

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

Förderprojekt  
**SynBioTech**

im Innovationsraum BioBall

**Sachlicher Abschlussbericht zum  
Verwendungsnachweis**

**Berichtszeitraum:** 01. April 2020 – 31. Dezember 2023

**Förderkennzeichen:** 031B0904E

**Zuwendungsempfänger:** Wacker Chemie AG („WACKER“), Gisela-Stein-Straße 1, 81671 München

**Ausführende Stelle:** Wacker Chemie AG - Consortium für elektrochemische Industrie, Zielstattstr. 20, 81379 München

**Projektleitung:** Dr. Christian Lange

München, 24. Juni 2024

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B0904E gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei dem Autor.

## Inhaltsverzeichnis

### Teil I

1	Aufgabenstellung .....	3
2	Ergebnisse (WACKER) .....	3
2.1	Orientierende Studien zur Reinigung von Carbonsäuren (WP2.2.6).....	3
2.2	Derivatisierung von Carbonsäuren als Vorstufen für Polymerprodukte (WP2.2.7) ...	4
2.3	Prozessentwicklung zur Aufarbeitung von Crotonsäure aus konzentrierten Kulturbrühen (WP4.2.6) .....	4
2.4	Polymerisationstests (WP4.2.7) .....	4
3	Zusammenfassung und Ausblick.....	4

### Teil II

1	Einleitung .....	5
2	Ergebnisse (WACKER) .....	7
2.1	Orientierende Versuche zur Reinigung von Dicarbonsäuren (WP2.2.6) .....	7
2.1.1	Elektrodialyse von Carbonsäurelösungen .....	7
2.1.2	Konditionierung und Elektrodialyse von <i>M.extorquens</i> -Kulturüberständen .....	9
2.2	Untersuchungen zur technischen Verwendbarkeit der Dicarbonsäuren (WP2.2.7).13	
2.2.1	Reduktion von Dicarbonsäuren .....	13
2.2.2	Radikalische Polymerisation von Mesaconsäure.....	14
2.2.3	Versuche zum <i>Grafting</i> von Mesaconsäure.....	16
2.3	Prozessdemonstration – Reinigung von Crotonsäure aus supplementierten <i>M.extorquens</i> -Kulturüberständen und Polymerisation (WP4.2.6) .....	18
2.4	Polymerisationstests (WP4.2.7) .....	20
2.5	Zusammenfassung und Ausblick (WACKER).....	21
3	Literatur.....	22

## **Teil I – Sachbericht zum Verwendungsnachweis – Kurzbericht**

### **1 Aufgabenstellung**

Gesamtziel des Verbundvorhabens SynBioTech im Rahmen des *Innovationsraums BioBall* war es, das Potential einer synergistischen bioökonomischen Verfahrensentwicklung für die Verwertung von CO<sub>2</sub> aus dezentral anfallenden Abgasströmen aufzuzeigen. Die geplante Verwertungskette beginnt dabei mit der chemischen Hydrierung von CO<sub>2</sub> zu Methanol, das anschließend als C-Quelle in Zellkulturen von Varianten des methylophilen Bakteriums *Methyloribrium extorquens* eingesetzt werden soll, um biotechnologisch Biomasse als Futtermittel bzw. Carbonsäuren als marktfähige Rohstoffe für die Polymerindustrie bereitzustellen.

Innerhalb dieses Gesamtrahmens war das Ziel der von WACKER bearbeiteten Arbeitspakete

- aus Carbonsäuren, die aus dem Ethylmalonat-CoA-Stoffwechselweg (EMCP) von modifizierten *M.extorquens*-Stämmen zugänglich gemacht werden können, mit chemischen Verfahren Derivate als Vorstufen für die Herstellung hochwertiger Polymere zu erzeugen (WP2.2.7);
- mit von den Projektpartnern bereit gestellten Kulturbrühen aus der methylophilen Fermentation dieser *M.extorquens*-Stämme in orientierenden Studien (WP2.2.6) Verfahren zur Isolation und Reinigung der generierten Carbonsäuren aufzuzeigen und diese Verfahren in folgenden Prozessentwicklungsarbeiten (WP4.2.6) zur Anwendungsreife zu entwickeln.
- die Eignung der erhaltenen gereinigten Carbonsäure-Präparationen auf Ihre Eignung für technische Anwendungen, insbesondere die etablierte radikalische Co-Polymerisation mit Vinylacetat zu testen (WP4.2.7).

### **2 Ergebnisse (WACKER)**

#### **2.1 Orientierende Studien zur Reinigung von Carbonsäuren (WP2.2.6)**

Orientierende Studien zur Reinigung wurden mit Modellsystemen durchgeführt; zum einen wurden Lösungen kommerziell erhältlicher Carbonsäuren in Wasser, zum anderen *M.extorquens*-Kulturüberstände der Projektpartner (DFI) mit nur geringen Konzentrationen methylophil produzierter Carbonsäuren eingesetzt. Neben der Testung von Membranfiltrationen, Ionenaustausch und Kristallisation als Grundoperationen für eine zur entwickelnde Reinigungsstrategie wurden Elektrodialyse-Verfahren als innovativer Ansatz zur Aufreinigung der Carbonsäuren untersucht.

## **2.2 Derivatisierung von Carbonsäuren als Vorstufen für Polymerprodukte (WP2.2.7)**

Die Reduktion von verzweigten Dicarbonsäuren aus dem EMCP (z.B. 2-Methylbernstein- bzw. Ethylmalonsäure) zu Diolen als potentielle Vorstufen für Polyether-Hybridpolymere bzw. Lactonen als Vorstufe für Polyester durch Druckhydrierung gelang nicht.

Versuche zur direkten radikalischen (Co-)polymerisation von Mesoconsäure blieben ebenfalls erfolglos. Damit verblieb von den aus dem EMCP zugänglichen Carbonsäuren lediglich Crotonsäure als Kandidat für eine technische Nutzung.

## **2.3 Prozessentwicklung zur Aufarbeitung von Crotonsäure aus konzentrierten Kulturbrühen (WP4.2.6)**

Das metabolische *Engineering* von *M.extorquens* erwies sich als hochkomplex; es gelang den Projektpartnern über den gesamten Förderzeitraum nicht, Produktionsstämme für die Gewinnung technisch interessanter Mengen an Carbonsäuren zu erzeugen. Eine Prozessentwicklung zur Aufarbeitung konnte deswegen nicht durchgeführt werden. Um die Machbarkeit einer Reinigung zu demonstrieren, wurde ein Kulturüberstand aus der Fermentation des wildtyp-nahen *M.extorquens*-Stamms PA1  $\Delta$ cel (MPIter) mit kommerzieller Crotonsäure supplementiert und diese anschließend erfolgreich isoliert und kristallisiert.

## **2.4 Polymerisationstests (WP4.2.7)**

Diese „Mock“-Präparation von Crotonsäure mit biogenem Verunreinigungsprofil konnte erfolgreich als Ausgangsmaterial für die radikalische Co-Polymerisation mit Vinylacetat zu VINNAPAS® C-Produkten eingesetzt werden; die Ergebnisse der Polymerisationsversuche waren dabei vergleichbar mit Ansätzen, in denen synthetische Crotonsäure eingesetzt wurde.

## **3 Zusammenfassung und Ausblick**

Die geplante Verwertungskette von CO<sub>2</sub> zu hochwertigen Polymeren konnte im Verbundprojekt SynBioTech nicht geschlossen werden, da keine Varianten von *M.extorquens* generiert werden konnten, die in Methanol-gefütterter Fermentation (methylo-troph) Carbonsäuren in hoher Ausbeute herstellen konnten.

In den bei WACKER durchgeführten Arbeiten konnte eine Reihe von Prozessschritten zur Aufreinigung von technisch äquivalenter Crotonsäure aus *M.extorquens*-Kulturbrühen für VINNAPAS® C-Polymere demonstriert werden; auf Basis dieser Arbeiten könnte bei Verfügbarkeit entsprechender Kulturbrühen voraussichtlich mit geringem Aufwand ein robuster und skalierbarer technischer Reinigungsprozess aufgesetzt werden. Darüber hinaus wurde in orientierenden Studien wertvolles technisches *Know-how* zur Elektrodialyse als ressourcenschonende Grundoperation für zukünftige Reinigungsprozesse für Carbonsäuren aufgebaut.

## Teil II – Eingehende Darstellung

### 1 Einleitung

Gesamtziel des Verbundvorhabens SynBioTech im Rahmen des Innovationsraums BioBall war es, das Potential einer synergistischen bioökonomischen Verfahrensentwicklung für die Verwertung von CO<sub>2</sub> aus dezentral anfallenden Abgasströmen aufzuzeigen.

Die geplante Verwertungskette beginnt dabei mit der chemischen Hydrierung von CO<sub>2</sub> zu Methanol, das anschließend als C-Quelle in Zellkulturen von Varianten des methylotrophen Bakteriums *Methylorubrum extorquens* eingesetzt wird, um fermentativ Biomasse als Futtermittel bzw. Carbonsäuren als marktfähige Rohstoffe für die Polymerindustrie bereitzustellen.

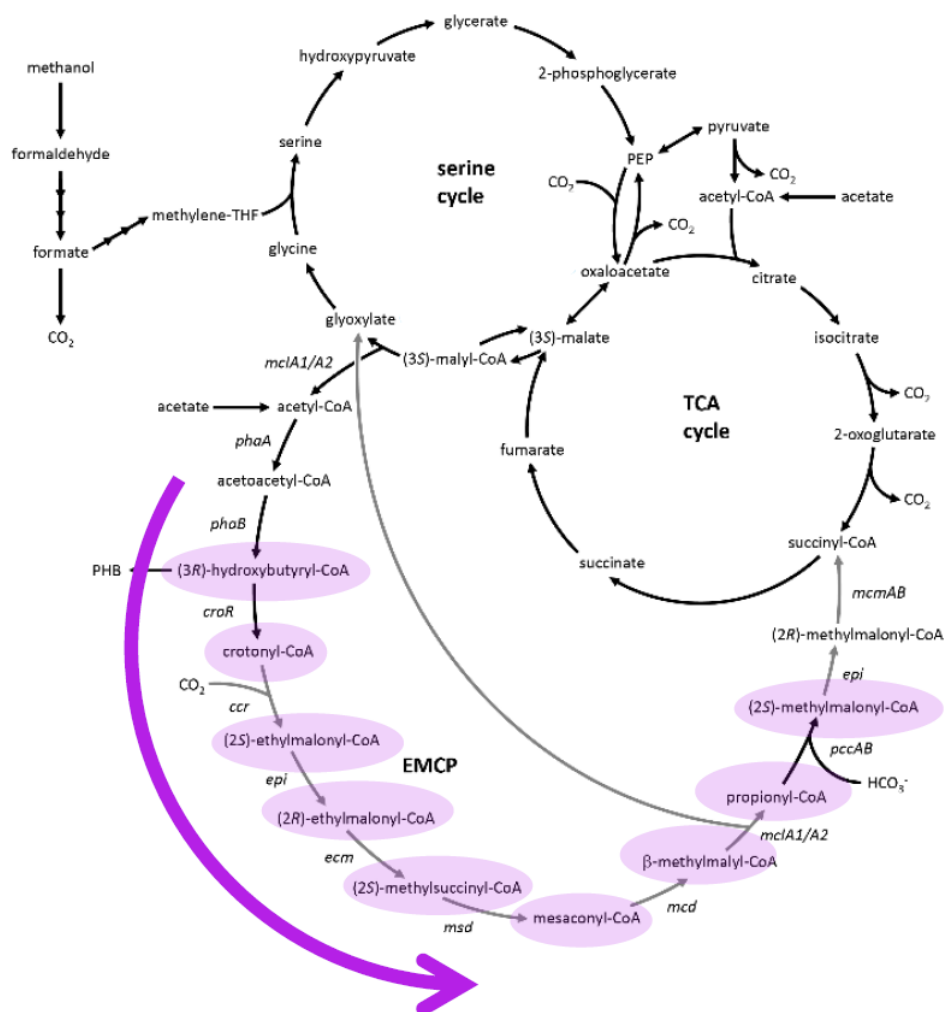


Abb.1 Schema des Ethylmalonsäure-CoA Stoffwechselwegs (EMCP) von *Methylorubrum extorquens* (T. Erb, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie)

Aus dem Etymalonsäure-CoA-Stoffwechselweg (EMCP) von *M.extorquens* sind prinzipiell eine Reihe komplexer verzweigter oder ungesättigter (Di-)Carbonsäuren zugänglich (s. Abb. 1), die in einer kreislaufbasierten Bioökonomie ein hohes wirtschaftliches Nutzungspotential aufweisen können. Voraussetzung dafür ist die Verfügbarkeit von Stämmen, die ihre effektive fermentative Produktion unter Nutzung gut verfügbarer *Feed*-Quellen (z.B. „grünes“ Methanol) erlauben. Basierend auf den Vorarbeiten der Projektpartner an der Universität Marburg (Becker), am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie (Erb) und am DECHEMA-Institut Frankfurt (Buchhaupt) sollten im Rahmen des Verbundprojekts SynBioTech durch gentechnische und evolutive Methoden solche Varianten von *M.extorquens* erzeugt und entsprechenden Fermentationsprozesse entwickelt werden.

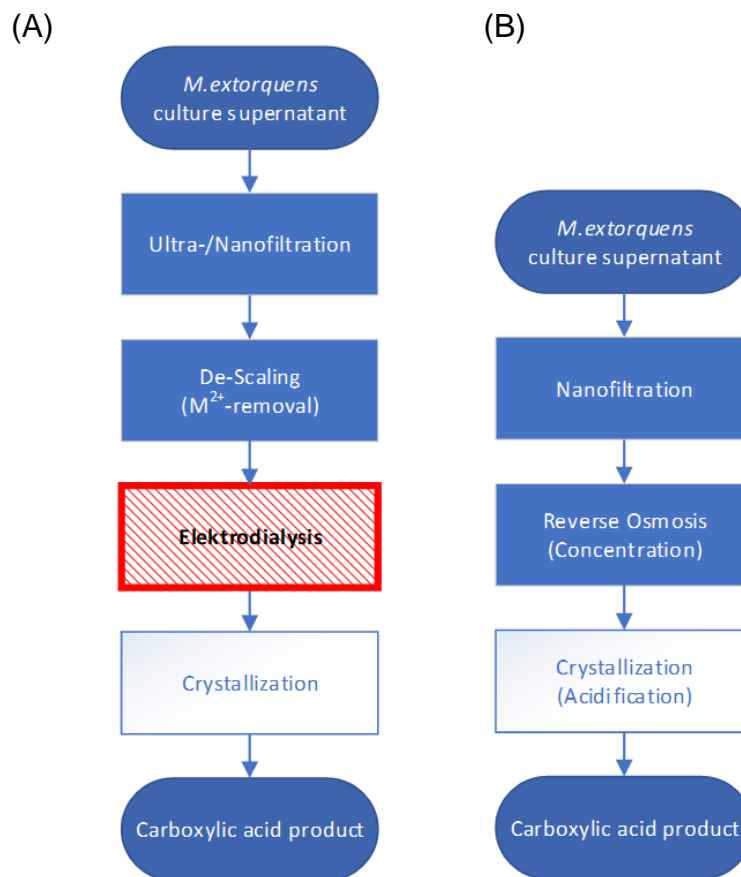


Abb. 2 Im Rahmen der Arbeiten bei WACKER untersuchte Prozessschemata für die Reinigung organischer Säuren aus mikrobiellen Kulturüberständen.

Die Aufgabe der Arbeiten bei WACKER war es, Strategien zur effizienten Aufarbeitung der Kulturbrühen (DSP) zu entwickeln, sowie wenn notwendig eine Folgechemie der generierten Carbonsäuren zu etablieren.

## **2 Ergebnisse (WACKER)**

### **2.1 Orientierende Versuche zur Reinigung von Dicarbonsäuren (WP2.2.6)**

Im Rahmen des Förderprojekts SynBioTech war es die Zielsetzung der biotechnologischen Arbeiten bei WACKER, kostengünstige Aufreinigungsprozesse (DSP) für Carbonsäuren aus dem Ethylmalonsäure-CoA-Stoffwechselweg (EMCP) zu entwickeln. Sowohl die Produktionsstämme als auch die methylotrophen Fermentationsverfahren für die Herstellung dieser Carbonsäuren sollten dabei durch die Projektpartner entwickelt und die gewonnenen Kulturbrühen als Ausgangsmaterial für die Reinigungsentwicklung bereitgestellt werden.

Da zu Projektbeginn keine hochproduktiven *M.extorquens*-Stämme zur Verfügung stehen konnten, sollten bei WACKER in initialen, orientierenden Studien Verfahren zur Isolation und Reinigung der generierten Carbonsäuren aufgezeigt werden, um die Grundlage dafür zu schaffen, diese Verfahren nach erfolgreicher Stamm- und Fermentationsentwicklung durch die Partner in DSP-Prozessentwicklungsarbeiten (WP4.2.6) bei WACKER zur Anwendungsreife zu entwickeln.

Als grundsätzliches und voraussichtlich gut und flexibel in den Prozessmaßstab zu skalierendes Schema zur Reinigung von Carbonsäuren aus fermentativen Produktströmen wurde dabei eine Kombination aus Membranfiltrationsverfahren zur Abreicherung biogener Verunreinigungen kombiniert mit einer finalen Kristallisation der angereicherten Carbonsäuren zum handhabbaren Produkt ins Auge gefasst (s. Abb. 2)

Besonderes Augenmerk wurde im Rahmen der orientierenden Studien auf die Testung und Bewertung von Elektrodialyseverfahren gelegt, da diese als Teil eines *Power-to-Purity*-Prozesskonzepts die Möglichkeit zur selektiven Aufreinigung und Konditionierung organischer Säuren bei minimalem Verbrauch von Hilfschemikalien versprechen [1].

#### **2.1.1 Elektrodialyse von Carbonsäurelösungen**

Für orientierende Studien zur Elektrodialyse stand ein Laboraufbau mit 10 cm<sup>2</sup> Membranfläche zur Verfügung, in dem maximal sechs getrennte Kreisläufe für Produkt-, Abfall- und Spülströme beschickt werden können. Durch Wahl geeigneter ionenselektiver Membranen können damit für verschiedene experimentelle Zwecke verschiedene Zellkonfigurationen realisiert werden; die in den orientierenden Versuchen zur Reinigung von Dicarbonsäuren (WP2.2.6) genutzten Konfigurationen sind in Abb. 3 schematisch dargestellt.

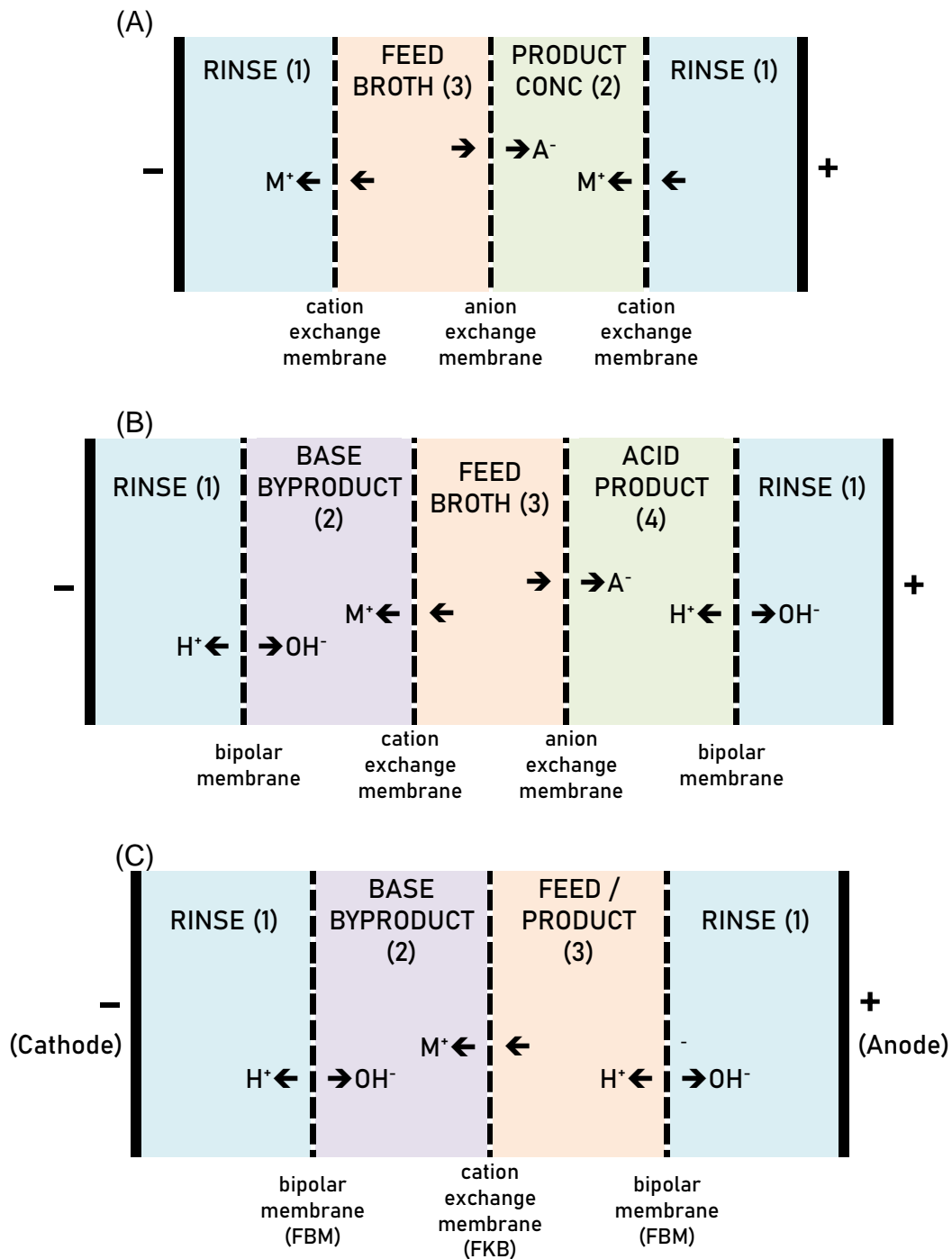


Abb. 3 Schematische Konfigurationen von Elektrodialysezellen zur (A) Anreicherung eines anionischen Produkts  $A^-$  aus dem *Feed*-Strom in den Produktkreislauf (Setup 1), (B) Produkthanreicherung mit simultaner Ansäuerung des Produktkreislaufs mittels bipolarer Membranen (Setup 2), bzw. (C) zur Ansäuerung des Produktstroms unter Abreicherung von Gegenionen  $M^+$  (Setup 3).

### Transportversuche mit reinen Carbonsäurelösungen:

In initialen Versuchsreihen im Labormaßstab konnte aus Modelllösungen in Wasser erfolgreich der Membrantransport verschiedener Carbonsäuren gezeigt werden. Grundsätzlich wurde in den Modelllösungen dabei durch Zugabe von NaOH ein neutraler pH eingestellt, um die Carbonsäuren in die entsprechenden Carboxylat-Anionen zu überführen; diese Situation ist analog zu Kulturbrühen aus *Fed batch*- oder kontinuierlichen Fermentationen, bei denen im Bioreaktor grundsätzlich eine enge pH-Kontrolle gewährleistet wird.

In den durchgeführten Versuchsreihen wurden sowohl die Spannungs- als auch die Konzentrationsabhängigkeiten der Transportraten untersucht (s. z.B. Abb. 4).

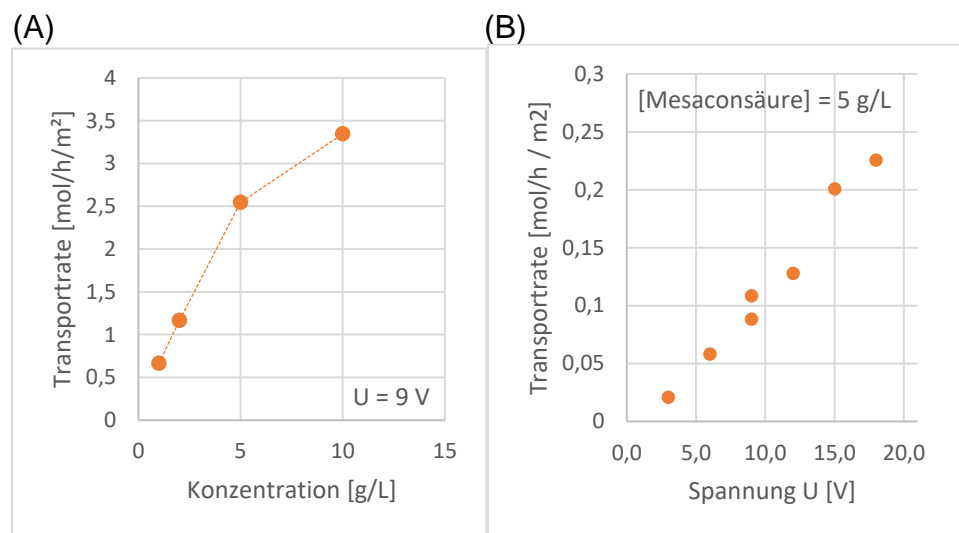


Abb. 4 Initiale Transportraten für Mesaconsäure aus Standardlösungen mit (A) Elektrodialyse-Setup 1 bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen,  $U = 9 \text{ V}$ , bzw. (B) Elektrodialyse-Setup 2 bei verschiedenen Spannungen, *feed*-Konzentration 5 g/L; System ElectroCell Micro Flow Cell, 10 cm<sup>2</sup>; Membranen Fumasep FBM, FAB, FKB

## 2.1.2 Konditionierung und Elektrodialyse von *M.extorquens*-Kulturüberständen

### Konditionierung von Kulturbrühen für Elektrodialyseversuche:

Weitere Versuche zur Elektrodialyse wurden mit Kulturbrühen geringer Produktkonzentration durchgeführt, die vom Partner DFI (Buchhaupt) zur Verfügung gestellt wurden; diese Kulturbrühen enthielten unterschiedliche Mengen verschiedener Dicarbonsäuren (s. Tab. 1).

Tabelle 1 Kulturbrühen (DFI), die für orientierende Studien zur Verfügung standen.

Kulturbrühe	Bereitstellung	Gehalt an Carbonsäuren	Gesamtprotein (Bradford)
DFI001	Nov'20	3.6 g/L Mesoconsäure 3.8 g/L Methylbernsteinsäure	0.64 g/L
DFI002	Okt'21	1.8 g/l Methyläpfelsäure	27 mg/L
DFI003		1.3 g/l Methyläpfelsäure	25 mg/L
DFI004		0.9 g/l Methyläpfelsäure	23 mg/L

Als Voraussetzung für eine Aufreinigung dieser Carbonsäuren durch elektrodialytischen Membrantransport war es notwendig, störende Verunreinigungen aus den Kulturüberständen zu entfernen. Dafür wurde initial eine Ultrafiltration zur Rückhaltung biologischer Makromoleküle eingesetzt (s. Abb. 5); ultrafiltrierte Kulturbrühen wurden zusätzlich durch Kationenaustausch (z.B. über Amberlite IR120, Na<sup>+</sup>-Form) enthärtet, um eine „Vergiftung“ der kationenselektiven Membranen in der Elektrodialyse auszuschließen.

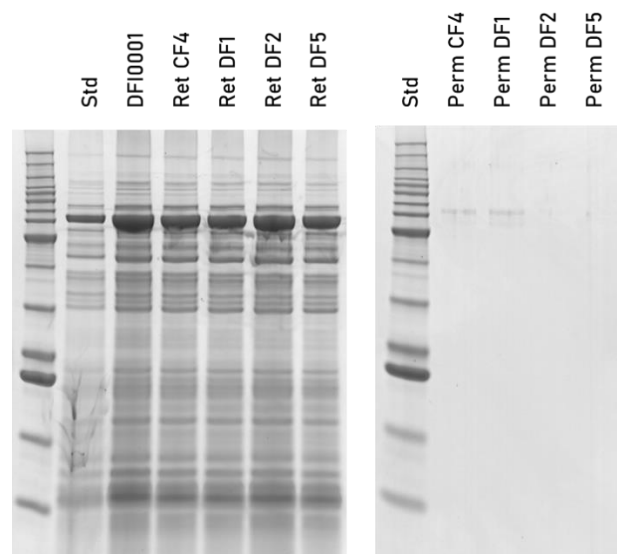


Abb. 5 Abreicherung von *M.extorquens*-Proteinen durch Ultrafiltration der Kulturbrühe DF0001 über eine regenerierte Cellulosemembran (Ultracel 3 kDa).

In weiteren Versuchen wurde darüber hinaus die Eignung von Nanofiltrationsschritten zur simultanen Abreicherung biogener Makromoleküle und zweiwertiger Metallionen untersucht (s. Abb 6).

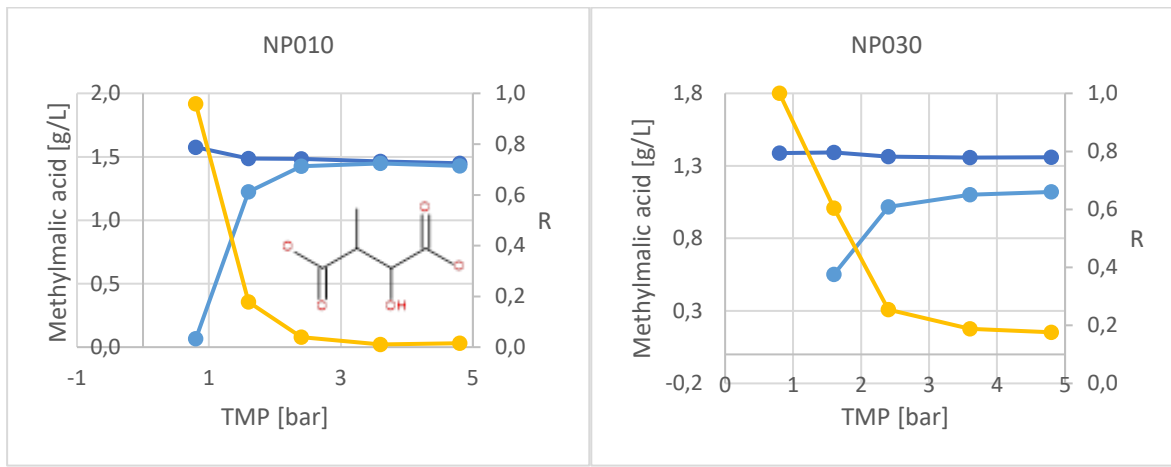


Abb. 6 Retentionsfaktoren R (gelb) für Methyläpfelsäure aus der Kulturbrühe DF0002 bei Nanofiltration über Microdyn Nadir NP010 bzw NP030 Nanofiltrationsmembranen.

Transportversuche mit konditionierten Kulturbrühen geringer Carbonsäurekonzentration:

Mit vorbehandelten Kulturbrühen wurden in allen Fällen mit allen getesteten Konditionierungsprotokollen deutlich niedrigere elektrodialytische Transportraten als mit reinen Carbonsäurelösungen beobachtet (s. beispielhaft Abb. 7).

Eine im Hinblick auf eine potentielle technische Anwendung hin besonders problematische Beobachtung war eine deutliche Reduktion der Transportraten bei wiederholtem Einsatz der Membran über mehrere Elektrodialysezyklen (s. Abb. 8).

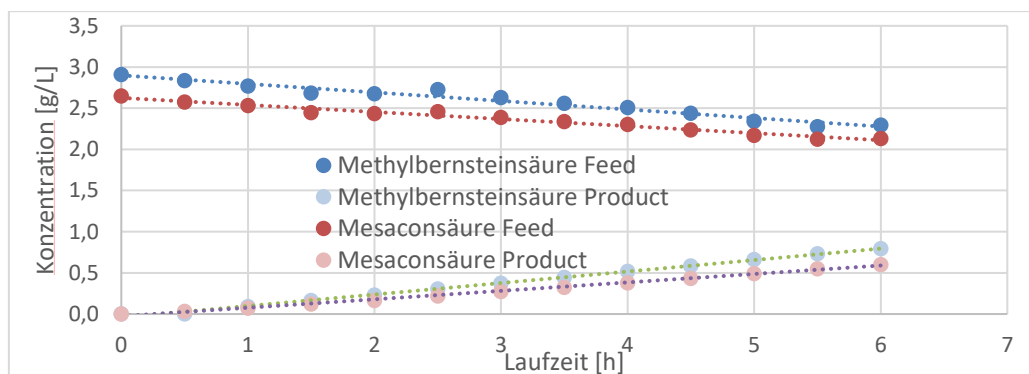


Abb. 7 Transportraten für Methylbernsteinsäure und Mesaconsäure aus *M.extorquens*-Kulturüberstand (DF0001, konditioniert) 10 cm<sup>2</sup>; Setup1; Membranen Fumasep FAB, FKB; U = 18 V; die ermittelten Transportraten betragen <0.05 mol/h/m<sup>2</sup>.

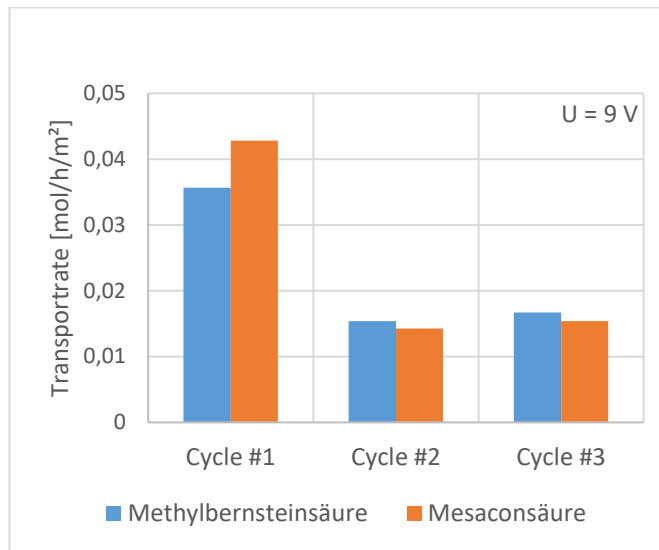


Abb. 8 Transportraten für Methylbernsteinsäure und MESAconsäure aus *M.extorquens*-Kulturüberstand (DF0001, konditioniert) über drei Produktionszyklen; 10 cm<sup>2</sup>; Setup1; Membranen Fumasep FAB, FKB; U = 9 V

Angesichts dieser Ergebnisse wurde entschieden, im Schema einer in WP4.2.6 geplanten Prozessentwicklung für einen Aufreinigungsprozess (der ersten Generation) zunächst auf einen Elektrodialyseschritt als Grundoperation zu verzichten (s. Abb. 2).

Da in den initialen Elektrodialyseversuchen neben der Spannungsabhängigkeit eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit der Transportraten für Carbonsäuren beobachtet worden war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Zukunft bei Vorliegen von Carbonsäuren in technisch relevanten Konzentrationen (>50 g/L in der Kulturbrühe) weitere Versuche zur elektrodialytischen Extraktion erfolgreich sein und zur Entwicklung eines insgesamt ökonomischeren und ressourcenschonenden Prozesses führen können.

### 2.1.1 Ansäuerung von nanofiltrierte *M.extorquens*-Kulturüberständen durch Elektrodialyse

Als letzte Grundoperationen des Reinigungsschemas für Carbonsäuren sind Kristallisation und Trocknung vorgesehen, um das Produkt für den technischen Einsatz in eine handhabbare und stabile Form zu überführen. In Kulturbrühen bei nahe neutralem pH liegen Carbonsäuren bevorzugt als Carboxylat-Anionen vor, die eine deutlich größere Löslichkeit in Wasser als die freien Säuren aufweisen. Die Elektrodialyse bietet sich als geeignete Methode an, den pH vorgereinigter Kulturüberstände zur Vorbereitung einer Kristallisation abzusenken.

Sowohl Crotonsäure-Modelllösungen als auch eine mit Crotonsäure supplementierte, durch Membranfiltrationen gereinigte und durch RO aufkonzentrierte *M.extorquens*-Kulturbrühe (s.

0) wurden als Ausgangsmaterial für eine Ansäuerungsexperiment mit Elektrodialyse-Setup 3 (s.o.) im Labormaßstab verwendet (Abb. 9).

Eine Ansäuerung der Lösungen auf pH <1, entsprechend einer Umsetzung von Crotonat in Crotonsäure, konnte mit hohen Umsatzraten realisiert werden; adverse Effekte der Gegenwart biogener Verunreinigungen im Feed-Stream wurden nicht beobachtet. Hieraus ergibt sich für potentielle zukünftige Prozessentwicklungen die Möglichkeit zur Einleitung der Kristallisation des Produktes ohne Einsatz von Hilfsstoffen (z.B. HCl).

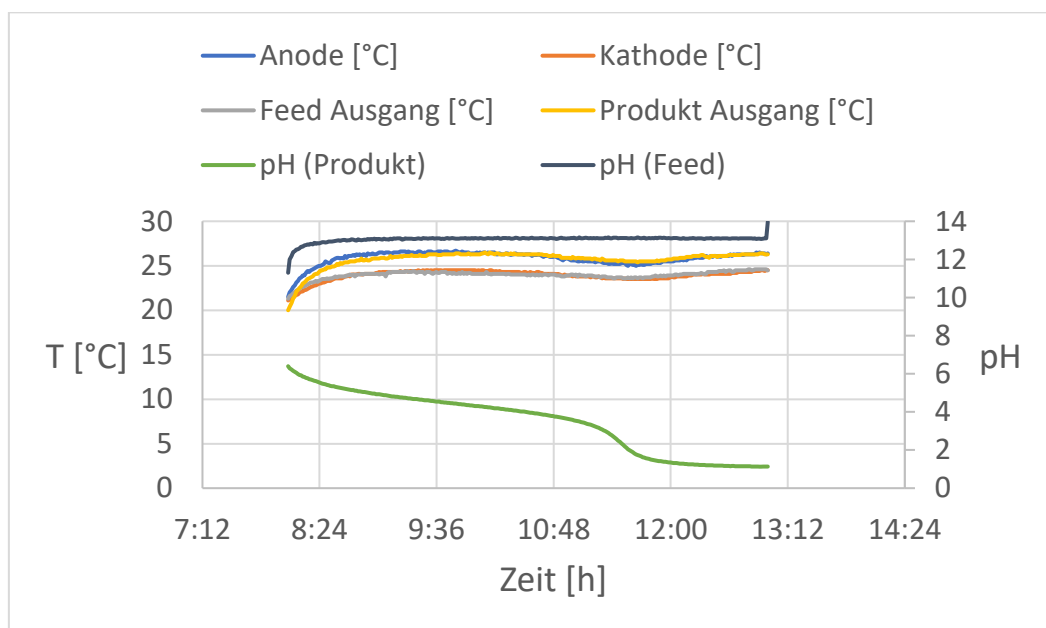


Abb. 9 (Ansäuerung von 100 mL RO-Konzentrat aus *M.extorquens* „Mock“-Kulturbrühe (73 g/L Crotonsäure); grün – pH -Entwicklung im Produkt (3), dunkelblau – pH-Entwicklung in Base/Byproduct, alle andern Spuren – Temperatur an den angegebenen Messpunkten der Elektrodialyse-Zelle; Rinse 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 cm<sup>2</sup> Membranfläche, Fumasep FKB & FBM, 12 V (Setup 3).

## 2.2 Untersuchungen zur technischen Verwendbarkeit der Dicarbonsäuren (WP2.2.7)

### 2.2.1 Reduktion von Dicarbonsäuren

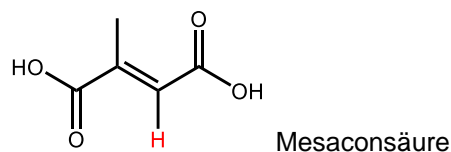
Initial wurde entsprechend des ursprünglichen Projektplans eine Reihe von Versuchen zur Reduktion der Dicarbonsäure Ethylmalonsäure aus dem EMCP mittels katalytischer Druckhydrierung durchgeführt. In keinem Fall ließen sich nach Abschluss der Reaktion die im Sinne der Aufgabenstellung gewünschten Produkte (bevorzugt Lactone bzw. Aldehyde oder Dirole) nachweisen. Stattdessen erfolgte in allen Fällen eine weitgehende Decarboxylierung des Edukts unter Bildung von Buttersäure. Auch bei folgenden Versuchen zur Reduktion von

Itaconsäure, einem Isomer der Dicarbonsäure Mesaconsäure aus dem EMCP, konnte keine Bildung verwertbarer Produkte beobachtet werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Fortsetzung der Versuche zur Reduktion von Dicarbonsäuren als Vorstufen für Polyether bzw. Polyester als nicht zielführend angesehen. Um die für das Arbeitspaket WP2.2.7 bereit gestellten personellen Ressourcen weiter im Sinn der Ziele des Förderprojekts, d.h. im Hinblick auf die Verwertbarkeit von Carbonsäuren aus dem EMCP, zu nutzen, wurde im Folgenden die Möglichkeit zur radikalischen Polymerisation der ungesättigten Dicarbonsäure Mesaconsäure untersucht.

### 2.2.2 Radikalische Polymerisation von Mesaconsäure

Mit VINNAPAS® C verfügt WACKER über eine etablierte Linie von kommerziellen Vinylacetat-/Crotonsäure-Copolymeren. Nachdem von den Carbonsäuren im EMCP neben Crotonsäure auch Mesaconsäure über eine Doppelbindung verfügt, sollte untersucht werden, ob sich diese analog zur Crotonsäure mit Vinylacetat radikalisch polymerisieren lässt, um dadurch potentiell zu neuen nutzbaren Co-Polymeren zu gelangen.



In den initialen Co-Polymerisationsversuchen, die im Labormaßstab entsprechend der etablierten Protokolle für die Herstellung von VINNAPAS® C-Polymeren, unter Ersatz der Crotonsäure, durchgeführt wurden, war eine schlechte Löslichkeit der Mesaconsäure im Reaktionsmedium beobachtet worden; eine Bildung der gewünschten Co-Polymeren konnte dabei nicht gezeigt werden. Daher wurde die Löslichkeit in verschiedenen Lösemitteln bestimmt (Tabelle 2).

Tabelle 2 Löslichkeit von Mesaconsäure in verschiedenen Lösemitteln

Lösemittel	Mesaconsäure gelöst
Wasser	4,4 Gew.-%
Aceton	13,5 Gew.-%
EtOAc	4,0 Gew.-%
DMF	46,1 Gew.-%
DMSO	46,3 Gew.-%

Um ihre Reaktivität besser zu verstehen, wurden anschließend eine Reihe von Versuchen zur Homopolymerisation der Mesaconsäure unter Variation des Lösemittels sowie des Initiators durchgeführt; in keinem Fall konnte die Bildung eines polymeren Produkts beobachtet werden. In einem weiteren Ansatz wurden literaturgängige Protokolle zur Co-Polymerisation von Fumarsäure mit Styrol [2,3] unter Ersatz von Fumarsäure mit Mesaconsäure angepasst; auch in diesem Fall war kein Umsatz der Mesaconsäure zu erkennen (s. Abb. 10)

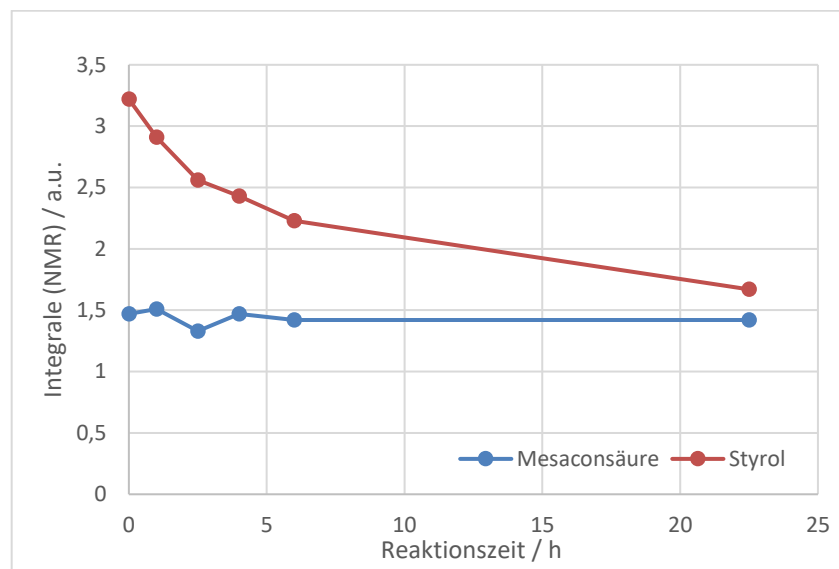


Abb. 10 Reaktionsverlauf der Copolymerisation von Mesaconsäure mit Styrol.

Zusammenfassend erwiesen sich damit auch die Arbeiten zur direkten radikalischen Polymerisation von Mesaconsäure in Lösung als nicht zielführend. In einer weiteren Versuchsreihe wurde daher die Möglichkeit der technischen Nutzung ungesättigter Carbonsäuren aus dem EMCP zur Modifikation von Polymeren über das radikalische Pfropfen oder *Grafting* untersucht.

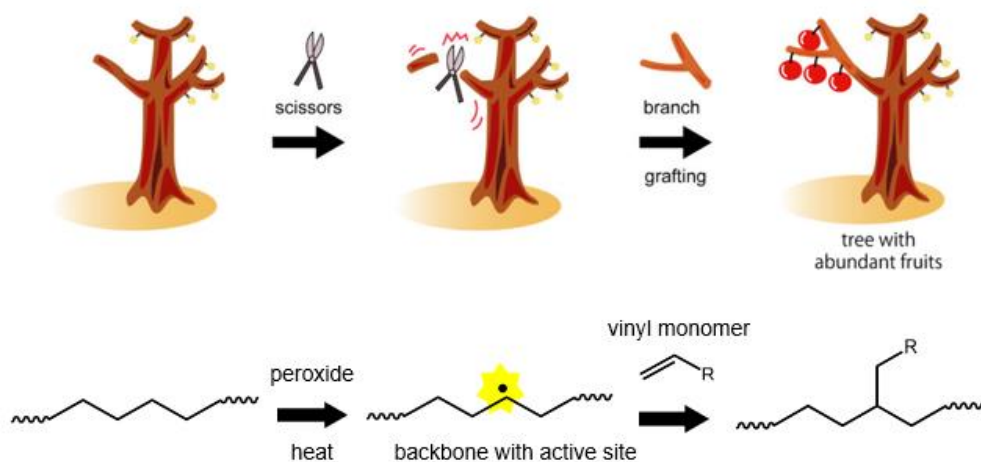


Abb. 11 Vereinfachteschematische Darstellung des Grafting-Prozesses [4].

### 2.2.3 Versuche zum *Grafting* von Mesaconsäure

Durch die polymeranaloge Reaktion des *Graftings* besteht die Möglichkeit, nachträglich das Eigenschaftsprofil von Polymeren zu modifizieren [5]. Zur Durchführung werden mittels Radikalstartern Radikale im Rückgrat einer zu modifizierenden Polymerkette erzeugt, welche dann mit eingebrachten Monomeren reagieren. Das Verfahren erinnert an das Pfropfen von Ästen auf einen Baum und bezieht daher seinen Namen (s. Abb. 11). In der Praxis können unerwünschte Nebenreaktionen wie z.B.  $\beta$ -Spaltung mit einhergehender Verkürzung der Polymerketten, aber auch Rekombination zu hochmolekularen Ketten auftreten.

In der durchgeführten Versuchsreihe wurde das Polyvinylacetat-Homopolymer VINNAPAS® B17 speziell in der Knetschmelze zur Reaktion mit Maleinsäure, Fumarsäure und Mesaconsäure gebracht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Bei den Versuchen mit Mesacon- sowie Fumarsäure war im Gegensatz zu Maleinsäure unter keiner der getesteten Reaktionsbedingungen ein erfolgreiches *Grafting* zu verzeichnen.

Zusammenfassend konnten in den im Rahmen des Förderprojekts durchgeführten Versuchen keine neuen technischen Nutzungsmöglichkeiten für die aus dem EMCP zugänglichen Carbonsäuren als Ausgangsmaterialien für die Herstellung hochwertiger Polymerprodukte identifiziert werden. Damit verblieb die Herstellung Crotonsäure mit ihrem etablierten Einsatzspektrum in Vinylacetat-/Crotonsäure-Copolymeren als Ziel für die Entwicklung von modifizierten methylotrophen *M.extorquens*-Produktionsstämmen sowie von entsprechenden Fermentationsverfahren durch die Projektpartner.

Tabelle 3 Ergebnisse der Grafting-Versuche im Laborknetter

Versuch.	Edukt		Carbonsäure	Temperatur	Zeit	Mn [g/mol]	Mw [g/mol]	Titration [mmol KOH/g]	Grafting auf PVAc [%]	Graftingerfolg [%]
<b>Edukt</b>	B17 Spezial	PVAc	-			11.026	30.788	0,0		
<b>ScF 1940/100°C</b>	B17 Spezial	PVAc	Mesaconsäure	100°C	20 min	14.584	38.746	0,049	0,212	3,19
<b>ScF 1941/100°C</b>	B17 Spezial	PVAc	Fumarsäure	100°C	20 min	13.850	38.717	0,00107	0,005	0,06
<b>ScF 1942/100°C</b>	B17 Spezial	PVAc	Maleinsäure	100°C	20 min	14.666	45 638	0,272	1,171	15,80
<b>ScF 1940/135°C</b>	B17 Spezial	PVAc	Mesaconsäure	135°C	20 min	12.981	37.261	0,0455	0,196	2,96
<b>ScF 1941/135°C</b>	B17 Spezial	PVAc	Fumarsäure	135°C	20 min	14.516	37.895	0,0146	0,063	0,85
<b>ScF 1942/135°C</b>	B17 Spezial	PVAc	Maleinsäure	135°C	20 min	14.942	46.691	0,258	1,112	15,00
<b>ScF 1940/150°C</b>	B17 Spezial	PVAc	Mesaconsäure	150°C	2 h	13.554	38.555	0,0493	0,212	3,21
<b>ScF 1941/150°C</b>	B17 Spezial	PVAc	Fumarsäure	150°C	2 h	13.992	39.344	0,00518	0,022	0,30
<b>ScF 1942/150°C</b>	B17 Spezial	PVAc	Maleinsäure	150°C	2 h	1.690.630 6.552	2.741.870 43.676	0,117	0,503	6,79

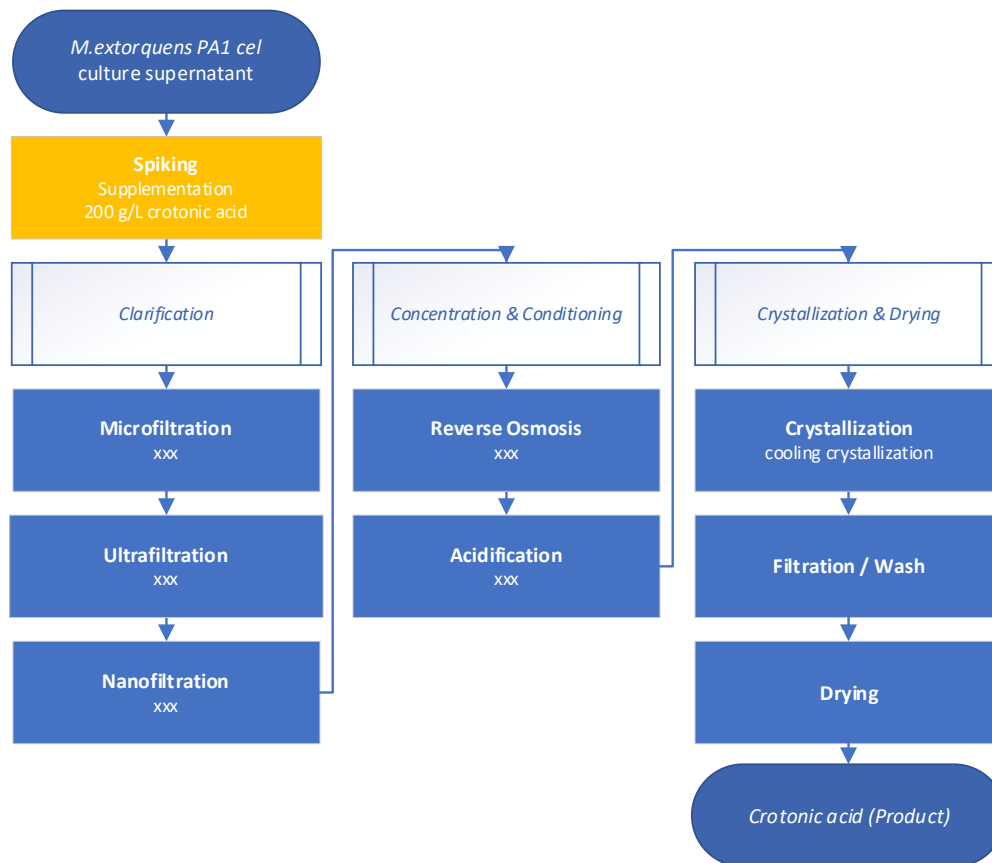


Abb. 12 Prozessschema für die Reinigung von Crotonsäure aus supplementierten *M. extorquens*-Kulturüberständen.

### 2.3 Prozessdemonstration – Reinigung von Crotonsäure aus supplementierten *M. extorquens*-Kulturüberständen und Polymerisation (WP4.2.6)

Da wegen der komplexen Herausforderungen der Genetik und des Metabolismus von *M. extorquens* über den gesamten Förderzeitraum von den Projektpartnern keine Stämme entwickelt werden konnten, die zur methylotrophen Produktion technisch interessanter Ausbeuten von Carbonsäuren aus dem EMCP einsetzbar waren, war es nicht möglich, die als Ziel von Arbeitspaket WP4.2.6 vorgesehene Entwicklung eines robusten und skalierbaren technologischen Prozesses zur Aufarbeitung durchzuführen.

Um trotz dieser Lücke die im Gesamtprojektplan des Verbundprojektes SynBioTech ins Auge gefasste Verwertungskette vom CO<sub>2</sub> zum hochwertigen Polymerprodukt so weit wie möglich zu demonstrieren, wurde die Entscheidung getroffen, eine simulierte „Mock“-Reinigung von Crotonsäure aus *M. extorquens*-Kulturüberständen durchzuführen.

Als Ausgangsmaterial wurde vom Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie (Abteilung Erb) der Kulturüberstand einer Fermentation des *M. extorquens*-Stammes PA1 Δcel zur Verfügung gestellt; in diesem Kulturüberstand war keine der im Laufe des Projekts betrachteten Säuren aus dem Ethylmalonat-CoA-Stoffwechselweg nachweisbar. Für die Reinigungsversuche wurden in 4 L Kulturüberstand 100 g/L kommerzieller Crotonsäure gelöst

und die Lösung mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Diese „Mock“-Kulturbrühe wurde der folgenden Sequenz aus Filtrations- und Reinigungsschritten unterzogen (s. Abb. 12)

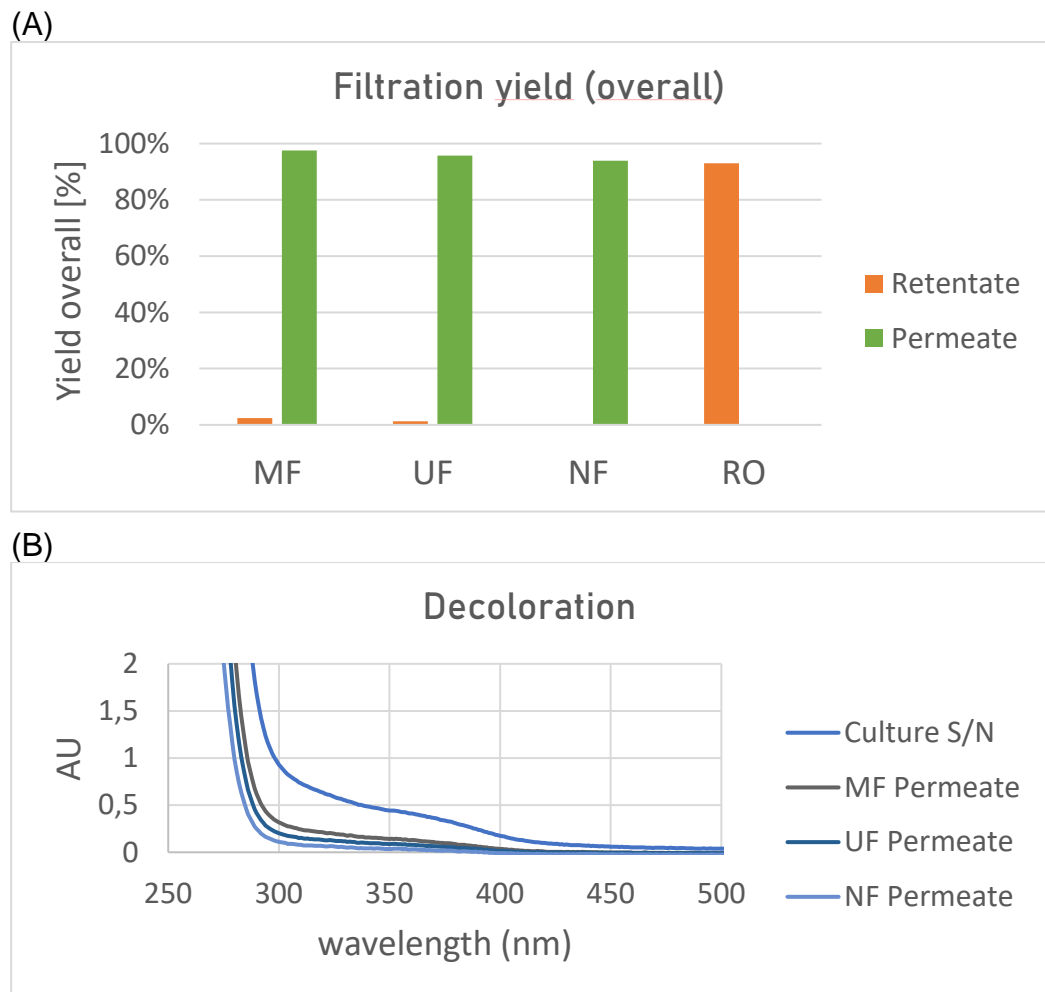


Abb. 13(A) Ausbeuten der Tangentialfluss-Filtrationsschritte und der Reversen Osmose zur Aufarbeitung von Crotonsäure aus *M.extorquens* „Mock“-Kulturbrühe; (B) UV-VIS-Spektren der Permeate aus sukzessiver Mikrofiltration (MF), Ultrafiltration (UF) und Nanofiltration (NF) der supplementierten *M.extorquens* „Mock“-Kulturbrühe.

Durch eine Reihe von Tangentialfluss-Filtrationsschritten konnte bei guter Ausbeute eine vollständige Klärung und signifikante Entfärbung der Kulturbrühe erzielt werden (s. Abb.13) Nach Konzentrierung des Filtrats über RO und Rotationsverdampfer und Ansäuerung auf pH <1 mit HCl konnte Crotonsäure durch Kühlungskristallisation wieder als Feststoff aus der Lösung abgeschieden werden (s. Abb. 14).

Nach Ernte der Kristalle mittels einer Filterzentrifuge, Waschen mit kalter 0.1 M HCl und Vakuumtrocknung wurden damit 0.19 kg partiell („Mock“-)gereinigte Crotonsäure erhalten; das entspricht einer DSP-Gesamtausbeute von 48 %. Die größten Verluste traten hierbei wegen der hohen Restlöslichkeit von Crotonsäure in der Mutterlauge (~25 g/L) sowie in der Waschlösung bei der Kristallisation und Ernte auf; in einem eventuellen zukünftigen

Herstellprozesswären müssten dementsprechend Maßnahmen zur Erhöhung der Ausbeute (z.B. durch Mutterkaugen-Recycling) implementiert werden.

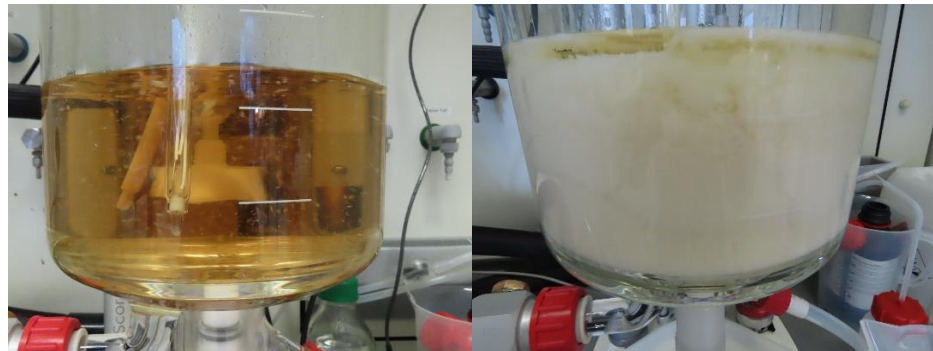


Abb. 14 Kühlungskristallisation von Crotonsäure; (links) Bildung initialer Kristalle während der Abkühlung; (rechts) Kristallisationsansatz nach Abschluss der Nachkristallisation; die Kristallisation wurde durch Abkühlung der konzentrierten „Mock“-Kulturbrühe (ca. 0.13 kg Crotonsäure/L) von 30°C auf 5 °C über 3 h bei gleichzeitiger Ansäuerung auf pH 1 durch Zugabe von 25 % HCl induziert; Nachkristallisation über 21 h.

## 2.4 Polymerisationstests (WP4.2.7)

Die gereinigte „Mock“-biogene Crotonsäure wurde in den Betriebslaboren der WACKER-Polymerchemie in einer Reihe von Polymerisationstests entsprechend der Rezepte für die Herstellung von Co-Polymeren der VINNAPAS® C-Reihe eingesetzt; diese Versuche wurden mehrfach und im direkten Vergleich mit konventionell eingesetzter chemisch-synthetischer Crotonsäure durchgeführt (s Tab. 4).

Im Ergebnis ergaben sich bei beiden getesteten Rezepten für VINNAPAS® C501 bzw. C305 mit unterschiedlichen Anteilen an Crotonsäure bezüglich Polymerisationskinetik, Monomer-Restgehalt und mittlerer Molmasse ( $M_w$ ) der erhaltenen Polymerprodukte keine signifikanten Unterschiede zwischen biogener und chemisch-synthetischer Crotonsäure; bei höherem Crotonsäureanteil (VINNAPAS® C305) wurde für die biogene Crotonsäure allerdings ein leicht erhöhter Polydispersitätsindex des Produkts ( $2.35 \pm 0.06$  vs  $3.2 \pm 0.4$ ;  $n=3$ ), d.h. ein etwas erhöhter Anteil an kürzeren Ketten beobachtet. Die Reproduzierbarkeit und Signifikanz dieser Abweichung müsste bei einer potentiellen zukünftigen Entwicklung einer biobasierten Verwertungskette weiter untersucht und im Hinblick auf eventuell erforderliche Anpassungen des Produktionsrezepts geprüft werden.

Die grundsätzliche Eignung der „Mock“-biogenen Crotonsäure als Ausgangsstoff für die Herstellung von Co-Polymeren für die industrielle Anwendung konnte mit den durchgeführten Polymerisationsversuchen erfolgreich demonstriert werden

Tabelle 4 (A) Kinetik der Feststoff-(Polymer-)bildung, (B) Monomer-Restanteile (GC) und Molmassenverteilung (SEC) im Produkt bei verschiedenen Reaktionsansätzen zur Darstellung von VINNAPAS® C301; blau: Ansätze mit chemisch-synthetischer Crotonsäure, grün: Ansätze mit „Mock“-biogener Crotonsäure;

(A)

	Feststoffgehalte [%]							
	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min
#22	12,7	26,2	39,6	54,8	-	69,3	-	x
#27	8,3	17,5	24,9	26,8	-	49,0	-	59,2
#28	10,5	23,1	34,0	42,6	54,6	-	62,3	x
#33	8,4	20,9	32,8	41,1	50,5	60,5	x	x
#24	11,2	14,2	26,7	37,1	48,4	57,7	64,1	x
#38	10,7	20,0	27,2	35,8	47,5	59,5	66,5	x
#41	9,7	22,0	30,0	37,7	49,6	59,4	72,0	x

(B)

	GC		SEC		
	VAc [%]	CS [ppm]	Mn [g/mol]	Mw [g/mol]	D
#22	3,97	< 20	43.600 44.200	139.200 139.000	3,19 3,15
#27	5,94	< 20	44.400 45.000	129.900 129.700	2,93 2,88
#28	4,69	45	47.500 46.400	141.600 141.300	2,98 3,05
#33	5,51	43	48.100 49.100	142.200 141.400	2,96 2,88
#24	2,69	< 20	45.700 45.500	143.100 143.600	3,13 3,16
#38	5,31	29	50.100 51.400	144.700 144.300	2,89 2,81
#41	5,97	< 20	48.700 50.000	143.100 143.000	2,94 2,86

## 2.5 Zusammenfassung und Ausblick (WACKER)

In den bei WACKER im Rahmen des Verbundprojekts SynBioTech durchgeführten orientierenden Studien zur Reinigung von Carbonsäuren (WP2.2.6) wurde technisches *Know-how* zur Elektrodialyse als Grundoperation für zukünftige Reinigungsprozesse aufgebaut.

Die Ergebnisse der Arbeiten zur Etablierung chemischer Folgenutzungen (WP2.2.7) für die Carbonsäuren aus dem Ethylmalonat-CoA-Stoffwechselweg (EMCP) führten zur Fokussierung weiterer Entwicklungsarbeiten auf Crotonsäure.

Eine Folge von Prozessschritten zur Aufreinigung von Crotonsäure aus *M.extorquens*-Kulturbrühen wurde demonstriert; das gereinigte Material war für die Herstellung von VINNAPAS® C-Co-Polymeren geeignet (WP4.2.6 & WP 4.2.7). Auf dieser Basis kann bei Verfügbarkeit von *M.extorquens*-Varianten zur methylotrophen Herstellung von Carbonsäuren in hoher Ausbeute mit voraussichtlich geringem Aufwand ein skalierbarer Reinigungsprozess entwickelt werden.

Der Großteil der von WACKER im Verbundprojekt SynBioTech geltend gemachten Kosten war durch den Personalaufwand für das bearbeitende wissenschaftlich-technische Personal

bedingt. Wegen des gegenüber der Planung erhöhten analytischen Aufwands für die Bearbeitung des Projektes wurde eine Umwidmung von Mitteln auf innerbetriebliche Leistungen beantragt und genehmigt; auch die Kosten für innerbetriebliche Leistungen beziehen sich überwiegend auf den Aufwand für das wissenschaftlich-technische Personal.

Die laut dem Projektplan von WACKER zu bearbeitenden Arbeitspakete waren abhängig vom Ergebnis der Arbeiten bei den Projektpartnern; dies betrifft insbesondere die Aufarbeitung und von Carbonsäuren aus *M.extorquens*-Kulturüberständen. Für das Arbeitspaket WP2.2.6 (Orientierende Studien) ergaben sich aus Verschiebungen im Gesamtprojekt Verzögerungen und eine Verteilung der Arbeiten über den gesamten verlängerten Förderzeitraum; das Arbeitspaket WP4.2.6 (Prozessentwicklung zur Aufreinigung von Carbonsäuren), für das eine signifikanter Anteil des von WACKER beantragten Förderumfangs vorgesehen war, konnte mangels Ausgangsmaterial nicht durchgeführt werden; die entsprechenden Mittel wurden nicht abgerufen. Die Arbeiten der anderen Arbeitspakete wurden im Rahmen des vorgesehenen Aufwands und mit Erfolg durchgeführt.

Wesentliche Fortschritte bei anderen Stellen auf dem Gebiet der von WACKER bearbeiteten Fragestellungen im Verbundprojekt SynBioTech über den Förderzeitraum sind nicht bekannt.

Eine unabhängige Veröffentlichung der von WACKER erzielten Ergebnisse ist nicht vorgesehen.

Teile der von WACKER erzielten Ergebnisse bilden die Basis für Prozessannahmen, die in einer von der Proxadis-Hochschule durchgeführten *Life-Cycle-Analysis* berücksichtigt wurden (Taherkhani *et al.* (2024) „Ecologic and economic evaluation of combined methanol synthesis from CO<sub>2</sub> and biotechnological upgrading to value products: part 1 environmental impact“, *in Vorb.*)

### 3 Literatur

- [1] Bailly (2002), „Production of organic acids by bipolar electro dialysis: realization & perspectives“, *Desalination* 144, 157-162.
- [2] Świtała-Żeliazkowi, M. (1999), „Radical copolymerization of fumaric acid with styrene in DMF solution“, *Eur. Polymer J.*, 35 (9), 1591–1597.
- [3] Świtała-Żeliazkowi, M. (2006), „Thermal degradation of copolymers of styrene with dicarboxylic acids – II: [...]“, *Polymer Degrad. Stab.* 91 (6), 1233–1239.
- [4] Ishihara, R. *et al.* (2020), „Recent Progress in Charged Polymer Chains Grafted by Radiation-Induced Graft Polymerization; Adsorption of Proteins and Immobilization of Inorganic Precipitates“, *QuBS* 4 (2), 20.
- [5] Berzin, F. *et al.* (2013), „Grafting of maleic anhydride on polypropylene by reactive extrusion: effect of maleic anhydride and peroxide concentrations“, *J. Polymer Eng.* 33 (8), 673–682.