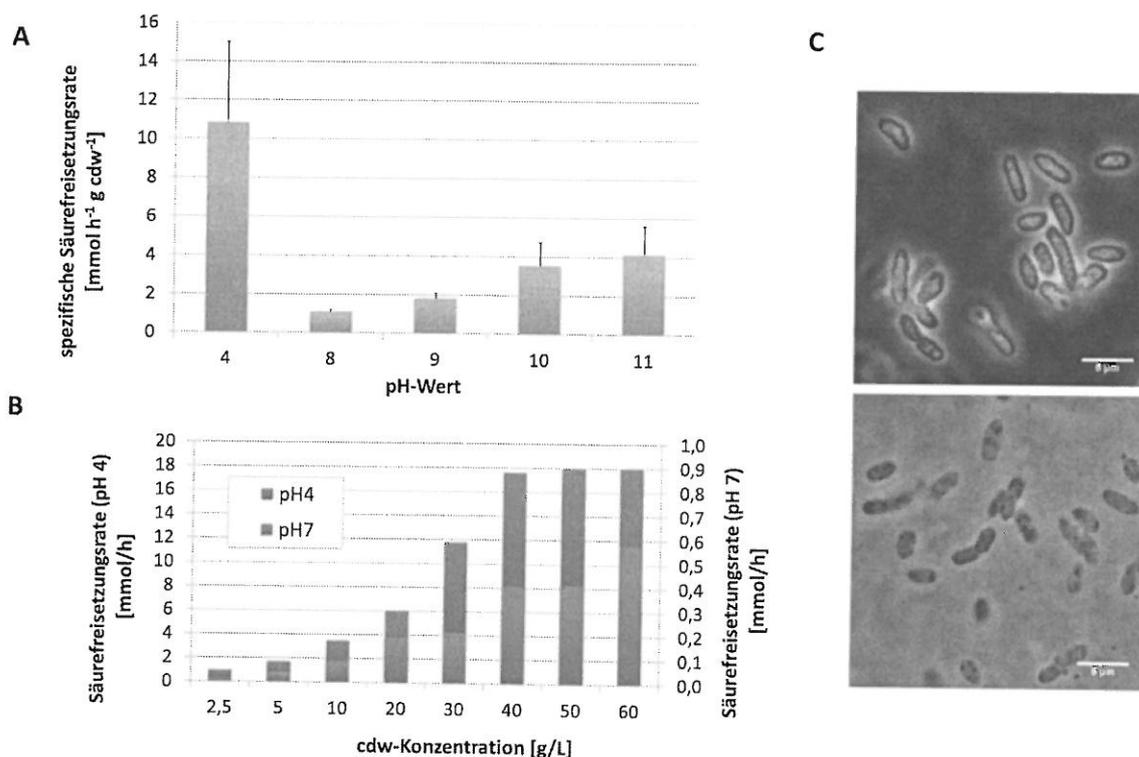


**Projektbericht: Synthons aus nachwachsenden Rohstoffen: Biotechnologische Produktion von (R)-3-Hydroxybuttersäure**  
**Prof. Dr. Dieter Jendrossek, Zentrum für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart**

Ziel des Projekts war es, (R)-3-Hydroxybuttersäure mit Hilfe von *Azohydromonas lata* (früher *Alcaligenes latus*) als Modelorganismus ausgehend von Saccharose herzustellen. Die prinzipielle Freisetzung von (R)-3-Hydroxyfettsäuren aus Mikroorganismen wurde in der Fachliteratur bereits für diverse (R)-3-Hydroxyfettsäuren beschrieben (Lee *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2009; Ruth *et al.*, 2007; Ruth *et al.*, 2008) (de Eugenio *et al.*, 2007; de Eugenio *et al.*, 2010) und konnte auch in unserem Labor bestätigt werden (Wang *et al.*, 2007).

Die Bedingungen zur Synthese und Speicherung von Poly[(R)-3-Hydroxybuttersäure] (PHB) in *A. lata* wurden optimiert (kombiniertes mineralisches Mineralmedium supplementiert mit komplexen Bestandteilen und 2% Saccharose). Dadurch gelang es *A. lata* Zellen mit  $\approx 90\%$  PHB Anteil am Zelltrochengewicht zu erhalten. Im Labormaßstab (1 L Schüttelkolben, batch Kultur) werden Zelldichten von etwa 20 g/L erreicht. Durch fed batch Verfahren, d. h. durch kontinuierliche Zuflüsse der jeweils limitierten Substanz kann die Zelldichte auf über 100 g/L gesteigert werden. Dieser Versuch wurde nicht weiter verfolgt, da das fed-batch Verfahren zur PHB Speicherung bereits etabliert ist und *A. lata* neben *Ralstonia eutropha* bereits zur industriellen Produktion von PHB eingesetzt wird. Kürzlich ist in Amerika die bisher größte Anlage zur Produktion von PHB ausgehend von Maisstärke mit einer maximalen Jahreskapazität von 50.000 t/a in Betrieb gegangen.

PHB-reiche Zellen (PHB > 80% cdw) von *A. lata* wurden im Labormaßstab im pH Statens bei verschiedenen (konstanten) pH Werten inkubiert und die Freisetzung von 3-Hydroxybuttersäure verfolgt. Aus der unten angegebenen Abb. ist ersichtlich, dass sowohl bei einen sehr niedrigen pH Wert von 4 als auch bei alkalischen pH Werten (pH 8-10) große Mengen an (R)-3-Hydroxybuttersäure freigesetzt werden. Die höchsten erzielten Werte betragen  $10,5 \text{ mmol } 3\text{HB h}^{-1} \text{ g cdw}^{-1}$  entsprechend von 1 g produzierter 3HB pro g cdw und Stunde (spezifische 3HB-Freisetzungsrates). Dieser hohe Wert ist durch die Aufnahme von einem Molekül Wasser pro 3HB-Einheit im Polymer im Zuge der Hydrolyse (= 20% Massezuwachs) sowie durch die rasche Reaktion von weniger als einer Stunde möglich. Bei alkalischen pH Werten (pH 8-11) war die spezifische Säurefreisetzungsrates zwar geringer ( $1,5 - 5 \text{ mmol h}^{-1} \text{ g cdw}^{-1}$ ), aber auch hier konnte ein quantitativer Umsatz des zuvor gespeicherten Polmers in 3HB festgestellt werden.



**Abb. 1:**

(A) Spezifischen Säurefreisetzungsrates in  $\text{mmol h}^{-1} \text{g cdw}^{-1}$  durch *A. lata*-Zellen bei pH 4 und pH 8-11. Zellen (PHB-Gehalt ca. 80 %) wurden dazu bei 1 g cdw/L und 37 °C im pH-Stat inkubiert. (B) Abhängigkeit der Säurefreisetzung von der Zelltrockengewichtskonzentration. Säurefreisetzungsrates bei pH 7 und pH 4 wurden für Anfangszelltrockengewichtskonzentrationen von bis zu 60 g/L bestimmt. (C) Nachweis des Verbrauchs von endogenem PHB durch Nilrotfärbung...

Für eine biotechnologische Produktion von 3HB ist es von Vorteil, mit möglichst hohen Biomassekonzentrationen zu arbeiten. Es wurde daher die Freisetzung von 3HB in Abhängigkeit von der eingesetzten Biomassekonzentration bestimmt. Dabei stellt sich heraus, dass bei pH 4 die 3HB spezifische 3HB-Freisetzungsrates weitgehend unabhängig von der Biomassekonzentration erfolgte und erst oberhalb von 40 g/L deutlich abnahm. Bei leicht alkalischen pH Wert war sogar eine schwache Zunahme der spezifische 3HB-Freisetzungsrates mit Zunahme der Biomassekonzentration festzustellen. So wurde für pH 8 bei einer eingesetzten Zelltrockenmasse von bis zu 100 g/L eine spezifische 3HB-Freisetzungsrates von  $\approx 0.3 \text{ g 3HB g}^{-1} \text{ cdw h}^{-1}$  bestimmt. Bei diesem pH Wert blieben die Zellen zu über 50% über den gesamten Versuchszeitraum lebensfähig. Im Gegensatz dazu verloren mehr als 99% aller Zellen ihre Vermehrungsfähigkeit, wenn der gleiche Versuch im Säuren bei pH 4 durchgeführt wurde.

Als Konsequenz aus dem raschen Absterben der Zellen bei pH 4 wurden im Folgenden Versuche nur noch im Alkalischen bei pH 8 durchgeführt. Um die aufwändige Separation von Zellen und produzierter 3-Hydroxybuttersäure zu erleichtern, wurde die Freisetzung von 3-Hydroxybuttersäure durch immobilisierte Zellen von *A. lata* untersucht. Dazu wurden PHB-reiche *A. lata* Zellen mit Alginat in Gegenwart von Ca-Ionen immobilisiert. Die optimalen Bedingungen zum Alginateinschluss wurden bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die immobilisierten Zellen für mehrere Tage mit nur geringem Verlust ihres 3HB-Freisetzungspotentials bei neutralem pH Wert (gekühlt) gelagert werden können. Allerdings war auch bei 5°C eine langsame Ansäuerung des Lagermediums durch geringe Freisetzung von 3HB festzustellen, so dass der pH Wert durch Pufferzugabe stabilisiert werden musste. Die Freisetzung von 3-Hydroxybuttersäure aus PHB-reichen Alginat-immobilisierten *A. lata* Zellen war sowohl qualitativ als auch quantitativ vergleichbar mit der Freisetzung durch freie Zellen. Durch mechanische Abtrennung der Alginatbeads (Dekantieren) nach erfolgter Freisetzung von dem Überstehendem konnte die freigesetzte 3-Hydroxybuttersäure quantitativ von den Beads und damit von den Zellen abgetrennt werden, ohne dass aufwändige Zentrifugation oder Filtrationstechniken notwendig gewesen wären. Die 3-Hydroxybuttersäure des Überstehenden war dann durch Gefrier/Sprühtrocknung einfach als Natrium- oder Kaliumsalz darstellbar.

Versuche, die in den abgetrennten Alginatbeads eingeschlossenen *A. lata* Zellen durch Zugabe von Medienbestandteilen und Saccharose wieder mit PHB "aufzuladen", um sie dann einem erneuten und Abbauzyklus zu 3-Hydroxybuttersäure zu unterwerfen, waren nicht erfolgreich unabhängig davon, ob die Zellen in Alginat eingeschlossen blieben oder durch EDTA-Zugabe freigesetzt wurden. In allen Fällen, war trotz Zugabe von frischem Medium nur ein sehr schwaches und langsames Anwachsen zu beobachten, das zudem durch Kontaminationen aufgrund der nicht sterilen Arbeitsweise mit den beads beeinträchtigt wurde.

**Schlussfolgerung:** Die Freisetzung von (*R*)-3HB aus PHB-haltigen *A. lata* Zellen erfolgt optimaler Weise bei saurem pH Wert (pH 4) oder bei alkalischem pH Wert (pH 8-10) innerhalb von 2 Stunden und ist selbst nach Immobilisierung der Zellen in Alginat beads gut möglich. Die Darstellung von (*R*)-3-Hydroxybuttersäure als Na- oder K-Salz gelingt durch Sprühtrocknung des dekantierten Überstandes. Eine lohnende Wiederverwendung der in Alginat-beads eingeschlossenen Zellen in erneuten PHB-Speicherungs/Abbau Zyklen ist nicht möglich.

## Literatur

- de Eugenio, L. I., Garcia, P., Luengo, J. M., Sanz, J. M., Roman, J. S., Garcia, J. L. & Prieto, M. A. (2007).** Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. *J Biol Chem* **282**, 4951-4962.
- de Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Morales, V., Dinjaski, N., Galan, B., Garcia, J. L. & Prieto, M. A. (2010).** The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. *Environ Microbiol* **12**, 207-221.
- Lee, S. Y., Lee, Y. & Wang, F. (1999).** Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnol Bioeng* **65**, 363-368.
- Park, S. J., Lee, S. Y. & Lee, Y. (2004).** Biosynthesis of R-3-hydroxyalkanoic acids by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* **113-116**, 373-379.
- Ren, Q., Grubelnik, A., Hoerler, M., Ruth, K., Hartmann, R., Felber, H. & Zinn, M. (2005).** Bacterial poly(hydroxyalkanoates) as a source of chiral hydroxyalkanoic acids. *Biomacromolecules* **6**, 2290-2298.
- Ren, Q., de Roo, G., Ruth, K., Witholt, B., Zinn, M. & Thöny-Meyer, L. (2009).** Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? *Biomacromolecules* **10**, 916-922.
- Ruth, K., Grubelnik, A., Hartmann, R., Egli, T., Zinn, M. & Ren, Q. (2007).** Efficient production of (*R*)-3-hydroxycarboxylic acids by biotechnological conversion of polyhydroxyalkanoates and their purification. *Biomacromolecules* **8**, 279-286.
- Ruth, K., de Roo, G., Egli, T. & Ren, Q. (2008).** Identification of two acyl-CoA synthetases from *Pseudomonas putida* GP01: one is located at the surface of polyhydroxyalkanoates granules. *Biomacromolecules* **9**, 1652-1659.
- Wang, L., Armbruster, W. & Jendrossek, D. (2007).** Production of medium-chain-length hydroxyalkanoic acids from *Pseudomonas putida* in pH stat. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 1047-1053.