

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

HBC.
HOCHSCHULE
BIBERACH
UNIVERSITY
OF APPLIED SCIENCES

Zuwendungsempfänger Hochschule Biberach

Titel der Förderung
Carotinoid-Pathway
Design: ein synthetische
Biologie Ansatz mit
Rhodospirillum rubrum
als Produktionswirt
(RhoCrt)' - Teilprojekt B

Verantwortlicher Autor
Hartmut Grammel

Förderkennzeichen
031B0835B

**„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit
Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung
unter dem Förderkennzeichen 031B0835B gefördert. Die
Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt
beim Autor.“**

Schlussbericht zu Nr. 8.1 NKBF 98

Maßgeschneiderte Inhaltsstoffe 2 - Verbundvorhaben:

Carotinoid-Pathway Design: ein synthetische Biologie Ansatz mit *Rhodospirillum rubrum* als Produktionswirt (RhoCrt)' - Teilprojekt B

ZE: Hochschule Biberach (Projektleiter Prof. Hartmut Grammel)	Förderkennzeichen: 031B0835B
---	-------------------------------------

Vorhabenbezeichnung:

Carotinoid-Pathway Design: ein synthetische Biologie Ansatz mit *Rhodospirillum rubrum* als Produktionswirt (RhoCrt) - Teilprojekt B

Laufzeit des Vorhabens:

01.02.2020 - 31.01.2023

Verantwortlicher Autor/Ansprechpartner

Prof. Dr. H. Grammel
Hochschule Biberach
University of Applied Science
Hubertus-Liebrecht-Str. 35
88400 Biberach
Tel.:(49) 07351/582-436
Email: grammel@hochschule-bc.de

HBC.
HOCHSCHULE
BIBERACH
UNIVERSITY
OF APPLIED SCIENCES

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Inhalt

I. Kurze Darstellung.....	3
I.1. Aufgabenstellung.....	3
I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	3
I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens	4
I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	5
I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	6
II. Eingehende Darstellung	7
II.1.Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele	7
II.1.1. Wachstumsversuche und spektroskopische Analyse	8
II.1.2. Bioreaktorkultivierungen von <i>R. rubrum</i> SLYC18 mit M2SF-Medium	10
II.1.3. Fed-Batch-Bioreaktorkultivierung mit M2SF Medium	11
II.1.4. Arbeiten mit Reststoffen aus der Agrar-/Lebensmittelindustrie (Frucht- und Molkereiabfälle).....	15
II.1.5. Kultivierungen mit TPS im Bioreaktor.....	20
II.1.6. Gegenüberstellung des erzielten Ergebnisses mit den vorgegebenen Zielen	22
II.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.....	23
II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	24
II.4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans.....	24
II.5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	26
II.6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse.....	27
References	27

I. Kurze Darstellung

I.1. Aufgabenstellung

Die Zielsetzung der Arbeitspakete des Teilprojekts B an der Hochschule Biberach (HBC) lag in der Entwicklung und Optimierung eines biotechnologischen Prozesses zur Produktion von Carotinoiden aus organischen Reststoffen mithilfe des photosynthetischen Bakteriums *Rhodospirillum rubrum*. Dabei wird insbesondere ein; von den Projektleitern entwickeltes Kultivierungsverfahren eingesetzt, welches die maximale Expression photosynthetischer Gene unter semiaeroben Bedingungen im Dunkeln erlaubt. Der als „Dunkel-Photosynthese“ bezeichnete Effekt eröffnet einen neuartigen Zugang zum Potenzial photosynthetischer Bakterien völlig unabhängig von Licht; in herkömmlichen Bioreaktoren im industriellen Maßstab.

Die Arbeitspakete im Teilprojekt an der HBC, betrafen in erster Linie die Bioprozessentwicklung und Optimierung. Es sollten geeignete Fed-Batch-Strategien entwickelt werden um Carotinoide in Hochzelldichte-Kulturen zu produzieren. Hierfür kamen genetisch designete *R. rubrum*-Stämme aus dem Teilprojekt A (Universität Stuttgart) zum Einsatz, die anstelle des natürlichen Carotinoids Spirilloxanthin durch Abänderung des Biosynthesewegs, industriell relevante Carotinoide, wie Lycopin oder β -Carotin produzieren. Im Bewilligungszeitraum wurden zwei rekombinanten Stämme vom Projektkoordinator Robin Ghosh, Universität Stuttgart, bezogen und im Teilprojekt B bearbeitet.

Schließlich bestand eine Hauptaufgabe des Teilprojekts darin, die entwickelten Konzepte auf reale biogene Reststoffe aus der Agrar- /Lebensmittelindustrie zu adaptieren, um das Verfahren im Sinne einer nachhaltigen Bioökonomie anwendbar zu machen.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Projekt wurde als Verbundvorhaben mit zwei Partnern (Universität Stuttgart und HBC) durchgeführt. Die Projektkoordination lag beim Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme (IBBS), Universität Stuttgart (Prof. Robin Ghosh).

An der HBC war das Projekt am Institut für Angewandte Biotechnologie (IAB) angesiedelt. Das IAB bietet die Möglichkeit der biotechnologischen Forschung im Rahmen von öffentlich geförderten Projekten und Auftragsforschungsprojekten. Dies geschieht in Zusammenarbeit sowohl mit der Industrie als auch mit nationalen und internationalen Hochschulen. Darüber hinaus werden Forschungsprojekte für Studien-, Bachelor- & Masterarbeiten angeboten.

Für die experimentellen Arbeitspakete stand am IAB der HBC eine Laborinfrastruktur zur Verfügung, wobei vor allem die Nutzung eines vollautomatisierten 10 Liter Bioreaktors Biostat Cplus (Sartorius) relevant war. Die Prozesssteuerung/-regelung erfolgte über Programmierung des Prozessleitsystems BioPAT® MFCS/win 3.0 (Sartorius)

Geplant war ursprünglich, die experimentellen Arbeiten an ein neues Gebäude, das Innovations und Transferzentrum ITZPlus, zu transferieren. Dieser Schritt konnte nicht innerhalb der

Projektlaufzeit vollzogen werden, da sich die Inbetriebnahme des Gebäudes bis in den Sommer 2024 verzögert.

Bearbeitet wurden die Arbeitspakete von einem PostDoc, zwei wissenschaftlichen Mitarbeitern/innen und einem technischen Assistenten. Im Verlauf des Projekts kam es zu mehreren Personalwechseln.

Die Bearbeitung des Projekts war in den Jahren 2020 und 2021 stark durch das Auftreten der Corona-Virus Pandemie eingeschränkt.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Personell wurden die Arbeitspakete vorwiegend durch wissenschaftliche Mitarbeiter/innen (ein PostDoc, zwei wissenschaftliche Mitarbeiter/innen) verantwortlich bearbeitet. Zur Unterstützung war außerdem ein technischer Mitarbeiter beschäftigt. Das Personal war auch für die Betreuung von studentischen Projekt- und Abschlussarbeiten im Projekt verantwortlich.

Während der Laufzeit kam es zu mehreren Personalwechseln, durch Abwanderung eines wissenschaftlichen Mitarbeiters in die Industrie und zu längeren Ausfallzeiten, durch Krankheit des technischen Mitarbeiters.

Eine wesentliche Prägung erhielt die Bearbeitung des Projekts durch die während der Projektlaufzeit im Frühjahr 2020 aufgetretene Covid19-Pandemie. Von der Ausbreitung des Coronavirus SARS-CoV-2 und dem allgemeinen Lockdown, waren auch die Arbeiten an der HBC betroffen. Teilweise mussten alle Beschäftigten im Home Office arbeiten und es konnten keine Laborexperimente durchgeführt werden. Anschließend war der Laborzugang eingeschränkt, z.B. durch Vorgaben zur max. Personenzahl im Labor.

Die geplanten Dienstreisen zum Projektpartner, fielen teilweise ebenfalls aus und wurden durch online MS Teams-Meeting ersetzt. Dasselbe gilt für die Teilnahme an Konferenzen. Es wurden deshalb weniger Reisemittel als veranschlagt, ausgegeben.

Zu weiteren Verzögerungen kam es durch ein defektes Kommunikationsmodul in der digitalen Steuereinheit des Bioreaktor Biostat Cplus im Oktober 2021, wodurch dieser Reaktor nicht mehr einsetzbar war. Die Beschaffung der benötigten Ersatzteile und die Reparatur durch Sartorius verzögerte sich durch allgemeine Schwierigkeiten in den globalen Lieferketten infolge der die Covid-19 Pandemie. Die Reparatur erfolgte entsprechend erst im Juni 2022 durch einen Techniker von Sartorius.

Der Ausfall konnte teilweise durch Nutzung eines an der HBC vorhandenen 30 L Bioreaktor kompensiert werden. Um den 30 L-Fermenters für die semiaerobe Prozessführungstrategie einsetzbar zu machen, musste zunächst das Prozessleitsystem BioPAT® MFCS/win 3.0 am Bioreaktor implementiert und die notwendigen Programme und Software-Rezepte vom 10 L-Fermenter übertragen werden.

Der Ausfallzeit der Laborgeräte Bioreaktor Biostat Cplus (Sartorius) wurde für Wachstumsversuche mit biogenen Reststoffen in Schüttelkolben genutzt.

Trotz der Schwierigkeiten wurden die wesentlichen Meilensteine des Projekts erreicht.

Die Arbeiten beschränkten sich auf die *R. rubrum*-Stämme *R. rubrum* S1 (Wildtyp), *R. rubrum* SLYC18 (Lycopin-Produzent (1)) und *R. rubrum* SWGK46 (β-Carotin-Produzent).

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das fakultativ photosynthetische Purpurbakterium *Rhodospirillum rubrum* ist ein natürlicher Carotinoid-Produzent und lagert unter anaeroben phototrophen Bedingungen das Carotinoid Spirilloxanthin als lichtabsorbierendes Pigment in die photosynthetischen Komplexe aus Reaktionszentren und Lichsammelzentren ein. Das Potenzial photosynthetischer Purpurbakterien für biotechnologische Anwendungen ist seit langem erkannt, jedoch bislang kaum in die industrielle Praxis umgesetzt. Durch das Verfahren der „Dunkel-Photosynthese“ lässt sich die Hauptschwierigkeit in der großtechnischen Gewinnung photosynthetischer Produkte, wie Carotinoiden, umgehen, da die Notwendigkeit der Versorgung mit Licht zur Erzeugung des photosynthetischen Zelltyps entfällt.

Für die großtechnische Anwendung photosynthetischer Purpurbakterien besteht die die Hauptschwierigkeit in der Notwendigkeit, die Kulturen ausreichend mit Licht zu versorgen. Dadurch wird die Skalierung in industrielle Maßstäbe und das Erreichen hoher Zelldichten technisch extrem aufwändig bzw. überhaupt unmöglich. Einen neuen Zugang zum vollen Potenzial photosynthetischer Bakterien, bietet dagegen die Entwicklung eines Kultivierungsverfahrens welches unter Verwendung des M2SF-Nährmediums und unter semiaeroben Bedingungen, die volle Expression photosynthetischer Gene, auch völlig unabhängig von Licht, maximal induziert (2, 3). Dadurch wird die Gewinnung photosynthetischer Produkte wie Pigmente (Carotinoide u.a.), Biowasserstoff, Biopolymere, Vitamine (B12), Coenzyme (Q10), u.a., in herkömmlichen Bioreaktoren in industriellen Maßstäben ermöglicht. Der in RhoCrt bearbeitete Prozess der „Dunkel-Photosynthese“ wird auch im aktuellen Bericht des Deutschen Biomasseforschungszentrums „Wasserstoff aus Biomasse“ von 2022 beschrieben (4).

Das M2SF-Nährmedium enthält als Besonderheit, zwei Kohlenstoffquellen, - Succinat und Fructose - wobei Succinat nur aerob verstoffwechselt werden kann, während die Verwertung von Fructose auch unter anaeroben Bedingungen durch Gärung, möglich ist.

Was mit dem Begriff „Dunkel-Photosynthese“ gemeint ist, wird in Abb. 1 verdeutlicht. Fakultativ photosynthetische Purpurbakterien, wie *R. rubrum*, gehören zu den stoffwechselseitig flexibelsten Lebensformen überhaupt. Während anaerob im Licht eine photosynthetische Lebensweise durch Ausbildung photosynthetischer Membranen mit lichtabsorbierenden Pigment-Protein-Komplexen (Reaktionszentren, Lichsammelkomplexe) erfolgt, unterbleibt die Ausbildung dieser Komplexe in Anwesenheit von Sauerstoff und die Zellen wachsen im Dunkeln unpigmentiert durch Atmungsstoffwechsel.

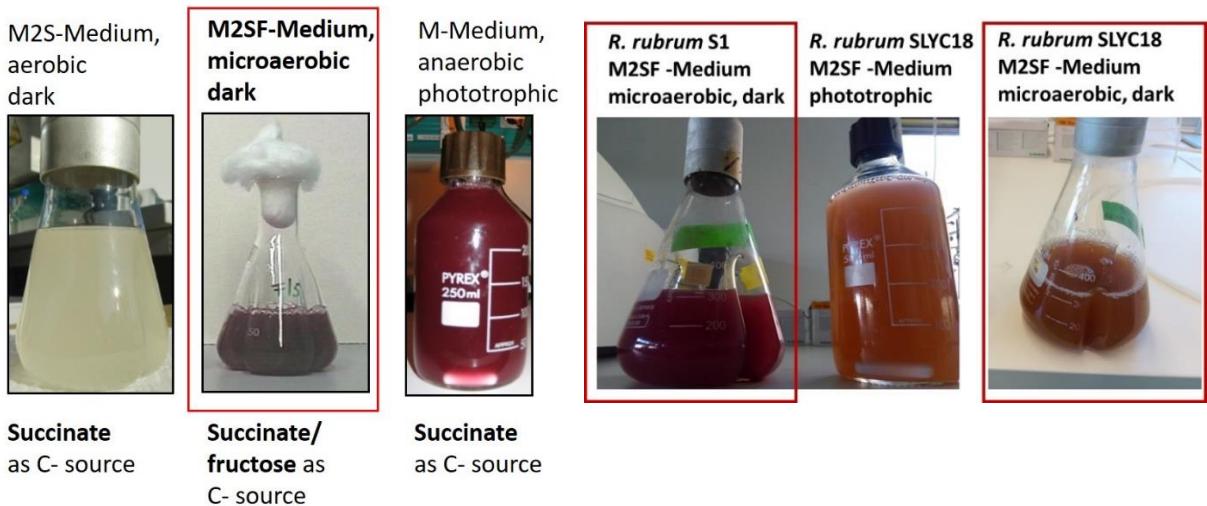


Abb. 1: Kulturen von *R. rubrum* unter aeroben, semiaeroben (*microaerobic*) und phototrophen Bedingungen. Der „Dunkel-Photosynthese-Effekt“ unter semiaeroben (*microaerobic*) Bedingungen in M2SF-Medium ist rot umrahmt.

In Abb. 1, links dargestellt ist eine im Dunkeln gezüchtete Kultur des Bakteriums (aerob, mit Sauerstoff und Atmung). Die Expression der photosynthetischen Gene, die zur Ausbildung der photosynthetischen Membranen führen, wird durch Sauerstoff unterdrückt, und es kommt zu keiner Rotfärbung. Die mit *phototrophic* überschriebenen Kulturen wurden photosynthetisch unter Kunstlicht kultiviert und zeigen durch die Rotfärbung den photosynthetischen Zelltyp mit intracytoplasmatischen photosynthetischen Membranen an. Der genetisch designete Lycopinproduzierende Stamm *R. rubrum* SLYC18 zeigt ebenfalls, in gleicher Weise wie der Wildtyp *R. rubrum* S1, den „Dunkel-Photosynthese“-Effekt bei semiaeroben Kultivierung mit M2SF-Medium (1) (Abb. 1). Bereits an der visuellen Erscheinung von *R. rubrum* SLYC18 ist zu erkennen, dass das Pigmentspektrum gegenüber dem Wildtyp verändert ist, und statt der purpurroten Färbung durch Spirilloxanthin, ein orangener Farbton, hervorgerufen durch Lycopin, auftritt.

Die in RhoCrt durchgeführte Fed-Batch-Kultivierung von rekombinanten *R. rubrum* Stämmen für die Produktion von Carotinoiden ist bislang nicht beschrieben. Eine weitere Entwicklung von RhoCrt bestand in der Adaptation des Kultivierungsverfahrens an Reststoffe aus der Agrar-/Lebensmittelindustrie als Wachstumssubstrate.

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Während des Projekts wurden Kontakte zu den Firmen Dairyfood GmbH, Riedlingen und RP Agroscience GmbH, Neustadt, geknüpft, über die biogene Reststoffe aus der Milch-/Molke-Industrie und aus der Weinherstellung bezogen werden konnten. Es kam zu mehreren Dienstreisen bzw. Aufenthalten der Projektmitarbeiter/innen bei diesen Firmen zur Beschaffung und vor-Ort-Prozessierung der biogenen Reststoffe.

Die Reststoffe wurden unentgeltlich durch die Firmen zur Verfügung gestellt (ca. 20 L / Charge). Von Dairyfood GmbH wurde ein Milch-/Molkepermeat als Reststoff bezogen, RLP AgroScience GmbH stellte einen Tresterpresssaft aus der Weinherstellung zur Verfügung.

II. Eingehende Darstellung

II.1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Ein Schwerpunkt der Arbeiten im Teilprojekt B an der HBC lag in der Entwicklung von Fed-Batch-Prozessen und in der Verwertung von organischen Reststoffen für die Produktion von Carotenoiden mithilfe des photosynthetischen Bakteriums *Rhodospirillum rubrum*. Die Kultivierung sollte hierbei semiaerob im Dunkeln unter Nutzung des „Dunkel-Photosynthese“-Effekts erfolgen. Der Begriff bezeichnet das Phänomen, dass bei Verwendung von M2SF-Nährmedium, in *R. rubrum* unter semiaeroben Bedingungen, die maximale Expression intracytoplasmatischer photosynthetischer Membranen und anderer photosynthetischer Gene erfolgt, die ansonsten nur durch phototrophe Kultivierung mit Licht beobachtet wird (1, 2, 3). Der Effekt beruht auf der Verstoffwechselung, der zwei in M2SF-Medium vorhandenen Kohlenstoffquellen, Succinat und Fructose, wodurch zelluläre Redoxsignale in derselben Weise beeinflusst werden, wie bei der Lichtregulation der photosynthetischen Genexpression (3). Das Kultivierungsverfahren bietet somit eine Möglichkeit, den vollen photosynthetischen Phänotyp der Zellen auch im Dunkel auszulösen und dadurch die großtechnische Herstellung photosynthetischer Produkte, wie z.B. Carotenoid-Pigmente, ohne die technisch komplizierte und ineffiziente Versorgung mit Licht, zu ermöglichen.

Zielsetzung des Teilprojekts war 1. die Entwicklung von Fed-Batch-Strategien zur Hochzelldichtekultivierung um die Produktausbeute zu steigern und 2. den Prozess von dem relativ teuren M2SF-Medium an reale Reststoffe aus der Agrar-/Lebensmittelindustrie zu adaptieren und damit ökologisch nachhaltig und ökonomisch wettbewerbsfähig zu machen.

Außer dem Wildtyp *R. rubrum* S1, wurden in dem Projekt zwei genetisch designete Stämme kultiviert, die vom Projektkoordinator Robin Ghosh, Universität Stuttgart, bezogen wurden:

Durch Deletion der Carotinoidbiosynthese-Gene *crtC* und *crtD* wurde der Stamm *R. rubrum* SLYC18 erzeugt, was zur Produktion von Lycopin anstelle des Wildtyp-Carotinoids, Spirilloxanthin, führte (1). Durch Einführen eines weiteren Carotinoid-Biosynthesegens, welches für das Enzym Lycopinyclase codiert, in *R. rubrum* SLYC18, entstand der Stamm *R. rubrum* SWGK46. Lycopinyclase katalysiert die β -Zyklisierung an beiden Enden des Lycopin-Moleküls, wodurch als neues, für *R. rubrum* unphysiologisches Produkt, β -Carotin entsteht. Die chemischen Strukturen sind in Abb. 2 dargestellt.

II.1.1. Wachstumsversuche und spektroskopische Analyse

Zunächst wurden mit den drei bearbeiteten Bakterienstämmen, Wachstumsexperimente in Schüttelkolben und spektroskopische Analysen der Pigmente durchgeführt (Abb. 2, Abb. 3).

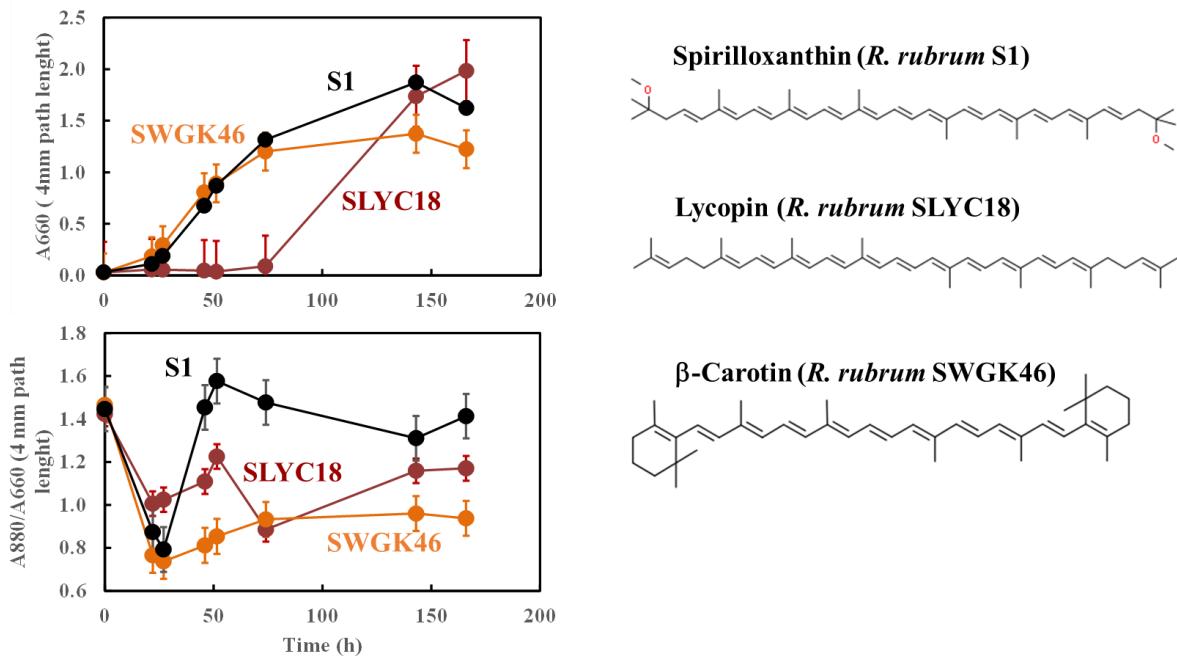


Abb. 2: Wachstum (A_{660}) und Expression photosynthetischer Membranen (A_{880}/A_{660}) von *R. rubrum* S1 (Wildtyp), *R. rubrum* SLYC18 (Lycopin.Produzent) und *R. rubrum* SWGK46 (β -Carotin-Produzent) bei semiaerober Kultivierung mit M2SF-Medium in Schüttelkolben. Die Wachstumsversuche wurden als biologische Triplikate durchgeführt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Kultivierungen zeigten bei *R. rubrum* SLYC18 ein deutlich verzögertes Wachstum mit einer, gegenüber S1 und SWGK46 verlängerten Lag-Phase. Nach Einsetzen des exponentiellen Wachstums waren die Wachstumsraten bei allen drei Stämmen ähnlich. Bei *R. rubrum* SWGK46 wurden allerdings insgesamt geringere Biomasseausbeuten erzielt.

Bei allen drei Stämmen zeigt der Anstieg der A_{880}/A_{660} -Werte im Verlauf der Kultivierungen, dass unter den gewählten Bedingungen, jeweils der semiaerobe Zustand erreicht wurde, bei dem in M2SF-Medium, die Expression photosynthetischer Membranen auch ohne Anwesenheit von Licht, maximal erfolgt („Dunkel-Photosynthese“-Effekt).

Aus den Kultivierungen wurden Absorptionsspektren aufgenommen, um den Carotinoidbereich des Absorptionsspektrums zu vergleichen (Abb. 3). Es wurde sowohl Carotinoid-Extrakte in organischen Lösungsmitteln, als auch Spektren aus lysierten Zellen aufgenommen (Abb. 3).

Die lysierten Zellen enthalten die vollständigen intakten photosynthetischen Membranen bzw. Chromatophoren, und unterscheiden sich spektroskopisch nicht von lebenden Zellen.

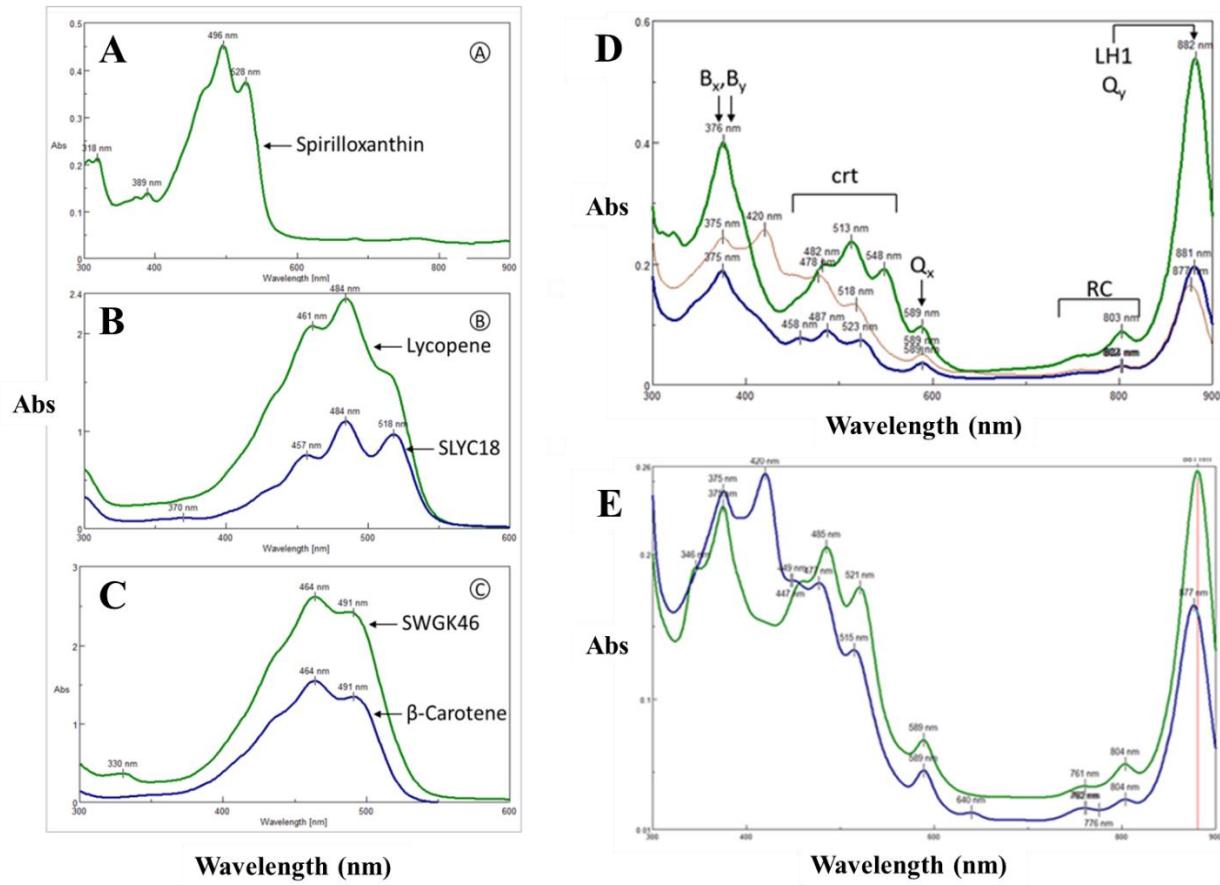


Abb. 3: Absorptionsspektroskopische Untersuchung der *R. rubrum*-Stämme S1 (Wildtyp), SLYC1 und SWGK46. A: Chloroform-Extrakte von *R. rubrum* S1. B: Chloroform Extrakt von *R. rubrum* SLYC18 und Lycopin-Standard. C: Chloroformextrakt von *R. rubrum* SWGK 46 und β -Carotin-Standard. D, E: Zelllysate (Chromatophoren). D: *R. rubrum* S1 (grün), *R. rubrum* SLYC18 (blau), *R. rubrum* SWGK45 (rot). E: *R. rubrum* SWGK46 semiaerob (blau), *R. rubrum* SWGK46 anaerob phototroph (grün).

Die spektroskopische Analyse bestätigte das veränderte Carotinoidspektrum in den genetisch modifizierten Stämmen gegenüber dem Wildtyp. Nach Extraktion zeigte *R. rubrum* SLYC18 ein identisches Absorptionsspektrum zu Lycopin, das Spektrum von SWGK46 ist identisch zu β -Carotin. Bei *R. rubrum* SWGK46 zeigten sich unterschiedliche Absorptionspektren unter semiaeroben und phototrophen Bedingungen (Abb. 3E). Demnach führt die anaerobe phototrophe Inkubation zu einer Veränderung im Carotenoidpektrum in diesem Stamm. Die genetische Instabilität wurde bereits beim Projektkoordinator an der Universität Stuttgart beobachtet und ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Aufgrund der Instabilität von *R. rubrum* SWGK46 wurde die weitere Bioprozessentwicklung mit *R. rubrum* SLYC18 und Lycopin als Produkt durchgeführt.

II.1.2. Bioreaktorkultivierungen von *R. rubrum* SLYC18 mit M2SF-Medium

Die Bioreaktorkultivierungen (Fermentationen) wurden in Sartorius Biostat Cplus-Bioreaktoren in 12 L oder 30 L Gesamtvolumen durchgeführt. Es ist zu erwähnen, dass für die Sauerstoffregelung (pO_2 -Regelung) eine optische pO_2 -Sonde (Hamilton, VisiFerm DO 120) verwendet wurde. Optische pO_2 -Elektroden beruhen auf dem Prinzip der Fluoreszenzlösung durch Sauerstoffmoleküle und sind im niedrigen Messbereich, der für die semiaeroben Bedingungen relevant ist, wesentlich genauer als herkömmliche amperometrische pO_2 -Elektroden. Für die pO_2 -Regelung wurden als Stellgrößen, die Rührerdrehzahl und die Begasungsrate mit Druckluft verwendet. D

Abb. 4 zeigt den Verlauf einer Batch-Fermentation im 10 L Bioreaktor.

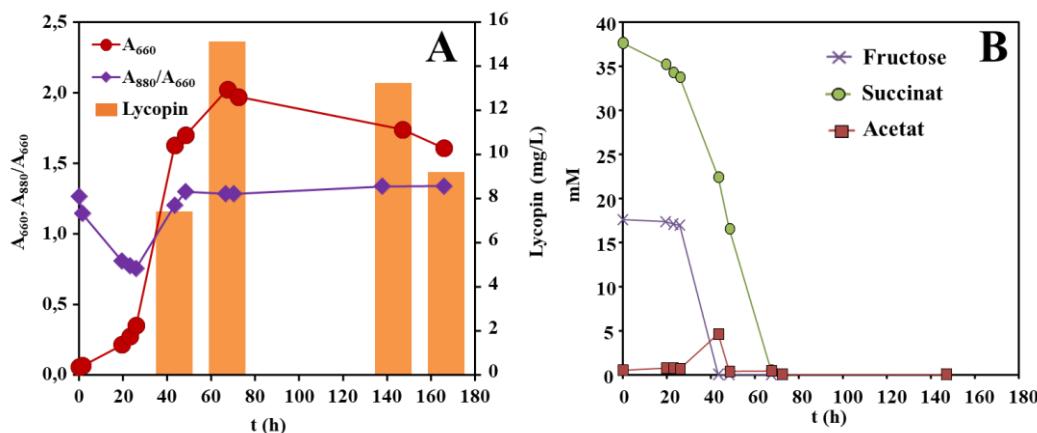


Abb. 4: Batch-Fermentation von *R. rubrum* SLYC18 im 10 L Bioreaktor mit M2SF-Medium. Wachstum (A_{660}) und Expression photosynthetischer Membranen (A_{880}/A_{660}), B: HPLC-Analyse des Kulturiüberstands.

Der Gehalt an photosynthetischer Membran pro Zelle ist in Abb. 4A durch den A_{880}/A_{660} -Wert dargestellt und zeigt, dass der semiaerobe Zustand nach ca. 25 h erreicht wurde, da ab hier der A_{880}/A_{660} -Wert ansteigt. Der Lycopin-Gehalt wurde zu vier Zeitpunkten gemessen. Die höchste Lycopinkonzentration von 15,12 mg/L Kultur wurde zum Ende der Wachstumsphase erreicht. Die Lycopinkonzentrationen aus der Batch-Fermentation entsprechen damit den bereits früher im Schüttelkolben mit M2SF-Medium erhaltenen Werten (1).

Der Verlauf der Substrate Succinat und Fructose, zeigte einen typischen Diauxie-Verlauf, bei dem unter semiaeroben Bedingungen zunächst Fructose und anschließend Succinat verstoffwechselt wird. Die Verstoffwechselung der Fructose ist mit der Ausscheidung von Acetat verbunden. Das Auftreten von Acetat ist im Sinne eines Overflow-Metabolismus zu interpretieren, da nach Fructose-Verbrauch, das zuvor ausgeschiedene Acetat, wieder aufgenommen wird und als Substrat für eine zweite Wachstumsphase nach ungefähr 48 h dient, mit einer geringeren Wachstumsrate als bei Wachstum auf Succinat/Fructose. Ein entsprechendes Verhalten ist bei vielen Bakterien und Hefen, meistens bei Wachstum mit Glucoseüberschuss, bekannt.

II.1.3. Fed-Batch-Bioreaktorkultivierung mit M2SF Medium

In den Fed-Batch-Fermentationen wurde Fructose als Substrat zugefüttert.

Die Berechnung der Feedrate (ml h^{-1}) für exponentielles Fed-Batch in Abhängigkeit der Zelltrockenmasse ($\text{cdw (g L}^{-1}\text{)}$), der Fructoseaufnahmerate (q_{Fru} (mmol $\text{g}^{\text{CDW-1}} \text{L}^{-1}$)), der Konzentration der Feedlösung (C_{Feed} (g L^{-1})) und der Molekulmasse Fructose (M_{Fru} (g mol^{-1})):

$$F_{\text{feed}} = \frac{(cdw \times e^{\mu t}) \times q_{Fru}}{c_{\text{Feed}} \times M_{\text{Fru}}}$$

Eine Fed-Batch-Fermentation im 30 L Bioreaktor mit Fructose-Feed ist in Abb. 5 gezeigt.

Die Fermentation trägt die Bezeichnung Fed-Batch-F.

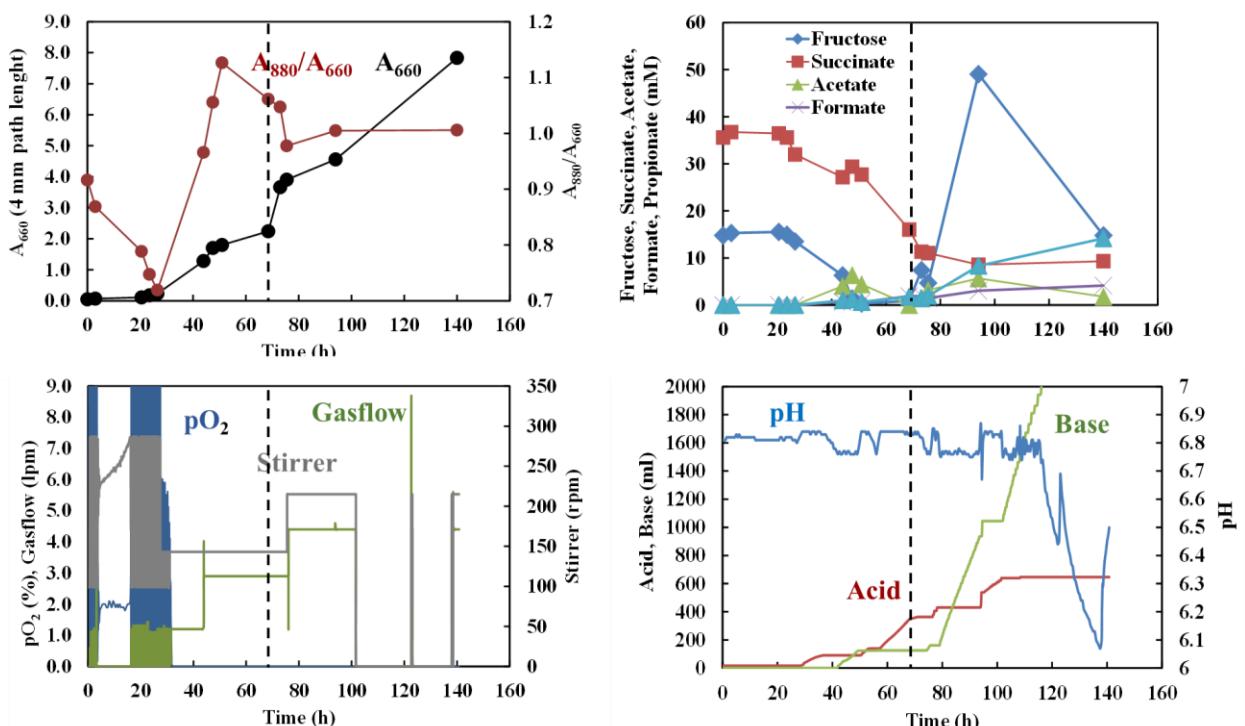


Abb. 5: Fed-Batch-Fermentation von *R. rubrum* SLYC18 im 30 L Bioreaktor mit Fructose-Feed. Der Beginn der Fed-Batch-Phase ist durch die gestrichelte Linie angezeigt. Oben links: Wachstum (A_{660}) und Expression photosynthetischer Membranen (A_{880}/A_{660}), Oben rechts: HPLC-Analyse des Kulturüberstands. Unten links: Online-Daten der pO_2 -Regelung. Unten rechts: Online-Daten der pH-Regelung. *Acid* und *Base* geben die Volumina zudosierter Säure (1 M H_2SO_4) und Base (1 M KOH) an.

Der semiaerobe Zustand wurde durch die Stellgrößen Rührerdrehzahl und die Begasungsrate mit Druckluft geregelt. Wie in Abb. 5 dargestellt, wurde nach Beginn der semiaeroben Phase, trotz Erhöhung der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate mit Druckluft, der Gelöstsauerstoff auf einem pO_2 -Wert von 0 % Luftsättigung gehalten. Der eingebrachte Sauerstoff wurde komplett veratmet. Der Anstieg des A_{880}/A_{660} -Quotienten nach 26,5 h, zeigt die Induktion der

semiaeroben Phase und die Expression photosynthetischer Membranen („Dunkel-Photosynthese“-Effekt) an.

Die Fermentation gliederte sich in eine Batch-Phase und eine Fed-Batch-Phase, die nach 68,5 h durch Zufütterung von Fructose startete. Die Zufütterungsrate (ml/h) wurde durch die Parameter der Batch-Phase, spezifische Wachstumsrate $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$ und einer Fructoseaufnahmerate $q_{Fru} = 0,4 \text{ mmol g}_{\text{cdw}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (cdw: *cell dry weight*, Zelltrockenmasse) berechnet. Während der Fed-Batch-Phase ergab sich eine spezifische Wachstumsrate von $0,08 \text{ h}^{-1}$.

Die Zugabe von Säure während der Batch-Phase, ist auf die Aufnahme von Succinat aus dem M2SF-Medium über ein Protonen-Symport-Transportsystem zurückzuführen. Nach Beginn der Fed-Batch-Phase überwiegt die Zugabe von Base, verursacht durch die Bildung von organischen Säuren (Acetat, Formiat, Propionat) durch anaerobe Verstoffwechselung der zugefütterten Fructose. Die starke Akkumulation der Fructose von Stunde 68,5 – 94, führte zu einem Abbruch der Zufütterung und zeigt, dass die gewählten Feed-Parameter nicht der realen physiologischen Situation im Bioreaktor entsprochen haben. Nach dem Stop des Feeds erfolgte die Verwertung der zudosierten Fructose und es kam zu einer weiteren Zunahme der Biomasse und zur Ausscheidung organischer Säuren.

Während der Fed-Batch-Phase ergab sich eine spezifische Wachstumsrate von $0,08 \text{ h}^{-1}$. In der Fed-Batch-Fermentation wurde insgesamt eine Biomassekonzentration (Zelltrockenmasse) von $7,2 \text{ g L}^{-1}$ erreicht.

Nach 140 h war eine starke Abnahme der Wachstumsrate zu verzeichnen und es erfolgte keine weitere Zunahme der Biomasse, obwohl noch ausreichend Fructose als Substrat verfügbar war. Die Überlegung war deshalb, dass bei hohen Zelldichten, Komponenten aus dem M2SF-Medium limitiert sein könnten. In einer weiteren Fed-Batch-Fermentation (Fed-Batch-FVAS) wurde deshalb zusätzlich zu Fructose, noch eine Vitaminlösung mit Vitaminen aus dem M2SF-Medium (5) sowie Ammonium-Succinat $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle zugeführt um eine Stickstofflimitierung zu verhindern.

Der Verlauf der Fermentation Fed-Batch-FVAS ist in Abb. 6 dargestellt.

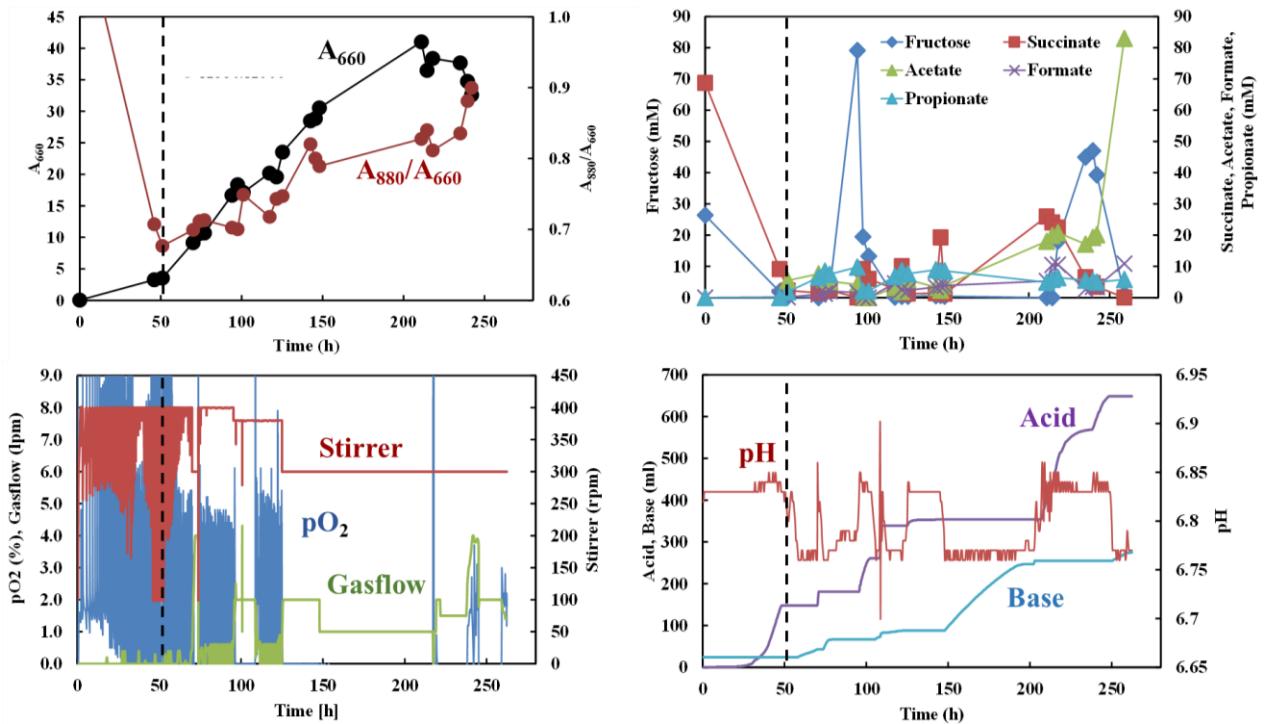


Abb. 6: Fed-Batch-Fermentation von *R. rubrum* SLYC18 im 10 L Bioreaktor mit Fructose-, Vitamin- und Ammonium-Feed (Fed-Batch-FVAS). Der Beginn der Fed-Batch-Phase ist durch die gestrichelte Linie angezeigt. Oben links: Wachstum (A_{660}) und Expression photosynthetischer Membranen (A_{880}/A_{660}). Oben rechts: HPLC-Analyse des Kulturüberstands. Unten links: Online-Daten der pO_2 -Regelung. Unten rechts: Online-Daten der pH-Regelung. Acid und Base geben die Volumina zudosierter Säure (1 M H_2SO_4) und Base (1 M KOH) an.

Während der initialen Batch-Phase nahm die Biomasse (A_{660}) mit einer Wachstumsrate $\mu = 0,093 \text{ h}^{-1}$ und einer Fructoseaufnahmerate $q = 0,4 \text{ mmol g}_{\text{CDW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zu. Der Anstieg der photosynthetischen Membranen (A_{880}/A_{660}) nach 50 h zeigt die semiaerobe Wachstumsphase an. Gleichzeitig wurde die Fed-Batch-Phase gestartet. Nach 211 Stunden wurde die maximale Biomassekonzentration mit einer Zelltrockenmasse von $32,1 \text{ g L}^{-1}$ erreicht.

Damit wurde durch die Supplementierung mit Vitaminen und Ammonium in der Fermentation Fed-Batch-FVAS, eine drastische Steigerung der Biomasse im Vergleich zu der Fermentation Fed-Batch-F aus Abb. 5 erreicht.

Lycopin wurde nach Extraktion mit org. Lösungsmitteln durch HPLC bestimmt. Die HPLC-Analyse erfolgte auf einer C18-Phase mit einem Gemisch aus 70 % Methanol, 25 % Acetonitril, 5 % Tetrahydrofuran als Laufmittel und einem Photodiodenarray-Detector (DAD). Die Chromatogramme und DAD-Spektren der Extrakte aus einer Bioreaktorkultivierung und einem Lycopin-Standard sind in Abb. 7 gegenübergestellt und zeigen völlige Übereinstimmung.

Die gewählte HPLC-DAD Methode erweist sich als geeignet für den qualitativen Nachweis und die quantitative Bestimmung von Lycopin. Es ist hervorzuheben, dass die Extrakte nur einen Carotin-Peak zeigten und keine Nebenprodukte aufwiesen. *R. rubrum* SLYC18 produziert demnach ausschließlich trans-Lycopin als einziges Carotinoid. Anhand der Chromatogramme in Abb. 7, war die Reinheit der Extrakte sogar höher als beim verwendeten Lycopin-Standard (Lycopin analytical standard, Merck, Darmstadt, Purity (HPLC AREA %) $\geq 85.0 \%$).

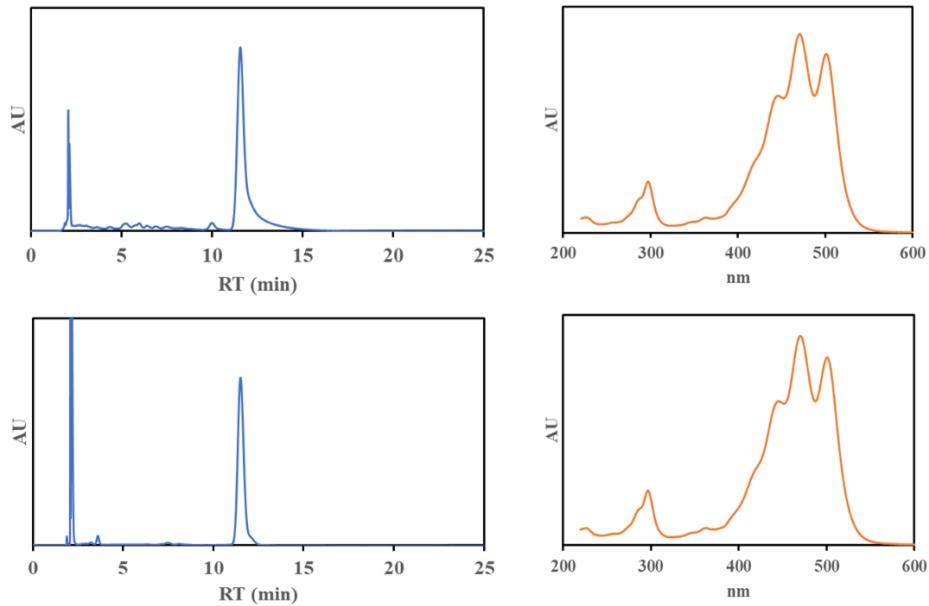


Abb. 7: HPLC-Analyse von Lycopin aus Bioreaktor-Kultivierungen. Oben: Lycopin-Standard, 1 mg/ml in Chloroform. Unten: Extrakt aus Fermentationskultur. Rechts: Chromatographische Auf trennung an C18-Phase. Lycopin eluiert in diesem Trennsystem mit einer Retentionszeit (RT) von 12 min. Rechts: DAD-Absorptionsspektren am Peakmaximum bei 12 min.

Die Lycopin-Konzentrationen zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten in den Fermentationen Fed-Batch-F (Abb. 5) und Fed-Batch-FVAS (Abb. 6) sind in Abb. 8 dargestellt.

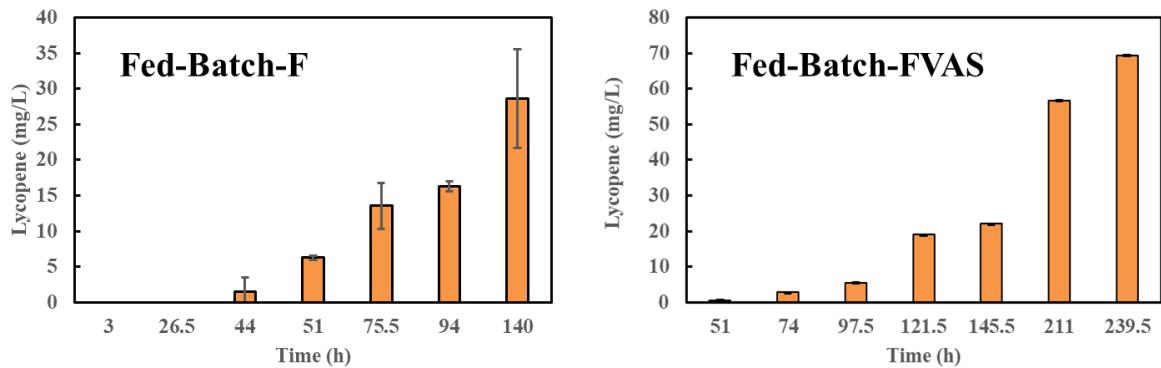


Abb. 8: Lycopin-Konzentrationen der Fermentation Fed-Batch mit Fructose (Fed-Batch-F, Abb. 5) und Fed-Batch mit Fructose, Vitaminlösung und Ammoniumsuccinat (Fed-Batch-FVAS, Abb. 6). Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus drei Messungen an.

Die Lycopinkonzentrationen nahmen parallel mit der Biomasse zu. In Fed-Batch-F betrug die maximale Lycopin-Konzentration $28,6 \text{ mg L}^{-1}$ zum Ende der Wachstumsphase. In Fed-Batch-FVAS wurde mit $69,3 \text{ mg L}^{-1}$ insgesamt mehr als doppelt so viel Lycopin produziert wie in Fed-Batch-F.

Zusätzlich zu Lycopin wurde auch der Gehalt an Polyhydroxyalkanoaten (PHA) untersucht, da PHA ebenfalls mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar ist. PHA stellt als biologisch abbaubares Biopolymer, eine Alternative zu Plastikkunststoffen für viele Anwendungen dar (6) und ist damit als weiteres Produkt aus den *R. rubrum*-Fermentationen interessant.

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse für Biotrockenmasse (CDW), Lycopin und PHA aus den Fermentation Fed-Batch mit Fructose (Fed-Batch-F, Abb. 5) und Fed-Batch mit Fructose, Vitaminlösung und Ammoniumsuccinat (Fed-Batch-FVAS, Abb. 6).

	CDW (g/L)	Lycopin (mg/L)	Lycopin (g/g CDW)	PHA (g/L)	PHB (g/g CDW)
Fed-Batch-F	7,22	28,6	3,97	1,87	0,26
Fed-Batch-FVAS	32,1	69,3	2,16	1,93	0,14

Die absolut erzielten Konzentrationen (g/L) von Lycopin und PHA waren in der Fermentation Fed-Batch-FVAS höher als in der Fermentation Fed-Batch-F, was auf die höhere Biomassekonzentration zurückzuführen ist. Bei den spezifischen Konzentrationen, bezogen auf die Biotrockenmasse (g/gCDW), ergaben sich allerdings die umgekehrten Verhältnisse und die Werte aus Fed-Batch-F lagen über denen aus Fed-Batch-FVAS.

II.1.4. Arbeiten mit Reststoffen aus der Agrar-/Lebensmittelindustrie (Frucht- und Molkereiabfälle)

Eine wesentliche Zielsetzung des Teilprojekts B an der HBC bestand in der Adaptation des Kultivierungsverfahrens an biogene Rest- /Abfallstoffe aus der Agrar- und Lebensmittelindustrie um den Prozess nachhaltiger und effizienter im Sinne einer zirkulären Bioökonomie zu betreiben. Während der Projektlaufzeit von RhoCrt wurden Kontakte zu zwei Unternehmen hergestellt, die entsprechende Abfallstoffe in größeren Mengen zur Verfügung stellen konnten.

Molkereiabfälle wurden durch die Fa. Dairyfood, GmbH, Riedlingen, bezogen. Der Schwerpunkt der Firma liegt in der „Verarbeitung von Molke aus der Alpenregion sowie umliegender Länder zu Molkeneiweiß- und Laktosepulver verschiedenster Zertifizierungen“ (www.dairyfood.de). Während der Verarbeitung fällt als Reststoff ein Milch-/Molkepermeat (MMP) -sogenannte Mutterlauge - in Mengen von 100.000 L pro Tag (!), allein am Standort Riedlingen, an. Die bisherige Verwertung erfolgt in der Tierernährung (Schweinemast) und als Substrat für Biogasanlagen. Der Rest muss über die kommunalen Kläranlagen entsorgt werden.

Das Wachstum von *R. rubrum* auf Molkereiabfällen wurde bereits in einer früheren Arbeit im Zusammenhang mit der Biowasserstoffproduktion beschrieben (7) – allerdings unter phototrophen Bedingungen, während in RhoCrt ein Verfahren unter semiaeroben Bedingungen im Dunkeln angestrebt wird („Dunkel-Photosynthese“). Als C-Quelle wird das in dem Reststoff enthaltene Laktat (Milchsäure) angesehen (7).

Charakterisierung des Reststoff Milch-Molkepermeat (MMP). Im Juni 2021 wurde eine erste

Mutterlaugen-Charge von der Dairyfood GmbH, Riedlingen, bezogen. Die Analyse im Labor der HBC ergab die folgende Zusammensetzung (Tab. 2):

Tabelle 2: Zusammensetzung Milch-Molke-Permeat („Mutterlauge“, MMP) der Fa. Dairyfood GmbH

“Mutterlauge” (MMP)		Unbehandelt
Allgemeine Werte	Leitfähigkeit [mS/cm]	28.3
	Osmolarität (osmol/kg)	2.26
	pH-Wert	5.03
Organische Säuren (mmol/L)	Laktat	366.2
	Acetat	74,1
Mono-/Disaccharide (mmol/L)	Lactose	366.2
	Glucose	23.8
	Galactose	8.7
Anionen (mmol/L)	Fluoride	4.34
	Chloride	14.00
	Bromide	0.14
	Nitrate	0.32
	Phosphate	9.55
	Sulfate	1.81
Kationen (mmol/L)	Natrium	6.90
	Ammonium	0.69
	Kalium	19.16
	Calcium	1.44
	Magnesium	5.31

Für die Verwendung als Substrat für die Kultivierung von *R. rubrum* sind hier insbesondere die Anteile an organischen Säuren Laktat und Acetat interessant. Das Rohmaterial enthielt ca. 32 g/L Laktat. Die ebenfalls in höheren Konzentrationen vorhandenen Kohlenhydrate Lactose, Glucose und Galactose können dagegen von *R. rubrum* nicht verstoffwechselt werden.

Aus der nativen Mutterlauge wurde eine Keimzahl von 13200 ± 2300 KBE bestimmt. Das Material ließ sich ohne Verlust von Nährstoffen durch Autoklavieren sterilisieren und ist dann bei Einlagerung bei 4 °C haltbar (Abb. 9).



Abb. 9: Von links nach rechts: Mutterlauge vor und nach dem Autoklavieren. LB.-Agarplatte mit Ausstrich nativer Mutterlauge nach 48 h Inkubation.

Wachstumsversuche. Zunächst wurde die Befähigung von *R. rubrum* untersucht, reine

Laktose bzw. reines Laktat als alleinige C-Quelle zu verwerten. Hierfür wurde das etablierte M2S-Medium modifiziert indem 40 mM Succinat als C-Quelle durch Laktose bzw. Laktat ersetzt wurden. Die Kultivierungen erfolgten sowohl unter aerob/semiaeroben Dunkelbedingungen als auch anaerob phototroph.

Die Ergebnisse des Wachstums und der Expression photosynthetischer Membranen sind in Abb. 10 dargestellt.

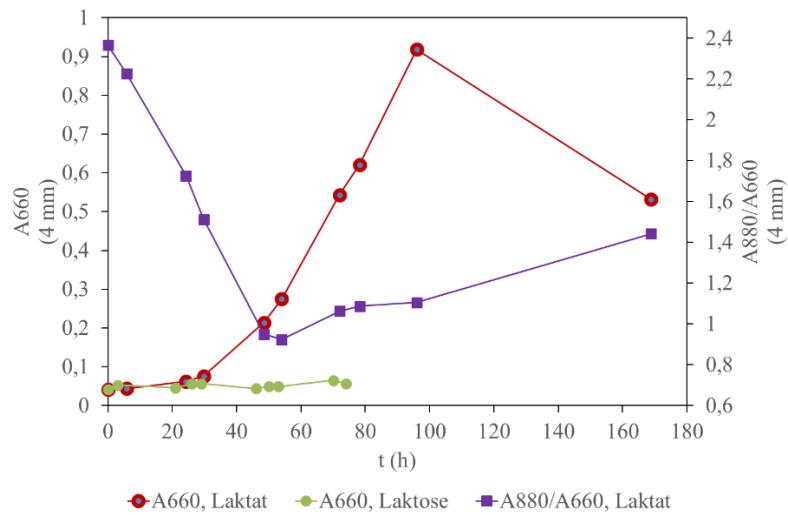


Abb. 10: Zellwachstum (A_{660}) und Expression photosynthetischer Membranen (A_{880}/A_{660}) mit Laktose bzw. Laktat als einziger C-Quelle. Dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Ergebnis aus jeweils fünf identischen semiaeroben Kultivierungen.

Die Kultivierungen mit Laktose zeigten keinerlei Zellwachstum. Im Gegensatz dazu, führte Laktat zu deutlichem Wachstum unter allen getesteten Bedingungen. Semiaerob wurde eine spezifische Wachstumsrate $\mu = 0,046 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Dies entspricht einer Verdopplungszeit von 14,9 h.

Die ersten Versuche mit nativer Mutterlauge ergaben, dass mit dem nativen Reststoff als Kultivierungssubstrat kein Wachstum von *R. rubrum* möglich war. Ebenso führte die Supplementierung des etablierten M2SF-Mediums mit 20 % (v/v) Mutterlauge zur Verhinderung des Zellwachstums. Die Inhibition wird vermutlich, zumindest zum Teil, durch den hohen Salz- und Zuckergehalt verursacht.

In einer Kultivierung mit einem Racemat aus DL-Laktat als Modellsubstrat, zeigte sich, dass beide Stereoisomere simultan von *R. rubrum* aufgenommen und als C-Quelle für Wachstum genutzt werden können (Abb. 11). Damit sollte sich auch MMP grundsätzlich als Wachstumssubstrat eignen.

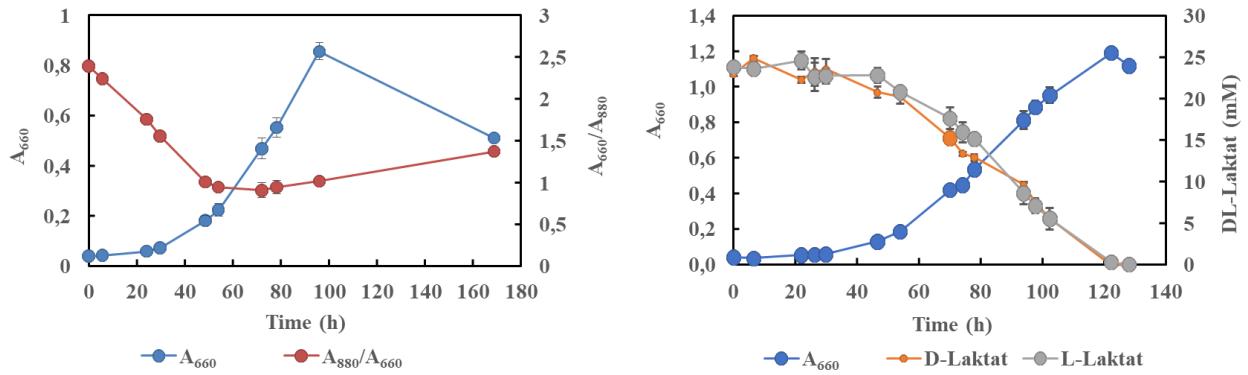


Abb. 11: Wachstumsversuch mit *R. rubrum* S1 unter Verwendung von DL-Laktat als Modellsubstrat. Zellwachstum (A_{660}) und Expression photosynthetischer Membranen (A_{880}/A_{660}).

Arbeiten mit Reststoff Treterpresssaft (TPS). Im Januar 2022 konnte außerdem eine Quelle für Fructose- und Succinat-haltige Reststoffe durch Kontakt zu RLP AgroScience GmbH, Neustadt, erschlossen werden (www.agroscience.de). Das Institut RLP AgroScience arbeitet an der Entwicklung einer nachhaltigen Landbewirtschaftung und hat unter anderem das Kernthema „Bioökonomie“ als Forschungsschwerpunkt. Bezogen wurden 2022 und 2023 ca. 30 Liter Treterpresssaft (TPS) aus dem Weinanbau. Nach Angaben von RLP AgoScience fallen allein in deutschen Weinbaugebieten 225.000 Tonnen (!) Traubentrester pro Jahr an.

Nach Bezug des Rohstoffs von RLP AgroScience, Neustadt, wurde zunächst die chemische Zusammensetzung in den Laboren der HBC analysiert. Organische Säuren und Zucker wurden durch HPLC bestimmt, die Analyse von Anionen und Kationen erfolgte durch Ionenchromatographie. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammensetzung Treterpresssaft (TPS) der RLP AgroScience GmbH

Treterpresssaft (TPS)		Unbehandelt
Allgemeine Werte		
Leitfähigkeit [mS/cm]		2,75
pH-Wert		3,69
Organische Säuren (mmol/L)		
Citrat		
Tartrat		20,9
Malat		53,4
Succinat		37,9
Monosaccharide (mmol/L)		
Glucose		516,5
Fructose		496,1
Anionen (mmol/L)		
Chlorid		1,25
Nitrat		0,83
Phosphat		5,65
Sulfat		20,05
Kationen (mmol/L)		
Natrium		0,65
Ammonium		6,31
Kalium		41,39
Calcium		4,87
Magnesium		4,93

Das TPS-Material ist vor allem durch den hohen Gehalt an Fructose (ca. 500 mM; entspricht > 80 g/L) ideal. Außerdem wurden ca. 38 mmol/L Succinat gefunden. Die Succinat-Konzentration entspricht damit in etwa dem M2SF-Medium. Mit den festgestellten Mengen an Succinat und Fructose sind beide Komponenten; die für den semiaeroben „Dunkel-Photosynthese“-Effekt notwendig sind, in ausreichenden Konzentrationen in diesem Reststoff vorhanden.

Kultivierung mit Reststoffen in Schüttelkolben. Kultivierungsversuche bei denen die unbehandelten Reststoffe als Wachstumssubstrate eingesetzt wurden, zeigten dass in dem unbehandelten Material weder bei MMP noch bei TSP, ein Wachstum der Bakterien erfolgte. Die Zusammensetzungen in Tab. 2 und Tab. 3 legen als Ursache für die Wachstumshemmung, insbesondere die hohe Osmolarität und hohe Zuckerkonzentrationen nahe. Bei allen Wachstumsversuchen wurde der pH-Wert auf 6,8 korrigiert.

Um die inhibierenden Effekte zu vermeiden, erfolgten weitere Versuche mit verdünnten Reststoffen. Abb. 10 zeigt, dass die Bakterien in 1:10 verdünntem TPS wachsen können, wobei ungefähr die Hälfte der mit M2SF-Medium erzielten Zellausbeuten (A_{660}) erreicht wurde. Der Anstieg im Pigmentgehalt/Zelle (A_{880}/A_{660}) nach ca. 20 h in M2SF-Medium, stellt den „Dunkel-Photosynthese“-Effekt dar, bei unter semiaeroben Bedingungen im Dunkeln, eine maximale Expression photosynthetischer Membranen erfolgt.

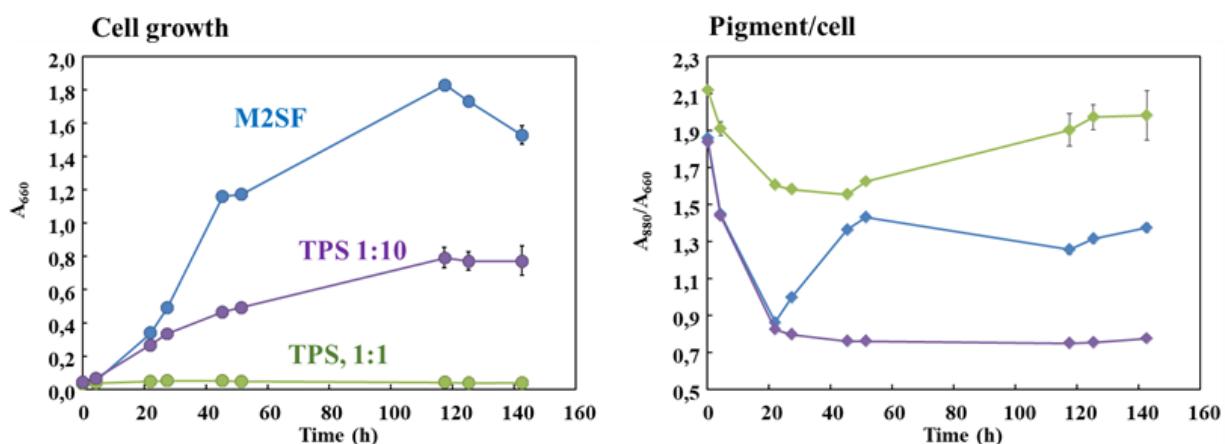


Abb. 10: Wachstumsversuch mit verdünntem Tresterpresssaft (TPS). M2SF-Medium diente als Kontrolle. A_{660} gibt den Verlauf der Biomasse wieder, A_{880}/A_{660} (Pigment/cell) zeigt den Gehalt an photosynthetischen Membranen pro Zelle.

In einem weiteren Ansatz wurden Experimente durchgeführt, bei denen M2SF-Medium mit 10 Volumenprozent des jeweiligen Reststoffs supplementiert wurden. Abb. 11 zeigt neben den Wachstumskurven und der Expression photosynthetischer Membranen (A_{880}/A_{660}), auch die Konzentrationsverläufe der Substrate sowie des Nebenprodukts Acetat.

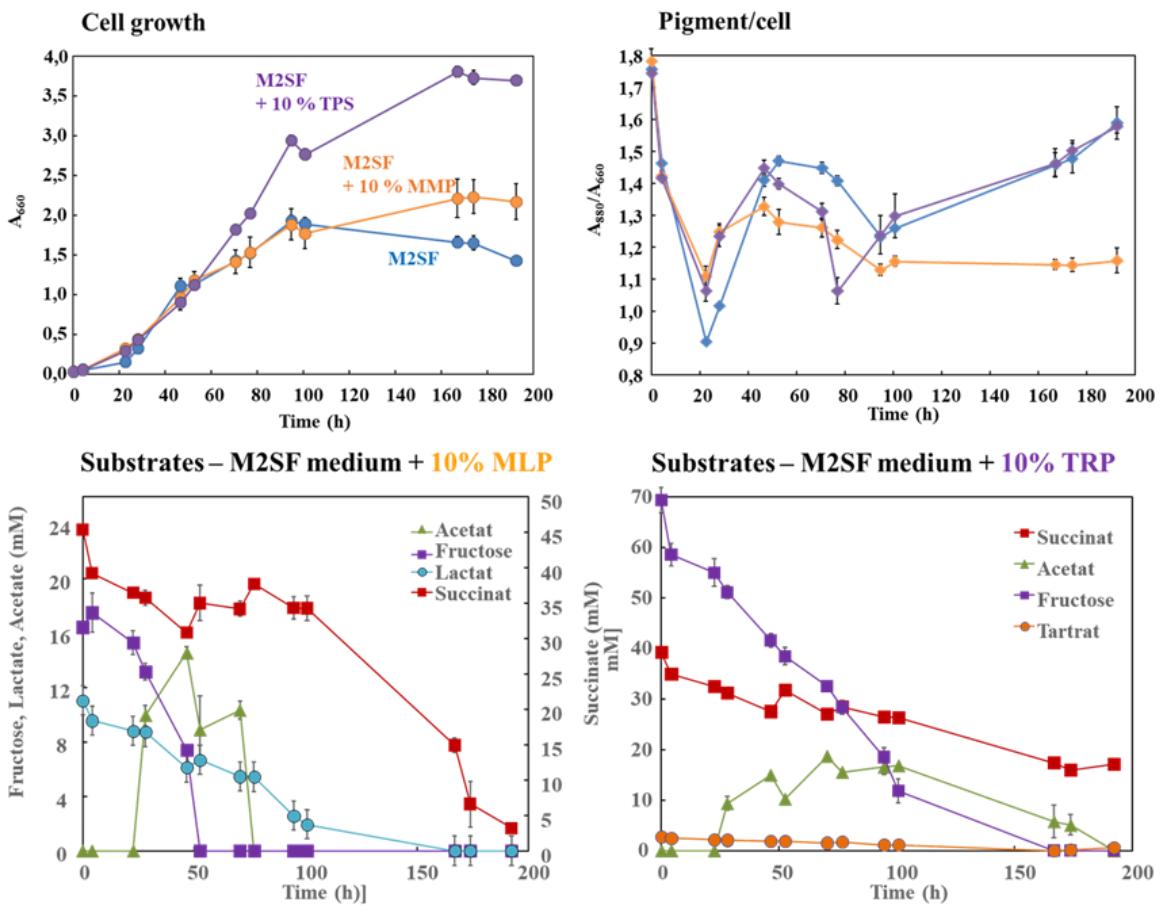


Abb. 11: Wachstumsversuche mit Supplementierung des M2SF-Mediums mit 10 % TPS bzw. 10 % MMP

Der Zusatz von 10 % TPS bzw. 10 % MMP führte zu einer Stimulation des Wachstums, was besonders deutlich für TPS zutraf. Damit sind beide Reststoffe vielversprechend für die Verwendung in Fed-Batch-Fermentationsprozessen, bei welchen TPS bzw. MMP in nicht-inhibierenden Konzentrationen zugefüttert werden um Carotinoide und andere Wertstoffe zu gewinnen.

Insbesondere TPS stellt ein sehr vielversprechendes Substrat dar, da durch den hohen Gehalt von Succinat und Fructose, die Bedingungen, die mit M2SF-Medium zum „Dunkel-Photosynthese“-Effekt führen, erfüllt werden.

II.1.5. Lycopinproduktion mit biogenen Reststoffen.

Vor der Verwendung wurden die Reststoffe MMP und TPS wie folgt prozessiert: Der unbehandelte Reststoff wurde mit 1 M NaOH auf pH 6,80 eingestellt und bei 4400 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Schottflasche dekantiert und zusätzlich durch eine Cross-Flow-Filtration (Sartorius AG SARTOFLOW® Slice 200 Benchtop Crossflow System) mit einer 0,2 µm Hydrosart Filtermembran (0,1 m²) filtriert. Anschließend wurde das Filtrat unter der Laminar-Air-Flow (LAF) (Scanlaf Mars Safety Class 2) mithilfe einer Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH & Co. KG, PC 3001 Vario pro) durch einen 0,2 µm Filter (Thermo Scientific Nalgene™ Rapid-Flow 75mm Bottle Top Filter) sterilfiltriert. Die Lagerung des prozessierten sterilen Reststoffs erfolgte bei 4 °C bis zur Verwendung.

Die Lycopin-Produktion in Kultivierungen mit den biogenen Reststoffen MMP und TPS sind in Abb.12 dargestellt. Die Lycopin-Konzentration in den Zellen wurde jeweils am Ende der Wachstumsphase durch HPLC-Analyse bestimmt. Für die Kultivierungen wurden entweder das chemisch definierte Nährmedium M2SF mit 10 Vol % Reststoff supplementiert (Abb. 1, A, B) oder 1:10 verdünnte Reststoffe eingesetzt (Abb. 1 C, D). In unverdünntem Reststoff fand weder bei MMP noch bei TSP, Zellwachstum statt – vermutlich aufgrund der hohen osmotischen Verhältnisse in diesen Substraten.

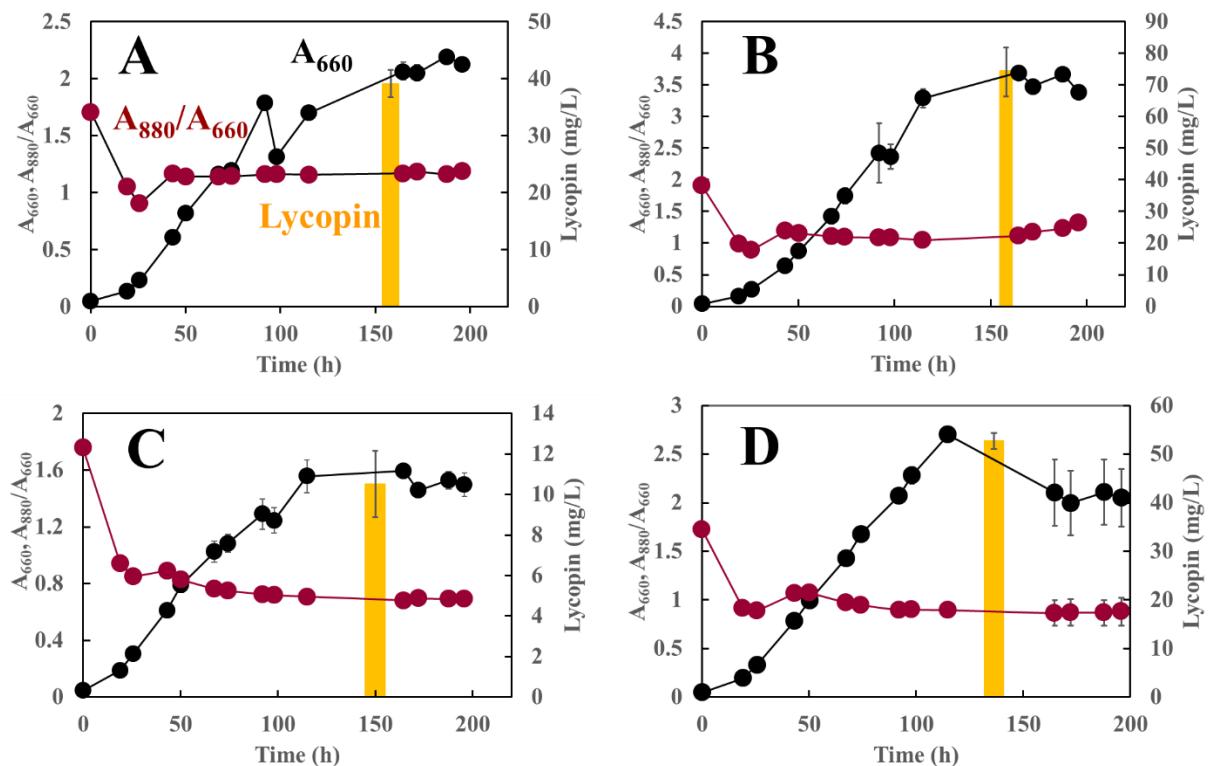


Abb. 12: Kultivierungen von *R. rubrum* SLYC18 mit biogenen Reststoffen. MMP: Milch-Molke-Permeat; TPS: Tresterpresssaft. A: M2SF + 10 % MMP. B: M2SF + 10 % TPS. C: TPS 1:10 + NH₄Cl. D: TPS 1:10 + NH₄Succinat.

Wie die Ergebnisse zeigen, stellt insbesondere 1:10 verdünnter TPS ein sehr vielversprechendes Substrat dar. Das Wachstum und die Lycopin-Produktion waren sogar gegenüber dem M2SF-Medium gesteigert. Unverdünnt enthält TPS ungefähr 80 g/L (!) Fructose und 40 mM Succinat, und somit beide Kohlestoffquellen die bei Verwendung des M2SF-Mediums für den „Dunkel-Photosynthese“-Effekt verantwortlich sind. Durch die 1:10 Verdünnung wird allerdings Succinat und Stickstoff limitierend, so dass in der Kultivierung Abb. 12 C,D) Ammonium zum Ausgleich zugesetzt wurde.

Die höchste Lycopinkonzentration wurde in M2SF + 10 % TPS gefunden, gefolgt von TPS 1:10 + (NH₄)₂-Succinat. Der spezifische Lycopingehalt (mg/g Biomasse) war am höchsten bei Kultivierung in TPS 1:10 + (NH₄)₂-Succinat (Abb. 13).

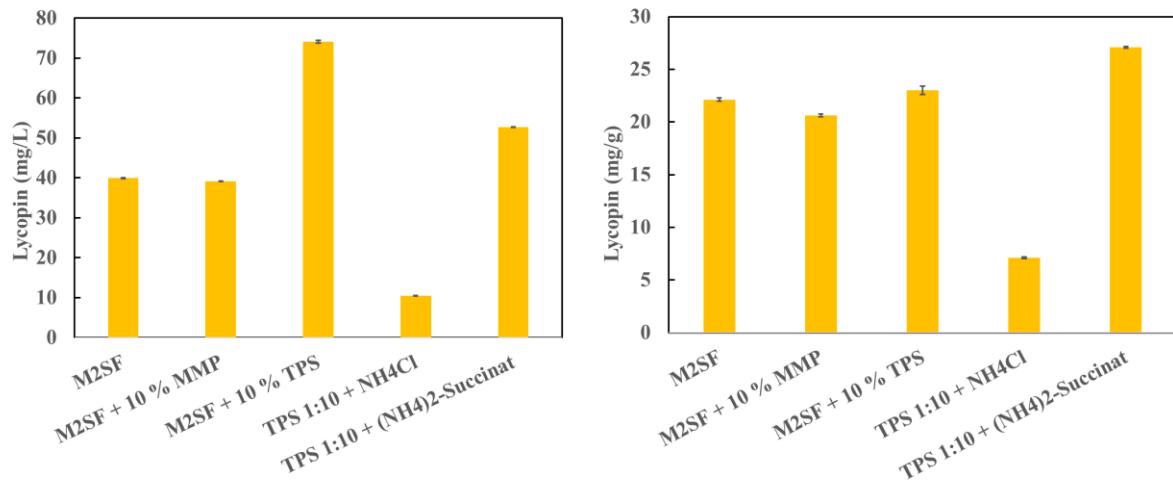


Abb. 13: Vergleich der Lycopin-Ausbeuten aus biogenen Reststoffen MMP und TPS aus Bioreaktorkultivierungen mit *R. rubrum* SLYC18

Allgemein wurden bei Verwendung von MMP als Reststoff, geringere Werte für Zellwachstum und Lycopin-Konzentration erhalten als bei Verwendung von TPS.

TPS erweist sich damit als vielversprechendes Substrat für die Gewinnung von Lycopin in microaeroben Dunkelkulturen mit *R. rubrum* SLYC18.

II.1.6. Gegenüberstellung des erzielten Ergebnisses mit den vorgegebenen Zielen

Die zwei wichtigsten Projektziele wurden erreicht:

1. Es konnte eine Prozessregelung zur Einstellung des „Dunkel-Photosynthese“-Effekts in Bioreaktorkultivierungen mit dem Wildtyp *R. rubrum* S1 und mit dem rekombinanten Lycopin-Produzenten *R. rubrum* SLYC18 entwickelt werden.

Durch Fed-Batch-Betrieb mit Zufütterung von Fructose, konnte die Zellausbeute und damit die Produktausbeute drastisch gesteigert werden.

Eine vollständige Automatisierung und Optimierung des Fed-Batch-Verfahrens steht noch aus, und wird im Nachfolgeprojekt RhoTech2 und im Projekt MoDe_ProBio (s.II.4) weiterverfolgt.

2. Die Produktion des industriell relevanten Carotinoids Lycopin wurde in M2SF-Medium und durch Verwendung von Milch/Molkepermeat und Tresterpresssaft als biogene Reststoffe demonstriert. Damit ist ein wesentlicher Meilenstein des Projekts erreicht worden.

Eine detaillierte Metabolom-Analyse konnte im Projekt nicht durchgeführt werden und ist Gegenstand aktueller und beantragter Folgeprojekte (s.II.4)

Der ursprünglich geplante Transfer in das neue Gebäude „Innovations- und Transferzentrum plus (ITZplus)“ ließ sich innerhalb der Projektlaufzeit nicht realisieren, da sich die Fertigstellung des Gebäudes verzögerte und die Inbetriebnahme erst im Sommer 2024 erfolgt.

II.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Aufgrund der Corona-Einschränkungen in den Jahren 2020 und 2021, sowie krankheitsbedingten und technischen Ausfallzeiten konnten die Finanzmittel nicht wie vorgesehen verwendet werden.

Den allgemeinen Maßnahmen zur Kontaktreduzierung fielen vor allem auch die Dienstreisen zum Opfer. Mehrere Meetings wurden daher online-durchgeführt. Ein an der HBC vorgesehenes Projekt treffen mit dem Projektpartner fiel aus.

Für die Vorstellung des Projekts auf der Konferenz PurpleWeek 2023, Madrid, Spanien, konnten 800 € gesperrte Mittel für Auslandsreisen entsperrt werden.

Die Mittel für Vergabe von Aufträgen konnten ebenfalls nicht in Anspruch genommen werden, da keine Stämme für Sequenzierung und Transkriptomanalysen zur Verfügung standen.

Aufgrund der durch die Covid-19 Pandemie und anderer Umstände aufgelaufenen Restmittel, konnte das Projekt zuwendungsneutral bis 31.01.2023 verlängert werden

Der Hauptteil der entstandenen Kosten betrifft die Personalmittel für die wissenschaftlichen Mitarbeiter*innen (E13) sowie einen technischen Assistenten (Abb. 14).

Unter sonst. allg. Verw.-Ausg. fallen Verbrauchsmaterialien die für die Durchführung der Experimente benötigt wurden. Auch hier konnten aufgrund der Ausfallzeiten weniger Mittel als vorgesehen ausgegeben werden.

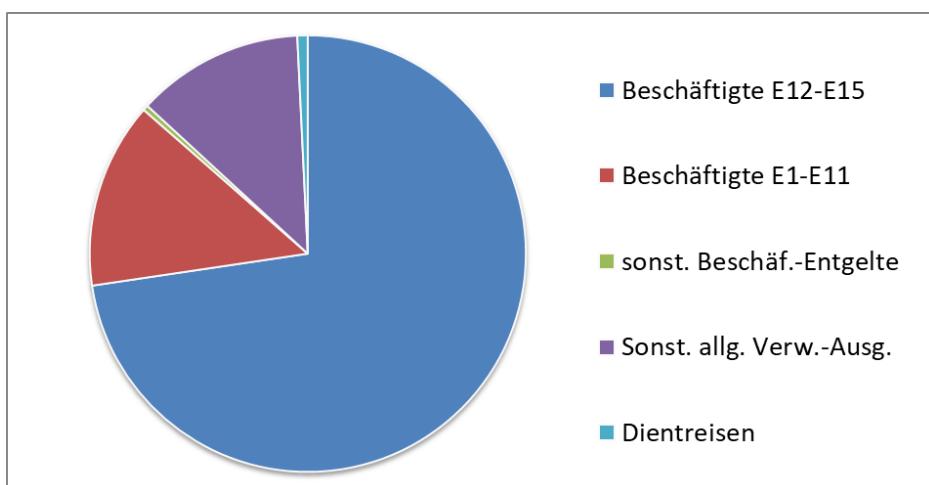


Abb. 14: Zusammenstellung der wichtigsten Positionen der Ausgaben.

II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die durchgeführten Arbeiten entsprechen den im RhoCrt-Antrag beschriebenen Arbeitspaketen.

Um die in II.1. dargestellten Ergebnisse zu erzielen, musste eine größere Anzahl von Fermentationsexperimenten durchgeführt werden. Manche Kultivierungen mussten abgebrochen werden, z.B. bei Auftreten von Kontaminationen, übermäßiger Schaumbildung, u.a. Allgemein gestalten sich Fermentationsexperimente im Bioreaktor langwierig, da erst eine Anzuchtschiene der Bakterien aus mehreren Vorkulturen durchlaufen wird, um das Inokulum zu erhalten. Außerdem müssen größere Mengen Nährmedium hergestellt werden, was bei M2SF-Medium ebenfalls aufwändig ist, da erst eine Spurenelementlösung, dann eine Vitaminlösung und dann das fertige Medium hergestellt werden müssen.

Ebenso wurden für die Reststoffe MMP und TSP mehrere Prozessierungsvarianten getestet, da es nach dem Autoklavieren und bei längerer Lagerung, zum Ausfallen von nicht-identifizierten Bestandteilen kam. Um die Rohstoffe für die Kultivierungen verwenden zu können und lagerungsfähig zu machen, wurde schließlich das unter II.1.5. beschriebene Protokoll als Standard festgelegt.

Auf die Verzögerung in der Bearbeitung der Arbeitspakete infolge der Corona-Pandemie und technischer Defekte am Bioreaktor wurde bereits hingewiesen (I.3).

II.4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Der in RhoCrt bearbeiteten Thematik der Gewinnung industriell relevanter Carotenoide aus biogenen Reststoffen, leistet einen Beitrag zum Entstehen einer Bioökonomie, in der Ressourcen effizienter genutzt werden und dadurch eine nachhaltigere Wirtschaftsweise ermöglicht wird.

Aus den Arbeiten in RhoCrt haben sich ideale Voraussetzungen ergeben, um die Technologie im Sinne eines Bioraffineriekonzepts weiterzuentwickeln.

Maßgeblich befördert durch die Arbeiten in RhoCrt, konnten eine Reihe von Aktivitäten gestartet werden, die die weitere Entwicklung einer auf Purpurbakterien basierenden Biotechnologie in nationalen und internationalen Kooperationsprojekten voranbringen und damit einen Beitrag zu einer zukünftigen nachhaltigen Bioökonomie zu leisten.

Für die weitere Verwertung relevant sind folgende aktuellen Entwicklungen:

- Ein Nachfolgeprojekt von RhoTech mit der Bezeichnung **RhoTech2** innerhalb der Fördermaßnahme des BMWK im Förderbereich 3.7 "Energetische Nutzung biogener Rest- und Abfallstoffe" im 7. Energieforschungsprogramm, wurde mit Bescheid vom 14.12.23 bewilligt (FKZ 03EI5475B, Projektkoordinator Robin Ghosh, Universität Stuttgart). In RhoTech2- soll das erste Up-Scaling dieses Prozesses in die industrielle Umgebung von einer KMU (Fa. Bayer Frucht- und Gemüsesaft GmbH, Ditzingen) im Vordergrund stehen. Dabei sollen alle Bausteine der BioH₂-Produktion ausschließlich auf regenerativen Energiequellen und biogenen Rest- und Abfallstoffen basieren. *R. rubrum* wird mit Frucht-/Gemüsetrester- Extrakten kultiviert und produziert BioH₂ und hochwertige Carotinoide.

- Im Förderprogramm für Angewandte Nachhaltigkeitsforschung an baden-württembergischen Hochschulen für Angewandte Wissenschaften „PAN HAW BW“ wurde im Oktober ein Verbundprojekt mit Beteiligung von vier Hochschulen für Angewandte Wissenschaften bewilligt. Im Projekt „Modellbasiertes Design von Prozessen für die Bioökonomie (**MoDe_ProBio**)“ (FEIH_PAN_2685068) soll aus der Kombination von digitalen Zwillingen (unterstützt durch künstliche Intelligenz), modellbasierter Versuchsplanung und Ökobilanzierung eine neue Designmethodik entstehen. Die neue Designmethodik wird im Vorhaben eingesetzt, um ressourcenschonende, innovative Bioprozesse und ihre digitalen Zwillinge z.B. zur Herstellung von Biowasserstoff und Carotinoiden mit *R. rubrum* aus Abfallstoffen bis zur Prozessreife zu entwickeln.
- **COST Action CA21146 – Fundamentals and applications of purple bacteria biotechnology for resource recovery from waste (**PURPLEGAIN**)**: COST Action CA21146 ist eine auf vier Jahre angelegte europäische Networking-Aktion zum Austausch von Technologien und Wissenstransfer zwischen akademischen und industriellen Sektoren. Beteiligt sind 21 COST Staaten und fünf Partnerländer. Thema ist die Verwertung von erneuerbaren Rohstoffen bzw. Abfallstoffen mit photosynthetischen Purpurbakterien. PurpleGain zielt außerdem darauf ab, eine Datenbank für Studien zu technoeconomischen, sozialen und ökologischen Auswirkungen zu erstellen, die die Marktfähigkeit sowohl der adressierten Technologien als auch der zu extrahierenden Produkte erleichtert. Einige Schwerpunktprodukte sind Polyhydroxyalkanoate, Einzelzellproteine, Biomasse zur Energiegewinnung, Biomasse als Düngemittel, Biowasserstoff, Carotinoide, Terpenoide, organische Säuren, Coenzym Q10 und 5-Aminolävulinsäure.

Aus RhoCrt sind Hartmut Grammel (HG) und Caroline Autenrieth (Fraunhofer IPA) Mitglieder in den Management Committees für die Arbeitsgruppen WG1 (*Metabolic, biochemical, and biophysical mechanisms of PPB and mathematical models*) und WG 3 (*Building the PPB value chain*).

Aktuell (März 2024) haben Partnerorganisationen aus dem PurpleGain-Konsortium aus sieben Ländern, inkl. HG für die HBC, einen Forschungsantrag im EU Call HORIZON-CL4-2024-TWIN-TRANSITION-01-01, „*Bio-intelligent manufacturing industries*“ eingereicht, in dem das „Dunkel-Photosynthese“-Kultivierungsverfahren für die nachhaltigen Herstellung von Feinchemikalien und Biopolymeren genutzt werden soll.

Geplant ist ferner, ein MSCA Doctoral Network (vorläufiger Titel: „Purfect - Purple Symbiotic Fermentation“) im Rahmen der EU Marie Skłodowska-Curie Actions zu beantragen:

<https://marie-sklodowska-curie-actions.ec.europa.eu/actions/doctoral-networks>

Beteiligt sind hier neun europäische Länder und ein Partner aus USA. Von der AG Grammel werden an der HBC, zwei Themen für joint doctorates angeboten:

1. *Integrative omics analysis for Purple Bacteria Interactions in Symbiotic Fermentation*
2. *Metabolic networks modeling of Purple Bacteria for nutraceutical production*

- Der Projektleiter HG wurde in der Projektlaufzeit, Mitglied im Baden-Württemberg Center of Applied Research (**BW-CAR**) im Forschungsschwerpunkt Energiesysteme und Ressourceneffizienz (ENERsource) und ist seit 2022 Mitglied im **Promotionszentrum** des

neu gegründeten Promotionsverband der Hochschulen für angewandte Wissenschaften, Baden-Württemberg. Beide Mitgliedschaften stehen nur für ausgewählte Professoren/innen an Hochschulen für Angewandte Wissenschaften, aufgrund der evaluierten Forschungsleistungen offen. RhoCrt hat wesentlich zur Mitgliedschaft beigetragen und bietet jetzt die Möglichkeit in Nachfolgeprojekten, Nachwuchswissenschaftler/innen an der HBC zur Promotion zu führen.

Bezüglich der Abschätzung des industriellen und ökonomischen Potenzials der in RhoCrt erzielten Ergebnisse, sei auf folgende Zahlen hingewiesen:

Reines Lycopin ($\geq 98\%$ HPLC) aus Tomaten wird aktuell im Chemikalienhandel zu einem Preis von 10 mg für 917,00 € angeboten (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Artikelnr.: SMB00706).

Demnach wurde in der Fed-Batch-Fermentation aus Abb. 6, (Lycopin-Konzentration 70 mg pro Liter, bei einem Kulturvolumen von ca. 10 L) eine Lycopin-Menge produziert, die einem theoretischen Gegenwert von rund 64.000 € entspricht (!).

Um den RhoCrt-Prozess tatsächlich in eine industrielle Anwendung zu bringen, sind jedoch weitere Maßnahmen erforderlich. Zu nennen sind hier die erforderlichen regulatorischen Anforderungen der Lebensmittelbehörden an einen biotechnologischen Prozess, insbesondere die Erteilung des GRAS-Status (*generally recognized as safe*) der FDA und die Zertifizierung durch die europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde EFSA. Diese Zulassungen sind aufwändig und teuer und sollen bei Vorliegen einer geeigneten Fördermaßnahme zukünftig beantragt werden.

Auch sollte die genetische Konstruktion von *R. rubrum* SLYC18 dahingehend geändert werden, dass der Genotyp auch ohne Selektionsdruck stabil erhalten bleibt. In allen Kultivierungen mit diesem Stamm, musste das Antibiotikum Kanamycin als Selektionsfaktor zugesetzt werden, da die Deletion der Carotinoidbiosynthesegene *crtC* und *crtD* durch Insertionsmutagenese mit einer Kanamycin-Resistenz-Cassette erfolgte (1). Ohne Kanamycin kann der Stamm spontan zum Wildtyp rückmutieren.

II.5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Insbesondere die Kontakte die durch die COST Action PURPLEGAIN ermöglicht wurden, helfen einen Überblick über die internationalen Aktivitäten zu erhalten. Die Nutzung von photosynthetischen Purpurbakterien hat dabei bereits einen erstaunlich hohen technologischen Reifegrad erreicht und wird teilweise bereits kommerzialisiert. Mehrere Pilotanlagen werden aktuell im industriellen Maßstab betrieben, wobei die Hauptanwendung in der Verwertung von biogenen Abfallstoffen zur Herstellung von BioH₂, Polyhydroxyalkanoaten und Biomasse (Single Cell Protein) besteht (8, 9). In einer Abwasserbehandlungsanlage in Linares, Spanien, werden beispielsweise 350.000 Liter Abwasser pro Tag zur Erzeugung von

Purpurbakterien in anaeroben Photobioreaktoren behandelt. Die erzeugte Biomasse dient als Rohstoff für die Produktion von Langzeitdüngern (Aqualia ANPHORA® technology).

Die RhoCrt-Dunkel-Photosynthese-Technologie ist unter diesen Entwicklungen einzigartig, da durch den Dunkel-Photosynthese-Effekt keine aufwändigen und technisch limitierten Photobioreaktoren benötigt werden, was den Prozess effizienter und großtechnisch skalierbar macht. Dieser Ansatz stellt ein Alleinstellungsmerkmal dar. Es ist nicht bekannt, dass andere Stellen an einem ähnlichen lichtunabhängigen semiaeroben Verfahren arbeiten.

II.6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die Veröffentlichung der Ergebnisse als peer-review Publikation, gemeinsam mit dem Projektkoordinator, ist geplant.

Konferenzvorträge:

Grammel H, Hädicke O, Autenrieth C, Ghosh R. Utilization of biogenic wastes to produce value-added compounds in semiaerobic dark bioreactor cultivations with *Rhodospirillum rubrum*. Purple Week 2023 - 2nd Workshop - Resource recovery from waste and wastewater and downstream procedures for PPB biomass, 6th July 2023, Madrid – Spain

In RhoCrt an der HBC entstandene Abschlussarbeiten (Masterarbeiten):

- Leibinger, Sarah. 2022. Verwertung von Molke- und Fruchtabfällen zur Herstellung von Biowasserstoff und Carotinoiden mithilfe des Purpurbakteriums *Rhodospirillum rubrum*. Bachelor Thesis, Hochschule Biberach
- Kay Christoph Bretz. 2022. Implementation of Bioprocess Control Strategies in BioPAT® MFCS/win 3.0 for Semiaerobic Application of the Purple Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Master Thesis, Hochschule Biberach
- Beck, Jonathan. 2024. Semiaerobic Fed-Batch High Cell Density Cultivation for Biotechnological Application of the Purple Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Master Thesis, Hochschule Biberach

References

1. Wang G-S, Grammel H, Abou-Aisha K, Sägesser R, Ghosh R. 2012. High-level production of the industrial product lycopene by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol* 78:7205–7215. doi:10.1128/AEM.00545-12.
2. Grammel H, Gilles E-D, Ghosh R. 2003. Microaerophilic cooperation of reductive and oxidative pathways allows maximal photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol* 69:6577–6586. doi:10.1128/AEM.69.11.6577-6586.2003.
3. Grammel H, Ghosh R. 2008. Redox-state dynamics of ubiquinone-10 imply cooperative regulation of photosynthetic membrane expression in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* 190:4912–4921. doi:10.1128/JB.00423-08.
4. Dögnitz N, Hauschild S, Cyffka K-F, Meisel K, Dietrich S, Müller-Langer F, Majer S, Kretzschmar J, Schmidt C, Reinholtz T, Gramann J. 2022. Wasserstoff aus Biomasse. DBFZ Report, Leipzig.

- https://www.dbfz.de/fileadmin/user_upload/Referenzen/DBFZ_Reports/DBFZ_Report_46.pdf. Accessed 3 February, 2024.
5. Ghosh R, Hardmeyer A, Thoenen I, Bachofen R. 1994. Optimization of the Sistrom Culture Medium for Large-Scale Batch Cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under Semiaerobic Conditions with Maximal Yield of Photosynthetic Membranes. *Appl Environ Microbiol* 60:1698–1700. doi:10.1128/aem.60.5.1698-1700.1994.
 6. Kalia VC, Singh Patel SK, Shanmugam R, Lee J-K. 2021. Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications. *Bioresour Technol* 326:124737. doi:10.1016/j.biortech.2021.124737.
 7. Zürrer H, Bachofen R. 1982. Aspects of growth and hydrogen production of the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* in continuous culture. *Biomass* 2:165–174. doi:10.1016/0144-4565(82)90027-0.
 8. Capson-Tojo G, Batstone DJ, Grassino M, Vlaeminck SE, Puyol D, Verstraete W, Kleerebezem R, Oehmen A, Ghimire A, Pikaar I, Lema JM, Hülsen T. 2020. Purple phototrophic bacteria for resource recovery: Challenges and opportunities. *Biotechnol Adv* 43:107567. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107567.
 9. Deep Purple. 2024. Press Release DEEP PURPLE 1 - Deep Purple. <https://deep-purple.eu/promomaterial/558/>. Accessed 13 February, 2024.