

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 50413/2012 (51) Int. Cl.: C12P 7/06 (2006.01)
(22) Anmeldetag: 27.09.2012
(43) Veröffentlicht am: 15.04.2014

(56) Entgegenhaltungen: ES 2019169 A6 CN 102618471 A JP H07132096 A Applied Microbiology and	(71) Patentanmelder: TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN 1040 WIEN (AT)
	(72) Erfinder: Herwig Christoph 1130 Wien (AT) Lorantfy Bettina 1070 Wien (AT) Martinz Porqueras Ester 1090 Wien (AT)
	(74) Vertreter: Redl Gerda Dr. 1220 Wien (AT)

(54) **Einsatz halophiler Mikroorganismen für die Produktion von Wertstoffen**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Wertstoffen aus einem hypersalinen Fermentationsmedium, welches beispielsweise als Abwasserstrom nach der Biowasserstoffproduktion anfällt, wobei in diesem hypersalinen Fermentationsmedium halophile Mikroorganismen kultiviert werden.

Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Wertstoffen aus einem hypersalinen Fermentationsmedium, welches beispielsweise als Abwasserstrom nach 5 der Biowasserstoffproduktion anfällt, wobei in diesem hypersalinen Fermentationsmedium halophile Mikroorganismen kultiviert werden.

EINSATZ HALOPHILER MIKROORGANISMEN FÜR DIE PRODUKTION VON WERTSTOFFEN

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Wertstoffen aus einem
5 hypersalinen Fermentationsmedium, welches beispielsweise aus einem Abwasserstrom nach der Biowasserstoffproduktion erzeugt wird, wobei in diesem hypersalinen Fermentationsmedium halophile Mikroorganismen kultiviert werden.

TECHNOLOGISCHER HINTERGRUND

10 Alternative Energien haben den Vorteil, dass bei ihrer Verwendung keine schädlichen Treibhausgase (THG) entstehen. Wasserstoff (H_2) ist ein gutes Beispiel, da bei seinem Einsatz in Verbrennungsmotoren Wasser als einziges oxidatives Nebenprodukt entsteht [1]. Verschiedenste Kohlenstoffquellen (Xylose, Glucose, Sucrose, etc.) kommen bei der Produktion von Biowasserstoff zum Einsatz, die durch
15 bestimmte Mikroorganismen mittels verschiedener Stoffwechselwege in Wasserstoff umgewandelt werden. Bekannte Verfahren zur H_2 -Produktion sind beispielsweise Biophotolyse, Dunkelfermentation und Photofermentation [2-4].

Im Labor werden bei Dunkelfermentationsverfahren strikt anaerobe, extrem thermophile Bakterien, beispielsweise *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (C.s) zu
20 diesem Zweck verwendet. *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* kann beispielsweise eine Vielzahl von Kohlenhydraten, unter anderem Xylose, in Kohlendioxid, Wasserstoff, Acetat, Lactat und Ethanol abbauen [5, 6]. Letztere verbleiben in der Fermentationsbrühe.

Diese Herstellungsverfahren wurden weiter optimiert, um die Ausbeute bei der
25 Biowasserstoffherstellung zu erhöhen. So wurden diese Fermentationsbrühen aufgrund ihrer immer noch hohen verfügbaren Restenergie für zweistufige Fermentationsprozesse verwendet. Dabei wird zuerst eine Dunkelfermentation mit anaeroben Bakterien und danach eine Photofermentation mit photosynthetischen Bakterien durchgeführt [7, 8]. Alternativ kann die Dunkelfermentation zur Herstellung
30 von Biowasserstoff auch mit einem Verfahren zur Herstellung von Methan gekoppelt werden [9, 10].

Folgende Anwendungen von halophilen Bakterien sind in der Literatur beschrieben:

- Abwasserbehandlung von hypersalinen Abwasserströmen enthaltend unterschiedliche organische Kohlenstoffquellen [15-20].
 - Produktion von Carotinoiden [21, 22].
 - Herstellung von Biokunststoffmaterialien wie PHAs, PHBs, PHBV [23, 24].
- 5 - Heterologe Überexpression [25, 26].

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Bei diesen literaturbekannten Verfahren verbleibt eine Vielzahl von wertvollen Metaboliten in der Abwasserstrom-Fermentationsbrühe. Diese Fermentationsbrühe kann für die Kultivierung von halophilen Archaeabakterien eingesetzt werden, wobei halophile Archaeabakterien aus diesen Metaboliten Biomasse und/oder andere Wertstoffe produzieren können.

Die Erfindung umfasst somit ein Verfahren zur Gewinnung von Wertstoffen aus einem hypersalinen Fermentationsmedium umfassend folgende Schritte:

- 15 a. Bereitstellen eines Abwasserstroms;
- b. gegebenenfalls Hinzufügen von NaCl zum Abwasserstrom um ein hypersalines Fermentationsmedium zu erhalten;
- c. Kultivieren von halophilen und/oder haloalkaliphilen Mikroorganismen in dem hypersalinen Fermentationsmedium;
- 20 d. Aufreinigen der Wertstoffe aus dem Fermentationsmedium.

Salzhaltige Abwässer fallen bei vielen Produktionsprozessen an, z.B. Abwässer aus der lebensmittelverarbeitenden Industrie (Gelatineherstellung, Pökeleien, Konserven, Fischverarbeitung, eingekochte Früchte oder Gemüse), Abwässer aus der Lederverarbeitung, Abwässer aus der Rohölförderung/-verarbeitung,

- 25 Deponiesickerwässer oder bei Verwendung von Meerwasser zur Toilettenspülung.

Saline Abwässer haben einen Salzgehalt bis 3,5 % (ähnlich wie Meerwasser). Als hypersalin werden Abwässer bezeichnet, die mehr als 3,5 % Salz enthalten. Die oben genannten Abwässer weisen neben dem hohen Salzgehalt auch eine große organische Fracht und einen hohen Nährstoffgehalt auf.

- 30 Ein Aspekt der Erfindung betrifft somit das oben beschriebene Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass der Abwasserstrom aus erneuerbaren Energieprozessen, industriellen Laugeströmen oder industriellen und/oder landwirtschaftlichen Abwasserströmen stammt, welcher aber zunächst nicht hypersalin sein muss.

Um ein optimales Wachstum der halophilen Mikroorganismen zu gewährleisten, kann es notwendig sein, zu diesen Abwasserströmen zusätzliche Medienkomponenten und/oder Kohlenstoffquellen hinzuzufügen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die oben beschriebenen Verfahren,

- 5 dadurch gekennzeichnet, dass weitere Medienkomponenten und gegebenenfalls eine weitere Kohlenstoffquelle zugesetzt werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist das oben beschriebene Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass als weitere Kohlenstoffquelle ein Kohlenhydrat zugesetzt wird.

- 10 Als hypersaline Lösungen sind Lösungen mit einem Salzgehalt von mindestens 4 % (w/v) anzusehen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind daher die oben beschriebenen Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt an NaCl in dem hypersalinen Fermentationsmedium 4 – 30 % (w/v), vorzugsweise 10 – 25 % (w/v), besonders 15 bevorzugt 20 – 25 % (w/v) beträgt.

Halophile Archaea und Bakterien können aus verschiedenen natürlichen Habitaten isoliert werden. Die Salzkonzentration liegt in diesen Habitaten mit 3,5% NaCl höher, als die des Meerwassers.

- Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind die oben beschriebenen Verfahren, 20 dadurch gekennzeichnet, dass die halophilen und/oder haloalkaliphilen Mikroorganismen ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Haladaptatus (Hap.), Halalkalicoccus (Hac.), Haloarcula (Har.), Halobacterium (Hbt.), Halobaculum (Hbl.), Halobiforma (Hbf.), Halococcus (Hcc.), Haloferax (Hfx.), Halogeometricum (Hgm.), Halogramnum (Hgn.), Halonotius (Hns.), Halopiger (Hpg.), Haloplanus (Hpn.), 25 Haloquadratum (Hqr.), Halorhabdus (Hrd.), Halorubrum (Hrr.), Halosimplex (Hsx.) Halostagnicola (Hst.), Haloterrigena (Htg.), Halovivax (Hvx.), Natrialba (Nab.), Natrinema (Nnm.), Natronoarchaeum (Nac.), Natronobacterium (Nbt.), Natronococcus (Ncc.), Natronolimnobiust (Nln.), Natronomonas (Nmn.) and Natronorubrum (Nrr.).

- Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind die oben beschriebenen Verfahren, 30 dadurch gekennzeichnet, dass der halophile Mikroorganismus Haloferax (Hfx.) ist.

Literaturbekannt ist beispielsweise die Produktion von Carotinoiden, die Gewinnung von Biokunststoffmaterialien wie PHAs, PHBs, PHBV und die heterologe

Expression von rekombinanten Produkten (Polypeptiden oder Proteinen) durch halophile Bakterien.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind daher die oben beschriebenen Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass der Wertstoff ein Carotinoid, Bioplastik oder 5 ein rekombinantes Produkt ist.

Aufgrund des hohen Salzgehaltes ist die Gefahr einer Kontamination während der Kultivierung der halophilen Bakterien sehr gering.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind daher die oben beschriebenen Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass diese Verfahren unter unsterilen Bedingungen 10 durchgeführt werden.

Zur Gewinnung des Wertstoffes werden die optional abgetrennten und aufkonzentrierten halophilen Bakterien in vorteilhafter Weise durch Zugabe von Wasser lysiert, wodurch der Wertstoff im Fermentationsmedium vorliegt und auf herkömmliche Weise gewonnen werden kann.

15 Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind die oben beschriebenen Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass das zum Aufreinigen des Wertstoffes das hypersaline Fermentationsmedium mit Wasser verdünnt und der Wertstoffe aus der Zelle extrahiert wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist das oben beschriebene Verfahren, 20 dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren in einem korrosionsbeständigen Bioreaktor, vorzugsweise in einem Reaktor aus Glas und/oder Polymer, durchgeführt wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Wertstoff erhältlich durch ein oben beschriebenes Verfahren.

25 Als Wertstoffe können beispielsweise Carotinoide, Biokunststoff aber auch spezielle rekombinante Produkte, die in hohen Salzkonzentrationen exprimiert werden können und, die von den halophilen Mikroorganismen hergestellt werden [25,26].

Carotinoide bilden eine Gruppe von Farbpigmenten mit gelber bis roter Farbtonnuance, die in der Natur weit verbreitet vorkommen und vielen Nahrungsmitteln ihre 30 charakteristische Färbung verleihen. Das bekannteste und am häufigsten vorkommende Carotinoid ist das β-Carotin, das auch als Provitamin A bekannt ist. Etwa 50 Carotinoide zeigen diese Wirkung, das heißt, sie werden im menschlichen Körper in Retinol umgesetzt. Carotinoide werden unter anderem als Zusatzstoff zur Färbung von

Lebensmittelzubereitungen, insbesondere von Getränkezubereitungen, als Mittel für die Herstellung pharmazeutischer und kosmetischer Zubereitungen sowie für die Herstellung von Nahrungsergänzungspräparaten im Human- und Tierbereich verwendet.

Als Biokunststoffe werden Kunststoffe bezeichnet, die vollständig oder teilweise

- 5 auf nachwachsenden Rohstoffen basieren, vollständig oder teilweise abbaubar sind oder eine Kombination aus beiden Kriterien darstellen.

Wichtige nachwachsende Rohstoffe, die für die Herstellung von Biokunststoffen in Frage kommen, sind unter anderem Stärke beziehungsweise Zucker. Es erfolgt eine Umwandlung von Zucker oder Stärke mit Hilfe von Milchsäurebakterien zu

- 10 Polylactiden (PLA). Fettsäuren, wie beispielsweise Polyhydroxyalkanoate (PHA), Polyhydroxybutensäure (PHB) oder Poly- β -hydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) werden gleichfalls durch Fermentation von zucker- oder stärkehaltigen Produkten gewonnen.

Halophile Mikroorganismen sind derart an hohe Salzkonzentrationen angepasst,

- 15 dass sie ihr Wachstum einstellen oder sterben oder lysieren, wenn der Salzgehalt unter eine bestimmte Schwelle sinkt. Je nach Grad der Anpassung unterscheidet man schwach, moderat oder extrem halophile Mikroorganismen.

Extrem halophile Archaea, wie beispielsweise Haloferax mediterranei (HFX)

weisen eine Reihe von neuen, molekularen Charakteristika auf, so zum Beispiel

- 20 Enzyme deren Funktionalität bei abnehmender Salzkonzentration verloren geht. Diese Eigenschaften und die Kapazität für großtechnische Kultivierung machen halophile Mikroorganismen potenziell wertvoll für die Biotechnologie [11, 12]. Aufgrund der hohen Salzkonzentration können diese Prozesse unter unsterilen Bedingungen durchgeführt werden. Weiter können beispielsweise die Zellen der Mikroorganismen einfach 25 durch die Zugabe von Wasser platzen und der in ihnen enthaltene Wertstoff effektiv freigesetzt werden. Dies ist wiederum ein großer Vorteil bei der großtechnischen Umsetzung.

Einige der halophilen Mikroorganismen können auf einfachen Kohlenstoff-

quellen wachsen, insbesondere auf kleinen organischen Verbindungen, wie

- 30 beispielsweise Carbonsäuren und/oder Aminosäuren sowie auf bestimmten Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Glycerin. Die Bedeutung von Glycerin im Kohlenstoffzyklus in hypersalinen Umgebungen kommt daher, dass Glycerin von halophilen Bakterien teilweise in organische Säuren umgewandelt wird (Acetat, D-

Laktat und Pyruvat) und daher Acetat, Laktat usw. auch von den Zellen als C-Quelle [13, 14] verwertet werden können.

Kurze Beschreibung der Figuren

5 Figur 1 zeigt den Verlauf der optischen Dichte und den Kohlenstoffverbrauch für Batch I

Figur 2a zeigt den Verlauf des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdrucks für Batch I

Figur 2b zeigt die Abgaswerte für Sauerstoff und Kohlendioxid für Batch I

10 Figur 3 zeigt den Verlauf der optischen Dichte und den Kohlenstoffverbrauch für Batch II

Figur 4a zeigt den Verlauf des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdrucks für Batch II

Figur 4b zeigt die Abgaswerte für Sauerstoff und Kohlendioxid für Batch II

15

Materialien und Methoden

Medienzusammensetzung

Quantitativer Vergleich zweier Medienzusammensetzungen für Halophile im Hinblick auf deren Kultivierung in einer Fermentationsbrühe (Tabelle 1), welche bei der 20 Biowasserstoffproduktion anfällt.

Tabelle 1: Medienzusammensetzungen für halophile Mikroorganismen und für die Biowasserstoffproduktion

HALOMEDIUM 2020 [27, 28]		Biohydrogen MEDIUM ZEIDAN 2009 [29, 30]	
mit folgenden Änderungen:	davon nur 20% Phosphat 20% Sulfat 20% Magnesium-Gehalt im Medium	Der geringe Magnesium- und Ammonium-Gehalt im Medium ist möglicherweise für halophile Bakterien nicht ausreichend	
Komponente	g/L	Komponente	g/L
Glycerin	10	Xylose	5
NH ₄ Cl	2	NH ₄ Cl	0,9
KH ₂ PO ₄	0,06	MgCl·6H ₂ O	0,85
FeCl ₃	0,005	KH ₂ PO ₄	0,75

NaCl	194	K ₂ HPO ₄	1,5
MgCl·6H ₂ O	3,2	Hefeextrakt	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,8	Cystein-HCl·H ₂ O	1
CaCl ₂ ·6H ₂ O	1		
KCl	5		
NaHCO ₃	0,2		
KBr	0,5		
+1 mL Spurenelemente-Lösung auf 1L mit destilliertes Wasser aufgefüllt; pH 7,2		+1 mL Spurenelemente-Lösung + 1 mL Vitaminlösung auf 1L mit destilliertes Wasser aufgefüllt; pH 6,5	

Die wichtigsten anorganischen Komponenten (beispielsweise NH₄Cl, MgCl₂ und KH₂PO₄) sind in beiden Medien vorhanden (Tabelle 1). Es fehlt jedoch NaCl, welches von essentieller Bedeutung für die Kultivierung von halophilen Bakterien ist. Die

- 5 geringen Mengen an Magnesium und Ammonium können möglicherweise für die Kultivierung von halophilen Bakterien nicht ausreichend sein. Die pH-Werte sind ebenfalls ähnlich. Aus praktischen Gründen ist das Einstellen des pH-Wertes mit 1 M NaOH vorzuziehen.

Um die möglicherweise vorhandenen Metaboliten zu identifizieren und zu quantifizieren wurde die Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoff-Produktion mit einem Standard-HPLC-Methode analysiert und die typischerweise vorhandenen kleinen Metaboliten, wie Zucker, Alkoholen und Säuren, quantifiziert:

- Agilent 1100 Series HPLC
- Säule: SUPELCOGEL C-610H (Sigma, 9 µm Teilchengröße, 300x 15 7.8mm)
- Säulentemperatur: 30 °C
- Vorsäule: SUPELCOGEL H Guard column (Sigma, 9 µm Teilchengröße 20 50x 4,6mm)
- Elutionsmittel: 0.1% H₃PO₄ in destilliertem Wasser (Spuren von NaN₃); 0.5mL/min
- Detektor: RI

Mittels quantitativer HPLC-Messungen wurden die wichtigsten möglichen Kohlenstoffquellen für Halophile in der Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion ermittelt:

- Xylose (Substratzufuhr)
- 5 • Laktat (Metabolit)
- Acetat (Hauptmetabolit)
- Ethanol (Metabolit)

Bei der Analyse der Fermentationsbrühe aus der Kultivierung von Halophilen können aufgrund der hohen Salzkonzentration in diesen halophilen Proben die 10 anorganischen Peaks in den Chromatogrammen sehr groß sein und die Quantifizierung erschweren. Die Quantifizierung war daher im Allgemeinen und insbesondere im Fall von Xylose nicht einfach, da die Retentionszeit von Xylose etwa im Bereich der Retentionszeit der großen anorganischen Peaks liegt.

Kultivierung im Schüttelkolben:

15 Allgemeines Verfahren für die Kultivierung im Schüttelkolben:

- 500 mL Erlenmeyer Schüttelkolben wurden vorsterilisiert um mögliche Kontaminationen zu vermeiden.

20 • Das Halomedium wurde wie folgt hergestellt. Zu einer Abwasserstrom-Fermentationsbrühe (aus der Herstellung von Biowasserstoff), welche unterschiedlichen Kohlenstoffquellen enthält, wurden optional zusätzliche Komponenten unter unsterilen Bedingungen zugegeben. Je 100 mL dieses Mediums wurden für die Schüttelkolben Experimente verwendet.

25 • Das Inokulum der halophilen Bakterien (HFX) war zuvor unter sterilen Bedingungen im Schüttelkolben hergestellt worden. 10 mL davon wurden für diese Schüttelkolbenexperiment verwendet.

• Inkubationsbedingungen: 37 °C und 160 rpm im Multitron Standard (INFORS HT, CH-Bottmingen).

• pH-Wert und die optische Dichte der Proben wurde in bestimmten Abständen gemessen um das Wachstum zu kontrollieren.

30 Kultivierung im Schüttelkolben mit verschiedenen Substraten

Zuerst wurde das Wachstum der halophilen Bakterien auf verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht, die bereits in der Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion vorkommen. Dazu wurde HFX im Schüttelkolben auf

Halomedium 202020 kultiviert, wobei zum Halomedium 202020 anstelle von Glycerin als Kohlenstoffquelle folgende unterschiedliche Kohlenstoffe zugesetzt wurden:

- Acetat
- Ethanol
- 5 • Laktat
- Xylose

Kultivierung im Schüttelkolben unter Verwendung einer Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion

Da die Kultivierung der halophilen Bakterien mit Halomedium 202020 und unterschiedlichen Kohlenstoffquellen erfolgreich war, wurde HFX im Schüttelkolben unter Verwendung einer Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion kultiviert. Folgende zusätzliche Komponenten wurden zu der Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion hinzugefügt:

15 Tabelle 2: Zusätzliche Komponenten im Halomedium 202020

g/L	Komponente
200	NaCl
1 mL	Spurenelemente
1	CaCl ₂ ·6H ₂ O
5	KCl
0,2	NaHCO ₃
0,5	KBr

Kultivierung im Bioreaktor

Batch I: Unter Verwendung eines angepassten Mediums

Nach den erfolgreichen Schüttelkolbenexperimenten mit der Abwaserstrom-

20 Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion wurde die Machbarkeit der Kultivierung von halophilen Bakterien im Bioreaktor untersucht. Aufgrund der hohen Salzkonzentration, die bei der Kultivierung von extrem halophilen Bakterien erforderlich ist, sind spezielle Systeme notwendig, die es erlauben, reproduzierbare Kultivierung und quantitative Bioprozessentwicklung unter korrosionsbeständigen Umständen durchzuführen. Besonders geeignet für die Kultivierung von extrem halophilen Bakterien sind Bioreaktoren, die aus korrosionsbeständigen Teilen wie Borosilikatglas oder PEEK Polymer bestehen, wie beispielsweise Labfors PEEK

Bioreaktor (INFORS HT, CH-Bottmingen). Für die Zusammensetzung des Mediums wurden die gleichen zusätzlichen Komponenten zu der Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion zugegeben wie im Schüttelkolbenexperiment (siehe Tabelle 2).

5 Kultivierungsparameter im Bioreaktor:

- Luftzufuhr: 0,4 NL/min
- Temperatur: 38 °C
- Agitation: 400rpm
- pH: 7,2

10 Batch II: Verwendung der Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion, wobei einzig NaCl zugesetzt wurde.

Es wurden Batchversuchen im Bioreaktor durchgeführt, wobei zu der Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion 200g/L NaCl zugesetzt wurden um den Anforderungen der extrem halophilen Bakterien zu

15 entsprechen. Die Kultivierung im Bioreaktor wurde mit den gleichen Parametern wie im vorherigen Experiment durchgeführt.

Wachstum auf Acetat

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der Schüttelkolbenexperimente auf Acetat als Kohlenstoffquelle. Trotz der Einschränkungen, die in Schüttelkolben aufgrund des 20 Fehlens von Belüftung und Bewegung und der zunehmenden optischen Dichte (OD) auftreten, war HFX in der Lage, Acetat, welches als einzige Kohlenstoffquelle im Halomedium 202020 vorhanden war, als Energiequelle zu verwenden. Da Acetat der Hauptmetabolit bei der Biowasserstoffproduktion ist, ist dieses in ausreichender Menge in der Abwasserstrom-Fermentationsbrühe vorhanden. Die Verwendung von 25 Acetat als einzige Kohlenstoffquelle wurde im Schüttelkolbenexperiment bereits gezeigt. Wenn HFX Acetat als Kohlenstoffquelle nutzt steigt der pH-Wert mit der Zeit der Kultivierung an.

Tabelle 3: Zusammenfassung des Schüttelkolbenexperiments mit Acetat

10 g/L Acetat					
Tag	Kontrolle OD600	HFX OD600	Kontrolle pH	HFX pH	Kohlenstoffquelle Restgehalt %
0	0,008	0,346	7,201	7,201	100

10 g/L Acetat					
Tag	Kontrolle OD600	HFX OD600	Kontrolle pH	HFX pH	Kohlenstoffquelle Restgehalt %
5	0,033	1,143	7,009	8,117	88,5
10	0,012	1,1175	6,571	7,765	85,6

Wachstum auf Ethanol

Tabelle 4 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der Schüttelkolbenexperimente mit Ethanol. HFX war in der Lage Ethanol als einzige C-Quelle im Halomedium 2020 zu verwerten.

Tabelle 4: Zusammenfassung des Schüttelkolbenexperiments mit Ethanol

5g/L Ethanol					
Tag	Kontrolle OD600	HFX OD600	Kontrolle pH	HFX pH	Kohlenstoffquelle Restgehalt %
0	0,022	0,2215	7,265	7,265	100
5	0,035	0,2965	7,126	7,499	42,3
10	0,026	0,3725	6,208	7,46	13,5

Wachstum auf Laktat

Tabelle 5 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der Schüttelkolbenexperimente mit Laktat. HFX ist auch in der Lage Laktat als einzige C-Quelle im Halomedium 2020 zu verwenden. Wie aus Tabelle 3, Tabelle 4 und auch aus Tabelle 5 ersichtlich ist, steigt der pH Wert in den Schüttelkolben während des Wachstums von halophilen Bakterien auf den Kohlenstoffquellen Acetat, Ethanol und Laktat unterschiedlich an. Daher sind Änderungen in den pH-Werten während des Wachstums abhängig von der C-Quelle, die für den Mikroorganismus zur Verfügung steht.

Tabelle 5: Zusammenfassung des Schüttelkolbenexperiments mit Laktat

10 g/L Laktat					
Tag	Kontrolle OD600	HFX OD600	Kontrolle pH	HFX pH	Kohlenstoffquelle Restgehalt %
0	0,012	0,3605	7,206	7,206	100

10 g/L Laktat					
Tag	Kontrolle OD600	HFX OD600	Kontrolle pH	HFX pH	Kohlenstoffquelle Restgehalt %
5	0,106	3,45	6,942	7,369	33
10	0,052	4,425	6,195	7,39	31,3

Wachstum auf Xylose

Tabelle 6 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der Schüttelkolbenexperimente mit Xylose. Obwohl die Änderungen in der OD nur gering sind, zeigen die HPLC Daten das Xylose durch HFX in geringen Mengen verwertet werden kann.

Tabelle 6: Zusammenfassung des Schüttelkolbenexperiments mit Xylose.

5 g/L Xylose					
Tag	Kontrolle OD600	HFX OD600	Kontrolle pH	HFX pH	Kohlenstoffquelle Restgehalt %
0	0,007	0,253	7,225	7,225	100
5	0,024	0,2605	7,085	7,349	96,8
10	0,009	0,206	6,236	6,4955	87,8

Schüttelkolbenexperiment unter Verwendung einer Fermentationsbrühe aus der10 Biowasserstoffherstellung

Tabelle 7 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der Schüttelkolbenexperimente mit der Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion und die Quantifizierung des Acetatverbrauchs. Da Acetat der Hauptmetabolit in der Fermentationsbrühe ist, wurde Acetat gewählt, um zu zeigen, dass Acetat als Kohlenstoffquelle von halophilen Bakterien verwertet werden kann. Die zunehmenden OD-Werte über die Zeit zeigen, dass mit der Zugabe von einigen weiteren Komponenten zum Halomedium 202020, wie in Tabelle 2 beschrieben, HFX auf der Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion wachsen kann.

20

Tabelle 7: Zusammenfassung des Schüttelkolbenexperiments mit der Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion

Nach der Ernte					
Tag	Kontrolle OD600	HFX OD600	Kontrolle pH	HFX pH	Kohlenstoffquelle Restgehalt %
0	0,271	0,644	7,189	7,189	100
5	0,749	2,139	7,048	8,33	51,9
10	0,905	1,757	6,785	8,185	44,2

Batch-Experimente unter Verwendung einer Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion im Bioreaktor

Batch 1: Adaptiertes Medium

- 5 Hier wurde die Machbarkeit des Wachstums von halophilen Bakterien im Bioreaktor unter Verwendung einer Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion gezeigt. Dazu wurden folgende Parameter während des Bioprozesses überwacht
- offline HPLC: Verbrauch verschiedener Metabolite in der
- 10 Fermentationsbrühe durch die halophilen Bakterien
- offline: Optische Dichte (600nm) Werte, die mit dem Biomassewachstum korrelieren
 - Online Prozessdaten: pH und pO₂ Werte
 - Abgasdaten: O₂ und CO₂
- 15 Figur 1 zeigt die offline Daten aus Batch I Fermentation. Es ist ersichtlich, dass die optische Dichte der Proben über die Zeit zunimmt, dies entspricht dem Anstieg des Wachstums. Die abnehmenden Peakflächen von Acetat, Laktat und Ethanol, zeigen, dass diese Kohlenstoffquellen durch HFX während des Bioprozesses aufgenommen werden.
- 20 In Figur 2 sind die pH-Wert und die pO₂-Kurven dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die pO₂-Werte nehmen ab während die OD-Werten parallel dazu zunehmen bis ca. 40 h Prozesszeit, wie die Länge des exponentiellen Wachstums zeigt. Wie in den Schüttelkolbenexperimenten gezeigt wurde, steigen die pH Werte während der Wachstumsphase der halophilen Bakterien unter Verwendung von
- 25 verschiedenen Kohlenstoffquellen unterschiedlich an. Wenn Acetat als Kohlenstoffquelle verwendet wurde, stieg der pH-Werte stark an, während bei Laktat der pH-Wert nur leicht anstieg. Aufgrund der pH-Wert Änderung kann daher auf die unterschiedliche Substrataufnahme im Bioreaktor geschlossen werden. Die Steuerung des pH-

Werts kann daher für eine strategische Prozessplanung sehr nützlich sein. Die zunehmende CO₂-Produktion in Figur 3 ist ebenfalls ein Zeichen der mikrobiellen Aktivität im Bioreaktor und kann darüber hinaus mit den OD- und pO₂ Werten korreliert werden.

5

Batch II: Zugabe von Salz

Durch Zugabe von zusätzlichen Komponenten zum Medium konnte das Wachstum von HFX in Batch I gezeigt werden. Im Batch II Experiment wurden einzig 10 200 g/L NaCl zur Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion zugegeben, keine zusätzlichen Komponenten. Ähnlich wie bei Batch I wurden folgende Analysen durchgeführt:

- Offline HPLC: Verbrauch verschiedener Metabolite in der Fermentationsbrühe durch die halophilen Bakterien
- Offline: Optische Dichte (600nm) Werte, die mit dem Biomassewachstum 15 korrelieren
- Abgasdaten: O₂ und CO₂

Durch einen Vergleich der optischen Dichten der Proben aus Batch I (Figur 1) und Batch II (Figur 4) konnte ein langsameres Wachstum im Fall von Batch II festgestellt werden. Dies bedeutet eine längere Wachstumsphase und eine geringere 20 Wachstumsrate in Batch II. Die Medien wiesen in beiden Prozessen die gleiche Kohlenstoffquelle auf, jedoch wurden in Batch I weitere zusätzliche Komponenten zugesetzt. Daher kann dieses Phänomen so interpretiert werden, dass nicht die Kohlenstoffquelle der limitierende Faktor während der Wachstumsphase in dem Bioreaktor ist, sondern möglicherweise andere Komponenten, die in unzureichender 25 Menge vorhanden waren. Jedoch konnte auch unter diesen Mangelbedingungen Wachstum gezeigt werden, da die Kohlenstoffquelle verbraucht wurde.

Figur 5 und 6 zeigen, dass auch im Bioreaktor Aktivität zu sehen ist. Die pH-Kurve zeigt, dass in diesem Fall die Kohlenstoffquelle anders als in Batch I verbraucht wurde. Diese Annahme wird auch durch die Unterschiede zwischen den Offline HPLC-Daten der Substrataufnahme aus Figur 1 und 4 unterstützt. Im Falle von Batch I wurde 30 Ethanol erst nach Acetat und Laktat verwertet, während in der Batch II Ethanol parallel mit Laktat von Beginn an verwertet wurde, wobei die Acetat Aufnahme in diesem

Prozessablauf erst nach 50 h erfolgte. Die pH-Änderungen in Figur 5 zeigen auch, dass Acetat erst nach 50 h verwertet wurde.

Fasst man die Ergebnisse der durchgeföhrten Experimente mit halophilen Bakterien auf der Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion zusammen, so kann daraus gefolgert werden:

- Halophile Bakterien können auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Xylose, Ethanol, Lactat und Acetat wachsen. Diese Kohlenstoffquellen finden sich beispielweise in den Abwasserstrom-Fermentationsbrühen nach der Biowasserstoffproduktion.

10 • Überraschenderweise wurde gefunden, dass halophile Mikroorganismen in einer Abwasserstrom-Fermentationsbrühe aus der Biowasserstoffproduktion kultiviert werden können, wobei zu dieser Abwasser-Fermentationsbrühe einzig NaCl und nur optional weitere zusätzliche Komponenten zugegeben werden müssen.

15 • Die Kopplung von Biowasserstoffproduktion mit anschließender Kultivierung von halophilen Bakterien in der als Abwasser anfallenden Fermentationsbrühe eröffnet neue Ansätze für die Herstellung von erneuerbaren Produkten, wie beispielsweise die Produktion von komplexen Produkten wie Carotinoiden, Biokunststoffen oder auch rekombinanten Produkten durch diese halophile Bakterien.

20 • Weiter können beispielsweise die Zellen der Mikroorganismen einfach durch die Zugabe von Wasser zum Platzen gebracht und der in ihnen enthaltene Wertstoff effektiv freigesetzt werden.

• Diese Prozesse können unter unsterilen Bedingungen durchgeführt werden. Dies macht diese Prozesse sehr interessant für die großtechnische Umsetzung. Extrem halophile Bakterien benötigen bis zu 20% NaCl für das Wachstum. Aufgrund 25 dieses hohen Salzgehaltes ist das Risiko für eine Kontamination sehr gering, da nur wenige Mikroorganismen unter diesen Bedingungen wachsen können.

Literatur

1. Guo, X.M., et al., Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. Int. J. Hydrogen Energy Full Journal Title: International Journal of Hydrogen Energy, 2010. 35(19): p. 10660-10673.
- 5 2. Bartacek, J., J. Zabranska, and P.N.L. Lens, Developments and constraints in fermentative hydrogen production. Biofuels, Bioprod. Biorefin., 2007. 1(3): p. 201-214.
3. Hallenbeck, P.C. and D. Ghosh, Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? Trends Biotechnol., 2009. 27(5): p. 287-297.
- 10 4. Manish, S. and R. Banerjee, Comparison of biohydrogen production processes. Int. J. Hydrogen Energy Full Journal Title: International Journal of Hydrogen Energy, 2008. 33(1): p. 279-286.
5. van de Werken, H.J.G., et al., Hydrogenomics of the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Appl. Environ. Microbiol. FIELD Full Journal Title: Applied and Environmental Microbiology, 2008. 74(21): p. 6720-6729.
- 15 6. Willquist, K., A. Zeidan Ahmad, and W.J. van Niel Ed, Physiological characteristics of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*: an efficient hydrogen cell factory. Microb Cell Fact FIELD Full Journal Title: Microbial cell factories, 2010. 9: p. 89.
- 20 7. Nath, K., et al., Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen. Int. J. Hydrogen Energy Full Journal Title: International Journal of Hydrogen Energy, 2008. 33(4): p. 1195-1203.
8. Ozgur, E., et al., Potential use of thermophilic dark fermentation effluents in photofermentative hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus*. J. Cleaner Prod. FIELD Full Journal Title: Journal of Cleaner Production, 2010. 18 (Suppl. 1): p. S23-S28.
- 25 9. Pakarinen, O.M., H.P. Tahti, and J.A. Rintala, One-stage H₂ and CH₄ and two-stage H₂ + CH₄ production from grass silage and from solid and liquid fractions of NaOH pre-treated grass silage. Biomass Bioenergy FIELD Full Journal Title: Biomass and Bioenergy, 2009. 33(10): p. 1419-1427.
- 30 10. Benemann, J.R. and D.C. Augenstein, Process for microbial production of hydrogen and methane fuels. 2009, (USA). Application: US, US. p. 6pp.

11. Falb, M., et al., Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, 2008. 12(2): p. 177-96.
12. DasSarma, S. and P. Arora, Halophiles. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES* Nature Publishing Group www.els.net, 2001.
- 5 13. Oren, A., Uptake and turnover of acetate in hypersaline environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1995. 18(1): p. 75-84.
14. Oren, A., The role of glycerol in the nutrition of halophilic archaeal communities: a study of respiratory electron transport. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1995. 16(4): p. 281-90.
- 10 15. Lefebvre, O., et al., Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reactor. *Water Res.*, 2005. 39(8): p. 1471-1480.
16. Pendashteh, A.R., et al., Biological treatment of produced water in a sequencing batch reactor by a consortium of isolated halophilic microorganisms. *Environ. Technol.*, 2010. 31(11): p. 1229-1239.
- 15 17. Kargi, F. and A.R. Dincer, Use of halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *Water Environ. Res.*, 2000. 72(2): p. 170-174.
18. Woolard, C.R. and R.L. Irvine, Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Res.*, 1995. 29(4): p. 1159-68.
- 20 19. Lefebvre, O., et al., Treatment of hypersaline industrial wastewater by a microbial consortium in a sequencing batch reactor. *Environ. Technol.*, 2004. 25(5): p. 543-553.
- 25 20. Hinteregger, C. and F. Streichsbier, *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water. *Biotechnol. Lett.*, 1997. 19(11): p. 1099-1102.
21. Asker, D. and Y. Ohta, Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, 1999. 88(6): p. 617-621.
22. Fang, C.-J., et al., Influence of nutritive factors on C50 carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation.
- 30 Bioresour. Technol. 101(16): p. 6487-6493.
23. Han, J., et al., Wide distribution among halophilic archaea of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(23): p. 7811-7819.

24. Lu, Q., et al., Genetic and biochemical characterization of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. *J. Bacteriol.*, 2008. 190(12): p. 4173-4180.
25. Pire, C., et al., Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001. 200(2): p. 221-227.
- 5 26. Diaz, S., et al., Gene cloning, heterologous overexpression and optimized refolding of the NAD-glutamate dehydrogenase from *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*, 2006. 10(2): p. 105-115.
- 10 27. Rodriguez-Valera, F., et al., Biopolymer production by *Haloferax mediterranei*. *NATO ASI Ser., Ser. A*, 1991. 201(Gen. Appl. Aspects Halophilic Microorg.): p. 373-80.
28. Legat, A., Dissertation. 2009.
29. Zeidan, A.A. and E.W.J. van Niel, A quantitative analysis of hydrogen 15 production efficiency of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor owensensis* OL. *Int. J. Hydrogen Energy* FIELD Full Journal Title: *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010. 35(3): p. 1128-1137.
30. Zeidan, A.A. and E.W.J. Van Niel, Developing a thermophilic hydrogen-producing co-culture for efficient utilization of mixed sugars. *Int. J. Hydrogen Energy* 20 2009. 34(10): p. 4524-4528.

Ansprüche:

1. Verfahren zur Gewinnung von Wertstoffen aus einem hypersalinen Fermentationsmedium umfassend folgende Schritte:
 - a. Bereitstellen eines Abwasserstroms;
 - b. gegebenenfalls Hinzufügen von NaCl zum Abwasserstrom um ein hypersalines Fermentationsmedium zu erhalten;
 - c. Kultivieren von halophilen und/oder haloalkaliphilen Mikroorganismen in dem hypersalinen Fermentationsmedium;
 - d. Aufreinigen der Wertstoffe aus dem Fermentationsmedium.
 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Abwasserstrom aus erneuerbaren Energieprozessen, industriellen Laugeströmen oder industriellen und/oder landwirtschaftlichen Abwasserströmen stammt.
 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass weitere Medienkomponenten und/oder eine weitere Kohlenstoffquelle zugesetzt werden.
 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als weitere Kohlenstoffquelle ein Kohlenhydrat zugesetzt wird.
 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt an NaCl in dem hypersalinen Fermentationsmedium 4 – 30 % (w/v), vorzugsweise 10 – 25 % (w/v), besonders bevorzugt 20 – 25 % (w/v) beträgt.
 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die halophilen und/oder haloalkaliphilen Mikroorganismus ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus *Haladaptatus* (*Hap.*), *Halalkalicoccus* (*Hac.*), *Haloarcula* (*Har.*), *Halobacterium* (*Hbt.*), *Halobaculum* (*Hbl.*), *Halobiforma* (*Hbf.*), *Halococcus* (*Hcc.*), *Haloferoxax* (*Hfx.*), *Halogeometricum* (*Hgm.*), *Halogramnum* (*Hgn.*), *Halonotius* (*Hns.*), *Halopiger* (*Hpg.*), *Haloplanus* (*Hpn.*), *Haloquadratum* (*Hqr.*), *Halorhabdus* (*Hrd.*), *Halorubrum* (*Hrr.*), *Halosimplex* (*Hsx.*) *Halostagnicola* (*Hst.*), *Haloterrigena* (*Htg.*), *Halovivax* (*Hvx.*), *Natrialba* (*Nab.*), *Natriniema* (*Nnm.*),

*Natronoarchaeum (Nac.), Natronobacterium (Nbt.), Natronococcus (Ncc.),
Natronolimnobius (Nln.), Natronomonas (Nm.) and Natronorubrum (Nrr.).*

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet,
5 dass der halophile Mikroorganismus *Haloferax (Hfx.)* ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet,
dass der Wertstoff ein Carotinoid, Bioplastik oder ein rekombinantes Produkt ist.

10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet,
dass das Verfahren unter unsterilen Bedingungen durchgeführt wird.

15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet,
dass der Wertstoff durch Verdünnen des hypersalinen Fermentationsmediums aus der
Zelle extrahiert wird.

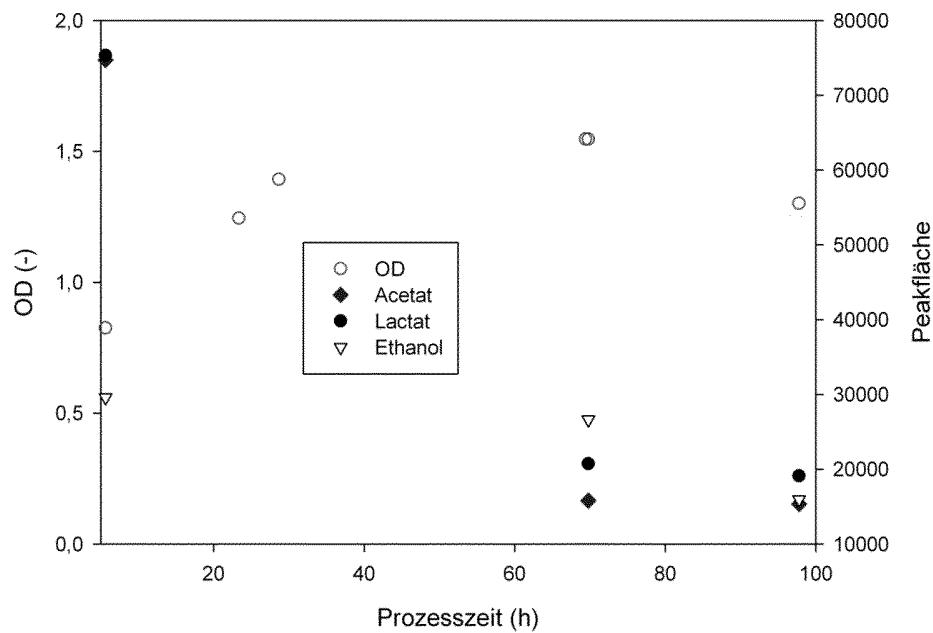
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet,
dass das Verfahren in einem korrosionsbeständigen Bioreaktor, vorzugsweise in
einem Reaktor aus Glas oder Polymer, durchgeführt wird.

20 12. Ein Wertstoff erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis
11.

Figuren:

Fig. 1

Batch I. Offline: OD und Aufnahme der C-Quellen



5

Fig. 2a

Batch I. Online: pH und gelöster Sauerstoff

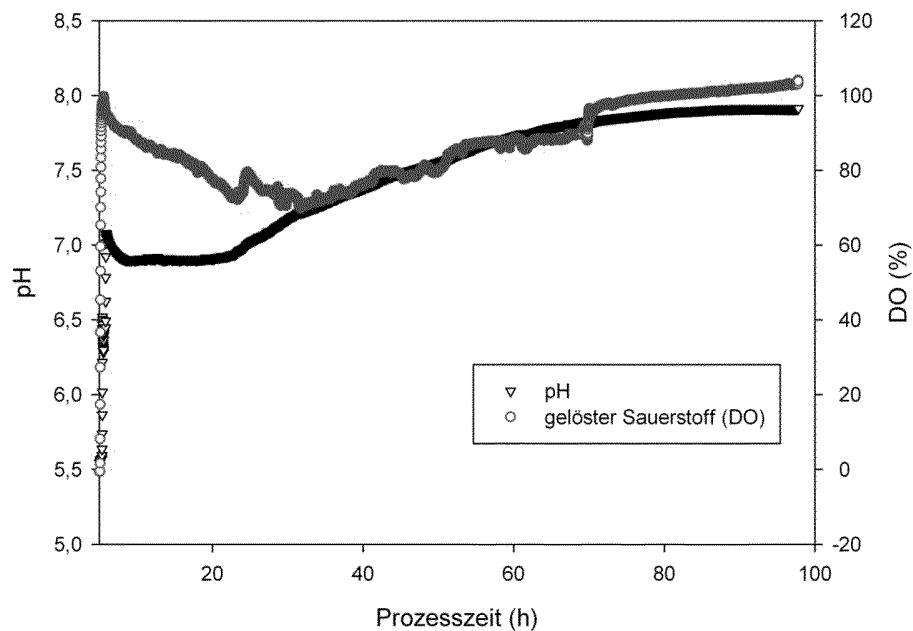


Fig. 2b

Batch I. Offgas: Sauerstoff und Kohledioxid

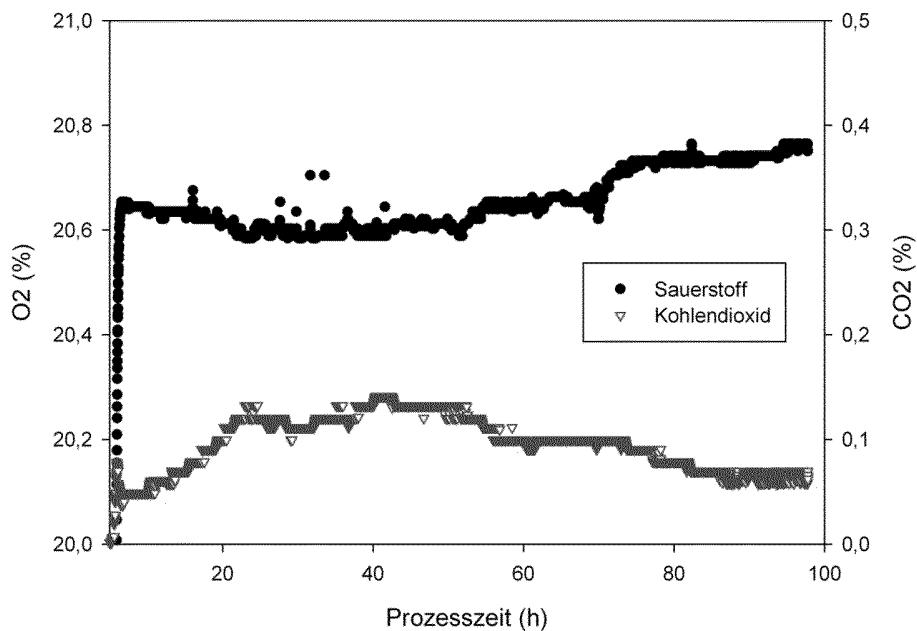


Fig. 3

Batch II. Offline: OD und Aufnahme der C-Quellen

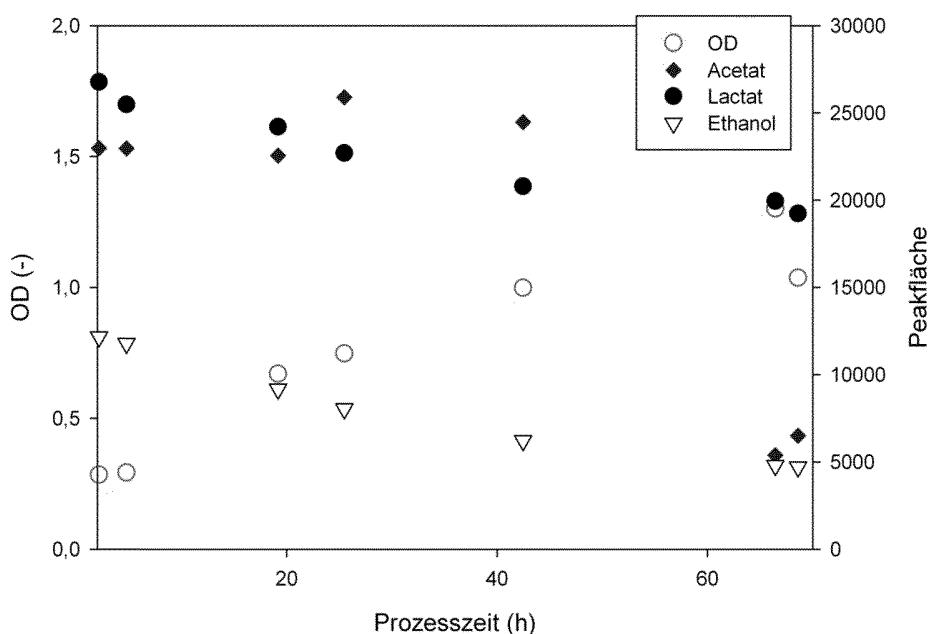


Fig. 4a

Batch II. Online: pH und gelöster Sauerstoff

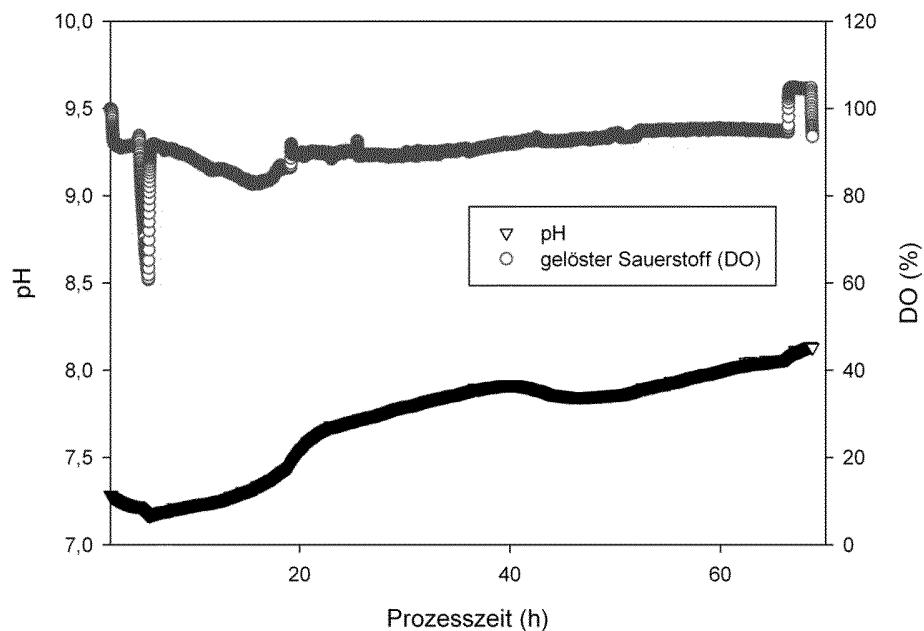
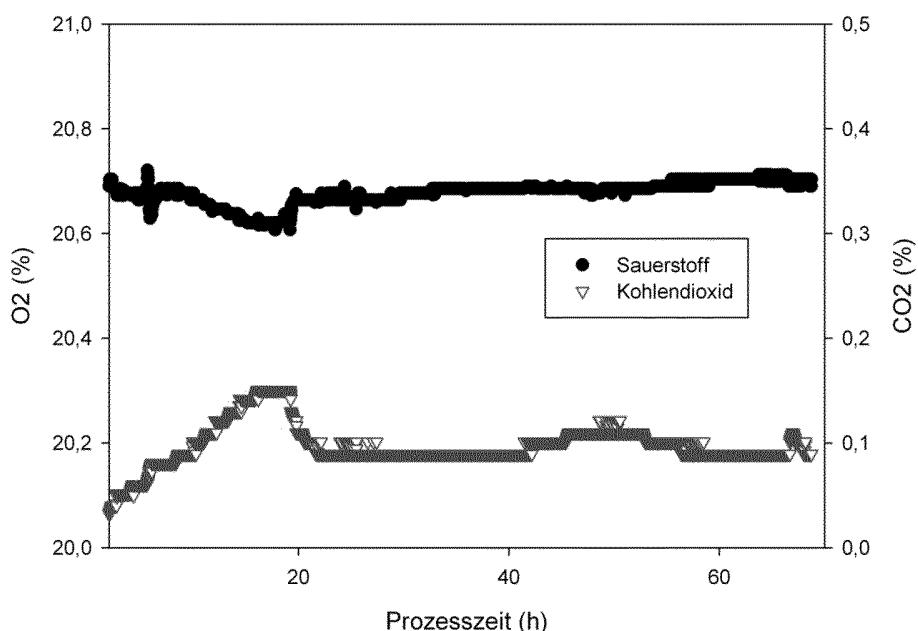


Fig. 4b

Batch II. Offgas: Sauerstoff und Kohlendioxid



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC:
C12P 7/06 (2006.01)

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß CPC:
C12P 7/065 (2013.01)

Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation):
C12P

Konsultierte Online-Datenbank:
WPI, EPODOC, Fulltext

Dieser Recherchenbericht wurde zu den am **27.09.2012** eingereichten Ansprüchen **1–12** erstellt.

Kategorie ^{*)}	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	ES 2019169 A6 (UNIV DE ALICANTE VICERESTORAD) 01. Juni 1991 (01.06.1991) [EPODOC-Zusammenfassung, online, heruntergeladen am 22.07.2013]; Ansprüche	1–12
X	CN 102618471 A (CHANGZHOU YAHUAN ENVIRONMENTAL PROT TECHNOLOGY CO LTD) 01. August 2012 (01.08.2012) [WPI-Zusammenfassung, online, heruntergeladen am 22.07.2013]	1–3, 5, 6, 10–12
X	JP H07132096 A (MICRO ALGE CORP KK) 23. Mai 1995 (23.05.1995) [WPI-Zusammenfassung, online, heruntergeladen am 22.07.2013]	1–3, 5, 6, 10–12
X	Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, Nr. 6, Seiten 743–750 [Medline-Zusammenfassung NLM12021793, online, heruntergeladen am 22.07.2013]	1–12

Datum der Beendigung der Recherche: **23.07.2013** Seite 1 von 1 Prüfer(in):
MOSSER Reinhold

^{*)}Kategorien der angeführten Dokumente:

- X** Veröffentlichung **von besonderer Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
 - Y** Veröffentlichung **von Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese **Verbindung für einen Fachmann naheliegend** ist.
- A Veröffentlichung, die den allgemeinen **Stand der Technik** definiert.
- P Dokument, das **von Bedeutung** ist (Kategorien X oder Y), jedoch **nach dem Prioritätstag** der Anmeldung veröffentlicht wurde.
- E Dokument, das **von besonderer Bedeutung** ist (Kategorie X), aus dem ein „**älteres Recht**“ hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).
- & Veröffentlichung, die Mitglied der selben **Patentfamilie** ist.