

Forschungsbericht BWPLUS

**„Biosynthese von Lävulinsäure-Derivaten als  
Plattformchemikalien aus Abfällen der Holz-, Papier- und  
Zuckerindustrie“ (BioLäv)**

von

Christine Woiski, Martina Kiel, Steffen Helbich, Daniel Dobsław

Universität Stuttgart  
Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft  
Biologische Abluftreinigung

Förderkennzeichen: BWBÖ17008

Die Arbeiten des Baden-Württemberg-Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre  
Sicherung (BWPLUS) werden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Juni 2018

## Kurzbeschreibung der Forschungsergebnisse

Es wurden 7 unterschiedliche Stämme isoliert, die Furan als alleinige Kohlenstoffquelle verwenden können: Die zur Familie Nocardiaceae zählenden Stämme FUR100 und FUR402, *Nocardia elegans* FUR200, die Stämme *Nocardioides albus* FUR300, FUR302 und FUR303 sowie *Rhodococcus* sp. FUR500. Für die Produktion von Lävulinsäure und deren Derivate erwies sich FUR100 als am besten geeignet, da er kein Wachstum zeigte auf 2-Methylfuran (MF) und 2,5-Dimethylfuran (DMF), diese aber transformieren konnte bei gleichzeitiger Zugabe von Furan. Die Wachstumsrate  $\mu$  bei Wachstum auf Furan betrug im Mittel  $0,184 \text{ h}^{-1}$ , die Verdopplungszeit 226 min. In einer kontinuierlichen Kultur konnte FUR100  $1 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{h})$  Furan stabil umsetzen. Für die Identifizierung der Furan-Abbaugene und damit der Gene, die für die Transformation der Furan-Derivate MF und DMF verantwortlich sind, wurde sowohl eine Gesamtgenomsequenzierung als auch eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Sequenzierungen liegen bisher noch nicht vor. Sind die Gene bekannt, können diese in einem geeigneten Expressionshost kloniert und exprimiert werden und aus Furanderivaten biotechnologisch Lävulinsäure und deren Derivate hergestellt werden.

## Motivation und Hintergründe des Vorhabens

Lävulinsäure (4-Oxopentansäure) und verwandte Bernsteinsäurederivate stellen wichtige Plattformchemikalien für die Synthese hochpreisiger chemischer Produkte wie Pharmazeutika, Kraftstoffadditive, Herbizide, Farbstoffe, Beschichtungen, Lösemittel, Bioplastik und Lebensmitteladditive dar und gehören zu den Top10 biobasierenden Plattformchemikalien gemäß dem US Department of Energy. Chemische, thermische sowie thermochemische Verfahren zur Herstellung von Lävulinsäure weisen jedoch eine begrenzte Ausbeute bei hohem Energieeinsatz, Abfallanfall und unwirtschaftlichen Produktionskosten von über  $7,20 \text{ €/kg}$  auf.

Ziel dieses Projektes ist die biologische Herstellung von Lävulinsäure und verwandten Derivaten aus kostengünstigen Cellulose- oder Zuckerabfällen. Hierfür erscheint eine Verfahrenskombination aus einem thermischen Vorbearbeitungsschritt zum Aufschluss der Lignocellulosen zu Furan-Derivaten (bis zu 70 % Ausbeute) und nachgeschalteter Biokonversion der Furan-Derivate zu Lävulinsäure geeignet. Der Forschungsfokus liegt dabei auf der Biotransformation der anfallenden Furan-Derivate zu Lävulinsäure und verwandten Derivaten mit dem Schwerpunkt auf 2-Methylfuran und 2,5-Dimethylfuran.

Als mittelfristiger Ausblick erscheint eine biologisch-chemisch Verfahrenskombination mit chemischer Dehydrierung bzw. eine rein biologische Kombination aus Delignifikation, fermentativer Transformation der Monosaccharide zu 2-Methylfuran und weiterer Konversion zu Lävulinsäure möglich.

## Aufgabenstellung

Die Herstellung von Lävulinsäure-Derivaten aus Cellulose- oder Zuckerabfällen erfordert zwei Verfahrensschritte. Zunächst werden aus Polysacchariden Furan-Derivate gewonnen, die im zweiten Schritt zu Lävulinsäure und deren Derivaten umgesetzt werden. Ziel dieser Kurzstudie war, die Möglichkeiten zu untersuchen, den zweiten Schritt dieses Syntheseweges statt mit chemischen und thermischen Verfahren durch bakterielle Transformation zu bewerkstelligen.

Die mikrobielle Biokonversion von 2-Methylfuran bzw. 2,5-Dimethylfuran wurde bis dato nicht in wissenschaftlichen Publikationen thematisiert. Lediglich die Arbeit von Pasanen et al. (1997) beschreibt alleinig die Bildung von 2-Methylfuran als MVOC von *Aspergillus versicolor*.

Im Gegensatz hierzu wurde der bakterielle Abbau von Tetrahydrofuran (THF) als abgesättigtem Furan bereits eingehend untersucht. THF wird dabei im Stamm *Rhodococcus opacus* nach Hydroxylierung zu 2-Hydroxytetrahydrofuran durch eine Isomerase zu 4-Hydroxybutanal und eine anschließende Dehydrogenase zu 4-Hydroxybuttersäure umgesetzt (Bernhardt & Diekmann, 1991). In *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 wurde als Abbauiintermediat Butyrolacton nachgewiesen, so dass hier der Abbau von THF nach Hydroxylierung über eine Dehydrogenase mit anschließender Hydrolase-Reaktion zu 4-Hydroxybuttersäure abläuft (Thiemer et al., 2003).

Auf Grundlage genannter Abbauwege erscheint im Falle von 2-Methylfuran eine anguläre Hydroxylierung unter Bildung von 1-Oxo-2-hydroxy-2-methylcyclobut-3-en und anschließender Isomerisierung zu 4-Oxopentanal und Dehydrogenierung zu Lävulinsäure (4-Oxopentansäure) möglich (s. Abbildung 1). Entsprechendes gilt für 2,5-Dimethylfuran nach erfolgter Decarboxylierung. Eine sterisch behinderte, anguläre Hydroxylierung wurde bereits im Abbau von Dibenzofuran, 2-Methoxybenzoat, Fluoren und Carbazol beobachtet (Engesser et al., 1989; Strubel et al., 1989; Dehmel et al., 1995; Wang et al., 2014)

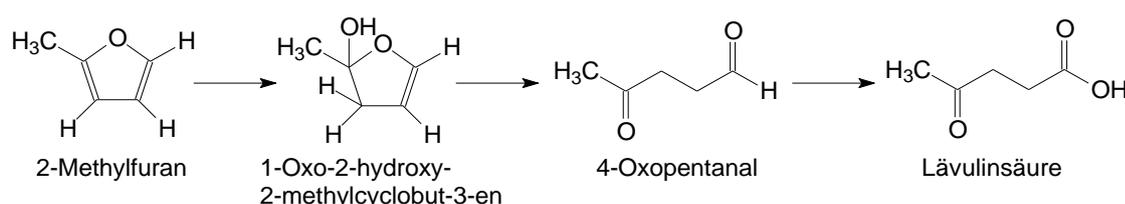


Abbildung 1 Potentieller Abbauweg für 2-Methylfuran

## Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

### Konventionelle Synthesewege von Lävulinsäure

Lävulinsäure als Plattformchemikalie wird konventionell durch petrochemische Reaktion aus Maleinsäureanhydrid oder aus Furfural-Alkoholen synthetisiert (Moens, 2002; Yan et al., 2008). Dieser Syntheseweg weist neben dem Verbrauch von Erdöl als fossilem Energieträger die erheblichen Nachteile einer hohen Umweltbelastung durch den hohen

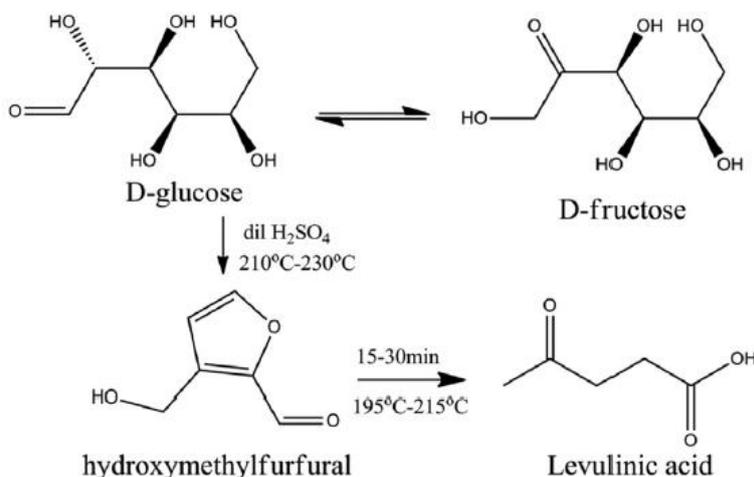
erforderlichen Energieeinsatz bei den vorgeschalteten Crack- und Hydrolysereaktionen auf und führt auch zur Bildung teerartiger Schlacken, die als Abfälle zu behandeln sind. Ferner ist das Verfahren aufgrund der eingesetzten Edukte, Energie und Katalysatoren verhältnismäßig teuer.

Alternative Synthesewege basieren auf dem Einsatz von Monosacchariden (Glukose, Fruktose), 5-Hydroxymethylfurfural, Furfural, Polysacchariden bzw. auf dem Einsatz der originären nachwachsenden landwirtschaftlichen Rohstoffe (stärkehaltige bzw. lignocellulosehaltige Rohstoffe).

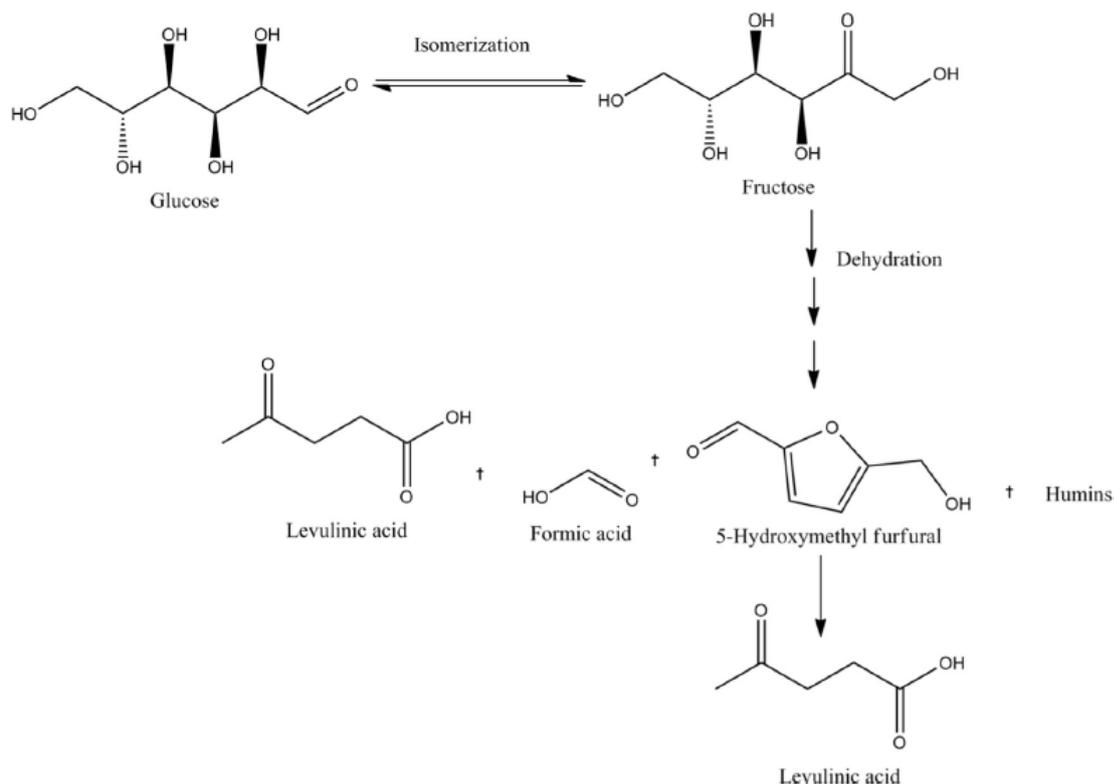
Die Synthese von Lävulinsäure aus Fruktose als Edukt stellt dabei den industriell bedeutendsten Syntheseweg dar. Fruktose wird hierbei durch saure Katalyse zu 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) dehydriert, welches durch verschiedene alternative Syntheserouten zu Lävulinsäure umgesetzt werden kann (s. Abbildung 2 und Abbildung 3). Der zweistufige Prozess läuft bei Drücken zwischen 10–25 bar ab. Dieser sogenannte Biofine-Prozess zeichnet sich durch eine hohe Ausbeute von 70 – 80 % an Lävulinsäure aus. Allerdings führt der Prozess zu einem hohen Anteil an gebildeten Huminsäuren, weist einen sehr hohen Wasserbedarf sowie sehr hohe Energiekosten auf und erlaubt nur eine begrenzte Rückgewinnung der eingesetzten Säure (Bozell et al., 2000; Hayes et al., 2005). Die kalkulierten Kosten liegen bei 3–5 €/kg Lävulinsäure (Aigner, 2015).

Bei Einsatz von Glukose kann diese entweder durch Zugabe von Metalloxidkatalysatoren wie  $\text{TiO}_2$  oder  $\text{ZrO}_2$  zu Fruktose isomerisiert werden (Huang et al., 2010; Qi et al., 2012) oder durch schwefelsaure Katalyse bei 210–230 °C zunächst zyklisiert und weiter zu Lävulinsäure hydriert werden (Morone et al., 2015).

Der Einsatz von Polysacchariden als Edukt zur Lävulinsäuresynthese wurde in einer Reihe von wissenschaftlichen Veröffentlichungen thematisiert und Angaben zur Lävulinsäureausbeute gemacht. Dabei stellen Stärke, Cellulose und Hemicellulose die einfachsten, billigsten und zugleich in größter Menge verfügbaren Polysaccharid dar (Mascal & Nikitin, 2008; Nikolla et al., 2011; Verendel et al., 2011). Ebenso von Relevanz sind hierbei das aus Chitin gewonnene Chitosan sowie Inulin (Lee & Jeong, 2015; Qi et al., 2010; Wang et al., 2013). Bei allen beschriebenen Verfahren werden die Polysaccharide zu den Monosacchariden Glukose und Fruktose umgesetzt.



**Abbildung 2 Biofine-Prozess zur Gewinnung von Lävulinsäure aus Fructose (nach Morone et al., 2015)**



**Abbildung 3 Chemische Synthese von Lävulinsäure aus Monosacchariden (nach Morone et al., 2015)**

Die für eine hohe Selektivität erforderliche Vorbehandlung und Aufreinigung der Polysaccharide ist für das jeweilige Polysaccharid spezifisch (Morone et al., 2015), so dass keine komplexen, Polysaccharid-reichen Abfallgemische eingesetzt werden können. Es ist somit ein sortenreiner Einsatz von landwirtschaftlichen Produkten erforderlich, der somit zu einer direkten Konkurrenz um Anbauflächen mit landwirtschaftlichen Produkten zur Nahrungserzeugung führt. Trotz aufwendiger Vorreinigung führt die säurekatalysierte Hydrolyse während der Monomerisierung der Polysaccharide zu einer Vielzahl an Nebenreaktionen, die einerseits die gewünschte Produktausbeute erheblich schmälern, zu einer komplexeren Aufreinigung führen und auch die Katalysatoraktivität negativ beeinflussen (Kuster, 1990). Morone et al. (2015) beschreiben säurekatalysierte Ausbeuten an Lävulinsäure von 16–59,4 % bei Einsatz verschiedener aufgereinigter landwirtschaftlicher Produkte sowie einiger landwirtschaftlicher Abfälle. Abfälle wie Holz, Stroh und Bagasse weisen hier Lävulinsäure-Ausbeuten von geringen 16–23,7 % auf, während für aufgereinigte Stärke bzw. Rohrzucker Ausbeuten von 35,4–50 % erzielt wurden. Weiterhin geben die Autoren einen umfassenden Literaturüberblick zur säurekatalysierten Lävulinsäuresynthese aus 15 verschiedenen Sacchariden und cellulosehaltigen Edukten mit zugehörigen Prozessbedingungen und zu erwartenden Lävulinsäureausbeuten (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1 Überblick über säurekatalysierte Lävulinsäure-Synthesewege (nach Morone et al., 2015; weiterführende Quellen dort referenziert)**

Sr. no.	Substrate	Substrate loading (%)	Reaction system/ solvent	Catalyst	Temperature (°C)	Reaction time	Yield (wt%)	Remark	Ref		
At Laboratory Scale											
1.	Fructose	1	Subcritical water	HCl	240	2 min	46.08	Indicates applicability of continuous tubular subcritical reactor	[118]		
		1	Subcritical water	p-Toluenesulfonic acid (PTSA)	240	2 min	33.72				
		2	Water	TFA	180	1 h	45	An aqueous/fluro biphasic system is envisaged for C6 sugar conversion to LA facilitating acid catalyst recycle	[119]		
		8	Water	TFA; Ru/C	180	8 h	34				
		10	Water-methanol	HCl	140	80 min	72	Use of flow reactors and inexpensive reagent systems	[120]		
		1	Water	CrCl <sub>3</sub> + HY zeolite hybrid catalyst	145.2	146.7 min	55.2	Use of hybrid catalyst enhanced LA production	[121]		
2.	Glucose	1.8	Water	HCl	141	60 min	60	Use of continuous reactor configuration with high extent of back mixing is suggested	[41]		
		1.8	Water	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	141	60 min	60		[122]		
		2	Water	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	140	120 min	60		[123]		
		2	Water	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	180	15 min	42	MSA minimizes corrosion and disposal issues	[124]		
		2	Water	Methanesulfonic acid	180	15 min	41		[76]		
		5	Water	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	170	2 h	34	Pseudo homogeneous first-order reaction	[126]		
		10	Water	HCl	160	4 h	41	ZrP has higher HMF selectivity and lower LA selectivity	[78]		
		10	Water	Zirconium phosphate	160	3 h	14		[127]		
		12	Water	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	24 h	30	Decrystallization of biomass followed by acid hydrolysis, separation and recovery of LA	[128]		
		13	Water	Sulphonated graphene oxide (GO-SO <sub>3</sub> H)	200	2 h	50	Higher density of Bronsted acid sites in GO led to higher catalytic activity of GO-SO <sub>3</sub> H	[73]		
		3.	Cellulose	1.6	Water	HCl	180	20 min	44	Batch reactor system; pseudo first-order reaction	[81]
				1.7	Water	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150	2 h	43	Use of continuous reactor configuration with high extent of back mixing is suggested	[127]
2	Water			CrCl <sub>3</sub>	200	180 mins	48	Transition metal chlorides exhibited high catalytic activity while alkali and alkaline earth metal chlorides were ineffective	[128]		
2	Water-GVL			Amberlyst 70	160	16 h	49	Ease of catalyst regeneration	[129]		
2	Water-MIBK			[MIMPSH]H <sub>2</sub> PW	140	12 H	45	Easy separation of catalysts and products	[76]		
4	Water			Sulphonated chloromethyl polystyrene resin	170	10 h	24	Presence of acid sites as well as cellulose-binding types; high catalytic activity	[130]		
4	Water-GVL			Sulphonated chloromethyl polystyrene resin	170	10 h	47		[131]		
4	Water			ZrP	220	2 h	12	ZrP has higher HMF selectivity and lower LA selectivity	[132]		
5	Water	Al-NbOPO <sub>4</sub>	180	24 h	52.9	Easy upgradation of LA to GVL without separation of LA; high selectivity and yield of LA	[133]				
4.	Inulin	2	Water	Sulphonated hyperbranched poly(aryleneoxindole)s	165	5h	45	Superior catalytic performance in terms of activity and selectivity	[40]		
5.	Flour from whole kernel grain sorghum	10	Water	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	40 min	32.6	Low cash value crop, flour loading is important parameter	[132]		
6.	Water hyacinth	1	Water	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	175	30 min	35	Utilization of this world's worst weed would reduce its removal cost	[6]		
7.	Sugarcane bagasse	10.5	Water	HCl	220	45 min	22.8	Energy consumption of the process is reduced	[75]		
8.	Paddy straw	10.5	Water	HCl	220	45 min	23.7		[133]		
9.	Rice straw	6	Water	S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> <sup>2-</sup> /ZrO <sub>2</sub> -SiO <sub>2</sub> -Sm <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	200	10 min	49	Steam explosion pretreatment of rice straw and solid super-acid as a potential catalyst	[133]		
10.	Olive tree pruning	7	Water	HCl	200	1 h	47.2	Adoption of microwave irradiation for heating; significant energy and time savings	[121]		
11.	Poplar sawdust	7	Water	HCl	200	1	37		[134]		
12.	Empty fruit bunch	1	Water	CrCl <sub>3</sub> +HY hybrid catalyst	145.2	146.7	15.5	53.2% and 66.1% efficiency of LA production, respectively	[127]		
13.	Kenaf	1	Water	CrCl <sub>3</sub> +HY hybrid catalyst	145.2	146.7	15		[95]		
14.	Bamboo shoot shell	1	Water; [BMIM]HSO <sub>4</sub>	-	145	104 min	46	High cost of ionic liquids is a drawback	[127]		
15.	Corn stover	6	Water-GVL	Amberlyst 70	160	16 h	54	Ease of catalyst regeneration	[95]		
16.	Corn stover	6.6	Water-GVL	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160	19 h	66	Use of single reactor system eliminates pretreatment and extraction and reduces 30% capital cost			

## **Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordene Fortschritte auf diesem Gebiet bei anderen Stellen**

Während dieser Kurzstudie sind keine Fortschritte auf diesem Gebiet bei anderen Stellen bekannt geworden.

## **Planung und Ablauf des Vorhabens**

Die Forschungsarbeiten teilten sich in vier Arbeitspakete auf:

### **Arbeitspaket 1: Biochemische Charakterisierung der Isolate**

Aus den Vorarbeiten der Antragsteller lagen die zwei Bakterienstämme FUR100 und FUR200 vor, die die Fähigkeit besitzen Furan als Kohlenstoff und Energiequelle zu mineralisieren. Die Cosubstrate 2-Methylfuran, 3-Methylfuran, 2,3-Dimethylfuran, 2,5-Dimethylfuran, 2-Furanon, 2-Furancarbonsäure sowie 3-Furancarbonsäure wurden von diesen Stämmen transformiert, jedoch nicht mineralisiert. Da diese Stämme zum Zeitpunkt der Isolierung bereits über eine hohe Lösemitteltoleranz von 2,4 g/L Furan verfügten, erschienen sie als potentielle Produktionsstämme für Biotransformationsverfahren in Ganzellsystemen geeignet.

Es sollten weitere Bakterienstämme isoliert und charakterisiert werden, die Furan vollständig abbauen können, um die Auswahl geeigneter Stämme für die Produktion von Lävulinsäure und -derivaten zu erhöhen.

Da speziell beim Einsatz von Abfällen aus Holz-, Cellulose- und Zuckerindustrie durch die thermische bzw. säurekatalysierte Aufbereitung ein breites Spektrum an Monosacchariden, Furanen, Furfuralen u. ä. Komponenten erzeugt wird, musste zunächst das Substratspektrum der Stämme sowohl in Hinblick auf Mineralisierungssubstrate als auch Transformationssubstrate ergänzt und erweitert werden. Die dabei auftretenden Umsatzkinetiken waren im Kontext einer weiterführenden Reaktorauslegung zu erfassen. Der Fortschritt dieser in Batch-Kultur laufenden Transformationsexperimente wurde mittels HPLC-UV/VIS sowie IC-Leitfähigkeitsdetektor analytisch begleitet. Die HPLC-Analytik erlaubt dabei durch Abnahme der im UV-Bereich auftretenden Absorption eine Quantifizierung der heterozyklischen Strukturen, während lineare organische Säuren mittels Anionenchromatographie mit einer Trennsäule für organische Säuren detektiert und im Kontext mit externen Standards quantifiziert werden können. Treten hierbei organische Säuren bzw. Metabolite auf, die nicht mittels Standards identifiziert werden können, so sind weiterführende Analysen erforderlich (vgl. Arbeitspaket 2).

Für die potentielle Applikation dieser Stämme in einer Biotransformation zur Synthese von Lävulinsäure-Derivaten mit Furan-Derivaten als Edukten ist die Toleranzschwelle dieser Mikroorganismen gegenüber den Furan-Derivaten wie auch deren Toleranzverhalten gegenüber pH-Wert, Salinität und Temperatur zu determinieren.

## **Arbeitspaket 2: Metabolomanalyse bei Biotransformation eingesetzter Methylfurane**

Auf Basis der Erkenntnisse aus Arbeitspaket 1 sowie auf den Kenntnissen aus den geleisteten Vorarbeiten wurde die co-metabolische Transformation der Methylfurane durch die bakteriellen Isolate unter Laborbedingungen in Batch-Verfahren nachgestellt. Der Transformationserfolg der eingesetzten heterozyklischen Substrate wurde einerseits über die Abnahme der im UV-Bereich auftretenden Absorption quantifiziert. Andererseits sollten Identität und Quantität der gebildeten Produkte über anionische Trennung über eine Säule für organische Säuren mit einer Ionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektor erfasst und mit externen Standards quantifiziert werden. Da das Transformationsverhalten der Stämme weder auf Genom- noch Proteom- noch Metabolomebene bis dato bekannt war, war von der Entstehung unbekannter mittels Standards nicht identifizierbarer Produkte auszugehen. Eine weitergehende Analyse kann dabei in Abhängigkeit der Hydrophilie/Lipophilie der entstehenden Produkte via HPLC-MS bzw. GC-MS-Analyse erfolgen. In beiden Fällen war eine Probenaufbereitung erforderlich und durchzuführen (Separation Biomasse, Dialyse zur Eliminierung von Phosphaten, Säulenreinigung und Fraktionierung der gebildeten Produkte, Extraktion mit organischer Phase mit anschließender Trocknung, Einengung und Fraktionierung der organischen Phase).

## **Arbeitspaket 3: Biosynthese von Lävulinsäure-Derivaten in einer Konti-Kultur im Labormaßstab**

Auf Basis der Ergebnisse der vorangegangenen beiden Arbeitspakete sowie der bereits vorliegenden Erfahrungen sollten geeignete Isolate für die Lävulinsäure-Synthese ausgewählt und in Konti-Kultur im Labormaßstab zum Einsatz gebracht werden. Da hierfür speziell Kenntnisse aus Arbeitspaket 2 erforderlich sind, war die Anfangsphase von Arbeitspaket 3 bis zum Vorliegen dieser Ergebnisse charakterisiert durch das Design und den Aufbau des Biotricklingfilters, die Erstellung einer geeigneten Steuer- und Regelungstechnik (Auswahl Sensoren, Signalübertragung, A/D-Wandlung, Datenerfassung und Datenaufbereitung) sowie den Probetrieb der Anlage ohne Biomasse (Funktionstest, Dichtigkeitstests, Steuer- und Regelungstechnik). Nach erfolgter Auswahl und Vorkultivierung der Biomasse erfolgte das Anfahren der Anlage mit graduierlich steigenden Feed-Raten und Feed-Konzentrationen. Die Prozessparameter des Laborreaktors werden dabei durch die semi-kontinuierliche Erfassung und Analyse (HPLC, IC) des Ablaufs adaptiert und Auslegungsparameter wie Konzentration, Kontaktzeit, pH-Wert, Betriebstemperatur und Transformationseffizienz abgeleitet. Erste Modifikationen der Betriebsparameter nach erfolgter Etablierung der Biologie im System waren vorzunehmen, um erste Erhöhungen in Umsatz und Ausbeute realisieren zu können. In Wiederkehrenden Analysen war die Identität der etablierten Biozönose mittels BOX-PCR bzw. 16S rRNA-PCR zu prüfen, um durch Kontaminationen verursachte konträre Abbaucharakteristika zu verhindern.

## **Arbeitspaket 4: Erste Ansätze zur Identifizierung prozessrelevanter Enzyme**

Die Vorergebnisse zeigten, dass die potentiell zum Einsatz kommenden bakteriellen Isolate bereits über eine hohe anfängliche Lösemitteltoleranz von ca. 2,4 g Furan/L verfügen. Für eine biotechnologische Anwendung sind – je nach Effizienz des vorgeschalteten

Aufschlusses – ggf. deutlich höhere Lösemitteltoleranzen erforderlich. Hierfür sind in der Literatur verschiedene geeignete Host-Vektoren beschrieben. Um diese für die hier dargestellte Transformationsaufgabe nutzen zu können, sind die für die Transformation erforderlichen Enzyme zu identifizieren und zu klonieren.

Bedingt durch das enge Zeitfenster des Projekts sind für diese Aufgabenstellung im Rahmen dieses Arbeitspaketes erste Lösungsansätze geplant. Ursprünglich angedacht war, Enzyme, die für den Abbau von Furan benötigt werden, mittels des Vergleichs zweier 2D-SDS-Gele zu identifizieren. Hierbei werden sowohl Proteine einer nicht induzierten Kultur als auch einer Furan-induzierten Kultur in je einem Polyacrylamidgel in zwei Dimensionen zum einen nach isoelektrischem Punkt (pI), zum anderen nach Größe aufgetrennt und die Bandenmuster verglichen. Proteindots, die ausschließlich ein dem Gel der Furan-induzierten Kultur zu finden sind, werden ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF analysiert.

Da bei dieser Methode nicht zwangsläufig alle am Abbau von Furan beteiligten Enzyme erfasst werden, wurde im Verlauf des Projektes eine andere Methode gewählt. Bei der Proteinsynthese werden bei der Translation mit Hilfe der messenger RNA (mRNA) Proteine im Ribosom synthetisiert. Die mRNA, die beim Abbau eines Substrates in einem Stamm hergestellt wird, liefert demnach direkt die Informationen über die induzierten Gene und daher die hergestellten Proteine. Statt Proteine zu analysieren, kann infolgedessen eine Genexpressionsanalyse auf Basis der synthetisierten mRNA (Transkriptomanalyse) eine noch weitreichendere Aussage über die Abbau-Enzyme treffen als die Proteomanalyse mittels 2D-SDS-PAGE. Daher wurde diese Methodik gewählt zur Identifizierung der Furan-Abbaugene. Gleichzeitig sollte eine Sequenzierung des Gesamtgenoms erfolgen. Die Kenntnis der relevanten Gensequenzen und ihrer Codierung innerhalb des Operons stellt eine wichtige Grundlage für eine spätere Klonierung in geeigneten Rezipienten dar (nicht Bestandteil der Konzeptstudie).

### **Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Sämtliche Sequenzier-Arbeiten wurden extern vergeben. Das beinhaltet sowohl die Analyse von 16S rRNA-Gensequenzen, die mittels Sanger-Sequenzierung von der Firma Microsynth SeqLab (Göttingen) durchgeführt wurden, als auch die Gesamtgenomsequenzierung und die Transkriptomanalyse (mRNA-Sequenzierung) des Stammes FUR100, die mittels Illumina Sequenzierung durch die Arbeitsgruppe Functional Genomics des Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB (Stuttgart) vorgenommen wurde.

### **Beitrag der Ergebnisse zu den Zielen des Förderprogramms des Zuwendungsgebers**

Baden-Württemberg weist mit einer Waldfläche von 38,4 % einen über dem gesamtdeutschen Schnitt liegenden Anteil an Waldfläche auf (2014: 32,0 %). Bei einem Holzeinschlag von 8,21 Mio. m<sup>3</sup> Holz (entspricht ca. 5,58 Mio. t) stellen 119 Betriebe in Baden-Württemberg Papierwaren im Wert von knapp 596 Mio. € her. 900 000 Tonnen an Papierprodukten werden wiederum von den Endverbrauchern durch die Abfallwirtschaftsbetriebe eingesammelt. Da bei der Holzverarbeitung bis zu 50 % als

Restholzabfälle anfallen und zur Herstellung von Recyclingpapier aus Altpapier ca. 20 % an Restfasern als Abfall zurückbleiben, beträgt die kalkulierte jährliche Holzabfallmenge in Baden-Württemberg ca. 2,94 Mio. t (davon 150 kt Altpapierrecycling).

Im Falle des Zuckerrübenanbaus werden im langjährigen Mittel ca. 15.000 h mit Zuckerrüben bewirtschaftet. Dabei liegt der Ertrag bei ca. 73,9 t/ha bei einem raffinierbaren Zuckeranteil von 18,2 %. Somit fallen im Bereich der Zuckerindustrie in Baden-Württemberg alleine auf Basis eigener landwirtschaftlicher Produktion ca. 0,8 Mio. t an verwertbaren Abfällen an.

Somit verfügt Baden-Württemberg mit knapp 3,74 Mio. t über eine breite, kostengünstige Rohstoffbasis für die Herstellung von Lävulinsäure-Derivaten aus diesen Edukten. Abfallprodukte können für die Produktion von Plattformchemikalien verwendet werden.

Weiterhin sind knapp 16 % der deutschen Biotechnologiefirmen in Baden-Württemberg ansässig, wodurch Baden-Württemberg im Falle eines positiven Projektverlaufs auch für eine großtechnische Umsetzung qualifiziert ist. Durch die Identifizierung der Furan-Abbaugene lässt sich eine biotechnologische Herstellung von Lävulinsäure und deren Derivaten kostengünstig umsetzen.

## **Erzielte Ergebnisse**

### **Arbeitspaket 1: Biochemische Charakterisierung der Isolate**

#### **Isolierung von Bakterienstämmen, die Furan abbauen**

Neben den zu Beginn des Vorhabens bereits vorhandenen Bakterienstämmen FUR100 und FUR200 wurden 6 weitere Stämme isoliert, die in der Lage sind, Furan vollständig abzubauen. Diese erhielten die Labornamen FUR300, FUR301, FUR302, FUR303 (isoliert aus Bodenproben), FUR402 (isoliert aus einer Kompostprobe) sowie FUR500 (isoliert aus Klärschlamm).

Um herauszufinden, ob es sich bei den isolierten Stämmen tatsächlich um unterschiedliche Stämme handelt, wurde ein BOX-PCR-Fingerprinting durchgeführt. Hierfür wurde DNA isoliert und mit dem Primer BOX-A1R eine PCR durchgeführt (Martin et al., 1992). Die Amplifikate wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und die Bandenmuster miteinander verglichen (s. Abbildung 4). Hierbei zeigten die Proben der Stämme FUR300 und FUR301 dasselbe Muster. Demnach handelt es sich um denselben Stamm.

Zur Identifizierung der Stämme wurde ein Teil des 16S rRNA-Genes mittels PCR mit den Primern 27F und 1492R amplifiziert und im Anschluss durch die Firma Microsynth SeqLab (Göttingen) sequenziert.

Bei dem Stamm FUR100 handelt es sich entweder um einen *Rhodococcus erythropolis* oder um einen *Nocardia coeliaca*. Die 16S rRNA-Gensequenz des Type-strains von *N. coeliaca* stimmt zu 100 % überein mit dem sequenzierten Bereich aus FUR100. Dasselbe gilt allerdings auch für *R. erythropolis*. Anhand dieser Sequenz lässt sich nicht mit Bestimmtheit

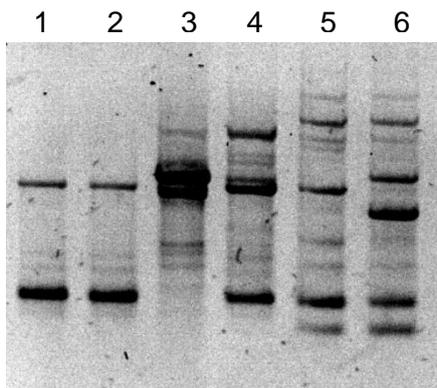
sagen, um welche Spezies es sich bei FUR100 handelt, die Familie ist jedenfalls Nocardiaceae. Da bei dem Stamm FUR100 jedoch eine Sequenzierung des gesamten Genoms durchgeführt wird (Ergebnisse liegen noch nicht vor), kann Anhand von den Sequenzen weiterer Gene (Quelle!) die Spezies genau bestimmt werden.

Der Stamm FUR200 gehört der Spezies *Nocardia elegans* an.

Bei FUR300 handelt es sich, ebenso wie bei FUR302 und FUR303, um *Nocardioides albus*. Da sich die Bandenmuster des BOX-Fingerprintings zwischen diesen drei Stämmen deutlich unterscheiden, ist davon auszugehen, dass es sich um unterschiedliche Stämme handelt, die alle der Spezies *Nocardioides albus* angehören.

Wie bei dem Stamm FUR100 handelt es sich auch bei FUR402 entweder um einen *Rhodococcus erythropolis* oder um einen *Nocardia coeliaca*.

Bei dem Stamm FUR500 handelt es sich entweder um *Rhodococcus jialingiae*, *Rhodococcus qingshengii* oder *Rhodococcus degradans*. Die 16S Sequenzen stimmen zu 100 % mit denen von allen drei Stämmen überein. Die Type-strains dieser 3 Stämme wurden nicht anhand der 16S Sequenz unterschieden, sondern anhand anderer Kriterien wie z. B. mittels DNA-DNA-Hybridisierung (Wang et al., 2010; Švec et al., 2015).



**Abbildung 4 BOX-PCR Fingerprinting der Furanstämme**

Agarosegel nach Auftrennung der Amplifikate der BOX-PCR zur Unterscheidung von Bakterienstämmen. 1: FUR300; 2: FUR301; 3: FUR302; 4: FUR303; 5: FUR402; 6: FUR500. FUR300 und FUR301 zeigen dasselbe Bandenmuster, es handelt sich demnach um denselben Stamm.

### Charakterisierung der Bakterienstämme

Insgesamt lagen demnach 7 unterschiedliche Furan abbauende Stämme vor. Zur näheren Charakterisierung wurden bei allen Stämmen ein KOH-Test durchgeführt, um auf das Gramverhalten zu schließen, sowie ein Katalase- und ein Oxidasetest. Allen gemein war, dass sie gram-positiv sind, Katalase-positiv und Oxidase-negativ (siehe Tabelle 2). Die Koloniemorphologie der Furan-Stämme ist in Tabelle 3 beschrieben, die Zellmorphologie in Tabelle 4.

Die pH-Toleranz der Stämme wurde untersucht. Hierfür wurden sie in Batchansätzen in flüssigen Minimal-Medien mit unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Das Substrat war Fructose. Die Stämme FUR100, FUR402 und FUR500 tolerierten pH-Werte des Mediums von 6–9, FUR303 von 6–8 und FUR300 sowie FUR302 von 7–9.

**Tabelle 2 Schnelltests zur Charakterisierung der Furan-Abbauer**

Stamm	Katalasetest	KOH-Test	Oxidasetest
FUR100	positiv	negativ	negativ
FUR200	positiv	negativ	negativ
FUR300	positiv	negativ	negativ
FUR302	positiv	negativ	negativ
FUR303	positiv	negativ	negativ
FUR402	positiv	negativ	negativ
FUR500	positiv	negativ	negativ

**Tabelle 3 Kolonimorphologien der Furan-Stämme**

Stamm	Farbe	Form	Größe	Glanz	Profil	Rand	Struktur
FUR100	orange	unregelmäßig	2 mm	matt	flach	konzentrische Zonen	filamentös
FUR200	weiß	gelockt	2 mm	matt	flach	gesägt	filamentös
FUR300	weiß	kreisförmig	1 mm	matt	spieeleiförmig	konzentrische Zonen	filamentös
FUR302	weiß	kreisförmig	2 mm	matt	spieeleiförmig	konzentrische Zonen	filamentös
FUR303	weiß	kreisförmig	2 mm	matt	spieeleiförmig	glatt	filamentös
FUR402	orange	kreisförmig	1 mm	matt	konvex	glatt	homogen
FUR500	beige	punktförmig	1 mm	matt	flach	glatt	filamentös

**Tabelle 4 Zellmorphologien der Furan-Stämme**

Stamm	Form	Beweglichkeit	Agglomeration
FUR100	kokkoide Stäbchen	Keine	Ja
FUR200	Kokken	Keine	Ja, Haufen
FUR300	Kokken	Keine	Ja, Ketten
FUR302	Kokken	Keine	Ja, Ketten
FUR303	Kokken	Keine	Ja, Ketten
FUR402	Kokken	Keine	Ja, Ketten und Haufen
FUR500	Kokken	Keine	Ja, Ketten und Haufen

Da sich herausgestellt hatte, dass vor allem FUR200 im Vergleich mit den anderen Stämmen deutlich langsamer wuchs und die Dauer der Kurzstudie mit drei Monaten eine genauere Untersuchung aller isolierter Stämme nicht zuließ, wurde ein Substratpattern nur mit den Stämmen FUR100, FUR300 und FUR500 durchgeführt. Hierfür wurden die Stämme mit unterschiedlichen Substraten versetzt und das Wachstum nach ein bis zwei Wochen Inkubation bei 30 °C beurteilt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

FUR100 kann auf den Zuckern Glucose und Fructose wachsen und auch auf Acetat. Der zyklische Ether Tetrahydrofuran wird ebenso verwertet wie Lävulinsäure und 1-Butanol. 2-Methylfuran, 2,5-Dimethylfuran und 2,5-Dihydrofuran sowie n-Hexan und Benzol wurden hingegen nicht verstoffwechselt.

FUR300 zeigte auf allen getesteten Substraten Wachstum.

FUR500 hingegen konnte nur auf Fructose und 1-Butanol wachsen. Bei allen anderen Substraten zeigte sich nur geringes bis kein Wachstum.

Da FUR300 sowohl 2-Methylfuran als auch 2,5-Dimethylfuran vollständig abbauen und nicht nur transformieren konnte, wurde im weiteren Verlauf der Kurzstudie der Fokus weiterer Untersuchungen auf den Stamm FUR100 gelegt.

**Tabelle 5 Substratpattern**

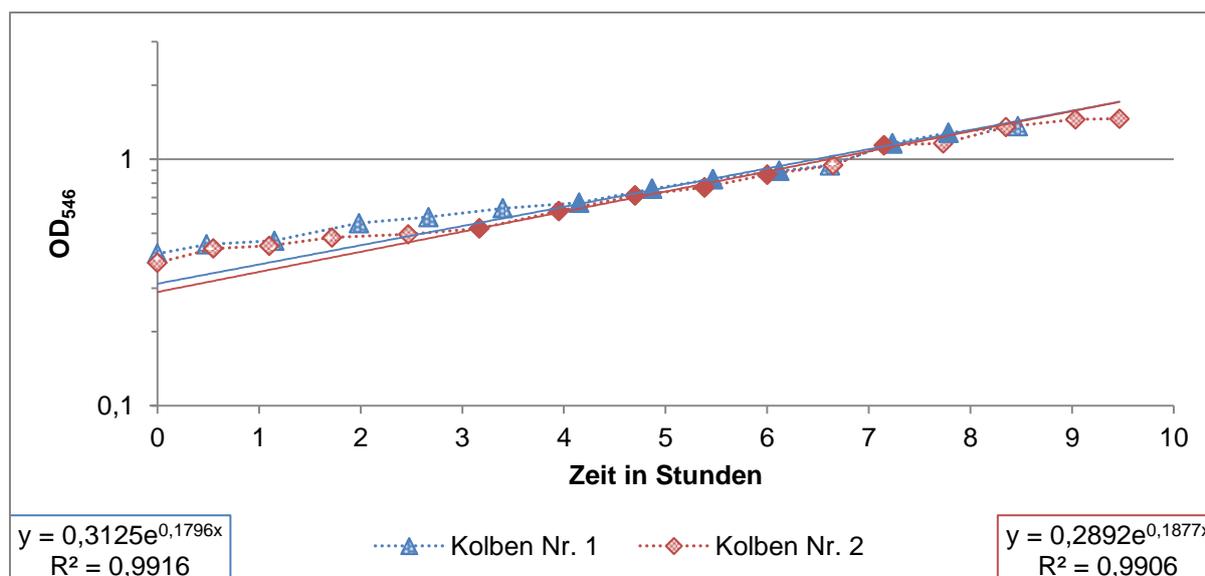
Substrat	FUR100	FUR300	FUR500
Glucose	+	++	+-
Fructose	++	++	+
Acetat	+	+	+-
n-Hexan	-	+	-
Benzol	-	+	-
Tetrahydrofuran	+	+	-
Lävulinsäure	+	++	+-
1-Butanol	++	++	++
2-Methylfuran	-	+	-
2,5-Dimethylfuran	-	+	-
2,5-Dihydrofuran	-	+	-

Substratpattern der Stämme FUR100, FUR300 und FUR500. -: kein Wachstum; +-: sehr geringes Wachstum; +: Wachstum; ++: sehr gutes Wachstum

### Wachstumskinetiken des Stammes FUR100

Die Wachstumsparameter von FUR100 wurden im Batch-Ansatz bestimmt. Hierfür wurde vorab getestet, bei welcher Furanzugabe das schnellste Wachstum erfolgt. Je 50 mL Minimalmedium in 250 mL-Schikanekolben wurden hierfür mit FUR100 angeimpft. In Verdampferaufsätzen wurden unterschiedliche Volumina Furan getestet von 10  $\mu\text{L}$  bis zu 200  $\mu\text{L}$ . Das Wachstum der Zellen wurde durch Messen der optischen Dichte bei 546 nm ( $\text{OD}_{546}$ ) am Folgetag beurteilt. Hierbei hat sich herausgestellt, dass die größte OD-Zunahme bei einem Volumen von 50  $\mu\text{L}$  Furan erfolgte. Höhere Volumina sorgten für ein verlangsamtes Wachstum.

Für die Bestimmung der Wachstumsparameter beim Abbau von Furan wurden daher zwei Flüssigkulturen angesetzt in jeweils 50 mL Medium unter Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Substrat, die Kolben bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert und die  $\text{OD}_{546}$  in regelmäßigen Abständen gemessen (s. Abbildung 5). Die Wachstumsrate  $\mu$  wurde jeweils graphisch ermittelt, indem während der Phase exponentiellen Wachstums eine exponentielle Trendlinie erstellt wurde, und betragen  $0,18 \text{ h}^{-1}$  (Kolben Nr. 1) und  $0,188 \text{ h}^{-1}$  (Kolben Nr. 2), im Mittel folglich  $0,184 \text{ h}^{-1}$ . Die Verdopplungszeiten beliefen sich daraus resultierend auf 231 bzw. 221 min (Durchschnitt: 226 min).



**Abbildung 5 Wachstumskurve FUR100 auf Furan**

Zwei Kolben mit jeweils 50 mL Minimalmedium wurden mit einer FUR100-Vorkultur angeimpft, mit je 50 µL Furan versetzt und die OD<sub>546</sub> regelmäßig bestimmt. Für beide Kulturen wurde  $\mu$  durch eine exponentielle Trendlinie während des exponentiellen Wachstums bestimmt und betrug für Kolben Nr. 1  $0,18 \text{ h}^{-1}$  und für Kolben Nr. 2  $0,188 \text{ h}^{-1}$ . Die Werte, die für die Berechnung der Trendlinie verwendet worden sind, sind in der Abbildung durch ausgefüllte Markierungen charakterisiert, die Werte, die nicht verwendet worden sind, sind schraffiert.

## Arbeitspaket 2: Metabolomanalyse bei Biotransformation eingesetzter Methylfurane

Auf Basis der Erkenntnisse aus Arbeitspaket 1 sowie auf den Kenntnissen aus den geleisteten Vorarbeiten wurde die co-metabolische Transformation der Methylfurane durch die bakteriellen Isolate unter Laborbedingungen in Batch-Verfahren nachgestellt. Der Transformationserfolg der eingesetzten heterozyklischen Substrate wurde einerseits über die Abnahme der im UV-Bereich auftretenden Absorption quantifiziert. Andererseits sollten Identität und Quantität der gebildeten Produkte über anionische Trennung über eine Säule für organische Säuren mit einer Ionenchromatografie mit Leitfähigkeitsdetektor erfasst und mit externen Standards quantifiziert werden. Da das Transformationsverhalten der Stämme weder auf Genom- noch Proteom- noch Metabolomebene bis dato bekannt war, war von der Entstehung unbekannter mittels Standards nicht identifizierbarer Produkte auszugehen. Eine weitergehende Analyse kann dabei in Abhängigkeit der Hydrophilie/Lipophilie der entstehenden Produkte via HPLC-MS bzw. GC-MS-Analyse erfolgen.

Der Stamm FUR100 wurde auf sein Transformationspotential von 2-Methylfuran (MF) und 2,5-Dimethylfuran (DMF) sowie Pyrrol und Thiophen hin untersucht. Hierfür wurden Flüssigkulturen von FUR100 angesetzt, die mit den Substraten

1. Furan
2. Furan + MF
3. Furan + DMF
4. MF
5. DMF
6. Pyrrol
7. Furan + Pyrrol
8. Thiophen
9. Furan + Thiophen

versetzt wurden. Die Kolben wurden bei 30 °C auf dem Schüttler für eine Woche inkubiert und im Anschluss die OD<sub>546</sub> bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass FUR100 auf keinem der getesteten Substrate wachsen konnte außer auf Furan (s. Tabelle 6). Bei allen Kolben, bei denen Furan Substrat war (alleinig oder zusätzlich), erfolgte deutliches Wachstum außer bei Kolben 9 (Furan + Thiophen). Thiophen wirkte demnach hemmend oder toxisch auf FUR100.

Bemerkenswert war, dass sich Kultur 3 (Furan + 2,5-Dimethylfuran) deutlich ins rot-bräunliche verfärbt hat. Wurden die Zellen vom Medium abzentrifugiert, verblieb die Färbung in den Zellen. Beim Umsatz von DMF entsteht demnach ein Metabolit, der direkte Auswirkungen auf die Zellfarbe hat ohne jedoch die Abbauleistung negativ zu beeinflussen.

**Tabelle 6 OD-Werte Transformationsversuche**

<b>Substrat(e)</b>	<b>End-OD<sub>546</sub></b>
1 Furan	3,2
2 Furan + MF	3,02
3 Furan + DMF	3,53
4 MF	0,133
5 DMF	0,146
6 Pyrrol	0,087
7 Furan + Pyrrol	0,792
8 Thiophen	0,073
9 Furan + Thiophen	0,119

FUR100 wurde in Flüssigkultur mit unterschiedlichen Substraten und Substratkombinationen inkubiert und die OD<sub>546</sub> nach einer Woche gemessen. 2-Methylfuran (MF), 2,5-Dimethylfuran (DMF), Pyrrol und Thiophen dienten FUR100 nicht als (alleiniges) Substrat. Thiophen wirkte hemmend auf den Abbau von Furan durch FUR100 oder war toxisch.

Die Kulturüberstände wurden im Anschluss an den Versuch auf möglicherweise entstandene Biotransformationsprodukte hin untersucht. Zum Einsatz kamen hierbei eine HPLC mit UV/Vis-Detektor und eine IC-Säule für die Detektion von organischen Säuren. Die Bakterien wurden hierfür zunächst durch Zentrifugation entfernt und die Probe anschließend durch einen Sterilfilter (Porendurchmesser 0,2 µm) filtriert. Bei der Analyse mit der HPLC konnte weder Furan noch eines der anderen Ausgangssubstrate (MF, DMF, Pyrrol) detektiert werden. Furan wurde demnach vollständig abgebaut, die Furanderivate wurden cometabolisch transformiert. Ein Transformationsprodukt konnte mittels HPLC allerdings nicht nachgewiesen werden. Auch mit der IC-Säule für die Detektion von organischen Säuren konnte leider kein Metabolit detektiert werden. Diese Methode erschien im Vorfeld als die vielversprechendste. Da auch die Extraktion der Kulturüberstände mit verschiedenen Extraktionsmitteln (Dichlormethan, Hexan, Butylacetat) und anschließender Analyse mittels GC-MS keine Ergebnisse lieferte, bleibt es weiterhin Aufgabe ein geeignetes Analyseverfahren zur Detektion der offensichtlich entstandenen Metabolite zu etablieren.

### **Arbeitspaket 3: Biosynthese von Lävulinsäure-Derivaten in einer Konti-Kultur im Labormaßstab**

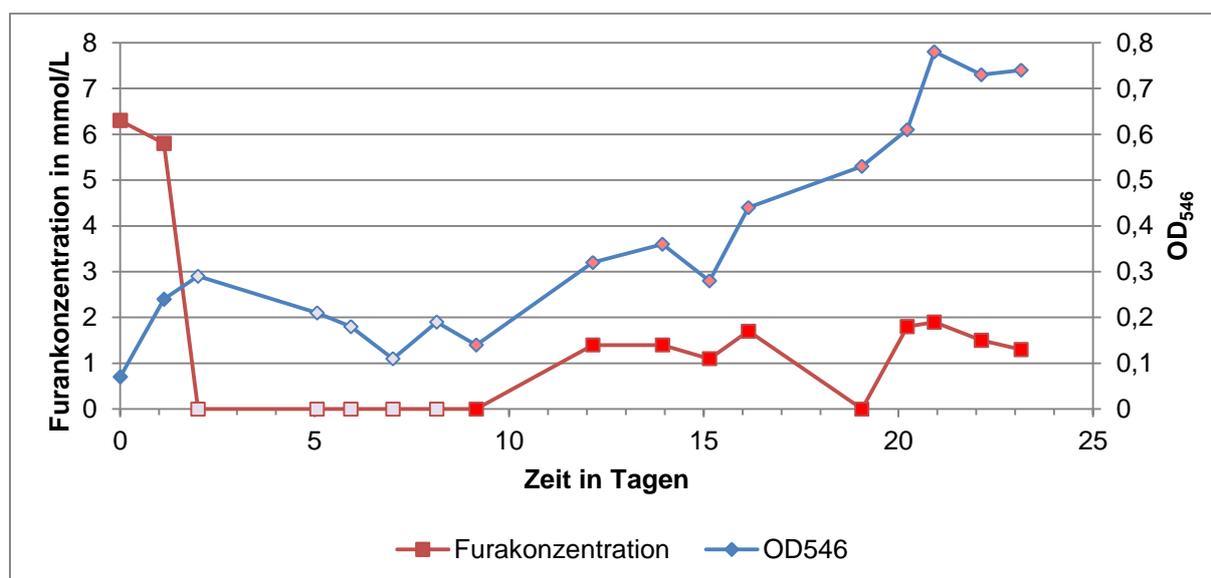
Für die kontinuierliche Kultur (Konti-Kultur) von FUR100 wurde zunächst ein Rührreaktor aufgebaut. Hierfür kam eine 10 L-Glasflasche zum Einsatz, die im unteren Bereich einen Auslass hat. Bestückt wurde die Flasche mit ca. 3 Liter Kultur. An den Auslass wurde ein

Schlauch derart geführt, dass bei einem Volumen größer als 3 Liter ein Überlauf vorlag und überschüssige Kultur abfließen konnte (hydraulische Brücke). Die Kultur wurde kontinuierlich mit einem Magnet-Rührstab auf einem Magnetrührer durchmischt, um zum einen eine homogene Verteilung der Biomasse und zum anderen einen Lufteintrag in die Kultur zu gewährleisten. Für die Belüftung wurde zusätzlich ein Aquarienstein derart montiert, dass er sich knapp oberhalb des Flüssigkeitsspiegels befand. Zu Beginn der Versuche befand er sich in der Kultur. Da durch diese direkte Belüftung allerdings das in der Flüssigkeit befindliche Furan ausgestrippt wurde, wurde der bereits beschriebene Ansatz gewählt und die Kultur von oben belüftet.

Über eine Dosierpumpe wurde das in einem Vorratsbehälter befindliche, Furan-haltige Medium kontinuierlich in den Reaktor dosiert. Die Furankonzentration in diesem Behälter betrug 100 mmol/L.

Die Bakterienkonzentration im Reaktor wurde mittels Messung der  $OD_{546}$  überwacht. Die Furankonzentration wurde mittels HPLC ermittelt.

Es wurden mehrere Anläufe gestartet, bis ein stabiler Betrieb gewährleistet werden konnte. Hierfür wurde der Reaktor mit einer Kultur von FUR100 versehen und zu Beginn mit etwa 6 mmol/L Furan versetzt. Nach zwei Tagen wurden zunächst kontinuierlich 0,6 mmol/h Furan zudosiert, was bei einem Reaktorvolumen von 3 Litern 0,2 mmol/(L · h) entspricht. Bei dieser Rate konnte kein Furan im Reaktor nachgewiesen werden, die Bakterien konnten es vollständig abbauen. Die  $OD_{546}$  blieb während dieser Zeit relativ konstant bei einem Wert zwischen 0,1 und 0,2, weswegen nach 9 Tagen die Furandosierung auf 1 mmol/(L · h) erhöht wurde. Im Anschluss nahm die Bakteriendichte im Reaktor kontinuierlich zu und erreichte nach insgesamt 24 Tagen Betriebsdauer einen OD-Wert zwischen 0,7 und 0,8. Die Furankonzentration im Reaktor betrug in dieser Zeit zwischen 0 und 2 mmol/L. Der Verlauf von optischer Dichte und Furankonzentration ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6** Furankonzentration und OD im Rührreaktor

Der Rührreaktor wurde zu Beginn mit FUR100 angeimpft und mit etwa 6 mmol/L Furan versetzt. Nach zwei Tagen wurde die kontinuierliche Furandosierung gestartet mit 0,2 mmol/(L · h) (blaue Markierungsfüllung). An Tag 9 wurde die Rate erhöht auf 1 mmol/(L · h) (rote Markierungsfüllung) und die OD nahm kontinuierlich zu, bis sie einen Wert zwischen 0,7 und 0,8 erreichte. In dieser Zeit wurden Furankonzentrationen zwischen 0 und 2 mmol/L im Reaktor nachgewiesen.

Unter diesen Betriebsbedingungen konnte ein stabiler Betrieb gewährleistet werden. Es konnte im Rahmen der Kurzstudie eine weitere Erhöhung der Furanzugabe nicht untersucht werden.

An Betriebstag 22 wurden die Gesamtkeimzahl sowie die Selektivkeimzahl im Reaktor bestimmt. Hierfür wurde eine Reaktorprobe dekadisch verdünnt und die einzelnen Verdünnungsstufen sowohl auf LB-Medium (zur Ermittlung der Gesamtkeimzahl) als auch auf Minimalmedium unter Zugabe von Furan (zur Ermittlung der Selektivkeimzahl) ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Die Auszählung der gewachsenen Kolonien ergab eine Gesamtkeimzahl von  $6,9 \cdot 10^7$  koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/mL) und eine Selektivkeimzahl von  $6,4 \cdot 10^7$  KBE/mL. Da die Werte in derselben Größenkategorie lagen, war davon auszugehen, dass alle Bakterien im Reaktor Furan abbauen konnten. Die Koloniemorphologie war hierbei homogen, weswegen außerdem zu vermuten ist, dass es sich bei den Bakterien ausschließlich um FUR100 gehandelt hat.

#### **Arbeitspaket 4: Erste Ansätze zur Identifizierung prozessrelevanter Enzyme**

Die für die Transformation von Furan und Furanderivaten erforderlichen Enzyme waren zu identifizieren, um sie in einem Folgeprojekt zu klonieren und exprimieren und auf diese Weise Lävulinsäure und deren Derivate zu produzieren.

Die Ergebnisse insbesondere von Arbeitspaket 1 und 2 zeigten, dass FUR100 der am besten geeignete Stamm hierfür ist. Eine Sequenzierung des Gesamtgenomes wurde daher in Auftrag gegeben. Hierfür wurden Zellen kultiviert und der Arbeitsgruppe Functional Genomics des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB (Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Gleichzeitig sollte die Transkriptomanalyse erfolgen. FUR100 wurde sowohl mit dem Substrat Furan (induzierter Zustand) als auch mit dem Substrat Fructose (nicht induzierter Zustand) kultiviert. Die bei beiden Induktionszuständen exprimierten Enzyme sollen durch Sequenzierung der mRNA identifiziert werden. Auf diese Weise können die für den Abbau von Furan benötigten Enzyme identifiziert werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt liegen diese Sequenzier-Ergebnisse noch nicht vor, da sowohl die Sequenzierung als auch die anschließend erforderliche Bioinformatik zeitaufwendig sind. Sobald die Daten bekannt sind, kann anhand der identifizierten induzierten Enzyme eine Auswahl getroffen werden, welche für eine Klonierung mit anschließender Expression geeignet sind, um Lävulinsäure und deren Derivate zu produzieren.

#### **Nutzen, insbesondere praktische Verwertbarkeit der Ergebnisse und Erfahrungen; Konzept zum Ergebnis- und Forschungstransfer auch in projektfremde Anwendungen und Branchen**

Es hat sich herausgestellt, dass der Bakterienstamm FUR100 bzw. seine Furan-Abbaugene besonders geeignet sind für die Produktion von Lävulinsäure und strukturähnlichen Plattformchemikalien. Der Umsatz von 2-Methylfuran und 2,5-Dimethylfuran zeugen davon, dass die Enzyme, sofern induziert, neben Furan auch mindestens diese beiden Derivate angreifen. Beim Abbau dieser Chemikalien entstehen Metabolite wie Lävulinsäure und deren

Derivate, die in der Industrie als Plattformchemikalien in vielerlei Hinsicht Verwendung finden.

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse von FUR100 werden darüber Aufschluss geben, um welche Gene es sich dabei konkret handelt. Sind diese bekannt, können sie in einem geeigneten Host exprimiert und auf diese Weise Lävulinsäure produziert werden. Eine andere Strategie wäre es, die Gene, die in FUR100 für den weiteren Abbau von Lävulinsäure vonnöten sind, zu inaktivieren, und diesen Stamm zu verwenden. Hier würde Lävulinsäure als Metabolit des Furanabbaus akkumulieren.

Für die Umsetzung der Produktion in einem wirtschaftlichen Maßstab wird zukünftig ein wissenschaftlicher (primär) bzw. wirtschaftlicher (sekundär) Kooperationspartner gesucht.

FUR100 eignet sich aber nicht nur zur Produktion von Chemikalien. Furan gilt als möglicherweise krebserregend. Bei Prozessen, in denen Furan z. B. in die Luft emittiert wird, kann eine biologische Abluftreinigungsanlage installiert werden, die mit dem Stamm FUR100 inokuliert wird. Auf diese Weise kann die Luft biologisch von Furan gereinigt werden. Um genauere Aussagen treffen zu können über die Frachten, die auf diese Weise behandelt werden können, müssten Experimente mit Abluftreaktoren wie Biofilter oder Biotricklingfilter durchgeführt werden. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von Furan kommt ein Biowäscher für diese Anwendung nicht in Frage.

Die Ergebnisse dieser Kurzstudie sollen im Rahmen von Publikationen und Fachtagungen (VAAM o.ä.) der Fachwelt vorgestellt werden. Durch Auswahl von Konferenzen mit hohem Anteil an industriellen Vertretern sollen erste Kontakte zu potentiellen Partnern geschlossen werden. Auch die direkte Kontaktaufnahme mit potentiellen wirtschaftlichen Partnern für eine weitere Umsetzung der Ergebnisse in Richtung marktfähiger Produkte soll verfolgt werden.

## **Erfolgte oder geplante Veröffentlichung der Ergebnisse**

Geplante Veröffentlichungen:

Draft Genome Sequence of furan degrading *Rhodococcus erythropolis*/*Nocardia coeliaca* FUR100.

Geplant zu veröffentlichen in dem Journal "Genome Announcements"  
(<http://genomea.asm.org/>).

Isolation, identification and characterization of bacterial strains able to degrade furan.  
Geplant zu veröffentlichen in dem Journal "Biodegradation"  
(<https://link.springer.com/journal/10532>)

## Literaturverzeichnis

- Aigner, F. (2015). Wozu Erdöl, wenn man Abfall hat? [https://www.tuwien.ac.at/aktuelles/news\\_detail/article/9315/](https://www.tuwien.ac.at/aktuelles/news_detail/article/9315/), accessed June 7, 2018.
- Bernhardt, D. & Diekmann, H. (1991). Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental Rhodococcus strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 36, 120–123.
- Bozell, J. J., Moens, L., Elliott, D.C., Wang, Y., Neuenschwander, G.G., Fitzpatrick, S.W., Bilski, R.J. & Jarnefeld, J.L. (2000). Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products. *Resources, Conservation and Recycling* 28, 227–239.
- Dehmel, U., Engesser, K.-H., Timmis, K. N. & Dwyer, D. F. (1995). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding a novel dioxygenase involved in metabolism of carboxydiphenyl ethers in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310. *Arch. Microbiol.* 163, 35–41.
- Engesser, K. H., Strubel, V., Christoglou, K., Fischer, P. & Rast, H. G. (1989). Dioxygenolytic cleavage of aryl ether bonds. 1, 10-dihydro-1, 10-dihydroxyfluoren-9-one, a novel arene dihydrodiol as evidence for angular dioxygenation of dibenzofuran. *FEMS Microbiology Letters* 65, 205–209.
- Hayes, D. J., Fitzpatrick, S., Hayes, M. H. B. & Ross, J. R. H. (2005). The Biofine Process—Production of Levulinic Acid, Furfural, and Formic Acid from Lignocellulosic Feedstocks. In *Biorefineries - Industrial Processes and Products. Status Quo and Future Directions*, pp. 139–164. Edited by B. Kamm, P. Gruber & M. Kamm, 1st edn. Weinheim, Bergstr: WILEY-VCH.
- Huang, R., Qi, W., Su, R. & He, Z. (2010). Integrating enzymatic and acid catalysis to convert glucose into 5-hydroxymethylfurfural. *Chemical communications (Cambridge, England)* 46, 1115–1117.
- Kuster, B. F. M. (1990). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). A Review Focussing on its Manufacture. *Starch/Stärke* 42, 314–321.
- Lee, S.-B. & Jeong, G.-T. (2015). Catalytic Conversion of Chitosan to 5-Hydroxymethylfurfural Under Low Temperature Hydrothermal Process. *Applied biochemistry and biotechnology* 176, 1151–1161.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D. A., Boulnois, G. J. & Claverys, J.-P. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucl Acids Res* 20, 3479–3483.
- Mascal, M. & Nikitin, E. B. (2008). Direct, high-yield conversion of cellulose into biofuel. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 47, 7924–7926.
- Moens, L. (2002). Sugar cane as a renewable feedstock for the chemical industry: challenges and opportunities. In *Proceedings of the 2002 Sugar Processing Research Conference*, pp. 26–41.
- Morone, A., Apte, M. & Pandey, R. A. (2015). Levulinic acid production from renewable waste resources. Bottlenecks, potential remedies, advancements and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 51, 548–565.

- Nikolla, E., Román-Leshkov, Y., Moliner, M. & Davis, M. E. (2011). "One-Pot" Synthesis of 5-(Hydroxymethyl)furfural from Carbohydrates using Tin-Beta Zeolite. *ACS Catal.* 1, 408–410.
- Pasanen, P., Korpi, A., Kalliokoski, P. & Pasanen, A.-L. (1997). Growth and volatile metabolite production of *Aspergillus versicolor* in house dust. *Environment International* 23, 425–432.
- Qi, X., Watanabe, M., Aida, T. M. & Smith, R. L. (2012). Synergistic conversion of glucose into 5-hydroxymethylfurfural in ionic liquid-water mixtures. *Bioresource technology* 109, 224–228.
- Qi, X., Watanabe, M., Aida, T. M. & Smith Jr., R. L. (2010). Efficient one-pot production of 5-hydroxymethylfurfural from inulin in ionic liquids. *Green Chem.* 12, 1855.
- Strubel, V., Rast, H. G., Knackmuss, H.-J. & Engesser, K. H. (1989). Enrichment of dibenzofuran utilizing bacteria with high co-metabolic potential towards dibenzodioxin and other anellated aromatics. *FEMS Microbiology Letters* 58, 233–238.
- Švec, P., Černošková, J., Busse, H.-J., Vojtková, H., Pantůček, R., Cnockaert, M., Mašláňová, I., Králová, S., Vandamme, P. & Sedláček, I. (2015). Classification of strain CCM 4446T as *Rhodococcus degradans* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 65, 4381–4387.
- Thiemer, B., Andreesen, J. R. & Schröder, T. (2003). Cloning and characterization of a gene cluster involved in tetrahydrofuran degradation in *Pseudonocardia* sp. strain K1. *Arch. Microbiol.* 179, 266–277.
- Verendel, J., Church, T. & Andersson, P. (2011). Catalytic One-Pot Production of Small Organics from Polysaccharides. *Synthesis* 2011, 1649–1677.
- Wang, C., Chen, Q., Wang, R., Shi, C., Yan, X., He, J., Hong, Q. & Li, S. (2014). A novel angular dioxygenase gene cluster encoding 3-phenoxybenzoate 1',2'-dioxygenase in *Sphingobium wenxiniae* JZ-1. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 3811–3818.
- Wang, Y., Pedersen, C. M., Deng, T., Qiao, Y. & Hou, X. (2013). Direct conversion of chitin biomass to 5-hydroxymethylfurfural in concentrated ZnCl<sub>2</sub> aqueous solution. *Bioresource technology* 143, 384–390.
- Wang, Z., Xu, J., Li, Y., Wang, K., Wang, Y., Hong, Q., Li, W.-J. & Li, S.-P. (2010). *Rhodococcus jialingiae* sp. nov., an actinobacterium isolated from sludge of a carbendazim wastewater treatment facility. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60, 378–381.
- Yan, L., Yang, N., Pang, H. & Liao, B. (2008). Production of Levulinic Acid from Bagasse and Paddy Straw by Liquefaction in the Presence of Hydrochloride Acid. *Clean Soil Air Water* 36, 158–163.