



Projektverbund
Ressourcenschonende
Biotechnologie

Projektverbund Ressourcenschonende Biotechnologie in Bayern

Abschlussveranstaltung am 22. November 2018 in
Garching

Biopolymere aus CO₂ Nachhaltige Wege zu PHB mit optimierten Eigenschaften

Prof. Dr. Volker Sieber

Technische Universität München

Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe

finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz

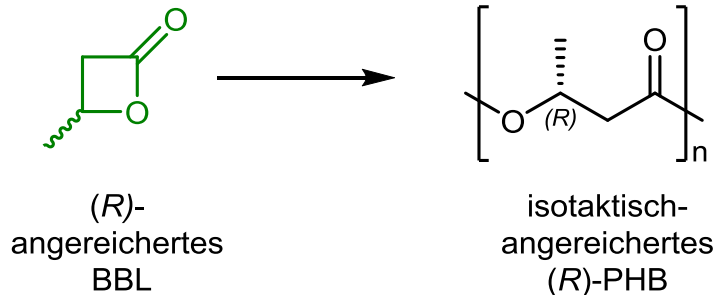
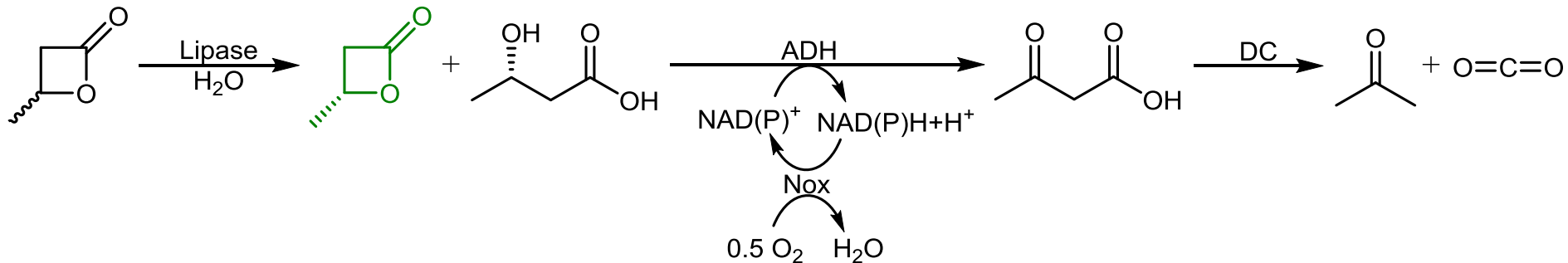


Projektübersicht

Biokatalytisches Verfahren

Biokatalytischer Weg zu isotaktisch-angereichertem (*R*)-PHB

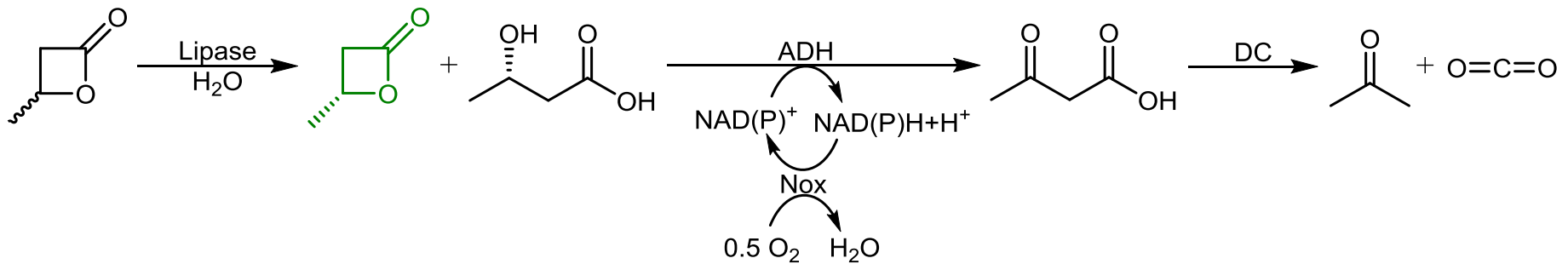
- Bereitstellung von enantiomerenreinem (*R*)-BBL via enzymatische Racematspaltung von *rac*-BBL



Lipase-katalysierte Racematspaltung

Biokatalytisches Verfahren

Enzymkaskade zum Abbau von (S)-BBL

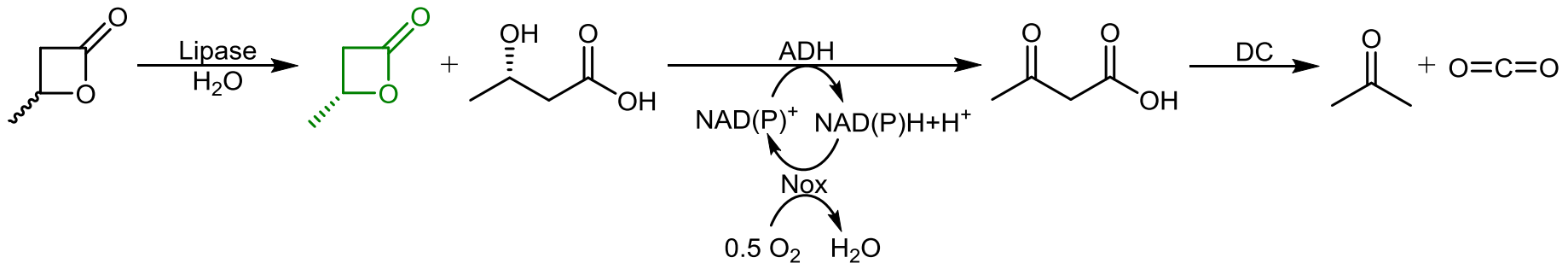


- Identifikation geeigneter Enzyme
- Enzymkaskade und Cofaktorregenerierung
- Immobilisierung für Einsatz in organischem Lösungsmittel
- Upscaling

Lipase-katalysierte Racematspaltung

Hydrolyse in H_2O

Verfolgung der Hydrolyse / Wasserstabilität von *rac*-BBL via 1H -NMR



- *rac*-BBL hydrolysiert in reinem oder saurem D_2O spontan zu 3HB
 - 2 h: 10 %; 24 h: 50 %

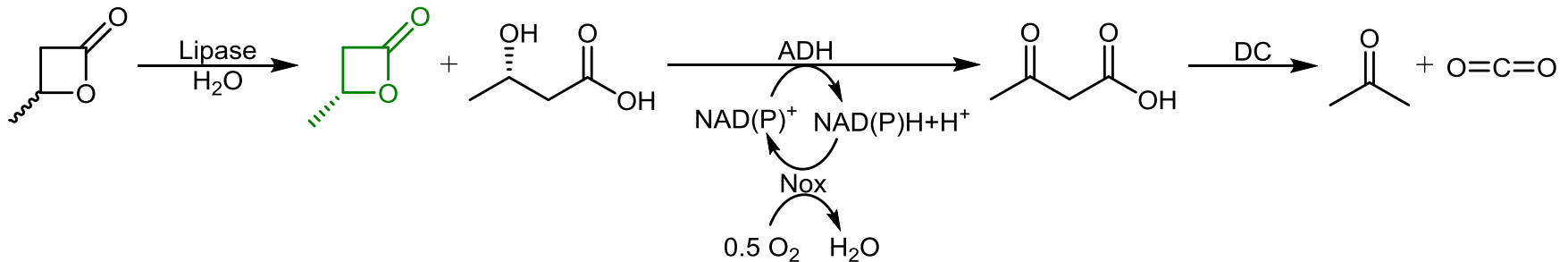
Optimierung Lipase-katalysierte Hydrolyse

- Analytik BBL-Enantiomere via GC-FID
- Identifizierung kommerzieller Lipase B aus *Candida antarctica* (CALB)
- Vollständige Hydrolyse (S)-BBL und geringe Verluste (R)-BBL
 - 30 °C, 500 mM *rac*-BBL, MTBE, 1 eq H_2O , 854 PLU CALB, 5 h

Abbau von (S)-3HB

ADH

Identifizierung geeigneter ADHs und Decarboxylasen



- Klonierung, Produktion, Reinigung und Charakterisierung verschiedener ADHs

	3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase (3HBDH)	L-Gulonat 3-Dehydrogenase (rabGDH)	Serin 3-Dehydrogenase (SerDH)
Substrat	(R)-3HB	(S)-3HB	(S)-3HB ((R)-3HB)
v _{max} [U mg ⁻¹]	45	0,6	4,8
K _m [mM]	0,8	0,6	35
Cofactor	NAD ⁺	NAD ⁺	NADP ⁺
pH Optima	7,5	7,5	9,0

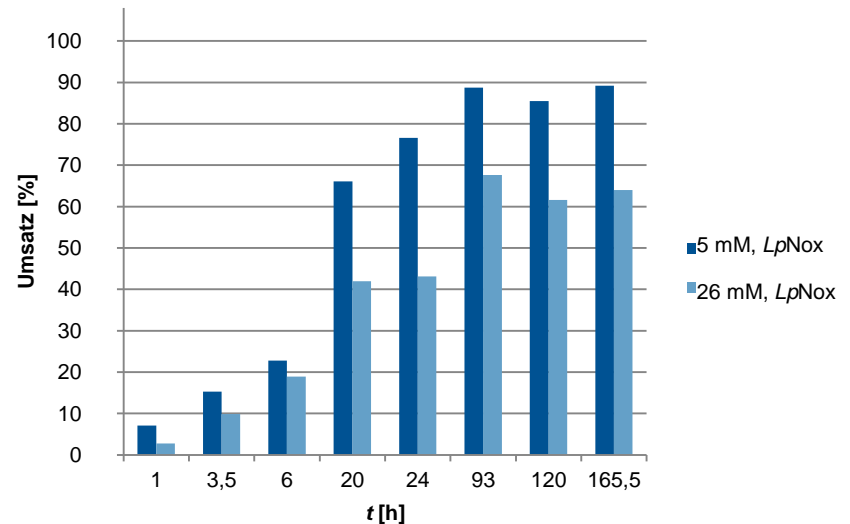
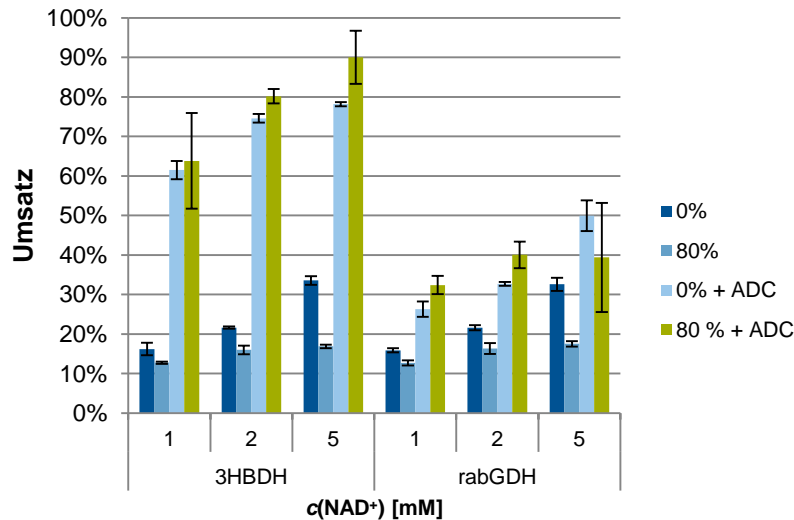
- Acetoacetat Decarboxylase (ADC) aus *Costridium acetobutylicum*
 - Immobilisierungsversuche: Trägermaterial aktiv in DC
 - Analytik via GC-MS HS von Aceton

Abbau von (S)-3HB

ADH

Reaktionsoptimierung

- Einsatz im Zweiphasensystem MTBE:Puffer
- Immobilisierung auf Superabsorber
- Einsatz in reinem MTBE
- NADH-Oxidase zur Cofaktorregenerierung



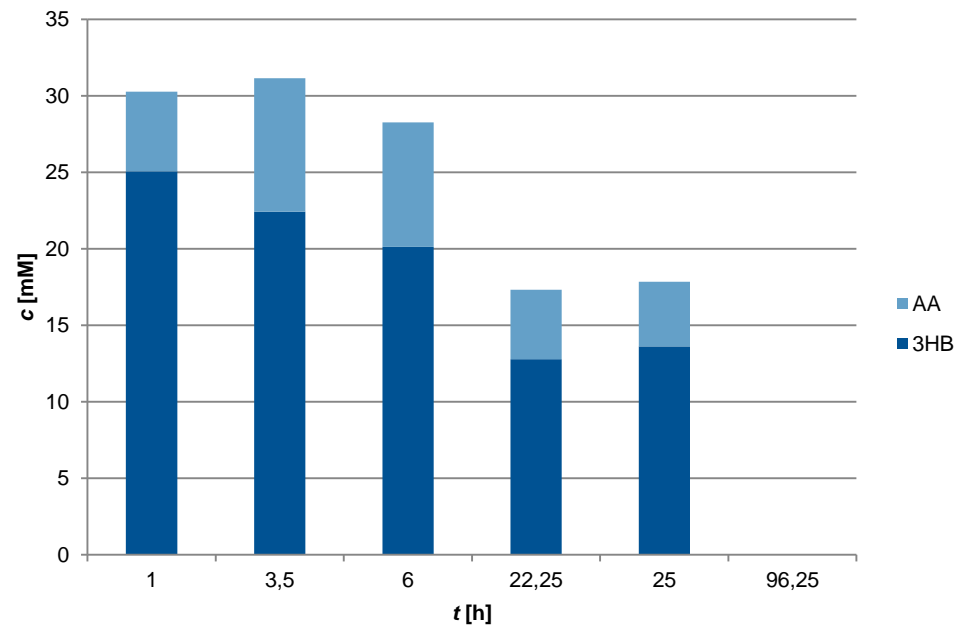
- Analytik via NADH-Absorption @ 340 nm bzw. GC-MS HS von Aceton

Abbau von (S)-3HB

ADH

Vollständigkeit der Enzymkaskade

- Schwierige Detektion/Quantifizierung des Kaskadenprodukt Aceton via HS
 - Kein Vollumsatz erreicht
- Detektion der Intermediate 3HB und AA via HPLC
 - Nachweis Vollumsatz



Upscaling

Destillative Abtrennung

- Reaktionsansatz mit optimierten Bedingungen
- Einsatz von 32,31 g *rac*-BBL
- Trennung von (*S*)-3HB durch Destillation
- Reinheit:
 - ee > 99 % (GC-FID)
 - > 99 % (¹H-NMR)
- Ausbeute:
 - 28 %

Zusammenfassung

Zusammenfassung

- ✓ Identifizierung, Charakterisierung & Bereitstellung der Enzyme für die Reaktionskaskade
- ✓ Immobilisierung & Übertrag der Enzymreaktionen in organisches Lösungsmittel
- ✓ Vollständiger Abbau von (*S*)-BBL & Anreicherung von (*R*)-BBL
- ✓ Erfolgreiches Upscaling zur Bereitstellung von (*R*)-BBL