



Algemene gegevens	
PPS-nummer	TKI-AF-12141
Titel	Green chemicals via microbes; natural nootkatone as flavour and agrochemical.
Roadmap/Koepel	TKI AF BBE
Uitvoerende kennisinstelling(en)	Wageningen UR, WPR, BU Bioscience
Projectleider onderzoek (naam en emailadres)	Jules Beekwilder – jules.beekwilder@wur.nl
Penvoerder PPS (namens private partij)	Jaap Drenth jaap.drenth@isobionics.com
Contactpersoon overheid	Cor Wever
Werkelijke startdatum	01-01-2014
Werkelijke einddatum	31-12-2016
Korte omschrijving inhoud (bij voorkeur 4 regels, max. half A4)	The methodology developed in this project can be implemented to produce many of the other (bioactive) terpenes with potential in food, flavour, cosmetics and even pharma, thus upgrading the quality of a wide range of consumer products with green molecules. Via microbial fermentation, many plant compounds can be produced without occupying large surface areas to grow the respective plant species (competing claims) and in a much more rapid and flexible manner. The project helps to develop a sustainable, high-tech and very competitive Dutch industry offering many chances for jobs in the Netherlands. The specific aim of this project is to produce natural nootkatone. This grapefruit flavour can be used as natural additive in many consumer products such as beverages and food, cosmetics and detergents. In addition, nootkatone also holds potential as sustainable insect repellent, partly replacing synthetic chemical insecticides. Particularly its activity towards ticks has interesting health benefits to prevent the transfer of lime disease.

Goedkeuring penvoerder / consortium	
De eindrapportage dient te worden besproken met de penvoerder/het consortium. De TKI's nemen graag kennis van evt. opmerkingen over de rapportage.	
De penvoerder heeft namens het consortium de eindrapportage	<input type="checkbox"/> goedgekeurd (zie opmerking). <input type="checkbox"/> niet goedgekeurd
Evt. opmerkingen over de eindrapportage:	Financiële eindrapportage moet nog aangeleverd worden door de afd. Finance en Control van WPR

Mutaties ten opzicht van het oorspronkelijke projectplan en follow-up	
Zijn er wijzigingen geweest in het consortium / de projectpartners? Zo ja, benoem deze.	Op 24-03-2016 is Miccell Bioservices B.V. te Doetinchem (Gelderland) door de rechtbank in Gelderland failliet verklaard. De in cash en het grootste deel van de in kind verplichtingen van MicCell zijn door Isobionics BV overgenomen.

Zijn er inhoudelijke wijzigingen geweest in het project?	Experimenten in 2014 binnen dit project laten zien dat expressie van P450 enzymen in Rhodobacter moeilijker is dan verwacht. Industriële partner Isobionics gebruikt nu een andere methode (waarbij geen P450 enzymen gebruikt worden) om nootkatone te maken. Daarom is de prioriteit van het P450 werk lager. In overleg met Isobionics is besloten om meer energie te steken in het verhogen van de valenceen opbrengst in microbiële cultures.
Is er sprake van knelpunten bij de uitvoering van het project?	Nee
Is er sprake van afwijkingen van het ingezette budget/de begroting?	Nee
Is er sprake van een octrooi-aanvraag (evt. first filing) vanuit deze PPS?	Nee
Is er sprake van spin-offs (contract-onderzoek dat voortkomt uit dit project, aanvullende subsidies die zijn verkregen of spin-off bedrijvigheid)	Aanvullend op dit project is er in 2016 een ZON-MW hotel project binnengehaald om transcriptomics te doen aan de industriële productiestam.

Resultaten en deliverables	
1. Welke deliverables zijn opgeleverd? (geef een korte beschrijving per deliverable uit het projectplan)	<p>1. Strategic knowledge on structure-function relationship of two very important classes of enzymes (terpene synthases and P450).</p> <p>In de eiwitstructuur terpeen synthases zijn drie nieuwe gebieden aangewezen, die essentieel zijn voor de activiteit van het eiwit. Daarnaast is vastgesteld dat de functie van een terpeen synthase verschilt, afhankelijk van de omgeving van het enzym en van de gastheer. Een publicatie hierover is in voorbereiding.</p> <p>2. Improved variants of valencene synthase genes. To increase valencene availability as precursor for nootkatone.</p> <p>Van 12 varianten van valenceen synthase is de activiteit in Escherichia coli bepaald. Een aantal varianten waren hoger actief dan het oorspronkelijke enzym, een ander deel lager actief en een deel inactief. Dit resultaat zal onderdeel worden van een publicatie.</p> <p>3. Variants of P450 genes that allow functional expression in microorganisms resulting in the hydroxylated terpene nootkatone.</p> <p>Deze deliverable is in overleg met de industriële partner komen te vervallen. In plaats daarvan is er in een aantal planten gezocht naar interessante terpenen, om in latere projecten naar synthases voor commercieel interessante producten te kunnen zoeken. Er zijn 2 van zulke planten geïdentificeerd.</p> <p>4. Optimised microbial strains producing increased amounts of valencene.</p> <p>Een methode om productie van valenceen te verhogen door een ondersteunende pathway uit een ander microorganisme op een stabiele manier in Rhodobacter en E. coli te krijgen is ontwikkeld. Deze methode zal in vervolg onderzoek worden toegepast en gepubliceerd.</p>

	<p>5. Optimised microbial strains producing nootkatone.</p> <p>6. Improved fermentation conditions Het fermentatie protocol is verbeterd door: een protocol voor schaalbare fermentatie voor nieuwe Rhodobacterstammen, en een chemostat studie om de optimale groeisnelheid van Rhodobacter voor valenceen productie te bepalen.</p> <p>7. Preliminary organoleptic and insecticidal assessment of the produced nootkatone Er is een dossier aangelegd over de potentiële toepassing van Nootkatone voor het bestrijden van muggen en teken.</p> <p>8. Versatility of technology; strain producing beta-santalol. Er zijn 10 stammen gemaakt die allen een andere sesquiterpeen maken. Zodoende hebben we nu inzicht in het potentieel van het terpeen productie platform. Er zitten grote verschillen in de productiviteit tussen de stammen. Deze eigenschappen kunnen terug gerelateerd worden aan de synthases</p>
2. Indien bepaalde deliverables niet gehaald zijn, wat was daarvoor de reden?	
3. Heeft het project onverwachte (neven)uitkomsten opgeleverd, die vooraf niet waren voorzien? Zo ja, benoem deze.	
4a. Binnen hoeveel jaar zullen de private partijen resultaten uit dit project gaan gebruiken in de praktijk?	binnen ..2... jaar
4b. Kan het gebruik van de resultaten in de praktijk nog worden versneld, en zo ja, wat is daarvoor nodig?	Nee
4c. Op welke wijze is over het project en de resultaten gecommuniceerd naar de brede doelgroep (incl. niet-deelnemende bedrijven)?	<p>Lezingen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Jules Beekwilder: Lecture at 5th european yeast flavour workshop on "Biotechnology for natural flavours production" Montreux (CH) May 4-7 2014. • Jules Beekwilder: Lecture at Synthetic Biology Congress, October 20-21, 2014, London (UK). • Jules Beekwilder: Lecture at Bioflavour 2015, September 9-11, 2015, Frankfurt am Main (D) (Chairman) • Jules Beekwilder: Lecture at International Bielefeld-CeBiTec Research Conference on "Advances in Industrial Biotechnology: New techniques, substrates and products", Bielefeld (D), 26-28 September 2016. • Georg Lentzen: Lecture at CIC 2014 – Bioeconomy enters industrial practice: Innovative production of natural ingredients" Düsseldorf (D) 19-20 November 2014 • Elena Melillo: Terpnet 2015 poster presentation, Vancouver (CA) 1-5 June 2015. <p>Publicaties</p> <ul style="list-style-type: none"> • Song CX, Schmidt R, de Jager V, Krzyzanowska D, Jongedijk E, Cankar K, Beekwilder J, van Veen A, de Boer W, van Veen J, Garbeva P (2015) Exploring the genomic traits of fungus-feeding bacterial genus Collimonas. BMC Genomics 16:1103
5. In hoeverre heeft het project bijgedragen aan de ontwikkeling van de betrokken kennisinstel-	Dit project heeft een aanzienlijke ontwikkeling in de kennis naar de mogelijkheden en inzetbaarheid van het bacteriële productieplatform voor food-ingredients gebracht. Ook is onze

ling(en)? (bijv. wetenschappelijk track record, nieuwe technologie, nieuwe samenwerkingen)	expertise met de sesquiterpenen verbreed, en is deze uitgedragen op congressen. Daardoor worden wij thans gevraagd om zitting te nemen in internationale bijeenkomsten waar de toekomst van biotechnologie voor flavour & fragrance producten wordt besproken, en hebben we veel contact met bedrijven uit de F&F industrie.
6. Krijgt het project een vervolg in de vorm van een nieuw project of een nieuwe samenwerking? Zo ja, geef een toelichting.	<ul style="list-style-type: none"> • Dit project wordt opgevolgd door TKI-AF-15263 "Harness bacterial platform for mono- and diterpene production", dat van 2016-2019 loopt. • Daarnaast is er in 2016 een ZON-MW hotel project binnengehaald om transcriptomics te doen aan de industriële productiestam. • Wageningen University vakgroep BioProceskunde heeft een NWO groen project binnengehaald met Isobionics (2015), waarin onze groep ook een rol speelt. • Wageningen University vakgroep Plant physiology heeft een STW project binnengehaald, dat in 2017 zal starten, waarin wij de begeleiding doen.

Highlights: geef een korte beschrijving van de belangrijkste resultaten

- **Veel sterkere connectie met Industriële partner (4 follow-up projecten)**
- **Valenceen in e markt gekomen, mede door inspanningen van dit project**
- **Product portfolio pipeline van Isobionics sterk verbreedt.**

Aantal opgeleverde producten in 2016 (geef in een bijlage de titels en/of omschrijving van de producten of een link naar de producten op openbare websites)			
Wetenschappelijke artikelen	Rapporten	Artikelen in vakbladen	Inleidingen/ workshops
1	0	0	1

Link naar Kennisonline/TKI AF

<http://www.tki-agrifood.nl/projecten/projecten-bbe/12141>

<http://www.wur.nl/nl/project/Green-chemicals-via-microbes-natural-nootkatone-as-flavour-and-agrochemical-AF12141.htm>

Bijlage: Titels van de producten of een link naar de producten op een openbare website

<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/index.php/events/conferences/460-2016-09-26-6th-int-bielefeld-cebitec-research-conference>

<http://bmccgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-015-2289-3>

Topsectorsecretaris Hans van der Kolk heeft deze rapportage inhoudelijk bestudeerd.

Financiën:

Opmerking Topsectorsecretaris Hans van der Kolk

Zoals hierboven is aangegeven moet de financiële eindrapportage van dit project nog komen van/via de afd. Finance & Control van PSG (WPR).

Kosten: Geef in deze tabel aan welke kosten gemaakt zijn. Splits dit uit naar de verschillende projectpartners. Bij private partijen gaat het hierbij om de in kind inbreng in de PPS		
Naam partner	Begroot (k€) (uit projectplan)	Gerealiseerd (k€)
Kennisinstellingen/publieke partijen		
Totaal kennisinstellingen	€	€
Bedrijven/private partijen		
Isobionics	€	€
MicCell	€	-
Totaal bedrijven/privaat		
Totaal kosten (publ. + priv.)	€990.000	€

Financiering: Geef in deze tabel de financiering aan. De totale financiering moet even hoog zijn als de totale kosten per partner						
Naam	Kvk nr. (bij private partij)	Gerealiseerde private cash bijdrage 1)	Gerealiseerde private in kind bijdrage	Overig publiek (DLO, TNO, NWO, regio, etc.)	TKI toeslag	Totale financiering
Publieke kennisinstellingen						
Kennisinstelling 1			Nvt			
			Nvt			
			Nvt			
			Nvt			
Private partners						
Bedrijf1		***				
Isobionics	14098887					
Totaal PPS						
Percentage private financiering	%					

** Hier alleen bedragen invullen die niet naar publieke kennisinstellingen gaan.

1) Specificatie van de private cash bijdrage: Geef in onderstaande tabel weer welke bedrijven de private cash hebben geleverd. Let erop dat het totaalbedrag overeenkomt met de totale cash bijdrage van de vorige tabel		
Private partner	Kamer van koophandel nr.	Bedrag in €
Totaal		

