

Rheinisch-Westfälische Technische Universität Aachen

**Projekt Value-PP – Valorisierung von Pflanzenschroten durch
Phosphatabreicherung mit gekoppelter Poly-P-Wertstoffsynthese**

(AZ 33006-01)

- Abschlussbericht -

Aachen, 24.03.2021

Projektlaufzeit: 01.01.2017 – 31.10.2020

Verfasst von:

AG Blank – Prof. Dr. Lars M. Blank, Dr. Jonas J. Christ

Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie, Institut für Angewandte Mikrobiologie (iAMB), Aachen
Biologie und Biotechnologie (ABBt), Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (RWTH)
Aachen, Worringer Weg 1, 52074 Aachen

AG Schwaneberg – Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg, Dr. Anna Joelle Ruff, Kevin R. Herrmann

RWTH Aachen Universität, Lehrstuhl für Biotechnologie, Institut für Biotechnologie, Worringer Weg
3, 52074 Aachen

Budenheim – Dr. Daniel Buchold, Dr. Sven Bach

Chemische Fabrik Budenheim KG, Rheinstraße 27, 55257 Budenheim

SeSaM – Milan Sobota

SeSaM-Biotech GmbH, Forckenbeckstraße 50, 52056 Aachen

06/02		Projektkennblatt		
		der		
Deutschen Bundesstiftung Umwelt				
Az	33006-01	Referat	Fördersumme 496.747 €	
Antragstitel	Value-PP - Valorisierung von Pflanzenschroten durch Phosphatabreicherung mit gekoppelter Poly-P-Wertstoffsynthese			
Stichworte	Phosphatrecycling aus Rapspresskuchen, Protein Engineering, Orthophosphat-Extraktion aus Rapspresskuchen mit Phytase, Polyphosphat-Hyperakkumulation mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , phytat-abgereicherter Rapspresskuchen, polyphosphat-reicher Hefeextrakt, Bio-Polyphosphat			
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)	
3 Jahre u. 10 Monate	01.01.2017	31.10.2020		
Zwischenberichte	2 Stück (31.08.2018, 04.03.2020)			
Bewilligungsempfänger	Prof Dr. Lars M. Blank Institut für Angewandte Mikrobiologie RWTH Aachen		Tel	+49 241 80 26600
			Fax	+49 241 80 622180
			Projektleitung	Prof. Dr. Lars M. Blank
			Bearbeiter	Sekr.: Frau Ulrike Schmitt
Kooperationspartner	<ul style="list-style-type: none"> • Prof. Dr. Lars M. Blank, RWTH Aachen Universität, Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie, Institut für Angewandte Mikrobiologie, Worringer Weg 1, 52074 Aachen • Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg, RWTH Aachen Universität, Lehrstuhl für Biotechnologie, Institut für Biotechnologie, Worringer Weg 3, 52074 Aachen • Dr. Daniel Buchold, Chemische Fabrik Budenheim KG, Rheinstraße 27, 55257 Budenheim • Milan Sobota, SeSaM-Biotech GmbH, Forckenbeckstraße 50, 52056 Aachen 			
Zielsetzung und Anlass des Vorhabens				
Die weltweiten Phosphaterz-Vorkommen werden in den nächsten 300 bis 400 Jahren erschöpft sein. In Value-PP wird daher ein Verfahren für eine nachhaltige Phosphornutzung entwickelt. Drei neue Produkte (phytat-abgereicherter Rapspresskuchen, polyphosphat-reicher Hefeextrakt, und Bio-Polyphosphat) werden aus einem ungenutzten Phosphorabfallstrom (Rapspresskuchen) gewonnen. Das im Presskuchen gebundene Phosphat wird enzymatisch freigesetzt und mit einer Hefe zu Polyphosphat hyperakkumuliert. In der anschließenden Downstream-Verarbeitung entstehen die o. g. Produkte.				
Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden				
Jährlich fallen in Deutschland bei der Pressung von Rapsamen ca. 6 mio. t Rapspresskuchen an. Der darin enthaltene Phosphor wird, bis auf eine anteilige Nutzung als Futtermittel, nicht genutzt. Gebunden als Phytat liegt Phosphor mit einer Konzentration von ca. 1 % (m / m) im Rapspresskuchen vor. Anfänglich etabliert die AG Schwaneberg Analytik zur Quantifizierung von Phytat und den de-phosphorylierten Zwischenprodukten dessen. Die AG Schwaneberg erzeugt danach zusammen mit SeSaM mittels Proteinengineering eine optimierte Phytase, die SeSaM den Partnern bereitstellt. Die AG Schwaneberg entwickelt ein Verfahren zur Extraktion des Phosphats aus Rapspresskuchen. Die AG Blank entwickelt Analytik zur Quantifizierung und Längenbestimmung von Polyphosphat aus Proben biogenen Ursprungs. Anschließend wird ein Fermentations-Verfahren zur Produktion polyphosphat-reicher <i>S. cerevisiae</i> entwickelt. Weiterhin entwickelt die AG Blank zwei Downstream-Prozesse zur Gewinnung von polyphosphathaltigem Hefeextrakt und Bio-Polyphosphat. Budenheim leistet begleitende P-Analytik, testet Anwendungsmöglichkeiten der neuen Produkte und schätzt das Verfahren wirtschaftlich ein.				
Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • http://www.dbu.de				

Ergebnisse und Diskussion

Die AG Schwaneberg hat sich mit der enzymatischen Phosphatrückgewinnung aus entölten Rapssamen (Rapspresskuchen) sowie dem Protein Engineering des verwendeten Enzyms befasst. Eine einstufige Extraktion und Hydrolyse der Phosphorspeicherform Phytat in Pflanzen mit dem Ziel des Phosphatrecyclings gab es bisher nicht. Durch exogene Phytasezugabe in einem mild gepufferten Milieu und bei moderaten Temperaturen von 37 °C konnte unter umweltfreundlichen Bedingungen Phosphat aus Presskuchen zurückgewonnen werden. Die erhaltenen Produkte (phosphorabgereicherter Presskuchen und phosphorhaltiger Reaktionsüberstand) sind im Sinne des Value-PP-Prozesses weiter verwertbar. Im Rahmen des Protein Engineerings wurde der Fokus auf die verbesserte Hydrolyse von InsP4 gelegt. Mit der Identifizierung einer Variante mit einer verbesserten Hydrolyse von InsP4 von 3,1-fach im Vergleich zur Wildtyp-Phytase von *E. coli* war diese Evolution sehr erfolgreich. Für den Nachweis von Phytat und seinen Hydrolyseprodukten wurde eine HPLC-Analytik etabliert. Bei der Expression und Fermentierung in *Pichia pastoris* sowie dem Protein Engineering der *E. coli* Phytase wurden mehrere verbesserte Varianten identifiziert. Der Projektpartner SeSaM hatte zum Ziel, Mutantenbibliotheken der Enzyme bereitzustellen, Phytasen zu produzieren, sie zu charakterisieren sowie untereinander und mit kommerziellen Enzymen zu vergleichen. Diese Ziele wurden erreicht. Jedoch hat nicht jeder der verfolgten Ansätze Früchte getragen. So schlug das SeSaM-Protokoll zur Generierung von Variantenbibliotheken wiederholt fehl, sodass als Alternative wurde eine „advanced“ epPCR hergestellt, die erfolgreich gescreened wurde. Die Ausbeuten der Phytaseproduktion konnten massiv erhöht werden, sowohl durch die Wahl der Produktionsorganismus, wie durch weitere Optimierungen der Expressionskassette und des Produktionsprozesses. Lediglich der Austausch des Signalpeptids zur Sekretion blieb ohne Verbesserung der Ausbeute. Die durch die AG Schwaneberg zur Verfügung gestellten Phytasen konnten durch den 4-MUP Assay mit kommerziellen Phytasen verglichen werden, und zeigten herausragende Leistung auf diesem Substrat. Die AG Blank entwickelte eine analytische Polyphosphat-Extraktion und zwei Enzymassays für die Bestimmung der Gesamt-Polyphosphat-Konzentration und der durchschnittlichen Polyphosphatkettlänge. Eine Fermentationsstrategie wurde entwickelt, bei der wild-typ Bäckerhefe phosphat-gehungert und anschließend phosphat-gefüttert wird. So konnte ein Gehalt (28 %) an Polyphosphat in Zelltrockenmasse erreicht werden. Die Weiterverarbeitung zum polyphosphat-reichem Hefeextrakt basierte auf einem Industrieprotokoll, welches dadurch abgeändert wurde, dass die Hefe zunächst hitzebehandelt wurde. Anschließend wurde der Prozess erfolgreich auf den 2000 L Maßstab hochskaliert. Die beste Möglichkeit zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Prozesses liegt in der Fermentation. Alle Fermentationen des entwickelten Prozesses wurden im Batch-Betrieb gefahren. Für einen wirtschaftlichen Prozess muss die Fermentation auf eine „one-pot“ (alle drei Schritte in einem Gefäß) Fermentation im fed-batch-Modus weiterentwickelt werden.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Bisher konnten in Value-PP drei Patente angemeldet, sieben Forschungsartikel und zwei Übersichtsartikel veröffentlicht werden. Zudem wurde ein Buch veröffentlicht. Die Ergebnisse wurden ebenfalls in zwei Vorträgen und sechs Posterpräsentationen vorgestellt.

Fazit

Das akademische Ziel Phosphat aus Rapsschrot zurückzugewinnen und biotechnologisch zu Polyphosphat zu valorisieren wurde zu Anfang des Projektes gesetzt. Zum Ende des Projektes konnte gezeigt werden, dass der ValuePP-Prozess (Rapsschrot -> Rapsextrakt -> beladene Hefe -> Hefeextrakt oder pures Bio-PolyP) im Labormaßstab funktioniert und er ebenfalls auf Presskuchen von anderen Pflanzen, wie Sesam oder Reis anwendbar ist. Ein Teilprozess (Pures Phosphat -> Hefeextrakt -> Wurstproduktion) wurde ebenfalls erfolgreich im 2000 L Maßstab durchgeführt. Die akademische Idee konnte also in einen funktionierenden Prozess umgesetzt werden. Die ganze Wertschöpfungskette vom Rapsschrot zu den PolyP Produkten kann entsprechend auch skaliert werden. Mit den Ergebnissen aus ValuePP können aber nicht nur die technischen Herausforderungen gemeistert werden, sondern sie zeigen auch Optimierungsmöglichkeiten auf. So muss die Phosphatbeladung der Hefe unter deutlich höheren Zellkonzentrationen ermöglicht werden. Nach der Weiterentwicklung der unterschiedlichen Technologien und der Optimierung der kompletten Wertschöpfungskette wird das Augenmerk noch deutlicher auf die Implementierung dieser in der Industrie sein.

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	5
2	Tabellenverzeichnis	7
3	Abkürzungsverzeichnis	8
4	Zusammenfassung.....	9
5	Anlass und Zielsetzung des Projekts.....	11
6	Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden.....	12
7	Ergebnisse	13
7.1	AG Schwaneberg: Arbeitsprogramm 1	13
7.2	SeSaM: Arbeitsprogramm 2	27
7.3	AG Blank: Arbeitsprogramm 3.....	32
7.4	Budenheim: Arbeitsprogramm 4.....	45
7.5	Stoffflüsse ValuePP-Prozess.....	49
8	Diskussion.....	51
8.1	AG Schwaneberg.....	51
8.2	SeSaM	52
8.3	AG Blank.....	52
8.4	Phosphatverwendung und Phosphatabfallströme in Deutschland	53
8.5	Sicherheit von Phosphat als Lebensmittel.....	56
8.6	Kommerzielles Potential des ValuePP-Prozesses.....	57
8.7	Ethische Einschätzung.....	60
9	Öffentlichkeitsarbeit.....	62
9.1	Patentanmeldungen	62
9.2	Forschungsartikel.....	62
9.3	Übersichtsartikel	63
9.4	Bücher	63
9.5	Vorträge	64
9.6	Poster-Präsentationen	64
10	Fazit.....	65
11	Anhang und Anlagen.....	65
12	Literaturangaben	66

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Definition des Substrats, der Produkte und der Prozesse von Value-PP.	12
Abbildung 2	Einfluss der Methanolkonzentration im Laufpuffer auf die Separation von InsP3 (a), InsP4 (b), InsP5 (c) sowie InsP6 (d).....	14
Abbildung 3	HPLC-Analyse der InsP ₃ -InsP ₆ Verteilung verschiedener Raps- und Sonnenblumenpresskuchen sowie von einem Sojapresskuchen.....	15
Abbildung 4	Isolation von InsP ₅ , InsP ₄ und InsP ₃ als Standards aus einer enzymatischen Hydrolyse von InsP ₆ mittels der <i>E. coli</i> Phytase.....	16
Abbildung 5	Analyse eines InsP ₆ Standards gelöst in Wasser (A) sowie einer InsP-Lösung verdünnt in 50 mM NaOAc pH 5-Puffer (B) mittels des Kapillarelektrophorese-Durchmusterungssystems und der indirekten UV-Detektion. Die Zuordnung der Peaks basiert auf der Injektion von verschiedenen Referenzproben und unterschiedlichen Konzentrationen, aber eine absolut ordnungsgemäße Identifizierung kann auf der Grundlage der verfügbaren Daten nicht garantiert werden. Der System-Peak wird durch andere im Elektrolyten vorhandene Ionen (außer dem des Chromophors) verursacht, wenn diese den Detektor erreichen. Die Messergebnisse wurden invertiert, um die gewohnten Signale zu bekommen und nicht mit Negativ-Peaks zu arbeiten.	17
Abbildung 6	Das AMol-Phosphatquantifizierungssystem ist hervorragend für den Phosphatnachweis zwischen 10-500 µM geeignet.	18
Abbildung 7	Phosphatextraktionsausbeuten von bis zu 2,5 % der Masse können durch direkte Phytasezugabe zu verschiedenen Presskuchen erreicht werden.	20
Abbildung 8	Phosphatextraktionsausbeuten verschiedener Pflanzennebenprodukte (Presskuchen oder Kleie), wovon der phosphathaltige Überstand anschließend von der AG Blank zur PolyP-Akkumulation in Hefe genutzt wurde.	21
Abbildung 9	Prozentualer Anteil der aktiven Varianten von den verschiedenen Mutanten-Bibliotheken, die mit dem AMol-Assay für die Hydrolyse von InsP ₄ ermittelt wurden.	22
Abbildung 10	Beispiel einer Platte, die das typische Screening-Ergebnis für epPCR-Bibliotheken mit 0,2 mM (A) oder 0,5 mM (B) MnCl ₂ darstellt. Die Aktivität wurde anhand der Fähigkeit zur Hydrolyse von InsP ₄ unter Verwendung des AMol-Assays gemessen. Die rot gepunktete Linie repräsentiert den Schwellenwert für die Klassifizierung von Klonen als verbessert.....	23
Abbildung 11	Computergestützte Darstellung der Proteinstruktur der <i>E. coli</i> Phytase und die Lage des Substrats InsP ₆ in der aktiven Bindetasche. Positionen, an denen Substitutionen eine signifikante Erhöhung der Hydrolyseaktivität von InsP ₄ bewirkt haben, sind in Rot hervorgehoben (T23, K24, M216 und R267).....	26
Abbildung 12	SDS-PAGE zur Analyse der Ausbeute der <i>E. coli</i> Phytase AppA nach der Produktion durch <i>P. pastoris</i> geleitet durch Signalpeptid-Varianten. (A) Die Sekretion der Phytase geleitet durch Signalpeptid-Varianten erzeugt durch „Advanced“-epPCR. (B) Die Sekretion der Phytase geleitet durch das Fusions-Signalpeptid Ost1-S1 (als Triplikat getestet). Das WT-Signalpeptid S1 dient jeweils als Referenz.	30
Abbildung 13	Durchschnittliche Aktivität auf 4-MUP Substrat von kommerziellen Phytasen (Quantum Blue, Vemozyme) und Mutanten (C10, A3) aus Fermenter- bzw. Schüttelkolbenherstellung als Lyophilisat	31
Abbildung 14	Durchschnittliche Aktivität auf 4-MUP Substrat zur Bestimmung der Phytase Lagerstabilität.....	31
Abbildung 15	Vergleich von Literaturmethoden zur analytischen Polyphosphat-Extraktion	33

Abbildung 16	Optimierung der besten Literaturmethode zur analytischen Polyphosphat-Extraktion.....	33
Abbildung 17	Optimierung der Polyphosphathyperakkumulation, Test dieser unter anaeroben Wachstumsbedingungen und Vergleich des fertigen Protokolls mit verschiedenen <i>S. cerevisiae</i> Stämmen.....	34
Abbildung 18	Polyphosphat-Hyperakkumulation in Abhängigkeit von der Zeit.	35
Abbildung 19	Analyse der hergestellten Hefeextrakte. Auto., Autolyse; plasm., Plasmolyse; w/ heat, enzymatische Hydrolyse mit vorheriger Hitzeinaktivierung; w/o heat, enzymatische Hydrolyse ohne vorheriger Hitzeinaktivierung.	36
Abbildung 20	Schema des neuen Enzymassays zur Bestimmung der durchschnittlichen Polyphosphatkettlänge.	38
Abbildung 21	Vergleich des Enzymassays mit der Referenzmethode ³¹ P NMR.	40
Abbildung 22	Entwicklung optimaler Parameter für die Fällung (A-C) und die Trocknung (D) von Polyphosphat.....	41
Abbildung 23	Analyse der polyphosphat-Produktion mit verschiedenen Pflanzenextrakten. A) Polyphosphat Gehalt [%], B) Durchschnittliche Kettenlänge [P-Einheiten], C) Polyphosphat Ausbeute [%], D) Titer [g Polyphosphat * L Füttermedium ⁻¹].	43
Abbildung 24	Orthophosphat im Füttermedium nach der Hyperakkumulation.	44
Abbildung 25	Fleischverarbeitung in einem Kutter (links) und verschiedene daraus hergestellte Fleischpatties nach Lagerung in Konserven für 12 h, aufwärmen auf 25 °C und anschließend absieben (rechts).....	47
Abbildung 26	Auswertung des Wasserverlusts (von links nach rechts): Blindprobe (kein Phosphatzusatz), Standard-Produkt (anorganisches Salz), polyphosphat-angereicherter Hefeextrakt (zwei Probenauswertungen dargestellt) und reines „Gewürz-Hefeextrakt“	47
Abbildung 27	Massenströme im ValuePP-Prozess. Eine schematische Prozesskette für das biotechnologische Pi-Recycling von Rapschrot in lebensmitteltaugliches PolyP wird vorgestellt. Die Bilder des Rapsfeldes, der chemischen Struktur des Phytats, der Ölflasche, der Suppe, des Kükens und der Gabel und des Messers gehören nicht den Autoren und stammen von der frei verwendbaren Bildwebseite wikimedia.commons.org . Anmerkungen: a) Daten entnommen aus Ref. , b) Daten entnommen aus Ref.	49
Abbildung 28	Deutsche Importe und Exporte von Phosphat, Phosphorsäure und Polyphosphat. Importe in A, Exporte in B. Daten aus Ref. ²³	54
Abbildung 29	Phosphatgebrauch in Deutschland. Einheiten: t Phosphat pro Jahr und Prozent Anteil. Bezogen auf das Jahr 2011 aus Ref.....	54
Abbildung 30	Phosphatabfallströme in Deutschland. Die meisten Daten stammen aus Ref. ²³ . Der Sojamehlwert wurde aus Ref. ^{25, 26} berechnet.	56
Abbildung 31	Preisentwicklung. Daten aus Ref. ³⁷	58

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Fortschritte in den Arbeitspaketen und Meilensteinen der AG Schwaneberg.....	13
Tabelle 2	Zusammenfassung der aktivsten Varianten für der Hydrolyse von InsP ₄ . Zusätzlich zur relativen Verbesserung im Vergleich zum Wildtyp sind die Substitutionen sowie der Ursprung der Variante (Strategie 1 oder Strategie 2) angegeben. In fett hervorgehoben sind Substitutionen, die an der Substratbindung beteiligt sind.	23
Tabelle 3	Übersicht der 13 besten Phytasevarianten mit verbesserter InsP ₄ -Hydrolyse, die beim Screening der SSM-Bibliotheken identifiziert wurden.....	25
Tabelle 4	Fortschritte in den Arbeitspaketen und Meilensteinen der SeSaM-Biotech GmbH	27
Tabelle 5	Fortschritte in den Arbeitspaketen und Meilensteinen der AG Blank	32
Tabelle 6	Vergleich Hefeextrakt-Paste und -Pulver aus Rapsextrakt und aus reinem Orthophosphat (P _i)	37
Tabelle 7	Interferierende Substanzen für den Enzymassay	39
Tabelle 8	Physikochemische Charakterisierung der Bio-Polyphosphate	42
Tabelle 9	Physikochemische Charakterisierung der Bio-Polyphosphate aus Reis- und Rapsextrakt.....	44
Tabelle 10	Fortschritte in den Arbeitspaketen und Meilensteinen von Budenheim.....	45

3 Abkürzungsverzeichnis

4-MUP	4-Methylumbelliferylphosphat
PolyP	Inorganisches Polyphosphat
P _i	Phosphat
P	Phosphor
AP	Arbeitspaket
InsP	Inositolphosphate
InsP ₆	Phytat, Phytinsäure
MS	Meilenstein

4 Zusammenfassung

Phosphor ist ein unersetzbares Element. Da die weltweiten Phosphaterzvorkommen in den kommenden 300 bis 400 Jahren erschöpft sein werden, müssen Strategien für eine nachhaltige Phosphatnutzung entwickelt werden. Das übergreifende Ziel von Value-PP war die Entwicklung eines Prozesses für die Herstellung von Wertstoffen (polyphosphat-reicher Hefeextrakt und Bio-Polyphosphat) aus Rapspresskuchen sowie dessen Valorisierung (phytat-abgereicherter Rapspresskuchen.) Rapspresskuchen entsteht als Pflanzenebenstrom bei der Ölherstellung, also bei der Pressung von Rapssamen. Jährlich werden in Deutschland ca. 6 Mio. t Rapspresskuchen erzeugt. Phosphor liegt mit ca. 1 % (m/m), gebunden als Phytat, im Rapsschrot vor. Die Projektpartner waren die AG Blank, die AG Schwaneberg, SeSaM Biotech und die Chemische Fabrik Budenheim.

Die Laufzeit von Value-PP wurde kostenneutral verlängert aufgrund einerseits des verspäteten Projektbeginns und um das Potential der Hochskalierung sowie der Anwendungstest im vollem Umfang ausführen zu können. Ansonsten verlief Value-PP im Zeitraum vom 01.01.2017 bis zum 31.10.2020 nach Plan.

Die AG Schwaneberg entwickelten eine optimierte Phytase für die Freisetzung von Phosphat aus Phytat, die SeSaM untersuchte die Fermentationsbedingungen und produzierte die ausgewählte Phytase. Die AG Schwaneberg entwickelt zudem die Phytat-Analytik und eine Methode für die Extraktion des im Rapspresskuchen als Phytat gebundenen Orthophosphats (Patentanmeldung). Die AG Schwaneberg hat die für die Validierung von Bibliotheken benötigte Screening-Methode AMol zum Nachweis von freiem Orthophosphat sowie eine HPLC-Analytik zum Nachweis von Phytat und seinen Hydrolyseprodukten etabliert. Zudem wurde eine Methode zur Phosphatabreicherung von Rapspresskuchen erstellt, bei der Phytasen direkt zur Schrotsuspension gegeben werden und freies Orthophosphat aus dem Pflanzenmaterial gewonnen wird, welches für die anschließende Biotransformation der AG Blank genutzt wurde.

Die AG Blank entwickelt die Polyphosphat-Analytik, eine Methode zur Polyphosphat-Hyperakkumulation aus dem Rapspresskuchen-Extrakt, und Methoden zur Herstellung von polyphosphat-reichem Hefeextrakt und Bio-Polyphosphat aus der beladenen Hefe.

Budenheim führte eine anwendungstechnische Bewertung des polyphosphat-reichen Hefeextrakts (Pulver) durch. Budenheim sieht die Anwendung der Hefeextrakts in der Herstellung von Schmelzkäse und in der Produktion von Fleischprodukten. Budenheim testete den Hefeextrakt auf seine Funktion zur Wasserbindefähigkeit in der Fleischwurstherstellung. Dabei konnte in einer neutralen, reproduzierbaren Fleischmatrix erfolgreich gezeigt werden, dass die angestrebte anwendungstechnische Funktion vergleichbar mit einem rein anorganischen Polyphosphatsalz ist, sobald eine vergleichbare Dosis auf Basis des Phosphatgehalts eingestellt wird. Zudem unterstützte Budenheim die Projektpartner mit Analytik und führte eine abschließende wirtschaftliche Einschätzung durch.

Es konnte gezeigt werden, dass die Hefeextrakt- und Bio-PolyP-Produktion aus Rapsextrakt möglich und somit die angestrebte Prozesskette von Value-PP (Rapspresskuchen -> Extraktion des Orthophosphats mittels Phytase -> PolyP-Hyperakkumulation mit *S. cerevisiae* -> Hefeextrakt- oder pure PolyP-Herstellung) funktioniert. Der Prozess konnte anschließend auf den 2000 L Maßstab hochskaliert werden. Um den europaweiten Bedarf an PolyP (11.000 t) zu decken, müssten nur 1/3 der insgesamt 6 mio. t Rapsschrot, die jährlich in Deutschland anfallen, mit dem Value-PP-Prozess verarbeitet werden.

Sechs Projekttreffen fanden statt, an denen alle Projektpartner teilnahmen. Um das übergreifende Ziel von Value-PP zu erreichen, arbeiteten die Projektpartner entlang der Prozesskette in enger Kooperation. SeSaM und AG Schwaneberg hielten durch regelmäßige Meetings Kontakt. SeSaM stellte Mutantenbibliothek der Phytase her und die AG Schwaneberg führte die Durchmusterung und die Validierung durch. Zusätzlich produzierte SeSaM die Phytase, vor allem die optimierte Phytase, in großem Maßstab und nutzte das produzierte Enzym für Lagerstabilitätsstudien. Die AG Schwaneberg versorgte die AG Blank mit Rapspresskuchen-Extrakt. Budenheim ermöglicht die Übertragung der Produktion des polyphosphat-reichen Hefeextrakts, die von der AG Blank im Labormaßstab entwickelt wurde, in den technischen Maßstab.

Die für Value-PP gesetzten Ziele konnten erreicht und sogar übertroffen werden. Das mit einer akademischen Idee gestartete Projekt konnte zu einem funktionierenden Prozess entwickelt werden, der im 2000 L Maßstab letztlich durchgeführt wurde und mit Applikationstest abgeschlossen wurde. Der überaus erfolgreiche Verlauf des Projektes spiegelt sich in der Veröffentlichung von sieben Forschungsartikeln, zwei Übersichtsartikeln und eines Buches wider. Zwei Vorträge und sechs Posterpräsentationen wurden gehalten. Zudem wurden drei Patente angemeldet und folgende Projekte beantragt und gefördert.

5 Anlass und Zielsetzung des Projekts

Phosphor ist ein unersetzbares Element für alle Lebewesen. Der weltweite Phosphatzyklus beginnt mit dem Abbau von Phosphaterz, für Europa überwiegend in Marokko. Über mehrere Zwischenstufen wird das Phosphat nach der Anwendung verbraucht und zum größten Teil in das Meer ausgewaschen. Erst nach Millionen von Jahren bilden sich die Phosphaterz-Vorkommen erneut. Die weltweiten Phosphaterzvorkommen werden nur noch für 300 bis 400 Jahre ausreichen¹. Strategien für eine nachhaltige Phosphatnutzung und Verfahren zur Rückgewinnung von Phosphat aus ungenutzten Phosphat-Abfallströmen müssen daher entwickelt werden. Das übergreifende Ziel von Value-PP war die Entwicklung eines Prozesses zur Produktion drei neuer Produkte (phytat-abgereicherter Rapspresskuchen, polyphosphat-reicher Hefeextrakt und Bio-Polyphosphat) aus einem ungenutzten Phosphat-Abfallstrom (Rapspresskuchen). Rapspresskuchen entsteht als Abfallprodukt bei der Pressung von Rapssamen. Jährlich werden in Deutschland ca. 6 Mio. t Rapspresskuchen erzeugt. Phosphor liegt mit ca. 1 % (m / m), gebunden als Phytat, im Rapschrot vor.

Der Beginn des Projekts ValuePP hat sich für die AG Blank und Budenheim vom 1. Januar 2017 auf den 1. März 2017 verschoben. Das Projekt begann für die AG Schwaneberg und SeSaM am 1. Oktober 2017. Die Suche eines Lohnproduzenten für die Herstellung von polyphosphat-reichem Hefeextrakt hat die Durchführung der Arbeitspakete (AP) von Budenheim verzögert. Aufgrund des verzögerten Beginns und der verspäteten Hefeextraktproduktion wurde das Projektende durch eine kostenneutrale Verlängerung vom ursprünglichen Abschlussdatum (30.04.20) auf den **31. Oktober 2020** verschoben. In diesem Abschlussbericht wird der Value-PP-Prozess vorgestellt und die erlangten Ergebnisse präsentiert und diskutiert.

6 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Die vier Projektpartner sind die AG Schwaneberg, die AG Blank, SeSaM Biotech und die Chemische Fabrik Budenheim. Abbildung 1 zeigt den schematischen Arbeitsfluss von Value-PP. Das Substrat und die Produkte sind schwarz, und Prozesse rot umrandet. Aufgabe der AG Schwaneberg war das Engineering eines verbesserten Phytase-Enzyms mittels KnowVolution, wobei Mutantenbibliotheken selber produziert aber auch von SeSaM Biotech erhalten wurde. Die AG Schwaneberg entwickelte anschließend zudem einen Prozess zur Freisetzung des im Rapspresskuchen gebundenen Phosphats mit der optimierten Phytase, sowie die auf HPLC-basierende Phytat-Analytik. Das Produkt, phytat-freier Rapspresskuchen' soll als Futtermittel für eine phosphor-kontrollierte Fütterstrategie dienen. Die AG Blank entwickelte eine Fermentation, um die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* maximal mit Polyphosphat aus dem Rapspresskuchen-Extrakt zu beladen. Anschließend entwickelte die AG Blank zwei Downstream-Prozesse, um aus den polyphosphat-reichen Zellen einen polyphosphat-reichen Hefeextrakt und Bio-Polyphosphat zu gewinnen. Polyphosphat-reicher Hefeextrakt kann als Lebensmitteladditiv verwendet werden. Bio-Polyphosphat kann als biologische Alternative des chemisch hergestellten Polyphosphats eingesetzt werden. Zudem entwickelt die AG Blank Methoden zur Quantifizierung und Längenbestimmung von Polyphosphat aus biologischen Proben. Die fertigen Produkte wurden von Budenheim auf ihre Anwendungen hin untersucht.

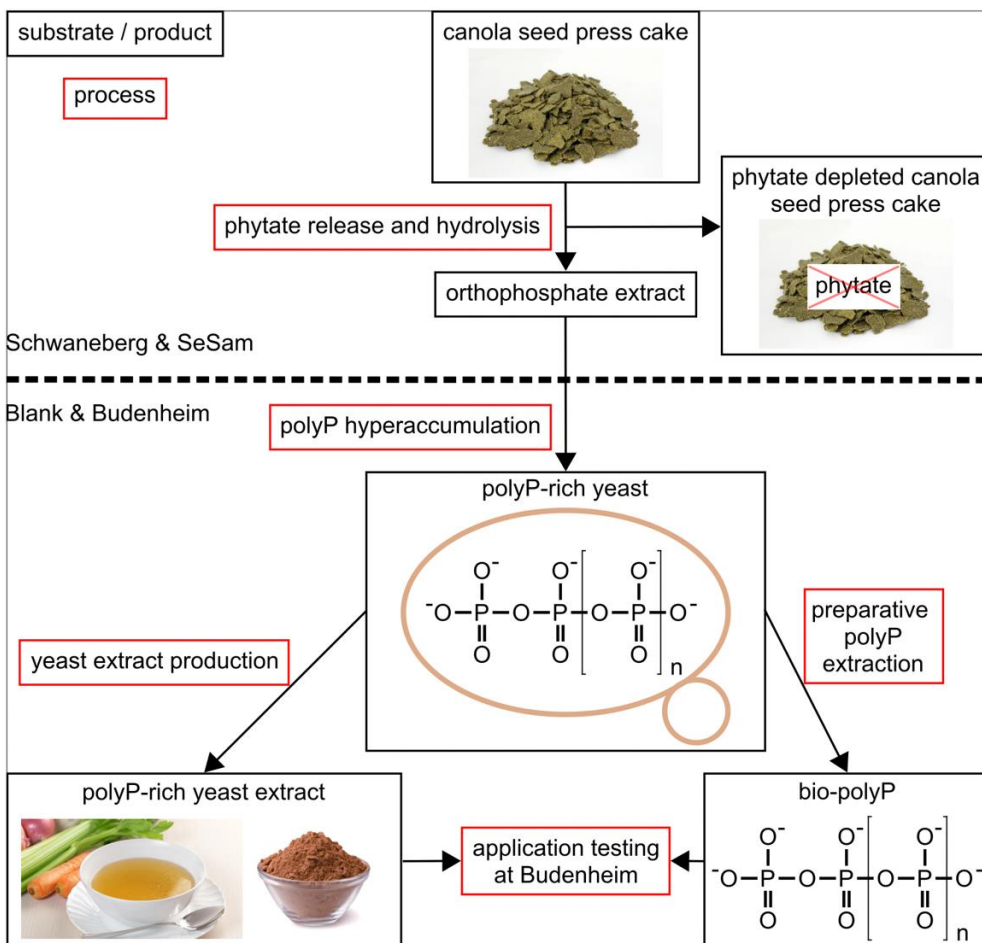


Abbildung 1 Definition des Substrats, der Produkte und der Prozesse von Value-PP.

7 Ergebnisse

7.1 AG Schwaneberg: Arbeitsprogramm 1

Die AG Schwaneberg befasste sich mit der enzymatischen Phosphatfreisetzung aus verschiedenen Rapspresskuchen (heiß oder kalt extrahiert) sowie dem Engineering des Phytase-Enzyms mittels KnowVolution. In dem von uns etablierten Recycling-Verfahren werden unter milden und umweltfreundlichen Reaktionsbedingungen (pH 5, 37 °C) bis zu 24 mg bioverfügbares Phosphat pro Gramm Rapspresskuchen (2,4 %) in Lösung gebracht. Dieses Phosphat kann im folgenden Schritt direkt von der AG Blank (Arbeitspaket 3) als Phosphat-Füttermedium zur Poly-P Akkumulation eingesetzt werden. Der Prozess der enzymatischen Phosphatfreisetzung wurde zum Patent angemeldet (DE 10 2020 200 670.9) und in *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* (2020, 8, 9, 3913–3921) veröffentlicht. Zur Analyse der Effizienz des Prozesses wurden der AMol-Assay (**AP 1.3**) sowie eine HPLC-Analytik erfolgreich etabliert und validiert. Mittels HPLC wurden die Hydrolyseprodukte als Standards bis Inositol-triphosphat aufgereinigt (**AP 1.1**). Für das Protein Engineering (**AP 1.4**) wurden insgesamt über 5500 Klone durchgemustert, wobei mehrere vielversprechende Varianten mit bis zu 3,1-facher Verbesserung der InsP₄-Hydrolyse identifiziert wurden. Zur Durchmusterung und dem Rescreening wurde der AMol-Assay in MTP-Platten statt der 96-Kanal-Kapillarelektrophorese eingesetzt (**AP 1.2**). Computergestützte Analysen (**AP 1.5**) ergaben, dass die zur verbesserten Hydrolyse beitragenden Aminosäure-Austausche häufig an der Substratbindung beteiligt sind. Alle Meilensteine wurden erreicht, wobei in Meilenstein 1 (Assay-Entwicklung) die Strategie angepasst werden musste, aber letztendlich erfolgreich war.

Tabelle 1 Fortschritte in den Arbeitspaketen und Meilensteinen der AG Schwaneberg

Arbeitspaket oder Meilenstein	Fortschritte [%]
AP1.1: HPLC Analytik & Standarderstellung	100 %
AP1.2: 96-Kanal-Kapillarelektrophorese-Durchmusterungssystem (wurde durch alternativen Assay ersetzt)	100 %
AP1.3: AMol-Phosphatquantifizierungssystem	100 %
AP1.4: Zwei Runden KnowVolution	100 %
AP1.5: Computergestützte Analyse von Varianten	100 %
MS 1: Analytik (AMol & Kapillarelektrophorese)	100 %
MS 2: Erste Runde KnowVolution	100 %

AP1.1: Etablierung einer HPLC-Analytik zur Detektion von Phytat und seiner fünf Hydrolyseprodukte zum myo-Inositolmonophosphat und Herstellung der Abbauprodukte als Standards.

Die Methode zur HPLC-Analytik von Phytat und seiner Hydrolyseprodukte ist vollständig etabliert. Mit der entwickelten Methode können InsP_3 - InsP_6 gut voneinander separiert werden. Für eine effiziente Auftrennung werden unter 50 % Methanol im Laufpuffer verwendet. Um die Analysezeit zu reduzieren, können Konzentrationen von über 50 % eingesetzt werden. Somit ist eine stete Anpassung an das Probenmaterial möglich (Abbildung 2).

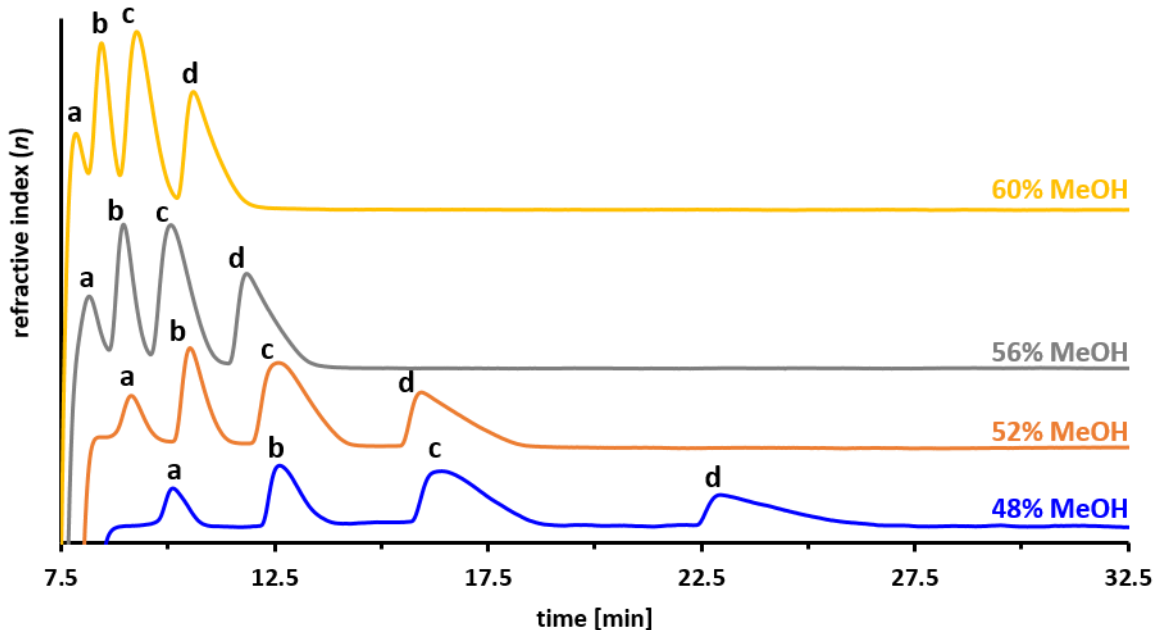


Abbildung 2 Einfluss der Methanolkonzentration im Laufpuffer auf die Separation von InsP_3 (a), InsP_4 (b), InsP_5 (c) sowie InsP_6 (d).

Die HPLC-Analytik wurde im Folgenden eingesetzt, um Rapspresskuchen, welcher als Ausgangssubstrat für die Phosphorrückgewinnung verwendet wurde, qualitativ auf InsP_3 - InsP_5 sowie auch quantitativ von InsP_6 zu untersuchen. Die etablierte Analytik ist nicht nur auf Rapspresskuchen, sondern auch auf andere Phytat-reiche Pflanzenschrote wie Sonnenblume oder Soja anwendbar (Abbildung 3). Insgesamt wurden fünf verschiedene Rapspresskuchen auf ihre Inositolphosphatverteilung untersucht und bei allen Proben waren nur InsP_5 und InsP_6 nachweisbar. Die Extraktionsmethodik zur Entölung der Rapssamen hat einen deutlichen Einfluss auf den InsP_5 -Gehalt: Durch die deutlich härteren Bedingungen während der Heiextraktion (herer Druck und here Temperaturen sowie Hexanbehandlung) im Vergleich zur Kaltextraktion hydrolysiert ein Teil des InsP_6 im spteren Presskuchen bereits zu InsP_5 (siehe Abbildung 3).

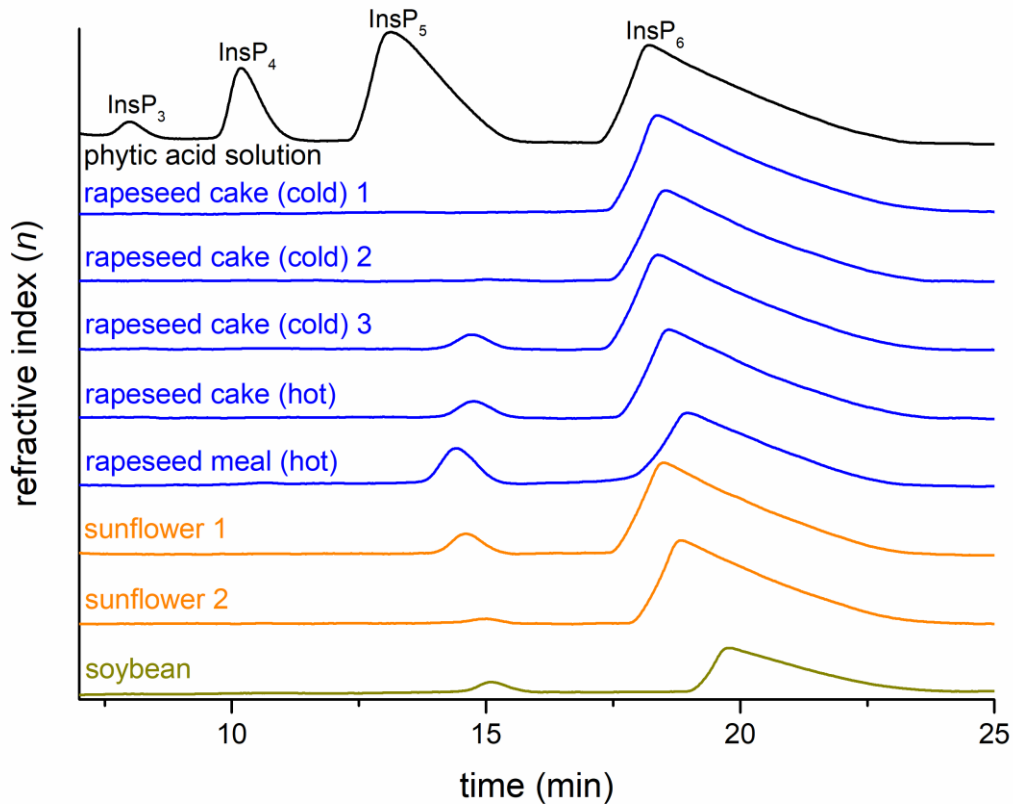


Abbildung 3 HPLC-Analyse der InsP_3 - InsP_6 Verteilung verschiedener Raps- und Sonnenblumenpresskuchen sowie von einem Sojapresskuchen.

Unter Verwendung dieser HPLC-Methodik wurden die Hydrolyseprodukte InsP_3 - InsP_5 anschließend semipräparativ aufgereinigt. Nach Anpassung der analytischen Auftrennungsbedingungen für die semipräparative Aufreinigung wurden die InsP -Isomere der *E. coli* Phytase erfolgreich isoliert (Abbildung 4). Der Doppelpeak für InsP_3 in Abbildung 4 ist auf eine Überladung der Säule zurückzuführen und stellt keine Kontamination dar. Die Herstellung von InsP_2 und InsP_1 als Standards war aufgrund gerätetechnischer Spezifikationen nicht möglich. Insgesamt konnten Standards für InsP_5 , InsP_4 und InsP_3 mit $\geq 90\%$ Reinheit isoliert werden.

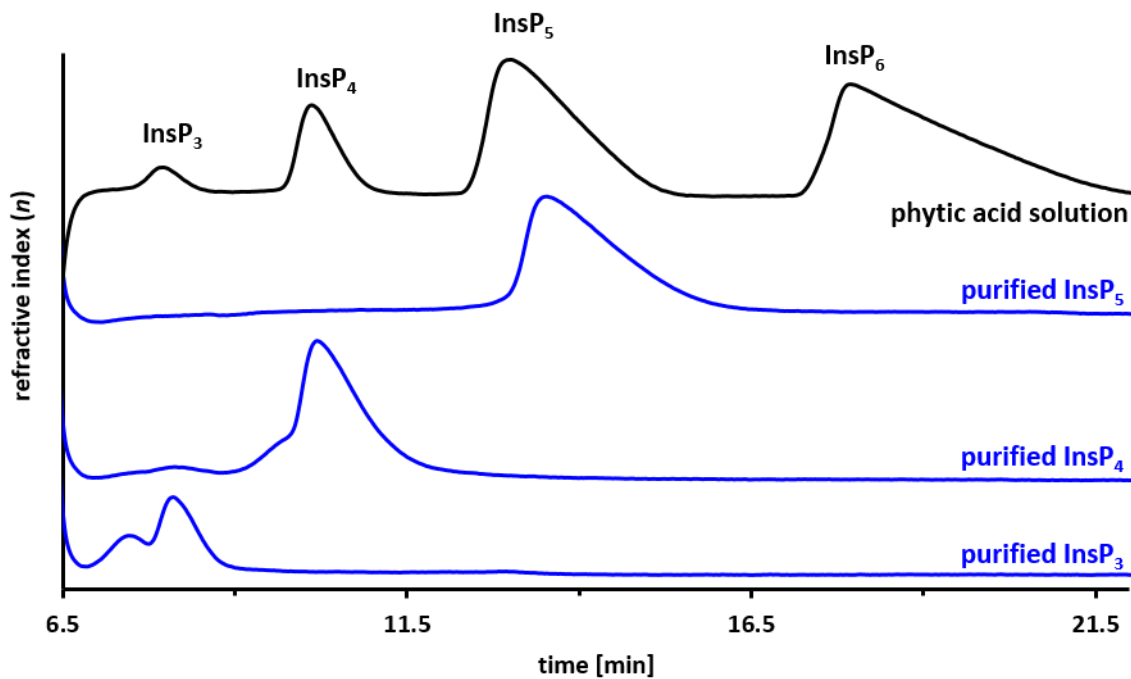


Abbildung 4 Isolation von InsP_5 , InsP_4 und InsP_3 als Standards aus einer enzymatischen Hydrolyse von InsP_6 mittels der *E. coli* Phytase.

AP1.2: Etablierung eines 96-Kanal-Kapillarelektrophorese-Durchmusterungssystems, um Phytasevarianten mit höherer Aktivität für die Hydrolyse von Tri- und Biphosphaten aus Phytat aufzufinden (Rescreening System).

Das AMol-Phosphatquantifizierungssystem (AP1.3) detektiert nur freies Orthophosphat und liefert keine Auskunft über den Hydrolysegrad von InsP_6 zu den kleineren InsPs . Der Vorteil einer multiplexed (96-Kanal-) Kapillarelektrophorese ist die Auftrennung der Inositolphosphate (InsPs) von IP_6 bis IP_1 bei einem gleichzeitigen Durchsatz von einer Mikrotiterplatte (MTP) pro Durchlauf (~2 Stunden für 96 Proben). Dadurch verbindet das 96-Kanal-Kapillarelektrophorese-Durchmusterungssystem die Vorteile der Unterscheidung der InsPs der HPLC (AP1.1, Vergleich Abbildung 2) mit der kurzen Analysezeit des AMol-Systems (AP1.3). Die Detektion mittels UV-Absorption ist jedoch herausfordernd, da die InsPs nicht UV-aktiv sind. Deshalb muss eine indirekte UV-Messung stattfinden, indem ein Puffer verwendet wird der UV-aktive Substanzen enthält. In der Folge wird eine hohe Hintergrundabsorption registriert, die verringert wird wenn die Proben den Detektor passieren (negative Peaks). Die Herausforderung besteht in der Abstimmung der einzelnen Parameter wie pH-Wert, angelegte Spannung, Konzentration der InsPs sowie Konzentration der UV-aktiven Substanz im Puffer.

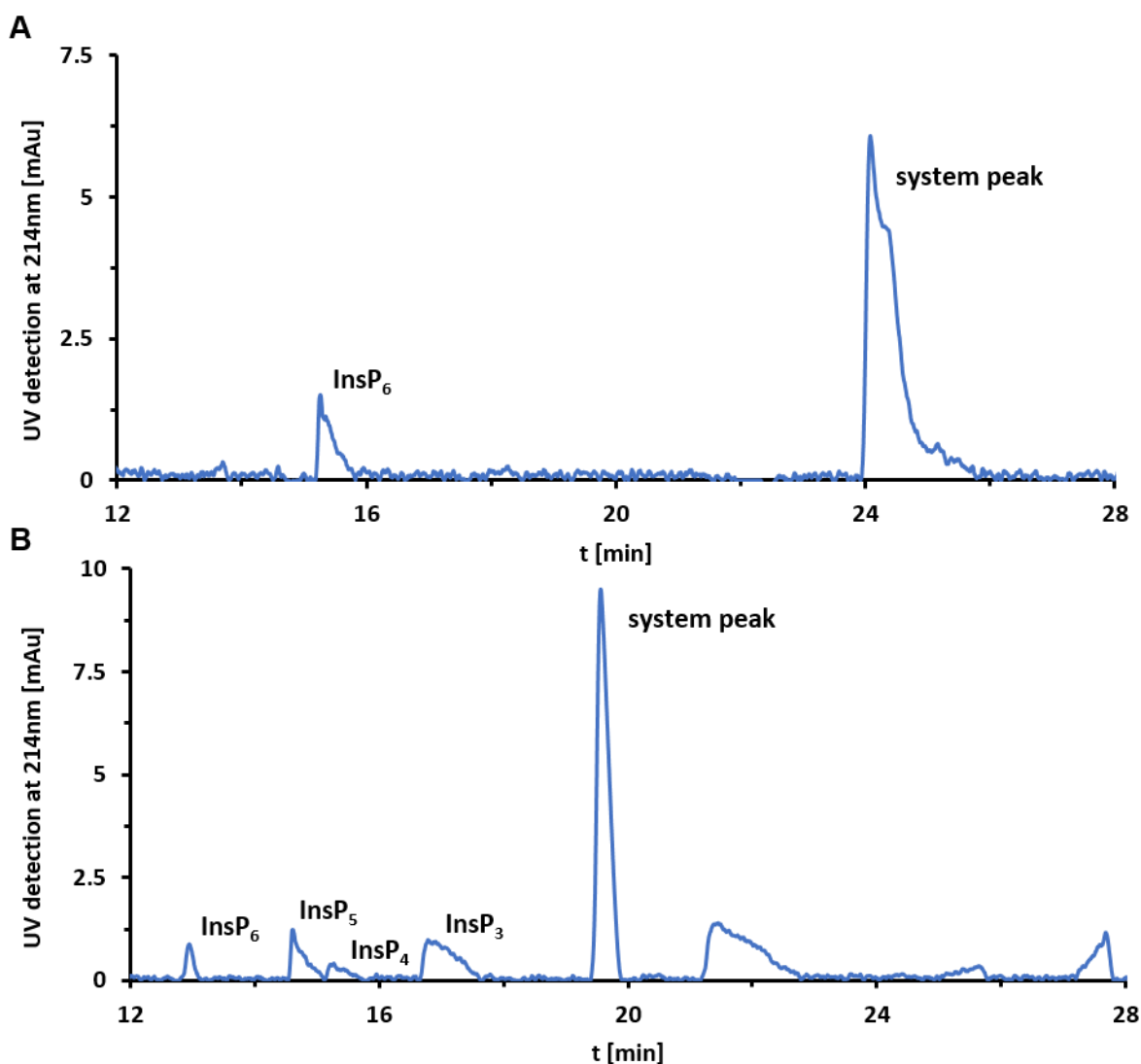


Abbildung 5 Analyse eines InsP_6 Standards gelöst in Wasser (A) sowie einer InsP -Lösung verdünnt in 50 mM NaOAc pH 5-Puffer (B) mittels des Kapillarelektrophorese-Durchmusterungssystems und der indirekten UV-Detektion. Die Zuordnung der Peaks basiert auf der Injektion von verschiedenen Referenzproben und unterschiedlichen Konzentrationen, aber eine absolut ordnungsgemäße Identifizierung kann auf der Grundlage der verfügbaren Daten nicht garantiert werden. Der System-Peak wird durch andere im Elektrolyten vorhandene Ionen (außer dem des Chromophors) verursacht, wenn diese den Detektor erreichen. Die Messergebnisse wurden invertiert, um die gewohnten Signale zu bekommen und nicht mit Negativ-Peaks zu arbeiten.

Die besten Nachweis- und Trennungsergebnisse für InsP_6 und eine Mischung aus InsP_3 - InsP_6 sind in Abbildung 5A und B gezeigt. Elektrolyte, die eine hohe Hintergrundabsorption für den indirekten UV-Nachweis liefern und die aus mehr als einer Komponente bestehen, sind oft anfällig für Systempeaks². Unterschiedliche Migrationszeiten von InsP_6 in der Phytatprobe und der InsP -Lösung sind auf die Verdünnung in Wasser bzw. Puffer zurückzuführen. Injektion unterschiedlicher Mengen der InsP -Lösung macht eine Zuordnung der Peaks wie in Abbildung 5 wahrscheinlich, erhebt aber keinen Anspruch auf absolute Richtigkeit. Möglicherweise enthält die InsP -Lösung auch InsP_2 und InsP_1 , was die Signale nach dem Systempeak erklären würde. Eine Bestätigung dieser Theorie ist aber nicht möglich, weil wir mit unserer HPLC-Analytik nur InsP_3 - InsP_6 darstellen können (Vergleich Abbildung 2). Ob die InsP -Lösung somit InsPs kleiner als InsP_3 enthält, bleibt damit spekulativ.

Der Machbarkeitsnachweis zur Auftrennung von InsPs mittels multiplexed (96-Kanal-) Kapillarelektrophorese wurde erfolgreich erbracht (Abbildung 5), allerdings wurde von einer weiteren Optimierung der Nachweis- und Trennungsergebnisse abgesehen. Der Hersteller der 96-Kanal-Kapillarelektrophorese *Advanced Analytical Technologies* wurde von *Agilent Technologies* aufgekauft und das Gerät sowie alle seine Verbrauchsmaterialien in der Folge eingestellt. Als sehr gute Alternative stand der AMol-Assay (AP1.3) als Rescreening-System zur Verfügung. Dieser liefert zwar keine Informationen über den Abbaugrad von InsP₆, sondern gibt „lediglich“ Auskunft über die Menge an freigesetztem Phosphat. Wird aber statt InsP₆ das in AP1.1 isolierte InsP₄ als Substrat für den Assay verwendet (Vergleich Abbildung 4), können trotzdem Varianten mit verbesserter InsP₄-Hydrolyse identifiziert werden, ohne den Abbaugrad kennen zu müssen. Mit diesem Assay war eine erfolgreiche KnowVolution Kampagne (AP1.4) möglich.

AP1.3: Anpassung des AMol-Phosphatquantifizierungssystems auf die *E. coli* Phytase und Applikationsbedingungen in Schrotsuspensionen (pH, Temperatur, Schrotinhaltsstoffe).

Das bereits von der AG Schwaneberg publizierte AMol-Phosphatquantifizierungssystem wurde auf die Phosphatextraktionsbedingungen in Rapspresskuchen angepasst. Es wurden sowohl Proben mit unterschiedlicher Herkunft (Teutoburger Ölmühle, Ölmühle Brökelmann, Henry Lamotte Bremen) als auch unterschiedlicher Vorbehandlung (unbehandelte Rapsamen, heiß und kalt extrahierter Rapspresskuchen sowie Rapspresskuchen als fertiges Futtermittel) auf die Möglichkeit der Phosphatrückgewinnung analysiert. Eine Quantifizierung des Pflanzenmaterials ist möglich, da die bei der Analyse störenden Substanzen durch extra Zentrifugationsschritte bei 4 °C vorher entfernt werden. Zudem wird der pH-Wert vor der Analytik mit einem Natriumacetatpuffer auf pH 5 eingestellt. Der lineare Bereich des AMol-Phosphatquantifizierungssystem ist in Abbildung 6 gezeigt und liegt im Bereich von 10-500 µM Phosphat.

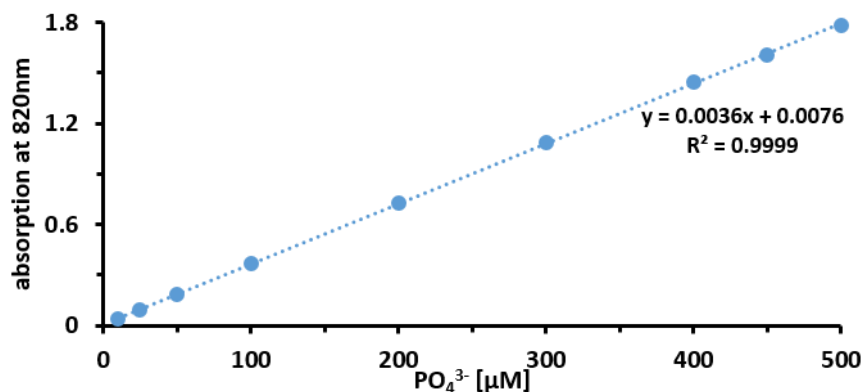


Abbildung 6 Das AMol-Phosphatquantifizierungssystem ist hervorragend für den Phosphatnachweis zwischen 10-500 µM geeignet.

Mit Hilfe des AMol-Phosphatquantifizierungssystems wurde das Potential der Phosphatrückgewinnung aus Rapspresskuchen bestimmt. Es gilt dabei zu beachten, dass nicht Phytat, die hauptsächliche Phosphatlagerungsform in Pflanzensamen, direkt gemessen wird, sondern freies Orthophosphat (PO_4^{3-}), welches an die Kooperationspartner der AG Blank für die Phosphathyperakkumulation in Hefen übergeben wird. Für die Analyse muss das Phytat jedoch zuerst aus dem Pflanzenmaterial isoliert werden, um es anschließend mit Phytasen in freies Orthophosphat umwandeln zu können. In der Literatur wird zur Phytatextraktion aus Pflanzenmaterial eine HCl-Extraktion angewendet. Um die Zugabe starker Säuren zu vermeiden, wurde mit einer direkten Phytasezugabe zum Pflanzenmaterial experimentiert. Nach einigen Anpassungen der Bedingungen konnten bis zu $24,5 \text{ mg} \pm 1,8 \text{ mg PO}_4^{3-}$ (2,5 %) pro Gramm Rapspresskuchen mit dieser Methode extrahiert werden (Abbildung 7). Die Vermeidung der stark ätzenden Chemikalie HCl sowie die Vorteile bei der weiteren Veredelung des freien Orthophosphats machen diese Extraktionsform in der bei Value-PP angestrebten Prozesskette zur bevorzugten Methode. Zudem ist das phosphat-abgereicherte Pflanzenmaterial weiterhin als Tierfutter verwendbar, wodurch diese Wertschöpfungskette weiterhin erhalten bleibt. Bei dem bisher bestimmten Potential bleibt zu Bedenken, dass das Ausgangsmaterial ein Rohstoff ist und somit natürlichen Schwankungen unterliegt, was durch die unterschiedlichen Phosphatgehalte in den Proben offensichtlich wird. Je nach Herkunft, Lagerungszeit und -bedingungen können unterschiedliche Phytatmengen vorliegen.

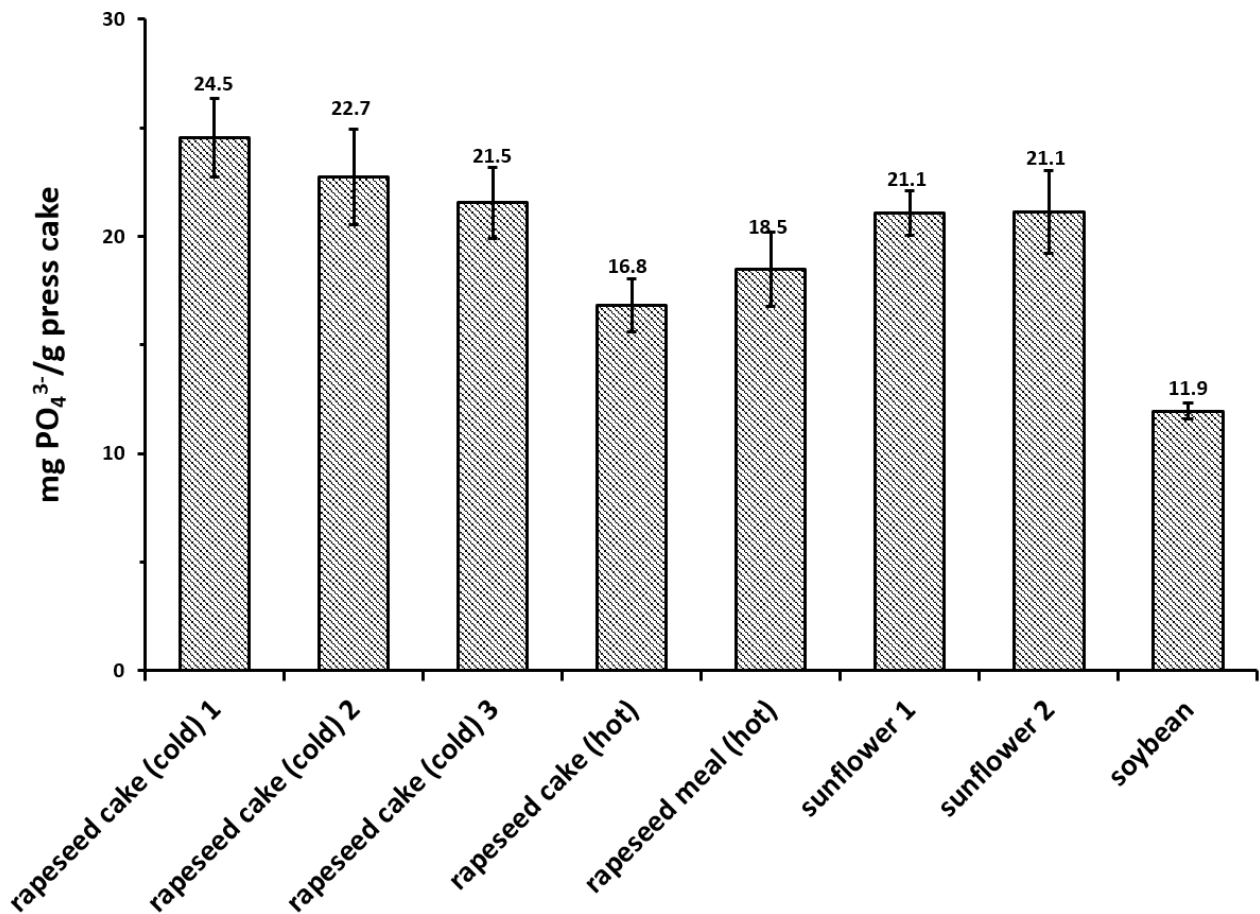


Abbildung 7 Phosphatextraktionsausbeuten von bis zu 2,5 % der Masse können durch direkte Phytasezugabe zu verschiedenen Presskuchen erreicht werden.

Zur Darstellung des Value-PP Prozesses (Presskuchen → Phosphat → PolyP) wurde in Zusammenarbeit mit der AG Blank ein Gemeinschaftsexperiment durchgeführt. Die AG Schwaneberg hat die Phosphatextraktion aus Presskuchen mittels direkter Phytasezugabe durchgeführt und den phosphathaltigen Reaktionsüberstand der AG Blank zur PolyP-Akkumulation in Hefe bereitgestellt. Die Phosphatextraktionsausbeuten verschiedener Presskuchen sind in Abbildung 8 gezeigt. Durch Optimierung der Extraktionsbedingungen konnte die Phosphatausbeute signifikant gesteigert werden (z.B. von „rapeseed meal (hot)“ von 18,5 mg auf 27,2 mg, +47 %; Vergleich Abbildung 8 zu Abbildung 8). Aus Weizen- oder Reisschalenkleie lässt sich fast doppelt so viel Phosphat zurückgewinnen wie aus Rapspresskuchen.

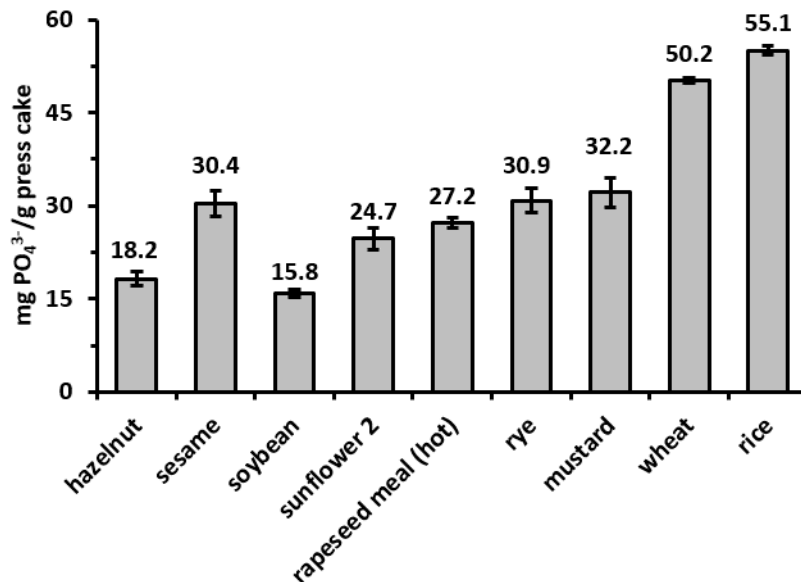


Abbildung 8 Phosphatextraktionsausbeuten verschiedener Pflanzennebenprodukte (Presskuchen oder Kleie), wovon der phosphathaltige Überstand anschließend von der AG Blank zur PolyP-Akkumulation in Hefe genutzt wurde.

AP1.4: Protein Engineering in zwei Runden KnowVolution unter Verwendung der SeSaM-Zufallsmutagenesebibliotheken, um Aktivität und Spezifität der *E. coli* Phytase für Phytat zu erhöhen.

Für das Protein Engineering der *E. coli* Phytase wurde eine KnowVolution Kampagne durchgeführt, die den Rahmen für ein zielgerichtetes und effizientes Vorgehen bietet. Als eine kritische Eigenschaft der *E. coli* Phytase für die effiziente Anwendung im Phosphor-Recyclingprozess, der in diesem Projekt entwickelt wurde (AP1.3), wurde der Abbau niederer InsPs identifiziert. Die Hauptspeicherform von Phosphor in Pflanzenzellen ist Phytat (InsP₆), welches 6 Phosphatgruppen am Zuckergrundgerüst trägt. Die spezifische Aktivität der *E. coli* Phytase für InsP₆ als Substrat ist mit etwa 1000 U/mg extrem hoch^{3,4}, weshalb dieses Enzym auch als Startpunkt für die Evolutionskampagne ausgewählt wurde. Nach Hydrolyse der ersten beiden Phosphate reduziert sich die Aktivität für das dann neue Substrat InsP₄ drastisch auf etwa 15 % der Aktivität von InsP₆⁵. Hier wollen wir mit dem Protein Engineering ansetzen und die Aktivität für InsP₄ erhöhen, um eine effizientere Phosphorrückgewinnung zu ermöglichen.

Im Rahmen der KnowVolution wurden 2 Strategien verfolgt, um eine möglichst hohe Diversität zu erzeugen und verbesserte Varianten zu identifizieren. Dafür wurden zum einen drei klassische epPCR Bibliotheken erzeugt, die unterschiedliche Mutationsfrequenzen (0,2-0,5 mM Manganchlorid (MnCl₂)) aufwiesen. Je höher die MnCl₂-Konzentration ist, desto wahrscheinlicher sind Mutationen im Gen und desto diverser ist die erzeugte Mutantenbibliothek. Zum anderen wurden drei Bibliotheken von der SeSaM Biotech erhalten, die mittels eines modifizierten epPCR Protokolls erzeugt wurden. Zum Screening wurde der mittels HPLC aufgereinigte InsP₄ Standard (AP1.1) verwendet.

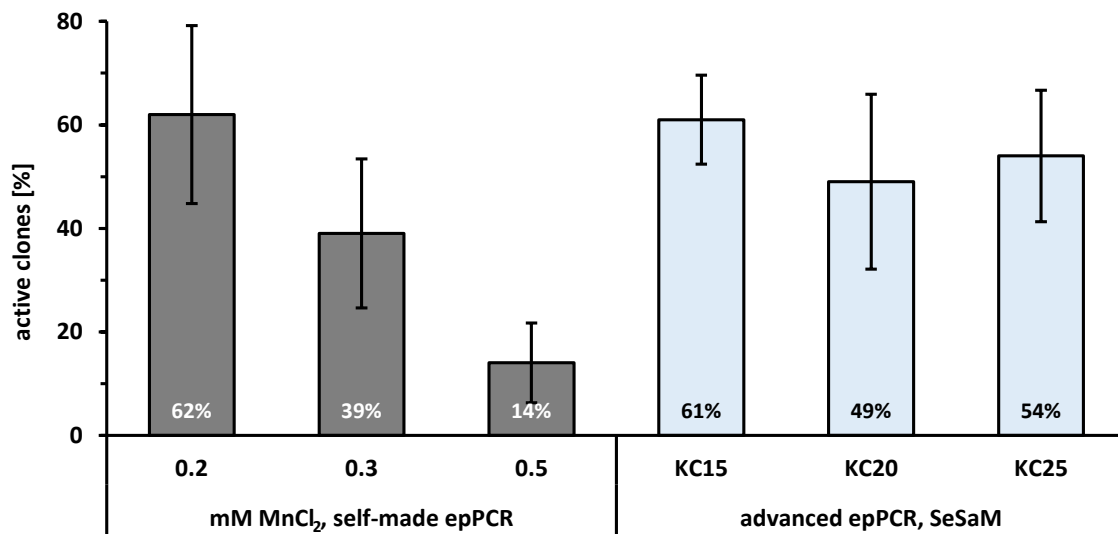


Abbildung 9 Prozentualer Anteil der aktiven Varianten von den verschiedenen Mutanten-Bibliotheken, die mit dem AMol-Assay für die Hydrolyse von InSP₄ ermittelt wurden.

In Abbildung 9 wird ersichtlich, dass bei den selbst erzeugten epPCR Bibliotheken die Mutationsfrequenz mit zunehmender MnCl₂-Konzentration zunimmt, da der Anteil aktiver Klone abnimmt. Mit zunehmender Mutationsfrequenz steigt die Wahrscheinlichkeit, dass auch für die Funktion des Enzyms wichtige Positionen mutiert werden, sodass eine inaktive Variante erzeugt wird. Aus diesem Grund ist eine Feinabstimmung der Mutationsfrequenz wichtig, um eine ausgewogene Balance zwischen aktiven und inaktiven Varianten zu erhalten. In der Regel wird eine Rate von 40-60 % aktiver Klone für gerichtete Evolution angestrebt. Die von SeSaM erzeugten Bibliotheken bewegten sich alle in diesem Bereich und wurden deshalb alle für das Screening ausgewählt. Das Zustandekommen der prozentualen Verteilung in Abbildung 9 ist für einzelne Platten nochmal exemplarisch in Abbildung 10 gezeigt. Die rot gepunktete Linie repräsentiert den Grenzwert für die Einstufung von Klonen als verbessert. Bei 0,2 mM MnCl₂ (Abbildung 10A) weisen die meisten Varianten eine Aktivität wie der Wildtyp auf, wohingegen bei 0,5 mM MnCl₂ (Abbildung 10B) ein Großteil der Varianten inaktiv sind.

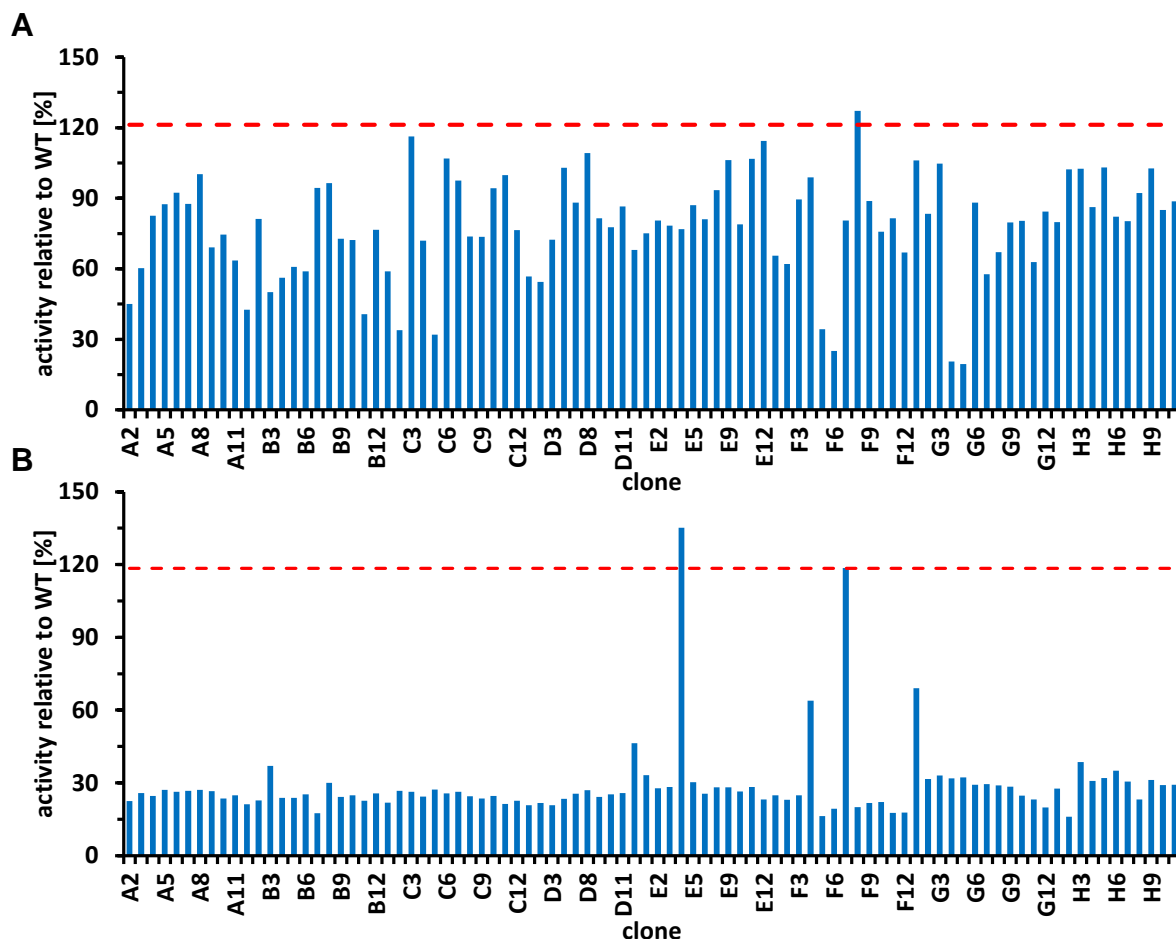


Abbildung 10 Beispiel einer Platte, die das typische Screening-Ergebnis für epPCR-Bibliotheken mit 0,2 mM (A) oder 0,5 mM (B) MnCl_2 darstellt. Die Aktivität wurde anhand der Fähigkeit zur Hydrolyse von InsP_4 unter Verwendung des AMol-Assays gemessen. Die rot gepunktete Linie repräsentiert den Schwellenwert für die Klassifizierung von Klonen als verbessert.

Varianten, die eine Aktivität oberhalb der rot gepunktete Linie aufwiesen, wurden in Mehrfachbestimmung analysiert (Rescreening), um die potentielle Aktivitätsverbesserung zu bestätigen. Die besten Varianten wurden anschließend sequenziert und sind in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** aufgelistet. Die Kristallstruktur der *E. coli* Phytase sowie die für die Substratbindung verantwortlichen Aminosäuren im aktiven Zentrum sind bekannt⁶. Substitutionen im aktiven Zentrum sind in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** in Rot hervorgehoben.

Tabelle 2 Zusammenfassung der aktivsten Varianten für der Hydrolyse von InsP_4 . Zusätzlich zur relativen Verbesserung im Vergleich zum Wildtyp sind die Substitutionen sowie der Ursprung der Variante (Strategie 1 oder Strategie 2) angegeben. In fett hervorgehoben sind Substitutionen, die an der Substratbindung beteiligt sind.

Variante	Substitution(en)	Bibliothek	Relative Verbesserung für InsP_4
CB30 H9	K24M , G228D	0.2 mM MnCl_2	2.5
CB51 G8	P173T, E197D, R267S	KC25	2.4

CB32 F8	M216D , Q346R, M360V, Q388R	0.2 mM MnCl ₂	2.3
CB20 F1	K24G , H113A, E165G, K199R, E231D, S266P, G395A	0.3 mM MnCl ₂	2.3
CB19 G6	T23I , M216T , I348V	0.2 mM MnCl ₂	1.9
CB30 H10	L145F, K199M	0.2 mM MnCl ₂	1.4
CB51 F5	A138V, L379M	KC25	1.2
CB41 E2	N326D	0.3 mM MnCl ₂	1.2
CB24 B12	K75N, V350I	KC15	1.2
CB44 D9	T39S, S240F	KC15	1.1

Es wurden insgesamt fünf Varianten identifiziert, die eine um bis zu 2.5-fach verbesserte Hydrolyse von InsP₄ aufwiesen. Es fällt auf, dass die fünf besten Varianten alle mindestens eine Substitution im aktiven Zentrum aufweisen. Dies ist plausibel, weil die Aktivität für das Substrat InsP₄ verbessert werden soll und daher vorteilhafte Substitutionen im aktiven Zentrum sehr wahrscheinlich sind. Die erste Phase der KnowVolution-Kampagne wurde mit dem Screening von über 4500 Klonen und der Identifizierung von Varianten mit verbesserter Hydrolyse von InsP₄ bis zu 2,5-fach im Vergleich zum Wildtyp sehr erfolgreich abgeschlossen. Die gewonnenen Daten waren zentraler Bestandteil zur Planung der zweiten Phase.

Bei der Auswahl der Positionen, auf die die Site-saturation-Mutagenese (SSM) in der zweiten Stufe der KnowVolution angewendet wurde, wurden die Ergebnisse der gerichteten Evolution (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), die Bindungssituation im aktiven Zentrum⁷ und Literaturberichte über eine erhöhte Aktivität der *E. coli* Phytase berücksichtigt. Das Screening der epPCR-Bibliotheken ergab die Positionen T23, K24, M216 und R267 in Varianten mit den höchsten Verbesserungen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, rot hervorgehoben), die alle an der Substratbindung beteiligt sind. Durch visuelle Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen InsP₆ und den Aminosäuren der *E. coli* Phytase in der Bindungstasche und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Phosphate in einer bestimmten Reihenfolge abgespalten werden, wurden die Positionen T92 und T305 ausgewählt⁸, identifizierten die Varianten K24E und K43E, K75M, S187G (in der ursprünglichen Zählweise K46E und K65E, K97M, S209G aufgrund unterschiedlicher Nummerierung) mit einer verbesserten katalytischen Aktivität für InsP₆. Da K75 auch in der Variante CB24 B12 auftrat, wurde diese Position ebenfalls mittels SSM saturiert. Insgesamt wurden sieben Positionen (T23, K24, K75, T92, M216, R267, T305) als Ziele für eine SSM ausgewählt, wobei für die Saturierung NNK Primer verwendet wurden. Folglich wurde jede der sieben Positionen mit allen 21 proteinogenen Aminosäuren saturiert, um für jede Position die beste Aminosäure für den effizienten Abbau von InsP₄ zu identifizieren. Um statistisch jede der erzeugten Mutanten zu analysieren, wurden insgesamt über 1250 Klone gescreent. Die Varianten mit einer um

mindestens 1,5-fach verbesserten InsP₄-Hydrolyse im Vergleich zum Wildtyp sind in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3 Übersicht der 13 besten Phytasevarianten mit verbesserter InsP₄-Hydrolyse, die beim Screening der SSM-Bibliotheken identifiziert wurden.

Substitution	Relative Verbesserung für InsP ₄
R267E	3.1
R267G	3.0
R267S	2.6
M216D	2.2
M216D	2.1
T305S	2.0
R267T	1.9
K24V	1.8
M216D	1.8
K24S	1.7
T305L	1.5
K24S	1.5
K24A	1.5

Die Saturierung der vier Positionen K24, M216, R267 und T305 führte zu verbesserten Varianten. Einige der in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** identifizierten Substitutionen wurde bei den SSM-Experimenten wiedergefunden, wie z.B. M216D oder R267S. Die relative Verbesserung dieser Einzelmutanten (Tabelle 3) entspricht der Verbesserung der Mehrfachmutanten (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) woraus geschlussfolgert werden kann, dass diese Mutation hauptsächlich für die gesteigerte Hydrolyserate von InsP₄ bei den Mehrfachmutanten verantwortlich ist. Zusätzlich haben die SSMs andere Substitutionen zum Vorschein gebracht die mittels epPCR nicht gefunden wurden, wie beispielsweise R267E oder R267G. Die beim Screening von über 1250 Klonen gefundenen Aminosäuresubstitutionen bewirken eine Verbesserung von bis zu 3,1-fach im Vergleich zum Wildtyp, was eine weitere Aktivitätssteigerung darstellt (vormals bis zu 2,5-fach bei Variante CB30 H9).

Nach computerunterstützter Analyse der bisherigen Verbesserung unter Berücksichtigung der jeweiligen Substitutionen und Analyse der Bindungsverhältnisse im aktiven Zentrum der *E coli*

Phytase (3. Stufe der KnowVolution, siehe AP1.5) wurden mehrere Rekombinationsexperimente durchgeführt. Dabei konnten keine OmniChange Bibliotheken erstellt werden, weil dazu eine räumliche Nähe der zu verändernden Aminosäuren gegeben sein muss. Aufgrund der Tatsache, dass die identifizierten Positionen nahezu auf das gesamte Protein verteilt sind (K24, M216, R267 und T305) wurden stattdessen mehrere Ortssättigungsmutagenesen (SDMs) durchgeführt. Keine der dabei generierten Varianten wies dabei eine Verbesserung der Hydrolyseaktivität von $\text{InsP}_4 > 3$ im Vergleich zum Wildtyp auf. Zusammenfassend haben die beiden Strategien der Diversitätsgenerierung in der KnowVolution-Kampagne und das Screening von über 5500 Klonen die Variante R267E hervorgebracht, die eine verbesserte Hydrolyseaktivität von InsP_4 im Vergleich zum Wildtyp > 3 aufweist.

AP1.5: Computerunterstützte Analyse um Aktivitäts- und Spezifitätsänderungen auf molekularer Ebene zu erklären

Das Protein Engineering der *E. coli* Phytase für eine erhöhte Hydrolyserate von InsP_4 mittels der mehrstufigen KnowVolution Strategie hat mehrere Positionen hervorgebracht, bei denen eine Aminosäuresubstitution eine um bis zu 3,1-fach erhöhte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bewirkt (Tabelle 3). Zu den Positionen mit großer Substitutionswirkung gehören T23, K24, M216 und R267 (siehe auch **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Diese vier Aminosäuren sind alle im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisiert und an der Substratbindung beteiligt. Ihre Lage bei gebundenem Substrat (InsP_6) ist in Abbildung 11 in Rot hervorgehoben.

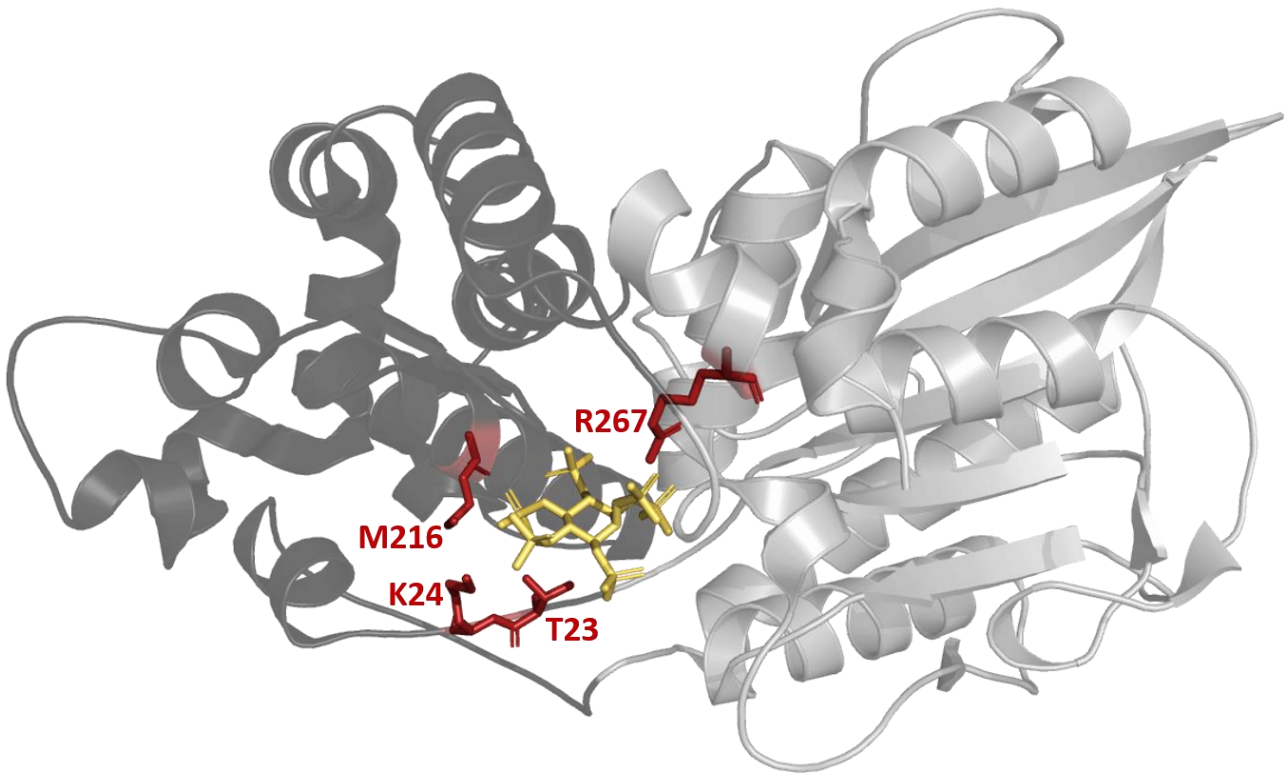


Abbildung 11 Computergestützte Darstellung der Proteinstruktur der *E. coli* Phytase und die Lage des Substrats InsP_6 in der aktiven Bindetasche. Positionen, an denen Substitutionen eine signifikante Erhöhung der Hydrolyseaktivität von InsP_4 bewirkt haben, sind in Rot hervorgehoben (T23, K24, M216 und R267).

Die Tatsache, dass Substitutionen in der Bindungstasche die Aktivität für das Substrat beeinflussen erscheint plausibel, insbesondere wenn man die unterschiedlichen Ladungen von InsP_6 und seinen Abbauprodukten berücksichtigt. Während InsP_6 unter physiologischen Bedingungen (moderaten pH-Werten von > 4) eine Nettoladung von -12 besitzt, hat InsP_4 nur eine Nettoladung von -8 und die Bindungstasche muss diesen signifikanten Veränderungen gerecht werden. Aminosäuren, die an der Bindung von Phytat in der Bindungstasche der Phytase beteiligt sind, sind überwiegend positiv geladen oder polar, um das stark negative InsP_6 anzuziehen und präzise zu fixieren. Die Varianten mit den höchsten Verbesserungen für die InsP_4 -Hydrolyse ersetzen positive Ladungen durch unpolare Aminosäuren (z.B. K24M oder K24G) oder führen sogar negativ geladene Aminosäuren in die Bindungstasche ein (M216D). Dadurch wird der geringeren Nettonegativladung von InsP_4 im Vergleich zu InsP_6 Rechnung getragen und die Aktivität der Variante für InsP_4 erhöht. Insgesamt werden bei den am stärksten verbesserten Varianten die Ladungen drastisch geändert oder sogar umgekehrt, wie die am höchsten verbesserte Variante R267E zeigt (Tabelle 3): Die positiv geladene Aminosäure Arginin wird durch die negativ geladene Aminosäure Glutaminsäure ersetzt.

7.2 SeSaM: Arbeitsprogramm 2

Projektstatus

Der offizielle Projekt-Start von Value-PP war der 01.01.2017, die Arbeiten durch die SeSaM-Biotech GmbH begannen am 01.10.2017, was eine Verschiebung der Meilensteine 3 und 4 auf den

31.10.2018 bzw. 31.10.2019 bewirkte (+ 9 Monate). Das Arbeitsprogramm der SeSaM-Biotech GmbH ist in fünf Teile aufgeteilt, wobei AP 2.1 – 2.5 bis zu dem vorliegenden Statusbericht bearbeitet wurden (Tabelle 4). **Sämtliche Arbeiten** verliefen erfolgreich.

Einleitung

Im Rahmen des Projekts Value-PP ist die SeSaM-Biotech GmbH für das zweite Arbeitsprogramm verantwortlich, welches der Herstellung von Phytase-Variantenbibliotheken sowie insbesondere der effizienten Produktion der *E. coli* Phytase mittels Schüttelkolben und Fermentern dient.

Tabelle 4 Fortschritte in den Arbeitspaketen und Meilensteinen der SeSaM-Biotech GmbH

Arbeitspaket oder Meilenstein	Grad der Bearbeitung	
	SOLL*	IST
AP2.1: Generierung von zwei Mutantenbibliotheken der <i>E. coli</i> Phytase	100 %	100 %
AP2.2: Produktion der <i>E. coli</i> Phytase mittels <i>P. pastoris</i>	100 %	100 %
AP2.3: Optimierung der Produktion zur Erhöhung des Phytase-Titers	100 %	100 %
AP2.4: Scale-up der Produktion (Start: Sep. 2018), Erweitertes Benchmarking	100 %	100 %
AP2.5: Untersuchung der Prozess- und Lagerstabilität der <i>E. coli</i> Phytase	100 %	100 %
MS 3: Performance der Phytase wurde in Schrotsuspension untersucht und ein Mindestreinheitsgrad wurde definiert (Monat 13)	100 %	100 %
MS 4: Produktionsprozess der Phytase ist im Fermenter etabliert (Monat 25)	100 %	100 %

*SOLL ist der geplante Arbeitsfortschritt gemäß GANTT-Diagramm für AP2

Strategie der bisherigen Arbeitspakete

Für den Projektpartner AG Schwaneberg werden für beide KnowVolution-Runden Variantenbibliotheken mittels der epPCR- und der „Advanced“-epPCR-Technologie alternativ zur patentierten SeSaM-Technologie erstellt, um effizient Aminosäurepositionen zu identifizieren, die Aktivität, Selektivität und Prozessstabilität der Phytase verändern können (AP 2.1). Im AP 2.2 wurde die Produktion der *E. coli* Phytase von *E. coli* als Produktionsstamm auf *Pichia pastoris* umgestellt und etabliert, womit AP 2.2 erfolgreich abgeschlossen ist. In AP 2.3 wird das Expressionssystem optimiert, um den Phytase-Titer insbesondere für die fermentative Produktion noch weiter zu

erhöhen. Hierzu werden u. a. neue Plasmidsysteme zur Expressionsstabilität, sowie verschiedene Signalpeptide zur Sekretion (z. B. α -mating factor, S1) und durch „Engineering“ modifizierte Signalpeptide getestet. Im Rahmen des AP 2.4 wurde bereits die Produktion in UltraYield Flask untersucht und für ein erweitertes „Benchmarking“ werden Alternativphytasen getestet. Nach der Wahl einer Phytasevariante durch den Partner AG Schwaneberg wird die Produktion im Fermenter etabliert, wobei das allgemeine Protokoll zur Fermentierung von *P. pastoris* bereits erfolgreich etabliert wurde und die Bedingungen für *P. pastoris* getestet wurden.

Status der Arbeitspakete

AP 2.1 – Generierung einer SeSaM-Bibliothek der *E. coli* Phytase

Die Erstellung einer SeSaM-Bibliothek der *E. coli* Phytase wurde nach fünf vergeblichen Anläufen eingestellt. Die parallel erstellte alternative epPCR-Bibliothek der *E. coli* Phytase wurde aufgrund zu geringer Effizienz durch die „Advanced“-epPCR-Bibliothek ersetzt. Diese wurde bereits im initialen Screening getestet und zur weiteren Validierung an AG Schwaneberg weitergegeben.

Im Detail: Begonnen wurde mit der Generierung einer SeSaM-Bibliothek des *E. coli* Gens, welches die Phytase AppA kodiert, mittels des originalen SeSaM-Protokolls. Nachdem insgesamt fünf Durchläufe mit dem originalen SeSaM-Protokoll und mit dem neu erstellten Prototyp des SeSaM-Pro Protokolls fehlschlugen, wurden eine alternative epPCR-Bibliothek und „Advanced“-epPCR-Bibliothek generiert. Die epPCR-Bibliothek ergab keinen Hit, wobei die „Advanced“-epPCR-Bibliothek bereits erfolgreich ein initiales Screening durchlief und nach erneuter Generierung und Anpassung an das Plasmidsystem an die AG Schwaneberg zwecks Validierung weitergegeben wurde. Mindestens eine vielversprechende Variante aus der „Advanced“-epPCR konnte bereits identifiziert werden.

AP 2.2 – Produktion der *E. coli* Phytase im Schüttelkolben

Die Umstellung der Produktion der *E. coli* Phytase von *E. coli* als Produktionsstamm zu *P. pastoris* als Produktionsstamm verlief erfolgreich. Durch die Verwendung von *P. pastoris* als Produktionsstamm wird die Phytase nun löslich produziert und sekretiert, womit sie sich im Zellüberstand befindet und die Aufreinigung stark vereinfacht ist. Die Phytase-Aktivität im Zellüberstand wurde mittels Substratsurrogat (4-MUP) validiert. Das AP 2.2 wurde somit erfolgreich abgeschlossen.

AP 2.3 – Optimierung der *E. coli* Phytase Produktion im Schüttelkolben

Durch Optimierung der Produktion der *E. coli* Phytase in *P. pastoris* wurde die **Ausbeute bereits um 80 % erhöht**. Zur Optimierung wurden bisher drei verschiedene Promotersysteme, drei verschiedene Expressionsmedien, die Produktion mittels integrierendem und episomalem Vektor und zwei verschiedene Signalpeptide für die Sekretion in den Zellüberstand getestet. Die zuletzt getestete Optimierung der Sekretion in den Zellüberstand mittels Modifizierung des Signalpeptids

(s. „Im Detail“) verfolgte das Ziel eine weitere signifikante Erhöhung der Ausbeute zu erwirken, welche jedoch nicht erreicht werden konnte. Insgesamt wurden somit sämtliche geplanten Arbeitsschritte zur Optimierung der Phytase-Produktion in *P. pastoris* abgeschlossen und AP 2.3 erfolgreich beendet.

Im Detail: Für die Optimierung der Sekretion der *E. coli* Phytase AppA in den Zellüberstand wurde das Signalpeptid mit Hilfe zwei verschiedener Ansätze modifiziert. Ein Ansatz war die Generierung einer „Advanced“-epPCR-Bibliothek des bereits etablierten S1 Signalpeptids. Der zweite Ansatz beinhaltet die Fusionierung der Pre-Region von einem zweiten Signalpeptid mit der Pro-Region des S1 Signalpeptids, um den eventuellen Vorteil eines alternativen Sekretionsweges zu nutzen. Die S1-Bibliothek erbrachte nur 92-118 % der Ausbeute im Vergleich zum WT (Abbildung 12A). Das Fusions-Signalpeptide Ost1-S1 (als Triplikat getestet) erbrachte mit 65-79% eine geringere Ausbeute als WT (Abbildung 12B). Beide Ansätze konnten somit keine nennenswerte Erhöhung der Ausbeute im Vergleich zum bereits etablierten S1 Signalpeptid (WT) erreichen.

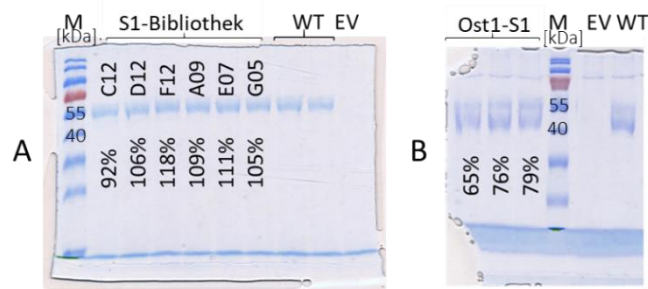


Abbildung 12 SDS-PAGE zur Analyse der Ausbeute der *E. coli* Phytase AppA nach der Produktion durch *P. pastoris* geleitet durch Signalpeptid-Varianten. (A) Die Sekretion der Phytase geleitet durch Signalpeptid-Varianten erzeugt durch „Advanced“-epPCR. (B) Die Sekretion der Phytase geleitet durch das Fusions-Signalpeptid Ost1-S1 (als Triplikat getestet). Das WT-Signalpeptid S1 dient jeweils als Referenz.

AP 2.4 – Scale-Up der Produktion

Die Produktion der *E. coli* Phytase AppA mittels des Produktionsstamms *P. pastoris* wurde bereits im Labormaßstab in UltraYield Flask getestet. Ein weiteres Scale-up zur Produktion im Fermenter wird durchgeführt, sobald vom Projektpartner AG Schwaneberg eine Phytasevariante ausgewählt wurde. In der Zwischenzeit wurde ein Protokoll zur Fermentierung von *P. pastoris* im 10 - 40 L Maßstab bereits erfolgreich etabliert und die Bedingungen für *P. pastoris* getestet. Ein Benchmarking wurde in Erweiterung der vorhergegangenen Versuche durchgeführt, in dessen

Rahmen kommerzielle Phytasen und Phytasevarianten getestet wurden. Der Produktionsprozess wurde erfolgreich eingesetzt, um die leistungsstärkste Phytasevariante im größeren Maßstab zu produzieren. Die Leistung der Phytasen wurde durch den 4-MUP Assay verglichen, wobei eine Variante der AG Schwaneberg deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zu den kommerziellen Enzymen zeigte.

Im Detail: Für ein erweitertes „Benchmarking“ wurden die beiden kommerziellen Phytasen Vemozyme® (Vemo, Bulgarien) und Quantum Blue® (AB Enzymes, Deutschland) sowie vier Alternativphytasen (SeSaM-Phytasen 1-4) aus der Literatur ausgewählt. Deren Leistung soll auf die Anwendung Phosphor aus Pflanzenschroten zur weiteren Verwendung für Poly-P-Wertstoffsynthese getestet werden. Zur Validierung wurde deren Leistung mit der Leistung der *E. coli* Phytase AppA und deren Mutanten verglichen. Die Klonierung der Alternativphytasen zur Produktion in *P. pastoris* wurde erfolgreich abgeschlossen. Versuche der Produktion zeigten positive Ergebnisse im Hinblick auf Nachweisbarkeit der Phytasen im Zellüberstand mittels SDS-PAGE für Sesam-Phytasen 1-4 und Aktivität auf 4-MUP für Sesam-Phytasen 1-3. Im Rahmen eines erweiterten Benchmarking wurden zwei leistungsstarke Phytasevarianten der AG Schwaneberg, A3 und C10, mittels des 4-MUP Assays auf Aktivität im Vergleich zu den kommerziellen Phytasen Quantum Blue® und Vemozyme® geprüft. Hierbei zeigte die C10 Variante aus dem Fermentationsprozess als Lyophilisat eine etwa 7-fach höhere Aktivität auf diesem Substrat, wobei anzumerken ist, dass es sich um ein Ersatz-Substrat und Enzym aus frischer Produktion handelt (Abbildung 13).

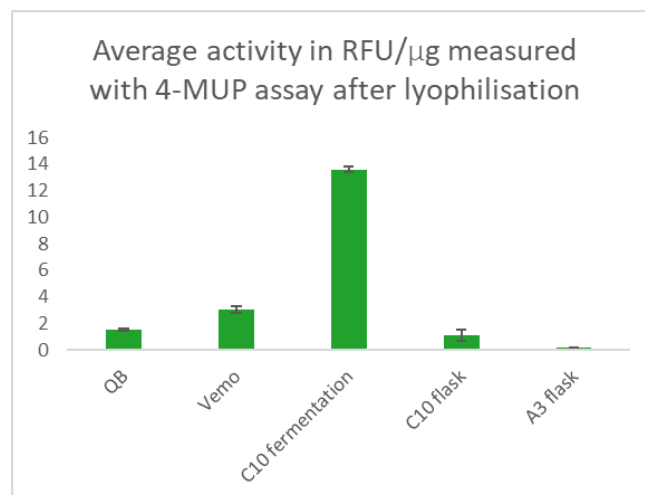


Abbildung 13 Durchschnittliche Aktivität auf 4-MUP Substrat von kommerziellen Phytasen (Quantum Blue, Vemozyme) und Mutanten (C10, A3) aus Fermenter- bzw. Schüttelkolbenherstellung als Lyophilisat

AP 2.5 – Untersuchung der Prozess- und Lagerstabilität Stabilität der vom Partner AG Schwaneberg zur Verfügung gestellten Phytasevarianten wurde in verschiedenen Bedingungen getestet, sowie mit den kommerziellen Enzymen verglichen. Hierbei wurde für die kommerziellen Enzyme kein Abfall der Aktivität über 4 Wochen festgestellt. Die Aktivität der C10 Variante fiel in den ersten zwei Wochen am stärksten, danach nur noch wenig, gerade bei niedrigen Temperaturen.

Im Detail: Die Aktivität der Enzyme Vemozyme, Quantum Blue und der Variante C10 des Partners AG Schwaneberg wurden mittels des 4-MUP Assays direkt nach der Lyophilisierung, sowie nach 2 und 4 Wochen der Lagerung bei -80, -20, 4 und 25 °C gemessen, um die Stabilität festzustellen (Abbildung 14). Dabei war ein Abfall der Aktivität um etwa 60% innerhalb nach zwei Wochen festzustellen, über alle Temperaturen hinweg, auf ein Niveau etwas über den kommerziellen Enzymen. In den darauffolgenden 2 Wochen war der Leistungsabfall relativ gesehen deutlich geringer, aber signifikant.

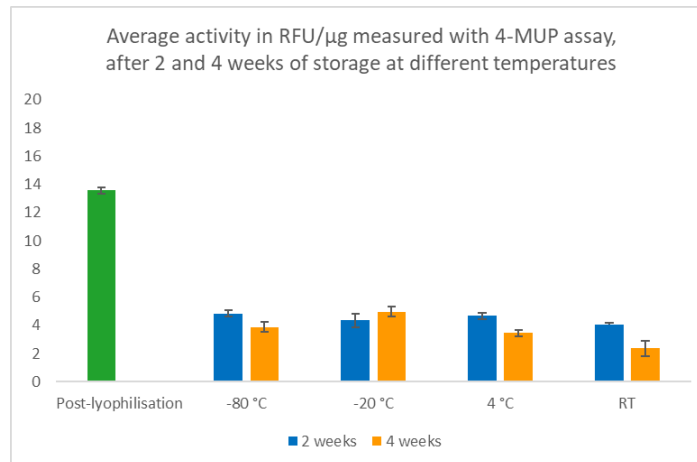


Abbildung 14 Durchschnittliche Aktivität auf 4-MUP Substrat zur Bestimmung der Phytase Lagerstabilität.

7.3 AG Blank: Arbeitsprogramm 3

Die Ziele der AG Blank umfassen die Entwicklung sowohl der Polyphosphat-Analytik, als auch einer Methode zur Produktion von polyphosphat-reicher *S. cerevisiae* aus Rapspresskuchen-Extrakt, und zweier Downstream-Prozesse zur Herstellung von polyphosphat-reichem Hefeextrakt und Bio-Polyphosphat aus der polyphosphat-reichen *S. cerevisiae*. Diese Ziele werden in fünf APen mit zwei Meilensteinen bearbeitet (Tabelle 5). AP3.4 wird nicht bearbeitet. Ziel von AP3.4 war das metabolische Engineering von *S. cerevisiae*, um die Polyphosphat-Produktion weiter zu verbessern. Es wurde bereits ein Rekordgehalt von 28 % Polyphosphat aus reinem Phosphat und ein sehr guter Gehalt von 15 % PolyP aus Rapsextrakt erreicht. Ein Bio-Polyphosphat aus gentechnisch veränderter Hefe hätte für die Lebensmittelindustrie zudem keinen Nutzen. Alle anderen APe wurden erfolgreich abgeschlossen. Alle Meilensteine (MS 5 und 6) wurden erreicht.

Tabelle 5 Fortschritte in den Arbeitspaketen und Meilensteinen der AG Blank

Arbeitspaket oder Meilenstein	Fortschritte [%]
AP 3.1: Generierung eines Modelmediums	100 %
AP 3.2: Optimierung des Mediums	100 %
AP 3.3: Herstellung des angereicherten Hefeextrakts und Analytik	100 %

AP 3.4: Generierung eines rekombinanten Produzenten für Bio-Polyphosphat	(wurde nach Absprache gestrichen)
AP 3.5: Produktion Bio-Polyphosphat	100 %
MS 5: Generierung eines angereicherten Hefeextraktes + Analytik	Erreicht
MS 6: Generierung von langkettigem Bio-Polyphosphat	Erreicht

Als erstes entwickelte die AG Blank Methoden für die Polyphosphat-Analytik (AP3.3). Polyphosphat-Analytik umfasst die analytische Polyphosphat-Extraktion aus *S. cerevisiae*, gefolgt von der Polyphosphat-Quantifizierung und -Längenbestimmung. Verschiedene Literaturmethoden zur analytischen Polyphosphat-Extraktion aus *S. cerevisiae* wurden verglichen (Abbildung 15). Die Methode, die das meiste Polyphosphat extrahierte, wurde weiter optimiert (Abbildung 16). Schlussendlich konnte die AG Blank eine neue analytische Polyphosphat-Extraktion entwickeln, die 40 % mehr Polyphosphat extrahiert als die aktuell beste Literaturmethode (vergleiche Balken 1 und 4 in Abbildung 16). Zudem benötigt die Methode nur 30 Minuten und ein Reaktionsgefäß im Vergleich zu den 5,5 h und fünf Reaktionsgefäßen, die der aktuelle Goldstandard benötigt. Die analytische Polyphosphat-Extraktion aus *S. cerevisiae* wurde der wissenschaftlichen Gemeinschaft als neue Methode in einem Forschungsartikel vorgestellt⁹.

In der Literatur finden sich keine Methoden zur **vollständigen** Quantifizierung von Polyphosphat aus Proben **biogenen** Ursprungs, die mit biologischen Substanzen, wie z. B. DNA und RNA, kontaminiert sind. Die AG Blank entwickelte daher einen neuen Enzymassay, der Polyphosphat vollständig und spezifisch quantifiziert. Der Assay wird von typischen biogenen Kontaminationen nicht gestört. Der Assay ist außerdem in der Lage, neben der Quantifizierung, auch die Länge von kurzem Polyphosphat (<20 P-Untereinheiten) zu bestimmen. Diese Methode der Längenbestimmung ist neuartig. Die Methode wurde im Journal *Analytical Biochemistry* veröffentlicht¹⁰.

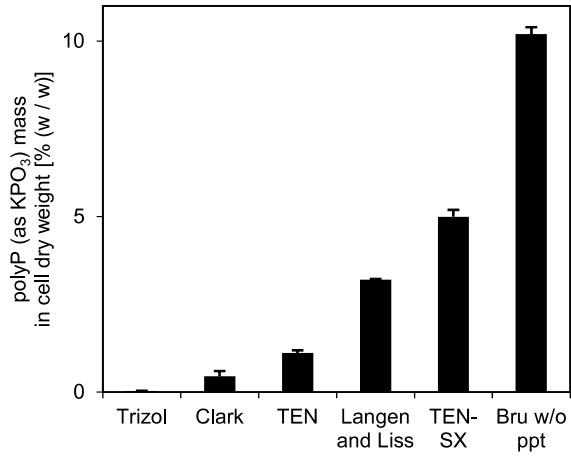


Abbildung 15 Vergleich von Literaturmethoden zur analytischen Polyphosphat-Extraktion

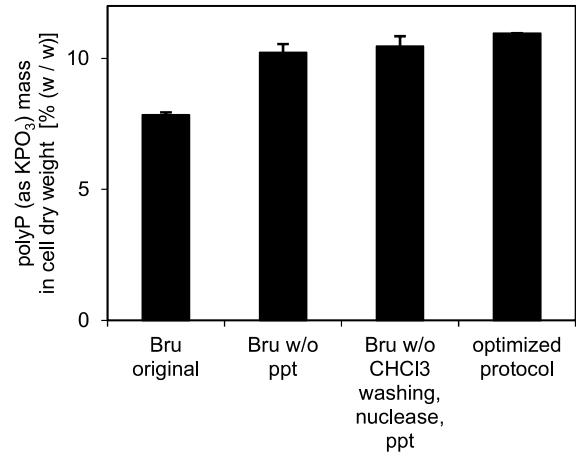


Abbildung 16 Optimierung der besten Literaturmethode zur analytischen Polyphosphat-Extraktion

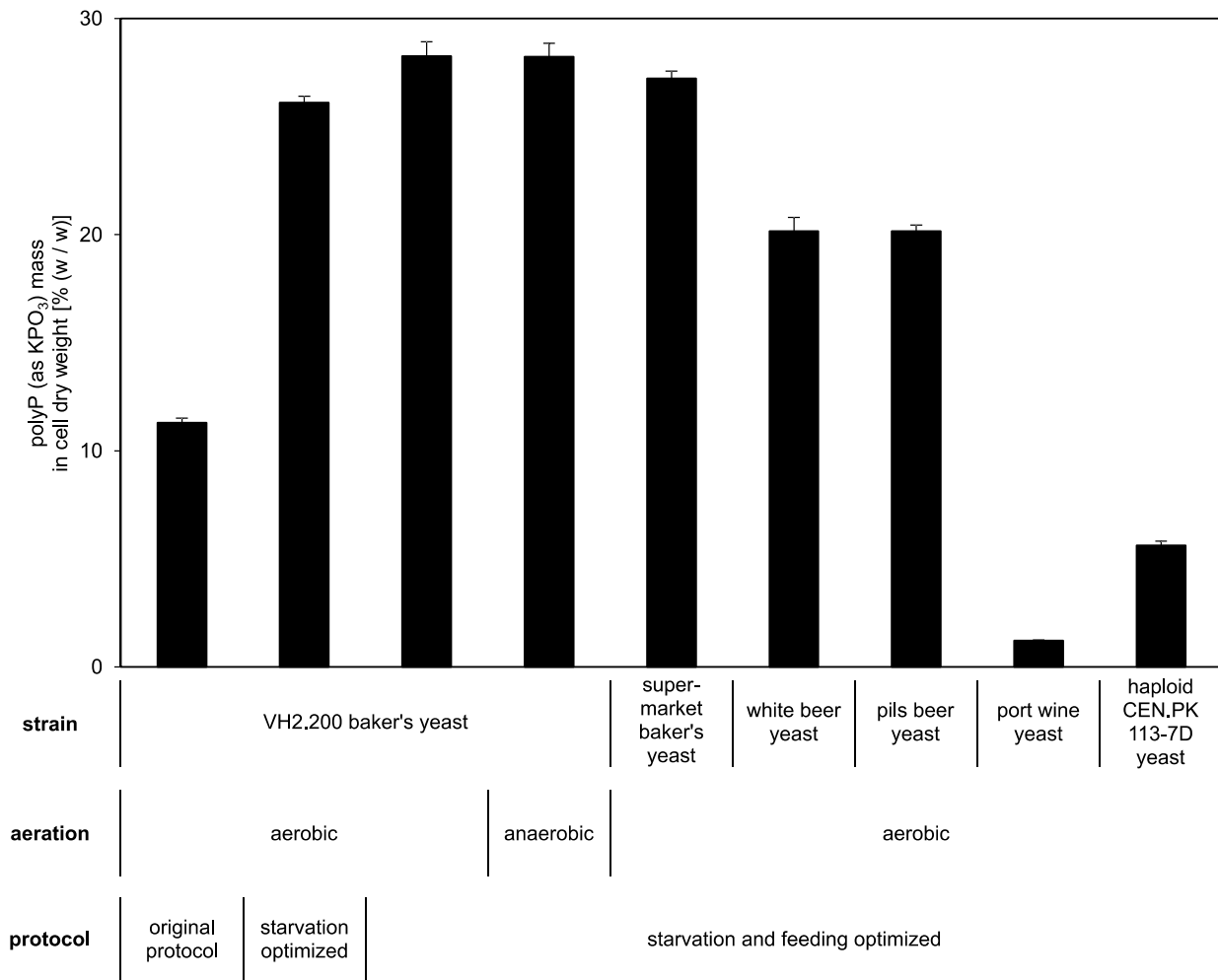


Abbildung 17 Optimierung der Polyphosphathyperakkumulation, Test dieser unter anaeroben Wachstumsbedingungen und Vergleich des fertigen Protokolls mit verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen.

Die Polyphosphat-Analytik in AP3.3 wurde damit fast vollständig abgeschlossen (Analytik-Teil von MS 5 fast erreicht). Lediglich die Längenbestimmung von langkettigem Polyphosphat (> 60 P-Untereinheiten) steht noch aus. Für dieses Ziel soll im weiteren Verlauf von Value-PP eine Erweiterung des Enzymassays entwickelt werden. Da die Längenbestimmung von langkettigem Polyphosphat ein bahnbrechender Durchbruch im Bereich der Polyphosphat-Forschung wäre, wurde AP3.3 verlängert.

Als nächste Aufgabe widmete sich die AG Blank der Entwicklung einer Methode für die Herstellung polyphosphat-reicher *S. cerevisiae*-Zellen. Als Fermentationsstrategie wurde die sog. Polyphosphat-Hyperakkumulation gewählt. Hierbei werden Hefezellen in einem orthophosphat-freien Nährmedium ausgehungert (engl. starvation) und anschließend in einem orthophosphat-reichem Nährmedium gefüttert (engl. feeding). Als Ausgangspunkt wurden ein Literaturprotokoll, und der Stamm VH2.200, der zur Produktion von Bäckerhefe industriell genutzt wird, gewählt. Ein Polyphosphatgehalt von 11 % (m / m, als KPO₃) in Zelltrockenmasse wurde erreicht (Balken 1 in Abbildung 17). Anschließend wurden das Hungern und Füttern schrittweise optimiert, um einen erhöhten Polyphosphat-Gehalt zu erzielen. Folgende Parameter wurden dabei getestet: Chemikalienkonzentration, pH, Inkubationszeiten, Zelldichte, und Sauerstoffbedarf. Nach

Optimierung des Hungerns wurde ein Polyphosphat-Gehalt von 26 % und nach Optimierung des Fütterns von 28 % erreicht (jeweils Balken 2 und 3 in Abbildung 17). Bei diesem Polyphosphat-Gehalt handelt es sich um einen Weltrekord, da in der Literatur maximal Gehalte von 14 % angegeben werden. Die Fermentation funktionierte auch anaerob, wodurch die Ökonomie des Prozesses verbessert werden konnte (Balken 4 in Abbildung 17). Außerdem konnte diese Fermentation auch mit Backhefe aus dem Supermarkt durchgeführt werden (Balken 5 in Abbildung 17). Dies ermöglicht die Unabhängigkeit von einem speziellen Stamm und somit die Nutzung von günstiger Backhefe als Zellmasse für den Gesamtprozess. Zwei Bierhefe-, ein Weinhefe- und ein haploider Laborstamm produzierten bei gleichem Protokoll weniger Polyphosphat (jeweils Balken 6 bis 9 in Abbildung 17).

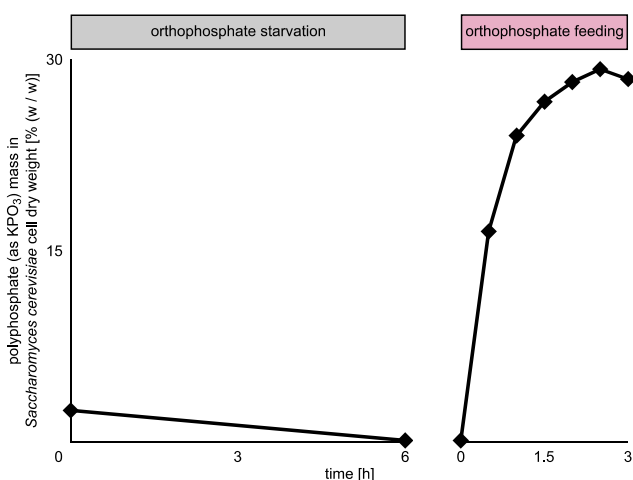


Abbildung 18 Polyphosphat-Hyperakkumulation in Abhängigkeit von der Zeit.

Der Polyphosphatgehalt während des Hungerns und des Fütterns wurde in Abhängigkeit von der Zeit untersucht (Abbildung 18). Während des Hungerns sank der Polyphosphatgehalt von den „normalen“ 2,5 % innerhalb von sechs Stunden auf 0,1 %. Während des Fütterns wurde ein Polyphosphat-Gehalt von 28 % in nur 2,5 Stunden erreicht.

Die von der AG Blank entwickelte Fermentationsstrategie zur Produktion von polyphosphat-reichen Zellen zeichnet sich durch den Einsatz gentechnisch nicht veränderter Hefe, dem Einsatz günstiger Backhefe als Zellmasse, dem Erreichen des Polyphosphat-Rekord-Gehaltes von 28 %, der günstigen anaeroben Fermentation und einer guten Passung zu einem gewöhnlichen Arbeitsalltag (6 h an Tag 1 und 2,5 h an Tag 2, im Vergleich zu den 15 konsekutiven Stunden für das Literaturprotokoll) aus. Das im Projektantrag definierte Ziel (min. Kettenlänge 3 - 5 Phosphate, 10 % Gesamtphosphat der Zelltrockenmasse) wurde erreicht, womit AP3.1 und AP3.2 erfolgreich abgeschlossen werden konnten.

Aus den polyphosphat-reichen Zellen sollte nun polyphosphat-reicher Hefeextrakt gewonnen werden. Vier verschiedene Protokolle für die Herstellung von Hefeextrakt wurden mit den gefütterten Zellen getestet: Autolyse, Plasmolyse, und enzymatische Hydrolyse mit und ohne vorherige Hitzeinaktivierung (Abbildung 19). Die nach Gefriertrocknung entstandene Hefeextrakt-Paste wurde

bei 120°C getrocknet, um ein freifließendes Pulver zu erzeugen. Schlussendlich konnte erstmalig in der Literatur ein Hefeextrakt-Paste und –Pulver mit folgenden Charakteristika hergestellt werden: Jeweils 20 und 14 % (m / m, als KPO_3) polyP mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 31 und 3 P-Untereinheiten, 7 und 14 % (m / m, als $K_{1.5}H_{1.5}PO_4$) P_i , 22 und 0 % (m / m) Wasser. Zudem besaß die Paste wenig Farbe und Aroma. Das Pulver hingegen war bräunlich gefärbt und besaß ein starkes Hefe/Röst-Aroma. Die Methode zur Produktion von polyphosphat-reichen Zellen und die Herstellung von polyphosphat-reichem Hefeextrakt wurde in in FEMS Yeast Research publiziert¹¹.

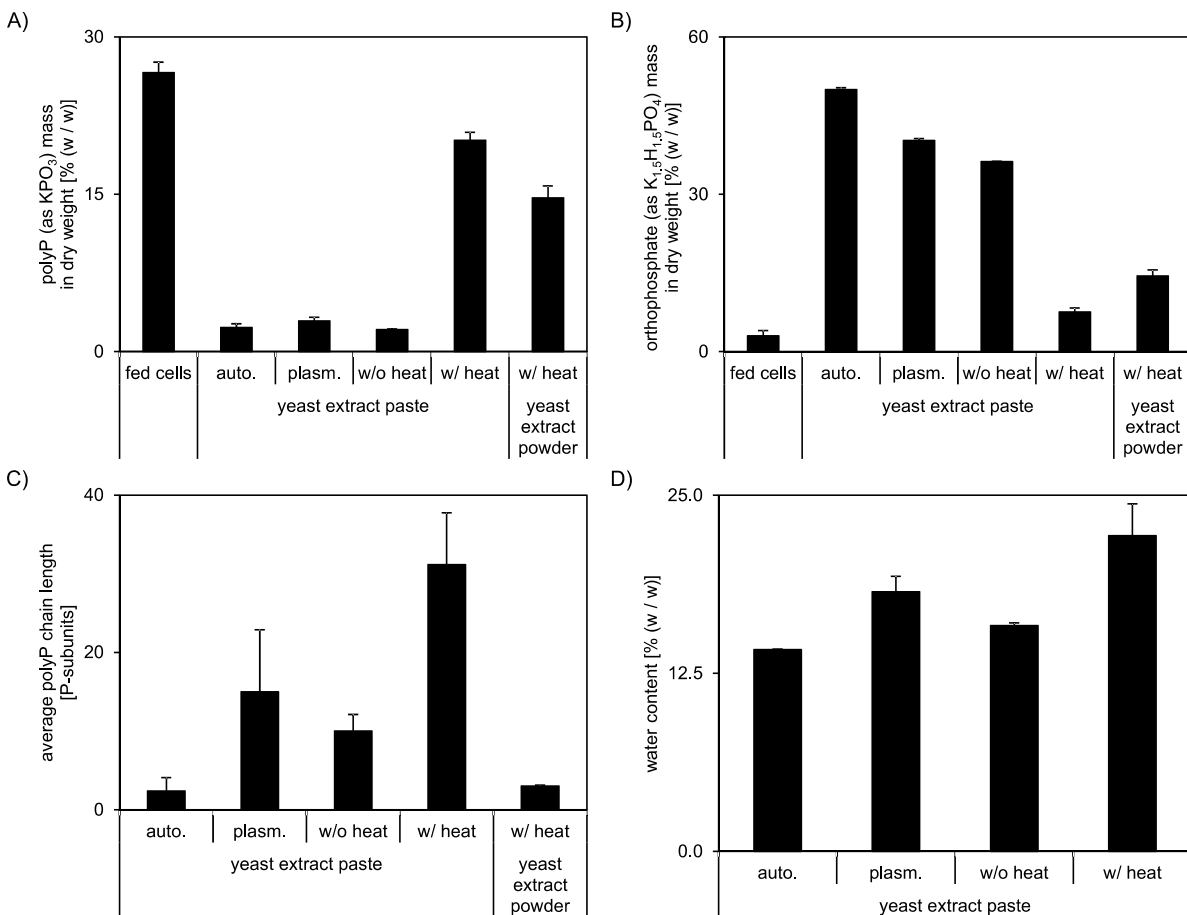


Abbildung 19 Analyse der hergestellten Hefeextrakte. Auto., Autolyse; plasm., Plasmolyse; w/ heat, enzymatische Hydrolyse mit vorheriger Hitzeinaktivierung; w/o heat, enzymatische Hydrolyse ohne vorheriger Hitzeinaktivierung.

Die Entwicklung der Methode zur Produktion von polyphosphat-reichem Hefeextrakt aus reinem Orthophosphat (AP3.3) wurde abgeschlossen. Die Produktion von polyphosphat-reichem Hefeextrakt aus Rapspresskuchen-Extrakt der AG Schwaneberg konnte zudem durchgeführt werden. Die AG Schwaneberg behandelte Rapspresskuchen mit Phytase und stellte so einen Rapsextrakt mit ca. 27 mM Orthophosphat her und übergab diesen der AG Blank. Die AG Blank führte eine Polyphosphat-Hyperakkumulation mit *S. cerevisiae* und eine anschließende Produktion von Hefeextraktpulver und -paste durch. Nach Polyphosphat-Hyperakkumulation wurde ein Polyphosphat-Gehalt von 15 % (als KPO_3) in Hefetrockenmasse erreicht (im Vergleich: mit reinem Orthophosphat erhielt man 28 % Polyphosphat). In Tabelle 6 sind die Eigenschaften der aus

Rapsextrakt und aus reinem Orthophosphat hergestellten/m Hefeextrakt-Paste/Pulver gezeigt. Wie bereits oben erwähnt wurde nach Hyperakkumulation mit reinem Orthophosphat eine Paste mit 20 % und ein Pulver mit 15 % Polyphosphat erhalten. Nach Hyperakkumulation mit Rapsextrakt wurde, aufgrund des niedrigeren Polyphosphat-Gehalts in den gefütterten Zellen, eine Paste mit 8 % und ein Pulver mit 10 % Polyphosphat erhalten. Die Kettenlänge war in der Paste aus reinem Orthophosphat 31 P-Untereinheiten und aus Rapsextrakt 11 P-Untereinheiten. Sowohl aus reinem Orthophosphat und aus Rapsextrakt betrug die Kettenlänge im Hefeextraktpulver 3 P-Untereinheiten. Obwohl mit reinem Orthophosphat ein Hefeextrakt mit mehr und längerem Polyphosphat hergestellt werden konnte, erfüllen der Polyphosphatgehalt und die Polyphosphatlänge nach Produktion aus Rapsextrakt die Anforderungen für eine Anwendung in der Lebensmittelindustrie. Eine kommerzielle Bewertung der neuen Produkte findet sich im Budenheim-Ergebnisteil (AP 4). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erfolgreich gezeigt werden konnte, dass die angestrebte Prozesskette bzw. generelle Idee von Value-PP (Rapspresskuchen -> Extraktion des Orthophosphats mittels Phytase -> PolyP-Hyperakkumulation mit *S. cerevisiae* -> Hefeextraktherstellung) funktioniert.

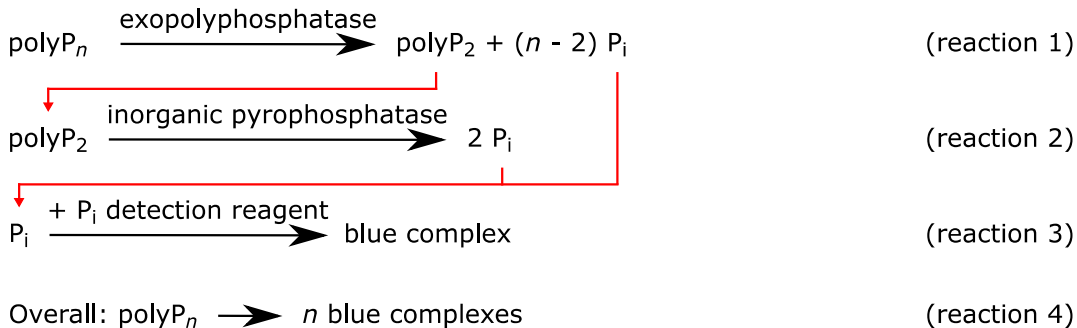
Tabelle 6 Vergleich Hefeextrakt-Paste und -Pulver aus Rapsextrakt und aus reinem Orthophosphat (P_i)

	Hefeextraktpaste		Hefeextraktpulver	
	aus Rapsextrakt	aus reinem P _i	aus Rapsextrakt	aus reinem P _i
Polyphosphat (als KPO ₃) in Trockenmasse [% (m / m)]	8	20	10	15
P _i (als K _{1.5} H _{1.5} PO ₄) in Trockenmasse [% (m / m)]	6	8	7	14
Durchschnittliche Kettenlänge [P-Untereinheiten]	11	31	3	3
Wassergehalt [% (m / m)]	11	22	0	0

Im Gegensatz zu dem Enzymassay, der 2018 von der AG Blank veröffentlicht wurde [3] und nur kurze Polyphosphatketten für die Längenbestimmung erfasst, kann der neu entwickelte Assay alle Kettenlängen messen. Die durchschnittliche Polyphosphatkonzentration kann als Quotient aus der Gesamtpolyphosphatkonzentration [mol Polyphosphat in Monomereinheiten / Liter] und der Polyphosphatkettenkonzentration [mol Ketten / Liter] berechnet werden. Die Gesamtpolyphosphatkonzentration wurde mittels enzymatischer Hydrolyse des Polyphosphats durch *S. cerevisiae* exopolyphosphatase 1 und *S. cerevisiae* inorganic pyrophosphatase 1, und anschließender kolorimetrischer Phosphatdetektion realisiert (Abbildung 20A). Zur Bestimmung der Polyphosphatkettenkonzentration wurde ausgenutzt, dass *S. cerevisiae* exopolyphosphatase 1 jede

Polyphosphatkette zu einem Molekül PolyP₂ umsetzt. Das PolyP₂ wurde anschließend in einer Enzymkaskade als NADPH detektiert (Abbildung 20B).

A) Colorimetric quantification of the total polyP concentration



B) Fluorometric quantification of the polyP chain concentration

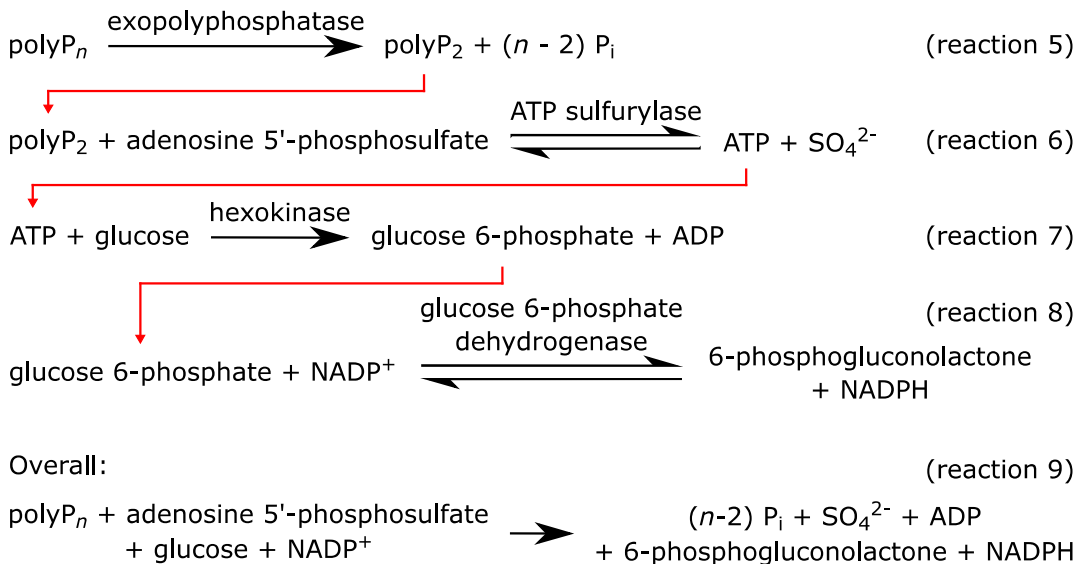


Abbildung 20 Schema des neuen Enzymassays zur Bestimmung der durchschnittlichen Polyphosphatkettenlänge.

Anschließend wurden zwecks Assayvalidierung interferierende Substanzen getestet (Tabelle 7). Einhundert und 400 mM NaCl hatten keinen Einfluss auf den Enzymassay. Meerwasser kann also als Probenmatrix genutzt werden. Das Endprodukt aus Reaktion 6 (NaSO₄, Abbildung 20) hatte keinen Effekt auf den Assay. ADP als Endprodukt aus Reaktion 7 (Abbildung 20) konnte nur bei niedrigen Konzentrationen getestet werden, da das gekaufte ADP mit ATP kontaminiert wurde. DNA und RNA hatten bis 4 g Nukleinsäure pro g Polyphosphat keinen Einfluss auf den Assay. Der Enzymassay zeigte somit eine gute Robustheit gegenüber den getesteten interferierenden Substanzen und ist somit für die meisten Probenmatrices geeignet.

Die Leistung des Enzymassays wurde mit der einzigen Referenzmethode (³¹Phosphor Nukleare Magnet Resonanz Spektroskopie, ³¹P NMR) verglichen (Abbildung 21). Eine exzellente Deckung zwischen beiden Methoden wurde gemessen. Bisher konnte die durchschnittliche

Kettenlänge aller Kettenlängen nur mit ^{31}P NMR bestimmt werden. ^{31}P NMR benötigt mM Konzentrationen, hat einen niedrigen Probendurchsatz (Minuten bis Stunden pro Probe), und die Verfügbarkeit des Geräts ist schlecht. Der neu entwickelte Enzymassay misst runter bis in μM -Konzentrationen, ist hochdurchsatzfähig und bedarf nur allgemein verfügbaren Equipments. Die Methode wurde in *Analytical Chemistry* veröffentlicht¹².

Tabelle 7 Interferierende Substanzen für den Enzymassay

interfering substance		interference [%]		
concentration [μM]	mass [g] to 1 g analyte	total polyP concentration	polyP chain concentration	polyP chain length
NaCl				
100,000	378.3	-2	0	-2
400,000	1,513.0	2	1	1
750,000	2,836.9	2	-10	13
NaSO₄				
10	0.1	1	0	0
100	0.9	5	5	0
1,000	9.2	4	2	2
ADP				
30	0.8	1	-1	2
300	8.3	3	blank too high	n. c.
3,000	83.0	-96	blank too high	n. c.
DNA				
20	0.4	-3	-2	-1
200	4.2	1	3	-2
2,000	42.3	-21	blank too high	n. c.
RNA				
20	0.4	-2	4	-5
200	4.4	2	6	-4
2,000	43.9	-11	12	-21

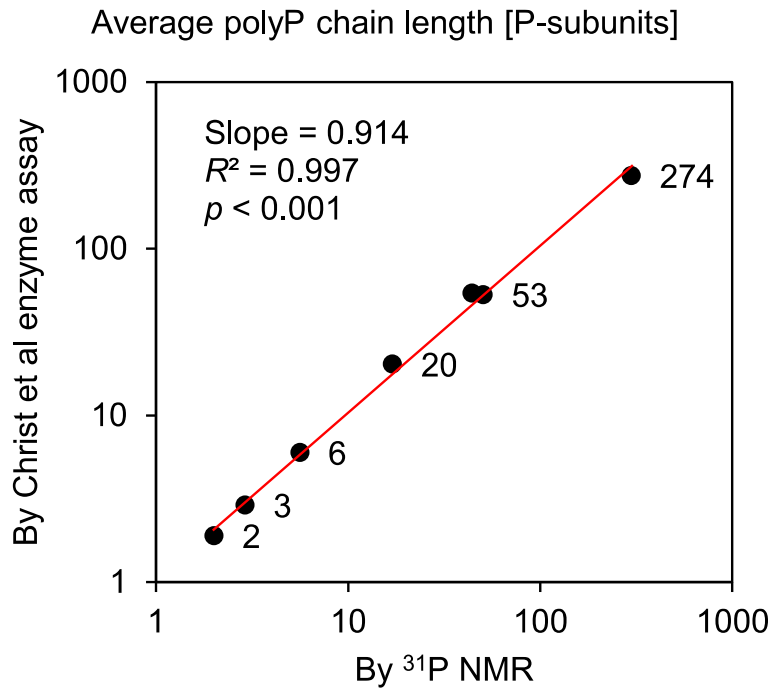


Abbildung 21 Vergleich des Enzymassays mit der Referenzmethode ^{31}P NMR.

Abschließend wurde ein Prozess entwickelt, um aus der beladenen Hefe pures Bio-PolyP herzustellen. Der generelle Ablauf des Downstreamprozesses zur Herstellung puren Bio-PolyPs beinhaltete die Freisetzung des Polyphosphats aus der Hefe durch Hitze und anschließend eine Ethanol-fällung des Polyphosphats zur Aufreinigung. Danach sollte das Bio-Polyphosphat getrocknet und gemahlen werden. Optimale Parameter für die Fällung von Polyphosphat wurden entwickelt (Abbildung 22). Es stellte sich heraus, dass Polyphosphat mit 100 mM NaCl (oder KCl) und 1 vol. Ethanol bei pH 7 aus wässriger Lösung gefällt und anschließend in einem Exsikkator innerhalb von 7 Tagen getrocknet werden kann.

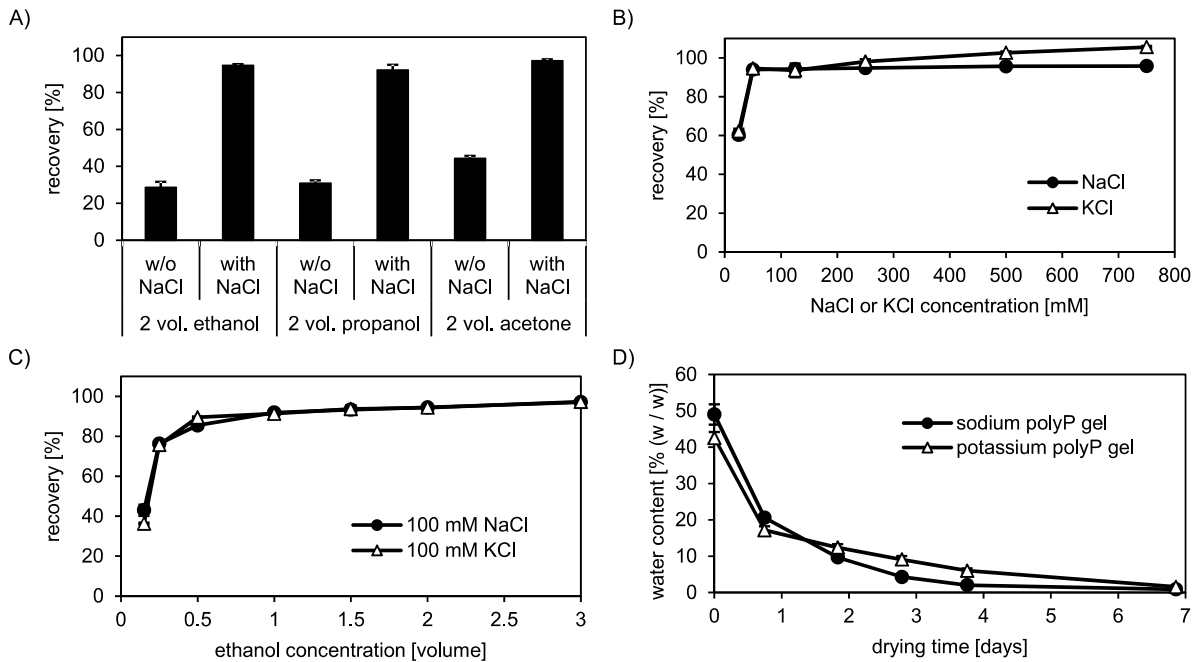


Abbildung 22 Entwicklung optimaler Parameter für die Fällung (A-C) und die Trocknung (D) von Polyphosphat.

Optimale Parameter zur Freisetzung von Polyphosphat aus Hefezellen wurden ebenfalls ermittelt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde der Prozess von 5 mg auf 1 g hochskaliert und das pure Bio-Polyphosphat in Kooperation mit Budenheim physikochemisch charakterisiert (Tabelle 8). Das Bio-Polyphosphat wurde mit einem neutralen pH und einer Kettenlänge von 42 und 11 P-Untereinheiten hergestellt. Gegenionen waren Natrium, Kalium und Magnesium. Die Reinheit war auf dem gleichen Level wie die von chemisch hergestelltem Polyphosphat. Der zyklische Polyphosphatgehalt lag zwischen 5 und 10 % in den chemisch hergestellten Polyphosphaten und unter 2 % in den biologischen Polyphosphaten. Es handelt sich hiermit um die erste Studie zur biotechnologischen Herstellung eines pulverförmigen wasserlöslichen Polyphosphats mit Lebensmittelqualität. Das Downstream- Processing wurde in *Biotechnology and Bioengineering* veröffentlicht¹³. Methoden zur Polyphosphat-Analytik wurden in einem Übersichtsartikel verglichen¹⁴. Abschließend lässt sich sagen, dass in ValuePP Methoden zur Polyphosphat-Analytik in *S. cerevisiae* entwickelt wurden. Zudem wurde ein biotechnologischer Prozess zur Beladung von *S. cerevisiae* mit PolyP und anschließender Verarbeitung zu purem Bio-PolyP oder polyP-reichem Hefeextrakt entwickelt.

Tabelle 8 Physikochemische Charakterisierung der Bio-Polyphosphate

Origin polyP	This study				Commercial		
	Na-polyP		K-polyP		Budite 4	Roth	P100
PolyP name	Long-chain	Short-chain	Long-chain	Short-chain			
Appearance	Fine-grained white powder						Large white flakes
Average molecular formula polymer	Na _{9.9} K _{12.4} Mg _{10.5} HP _{42.3} O _{127.8}	Na _{3.7} K _{3.6} Mg _{2.5} HP _{11.3} O _{35.0}	K _{15.3} Mg _{9.1} HP _{32.6} O _{98.7}	K _{7.8} Mg _{2.7} HP _{12.3} O _{37.9}	Na _{19.2} H ₂ P _{19.2} O _{58.5}	Na _{20.1} H ₂ P _{20.1} O _{61.3}	Na _{42.0} H ₂ P _{42.0} O _{127.0}
Average molecular weight polymer [g * mol ⁻¹]	4320 ± 211	1197 ± 21	3410 ± 52	1362 ± 19	1972	2066	4299
Molar ratio Na + K to Mg in the polymer	2.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1	1.7 ± 0.0	2.9 ± 0.1	n.a.	n.a.	n.a.
Chain length distribution [P-subunits]	<15 – 314	<15 – 130	<15 – 314	<15 – 130	<15 – 207	<15 – 207	<15 – 700
pH of a 1 % (w/v) polyP solution	6.6 ± 0.0	6.8 ± 0.0	6.4 ± 0.0	6.7 ± 0.0	3.6	5.4	5.3
Crystal water (LOQ: < 0.1 %) [a]	6.7 ± 0.3	5.7 ± 0.2	6.2 ± 0.0	4.6 ± 0.1	0.2	n.d.	0.3
Average chain length [P-subunits]							
By enzyme assay	42.3 ± 2.2	11.3 ± 0.2	32.6 ± 0.6	12.3 ± 0.2	19.2	20.1	42.0
By PAGE	122 ± 2	76 ± 0	110 ± 1	72 ± 1	90	85	152
PolyP purity [% (w/w)] [a]							
Linear polyP incl. counterions in desiccator-dry substance	85.0 ± 1.3	79.3 ± 0.1	81.8 ± 1.2	78.4 ± 0.2	89.0	87.5	85.5
Linear polyP incl. counterions and crystal water in desiccator-dry substance	91.7 ± 1.6	85.0 ± 0.2	88.0 ± 1.2	83.0 ± 0.3	89.2	87.5	85.8
Impurities in the polyP [% (w/w)] [a]							
Insolubles (LOQ: < 0.01 %)	n.d.	n.d.	6.2 ± 0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chloride (as Cl ⁻ , LOQ: < 0.75 %)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cyclic polyP (as MPO ₃)	0.8 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.7 ± 0.0	1.5 ± 0.0	7.8	10.3	5.2
P _i (as PO ₄ ³⁻ , LOQ: < 0.01 %)	n.d.	1.8 ± 0.2	n.d.	0.6 ± 0.1	n.d.	n.d.	0.7
Nucleic acid (as RNA, LOQ: < 0.05 %)	0.2 ± 0.0	1.7 ± 0.1	0.1 ± 0.0	1.6 ± 0.0	n.d.	n.d.	n.d.
Arsenic, cadmium, calcium, chromium, copper, iron, lead, nickel, vanadium (LOQ: < 0.25 %)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Yield preparative extraction [% (mole/mole)] [b]							
Individual for both polyP fractions	15.9 ± 1.8	64.7 ± 2.4	21.3 ± 0.8	54.5 ± 0.6	n.a.	n.a.	n.a.
Sum of both polyP fractions	80.6 ± 0.6		75.8 ± 0.2				

Die AG Blank konnte die Entwicklung einer Methode zur Herstellung polyphosphat-reichen Hefeextrakts und puren Bio-PolyPs abschließen. Im Labor der AG Blank war aber lediglich die Produktion kleinerer Mengen (ca. 10 g Produkt) möglich. Budenheim, als Mitglied der Oetker-Gruppe, stellte den Kontakt zu Agrano (ebenfalls ein Mitglied der Oetker-Gruppe) her. Als Hersteller von Hefeextrakt war Agrano ideal dafür geeignet die von der AG Blank entwickelte Methode im großen Maßstab (2000 L Fermenter) zur Produktion mehrerer Kilogramm polyphosphat-reichen Hefeextrakts durchzuführen. Die Fermentation verlief erfolgreich und konnte 22 kg Hefecreme mit einem 25 % Polyphosphatgehalt in Zelltrockenmasse erzeugen. Teile dieser Hefecreme wurden zu der Firma Leiber verschickt, die daraus 750 g polyP-reichen Hefeextrakt herstellte. Dieser

Hefeextrakt wurde von Budenheim zur Herstellung von Fleischwurst im hauseigenen Applikationslabor genutzt.

Die Produktion von polyphosphat-reichen Zellen aus verschiedenen Pflanzenextrakten der AG Schwaneberg konnte zudem durchgeführt werden. Die AG Schwaneberg behandelte Presskuchen aus Haselnuss, Soja, Sesam, Senf, Sonnenblume, Roggen, Weizen und Reis mit Phytase, stellte so Pflanzenextrakte mit verschiedenen Konzentrationen an Orthophosphat her und übergab diese der AG Blank. Die AG Blank führte eine Polyphosphat-Hyperakkumulation mit *S. cerevisiae* durch. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Extrakte wurden diese auf eine Orthophosphatkonzentration von 30 mM verdünnt. Es war möglich polyphosphat-reiche Zellen mit einem Polyphosphatgehalt zwischen 10 und 20 % zu produzieren. Die Kettenlänge war je nach Extrakt zwischen 20 und 36 P-Untereinheiten. Dabei konnte eine Ausbeute von durchschnittlich 38,9 % und ein Titer von rund 1,5 g Polyphosphat / L Füttermedium erreicht werden (Abbildung 23). Während der Polyphosphat-Hyperakkumulation konnte so durchschnittlich 75% des Orthophosphates aus dem Medium aufgenommen werden (Abbildung 24). Weder im Polyphosphat-Gehalt noch in der Ausbeute oder dem Titer gab es große Unterschiede zwischen den Pflanzenextrakten. Diese unterschieden sich nur teilweise in der Polyphosphat Kettenlänge, welche erreicht werden konnte und in der Menge an Orthophosphat, welches von der Hefe aus dem Medium aufgenommen werden konnte (Abbildung 24).

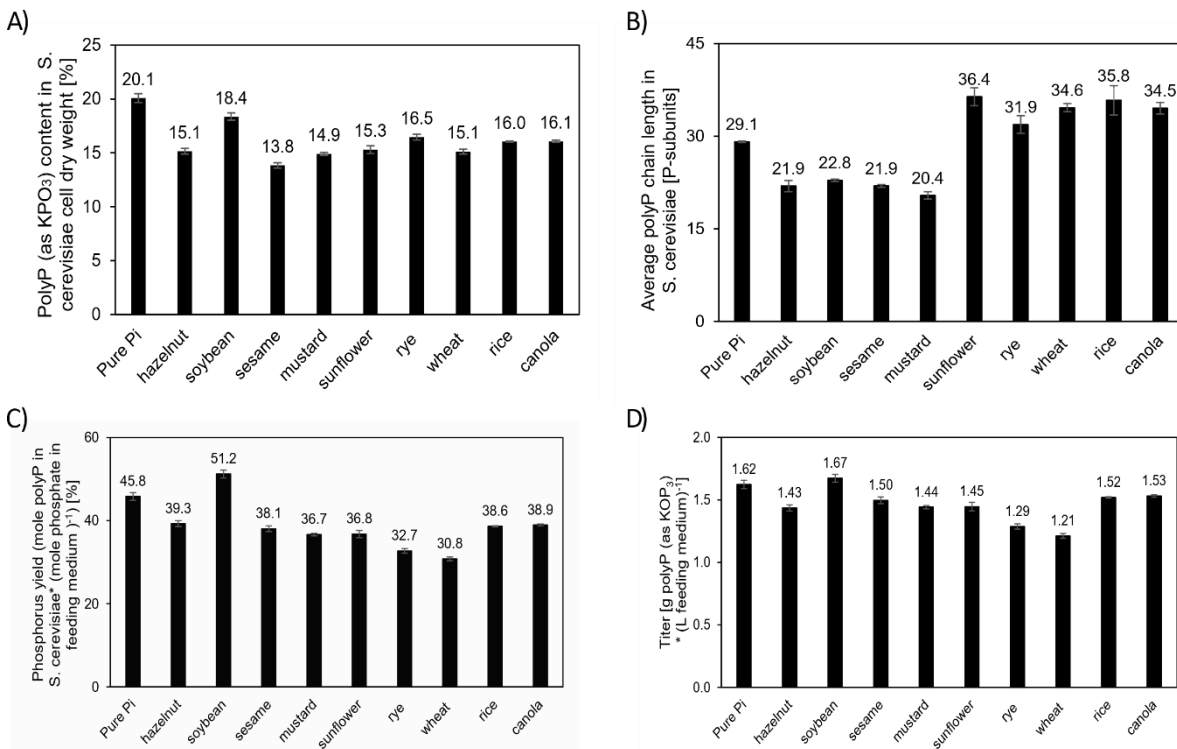
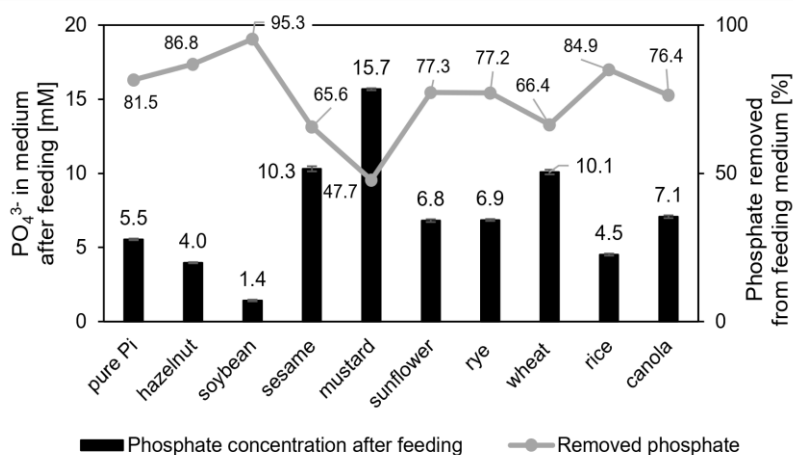


Abbildung 23 Analyse der polyphosphat-Produktion mit verschiedenen Pflanzenextrakten. A) Polyphosphat Gehalt [%], B) Durchschnittliche Kettenlänge [P-Einheiten], C) Polyphosphat Ausbeute [%], D) Titer [g Polyphosphat * L Füttermedium⁻¹].



Abbildungung 24 Orthophosphat im Füttermedium nach der Hyperakkumulation.

Abschließend wurde der komplette Prozess ab der enzymatischen Behandlung von Presskuchen aus Reis und Raps durch die AG Schwaneberg, über die Polyphosphat-Hyperakkumulation und der anschließenden Freisetzung von Polyphosphat aus Hefezellen durch die AG Blank durchlaufen. Es war möglich 546 mg Polyphosphat aus Rapsextrakt und 893 mg Polyphosphat aus Reisextrakt herzustellen. Das pure Bio-Polyphosphat wurde in Kooperation mit Budenheim physikochemisch charakterisiert (Tabelle 9). Das Bio-Polyphosphat wurde mit einem neutralen pH und einer Kettenlänge von 10.1 und 10.2 P-Untereinheiten hergestellt. Gegenionen waren Natrium, Kalium und Magnesium. Die Reinheit war auf dem gleichen Level wie die von chemisch hergestelltem Polyphosphat. Die Produktion von polyphosphat-reichen Zellen mit verschiedenen Pflanzenextrakten und der komplette Prozessdurchlauf mit den Extrakten aus Raps- und Reis-Presskuchen werden noch veröffentlicht.

Tabelle 9 Physikochemische Charakterisierung der Bio-Polyphosphate aus Reis- und Rapsextrakt

Pi source fermentation	Rice	Canola
Appearance	Fine-grained white powder	
Average molecular formula polymer	$\text{Na}_{3.1}\text{K}_{2.1}\text{Mg}_{1.8}\text{HP}_{10.1}\text{O}_{30.8}$	$\text{Na}_{3.2}\text{Mg}_{2.3}\text{K}_{1.8}\text{HP}_{10.2}\text{O}_{31.1}$
Average molecular weight polymer ($\text{g} \times \text{mol}^{-1}$)	1012	1008
pH of a 1% (w/v) polyP solution	7.6 ± 0.0	$7,3 \pm 0.0$
Crystal water (LOQ: < 0.1 %) [a]	$6,3 \pm 0.0$	$8,1 \pm 0.0$
Average chain length [P-subunits]	10.1 ± 0.4	10.2 ± 1.1
PolyP purity [% (w/w)] [a]		
polyP incl. counterions in desiccator-dry substance	89.7	89.0
polyP incl. counterions and crystal water in desiccator-dry substance	96.0	97.1
Impurities in the polyP [% (w/w)] [a]		
Insolubles (LOQ: < 0.01 %)	n.d.	n.d.
Pi (as PO_4^{3-} , LOQ: < 0.01 %)	4.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1
Aluminum, arsenic, cadmium, chromium, copper, iron, lead, manganese, mercury, nickel, zinc (LOQ: < 0.1 %)	Ca: 0,16 0,38	Zn: 0.22

7.4 Budenheim: Arbeitsprogramm 4

Budenheim bearbeitet drei APe mit zwei Meilensteinen (Tabelle 10). Alle APe und Meilensteine wurden erfolgreich abgeschlossen.

Tabelle 10 Fortschritte in den Arbeitspaketen und Meilensteinen von Budenheim

Arbeitspaket oder Meilenstein	Fortschritte [%]
AP 4.1: Begleitende Analytik	100 %
AP 4.2: Bewertung der Zwischen- und Endprodukte	100 %
AP 4.3: Wirtschaftliche Auswertung	100 %
MS 5: Abgeschlossene Analyse des Autolysats (Phosphatinhalt u. -struktur)	Erreicht
MS 6: Applikationsanalyse Zwischen- u. Endprodukte	Erreicht

Im Rahmen von AP4.1 beriet Budenheim die AG Blank in der Wahl einer geeigneten Polyphosphat-Analytik und die AG Schwaneberg bei dem Thema Gesamtphosphor-Analyse des Rapspresskuchens. Budenheim analysierte die Bio-Polyphosphate, welche von der AG Blank hergestellt wurden, auf deren Kationenzusammensetzung und Chloridgehalt hin. Die angewandten Messmethoden umfassten atomare Absorptionsspektroskopie, optische Emissionsspektroskopie und Ionenchromatographie. Budenheim erbrachte somit Beiträge zu dem Forschungsartikel Christ *et al.* (2020) und der Patentanmeldung Christ und Blank (2019) (AP4.1). Zusammen mit der AG Blank konnte Budenheim das Bio-PolyP vollumfassend charakterisieren. Damit wurde Meilenstein 5 erreicht.

Zu AP 4.2: Die AG Blank stellte erstmalig im Labormaßstab die neuen Produkte polyphosphatreiche Hefeextrakt-Paste und polyphosphat-reiches Hefeextrakt-Pulver her. Budenheim führte anhand der Eigenschaften (Polyphosphatgehalt und -kettenlänge, Orthophosphatgehalt und Aroma) eine kommerzielle Bewertung dieser zwei Produkte durch. Obwohl die Hefeextraktpaste und das Hefeextraktpulver aus Rapsextrakt einen niedrigeren Polyphosphatgehalt und – im Fall der Paste – eine kürzere Polyphosphat-Kettenlänge aufweist, werden die Produkte als kommerziell wertvoll eingestuft. Die Hefeextrakt-Paste mit ihrem hohen Polyphosphatgehalt, langen Kettenlängen und wenig Orthophosphat könnte vor allem in der Herstellung von Schmelzkäse Anwendung finden. Hier werden langkettige Polyphosphate benötigt, um das Calcium in der Milch zu komplexieren, das Caseinmolekül aufzuschließen und dem Schmelzkäse so seine einzigartige Konsistenz zu verleihen. Eine Anwendung der Hefeextrakt-Paste für die Herstellung von Schmelzkäse empfiehlt sich zudem, da die Paste wenig Aroma besitzt und nahezu farblos ist. Der Einsatz des Hefeextrakt-Pulvers wird in erster Linie bei der Herstellung von Fleischprodukten gesehen. Das Hefeextrakt-Pulver zeichnet sich durch eine durchschnittliche Polyphosphatkettenlänge von ca. 3 aus. Für die Herstellung von Fleischprodukten wird

Polyphosphat der Kettenlängen 2 und 3 benötigt (sog. Pyrophosphat und Tripolyphosphat). Pyrophosphat besitzt die einzigartige Eigenschaft, das Actomyosin des Fleisches nach dem rigor mortis wieder zu aktivieren, und stellt so die natürliche, ursprüngliche Wasserbindfähigkeit des Warmfleisches wieder her. Da das Hefeextraktpulver unter den kurzkettigen Polyphosphaten auch Pyrophosphat enthält, empfiehlt sich die Anwendung für Fleischprodukte. Der ebenfalls vorhandene Orthophosphat-Gehalt ist dafür geeignet den pH der Fleischprodukte zu stabilisieren. Das typische Aroma des Hefeextrakt-Pulvers könnte hilfreich für die Herstellung von Fleischprodukten sein, da so ggf. die Zugabe von künstlichen Aromastoffen reduziert oder sogar ein neuartiger Geschmack erzeugt werden könnte.

Im Rahmen von AP4.2 beriet Budenheim die AG Blank in Bezug auf die gewünschten Eigenschaften des Bio-Polyphosphats. So sind Produkte mit unterschiedlichen Kettenlängen (2 bis 40 P-Untereinheiten), pH-Werten (pH 4 bis 7) und Kationenzusammensetzungen (Na^+ , K^+ oder eine Mischung aus beiden) erwünscht. Die kurzkettigeren Varianten finden Einsatz in Fleischprodukten, während langkettige Polyphosphate in der Herstellung von Schmelzkäse verwendet werden. Kalium-Polyphosphate sind für eine natrium-reduzierte Ernährung wichtig. Der pH-Wert bestimmt das Wasserbindevermögen bei der Herstellung von Fleischprodukten und sollte in Verbindung mit den anderen Lebensmittelzusatzstoffen im leicht sauren Bereich liegen. In Absprache mit der AG Blank zeigte sich, dass die Flexibilität der Bio-PolyP-Herstellung einen besonderen Wert besitzt, da bei der Herstellung die Eigenschaften (Kettenlänge, pH, Kationenzusammensetzung) nach Wunsch eingestellt werden können. Solch eine Individualisierung der Polyphosphate ist in der chemischen Synthese nicht möglich.

Budenheim analysierte im hauseigenen Applikationslabor den Einsatz des polyphosphatreichen Hefeextrakts für die Fleischwurstherstellung. Budenheim testete den Hefeextrakt in einer neutralen, reproduzierbaren Fleischmatrix. Die standardisierten Ansätze wurden mit unterschiedlicher Menge an verschiedenen funktionalen Produkten intensiv gemischt (Abbildung 25 links), in eine Konservendose abgefüllt und 75 min bei 85 °C gekocht. Nach einer Kühlphase von 12 h bei 6 °C wurde die Konserve auf 25 °C erwärmt, der Fleischpattie abgesiebt und die verbliebene Masse ausgewogen (Abbildung 25 rechts). Der ermittelte Verlust entspricht der Menge Wasser, die nicht durch das Fleisch gebunden werden konnte.

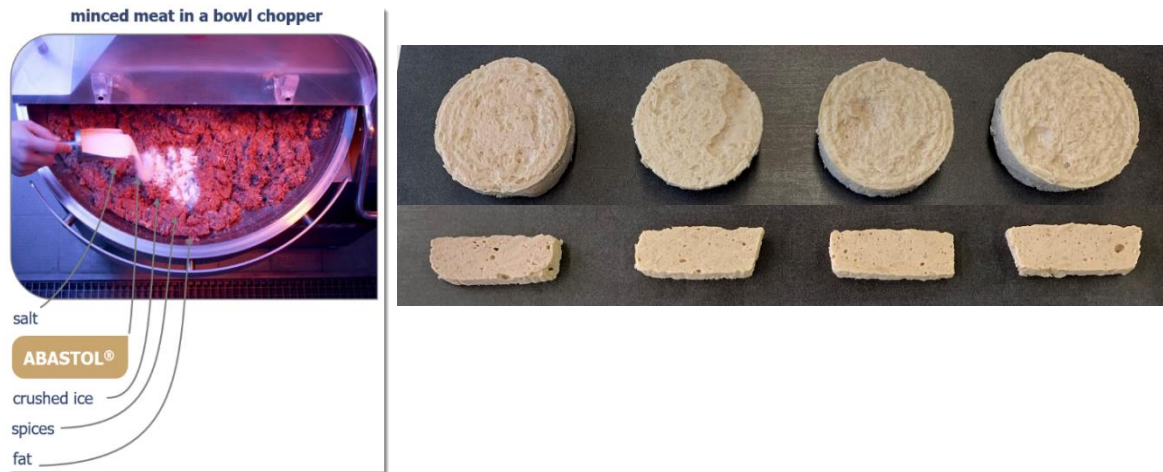


Abbildung 25 Fleischverarbeitung in einem Kutter (links) und verschiedene daraus hergestellte Fleischpatties nach Lagerung in Konserven für 12 h, aufwärmen auf 25 °C und anschließend absieben (rechts).

Als Referenz wurde ein Ansatz ohne weitere Zusätze verarbeitet (Abbildung 26, linke Säule). Dabei ergibt sich ein Gewichtsverlust von > 13 %. Für ein Standardprodukt liegt dieser Wert bei < 2 % (2. Säule). Für den polyphosphat-reichen Hefeextrakt wurde eine Menge dosiert, die dem Phosphatgehalt der Standardprodukte entspricht. Dies wurde mit ca. der 6-fachen Menge Hefeextrakt erreicht. Die ermittelten Werte liegen wie postuliert auf vergleichbar hohem Niveau (3. + 4. Säule). Zur weiteren Überprüfung wurde ein klassischer Gewürzhefeextrakt in der gleichen Dosierung wie der polyphosphatreichen Hefeextrakt verarbeitet. Die Auswertung zeigt mit einem Verlust von 11 Gew.-% eindeutig, dass hierbei lediglich der Geschmack als Funktionalität zum Tragen kam, aber wie angenommen keinerlei Wasserbindefähigkeit zu erkennen war (Abbildung 26, Säule rechts).

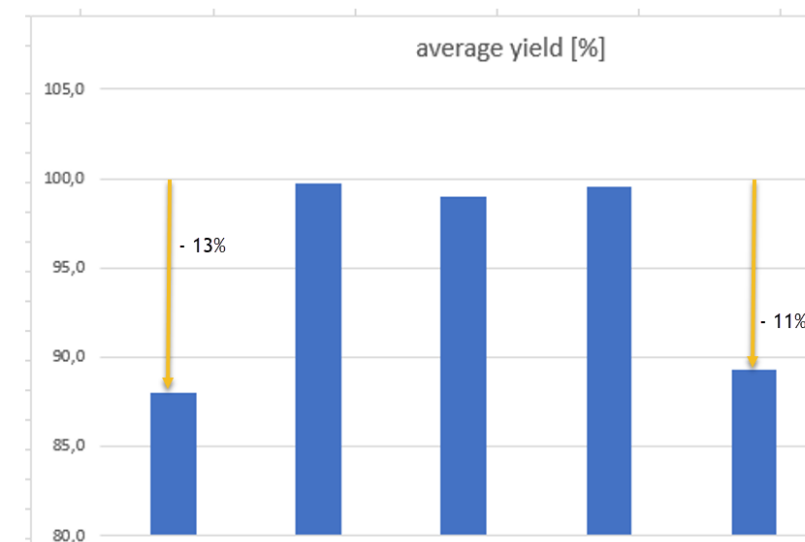


Abbildung 26 Auswertung des Wasserverlusts (von links nach rechts): Blindprobe (kein Phosphatzusatz), Standard-Produkt (anorganisches Salz), polyphosphat-angereicherter Hefeextrakt (zwei Probenauswertungen dargestellt) und reines „Gewürz-Hefeextrakt“.

Neben diesen quantitativen Untersuchungen wurde zusätzlich qualitativ der Biss, die Textur, Farbe, Geruch und Geschmack sowie die Struktur des entstandenen Fleischpatties bewertet und mit Standardansätzen verglichen. Während alle Parameter unauffällig waren, zeigte sich, dass der polyphosphatreiche Hefeextrakt überraschend neutral im Geschmack war. Dies ist positiv, da die höhere Dosierung sonst zu einer ungewünschten Beeinflussung des Geschmacks führen könnte.

Durch die Anwendung des Hefeextrakts in der Fleischwurstherstellung konnte Meilenstein 6 erreicht werden. Die Anwendung des reinen Bio-Polyphosphats konnte nicht durchgeführt werden, da dafür >100 g PolyP benötigt würden, die die AG Blank nicht zur Verfügung stellen konnte.

Wirtschaftliche Auswertung (AP4.3)

Während die anwendungstechnische Eignung bestätigt werden konnte, ist eine wirtschaftliche Betrachtung jedoch nicht ohne Weiteres möglich, da die bisherigen Produktionsschritte durch ihren Versuchscharakter bestimmt waren. Alle Vorgänge dienten zunächst einer Machbarkeitsprüfung. Für eine Wirtschaftlichkeitsprüfung sind weitergehende Versuche notwendig, bei der sowohl eine Optimierung der Produktionsabläufe als auch eine Optimierung der Rohstoffe und Prozessparameter sowie der Supply Chain und Logistik betrachtet werden müssen. Auch die vergleichsweise hohe Dosierung des Extrakts muss kritisch beleuchtet werden, da sich diese unmittelbar auf die Kosten für den Kunden auswirkt und eventuell durch eine Preisgestaltung kompensiert werden muss.

7.5 Stoffflüsse ValuePP-Prozess

Eine Übersicht über den ValuePP-Prozess und die Massenflüsse ist in Abbildung 27 dargestellt. Der Projektpartner RWTH hat einen Pi-Gehalt von ca. 23,5 kg Pi pro t Rapsschrot gemessen, wobei das Pi als Phytat gebunden wurde.

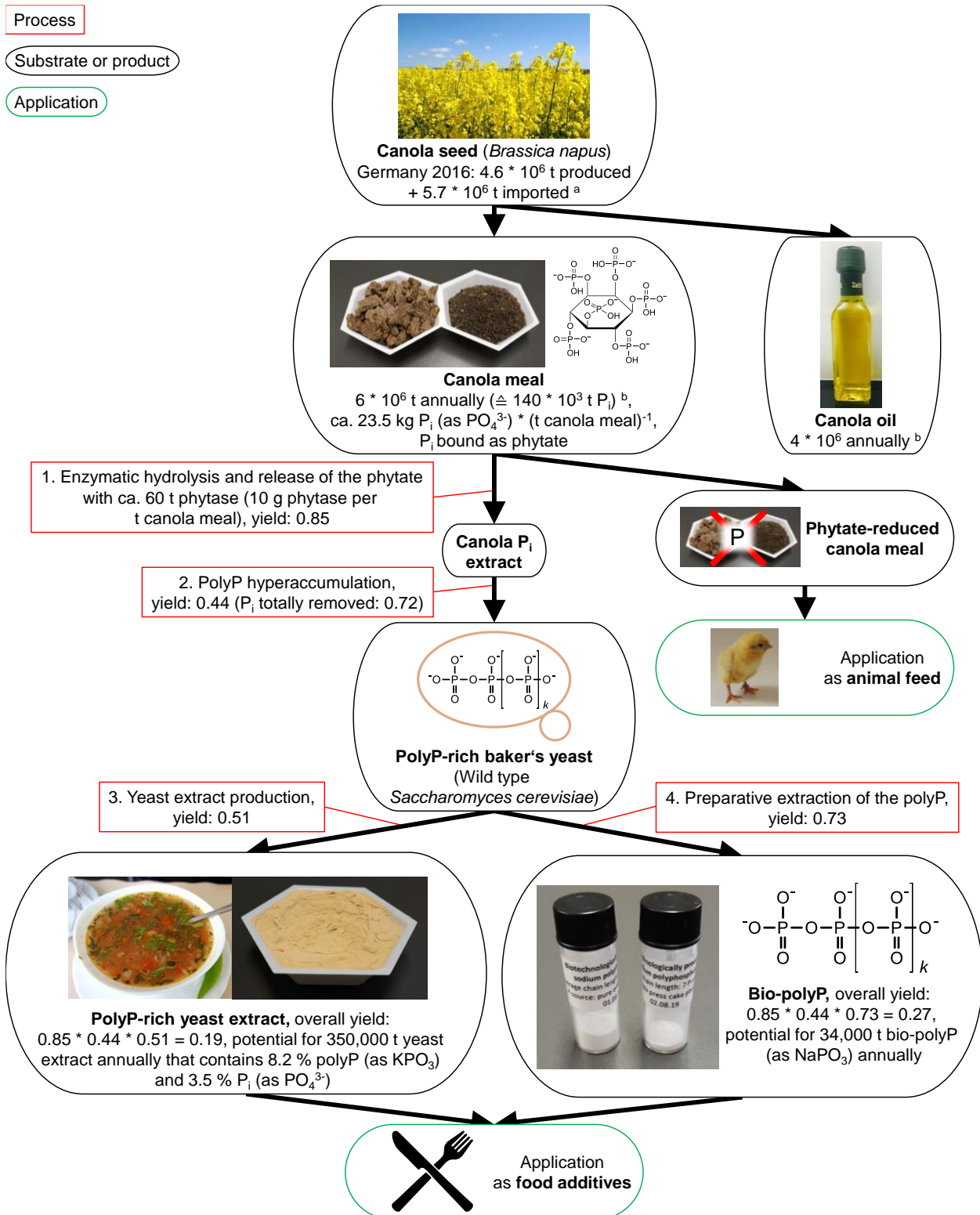


Abbildung 27 Massenströme im ValuePP-Prozess. Eine schematische Prozesskette für das biotechnologische Pi-Recycling von Rapsschrot in lebensmitteltaugliches PolyP wird vorgestellt. Die Bilder des Rapsfeldes¹⁵, der chemischen Struktur des Phytats¹⁶, der Ölfflasche, der Suppe, des Küchens¹⁷ und der Gabel

und des Messers¹⁸ gehören nicht den Autoren und stammen von der frei verwendbaren Bildwebseite [wikimedia.commons.org](https://commons.wikimedia.org). Anmerkungen: a) Daten entnommen aus Ref. ¹⁹, b) Daten entnommen aus Ref.^{20,21}.

Darüber hinaus wurden Pi-Ausbeuten von 0,60 bis 0,85 für die enzymatische Pi-Extraktion aus Rapsschrot ermittelt. Die hohe Ausbeute von 0,85 wurde für die Rapssaat-Extraktionsschrote erzielt, während die Rapssaat-Presskuchen geringere Extraktionsausbeuten aufwiesen. Mit anderen Worten, 85 % (Mol/Mol) des Pi's im Rapssamenextraktionsschrot wurden bei der Behandlung mit Phytase freigesetzt. 10 g Phytase wären erforderlich, um eine Tonne Rapsschrot zu behandeln. Für die Verarbeitung des deutschen Jahresumsatzes an Rapsschrot ($6 \cdot 10^6$ t) wären 60 t Phytase erforderlich.

Für die PolyP-Hyperakkumulation wurde ein Ertrag von 0,44 gemessen. Die Ausbeute für die polyP-reiche Hefeextraktproduktion betrug 0,51. Die Ausbeute für die Produktion von reinem Bio-PolyP betrug 0,73.

Für die Produktion von polyP-reichem Hefeextrakt aus Rapsschrot wurde eine Gesamt-Pi-Ausbeute von 0,19 ($0,85 \cdot 0,44 \cdot 0,51$) erzielt. Die Gesamt-Pi-Ausbeute für die Herstellung von reinem Bio-PolyP aus Rapsschrot betrug 0,27 ($0,85 \cdot 0,44 \cdot 0,73$).

Der jährliche Umsatz an Rapssaatgut in Deutschland beträgt ca. $10,3 \cdot 10^6$ t. Aus dem Rapssaatgut werden jährlich $6 \cdot 10^6$ t Rapsschrot hergestellt. Dieses Rapsschrot enthält ca. 140.000 t Pi, die als Phytat gebunden sind. Es wäre möglich, jährlich 350.000 t Hefeextrakt mit einem PolyP-Gehalt von 8,2 % (w/w, als KPO_3) und einem Pi-Gehalt von 3,5 % (w/w, PO_4^{3-}) herzustellen. Alternativ wäre es möglich, jährlich 34.000 t Bio-PolyP (w/w, als $NaPO_3$) zu produzieren. Die Anwendung des phytatreduzierten Rapsschrots liegt in der Pi-kontrollierten Fütterung von Nutztieren, während der polyP-reiche Hefeextrakt und das Bio-PolyP als Lebensmittelzusatzstoffe eingesetzt werden können.

8 Diskussion

8.1 AG Schwaneberg

Die AG Schwaneberg hat sich mit der enzymatischen Phosphatrückgewinnung aus entölten Rapssamen (Rapspresskuchen) sowie dem Protein Engineering des verwendeten Enzyms befasst. Eine einstufige Extraktion und Hydrolyse der Phosphorspeicherform Phytat in Pflanzen mit dem Ziel des Phosphatrecyclings gab es bisher nicht. Durch exogene Phytasezugabe in einem mild gepufferten Milieu und bei moderaten Temperaturen von 37 °C kann unter umweltfreundlichen Bedingungen Phosphat aus Presskuchen zurückgewonnen werden. Die erhaltenen Produkte (phosphorabreicherter Presskuchen und phosphorhaltiger Reaktionsüberstand) sind im Sinne des Value-PP-Prozesses weiter verwertbar: durch die schonende Behandlung des Presskuchens kann dieser weiterhin als Futtermittel eingesetzt und das zurückgewonnenen Phosphor kann zur Herstellung hochwertiger Phosphate wie Poly-Phosphat verwendet werden. Damit ist eine ganzheitliche Ressourcennutzung möglich und der im Value-PP angestrebte Prozess (Presskuchen → Phosphat → PolyP) darstellbar. Hervorzuheben ist hierbei die kooperative und produktive Zusammenarbeit mit der AG Blank, mit der ein regelmäßiger Probenaustausch und eine Diskussion der Ergebnisse stattfand. Aufgrund der Effizienz des Gesamtprozesses erfolgte eine sehr enge Zusammenarbeit, die deutlich über das im Voraus geplante hinausging. Die Chemische Fabrik Budenheim unterstützte von Seiten der AG Schwaneberg vor allem bei der Charakterisierung der InsP_6 -Standards, weil weder von Lieferanten noch in der Literatur ausreichende Informationen für eine präzise Quantifizierung zu erhalten waren.

Im Rahmen des Protein Engineerings wurde der Fokus auf die verbesserte Hydrolyse von InsP_4 gelegt. In der Literatur sind bisher nur Evolutionskampagnen zur Verbesserung der InsP_6 -Hydrolyse von Phytasen beschrieben, sodass die im Rahmen von Value-PP durchgeführte Evolution einzigartig ist. Mit der Identifizierung einer Variante mit einer verbesserten Hydrolyse von InsP_4 von 3,1-fach im Vergleich zur Wildtyp-Phytase von *E. coli* war diese Evolution sehr erfolgreich. Auf dem steinigen Weg zu diesem Erfolg wurden einige neue Möglichkeiten erschlossen wie die HPLC-Aufreinigung von Standards für InsP_3 , InsP_4 und InsP_5 (Abbildung 4). Der Einsatz der 96-Kanal-Kapillarelektrophorese zum Rescreening der verbesserten Varianten war allerdings nicht möglich, weil der Gerätehersteller *Advanced Analytical Technologies* von *Agilent Technologies* aufgekauft und das Gerät sowie alle seine Verbrauchsmaterialien in der Folge eingestellt wurden (AP1.2 & MS1). Durch die Kombination des modifizierten AMol-Assays (AP1.3) sowie dem Einsatz des InsP_4 -Standards (AP1.1) konnte jedoch eine leistungsfähige Alternative entwickelt werden. Die Rekombination der während des Engineerings identifizierten Positionen erfolgte nicht mittels der OmniChange-Technologie (AP1.4), weil keine unmittelbare Nähe der zu saturierenden Positionen (K24, M216, R267 und T305) gegeben war. Stattdessen erfolgte die Saturierung der Positionen mittels mehrere Ortssättigungsmutagenesen (SDMs).

Bei der Expression und Fermentierung in *Pichia pastoris* sowie dem Protein Engineering der *E. coli* Phytase wurde mit SeSaM Biotech zusammengearbeitet. Im Rahmen des Protein Engineerings hat SeSaM mit seiner Expertise in der Herstellung von Mutantenbibliotheken insgesamt drei Bibliotheken zur Verfügung gestellt, die von der AG Schwaneberg gescreent wurden. Dabei wurden mehrere verbesserte Varianten identifiziert (Tabelle 2).

Die erfolgreichen Ergebnisse wurden Dank einer hervorragenden Kooperation zwischen den Projektpartnern erreicht und der stets konstruktiven Diskussionen im Konsortium, die innerhalb und außerhalb der regelmäßigen Projekttreffen möglich waren.

8.2 SeSaM

Der Projektpartner SeSaM hatte zum Ziel, Mutantenbibliotheken der Enzyme bereitzustellen, Phytasen zu produzieren, sie zu charakterisieren sowie untereinander und mit kommerziellen Enzymen zu vergleichen. Diese Ziele wurden erreicht. Jedoch hat nicht jeder der verfolgten Ansätze Früchte getragen. So schlug das SeSaM-Protokoll zur Generierung von Variantenbibliotheken wiederholt fehl, sodass als Alternative wurde eine „advanced“ epPCR hergestellt, die erfolgreich gescreened wurde. Die Ausbeuten der Phytaseproduktion konnten massiv erhöht werden, sowohl durch die Wahl der Produktionsorganismus, wie durch weitere Optimierungen der Expressionskassette und des Produktionsprozesses. Lediglich der Austausch des Signalpeptids zur Sekretion blieb ohne Verbesserung der Ausbeute, wobei der Ansatz grundsätzlich weiterhin interessant ist. Die durch die AG Schwaneberg zur Verfügung gestellten Phytasen konnten durch den 4-MUP Assay mit kommerziellen Phytasen verglichen werden, und zeigten herausragende Leistung auf diesem Substrat. Allerdings ist anzumerken, dass sich dieser Vorsprung nach Lagerung relativiert, und auf „echtem“ Substrat laut AG Schwaneberg weit weniger deutlich ist. Die Zusammenarbeit mit den weiteren Kooperationspartnern ist als ausgesprochen produktiv und angenehm hervorzuheben.

8.3 AG Blank

Die AG Blank hatte die Ziele die Polyphosphat-Analytik zu etablieren, einen Prozess zur biotechnologischen PolyP-Produktion zu entwickeln und abschließend diesen Prozess hochzuskalieren. Keine geeignete Methode zur Polyphosphat-Analytik konnte in der Literatur gefunden werden. Daher wurde eine analytische Polyphosphat-Extraktion und zwei Enzymassays für die Bestimmung der Gesamt-Polyphosphat-Konzentration und der durchschnittlichen Polyphosphatkettenlänge entwickelt. Damit lag die analytische Basis vor, um den biotechnologischen Prozess zu entwickeln. Es gab vor ValuePP keinen Prozess zur biotechnologischen Polyphosphat-Produktion. Eine Fermentationsstrategie wurde entwickelt, bei der wild-typ Bäckerhefe phosphat-gehungert und anschließend phosphat-gefüttert wird. So konnte ein rekordhoher Gehalt (28 %) an Polyphosphat in Zelltrockenmasse erreicht werden. Die

Weiterverarbeitung zum polyphosphat-reichem Hefeextrakt basierte auf einem Industrieprotokoll, welches dadurch abgeändert wurde, dass die Hefe zunächst hitzebehandelt wurde, um die hefe-eigenen Polyphosphatasen zu inaktivieren. Es gab bis zu ValuePP keinen Prozess, um Bio-Polyphosphat in purer Form in Lebensmittelqualität aus beladener Bäckerhefe aufzureinigen. Ein skalierbarer Prozess wurde entwickelt, mit dem man Natrium- oder Kalium-Bio-Polyphosphat aus der polyP-reichen *S. cerevisiae* in Lebensmittelqualität gewinnen kann. Anschließend wurde der Prozess erfolgreich auf den 2000 L Maßstab hochskaliert.

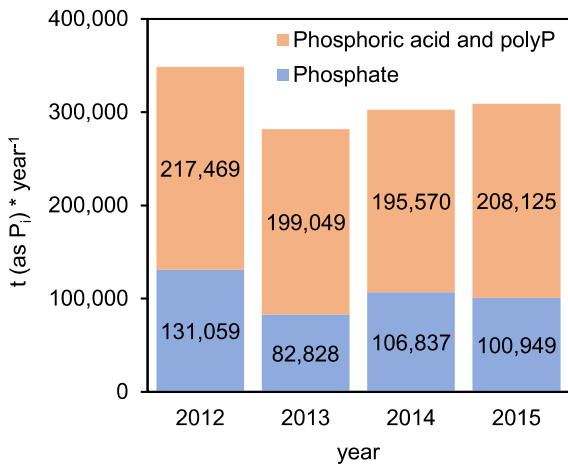
Die beste Möglichkeit zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Prozesses liegt in der Fermentation. Der entwickelte Prozess bestand aus drei Schritten: der Zellmassenproduktion, dem Phosphat-Hungern und dem Phosphat-Füttern. Alle Fermentationen wurden im Batch-Betrieb gefahren. Für einen wirtschaftlichen Prozess muss die Fermentation auf eine „one-pot“ (alle drei Schritte in einem Gefäß) Fermentation im fed-batch-Modus weiterentwickelt werden. Zudem muss Glukose durch die hefeindustrieübliche Melasse als Kohlenstoff- und Energiequelle ersetzt werden.

Weiterhin besteht Entwicklungspotential in der Aufreinigung des Bio-Polyphosphats aus der beladenen Hefe. Hier kann der Prozess so weiterentwickelt werden, dass man das Gegenion, die Reinheit und die Kettenlänge flexibel einstellen kann.

8.4 Phosphatverwendung und Phosphatabfallströme in Deutschland

Ziel dieses Kapitels ist es zu beschreiben, in welcher Größenordnung Pi in Deutschland verwendet wird. Darüber hinaus werden die wichtigsten Pi-Abfallströme in Deutschland zusammengefasst. Beide Themen dienen dem Zweck, den ValuePP-Prozess in das Gesamtbild der deutschen Pi-Landschaft einzuordnen. Die Daten zu den deutschen Importen und Exporten von Pi-haltigen Stoffen wurden aus Ref.²² genommen. Deutschland ist zu 100 % von Pi-Importen abhängig. Pi, Phosphorsäure und PolyP werden nach Deutschland importiert (Abbildung 28A). In der Datenquelle wurde leider nicht zwischen Phosphorsäure und PolyP unterschieden. Im Jahr 2015 wurden insgesamt ca. 310.000 t Phosphorsäure, PolyP und Pi nach Deutschland importiert. Der Export dieser Stoffe aus Deutschland war ca. 20-mal geringer als der Import (Abbildung 28B). Der größte Teil des Pi's (92,1 %) wurde aus Israel importiert (Abbildung 29B). Die Pi-Exporte verteilten sich auf Schweden (23,9 %), Dänemark (23,6 %), die Niederlande (20,4 %), Italien (16,5 %) und Frankreich (12,6 %). Das Importland von 58,9 % der Phosphorsäure und des PolyP wurde als vertraulich gemeldet. 18,2 % der Phosphorsäure und des PolyP's wurden aus Belgien importiert. Die Phosphorsäure und PolyP wurden in die Niederlande (21,7 %) und nach Polen (16,4 %) exportiert. Über Länder mit einem Anteil von < 10 % an den Importen oder Exporten wurden keine Daten berichtet.

A) Imports



B) Exports

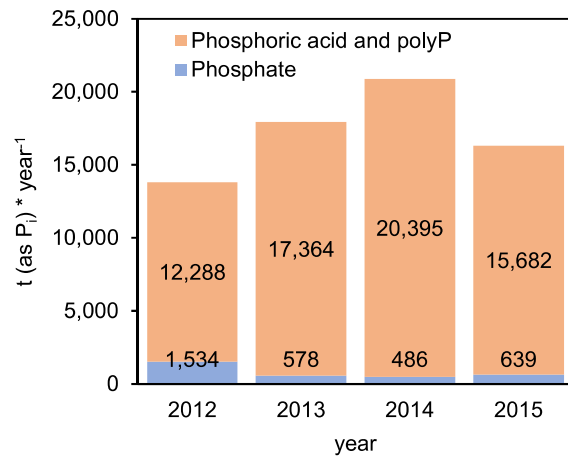


Abbildung 28 Deutsche Importe und Exporte von Phosphat, Phosphorsäure und Polyphosphat. Importe in A, Exporte in B. Daten aus Ref.23.

Die Daten für die Pi-Verwendung in Deutschland wurden aus Ref.²³ genommen. Insgesamt 517.000 t Pi wurden im Jahr 2011 in Deutschland für verschiedene Anwendungen und Branchen verwendet (Abbildung 29). Die Diskrepanz zwischen der Menge an importiertem Pi (350.000 t im Jahr 2012²³) und der Menge an verbrauchtem Pi (517.000 t im Jahr 2011) wurde von den Autoren bemerkt. Eine Erklärung könnte sein, dass das Pi in Düngern, der als Dünger verwendet wurde, in den Düngerdaten. Es wurden große Anstrengungen unternommen, in diesem Kapitel eine einheitliche Einheit (Pi) zu verwenden und die Werte aus der Literatur in diese Einheit umzurechnen. Dennoch kann die Diskrepanz zwischen der Menge an importiertem und gebrauchtem Pi wahrscheinlich bis zu einem gewissen Grad auf die nicht standardisierte Verwendung von Einheiten (P, Pi, P₂O₅, H₃PO₄) in der Literatur zurückgeführt werden.

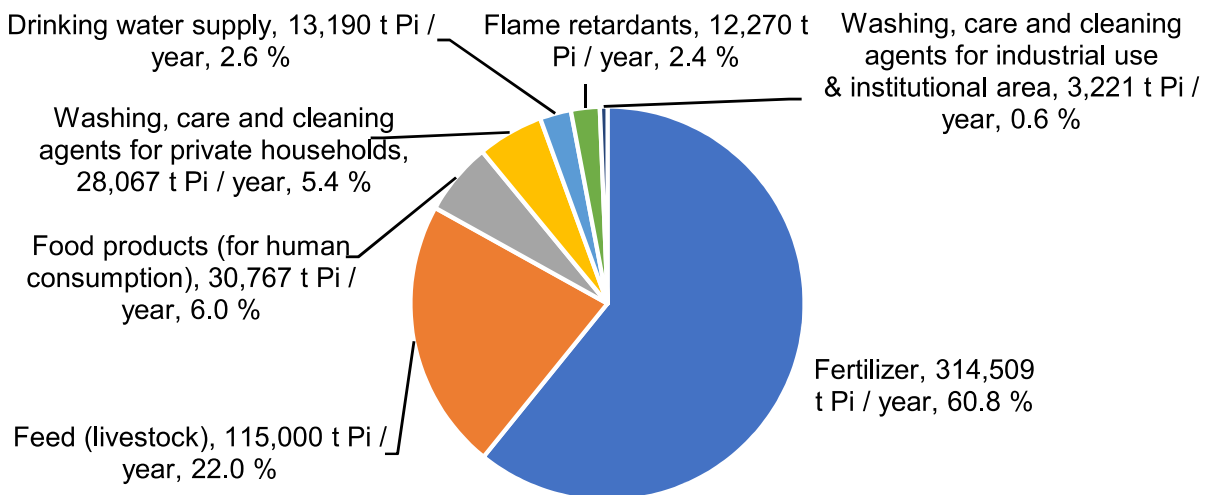


Abbildung 29 Phosphatgebrauch in Deutschland. Einheiten: t Phosphat pro Jahr und Prozent Anteil. Bezogen auf das Jahr 2011 aus Ref.²⁴.

Im Jahr 2011 wurde der größte Teil des Pi (60,8 %) als Dünger verwendet. Fast ein Viertel des Pi wurde als Viehfutter verwendet, während nur 6 % in Nahrungsmitteln für den menschlichen

Verzehr (31.000 t) verwendet wurden. Die verbleibenden Anwendungen fanden sich in Wasch-, Pflege- und Reinigungsmitteln, in der Trinkwasserversorgung und in Flammschutzmitteln. Zu den Nischenanwendungen, die in Abbildung 29 nicht aufgeführt sind, gehörte die Anwendung als Korrosionsschutz, als Insektizid, als Herbizid und in pharmazeutischen Produkten. Es ist darauf hinzuweisen, dass eine Ernährung auf pflanzlicher Basis den Pi-Bedarf, der erforderlich ist, um den jährlichen Lebensmittelbedarf eines Stadtbewohners zu decken, im Vergleich zu einer Ernährung auf der Basis tierischer Produkte um 72 % senken würde²⁴.

Die wichtigsten Pi-Abfallströme in Deutschland und die potenziell verwertbare Menge an Pi sind in Abbildung 30 dargestellt. Tierische Gülle stellt den häufigsten Pi-Strom dar (1.362.000 t Pi * Jahr⁻¹). Gärrest (383.000 t Pi * Jahr⁻¹) werden hauptsächlich als Nebenprodukt bei der Produktion von Biogas gewonnen. Kommunales Abwasser, Klärschlamm und Klärschlammasche führen zusammen 319.000 t Pi * Jahr⁻¹. Rapschrot birgt ein Verwertungspotenzial von 140.000 t Pi * Jahr⁻¹. Sojaextraktionsschrot (abgekürzt Sojaschrot) sollte ebenfalls erwähnt werden (100.000 t Pi * Jahr⁻¹). Im Jahr 2018 wurden in Deutschland $5,1 \cdot 10^6$ t Sojaschrot produziert²⁵. Der Pi-Gehalt von Sojaschrot beträgt ca. 2 %, wobei 60 % des Pi als Phytat gebunden sind^{26,27}. Sojaschrot erscheint als ein weiterer potenzieller Rohstoff für das ValuePP-Verfahren. Andere Ölsaatenmehle, die in Abbildung 30 nicht aufgeführt sind, umfassen $0,4 \cdot 10^6$ t Palmkernextraktionsschrot * Jahr⁻¹ und $0,4 \cdot 10^6$ t Sonnenblumenextraktionsschrot * Jahr⁻¹ Ref.²⁵. Tierische Abfallprodukte (z. B. Schlachthofabfälle) und Industrieabwässer enthalten 61.000 und 46.000 t Pi * Jahr⁻¹. Pi-Abfallströme, für die keine Daten über das potenziell verwertbare Pi vorliegen, umfassen ehemalige Klärschlammdeponien, Komposte und Rückstände aus der biologischen Behandlung von Hausmüll.

Der große Vorteil des Pi-Recycling mit *S. cerevisiae* liegt in der spezifischen Pi-Aufnahme aus kontaminierten Pi-Quellen mit niedrigen Pi-Konzentrationen. Das ValuePP-Verfahren wurde modular aufgebaut. Dies bedeutet, dass die PolyP-Hyperakkumulation mit anderen Pi-Extrakten als Raps-Pi-Extrakt durchgeführt werden kann. Wenn das Pi aus den oben erwähnten Pi-Strömen in wässrige Lösung gebracht wird, könnte *S. cerevisiae* zur Hyperakkumulation des Pi verwendet werden. Von den oben erwähnten Pi-Quellen besitzen jedoch nur die Pflanzenmaterialien (Rapschrot, Sojaschrot, Palmkernexpeller, Sonnenblumenextraktionsschrot) Lebensmittelqualität. Selbstverständlich kann bio-polyP auch in technischen Anwendungen eingesetzt werden. In Anbetracht des höheren Wertes eines Bio-PolyP in Lebensmittelqualität ist die Anwendung als Lebensmittelzusatzstoff vorgesehen.

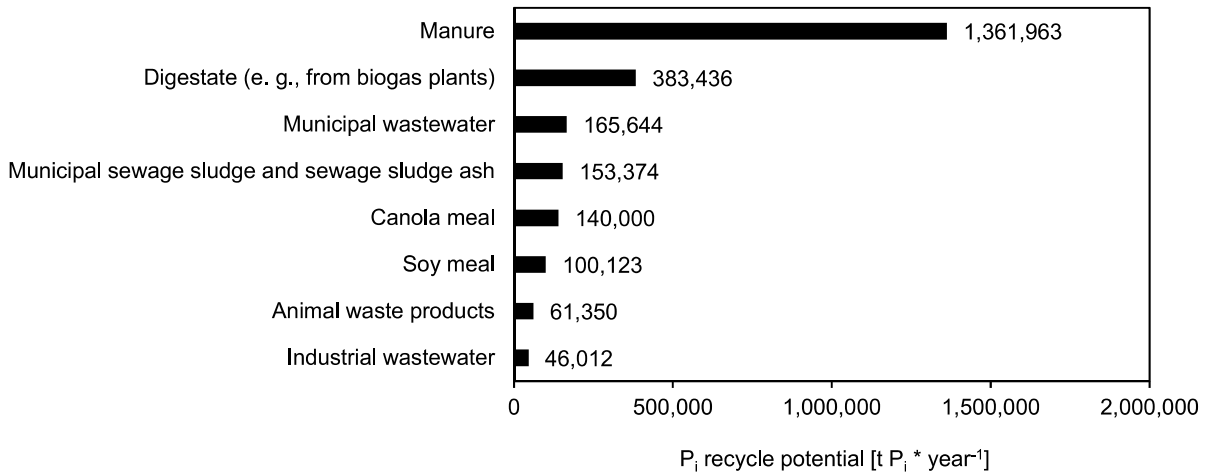


Abbildung 30 Phosphatabfallströme in Deutschland. Die meisten Daten stammen aus Ref.²³. Der Sojamehlwert wurde aus Ref.^{25, 26} berechnet.

Da Pi-Recycling jedoch nicht rentabel ist, stellen gesetzliche Regelungen einen geeigneten Weg dar, Pi-Recycling durchzusetzen. Die neue Düngemittelverordnung trat 2017 in Kraft und reduzierte den zulässigen Pi-Eintrag in deutsche landwirtschaftliche Flächen von 26 kg Pi * Hektar⁻¹ * Jahr⁻¹ auf 13 kg Pi * Hektar⁻¹ * Jahr⁻¹ REF²⁸. Diese Regelung gilt für Ackerland, das $\leq 26 \text{ mg Pi} * (100 \text{ g Boden})^{-1}$ enthält. Bei einem Boden-Pi-Gehalt von $> 26 \text{ mg Pi} * (100 \text{ g Boden})^{-1}$ darf nur die Menge des Pi-Austrages gedüngt werden. 20 % des gesamten Pi in Rinder- und Schweinegülle sind als Phytat gebunden und daher nicht bioverfügbar²⁹. Noch schlimmer ist die Situation bei Hühnermist, wo 40 % des gesamten Pi als Phytat gebunden sind. Infolgedessen sind 60 bis 80 % des organischen Pi im Boden als Phytat gebunden³⁰. Das Pi im Phytat wird für Pflanzen erst nach einer langen Zeit der mikrobiologischen Verdauung im Boden verfügbar. Da die Gesamtmenge an Pi gesetzlich begrenzt ist, ist der Landwirt an möglichst wenig Pi im Dung interessiert. Hier kommt das ValuePP-Verfahren ins Spiel. Würden Schweine und Geflügel mit phytatreduziertem Rapschrot aus dem ValuePP-Verfahren gefüttert, könnte der Phytatgehalt der Gülle erheblich reduziert werden.

8.5 Sicherheit von Phosphat als Lebensmittel

Die primäre Anwendung des Bio-PolyP, das im ValuePP-Prozess hergestellt wurde, wird als Lebensmittelzusatzstoff gesehen. PolyP hydrolysiert im sauren Milieu des Magens zu Pi. Eine Mindestmenge an Pi ist für die menschliche Ernährung essentiell. Die tägliche Pi-Aufnahme in g Pi * Tag⁻¹ reicht von 5,5 bis 8,6 bei Männern, von 4,6 bis 6,4 bei Frauen, von 4,0 bis 5,8 bei Kindern im Alter von 4 bis 10 Jahren und von 4,9 bis 7,7 bei Jugendlichen im Alter von 11 bis 17 Jahren³¹. Solange die akzeptable Tagesdosis von P_i (122 mg Pi * kg Körpergewicht⁻¹ * Tag⁻¹) nicht überschritten wird, ist PolyP für den menschlichen Verzehr bei gesunden Personen sicher³². Für eine gesunde Person mit 70 kg Körpergewicht sind das insgesamt 8,5 g Pi täglich. Eine detaillierte Diskussion über Gesundheitsfragen bezüglich der Pi-Aufnahme findet sich in Ref.³³. Dort kommen die Autoren zu dem Schluss: "Auf der Grundlage der aktuellen wissenschaftlichen Evidenz kann der

Schluss gezogen werden, dass normale westliche Niveaus der ernährungsbedingten P-Aufnahme sicher sind: keine Studien haben über einen klaren Zusammenhang mit Gesundheitsrisiken beim Menschen berichtet³³. Überschüssiges Pi wird über die Niere ausgeschieden. Bei Patienten mit Nierenproblemen kann ein Überschuss an Pi in der Nahrung zu Gesundheitsschäden führen.

Der größte Teil des Pi in der menschlichen Ernährung stammt aus natürlichen Quellen, wie Milch, Milchprodukten und Fleisch. Der Pi-Gehalt von Nahrungsmitteln beträgt z.B. 1,534 % (w/w) für Tilsiter Käse, 0,727 % für Rindfleisch, 0,282 % für Kuhmilch und 0,043 % für Cola-Getränke^{34, 35}, S. 63 in Ref.³⁶). Ein gesunder Mensch mit 70 kg Körpergewicht müsste 0,5 kg Tilsiter-Käse, 1,1 kg Rindfleisch, 3 l Kuhmilch oder 20 l Cola-Getränke zu sich nehmen, um die akzeptable tägliche Aufnahme von Pi zu erreichen. Der diätetische Beitrag von Pi aus Lebensmittelzusatzstoffen beträgt nur ca. 0,36 g Pi * Tag⁻¹ Ref.³³.

8.6 Kommerzielles Potential des ValuePP-Prozesses

Nachdem der Preis für Pi-Erz von 1980 bis 2006 mit 40 US-Dollar pro t Pi-Erz relativ konstant geblieben war, stieg er 2008 für einen kurzen Zeitraum auf 430 US-Dollar pro t Pi-Erz an (Abbildung 31, REF³⁷). Die Preisvolatilität blieb seither hoch. Jetzt, im Jahr 2019, liegt der aktuelle Preis für Pi-Erz bei ca. 430 US-Dollar pro t Pi-Erz. 100 US-Dollar pro t (\cong 92 Euro pro t Pi-Erz). Der am häufigsten vorkommende Rohstoff, der aus Pi-Erz hergestellt wird, ist Pi-Dünger. Der Preis von zwei der gebräuchlichsten Pi-Düngemittel (Dreifach-Superphosphat und Diammoniumphosphat) folgte der gleichen Preisentwicklung wie Pi-Erz (Abbildung 31). Heute liegt der Preis für beide bei etwa 320 US-Dollar pro t (\cong 294 Euro pro t Pi-Düngemittel).

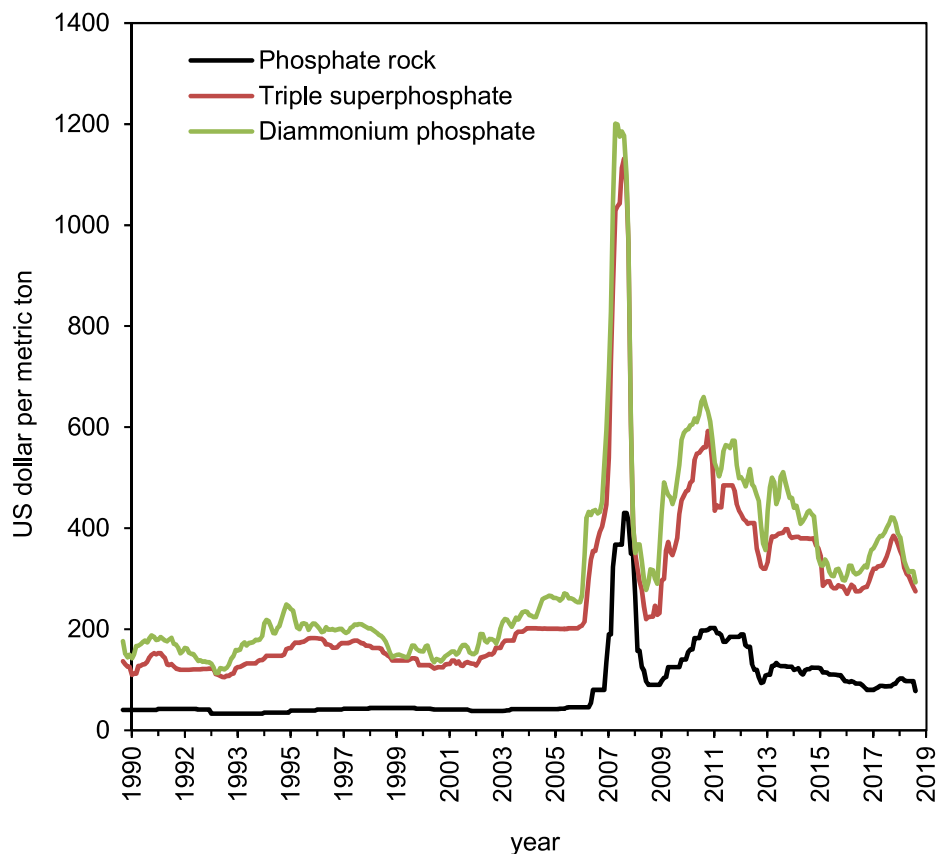


Abbildung 31 Preisentwicklung. Daten aus Ref.³⁷.

Bei vielen Pi-Recyclingverfahren wird Pi in Form von Pi-Dünger zurückgewonnen. Dieser recycelte Pi-Dünger muss finanziell mit dem Preis von Düngemitteln wie Dreifach-Superphosphat und Diammoniumphosphat konkurrieren. Der ValuePP-Prozess gewinnt das Pi aus Rapschrot zurück und recycelt es zu dem wertvolleren PolyP. Der aktuelle Preis von PolyP in Lebensmittelqualität wurde ermittelt, indem auf einem der größten B2B-Online-Marktplätze www.alibaba.com entweder nach "Lebensmittel-SHMP" oder nach "Polyphosphat in Lebensmittelqualität" gesucht wurde. SHMP (engl. für Natriumhexametaphosphat) ist der Handelsname von PolyP, obwohl diese Beschreibung chemisch nicht genau ist. Neunzehn Angebote aus Asien wurden ausgewertet. Der Preis reichte von 600 bis 5.000 US-Dollar pro t PolyP mit einem Durchschnitt von 1.561 US-Dollar pro t PolyP (\cong 1.436 Euro pro t PolyP).

Dr. Rainer Schnee wurde zum Preis von PolyP befragt. Seinem Gutachten zufolge kostet PolyP aus Europa oder Nordamerika ca. 2.000 Euro pro t und PolyP für Spezialanwendungen, wie z.B. die Herstellung von Weichkäse, ca. 3.000 Euro pro t. Bio-PolyP muss als "Premium-PolyP" betrachtet werden, da es für die Herstellung von Bio-Produkten verkauft werden kann und als ökologisch nachhaltig vermarktet werden kann. Daher wird der Wert von Bio-PolyP auf 2.000 bis 5.000 Euro pro t geschätzt.

Jährlich werden 2.700 t und 11.000 t PolyP mit einer Kettenlänge von ≥ 4 P-Untereinheiten ($\text{PolyP}_{n \geq 4}$) in Deutschland bzw. Europa verkauft³⁸. Leider ist dieser Bericht aus dem Jahr 2012 die einzige Statistik über den PolyP-Absatz. Der kombinierte jährliche Verkauf von PolyP_2 und PolyP_3

wird um eine Größenordnung höher geschätzt. Bio-PolyP und Hefeextraktpaste aus dem ValuePP-Verfahren messen ≥ 4 P-Untereinheiten ($\text{polyP}_{n \geq 4}$).

Von den $6 * 10^6$ t Raps, die in Deutschland jährlich produziert werden, werden $4 * 10^6$ t als Tierfutter verwendet³⁹. Wie viel von diesen $4 * 10^6$ t dem ValuePP-Verfahren unterzogen werden könnte, hängt von der Nachfrage der Futtermittelindustrie nach phytatreduziertem Rapsschrot ab. Das Pi in den verbleibenden $2 * 10^6$ t Rapsschrot geht aus der Nahrungsmittelkette verloren und sollte mit dem ValuePP-Verfahren verwertet werden.

Würde das gesamte Rapsschrot in Deutschland ($6 * 10^6$ t) dem ValuePP-Verfahren unterzogen werden, könnten in Deutschland jährlich ca. 34.000 t Bio-PolyP produziert werden. Diese Menge übersteigt den deutschen Jahresumsatz von $\text{PolyP}_{n \geq 4}$ deutlich. Das Bio-PolyP könnte auch in die Europäische Union exportiert werden. Selbst wenn nur das nicht als Tierfutter verwendete Rapsschrot ($2 * 10^6$ t Rapsschrot) dem ValuePP-Verfahren unterzogen würde, könnten 11.000 t Bio-PolyP produziert werden, was die europäische Nachfrage nach $\text{PolyP}_{n \geq 4}$ decken würde.

Geht man von einem europäischen Marktanteil von 10 % ($1.100 \text{ t PolyP}_{n \geq 4} * \text{Jahr}^{-1}$) und einem Marktpreis von 5.000 Euro pro t Bio-PolyPn aus, könnte mit dem Verkauf von Bio-PolyP ein jährlicher Erlös (Preis mal Menge) von $5,5 * 10^6$ Euro erzielt werden (Eq. 1). Die Kosten sind definiert als Produktionskosten mal Menge (Eq. 2). Geht man von Produktionskosten von 3.600 Euro pro Tonne Bio-PolyP aus, so belaufen sich die Kosten auf $3,9 * 10^6$ Euro pro Jahr. Mit der Produktion von Bio-PolyP kann theoretisch ein Gewinn, definiert als Ertrag minus Kosten, von $1,6 * 10^6$ Euro pro Jahr erwirtschaftet werden (Eq. 3). Magnus gibt an, dass Zucker bei der biotechnologischen Fermentation ca. 60 % der Produktionskosten ausmacht und dass Zucker ca. 268 Euro pro Tonne kostet⁴⁰. Die biotechnologische PolyP-Produktion, wie sie in dieser Doktorarbeit beschrieben wird, erfordert 82,5 g Glukose pro g Bio-PolyP. Daher liegen die derzeitigen Produktionskosten bei 36.000 Euro pro Tonne Bio-PolyP, was zehnmal zu hoch ist, um rentabel zu sein (Eq. 2, Eq. 3). Eine Senkung der Produktionskosten ist wahrscheinlich, weil die Prozessentwicklung und das Upscaling noch ganz am Anfang stehen. Eine richtige Business-Case-Analyse ist komplexer. Insbesondere die Produktionskosten sollten in zukünftigen Studien, die eine schrittweise Hochskalierung des ValuePP-Prozesses begleiten, geschätzt werden. Während die Rentabilität des Prozesses ein wesentliches Kriterium bei der Realisierung des Prozesses ist, sollten auch andere Aspekte wie die Pi-Versorgungssicherheit, die intergenerationelle Gerechtigkeit und eine nachhaltige Pi-Wirtschaft berücksichtigt werden (S. VIII in Ref.⁴¹).

$$\text{Umsatz} = \text{Preis} * \text{Quantität} = 5,000 \text{ €/t} * 1,100 \text{ t/Jahr} = 5.5 \text{ mio. €/Jahr} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{Kosten} = \text{Produktionskosten} * \text{Quantität} = 3,600 \text{ €/t} * 1,100 \text{ t/Jahr} = 3.9 \text{ mio. €/Jahr} \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Profit} = \text{Umsatz} - \text{Kosten} = 5.5 \text{ mio. €/Jahr} - 3.9 \text{ mio. €/Jahr} = 1.6 \text{ mio. €/Jahr} \quad \text{Eq. 3}$$

Die Einführung des ValuePP-Prozesses in den Markt kann schrittweise erfolgen. Im ersten Schritt wird ein polyP-reicher Hefeextrakt als minimal lebensfähiges Produkt aus reinem Pi als

Clean-Label-Pi-Lebensmittelzusatz hergestellt. Die Marktnachfrage von Lebensmittelherstellern (business to business, B2B) nach einem solchen Produkt ist vorhanden. Dieses Verfahren könnte von den Hefeextrakt-Herstellern mit nur geringen Investitionen umgesetzt werden, da die kritischen Maschinen (Gär- und Reaktionsbehälter, Fest-Flüssig-Trenner und Sprühtrockner) bereits vorhanden und der Markt für Hefeextrakte bekannt ist. Der überzeugende Verkaufsslogan würde lauten: "clean-label Pi Lebensmittelzusatzstoff". Der Clean-Label-Status des Produkts muss bestätigt werden.

In einem zweiten Schritt kann der ValuePP-Prozess als Ganzes (Rapsschrot zu Bio-PolyP) in den Markt eingeführt werden. Siehe Carraresi et al. für einen detaillierten Überblick über mögliche Business Cases⁴². Die Umsetzung dieses Prozesses ist schwieriger, da kein bestehendes Unternehmen die notwendigen Maschinen und die Logistik anbietet. Darüber hinaus würde ein solches Vorhaben Industrien zusammenführen, die normalerweise nicht zusammenarbeiten (Ölmühlen, Enzymproduzenten, eine neue Bio-PolyP-Produktionsanlage und Pi-Unternehmen als Vertriebspartner). Die Verkaufsargumente könnten "grüne PolyP" und "Unabhängigkeit von Pi-Importen" sein.

8.7 Ethische Einschätzung

Die globalen Pi-Erzreserven werden in einigen hundert Jahren erschöpft sein. Es müssen Strategien zur Reduzierung, Wiederverwendung und zum Recycling von Pi entwickelt werden. Das ValuePP-Projekt zielte darauf ab, Pi aus dem ungenutzten Pi-Abfallstrom Rapsschrot zu lebensmittelechtem PolyP wiederzuverwerten. Eine erfolgreiche Umsetzung des ValuePP-Prozesses wäre ein Schritt hin zu einer geplanten zirkulären Pi-Wirtschaft.

Ein wirtschaftlicher Vorteil des polyP-reichen Hefeextrakts wäre, dass er ein Clean-Label-Pi und ein PolyP-Lebensmittelzusatzstoff ist. Das bedeutet, dass Lebensmittelhersteller in der Lage wären, ihren Produkten Pi (E339, E340) und PolyP (E450, E451, E452) hinzuzufügen, ohne sie mit ihren jeweiligen E-Nummern auf der Lebensmittelverpackung kennzeichnen zu müssen. Aus der Sicht der Lebensmittelhersteller ist dies wünschenswert, da die Kunden Lebensmittelprodukte mit wenigen bis gar keinen E-Nummern bevorzugen. Dieser Ansatz ist in der Lebensmittelindustrie gängige Praxis. Glutamat-reicher Hefeextrakt, Inosin-Monophosphat-reicher Hefeextrakt und Guanosin-Monophosphat-reicher Hefeextrakt (alle als "Hefeextrakt" bezeichnet) ersetzen die Geschmacksverstärker Mononatriumglutamat (E621), Dinatriuminosinat (E631) und Dinatriumguanylat (E627). Sowohl rote Rüben- als auch Paprikaextrakte ersetzen rote Lebensmittelfarbe. Das Verstecken von Lebensmittelzusatzstoffen in Hefeextrakt kann aus ethischer Sicht als Kundentäuschung angesehen werden, da die Verbraucher nicht kontrollieren können, welche Zusatzstoffe sie konsumieren. Hefeextrakthersteller argumentieren, dass z.B. Glutamat ein natürlicher Bestandteil von Hefeextrakt ist. Obwohl unter anderem auch Käse, Fleisch, Fisch, Meeresfrüchte, Pilze und Nüsse beträchtliche Mengen an Glutamat enthalten, ist es unstrittig, ob Glutamat auf diesen Produkten gekennzeichnet werden muss. Daher gibt es keine definitive Antwort

auf die Frage, ob Glutamat aus glutamatreichem Hefeextrakt gekennzeichnet werden muss. Im Falle von polyP/Pi-reichem Hefeextrakt könnte man mit dem gleichen Argument für das Clean-Label argumentieren. Der von Natur aus hohe Pi-Gehalt in z.B. Fleisch, Geflügel, Fisch, Soja, Nüssen, Samen, Hülsenfrüchten, Milch und Getreide ist nicht gekennzeichnet. Der Produktionsprozess dieser Lebensmittel wird jedoch nicht absichtlich verändert, um den Pi-Gehalt des Endprodukts zu erhöhen. Die PolyP-Hyperakkumulation in dieser Doktorarbeit zielte bewusst auf die Erhöhung des Pi/polyP-Gehalts des Hefeextrakts ab. Daher kann man argumentieren, dass das natürlich vorhandene Pi/polyP (es gibt kein nachweisbares PolyP, jedoch bis zu 7 % Pi) in Hefeextrakt aus "normalem" *S. cerevisiae* als clean-label angesehen werden kann. Pi/polyP in Hefeextrakt aus polyP-reichem *S. cerevisiae* (absichtlich angereichert) sollte jedoch deklariert werden. Auch die Gesundheit der Verbraucher sollte berücksichtigt werden. Von Pi/polyP in Lebensmitteln sind keine nachteiligen gesundheitlichen Auswirkungen für eine gesunde Person zu erwarten. Menschen mit z.B. Nierenfunktionsstörungen sollten jedoch Pi-reiche Lebensmittel vermeiden. Die Nichtkennzeichnung von Pi auf Nahrungsmitteln kann für diese Personen ein Gesundheitsrisiko darstellen.

Gegenwärtig werden keine biotechnologisch hergestellten PolyPs industriell verwendet. PolyP-reicher Hefeextrakt kann als Mittel zu einem größeren Ziel betrachtet werden, nämlich dem Markteintritt und der Akzeptanz von biotechnologisch hergestellten PolyP. PolyP-reicher Hefeextrakt kann von der Industrie aufgrund des wirtschaftlichen Vorteils des Clean-Label akzeptiert werden. Dies kann den Weg für den Markteintritt von reinem Bio-PolyP ebnen, welches aus Pi-Abfallströmen hergestellt wird. Die Umsetzung der Produktion von reinem Bio-PolyP aus Pi-Abfallströmen im industriellen Maßstab ist teuer, da nur wenig vorhandene Infrastruktur und Maschinen genutzt werden können. Eine positive Erfahrung mit polyP-reichem Hefeextrakt könnte die Bereitschaft der Industrie erhöhen, in die Produktion von reinem Bio-PolyP zu investieren. Das reine Bio-PolyP muss auf Lebensmittelprodukten gekennzeichnet werden. Zudem muss reines Bio-PolyP wahrscheinlich als neuer Lebensmittelzusatzstoff von der Lebensmittelbehörde zugelassen werden, was teuer und zeitaufwendig ist. Das umweltverträgliche Image von reinem bio-polyP könnte jedoch in Zeiten zunehmenden öffentlichen Umweltbewusstseins für die Kunden attraktiv sein.

9 Öffentlichkeitsarbeit

Bisher konnten in ValuePP drei Patente angemeldet, und sieben Forschungsartikel und zwei Übersichtsartikel veröffentlicht werden. Zudem wurde ein Buch veröffentlicht. Zwei Vorträge und sechs Posterpräsentationen wurden gehalten. Folgeprojekte entstanden und weisen die hervorragenden Ergebnisse und Kooperationen nach. Das MWIDE geförderte Projekt Business-P untersuchte das Business Case Modell für die Valorisierung des Phosphors. Des Weiteren wird im DBU geförderte Projekt PhANG die Herstellung von Phosphor reduziertem Futter auf Roggenkleie Basis bearbeitet. Das BMBF fördert die Synthese von PolyP mit Hefen im Projekt MeY4bioPP.

9.1 Patentanmeldungen

Die Patentanmeldung von Ruff *et al.* (2020) befasst sich mit der Freisetzung von Phosphat aus verschiedenen Pflanzenmaterialien mittels Phytasebehandlung. Die Patentanmeldung von Christ und Blank (2019) beschreibt die Freisetzung und Aufreinigung von Bio-Polyphosphat aus polyphosphat-reicher *S. cerevisiae*. Die Patentanmeldung von Christ und Blank (2018) thematisiert die Produktion von polyphosphat-reicher *S. cerevisiae* und der Herstellung von polyphosphat-reichem Hefeextrakt daraus.

Ruff AJ, Schwaneberg U, Herrmann KR (2020) Verfahren zur Bereitstellung von Phosphat aus einer Phytat-haltigen Biomasse, Phytat- und Phosphatreduzierte Biomasse und Verwendungen hiervon, DE 10 2020 200 670.9.

Christ JJ, Blank LM (2019) Zusammensetzung, enthaltend getrocknetes Polyphosphat und Verfahren zur Gewinnung von Polyphosphat aus polyphosphat-haltigen Hefezellen dazu, DE 10 2019 131 561.1.

Christ JJ, Blank LM (2018) Polyphosphatreiche Hefeextrakte und Herstellverfahren dazu, DE 10 2018 130 081.6 und PCT/EP2019/082709.

9.2 Forschungsartikel

Der Forschungsartikel von Herrmann *et al.* (2020) beschreibt die Freisetzung von Phosphat aus verschiedenen Pflanzenmaterialien mittels Phytasebehandlung. Der Forschungsartikel von Christ *et al.* (2020) befasst sich mit der Freisetzung und Aufreinigung von Bio-Polyphosphat aus polyphosphat-reicher *S. cerevisiae*. Der Forschungsartikel von Christ und Blank (2019) befasst sich mit der Produktion von polyphosphat-reicher *S. cerevisiae* und der Herstellung von polyphosphat-reichem Hefeextrakt daraus. In den Forschungsartikeln von Christ und Blank (2018), Christ und Blank (2019) und Christ *et al.* (2019) wurden Methoden zur analytischen Polyphosphatextraktion, der Gesamtpolyphosphatbestimmung und der Quantifizierung der durchschnittlichen Polyphosphatkettlänge entwickelt.

Herrmann KR, Ruff AJ, Schwaneberg U (2020) Phytase-based phosphorus recovery process for 20 distinct press cakes, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b07433> [Epub – ahead of publication].

Volhard MF, Christ JJ, Blank LM, Jüstel T (2020) Seawater activated TiO₂ photocatalyst for degradation of organic compounds, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 16, 100251.

Christ JJ, Smith SA, Willbold S, Morrissey JH, Blank LM (2020) Biotechnological synthesis of water-soluble food-grade polyphosphate with *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and Bioengineering*, 117 (7), 2089-2099.

Christ JJ, Willbold S, Blank LM (2019) Polyphosphate chain length determination in the range of two to several hundred P-subunits with a new enzyme assay and ³¹P NMR, *Analytical Chemistry*, 91 (12), 7654-7661.

Christ JJ, Blank LM (2019) *Saccharomyces cerevisiae* containing 28 % polyphosphate and production of a polyphosphate-rich yeast extract thereof, *FEMS Yeast Research*, 19 (3), foz011.

Christ JJ, Blank LM (2018) Analytical polyphosphate extraction from *Saccharomyces cerevisiae*, *Analytical Biochemistry*, 563, 71-78.

Christ JJ, Blank LM (2018) Enzymatic quantification and length determination of polyphosphate down to a chain length of two, *Analytical Biochemistry*, 548, 82-90.

9.3 Übersichtsartikel

Christ *et al.* (2020) geben einen Überblick über die Möglichkeiten der Polyphosphatanalytik in den Biowissenschaften. Herrmann *et al.* (2019) fassen das Potential und den Einsatz optimierter Phytasen in neuen biotechnologischen Anwendungen zusammen.

Christ JJ, Willbold S, Blank LM (2020) Methods for the analysis of polyphosphate in the life sciences, *Analytical Chemistry*, 92 (6), 4167-4176].

Herrmann KR*, Ruff AJ*, Infanzón B, Schwaneberg U (2019) Engineered phytases for emerging biotechnological applications beyond animal feeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (16), 6435-6448.

9.4 Bücher

Die Doktorarbeit von Jonas Christ wurde als Buch im Apprimus Verlag veröffentlicht und behandelt die Themen Phosphatrecycling, Polyphosphatanalytik und biotechnologische Polyphosphatproduktion.

Christ JJ (2020) Novel polyphosphate analytics for the development of biotechnological polyphosphate production. Aachen, Deutschland: Apprimus Verlag. Auch digital: <https://publications.rwth-aachen.de/record/787160/files/787160.pdf>

Die Doktorarbeit von Kevin Herrmann wird an der RWTH veröffentlicht und wird im Publikationsserver der Universitätsbibliothek frei zugänglich sein. Diese behandelt die Themen Biotechnologische phosphor Rückgewinnung, Phytase Engineering und Phosphat Herstellung aus entölten Samen.

Herrmann Kevin R. (2021) Phytase engineering for efficient phosphate recovery from press cakes. Aachen Deutschland: RWTH Publications, Digital. Link verfügbar nach der Prüfung ab voraussichtlich Februar 2021.

9.5 Vorträge

Der ValuePP-Prozess wurde 2019 auf dem Forum der Deutschen Phosphor Plattform in Frankfurt den Keyplayern der Phosphat-Gemeinschaft vorgestellt. Zudem wurde der ValuePP-Prozess auf dem BioSC International Workshop und der Tagung AcES (Aachen Protein Engineering Symposium) einer internationalen Gemeinschaft von Forschern präsentiert.

Christ JJ, Herrmann KR, Ruff AJ, Schönauer D, Cardinier K, Buchold D, Schnee R, Schwaneberg U, Blank LM (2019) ValuePP – Phosphatrecycling aus Raps mit gekoppelter Valorisierung zu Polyphosphat (Engl. translation: Phosphate recycling from canola with coupled valorization into polyphosphate), Forum der Deutschen Phosphor Plattform (German Phosphorus Platform), Frankfurt a. M., Germany.

Christ JJ, Herrmann KR, Ruff AJ, Schoenauer D, Cardinier K, Buchold D, Schnee R, Schwaneberg U, Blank LM (2019) The ValuePP process – biotechnological phosphate recycling from canola seed press cake into food-grade polyphosphate, BioSc International Workshop, Aachen, Germany.

Ruff AJ, Herrmann KR and Schwaneberg U (2018) Phosphorus recovery from plant seeds using engineered phytases, AcES Symposium, Aachen Germany.

9.6 Poster-Präsentationen

Ergänzend zu den oben geschilderten Vorträgen wurden Inhalte von ValuePP auf Postern auf diversen Fachtagungen vorgestellt (BioTrans in Groningen 2019, DPP Forum in Frankfurt 2019, PYFF 2019 in Mailand, VAAM 2019 in Mainz, AcES 2018 in Aachen und zwei BioSC-Treffen 2018).

Herrmann K R., Ruff AJ, Christ JJ, Blank LM, Schwaneberg U (2019) Phosphorus recovery from plant seeds using engineered phytases. 14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (BioTrans), Groningen (Netherlands).

Christ JJ, Herrmann KR, Ruff AJ, Schönauer D, Cardinier K, Buchold D, Schnee R, Schwaneberg U, Blank LM (2019) ValuePP – Phosphatrecycling aus Raps mit gekoppelter Valorisierung zu Polyphosphat (Engl. translation: Phosphate recycling from canola with coupled valorization into polyphosphate), Forum der Deutschen Phosphor Plattform (German Phosphorus Platform), Frankfurt a. M., Germany.

Christ JJ, Blank LM (2019) Polyphosphate in *Saccharomyces cerevisiae* – from overcoming analytical challenges to biotechnological polyphosphate production, 7th conference on physiology of yeasts and filamentous fungi, Milano, Italy.

Christ JJ, Blank LM (2019) Polyphosphate analytics for *Saccharomyces cerevisiae* utilizing a new enzymatic assay, Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Mainz, Germany.

Herrmann KR, Ruff AJ, Christ JJ, Blank LM, Schwaneberg U (2018) Phosphorus recovery from plant seeds using engineered phytases. 2nd Aachen Protein Engineering Symposium (AcES), Aachen, Germany.

Herrmann KR, Ruff AJ, Christ JJ, Blank LM, Schwaneberg U (2018) Phosphorus recovery from plant seeds using engineered phytases. 3rd BioSC Spotlight: Phosphorus recovery and recycling Aachen, Germany.

Christ JJ, Blank LM (2018) Polyphosphate analytics for *Saccharomyces cerevisiae* utilizing a new enzymatic assay, 2nd Aachen Protein Engineering Symposium (AcES), Aachen, Germany.

Christ JJ, Blank LM (2018) Polyphosphate analytics, and polyphosphate production with *Saccharomyces cerevisiae*, BioSC International Workshop N/P/C storage pools in algae and cyanobacteria and nutrient uptake from waste streams, Jülich, Germany.

Christ JJ, Blank LM (2018) Enzymatic quantification and length determination of polyphosphate down to a chain length of two, Third BioSC Spotlight Phosphorus recovery and cycling, Aachen, Germany.

10 Fazit

Das akademische Ziel Phosphat aus Rapsschrot zurückzugewinnen und biotechnologisch zu Polyphosphat zu valorisieren wurde zu Anfang des Projektes gesetzt. Zum Ende des Projektes konnte gezeigt werden, dass der ValuePP-Prozess (Rapsschrot -> Rapsextrakt -> beladene Hefe -> Hefeextrakt oder pures Bio-PolyP) im Labormaßstab funktioniert und er ebenfalls auf Presskuchen von anderen Pflanzen, wie Sesam oder Reis anwendbar ist. Ein Teilprozess (Pures Phosphat -> beladene Hefe -> Hefeextrakt -> Wurstproduktion) wurde ebenfalls erfolgreich im 2000 L Maßstab durchgeführt. Die akademische Idee konnte also in einen funktionierenden Prozess umgesetzt werden. Die ganze Wertschöpfungskette vom Rapsschrot zu den PolyP Produkten kann entsprechend auch skaliert werden. Mit den Ergebnissen aus ValuePP können aber nicht nur die technischen Herausforderungen gemeistert werden, sondern sie zeigen auch Optimierungsmöglichkeiten auf. So muss die Phosphatbeladung der Hefe unter deutlich höheren Zellkonzentrationen ermöglicht werden. Nach der Weiterentwicklung der unterschiedlichen Technologien und der Optimierung der kompletten Wertschöpfungskette wird das Augenmerk noch deutlicher auf die Implementierung dieser in der Industrie sein. Auch hier liefert ValuePP die Grundlage.

11 Anhang und Anlagen

Dem Abschlussbericht beigefügt sind:

- Veröffentlichte Bücher/Dissertationen
- Veröffentlichte Forschungsartikel
- Der Kooperationsvertrag
- Patentanmeldungen

- Poster, die auf Fachtagungen präsentiert wurden
- Vorträge, die auf Fachtagungen gehalten wurden
- Veröffentlichte Übersichtsartikel

12 Literaturangaben

- ¹ N. Gilbert, Environment: The disappearing nutrient, *Nature*, 461 (2009) 716-718.
- ² Macka, M.; Haddad, P. R.; Gebauer, P.; Boček, P. System Peaks in Capillary Zone Electrophoresis. 3. Practical Rules for Predicting the Existence of System Peaks in Capillary Zone Electrophoresis of Anions Using Indirect Spectrophotometric Detection. *Electrophoresis* 1997, 18 (11), 1998–2007. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181120>.
- ³ Miksch, G.; Kleist, S.; Friehs, K.; Flaschel, E. Overexpression of the Phytase from *Escherichia Coli* and Its Extracellular Production in Bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 59 (6), 685–694. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1071-z>.
- ⁴ Tai, H. M.; Yin, L. J.; Chen, W. C.; Jiang, S. T. Overexpression of *Escherichia Coli* Phytase in *Pichia Pastoris* and Its Biochemical Properties. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61 (25), 6007–6015. <https://doi.org/10.1021/jf401853b>.
- ⁵ Greiner, R.; Konietzny, U.; Jany, K. D. Purification and Characterization of Two Phytases from *Escherichia Coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 303 (1), 107–113. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1261>.
- ⁶ Lim, D.; Golovan, S.; Forsberg, C. W.; Jia, Z. Crystal Structures of *Escherichia Coli* Phytase and Its Complex with Phytate. *Nat. Struct. Biol.* 2000, 7 (2), 108–113. <https://doi.org/10.1038/72371>.
- ⁷ Lim, D.; Golovan, S.; Forsberg, C. W.; Jia, Z. Crystal Structures of *Escherichia Coli* Phytase and Its Complex with Phytate. *Nat. Struct. Biol.* 2000, 7 (2), 108–113. <https://doi.org/10.1038/72371>.
- ⁸ Kim, M. S.; Lei, X. G. Enhancing Thermostability of *Escherichia Coli* Phytase AppA2 by Error-Prone PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 79 (1), 69–75. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1412-7>.
- ⁹ J.J. Christ, L.M. Blank, Analytical polyphosphate extraction from *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal. Biochem.*, 563 (2018) 71-78.
- ¹⁰ J.J. Christ, L.M. Blank, Enzymatic quantification and length determination of polyphosphate down to a chain length of two, *Anal. Biochem.*, 548 (2018) 82-90.
- ¹¹ J.J. Christ, L.M. Blank, *Saccharomyces cerevisiae* containing 28 % polyphosphate and production of a polyphosphate-rich yeast extract thereof, *FEMS Yeast Res*, 19 (2019) foz011.
- ¹² J.J. Christ, S. Willbold, L.M. Blank, Polyphosphate chain length determination in the range of two to several hundred P-subunits with a new enzyme assay and ³¹P NMR, *Anal. Chem.*, 91 (2019) 7654-7661.
- ¹³ J.J. Christ, S.A. Smith, S. Willbold, J.H. Morrissey, L.M. Blank, Biotechnological synthesis of water-soluble food-grade polyphosphate with *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, 117 (2020) 2089-2099.
- ¹⁴ J.J. Christ, S. Willbold, L.M. Blank, Methods for the analysis of polyphosphate in the life sciences, *Anal. Chem.*, 92 (2020) 4167-4176.
- ¹⁵ Wikimedia-Commons, Canola field picture, https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9f/CSIRO_ScienceImage_3650_Canola_Flowers.jpg, accessed on 27.09.2019., 2019.
- ¹⁶ Wikimedia-Commons, Phytate picture, <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/75/Phytate.svg>, accessed on 23.09.2019., 2019.
- ¹⁷ Wikimedia-Commons, Chick picture, https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/10/Basque_Hen_%28Euskal_Oiloa%29_chick_1.jpg, accessed on 27.09.2019., 2019.
- ¹⁸ Wikimedia-Commons, Fork and knife picture, https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/50/Sinnbild_Autobahngasthaus.svg, accessed on 27.09.2019., 2019.
- ¹⁹ BMEL, Statistik und Berichte des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Inlandsverwendung von Ölsaaten im Wirtschaftsjahr 2016/17 sinkt geringfügig bei erneut fallender Inlandserzeugung (Engl. translation: Statistics and reports of the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL). Domestic use of oilseeds in the 2016/17 marketing year declines slightly as domestic production falls again), www.bmel-statistik.de/ernaehrung-fischerei/versorgungsbilanzen/oelsaaten/, accessed on 20.09.2019., 2019.

- ²⁰W. Sommer, Rapsschrot hat sich bewährt, landwirtschaftskammer.de/landwirtschaft/tierproduktion/schweinehaltung/fuetterung/rapsschrot-2007.htm, accessed 20.09.2019, (2007).
- ²¹ J. Weigel, Verwendungsmöglichkeiten des Nebenproduktes Rapskuchen aus der Ölmühle Anklam in der Milchviehfütterung, Bachelor thesis, Hochschule Neubrandenburg, accessible via digibib.hs-nb.de/file/dbhsnb_derivate_0000000095/Bachelorarbeit-Weigel-2008.pdf, (2008).
- ²² BGR, Deutschland - Rohstoffsituation 2015, Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR) (Engl translation: Germany - Raw Materials Situation 2015, Federal Institute for Geosciences and Natural Resources), www.bgr.bund.de/DE/Themen/Min_rohstoffe/Downloads/Rohsit-2015.pdf?__blob=publicationFile&v=3, accessed on 23.09.2019., 2015.
- ²³ LAGA, Bewertung von Handlungsoptionen zur nachhaltigen Nutzung sekundärer Phosphoreserven, von der Bund/Länder Arbeitsgemeinschaft Abfall, 2012.
- ²⁴ G.S. Metson, D. Cordell, B. Ridoutt, Potential impact of dietary choices on phosphorus recycling and global phosphorus footprints: The case of the average australian city, *Front Nutr*, 3 (2016) 35-35.
- ²⁵ OVID, Aktuelle Zahlen für 2018, OVID Verband der ölsaatenverarbeitenden Industrie in Deutschland (engl. translation: Current figures for 2018, OVID Verband der ölsaatenverarbeitenden Industrie in Deutschland (Association of the Oilseed Processing Industry in Germany)), <https://www.ovid-verband.de/positionen-und-fakten/zahlen-deutschland/>, accessed on 20.09.2019., 2019.
- ²⁶ LWK, Tabellen Rapsschrot 2007 von der Landwirtschaftskammer Deutschland (engl. translation: Tables canola seed meal 2007 from the Chamber of Agriculture Germany), www.landwirtschaftskammer.de/landwirtschaft/tierproduktion/schweinehaltung/pdf/tabellen-rapsschrot-2007.pdf, accessed on 06.10.2019., (2007).
- ²⁷ T.S. Nelson, L.W. Ferrara, N.L. Storer, Phytate phosphorus content of feed ingredients derived from plants, *Poult. Sci.*, 47 (1968) 1372-1374.
- ²⁸ DüV, Verordnung über die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis beim Düngen (Düngeverordnung - DüV) (Engl. translation: German fertilizer ordinance) from 05.12.2012, amended on 26.05.2017, https://www.gesetze-im-internet.de/d_v_2017/DüV.pdf, accessed on 06.10.2019., 2017.
- ²⁹ F. Peretzki, L. Heigl, Nährstoffgehalte, Nährstoffwirkung, Mengenanfall, Ausbringung, von dem Bayerischen Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten (Engl. translation: Nutrient content, nutrient effect, quantity accumulation, application, from the Bavarian State Ministry for Agriculture and Forestry), <http://web.archive.org/web/20070812072331/http://www.lfl.bayern.de/iab/duengung/organisch/09556/>, accessed on 05.10.2019., 2004.
- ³⁰ Z. He, C. Honeycutt, B. Xing, R. McDowell, P. Pellechia, T.Q. Zhang, Solid-state Fourier transform infrared and ³¹P nuclear magnetic resonance spectral features of phosphate compounds, *Soil Sci.*, 172 (2007) 501-515.
- ³¹ A. Flynn, T. Hirvonen, G.B. Mensink, M.C. Ocke, L. Serra-Majem, K. Stos, L. Szponar, I. Tetens, A. Turrini, R. Fletcher, T. Wildemann, Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries, *Food Nutr. Res.*, 53 (2009).
- ³² M. Younes, G. Aquilina, L. Castle, K.-H. Engel, P. Fowler, M.J. Frutos Fernandez, P. Fürst, R. Gürtler, T. Husøy, W. Mennes, P. Moldeus, A. Oskarsson, R. Shah, I. Waalkens-Berendsen, D. Wölflle, P. Aggett, A. Cupisti, C. Fortes, G. Kuhnle, I.T. Lillegaard, M. Scotter, A. Giarola, A. Rincon, A. Tard, U. Gundert-Remy, EFSA Panel on Food Additives Flavourings, Re-evaluation of phosphoric acid-phosphates – di-, tri- and polyphosphates (E 338–341, E 343, E 450–452) as food additives and the safety of proposed extension of use, *EFSA Journal*, 17 (2019) 5674.
- ³³ R. Schnee, H.C. Stevens, M. Vermeulen, Phosphorus in the diet and human health, in: R.W. Scholz, A.H. Roy, F.S. Brand, D.T. Hellums, A.E. Ulrich (Eds.) *Sustainable phosphorus management - A global transdisciplinary roadmap*, Springer, Dordrecht (Netherlands) Heidelberg (Germany) New York (USA) London (United Kingdom), 2014, pp. 232-236.
- ³⁴ E. Wickham, Phosphorus content in commonly consumed beverages, *J. Ren. Nutr.*, 24 (2014) e1-e4.
- ³⁵ R.A. Sherman, O. Mehta, Phosphorus and potassium content of enhanced meat and poultry products: implications for patients who receive dialysis, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 4 (2009) 1370-1373.
- ³⁶ R. Scholz, A. Roy, F. Brand, D. Hellums, A. Ulrich, *Sustainable phosphorus management: A global transdisciplinary roadmap*, First ed., Springer, Dordrecht (Netherlands) Heidelberg (Germany) New York (USA) London (United Kingdom), 2014.
- ³⁷ Indexmundi, Rock phosphate monthly price, <https://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=rock-phosphate>, accessed on 02.10.2019., 2019.
- ³⁸ R. Schnee, Oral statement from Dr. Rainer Schnee (Chemische Fabrik Budenheim KG, Budenheim, Germany) made in October 2019. He refers to a confidential statistic from the European Chemical Industry Council from 2012., (2019).
- ³⁹ OVID, Was füttern die deutschen Bauern? OVID, Verband der ölsaatenverarbeitenden Industrie in Deutschland, <https://www.ovid->

verband.de/fileadmin/user_upload/Statistiken/Infografiken/Infografik_Raps_toppt_Soja.pdf, accessed on 20.09.2019., 2019.

⁴⁰ J. Magnus, Development of processes for the production of bulk chemicals by fermentation at industrial scale – An integrated approach, in: M. Coelho, B. Ribeiro (Eds.) *White Biotechnology for Sustainable Chemistry*, RSC, Cambridge (UK), 2015, pp. 362-390.

⁴¹ H. Ohtake, S. Tsuneda, *Phosphorus recovery and recycling*, First ed., Springer, Singapore, 2019.

⁴² L. Carraresi, S. Berg, S. Bröring, Emerging value chains within the bioeconomy: Structural changes in the case of phosphate recovery, *Journal of Cleaner Production*, 183 (2018) 87-101.