



Abschlussbericht Teilprojekt 6

Synthese von Biopolymeren aus Kohlenstoffdioxid - nachhaltige Wege zum PHB

Projektverbund

Ressourcenschonende Biotechnologie in Bayern

Auftraggeber

Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz
Rosenkavalierplatz 2
81925 München

Projektnehmer

Technische Universität München
WACKER-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie
Prof. Dr. Dr. h.c. Bernhard Rieger
Lichtenbergstr. 4
85748 Garching bei München
Tel.: 089289-13571
Fax: 089289-13562
E-Mail: rieger@tum.de
Web: www.makro.ch.tum.de/

Berichtszeitraum:

1. Juli 2015 bis 30. Juni 2018



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	5
2	Aufgabenstellung	6
3	Arbeitspaket 1	7
3.1	Dokumentation der Literatur und Gesamtproblematik.....	7
3.2	Planung und Ablauf	8
3.3	Angewendete Methoden und Fortschritte	8
3.3.1	AP 1.1	8
3.3.2	AP 1.2	10
3.3.3	AP 2.3.....	10
3.4	Bewertung der Ergebnisse und Zusammenfassung	11
3.5	Voraussichtlicher Nutzen.....	11
3.6	Ausblick.....	11
4	Direkte Polymerisation von chiralem BBL (AP2)	11
5	Enzymatischer Teil	12
5.1	Planung und Ablauf der Arbeiten.....	12
5.1.1	Direkte asymmetrische Ringöffnungspolymerisation aus Lacton (AP3).....	12
5.1.2	Bereitstellung des enantiomerenreinen R-Lactons durch enzymatische Racematspaltung (AP4)	12
5.2	Angewendete Methoden und Fortschritte	13
5.2.1	Direkte asymmetrische Ringöffnungspolymerisation aus Lacton (AP3).....	13
5.2.2	Bereitstellung des enantiomerenreinen (R)-Lactons durch enzymatische Racematspaltung (AP4)	13
5.3	Bewertung der Ergebnisse und Zusammenfassung	16
5.4	Voraussichtlicher Nutzen.....	16
5.5	Ausblick.....	17
6	Fermentation von CO₂	18
7	Patente	18
7.1	Posterbeiträge.....	18
7.2	Publikationen	18
8	Literaturverzeichnis	19
9	Anhang	20

9.1	Methoden biotechnologischer Teil.....	20
9.2	Arbeitspakete	21

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenverhältnis
3HB	3-Hydroxybutyrat
3HBDH	3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase
AA	Acetoacetat
ADC	Acetoacetat Decarboxylase aus <i>Clostridium acetobutylicum</i>
ADH	Alkohol Dehydrogenase
BBL	β-Butyrolacton
BDSA	Bis-dimethyl-silylamid
Binol	1,1'-Bi-2-naphtol
Box	Bisoxazolin
CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
Dia	Diaphorase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HS	Headspace
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
K_m	Michaeliskonstante
<i>LpNox</i>	NADH-Oxidase aus <i>Lactobacillus pentosus</i>
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NAD(P) ⁺	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
NAD(P)H	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PHB	Poly(3-hydroxybutyrat)
rabGDH	L-Gulonat 3-Dehydrogenase aus <i>Oryctolagus cuniculus</i>
SerDH	Serin 3-Dehydrogenase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ROP	Ringöffnungspolymerisation
THF	Tetrahydrofuran
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit

1 Abstract

Im chemischen Teil dieses Projektes sollte durch eine neue Seltenerdmetall-Komplexstruktur die stereoselektive Ringöffnungspolymerisation von racemischem BBL (*rac*-BBL) zu (*R*)-isotaktisch-angereichertem bis isotaktischem PHB realisiert werden. Es war möglich Katalysatoren zu finden, die aktiv in der Ringöffnungspolymerisation von *rac*-BBL waren. Die Mikrostrukturanalyse über ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestätigte, dass isotaktisch-angereichertes PHB mit unterschiedlichen Taktizitäten erhalten wurde. Einige PHB Proben besaßen dabei genau die Taktizität, wie sie im Ziel dieses Projektes formuliert wurde.

Im biotechnologischen Teil des Projekts wurde eine enzymatische Racematspaltung zur Anreicherung des (*R*)-BBL bereitgestellt. Es wurde eine (*S*)-selektive Lipase gefunden, welche in organischem Lösungsmittel die Hydrolyse des ungewünschten Enantiomers katalysierte. Das Hydrolyseprodukt wurde in anschließenden Reaktionsschritten zu Acetoacetat unter NAD(P)^+ -Verbrauch oxidiert und anschließend zu Aceton und CO_2 abgebaut. Die entsprechenden Enzyme wurden erfolgreich immobilisiert, um den Einsatz in organischem Medium zu ermöglichen. Dies ist notwendig, um die nicht-selektive Hydrolyse des *rac*-BBL zu unterdrücken. Die Vollständigkeit der Racematspaltung wurde mittels HPLC-Analytik untersucht und das Kaskadenprodukt Aceton mittels GC-MS HS detektiert.

2 Aufgabenstellung

Ziel des Projektes war die Entwicklung neuer Produktionswege für (*R*)-PHB, um eine Herstellung aus wertvollen und Nahrungsmittel-relevanten Stoffen zu umgehen. Dafür wurden mehrere alternative Ansätze evaluiert, die auf der Kombination von chemischen und biotechnologischen Verfahren, ausgehend von CO₂, basierten.

Auf dem **chemischen Weg** sollten folgende Ansatzpunkte untersucht werden:

- Stereoselektive Ringöffnungspolymerisation (ROP) von racemischem β -Butyrolacton ((*rac*)-BBL) (AP1)
- Direkte Polymerisation von (*R*)-BBL (AP2)

Folgende **biokatalytische Verfahren** sollten untersucht werden:

- Lipase-katalysierte Ringöffnungspolymerisation (AP3)
- Lipase-katalysierte Racematspaltung von racemischem β -Butyrolacton durch Hydrolyse (AP4)

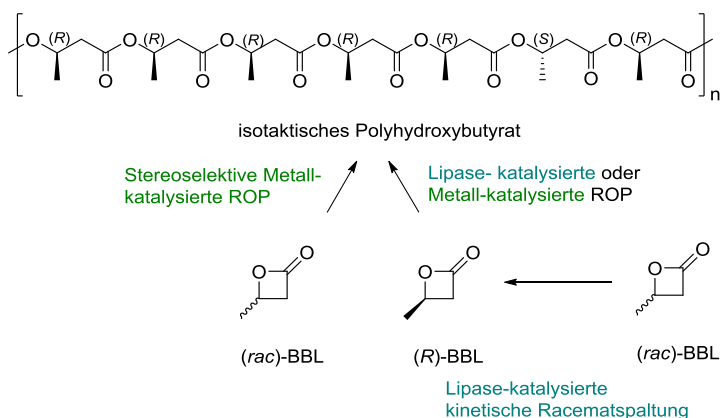


Abbildung 1: Synthese von PHB aus BBL.

3 Arbeitspaket 1

3.1 Dokumentation der Literatur und Gesamtproblematik

Ihrer beeindruckenden Vielfaltigkeit haben es Kunststoffe zu verdanken, dass sich ihr Anwendungshorizont weit über die Verwendung als gewöhnliche Gebrauchsgüter im privaten Sektor erstreckt. Sie finden immer mehr Einzug in industrielle Zweige und sind bereits fester Bestandteil in der Automobilbranche, der Bauindustrie oder auch dem elektrotechnischen Sektor.^[1] Aufgrund der breiten Anwendungsmöglichkeiten wächst der Stellenwert von Kunststoff in der industriellen Verarbeitung stetig. Für die Herstellung dieser Polymere ist es unumgänglich, die mechanischen und thermischen Eigenschaften gezielt beeinflussen zu können. Die Verfügbarkeit von Katalysatoren zur präzisen Synthese von Polymeren mit variabler Taktizität, kontrollierbaren Molekulargewichten und engen Molmassenverteilungen ist die Grundvoraussetzung, um Hochleistungspolymere für verschiedenste Anwendungen zu etablieren.

Der aliphatische Polyester Poly-(3-hydroxybutyrat) (PHB) gehört zur Gruppe der Polyhydroxyalkanoate (PHA) und wurde in seiner reinen (*R*)-isotaktischen Form ((*R*)-PHB) erstmals gegen Ende der 1950er Jahre in der Bakterienart *Bacillus megaterium* entdeckt. Er dient dort als intrazellulärer Speicher für Kohlenstoff bzw. Energie und ist somit ein notwendiger Bestandteil des Stoffwechsels der Organismen.^[2] (*R*)-PHB ist ein Biopolymer, das wegen seiner Eigenschaften, einschließlich Bioabbaubarkeit, ein hohes Potential für die großtechnische Nutzung besitzt. Die Materialeigenschaften von PHB sind vergleichbar mit denen von Polypropylen, einem weit verbreiteten, aber nicht biologisch abbaubaren Kunststoff. PHB hat zusätzlich bessere Sauerstoffbarriereigenschaften, eine höhere Dichte und ist biologisch abbaubar. PHB ist ebenfalls in Abhängigkeit von der Temperatur formbar und kann daher als Ersatz für, auf Basis von Erdöl hergestellte, Kunststoffe für Verpackungs- und Beschichtungsanwendungen verwendet werden.^[3]

Trotz der Fortschritte zur Herstellung dieses Kunststoffes ist die fermentative Herstellung mit einigen Problemen verbunden. Hohe Kosten entstehen durch eine aufwendige Abtrennung des Polymers, wodurch die Durchsetzung als Massenkunststoff nahezu unmöglich ist. Zusätzlich ist bis heute eine rein chemische oder enzymatische Darstellung von (*R*)-PHB aus regenerativen, nicht nahrungsmittelrelevanten Stoffen im großen Maßstab nicht bekannt.

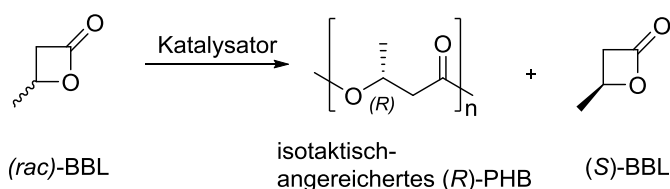
Deswegen ist die Verbesserung/Entwicklung biochemischer und chemisch-synthetischer Routen für die Herstellung des Polymers unumgänglich. Eine der am meisten verbreiteten Möglichkeiten PHB auf synthetischem Weg herzustellen, ist dabei die metall-katalysierte Ringöffnungspolymerisation von β -Butyrolacton.

Eine wesentliche Eigenschaft von isotaktischem PHB ist neben seiner Bioabbaubarkeit die hochkristalline Mikrostruktur und der damit verbundene hohe Schmelzpunkt ($T_M \sim 180 \text{ °C}$). Da sich dieser jedoch nahe dem Zersetzungspunkt des Polymers befindet, ist bis heute die industrielle Verarbeitbarkeit Einschränkungen unterworfen.^[4] Aus diesem Grund liegt der Schwerpunkt der aktuellen Forschung auf der Entwicklung innovativer Katalysator-Systeme, um die mechanischen und thermischen Eigenschaften gezielt beeinflussen zu können. Eine

Verringerung der Kristallinität kann dabei zu einem geringeren Schmelzpunkt und einer höheren Zugdehnung führen.

3.2 Planung und Ablauf

Die Synthese eines asymmetrischen Seltenerdmetall-Komplexes sollte durch die Einführung eines chiralen Liganden realisiert werden. Eine Komplexbildung mit einem Metallprecursor sollte zu der gewünschten Komplexstruktur führen (Abbildung 2). Nach vollständiger Charakterisierung (NMR, Elementaranalyse und Kristallographie) sollte dieser in der Ringöffnungspolymerisation von racemischem BBL getestet werden. Dabei sollten sowohl die Aktivität des Komplexes, als auch die Mikrostruktur des erhaltenen Polymers und seine thermischen und mechanischen Eigenschaften untersucht werden. Ziel des Projektes war die stereoselektive Ringöffnung von racemischem BBL, wobei nur das (*R*)-Isomer in die Polymerkette eingebaut wird und das (*S*)-Butyrolacton vorwiegend in Lösung verbleibt (siehe Schema 1). Nur ein geringer Anteil an (*S*)-Stereoehlern sollte eingebaut werden, um die mechanischen Eigenschaften zu optimieren.



Schema 1: Ringöffnungspolymerisation von racemischem BBL zu isotaktisch angereichertem (*R*)-PHB.

3.3 Angewendete Methoden und Fortschritte

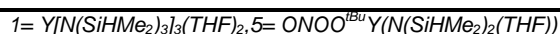
3.3.1 AP 1.1

Im Arbeitspaket 1.1 wurden zunächst die literaturbekannten Komplexe $\text{Y}[\text{N}(\text{SiHMe}_2)_3]_3(\text{THF})_2$ und $\text{ONOO}^{\text{tBu}}\text{Y}(\text{N}(\text{SiHMe}_2)_2)(\text{THF})$ (2-Methoxyethylamino-bis(phenolat) yttrium-thf-bdsa-Komplex) (siehe Abbildung 3) in der Ringöffnungspolymerisation von (*rac*)-BBL getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. $\text{Y}[\text{N}(\text{SiHMe}_2)_3]_3(\text{THF})_2$ zeigte nur geringe Aktivität, es wurde daher kein Polymer isoliert. $\text{ONOO}^{\text{tBu}}\text{Y}(\text{N}(\text{SiHMe}_2)_2)(\text{THF})$ war sehr aktiv in der ROP, wie auch in der Literatur beschrieben. Dieser Katalysator produziert dabei jedoch syndiotaktisches PHB.

Tabelle 1: Polymerisation von (*rac*)-BBL mit $\text{Y}[\text{N}(\text{SiHMe}_2)_3]_3(\text{THF})_2$ und $\text{ONOO}^{\text{tBu}}\text{Y}(\text{N}(\text{SiHMe}_2)_2)(\text{THF})$

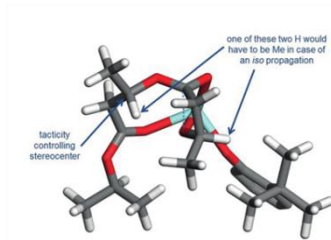
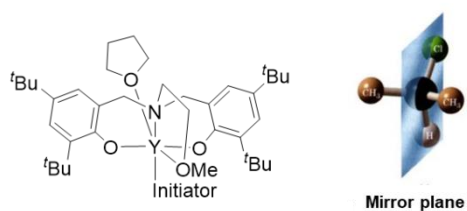
Kat.	LM	Zeit (h)	Umsatz [%]	[BBL]/[Y]	[BBL] (mol l ⁻¹)	M _n (x 10 ³ g mol ⁻¹)	M _w /M _n
1	Tol	21	-	200	2.49	-	-

1	DCM	21	-	200	2.49	-	-
5	DCM	1	86	200	2.49	24.0	2.74
5	DCM	1	78	400	4.98	40.8	2.47
5	DCM	1	22	800	9.96	51.8	2.23
5	DCM	18	78	400	2.44	48.4	2.66
5	DCM	18	49	800	2.44	110.3	2.03
5	DCM	18	95	200	2.49	29.7	2.66
5	DCM	18	89	400	4.98	39.0	2.54
5	DCM	18	49	800	9.96	71.0	2.01
5	Tol	21	52	200	2.49	26.0	2.03

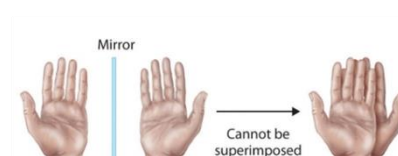


Es wurde darüber nachgedacht, die Symmetrie des Liganden zu ändern. Der bis dahin verwendete Bis(Phenolat)-Ligand verfügt über eine Spiegelebene, die durch einen Liganden mit Chiralität ausgetauscht werden sollte (siehe Abbildung 3). Dafür wurde das häufig verwendete chirale Molekül Binaphthol verwendet um möglicherweise isotaktisches PHB herzustellen.

2-Methoxyethylamino-bis(phenolate)yttrium catalyst:



Aim:



Mirror image

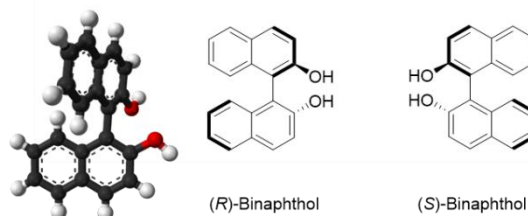


Abbildung 2: Entstehung der Zielstellung durch Untersuchungen mit aktiven literaturbekannt-Katalysatoren.

3.3.2 AP 1.2

Die Ligandensynthese wurde mit racemischem, (*R*)- und (*S*)-Binaphthol als Ausgangssubstanz durchgeführt (siehe Schema 2). Nach anfänglichen Problemen bezüglich der resultierenden Ausbeute der Liganden, konnte diese Route soweit optimiert werden, sodass verschiedenen Liganden in zufriedenstellender Ausbeute isoliert werden konnte. Die verschiedenen Liganden unterscheiden sich dabei in der Stereoinformation im Binaphthol. Alle Liganden wurden vollständig durch NMR-Spektroskopie und Elementaranalyse charakterisiert.

Die isolierten Liganden wurden anschließend komplexiert, um zu dem gewünschten Katalysator zu führen. NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass mehrere Spezies entstehen, die nicht einzeln isoliert werden konnten.

Trotzdem wurde der isolierte Komplex in der Ringöffnungspolymerisation (ROP) von (*rac*)-BBL getestet. Wie im Zwischenbericht diskutiert, zeigte sich bei einem Umsatz von 90% eine Isotaktizität, wie sie im Ziel dieses Projektes formuliert wurde ($P_m = 0.65 - 0.80$).

Im weiteren Verlauf des Projekts wurde der Fokus auf die Analyse der Komplexstruktur gelegt (AP 1.2 -1.3). Eine andere Syntheseroute wurde für die Synthese einer Katalysatorspezies verwendet. Nach Aufreinigung durch Waschen mit Pentan wurde in Toluol- d_8 (*rac*)-BBL zugegeben und die Reaktion über ^1H -NMR-Spektroskopie verfolgt (siehe Schema 6 und Abbildung 8). Eine Abnahme der Signale für BBL, sowie des Initiators des Komplexes war sichtbar, zeitgleich war ein Ausfallen eines Feststoffes sichtbar, wobei es sich um kristallines PHB handeln könnte.

Die Reaktionslösung wird anschließend abdekantiert und der kristalline Feststoff für ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie in CDCl_3 gelöst. Über ^1H -NMR-Spektroskopie wurde bestätigt, dass es sich bei dem kristallinen Feststoff um PHB handelt. Über ^{13}C -NMR-Spektroskopie wurde die Mikrostruktur des erhaltenen Polymers bestimmt. Dabei kann sowohl das Carbonyl-Signal bei 169 ppm (siehe Abbildung 9 links) als auch das Methylen-Signal bei 40 ppm (siehe Abbildung 9 rechts) betrachtet werden. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit für *meso*-Verknüpfungen angegeben (P_m -Wert; *meso* = zwei nebeneinanderliegende Zentren mit derselben Anordnung) bestimmt. Berechnet wird dieser Wert über das Verhältnis zwischen dem isotaktischen Anteil des Polymers (*mm*- und *rm*-Anteil) und dem syndiotaktischen Anteil (*rr*- und *mr*-Anteil). Nach Waschen mit Methanol konnten leichte Verunreinigungen entfernt werden und es wurde ebenfalls PHB mit einer Isotaktizität erhalten, wie sie im Ziel des Projektes formuliert wurde.

GPC-Studien zeigten, dass bei dieser Aktivierung, und auch bei anderen versuchten Aktivierungen der PDI sehr breit ist und/oder die Reaktion sehr langsam ist.

3.3.3 AP 2.3

Da es uns bisher nicht möglich war eine zufriedenstellende Aktivierung zu erlangen, haben wir uns als nächstes mit Änderungen in der Ligandenstruktur befasst.

Auch bei diesem Liganden wurden zunächst NMR-Studien durchgeführt, aber es zeigte sich, dass mehrere Spezies entstehen.

3.4 Bewertung der Ergebnisse und Zusammenfassung

Im chemischen Teil dieses Projektes sollte durch eine neue Komplexstruktur die stereoselektive Ringöffnungspolymerisation von racemischem BBL (*rac*-BBL) zu (*R*)-isotaktisch-angereichertem bis isotaktischem PHB realisiert werden. Alle verwendeten Katalysatoren waren aktiv in der Ringöffnungspolymerisation von *rac*-BBL. Die Mikrostrukturanalyse über ¹³C-NMR-Spektroskopie bestätigte, dass isotaktisch-angereichertes PHB mit unterschiedlichen Taktizitäten erhalten wurde. Einige PHB Proben besaßen dabei genau die Taktizität, wie sie im Ziel dieses Projektes formuliert wurde. Weitere Aktivitätsstudien und Untersuchungen der Mikrostruktur wurden im weiteren Verlauf des Projektes durchgeführt, die Polydispersitäten und Aktivitäten konnten dabei nicht weiter optimiert werden. Die Arbeiten im Arbeitspaket 1 lagen bis Punkt 2.2 exakt im Zeitplan. Punkt 2.3, der sich mit den Optimierungen an dem Katalysator und an den Polymerisationsparametern befasst hat, konnte nicht vollständig durchgeführt werden, da eine Optimierung nicht erreicht werden konnte. Arbeitspaket 2 wurde entgegen des Zeitplans nicht durchgeführt, da kein (*R*)-BBL bereitgestellt wurde. (Begründung siehe enzymatischer Teil; AP4).

3.5 Voraussichtlicher Nutzen

Durch die erfolgreiche Synthese von isotaktischem PHB in diesem AP, wurde der erste Schritt zu einer ersten bioabbaubaren Alternative zu Polypropylen erfolgreich realisiert. Weitere Schritte sind jedoch notwendig um die Synthese weiter zu optimieren und die Kosten dieses Prozesses zu senken.

3.6 Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Katalysatoren aktiv in der Ringöffnungspolymerisation von racemischem BBL sind. Sie sind die ersten homogenen Katalysatoren, die in der Lage sind isotaktisches und isotaktisch-angereichertes PHB zu produzieren. Daher wurden die wichtigsten Schritte für dieses Projekt im Arbeitspaket 1 erfolgreich realisiert.

Der Zeitplan in diesem Arbeitspaket wurde eingehalten. Wenige Synthesen sind im weiteren Verlauf des Projektes noch notwendig (AP1 Punkt 1.3) um z.B. gezielt Aktivierungen durchführen zu können, oder den Liganden noch zu Ende herzustellen. Außerdem könnten noch Studien durchgeführt werden um durch die Temperatur, Lösemittel etc. die Aktivität des Katalysators sowie die Taktizität des Polymers zu steuern. Außerdem muss noch weitergehend untersucht werden, welches Enantiomer des Katalysators welches Enantiomer des Monomers einbaut. Dafür werden die Polymerisationen nur mit (*R*)-BBL durchgeführt, um zu untersuchen welcher Katalysator diese reine Form des Butyrolactons polymerisieren kann.

4 Direkte Polymerisation von chiralem BBL (AP2)

AP2 wurde nicht durchgeführt, da kein (*R*)-BBL bereitgestellt wurde. Begründung siehe AP4.

5 Enzymatischer Teil

5.1 Planung und Ablauf der Arbeiten

5.1.1 Direkte asymmetrische Ringöffnungspolymerisation aus Lacton (AP3)

AP3: Bei der Lipasekatalysierten ROP sollten zunächst kommerziell erhältliche Lipasen auf ihre Eignung analysiert werden. Damit sollte gewährleistet werden, dass eine rasche Umsetzung der Ergebnisse möglich wird. Gleichzeitig sollten in diesem Stadium nötige Anpassungen vorgenommen werden, die die Analyse von Variantenbibliotheken mit hohem Durchsatz ermöglichen. Ausgewählte Enzyme sollten dann basierend auf Kristallstrukturen oder anhand der Erstellung von Strukturmodellen einer Mutagenese unterzogen werden. Anschließend sollten die erhaltenen Varianten rekombinant exprimiert und analysiert werden, um Enzyme mit besonders hoher Enantioselektivität und niedriger Abbruchrate zu erhalten.

Es war literaturbekannt, dass die Lipase-katalysierte ROP von *rac*-BBL aufgrund frühzeitigen Kettenabbruchs nur zu geringen Molekulargewichten führt^[12]. Des Weiteren war bekannt, dass durch die Verwendung von (*R*)-angereichertem BBL höhere Molekulargewichte erreicht werden können^[13]. Es wurden daher zunächst kommerzielle Lipasen getestet, um die Ergebnisse zu reproduzieren und für nachfolgende Vergleiche die erzielbaren Molekulargewichte der Polymere zu ermitteln. Zur Analyse von Variantenbibliotheken wurden ein colorimetrischer Assay sowie eine chirale Gaschromatographie-Methode etabliert.

5.1.2 Bereitstellung des enantiomerenreinen R-Lactons durch enzymatische Racematspaltung (AP4)

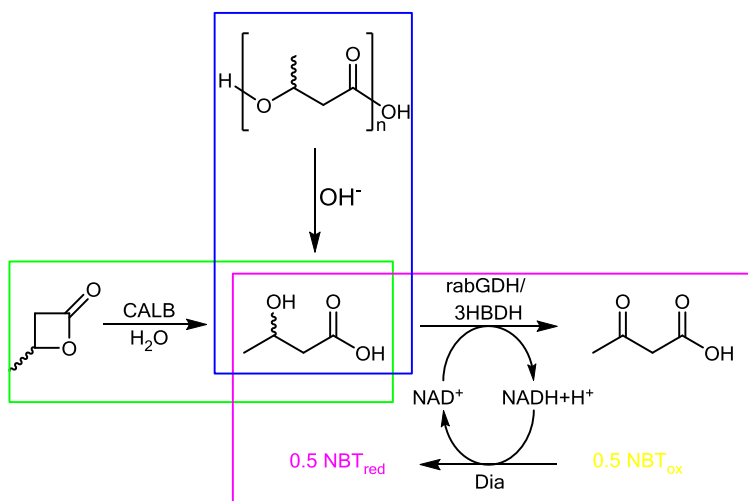
AP4: Die Lipasen aus AP3 und weitere Esterasen sollten parallel auf ihre Eignung zur selektiven Hydrolyse des *S*-Enantiomers geprüft werden. Zusätzlich sollten die Enzyme 3-(*S*)-Hydroxybutyratdehydrogenase, NADH-Oxidase und eine Acetoacetatdecarboxylase hergestellt werden. Mit diesen Enzymen sollte dann die Kaskade zur Umwandlung des (*S*)-BBL in Aceton und CO₂ etabliert werden.

Neben der Untersuchung der selektiven Hydrolyse des (*S*)-BBL wurde eine geeignete Methode zur Analytik etabliert. Des Weiteren wurden die Enzyme 3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase (zur Oxidation der (*R*)-3-Hydroxybuttersäure), L-Gulonat 3-Dehydrogenase und Serin 3-Dehydrogenase, welche neben ihren natürlichen Substraten auch die (*S*)-3-Hydroxybuttersäure oxidieren, sowie Acetoacetat Decarboxylase hergestellt. Mittels HPLC-Analytik wurden die Zwischenprodukte der Kaskade analysiert und optimale Reaktionsbedingungen bestimmt. Das Endprodukt Aceton konnte mittels Headspace Gaschromatographie detektiert werden. Die Kaskade wurde erfolgreich in organisches Medium übertragen, wobei die entsprechenden Enzyme immobilisiert wurden. Ein anschließendes Upscaling wurde ebenfalls erfolgreich durchgeführt.

5.2 Angewendete Methoden und Fortschritte

5.2.1 Direkte asymmetrische Ringöffnungspolymerisation aus Lacton (AP3)

Die ROP von *rac*-BBL wurde mit verschiedenen kommerziellen Lipasen durchgeführt und die erhaltenen Polymere über Gelpermeationschromatographie (GPC) auf ihr Molekulargewicht untersucht. Die PPL lieferte das höchste gewichtsmittlere Molekulargewicht. Dieses liegt mit $8,21 \cdot 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ höher, als in der Literatur bekannte ermittelte Molekulargewichte mit bis zu $7,3 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$. Die genaue Zusammensetzung der Monomere konnte durch die Analyse der Methylester mittels chiraler Gaschromatographie (chirale stationäre Phase aus Cyclodextrin von MEGA s.n.c.) und Detektion über FID erfolgen. Hinsichtlich einer Anpassung auf Hochdurchsatzscreening wurde ein schnelleres, photometrisches Verfahren etabliert. Dieses beruht auf den beiden Enzymen L-Gulonat 3-Dehydrogenase (*rabGDH*) aus *Oryctolagus cuniculus* und 3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase (*3HBDH*) aus *Rhodobacter sphaeroides*, welche in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Diese Enzyme oxidieren jeweils das (*S*)- bzw. (*R*)-3HB Enantiomer und führen so zu einer Farbreaktion (siehe Schema 9), welche mittels Kalibrierung quantifiziert werden kann. Außerdem wurden diese Enzyme im weiteren Arbeitspaket bei der Herstellung von enantiomerenreinem (enantiomerenangereichertem) BBL verwendet. Des Weiteren wurde die für den Assay notwendige Diaphorase zur Verfügung gestellt. Mittels dieses Assays konnten die Monomerzusammensetzung der Polymere (via Hydrolyse) sowie die Enantioselektivität der Lipase-katalysierten Hydrolyse (AP4) ermittelt werden.

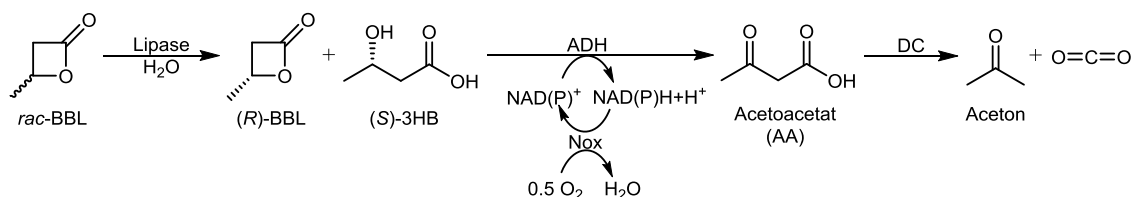


Schema 2: Reaktionsschema der Lipase-katalysierten Hydrolyse (grüne Box), der Hydrolyse von PHB (blaue Box) und der anschließenden separaten Detektion der Hydrolyseprodukte mittels NBT-Dia Assay (lila-farbene Box) im Mikrotiterplattenformat.

5.2.2 Bereitstellung des enantiomerenreinen (*R*)-Lactons durch enzymatische Racematspaltung (AP4)

Mittels ¹H-NMR-Analytik wurde die nicht-selektive Hydrolyse von *rac*-BBL in wässriger angesäuerter Lösung (reines D₂O, pH 6, pH 4 und pH 2) untersucht. Daraus ergab sich, dass innerhalb von 2 h etwa 10 % *rac*-BBL hydrolysierten, nach 24 h lag die Hälfte hydrolysiert vor.

Die Reaktion musste daher in hauptsächlich organischem Medium stattfinden, um die nicht-selektive Hydrolyse zu vermeiden. Die Reaktionskaskade zur Bereitstellung von (*R*)-angereicherterem BBL ist in Schema 10 dargestellt.



Schema 3: Reaktionsschema der Enzymkaskade für die Racematspaltung von *rac*-BBL durch Hydrolyse und Abbau des unerwünschten (*S*)-BBL zu Aceton und CO₂.

Es wurde eine (*S*)-selektive CALB (CALB immo Plus, c-LEcta, Leipzig, DE) identifiziert, welche im Reaktionsverlauf (*R*)-BBL durch Hydrolyse des (*S*)-BBL anreicherte. Dies wurde über GC-FID mittels chiraler Trennsäule analysiert. Jedoch nahm die eingesetzte Konzentration an (*R*)-BBL bei zu langer Reaktionszeit ab, da hier ebenfalls Hydrolyse stattfand. Die Lipase-katalysierte Hydrolyse wurde daher in reines organisches Lösungsmittel (MTBE) übertragen und die Konzentration an *rac*-BBL im Reaktionsansatz von 5 mM auf 50 mM erhöht sowie die Lipasemenge verdoppelt. Somit konnte mittels der gewählten CALB das (*S*)-BBL enantioselektiv hydrolysiert werden und das (*R*)-BBL im Reaktionsverlauf angereichert werden. Für die folgenden Reaktionsschritte wurden passende Enzyme in *E. coli* überproduziert. Die Enzyme wurden über His-Tag gereinigt und die kinetischen Parameter der Enzymlösungen photometrisch bestimmt. Für den Einsatz in organischem Lösungsmittel wurden die Enzyme auf ihre verbleibende Aktivität bzw. ihren Umsatz im Zweiphasensystem MTBE:Puffer getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Enzyme in Anwesenheit von organischem Lösungsmittel aktiv sind. Die rabGDH-Rkt. verläuft in der untersuchten Reaktionszeit nicht vollständig ab, kann jedoch durch den ADC-Einsatz verbessert werden, da hierbei das Gleichgewicht der Reaktion verschoben wurde. Die 3HBDH-Rkt. verlief ohne ADC-Zugabe ähnlich zur rabGDH-Rkt. Der Einsatz von ADC ermöglichte einen nahezu quantitativen Umsatz. Im Verlauf der Kaskadenreaktion reicherte sich das (*R*)-BBL durch Hydrolyse des (*S*)-BBL von einem anfänglichen Anteil an Gesamt-BBL von 53 % (Standard) auf 100 % nach 23 h an. Die tatsächliche Menge an (*R*)-BBL hatte sich im Vergleich zum Anfang nach 23 h auf etwa die Hälfte (55 %) reduziert; das (*S*)-BBL wurde komplett hydrolysiert. Bezüglich der Hydrolysereaktion war daher eine kürzere Reaktionsdauer vorteilhaft, um geringere Mengen an (*R*)-BBL zu hydrolysieren. Die Bildung von Aceton erfolgte nicht vollständig (1 mM Aceton bei 2,38 mM hydrolysiertem BBL nach 4 h). Die separate Untersuchung der Decarboxylierungsreaktion ergab schon nach kurzen Reaktionszeiten einen vollständigen Umsatz. Möglicherweise inhibierte eine hohe Konzentration an NAD⁺ bzw. an gebildetem NADH das Enzym und die Oxidationsreaktion findet trotz des Einsatzes an ADC, welche das Gleichgewicht der Reaktion verschiebt, nicht vollständig statt. Daher kam eine Cofaktorregenerierung (NADH-Oxidase aus *Lactobacillus pentosus*) zum Einsatz. Dadurch wurde der (bislang überstöchiometrische) Einsatz von NAD⁺ im Kaskadengemisch reduziert und der Gesamtprozess konnte zudem kostengünstiger ablaufen. Der Einsatz von *LpNox* und einer geringeren Konzentration an NAD⁺ führte zu einer höheren Konzentration an gebildetem Aceton. Jedoch waren die Produktkonzentrationen insgesamt geringer, als bei vorigen Mes-

sungen. Die Ursache dafür konnte auf die Verschlechterung der Enzymaktivität (v.a. rabGDH) mit längerer Lagerung zurückgeführt werden.

Aus diesem Grund und der geplanten Übertragung der Reaktion in organisches Medium (zur Vermeidung der nicht-selektiven Hydrolyse des *rac*-BBL) erfolgte eine Immobilisierung der Kaskadenenzyme. Die immobilisierten Enzyme wurden anschließend in Reaktionen eingesetzt und diese mittels GC-MS HS analysiert. Hierbei zeigte sich, dass mit unterstöchiometrischen Mengen Cofaktor und Cofaktorrecycling höhere Produktausbeuten erzielt werden konnten. Mit den immobilisierten Enzymen zeigte sich bei gleicher Enzymmenge im Reaktionsgemisch keine Produktbildung. Die rabGDH wurde daraufhin mit anderen Verfahren immobilisiert. Basierend auf der Cofaktormenge wurde damit ein Umsatz von bis zu 60 % für die freie Enzymlösung sowie die Immobilisierung auf dem Epoxyträger möglich. Der Einschluss in PVA/PEG lieferte nur 30 % Umsatz und damit nur halb so viel, wie die freie Enzymlösung. Für die Verwendung in reinem organischem Medium musste der Cofaktor zusammen mit den Enzymen der Racematspaltung coimmobilisiert werden. Daher wurde ein weiteres Verfahren der Enzymimmobilisierung getestet. Hierbei kam ein Superabsorber (Favor SXM) von Evonik Industries AG (Essen, DE) zum Einsatz. Die Coimmobilisierung von Cofaktor und rabGDH war auf dem Epoxyträger nicht möglich. Es fand keine Reaktion statt. Für den Einschluss in PVA/PEG und den Superabsorber war dies möglich. Für den Superabsorber ergaben sich dabei die höchsten Acetonkonzentrationen des Experiments. Mit der rabGDH wurde trotz Variation bzw. Erniedrigung des Cofaktors und dem Einsatz eines Cofaktorregenerationssystems dennoch immer nur bis 70 % Aceton gebildet. Daher wurde aufgrund von mangelnder Aktivität / Stabilität / Gleichgewichtslage nach einem alternativen Enzym gesucht. Die Literaturrecherche ergab eine L-Serin Dehydrogenase, welche neben ihrem natürlichem Substrat L-Serin auch promiskuitiv gegenüber 3HB ist. Nach Expression und Reinigung wurden die verschiedenen Dehydrogenasen (3HBDH gegenüber (*R*)-3HB und SerDH gegenüber (*S*)-3HB) auf möglichen vollständigen Umsatz untersucht. Als Regenerationssystem kamen die *LpNox*, sowie eine Lactat-Dehydrogenase (LDH) zum Einsatz, um den gegebenenfalls limitierenden O₂ für die Regeneration auszuschließen. Insgesamt ergaben beide Regenerationssysteme ähnliche Umsätze. Somit lag der nicht-vollständige Umsatz nicht an einer O₂-Limitierung der *LpNox*. Für die 3HBDH-Reaktion zeigten sich nach kürzerer Zeit schon höhere Umsätze, jedoch war hier die Enzymaktivität auch 100-fach höher. Insgesamt erreichte die 3HBDH 90 % Umsatz. Die SerDH zeigte für die niedrigere Substratkonzentration bis 80 % Umsatz, für die höhere bis 70 %. Somit waren auch keine höheren Umsätze als mit der rabGDH möglich. Auch für die 3HBDH-Reaktion war kein Vollumsatz erreicht. Der Vorteil der SerDH gegenüber der rabGDH war allerdings, die ebenfalls promiskuitive Aktivität gegenüber dem (*R*)-Enantiomer. So können für die Racematspaltung auch geringe Mengen an hydrolysiertem (*R*)-BBL abgebaut werden. Des Weiteren besitzt dieses Enzym insgesamt eine höhere Aktivität.

Um nun den Flaschenhals des nicht-vollständigen (*S*)-3HB-Abbaus zu AA und später Aceton zu identifizieren, wurde die SerDH-Reaktion mittels HPLC analysiert. Die HPLC-Messungen deuteten auf einen vollständigen Umsatz des (*S*)-3HB zu Aceton hin. Die Konzentration des Substrats 3HB nahm über den Reaktionsverlauf ab, während das Intermediat AA kurzzeitig zunahm und später wieder abnahm. Somit konnte über die Intermediate die Vollständigkeit der Reaktion gezeigt werden.

5.3 Bewertung der Ergebnisse und Zusammenfassung

Im biotechnologischen Teil dieses Projektes sollte eine enzymatische Racematspaltung zur Anreicherung des (*R*)-BBL aus *rac*-BBL erfolgen. Hierbei sollte das unerwünschte Enantiomer enzymatisch zu Aceton und CO₂ abgebaut werden, um eine einfache Abtrennung vom Produkt zu ermöglichen. Hier war es möglich, für jeden Reaktionsschritt ein geeignetes Enzym zu identifizieren. Die Hydrolyse des *rac*-BBL erfolgte mit einer kommerziellen Lipase (CALB Immo plus, c-LEcta, Leipzig, DE), wobei die gewünschte (*S*)-Selektivität vorliegt. Diese Reaktion ist in organischem Lösungsmittel (MTBE) möglich, was nötig ist, um die nicht-selektive Hydrolyse zu unterbinden. Die weiteren Enzyme, Dehydrogenasen (L-Gulonat 3-Dehydrogenase & L-Serin 3-Dehydrogenase sowie 3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase zur Oxidation der (*S*)-/(*R*)-3HB) und eine Acetoacetat Decarboxylase wurden kloniert, exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Außerdem kam eine NADH-Oxidase zur Cofaktorregenerierung zum Einsatz. Die Enzyme wurden in einem one-pot *in vitro* Reaktionsansatz auf die Racematspaltung des (*S*)-BBL und dem anschließendem Abbau zu Aceton und CO₂ getestet. Hierbei konnte über GC-MS HS Messungen gezeigt werden, dass das Produkt Aceton gebildet wird. Die Analytik der Intermediate mittels HPLC-Messungen deutete Vollumsatz an. Die Immobilisierung der Enzyme auf Superabsorber war erfolgreich und so konnten diese in organischem Medium eingesetzt werden und die Racematspaltung erfolgreich durchgeführt werden. Somit wurde (*R*)-angereichertes BBL aus *rac*-BBL bereitgestellt, welches für die anschließende Ringöffnungspolymerisation zu PHB zur Verfügung steht.

Bei der Bearbeitung des AP3 zur direkten asymmetrischen Ringöffnungspolymerisation aus Lacton konnte ein enzymatischer colorimetrischer Assay zur Verfügung gestellt werden, um die Monomierzusammensetzung ((*R*)- bzw. (*S*)-3HB) des PHB im Hochdurchsatz bestimmen zu können. Des Weiteren wurde eine GC-FID Analytik etabliert, mit der das PHB nach Methanolyse auf die prozentuale Zusammensetzung aus (*R*)- bzw. (*S*)-3HB untersucht werden kann. Erste Polymerisationen des *rac*-BBL mit kommerziellen Lipasen lieferten hohe Molekulargewichte.

5.4 Voraussichtlicher Nutzen

Durch die erfolgreiche CALB-katalysierte enantioselektive Hydrolyse von *rac*-BBL konnte reines (*R*)-BBL bereitgestellt werden. Ein Upscaling ermöglichte es das Monomer für die Polymersynthese zur Verfügung zu stellen. Die anschließende Reaktionskaskade zum Abbau des Hydrolyseprodukts zu Aceton und CO₂ ermöglicht eine einfache Abtrennung. Die Enzyme der Kaskadenreaktion wurden für den Einsatz im organischen Lösungsmittel immobilisiert. Somit konnte die Reaktion im wasserfreien Medium durchgeführt werden, um die spontane, nicht-enantioselektive Hydrolyse zu vermeiden.

Für die Analyse der Monomere wurde eine GC-Analytik entwickelt, mit dem der Anteil der Enantiomere im Polymer nach Methanolyse bestimmt werden kann. Des Weiteren kann im Hochdurchsatz mittels eines colorimetrischen Enzymassays ebenfalls der Anteil der beiden Enantiomere im Polymer nach Hydrolyse bestimmt werden.

5.5 Ausblick

Es konnte die erste enzymatische Racematspaltung von *rac*-BBL gezeigt werden, welche zur Anreicherung des (*R*)-BBL führt und für die Polymerisation zu (*R*)-angereichertem PHB zur Verfügung steht. Das Hydrolyseprodukt wurde zum leicht abtrennbaren Aceton und CO₂ umgewandelt. Somit wurden die Punkte im Arbeitspaket 4 erfolgreich bearbeitet.

Für die direkte ROP aus *rac*-BBL (AP 3) wurden geeignete kommerzielle Lipasen auf ihre Eignung identifiziert. Hierfür ist eine etablierte GPC-Methode für die Analytik der Polymere vorhanden. Des Weiteren wurde eine Screeningmethode zur Untersuchung der Monomere im Polymer etabliert. Dies beruht zum einen auf der GC-Analytik sowie zum anderen in einem enzymatischen colorimetrischen Assay, welcher für Hochdurchsatz geeignet ist. Diese beiden Methoden erlauben es zukünftige Lipasevarianten zu screenen, welche veränderte Enantioselektivitäten aufweisen und (*R*)-angereichertes PHB aus *rac*-BBL herstellen bzw. PHB mit höheren Molekulargewichten zu generieren.

6 Fermentation von CO₂

Als Stämme für die geplanten Fermentationen wurden *C. necator* und *Ideonella* spp. ausgewählt und anschließend geeignete Kultivierungsbedingungen anhand von Literaturangaben recherchiert. Zeitgleich wurde die für die Fermentationen vorgesehene Reaktoranlage in Betrieb genommen. Aktuell werden seitens des Unterauftragnehmers noch Experimente durchgeführt, sodass noch kein abschließender Bericht erstellt werden konnte.

7 Patente

Durch die Ergebnisse, die im Arbeitspaket 1 erarbeitet wurden, wurde am 23. Dezember 2017 ein Patent unter dem Titel „Process for polymerizing β -Butyrolactone“ eingereicht. Da diese Patentschrift noch nicht veröffentlicht ist unterliegt der gesamte Abschlussbericht der **Geheimhaltung**.

7.1 Posterbeiträge

Steiner L., Sperl J., Sieber V.; Posterbeitrag; Synthesis of biopolymers using CO₂, COST Training School „Systems Biocatalysis“, Siena, Italien, 2016

Steiner L., Sperl J., Sieber V.; Posterbeitrag; Lipase-Catalyzed Hydrolysis of *rac*-BBL for Synthesis of (*R*)-enriched PHB, BioTrans 2017 – 13th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Budapest, Ungarn, 2017

Sperl J., Steiner L., Sieber V.; Posterbeitrag: Lipase-Catalyzed Hydrolysis of *rac*-BBL for Synthesis of (*R*)-enriched PHB, MECP 2018, Trondheim, Norwegen, 2018

Steiner L., Sperl J. M., Sieber V.; Posterbeitrag; Enzymatic chiral resolution of *rac*-BBL for synthesis of (*R*)-enriched PHB, Gordon Research Seminar „Biocatalysis“, Biddeford, ME, USA, 2018

Steiner L., Sperl J. M., Sieber V.; Posterbeitrag; Enzymatic chiral resolution of *rac*-BBL for synthesis of (*R*)-enriched PHB, Gordon Research Conference „Biocatalysis“, Biddeford, ME, USA, 2018

Steiner L., Sperl J. M., Sieber V.; Posterbeitrag; Lipase-Catalyzed Hydrolysis of *rac*-BBL for Synthesis of (*R*)-enriched PHB, 6. Kooperationsforum Biopolymere, Straubing, Deutschland, 2018

7.2 Publikationen

Haslböck, M., Klotz, M., Steiner, L., Sperl, J., Sieber, V., Zollfrank, C., van Opdenbosch, D. (2018). Structures of Mixed-Tacticity Polyhydroxybutyrates. *Macromolecules* 51 (14): 5001-5010.

8 Literaturverzeichnis

[1] Plastics Europe, *Plastics – the Facts*, **2012**.

[2] A. Morschbacker, *Polym. Rev.* **2009**, 49, 79–84.

[3] Rieger et al., *Adv. Polym. Sci.* 2012, 245, 49-90.

[4] K. Sudesh, H. Abe, *Progress in Polymer Science* **2000**, 25, 1503-1555.

[11] Ajellal, N.; Bouyahyi, M.; Amgoune, A.; Thomas, C. M.; Bondon, A.; Pillin, I.; Grohens, Y.; Carpentier, J.-F., *Macromolecules* **2009**, 42 (4), 987-993.

[12] S. Matsumara, Y. Suzuki, K. Tsukada, K. Toshima, Y. Doi, and K. Kasuya, "Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of β -Butyrolactone to the Cyclic and Linear Poly(3-hydroxybutyrate)," *Macromolecules*, vol. 31, no. 19, pp. 6444–6449, 1998.

[13] Y. Suzuki, S. Taguchi, T. Saito, K. Toshima, S. Matsumara, and Y. Doi, "Involvement of Catalytic Amino Acid Residues in Enzyme-Catalyzed Polymerization for the Synthesis of Polyesters," vol. 2, pp. 541–544, 2001.

9 Anhang

9.1 Methoden biotechnologischer Teil

9.1.1.1 Photometrische Bestimmung v_{\max} und K_m

NAD(P)H-abhängige Reaktionen wurden bei 340 nm verfolgt, die Abnahme von Acetoacetat bei 290 nm. Die Enzyme rabGDH und 3HBDH wurden in 100 mM HEPES pH 7,5 getestet, SerDH bei 200 mM Tris pH 9, *LpNox* bei 50 mM Tris pH 7,5 und ADC bei 100 mM KP_i pH 6,3. Mittels dieser Werte wurden Michaelis-Menten Kinetiken aufgenommen und die kinetischen Parameter v_{\max} und K_m bestimmt. Für die Oxidationsreaktion wurden verschiedene Enzyme identifiziert. Die Oxidation des (*R*)-3HB-Enantiomers findet NAD⁺-abhängig mit einer 3-Hydroxybutyratdehydrogenase (3HBDH) statt. Hierfür wurde die auf *E. coli* optimierte Gensequenz aus *Rhodobacter sphaeroides* in pET24a(+) kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3) überproduziert. Nach anschließender Proteinreinigung über Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) wurde v_{\max} zu durchschnittlich 45 U mg⁻¹ und K_m zu 0,8 mM bestimmt. Für die Oxidation des (*S*)-Enantiomers wurde die promiskuitive L-Gulonat 3-Dehydrogenase identifiziert. Dieses Enzym toleriert neben dem natürlichen Substrat L-Gulonat weitere (*S*)-3-Hydroxysäuren. Die Gensequenz aus *Oryctolagus cuniculus* wurde für *E. coli* optimiert, in pET24a(+) kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3) überproduziert. Nach der Proteinreinigung wurden die kinetischen Parameter v_{\max} und K_m zu durchschnittlich 0,6 U mg⁻¹ und 0,6 mM bestimmt. Außerdem wurde die Serin 3-Dehydrogenase gefunden, welche neben dem natürlichen Substrat L-Serin weitere 3-Hydroxysäuren akzeptiert. Als Substrat werden hauptsächlich die (*S*)-Enantiomere akzeptiert, jedoch ist für 3HB auch eine Aktivität gegenüber dem (*R*)-Enantiomer vorhanden. Das Enzym wurde aus *Saccharomyces cerevisiae* in pET28a(+) mit N-terminalem His-Tag kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3) überproduziert. Nach Reinigung über IMAC betrug v_{\max} durchschnittlich 4,8 U mg⁻¹ und K_m 35 mM. Für die Decarboxylierung wurde eine Acetoacetat Decarboxylase aus *Clostridium acetobutylicum* in pET24a(+) kloniert und nach Überproduktion in *E. coli* BL21 (DE3) über IMAC gereinigt. v_{\max} betrug durchschnittlich 300 U mg⁻¹ und K_m 19 mM. Für die Regenerierung des Cofaktors wurde die NADH-Oxidase aus *Lactobacillus pentosus* gewählt. Nach Reinigung betrug v_{\max} durchschnittlich 84 U mg⁻¹ und K_m 0,08 mM.

9.2 Arbeitspakete

Arbeitspakete		Jahr 1				Jahr 2				Jahr 3			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	Stereoselektive Polymerisation von <i>rac</i>-BBL												
1.1	Systematisierung der literaturbekannten Katalysatoren												
1.2	Entwicklung neuer Katalysatoren auf Seltenerdmetall-Basis												
1.3	Optimierung der Systeme in Bezug auf Enantioselektivität und Aktivität												
2	Direkte Polymerisation von chiralem BBL												
2.1	Systematisierung der literaturbekannten Katalysatoren												
2.2	Entwicklung neuer Katalysatoren auf Seltenerdmetall-Basis												
2.3	Optimierung der Systeme in Bezug auf Enantioselektivität und Aktivität												
3	Direkte asymmetrische Ringöffnungspolymerisation aus Lacton												
3.1	Analyse kommerzieller Lipasen												
3.2	rek. Produktion ausgewählter Lipasen und Optimierung Bedingungen												
3.3	Mutagenese basierend auf Strukturmodellierung												
3.4	Screening verbesserter Lipasen												
4	Bereitstellung des eneantiomerenreinen R-Lactons durch enzymatische Racematspaltung												
4.1	Etablierung Enzymkaskade												
4.2	Fusion oxidative Enzyme incl. Cofaktor												
4.3	Prozessumsetzung (Immobilisierung, Upscaling)												
5	Fermentation von CO₂												
5.1/2	Stammauswahl, Fermentation und Optimierung												
5.3	Wirtschaftlichkeitsanalyse												