

PlastoCyan

PROJEKTBERICHT FÜR DIE ABSCHLUSSSITZUNG

Interreg



EUROPÄISCHE
UNION

Österreich-Tschechische Republik

Europäischer Fonds für regionale Entwicklung

ÚVOD

Vážení přátelé,

Mikrobiologický ústav AV ČR – Algatech v Třeboni ve spolupráci s Technickou univerzitou ve Vídni a Univerzitou aplikovaných věd ve Welsu v Horním Rakousku si Vám dovoluje představit projekt Produkce biologicky rozložitelného polymeru polyhydroxybutyrátu (PHB) ze sinic cestou kultivace v odpadních vodách, zkráceně **Plastocyan**, který vznikl v rámci programu INTERREG V-A Rakousko – Česká republika.

Společnost označuje současnost jako dobu plastovou. Plasty jsou univerzální a odolný materiál používaný po celém světě ve všech průmyslových odvětvích. Plasty vyráběné na bázi ropy způsobují vážné ekologické problémy kvůli jejich nerozložitelné povaze. Jakkoli bylo navrženo mnoho strategií pro kontrolu plastového odpadu, mikroplasty, nanoplasty a likvidace plastů stále způsobují obrovskou kontaminaci, která zatěžuje půdu i vodní prostředí. Navzdory vyčerpání neobnovitelných fosilních zdrojů, rostoucímu tempu cen ropy a negativnímu dopadu na životní prostředí je celosvětová poptávka po plastech stále na vzestupu. Tato alarmující situace vede k hledání alternativ. Biologicky odbouratelné plasty vyrobené mikroorganismy, jako jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA), se ukazují jako nejlepší řešení, jak nahradit konvenční plasty a chránit tak životní prostředí.

Projekt Plastocyan přichází s novou technologií výroby 100% biodegradovatelného bioplastu - polyhydroxybutyrátu (PHB), přírodní cestou, a to pěstováním sinic v odpadní vodě.

EINFÜHRUNG

Liebe Freunde,

Das Institut für Mikrobiologie des CAS – Algatech Centre in Třeboň, in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Wien und der Fachhochschule Wels, Oberösterreich, möchte das Projekt Produktion von biologisch abbaubarem Polymer Polyhydroxybutyrat (PHB) aus Cyanobakterien durch Kultivierung in Abwasser, kurz Plastocyan, vorstellen, das im Rahmen des INTERREG V-A Programms Österreich - Tschechische Republik eingerichtet wurde.

Das Unternehmen bezeichnet die Gegenwart als das Plastikzeitalter. Kunststoffe sind ein vielseitiges und langlebiges Material, das weltweit in allen Branchen eingesetzt wird. Kunststoffe auf Erdölbasis verursachen ernsthafte Umweltprobleme, da sie nicht abbaubar sind. Obwohl viele Strategien zur Eindämmung von Kunststoffabfällen vorgeschlagen wurden, stellen Mikroplastik, Nanoplastik und die Entsorgung von Kunststoffen nach wie vor eine enorme Belastung für den Boden und die aquatische Umwelt dar. Trotz der Erschöpfung der nicht erneuerbaren fossilen Ressourcen, der steigenden Ölpreise und der negativen Auswirkungen auf die Umwelt steigt die weltweite Nachfrage nach Kunststoffen weiter an. Diese alarmierende Situation führt zu einer Suche nach Alternativen. Biologisch abbaubare Kunststoffe, die von Mikroorganismen hergestellt werden, wie z. B. Polyhydroxyalkanoate (PHA), erweisen sich als die beste Lösung, um herkömmliche Kunststoffe zu ersetzen und so die Umwelt zu schützen.

Im Rahmen des Plastocyan-Projekts wurde eine neue Technologie zur Herstellung von 100 % biologisch abbaubarem Biokunststoff - Polyhydroxybutyrat (PHB) - auf natürliche Weise durch das Wachstum von Cyanobakterien in Abwässern entwickelt.

INTRODUCTION

Dear friends,

The Institute of Microbiology of the CAS – Algatech Centre in Třeboň, in cooperation with the Technical University of Vienna and the University of Applied Sciences in Wels, Upper Austria, would like to introduce the project Production of biodegradable polymer polyhydroxybutyrate (PHB) from cyanobacteria by cultivation in wastewater, abbreviated as Plastocyan, which was established within the INTERREG V-A Austria - Czech Republic programme.

The company refers to the present as the plastic age. Plastics are versatile and durable materials used worldwide in all industries. Petroleum-based plastics cause serious environmental problems due to their non-degradable nature. Although many strategies have been proposed to control plastic waste, microplastics, nanoplastics, and plastic disposal still cause enormous contamination, which affects soil as well as aquatic environments. Despite the depletion of non-renewable fossil resources, rising oil prices, and the negative impact on the environment, the global demand for plastics is still on the rise. This alarming situation is leading to a search for alternatives. Biodegradable plastics produced by microorganisms, such as polyhydroxyalkanoates (PHAs), are the best solution to replace conventional plastics and thus protect the environment.

The Plastocyan project has come up with a new technology to produce 100% biodegradable bioplastic - polyhydroxybutyrate (PHB) - naturally by growing cyanobacteria in wastewater.

THE PROJECT'S MISSION

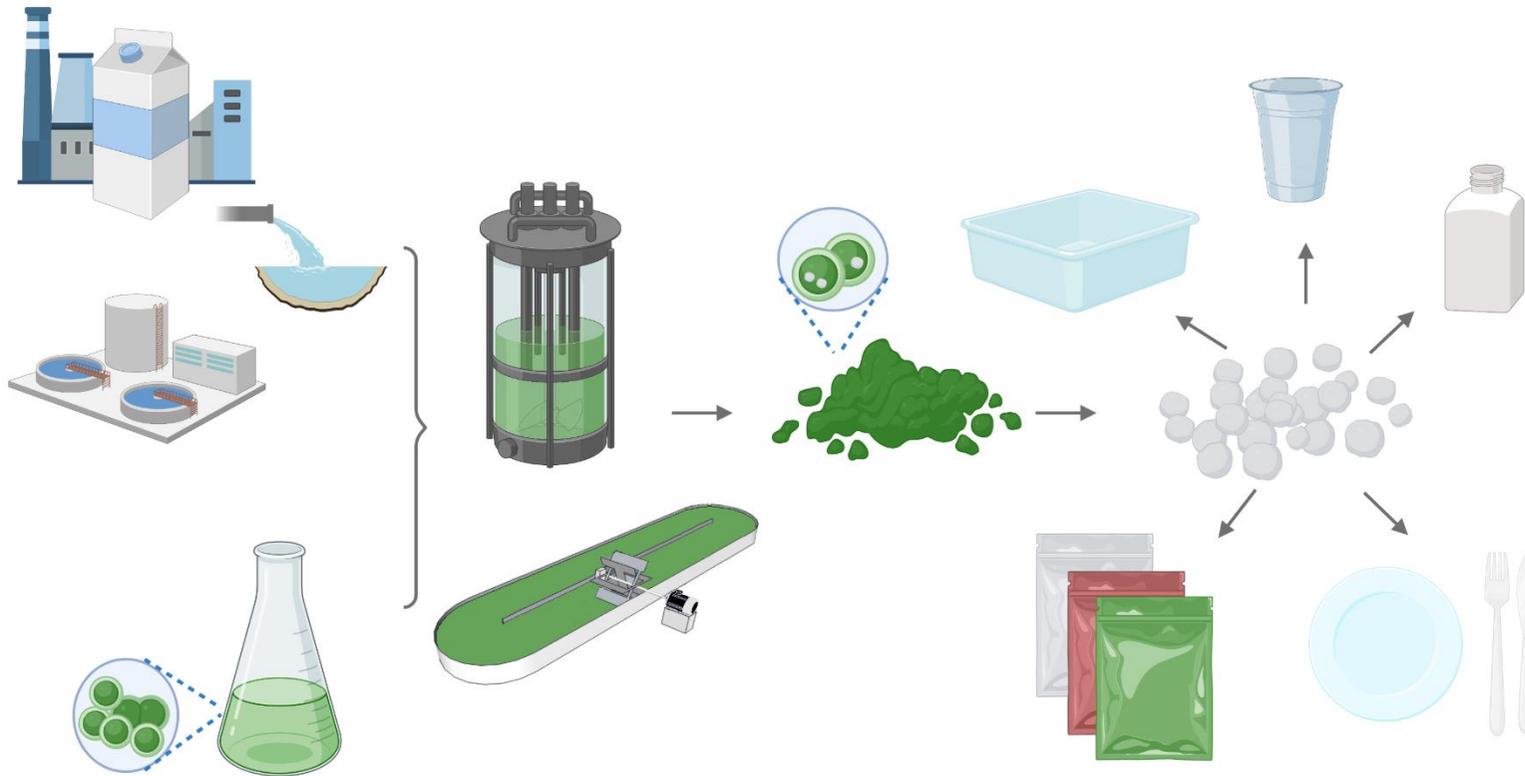
Hauptziel des Projekts ist die Entwicklung einer ökologisch innovativen Technologie für die Herstellung von Biokunststoffen aus Cyanobakterien, die kommunalen Abwässer und Abwässer aus der Milchwirtschaft als Nährstoffquelle für ihr Wachstum nutzen.

PHB AND ITS PRODUCTION BY MICROORGANISMS

Polyhydroxybutyrat (PHB) ist ein thermoplastischer, wasserabweisender, UV-beständiger Kunststoff mit Eigenschaften, die herkömmliche Kunststoffe wie Polypropylen oder Polyethylen ersetzen.

Unter bestimmten Bedingungen können einige Mikroorganismen PHB-Granulate bilden, die als Kohlenstoffspeicher dienen. Gegenwärtig produzieren chemotrophe Bakterien natürliches PHB, das innerhalb weniger Tage bis zu 80 % des Trockengewichts der Zellen ausmacht. Allerdings sind die Produktionskosten von PHB im Vergleich zu denen herkömmlicher Kunststoffe sehr viel höher. Bei der Herstellung von PHB entfallen bis zu 50 % der Kosten auf das Vorläufersubstrat, insbesondere die Kohlenstoffquelle. Die meisten Cyanobakterien produzieren auf natürliche Weise 5-20 % PHB ihrer Zellmasse. Cyanobakterien können nicht mit chemotrophen Bakterien konkurrieren, was den PHB-Gehalt oder die Wachstumsrate der Biomasse angeht. Da Cyanobakterien jedoch photosynthetisierende Organismen sind, ist ihre Kohlenstoffquelle das aus der Luft gewonnene CO₂. Im Gegensatz zu bakteriellen PHB-Produzenten verbrauchen photoautotrophe Cyanobakterien keinen Zucker und sind daher nicht auf Pflanzen angewiesen, was sie zu einem alternativen grünen Produktionssystem macht.

THE PLASTOCYAN PROJECT



Im Rahmen des Projekts ist es gelungen, ein Verfahren zur Kultivierung von Cyanobakterien zu entwickeln, bei dem das Substrat Abwasser ist. Für das Wachstum der Cyanobakterien-Biomasse wurden zwei Arten von Abwasser verwendet: (i) kommunale Abwässer aus dem Klärprozess und (ii) Abwässer aus der Milchproduktion. Beide Substrate enthalten Stickstoff (250 mg/L für beide Substrate) und Phosphor (150 mg/L kommunales Abwasser und 25 mg/L Molkereiabwasser), die wichtigsten Komponenten für das Wachstum der Cyanobakterien.

Für die Kultivierung wurde ein durch UV-Mutagenese erzeugter Stamm des Cyanobakteriums *Synechocystis* mit höherer PHB-Produktion verwendet. Für die Kultivierung im Abwasser der kommunalen Kläranlage wurde eine Dünnschicht-Außenkultivierungseinheit verwendet. Die Kultivierung in Molkereiabwässern erfolgte in einem geschlossenen ringförmigen Photobioreaktor. Dies wurde durchgeführt, um die Bedingungen für die spätere Prüfung eines gentechnisch veränderten Stammes mit höherer PHB-Produktion und Laktoseverarbeitbarkeit zu optimieren. Die Kultivierung des Stammes in beiden Pilotanlagen dauerte 4-6 Wochen, um die maximale PHB-Menge zu erreichen. Am Tag der Biomasseernte betrug der PHB-Gehalt 23 % des Zelltrockengewichts im kommunalen Abwasser und 10 % im Milchabwasser. Im Vergleich zu den verfügbaren Daten liegt die PHB-Produktion im phototrophen Regime (ohne organische Kohlenstoffquelle) von genetisch unveränderten Cyanobakterien unter optimalen Nährmediumbedingungen in einer Pilotanlage bei 4-25 %. Der im Plastocyan-Projekt verwendete Stamm erreichte in der vorangegangenen Studie unter Laborbedingungen in kleinem Maßstab 37 % PHB-Zelltrockengewicht im optimalen Wachstumssubstrat. Der Hauptnutzen des Projekts liegt jedoch in der Wiederverwertung des Abwassers. Auch in dieser Hinsicht sind die Ergebnisse des Projekts überdurchschnittlich gut. In beiden Abwassertypen war es möglich, Biomasse bis zu einer Dichte von 2-2,5 g/L zu züchten, während die Durchschnittswerte für das Wachstum von Cyanobakterien in Abwasser bei 0,6-3,15 g/L liegen sollen. Das PHB-Granulat kann durch verschiedene Extraktionsmethoden aus den Zellen gewonnen werden, wobei hauptsächlich organische Lösungsmittel wie Chloroform verwendet werden, die umweltschädlich sein können. Das Projekt befasst sich auch mit der umweltfreundlichen und wirtschaftlichen Alternative der Extraktion von PHB aus Biomasse unter Verwendung so genannter ionischer Flüssigkeiten, die zur Kategorie der grünen Lösungsmittel gehören. In vielen Fällen ist die Extraktion des Produkts mit ionischen Flüssigkeiten leichter zugänglich, kann recycelt und somit wiederverwendet werden. Im Rahmen des Projekts wird auch ein genetisch veränderter Stamm entwickelt, der PHB überproduziert und Laktose als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Dies könnte die PHB-Produktion in geschlossenen Kultivierungseinheiten unter Verwendung von Molkereiabwässern rationalisieren. Die durch UV-Strahlung erzeugte Mutante *Synechocystis* sp. PCC 6714 Mt_a24 wurde genetisch weiter verbessert, indem zwei Gene (*spsA* und *glgC*), die in metabolisch konkurrierenden Stoffwechselwegen beteiligt sind, ausgeschaltet wurden. Die Eliminierung dieser Gene soll eine metabolische Verschiebung zu höherer PHB Produktionsrate auslösen. Gleichzeitig wurden Gene eingeführt, die die Nutzung von Laktose (*beta-Gal*) als Kohlenstoffquelle erhöhen, kloniert und in die Cyanobakterien eingeführt. Des Weiteren sind Tätigkeiten, die die Erhöhung der PHB-Produktion (Klonierung von Plasmiden, die *phaA* und *phaB* Gene beinhalten) im Gange.

Zu den wichtigsten Ergebnissen des Projekts gehören:

- a) Optimierung der Kultivierung von Cyanobakterien in Abwässern (städtische Abwässer, Molkereiabwässer) für die Herstellung von Biokunststoff - Polyhydroxybutyrat (PHB) im Pilotmaßstab.
- b) Ökologische Extraktion von PHB aus cyanobakterieller Biomasse unter Verwendung ionischer Flüssigkeiten.
- c) Generierung genetisch verbesserter Stämme mit dem Potenzial zu höherer PHB-Produktion und Laktose-Verwertung.

Drei Institutionen, das Institut für Mikrobiologie des CAS - Algatech Centre in Třeboň (MBU), die Fachhochschule Wels, Oberösterreich (FH OOE), und die Technische Universität Wien (TU Wien), arbeiten an dem Projekt mit. Jeder Partner koordiniert ein spezifisches Arbeitspaket unter Berücksichtigung seines Fachwissens.

Die folgenden Aktivitäten beschreiben die im Rahmen des Projekts erzielten Ergebnisse und Leistungen.

Aktivität A.T1.1 Kultivierung von PHB-produzierenden Cyanobakterien in Abwasser-haltigen Medien

Coordinator: MBU

Bei dieser Aktivität wurden Abwässer aus zwei verschiedenen Quellen getestet, (i) Abwässer aus der kommunalen Kläranlage in Třeboň und (ii) Abwässer aus der Milchproduktion, die von Madeta a.s. bereitgestellt wurden. Ziel dieser Maßnahme war es, aus dem Abwasser ein geeignetes Substrat für die Gewinnung von Cyanobakterien-Biomasse zu gewinnen, die auch einen biologisch abbaubaren Kunststoff - Polyhydroxybutyrat (PHB) - bildet.

Die Kultivierungsparameter konnten so angepasst werden, dass die Anwesenheit von Cyanobakterien-Räubern, die bei der Kultivierung in großem Maßstab auftreten können, ausgeschlossen wurde. Kulturen des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. in Abwasser wurden im Pilotmaßstab durchgeführt - das Wachstum von *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt_a24 wurde in einer TL-RWP (thin-layer raceway pond) genannten Kulturvorrichtung im Pilotmaßstab im Medium mit Abwasser aus der kommunalen Kläranlage in Třeboň und in einem geschlossenen anaeroben Photobioreaktor mit Milchabwasser für die PHB-Produktion optimiert, was die Grundlage für die erfolgreiche Umsetzung der Technologie darstellt. Die aus diesen Anbauten gewonnene Biomasse (110 g TL-RWP; 18 g PBR) enthielt das biologisch abbaubare Polymer PHB. Am Tag der Ernte machte PHB 23 % des Trockengewichts der Biomasse im kommunalen Kläranlagenabwasser und 10 % im Milchabwasser aus. Die Biomasse wurde dem Partner TU Wien zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt.

Detailoutput A.T1.1.1 Bericht über die Auswahl und Analyse von unterschiedlichen Abwässern als Nährstoffquelle für die Cyanobakterienkultivierung

Das sogenannte Zentrat aus der Kläranlage wurde zentrifugiert, um ein für den Anbau geeignetes Abwasser zu erhalten. Es wurde von Povodí Vltavy, einem staatlichen Unternehmen und Wasserwirtschaftslabor in České Budějovice, extern analysiert (Tab. 1). Im Rahmen dieser Tätigkeit wurde ein Test durchgeführt, um die Auswirkungen des Abwassers auf die Wachstumshemmung und die am besten geeignete Behandlung des Abwassers für den Anbau zu ermitteln (Abb. 1). Bei diesem Test wurde die Auswirkung der Abwasserbehandlung (Wärme, UV-Behandlung, Verdünnung usw.) auf die Unterdrückung von Wachstumshemmstoffen und vorhandenen Mikroorganismen geprüft (Tab. 2). Während der Validierung wurde der physiologische Zustand der Kultur durch Messung der Photosynthese, des Vorhandenseins von Verunreinigungen und des Biomassewachstums, des Nährstoffabbaus im Abwasser während des Cyanobakterienwachstums und des PHB-Gehalts ausgewählter Proben bestimmt (Analyse im Rahmen einer Mitarbeiterreise zum Projektpartner). Auf der Grundlage der Ergebnisse wurde die UV-Entkeimung als die am besten geeignete Abwasserbehandlung für die Kultivierung im Pilotmaßstab gewählt. Außerdem wurden vier Arten von Molkereiabwässern, die von Madeta Inc. zur Verfügung gestellt wurden, analysiert (in Tabelle 1 mit M1, M2, M3 und M4 bezeichnet). Auf der Grundlage erster Tests wurde das am besten geeignete Milchabwasser (M1) mit ausreichenden Nährstoffen und minimalen Hemmstoffen für das Wachstum von Cyanobakterien für die PHB-Produktion ausgewählt. Dieses Abwasser wurde für die Pilotkultur in einem Photobioreaktor verwendet.

Tab 1 Chemische Analyse des Abwassers, CWW (clean wastewater) Abwasser nach vollständiger Behandlung in der Kläranlage, WW (wastewater) Zentrat aus dem Belebtschlamm, HT WW (heat treatment) Zentrat mit Wärme behandelt UV WW Zentrat mit UV behandelt, M1 Abwasser aus dem Kanal der Milchproduktion, M2 Abwasser aus der Käseproduktion, M3 Abwasser aus den Rahmtanks, M4 Abwasser aus der Butterproduktion.

Abwasseranalyse [mg L ⁻¹]	CWW	WW	HT WW	UV WW	M1	M2	M3	M4	BG-11medium
BOD*	6.5	150	190	170	1400	4000	15000	450	-
COD**	34	740	720	730	2700	4700	32000	1900	-
TOC***	15	310	300	300	1100	1800	8200	520	-
Nitrates	-	-	-	-	320	22	8.7	6.2	-
N-NO ₃	7.5	<0,15	<0,15	<0,15	72	5.0	2.0	1.4	250
N-NO ₂	0.006	0.005	0,005	0.003	0,07	0.01	0.002	0.004	-
N-NH ₄	0.02	180	170	170	3.0	1.7	0.47	0.2	-
Total N	8.7	250	240	250	260	120	120	16	250
P-PO ₄	2.3	150	130	140	12	21	8.0	1.1	7
Total P	2.8	160	140	150	24	30	17	2.0	7

*Biologischer Sauerstoffbedarf; **Chemischer Sauerstoffbedarf; ***Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff

Tab 2 Bestimmung der bakteriellen Koloniereinheiten nach verschiedenen Abwasserbehandlungen.

Behandlung	Koloniebildende Einheiten (colony forming units) [CFU/ml]
CWW	6800
WW	18000
50% ředená WW	9000
HT WW	260
UV WW	0



Fig 1 Kultivierung in Glaszylindern für die Analyse verschiedener Abwassertypen.

Detailoutput A.T1.1.2 Standard Operating Procedure (SOP) zur Kultivierung von Cyanobakterien mit Abwasser-haltigen Medien im Pilotmaßstab

Standard Operating Procedure for Cultivation Unit

A) Dünnschicht-Laufteich, (thin-layer raceway pond; TL-RWP)



Dünnschichtteich in einem Gewächshaus mit einer Kulturfläche von 5 m² und einem Arbeitsvolumen von 100-600 l, einer Kulturschichtdicke zwischen 15 und 60 mm und einer Strömungsgeschwindigkeit von etwa 0,2 m/s. Die Durchmischung erfolgt über ein Schaufelrad.

B) ringförmiger Photobioreaktor (PBR)



Ein ringförmiger 30-Liter-Photobioreaktor mit einer Gesamthöhe von 100 cm, einem Außendurchmesser von 30 cm und einem Innendurchmesser von 18 cm, mit einstellbarer interner LED-Beleuchtung. Die Kultur wird durch Röhren am Boden des Photobioreaktors mit Luft gemischt. Die optimale Dicke der Kulturschicht (Lichtweg) beträgt 5,5 cm.

Standard operational protocol:

Cyanobakterienstamm: *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt_a24

1. Vorkultivierung eines Stammes des Cyanobakteriums *Synechocystis* aus einer Petrischale in eine 5-15-Liter-Kulturflasche.
2. Anbaubedingungen der Saatgutkultur: steriles anorganisches Medium -BG-11; pH 8,0; temperatur 26-30 °C; kontinuierliche Beleuchtung mit einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Durchmischung mit Luft + 1% CO_2 (v/v). Kultivierungsdauer - bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase (10-14 Tage).
- 3.a Kultivierung in einem Dünnschicht-Umlaufbecken im Freien (TL-RWP) unter Verwendung von Abwasser aus einer kommunalen Kläranlage. Für die Kultivierung im TL-RWP werden ca. 90 l zentrifugierter Belebtschlamm, Zentrat genannt, benötigt. Der Sedimentanteil beträgt 10-20 %, zentrifugiert bei 4000 g, 5 min. Optimale Bedingungen: Gewächshaustemperatur 15-34 °C. Maximale tägliche Sonneneinstrahlung $\leq 1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- 4.a Das zentrifugierte Abwasser wird teilweise mit einer UV-Tauchlampe entkeimt. Die Sterilisation des gesamten Volumens für 1 h wird durch Einblasen von Luft sichergestellt.
- 5.a Das Substrat, d. h. das Abwasser, wird in den TL-RWP gefüllt und das Kulturinokulum wird bis zu einer endgültigen optischen Dichte von $\text{OD}_{750} = 0,4$ zugegeben. (Das Volumen wird durch Berechnung der Mischungsgleichung ermittelt: $\text{OD}_{750}\text{Inokulum} \times X \text{ Liter} = 0,4 \times 100 \text{ Liter}$).
- 3.b Kultivierung in einem geschlossenen anaeroben Photobioreaktor unter Verwendung von Abwässern (M1 Sub-Output A.T1.1.1) aus der Milchproduktion. Für die Kultivierung in einem 30-Liter-PBR werden 25-27 Liter Milchabwasser benötigt.
- 4.b Das Abwasser wird teilweise mit einer UV-Lampe entkeimt. Die Sterilisation des gesamten Volumens für 1 h wird durch Einblasen von Luft sichergestellt.
- 5.b Das Substrat, d. h. das Abwasser, wird in den TL-RWP gefüllt und das Kulturinokulum wird bis zu einer endgültigen optischen Dichte von $\text{OD}_{750} = 0,4$ zugegeben. (Das Volumen wird durch Berechnung der Mischungsgleichung ermittelt: $\text{OD}_{750}\text{Inokulum} \times X \text{ Liter} = 0,4 \times 30 \text{ Liter}$). Kulturbedingungen: Temperatur 26-30 °C; Beleuchtung mit 12/12 Stunden Lichtzyklus und einem Lichtweg von 5,5 cm; Luftdurchmischung.
6. Die Kulturprobe wird täglich auf das Vorhandensein von Räufern (meist Geißeltierchen) untersucht, die erst nach dem Wachstum der Kultur (2-4 Tage) auftreten.
7. Sofort, wenn die ersten Räuber beobachtet werden, den pH-Wert mit 1M Natriumhydroxid auf $\approx 10,5$ einstellen.
8. Ein pH-Wert von $\approx 10,5$ wird während der gesamten Kultivierungsdauer, d. h. 26-30 Tage, beibehalten.
9. Die Kultur wird bei 17 000 g 7 Minuten lang zentrifugiert, und die Biomasse wird für die anschließende PHB-Extraktion gefriergetrocknet.

Aktivität A.T1.2 Generierung und Auswahl von Transformanten mit erhöhter PHB Produktion

Coordinator: FH OOE.

Detailoutput A.T1.2.1 Liste von Transformanten mit erhöhter PHB Produktion

Die zellulären Komponenten die als Ausgangsmaterial für die PHB Produktion dienen können in Form von Glykogen gespeichert werden. Um mehr dieser Ausgangsmaterialien für die PHB Produktion zur Verfügung zu stellen und den Stoffwechselweg für die PHB Produktion in dem Cyanobakterien Stamm *Synechocystis* PCC6714 Mt_a24 (weiter Mt_a24) mutant zu verbessern, wurde der Stoffwechselweg zur Herstellung von Glykogen durch genetische Manipulation inhibiert. Dadurch wird der Stoffwechsel in Richtung PHB Produktion gedrängt. Um die Glykogen Produktion zu inhibieren wurde eines der hauptverantwortlichen Gene, glgC, molekularbiologische Methoden ausgeschaltet. Dazu wurden Plasmide generiert die eine Kopie des Antibiotikaresistenzgens Spectinomycin, statt des glgC Gens integrieren (Fig. 2). Dieses Plasmid wurde sequenziert und in den Mt_a24 transformiert. Die Anwesenheit des Gens wurde durch Isolierung der genomischen DNA und PCR nachgewiesen.

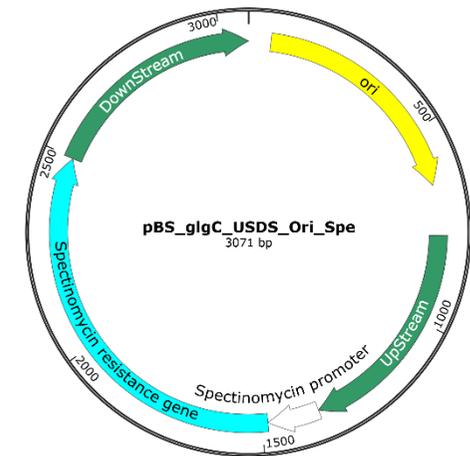


Fig 2 Plasmidkarte des erzeugten glgC knock-out Plasmids pBS_k.o.glgC.

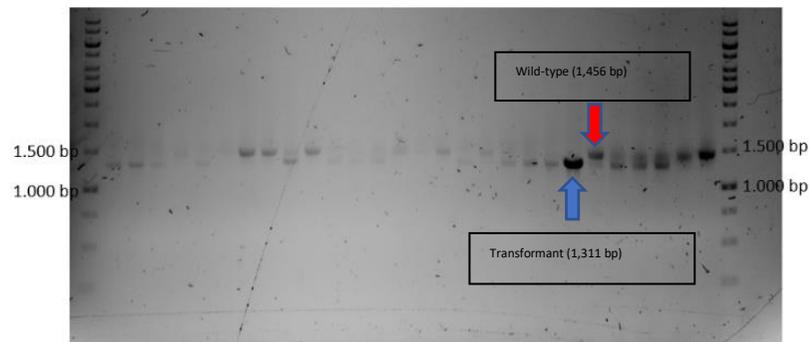


Fig 3 Segregierung von mit dem glgC knock-out Plasmid pBS_k.o.glgC transformierten *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt_a24.

Da Cyanobakterien mehrere genomische Kopien pro Zelle aufweisen können, müssen sie für mehrere Wochen unter Antibiotischen Druck selektioniert werden um vollständig in stabile und reine Klone, die nur Kopien des einzubringenden Gens, aber keine Kopien des originalen, auszuschaltenden (knock-out) Gens beinhalten, zu segregieren. Die transformierten kulturen segregierten mehreren Wochen unter wachsendem antibiotischem Selektiondruck. Die Segregation der Kulturen wurde regelmäßig überprüft und der knock-out wurde in mehreren Klonen bestätigt (Fig. 3). Auch segregierten die Kulturen über einen bestimmten Zeitraum immer weiter, aber sie segregierten nie vollständig. Das könnte ein Hinweis sein, dass die auszuschaltenden Gene lebenswichtig für die Cyanobakterien sind und, dass sie zumindest ein paar wenige Kopien benötigen um zu überleben.

Eine Überproduktion von PHB wird erreicht, indem die Kopienzahl von zwei Genen erhöht wird, die für die PHB-Produktion verantwortlich sind (PhaA und PhaB). Die beiden Gene wurden vom Genom des Cyanobakterien Stammes *Synechocystis* sp. PCC6714 mittels PCR isoliert und amplifiziert. Die Gene wurden dann mittels der state-of-the-arte Gibson assembly methode in das zuvor beschriebene glgC knock-out plasmid pBS_k.o.glgC kloniert (Fig. 4). Mehrere leicht unterschiedliche DNA-Fragmente wurden durch die Verwendung von verschiedenen Gibson-Primern hergestellt und für diesen Klonierungsschritt verwendet. Jedoch zeigte die Sequenzierung der erzeugten Plasmide, dass PhaA and PhaB Gene nie in dem Plasmid inkorporiert waren. Deshalb wurden die beiden Gene fusioniert an ein Spectinomycin Resistenzgen synthetisch hergestellt um das Ziel sie in dem Cyanobakterien Stamm sp. PCC6714 Mt_a24 zu überexprimieren. Dieses DNA Fragment wurde in das glgC knock-out Plasmid pBS_k.o.glgC, auch mittels Gibson Klonierungsmethode, kloniert. Erste Sequenzanalysen zeigen nun, dass die Klonierung des PhaAB-Überexpressionsplasmids endlich funktioniert hatte. Der anschließende Schritt um PhaAB zu überexprimieren, die Transformation in die Cyanobakterien, ist im Moment im Gange und es wird erwartet, dass bis zum Ende der Projektlaufzeit Transformaten erzeugt sind.

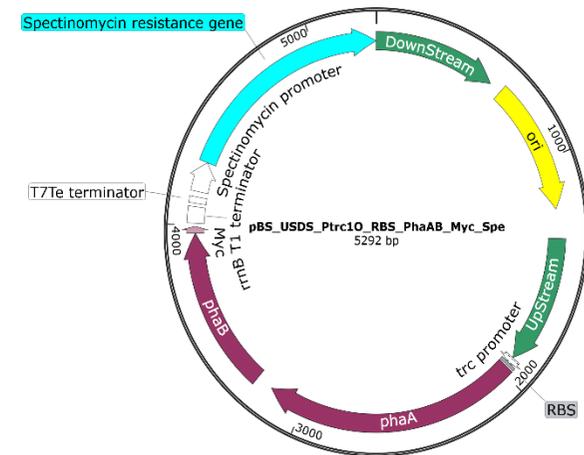


Fig 4 Plasmidkarte des designten PhaAB Expressionsplasmids pBS_glgC::PhaAB.

Detailoutput A.T1.2.2 Liste von Laktose verwertenden Transformanten

Da Cyanobakterien nicht fähig sind Laktose, einen Bestandteil von Molkereiabfall, abzubauen, wurde ein Gene für β -Galaktosidase, welches Laktose in Glukose und Galaktose abbaut, eingeführt. Für diesen Ansatz wurden drei Versionen eines β -Galaktosidase Gens in einen Cyanobakterien Plasmidvector kloniert. Erstens, das *Escherichia coli* LacY and LacZ Gene, zweitens die leistungsfähigen β -Galaktosidase Gene aus *Trichoderma reesei* (BGA1) und *Bacillus circulans* (BgaD-D). Die gewünschten Plasmide sind in Fig. 5 zu sehen. Die Aminosäuresequenz der Gene wurde für Proteinexpression in Cyanobakterien Codon-optimiert und die entsprechende DNA, verbunden mit passenden Export-Sequenzen die eine Sekretion der produzierten Enzyme ins umliegende externe Medium erlauben, synthetisiert. Die synthetisierten DNA Fragmente wurden dann in cyanobakterielle Expressionsvektoren kloniert. Die Plasmide pBS_spsA::bGAI-bact und pBS_spsA::bGAI-fungal wurden erfolgreich kloniert und sequenziert. Da bereits zwei Versionen eines β -Galaktosidase Gens erfolgreich in das gewünschte Plasmid kloniert wurden, wurden die Anstrengungen die dritte Version (pBS_spsA::lacYZ) zu generieren eingestellt. Anschließend wurde der Cyanobakterienstamm *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt_a24 mit beiden Plasmiden transformiert. Die Anwesenheit des Gens wurde durch Isolierung der genomischen DNA und PCR nachgewiesen (Fig. 6).

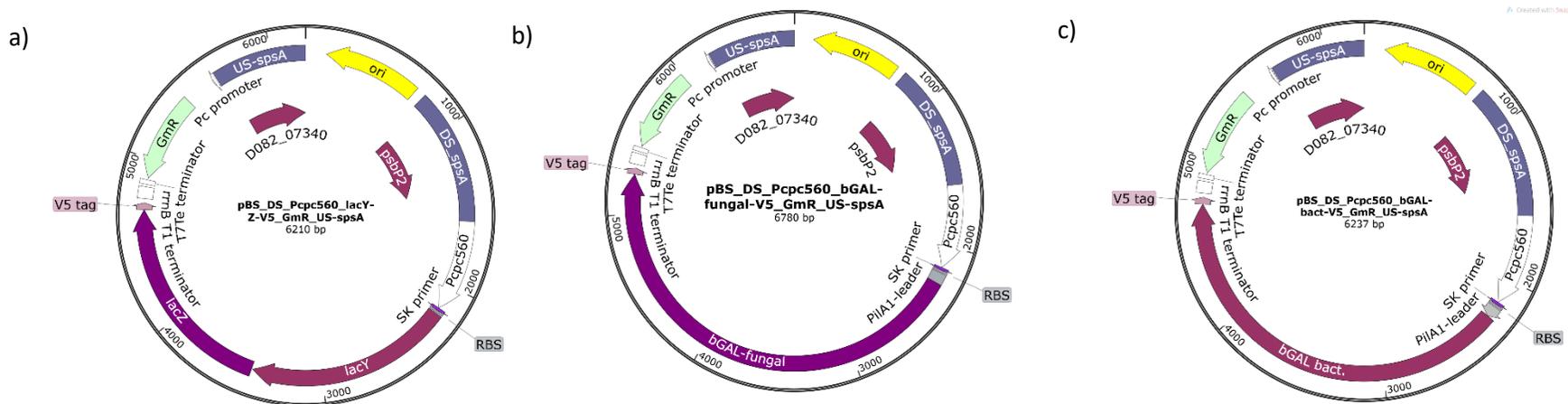


Fig 5 Plasmidkarte des erzeugten β -galaktosidase Expressionsplasmids a) pBS_spsA::lacYZ b) pBS_spsA::bGAL-bact c) pBS_spsA::bGAL-fungal.

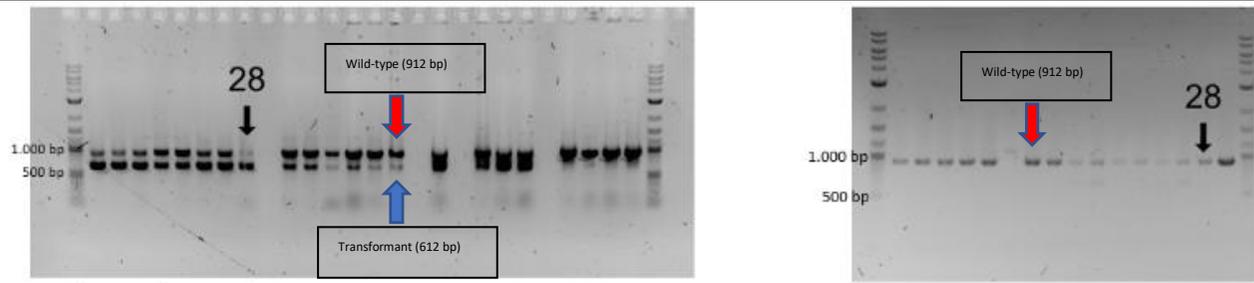


Fig 6 Segregierung von dem mit dem β -Galaktosidase Expressionsplasmiden pBS_spsA::bGAL-bact (links) and pBS_spsA::bGAL-fungal (rechts) transformierten Stamm *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt_a24.

Die erzeugten Plasmide sind so designt, dass die β -Galaktosidase Genes an Stelle des *spsA* Gens im Genom des Cyanobakterien Stammes *Synechocystis* sp. PCC6714 integrieren. So wird zugleich die β -Galaktosidase exprimiert, bzw. integriert, und ein konkurrierender Stoffwechselweg ausgeschaltet. Auch in diesem Fall müssen die Cyanobakterienkulturen mehrere Wochen bei steigendem antibiotischem Selektionsdruck kultiviert werden um vollständig in stabile und reine Klone, die β -Galaktosidase und keine Kopie des originalen *spsA* Gens enthalten, zu segregieren. Dieser Prozess ist im Moment im Gange und die transformierten Kulturen werden regelmäßig analysiert. Wie in Fig. 6 ersichtlich, war ein Klon (#28) fast vollständig segregiert (a), wenige Tage später aber war das Verhältnis von dem Original-Stamm *spsA*-Gen zu dem β -Galaktosidase Gen dann aber wieder umgekehrt (b). Offenbar konnten bis dato keine vollständig segregierten und stabilen Kulturen erhalten werden. Der Segregations-Prozess ist allerdings noch im Gange.

Aktivität A.T1.3 Selektion von Transformanten bezüglich ihrer PHB Produktion und PHB Reinigung aus der Biomasse

Coordinator: TU Wien.

Detailoutput A.T1.3.1 Bericht über das Auswahlverfahren der Transformanten im Labormaßstab.

Zum jetzigen Projektzeitpunkt sind keine Transformaten für die Metabolisierung von Laktose verfügbar (Aktivität A.T1.2)

Detailoutput A.T1.3.2 Standard Operating Procedure (SOP) zur Aufreinigung von PHB aus Cyanobakterien.

Die ionischen Flüssigkeiten (IL), EMIM Chlorid, EMIM Acetat & EMIM Diethylphosphat wurden für die Untersuchung ausgewählt weil diese hochkorrodierend sind, die Mikroalgen-Biomasse lösen können, sehr polar sind (PHB ist dadurch nicht löslich), über gute Löseeigenschaften verfügen und teilweise in Lage sind Esterbindungen zu spalten (hängt an der Basizität der jeweiligen Gruppen: Acetate > Diethylphosphate > Chloride; mit der Regel: je basischer desto mehr Esterbindungen werden gespalten).

Aufgrund der Vorergebnisse der ersten Experimente, wurde EMIM Diethylphosphat als das am Besten geeignete IL gewählt. Dabei wurde mit folgenden Parametern ein vollständiges Lösen der Biomasse observiert: 10 g IL lösen 1 g Biomasse vollständig auf.

PHB sollte sich aufgrund der hohen Polarität nicht lösen. Dementsprechend kann das IL-Biomasse Gemisch über Zentrifugation/ Filtration von dem resultierenden PHB abgehoben werden.

Allerdings ist die Viskosität des Biomasse-IL Gemischs sehr hoch, sodass das vollständige Separieren von dem ausfallenden PHB und der flüssigen Phase nicht möglich ist.

Man kann die ILs mit Wasser verdünnen (bis zu 5 % w/w), bevor die Lösekraft sinkt. Dies hängt an den freien Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren-Donoren von IL ab. Der Kosolvent darf keine Wasserstoffbrückenbindung mit IL eingehen! Es gibt allerdings Kosolvenzien welche die Viskosität von dem IL-Biomasse Gemisch senken könnten ohne dessen Löseeigenschaften zu verändern.

Kosolvenzien mit nicht verändernden Kamlett Taft Parameter wären:

- DMSO
- Acetonitril
- Gamma-Valerolacton
- Cyrene – Dihydrolevoglucosenon

Da Cyrene als nachhaltigste Chemikalie im Bereich dieser vorher genannten Kossolvenzien detektiert wurde, wurde die Chemikalie als die geeignete Methode gewählt um die Viskosität zu verringern.

Sobald die Viskosität verringert wurde gilt es zu testen ob 100% der gelösten Biomasse wiedergefunden werden kann, wenn man das Gemisch mit Wasser ausfällt. Nach Zugabe von Wasser konnte PHB von dem IL-Biomasse Gemisch wieder gut abgetrennt werden. Um den Reinheitsgehalt des ausgefallten Pellets weiter zu erhöhen wurden diverse Fällungs- und Waschreagenzien versucht:

- Erneuter Waschschrift des PHB Feststoffes mit reinem Methanol
- Erneuter Waschschrift des PHB Feststoffes mit reinem Aceton
- Erneuter Waschschrift des PHB Feststoffes mit reinem Cyrene
- Erneuter Waschschrift des PHB Feststoffes mit reinem IL
- Erneuter Waschschrift des PHB Feststoffes mit reinem Hexan
- Erneuter Waschschrift des PHB Feststoffes mit reinem Chloroform

Sobald diese Methode finalisiert wird, können wir im Zuge des Projekts Plastocyan auf eine grünere Extraktionsmethode von PHB im Vergleich zum aktuellen Extraktionsmethode (Chloroform-Extraktion) blicken, welche in weiterer Folge die Bioplastikproduktion weiter nach vorne bringen könnte.

Aktivität A.T1.4 Wissensaustausch und Verbesserung der Zusammenarbeit

Detailoutput A.T1.4.1 Bericht über den Mitarbeiteraustausch

Mitarbeiteraustausch 1

In der Zeit vom 21.11. bis 25.11.2021 nahm die Mitarbeiterin des Instituts für Mikrobiologie, Romana Beloš, an einem Mitarbeiteraustausch bei Projektpartner 3 (TU Wien) teil, um die Methodik zur Extraktion von Polyhydroxybutyrat (PHB) aus Cyanobakterien-Biomasse zu erlernen. Im Rahmen dieses Kurzpraktikums lernte R. Beloša die Analyse von PHB mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). HPLC wird verwendet, um Probenbestandteile zu trennen und ihre Anwesenheit und Konzentration zu bestimmen. Die Mitarbeiterin brachte Proben gefriergetrockneter Biomasse von, in Abwasser (aus der kommunalen Kläranlage in Třeboň) gewachsenen Cyanobakterien, mit. Untersucht wurden vor allem Proben nach unterschiedlichen Behandlungen des Abwassers (unsterilisiertes Abwasser, UV-Sterilisation und Hitzesterilisation im Vergleich zu BG-11-Wachstumsmedium) und Proben aus der Pilotkultur. Die TU Wien verfügt über moderne Geräte zur analytischen Bestimmung des Gehalts verschiedener Substanzen, wobei die Bestimmung des PHB-Gehalts eine der standardisierten Methoden ist. Die Doktoranden Ricarda Kriechbaum und Julian Kopp stellten Roman Beloša die Aufbereitung und Analyse der Proben im Detail vor. Vor der Analyse wurden die Proben mit Säuren (oder Basen) hydrolysiert, dann wurde PHB in Form von trans-Crotonsäure mittels HPLC nachgewiesen. Die anschließende Analyse und Vergleich der Werte mit dem Standard sowie die Berechnung der PHB-Konzentration erfolgten mit dem Analyseprogramm Chromeleon. Gleichzeitig halfen die Ergebnisse dieser Messungen die Aufbereitung des Substrats (Abwassers) aus der kommunalen Kläranlage vor der Verwendung zu optimieren (Tabelle 3). Ziel des Aufenthaltes war es, die Zusammenarbeit zu vertiefen, notwendige Analysen im Rahmen des Projektes durchzuführen und Know-how zur Bestimmung des PHB-Gehaltes mittels HPLC an den tschechischen Arbeitsplatz zu transferieren. Dieser Austauschaufenthalt kam dem tschechischen Partner bei der Einführung einer neuen Methodik am Arbeitsplatz zugute. Auf der Grundlage des Know-how-Transfers konnte der MBU-Arbeitsplatz anschließend die erforderliche Ausrüstung (PHB-Standard, Säule für HPLC) erwerben, so dass die Analysen weiterer Tests zur Optimierung der PHB-Produktion durch Cyanobakterien im Abwasser am MBU-Arbeitsplatz durchgeführt werden konnten. Die Methodik wurde erfolgreich am Institut für Mikrobiologie in Třeboň eingeführt.

Tab 3 PHB-Analyse von Proben des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt_a24, das Tage lang in Abwasser nach verschiedenen Behandlungen wuchs.

probe	PHB-Gehalt [% trockener Biomasse]
Wärmebehandlung	9.2
Unbehandelte Abwässer	5.8
UV-Behandlung	8.4
BG-11Medium	5.1



Mitarbeiteraustausch 2

Vom 2. bis 4. November 2022 war Tomáš Grivalský vom Institut für Mikrobiologie der Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik, Algatech Center (MBÚ), im Zuge eines Mitarbeiteraustausches in der Partnerorganisation der Fachhochschule Wels (FH OÖ). Während diesem kurzen Praktikum arbeitete er an der Untersuchung des Segregationsprozesses in Transformanten des *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt_a24 sowie an der Optimierung des Protokolls zur Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität in einem verbesserten Stamm, der Laktose verarbeiten kann. *Synechocystis* ist ein einzelliger Organismus mit mehreren Genomkopien pro Zelle. Nach der Transformation muss die Fremd-DNA durch einen homologen Rekombinationsprozess in alle Kopien des Genoms integriert werden, um die Stabilität der gewünschten Fremd-DNA zu gewährleisten. In bestimmten Fällen kann die DNA jedoch nicht in alle Kopien integriert sein. Die PCR bestimmt den Grad dieser Segregation und damit das Vorhandensein von Fremd-DNA. Durch diesen Personalaustausch beherrscht der Mitarbeiter die PCR-Methode zum Nachweis von Genen für die PHB-Überproduktion und er wird nun in der Lage sein, diese Methode am tschechischen Arbeitsplatz (MBÚ) anzuwenden. Dieses Verfahren muss vor der Kultivierung im Pilotmaßstab angewendet werden, um den Verlust der verbesserten Eigenschaften des transformierten Stammes zu vermeiden. Darüber hinaus arbeitete er mit einem Mitarbeiter des Projektpartners 2 - Kevin Trenzinger - an der Optimierung des Protokolls zur Messung der Beta-Galaktosidase-Aktivität in Transformanten, die Laktose als Substrat verwenden können. Dieses Protokoll ist für die Auswahl des am besten geeigneten Stammes für das Wachstum in Milchabwässern unerlässlich. Auf der Grundlage dieses Protokolls wurden Stämme gescreent, die zur Produktion von Beta-Galaktosidase fähig sind (Tabelle 4), und die ausgewählten Stämme wurden für weitere Tests an den tschechischen Arbeitsplatz gebracht. Kevin Trenzinger führte den MBÚ-Mitarbeiter durch den gesamten FH OÖ-Arbeitsplatz, der über viele moderne Laborgeräte mit gut etablierten Arbeitsabläufen verfügt. Dies kann sich positiv auf den Aufbau einer weiteren Zusammenarbeit auswirken. Ziel und Ergebnis dieses Praktikums waren die Vertiefung der Zusammenarbeit und der Transfer von Know-how zum Nachweis von Genen für die PHB-Überproduktion und die Laktoseverarbeitung mittels PCR-Protokoll.

Tab 4 Ermittlung der Fluoreszenz zur Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität in ausgewählten Transformanten von *Synechocystis* Mt_a24. Die Fluoreszenz wurde von Zellpellets sowie dem Überstand gemessen. Der UV-Mutant ohne β -galactosidase Gen diente als Kontrolle (Blindwert).

Dehnung / Fluoreszenzwerte	#56	#67	#75	#86	#79	#39	Mt_a24 (blank)
Pellet	13911	17559	109753	16221	72194	9984	261
Supernatant	303	434	697	418	560	392	338



Mitarbeiteraustausch 3

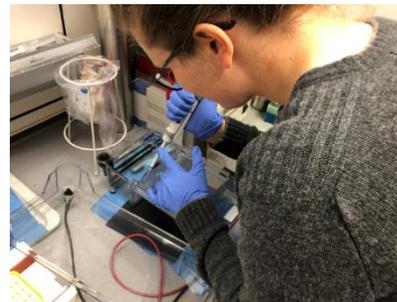
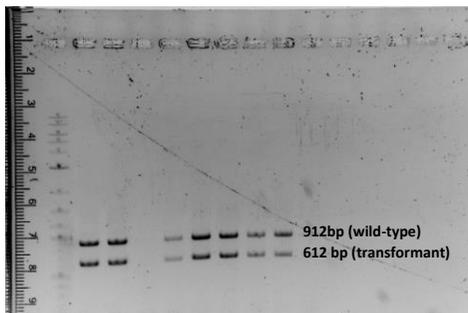
Ricarda Kriechbaum, von der Technischen Universität Wien (Arbeitsgruppe: Integrierte Bioprozessentwicklung), war drei Tage lang im Zuge eines Personalaustauschs des Interreg Projekts Plastocyan in der Partnerorganisation der Fachhochschule Wels (FH OÖ). Während dieses Austausches, wurde das Programm Snapgene besprochen, PCR-Ansätze mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt und der β -Galaktosidase Aktivitätsassay mit dem Experimentaldesign der TU Wien verglichen.

Workflow

1. Snapgene Einweisung + Detailbesprechung der Klonierungsstrategie + Codon Optimization in *Synechocystis* sp. PCC6714

Während dem Personalaustausch wurde der Segregationsprozess der Transformanten des *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt_a24 beobachtet und mittels PCR und Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. *Synechocystis* ist ein Organismus mit mehreren Genomkopien pro Zelle, daher muss nach der Transformation die eingeschleuste DNA durch einen homologen Rekombinationsprozess in alle Kopien des Genoms integriert werden. Das wird durch eine PCR Methode mit 3 verschiedenen Primern überprüft. Ricarda Kriechbaum wurde in das Programm Snapgene eingewiesen, mit dem an der FH OÖ Wels die Plasmide entworfen wurden. Sie beherrscht nun ebenfalls die PCR Methode mit der diese Segregation überprüft wurde und ist nun in der Lage diese am Arbeitsplatz TU Wien zu reproduzieren.

2. Screening PCR – Multiplex PCR (mit drei Primern)



3. β -Galaktosidase-Aktivitätstest unter Verwendung von Fluorescein Di- β -D-Galaktopyranosid (FDG)

Ziel: Comparison of the SOPs of TU Wien and FH OÖ

Die β -gal-Aktivitäten der Transformanten wurden mit der Aktivität des *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt_a24 verglichen und mittels Standardkalibrierungskurve quantifiziert. Diese Methode wurde mit der Methode der TU Wien verglichen und optimiert.

Regressionsgleichung auf Basis der Kalibrierungskurve zur Verknüpfung der gemessenen Fluoreszenzintensität (Absorption; y) mit der produzierten Menge an β -gal-Aktivität (x) [ng/mL]: $y = 14,57x + 291,76$

Tab 5 β -Galactosidase-Aktivitäten der untersuchten Transformanten. 7 Transformanten mit β -gal-Gen pilzlichen oder bakteriellen Ursprungs und Mt_a24 als Kontrolle. Die Absorption wurde in dreifacher Ausfertigung gemessen und β -gal wurde mit Hilfe einer Regressionsgleichung berechnet.

β -gal Wirt	Stamm	1. mes	2. mes	3. mes	Mittelwert \pm Abweichung	ng/mL
no BGAL	Mt 24	22,33	-9,67	-9,67	1,00 \pm 15,08	0
fungal	79	10,33	-6,67	-12,67	-3,00 \pm 9,74	0
fungal	86	-2,67	-8,67	-7,67	-6,33 \pm 2,62	0
fungal	75	-7,67	-8,67	-7,67	-8,00 \pm 0,47	0
bacterial	28	-7,67	-8,67	-10,67	-9,00 \pm 1,25	0
fungal	67	-8,67	-9,67	-7,67	-8,67 \pm 0,82	0
fungal	39	-7,67	-9,67	-7,67	-8,33 \pm 0,94	0
fungal	50	-11,67	-8,67	-9,67	-10,00 \pm 1,25	0

Die Stämme zeigten im Vergleich zu früheren keine β -Gal-Aktivitäten und müssen weiter überprüft und analysiert werden.

4. Open House FH Wels – project presentation with Roll-Up:

Am 11. November 2022 fand an der FH OÖ ein Tag der offenen Tür statt, um Studieninteressierten die verschiedenen Studienrichtungen, die an der FH Wels studiert werden können, vorzustellen. Kevin Trenzinger (FH OÖ) und Ricarda Kriechbaum (TU Wien) stellten den SchülerInnen das Projekt und das mögliche Tätigkeitsfeld nach dem Studium vor.



Mitarbeiteraustausch 4

Vom 28.11. bis 1.12. nimmt Kevin Trenzinger (FH OÖ) an einem Mitarbeiteraustausch in der Partnerorganisation Institut für Mikrobiologie der Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik, Algatech Center (MBÚ) in Trebon teil. Hierbei wird eine Kultivierung in einem 30 L Photobioreaktor (PBR) der Transformante KO glc #5 in Abwässern aus der Milchindustrie durchgeführt. Die Transformante basiert auf *Synechocystis* sp. PCC6714 Mt_a24, wobei ein Gen (*glcC* - Glucose-1-phosphate adenyltransferase) herunterreguliert wurde. Dies soll zu einer erhöhten Ausbeute von PHB führen. Aufgrund der Zugabe von Abwässern der Milchindustrie ändern sich diverse Parameter, wie der pH-Wert und die Nährstoff-Versorgung. Dementsprechend muss die Kultivierung angepasst werden. Durch die Kultivierung in diesem Pilotmaßstab können zusätzlich neue Erkenntnisse gewonnen und vor allem neue Methoden auch am Arbeitsplatz an der FH OÖ (Wels) angewendet werden. Dies ist wichtig, da hier bisher lediglich in kleinem Maßstab kultiviert wurde und durch die Hochskalierung sich neue Herausforderungen ergeben. Daher ist es sehr wichtig die Kultivierung und Probennahme während dieses Vorgangs an die neuen Gegebenheiten anzupassen. Durch den Aufenthalt in Trebon werden die Mitarbeiter in Wels auch Experimente im Pilotmaßstab durchzuführen und so zukünftige Projekte oder Kooperationen verbessern.

Der Status der Segregation dieser Transformante wird während des Mitarbeiteraustausches ebenfalls mittels PCR überprüft. Dies ist essenziell, da gewährleistet sein muss, dass die Gene weiterhin herunterreguliert sind. Dadurch kann auch die Methode in Trebon gefestigt und eventuelle Optimierungen durchgeführt werden.

Aktivität A.T1.5 Bilaterales Abschlussmeeting mit Endanwendern

Detailoutput A.T1.5.1 Bilaterales Abschlussmeeting mit Endanwendern

Ihre Anmerkungen



PARTNER UND KONTAKTINFORMATIONEN

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Centrum Algatech

Das Zentrum Algatech Třeboň ist eine Abteilung des Instituts für Mikrobiologie (MBU) und hat seit seiner Gründung im Jahr 1962 umfangreiche Erfahrungen in allen Bereichen der mikrobiellen Forschung gesammelt. Gegenwärtig ist es eine der kompetentesten Institutionen in der Region Südwestböhmen, die Forschung auf dem Gebiet der Mikroalgenkulturen betreibt. MBU verfügt über langjährige Erfahrungen in der Kultivierung verschiedener Stämme von Mikroalgen und Cyanobakterien, die für die Produktion von Biomasse und die Isolierung und Identifizierung bioaktiver Substanzen eingesetzt werden, sowie in der Entwicklung und Erprobung verschiedener Kultivierungseinheiten im Labor- und Pilotmaßstab. Verschiedene physiologische, biochemische und biophysikalische Techniken werden eingesetzt, um den Kultivierungsprozess zu optimieren. Im MBU wurden auch zahlreiche analytische Techniken entwickelt, um verschiedene in der Biomasse vorhandene Komponenten nachzuweisen.

Adresse: Novohradská 237, 379 01 Třeboň, Czech Republic

Web: www.alga.cz

Projektkoordinator für MBU: Tomáš Grivalský, grivalsky@alga.cz

Fachhochschule Oberösterreich Forschungs- und Entwicklungs GmbH, AG Biosciences

Die AG Biosciences steht in enger Zusammenarbeit mit dem Studiengang Bio- u. Umwelttechnik (FH OOE) und verfügt über ein gut ausgestattetes Molekularbiologielabor mit einer Vielzahl etablierter Methoden zur genetischen Veränderung von Cyanobakterien und Hefen. Ihr Schwerpunkt liegt auf der nachhaltigen Herstellung von Wertstoffen in verschiedenen Mikroorganismen: Nutzung von Abfallstoffen mit Hefen im Projekt IWB Combined Agro Forest Biorefinery, Biodiversität der Schneecalgen durch FWF geförderte Projekte und Etablierung von Cyanobakterien als nachhaltiges Produktionssystem. Viele Methoden der Gentechnik von Cyanobakterien konnten im INTERREG Projekt ATCZ15 sowie in einem FFG Projekt etabliert u. umfangreiches Wissen über deren Kultivierung und PHB Produktion gewonnen werden

Adresse: Roseggerstrasse 15, 4600 Wels, Austria

Web: www.fh-ooe.at/campus-wels

Projektkoordinator für FH OOE: Alexander Zwirzitz, alexander.zwirzitz@fh-wels.at

Technische Universität Wien - Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Integrierte Bioprozessentwicklung

Die Forschungsgruppe Integrierte Bioprozessentwicklung am Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften an der Fakultät Technische Chemie der TU Wien hat seit über 10 Jahren Erfahrung mit der Entwicklung von skalierbaren, mikrobiellen Bioprozessen.

In dieser AG werden mikrobielle Bioprozesse integriert entwickelt und optimiert, dh Stämme werden generiert, Bioreaktor-Kultivierungen im Maßstab 0,1–30 L designed und durchgeführt, unterschiedliche Produkte in aufwendigen Reinigungsschritten isoliert und gereinigt, und die Produkte charakterisiert und auf Anwendbarkeit getestet. Anschließend werden diese Prozesse in den Industriemaßstab transferiert. Seit 3 Jahren arbeitet diese AG auch mit Mikroalgen und Cyanobakterien und entwickelt neuartige Technologien, um diese kontrolliert zu kultivieren. Weiters werden Verfahren entwickelt, um wertgeschöpfte Produkte (zB. Carotenoide, Glycogen, Lipide) effizient aus Mikroalgen zu isolieren und zu charakterisieren.

Adresse: Getreidemarkt 9, 1060 Wien, Austria

Web: www.vt.tuwien.ac.at/biochemical_engineering/integrierte_bioprozessentwicklung/

Projektkoordinator für TU Wien: Oliver Spadiut, oliver.spadiut@tuwien.ac.at

SOUHRNNÉ INFORMACE

Název projektu

Produkce biologicky rozložitelného polymeru polyhydroxybutyrátu PHB ze sinic cestou kultivace v odpadních vodách.

Číslo projektu, zkratka

ATCZ260, PlastoCyan

Program

Program Interreg V-A Rakousko-Česká republika, Evropský fond pro regionální rozvoj

Prioritní osa

Životní prostředí a zdroje

Doba trvání projektu

01. 06. 2021 – 31. 12. 2022

Vedoucí partner

Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i.

Partneři projektu

- Fachhochschule Oberösterreich Forschungs- und Entwicklungs GmbH
- Technische Universität Wien - Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften

Álokované prostředky EFRR

€ 335 365.62

WEB:

https://www.at-cz.eu/cz/ibox/po-2-zivotni-prostredi-a-zdroje/atcz260_plastocyan
www.at-cz.eu/cz



BASIS INFORMATIONEN

Projektname

Herstellung von biologisch abbaubarem Polymer Polyhydroxybutyrat PHB aus Cyanobakterien durch Kultivierung in Abwasser.

Projektnummer, Akronym

ATCZ260/ PlastoCyan

Programm

Programm Interreg V-A Österreich – Tschechische Republik, Der Europäische Fonds für regionale Entwicklung

Prioritätsachse

Umwelt und Ressourcen

Projektdauer

01. 06. 2021 – 31. 12. 2022

Lead Partner

Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i.

Projektpartner

- Fachhochschule Oberösterreich Forschungs- und Entwicklungs GmbH
- Technische Universität Wien - Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften

Genehmigte EFRE-Mittel

€ 335 365.62

WEB:

https://www.at-cz.eu/cz/ibox/po-2-zivotni-prostredi-a-zdroje/atcz260_plastocyan
www.at-cz.eu/cz



BASIC INFORMATION

Project name

Production of the biodegradable polymer polyhydroxybutyrate PHB from cyanobacteria via wastewater cultivation.

Project number/Acronym

ATCZ260/PlastoCyan

Program

Interreg V-A program Austria-Czech Republic, European Regional Development Fund

Priority axis

Life environment and sources

Project duration

01. 06. 2021 – 31. 12. 2022

Lead partner

Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences

Project partners

- University of Applied Sciences Upper Austria
- Vienna University of Technology - Institute for Process Engineering, Environmental Engineering and Technical Biosciences

Budget from ERDF

€ 335 365.62

WEB:

https://www.at-cz.eu/cz/ibox/po-2-zivotni-prostredi-a-zdroje/atcz260_plastocyan
www.at-cz.eu/cz

