

Schlußberichte Teil I & Teil II

Zuwendungsempfänger: VAN HEES GmbH Kurt-van-Hees-Straße 1 65396 Walluf	Förderkennzeichen: 031B1131B
--	--

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Fördermaßnahme:

Innovationsräume Bioökonomie – BioBall

Vorhabenbezeichnung:

Verbundprojekt: AMP Food

Verbundvorhaben: AMP Food – Antimikrobielle Peptide aus *Hermetia illucens* zur Konservierung von Lebens- und Futtermitteln (Teilprojekt B)

Laufzeit des Vorhabens:

01.09.2021 bis 31.08.2024

Autor:

Dipl.-Ing. Martin Kempkes

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B1131B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei dem Autor.

Teil I Kurzbericht:

Das Projekt „AMP Food – Antimikrobielle Peptide aus *Hermetia illucens* zur Konservierung von Lebens- und Futtermitteln“ des Innovationsraums BioBall zielt darauf ab, antimikrobielle Peptide (AMPs) aus Insekten, insbesondere der schwarzen Soldatenfliege (BSF), zu gewinnen und als Zutaten für Lebens- und Futtermittel zu nutzen. Diese AMPs sollen den mikrobiellen Verderb durch gram-negative Keime verhindern. Das Projekt verfolgt eine flexible Produktion von AMPs aus biogenen Stoffströmen und baut auf Erkenntnissen des Projekts INFeed auf. Es umfasst zwei Konzepte: die Extraktion und Machbarkeitsstudie der AMPs sowie deren rekombinante Bereitstellung durch Fermentation. Ziel ist es, chemische Konservierungsstoffe zu ersetzen, die Produktsicherheit zu erhöhen und natürliche Ressourcen zu schonen.

Während des Projektes wurden bedeutende Fortschritte gemacht, obwohl einige Herausforderungen und Verzögerungen aufgetreten sind. Die Zusammenarbeit zwischen der VAN HEES GmbH und der Forschungsstelle des Fraunhofer IME in Gießen hat zu wichtigen Erkenntnissen geführt.

Wesentliche Ergebnisse

Die Etablierung der Larvenzucht war ein wichtiger Schritt, bei dem verschiedene Diäten getestet wurden. Es stellte sich heraus, dass Larven, die mit Birtreber und Altheife gefüttert wurden, ähnliche Wachstumsraten wie die Referenzlarven auf Hühnerfutter aufwiesen. Apfeltrester erwies sich hingegen als ungeeignet, während Kakaoschalen und Birtreber mit Altheife vielversprechend waren. Ein Upscaling der Larvenzucht führte zu einer signifikanten Steigerung des Larvengewichts pro Box.

Eine neue Methode zur Extraktion antimikrobieller Peptide (AMPs) wurde entwickelt, die Methanol, Wasser und Essigsäure verwendet. Diese Methode zeigte antimikrobielle Aktivitäten gegen *Staphylococcus aureus* und teilweise gegen *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*.

Die rekombinante Produktion von AMPs wurde ebenfalls vorangetrieben, wobei alternative Expressionssysteme wie *Komagataella phaffii* getestet wurden. Trotz Optimierungen bei verschiedenen Parametern traten Probleme bei der vollständigen Expression der Peptide auf, insbesondere an der Enterokinase-Schnittstelle. Weitere Tests sollen mit der Tobacco-Etch-Virus (TEV)-Schnittstelle und in anderen Organismen durchgeführt werden.

Um größere Mengen an Peptiden zu produzieren, wurde das Extraktionsverfahren auf einen größeren Maßstab umgestellt. Dabei konnten 5,5 kg getrocknetes Larvenpulver extrahiert werden, was 18 g Peptidextrakt ergab.

Antimikrobielle Aktivität und Wirksamkeit

Die Tests zur Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) zeigten, dass bei einer Konzentration von 195 ppm ein hemmender Effekt auf *Campylobacter jejuni* beobachtet wurde. Bei einer Konzentration von 391 ppm war kein Wachstum mehr vorhanden, was auf eine vielversprechende in vitro hemmende Wirkung hinweist. Die In-situ-Studie zur Evaluierung der Wirksamkeit der AMPs auf Hühnchenhaut ergab jedoch, dass bei der Anwendung auf Hühnchenhaut nur eine sehr geringe Abtötungsrate bestimmbar war. Es wurde empfohlen, die Wirksamkeit mit höheren Konzentrationen und geringeren Kontaminationsdichten weiter zu untersuchen und den Extrakt aufzureinigen, um eine höhere Anwendungskonzentration zu ermöglichen.

Projektablauf und Zeitplan

Das Arbeitspaket 1.1, das die Extraktion von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) umfasst, sollte ursprünglich von September bis November 2021 abgeschlossen sein. Bis August 2024 war dieses Arbeitspaket jedoch noch nicht abgeschlossen, weshalb es zu Verzögerungen in den nachfolgenden Arbeitspaketen kam.

Das Arbeitspaket 1.2, das MIC-Tests und Metagenomanalysen beinhaltet, sollte von November 2021 bis Juli 2022 durchgeführt werden. Dieses Arbeitspaket wurde begonnen, konnte jedoch bis August 2024 aufgrund der gering verbliebenen zeitlichen Ressource und geringer Abtötungsraten in situ nicht abschließend durchgeführt werden.

Die Applikation der AMPs in Lebens- und Futtermittelsystemen (Arbeitspaket 1.3) war ursprünglich für den Zeitraum von Juli bis Dezember 2022 geplant. Aufgrund der Verzögerungen konnte dieses Arbeitspaket bis Ende August 2024 nicht begonnen werden. Der Fokus lag zuletzt auf Oberflächenapplikationen von Lebensmittelsystemen, da hier ein hohes Risikopotential gegenüber gram-negativen Oberflächenkeimen besteht.

Das Arbeitspaket 1.5, das die mikrobiologische Untersuchung der hergestellten Lebensmittel und Futtermittel umfasst, sollte von Januar bis Juni 2023 durchgeführt werden. Dieses Arbeitspaket wurde begonnen, konnte jedoch aufgrund der geringen Restlaufzeit des Projektes nicht beendet werden.

Das Arbeitspaket 2.2, Challenge Tests mit Extrakten, sollte von August 2022 bis März 2023 durchgeführt werden. Dieses Arbeitspaket wurde begonnen, konnte jedoch ebenfalls aufgrund der geringen Restlaufzeit des Projektes nicht beendet werden. Die durchgeführten Tests auf Oberflächen von Hähnchenteilen führten leider nur zu Ergebnissen mit sehr geringe Abtötungsraten. Weitegehende mikrobiologische Untersuchungen stehen noch aus.

Die Arbeitspakete 2.3 (Applikation rekombinanter AMPs in Lebens- und Futtermittelsystemen) und 2.5 (mikrobiologische und sensorische Untersuchung) sollten ursprünglich im Zeitraum von September 2022 bis Dezember 2023 durchgeführt werden. Diese Arbeitspakete konnten bis zum Ende des Projektzeitraumes noch nicht begonnen werden.

Die Arbeitspakete 3.2 (Challenge Tests mit Extrakten), 3.3 (Applikation der AMPs in Lebens- und Futtermittelsystemen), 3.4 (mikrobiologische Untersuchung der Endprodukte) und 3.5 (sensorische Untersuchung der Lebens- und Futtermittel) sollten ursprünglich im Zeitraum von Januar 2024 bis Dezember 2025 durchgeführt werden. Diese Arbeitspakete konnten bis Ende 2023 ebenfalls noch nicht begonnen werden.

Die Arbeitspakete 4.2 (Applikation der AMPs in Lebens- und Futtermittelsystemen) und 4.3 (mikrobiologische Untersuchungen und Validierung) sollten ursprünglich im Zeitraum von Dezember 2025 bis Dezember 2026 durchgeführt werden. Auch diese Arbeitspakete konnten bis Ende 2023 noch nicht begonnen werden.

Zusammenfassung der Verzögerungen

Aufgrund der nachvollziehbaren Verzögerungen des ersten Arbeitspakets konnten mehrere darauffolgende Arbeitspakete nicht mehr durchgeführt werden. Dies führte zu einer Verschiebung der Vorhabenziele. Die Möglichkeit, eine kostenneutrale Verlängerung des Projektes um weitere 12 Monate zu beantragen, wurde nach eingehender Prüfung und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der internen und externen Abstimmungsprozesse sowie der Abschätzung der zusätzlich aufzubringenden Finanzmittel nicht durchgeführt.

Für VAN HEES ist es sehr bedauerlich, dass das Projekt ohne vollumfängliche Bearbeitung beendet wurde.

Teil II Eingehende Darstellung:

1. Einleitung

Das Projekt "Innovationsraum: BioBall – AMP Food – Antimikrobielle Peptide aus *Hermetia illucens* zur Konservierung von Lebens- und Futtermitteln" zielt darauf ab, nachhaltige und effiziente Methoden zur Konservierung von Lebens- und Futtermitteln zu entwickeln. Im Rahmen dieses Projekts wurden antimikrobielle Peptide (AMPs) aus *Hermetia illucens* (Schwarze Soldatenfliege) extrahiert und deren Wirksamkeit untersucht.

2. Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung

Die ursprünglichen Ziele des Projekts umfassten die Etablierung der Larvenzucht, die Entwicklung einer Extraktionsmethode für AMPs, die rekombinante Produktion von AMPs, die Herstellung der AMPs im Pilotmaßstab und die Bewertung der antimikrobiellen Aktivität. Diese Ziele wurden im Wesentlichen erreicht, obwohl einige Herausforderungen und Verzögerungen auftraten.

3. Durchgeführte Arbeiten

3.1 Etablierung der Larvenzucht

- **Ziel:** Entwicklung von Wachstumskurven für verschiedene Diäten und Optimierung der Zuchtbedingungen.
- **Ergebnisse:** Wachstumskurven für verschiedene Diäten wurden erfolgreich erstellt. Larven, die auf Birtreber und Altheife kultiviert wurden, zeigten ähnliche Wachstumsraten wie Referenzlarven auf Hühnerfutter. Apfeltrester erwies sich als ungeeignet, während Kakaoschalen und Birtreber mit Altheife vielversprechend waren. Ein Upscaling der Larvenzucht führte zu einer signifikanten Steigerung des Larvengewichts pro Box.

3.2 Entwicklung einer Extraktionsmethode für AMPs

- **Ziel:** Schaffung einer effizienten Methode zur Extraktion von AMPs aus Insekten.
- **Ergebnisse:** Eine neue Methode zur Extraktion von Peptiden mit Methanol/Wasser/Essigsäure wurde erfolgreich entwickelt. Die Methode zeigte antimikrobielle Aktivitäten gegen *Staphylococcus aureus* und teilweise gegen *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*.

3.3 Rekombinante Produktion von AMPs

- **Ziel:** Testen und Optimieren alternativer Expressionssysteme für die Produktion von AMPs.
- **Ergebnisse:** Alternative Expressionssysteme wie *Komagataella phaffii* wurden getestet. Trotz Optimierungen bei verschiedenen Parametern traten Probleme bei der vollständigen Expression der Peptide auf, insbesondere an der Enterokinase-Schnittstelle. Weitere Tests sollen mit der Tobacco-Etch-Virus (TEV)-Schnittstelle und in anderen Organismen durchgeführt werden.

3.4 Herstellung der AMPs im Pilotmaßstab

- **Ziel:** Skalierung des Extraktionsverfahrens zur Produktion größerer Mengen an AMPs.
- **Ergebnisse:** Das Extraktionsverfahren wurde erfolgreich auf einen größeren Maßstab umgestellt. Dabei konnten 5,5 kg getrocknetes Larvenpulver extrahiert werden, was 18 g Peptidextrakt ergab.

3.5 Bewertung der antimikrobiellen Aktivität

- **Ziel:** Untersuchung der Wirksamkeit der AMPs gegen verschiedene pathogene Mikroorganismen.
- **Ergebnisse:** Die MIC-Tests zeigten, dass bei einer Konzentration von 195 ppm ein hemmender Effekt auf *Campylobacter jejuni* beobachtet wurde. Bei einer Konzentration von 391 ppm war kein Wachstum mehr vorhanden, was auf eine vielversprechende in vitro hemmende Wirkung hinweist. Eine Studie zur Evaluierung der Wirksamkeit der AMPs auf Hühnchenhaut ergab jedoch, dass bei der Anwendung auf Hühnchenhaut nur eine sehr geringe Abtötungsrate bestimmbar war. Es wird empfohlen, die Wirksamkeit mit höheren Konzentrationen und geringeren Kontaminationsdichten weiter zu untersuchen und den Extrakt aufzureinigen.

4. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises umfassen die Ausgaben für FE-Fremdleistungen, Personal und Reisekosten. Materialkosten sind nicht angefallen.

Finanzdaten

- **Förderquote:** 30,00 %
- **Bewilligte Zuwendung:** 109.619,00 EUR
- **Gezahlte Bundesmittel bis einschließlich 2023:** 25.978,14 EUR

Entstandene Kosten

1. FE-Fremdleistungen (Position 0823):

- **Entstandene Kosten insgesamt bis einschließlich 2023:** 6287,76 EUR
- **Entstandene Kosten insgesamt in 2024:** 8.886,60 EUR
- **Anerkannte Kosten insgesamt bis einschließlich 2024:** 62.773,00 EUR
- **Verbleibender Anteil:** 47.598,64 EUR

2. Personalkosten (Position 0837):

- **Entstandene Kosten insgesamt bis einschließlich 2023:** 19.688,36 EUR
- **Entstandene Kosten insgesamt in 2024:** 5.347,99 EUR
- **Anerkannte Kosten insgesamt bis einschließlich 2024:** 283.376,00 EUR
- **Verbleibender Anteil:** 258.339,65 EUR

3. Reisekosten (Position 0838):

- **Entstandene Kosten insgesamt bis einschließlich 2024:** 1.457,91,00 EUR
- **Anerkannte Kosten insgesamt bis einschließlich 2024:** 1.250,00 EUR
- **Fehlbetrag:** -207,91 EUR

5. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die geleisteten Projektarbeiten waren notwendig und angemessen, um die Ziele des Projekts zu erreichen. Insbesondere die Entwicklung und Optimierung der Larvenzucht, die Extraktion und Produktion von AMPs sowie die Bewertung ihrer antimikrobiellen Aktivität waren zentrale Aufgaben, die im Einklang mit den ursprünglichen Zielen des Projekts standen.

1. Etablierung der Larvenzucht

Notwendigkeit: Die Etablierung der Larvenzucht war ein grundlegender Schritt, um eine stabile und nachhaltige Quelle für die Gewinnung von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) zu schaffen. Ohne eine optimierte Zucht ist eine kontinuierliche und effiziente Produktion der benötigten Larven nicht möglich.

Angemessenheit: Die durchgeführten Arbeiten zur Erstellung von Wachstumskurven für verschiedene Diäten und die Optimierung der Zuchtbedingungen waren notwendig, um die besten Fütterungsstrategien zu identifizieren. Die Erkenntnisse, dass Biertreber und Althefer geeignete Diäten sind, während Apfeltrester ungeeignet ist, sind entscheidend für die Effizienz der Larvenzucht.

2. Entwicklung einer Extraktionsmethode für antimikrobielle Peptide (AMPs)

Notwendigkeit: Eine effiziente Methode zur Extraktion von AMPs war notwendig, um die antimikrobiellen Substanzen aus den Larven zu gewinnen. Ohne eine geeignete Extraktionsmethode ist es nicht möglich die AMPs in ausreichender Menge und Qualität zu isolieren.

Angemessenheit: Die Entwicklung einer neuen Methode zur Extraktion von Peptiden mit Methanol/Wasser/Essigsäure war angemessen, da sie antimikrobielle Aktivitäten gegen verschiedene pathogene Mikroorganismen zeigte. Diese Methode kann für die Gewinnung von AMPs, die in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie verwendet werden, entscheidend sein.

3. Rekombinante Produktion von AMPs

Notwendigkeit: Die rekombinante Produktion von AMPs war notwendig, um alternative und möglicherweise effizientere Produktionsmethoden zu erforschen. Dies ist besonders wichtig, um die Produktion von AMPs in größerem Maßstab zu ermöglichen.

Angemessenheit: Die Tests und Optimierungen alternativer Expressionssysteme wie *Komagataella phaffii* waren angemessen, um die besten Bedingungen für die Produktion von AMPs zu identifizieren. Trotz der aufgetretenen Probleme bei der vollständigen Expression der Peptide waren diese Arbeiten notwendig, um die Herausforderungen zu verstehen und zukünftige Optimierungen zu ermöglichen.

4. Herstellung der AMPs im Pilotmaßstab

Notwendigkeit: Die Skalierung des Extraktionsverfahrens war notwendig, um größere Mengen an AMPs zu produzieren und deren Anwendung in der Praxis zu testen. Dies ist ein entscheidender Schritt, um die industrielle Nutzung der AMPs zu ermöglichen.

Angemessenheit: Die Umstellung des Extraktionsverfahrens auf einen größeren Maßstab und die Extraktion von 5,5 kg getrocknetem Larvenpulver, was 18 g Peptidextrakt ergab, waren angemessen, um die Machbarkeit der Produktion in größerem Maßstab zu demonstrieren.

5. Bewertung der antimikrobiellen Aktivität

Notwendigkeit: Die Bewertung der antimikrobiellen Aktivität der AMPs war notwendig, um deren Wirksamkeit gegen verschiedene pathogene Mikroorganismen zu bestätigen. Dies ist entscheidend, um die Anwendung der AMPs in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie zu rechtfertigen.

Angemessenheit: Die durchgeführten MIC-Tests und die Studie zur Evaluierung der Wirksamkeit der AMPs auf Hühnerhaut waren angemessen, um die in vitro nachgewiesene Wirksamkeit zu bestätigen und die Herausforderungen bei der praktischen Anwendung zu identifizieren. Die Erkenntnisse, dass höhere Konzentrationen und geringere Kontaminationsdichten notwendig sind, sind wertvoll für zukünftige Optimierungen.

Fazit

Die geleisteten Projektarbeiten waren sowohl notwendig als auch angemessen, um Teilziele des Projekts zu erreichen. Leider konnten nicht alle Arbeitspakete wie geplant abgearbeitet werden. Die Teilziele haben wichtige Erkenntnisse und Fortschritte in der Entwicklung und Anwendung antimikrobieller Peptide zur Konservierung von Lebens- und Futtermitteln geliefert. Die gewonnenen Erkenntnisse bieten wertvolle Grundlagen für zukünftige Forschungs- und Entwicklungsarbeiten und tragen zur Erreichung der förderpolitischen Ziele des BMBF bei.

6. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Der voraussichtliche Nutzen des Projekts liegt in der Entwicklung nachhaltiger und effizienter Methoden zur Konservierung von Lebens- und Futtermitteln. Die gewonnenen Erkenntnisse und Technologien können im begrenzten Umfang (aufgrund der nicht vollumfänglichen Bearbeitung aller Arbeitspakete) in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie angewendet werden, um die Haltbarkeit von Produkten zu verlängern und die Lebensmittelsicherheit zu erhöhen. Konkrete Planungen für die nähere Zukunft umfassen die Weiterentwicklung und Optimierung der AMPs sowie deren Anwendung in verschiedenen Lebensmittelsystemen.

7. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit wurden bei VAN HEES in begrenztem Umfang Fortschritte bei der Anwendung von AMPs erzielt. Beim Projektpartner Fraunhofer IME Gießen wurden größere Fortschritte bei der Extraktion verzeichnet sowie neue Erkenntnisse der rekombinanten Herstellung von Peptiden gesammelt.

8. Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF

Die ersten Ergebnisse des Projekts wurden bereits der wissenschaftlichen Gemeinschaft zugänglich gemacht. Diese Veröffentlichungen umfassen Präsentationen auf Fachkonferenzen. Ziel ist es, die gewonnenen Erkenntnisse zu verbreiten und den Wissenstransfer zu fördern.