

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-  
Programm

## Biologische Innovation und Ökonomie

**Förderkennzeichen:** 0315238

**Forschungsvorhaben:** BioIndustrie 2021 - Cluster  
Biopolymere/Biowerkstoffe. Verbundprojekt: Herstellung von  
Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw.  
1,4-Butandiol

**Zuwendungsempfänger:** BASF SE, 67056 Ludwigshafen

**Projektleitung:** Herr Dr. von Abendroth

**Laufzeit:** 01.02.2008 bis 31.12.2011

"Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit  
Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem  
Förderkennzeichen 0315238 gefördert. Die Verantwortung für den  
Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor".



Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

## Schlussbericht

24.07.2012

GVF – B009

BASF SE, 67056 Ludwigshafen

Dr. Carsten Sieden

### **Autoren:**

Dr. Gregory von Abendroth

Dr. Robert Loos

Dr. Hartwig Schröder

**ZE: BASF SE**

**Förderkennzeichen: 0315238**

**Rahmenprogramm:**

**Bioindustrie2021 - Cluster Biopolymere/Biowerkstoffe**

**Verbundprojekt:**

**„Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ  
hergestellter Bernsteinsäure bzw. 1,4-Butandiol“**

Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2008 – 31.12.2011

## Kurzfassung

Im Rahmen des Vorhabens „Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw. 1,4-BDO“ gelang den beteiligten Partnern BASF und dem Institut für Verfahrens und Biotechnologie (ibvt) an der TU Braunschweig die Untersuchung verschiedener Herstellprozesse für kostengünstige Bernsteinsäure und die Herstellung neuartiger Bernsteinsäurepolyester. Der Fokus der Forschungsarbeit lag dabei auf der effektiven, fermentativen Herstellung des Monomers Bernsteinsäure und der anschließenden Polymerisation zu Biopolyestern. Das Projekt endete nach einer kostenneutralen Verlängerung des Projektes um 10 Monate mit der erfolgreichen Demonstration der Herstellung fermentativer Bernsteinsäure im industriellen Maßstab um die Weiterverarbeitung zu Biopolyestern im Rahmen eines Pilotversuches zu untersuchen.



Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

## **Inhaltsverzeichnis Kapitel II**

<b>I. Kurze Darstellung .....</b>	<b>S. 3-14</b>
1. Aufgabenstellung .....	3
2. Ausgangsbedingungen .....	4
3. Planung und Ablauf des Vorhabens .....	6
4. Stand Wissenschaft und Technik .....	9
5. Literatur .....	12
6. Zusammenarbeit .....	13
 <b>II. Eingehende Darstellung .....</b>	 <b>S. 15-39</b>
7. Erzielte Ergebnisse und Verwendung der Zuwendung .....	15
8. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit .....	36
9. Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses .....	36
10. Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen .....	37
 <b>III. Kurzfassung (Berichtsblatt) .....</b>	 <b>separates Dokument</b>

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

## I. Kurze Darstellung

### 1. Aufgabenstellung

Ziel des Projekts war die Entwicklung eines wirtschaftlichen Verfahrens zur Herstellung von Bernsteinsäure bzw. 1,4-Butandiol (BDO) aus nachwachsenden Rohstoffen. In einem Forschungsprojekt sollte ein vollständiges Verfahren entwickelt werden, um fermentativ Bernsteinsäure mit hoher Ausbeute und Effizienz herzustellen, diese Bernsteinsäure chemisch zu BDO umzuwandeln und diese beiden Monomeren einzusetzen, um innovative und marktfähige Polyester auf der Basis nachwachsender Rohstoffe herzustellen. Bei diesen Polyestern handelt es sich um entweder bereits am Markt erfolgreich etablierte Polymere (z. B. Polybutylen-Terephthalat (PBT)), oder aber neue Polymere mit bisher wenig bekannten Eigenschaften (z. B. Polybutylensuccinat (PBS)-Derivate).

Am Beispiel des aktuell gültigen fossilen CO<sub>2</sub>-Kreislaufs bezüglich der Herstellung von Polymeren können die kurz- und mittelfristigen Nachhaltigkeitsziele des Projekts verdeutlicht werden. Heute wird die über Jahrmillionen abgelagerte Biomasse in ihrer fossilen Form und in kurzen Zeiträumen durch „fossile“ Chemie verbraucht. Ziel des Projekts hingegen war die Nutzung von Biomasse durch die Methoden der biosynthetischen Chemie zur Herstellung relevanter großvolumiger Biomonomere und -polymere mit hoher Wertschöpfung. In der Laufzeit des beantragten Projekts sollten die entscheidenden Fragestellungen für eine „biosynthetische Chemie“ gelöst und damit eine beispielhafte neuartige Alternativroute zur fossilen Herstellweise insbesondere von Polymeren etabliert werden.



Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

## 2. Ausgangsbedingungen

Sowohl die Verknappung von petrochemischen Rohstoffen, als auch der CO<sub>2</sub>-bedingte Wärmeanstieg der Erde sind treibende Kräfte um nachwachsende Rohstoffen für Treibstoffe und zur Herstellung von Chemikalien einzusetzen. Historisch betrachtet konnten sich biotechnologische Verfahren auf Basis nachwachsender Rohstoffe allerdings bisher nur dann durchsetzen, wenn sie auf Kostenbasis gleichwertig gegenüber der Produktion auf Basis petrochemischer, „fossiler“ Rohstoffe waren (Beispiel: Vitamin B2-Herstellung der BASF). Die Entwicklung der letzten Jahre mit steigenden Ölpreisen und einer globalen Erwärmung der Atmosphäre, vermutlich verursacht durch CO<sub>2</sub>-Emissionen aus fossiler Quelle, haben die Ökonomie und Ökologie-Betrachtung der Anwendung von nachhaltiger Biotechnologie entscheidend verändert. Verfahren zur Herstellung von Bio-Ethanol aber auch Chemikalien wie 1,3-Propandiol sind bereits etablierte biotechnologische Produkte. Trotzdem ist anzunehmen, dass sich langfristig trotz ökologischer Vorteile global nur ökonomisch tragbare Verfahren durchsetzen werden. Deshalb ist bei der Entwicklung von biotechnologischen Verfahren eine ökonomische Betrachtung eine entscheidende Grundbedingung.

Polymere stellen einen wesentlichen Anteil der jährlich aus petrochemischen Rohstoffen hergestellten Industrieprodukte. Polymere werden fast ausschließlich aus petrochemischen Rohstoffen hergestellt und weisen in allgemeinen keine biologische Abbaubarkeit auf. In den letzten ca. 20 Jahren sind immer wieder Anstrengungen unternommen worden, biobasierte Polymere aus nachwachsenden Rohstoffen herzustellen, wie auch biologisch abbaubare Polymere zu produzieren (Braunegg, 1998). Beispiele sind Polyhydroxyalkanoate (PHA, Biopol-Monsanto/Metabolix) und Polymilchsäure (PLA-Natureworks, Cargill). Diese biologisch abbaubaren Polyester ähneln in ihrem Anwendungsprofil Standard-Polymeren wie den *low cost* Polymeren Polyethylen (PE) und Polypropylen (PP), weisen jedoch teils schlechte Materialeigenschaften (PLA) oder hohe Produktionskosten durch geringe Raum-Zeit- und Kohlenstoff-Ausbeuten und eine bisher nicht zufrieden stellend gelöste Aufarbeitung auf (PHA). Für technische Anwendungen bei erhöhten Leistungsanforderungen eignen sich diese Polymere kaum. Dies gilt zum Beispiel im Automobilbau und für hochwertige Consumer-Products (z. B. Baubereich, Werkzeuge, Spielzeug etc.). Ein erstes Beispiel für den technischen Einsatz eines biobasierten Monomers das zu Polymeren mit verbesserten Materialeigenschaften wie Temperaturbeständigkeit und Stabilität führt, ist die biobasierte Herstellung von 1,3 Propandiol. Dieses Diol wurde bisher chemisch aus fossilen Rohstoffen hergestellt und mit Terephtalsäure zu einem Polyester umgesetzt. Zukünftig wird in diesem Polyester (Sorona, DuPont) der Propandiol-

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

Anteil durch ein biobasiertes Material ersetzt. Bei BASF wurde das Polyester Exoflex auf Basis von Adipinsäure und weiterer Monomere fossilen Ursprungs als erster biologisch abbaubarer Polyester entwickelt. Aufbauend auf dieser Produktklasse wurden erste Arbeiten zur Untersuchung Bernsteinsäure-basierter Polyestern, die sich ebenfalls biologisch abbauen lassen, durchgeführt.

Bei BASF konnte vor Beginn der BMBF-geförderten Arbeiten das Bernsteinsäure-produzierende Bakterium *Basfia succiniciproducens* DD1 aus dem Pansen einer Kuh isoliert und grundlegend untersucht werden. Dieser natürliche Bernsteinsäure-Produzent zeigte bereits sowohl hohe Kohlenstoffausbeuten als auch Raum-Zeit-Ausbeuten zur Herstellung hoher Konzentrationen des gewünschten Produktes und eine weitreichende Substratflexibilität. Interessanterweise beinhalten die Stoffwechselwege zur Umwandlung diverser Zucker oder Glycerin zu Bernsteinsäure in *Basfia succiniciproducens* einen ATP-generierenden und zugleich CO<sub>2</sub>-fixierenden Schritt. Die Sequenzierung des Genoms zeigte eine große Ähnlichkeit zu einem anderen Bernsteinsäure-Produzenten *Mannheimia succiniciproducens*.

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

### **3. Planung und Ablauf des Vorhabens**

#### **Planung des Vorhabens**

Gemeinsam mit der BASF arbeitete ein Universitätspartner in diesem Vorhaben gemeinschaftlich an der o.g. Aufgabenstellung. Folgende Aufgabenteilung wurde vereinbart:

#### **1. BASF SE (Projektkoordination)**

BASF SE fiel die Aufgabe zu, die Technologie zur Herstellung fermentativer Bernsteinsäure (BS) auf der Basis des BASF-eigenen Stammes *Basfia succiniciproducens* zu entwickeln (Etablierung der molekularbiologischen Methoden für den spezifischen Stamm, Fermentationsprozessoptimierung und Aufarbeitung von BS bzw. BDO) und in den industriellen Maßstab zu überführen. Darüber hinaus sollten in den BASF-Laboren für Polymerchemie die im Rahmen des Projektes erzeugten fermentativen Monomere eingesetzt werden, um bernsteinsäurehaltige Polymere (z.B. PBS Derivate) herzustellen und zu analysieren.

#### **2. Institut für Bioverfahrenstechnik (ibvt), TU Braunschweig**

Prof. Christoph Wittmann übernahm mit seiner Arbeitsgruppe die Arbeiten im Bereich der systembiotechnologischen Optimierung der biotechnologischen Herstellung von Bernsteinsäure 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**

Ursprünglich war es angedacht in späteren Verlauf des Projektes weitere Industriepartner zur Untersuchung weiterer Anwendungen für die behandelten biobasierten Monomere und Polymere hinzuzuziehen. Dieses Vorhaben wurde jedoch nicht umgesetzt, da die Untersuchungen weitgehend bei BASF durchgeführt werden konnten und der Fokus in Absprache mit dem Projektträger auf die industrielle Machbarkeit der Technologie gelegt wurde.

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

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: Entwicklung der Gentechnik für den vorliegenden Mikroorganismus *Basfia succiniciproducens* DD1 (BASF-Biotechnologie)
- AP2: Metabolische Netzwerkanalyse von DD1 (ibvt)
- AP3: Etablierung und Optimierung der Produktion von Bernsteinsäure auf einem definierten mineralischen Medium (ibvt, BASF-Biotechnologie)
- AP4: Systembiotechnologie BS-produzierender Stämme: Stoffwechsellaufklärung und Targetidentifizierung (ibvt, BASF-Biotechnologie)
- AP5: Erweiterung des Kohlenstoffspektrums durch a) adaptive Mutagenese und b) durch gentechnische Veränderung (ibvt)
- AP6: Weiterentwicklung und Upscaling der Bernsteinsäure-Laborfermentation zu einem Gesamt-Prozesskonzept zur erfolgreichen technischen Umsetzung der Fermentation (BASF-Biotechnologie)
- AP7-1: Entwicklung eines Gesamt-Prozesskonzepts zur erfolgreichen technischen Herstellung von BDO aus BS (BASF-Biotechnologie)
- AP7-2: Entwicklung eines geeigneten Hydrierverfahrens von BS zu BDO Herstellung von Musterteilen (BASF-Chemie)
- AP7-3: Polykondensation von biobasiertem BDO und Bernsteinsäure zu Polymeren wie PBT, PBS Ecoflex (BASF-Polymerchemie)
- AP8: Aufbau einer Miniplant-Anlage für die Herstellung von BS, Aufarbeitung und Reinigung von BS und Hydrierung von BDO (BASF)
- AP9: Herstellung von Musterprodukten (BASF-Polymerchemie)
- AP10: Projekt-Networking & Projektevaluation (alle Partner)

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





Schlussbericht FKZ 0315238

Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO



Abbildung 3.1: Meilensteinplan

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

### **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 Bernsteinsäure und die Polymerisation zu Biopolyestern. Das Monomer 1,4-BDO wurde direkt zu Beginn des Förderzeitraums aus dem Fokus genommen, da die Wirtschaftlichkeit zur Herstellung dieses Monomers aus fermentativer Bernsteinsäure nicht gegeben war.

Im AP-8 wurde anstelle einer Miniplant ein industrieller Demonstrationsversuch durchgeführt, um in diesem Maßstab bis zu Herstellung von Mustermengen Biopolyester vordringen zu können. Aus diesem Grund wurde eine kostenneutrale Verlängerung des BMBF-geförderten Projektes bis Dezember 2011 beschlossen.

### **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. Biobasierte Polymere auf Basis von PHA und PLA können hier nicht eingesetzt werden. Deshalb muss nach anderen, besser geeigneten Polymeren gesucht werden. Polyester stellen mit ihren Produkteigenschaften, wie ihrer Temperaturstabilität und Zähigkeit, eine wichtige Polymergruppe bei den technischen Kunststoffen dar und werden z. Z. fast ausschließlich aus petrochemischen Rohstoffen hergestellt. Durch die erreichbaren Produkteigenschaften der Polyester ist im Vergleich zu Standard-Polymeren auch eine höhere Wertschöpfung möglich. 1,4 Butandiol (BDO) ist bereits ein wichtiger Bestandteil von Polyestern und anderen Polymeren (PBT, Poly-THF), Bernsteinsäure hingegen noch nicht.

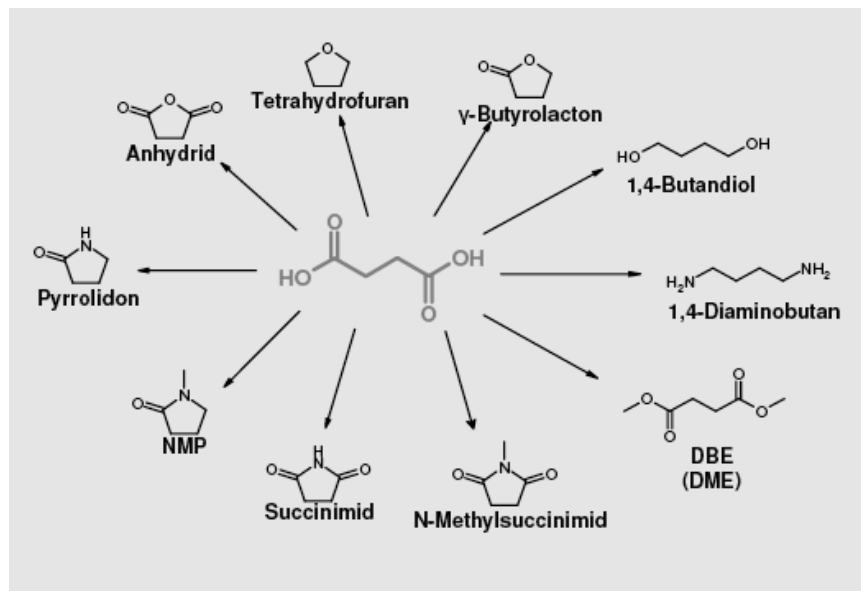
BASF verfügt über ein Portfolio von Polyester-Polymeren, die bisher ausschließlich auf fossilen Rohstoffen basieren. Unter diesen Polymeren zeichnet sich das BASF-Produkt Ecoflex durch vollständige biologische Abbaubarkeit nach den relevanten Normen aus (EU: EN 13432, Japan: GreenPla, US: ASTM D-6400-04). Ecoflex besteht aus einem Polyester aus BDO, Terephthalsäure und Adipinsäure. Technisch verhält sich dieses Polymer in Materialeigenschaften vergleichbar zu Polyethylen, bei gleichzeitiger biologischer Abbaubarkeit. Der Einsatz von biobasiertem BDO in Ecoflex stellt den Einstieg zu einem vollständig biobasiertem Polymer mit hervorragenden Eigenschaften in der Folienherstellung und im Markt für Verpackungsmaterialien dar.

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

Ein weiterer Anwendungsbereich von biobasiertem BDO ist der Einsatz in Polymeren wie Polybutylen-Terephthalat (PBT). PBT findet besonders in der Elektronik- und Autoindustrie Anwendung. Auch hier ist das Ziel, PBT-Polyester durch Einsatz von fermentativ hergestelltem BDO schrittweise biobasiert zu produzieren. Eine weitere Anwendung von biobasiertem BDO ist das biologisch abbaubare Polymer Polybutylen-Succinat (PBS), zu gleichen Teilen aus BDO und Bernsteinsäure (BS) polymerisiert und auf Basis des vorgeschlagenen Verfahrens dann 100% biobasiert. Bei erfolgreicher Bearbeitung dieses Projekts kann sich ein weiteres Projekt zur Umwandlung von BDO in Tetrahydrofuran (THF) und die Polymerisation von THF zu Poly-THF (Spandex-Faser) und zu Pyrrolidonen anschließen. Auch THF und Poly-THF sind bereits großtechnische Produkte mit großem Produktionsvolumen bei BASF. Weitere Einsatzmöglichkeiten für BS und BDO ergeben sich aus der Polykondensation mit weiteren Dicarbonsäuren aus nachwachsender Produktion (Sebacinsäure) bzw. Adipinsäure.

Einen Überblick der Bernsteinsäure-basierten Monomere und weiteren möglichen chemischen Verbindungen aus Bernsteinsäure bzw. BDO als Plattformchemikalien zeigt Abbildung 4.1.



**Abbildung 4.1:** Mögliche chemische Grundstoffe aus Bernsteinsäure (Mitte) produziert. Mehrere der gezeigten Verbindungen sind bereits Produkte der BASF-Wertschöpfungskette (Quelle: BASF).

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

Wichtig bei der Konzeption der Herstellung von Bernsteinsäure-basierten Chemikalien ist die Betrachtung eines kommerziell funktionierenden Gesamtprozesses. Parameter sind: die Auswahl geeigneter Rohstoffe, wie Zucker, Pentosen aus Biomasse-basierter Hemicellulose und z. Z. preisgünstigem Glycerin, die mikrobielle Fermentation der Bernsteinsäure, die Isolierung und Aufreinigung von BS, der katalytischen Umsetzung von BS zu BDO, die Einhaltung der notwendigen Spezifikationen (Nebenprodukte, Reinheit >99%) der Monomere zur Polymerisation sind umfangreiche Betrachtungen aller Prozessparameter durchzuführen. Faktoren sind u. a. Mediumsbestandteile, die Katalysatoren vergiften, Nebenprodukte, die nur schwer abtrennbar sind und die gleichzeitig die Kohlenstoff- und Aufarbeitungsausbeute entscheidend verschlechtern, wie auch Organismus-spezifische essentielle Mediumsbestandteile, die hohe Mediumskosten hervorrufen. So sind aus Sicht von BASF die bisher bekannten Herstellverfahren von Bernsteinsäure, basierend auf unterschiedlichen Mikroorganismen und unterschiedlichen Fermentationskonzepten, nach Literaturangaben und umfangreichen eigenen Versuchen bei BASF z. Z. noch nicht geeignet Bernsteinsäure (BS) und daraus 1,4 Butandiol (BDO) zu wettbewerbsfähigen Herstellkosten bereitzustellen.

Gründe dafür sind:

- nicht ausreichende Raum-Zeit-Ausbeuten (McKinlay 2007, Song und Lee 2006, interne Informationen BASF)
- nicht ausreichende Kohlenstoffausbeuten durch eine aerobe Anzuchtphase und damit verbundenen hohem Substratverlust (Song und Lee 2006, Okino et al. 2005).
- fehlende gentechnische Zugänglichkeit des Produktionsorganismus bei strikt anaerobem Stammhandling (McKinlay 2007, Song et al. 2006)
- Inkompatibilität der mikrobiologisch essentiellen Mediumsbestandteilen mit den notwendigen chemischen Aufarbeitungs- und Hydrierungsreaktionen (Guttler 1996, interne Informationen BASF)
- Ungeklärte Auxotrophien und Abhängigkeit von teuren Hefeextrakt-Zusätzen (interne Informationen BASF)
- Instabilitäten von Stämmen nach gentechnischer Stammoptimierung (interne Informationen BASF)
- Lange und komplexe Entwicklungszyklen, fehlende Stoffwechselwege (*S. cerevisiae* als Produktionssystem)

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

Viel versprechend sind die Arbeiten von San Yup Lee et al. (Lee et al. 2006). Der von seiner Arbeitsgruppe isolierte Mikroorganismus ist sequenziert und gentechnisch zugänglich, jedoch konnte bisher keine alleinige Produktion von BS ohne Nebenproduktbildung erreicht werden (Lee 2006 et al.). Auch ist die maximal beschriebene Bernsteinsäurekonzentration von 60g/l bei weitem nicht ausreichend für eine wirtschaftliche Produktion von BS. Aus Sicht von BASF erreicht deshalb keines der bisher in der Literatur beschriebenen Verfahren alle notwendigen Eigenschaften für eine wirtschaftliche Herstellung von BDO. BASF hat sich entschieden, einen eigenen, geeigneten BS-Produktionsorganismus zu isolieren und weiter zu entwickeln. Dieser bereits sequenzierte und proprietäre, fakultativ anaerobe Mikroorganismus *Basfia succiniciproducens* DD1 verfügt über bisher wenig charakterisierte Wege zur Verstoffwechslung unterschiedlichster Zucker und Polyolen aus nachwachsenden Rohstoffen.

## 5. Literatur

Braunegg, J. *Biotechnology* 1998 65:127-61

McKinlay J. B., Vieille, C., Zeikus J. G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007 76:727–740

PNNL, NREL, DOE Studie 2004 Top Value Added Chemicals From Biomass

Okino et al. 2005 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 684: 75-80.

Guettler, M. V., Jain, M. K. und Rumler, D., 1996, US Patent 5,504,004, 5,573,931

Lee, S.L., Song, H., Lee S.Y. *Applied and Environmental Microbiology* 2006 72: 1939-48

Lee P. C. Lee S. Y., Hong H., Chang H. N., *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2003 26: 63–67

Lin H. , Bennett, G. N., San, K. S. *Metabolic Engineering* 2005, Vol. 7, 116-127

PERP Report 2004 „1,4 Butanediol/THF“, Nexant chemical systems

Song, H., , Lee, S.Y. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006) 352–361

Zeikus, J. G., Jain, M. K. Elankovan, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999) 51: 545-552

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

## 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.

BASF SE fiel die Aufgabe zu, die Technologie zur Herstellung fermentativer Bernsteinsäure auf der Basis des BASF-eigenen Stammes *Basfia succiniciproducens* DD1 zu entwickeln (Etablierung der molekularbiologischen Methoden, Fermentationsprozessoptimierung und Aufarbeitung von BS bzw 1,4-BDO) und in den industriellen Maßstab zu überführen. Darüber hinaus sollten in den BASF-Laboren für Polymerchemie die im Rahmen des Projektes erzeugten fermentativen Monomere eingesetzt werden, um bernsteinsäurehaltige Polymere (z.B. PBS) herzustellen und zu analysieren.

### 6.2 Institut für Bioverfahrenstechnik (ibvt), TU Braunschweig



Institut für Bioverfahrenstechnik  
Technische Universität Braunschweig  
Gaußstrasse 17  
38106 Braunschweig

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

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, 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 diverser Bakterien, die in zahlreichen Forschungsprojekten mit industriellen Partnern, sowie mit Förderung der DFG erfolgreich eingesetzt wurden. Die verfügbaren Methoden umfassen u. a. die metabolische <sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse, die Metabolomanalyse, Enzymassays und die *in silico* Modellierung, sowie eine umfangreiche Erfahrung in der gezielten genetischen Veränderung von Mikroorganismen, wie z.B. *Corynebacterium glutamicum*.

Prof. Wittmann übernahm mit seiner Arbeitsgruppe die Arbeiten im Bereich der systembiotechnologischen Optimierung der biotechnologischen Herstellung von Bernsteinsäure ganz zu Beginn der zu untersuchenden Wertschöpfungskette.

### **6.3 Industriepartner**

In dieses Projekt wurden wie in Kapitel 3 begründet keine weiteren Industriepartner miteinbezogen.

### **6.4 BIOPRO GmbH**

Während der Projektphase wurden die Clusteraktivitäten von der Projektmanagementgesellschaft BIOPRO unterstützt.

## II. Eingehende Darstellung

### 7. Erzielte Ergebnisse und Verwendung der Zuwendung

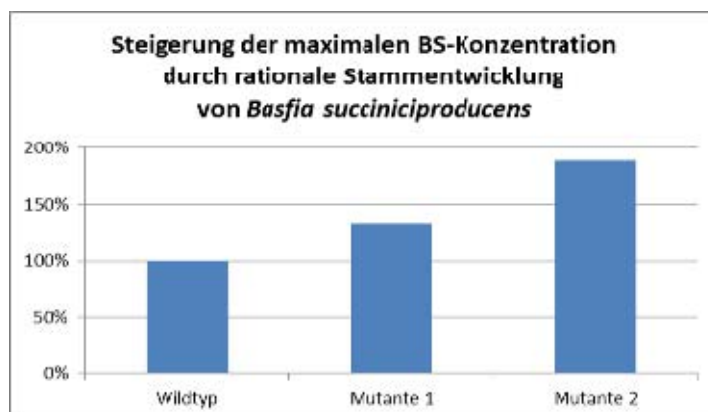
Die durch die Zuwendung des BMBF geförderten Mitarbeiter sind im Zusammenhang mit den jeweiligen Arbeitsgebieten explizit genannt.

#### 7.1. Arbeitspaket 1: Entwicklung der Gentechnik für den vorliegenden Mikroorganismus *Basfia succiniciproducens* DD1 (BASF)

**Beteiligte Mitarbeiter:** Stefan Haefner, Mareike Lorentz, Jeanette Ristau, Andrea Schatz, Gabriele Schlinzig, Hartwig Schröder, Karin Vogel (alle BASF).

Grundlage für die biotechnologische Herstellung von Bernsteinsäure (BS) bildete das Gram-negative Bakterium *Basfia succiniciproducens* DD1, welches bereits vor Beginn des BMBF-geförderten Projektes eigens aus dem Pansen einer Kuh isoliert wurde und unter anaeroben Bedingungen natürlicherweise große Mengen Bernsteinsäure herstellt. Das Genom wurde im Verlauf des Projekts sequenziert und annotiert. Um Parameter, wie z.B. die Ausbeute zur Bernsteinsäureproduktion, in diesem Organismus zu optimieren, mussten darüber hinaus gentechnische Methoden etabliert werden.

Es ist gelungen, im Rahmen des Projektes gentechnische Methoden zur Überexpression und Herabregulation von Genaktivitäten in *Basfia succiniciproducens* zu etablieren und entsprechende Mutanten von *Basfia* herzustellen und zum Patent anzumelden (WO2010092155, EP2202294, EP2204443). Diese Mutanten wurden in der Fermentation auf ihr Potenzial zur Bernsteinsäureproduktion hin untersucht. Die Bernsteinsäureausbeute wurde im Vergleich zum Wildtyp drastisch erhöht (Abbildung 7.1.1).



**Abbildung 7.1.1:** Maximale Bernsteinsäuretitertiter in zwei verschiedenen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp *Basfia succiniciproducens* DD1.



Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

## **7.2. Arbeitspaket 2: Metabolische Netzwerkanalyse von DD1 (ibvt)**

**Beteiligte Mitarbeiter: Judith Becker, Tobias Fürch, Anna Lang, Jasper Reinefeld (geb. Hangebrauck), Rene Stellmacher (alle ibvt).**

Die  $^{13}\text{C}$  metabolische Flussanalyse (MFA) bildet seit einigen Jahren einen festen Bestandteil der Omics-Analysen zur systemweiten Erfassung von zellulären Funktionen. Da sie unmittelbar den funktionalen Output der Zelle als Zusammenspiel von Transkriptom, Proteom und Metabolom darstellt, ist die Flussanalyse am besten für die direkte Beschreibung des Phänotyps geeignet. Im Bereich des *Metabolic Engineering* zur gezielten Stammoptimierung stellt sie eine der wichtigsten Methoden dar, um zum einen neue genetische Targets zu identifizieren und zu validieren (Kiefer 2002, Becker 2005, 2007, 2009, 2011), aber auch um eine unerwartete Antwort der Zelle auf genetische Veränderungen zu erklären (Becker 2008). Für die Standard  $^{13}\text{C}$  MFA wird dabei in der Regel auf das während des Wachstums gebildete Zellprotein zurückgegriffen. Dafür erforderlich ist ein konstantes Steady-State Wachstum sowie ein über den Kultivierungszeitraum unverändertes Markierungsmuster im Zellprotein.

Darüber hinaus ist die Flussanalyse in Komplexmedium nicht ohne weiteres durchführbar, so dass zunächst ein Glucose-basiertes Minimalmedium entwickelt wurde (siehe Kap. 7.3). Mit Hilfe dieses Basismediums wurden anschließend Kultivierungsexperimente zur Untersuchung der Bernsteinsäureproduktion durchgeführt. Das Medium diente außerdem als Standardmedium für die evolutive Adaptation.

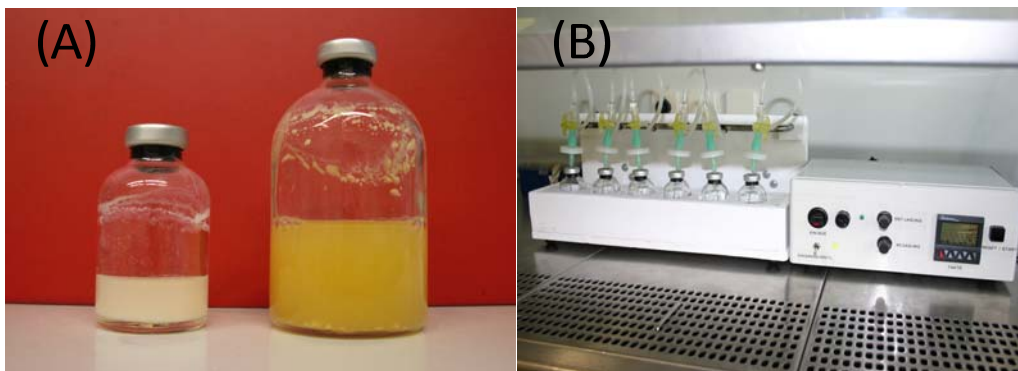
### **Optimierung der Kultivierung mit *Basfia succiniciproducens* DD1 als Grundlage zur Metabolischen Flussanalyse**

Die Arbeiten zur Bernsteinsäureproduktion sahen Kultivierungen in Serumflaschen unter  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre vor. Das Basisprotokoll dazu wurde von BASF bereitgestellt und in enger Zusammenarbeit am ibvt etabliert. Aufbauend auf dem experimentellen Set-up wurden einige Optimierungen vorgenommen, die zunächst auf die inhaltlichen Anforderungen der Arbeiten am ibvt angepasst waren, sich darüber hinaus aber auch als vorteilhaft für die Standardkultivierung bei der BASF zeigten. Dies beinhaltete ein Scale-Down des Kultivierungssystems (Abbildung 7.2.1A) von 50 mL Kultivierungsvolumen (100 mL Flasche) auf 10 mL Kultivierungsvolumen (30 mL Flasche) (Stellmacher et al. 2010). Der Vorteil dabei bestand in relativen einer Vergrößerung des Gasvolumens im Vergleich zum Kultivierungsvolumen ( $\text{CO}_2$ -Bereitstellung). Darüber hinaus konnten auch die Kosten für die geplanten  $^{13}\text{C}$ -

Schlussbericht FKZ 0315238

Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO

Markierungsexperimente aufgrund des geringeren Substratbedarfs deutlich reduziert werden. Zusätzlich zum Scale-Down wurde mit Unterstützung der Werkstatt des ibvt eine automatisierte Begasungseinheit für Serumflaschen entworfen und gebaut (Abbildung 7.2.1 B).



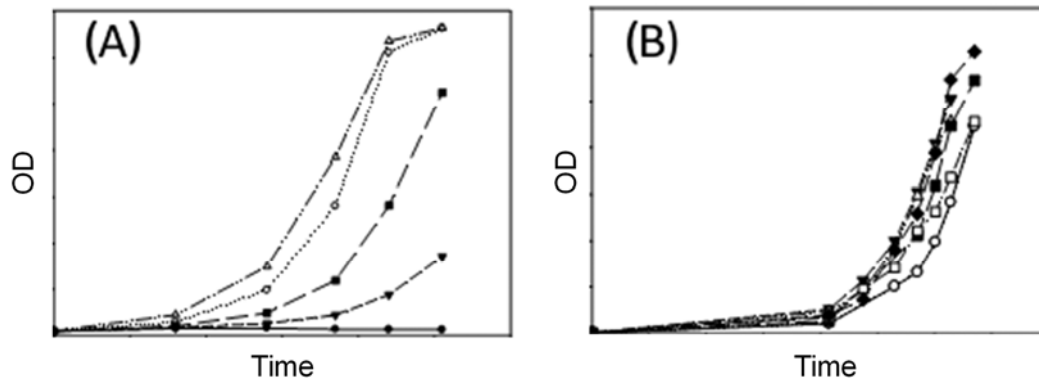
**Abbildung 7.2.1 A und B:** Optimierungsansätze zur Kultivierung von *Basfia succiniciproducens* in Serumflaschen. (A) Scale-Down zur Reduktion des Kultivierungsvolumens sowie zur Vergrößerung der Gasatmosphäre. (B) Automatisierte Begasungseinheit zur parallelen Begasung von bis zu sechs Serumflaschen.

Dies ermöglicht eine automatische Begasung von bis zu sechs Serumflaschen, wobei der Gasraum in einer variabel einstellbaren Zahl von Zyklen mit der CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gespült werden kann, bevor der für die Kultivierung benötigte Überdruck angelegt wird. Der Vorteil dieser Begasungseinheit liegt nicht nur in der Parallelisierung sondern in einer deutlich erhöhten Reproduzierbarkeit durch die Automatisierung. Ein entsprechender Bauplan dazu wurde mit BASF in enger Abstimmung verfeinert und angepasst, die im Folgenden eine entsprechende Begasungseinheit ebenfalls konstruierte und für die weiteren Arbeiten in Betrieb nahm. Die Reproduzierbarkeit der Kultivierung - insbesondere in Minimalmedium - ließ sich zusätzlich weiter verbessern, indem das Standardprotokoll, bestehend aus einer Vorkultur in Komplexmedium und einer Hauptkultur, durch eine weitere Vorkultur ergänzt wurde. Diese zweite Vorkultur wurde dabei analog zur Hauptkultur durchgeführt (Medium, Kohlenstoffquellen, Temperatur). Die dadurch erzielte Verbesserung ist in Abbildung 7.2.2 illustriert.



Schlussbericht FKZ 0315238

Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO



**Abbildung 7.2.2:** Vergleich paralleler Kultivierungsansätze von *B. succiniciproducens* in Minimalmedium mit Glucose: (A) ursprüngliches Protokoll mit einer Vorkultur und manueller Begasung (B) optimiertes Protokoll mit zusätzlicher Vorkultur und automatisierter Begasung.

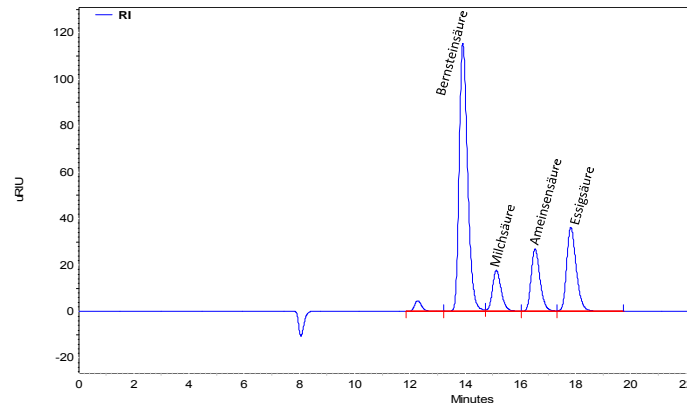
Darüber hinaus wurde die Kultivierung durch eine Anpassung des Mediums weiter optimiert. Eine detaillierte Beschreibung der wichtigsten Ergebnisse dazu findet sich im Kapitel 7.3.

Neben den Kultivierungsprotokollen wurden die für die Prozessbewertung relevanten Analytikmethoden etabliert. Allem voran wurde dazu eine Messmethode zur Quantifizierung der Bernsteinsäurekonzentration von BASF übernommen und angepasst. Diese wurde dahingehend etabliert, dass eine parallele Messung von Bernsteinsäure und anderen organischen Säuren, wie die häufig als Nebenprodukte auftretende Milchsäure, Essigsäure und Ameisensäure, möglich war (Abbildung 7.2.3).



Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*



**Abbildung 7.2.3:** Chromatographische Trennung prozessrelevanter organischer Säuren mit HPLC zur Quantifizierung von Bernsteinsäure und Nebenprodukte (Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure).

Für die geplanten  $^{13}\text{C}$ -Markierungsstudien wurde darüber hinaus eine GC-MS-Methode mittels MBDSTFA-Derivatisierung für die Vermessung von Bernsteinsäure aus Kulturüberstandsproben entwickelt. Eine für die metabolische Flussanalyse essentielle Prozessgröße stellt neben der Produktion organischer Säuren auch die gebildete Biomasse dar. Daher wurde ein Korrelationsfaktor zwischen optischer Dichte und entsprechender Biotrockenmasse ermittelt.

Dieses experimentelle Set-up bildete eine wichtige Grundlage für die darauf aufbauenden Experimente der metabolischen Flussanalyse (Kap. 7.2), Medienoptimierung (Kap. 7.3) sowie der evolutiven Adaptation (Kap. 7.5).

### **Metabolische Flussanalyse**

Wichtige Voraussetzung für eine biomassebasierte  $^{13}\text{C}$  Flussanalyse ist ein über den kompletten Kultivierungszeitraum stabiles Wachstum, so dass sich die Zellen im metabolischen Gleichgewicht befinden. Dies stellt sicher, dass auch die Markierungsmuster der Aminosäuren konstant bleiben. In diese Markierungsmuster ist die Information über die metabolischen Flüsse wie in einem Fingerabdruck gespeichert und diese werden für die Flussberechnung herangezogen. Die ersten  $^{13}\text{C}$ -Experimente dienen daher der Überprüfung des bestehenden experimentellen Ansatzes. Dabei zeigte sich, dass das Markierungsmuster einer Aminosäure über den Kultivierungszeitraum

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

hinweg keineswegs konstant war. Vielmehr konnte im Laufe der Kultivierung festgestellt werden, dass zunächst die im Medium vorhandene Aminosäure von den Zellen verwertet wurde und erst zu einem späteren Kultivierungszeitpunkt eine Neusynthese der Aminosäure einsetzt.

Trotz der bereits intensiven Optimierung von Medium und Kultivierungsstrategie, machte dies eine weitere Überarbeitung des Mediums erforderlich. Nachfolgende Kultivierungen zur metabolischen Flussanalyse wurden nun in Minimalmedium ohne weitere Zugabe von Aminosäuren durchgeführt. Dies ermöglichte eine Kultivierung, bei der die Zellen physiologisch stabil wachsen, was sich in den konstanten Wachstums- und Produktionseigenschaften sowie über den Kultivierungszeitraum konstanten Markierungsmustern in proteinogenen Aminosäuren widerspiegelt. Das neue experimentelle Set-up konnte dazu genutzt werden, repräsentative Kultivierungsexperimente als Grundlage für die metabolische Flussanalyse durchzuführen. Parallel zu den essentiellen experimentellen Optimierungen wurde dazu ein computergestütztes Modell erstellt, das auf Basis der stöchiometrischen Daten sowie der Markierungsmuster der Aminosäuren und von sekretiertem Succinat eine Simulation der metabolischen Flussverteilung ermöglicht. Für die Modellierung wurde dabei auf die Open-Source Software "OpenFlux" zurückgegriffen, in die das Stoffwechselmodell von *Basfia succiniciproducens* (Abbildung 7.2.4) implementiert wurde.

Schlussbericht FKZ 0315238

Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO

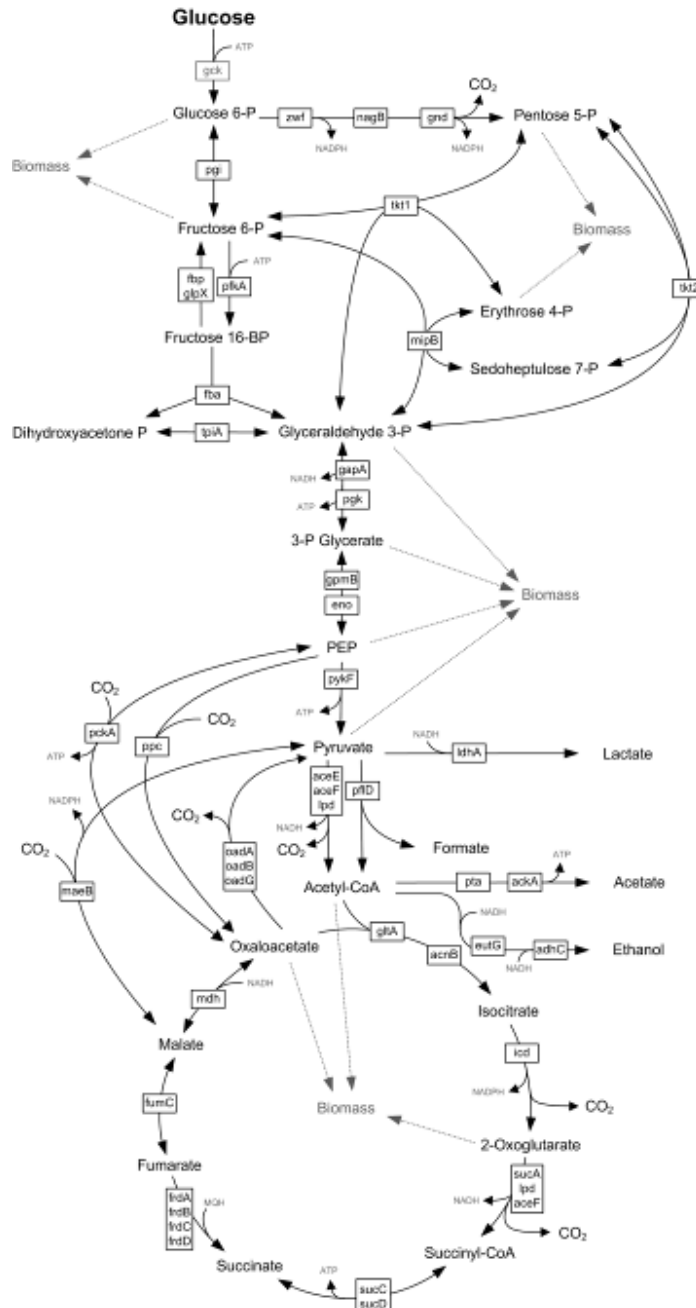


Abbildung 7.2.4: Modell des Zentralstoffwechsels von *B. succiniciproducens* als Grundlage für die metabolische Flussanalyse.

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

Das Modell wurde dabei auf Basis der in KEGG hinterlegten Genomsequenz des nahe verwandten Organismus *Mannheimia succiniciproducens* rekonstruiert. Das dort annotierte Set an Stoffwechselwegen beinhaltet die Glykolyse, den Pentosephosphatweg, den Zitratzyklus sowie PEP-Carboxylase, Malatenzym, Oxalacetatdecarboxylase und eine ATP- bildende PEP-Carboxykinase als anaplerotische Enzyme. Darüber hinaus beinhaltet das Modell Daten zur Biomassezusammensetzung, um den anabolen Bedarf für die Biomassebausteine Glukose-6-Phosphat, Fruktose-6-Phosphat, Ribose-5-Phosphat, Erythrose-4-Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 3-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat, Pyruvat, Acetyl-CoA, 2-Oxoglutarat und Oxalacetat zu bestimmen. Als stöchiometrische Grundlage für die Berechnung wurden Mittelwerte aus fünf parallelen Kultivierungsansätzen gebildet.

Aus diesen Daten geht hervor, dass Deletionsmutanten für wesentliche Nebenprodukte ein deutlich anderes Nebenproduktspektrum aufweisen als der Wildtyp-Stamm. Als Antwort auf die neuen metabolischen Engpässe reagiert die Zelle mit einer Verschiebung der Nebenproduktzusammensetzung.

Mit Hilfe von Metabolome Profiling über NMR in Kooperation mit der Universität Greifswald (AG Lalk) gelang es, bisher nicht berücksichtigte Nebenprodukte zu detektieren. Diese konnten im Folgenden gezielt in das metabolische Modell implementiert werden. In allen Fällen konnte aus einem reichhaltigen Set an <sup>13</sup>C-Markierungsdaten die Flussverteilung eindeutig angepasst werden. Die hohe Konsistenz der Daten umfasste sowohl die Identifikation des globalen Minimums als auch eine exzellente Anpassung der experimentellen Messwerte durch die Simulation.

Der identifizierte Nebenproduktfluss stellt einen Nachteil für die Succinatproduktion dar, da dadurch Kohlenstoff für die Produktbildung verloren geht. Kann dieser Kohlenstoff durch gezielte genetische Ansätze für die Bernsteinsäureproduktion verfügbar gemacht werden, so kann eine Verbesserung der Produktionsausbeute erzielt werden.

Schlussbericht FKZ 0315238

Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO

### **7.3. Arbeitspaket 3: Etablierung und Optimierung der Produktion von Bernsteinsäure auf einem definierten mineralischen Medium (ibvt, BASF-Biologie)**

**Beteiligte Mitarbeiter: Gregory v. Abendroth, Stefanie Demming, Klaus Frambach, Oliver Hauck, Axel Mittelstrass, Torsten Renz, Kerstin Rieger (alle BASF); Rene Stellmacher (ibvt).**

Den Ausgangspunkt für die Medienoptimierung bildete ein komplexes Fermentationsmedium mit hohen Anteilen an Hefeextrakt, welches für einen industriellen Fermentationsprozess einen erheblichen Kostenfaktor darstellt. Durch strategische Experimente, die die gezielte Fütterung einer Auswahl an Aminosäuren und Vitaminen beinhaltete, konnte im Zuge der Medienoptimierung ein definiertes mineralisches Medium entwickelt werden.

#### **7.3.1. Arbeiten bei BASF**

Durch systematische Weglassversuche im Serumflaschenmaßstab konnte der Hefeextrakt vollständig durch eine Vitaminlösung ersetzt werden und ein definiertes mineralisches Medium postuliert werden. Im Fermentationsmaßstab konnte in diesem schlanken Medium ebenfalls Wachstum von *Basfia succiniciproducens* und Bernsteinsäureproduktion gezeigt werden. Das Wachstum konnte durch die Zugabe von Aminosäuren beschleunigt werden, unterschied sich aber kaum hinsichtlich der maximalen Zellzahl von gewachsenen Zellen in komplexem Medium.

Das definierte Minimalmedium wurde mit verschiedenen Mutanten von *Basfia succiniciproducens* und verschiedenen Substraten ausgetestet und weiter optimiert. Die Kultivierung von *Basfia* in definiertem Medium konnte sowohl im Labormaßstab in Serumflaschen bis hin zum Pilotmaßstab in Fermentern (bis 5m<sup>3</sup>) demonstriert werden.

Das definierte Medium war die Grundlage für Arbeiten am ibvt zur Stoffstromanalyse (Kap. 7.2) und evolutiven Optimierung von *Basfia succiniciproducens* (Kap. 7.5).

#### **7.3.2. Arbeiten am ibvt**

Die Arbeiten am ibvt schlossen an die Arbeiten der BASF an, um verschiedene Variationen des definierten Mediums zu analysieren und schließlich ein geeignetes Medium für die Stoffstromanalyse verfügbar zu machen.

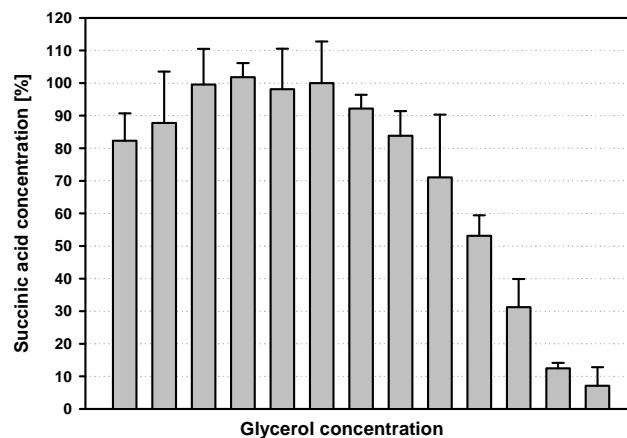
So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in Gegenwart von Vitaminen und ausgewählten Aminosäuren eine Reduktion des Hefeextrakt-Anteils um 50 % möglich war, ohne dabei die Produktionseigenschaften von *Basfia succiniciproducens* zu beeinträchtigen.



Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

Es wurden auch Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen durchgeführt. Neben Glucose ist für die Bernsteinsäureproduktion auch der Einsatz von Glycerin in Gegenwart eines Ko-Substrates wie z.B. Maltose möglich. Die am ibvt durchgeführten Experimente zur Kultivierung auf einem Maltose-Glycerin-Gemisch zeigten dabei, dass das Mischungsverhältnis dieser Ko-Substrate entscheidenden Einfluss auf die Produktivität hat. Für eine optimierte Produktion ist daher eine genaue Einstellung des Maltose-Glycerin-Gemisches erforderlich (Abbildung 7.3.1).



**Abbildung 7.3.1:** Einfluss der Glycerinkonzentration auf die Bernsteinsäureproduktion mit *B. succiniciproducens* bei konstanter Maltosekonzentration. Bestimmt wurde die Bernsteinsäurekonzentration nach 48 h. Alle Werte sind in % angegeben und auf die beste Produktion (= 100 %) normiert.

Das für die metabolische Flussanalyse geeignete Minimalmedium sollte ein reproduzierbares und metabolisch stabiles Wachstum in Serumflaschen ermöglichen. Wichtige Arbeiten dazu, wie die Einführung einer zweiten Vorkultur und die Entwicklung einer automatisierten Begasungseinheit, sind bereits in Kapitel 7.2 detailliert beschrieben worden. Ausgehend von einem bei der BASF in systematischen Optimierungsversuchen entwickelten Zwischenstand des Minimalmediums wurde zunächst ein weiter reduziertes Medium ausgetestet, da die ursprünglich eingesetzten Aminosäuren bei der metabolischen Flussanalyse mit dem <sup>13</sup>C-markierten Substrat interferieren und damit die Flussauflösung erschweren. Zusätzlich wurde die Vitaminkonzentration im Medium

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

erhöht, was zu einem verbesserten Wachstumsverhalten von *B. succiniciproducens* führte. In weiterführenden Experimenten konnten dabei limitierende Vitamine identifiziert werden.

Mit Hilfe dieses Basismediums wurden anschließend Kultivierungsexperimente zur Untersuchung der Bernsteinsäureproduktion durchgeführt. Dabei sollte der Wildtyp mit zwei genetisch modifizierten Stämmen im Hinblick auf maximale Bernsteinsäurekonzentration, Produktivität, Ausbeute und metabolische Flussverteilung verglichen werden. Das Medium diente außerdem als Standardmedium für die evolutive Adaptation (Kap. 7.5).

#### **7.4. Arbeitspaket 4: Systembiotechnologie BS-produzierender Stämme: Stoffwechsellklärung und Targetidentifizierung (ibvt, BASF-Biologie)**

**Beteiligte Mitarbeiter: Gregory v. Abendroth, Stefan Haefner, Hartwig Schröder (alle BASF); Tobias Fürch, Jasper Reinefeld (geb. Hangebrauck) (ibvt).**

Mit Hilfe der Stoffstromanalyse am ibvt konnten Targets zur molekularbiologischen Optimierung identifiziert werden. So wurden weitere Zielgene und Enzyme zur Vermeidung von Nebenprodukten und zur verbesserten Verstoffwechslung verschiedener Substrate identifiziert, die mit Hilfe der rationalen Stammentwicklung in *Basfia succiniciproducens* ausgeschaltet bzw. überexprimiert werden können. Ziel dieser Arbeiten ist es sowohl eine höhere Ausbeute für die Bernsteinsäure zu erreichen, als auch die Aufarbeitung von Bernsteinsäure aus der Fermentationsbrühe zu erreichen. Arbeiten zu dieser Problemstellung sind weiterhin im Gange.#

#### **7.5. Arbeitspaket 5: Erweiterung des Kohlenstoffspektrums durch a) adaptive Mutagenese und b) durch gentechnische Veränderung (ibvt)**

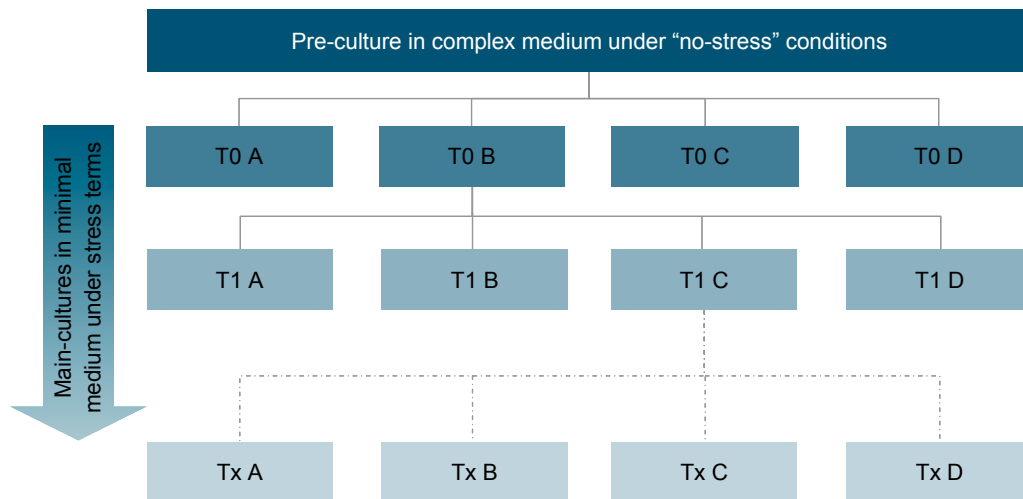
**Beteiligte Mitarbeiter: Rene Stellmacher, Rudolf Schäfer, Judith Becker (ibvt).**

##### **a) Evolutive Adaptation**

Mit Hilfe eines evolutiven Ansatzes sollten *B. succiniciproducens* Mutanten hergestellt werden, die gegenüber Stressfaktoren eine höhere Toleranz aufweisen. In Serial-Batch-Experimenten mit eigens optimiertem Minimalmedium zur Vermeidung von Auxotrophien wurden die Stämme dabei mit verschiedenen Stressfaktoren konfrontiert (Abbildung 7.5.1).

Schlussbericht FKZ 0315238

Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO



**Abbildung 7.5.1:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur evolutiven Adaptation von *B. succiniciproducens* an Stressbedingungen in Serial-Batches.

Verschiedene prozessrelevante Parameter konnten evolutiv erfolgreich angepasst werden. Da die Evaluation und Patentierung dieser Erfindungen noch anhängig sind, kann an dieser Stelle noch keine weitere Beschreibung der Ergebnisse erfolgen.

#### b) Genetische Veränderung

Für die Durchführung gentechnischer Veränderungen an *B. succiniciproducens* wurde auf die von der BASF entwickelten Plasmide zur episomalen bzw. genombasierten Modifikation zurückgegriffen. Die ersten Schritte beinhalteten eine Etablierung der Methodik am ibvt, bei der *B. succiniciproducens* zunächst mit dem episomalen Plasmid transformiert und auf Antibiotika haltigem Medium selektiert wurde. Nach diesem ersten Proof-of-concept zur Methodik wurden im Folgenden gezielt heterologe Gene zur Modifikation des Kohlenstoffstoffwechsels eingebracht. Um nun die Aufnahme und Verwertung von Kohlenstoff zu verbessern, sollten Gene aus *Escherichia coli* in *B. succiniciproducens* eingebracht werden.

Ein selbst geclonter Vektor mit den zu exprimierenden Genen wurde in den *B. succiniciproducens* Wildtyp-Stamm eingebracht. Der Nachweis erfolgte mittels PCR. Die Stämme wurden anschließend in Kultivierungsexperimenten im Hinblick auf einen veränderten Kohlenstoffstoffwechsel untersucht. Dabei konnten allerdings keine Unterschiede im Vergleich

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

zum Ausgangsstamm festgestellt werden. Die Ursache dafür können darin begründet sein, dass das heterologe Gen unter der Kontrolle des nativen Promotors aus *E. coli* nicht effizient in *B. succiniciproducens* exprimiert wird und somit trotz erfolgreicher Transformation die Bildung des katalytischen Proteins nicht erfolgt.

#### **7.6. Arbeitspaket 6: Weiterentwicklung und Upscaling der Bernsteinsäure-Laborfermentation zu einem Gesamt-Prozesskonzept zur erfolgreichen technischen Umsetzung der Fermentation (BASF)**

**Beteiligte Mitarbeiter:** Gregory v. Abendroth, Nicole Barwicki, Klaus Frambach, Beate Höh, Rajan Hollmann, Ralf Mar, Agnieszka Peters, Torsten Renz, Kerstin Rieger (geb. Ulrich), Thomas Schaefer, Oskar Zelder (alle BASF).

Der Fermentationsprozess mit *Basfia succiniciproducens* konnte innerhalb des Förderzeitraumes erheblich verbessert werden. Die **Testung verschiedener rational und evolutiv optimierter Mutanten von *B. succiniciproducens*** (siehe Kapitel 7.1 und 7.5) im Fermentationsprozess und dessen Anpassung auf die jeweilige Mutante erfolgte ebenfalls im Zusammenhang mit diesem Arbeitspaket.

Die **Vorkulturschiene** wurde angepasst, um einen möglichst schnellen und reproduzierbaren Prozess zu ermöglichen. Dazu war es z.B. möglich, große Volumina Kulturvolumen in der exponentiellen Wachstumsphase als Cryo-Stocks einzufrieren und auf diese Weise eine Revitalisierung von *B. succiniciproducens* in relativ großem Maßstab zu ermöglichen.

Verschiedene **Substratkombinationen und Medienzusammensetzungen** wurden, wie in Kap. 7.3 beschrieben, ausgetestet und optimiert. Die weitreichende Substratflexibilität von *B. succiniciproducens* über die Standardzucker Glucose und Saccharose hinaus konnte bestätigt werden. Auch die Substratkombinationen mit Glycerin ist möglich.

Das **Basenkonzept** zur Einstellung des neutralen pH-Wertes während der Fermentation wurde grundlegend untersucht. Es konnten deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen ein- und zweiwertigen Basen hinsichtlich der Bernsteinsäureproduktivität gezeigt werden. Diese Entdeckung war eine wesentliche Grundlage zur Anpassung der Aufarbeitung in Richtung eines effizienten Basenrückführungssystems.

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

In Vorbereitung der industriellen Fermentation wurde die **Robustheit des FedBatch-Fermentationsverfahrens** angepasst, industrielle Einsatzstoffe ausgewählt und ein Konzept zur Medienzubereitung ausgearbeitet. Der Einfluss der CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit im Fermentationsprozess wurde untersucht.

Um das **Upscaling** vom Labor- in den Industriemaßstab vorzubeleuchten, wurden Fermentationen bis in den 5m<sup>3</sup>-Maßstab erfolgreich durchgeführt. Auf dieser Grundlage wurde auch erstes Mustermaterial der Bernsteinsäure im Maßstab von ca. 100kg verfügbar gemacht.

#### **7.7. Arbeitspaket 7-1: Entwicklung eines Gesamt-Prozesskonzepts zur erfolgreichen technischen Herstellung von BDO aus BS (BASF)**

Die technische Machbarkeit eines Prozesses zur Herstellung von BDO auf der Basis von Bernsteinsäure ist bekannt und wurde kurz vor Beginn der Förderung dieses Projektes auch in einem speziell in die Fermentation von Diammoniumsuccinat eingepassten Prozess demonstriert (siehe Kapitel 7.10). In Rücksprache mit dem Projektträger wurde der Fokus dieses Projektes jedoch zunächst auf die Herstellung fermentativer Bernsteinsäure gelegt, da diese attraktivere Herstellkostenpotenziale zeigt und damit die Entwicklung neuartiger Bernsteinsäurepolyester erlaubt.

#### **7.8. Arbeitspaket 7-2: Entwicklung eines geeigneten Hydrierverfahrens von BS zu BDO Herstellung von Musterteilen (BASF)**

Eine Stellungnahme zum geeigneten Hydrierverfahren von BS zu BDO wurde bereits in Kap. 7.7 und 7.10 gegeben. BS-Musterteile werden in Kap. 7.9 beschrieben.



Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

### **7.9. Arbeitspaket 7-3: Polykondensation von biobasiertem BDO und Bernsteinsäure zu Polymeren wie PBT, PBS Ecoflex (BASF)**

**Beteiligte Mitarbeiter: Birgit Baab, Martina Frühbeis, Andreas Füssel, Peggy Helbig, Kalrheinz Jochem, Andreas Künkel, Robert Loos, Kian Molawi, Arnold Schneller, Kai Siegenthaler, Karthikeyan Sharavan, Gabriel Skupin, Xin Yang, Matthias Zimmermann (alle BASF).**

Biologisch abbaubare Polyester auf Basis von fossiler Bernsteinsäure sind bereits seit längerem bekannt und teilweise auch kommerziell von den japanischen Firmen Showa Denko und Mitsubishi erhältlich. Im Vergleich zu den ebenfalls biologisch abbaubaren fossil basierten aliphatisch-aromatischen Copolyestern (z.B. Ecoflex<sup>®</sup> von BASF) konnten sich diese Polyester aber aufgrund ihrer zu hohen Herstellkosten, der zu langsamen biologischen Abbaubarkeit in industriellen Kompostierungsanlagen sowie der schlechteren Folieneigenschaften bisher nicht breit gegenüber fossilen Standardpolymeren durchsetzen.

Durch die Verfügbarkeit von biobasierter und kostengünstiger Bernsteinsäure ergeben sich aber nun neue Chancen und Anwendungsgebiete, um v.a. in Kombination mit anderen biobasierten Polymeren biologisch abbaubare Produkte mit neuen Eigenschaften gepaart mit einer hervorragenden Ökobilanz zu kreieren. Im Fokus standen v.a. biologisch abbaubare Produkte mit hoher Wärmeformbeständigkeit im Bereich steifer Verpackungslösungen, die mit den heute im Markt verfügbaren Biopolymeren nicht breit adressierbar sind. Mögliche Lösungen erfordern entweder in der Verarbeitung zusätzliche Prozessschritte verglichen mit Standardkunststoffen (z.B. nachträgliche Kristallisation von Polymilchsäure) oder sind deutlich teurer (z.B. Polyhydroxyalkanoate).

Im Rahmen des Arbeitspaketes wurde zunächst im Labormaßstab die Polykondensation von biobasierter Bernsteinsäure in Kombination mit anderen Dicarbonsäuren zu verschiedenen Co-Polyestern untersucht. Aus den Anforderungen an die benötigten Materialeigenschaften (z.B. Steifigkeit, Zähigkeit, Kristallisationsgeschwindigkeit) und der biologischen Abbaugeschwindigkeit ergaben sich am Ende mehrere Rezepturen, die für eine weitere Entwicklung geeignet erschienen.

Im Verlauf der weiteren Arbeiten wurden einerseits im Labormaßstab Polyester auf Basis fermentativer Bernsteinsäure unterschiedlicher Reinheitsgrade hergestellt, um ein optimales Farb- und Eigenschaftsprofil der finalen Polyester zu garantieren. Die final synthetisierten Polyester sind im Rahmen der durchgeführten Analysen als vergleichbar mit den analogen Polyestern auf Erdölbasis anzusehen. Parallel dazu wurden Polykondensationskapazitäten im Pilotmaßstab installiert, um ausreichende Mengen für eine genaue Charakterisierung der Polyester sowie erste Anwendungsversuche zu ermöglichen. Diese Copolyester wurden zunächst auf Basis fossiler Bernsteinsäure im Pilotmaßstab (<100 kg) synthetisiert und die weiteren Versuchsserien mit verschiedenen anderen Biopolymeren und/oder verschiedenen Füllstoffen compoundiert (siehe Kapitel 7.11, Musterherstellung).

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

Ausgewählte Materialien wurden Kompostiertests im Pilotmaßstab unterzogen und so vielversprechende Kandidaten identifiziert, die auch in höheren Wandstärken > 1mm das Potential haben, in einem Zertifizierungsprozess zu bestehen und gleichzeitig eine hohe Wärmeformbeständigkeit aufzuweisen.

Aufgrund des guten Projektfortschritts wurde beschlossen, einen Betriebsversuch im Tonnenmaßstab durchzuführen, um das Syntheseverfahren für den Polyester zu validieren und genügend Polyestermengen für die weitere Compound- und Produktoptimierung bereitzustellen. Dazu wurde im Vorfeld eine Serie von Pilotversuchen durchgeführt, die der Simulation & Vorbereitung des Betriebsversuches dienen. Dabei zeigte sich, dass für den Scale-Up noch einige Änderungen zu berücksichtigen waren, die u.a. eine Anpassung der Fahrweise bei der Polyestersynthese zur Folge hatten und die in weiteren Versuchen im Pilotmaßstab validiert wurden. Pilotversuche mit biobasierter Bernsteinsäure aus dem erfolgreichen Upscale beim Kooperationspartner PURAC zeigten ferner, dass die Polyester im 100 kg Maßstab erfolgreich hergestellt werden können, allerdings ggü. den Polyestern auf Basis fossiler Bernsteinsäure noch Farbunterschiede auftreten sowie eine etwas längere Polykondensationszeit benötigt wird.

Bei dem gegen Ende der Projektlaufzeit durchgeführten Betriebsversuche gelang es schließlich, mehrere Tonnen spezifikationsgerechten Polyester auf Basis Bernsteinsäure zu synthetisieren und wertvolle Informationen hinsichtlich der benötigten Anlagentechnik für eine kommerzielle Produktion im industriellen Maßstab zu gewinnen.

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

### **7.10.      Arbeitspaket 8: Aufbau einer Miniplant-Anlage für die Herstellung von BS, Aufarbeitung und Reinigung von BS und Hydrierung zu BDO (BASF)**

**Beteiligte Mitarbeiter: Gregory von Abendroth, Katja Bergmann, Matthias Boy, Stefanie Demming, Hans Gurski, Yvonne Hoelzl, Andreas Krebs, Aline Raddatz, Wolfgang Siegel (alle BASF).**

#### **Aufbau einer Miniplant-Anlage für die Herstellung von Bernsteinsäure:**

Um ein Verfahren in den industriellen Maßstab zu überführen, gibt es die Möglichkeit den gesamten Prozess vorab im Labormaßstab über einen längeren Zeitraum zu demonstrieren (Miniplant-Konzept).

Da sich in diesem Projekt die Möglichkeit auftat, den Prozess zur Herstellung von Bernsteinsäure in einer bereits existierenden Industrieanlage der Firma Purac zu demonstrieren, wurde das Konzept der Miniplant zu Gunsten eines Demonstrationslaufs in Absprache mit dem Projektträger eingetauscht. Der erfolgreiche Demonstrationslauf führte in fünf Fermentationen im >100m<sup>3</sup>-Maßstab zu mehreren Tonnen spezifikationsgerechtem Produkt (Abb. 7.10.1). Dieses Produkt sollte zur Entwicklung der Polyesteranwendung im Pilotmaßstab eingesetzt werden und dient darüber hinaus zur Bemusterung von externen Kunden und der Entwicklung neuer Märkte.



**Abb. 7.10.1:** Ein Bigbag der von BASF und Purac gemeinsam im industriellen Maßstab hergestellten biobasierten Bernsteinsäure.

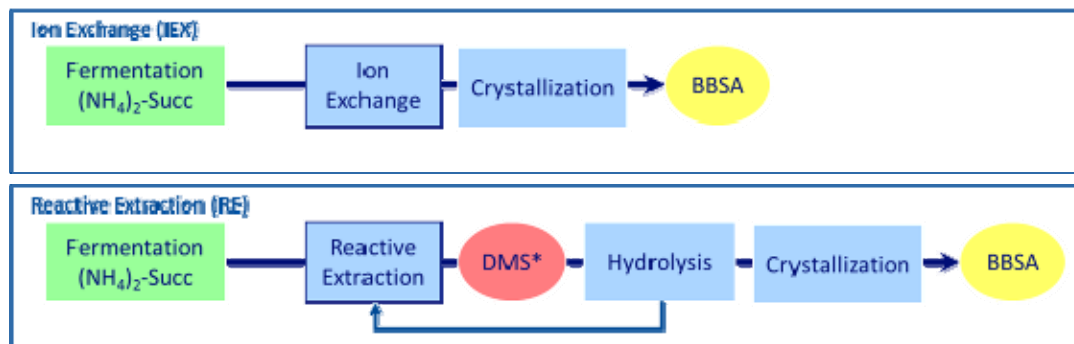


Schlussbericht FKZ 0315238

Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO

### Aufarbeitung und Reinigung von Bernsteinsäure:

Verschiedene Alternativen zur Aufarbeitung von Bernsteinsäure aus der Fermentationsbrühe wurden im Rahmen des Projektes untersucht und miteinander verglichen. Es wurden zwei Wege der Aufreinigung freier Bernsteinsäure mit Hilfe von a) Ionentauschern und b) einer Extraktion mit Toluol bei BASF entwickelt (Abb. 7.10.1), im Labormaßstab demonstriert und zum Patent angemeldet (WO2010/037807; WO2010/092155).



**Abb. 7.10.1:** Schematische Darstellung der Aufarbeitung von Fermentationsbrühe mit Diammoniumsuccinat zu biobasierter Bernsteinsäure (BBSA) über Ionentausch bzw. Reaktivextraktion, bei welcher Dimethylsuccinat (DMS) als Zwischenprodukt generiert wird.

Beide Verfahren erlauben die Herstellung von polymergrade Bernsteinsäuremonomeren, bringen jedoch die Tatsache mit sich, dass das in der Fermentation über die Base eingebrachte Salz im Prozess nicht zurückgeführt sondern verworfen werden muss, was mit erheblichen ökologischen und ökonomischen Nachteilen verbunden ist. In Zusammenarbeit mit der Firma Purac, dem Weltmarktführer für Milchsäure - eine ebenfalls fermentativ hergestellte Carbonsäure -, wurden deshalb weitere Alternativen der Aufarbeitung freier Bernsteinsäure beleuchtet und ein kostengünstiger Gesamtprozess identifiziert.

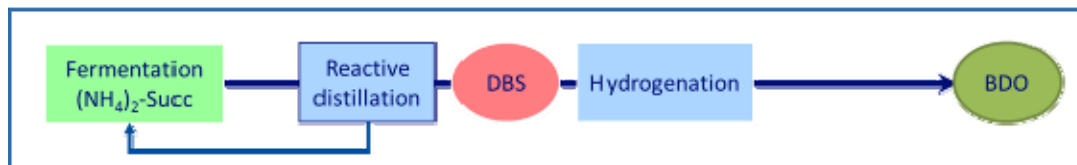


Schlussbericht FKZ 0315238

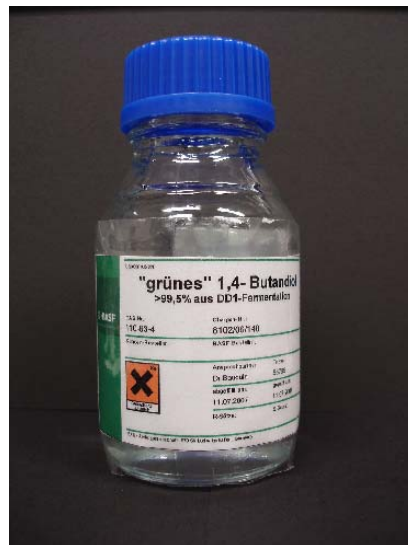
*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

### Hydrierung zu BDO:

Die Hydrierung zu BDO wurde bereits vor Beginn des Förderzeitraumes auf der Basis der Veresterung von Diammoniumsuccinat zum Dibutylester der Bernsteinsäure und anschließender Hydrierung zum BDO (Abb. 7.10.2) im Labormaßstab gezeigt und zum Patent angemeldet (WO2007/116005, Abb. 7.10.3). Die Herstellkostenanforderungen für BDO liegen jedoch deutlich über denen für BS, weshalb im Rahmen der Förderung der Fokus auf die Herstellung der freien Bernsteinsäure als Basismonomer für Bio-Polyester gelegt wurde.



**Abb. 7.10.2:** Schematische Darstellung der Aufarbeitung von Fermentationsbrühe mit Diammoniumsuccinat über Dibutylsuccinat (DBS) hin zum 1,4-Butandiol (BDO).



**Abb. 7.10.3:** Bei BASF im Labormaßstab hergestelltes Bio-BDO Muster.

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

### **7.11.      Arbeitspaket 9: Herstellung von Musterprodukten (BASF, ggf. weitere Industriepartner)**

Musterprodukte des Bernsteinsäure basierten Polyesters konnten bei BASF untersucht werden, so dass keine weiteren Industriepartner hinzugenommen wurden. In der letzten Phase des Projektes erfolgte auch die Bemusterung externer Kunden.

Bei den in Kapitel 7.9 beschriebenen Compounds wurden in mehreren Iterationsschleifen die Materialeigenschaften durch Variation der Polyester- und Comopundrezepturen soweit verbessert, dass erstmals erfolgreiche Anwendungsversuche mit industriellen Umformungsmethoden (Flachfolienextrusion & Thermoforming) erreicht werden konnten. Erste Pilotmengen dieser Compounds wurden im weiteren Projektverlauf bei potentiellen Kunden auf deren Pilotanlagen getestet, um die Eigenschaftsprofile weiter zu verbessern und alle kritischen vom Kunden gestellten Anforderungen an das Material zu erfüllen. Es konnten dabei z.B. Deckel für Heißgetränkebecher oder Kunststoffbecher für den Kontakt mit heißen Lebensmitteln erfolgreich hergestellt werden, die in Bezug auf ihre Wärmeformbeständigkeit die Kundenanforderungen voll erfüllten (Abb. 7.11.1).



**Abbildung 7.11.1:**      Beispielfotos wärmeformbeständiger Produkte auf Basis bernsteinsäurehaltiger Polyester aus externen Kundenversuchen.

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

## **7.12. Arbeitspaket 10: Projekt-Networking & Projektevaluation (alle Partner)**

### **Projekt-Networking:**

In regelmäßigen Abständen trafen sich die Projektpartner BASF und ibvt zu Clustertreffen (ca. alle 6 Monate), um sich über den Fortschritt des Projektes zu informieren. In der Zwischenzeit fanden Telefonkonferenzen und direkter Austausch zwischen den zusammenarbeitenden Personen statt. So konnten Studenten und Doktoranden des ibvt zu Forschungseinsätzen bei BASF gastieren. Das Projekt wurde teilweise gemeinschaftlich der Öffentlichkeit vorgestellt (ProcessNet Tagung Aachen, 2010) und mit Hilfe des Cluster Instituts BioPro in Stuttgart diskutiert.

### **Projekt-Evaluation:**

Das Projekt vernahm einen technisch vielversprechenden Verlauf, da die fermentative Herstellung der Bernsteinsäure mit Hilfe des Modellorganismus *Bastia succiniciproducens* deutlich verbessert und der gesamte Herstellprozess für freie Bernsteinsäure bis in den industriellen Maßstab gezeigt werden konnte. Auch die Entwicklung eines Bernsteinsäurepolyesters wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Projektes deutlich vorangetrieben und bis im Pilotmaßstab gezeigt.

Auch die ökonomische Betrachtung des Verfahrens zur Herstellung fermentativer Bernsteinsäure sieht attraktiv aus, nachdem gemeinsam mit einem neuen Partner, der Purac, die Effizienz des Gesamtverfahrens erhöht werden konnte. Das geförderte Projekt bietet nun die Grundlage die Technologieentwicklung bis zur Produktionsreife zu vollenden und eröffnet die Möglichkeit zur kostengünstigen Produktion von biobasierter Bernsteinsäure.

Die wirtschaftliche Betrachtung für die bernsteinsäurebasierten Polyester und den daraus abgeleiteten Compounds sowie deren Marktpotential fiel ebenfalls positiv aus und es wird weiterhin eine zeitnahe Kommerzialisierung angestrebt. Bestätigt wird diese positive Einschätzung ferner durch die in Kapitel 11. ausgeführten Aktivitäten von Wettbewerbern auf diesem Arbeitsgebiet.

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

## **8. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Die im Rahmen des BMBF-geförderten Projektes durchgeführten Arbeiten waren aus technischer Sicht äußerst erfolgreich und führten zur Entwicklung eines ökonomischen Herstellprozesses für biobasierte Bernsteinsäure und der Herstellung von Musterbauteilen aus Bernsteinsäure-basierten Polyestern.

Hohe Ausgaben entstanden im Zusammenhang mit der Entwicklung der Technologie bis zur Realisierung im Technikums- und Industriemaßstab. Letzteres war eine große Chance für das Projekt, die genutzt werden konnte, um Zuversicht für die industrielle Realisierbarkeit der Technologie zu generieren und ausreichende Mengen Material zur Bemusterung biobasierter Anwendungen verfügbar zu machen.

## **9. Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses**

Die Ergebnisse aus dem BMBF-geförderten Projekt wurden in zahlreichen Veröffentlichungen zur Verfügung gestellt bzw. in Patenten gesichert. Die BASF SE ist auf der Grundlage der im BMBF-geförderten Projekt generierten Einsichten an einer weiteren Entwicklung der Technologie bis hin zur Industriereife interessiert und treibt diese aktuell voran. So wird derzeit ein Joint Venture mit der Firma Purac verhandelt, um gemeinsam die Produktion biobasierter Bernsteinsäure realisieren zu können.

Die im Rahmen des BMBF-Projektes gewonnenen Erkenntnisse auf dem Gebiet der Bernsteinsäurepolyester wurden durch einige Patentanmeldungen abgesichert und führten zu der Entscheidung, diese Ergebnisse in den kommerziellen Maßstab zu überführen.

Schlussbericht FKZ 0315238

*Herstellung von Polyestern auf Basis fermentativ hergestellter Bernsteinsäure bzw 1,4-BDO*

## 10. Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen

Bereits zu Beginn des Projektes waren Wettbewerber zur Herstellung biobasierter Bernsteinsäure bekannt, die in der Zwischenzeit teilweise ebenfalls mit erheblichen Förderungen durch staatliche Stellen, Herstellverfahren entwickelt und zum Teil in die Anwendung überführen konnten.

### 1. Reverdia

Das Joint Venture Reverdia wurde während des Förderzeitraumes von den Firmen DSM (Niederlande) und Roquette (Frankreich) gegründet und hatte zunächst eine *E.coli* basierte Fermentationstechnologie einlizensiert. Die Optimierung dieser Technologie wurde schließlich durch die Entwicklung eines neuen, Hefe-basierten Verfahrens abgelöst. Die Hefe-Technologie ermöglicht die Fermentation im pH-sauren Bereich und dadurch das Weglassen einer neutralisierenden Base, was die Aufarbeitung der freien Säure vereinfacht. Reverdia hat angekündigt, Ende 2012 mit einer 10kt Anlage in Italien die Produktion zu starten.

### 2. Bioamber

Das Joint Venture Bioamber wurde bereits vor 2008 von den Firmen DNP (USA) und ARD (Frankreich) gegründet und hat eine *E.coli* basierte Fermentationstechnologie von der University of Chicago einlizensiert. Die Optimierung dieser Technologie erfolgte bis in den Maßstab einer 3kt Demonstrationsfabrik, welche in Reims (Frankreich) gebaut werden konnte. Kürzlich wurde die Einlizensierung eines neuen, ebenfalls Hefe-basierten Verfahrens von der Firma Cargill angekündigt, die das *E.coli* Verfahren ab 2015 als drop-in Lösung ablösen soll. Bioamber hat angekündigt, in 2013 den Bau einer Anlage in Sarnia (Kanada) fertigzustellen und im Maßstab von 34kt biobasierter Bernsteinsäure mit der Produktion zu starten.

### 3. Myriant

Als vierter Spieler im zukünftigen Bernsteinsäuremarkt ist der Start-up Myriant bekannt, welcher eine *E.coli* Fermentationstechnologie aus der University of Florida einlizensiert hat. Der Bau einer 14kt Produktionsanlage erfolgt derzeit in Louisiana (USA) mit Produktionsstart voraussichtlich in 2013.

Im Bereich der Bernsteinsäure-basierten Polyester entstand 2011 das Joint-Venture „ptt MCC Biochem“ zwischen PTT (Thailand) und Mitsubishi (Japan). Das Joint-Venture hat sich durch Beteiligungen & Kooperationen (PTT an der Fa. Myriant für Bio-Bernsteinsäure, Mitsubishi mit Bioamber für Biobernsteinsäure und Genomatica für Bio-1,4-Butandiol) in die benötigten biobasierten Monomere rückwärtsintegriert und verfügt über das benötigte Polymersations-Know-How.

Anfang 2012 erfolgte die Gründung des Joint-Ventures „Amberworks“ zwischen Bioamber und Natureworks, dem global führenden Polymilchsäurehersteller. Das JV plant ebenfalls, Compounds auf Basis bernsteinsäurehaltiger Polyester anzubieten.

Beide JV's unterstreichen das hohe Potential, welches auch andere Firmen in den biobasierten Polymeren auf Basis Bernsteinsäure und deren Blends sehen.