

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

**Zuwendungsempfänger:
Technische Hochschule Mittelhessen**

**Titel der Förderung: Maßgeschneiderte Inhalts-
stoffe 1-2 - Verbundvorhaben: Prozessentwick-
lung für eine heterotrophe Terpene-Produktion
in *Cupriavidus necator* (ProNecator)
– Teilprojekt A**

**Verantwortlicher Autor:
Prof. Dr.-Ing. Dirk Holtmann
Förderkennzeichen: 031B1050A**

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B1050A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.“

Eingehende Ergebnisdarstellung

Forschungsvorhaben: 031B1050A
Thema: Maßgeschneiderte Inhaltsstoffe 1-2 - Verbundvorhaben: Prozessentwicklung für eine heterotrophe Terpene-Produktion in *Cupriavidus necator* (ProNecator) – Teilprojekt A
Laufzeit: 01.02.21 - 30.04.24
Ausführende Stelle: Technische Hochschule Mittelhessen - Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie (IBPT), Wiesenstr. 14, 35390 Gießen
Projektleitung: Prof. Dr.-Ing. Dirk Holtmann

Ergebnisdarstellung und Vergleich der Ergebnisse zur Vorhabenbeschreibung

Die Darstellung der Ergebnisse orientiert sich an den geplanten Arbeitspaketen gemäß Vorhabensbeschreibung (der Fokus wird auf die von der THM geleiteten APs gelegt).

AP 2: Genomische Integration biosynthetischer Enzymkaskaden in *C. necator*

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde ein umfassender Methodenvergleich zur Genomin-Integration in *C. necator* durchgeführt. Verschiedene Strategien zur Integration biosynthetischer Enzymkaskaden in das Genom dieses Bakteriums wurden evaluiert, um die besten Ansätze für stabile und effiziente Genommodifikationen zu identifizieren. Diese Untersuchungen konzentrierten sich auf die Vergleichbarkeit und Effizienz von Techniken wie Plasmid-basierte Systeme und Transposon vermittelte Integration. Nach eingehender Analyse und Tests wurde der Stamm *C. necator* PHB-4 als optimaler Integrationsstamm festgelegt. *C. necator* ist ein bekannter Polyhydroxybutyrat (PHB)-Produzent, jedoch ist bei *C. necator* PHB-4 das PHB-Biosynthese Gen deletiert und dieser dadurch PHB-defizient. Dies kann zusätzliche genetische Stabilität, einen erhöhten metabolischen Flux hinsichtlich möglicher Produktbildung und Platz für die Integration neuer Gene bieten. Als Genomdeletionsstelle wurde der PHB-Locus ausgewählt, welcher durch die Deletion obsolet erscheint und sich dadurch als besonders geeignet für die stabile Integration erweist. Die Wahl der Integrationsmethode fiel auf das Shuttle-Plasmid pJQ200mp18Tc (Abbildung 1) in Kombination mit dem Donorstamm *E. coli* S17-1 λ pir.

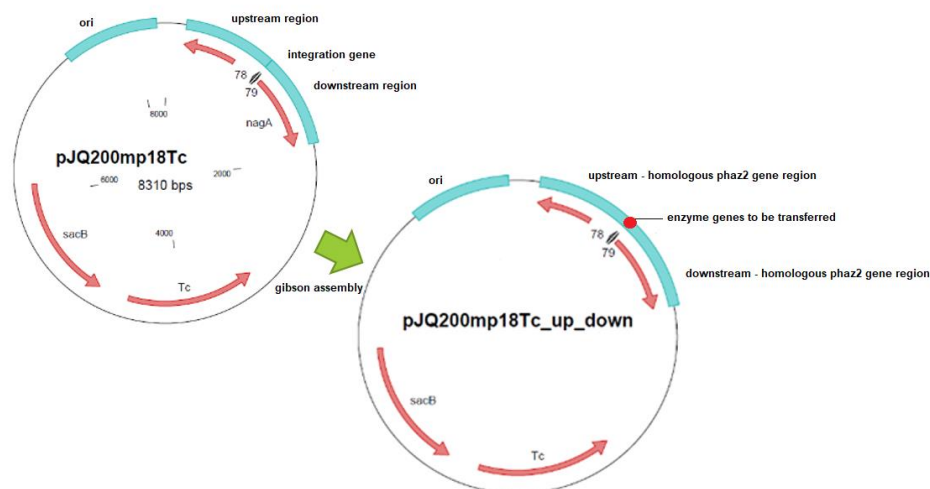
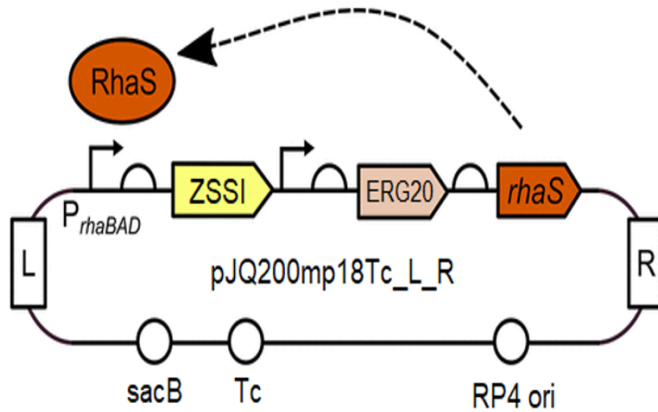


Abbildung 1: Modifikationsschema des Shuttle-Plasmides pJQ200mp18Tc zur Genomintegration

Diese Methode wurde aufgrund ihrer bewährten Anwendung in vergleichbaren Systemen und ihrer Fähigkeit zur effizienten Genübertragung in der Literatur bevorzugt. Das Plasmid pJQ200mp18Tc ermöglicht eine präzise Integration durch homologe Rekombination mittels dem Donor *E. coli* S17-1 λ pir. In den folgenden Experimenten wurde versucht, die α -Humulen Synthase in das Genom von *C. necator* PHB-4 zu integrieren und das phaz2-Gen zu ersetzen. Trotz intensiver Bemühungen und mehrerer Optimierungsversuche gelang die Integration nicht. Verschiedene molekularbiologische Techniken wie Insert- und Backbone-PCR sowie

Overlay-PCR wurden eingesetzt und optimiert, um das Shuttle-Plasmid und die erfolgte Integration zu bestätigen. Zusätzlich wurden mehrfache Optimierungsversuche in der Gibson-Assembly Amplifikationsmethode und anderen PCR-Methoden zum Design des Zielkonstruktes (Abbildung 2) vorgenommen, es konnte jedoch keine erfolgreiche Genomintegration erreicht werden.



Required Oligonucleotides

Backbone pJQ200mp18Tc L homolog Insert R homolog

Name	Primer 5' (overlap/spacer/ANNEAL) 3'
Backbone pJQ200mp18Tc_fwd	atgcggtgatGAATTCGAGCTCGGTACC
Backbone pJQ200mp18Tc_rev	gctgcccttcGTAATCATGTCATAGCTGTTTC
L homolog_fwd	acatgattacGAGGGGACGATGCCAG
L homolog_rev	gaaagattaaGAGCTGGGACATCGGCG
Insert_fwd	tcccagctctTTAATCTTCTCGAATTGAG
Insert_rev	aacccttcctATTTCCTCTCTGTAAAC
R homolog_fwd	aagcaaatagGAAGGGGTTTTCCGGGG
R homolog_rev	gctgcaattcATCACCGCATCCAGTCG

Abbildung 2: Shuttle-Plasmid pJQ200mp18Tc_L_R bestehend aus: rhaBAD-Promotorsequenz + rhaS Gen zur Transkriptionsaktivierung; homologe Regionen der Genomintegrationsstelle L und R; RP4-ori für Transfersystem; Tetrazyklin-Resistenzgen; sacB-Gen sowie die Gene zssI und erg20 für die α -Humulen Synthese. Zusätzlich Übersicht der verwendeten Primer zur Gibson-Assembly des Zielkonstruktes pJQ200mp18Tc_L_R

Die eingesetzten molekularbiologischen Methoden wurden während diesem Arbeitspaket umfassend optimiert. Dies umfasste die Optimierung der Insert- und Backbone-PCR, Overlay-PCR sowie die Parameter der Gibson-Assembly Amplifikation. Jede Methode wurde detailliert angepasst, um die nachfolgende Effizienz der Genomintegration zu maximieren. Dabei wurde vor Allem die PCR-Methodik zur Herstellung der einzelnen Gibson-Fragmente durch optimiertes Primerdesign und Parameterhandling verbessert. Diese Bemühungen waren wichtig, um systematische Fehler beim Design des finalen Shuttle-Plasmides (Abbildung 3) auszuschließen und die Genomintegrationsmethodik zu verfeinern.

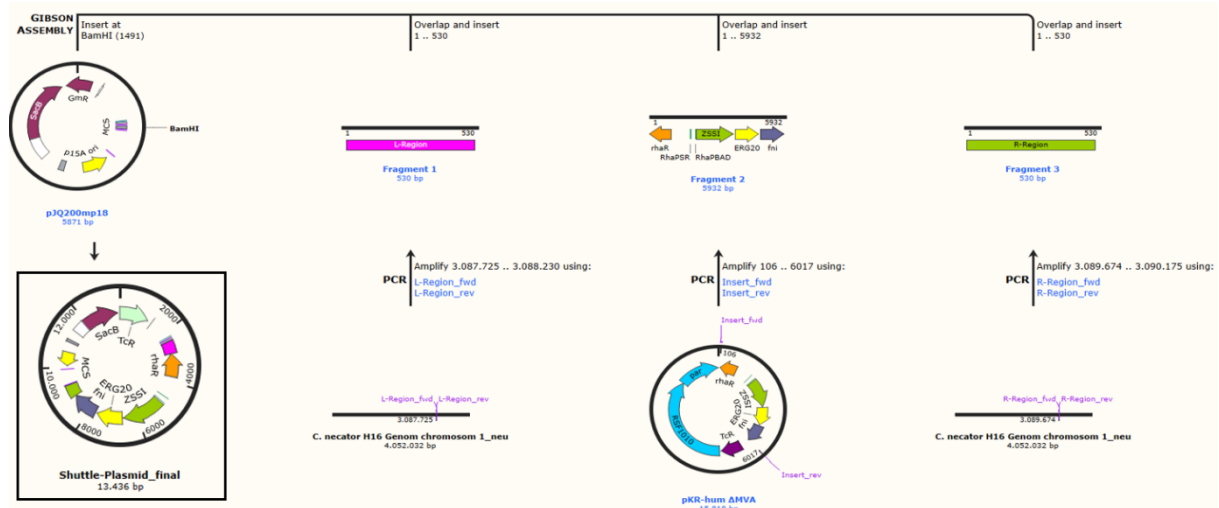


Abbildung 3: Schematische Übersicht des Workflows zur Konstruktion des finalen Shuttle-Plasmides

Aufgrund der Herausforderungen wurde schließlich die attTn7-site gerichtete Integration als alternative Methode gewählt. Dieses System nutzt das mini-Tn7 Transposon, welches eine Integration an spezifischen Stellen im Genom ermöglicht. Diese Methode zeigte in der Literatur eine hohe Frequenz der Integration und versprach dadurch potenziell höhere Expressionsraten und Produktausbeuten der Terpene nach erfolgreicher Integration. Trotz der Wahl dieser

alternativen Methode und intensiver Versuche konnte zwar wahrscheinlich eine genomische Integration des Mevalonat (MVA)-Weges und/oder der Terpensynthasen erreicht werden. Die erwarteten Verbesserungen in der Expressionsrate und Produktivität konnten allerdings nicht realisiert werden, was auf weitere, bislang unbekannte Herausforderungen bei der Genomin- tegration in *C. necator* hinweist.

AP 3: Screening von Stamm-Varianten und Prozessparametern

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde das Screening und die Auswirkungen einer Variation der Prozessparameter Kultivierungstemperatur, Schüttelfrequenz und Volumen des Extraktionsmittels auf das Zellwachstum und die α -Humulen Produktion von *C. necator* pKR-Hum untersucht. Die Analyse und Auswertung basierte auf den Ergebnissen eines Design of Experiments (DoE) Ansatzes. Zuerst wurden in Vorversuchen zur Bestimmung der Trockenmasse von *C. necator* pKR-hum 1 L Schüttelkolben mit 200 mL LB-Medium gefüllt, aus einer Vorkultur bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,10$ angeimpft und in dreifacher Ausführung bei 180 U/min und 30 °C kultiviert. Sobald die OD_{600} anstieg, wurden 20 mL entnommen und bei 3.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in Reinstwasser bis zu einer OD_{600} von 1,5; 2,0; 3,0; 3,5 und 4,0 resuspendiert und in den Feuchtebestimmer (Kern DBS 60-3; Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) gegeben. Nach Erreichen der eingestellten Parameter (Zieltemperatur 120 °C, Gewichtstoleranzbereich maximal 0,055 % für 30 s) wurde die Trockenmasse der Zellen bestimmt. Diese gemessenen Zelltrockenmassen wurden nun auf einen linearen Zusammenhang mit den zuvor eingestellten optischen Dichten untersucht, um den benötigten Umrechnungsfaktor zu erhalten (Abbildung 4).

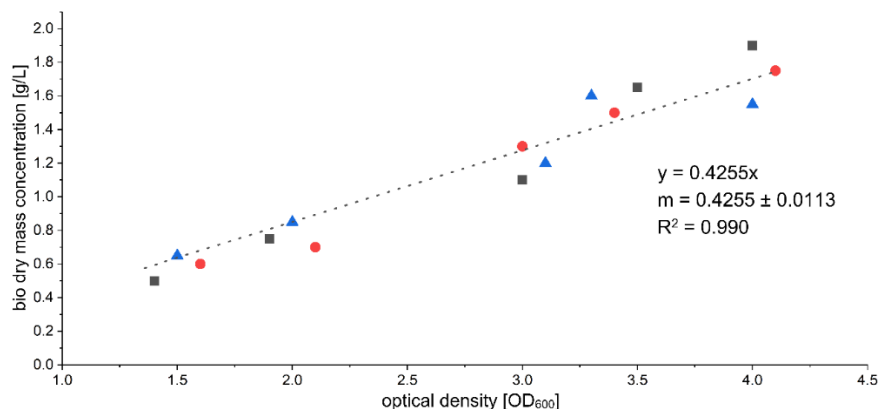


Abbildung 4: Bestimmung der Zelltrockenmasse Konzentration anhand von *C. necator* pKR-hum Kulturproben, lineare Beziehung zwischen optischer Dichte (600 nm) und Zelltrockenmasse Konzentration (n = 3)

Unter Berücksichtigung der obigen Abbildung 4 lässt sich sagen, dass eine OD_{600} von 1 gleich 0,4255 g/L *C. necator* pKR-hum Zelltrockenmasse entspricht, so dass der *C. necator* pKR-hum Umrechnungsfaktor anschließend auf 0,43 gesetzt und fortlaufend verwendet wurde. Zusätzlich wurden in Vorversuchen Screening-Experimente der Prozessparameter (Abbildung 5) durchgeführt, um die Grenzen der Faktorvariation im Rahmen des experimentellen Ansatzes mit dem α -Humulen produzierenden *C. necator* pKR-hum Stamm zu testen. Dabei wurde die Implementierung höherer Schüttelgeschwindigkeiten und Kultivierungstemperaturen innerhalb des Inkubators (Ecotron, Infors HT; Bottmingen, Schweiz) im Hinblick auf die technische Machbarkeit und die Biokompatibilität, sowie dem Wachstumsverhalten von *C. necator* pKR-hum getestet. Zur Erfassung des Zellwachstums wurden in diesem Arbeitspaket, sowie auch in den nachfolgenden, die Schüttelkolben in Triplets im Gerät Cell Growth Quantifier (CGQ, Scientific Bioprocessing; Pittsburgh, USA) alle 60 s vermessen und die resultierenden Backscatterwerte der Zellsuspension über die optische Dichte hin zu den entsprechenden Zelltrockenmassenkonzentrationen berechnet und dargestellt.

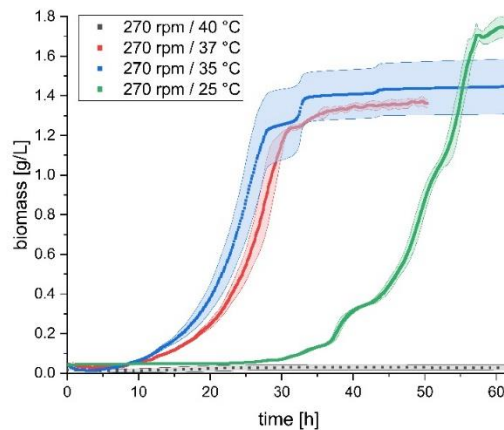


Abbildung 5: Wachstumsverlauf von *C. necator* pKR-hum unter verschiedenen Kultivierungstemperaturen zwischen 25 und 40 °C und einer Schüttelfrequenz von 270 U/min in Minimalmedien, uninduziert (n = 3)

Die Screening-Versuche verliefen erfolgreich, wie das in Abbildung 5 gezeigte Wachstumsverhalten von *C. necator* pKR-hum zeigt. Eine höhere Schüttelfrequenz von 270 U/min in Kombination mit Kultivierungstemperaturen von 25 - 40 °C war technisch umsetzbar und führte zu einem Zellwachstum von *C. necator* pKR-hum, außer bei 40 °C. Es zeigt sich jedoch, dass eine niedrige Kultivierungstemperatur von 25 °C zu einem verzögerten Wachstumsverhalten mit einer Lag-Phase von bis zu 25 h führte. Eine Kultivierungstemperatur von 35 oder 37 °C führte zu einem schnelleren Wachstum der Zellen mit einer Lag-Phase von 10 h. Eine weitere Erhöhung auf 40 °C Kultivierungstemperatur ist technisch möglich, führte aber nicht zu einem Zellwachstum von *C. necator* pKR-hum. Damit kann der entsprechende Auslegungsbereich des experimentellen Ansatzes in dem Design of Experiment Versuchen realisiert werden. Die Endbiomassen bei 35 und 37 °C Kultivierungstemperatur zum Zeitpunkt des Erreichens der stationären Phase nach 40 h lagen bei 1,3 - 1,6 g/L. Im Beispiel von 25 °C nach 55 h Kultivierungszeit bei 1,7 - 1,8 g/L, wobei die Standardabweichungen berücksichtigt wurden. Nachfolgend sind die 3D response surface plots des Design of Experiment Ansatzes in Abbildung 6 dargestellt. Es wurden die Prozessparameter Schüttelfrequenz (Minimum 30 - Maximum 330 U/min), Kultivierungstemperatur (Minimum 28 - Maximum 39 °C) und Volumen des *in situ* Extraktionsmittels n-Dodekan (Minimum 3 - Maximum 37 % v/v) im experimentellen Ansatz in verschiedenen Runs variiert. Die Ergebnisse der Responses (Zeit bis zum Induzieren, α -Humulen Konzentration und Biomasse 48 h nach Induktion, sowie Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ + $Y_{P/X}$ 48 h nach Induktion) wurden untersucht, ausgewertet und moduliert dargestellt.

Unterschiedliche Schüttelfrequenzen und Kultivierungstemperaturen beeinflussten alle gemessenen Responses in den Modellen (Abbildung 6). Insbesondere zeigte sich, dass die Kultivierungstemperatur einen großen Einfluss auf das Wachstum von *C. necator* pKR-hum und die α -Humulen Produktion hat. Eine Temperatur von 33 °C erwies sich als optimal für ein schnelles Zellwachstum und eine Verkürzung der Prozesszeit bis zur Induktion von bis zu 40 h (39 °C) auf 14 h (32 - 33 °C) (Abbildung 6 - A). Ähnliche Effekte wurden auch bei der Endbiomasse 48 h nach der Induktion beobachtet, wo eine Kultivierungstemperatur von 33 - 34 °C ebenfalls zu den höchsten Messwerten mit bis zu 2,7 g/L führte. Höhere und niedrigere Kultivierungstemperaturen von 39 bzw. 28 °C führten zu einer geringen Biomasse von 0,8 g/L (Abbildung 6 - C). Komplementär zu diesem Effekt ist das Verhalten der α -Humulen Produktion beschreibenden Responses, wie die α -Humulen Konzentration 48 h nach Induktion (Abbildung 6 - B), der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/S}$ (Abbildung 6 - D) und $Y_{P/X}$ 48 h nach Induktion (Abbildung 6 - E).

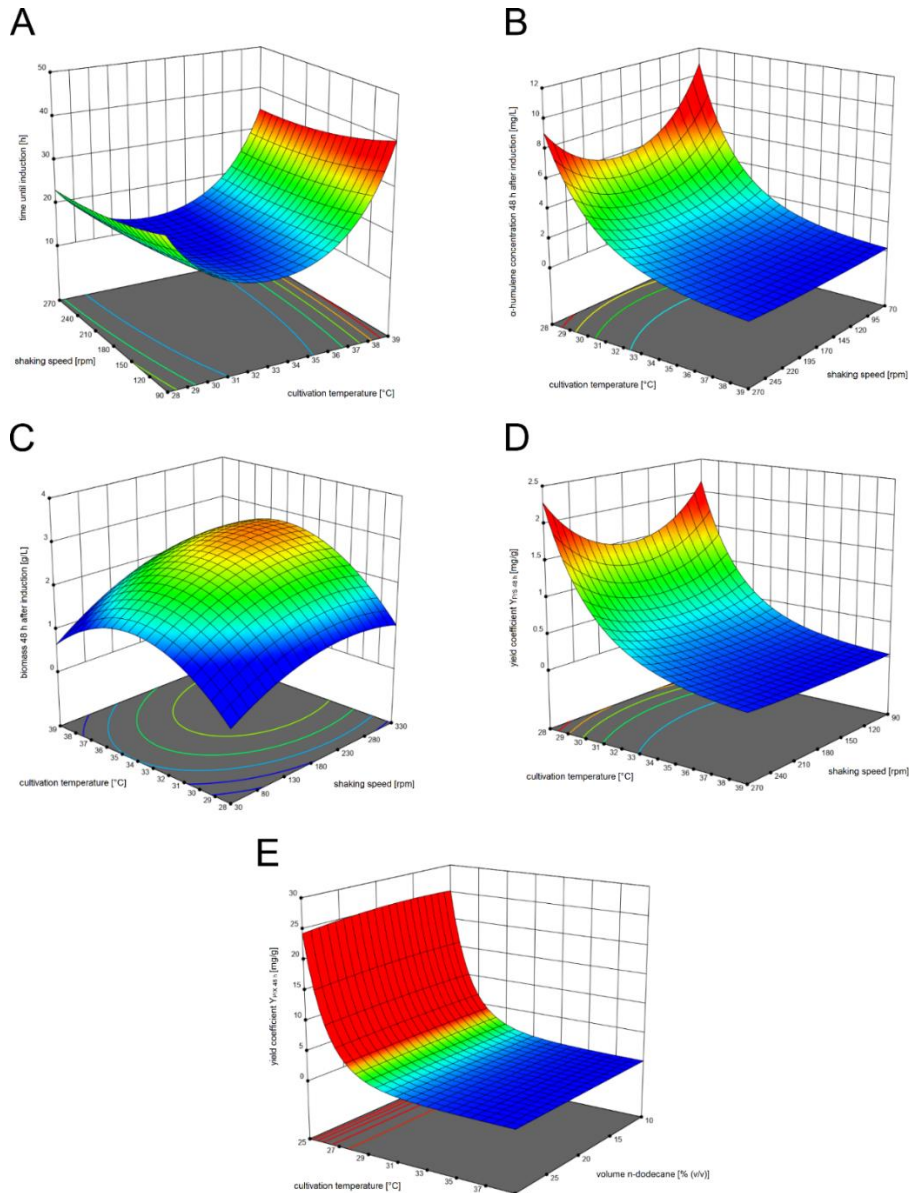


Abbildung 6: 3D response surface Modellierung der Kultivierungszeit bis zur Induktion (A), der α -Humulen Konzentration (B) und der Biomasse (C) sowie der Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ (D) und $Y_{P/X}$ (E) 48 h nach der Induktion in Abhängigkeit von den Modellfaktoren der *C. necator* pKR-hum Kultivierung. Schüttelfrequenz und Kultivierungstemperatur (A - D, mit 20 % (v/v) n-Dodekan Lösungsmittelvolumen), Lösungsmittelvolumen und Kultivierungstemperatur (E, mit 180 U/min Schüttelfrequenz). Für die Modellierung wurden nur signifikante Modellfaktoren verwendet und dargestellt

Es ist zu erkennen, dass die höchsten finalen α -Humulen Konzentrationen bei den niedrigsten Kultivierungstemperaturen von 28 °C auftraten. In dem oben dargestellten Modell kann die α -Humulen Konzentration somit 48 h nach der Induktion bis zu 10 mg/L betragen, verglichen mit 2 - 3 mg/L α -Humulen bei höheren Temperaturen von 31 - 32 °C (Abbildung 6 - B). Der Ausbeutekoeffizient $Y_{P/X}$ 48 h nach der Induktion ist hauptsächlich von der Kultivierungstemperatur abhängig und kann laut Modell durch niedrige Kultivierungstemperaturen von 25 - 28 °C auf bis zu 25 mg α -Humulen / g Biomasse gesteigert werden (Abbildung 6 - E). Eine Faktorvariation der zugegebenen Menge des Lösungsmittels n-Dodekan oder der Schüttelfrequenz hatte in diesem Modell keinen signifikanten Einfluss auf $Y_{P/X}$. Die Ergebnisse der statistischen Versuchsplanung zum AP3 deuten in ihren 3D response surface Modellierungen darauf hin, dass eine Aufteilung des α -Humulen Produktionsprozesses in zwei Phasen sinnvoll ist. Die erste Phase dient dem optimierten Zellwachstum und verkürzt die Zeit bis zum Induzieren, sie läuft unter Standardtemperatur (30 °C) bzw. moderat höheren Temperaturen ab.

Die zweite Phase startet nach dem Induzieren mit dem Herabsenken auf niedrigere Kultivierungstemperaturen von 25 - 28 °C und dient einer erhöhten α -Humulen Produktion durch *C. necator* pKR-hum.

AP 4: Entwicklung eines skalierbaren DSP-Konzepts

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurden verschiedene vielversprechende Lösungsmittel für die *in situ* Produktentfernung von α -Humulen identifiziert und ihre Eignung als Alternative zu n-Dodekan untersucht. In einem ersten Schritt wurde deren Biokompatibilität und Einfluss auf das Wachstum von *C. necator* pKR-hum untersucht.

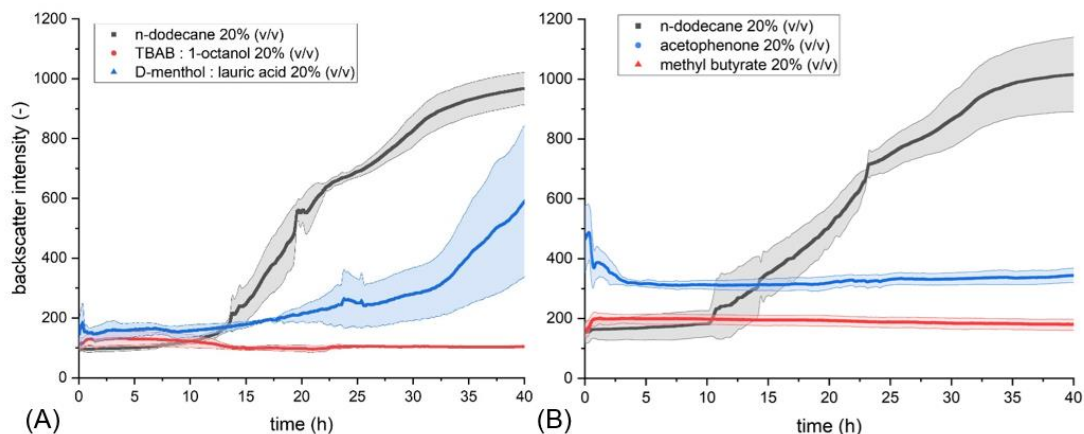


Abbildung 7: (A) Wachstum von *C. necator* pKR-hum in Minimalmedien unter dem Einfluss verschiedener deep-eutectic Lösungsmittel zur *in situ* Produktentfernung von α -Humulen (n = 3), (B) Wachstum von *C. necator* pKR-hum in Minimalmedien unter dem Einfluss verschiedener Lösungsmittel zur *in situ* Produktentfernung von α -Humulen (n = 3)

Das Wachstum von *C. necator* pKR-hum in Minimalmedien wurde durch die Zugabe von 20 % (v/v) der deep-eutectic Lösungsmittel im Vergleich zu n-Dodekan inhibiert (Abbildung 7 - A). Die Zugabe von 20 % (v/v) 1:2 molarem TBAB:1-Oktanol nach dem Animpfen aus einer LB-Vorkultur führte zu keinem Wachstum. Die Zugabe von 20 % (v/v) der 2:1 molaren D-Menthol:Laurinsäure Mischung führte zu einem verringerten Wachstum mit einer verlängerten Lag-Phase von bis zu 20 h. Außerdem verringerte sich die endgültige Biomassekonzentration nach 40 h im Vergleich zu n-Dodekan. Dennoch wurde eine erfolgreiche Trennung und Bildung einer zweiten Phase oberhalb des Minimalmediums für beide deep-eutectic Lösungsmittel beobachtet, die mit der Phasentrennung von n-Dodekan identisch waren. Durch Zugabe von 20 % (v/v) der alternativen Lösungsmittel Acetophenon bzw. Methylbutyrat zum Kultivierungsprozess nach dem Animpfen wurde im Vergleich zum Standardextraktionslösungsmittel 20 % (v/v) n-Dodekan kein Wachstum festgestellt (Abbildung 7 - B). Beide alternativen Lösungsmittel bildeten zwar erfolgreich eine zweite Phase, die sich vom Minimalmedium abtrennte, wobei die Zugabe von 20 % (v/v) Methylbutyrat eine obere Phase bildete, die mit der Phase von 20 % (v/v)n-Dodekan identisch war. Die Zugabe von 20 % (v/v) Acetophenon bildete eine Phase, die am Boden des Schüttelkolbens erschien. Außerdem wurde bei der Verwendung von Acetophenon und Methylbutyrat ein starker unangenehmer Geruch im Vergleich zu den anderen getesteten Lösungsmitteln festgestellt.

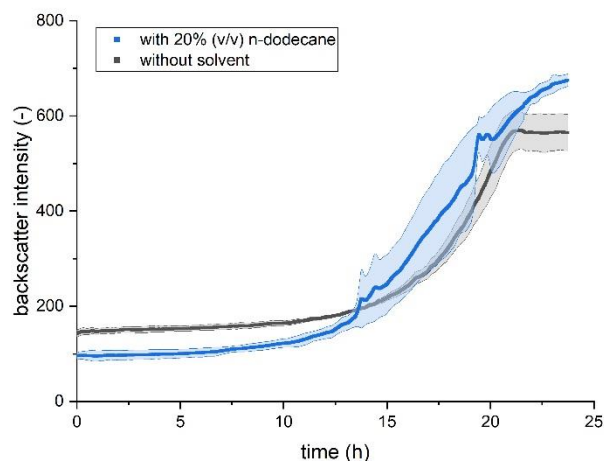
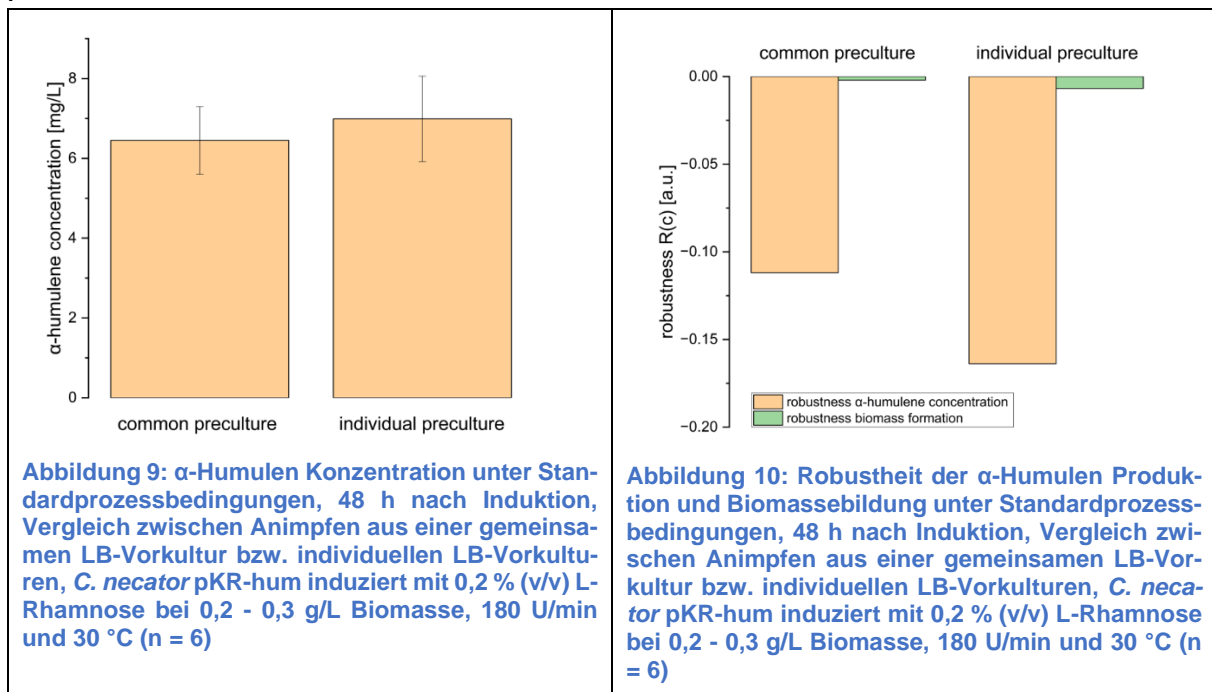


Abbildung 8: Wachstum von *C. necator* pKR-hum in Minimalmedien unter dem Einfluss von 20 % (v/v) n-Dodekan bzw. ohne Lösungsmittelzusatz (n = 3)

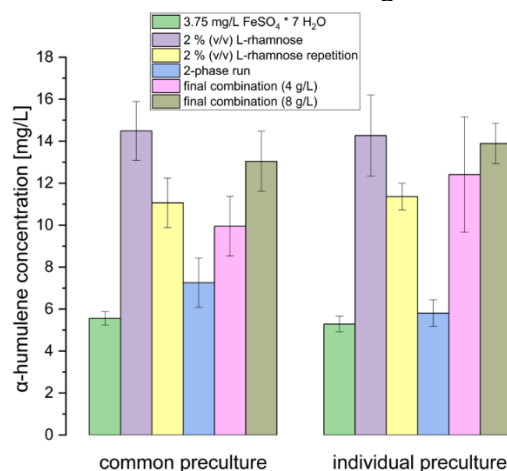
Das Wachstumsverhalten in Abbildung 8 zeigt einen ähnlichen Verlauf zwischen dem *C. necator* pKR-hum Wachstum ohne hinzugefügtes Lösungsmittel bzw. mit 20 % (v/v) n-Dodekan, unter Berücksichtigung der Standardabweichungen. In beiden Versuchen betrug die Länge der Lag-Phase etwa 10 h und die exponentiellen Phasen verhielten sich ähnlich. Das Zellwachstum unter der Zugabe von 20 % (v/v) n-Dodekan erreichte einen höheren finalen Endwert der Biomassekonzentration nach 25 h im Vergleich zum Zellwachstum ohne Lösungsmittel Zugabe, gemessen mittels der Rückstreuungsintensität der Zellsuspension. Dieser erhöhte Wert der Rückstreuungsintensität kann jedoch auf das zusätzliche n-Dodekan zurückgeführt werden, da eine Offline-Messung der optischen Dichte bei 600 nm für beide Versuche einen Wert von 3,0 bzw. 3,1 am Ende der Kultivierung ergab. Daher kann der leicht erhöhte Rückstreuwert durch die Zugabe von phasenbildenden Lösungsmitteln und deren Einfluss auf die Messung im Allgemeinen erklärt werden. Des Weiteren bieten höhere Alkane wie Tetradekan, Pentadekan und Hexadekan eine Alternative zur *in situ* Extraktion von α -Humulen mittels n-Dodekan. Den höheren Alkanen konnte zwar keine erhöhte α -Humulen Extraktionskinetik im Vergleich zu n-Dodekan nachgewiesen werden, jedoch bieten Tetra-, Penta- und Hexadekan durch identische Biokompatibilitäten effektive Alternativen zu n-Dodekan. Auf diese kann beispielsweise bei Preisunterschieden oder Lieferengpässen, ohne resultierende Einbußen bei der Prozessleistung, zurückgegriffen werden. Die Extraktion stellt damit ein sehr gut skalierbares DSP-Verfahren dar.

AP 5: Stabilität und Robustheit der Prozesse

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurden die Robustheit und Stabilität der α -Humulen Produktion mittels *C. necator* pKR-hum getestet und der Einfluss von Änderungen zuvor etablierter individuellen Prozessfaktoren untersucht. Dabei wurden Prozessfaktoren wie die Zusammensetzung des Minimalmediums, die L-Rhamnose Induktion und die Prozesstemperatur variiert und die resultierende Robustheit geprüft. Darüber hinaus wurde der Effekt einer simulierten Prozesstörung (12 h ohne Schüttlung nach Induktion – im Inkubator bei 30 °C) auf die Robustheit des Produktionsstammes *C. necator* pKR-hum geprüft. Die Robustheit wurde nachfolgend mit der Formel $R = -(\sigma^2/\bar{x})$ berechnet und einheitenlos angegeben. Bei den durchgeführten Versuchen wurde außerdem der Einfluss einer gemeinsamen LB-Medium Vorkultur im Vergleich zu dem Animpfen aus individuellen LB-Vorkulturen (jeweils n = 6) auf die α -Humulen Produktion und Robustheit mittels *C. necator* pKR-hum untersucht. Zuerst wurde dazu der Einfluss des Animpfens der Hauptkulturen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur bzw. individuellen LB-Vorkulturen auf die finalen α -Humulen Konzentrationen unter Standardbedingungen getestet (Abbildung 9).



Es zeigte sich, dass unter Berücksichtigung der Standardabweichungen zwischen dem Animpfen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur bzw. individuellen LB-Vorkulturen keine Unterschiede in der finalen α -Humulene Konzentration nach 48 h Produktionszeit erkennbar sind. Die Robustheit der α -Humulene Produktion und Biomassebildung beim Animpfen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur und aus individuellen LB-Vorkulturen bewegt sich in Abbildung 10 mit maximal -0,16 in einem geringen Wertebereich und spricht daher für robuste Prozessbedingungen unter Standardbedingungen. Es ist jedoch zu erkennen, dass die Robustheitswerte beim Animpfen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur geringer und robuster ausfallen. Nachfolgend wurden nun in Abbildung 11 einzelne Prozessbedingungen, die in Arbeitspaketen zuvor untersucht und etabliert wurden, im Vergleich zu den Standardprozessparametern eingefügt und deren Einfluss auf die finale α -Humulene Konzentration getestet.



Der Abbildung 11 ist zu entnehmen, dass unter Berücksichtigung der Standardabweichungen besonders die Prozessbedingungen: 2 % (v/v) L-Rhamnose, der 2-Phasen Lauf und die finale

Kombination mit 8 g/L Fruktose ihre finalen α -Humulen Konzentrationen erhöht hatten. Zwischen dem Animpfen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur bzw. individuellen LB-Vorkulturen sind unter Berücksichtigung der Standardabweichungen keine Unterschiede in den finalen α -Humulen Konzentrationen nach 48 h Produktionszeit erkennbar.

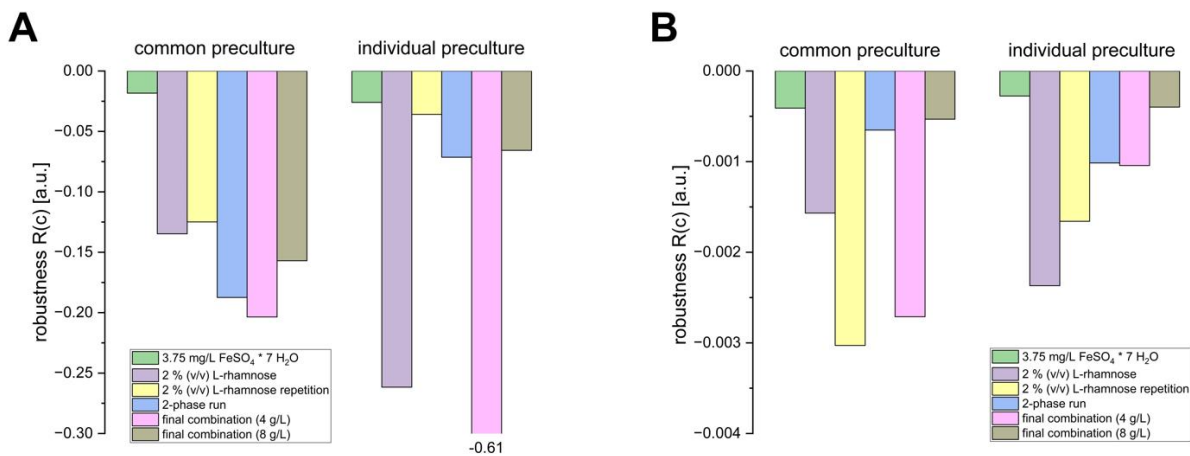


Abbildung 12: Vergleich der Robustheit der α -Humulen Produktion (A) und der Biomassebildung von *C. necator* pKR-hum (B) nach Änderung einzelner Prozessbedingungen, 48 h nach Induktion, *C. necator* pKR-hum induziert mit 0,2 % (v/v) L-Rhamnose bei 0,2 - 0,3 g/L Biomasse als Standardlauf - 180 U/min und 30 °C. 2-Phasen Lauf bestehend aus 30 °C bis 24 h nach dem Induktionsschritt, dann Absenken auf 25 °C Kultivierungstemperatur. Vergleich zwischen dem Animpfen der Hauptkulturen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur bzw. individuellen LB-Vorkulturen (n = 6)

Die Robustheiten der α -Humulen Produktion (A) und Biomassebildung (B) beim Animpfen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur und aus individuellen LB-Vorkulturen bewegen sich in Abbildung 12 in einem geringen Wertebereich und sprechen daher für sehr robuste Prozesskonditionen unabhängig von dem Handling der Vorkultur und des Animpfens. Es ist jedoch zu erkennen, dass die Robustheitswerte der Biomassebildung sich in einem viel geringeren Wertebereich als die der α -Humulen Produktion bewegen, was für eine sehr robuste Biomassebildung von *C. necator* pKR-hum spricht. Nachfolgend wurde nun der Einfluss einer simulierten Prozessstörung auf Robustheit und finale α -Humulen Konzentration des Produktionsprozesses getestet.

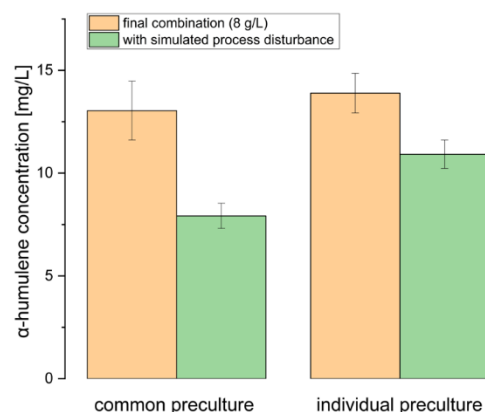


Abbildung 13: α -Humulene Konzentration des finalen Kombinationslaufs mit und ohne simulierte Prozessstörung, 48 h nach Induktion, Vergleich zwischen Animpfen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur bzw. individuellen LB-Vorkulturen, *C. necator* pKR-hum induziert mit 0,2 % (v/v) L-Rhamnose bei 0,2 - 0,3 g/L Biomasse, 180 U/min und 30 °C (n = 6)

Aus Abbildung 13 lässt sich ableiten, dass unter Berücksichtigung der Standardabweichungen zwischen dem Animpfen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur bzw. individuellen LB-Vorkulturen keine Unterschiede in der finalen α -Humulen Konzentration im finalen Kombinationslauf

(8 g/L) nach 48 h Produktionszeit resultierten. Trotz einer simulierten Prozessstörung (Unterbrechung des Schüttelns für 12 h nach Induktion) wurden noch 79 % der maximalen α -Humulen Konzentration nach dem Animpfen aus individuellen LB-Vorkulturen produziert.

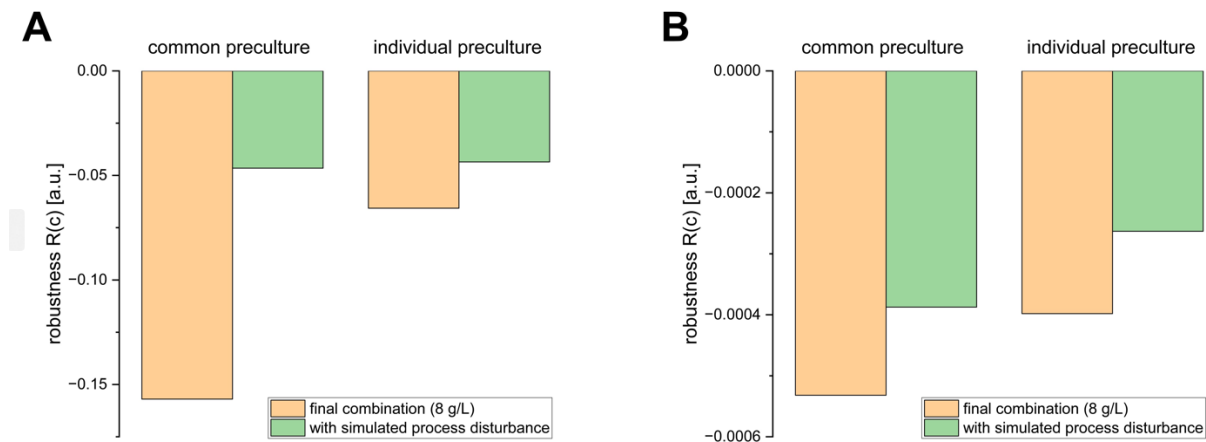


Abbildung 14: Vergleich der Robustheit der α -Humulen Produktion (A) und der Biomassebildung von *C. necator* pKR-hum (B) nach dem Einbau einer simulierten Prozessstörung in den finalen Kombinationslauf, 48 h nach der Induktion, *C. necator* pKR-hum induziert mit 0,2 % (v/v) L-Rhamnose bei 0,2 - 0,3 g/L Biomasse, 180 U/min und 30 °C. Vergleich zwischen dem Animpfen der Hauptkulturen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur bzw. individuellen LB-Vorkulturen (n = 6)

Die Robustheiten der α -Humulen Produktion (A) und Biomassebildung (B) beim Animpfen aus einer gemeinsamen LB-Vorkultur und aus individuellen LB-Vorkulturen bewegen sich in Abbildung 14 in einem geringen Wertebereich und sprechen daher für robuste Prozessbedingungen im finalen Kombinationslauf (8 g/L), unabhängig von dem Handling der Vorkultur und des Animpfens. Es ist jedoch zu erkennen, dass die Robustheitswerte der Biomassebildung sich auch bei der Testung des finalen Kombinationslaufes (8 g/L) in einem viel geringeren Wertebereich als die der α -Humulen Produktion bewegen, was hier für eine sehr robuste Biomassebildung von *C. necator* pKR-hum spricht. Der Einfluss einer simulierten Prozessstörung auf die Robustheit des Produktionsprozesses deutet geringe Robustheitswerte an und spricht für einen, gegenüber den simulierten Prozessstörungen, robusten *C. necator* pKR-hum Produktionsstamm. Ziel dieses Arbeitspaketes war es, die Robustheit und Stabilität der α -Humulen Produktion mittels *C. necator* pKR-hum zu testen. Diese Analyse hinsichtlich einzelnen, zuvor optimierten, Prozessbedingungen und einer simulierten Prozessstörung wurde n = 6 erfolgreich durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die α -Humulen Produktion mittels *C. necator* pKR-hum sehr robust verläuft und zwischen dem Animpfen aus einzelnen bzw. gemeinsamen LB-Vorkulturen kein Unterschied bezüglich Robustheit vorliegt. Außerdem verhält sich die *C. necator* pKR-hum Biomassebildung wesentlich robuster als die induzierte α -Humulen Produktion. Selbst nach einer simulierten Prozessstörung im Inkubator (Unterbrechung der Schüttlung für 12 h) wurden noch 79 % der zuvor maximalen α -Humulen Konzentration in der Testcharge produziert. Abschließend konnte somit nachgewiesen werden, dass *C. necator* selbst gegenüber auftretenden Prozessstörungen ein robuster und geeigneter Terpen-Produktionsstamm ist.

AP 7: Modellbasierte Optimierung

Ziel des APs war die Identifizierung von Bottlenecks und die Ermittlung von Optimierungsszenarien mittels Modelle. Zum einen wurden Prozessmodelle verwendet, um die Optimierungspotentiale für den Fermentationsprozess aufzudecken, zum anderen wurden bestehende metabolische und genomskalige Stoffwechselmodelle zur Identifizierung limitierender metabolischer Faktoren herangezogen. Als Basis für die Optimierung wurde das Modell von N. Percy (A genome-scale metabolic model of *Cupriavidus necator* H16 integrated with TraDIS and transcriptomic data reveals metabolic insights for biotechnological applications, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010106>). Es zeigte sich, dass unter Stickstofflimitierenden Bedingungen die Vorstufe Acetoacetyl-CoA nicht limitierend ist, die Limitierungen liegen

in dem MVA-Stoffwechselweg (siehe dazu Abschlussbericht des Projektpartners). Darüber hinaus wurde die Expression und Aktivität der 3-Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase (hmgR) aus *Myxococcus xanthus* als Haupteinschränkung unseres konstruierten *C. necator* pKR-hum-Stammes identifiziert. Mögliche Lösungen zur weiteren Verbesserung des Produktionsstammes ist z.B. den Ersatz der hmgR aus *M. xanthus* durch eine pflanzenbasierte Variante, um die α -Humulen-Produktionstiter in Zukunft zu erhöhen. Das Prozessmodell ist in Milker, S., Sydow, A., Torres-Monroy, I., Jach, G., Faust, F., Kranz, L., Tkatschuk, L., Holtmann, D. Gram-scale production of the sesquiterpene α -humulene with *Cupriavidus necator*. *Biotechnology Bioengineering*. 2021, 118, 2694–2702. <https://doi.org/10.1002/bit.27788> im Detail beschrieben. In der Simulation der heterotrophen Produktion mit SuperPro Designer wurden α -Humulen-Titer von 30 g L^{-1} bei einer Biomassebildung von $7,5 \text{ g L}^{-1}$ in einem 10.000 L Fermenter im Hauptbetriebsschritt während der 24-stündigen Produktionszeit simuliert. Dies entspricht $316 \text{ kg } \alpha$ -Humulen pro Bioreaktorlauf (1546 mol). Die Dauer des Gesamtprozesses einschließlich Vorkultivierung und Aufarbeitung wurde auf $334,5$ Stunden geschätzt. Bei der Simulation der autotrophen Produktion mit SuperPro Designer wurden α -Humulen-Titer von $38,9 \text{ g L}^{-1}$ und eine Biomassebildung von $21,7 \text{ g L}^{-1}$ in einem 7935 L Reaktor innerhalb von 40 Kultivierungsstunden erreicht. Dies entspricht $310,7 \text{ kg } \alpha$ -Humulen pro Reaktorlauf (1520 mol). Der gesamte Prozess von der Vorkultivierung bis zum destillierten α -Humulen dauert $339,1$ Stunden (Abbildung 15). Der Zeitplan der einzelnen Unit Operations ist in Abbildung 16 dargestellt. Final wurde noch eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt, um die Prozessökonomie zu steigern, wäre eine Reduktion der Substratkosten der relevanteste Parameter.

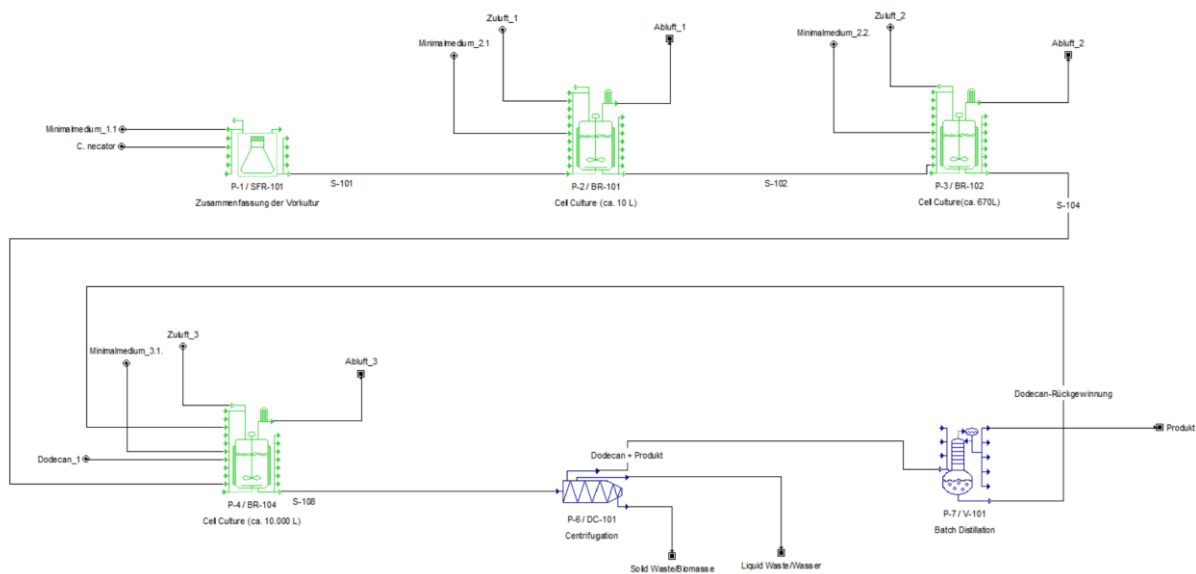


Abbildung 15: Schematische Darstellung des modellierten Prozesses der heterotrophen Produktion von α -Humulen mit *C. necator*. Der Upstream-Prozess (grün) besteht aus einer Vorkultivierung von *C. necator* im Erlenmeyer Kolben, Fermentationen zur Zellvermehrung (10 L und 670 L) und der Hauptfermentation 10 m^3 . Der Downstream-Prozess (blau) besteht aus einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit anschließender Destillation.

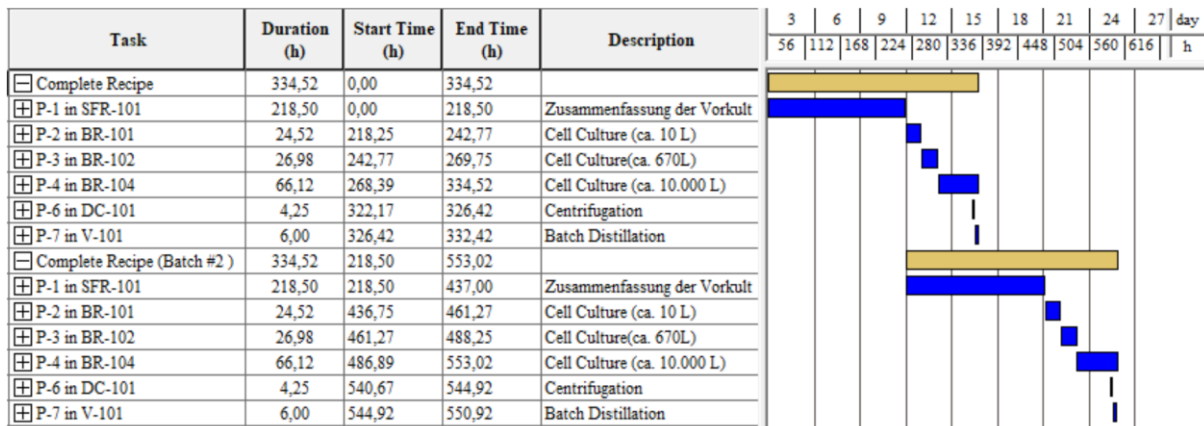
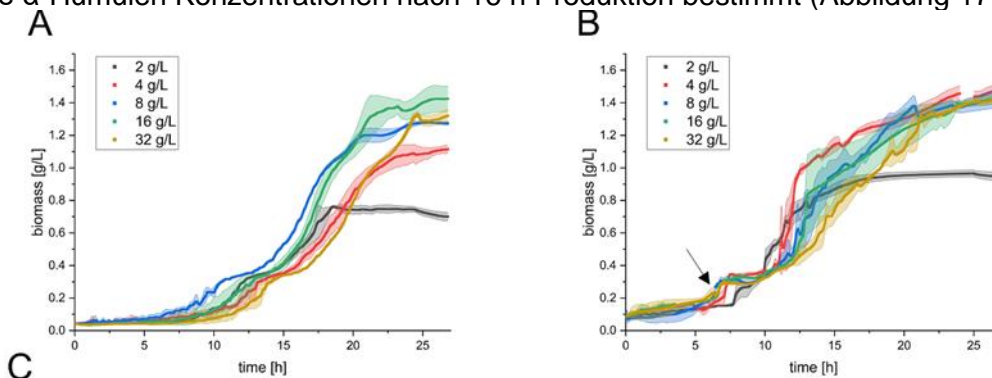


Abbildung 16: Zeitplan der Unit Operations des heterotrophen Prozesses für zwei Batches. Der Plan wurde mit dem Gantt-Chart-Tool von SPD erstellt.

AP 8: Herstellung von Humulen-Mustern

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurden, aufbauend auf den zuvor dargestellten Ergebnissen in AP3, etablierte Prozessparameter der α -Humulen Produktion mittels *C. necator* pKR-hum variiert und optimiert. Dazu gehörte die Zusammensetzung des Minimalmediums, die L-Rhamnose Induktion und die Prozesstemperatur. Darüber hinaus wurde der Produktionsprozess in die zuvor beschriebenen zwei Temperaturphasen unterteilt. Dafür wurde zuerst das Wachstum von *C. necator* pKR-hum unter verschiedenen Fruktosekonzentrationen zwischen 2 und 32 g/L im Standardminimalmedium in einer uninduzierten (Abbildung 17 - A) und einer induzierten Kultur (Abbildung 17 - B) aufgezeichnet. Darüber hinaus wurden die Wachstumsrate μ_{max} , der Restfruktosegehalt nach 24 h, die Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ und $Y_{P/S}$, sowie die α -Humulen Konzentrationen nach 16 h Produktion bestimmt (Abbildung 17 - C).



$C_{fructose\ initial}$ [g/L]	μ_{max}		$C_{fructose\ 24\ h}$ [g/L]		$Y_{X/S\ 24\ h}$		$Y_{P/X\ 16\ h}$	$Y_{P/S\ 16\ h}$	$C_{\alpha\text{-humulene}\ 16\ h}$ [mg/L]
	no induction	induction	no induction	induction	no induction	induction	induction	induction	induction
2	0.159 ± 0.012	0.230 ± 0.050	0	0	0.351 ± 0.005	0.410 ± 0.033	2.599 ± 0.056	1.067 ± 0.107	2.12 ± 0.12
4	0.147 ± 0.008	0.151 ± 0.013	0.89 ± 0.17	0	0.339 ± 0.041	0.369 ± 0.007	3.201 ± 0.332	1.183 ± 0.140	4.72 ± 0.46
8	0.193 ± 0.012	0.160 ± 0.009	4.91 ± 0.08	4.00 ± 0.60	0.390 ± 0.008	0.349 ± 0.099	3.642 ± 0.469	1.232 ± 0.341	4.57 ± 0.61
16	0.210 ± 0.020	0.165 ± 0.005	12.70 ± 0.30	12.44 ± 0.12	0.405 ± 0.051	0.369 ± 0.029	4.350 ± 0.854	1.623 ± 0.405	5.68 ± 1.16
32	0.177 ± 0.012	0.131 ± 0.009	26.49 ± 0.11	28.26 ± 0.29	0.232 ± 0.013	0.247 ± 0.018	4.578 ± 0.582	1.748 ± 0.094	6.52 ± 0.16

Abbildung 17: (A) Wachstum von *C. necator* pKR-hum in Abhängigkeit von verschiedenen Fruktosekonzentrationen in Minimalmedien, 180 U/min und 30 °C, uninduziert (n = 3); (B) Wachstum von *C. necator* pKR-hum in Abhängigkeit von verschiedenen Fruktosekonzentrationen in Minimalmedien, 180 U/min und 30 °C, induziert mit 0,2 % (v/v) L-Rhamnose bei 0,2 - 0,3 g/L Biomasse und anschließende Zugabe von 20 % (v/v) n-Dodekan, siehe Pfeil (n = 3); (C) Leistungsindikatoren des *C. necator* pKR-hum Wachstums und der α -Humulen Produktion der induzierten Kulturen (B) nach 16 h Produktionszeit

Unter Berücksichtigung des dargestellten Wachstumsverhaltens von *C. necator* pKR-hum und der berechneten Leistungsindikatoren und Ausbeutekoeffizienten konnte eine geeignete Konzentration von 8 g/L Fruktose bestätigt werden, die am Ende des Produktionsprozesses sogar noch Restfruktose aufweist. Der Biomasse/Substrat Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ für Fruktose ist bei dieser Konzentration mit bis zu 0,39 ebenfalls hoch. Im nächsten Schritt wurde das Wachstum von *C. necator* pKR-hum bei verschiedenen Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat- und Eisen(II)-

sulfat-Heptahydrat-Konzentrationen zwischen dem 1- und 15-fachen der Standardmenge (0,75 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) im Standard-Minimalmedium in einer uninduzierten Kultur aufgezogen (Abbildung 18). Zu diesem Zweck wurde die Standardzusammensetzung des Minimalmediums mit den entsprechenden Konzentrationen von Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat bzw. Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat supplementiert.

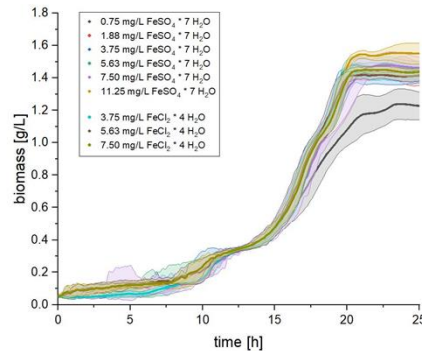


Abbildung 18: *C. necator* pKR-hum Wachstum in Abhängigkeit von verschiedenen Eisen(II)-sulfat Heptahydrat und Eisen(II)-chlorid Tetrahydrat Konzentrationen in Minimalmedium; 180 U/min und 30 °C, uninduziert (n = 3)

Es konnte gezeigt werden, dass eine minimale Erhöhung der Eisen(II)-sulfat Heptahydrat Konzentration von 0,75 auf 1,88 mg/L ausreichte und zu einem erhöhten Wachstum der Biomasse von *C. necator* pKR-hum führte. Um mögliche Einschränkungen auszuschließen, konnte im Minimalmedium somit eine 5-fache Erhöhung (3,75 mg/L) der etablierten Eisen(II)-sulfat Heptahydrat Konzentration zur Optimierung des Wachstums bestätigt werden. Nach den Untersuchungen zur Minimalmedienoptimierung wurde ein möglicher Einfluss der Konzentration des L-Rhamnose Induktors auf die α -Humulen Produktion getestet. Dafür wurde die α -Humulen Konzentration von *C. necator* pKR-hum 48 h nach Induktion mit 0,2 bzw. höheren Konzentrationen von 1 und 2 % (v/v) L-Rhamnose zu einem Induktionszeitpunkt von 0,2 - 0,3 g/L Biomasse analysiert (Abbildung 19).

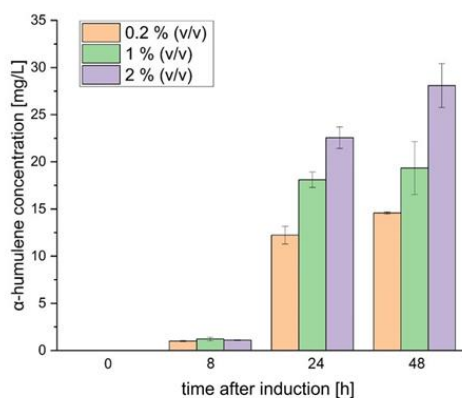


Abbildung 19: α -Humulen Konzentrationen in Abhängigkeit von verschiedenen L-Rhamnose Induktorkonzentrationen in Minimalmedien, 180 U/min und 30 °C, *C. necator* pKR-hum induziert bei 0,2 - 0,3 g/L Biomasse (n = 3)

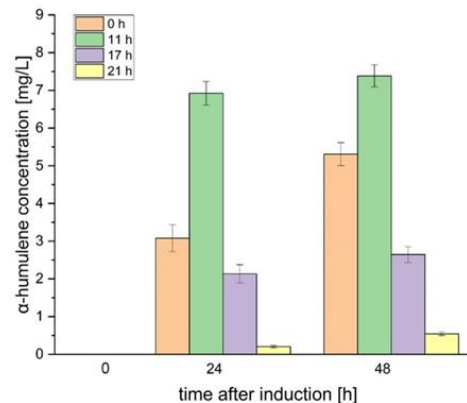


Abbildung 20: α -Humulen Konzentrationen in Abhängigkeit von unterschiedlichen L-Rhamnose Induktionszeitpunkten in Minimalmedien, *C. necator* pKR-hum induziert mit 0,2 % (v/v) L-Rhamnose bei einer Biomasse von 0,043 g/L (0 h), 0,25 g/L Biomasse (11 h), 0,90 g/L Biomasse (17 h) und 1,20 g/L Biomasse (21 h); 180 U/min und 30 °C (n = 3)

Die Erhöhung der L-Rhamnose Induktorkonzentration von 0,2 % (v/v) auf 1 bzw. 2 % (v/v) führte zu einem Anstieg der finalen α -Humulen Konzentrationen um 33 % bzw. 93 % nach

48 h Produktionszeit. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Variation des Induktionszeitpunktes auf die α -Humulen Produktion, sowie eine mögliche Aufnahme oder ein Verbrauch von L-Rhamnose bis zu 48 h nach Induktion (Zugabe), analysiert. Dafür wurde der Induktionszeitpunkt der Kulturen in verschiedenen Wachstumsphasen zwischen 0 und 21 h nach dem Animpfen gewählt und durchgeführt (Abbildung 20). Eine frühe Induktion mit L-Rhamnose direkt nach dem Animpfen der Hauptkulturen (0 h) kann das weitere Zellwachstum und den Energiestoffwechsel beeinflussen, was hier zu niedrigeren α -Humulen Konzentrationen führte. Eine späte Induktion (17 und 21 h), nahe der stationären Phase bei geringerer Performance der Zellen, verringerte ebenfalls die Konzentrationen. Der optimale Induktionszeitpunkt für *C. necator* pKR-hum innerhalb der getesteten Zeiten liegt somit in der exponentiellen Wachstumsphase 11 h nach dem Animpfen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *C. necator* pKR-hum extrazelluläre L-Rhamnose weder speichert noch verbraucht, da der Gehalt im extrazellulären Minimalmedium über die Produktionszeit von 48 h hinweg konstant blieb (Abbildung 21 - B). Um einen möglichen Einfluss der Konzentration des L-Rhamnose Induktors auf die α -Humulen Produktion zu bestätigen, wurden die zeitabhängige Biomasse- und Substrat-Konzentrationen (Fruktoseanalyse mittels HPLC) nach Zugabe von 0,2, 1 bzw. 2 % (v/v) L-Rhamnose analysiert und damit die dazugehörigen Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ und $Y_{P/X}$ bestimmt (Abbildung 21 - A, C und D).

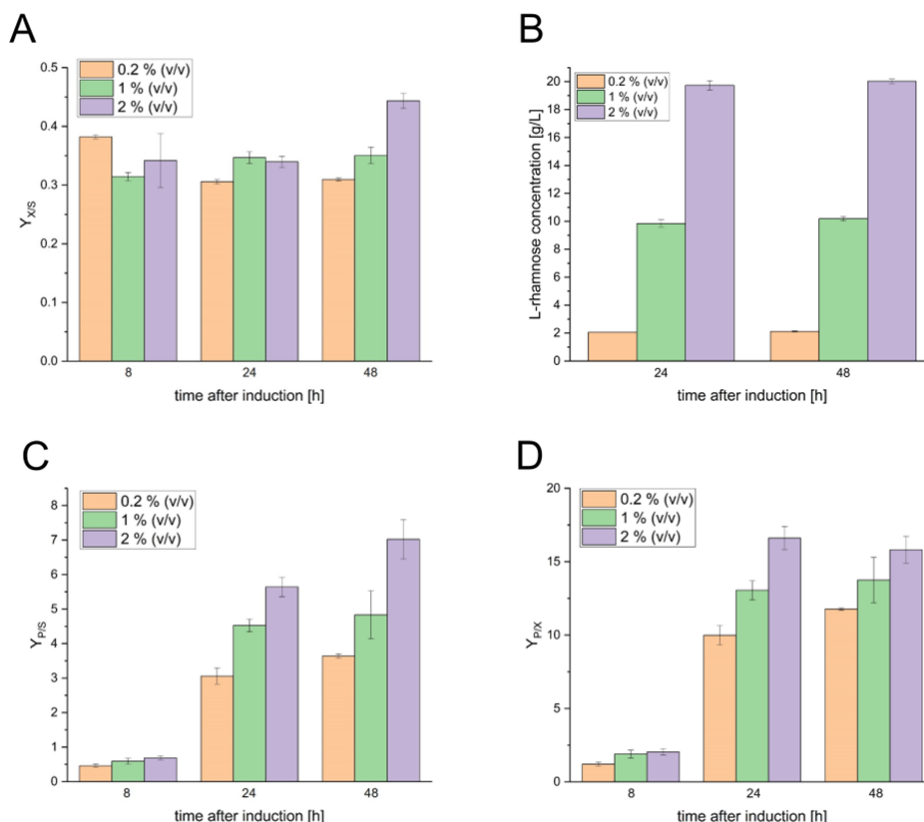


Abbildung 21: (A) Biomasse/Substrat-Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ von *C. necator* pKR-hum in Abhängigkeit der Konzentration des L-Rhamnose Induktors und Zeit nach Induktion in Minimalmedien (n = 3); (B) Zeitabhängigkeit verschiedener L-Rhamnose Konzentrationen nach Induktion von *C. necator* pKR-hum in Minimalmedien (n = 3); (C) Produkt/Substrat-Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ von *C. necator* pKR-hum in Abhängigkeit der Konzentration des L-Rhamnose Induktors und Zeit nach Induktion in Minimalmedien (n = 3); (D) Produkt/Biomasse-Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/X}$ von *C. necator* pKR-hum in Abhängigkeit der Konzentration des L-Rhamnose Induktors und Zeit nach Induktion in Minimalmedien (n = 3); alle Kolben wurden bei 180 U/min und 30 °C kultiviert, Induktion bei 0,2 - 0,3 g/L Biomasse

Nach den Medienoptimierungen und L-Rhamnose Tests wurde nun ein möglicher Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die finale α -Humulen Konzentration untersucht, indem die Produktion von α -Humulen durch *C. necator* pKR-hum in Abhängigkeit von der Prozesstemperatur analysiert wurde (Abbildung 22). Alle Testkolben wurden bei 180 U/min und 30 °C bis zur

Induktion im Bereich von 0,2 - 0,3 g/L Biomasse mit 0,2 % (v/v) L-Rhamnose kultiviert. Nach der Induktion wurde die Kultivierungstemperatur auf 25 bzw. 20 °C abgesenkt oder als Kontrolle bei 30 °C belassen. Diese Kultivierungstemperaturen wurden dann bis zum Ende des Experiments beibehalten.

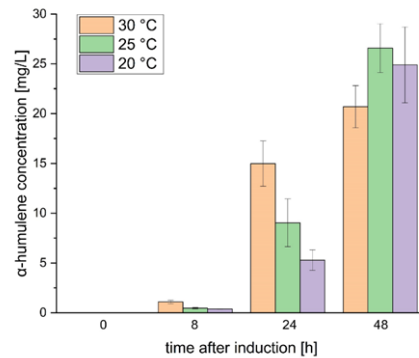


Abbildung 22: α-Humulene Konzentrationen unter verschiedenen Kultivierungstemperaturen in Minimalmedien nach Induktion, *C. necator* pKR-hum induziert mit 0,2 % (v/v) L-Rhamnose bei 0,2 - 0,3 g/L Biomasse, 180 U/min und 30 °C bis zur Induktion, dann Wechsel auf 25 bzw. 20 °C (n = 3)

Der Anstieg der finalen α-Humulene Konzentration 48 h nach Induktion betrug 28 % bei 25 °C und 20 % bei 20 °C im Vergleich zur Kultivierungstemperatur von 30 °C. Die entsprechenden Produktausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ und $Y_{P/X}$ bestätigen diesen beobachteten Effekt nach 48 h Produktionszeit und sind nachfolgend dargestellt (Abbildung 23 - A, B).

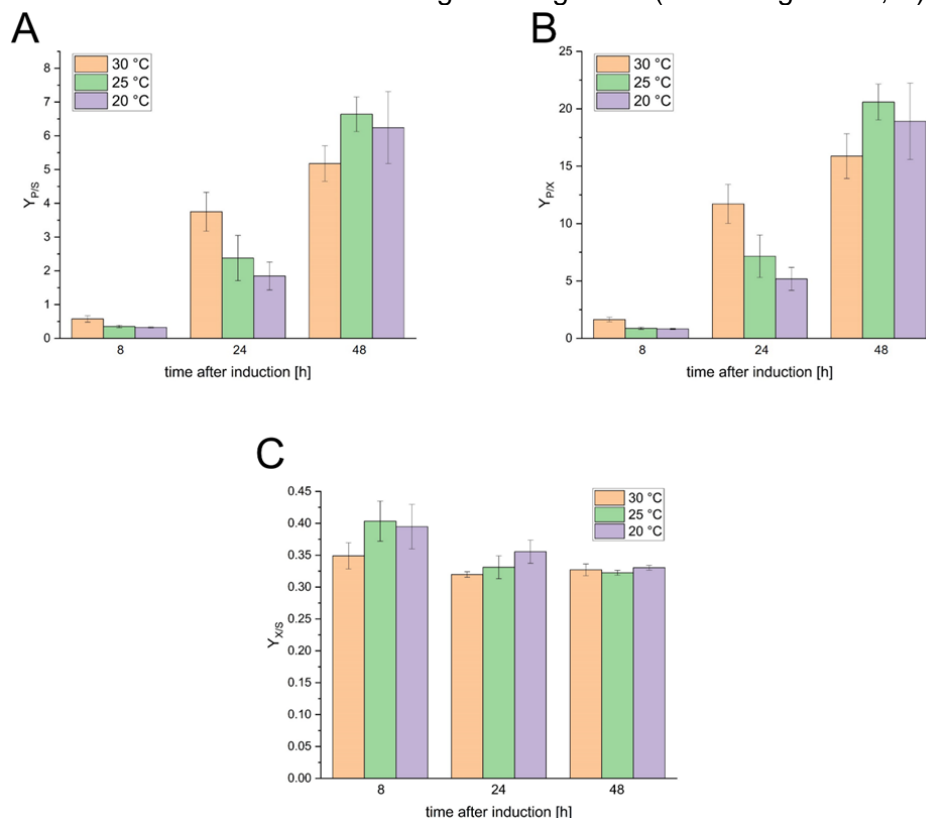


Abbildung 23: (A) Produkt/Substrat-Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/S}$ von *C. necator* pKR-hum in Abhängigkeit von verschiedenen Kultivierungstemperaturen und Zeiten nach der Induktion in Minimalmedien (n = 3); (B) Produkt/Biomasse-Ausbeutekoeffizienten $Y_{P/X}$ von *C. necator* pKR-hum in Abhängigkeit von verschiedenen Kultivierungstemperaturen und Zeiten nach der Induktion in Minimalmedien (n = 3); (C) Biomasse/Substrat-Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ von *C. necator* pKR-hum in Abhängigkeit von verschiedenen Kultivierungstemperaturen und Zeiten nach der Induktion in Minimalmedien (n = 3); alle Kolben wurden bei 180 U/min und 30 °C bis zur Induktion bei 0,2 - 0,3 g/L Biomasse mit 0,2 % (v/v) L-Rhamnose kultiviert - dann auf die entsprechende Kultivierungstemperatur umgestellt

Um eine mögliche Auswirkung der Zusammensetzung der Vorkulturmedien auf das Wachstum der Hauptkulturen zu ermitteln, wurden *C. necator* pKR-hum Vorkulturen über Nacht in SOB- und LB-Medien bei 180 U/min und 30 °C angesetzt. Hauptkulturen in Standard-Minimalmedium wurden zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,10 (entspricht 0,043 g/L Biomasse) aus SOB- oder LB-Vorkulturen angeimpft und bei 180 U/min und 30 °C kultiviert (Abbildung 24 - A). Darüber hinaus wurde die Kultivierungstemperatur der Hauptkulturen nach dem Animpfen aus LB-Vorkulturen auf 25, 30, 32 oder 35 °C variiert und das Zellwachstum aufgezeichnet (Abbildung 24 - B).

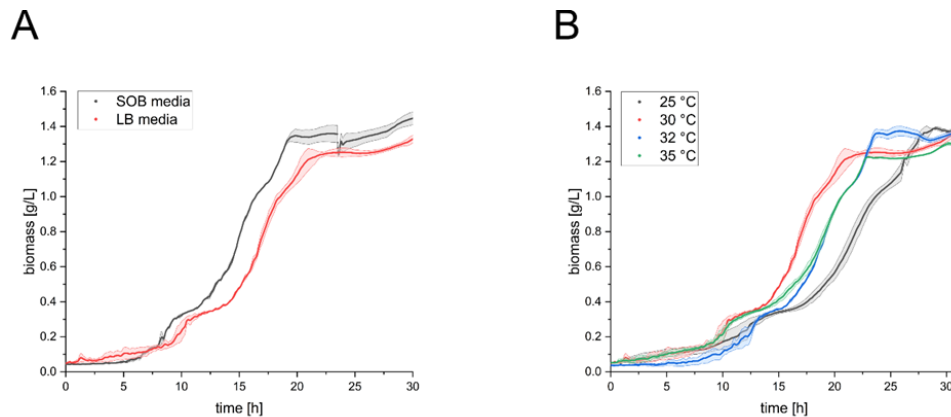


Abbildung 24: (A) Wachstum der *C. necator* pKR-hum Hauptkulturen in Minimalmedien nach Animpfen aus SOB- oder LB-Medien Vorkulturen, 180 U/min und 30 °C, uninduziert (n = 3); (B) Wachstum der *C. necator* pKR-hum Hauptkulturen in Minimalmedien unter verschiedenen Kultivierungstemperaturen, 180 U/min und uninduziert (n = 3)

Die Variation der Kultivierungstemperatur von z.B. 30 auf 25 °C wirkte sich verzögernd auf das Wachstumsverhalten der *C. necator* pKR-hum Hauptkulturen in Minimalmedien aus, mit einer verlängerten exponentiellen Phase und einer bis zu 6 h später einsetzenden stationären Phase (Abbildung 24 - B). Es ist zu erkennen, dass die etablierte Standardtemperatur von 30 °C unter den getesteten Temperaturen zu einem optimalen Wachstum führte. Eine Erhöhung der Temperatur auf 32 oder 35 °C führte zu einer verlängerten Lag- und Exponentialphase von bis zu 2,5 h im Vergleich zu 30 °C, aber zu ähnlichen Endbiomassen im Bereich von 1,3 - 1,4 g/L. Nach der Anpassung und Optimierung der zuvor gezeigten Einzelschritte gegenüber den etablierten Standardbedingungen im Produktionsprozess von α -Humulen, stellte sich die Hauptfrage, wie sich die Kombination von diesen Optimierungen auf die Gesamtprozessleistung auswirken würde. Die Standardparameter wurden, aufbauend auf den zuvor gezeigten Ergebnissen, um die folgenden Erkenntnisse erweitert. Optimierungen des Minimalmediums: (i) 8 statt 4 g/L Fruktose und (ii) die Zugabe von 3,75 mg/L Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat. Optimierungen des Induktionsschritts: (iii) 2 % statt 0,2 % (v/v) L-Rhamnose und (iv) Absenkung der Kultivierungstemperatur von 30 auf 25 °C, 24 h nach dem Induktionsschritt. Die α -Humulen Konzentrationen wurden 8, 24 und 48 h nach dem Induktionsschritt unter etablierten Standardbedingungen und den optimierten Bedingungen bei 25 und 20 °C gemessen und verglichen (Abbildung 25).

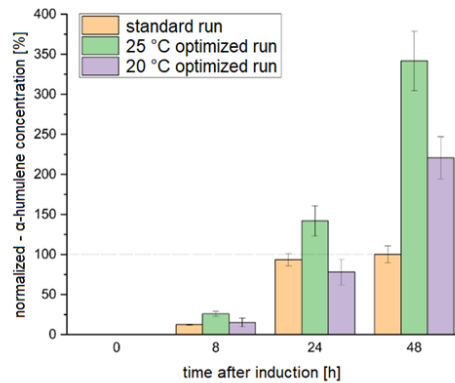


Abbildung 25: α -Humulen Konzentrationen im Vergleich zwischen Standard- und optimierten Bedingungen und Temperaturen (n = 3); *C. necator* pKR-hum Kultivierung 180 U/min und 30 °C, Standardprozess induziert mit 0,2 % (v/v) L-Rhamnose bei 0,2 - 0,3 g/L Biomasse / optimierter Prozess induziert mit 2 % (v/v) L-Rhamnose bei 0,2 - 0,3 g/L Biomasse, dann Wechsel zu 25 bzw. 20 °C Kultivierungstemperatur 24 h nach Induktion, zusätzlich Minimalmedium mit 8 g/L Fruktose und 3,75 mg/L Eisen(II)-sulfat Heptahydrat

Abbildung 25 zeigt, dass eine kontinuierliche Kultivierungstemperatur von 30 °C in Kombination mit den etablierten Standardparametern (Standardlauf, normiert auf 48 h Wert) zu deutlich niedrigeren finalen α -Humulen Konzentrationen als der optimierte Lauf bei 25 °C zu den Messzeitpunkten 8, 24 und 48 h nach Induktion führte. Diese Steigerungen der finalen α -Humulen Konzentrationen nach 48 h Produktionszeit unter optimierten Prozessbedingungen betrugen 242 % bei 25 °C und 121 % bei 20 °C im Vergleich zu den finalen α -Humulen Konzentrationen nach 48 h Produktionszeit mit Kultivierung bei 30 °C unter etablierten Standardbedingungen. Ziel dieses Arbeitspaketes war die Optimierung der mikrobiellen α -Humulen Produktion, um die Biomasse- und Terpenproduktion von *C. necator* pKR-hum zu erhöhen. Die Analyse und Variation der Prozessparameter war erfolgreich. Die optimierten Parameter, die zu einer gesteigerten Biomasse- und α -Humulen Produktion führten, sind: eine Fruktosekonzentration von 8 g/L, eine Eisen(II)-Sulfat Heptahydrat Konzentration von 3,75 mg/L, eine L-Rhamnose Konzentration von 2 % (v/v) und die Aufteilung des gesamten Prozesses in zwei Kultivierungstemperaturphasen von 30 und 25 °C. Die Kombination der optimierten Einzelparameter führte zu einer Erhöhung der finalen α -Humulen Konzentration um 242 % im Vergleich zu dem nicht optimierten Prozess. Somit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, den auf *C. necator* pKR-hum basierenden α -Humulen Produktionsprozess durch Screening und Anpassung der Standardparameter zu optimieren.

Im *C. necator* pKR-hum basierten Produktionsprozess von α -Humulen wurden weiterhin Bilanzierungen des Kohlenstoffs, Stickstoffs und Sauerstoffs durchgeführt. Es wurden insgesamt weit mehr als 100 Fermentationen erfolgreich durchgeführt. Dabei wurden auch verschiedene Prozesskonditionen und Parameter variiert und bei Erfolg als Optimierung implementiert, sowie deren Robustheit bzw. die gesamte Prozessrobustheit bestimmt. Durch die erfolgreiche Bearbeitung der Arbeitspakete und die damit verbundene gesteigerte Prozessperformance hinsichtlich Biomasse- und α -Humulenbildung, wurde ausreichend α -Humulen (>10 g) in den vielzähligen Fermentationen unter optimierten Prozessbedingungen hergestellt und dienen als Mustermengen.

Zusammenfassung/Abgleich

Die folgende Tabelle zeigt den Endstatus der geplanten und in der Projektbeschreibung dargestellten Meilensteine (dargestellt sind nur die Meilensteine, für die die THM verantwortlich war). Es wurden alle geplanten Meilensteine erreicht (siehe Anmerkung unten).

Tabelle 1: Endstatus der Meilensteine (MS)

Meilenstein	Endstatus
Gene des MVA-Weges und benötigte Terpensynthase(n) sind in das Genom integriert	Erreicht (*)
Ein skalierbares DSP-Konzept ist entwickelt	Erreicht
Eine robuste Kultivierungsstrategie ist verfügbar und wurde in mindestens 8 Fermentationen bewertet	Erreicht
Modellbasierte Optimierung ist abgeschlossen, Bottlenecks sind identifiziert und Optimierungsszenarien entwickelt	Erreicht

(*) auf Basis der obigen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass das Ziel erreicht wurde (die Gene wurden integriert), allerdings waren die entsprechenden Proteine nicht funktionell

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die im Projekt durchgeführten Forschungsarbeiten und die dafür eingesetzten Ressourcen waren notwendig und angemessen, da sie der im Projektantrag formulierten Planung entsprachen und alle im Arbeitsplan formulierten Aufgabenschwerpunkte wissenschaftlich erfolgreich bearbeitet wurden. Die THM wendet erhebliche Mittel für die Infrastruktur und die Modernisierung der Grundausstattung der wissenschaftlichen Arbeitsgruppen auf. Sie übernahm die Arbeitsplatzkosten sowie die Kosten für Wasser und Strom. Die Mess- und Analysegeräte der THM wurden für das Projekt genutzt. Eine Finanzierung der für das beantragte Projekt erforderlichen Personalstellen, Geräteinvestitionen, Sachmittel und Reisekosten durch die THM ist nicht möglich.

Fortgeschriebener Verwertungsplans

Die folgenden Tabellen zeigen sowohl die wissenschaftlichen Erfolgsaussichten als auch die wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit aus Sicht der THM. Es werden jeweils die ursprünglichen Planungen, die bisher durchgeführten Maßnahmen sowie die geplanten weiteren Maßnahmen dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenstellung der wissenschaftlichen und/oder technischen Erfolgsaussichten

Gegenstand/Instrument	Ursprüngliche Planung	Erfolgte Umsetzung	Weitere Planung
Erstellung von Publikation mit (Teil)-Ergebnissen in nationalen und internationalen Fachtagungen	Während der Laufzeit, 0 – 2 Jahre nach Abschluss	Ja, im Rahmen des Projekts ProNector wurden bisher 4 Publikationen erstellt (siehe Erfolgte und geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse).	2 weitere Publikationen sind in Vorbereitung
Wissenschaftliche Vorträge	Während der Laufzeit, 0 – 2 Jahre nach Abschluss	Ja, das Projekt wurde im Rahmen der „Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering 2024 - Novel Strategies and Technologies for Sustainable Bioprocesses and	Teilaspekte werden in weiteren Vorträgen der breiten Öffentlichkeit dargestellt.

Gegenstand/Instrument	Ursprüngliche Planung	Erfolgte Umsetzung	Weitere Planung
		Bioproducts, 6.-8. Mai 2024, Regensburg vorgestellt.	
Übernahme der Ergebnisse in die Lehre der Hochschule	0 – 5 Jahre nach Abschluss der Arbeiten	Ja, sowohl an der THM als auch am KIT sind die Ergebnisse Bestandteil von Vorlesungen.	Diese Maßnahme wird weitergeführt.
Qualifizierung von Fach- und Führungskräften	0 – 10 Jahre nach Abschluss der Arbeiten	Ja, es wurden bisher zwei Bachelorarbeiten auf dem Themengebiet durchgeführt. Die Promotion von L. Becker wird 2025 erfolgen.	Diese Maßnahme wird weitergeführt.

Tabelle 3: Darstellung der wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Anschlussfähigkeit

Gegenstand/Instrument	Ursprüngliche Planung	Erfolgte Umsetzung	Weitere Planung
Weiterführung von Forschungs-Partnerschaften (Forschung, Politik, Industrie)	0 – 5 Jahre nach Abschluss der Arbeiten	Ja, wichtige Aspekte des Projektes (Robustheit) werden in dem BMBF-Projekt „GreenProScale - Prozessintegration und Scale-Up einer Grünschnitt-Bioraffinerie unter Berücksichtigung der Robustheit des Systems“ FKZ: 031B1497B	Es wurde ein weiterer Antrag im Rahmen des Programmes „Richtlinie zur Förderung von Vorhaben der strategischen Projektförderung mit der Republik Singapur zum Thema „Kreislaufwirtschaft“,“ eingereicht.

Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die kontinuierliche Recherche (wissenschaftliche Literatur und Patente) während der Projektlaufzeit ergab keine Ergebnisse, die der Zielerreichung entgegenstehen.

Erfolgte und geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse

Es wurden bisher 4 Publikationen im Zusammenhang mit dem ProNecator Projekt veröffentlicht:

- Milker, S., Sydow, A., Torres-Monroy, I., Jach, G., Faust, F., Kranz, L., Tkatschuk, L., Holtmann, D. Gram-scale production of the sesquiterpene α -humulene with *Cupriavidus necator*. *Biotechnology Bioengineering*. **2021**, 118, 2694–2702. <https://doi.org/10.1002/bit.27788> (Anmerkung: diese Publikation ist am Übergang zwischen dem aktuellen Projekt und dem Vorgängerprojekt entstanden)

- Becker, L., Strum, J., Eiden, F., Holtmann, D. Analyzing and understanding the robustness of bioprocesses. *Trends in Biotechnology* **2023**, *41*, 8. https://doi.org/10.1002/14356007.e08_e01.pub3
- Sydow, A.; Becker, L.; Lombard, E.; Ulber, R.; Guillouet, S.E.; Holtmann, D. Autotrophic Production of the Sesquiterpene α -Humulene with *Cupriavidus necator* in a Controlled Bioreactor. *Bioengineering* **2023**, *10*, 1194. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10101194>
- Becker, L., Holtmann, D. Anti-inflammatory effects of α -humulene on the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-induced THP-1 cells. *Cell Biochem Biophys* **2024**, *82*, 839–847. <https://doi.org/10.1007/s12013-024-01235-7>

Die weiteren geplanten Publikationen zielen (i) auf die Optimierung der α -Humulen-Produktion (basierend auf den Ergebnissen des AP3 und AP4) und (ii) auf die Robustheit der Prozesse (ebenfalls basierend auf den Ergebnissen des AP4).