Gefördert durch:

Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

HMOs
Oligo
Science

Verbundprojekt: ProFaM – „Produktion von Fucosyllactose auf Molke Basis“

Förderkennzeichen: 031 B1 360A

Autoren: Kai Vocke, Frederick Hauling, Alena Rasche, Maik Kittel, Max Peracha

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031 B1 360A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der OligoScience Biotechnology GmbH.

Vorhabensbezeichnung:	**KMUi-Bö03: ProFaM – „Produktion von Fucosyllactose auf Molke Basis“**
Zuwendungsempfänger:	**OligoScience Biotechnology GmbH**
	Siemensstraße 42, 59199 Bönen
Laufzeit des Vorhabens:	**01.02.2023 – 30.06.2025**
Berichtszeitraum:	**01.02.2023 – 30.06. 2025**

Teil I) Kurzbericht

Projektziel und wissenschaftliche Ausgangslage

Das Projekt ProFaM zielte darauf ab, ein innovatives Verfahren zur biotechnologischen Herstellung des Humanmilch-Oligosaccharids (HMO) 2′-Fucosyllactose (2′-FL) zu entwickeln. Besonderes Augenmerk lag auf der Nutzung von Sauermolke als nachhaltige und kostengünstige Laktosequelle. Sauermolke fällt in großen Mengen als Nebenstrom der Milchverarbeitung an, wird jedoch bislang kaum stofflich genutzt. Die Erschließung dieses Substrats bietet das Potenzial, Produktionskosten zu senken und gleichzeitig die ökologische Wertschöpfung der Molkereiwirtschaft zu steigern.

Neben OligoScience (OS) waren die Hochschule Hamm-Lippstadt (HSHL) und das DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien beteiligt. Die Partner vereinten Kompetenzen in Fermentationstechnologie (OS), Kultivierung und Prozessführung (HSHL) sowie Membran- und Entsalzungstechnologien, insbesondere *Flow Electrode Capacitive Deionization* (FCDI) (DWI).

Da die Nutzung von Sauermolke für die Herstellung von HMOs bisher nicht untersucht wurde, adressierte das Projekt eine bislang unerschlossene technologische Nische mit hohem Markt- und Innovationspotenzial.

Projektverlauf

Zu Beginn wurden die Zusammensetzung der Sauermolke charakterisiert sowie analytische und verfahrenstechnische Grundlagen geschaffen. Erste Versuche zeigten, dass bestimmte Inhaltsstoffe wie Calcium, Acetat und Laktat das Wachstum

des Produktionsstammes hemmen können. Parallel entwickelte das DWI eine Strategie zur gezielten Entfernung dieser Stoffe mithilfe von Nanofiltration und FCDI.

Im weiteren Projektverlauf wurden Sauermolkepermeate in Schüttelkolben und Reaktoren getestet und ein 2´-FL Produktionsstamm entwickelt, der auch höhere Laktosekonzentrationen toleriert. Alternativ zu FCDI vorbehandelten Sauermolkemedien, wurden Aufarbeitungsprozesse für die Herstellung von Sauermolkepermeat basiertem Batch medium (AWM) und Laktoselösung (AWL) mit üblichen Molkereiprozessschritten entwickelt. Auf der Basis dieser Medien konnten stabile Fermentationsprozesse im 1–5-L-Maßstab etabliert werden.

Ab 2024 lag der Fokus auf der Entwicklung eines integrierten Downstream-Prozesses zur Abtrennung und Reinigung von 2′-FL. Dies umfasste Membranverfahren, Aktivkohlebehandlung und Trocknungsschritte. Die analytische Begleitung erfolgte fortlaufend und gemeinsam durch alle Partner.

Zentrale Ergebnisse

- **Sauermolke als Substrat nutzbar**: Durch geeignete Vorbehandlung und Ergänzung notwendiger Nährstoffe konnte Sauermolke erfolgreich als Basis für Medien zur fermentativen Herstellung von 2´-Fucosyllactose eingesetzt werden.
- **Fermentationsleistung**: Mit dem optimierten Produktionsstamm wurden reproduzierbar 2′-FL-Titer bis 80 g/L erreicht.
- **Downstream-Prozess**: Ein mehrstufiges Aufreinigungsverfahren einschließlich Mikro-, Ultra- und Nanofiltration, FCDI und Aktivkohle Behandlung wurde erfolgreich etabliert. Ein 2´-FL Pulver wurde durch Gefriertrocknung erzeugt.
- **Technologischer Nutzen**: Die im Projekt entwickelten Prozesse schaffen die Grundlage für eine skalierbare, rohstoffeffiziente und ökologisch vorteilhafte 2′-FL-Produktion unter Verwertung des Molkerei Nebenstromes Sauermolke.

Das Projekt demonstriert somit erstmals die technische Machbarkeit eines sauermolkebasierten Herstellungsprozesses für ein HMO und eröffnet Perspektiven für nachhaltige Wertschöpfung aus Molkereinebenströmen.

Vorhabensbezeichnung:	**KMUi-Bö03: ProFaM – „Produktion von Fucosyllactose auf Molke Basis“**
Zuwendungsempfänger:	**OligoScience Biotechnology GmbH**
	Siemensstraße 42, 59199 Bönen
Laufzeit des Vorhabens:	**01.02.2023 – 30.06.2025**
Berichtszeitraum:	**01.02.2023 – 30.06. 2025**

Teil II) Eingehende Darstellung

1) Ziel und Arbeitspakete des ProFaM Projektes

Das ProFaM-Projekt verfolgte das Ziel, den in der Molkereiindustrie anfallenden Nebenstrom *Sauermolke* als nachhaltige Ressource für die biotechnologische Herstellung des Humanmilch-Oligosaccharids (HMO) 2′-Fucosyllactose (2′-FL) nutzbar zu machen. Sauermolke enthält neben Laktose auch organische Säuren, Mineralien, Spurenelemente, Proteine, Peptide und Nukleinsäuren (Menchik et al., 2019) und stellt damit eine komplexe, aber potenziell wertvolle Matrix für fermentative Prozesse dar. Um diesen Rohstoff nutzbar zu machen, wurden im Projekt sowohl die Zusammensetzung der Sauermolke angepasst, der 2´-FL Produktionsstamm an die Matrixbedingungen optimiert als auch geeignete Prozess- und Aufreinigungsstrategien entwickelt.

Zu Projektbeginn sah Arbeitspaket 1 die Etablierung und Harmonisierung analytischer Methoden zur umfassenden Charakterisierung der Sauermolke vor. Darauf aufbauend sollte in Arbeitspaket 2 ein steriles, fermentationsfähiges Ausgangsmaterial geschaffen werden, indem verschiedene Sterilisations- und Behandlungsverfahren untersucht werden.

Arbeitspaket 3 hatte die Entwicklung geeigneter Vorbehandlungstechnologien (u. a. Nanofiltration und FCDI) zum Ziel, um die Sauermolke in ihrer Zusammensetzung hinsichtlich fermentationsrelevanter Komponenten gezielt anzupassen. Parallel dazu sollte in Arbeitspaket 4 systematisch untersucht werden, welche Inhaltsstoffe und Zusätze das Wachstum und die Produktivität des Produktionsstammes beeinflussen, um daraus Anforderungen an Medien- und Prozessgestaltung abzuleiten.

Die Ergebnisse der ersten Projektphase sollten im Arbeitspaket 5 zusammengeführt und für die weitere Arbeitsplanung genutzt werden, einschließlich möglicher Anpassungen an den ursprünglich vorgesehenen Prozessverlauf.

Arbeitspaket 6 war anschließend auf die Entwicklung und Optimierung von Fermentationsprozessen ausgerichtet, einschließlich der Formulierung sauermolkebasierter Medien und der Durchführung von Kolben- und Reaktorfermentationen. Darauf aufbauend sollten in Arbeitspaket 7 die Vorbehandlungsprozesse skaliert und standardisiert werden, um Sauermolkepermeat in geeigneten Mengen und Qualitäten für Fermentationsversuche bereitstellen zu können.

Arbeitspaket 8 umfasste die Entwicklung eines geeigneten Downstream-Prozesses zur Abtrennung und Aufreinigung von 2′-FL aus der Fermentationsbrühe. Abschließend sah Arbeitspaket 9 eine integrative Bewertung der technischen und wirtschaftlichen Umsetzbarkeit vor und sollte mögliche Weiterentwicklungs- und Skalierungsoptionen ableiten.

Dieser Abschlussbericht beschreibt die von OS geplanten und durchgeführten Arbeiten gemäß den zu Beginn definierten Arbeitspaketen, einschließlich Analytik (AP1), Sterilisation (AP2), Charakterisierung wachstumsrelevanter Komponenten (AP4), Entwicklung des Fermentationsprozesses (AP6) sowie der Aufarbeitung des Produkts (AP8).

2) Verwendung der Zuwendung durch OligoScience (OS)

Die im Rahmen des ProFaM-Vorhabens gewährten Fördermittel wurden bei OligoScience (OS) zweckgebunden zur Bearbeitung der projektbezogenen Arbeiten eingesetzt. Die Mittel flossen hauptsächlich in die Bereiche Analytik, Stammentwicklung, Fermentation sowie Downstream-Processing (DSP) und stellten die Grundlage für die Umsetzung der vorgesehenen Arbeitspakete dar.

Ein wesentlicher Anteil der Zuwendung wurde für den Personaleinsatz verwendet. Hierzu zählten wissenschaftliche Mitarbeitende für Analytik, Stammentwicklung, Fermentation und Prozessentwicklung, technische Fachkräfte für Laborarbeiten und Probenvorbereitung sowie Personal für Projektkoordination und strategische

Projektsteuerung. Diese personellen Ressourcen gewährleisteten die kontinuierliche Durchführung der experimentellen Arbeiten, die Auswertung der Ergebnisse sowie die organisatorische Umsetzung des Vorhabens.

Darüber hinaus wurden Fördermittel für projektbezogene Verbrauchsmaterialien eingesetzt, darunter Laborbedarf für Analytik, Fermentation und DSP sowie spezifische Verschleißmaterialien für Bioreaktorbetrieb und Filtrationsverfahren. Für die Entwicklung des Downstream-Prozesses wurde zudem das DSP-System „Sani Membranes VibroLab 280“ einschließlich zugehöriger Membranmodule (0,2 µm, 800 kDa, 5 kDa) beschafft. Dieses System bildete eine zentrale technische Grundlage für die im Projekt durchgeführten Mikro-, Ultra- und Nanofiltrationsschritte.

Die zielgerichtete Verwendung der Fördermittel ermöglichte die vollständige Bearbeitung aller im Projekt vorgesehenen Arbeitspakete und trug maßgeblich zur erfolgreichen Durchführung des Vorhabens bei. Die Mittelverwendung war notwendig und angemessen, um die angestrebten wissenschaftlich-technischen Entwicklungen zu realisieren.

3) Ergebnisse

3.1 Arbeitspaket 1 - Organisation & Etablierung der Analysemethoden

Im ersten Arbeitspaket wurden die organisatorischen Grundlagen des Projekts geschaffen. Dazu gehörten die Erstellung des Kooperationsvertrags sowie die Sicherstellung einer kontinuierlichen Sauermolke (SM) - und Sauermolkepermeat (SMP) - Belieferung durch die Hochwald Foods GmbH (Hochwald), die bis Mai 2023 vollständig implementiert war.

Parallel wurde die analytische Basis für alle weiteren Arbeitspakete etabliert. Bei OS wurde eine Probenvorbereitung und Auswertemethodik für die Zuckeranalytik mittels HPLC-HILIC mit ELS-Detektion entwickelt. Diese Methodik diente auch als Vorlage für die Einrichtung einer entsprechenden Analytik an der HSHL. Zur Charakterisierung der Mineral- und Metabolit Zusammensetzung etablierte das DWI-Ionenchromatographie-basierten Analysekapazitäten zur Bestimmung enthaltene Salze, organischen Säuren und Zucker. Eine ausführliche Darstellung wird in Kapitel 1 des Eingehende Berichtes des DWI gegeben. Bei OS wurden zusätzlich die Proteinfraktion über die Bradford-

Methode sowie Nukleinsäuren photometrisch quantifiziert. Die Zusammensetzung des gelieferten Sauermolkepermeats nach 10-kDa-Ultrafiltration bei Hochwald ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Ionen Zusammensetzung des 10 kDa Ultrafiltrationspermeates eines exemplarischen Sauermolkebatches (Für Methodik siehe Eingehender Bericht des DWI – Kapitel 1, Tabelle 2).

Substanz	Konzentration [g/L]
Acetat	12
Laktat	13
Laktose	40
Chlor	0,78
Phosphor	18
Kalium	18
Calcium	4

Die hohen Konzentrationen von Acetat und Laktat führen zu einem niedrigen pH-Wert von 4,2, während für die Kultivierung des verwendeten *Escherichia coli* -Produktionsstammes ein pH-Bereich von 6,0–7,5 erforderlich ist (Kern et al., 2018). Auch die hohen Gehalte an Kalium, Calcium und Phosphat sowie die in der Sauermolke enthaltenen Peptide und Aminosäuren beeinflussen das Wachstum, das Schaumbildungsverhalten des Stammes und erfordern eine gezielte Einstellung der Matrix.

Aus diesen Analysedaten ergab sich die Notwendigkeit, optimale Konzentrationsbereiche für die relevanten Ionen festzulegen sowie Strategien zur Entfernung organischer Säuren zu entwickeln. Diese Anforderungen bildeten die Grundlage für die in Arbeitspaket 3 geplante Anpassung und Optimierung der FCDI- und Nanofiltrationsschritte zur Herstellung eines fermentationsfähigen Sauermolkepermeats.

3.2 Arbeitspaket 2 - Sterilisation von Sauermolke

Auf Grundlage, der in Arbeitspaket 1 etablierten Analytik wurde im folgenden Schritt die Frage adressiert, wie sich die Sauermolke so behandeln lässt, dass sie als sterile Substratbasis für Kultivierungsversuche genutzt werden kann. Dazu ist ein Sterilisationsverfahren erforderlich, das die mikrobielle Sicherheit gewährleistet, gleichzeitig jedoch die Zusammensetzung der Sauermolke – insbesondere den Laktosegehalt – möglichst unverändert lässt. Es wurden dazu verschiedene Verfahren der thermischen-, chemischen Inaktivierung und Filtration untersucht.

Die thermische Behandlung führte aufgrund der in der Sauermolke enthaltenen Laktose und Peptide zu ausgeprägten, in der Literatur beschriebenen, Reaktionen, die sowohl einen Verlust an Laktose als auch die Bildung von Lactulose nach sich zogen (O'Brien, 2009). Chemische Inaktivierungsverfahren, beispielsweise mit Ethanol oder $CaCl_2$, erwiesen sich zwar als effektiv, waren jedoch ebenfalls mit Laktoseverlusten und starker Präzipitation verbunden.

Die Sterilfiltration zeigte demgegenüber den geringsten Einfluss auf die Substratzusammensetzung und führte gleichzeitig zur Entfernung membranstörender Bestandteile wie Proteinen und Peptidoglykanen. In keiner der untersuchten Sauermolkechargen konnten Phagen über Plaque Tests nachgewiesen werden. Für den theoretischen Fall einer Phagenkontamination, welche mittels Sterilfiltration nicht abgetrennt werden können, wurden verschiedene Optionen wie Hitze- oder UV-Inaktivierung evaluiert. Mangels positiver Kontrolle konnte ihre Wirksamkeit jedoch nicht experimentell bestätigt werden.

Insgesamt erwies sich die Sterilfiltration als die technisch am besten geeignete, skalierbare und in der Molkereipraxis bereits etablierte Methode. Das resultierende sterile Sauermolkepermeat zeigte auch nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur weder auf Platten noch in Flüssigkultur mikrobielles Wachstum (Abbildung 1) und stellte damit ein geeignetes Ausgangsmaterial für die weitere fermentative Prozessentwicklung dar.

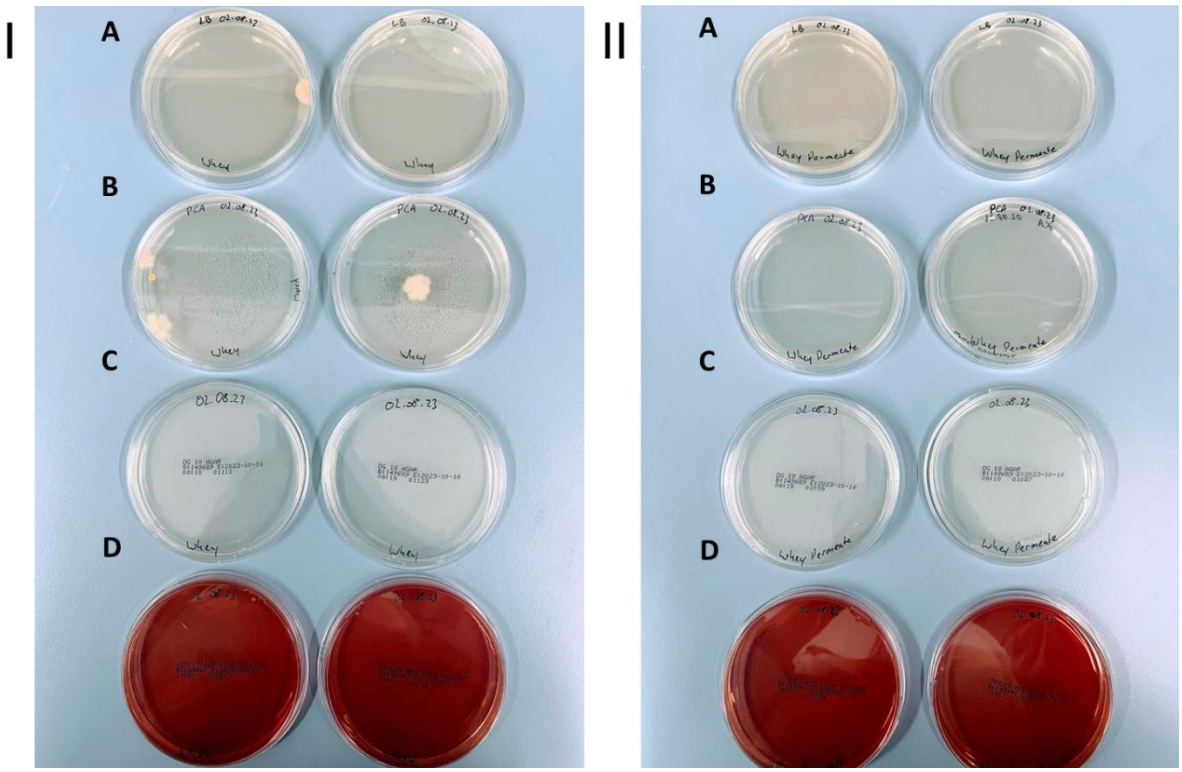

Abbildung 1: I) Sauermolke Ausstrich Plattensatz nach 24 h Inkubation bei 37°C und 22°C. 1 Kolonie auf einer der LB-Agar Platten (A); < 3 Kolonien auf den PCA-Platten (B); Keine Kolonien auf den DG 18 Platten (C) und Violet–Red–Bile–Glucose (VRBG) Platten (D), geformt. **II)** Sauermolke 10 kDa Ultrafiltrationspermeat Ausstrich Plattensatz nach 24 h Inkubation bei 37°C und 22°C. Keine Kolonien auf LB-Agar Platte (A); PCA-Platte (B); DG 18 Platte (C) und Violet – Red – Bile – Glucose Platte (D), geformt.

Für alle nachfolgenden Versuche wurde Sauermolkepermeat verwendet, das nach einer 10-kDa-Ultrafiltration durch Hochwald bereitgestellt wurde. Da Ultrafiltration mit einem Cut-off von 10 kDa potenziell vorhandene Phagen nicht zurückhält, ist eine Pasteurisierung des Sauermolkepermeats vor weiteren Prozessschritten grundsätzlich sinnvoll. Untersuchungen zur thermischen Stabilität der Matrix zeigten, dass eine Erhitzung auf 95 °C für bis zu 10 min weder die Laktosekonzentration noch deren Zusammensetzung maßgeblich beeinflusst. Damit sind pasteurisierende oder Ultra-Hoch-Temepratur (UHT) - ähnliche Erhitzungsschritte, wie sie in Molkereiprozessen üblich sind, für die Herstellung sauermolkebasierter HMO - Produktionsmedien grundsätzlich anwendbar.

3.3 Arbeitspaket 3 - Vorbehandlung der Sauermolke

Nachdem ein geeignetes Sterilisationsverfahren definiert war, konnten im Anschluss die verfahrenstechnischen Schritte zur gezielten Anpassung der Sauermolkezusammensetzung untersucht werden. Am DWI wurden Vorbehandlungsverfahren auf Basis von Flow-Electrode Capacitive Deionization (FCDI) und Nanofiltration (NF) untersucht. Das DWI konzipierte hierfür einen speziell auf die Sauermolkematrix abgestimmten FCDI-Versuchsaufbau zur Abtrennung organischer Säuren und relevanter Ionen. Ergänzend wurden Layer by Layer (LbL) Membranherstellungs- und NF-Verfahren zur Laktosekonzentrierung geprüft sowie kombinierte Prozessführungen aus NF und FCDI bewertet. Die vollständigen experimentellen Ergebnisse, Optimierungsstrategien und Prozessparameter dieser Arbeiten sind in der eingehenden Darstellung des DWI (Kapitel 2) dokumentiert.

OS nutzte die im DWI-Bericht beschriebenen Vorbehandlungsstufen als Grundlage für nachfolgende Versuche sowie zur Ableitung eigener Vorbehandlungsstrategien im Rahmen von Arbeitspaket 6.

3.4 Arbeitspaket 4 - Bestimmung störender Sauermolke - Bestandteile und notwendiger Zusätze

Parallel zu diesen verfahrenstechnischen Entwicklungen war es notwendig zu bestimmen, wie die in Arbeitspaket 1 (Abschnitt 2.1) identifizierten Inhaltsstoffe biologisch auf den Produktionsstamm wirken. Aus den Analysedaten ergaben sich hohe Konzentrationen von Laktose, Acetat, Laktat sowie relevanten Ionen wie Calcium, Chlorid und Phosphat. Zur systematischen Untersuchung ihres Einflusses auf das Wachstum des Produktionsstamms wurde gemeinsam mit der HSHL ein standardisiertes Kolbenversuchsprotokoll entwickelt. Eine Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse, Optimierungsstrategien und Prozessparameter der HSHL zu Arbeitspaket 4 sind in der eingehenden Darstellung der HSHL dokumentiert.

In den ersten Versuchsreihen wurden Optionen zur pH-Anhebung und zur Ergänzung definierter Zusätze geprüft. Die Einstellung des pH-Wertes mittels Ammoniaks (OS) oder NaOH (HSHL) führte ab pH 6,0 zur Bildung unlöslicher Komplexe. Eine anschließende Analyse der ausgefallenen Salze zeigte, dass es sich dabei um Calciumphosphat ($CaPO_4$) handelte (Abbildung 2). Dieser Befund verdeutlichte die

Notwendigkeit einer gezielten Einstellung der Ionenkonzentrationen sowie einer definierten Entfernung störender Komponenten im Rahmen der weiteren Vorbehandlungs- und Prozessentwicklung.

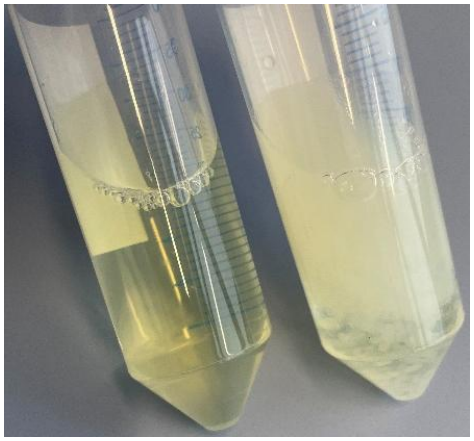

Abbildung 2: Sauermolkepermeat vor (links) und nach Einstellung des pH-Wertes auf 7.0 (rechts). Nach Einstellen eines pH-Wertes > 6.0 wird der Ausfall eines weißen Feststoffes sichtbar.

Die optimalen Konzentrationsbereiche der organischen Säuren Acetat und Laktat wurden in Kolbenversuchen durch deren gezielte Zugabe zu definiertem Medium bestimmt. Beide Metabolite beeinflussten Wachstum und Produktivität des Produktionsstamms, jedoch in unterschiedlicher Weise: Laktat wirkte bis zu einer Konzentration von 50 mM wachstums- und produktivitätsfördernd, während Acetat bereits ab 10 mM eine deutliche Reduktion von Wachstum und 2′-FL-Bildung verursachte (Abbildung 3).

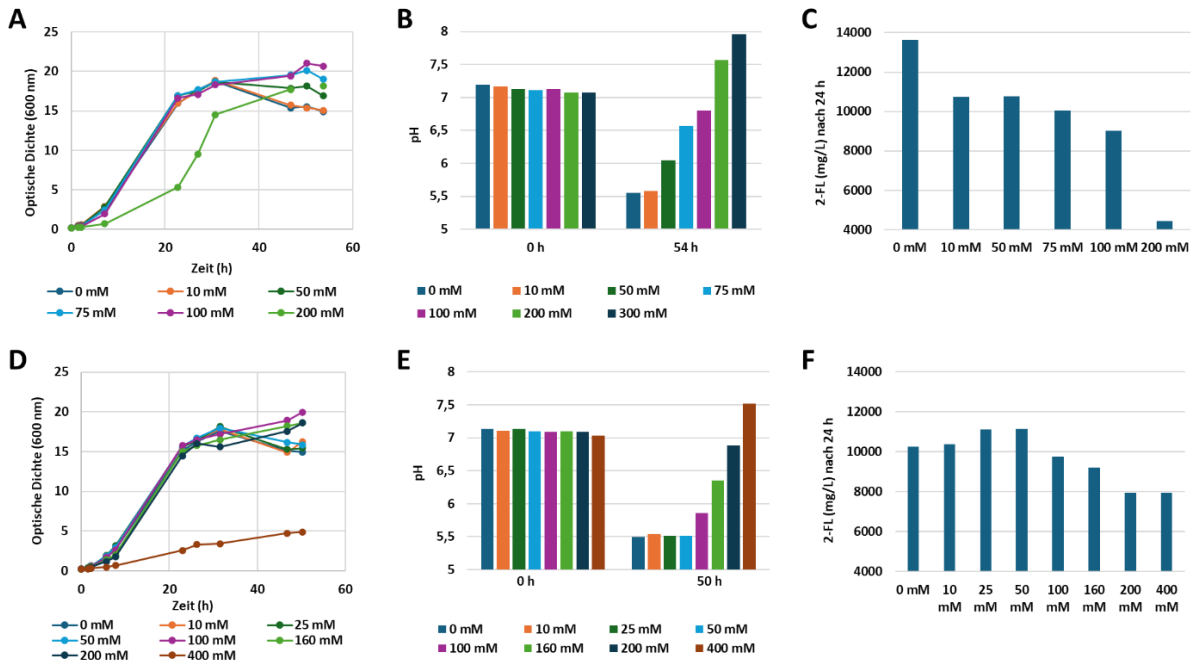

Abbildung 3: Kolbenversuche zur Bestimmung des Konzentrationsoptimums für Acetat (obere Reihe) und Laktat (untere Reihe). Wachstumskurven **(A)** pH Entwicklung **(B)** und 2´-FL Produktion **(C)**, des 2´-FL Produktionsstammes bei Acetatkonzentrationen von 0, 10, 50, 75, 100, 200 und 300 mM. Wachstumskurven **(D)** pH Entwicklung **(E)** und 2´-FL Produktion **(F)**, des 2´-FL Produktionsstammes bei Laktatkonzentrationen von 0, 10, 25, 50, 100, 160, 200 und 400 mM.

Die im Sauermolkepermeat enthaltene Laktosekonzentration von etwa 45 g/L führte in Kultivierungsversuchen mit dem eingesetzten Produktionsstamm zu einer deutlichen Reduktion von Wachstum und Produktivität. Dieser Effekt ist konsistent mit dem in der Literatur beschriebenen „lactose killing“-Phänomen, das bei *E. coli*-Stämmen mit überexprimierten Laktosetransportern auftritt (Therisod et al, 1985). Damit ergibt sich für sauermolkebasierte Medien eine natürliche Einschränkung der im Batch zulässigen Laktosegehalte, was ohne weitere Prozess- oder Stammentwicklung eine Verdünnung oder Vorbehandlung des Sauermolkepermeats erforderlich machen würde.

Durch die Stammentwicklungsabteilung von OS wurde daher eine modifizierte Laktosetransporter-Variante eingeführt, die dem Produktionsstamm eine deutlich erhöhte Toleranz gegenüber hohen Laktosekonzentrationen verleiht. Mit dieser Anpassung konnte der Stamm unter Produktionsbedingungen in definiertem Medium Laktosegehalte bis zu 90 g/L ohne Wachstums- oder Produktivitätseinbußen tolerieren (Abbildung 4). Die zugrunde liegende genetische Modifikation wurde im Dezember 2024 als Schutzrecht von OS angemeldet (EP 24216509.0) und stellt einen

wesentlichen Baustein für die Nutzbarkeit von Sauermolke als Substratquelle in der HMO-Produktion dar.

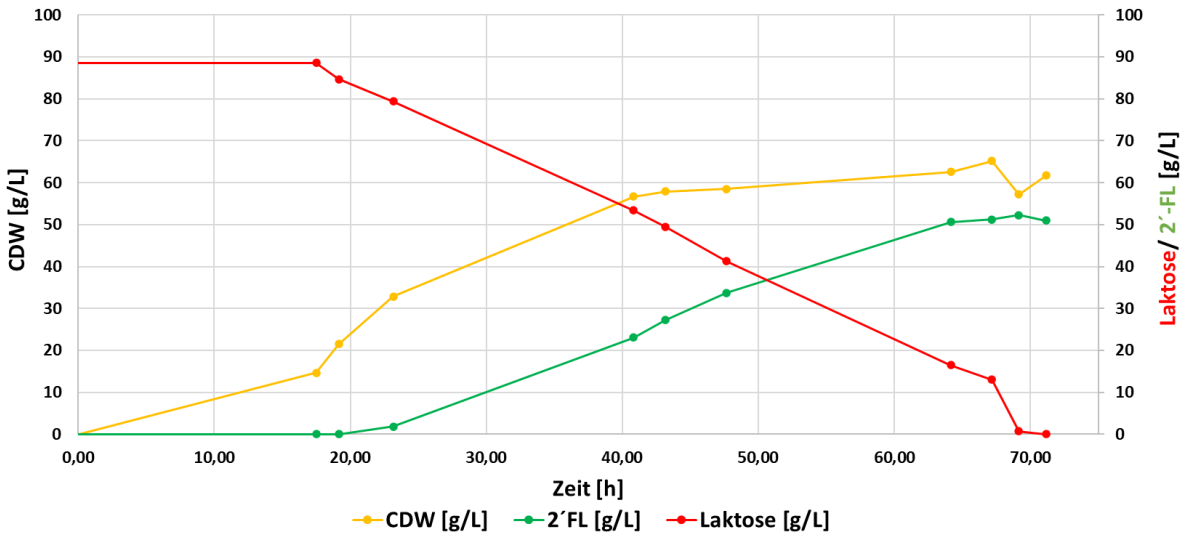

Abbildung 4: Einfluss von hohen Laktosekonzentrationen auf Wachstum und die 2´-FL Produktion des Produktionsstammes. Dargestellt sind die 2´-FL Produktion (2´-FL [g/L]) des Produktionsstammes, Laktosegehalt im definierten Medium (Laktose [g/L]) und das Zelltrockengewicht (CDW [g/L]) im Verlauf der Fermentation.

Zusätzlich zur Einstellung wachstumshemmender Komponenten wie organischer Säuren und störender Calciumionen, die durch pH Anhebung teilweise ausfallen, wurde im Rahmen von Arbeitspaket 4 die Notwendigkeit spezifischer Salze und Spurenelemente für eine stabile Kultivierung untersucht. Hierzu diente das bei OS etablierte BG-Minimalmedium (nach Baumgärtner et al., 2013) als Referenz. Durch systematische Ausschlussversuche wurde geprüft, welche der im definierten Medium enthaltenen Komponenten für Wachstum und 2′-FL-Produktion essenziell sind und welche in sauermolkebasierten Medien ergänzt werden müssen (Abbildung 5).

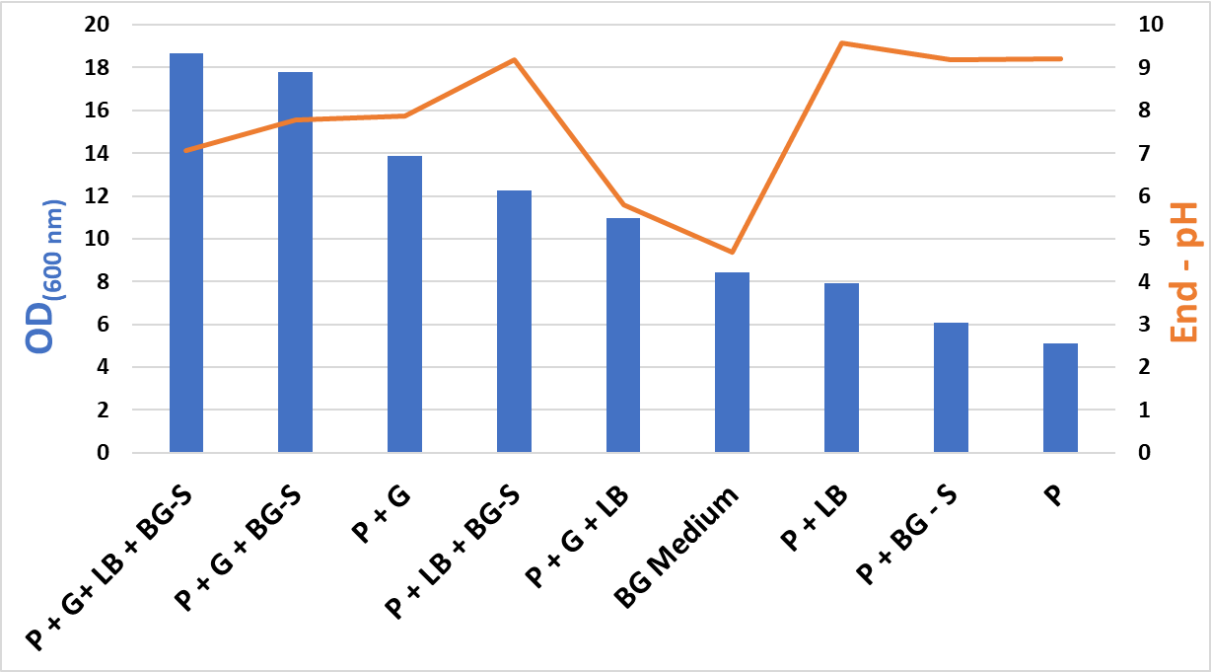

Abbildung 5: Test des Einflusses von definiertem Medium - Bestandteilen auf die Kultivierung des Produktionsstammes in neutralisiertem Sauermolkepermeat (pH 6.0). Die optische Dichte (OD $_{(600nm)}$) und der End-pH der Kultivierung wurden für Sauermolkepermeat (pH 6.0) (P) basiertes Medium mit Zusatz von Glycerin (G), BG-Zusätzen (BG-Z), LB (Lennox) (LB) in verschiedenen Kombinationen, sowie BG-Medium ohne Sauermolkepermeat aufgetragen.

Die Zugabe von Glycerin, BG-Zusätzen und LB-Medium zeigte dabei einen unterschiedlich starken Effekt. Neutralisiertes Sauermolkepermeat (pH 6.0), nach Abtrennung von $CaPO_4$ – Präzipitaten, als Mediums Basis zeigte einen positiven Effekt auf das Wachstum und die Stabilisierung des pH über die Fermentation im Vergleich zu definiertem Medium. Die Zugabe einer zusätzlichen C-Quelle in Form von Glycerin kann nicht durch die Inhaltsstoffe des Sauermolkepermeates ausgeglichen werden. Laktose, als primäre C-Quelle in Sauermolke, kann vom Produktionsstamm nicht abgebaut und verstoffwechselt werden. Die Zugabe von LB-Medium ist bei Nutzung von Sauermolkepermeat als Mediums Basis nicht notwendig. Im Gegensatz dazu konnten die BG-Zusätze nicht ausreichend durch die Sauermolkepermeat Basis ersetzt werden.

Um die Notwendigkeit der in der Spurenelementlösung enthaltenen Inhaltsstoffe zu testen, wurden Ausschluss Kultivierungen ohne einzelne Spurenelemente durchgeführt. Der Einfluss der Spurenelemente auf das Wachstum und die Produktivität in Sauermolkepermeat basiertem Medium wird in Abbildung 6 gezeigt.

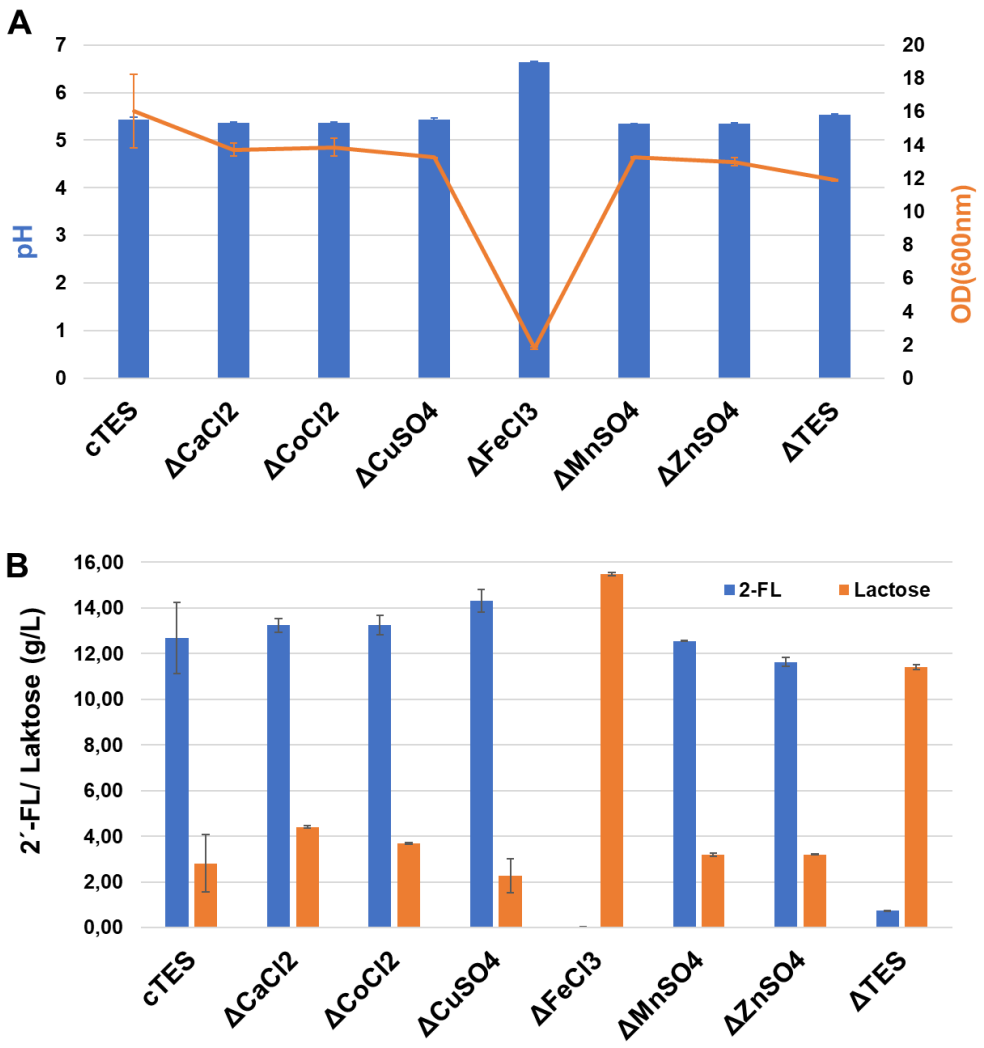

Abbildung 6: Test des Einflusses von Spurenelementen auf die Kultivierung des Produktionsstammes in Sauermolkepermeat (pH 6.0). A) Die optische Dichte (OD $_{(600nm)}$) und der End-pH wurden für Kultivierung mit Sauermolkepermeat (pH 6.0) basiertem Medium mit Zusatz von Glycerin, BG-Salzen und Spurenelementlösung komplett (cTES) und mit einzelnen fehlenden Spurenelementen (ΔCaCl$_2$/ ΔCoCl$_2$/ ΔCuSO$_4$/ ΔFeCl$_3$/ ΔMnSO$_4$/ ΔZnSO$_4$), sowie ohne Spurenelementlösung (ΔTES) aufgetragen. **B)** Produzierte Menge an 2´-FL und verbleibende Menge an Laktose zum Ende der Kultivierungszeit wurden für Kultivierung mit Sauermolkepermeat (pH 6.0) basiertem Medium mit Zusatz von Glycerin, BG-Salzen und Spurenelementlösung komplett (cTES) und mit einzelnen fehlenden Spurenelementen (ΔCaCl$_2$/ ΔCoCl$_2$/ ΔCuSO$_4$/ ΔFeCl$_3$/ ΔMnSO$_4$/ ΔZnSO$_4$), sowie ohne Spurenelementlösung (ΔTES) aufgetragen.

3.5 Arbeitspaket 5 - Zwischenbericht und weitere Planung

Im Verlauf der ersten Projektphasen wurden durch die Analysen aus den Arbeitspaketen 3 und 4 sowohl die störenden Inhaltsstoffe der Sauermolke als auch

die fehlenden Nährstoffkomponenten klar charakterisiert. Darüber hinaus konnten die für die Vorbehandlung relevanten Konzentrationsbereiche der Schlüssel - Ionen und organischen Säuren definiert werden, sodass eine wissenschaftlich fundierte Grundlage für die weitere Prozessentwicklung geschaffen war.

Im Zuge des regelmäßigen Monitorings zeigte sich, dass die im Projekt verfügbaren Anlagenkapazitäten des DWI für die Vorbehandlung von Sauermolke mittels FCDI und/ oder Nanofiltration, nur begrenzte Volumina erzeugen konnten. Die herstellbaren Mengen vorbehandelten Sauermolkepermeats reichten für Kolbenversuche aus, lagen jedoch unterhalb der für umfangreichere Reaktorversuche (5 L Maßstab) benötigten Volumen. Diese Beobachtung wurde als wichtiger Planungshinweis gewertet und mündete in einer gezielten Anpassung des Arbeitsplans. Auf dieser Basis wurde das Arbeitspaket 6 fortgeschrieben und um eine zusätzliche Vorbehandlungsstrategie bei OS ergänzt, die unabhängig von FCDI und Nanofiltration arbeitet und direkt auf die definierten stammbezogenen Anforderungen abgestimmt ist. Diese Erweiterung ermöglichte es, kontinuierlich ausreichend Sauermolkemedium für Fermentationsversuche bereitzustellen und gleichzeitig die in Arbeitspaket 4 identifizierten Konzentrationsgrenzen und Nährstoffbedarfe zu berücksichtigen.

Parallel dazu wurden zwischen OS, HSHL und DWI, die für die Realisierung des Downstream-Prozesses notwendigen Arbeitsschritte systematisch abgestimmt. Dies umfasste die Klärung technischer Abläufe, die Abstimmung analytischer Schnittstellen sowie die Einteilung von Aufgabenpaketen und Zeitfenstern. Durch diese koordinierte Planung konnten die Voraussetzungen geschaffen werden, um einen kompletten DSP-Prozess über alle beteiligten Standorte hinweg schlüssig abzubilden und experimentell umzusetzen.

3.6 Arbeitspaket 6 - Fermentationen mit vorbehandelter und angepasster Sauermolke

Auf Grundlage, der in den Arbeitspaketen 3 und 4 gewonnenen Erkenntnisse zur Zusammensetzung des Sauermolkepermeates und den notwendigen Nährstoffkomponenten wurden in Arbeitspaket 6 verschiedene Strategien zur Nutzung vorbehandelter Sauermolke in der Fermentation entwickelt und bewertet. Hierfür stellte das DWI zunächst Proben bereit, die mittels FCDI, Nanofiltration sowie Kombinationen

beider Verfahrenseinheiten (FCDI & NF) erzeugt worden waren. Erste Kolben- und Reaktorversuche bestätigten, dass diese Vorstufen grundsätzlich als Laktose- und Nährstoffquelle einsetzbar sind, wobei Nanofiltrationsretentat aufgrund seines erhöhten Laktosegehalts und reduzierten Gehalts organischer Säuren besonders geeignet erschienen.

Parallel wurden die in Arbeitspaket 4 identifizierten störenden Inhaltsstoffe und erforderlichen Nährstoffkomponenten in die Medienentwicklung integriert. Auf diese Weise konnten zwei komplementäre, FCDI- und NF-unabhängige Medienkomponenten formuliert werden: ein sauermolkebasiertes Batchmedium (AWM) und eine hochkonzentrierte sauermolkebasierte Laktoselösung (AWL). Für das AWM wurde das Sauermolkepermeat neutralisiert, durch gezielte Ca-Phosphat-Fällung in die in AP4 definierten Ionentoleranzen eingestellt und anschließend mit den notwendigen Nährstoffkomponenten ergänzt und sterilfiltriert. Das AWL enthielt dagegen keine zusätzlichen Nährstoffkomponenten und diente ausschließlich der Bereitstellung einer kontrollierbaren Laktosequelle. Die Laktosekonzentration wurde über Nanofiltration oder definierte Laktose Supplementierung auf 250 g/L eingestellt.

In den anschließenden Reaktorversuchen erwiesen sich AWM und AWL als leistungsfähig. AWM fungierte als stabiles Grundmedium, während AWL eine präzise Steuerung der Laktoseversorgung ermöglichte. Sowohl punktuelle AWL-Zugaben als auch Fed-Batch-Strategien führten zu gleichmäßigen Substratprofilen und hohen, reproduzierbaren 2′-FL-Titern. Abbildung 7 zeigt exemplarisch den Vergleich verschiedener Laktoseversorgungsstrategien.

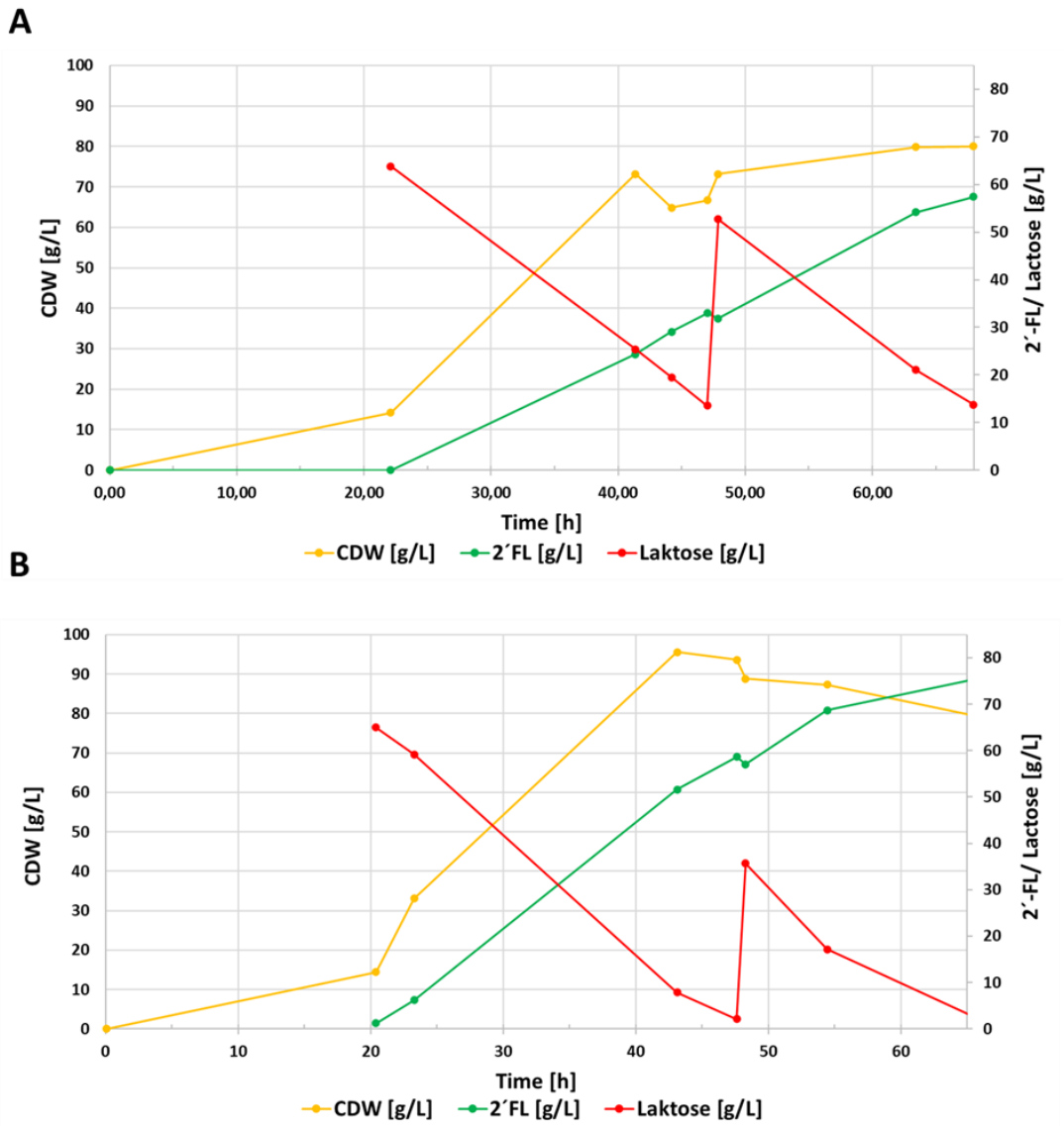

Abbildung 7: Vergleich von Standard und Sauermolke basiertem 2´-FL Fermentationsprozess im 5 L Bio Reaktor. Dargestellt sind die 2´-FL Produktion (2´-FL [g/L]) des Produktionsstammes, Laktosegehalt im Medium (Laktose [g/L]) und das Zelltrockengewicht (CDW [g/L]) im Verlauf der Fermentation. **A)** Standard-Fermentationsprozess mit definiertem Batch Medium und punktueller Zugabe von Laktoselösung aus Laktosepulver. **B)** Definiertes Batch Medium. Laktose Supplementierung punktuell durch AWL.

Insgesamt wurde in Arbeitspaket 6 ein klar strukturiertes, sauermolkebasiertes Medienkonzept etabliert, das sowohl in seiner Zusammensetzung als auch in der Prozessführung überzeugende Ergebnisse zeigte. Die entwickelten Verfahren ermöglichen eine zuverlässige Nutzung von Sauermolke als nachhaltige und kosteneffiziente Ressource für die fermentative Herstellung von 2′-FL. Damit bildet das Medien- und Prozesskonzept eine tragfähige Basis für weiterführende Optimierungen und künftige Scale-up-Studien.

3.7 Arbeitspaket 7 - Entwicklung eines Vorbehandlungsprozesses für standardisierte Sauermolke

Während OS die medientechnische Aufbereitung weiter standardisierte, wurde am DWI der parallel erforderliche Vorbehandlungsprozess in Richtung einer reproduzierbaren Standardisierung vertieft. Auf Basis der Erkenntnisse aus den Arbeitspaketen 3, 4 und 6 entwickelte das DWI einen integrierten Vorbehandlungsprozess, in dem Nanofiltration und Flow-Electrode Capacitive Deionization (FCDI) zu einer auf die Sauermolkematrix abgestimmten Prozesskette kombiniert wurden. Ziel war die Bereitstellung eines standardisierten und reproduzierbaren Sauermolkepermeats, bei dem störende Ionen und organische Säuren gezielt reduziert und gleichzeitig hohe Laktoseretentionen erreicht werden.

Hierzu wurden am DWI verschiedene Nanofiltrationsmembranen sowie unterschiedliche Betriebsparameter des FCDI-Prozesses evaluiert. Die Kombination aus beiden Verfahren erlaubte eine schrittweise Anpassung der Ionenzusammensetzung und stellte geeignete Vorstufen für nachfolgende Kolbenversuche bereit, die bei der HSHL durchgeführt wurden.

Die vollständigen Versuchsdaten, Parameterstudien und Leistungskennzahlen der einzelnen Prozessschritte werden im eingehenden Bericht des DWI (Kapitel 2) detailliert beschrieben und bilden eine fundierte Grundlage für weitere Optimierungen und zukünftige Scale-up-Überlegungen.

3.8 Arbeitspaket 8 - Entwicklung eines Aufarbeitungsprozesses

Für die Aufreinigung der in sauermolkebasierten Fermentationsmedien erzeugten 2′-Fucosyllactose (2′-FL) wurde ein mehrstufiger Downstream-Prozess entwickelt. Die Biomasseabtrennung und sterile Gewinnung des Fermentationsüberstands erfolgten bei OS mittels Zentrifugation und Mikrofiltration über eine Vibrofiltrationsanlage (800 kDa MWCO). Die anschließende Ultrafiltration (5 kDa MWCO) ermöglichte die weitgehende Entfernung makromolekularer Begleitstoffe bei gleichzeitig hoher Durchlässigkeit für 2′-FL und Laktose.

Das 5-kDa-Permeat wurde dem DWI zur weiteren Entsalzung mittels Nanofiltration und FCDI bereitgestellt. Unter den verfügbaren Anlagenbedingungen konnte eine

Salzreduktion von etwa 48 % erzielt werden. Die detaillierten Ionenprofile und Parameterstudien sind im eingehenden Bericht des DWI dokumentiert (Kapitel 3) und bildeten eine wichtige Grundlage für die Bewertung der technologischen Eignung dieser Verfahrenskombination.

Da während der Fermentation farbgebende Reaktionsprodukte entstehen, die durch FCDI und NF nicht vollständig entfernt werden konnten, untersuchte OS verschiedene Aktivkohlesorten hinsichtlich Farbstoffbindung und Produktausbeute. Eine Aktivkohlemenge von 2 % (w/v) zeigte dabei den besten Kompromiss zwischen Entfärbung und Produkterhalt. Tests mit verschiedenen Aktivkohlesorten zeigten, dass die Aktivkohle A bei 2 % (w/v) und einer Kontaktzeit von 20 min bei 22 °C den günstigsten Kompromiss zwischen Farbstoffbindung und Produkterhalt darstellte, mit einem 2′-FL-Verlust von lediglich 3 % (Abbildung 8).

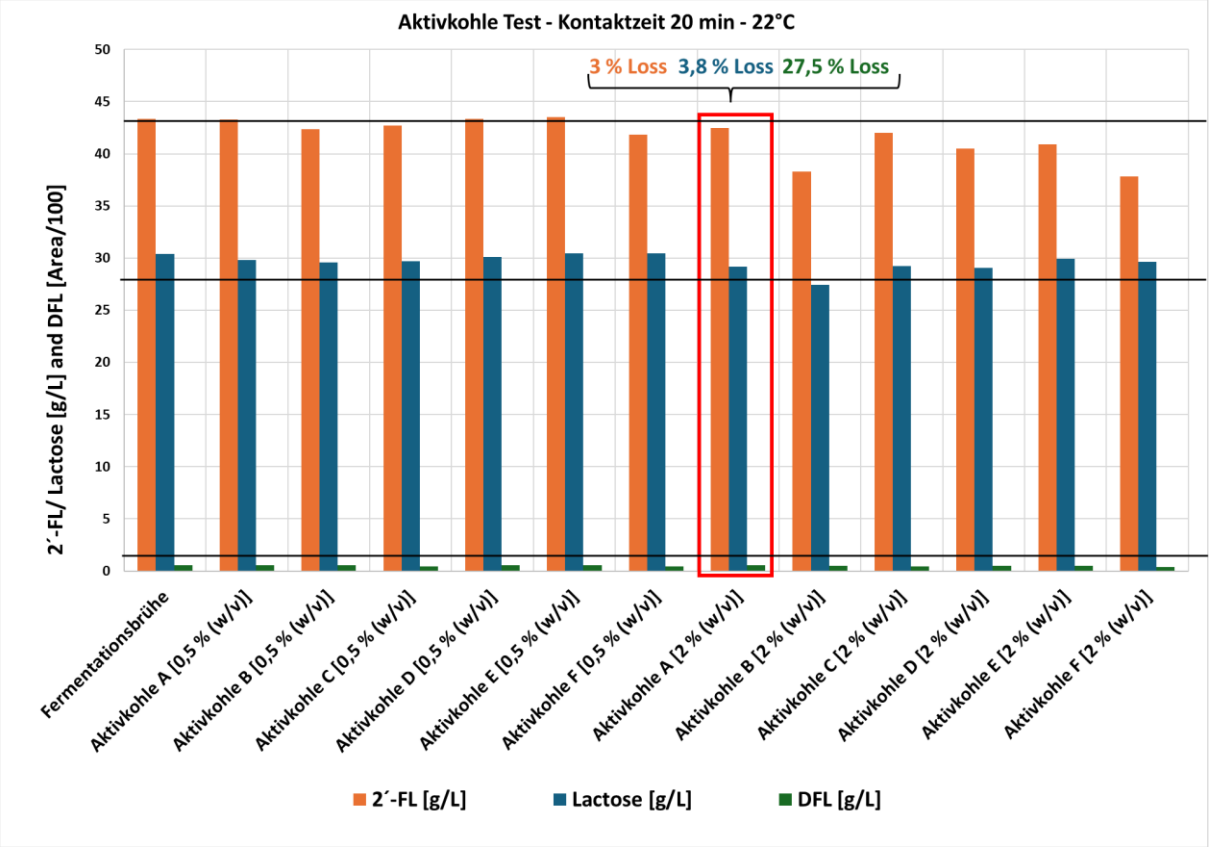

Abbildung 8: Produkt (2´-FL) -/ Nebenprodukt (DFL (Difucosyllactose)) Verlust durch Bindung an die getesteten Aktivkohlesorten mit 0,5 % und 2% (w/v) eingesetztem Anteil.

Die kombinierte Vorreinigung (MF/UF), Teilentsalzung (FCDI/NF) und Aktivkohlebehandlung lieferte eine klare, weitgehend farbfreie 2`-FL Lösung. Diese wurde an der HSHL mittels Gefriertrocknung zu einem 2´-FL Pulver weiterverarbeitet (siehe Abbildung 9).

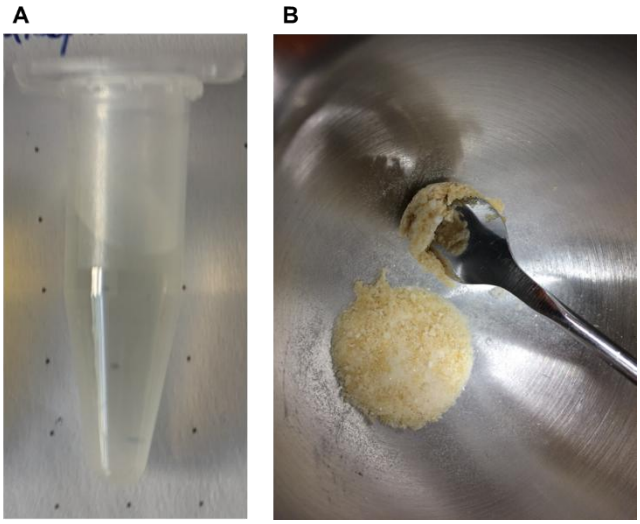

Abbildung 9: 2´-FL Lösung vor und 2´-FL Pulver nach Gefriertrocknung. A) Durch Aktivkohlebehandlung entfärbte 2´-FL Lösung vor Gefriertrocknung. **B)** 2´-FL Pulver nach Gefriertrocknung.

Das erhaltene Pulver erreichte eine 2′-FL-Reinheit von etwa 40 % bei einer Ausbeute von 75 % und stellt damit eine belastbare Grundlage für weitere Optimierungen und Scale-up-Studien dar.

3.9 Arbeitspaket 9 – Bewertung des Projektes

Im Projekt wurde ein kosteneffizientes und skalierbares Verfahren zur Herstellung der sauermolkebasierten Medienkomponenten AWM und AWL entwickelt. Beide Medien können mit gängiger Molkereitechnik produziert werden und bilden eine praxisnahe Grundlage für flüssige und pulverförmige *E. coli*-Nährmedien. Darauf basierend wurden stabile Fermentationsprozesse etabliert, die 2′-FL-Titer von über 70 g/L in 70 h ermöglichen. Die Aufarbeitung war mittels Zentrifugation, Membranverfahren und Aktivkohlebehandlung realisierbar; die Kristallisation zeigte jedoch deutliche Produktverluste, sodass für einen industriellen Prozess ein optimierter DSP inklusive verbesserter NF-/FCDI-Schritte und Ionenaustausch erforderlich ist.

Das Projekt bestätigt die technische Machbarkeit eines sauermolkebasierten 2′-FL-Prozesses und legt die Grundlage für weitere Optimierung und Skalierung. Ein Anschlussprojekt zur Weiterentwicklung der DSP-Schritte und zur Pilotierung des Gesamtprozesses wird vorbereitet.

4) Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalmittel, Verbrauchsmittel, Reisemittel.

5) Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Dem Arbeitsplan angemessen.

6) Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit der Ergebnisse

Durch das Projekt wurden zentrale Grundlagen für die Nutzung von Sauermolke als nachhaltige Substratquelle geschaffen. AWM/AWL-Vorbehandlung, robuste Fermentationsprozesse sowie ein modularer DSP bilden einen zusammenhängenden, skalierbaren Prozess zur Herstellung von 2′-FL. Die Ergebnisse haben damit die Basis für Kostensenkungen, neue Wertschöpfungsoptionen für Molkereien und ein hohes Transferpotenzial für die HMO-Industrie geliefert. Die entwickelten Technologien wurden durch mehrere Schutzrechtsanmeldungen abgesichert (HMO - Herstellung aus Sauermolke, FCDI basiertes HMO - Aufreinigungsverfahren und FCDI basierter Sauermolkeaufbereitung zu Molke Produkten) und bilden eine Basis für zukünftige Technologietransfer- und Lizenzaktivitäten. Die Weiterentwicklung in Richtung Pilotmaßstab ist vorgesehen und besitzt hohes Marktpotenzial im Bereich funktioneller Lebensmittel, Säuglingsnahrung und mikrobiomrelevanter Produkte, sowie Futtermittelzusatzstoffe.

7) Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Es wurden keine externen Arbeiten identifiziert, die direkt die sauermolkebasierte HMO-Herstellung oder den Einsatz von FCDI zur Aufwertung von Sauermolke adressieren oder weiterentwickeln.

8) Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die OligoScience Biotechnology GmbH hat drei europäische Patentanmeldungen zu den entwickelten Prozessmodulen eingereicht (HMO-Herstellung aus Sauermolke, FCDI-basierte Entsalzung von Fermentationsbrühen, FCDI-Prozessierung von Molke). Wissenschaftliche Veröffentlichungen sowie Konferenzbeiträge sind geplant. Die Projektergebnisse sollen darüber hinaus in die Lehre an der HSHL und der RWTH Aachen einfließen. Langfristig ist geplant, die geschützten Technologien in skalierte Produktionsprozesse zu überführen und damit die HMO-Herstellung und die Aufwertung von Molkereinebenströmen zu unterstützen.

9) Literatur

Baumgärtner, F., Seitz, L., Sprenger, G.A. et al. Construction of Escherichia coli strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2′-fucosyllactose. Microb Cell Fact 12, 40 (2013). https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-40

Kern et al., “Parallel substrate supply and pH stabilization for optimal screening of E. coli with the membrane-based fed-batch shake flask”, Microbial Cell Factories, 2018

Menchik et al., “Short communication: Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate”, J. Dairy Sci., 2019

O’Brien, J. (2009). Non-Enzymatic Degradation Pathways of Lactose and Their Significance in Dairy Products. In: McSweeney, P., Fox, P. (eds) Advanced Dairy Chemistry. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_7

Therisod, H. (1985). Implication of proteases in the respiration dependent inactivation of the lactose permease of E. coli. In: FEBS Letters , Volume 187, Issue 1, 22 July 1985, Pages 38-42