

## **„Zellfreie Enzymkaskade im Mikrofluidsystem für die optimierte biotechnologische Produktion von chemischen Grundbausteinen aus Reststoffen“**

Projektlaufzeit: 01.01.2012 – 31.12.2015

Projektpartner:

- [KIT CN: IMVT](#) (Prof. R. Dittmeyer, Dipl.-Chem. M. Kraut)
- [KIT CN: IFG](#) (Prof. U. Obst, Dr. G. Brenner-Weiß)
- [KIT CS: IBLT 4](#) (Prof. J. Hubbuch)

Förderung:

Portfolio-Prozess BioÖkonomie ("[Sustainable BioEconomy](#)") der Helmholtzgemeinschaft Deutscher Forschungszentren (HGF)

Nachwachsende Rohstoffe und Reststoffe bilden mittlerweile ein bedeutendes Reservoir für die Produktion von vielfältigen chemischen Grundbausteinen, die ihrerseits als Ausgangssubstanzen in unterschiedlichsten Bereichen (Energie, Nahrungsmittel, Gesundheit, Chemie usw.) Anwendung finden.

Hierbei hat sich in den letzten Jahren besonders die Biotechnologie zur Herstellung solcher Substanzen bewährt, wobei in der Regel fermentative Prozesse nach wie vor die Grundlage in der Biotechnologie bilden.

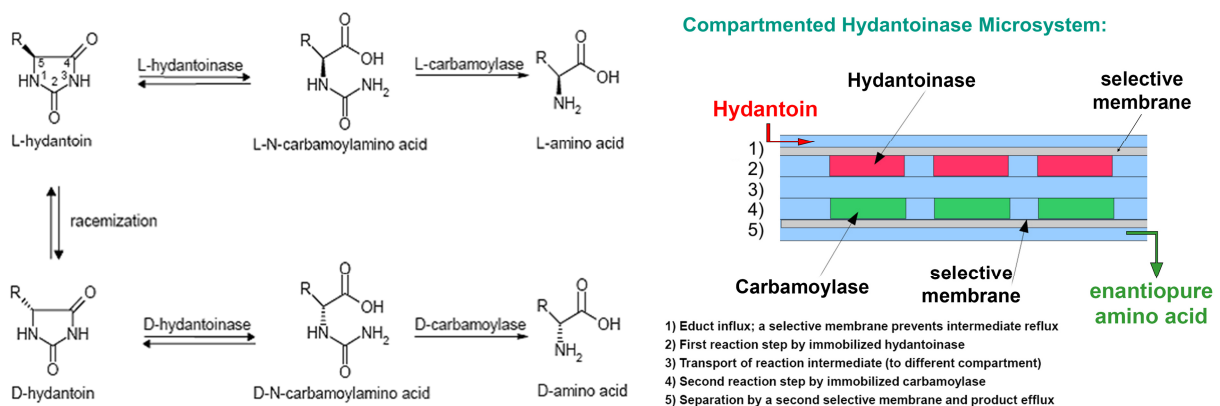
Trotz bedeutender Fortschritte in Bereichen wie z.B. der Prozessführung oder Stammentwicklung unterliegen alle biotechnologischen Verfahren gewissen Einschränkungen, die in erster Linie auf der Integrität des verwendeten Organismus und der gewünschten Funktionalität des Produktes beruhen. Durch die Übertragung zellulärer Stoffwechselschritte aus dem Inneren der Zelle in die freie Lösung können diese Einschränkungen jedoch überwunden werden. Weitere grundlegende Vorteile zellfreier Systeme sind die Erzeugung weniger Nebenprodukte oder der geringere Energieverbrauch, da der zusätzliche Energieaufwand für den Stoffwechsel der gesamten Zelle entfällt.

So ist es denkbar, entsprechende Enzyme einer ganzen Reaktionskaskade eines Stoffwechselweges *in vitro* zusammenzuführen, um die kontinuierliche Synthese eines entsprechenden Produktes zu ermöglichen. Obwohl stetig Fortschritte im Bereich „molecular engineering“ erzielt werden, sind nur wenige großtechnisch nutzbare zellfreie Prozesse bekannt, die mehr als drei Stoffwechselschritte beinhalten. Darüber hinaus gibt es Forschungsansätze *in vitro* ganze Vesikel und Zellkompartimente wie z.B. Chloroplasten oder Membranproteine technisch zu nutzen.

Die Mikrotechnik gewinnt in der Biotechnologie eine immer wichtigere Rolle. Aufgrund vielfältiger Vorteile, z.B. Nutzung sehr geringer Reagenzvolumina, hohe Dosiergenauigkeit, Verringerung der Reagenzzeiten, Automatisierung und neue analytische Methoden werden zunehmend mikrofluidische Systeme eingesetzt.

Ziel des vorliegenden Projektes ist daher die Entwicklung eines mikrofluidischen Systems, das metabolische Enzymkaskaden einer Zelle in intrazellulären Kompartimenten steuerbar und effektiv nachbildet, um chemische Grundbausteine aus Reststoffen zellfrei biotechnologisch herzustellen. Weiterhin soll eine neue Screeningplattform für die Charakterisierung von Enzymvarianten basierend auf der zellfreien Synthese von Enzymen im 96 well-Maßstab entwickelt werden.

Als Modellprozess soll zunächst eine zellfreie Enzymkaskade zur Synthese nicht-kanonischer Aminosäuren aus unterschiedlich substituierten Hydantoinderivaten entwickelt werden:



### Modellreaktion und Modellsystem

Hierzu sollen die Hydantoine unter Einsatz zweier stereoselektiver Amidohydrolasen umgesetzt werden. Durch eine Racemase wird das umzusetzende Enantiomer des Edukts kontinuierlich nachgeliefert, so dass Ausbeuten bis zu 100% möglich sind. Hydantoinderivate können ihrerseits über eine relativ einfache chemische Synthese aus kostengünstigen Vorstufen ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen (Lignin-Monomere) und Reststoffen (u.a. Harnstoff) erzeugt werden.