

Abschlussbericht

zum Projekt

zur

**Überwachung biotechnologischer Prozesse mittels
Diacetyl-/Acetoin-Biosensor und Evaluierung von
Acetoin-Reduktasen zur Verwendung in
Biotransformationen**

**Projektbeteiligte: Prof. Dr. Petra Siegert
Prof. Dr. Johannes Bongaerts
Prof. Dr. Torsten Wagner
Prof. Dr. Michael J. Schöning
Prof. Dr. Thorsten Selmer**

**Institut für Nano- und Biotechnologien der
FH Aachen**

Laufzeit: 01.01.2016 – 31.12.2019 (verlängert bis 31.12.2020)

Förderkennzeichen: 322-8.03.04.02-FH-Struktur 2016/02

Gefördert durch:

Ministerium für Innovation,
Wissenschaft und Forschung
des Landes Nordrhein-Westfalen



I. Kurzdarstellung des Projekts Überwachung biotechnologischer Prozesse mittels Diacetyl-/Acetoin-Biosensor und Evaluierung von Acetoin-Reduktasen zur Verwendung in Biotransformationen

Aufgabenstellung

Ziel des durchgeführten Forschungsvorhaben war es, enzymatische Systeme auf der Basis von Acetoin-Reduktasen/Butandioldehydrogenasen zu etablieren. Eine Biosensoranordnung zur qualitativen und quantitativen Erfassung von Diacetyl (Butan-2,3-on) und (R/S)-Acetoin (Butan-2-on-3-ol) für eine mögliche online-Überwachung von biotechnologischen Prozessen sollte entwickelt werden. Mehrere Enzyme sollten zunächst rekombinant produziert und charakterisiert werden. Ein weiteres Ziel war es, diese Enzyme in Biotransformationen einzusetzen und ihr Substrat und Produktspektrum zu evaluieren.

Wissenschaftlicher und technischer Sachstand, an den angeknüpft wurde

I) **Einsatz von Acetoin-Reduktasen in Biotransformationen zur Synthese chiraler Moleküle:** die auch für den Acetoin-Sensor produzierten und bewerteten Enzyme sind wertvolle Biokatalysatoren zur Synthese chiraler Moleküle. So werden das enantiomerenreine (R,R)-2,3-Butandiol bzw. das (S,S)-2,3-Butandiol eingesetzt, um den chiralen Übergangsmetall-Katalysator Chiraphos[®] herzustellen, mit dem in der technischen enantioselektiven Katalyse hohe Enantiomerenüberschüsse erzielt werden. Auch diverse verwandte Moleküle, weitere 2-Hydroxyketone bzw. Diole, können enzymatisch mittels der hier beschriebenen Enzyme synthetisiert werden und ggf. als Synthesebausteine in pharmazeutisch interessanten Molekülen, oder auch als Aromastoffe oder Pheromone eingesetzt werden [1]. Dehydrogenasen mit ähnlichen Reaktionen sind bereits beschrieben, Enzyme mit hohen Spezifitäten für solch kleine Moleküle waren vor Beginn des Projekts nur wenig erforscht.

II) **Einsatz des Sensors zur Prozesskontrolle:** Im so genannten Überfluss-Stoffwechsel findet eine unvollständige Oxidation des Substrats Glucose statt. Im Falle von *Bacillus*-Spezies, zu denen wichtige industriell genutzte Produktionsorganismen gehören, sind dies v. a. Acetoin und 2,3-Butandiol. Der Zeitpunkt der Bildung dieser Metabolite ist entscheidend für die Prozesskontrolle, z.B. Start der Substrat-Zufütterung. Die Standardanalyse mit chromatographischen Methoden (GC oder HPLC) ist zu zeitaufwändig, d. h. die Ergebnisse liegen zu spät vor, um noch rechtzeitig in den laufenden Prozess einzugreifen. Ein Ansatz zeitnäher (*at-line*) den Fermentationsprozess zu verfolgen, wurde mit Hilfe von elektrischen DNA-Chips verfolgt [2]. Dabei wurde zunächst ein schneller Prozess zur mRNA-Isolation entwickelt, um anschließend ausgewählte Marker-mRNAs nach Hybridisierung auf dem Chip zu quantifizieren. Als Marker für die Glucose-Verfügbarkeit wurde das Gen *acoA* verwendet, das für die E1-Komponente der Acetoin-Dehydrogenase codiert. Trotz weiterer Optimierungen und Automatisierung konnte die Analysezeit nur auf eine Stunde reduziert werden, so dass auch dieser Weg abgesehen vom apparativen Aufwand noch weit von einer online-Analytik entfernt ist [2]. Erst kürzlich wurde ein neuer Ansatz beschrieben, der mittels Nah-Infrarot-Spektroskopie tatsächlich eine online-Verfolgung der Acetoin-Bildung während der Fermentation erlaubt [3]. Hohe Kosten und der apparative Aufwand schränken diesen Ansatz jedoch auf Großunternehmen ein. Ein

unmittelbares sowie einfaches und kostengünstiges Verfahren zur Erfassung der Überflusstoffwechsel-Metaboliten stand zu Beginn des Projekts nicht zur Verfügung.

III) Einsatz des Sensors bei der Wein- und Bierherstellung: Bei der Wein- und Bierherstellung stellen Aroma und Geschmack des Diacetyl und Acetoin entscheidende Qualitätsmerkmale dar. So ist das durch das Diacetyl hervorgerufene Butteraroma in Bier unerwünscht. Ebenso kann Diacetyl im Wein geschmacklich stören. Die schnelle, einfache und kostengünstige Analyse der Stoffe reduziert die Lagerzeiten und optimiert damit den Prozess. Vor Beginn des Projekts es gab keinen vergleichbaren Sensor.

Ablauf des Vorhabens

Das Projekt war für den Zeitraum 01.01.2016 – 31.12.2019 (2 Jahre FHprofunt gefördert, 2 Jahre FH Aachen) geplant, eine kostenneutrale Verlängerung bis zum 31.12.2020 wurde zwischenzeitlich vereinbart. Die Arbeiten wurden inhaltlich an der FH Aachen durchgeführt, die erste Promotion (Lukas Muschallik) erfolgte 01/2021 an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. Die zweite Doktorandin (Frau Welden, geb. Jablonski, M.Sc., geplante Promotion an der Philipps-Universität Marburg, 2022), arbeitete ab 14.08.2017 an der Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung amperometrischer und kapazitiver Biosensorstrukturen.

Überblick über die wesentlichen Projektergebnisse

Einsatz von Acetoin-Reduktasen in Biotransformationen zur Synthese chiraler Moleküle

- Es wurden insbesondere das S-spezifische Enzym aus *Bacillus licheniformis* DSM 13^T und das R-spezifische Enzym aus *Bacillus clausii* DSM 8716^T rekombinant produziert und im Detail untersucht, sowie in Synthesen eingesetzt [4,6,7].
- **Einsatz des Sensors zur Prozesskontrolle und bei der Wein- und Bierherstellung:** Eine Biosensoranordnung in Siliziumtechnik zum Diacetyl/Acetoin-Nachweis zur Überwachung der Diacetyl und Acetoin-Bildung in Brau- und allgemein Fermentationsprozessen konnte erfolgreich etabliert werden [5,8,9]. In Proben aus Fermentationsbrühen und Rotwein- und Bier-Proben konnten Acetoin-Konzentrationen erfolgreich zwischen 1 µM und 500 µM detektiert werden.

Literatur

[1] Kochius S. et al. (2014) *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **103**, 61; [2] Pioch, D. et al. (2007) *T. Eng. Life Sci.* **7**, 373; [3] Pioch, D. et al. (2008) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 953. [4] Muschallik L. et al., *Journal of Biotechnology* (2017), 258, 41-50. [5] Molinnus D. et al., *Biosensors and Bioelectronics* 115 (2018) 1–6. [6] Muschallik L. et al., *RSC Advances*, 2020, **10**, 12206-12216. [7] Muschallik L. et al., *Journal of Biotechnology* (324) 2020, 61-70. [8] Jablonski M. et al., *Physica Status solidi A*, 2021, 2000765. [9] Welden M. et al., *Chemosensors*, 2022, 10, 218.

II. Eingehende Darstellung

Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse

Im Forschungsvorhaben wurde eine Biosensoranordnung zur qualitativen und quantitativen Erfassung von Diacetyl (Butan-2,3-on) und (R/S)-Acetoin (Butan-2-on-3-ol) für eine mögliche online-Überwachung von biotechnologischen Prozessen entwickelt. Hierzu wurde ein enzymatisches System auf der Basis von Acetoin-Reduktasen entwickelt, Enzymen die zunächst rekombinant produziert und charakterisiert wurden. Diese Enzyme finden gleichermaßen Anwendung in Biotransformationen zur Synthese chiraler Moleküle.

Wissenschaftliche Ergebnisse und Stand der Arbeiten im Vergleich zum Projektplan:

I) Einsatz von Acetoin-Reduktasen in Biotransformationen

Die Klonierung insgesamt sechs neuer Gene ist erfolgt und die Genprodukte in *E. coli* überexprimiert. Zwei neuartige Enzyme, die Butandioldehydrogenasen/Acetoin-Reduktasen aus *Bacillus clausii* bzw. *Bacillus licheniformis*, wurden erfolgreich biochemisch und enzymologisch charakterisiert (s. Liste der Projektpublikationen). Die Bewertung der beiden ausgewählten Enzyme hinsichtlich ihres Einsatzes in der Synthese chiraler Verbindungen wurde im Verlauf der Promotion und in mehreren studentischen Abschlussarbeiten intensiv bearbeitet. Insbesondere das Substratspektrum der Enzyme wurde untersucht und dabei wissenschaftlich überraschend gefunden, dass von dieser Enzymklasse nicht ausschließlich kleine aliphatische Moleküle akzeptiert und umgesetzt werden, sondern dass auch aromatische Substanzen als Substrate dienen können.

Außerdem erfolgte ein Up-scale (in den Labormaßstab) der biokatalytischen Synthesen. Hierbei wurde zunächst vorrangig das Enzym aus *Bacillus clausii* als Katalysator eingesetzt. Hierzu erfolgte zunächst erfolgreich der Aufbau einer geeigneten Analytik, auch für einige der nicht kommerziell erhältlichen Produkte, sowie erste Versuche in einem Enzym-Membran-Reaktor (kontinuierlicher Rührkessel Reaktor). Im weiteren Verlauf der Arbeiten erfolgte eine Optimierung der biokatalytischen Synthesen im Labormaßstab incl. Aufarbeitung und Charakterisierung der chiralen (und oft enantiomerenreinen) Produkte. Als interessante Zielmoleküle wurden 5-Methyl-2-hydroxy-3-hexanon und 5-Methyl-3-hydroxy-2-hexanon identifiziert. Diese sind als Aromastoffe bekannt und deren Einsatz in z.B. Schokoladenmilchdrinks wird von der Firma Givaudan S.A., Vernier-Genève in einem Patent geclaimt (2004, EP0952140).

Auch das Enzym aus *Bacillus licheniformis* wurde im Verlauf des Projekts weiter biochemisch und biokatalytisch bearbeitet. Es konnte anfänglich gezeigt werden, dass diese BDH zu dem aus Enzym aus *B. clausii* (vorwiegend (R)-Produkte) komplementäre Produkte ((S)-Produkte) bildet. Da jedoch auch diese Produkte in der Regel nicht kommerziell verfügbar sind und damit nicht als Referenzen für die Analytik zur Verfügung stehen, ist die eindeutige Identifikation der Produkte schwierig und (zeit-)aufwendig. Zudem zeichnete sich ab, dass das Enzym aus *Bacillus licheniformis* eine geringere Selektivität besitzt, als das Enzym aus *Bacillus clausii*.

Die Butandioldehydrogenase aus *Bacillus clausii* ist ein von zweiwertigen Metallionen, vermutlich Zn^{2+} , abhängiges Enzym. Der Einsatz verschiedener Metallionen beeinflussen das Enzym unterschiedlich. Hier konnte insbesondere gezeigt werden, dass die (vermutliche) Substitution des katalytischen Zn^{2+} durch Mn^{2+} die Aktivität des Enzyms um ein Vielfaches steigert. Ein Effekt, der sich auch in der Syntheseleistung wiederfindet. Um diese Effekte besser untersuchen zu können, wurde eine Mutagenesestudie zur Bindefähigkeit von Metallionen
Abschlussbericht FH-Struktur 2016/02: Diacetyl-/Acetoin-Biosensor und Evaluierung von Acetoin- 6
Reduktasen zur Verwendung in Biotransformationen

durchgeführt und die Metallionen-bindenden Aminosäuren im aktiven Zentrum ausgetauscht. Jedoch führte keiner der Aminosäureaustausche weder zu einer verbesserten Leistung des Enzyms, noch zu einem veränderten Substratspektrum.

Die Ergebnisse dieser biochemisch-biokatalytischen Arbeiten wurden in zwei weiteren Manuskripten (s. Liste der Projekt-Publikationen) veröffentlicht.

II) Einsatz des Sensors zur Prozesskontrolle bzw. III) Biosensoranordnung zur qualitativen und quantitativen Erfassung von Diacetyl (Butan-2,3-on) und Acetoin (Butan-2-on-3-ol) für eine online-Überwachung in Brauprozessen

Es gelang erstmalig, erfolgreich kapazitive Feldeffektstrukturen mit immobilisierter Acetoin-Reduktase zu implementieren. Hierzu wurden in AP3 („Entwicklung/Herstellung von amperometrischen und kapazitiven Sensorstrukturen mit aufgesetzten Mikrofluidik-strukturen“), zunächst unterschiedliche Feldeffekt-Grundstrukturen ausgewählt, prozessiert, sowie physikalisch und elektrochemisch charakterisiert. Im Falle der Sensorstruktur aus Al/p-Si/SiO₂/Ta₂O₅ konnte eine hohe, nahezu Nernst'sche pH-Sensitivität erzielt werden, die für die Ankopplung der Enzymschicht in AP4 („Immobilisierung des Enzyms auf die Sensorstrukturen“) eine der wesentlichen Grundvoraussetzungen darstellt. In diesem Arbeitspaket bestand eine besondere Herausforderung in der Etablierung einer aktivitätsschonenden und gleichzeitig stabilen Immobilisierungsstrategie des Enzyms. Diese wurde sukzessive optimiert, entsprechend wurde in AP5 („Physikalische und elektrochemische Charakterisierung der Sensoren“) der entwickelte Enzymbiosensor bezüglich seiner intrinsischen Sensoreigenschaften (wie z.B. Hysterese, Drift, Ansprechzeit, Reproduzierbarkeit, pH Optimum) charakterisiert und iterativ weiterentwickelt. Bei den Untersuchungen hat sich u.a. gezeigt, dass eine Probenzellenkonfiguration, ähnlich aufgebaut wie eine optische Messküvette, entscheidende Vorteile hat, wenn es darum geht, reproduzierbare und stabilere Biosensoren zu realisieren. Deshalb wurde die ursprünglich geplante, aufgesetzte Mikrofluidikstruktur nicht weiter favorisiert.

Die in AP3 – AP5 erzielten Ergebnisse konnten auf mehreren Fachkonferenzen vorgestellt werden und fanden vielerorts großes Interesse und Beachtung. Zusätzlich konnten die erzielten Resultate mit dem Titel: „Development and characterization of a field-effect biosensor for the detection of acetoin“ in *“Biosensors and Bioelectronics”* publiziert werden. Dieses Journal hat den derzeit mit Abstand höchsten Impact-Faktor in diesem Themenfeld (IF: 8,1739) (s. Liste der Projektpublikationen). Die erfolgreiche Publikation zeigt auch international den Stellenwert dieser Forschungsarbeiten. Da die kapazitive Feldeffektstruktur mit immobilisierter Enzymschicht sehr gute Ergebnisse lieferte und bereits sogar erste grundlegenden Experimente in Realproben durchgeführt werden konnten (Weißwein), wurde dementsprechend ein Schwerpunkt auf diese Aktivitäten während des Projektzeitraums gelegt.

Erwähnenswert sind auch die Ergebnisse mit einem neuen unkonventionellen Ansatz für die Enzymimmobilisierung (AP5) auf den kapazitiven Sensorstrukturen vorgeschlagen. Hierbei werden Tabakmosaikviren (TMV) als Nanogerüste für die spezifische Anbindung der Acetoin-Reduktase auf der Sensoroberfläche eingesetzt. Die dreidimensionale Struktur und die gezielte Anbindung der Enzyme sorgt für optimierte sterische Bedingungen wodurch Diffusionsvorgänge besser ablaufen können. Zudem können TMV-Partikel die Enzymaktivität stabilisieren und damit die Langzeitstabilität der Sensoren verbessern. Es wurden grundlegende Experimente mit dieser neuen Immobilisierungsstrategie durchgeführt. Die TMV-basierten Acetoin-Biosensoren wurden elektrochemisch in Pufferlösung mit unterschiedlichen Acetoin-

Konzentrationen charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigten, dass die TMV-basierten Acetoin-Sensoren einen deutlich größeren Detektionsbereich besitzen, wobei Acetoin-Konzentrationen zwischen 0,25 μM und 2 mM gemessen werden konnten. Zudem zeigte sich eine deutlich längere Lebensdauer der Biosensoren, die nach 72 Tagen immer noch ca. 45% ihrer Anfangssensitivität besaßen. In einer ersten Proof-of-Concept-Messung zeigte der TMV-basierte Sensor zudem einen Signalausschlag für Diacetyl in Puffer-Lösung. Aufgrund der Corona-bedingten Einschränkungen im Laborbetrieb konnten die Untersuchungen zu dieser Sensoranordnung im Jahr 2020 nicht vollständig abgeschlossen werden. Es ist über den Projektzeitraum hinaus geplant, weitere Experimente durchzuführen.

Im abschließenden Projektzeitraum des Jahres 2020 wurde, nachdem die extensiven Untersuchungen zur Herstellung eines amperometrischen Acetoinbiosensors zuvor zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führten, ein weiterer amperometrischer Ansatz zur Acetoin-Detektion untersucht. Da die Untersuchungen mit komplexen Sensorsystemen unter Verwendung von verschiedenen Mediatoren und Multi-Enzym-Systemen nicht zielführend waren, wurde abschließend die direkte elektrochemische Oxidation (bei einem hohen Arbeitspotential) von NADH an der Arbeitselektrode untersucht (wobei der NADH-Verbrauch als Indikator für die enzymatische Umsetzung des Acetoins dient). Doch auch hier konnte, trotz eingehender Untersuchungen, die amperometrische Acetoin-Detektion nicht realisiert werden.

Acetoin-Messungen in Rotwein- und Bier-Proben konnten erfolgreich durchgeführt werden (AP 6 Messungen unter Realbedingungen). Dazu wurden diese entsprechend mit verschiedenen Acetoin-Konzentrationen zwischen 1 μM und 500 μM gespiked. Die Messergebnisse mit dem hergestellten Biosensor zeigten eine konzentrations-abhängige Kalibrierkurve, die unterschiedlichen Acetoin-Konzentrationen konnten reproduzierbar erfasst werden. Der on-line Nachweis von Acetoin ist - nach wie vor - nicht zufriedenstellend im Bereich der Lebensmitteltechnologie gelöst. Insofern fanden die von uns erzielten Ergebnisse, die im Rahmen der internationalen Tagung „Engineering of Functional Interfaces“ (EnFI), 8.-9.7.2019, KU Leuven (Belgien), unter dem Titel „Two strategies for detecting acetoin during fermentation processes of alcoholic beverages“ in Form eines Kurzvortrages und eines Posters vorgestellt wurden, große Beachtung. 2020 konnten neben Messungen in alkoholischen Getränken auch erste Acetoin-Messungen in Fermentationsbrühen durchgeführt werden. Dafür wurden Fermentationsproben aus „in-house“-Reaktoren verwendet, die Subtilisin-Proteasen mit *B. subtilis* produzierten. In diesen Proben konnten gespikete Acetoin-Konzentrationen erfolgreich zwischen 1 μM und 500 μM detektiert werden. Zudem konnte das natürlich gebildete Acetoin in den Fermentationsbrühen mit dem entwickelten Acetoin-Biosensor nachgewiesen werden. Als Referenzmethode wurde hier der Acetoin-Gehalt der Proben gaschromatographisch ermittelt. Die erzielten Ergebnisse dieses Arbeitspaketes konnten unter dem Titel „Capacitive field-effect biosensor applied for the detection of acetoin in alcoholic beverages and fermentation broths“ in „physica status solidi (a)“ veröffentlicht werden. Zudem wurde diese Arbeit u.a. auf der internationalen Fachkonferenz „International Meeting on Chemical Sensors“ (IMCS), 30.05.-03.06., (online) Chicago (USA), in Form eines Vortrages präsentiert. Die von uns erzielten Ergebnisse fanden große Beachtung, was sich auch durch die Auszeichnung des Beitrages mit dem „Second Place Student Presentation Award“ abzeichnete.

Erreichen der Meilensteine (MS)

MS1 (9. Monat): **Erste Auswahl eines oder mehrerer Enzyme für den Einsatz in Biotransformationen bzw. für die Sensoren.** Da beide Applikationen unterschiedliche Anforderungen (Substratspezifität bzw. Stereoselektivität) besitzen, sind dies womöglich verschiedene Enzyme. *Wurde erreicht*

MS2, MS3 (18. Monat): **Abschließende Beurteilung der verschiedenen Enzyme bzgl. Teilprojekte I-III.** *Wurde erreicht*

MS4 (24. Monat): **4a Auswahl eines Enzyms zum Scale-up eines technischen Produkts (Auswahl des Produkts) 4b Entscheidung über Mutagenesestrategie.** *Wurde erreicht*

MS5 (48. Monat): **Entscheidung über industrielle Relevanz der entwickelten Synthesestrategie (z.B. mit dem Partner evocatal, Hersteller von Enzymen bzw. Feinchemikalien).**

Es wurde insbesondere mit der Acetoin-Reduktase aus *Bacillus clausii* Synthesestrategien für diverse Moleküle erfolgreich entwickelt, d.h. verschiedene chirale Zielmoleküle können im Labormaßstab produziert werden (Dissertation Muschallik, 2021 und dazugehörige Publikationen). Über die technische Relevanz wurde noch nicht entschieden, da die Firma evocatal in die Firma evoxx technologies GmbH aufgegangen ist. Die Nachfolgefirma hat einen anderen Schwerpunkt und hatte kein Interesse und Möglichkeiten einer weiteren Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projekts. Daher ist es unser Ziel für evt. Folgearbeiten einen neuen Partner, mit dem die industrielle Relevanz diskutiert werden kann, zu suchen.

Wurde nur zum Teil erreicht

MS6 (24. Monat): **Herstellung und Optimierung von Si-basierten amperometrischen und kapazitiven Sensorstrukturen mittels Mikrotechnologien im Hinblick auf die sensorintrinsic Eigenschaften und die Enzymkompatibilität. Anhand von elektrochemischen und physikalischen Untersuchungen wird entschieden, welche NADH/NAD⁺- und welche H⁺-sensitive Sensorstruktur für die Immobilisierung von Acetoin-Reduktase(n) am besten geeignet ist.** *Wurde erreicht*

MS7 (32. Monat): **Die Optimierung der unterschiedlichen Immobilisierungsstrategien zur Ankopplung der mit MS1 und MS2 ausgewählten Enzyme an die Si-Sensorstrukturen im Hinblick auf optimale Enzymaktivität, -stabilität und -spezifität und optimalen intrinsischen Sensoreigenschaften in Laborlösungen sind abgeschlossen. Dabei wurden und werden aktuell auch neue unkonventionelle Ansätze verfolgt (z.B. auf der Basis von TMV-Nanocarrier); die Experimente diesbezüglich werden im Berichtszeitraum für das Jahr 2020 abgeschlossen werden.** *Wurde erreicht*

MS8 (36. Monat): **Anhand von physikalischen und elektrochemischen Untersuchungen in Laborlösungen (Pufferlösungen, NADH/NAD⁺-haltige Standards) muss diejenige Biosensoranordnung definiert sein, die für die weitere Projektphase (Messungen in Reallösungen, unter Realbedingungen) eingesetzt werden soll.**

Die kapazitiven Feldeffektsensoren zeichneten sich im Projektverlauf als die geeignetere Sensoranordnung ab, die amperometrischen Strukturen konnten für die Herstellung der Biosensoren ausgeschlossen werden. Es wurde eine zusätzliche Immobilisierungsstrategie eingeführt, um Enzymmoleküle auf der Sensoroberfläche anzukoppeln. *Wurde erreicht*

MS9/10 (48. Monat): Validierung der entwickelten Biosensoranordnung in Realproben (Bier-Herstellung, industriell relevante Bacillus-Fermentation zur Enzymproduktion).

Die Validierung der entwickelten Biosensoranordnung in Realproben wurde erfolgreich abgeschlossen. Im abschließenden Berichtszeitraum konnten Experimente im Rahmen der Bacillus-Fermentation mit Proben aus in-house Reaktoren erfolgreich durchgeführt werden.

Wurde erreicht

Beginn, Maßnahmedauer, Abschluss, Abweichungen von den dem Zuwendungsbescheid zugrundeliegenden Planungen und vom genehmigten Finanzierungsplan

Das Projekt (01/2016 bis 12/2019) startete termingerecht mit der Einstellung des 1. Doktoranden (Lukas Muschallik, M.Sc.) für die biotechnologischen Arbeiten. Die Thematik dieses Projektes ist hochgradig interdisziplinär, daher war es sehr schwer, weiteres geeignetes Personal mit den entsprechenden fachlichen Voraussetzungen, die dieses Themenspektrum weitestgehend abdecken, zu akquirieren. Aufgrund dieser Bemühungen konnte erst ab 14.08.2017 eine geeignete Kandidatin gefunden werden, die die Position der zweiten Doktorandenstelle (Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung amperometrischer und kapazitiver Biosensorstrukturen) besetzte. Aufgrund dieser Problematik kann auch erst ab diesem Zeitpunkt mit den Arbeitspaketen des Projekts, die zum Aufgabenbereich der Doktorandin gehören begonnen werden. Dies führte zu erheblichen Verzögerungen in der Projektarbeit, da die Arbeiten, die zum Aufgabengebiet der Doktorandin gehören, bis dahin nicht zufriedenstellend bearbeitet wurden (s. auch Antrag auf Laufzeitverlängerung des Projektes). Da dieses Projekt eine interdisziplinäre Zusammenarbeit voraussetzt, kam es aufgrund der verspäteten Besetzung der 2. Doktorandenstelle zu Verspätungen bei der Entwicklung und Herstellung des entsprechenden Diacetyl-/Acetoin-Biosensors. Davon war auch die Projektarbeit des anderen Doktoranden betroffen, da dessen Aufgabe war, die entsprechenden Enzyme zur Verfügung zu stellen. Hier konnten jedoch andere Arbeitspakete bearbeitet werden, so dass der zeitliche Verlauf dieser Promotion wenig beeinträchtigt wurde. Danach lief das Projekt nach dem angepassten Zeitplan.

Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises / Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Es wurden Finanzmittel hauptsächlich für Personal und Reisetätigkeiten verwendet. Nach TV-L, Entgeltgruppe 13, wurden wissenschaftliche Mitarbeiter finanziert, wissenschaftliche Hilfskräfte wurden ebenfalls eingesetzt. Die Details sind im zahlenmäßigen Nachweis dargestellt.

Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse/ Hebelwirkung in Bezug auf die Forschungstätigkeit und Einwerbung von Drittmitteln an der Hochschule

Dieses Projekt hat FH-intern einen großen Beitrag zur Intensivierung der Zusammenarbeit der verschiedenen Disziplinen im Institut für Nano- und Biotechnologien (INB) beigetragen. Zudem wurden Studierenden die Möglichkeit zu fachbereichsübergreifenden Abschlussarbeiten geboten, die insbesondere die Gebiete Biotechnologie und Sensortechnologie verbinden. Mit den externen Partnern fand ein reger inhaltlicher Austausch statt (insbesondere AG Prof. Pohl, HHU Düsseldorf/FZ Jülich). Die zum Zeitpunkt des Projektstarts noch neuberufenen Kollegen (Prof. Siegert, Prof. Wagner, Prof. Bongaerts) fanden auch über dieses Projekt die Möglichkeit sich in die Forschung der FH Aachen zu integrieren.

Die wissenschaftlichen Ziele wurden sehr erfolgreich erreicht, wie die umfangreichen und hochwertigen Publikationen beweisen. Das *proof of principle* in der technischen Entwicklung und Anwendung des Sensors konnte an verschiedenen Beispielen gezeigt werden. Die erfolgreiche Sensorentwicklung kann auf weitere (neue) Enzyme ausgedehnt werden – erste Vorschläge liegen bereits vor. Von den biotechnologischen Arbeiten dieses Projekts profitiert bereits im Bereich der Biokatalyse ein neues Förderprojekt „LipoPep“, das sich mit Synthesen mittels Aminoacylasen beschäftigt (Prof. Siegert/Bongaerts, Kooperation TH Köln und Industriepartner). Der Zweck des Projekts wurde folglich erreicht.

Die unmittelbare Markt-/Verwertungsorientierung war vor allem auf die KMUs der Bier- und Weinherstellung gerichtet. Leider ist unser Partner, Herr Hilsman, der als Berater für die Brauerei Krombacher tätig war, während des Projekts schwer erkrankt und stand nicht mehr zur Verfügung. Die erfolgreiche Acetoin-Bestimmung aus realen *Bacillus*-Fermentationsproben beweist das Potenzial des entwickelten Acetoin-Biosensors. Die kontinuierliche Acetoin-Erfassung in Fermentationsprozessen steht noch aus. Weiterführende Entwicklungsarbeiten v.a. auch in Hinblick auf angepasste Prozessführungsstrategien bedürfen zunächst weitere Forschungsaktivitäten, bevor eine Übernahme dieser Technologie für Enzymhersteller sinnvoll ist.

Weitere Arbeiten mit der BDH aus *Bacillus licheniformis* DSM 13^T (BlichBDH) im FZ Jülich (AG Prof. D. Rother)

Derzeit ist die BDH aus *Bacillus licheniformis* DSM 13^T eines Projekts, bei dem in einer simultanen 2-step one Pot Kaskade stereoisomerenreines (4*S*,5*S*)-Octandiol hergestellt wird. Die *de* und *ee* Werte sind bisher sehr gut (>99%), sofern das erste Enzym eine starke *S* Selektivität aufweist. Die BlichBDH wurde erfolgreich im wässrigen als auch im organischen Reaktionssystem für die Produktion von 4,5-Octandiol genutzt. In der Kaskade wird aus 2 Butanalmolekülen durch das Enzym PfBAL Butyroin (5-Hydroxy-4-octanone) gebildet, welches dann von der BlichBDH zu 4,5-Octandiol reduziert wird. Hierbei wurde 1,2-Propandiol als Cosubstrat für die Rezyklisierung von NADH eingesetzt. Das Enzym wurde als lyophilisierte ganze Zellen formuliert und hatte dadurch eine sehr hohe Lagerstabilität und es musste kein Cofaktor bei der Reaktion hinzugefügt werden. Diese Reaktion ist Teil einer Publikation, die derzeit noch in Arbeit ist. Die BlichBDH kam hierbei bei der Reaktion zu 4,5-Octandiol zum Einsatz, da sie die bisher höchste Aktivität auf Butyroin gezeigt hat (in Vergleich einer anderen DH, welche für andere Diole eingesetzt wird).

Weitere Arbeiten mit den neuen (Butandiol)Dehydrogenasen

Weitere Arbeiten mit den neuen (Butandiol)Dehydrogenasen erfolgen, auch nach der Projektlaufzeit, in den Forschungsgruppen (Prof. Siegert/Bongaerts) der FH Aachen, sowie im Rahmen der Praktika im Bachelorstudium Biotechnologie. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass bisher lediglich 2 der 6 anfänglich betrachteten Enzyme, aufgrund des Fokus des Projekts, im Detail bearbeitet wurden.

Weiterführung der Arbeiten zur Etablierung der TMV-Immobilisierung (Kooperation Prof. Wege, Uni Stuttgart)

Wie bereits weiter oben erwähnt, konnte kurz vor Ende der Projektzeit der etablierte Sensor mit einer neuartigen Immobilisierungsmethode (Bindung über TMV) verbessert werden.

Insgesamt gesehen hat dieses Projekt zur Weiterentwicklung des Instituts für Nano- und Biotechnologien an der FH Aachen geführt und die Forschungsschwerpunkte ‚Industrielle Biotechnologie‘ und ‚Sensortechnologie‘ weiter verstärkt und miteinander verknüpft. Leider muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass Prof. Selmer im Projektzeitraum schwer erkrankte und verstorben ist. Das Forschungsprofil der Life Science Forschung an der FH Aachen konnte weiter geschärft werden, insbesondere da mit der Entwicklung des Sensors für die Bier- und Weinherstellung ein Beitrag für die nachhaltige Lebensmittelkontrolle geleistet wurde.

Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Fortschritte bei anderen als den am Projekt beteiligten Stellen sind nicht bekannt.

Übersicht der Gerätebeschaffung

Investitionen							11.540,92
Belegnr.	Mitarbeiter	Partner	Buch. Dat.	Belegtext	Positionstext	Gezahlt am	Buchung
30012584	-	LabMarket GmbH	31.03.2018	3120342502-17-26	3424977, Gefriertrockner Steuerung SPS;	11.04.2018	11.032,73
30009404	-	VWR International Deutschland	28.02.2019	3120342502-19-46	GWG 19042; Chromatographie säule XK 26	08.03.2019	508,19

Publikationen und Abschlussarbeiten im Rahmen des Projekts

Die Ergebnisse des Projekts wurde bereits in verschiedenen Fachzeitschriften (6 *Peer-reviewed*-Publikationen) veröffentlicht bzw. als Tagungsbeiträge (3 Proceedings und 17 Poster) publiziert. Auch fanden die Themen Eingang in die Lehre (Praktika und 9 Abschlussarbeiten an der FH Aachen) der Forscher und haben so auch dort in der anwendungsorientierten Ausbildung der Studierenden einen wichtigen Beitrag geleistet.

Dissertation

Lukas Muschallik, **Biochemische und biokatalytische Charakterisierung der Butandioldehydrogenasen aus *Bacillus clausii* DSM 8716^T und *Bacillus licheniformis* DSM 13^T**, Dissertation HHU Düsseldorf 2021.

Publikationen

Welden M., Severins R., Poghossian A., Wege C., Bongaerts J., Siegert P., Keusgen M., Schöning M.J., **Detection of Acetoin and Diacetyl by a Tobacco Mosaic Virus-Assisted Field-Effect Sensor**, *Chemosensors*, 2022, 10, 218.

Jablonski M., Münstermann F., Nork J., Molinnus D., Muschallik L., Bongaerts J., Wagner T., Keusgen M., Siegert P., Schöning M.J., **Capacitive field-effect biosensor applied for the detection of acetoin in alcoholic beverages and fermentation broths**, *Physica Status solidi A*, 2021, 2000765.

Muschallik L., Recker I., Jablonski M., Gellissen M., Kipp C.R., Bongaerts J., Pohl M., Schöning M.J., Selmer T., Siegert P., **Synthesis of α -hydroxy ketones and vicinal diols with *Bacillus licheniformis* DSM 13^T butane diol dehydrogenase**, *Journal of Biotechnology* (324) 2020, 61-70.

Abschlussbericht FH-Struktur 2016/02: Diacetyl-/Acetoin-Biosensor und Evaluierung von Acetoin- 12 Reduktasen zur Verwendung in Biotransformationen

Muschallik L., Molinnus D., Kipp C.R., Bongaerts J., Pohl M., Wagner T., Schöning M.J., Selmer T., Siegert P., **Synthesis of α -hydroxy ketones and vicinal (R,R)-diols by *Bacillus clausii* DSM 8716^T butanediol dehydrogenase** *RSC Advances*, 2020, **10**, 12206-12216.

Molinnus D., Muschallik L., Gonzalez L.O., Bongaerts J., Wagner T., Selmer T., Siegert P., Keusgen M., Schöning M.J., **Development and characterization of a field-effect biosensor for the detection of acetoin**. *Biosensors and Bioelectronics* 115 (2018) 1–6.

Muschallik L., Molinnus D., Bongaerts J., Pohl M., Wagner T., Schöning M.J., Siegert P. and Selmer T., **(R,R)-Butane-2,3-diol Dehydrogenase from *Bacillus clausii* DSM 8716^T: Cloning and Expression of the bdhA-Gene, and Initial Characterization of Enzyme**. *Journal of Biotechnology* (2017), 258, 41-50.

Tagungsbeiträge (Proceedings)

Welden M., Severins R., Poghossian A., Wege C., Siegert P., Keusgen M., Schöning M.-J., **Studying the immobilization of acetoin reductase with Tobacco mosaic virus particles on capacitive field-effect sensors**, *Conference Proceedings: International Symposium on Olfaction and Electronic Nose*. Aveiro, Portugal, May 29 - June 1, 2022, Page(s):1 - 4.

Muschallik L., Molinnus D., Jablonski M., Kipp C., Bongaerts J., Wagner T., Pohl M., Selmer T., Schöning M.J. und Siegert P., **(2R,3R)-Butan-2,3-diol Dehydrogenase aus *Bacillus clausii* DSM 8716^T- ein vielversprechender Biokatalysator für die Synthese chiraler α -Hydroxyketone / Diole sowie zur Biosensorentwicklung**. *Sonderheft der Chemie Ingenieur Technik (CIT) zur ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2018*, *Chemie Ingenieur Technik* 90(9):1278-1278, September 2018.

Molinnus D., Muschallik L., Bongaerts J., Selmer T., Wagner T., Siegert P., Keusgen M., Schöning M.J., **Development of a biosensor for the detection of acetoin during wine fermentation**. *Proceedings 2017*, 1(8), 718. 5th International Symposium on Sensor Science 2017, Barcelona, Spain.

Tagungsbeiträge (Poster)

Quality control in beer and wine: Detection of acetoin and diacetyl by means of a TMV-assisted capacitive field-effect biosensor. Welden M., Severins R., Poghossian A., Wege C., Bongaerts J., Siegert P., Keusgen M., Schöning M.J. *Engineering of Functional Interfaces 2022*, Maastricht (Netherlands) July, 2022.

Integration of adaptive syntheses in the sustainable production of bio-fuels and chiral fine chemicals *Maria Allahham, Jan-Dirk Spöring, Jan Wiesenthal, Victoria Pfennig, William Graf von Westarp, Andreas Jupke, Carsten Bolm, Jürgen Klankermayer, Petra Siegert and Dörte Rother*. *(Bio)Process Engineering Conference, Aachen (Germany), 12 - 15 September 2022*.

Biosensoric acetoin detection in alcoholic beverages and fermentation broths. Jablonski, M., Nork, J., Molinnus, D., Muschallik, L., Bongaerts, J., Wagner, T., Keusgen, M., Siegert, P., Schöning, M.J.. XXII Polish Conference on Biocybernetics and Biomedical Engineering, Warsaw (Poland), 19.05-21.05.2021 (online).

Acetoin Biosensor based on Acetoin reductase-Modified Field-Effect Sensor Applied for Acetoin Detection in Beer Samples. Jablonski M., Münstermann F., Molinnus D., Muschallik L., Bongaerts J., Wagner T., Keusgen M., Siegert P., Schöning M.J.. 239th ECS Meeting and the 18th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS 2021), Chicago (USA), 30.05.-03.06.2021 (online). *Second Place Student Presentation Award*

Acetoin reductase-modified field-effect sensor for the detection of acetoin in beer samples. Jablonski M., Münstermann F., Molinnus D., Muschallik L., Bongaerts J., Wagner T., Keusgen M., Siegert P., Schöning M.J. 10. ProcessNet-Jahrestagung und 34. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2020, Aachen (Deutschland), 21.09.-24.09.2020 (online).

Two strategies for detection acetoin during fermentation processes of alcoholic beverages. Jablonski M., Molinnus D., Muschallik L., Münstermann F., Goretzki A., Bongaerts J., Wagner T., Selmer T., Siegert P., Keusgen M., Schöning M.J.. 12th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces (EnFI) 2019, Leuven (Belgium) 08.-09.07.2019. *Posterpreis, s. Pressemeldung*

Capacitive field-effect biosensor with acetoin reductase for acetoin detection. Jablonski, M., Molinnus, D., Muschallik, L., Bongaerts, J., Wagner, T., Selmer, T., Siegert, P., Keusgen, M., Schöning, M.J., 2nd European Biosensor Symposium, Florence (Italy), 18.02.-21.02.2019.

Development of an acetoin field-effect biosensor to monitor fermentation processes. Molinnus, D.; Gonzales, L.O.; Muschallik, L.; Jablonski, M.; Bongaerts, J.; Wagner, T.; Selmer, T.; Siegert, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J., Electrochemical Micro & Nano System Technologies, Milano (Italy) 28.08.-01.09.2018.

(R,R)-Butane-2,3-diol dehydrogenase from *Bacillus clausii* DSM 8716^T - a useful biocatalyst for synthesis of α -hydroxy ketones / diols and biosensor development. Muschallik L., Molinnus D., Jablonski M., Kipp C., Bongaerts J., Wagner T., Pohl M., Selmer T., Schöning M.J. and Siegert P., ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA- Jahrestagung der Biotechnologen 2018, Aachen (Germany), 10.09.-13.09.2018.

(R,R)-Butane-2,3-diol dehydrogenase from *Bacillus clausii* DSM 8716^T - a versatile biocatalyst for synthesis of α -hydroxy ketones / diols and biosensor development. Muschallik L., Molinnus D., Jablonski M., Kipp C., Bongaerts J., Wagner T., Pohl M., Selmer T., Schöning M.J., Siegert P., 9th International Congress on Biocatalysis: BIOCAT2018, Hamburg (Germany), 26.08.-30.08.2018.

Field-effect biosensor for acetoin detection during fermentation process of alcoholic beverages. Molinnus D., Muschallik L., Jablonski M., Bongaerts J., Wagner T., Selmer T., Siegert P., Keusgen M., Schöning M.J., IMCS 2018, Vienna (Austria), 15.07.-19.07.2018.

Development and characterization of a field-effect biosensor for the detection of acetoin during fermentation processes. Molinnus D., Muschallik L., Jablonski M., Bongaerts J., Wagner T., Selmer T., Siegert P., Keusgen M., Schöning M.J., 11th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces (EnFI 2018), Lutherstadt Wittenberg (Germany), 01.07.-03.07.2018.

Monitoring of biotechnological processes Using a diacetyl/acetoin biosensor and evaluation of acetoin reductases for use in biotransformations. Muschallik, L., Molinnus, D.; Bongaerts, J.; Wagner, T.; Siegert, P.; Schöning, M.J.; Selmer, T., Tag der Forschung der FH Aachen, Aachen (Germany) 15.03.2018.

(R,R)-Butane-2,3-diol dehydrogenase from *Bacillus clausii* DSM 8716^T – a versatile biocatalyst. Muschallik L., Molinnus D., Jablonski M., Kipp C., Bongaerts J., Wagner T., Pohl M., Selmer T., Schöning M.J., Siegert P., Poster, Symposium zum 10-jährigen Bestehen des INB, FH Aachen intern, 2018, Jülich (Germany), 23.02.2018.

Development of a biosensor for the detection of acetoin during wine fermentation. Molinnus D., Muschallik L., Bongaerts J., Selmer T., Wagner T., Siegert P., Keusgen M., Schöning M.J., 5th International Symposium on Sensor Science 2017, Barcelona (Spain), 27.09.-29.09.2017.

Development of an enzyme-based diacetyl/acetoin biosensor for monitoring crucial parameters in fermentation processes. Muschallik L., Molinnus D., Müschen M., Bongaerts J., Wagner T., Selmer T., Schöning M.J. and Siegert P.; Aachen Protein Engineering Symposium, Aachen (Germany), 21.09.-23.09.2016.

Abschlussarbeiten

Robin Severins (Masterarbeit 2021, FH Aachen)

Untersuchungen zur Herstellung eines Acetoinbiosensors auf Basis von Tabakmosaik-virus-modifizierten Feldeffektstrukturen

Jasmina Nork (Praxissemester 2020, FH Aachen)

Weiterführende biochemische und biokatalytische Charakterisierung der Butandiol-Dehydrogenase aus *Bacillus licheniformis* DSM13^T

Alexander Goretzki (Masterarbeit 2019, FH Aachen)

Konzeptionierung und Validierung eines amperometrischen Enzym-Biosensors zur Detektion von Acetoin

Inga Recker (Bachelorarbeit 2019, FH Aachen)

Biochemische und biokatalytische Charakterisierung der Butandiol-Dehydrogenase aus *B. licheniformis*

Felix Münstermann (Bachelorarbeit 2019, FH Aachen)

Untersuchungen zur Optimierung und Weiterentwicklung eines feldeffektbasierten Biosensors zur Acetoin-Detektion

Ronja Carina Kipp (Bachelorarbeit 2018, FH Aachen)

Untersuchung des Substratspektrums der Acetoin-Reduktase aus *B. licheniformis* in der Biokatalyse sowie biochemische Charakterisierung der Acetoin-Reduktase aus *B. clausii*

Julia Mohr (Bachelorarbeit 2018, FH Aachen)

Mutagenesen am aktiven Zentrum der Butan-2,3-diol-Dehydrogenase aus *Bacillus clausii*

Marcel Müschen (Bachelorarbeit 2016, FH Aachen)

Untersuchungen zur Stereoselektivität von Acetoinreduktasen aus *B. clausii* und *B. licheniformis*

Abschlussbericht FH-Struktur 2016/02: Diacetyl-/Acetoin-Biosensor und Evaluierung von Acetoin- 15
Reduktasen zur Verwendung in Biotransformationen

Laura Osorio González (Mini & Written Project 2017, FH Aachen)

Monitoring of Biotechnological Processes by means of an Acetoin Biosensor. Written Project
Juli 2017 bis Dezember 2017: Entwicklung eines Biosensors zur Detektion von Acetoin
während der Weingärung