstellung von Diaminopentan und der negativen Ökobilanzierung von PA5.10 ein Serieneinsatz im Automobil nicht weiter verfolgt, dagegen wird aufgrund von technischen und ökologischen Vorteilen von PA6.10 und PA4.10 der Serieneinsatz im Automobil weiterhin überprüft.

Die **Firma fischer** plant zum heutigen Zeitpunkt keine weitere Verwendung der Ergebnisse.

11. Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen

Bereits zu Beginn des Projektes waren Patente der Firmen Toray, Ajinomoto und Evonik zur fermentativen bzw. biokatalytischen Herstellung von Diaminopentan bekannt. Im Laufe des vorliegenden Projektes wurden keine weiteren Fortschritte auf diesem Gebiet aus anderen Firmen gemeldet.

12. Veröffentlichung des Ergebnisses

Wissenschaftliche Publikationen:

- Becker, J., 2009. Systems Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* towards improved Lysine Production. ibvt-Schriftenreihe. Cuvillier-Verlag, ISBN 978-3-86955-426-6.
- Becker, J., Klopprogge, C., Schröder, H., Wittmann, C., 2009. Metabolic engineering of the tricarboxylic acid cycle for improved lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol. 75, 7866-9.
- Becker, J., Buschke, N., Bücker, R., Wittmann, C., 2010. Systems Level Engineering of *Corynebacterium glutamicum* - Reprogramming Translational Efficiency for Superior Production. Engineering in Life Sciences. 10, 430 - 438.
- Buschke, N., Schröder, H., Wittmann, C., Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Production of 1,5-Diaminopentane from Hemicellulose, Biotechnology Journal, 2010, in press
- Kind, S., Jeong, W. K., Schröder, H., Wittmann, C., 2010a. Systems-wide metabolic pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of diaminopentane. Metab Eng. 12, 341 - 351

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Kind, S., Jeong, W. K., Schröder, H., Zelder, O., Wittmann, C., 2010b. Identification and elimination of the competing pathway towards N-acetyl diaminopentane for improved production of diaminopentane by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol.*

Kohlstedt, M., Becker, J., Wittmann, C., 2010. Metabolic fluxes and beyond - Systems biology understanding and engineering of microbial metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88, 1065-75.

Wittmann, C., 2010. Analysis and Engineering of Metabolic Pathway Fluxes in *Corynebacterium glutamicum*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 120, 21 - 49.

Ostermann, S., 2011. Möglichkeiten des Serieneinsatzes von Biopolymerwerkstoffen in der Automobilindustrie. Diplomarbeit, Universität Flensburg.

Patente:

WO2009/133114: Herold, A., Schröder, H., Jeong, W. K., Klopprogge, C., Zelder, O., Haefner, S., Richter, U., Becker, J., Wittmann, C.; Production process for fine chemicals using microorganisms with reduced isocitrate dehydrogenase activity.

WO2009/092793: Voelkert, M., Zelder, O., Burkhard, E., Jeong, W. K.; Verfahren zur fermentativen Herstellung von 1,5-Diaminopentan

EP09179642: Schröder, H., Jeong, W. K., Serwe, A., Zelder, O.; Processes and Recombinant Microorganisms for the Production of Cadaverine.

EP11155432: Wittmann, C., Kind, S.; Processes and Recombinant Microorganisms for the Production of Cadaverine

Eine weitere Patentanmeldung ist in Vorbereitung.



Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Tagungsbeiträge:

- Kind, S., Schröder, H., Jeong, W.-K., Wittmann C Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for biobased diaminopentane production. European Bioperspectives, 07.-09.10.08, Hannover
- Wittmann, C., Becker, J., Kind, S., Jeong, W.-K., Zelder, O., Schröder, H., Towards Novel Biopolyamides – Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-Diaminopentane. Achema, May 12 – 15, 2009, Frankfurt
- Kind, S., Schröder, H., Jeong, W.-K., Wittmann C Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for biobased diaminopentane production. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, 08.-10.09.09, Mannheim
- Weiß, C (2009) 3. BioKunststoffe – Technische Anwendungen biobasierter Kunststoffe, Duisburg, 6.-7. Oktober
- Wittmann C (2009) Towards Novel Biopolyamides - Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Production of 1,5-Diaminopentane. 1st Annual SYSINBIO Meeting, Istanbul, Turkey.
- Becker, J., Busche N., Wittmann C. Efficient down-regulation of Enzyme Activities in *Corynebacterium glutamicum* and beneficial Application towards improved L-Lysine Production. VAAM Tagung, 2010, Hannover
- Becker, J., Buschke, N., Bückner, R., Wittmann C., Reprogramming translational efficiency for superior lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. DECHEMA Tagung Anlagendesign, Mai 2010, Nürnberg,
- Kind, S., Schröder, H., Jeong, W.-K., Wittmann C. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for diaminopentane production by optimized expression of lysine decarboxylase. 9th Metabolic Engineering Conference, Juni 2010, Jeju Island, Korea
- Becker, J., Schröder, H., Klopprogge, C., Zelder, O., Wittmann C. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* towards improved lysine production. 9th Metabolic Engineering Conference, Juni 2010, Jeju Island, Korea
- Wittmann C (2010) Towards Superior Cell Factories – Systems-wide Analysis and Engineering of Metabolic Pathways in *Corynebacterium glutamicum*. Systems Biology of Microorganisms, Paris, France.

Schlussbericht *Biobasierte Polyamide durch Fermentation* (FKZ 0315239A)

Wittmann C (2010) From Zero To Hero: Design of a Tailor-made *Corynebacterium glutamicum* strain for Production of Diaminopentane towards Bio-based Polyamides. 8th Metabolic Engineering Conference – Metabolic Engineering for Green Growth. Jeju Island, Korea.

Wittmann C (2010) Industrial Systems Biology Conference, Göteborg, 19-20 August 2010

Von Abendroth, G (2010) DECHEMA Jahrestagung der Biologen, Aachen, 21. September

Fischer, R (2010) Forum Biotechnologie, SIMT-Stuttgart, 23. September

Wittmann C (2010) International Conference on Systems Biology, Edinburgh, 12-16 Oktober

Pressemitteilungen / Homepageeintragungen:

<http://researchinfo.bosch.com/content/language1/html/5729.htm>

<http://www.bioplastics24.com>, 18.6.2009 vdi-Preis

http://www.ibvt.de/_Downloads/Presse/bioplasticsmagazine.pdf

<http://www.ibvt.de/DE/Partner/Kooperationspartner.php>

<http://www.ibvt.de/DE/Partner/Praemierung.php>

http://www.ibvt.de/DE/Archiv/Newsarchiv/news_100729.php

http://www.ibvt.de/DE/Archiv/Newsarchiv/news_100430.php

<http://idw-online.de/pages/de/news365825>

http://www.ibvt.de/DE/Archiv/Newsarchiv/news_100222.php

<http://www.materialicadesign.de/>

Preise / Awards:

- VDI-Preis für innovative Werkstoffanwendungen 2009, 20.4.2009, Hannover.

- MATERIALICA Design und Technology Award 2009, Best of material, 13.10.2009 München.

- Young Metabolic Engineer Award 2010, Metabolic Engineering Conference, Stefanie Kind, 12.8.2010

- HZI-Förderpreis 2010, Beste Promotion im Life Science Bereich der TU Braunschweig, Promotion Judith Becker.

- Förderpreis der Fördergesellschaft Chemie- und Bioingenieurwesen 2010, Promotion Nele Buschke.