GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor

Schlussbericht/ Sachbericht

(gemäß BNBest-BMBF 98 (Stand: April 2006) Nr. 3.2)

Zuwendungsempfänger: Rheinische Friedrich Wilhelms-Universität Bonn Prof. Dr. Uwe Deppenmeier	**Förderkennzeichen:** 031B0846A
Vorhabenbezeichnung: Darmbakterien des Phylums Bacteroidetes zur Herstellung von Probiotika, bioaktiven Substanzen und organischen Säuren aus nachwachsenden Rohstoffen (BaPro)	
Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2020 – 31.12.2013	
Verfasser des Schlussberichts: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier	

I. Kurzbericht

Aufgabenstellung

Bislang werden Bacteroidota-Stämme für biotechnologische Verfahren nicht verwendet. Es ist jedoch bekannt, dass Mitglieder des Phylums Bacteroidota hoch-effektive Succinat- und Propionat-Produzenten sind[1] und ausgefeilte Enzymsysteme für den Abbau komplexer Polysaccharide besitzen[2]. Es gibt auch deutliche Belege dafür, dass diese Organismen an der Synthese präbiotischer und bioaktiver Verbindungen beteiligt sind, die häufig mit Vorteilen für die Gesundheit von Mensch und Tier verbunden sind[3]. Daher sollen in diesem Forschungsprojekt biotechnologische Ansätze unter Verwendung von Bacteroidota-Arten als Plattformorganismen für die effiziente und nachhaltige Umwandlung nachwachsender Rohstoffe in bioaktive Verbindungen und wichtige Bulk-Chemikalien entwickelt werden. In diesem Teilprojekt haben wir uns auf die Identifizierung von Bacteroidota-Stämmen konzentrieren, die Succinat (das Salz der Bernsteinsäure) in hohen Ausbeuten und mit hohen Produktionsraten produzieren. Succinat gehört zu den 12 vielversprechendsten biobasierten Plattformchemikalien[4] und wird z. B. als Grundchemikalie in großen Mengen zur Herstellung von Polyurethan verwendet[5]. In einem zweiten Teilaspekt ging es um die Produktion von Phenolsäure, deren Präsenz im Darmtrakt im Allgemeinen mit Vorteilen für die menschliche Gesundheit verbunden ist. Hier sollte analysiert werden, ob Bacteroidota-Stämme für die Synthese dieser Verbindungen geeignet sind.

Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Voraussetzungen für dieses Projekt wurden im Rahmen des BMBF-Verbunds BaPro festgelegt. Im Jahre 2019 wurde der Antrag eines gemeinsamen Verbunds zum Thema „Darmbakterien des Phylums Bacteroidota zur Herstellung von Probiotika, bioaktiven Substanzen und organischen Säuren aus nachwachsenden Rohstoffen“ innerhalb der Förderprogramms „Mikrobielle Biofabriken für die industrielle Bioökonomie“ eingereicht. Der Antrag wurde im Jan. 2020 genehmigt. Die im BaPro-Verbund beteiligten wissenschaftlichen Partner waren Prof. Dr. Jochen Büchs (RWTH Aachen), Prof. Dr. Mirko Basen (Universität Rostock), Prof. Dr. Ralf Rabus (Universität Oldenburg), Prof. Dr. Wolfgang Streit (TU Hamburg) und Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit (Universität Kiel). Der industrielle Partner in dem Verbund war Dr. Thomas Polakowski von der Firma Novozymes (Berlin)

Das Ziel dieses Verbunds war die Erarbeitung von biotechnologischen Ansätzen unter Verwendung von Bacteroidota spp. als Plattformorganismen. Diese Mikroorganismen sollten für eine effiziente und nachhaltige Umwandlung von erneuerbaren organischen Stoffen in bioaktive Verbindungen und wichtige Massenchemikalien eingesetzt werden

Planung und Ablauf des Vorhabens

Alle im Projektvorschlag beschriebenen Aufgaben wurden umfassend erforscht und die Ziele/ Meilensteine erreicht. Die Ergebnisse sind in Abschnitt II im Detail dargestellt. Insgesamt wurden vier Publikationen, die direkt mit dem hier gezeigten Teilprojekt zusammenhängen, in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht (siehe Berichtsblatt 1 - 4). Eine weitere Publikation ist in Vorbereitung. Darüber hinaus wurden die erzielten Ergebnisse erfolgreich auf nationalen Konferenzen publiziert.

Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Bis heute konzentrieren sich fast alle wissenschaftlichen Untersuchungen, die Mitglieder des Phylums Bacteroidota betreffen, auf die menschliche Gesundheit. Im Gegensatz dazu fehlen biotechnologische Ansätze, die Bacteroidota-Arten als Plattformorganismen für die effiziente

und nachhaltige Umwandlung nachwachsender Rohstoffe in bioaktive Verbindungen und wertvolle Massenchemikalien (z. B. Succinat und Propionat) verwenden.

Wissensstand zur Succinat-Produktion:

Succinat ist eine sehr wichtige Grundchemikalie und wird in großen Mengen für die industrielle Produktion verwendet[5]. Während die traditionelle Petro-basierte und synthetische Erzeugung von Succinat rückläufig ist, nimmt die biobasierte Synthese dieser Verbindung durch mikrobielle Fermentation eine zunehmende Bedeutung als industrielle Produktionsstrategie ein. In der Literatur werden verschiedene genetisch optimierte Mikroorganismen genannt, die aus Glucose oder Glycerin hohe Produktionsausbeuten und Erträge erzielen (z.B. *Mannheimia succiniciproducens*; *Corynebacterium glutamicum*, *Yarrowia lipolytica*)[6-9]. Diese sehr hohen Ausbeuten sind jedoch nur bei ganz speziellen Reaktionsbedingungen zu erzielen. Diese Ansätze sind industriell so nicht umsetzbar. Ein weiterer Nachteil ist, dass Glycerin oder Glucose als Substrat eingesetzt werden müssen (mit Ausnahme von *Basfia succiniciproducens*)[10,11]. Nachwachsende Rohstoffe werden nicht verwertet, da entsprechende Enzyme in den genannten Organismen fehlen.

Wissensstand zu bioaktiven Phenolsäuren

Die Präsenz von Phenolsäuren im Darmtrakt ist im Allgemeinen mit Vorteilen für die menschliche Gesundheit verbunden. Diese Verbindungen stammen entweder aus Nahrungsmitteln, die reich an pflanzlichen Bestandteilen sind, oder entstehen mittels mikrobieller Fermentation von aromatischen Aminosäuren (AAAs) im Dickdarm. Drei der am häufigsten in menschlichen Stuhlproben nachgewiesen Phenolsäuren sind Phenylessigsäure, 4-Hydroxyphenyl-Essigsäure und Indolessigsäure[12,13]. Es wurde gezeigt, dass fünf Mitglieder der Gattung *Bacteroides* die Fähigkeit besitzen, alle drei AAAs zu fermentieren und dass die Proteinfermentation die wahrscheinliche Quelle der Hauptproduktion von Phenolsäuren ist[12]. Ansätze zur biotechnologischen Herstellung von Phenolsäuren als Nahrungsergänzungsmittel und Bulk-Chemikalien mit den oben genannten Organismen gibt es nicht.

Zusammenarbeit mit anderen Stellen: siehe oben

Ergebnisse:

Um die oben genannten Ziele zu erreichen, wurden Mitglieder der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* im Hinblick auf die Succinat-Herstellung analysiert. Hier wurde getestet, ob die Succinat-Produktion durch genetische Modifikation erhöht werden kann. Dafür wurden Systeme für die genetische Manipulierbarkeit der Organismen entwickelt. Im Mittelpunkt standen Ansätze zur gesteigerten Produktion von Schlüsselenzymen der Succinat-Bildung und das Ausschalten von konkurrierenden Stoffwechselwegen. In einem zweiten Ansatz wurden Isolate aus Anreicherungskulturen zur Identifizierung von Hochleistungs-Succinat-Produzenten verwendet.

Eine zweite Klasse von Produkten, die von Bacteroidota-Arten gebildet werden, sind bioaktive Phenolsäurederivate, die aus der Fermentation von aromatischen Aminosäuren stammen. Die allgemeine Strategie war das Screening auf effektive Produzenten und die Aufklärung der entsprechenden Stoffwechselwege. Zur Steigerung der Produktivität wurden die Stämme durch metabolisches Engineering weiterentwickelt. Das finale Ziel dieses Projekts war die Generierung von Bakterienstämmen zur optimierten Produktion von Succinat und Phenolsäurederivaten, die in Zukunft als „Bulk Chemicals“ bzw. als Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden könnten.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Arbeitspakete 1.1, 1.2 und 1.4: Screening nach geeigneten Stämmen aus dem Phylum Bacteroidota und Klassifizierung

Für die Identifizierung von geeigneten Ausgangsorganismen für die Produktion von Succinat und Phenylsäure-Derivaten wurde ein umfangreiches Screening durchgeführt. Als Probenmaterial wurden humane Faeces, Pansensaft aus Schafen, vergorene Milch und Material aus Biogas-Anlagen gewählt, da in diesen Habitaten bereits eine große Artenvielfalt des Phylums Bacteroidota mittels Metagenomanalysen nachgewiesen werden konnte. Zur selektiven Anreicherung von Bacteroidota wurde das Probenmaterial auf Nährböden mit komplexen Kohlenhydraten (Xylan, Cellulose, Muzin, Pektin) aufgetragen. Zur weiteren Selektion wurden Antibiotika verwendet, welche primär gegen Gram-positive Organismen wirken. Insgesamt wurden 40 neue Stämme aus verschiedenen Phyla isoliert (Tab. 1).

Tab1: Stammbibliothek von Mikroorganismen, angereichert aus natürlichen, anaeroben Habitaten.

Isolat	Anreicherung	Material	Klassifizierung
1	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Agathobacter rectalis Neff 23
2	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Anaerostipes spec. Neff 24
3	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Phacaeicola dorei Neff 3
4	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Phacaeicola dorei Neff 7
5	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Bacteroides kribbi Neff 1
6	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Bacteroides kribbi Neff 10
7	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Bacteroides kribbi Neff 17
8	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Bacteroides kribbi Neff 5
9	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Phacaeicola vulgatus Neff 11
10	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Phacaeicola vulgatus Neff 12
11	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Phacaeicola vulgatus Neff 14
12	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Phacaeicola vulgatus Neff 2
13	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Phacaeicola vulgatus Neff 4
14	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Phacaeicola vulgatus Neff 6
15	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Phacaeicola vulgatus Neff 8
16	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Phacaeicola vulgatus Neff 9
17	Anreicherung J. Polenz	gegorene Milch	Bifidobacterium lactis JP12
18	Anreicherung J. Polenz	gegorene Milch	Bifidobacterium lactis JP13
19	Anreicherung J. Polenz	gegorene Milch	Bifidobacterium lactis JP14
20	Anreicherung J. Polenz	gegorene Milch	Bifidobacterium longum JP15
21	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Blautia luti Neff 13
22	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Blautia luti Neff 18
23	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Blautia luti Neff 19
24	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Blautia luti Neff 20
25	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Clostridium strain Neff 21
26	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Coprococcus comes Neff 15
27	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Dorea longicatena Neff 16
28	Anreicherung J. Polenz	gegorene Milch	Enterococcus faecium JP16
29	Anreicherung J. Polenz	gegorene Milch	Enterococcus faecium JP17
30	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Enterococcus saigonensis Neff 22
31	Anreicherung A. Neff 2	Stuhl	Leuconostoc lactis
32	Anreicherung J. Polenz	gegorene Milch	Streptococcus thermophilus JP11
33	Anreicherung A. Neff 1	Biogas-Schlamm	Lactobacillus ingluviei
34	Anreicherung A. Neff 1	Biogas-Schlamm	Lactobacillus agilis
35	Anreicherung A. Neff 1	Biogas-Schlamm	Streptococcus salivarius
36	Anreicherung A. Neff 1	Biogas-Schlamm	Lactobacillus salivarius
37	Anreicherung A. Neff 1	Biogas-Schlamm	Lactobacillus fermentum
38	Anreicherung A. Neff 3	Pansen Saft	Selenomonas ruminantium
39	Anreicherung A. Neff 3	Pansen Saft	Lactobacillus mucosae
40	Anreicherung A. Neff 3	Pansen Saft	Bacteroides cellulosilyticus

Die 16S-rRNA aller Stämme wurde mittels PCR amplifiziert und die Amplifikate sequenziert und taxonomisch eingeordnet.

Die Verwendung von Levan als Substrat in Kombination mit dem Antibiotikum Amikacin führte zu einer Anreicherung von Mikroorganismen aus dem Phylum Bacteroidota. Unter diesen Bedingungen konnten mehrere Stämme aus den Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* isoliert werden.

Um Screenings von geeigneten Succinat/ Phenolsäure-Produzenten zu erweitern wurden neben der Isolierung von Wildstämmen bereits bestehende Sammlungen aus anderen Projekten überprüft. Im Rahmen dieser Überprüfung konnten neben den isolierten Wildstämmen noch weitere Vertreter der Bacteroidota aus der deutschen Stammsammlung (DSMZ) dem Spektrum der Verfügbaren Organismen hinzugefügt werden (Tab. 2). Außerdem wurden weitere Stämme von Projektpartner 4 (Prof. Dr. M. Basen, Universität Rostock) zur Verfügung gestellt und in die Liste aufgenommen (Tab. 2)

Tabelle 1: Organismen des Phylums Bacteroidota aus Stammsammlungen (DZMZ und Universität Rostock).

Organismus	**Stammbezeichnung**
Parabacteroides johnsonii	DSM 18315
Segatella copri	DSM 18205
Bacteroides intestinalis	DSM 17393
Bacteroides graminisolvens	DSM 19988
Bacteroides paurosaccharolyticus	DSM 21004
Bacteroides propionicifaciens	DSM 19291
Bacteroides xylanisolvens	DSM 18836
Parabacteroides chartae	DSM 24967

Arbeitspaket 1.3: Test des Abbaus komplexer Heteropolysaccharide

Bemerkenswerterweise steht eine ballaststoffreiche Ernährung in signifikantem Zusammenhang mit einer von *Prevotellaceae*-Arten dominierten Darmmikrobiota, wobei die am häufigsten vorkommende Art *Segatella (S.). copri* ist. Diese Ballast-Stoffe enthalten sehr viele Xylan-Polymere, die wiederum hauptsächlich aus Xylose aufgebaut sind. Für das Verständnis des Pentose-Metabolismus in *S. copri*, wurde das Wachstum des Organismus auf unterschiedlichen Substraten untersucht und verglichen. Generell konnte durch das Wachstum von *S. copri* auf Minimalmedium (DMM) mit Xylose gezeigt werden, dass ein biochemischer Weg zur Pentose-Umwandlung im Organismus vorhanden sein muss. Im Vergleich zum Substrat Glukose zeigte das Bakterium auch für Xylose eine typische exponentielle Wachstumsphase. *S. copri* erreichte in Minimal-Medium (DMM) + Glukose eine

Verdopplungszeit von 1,8 h und in DMM + Xylose war die Verdopplungszeit mit 2,6 h etwas höher. Auf beiden Substraten wurde eine maximale optische Dichte (OD_{600}) von 1,6 erzielt.

Von besonderem Interesse war auch die Untersuchung natürlicher Wachstumssubstrate wie pflanzliche Polysaccharide. Dazu wurden unterschiedliche Hemicellulosen und Pektine als Wachstumssubstrate eingesetzt (Abb. 1), da diese Polysaccharide vor allem aus Pentosen aufgebaut sind oder zumindest Seitenketten aus C5-Körpern besitzen. Bei Wachstum auf Weizen-Arabinoxylan zeigte *S. copri* eine Verdopplungszeit von 2,7 h. Wohingegen sich die Verdopplungszeit auf 3,5 h erhöhte, wenn Tamarinden-Xyloglucan als Substrat vorlag. Beim Einsatz von Apfel-Pektin als Substrat teilte sich der Organismus im Vergleich mit 2 h am schnellsten. Die maximalen OD_{600} mit den Substraten Arabinoxylan und Xyloglucan waren mit ungefähr 0,9 ähnlich. Wohingegen mit Pektin eine maximal OD_{600} von 1,8 erzielt werden konnte. Bei der Verwendung von Xylan aus Haferspelzen, trübte sich das Kulturmedium so stark, dass das Wachstum nicht über die Messung der OD_{600} erfolgen konnte. Daher wurde das Wachstum über die Bestimmung der Proteinkonzentration bestimmt. Es wurde ein ähnliches Wachstumsverhalten wie für das Substrat Xylose beobachtet. Bei Wachstum auf Xylan aus Haferspelzen wies *S. copri* eine Verdopplungszeit von 2,4 h auf.

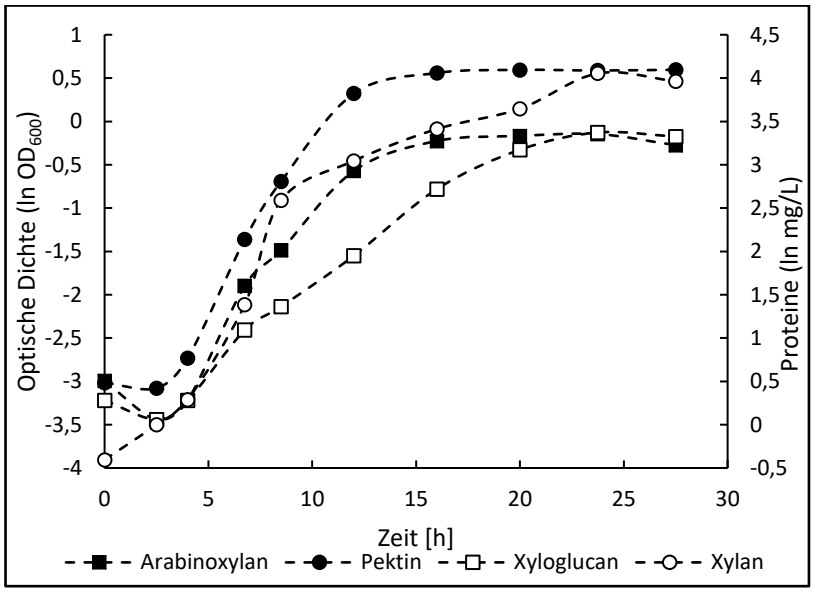

Abb. 2: Wachstumskurven von *S. copri* in DMM mit Arabinoxylan aus Weizen (■), Pektin aus Apfel (●), Xyloglucan aus Tamarinden (□) und Xylan aus Haferspelzen (○). Das Experiment wurde dreimal durchgeführt, wobei sehr ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. Ein Experiment ist abgebildet. Die Kulturen wurden anaerob in modifiziertem Defined Minimal Medium (DMM) bei 37 °C in mit Butylgummistopfen verschlossenen Serumflaschen unter einer N_2/CO_2-Atmosphäre (80/20%) inkubiert[14]. Vor dem Animpfen wurden Substrat (Glucose 15 mM, Polysaccharide 5 g/L), L-Cystein (0,5 g/l) als Reduktionsmittel, Vitamin K1 (0,1%(v/v)) und Hämin (5 mg/l) zugesetzt wurden. DMM wurde zusätzlich mit 1 ml/l Vitaminlösung[15] und Kaliumbutyrat (2 mM) ergänzt.

Vergleichbare Experimente wurden auch mit drei verschiedenen Stämmen von *Phocaeicola vulgatus* durchgeführt. Hier wurde festgestellt, dass die verwendeten Xylane nicht verstoffwechselt wurden und kein Wachstum mit diesen Substraten auftrat. Demgegenüber wurden Glucose und Pektin als Substrate verwendet und die optischen Dichten der Kulturen erreichten 2,1 (Glucose) und 0,7 (Pektin) nach 46 h Inkubation bei 37 °C. Weitere

Untersuchungen zeigten, dass zwar keine polymeren Xylane verwertet wurden, aber Xylooligosaccharide abgebaut wurden.

B. propionicifaciens wurde aufgrund der effizienten Bildung von Succinat und Propionat als potentieller Plattformorganismus für die biotechnologische Herstellung von Succinat identifiziert (persönliche Mitteilung Prof. Basen). Da in der Fachliteratur für viele Vertreter des Phylums Bacteroidota ausführlich der Abbau von pflanzlichen Polysacchariden beschrieben wurde[16], sollte im weiteren Verlauf das Abbaupotenzial von *B. propionicifaciens* gegenüber Polysacchariden bewertet werden. Hierfür wurden Kulturen in PY-Medium mit verschiedenen Polysacchariden (Cellulose, Galactomannan, Pectin, Xylan aus Haferspelzen) in der Konzentration 5 g L^{-1} als Kohlenstoffquelle versetzt. Während die Messung der OD_{600} kontinuierlich in einem Plattenlesegerät erfolgte, wurde für eine Analyse der Stoffwechselendprodukte am Ende der Kultivierung der Überstand mittels HPLC analysiert. Für keines der untersuchenden Polysaccharide konnte ein Wachstum von *B. propionicifaciens* beobachtet werden. Es kam weder zu einer Zunahme der OD_{600} noch konnten die zu erwartenden Stoffwechselendprodukte Acetat, Succinat, Formiat, Lactat und Propionat nachgewiesen werden. Daraus resultierend konnte eine Bildung von Succinat aus nachwachsenden Rohstoffen für *B. propionicifaciens* nicht bestätigt werden.

Arbeitspaket 2 und 3: Entwicklung von genetischen Werkzeugen und genetische Optimierung der Succinat-Produktion

Die Arbeitspakete waren sehr umfangreich und es geht sicher über den Rahmen eines Endberichts hinaus, alle Details zu benennen. Daher sind im folgenden Kapitel die Ergebnisse zu den Arbeitspaketen 2.1 – 2.5 und 3.1 – 3.5 kurz zusammengefasst. Der Text basiert auf unserer Veröffentlichung in der Zeitschrift Biospektrum, die eine sehr breite Leserschaft hat[17]. Die beschriebenen Ergebnisse sind bereits im Detail veröffentlicht.[18,19] Eine weitere Veröffentlichung ist in Vorbereitung.

Bisherige Studien zur Darmmikrobiota fokussierten sich hauptsächlich auf die mikrobielle Zusammensetzung und deren Wechselwirkung mit dem Wirt, vor allem im Kontext der menschlichen Gesundheit. Diese Organismen und ihre Stoffwechselwege bergen jedoch auch Potenzial für die industrielle Anwendung unter Verwendung nachwachsender Rohstoffe, beispielsweise für eine nachhaltige Synthese von Succinat. Ehemals bekannt als *Bacteroides vulgatus* wird *Phocaeicola* (*P.*) *vulgatus* aufgrund seiner hohen Abundanz als eines der wichtigsten Darmkommensale im menschlichen Dickdarm betrachtet[20]. Zudem besitzt das Bakterium Enzymsysteme für den Abbau pflanzlicher Polysaccharide. Daher eignet sich *P. vulgatus* als Modellorganismus für genetische Modifikationen und für die Validierung des biotechnischen Potentials für die Produktion der Plattformchemikalie Succinat.

In den letzten Jahren wurden bereits einige Werkzeuge für die genetische Manipulation von Arten der Ordnung Bacteroidales entwickelt, die sich jedoch überwiegend auf Bakterien der Risikogruppe 2 bezogen. Deshalb ist es nicht möglich, diese Organismen industriell als Produktionsstämme für eine nachhaltige Succinat-Produktion einzusetzen. Um *P. vulgatus* als alternative Plattform zu etablieren, erfolgte eine Neuausrichtung dieser genetischen Werkzeuge. Die aktuelle genetische Toolbox für *P. vulgatus* basiert auf zwei Plasmid-Systemen: Der Shuttle-Vektor pG106 und der Genom-integrative Vektor pMM656 (Abb. 1)[21,22]. Nach Anpassung der Methodik ließen sich beide Plasmide mittels Konjugation aus geeigneten *E. coli*-Stämmen zuverlässig in *P. vulgatus* übertragen. Mithilfe des pG106-Shuttle Vektors

wurde zunächst ein System zur Überproduktion von Proteinen in *P. vulgatus* entwickelt [18]. Durch die Kombination des potenten konstitutiven Promotors des Gens der Lactat-Dehydrogenase (*ldh*, *bvu_2499*) und Genen des Zentral-Stoffwechsels wurde bestätigt, dass sich der Kohlenstofffluss in *P. vulgatus* modifizieren lässt. Konkret wurde gezeigt, dass die *ldh*-Überexpressionsmutante eine ca. 1500-fache Steigerung der *ldh*-Transkriptmenge und eine 200-fach höhere Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Letztendlich führte dies dazu, dass die Lactatproduktion um das Zehnfache gesteigert wurde. Ähnliche Effekte bezüglich der Formiat-Produktion wurden durch die Überproduktion der Pyruvat: Formiat Lyase (PFL, BVU2880) in *P. vulgatus* erzielt.
Neben der Überproduktion von Enzymen war auch die Deletion von Genen von wichtiger Bedeutung. Für eine Modifizierung des Stoffwechsels mithilfe der markerlosen Deletion von Gensequenzen durch homologe Rekombination wurde für *P. vulgatus* ein potenter Gegenselektionsmarker identifiziert und evaluiert[19]. Die Kombination des Plasmid-Rückgrats von pMM656 und des *sacB*-Gens ermöglichte die Entwicklung eines modularen Deletionsvektors, welcher sich für die Durchführung einer markerlose Deletion in *P. vulgatus* eignet (Abb. 3). Als Demonstration wurden, mit *sacB* als Gegenselektionsmarker, die Enzyme des Uracil-„salvage pathways“ (BVU_0984 und BVU_3649) ausgeschaltet. Somit wurde erstmals gezeigt, dass eine Deletion von mehr als einem Gen in *P. vulgatus* möglich ist. Darüber hinaus wurde die Basis für die Einführung eines zusätzlichen Systems zur markerlosen Deletion von Genen in *P. vulgatus* gelegt. Dieses System beruht auf den Genen *bvu_0984* und *bvu_3649* als Gegenselektionsmarker, wobei 5-Fluoruracil eingesetzt wird [18].

Die Deletionssysteme wurden nachfolgend auf mehrere Gene des Zentralstoffwechsels angewandt, wobei Mutanten erzeugt wurden, die Inulin bzw. Rhamnose nicht mehr verwerten konnten. Die Mutanten dienten nachfolgend für die Aufklärung der Stoffwechselwege zur Verwertung von Fruktanen und zur Synthese von Phenolsäuren. Zusammenfassend wurden Systeme für *P. vulgatus* etabliert, die die Überexpression, Regulation und Deletion von Genen des zentralen Stoffwechsels erlauben.

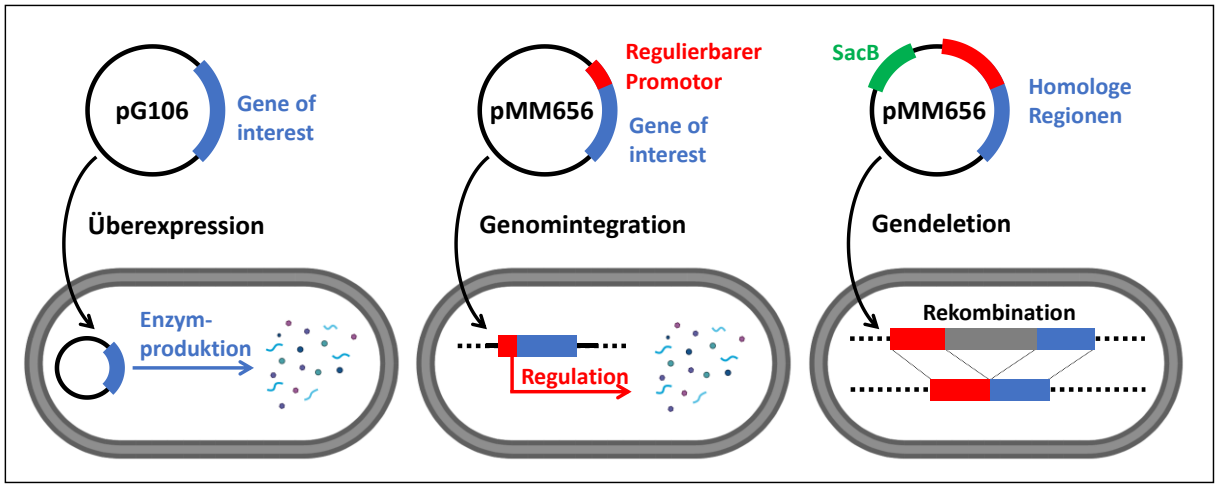

Abb. 3: Schematische Darstellung der genetischen Werkzeuge für *P. vulgatus*. A) pG106 Shuttle-Vektor: High-Copy Plasmid für die konstitutive homologe und heterologe Überexpression von Genen in *P. vulgatus*. B) Genomintegrativer Vektor pMM656: Über eine NBU2-Integrase wird das Plasmid im Genom von *P. vulgatus* inseriert und ein Rhamnose-induzierbarer Promotor erlaubt eine kontrollierte Expression von Genen. C) Modularer Vektor für eine markerlose Gendeletion auf Basis von pMM656. Frei wählbare homologe Sequenzen zu der Zielregion im Genom ermöglichen die Deletion des gewünschten Gens durch Rekombination

Der zentrale Metabolismus von *P. vulgatus* beruht auf einer gemischten Säuregärung wobei neben Succinat auch Acetat, Propionat, Formiat und Lactat produziert werden (Abb. 4). Polysaccharide werden mittels Hydrolasen in Monosaccharide überführt und über die Glykolyse werden Substrate zunächst in Phosphoenolpyruvat (PEP) umgewandelt, wobei dieses Intermediat zu Oxalacetat carboxyliert (respiratorischer Ast) oder zu Pyruvat (fermentativer Ast) metabolisiert werden kann. Im Zuge der Fumarat-Atmung wird Oxalacetat (OAA) zunächst zu Fumarat und anschließend zu Succinat reduziert. Succinat kann anschließend in Propionat umgewandelt werden. Im fermentativen Ast kann Pyruvat zu Lactat reduziert werden (BVU_2499) oder es erfolgt die Bildung von Acetyl-CoA mittels einer Pyr:Fd Oxidoreduktase (BVU_3787) bzw. einer Pyr:Formiat-Lyase (BVU_2880), wobei in diesem Falle zusätzlich Formiat entsteht Zur Steigerung der Succinat-Ausbeute war es daher notwendig die Synthese der Nebenprodukte zu verringern oder ganz zu unterbinden (Abb. 4).

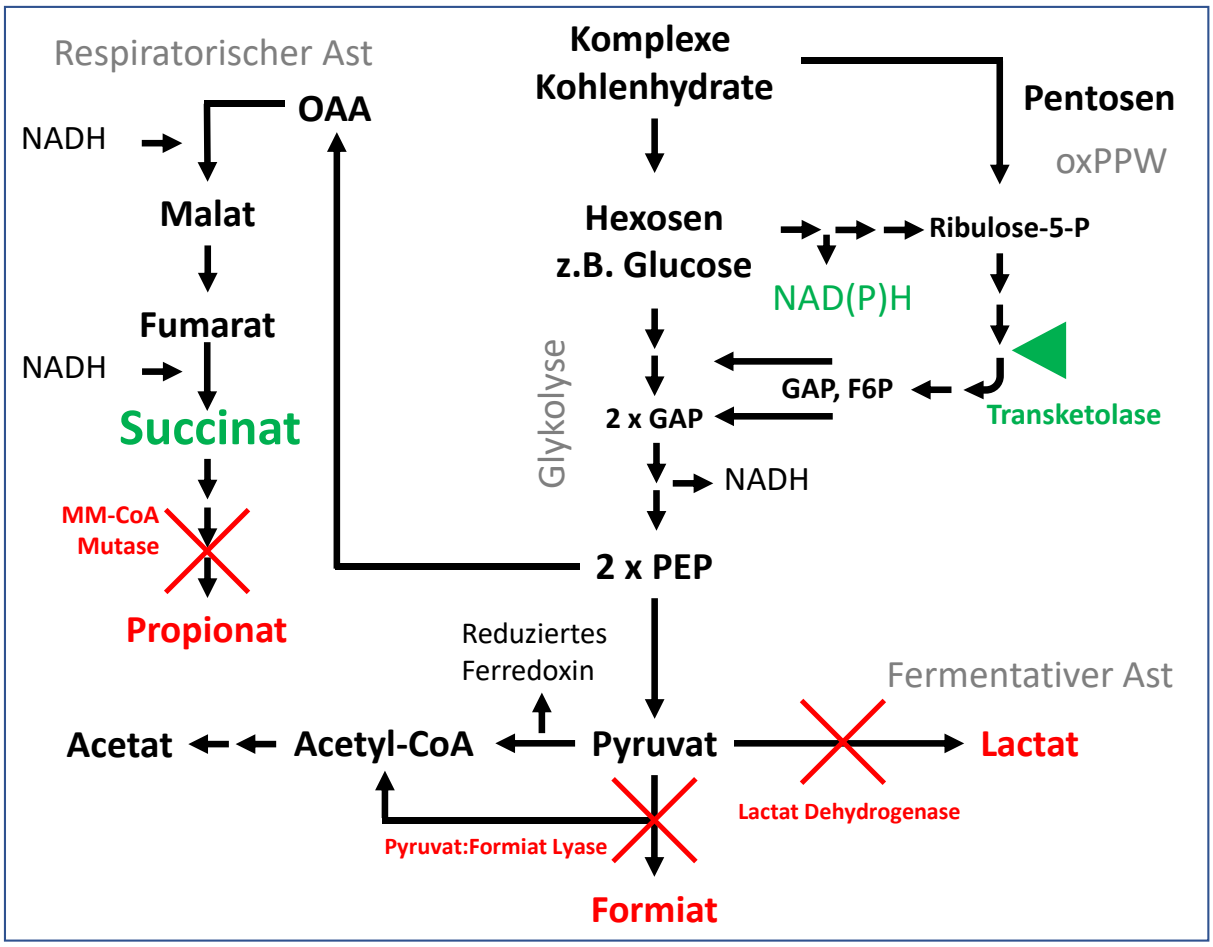

Abb. 4: Schema des zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsels von *P. vulgatus*. Die aus dem Abbau von pflanzlichen Kohlenhydraten resultierenden Zucker-Monomere werden zu kurzkettigen Fettsäuren wie Succinat, Propionat, Lactat, Formiat und Acetat umgesetzt. Rot: Deletierte Gene und ausgeschaltete Produkte. Grün: Überproduzierte Enzyme und Produkte. GAP, Glyceraldehyd-Phosphat; F6P, Fructose-6-Phosphat; CoA, Coenzym A.

Dazu wurde zunächst das Gen für die Methylmalonyl-CoA-Mutase (*bvu_0309-10*) in *P. vulgatus* mittels des SacB-Deletionssystems ausgeschaltet. Das entsprechende Enzym ist Bestandteil des Synthesewegs zu Propionat und dessen Ausschaltung resultierte in einer Erhöhung der Succinat-Ausbeute um fast 100 % im Vergleich zum Wildtyp. Weitere Deletionen

der Gene für die Pyruvat:Formiat-Lyase und die D-Lactat-Dehydrogenase verhinderten die Synthese der Endprodukte Formiat und Lactat. Diese Dreifachmutante produzierte nur noch Succinat und Acetat in äquimolaren Mengen. Weitere Ansätze sind geplant, um den Anteil von Acetat so weit wie möglich zu reduzieren. Die Ergebnisse legen nahe, dass es möglich ist, mehrere Gene des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* zu entfernen (Abb. 4).

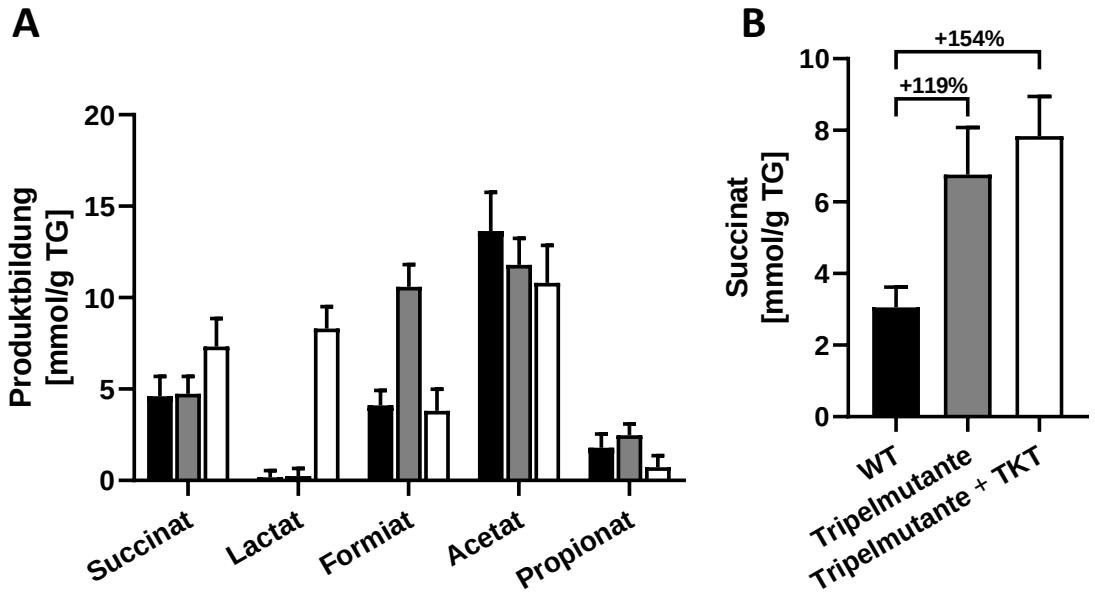

Abb. 5: Produktbildung der Mutanten. A) Quantifizierung der Endprodukte: Wildtyp (Schwarzer Balken), Pyruvat: Formiat Lyase überproduzierende Mutante (Grauer Balken) und Lactat-Dehydrogenase überproduzierende Mutante (Weißer Balken). B) Succinat-Produktion: Wildtyp (schwarzer Balken), Tripel-Mutante (*Δ0309-10 Δ2449 Δ2880*; grauer Balken) und Tripel-Mutante mit Überexpression des *tkt*-Gens (weißer Balken). Gezeigt werden die Mittelwerte der Produktbildung in Abhängigkeit des Trockengewichts. Die Standardabweichungen sind durch entsprechende Fehlerbalken angegeben.

Da für die Erzeugung von Succinat während der Fumarat-Atmung Reduktionsäquivalente in Form von NADH benötigt werden, wurden im nächsten Schritt Gene des Pentosephosphatwegs (oxPPW) überexprimiert. Insbesondere der oxidative Teil dieses Stoffwechselwegs nimmt eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung von NAD(P)H ein. Daher wurde die Transketolase (BVU_2318), eines der Schlüsselenzyme des oxPPW (Abb. 4), in der Dreifachmutante von *P. vulgatus* homolog überproduziert. Dieses Vorgehen führte zu einer weiteren Erhöhung des Succinat-Ertrags um 35 % (Abb. 5). Daher repräsentiert die erzeugte Tripel-Deletionsmutante *P. vulgatus Δ0309-10 Δ2449 Δ2880*, ergänzt durch das Plasmid zur Überproduktion der Transketolase, ein geeignetes biotechnologisches Modell für eine nachhaltige und biobasierte Succinat-Herstellung.

Arbeitspakete 4.1 – 4.5: Produktion von Phenolsäuren

Die Präsenz von Phenolsäuren im Darmtrakt ist im Allgemeinen mit Vorteilen für die menschliche Gesundheit verbunden. Diese Verbindungen sind Ausgangspunkte für die Synthese verschiedener sekundärer Metaboliten und werden im Phenylpropanoid-Weg gebildet. Drei der am häufigsten in menschlichen Stuhlproben nachgewiesen Phenolsäuren sind Phenylessigsäure, 4-Hydroxyphenyl-essigsäure und Indolessigsäure[12,13].

AP 4.1 und 4.2: Screening nach produktiven Phenolsäure-Produzenten und Wachstumsoptimierung: Für die Bearbeitung dieses Meilensteins wurde aus Probenmaterial von Biogasanlagen, Pansen von Schafen und Stuhlproben Bakterien des Phylums Bacteroidota selektiv angereichert (s. Meilenstein 1.1). Zur Identifizierung vielversprechender Produktionsstämme wurden mittels HPLC-Analysen Vertreter des Phylums Bacteroidota genutzt um die Produktion von Substanzen mit Phenyl-Substituenten nachzuweisen. In Untersuchungen konnten jedoch keine geeigneten Produzenten von Phenolsäuren identifiziert werden. Somit konnte auch keine Wachstumsoptimierung möglicher Phenylsäure-Produzenten bearbeitet werden. Aus diesem Grund wurden Experimente mit *P. vulgatus* als Plattformorganismus für die Produktion von Phenolsäuren durchgeführt.

AP 4.3: Aufklärung des Metabolismus zur Phenolsäure-Produktion

Die Bildung von Phenolsäuren in Mikroorganismen fußt primär auf dem Stoffwechsel der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Im Hinblick auf die Produktion von Phenolsäuren wurde in *P. vulgatus* ein neuartiger Stoffwechselweg postuliert und analysiert. Bioinformatische Analysen ergaben, dass *P. vulgatus* ausgehend von Phenylalanin theoretisch in der Lage sein sollte, Phenylessigsäure unter Freisetzung von ATP zu generieren. In diesem Zusammenhang konnten in *P. vulgatus* eine Reihe von Enzymen identifiziert werden, welche ausgehend von Phenylalanin das gewünschte Produkt Phenylessigsäure bilden können (Abb. 6).

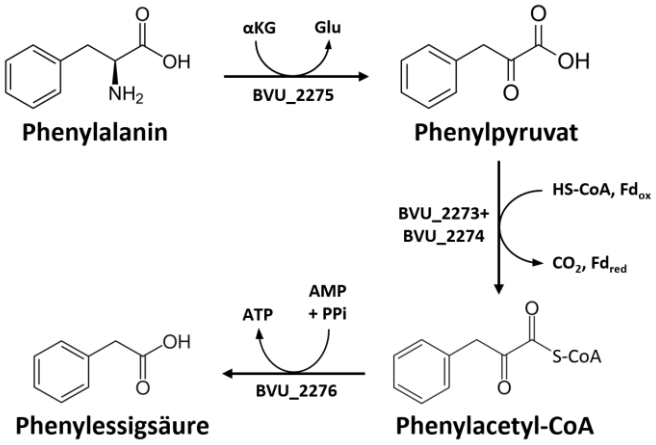

Abb. 6: Potenzielle Synthese von Phenylessigsäure in *P. vulgatus*. Ausgehend von Phenylalanin besitzt *P. vulgatus* die Enzyme zur Bildung von Phenylacetyl-Coenzym A (CoA). BVU_2275: Aminotransferase; BVU_2273/2274: Indolpyruvat Ferredoxin Oxidoreductase; BVU_2276: Phenylacetat-CoA ligase; αKG: α-Ketoglutarat; Glu: Glutamat; Fd: Ferredoxin; Ox: Oxidiert; Red: Reduziert; AMP: Adenosin-Monophosphat; PPi: Pyrophosphat; ATP: Adenosin-Triphosphat.

Weiterhin konnte in *P. vulgatus* eine aromatische Ammoniak-Lyase (AAL) identifiziert werden. Diese Enzymklasse wandelt Phenylalanin oder Tyrosin unter Freisetzung von Ammoniak zu Zimtsäure bzw. Cumarsäure um. Bei beiden Stoffen handelt es sich um für die Industrie relevante Phenolsäuren, die als Ausgangsverbindung für die Synthese vieler pharmakologisch wertvoller Substanzen benötigt werden. Das Protein BVU_1010 ist in Datenbanken als Histidin-Ammonia Lyase annotiert, jedoch besitzen AAL häufig ein sehr breites Substratspektrum (Abb. 7).

Um das Potenzial von *P. vulgatus* für die Produktion von Phenylessigsäure und Zimt/Cumarsäure zu bewerten wurden die beteiligten Enzyme im Detail analysiert.

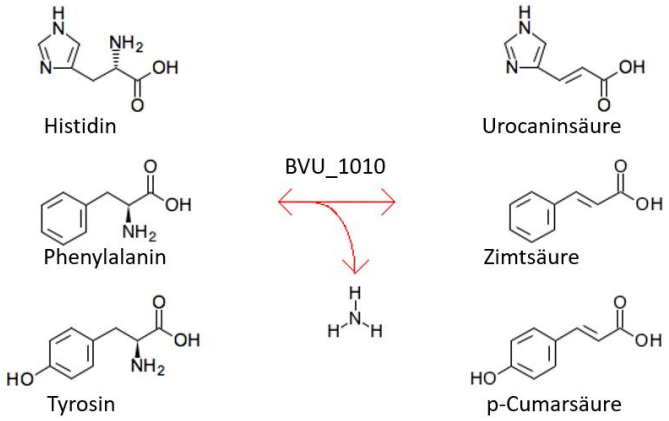

Abb. 7: mögliches Substrat- und Produktspektrum der Histidin Ammonia Lyase (BVU_1010) aus *P. vulgatus.*

AP 4.4: Charakterisierung der Enzyme zur Phenolsäure-Produktion

In *P. vulgatus* wurden drei Enzyme im Zusammenhang mit der Produktion von Phenylessigsäure identifiziert. Die Enzyme BVU_2275, 2273/2274 und 2276 sind Teil eines Stoffwechselpfads für die Synthese von Phenylessigsäure, ausgehend von Phenylalanin. Für eine physikochemische Charakterisierung dieser Enzyme wurden diese heterolog in *E. coli* überproduziert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Indolpyruvat Oxidoreduktase (BVU_2273/2274) konnte bereits in ihrer Funktion charakterisiert werden (Abb. 8).

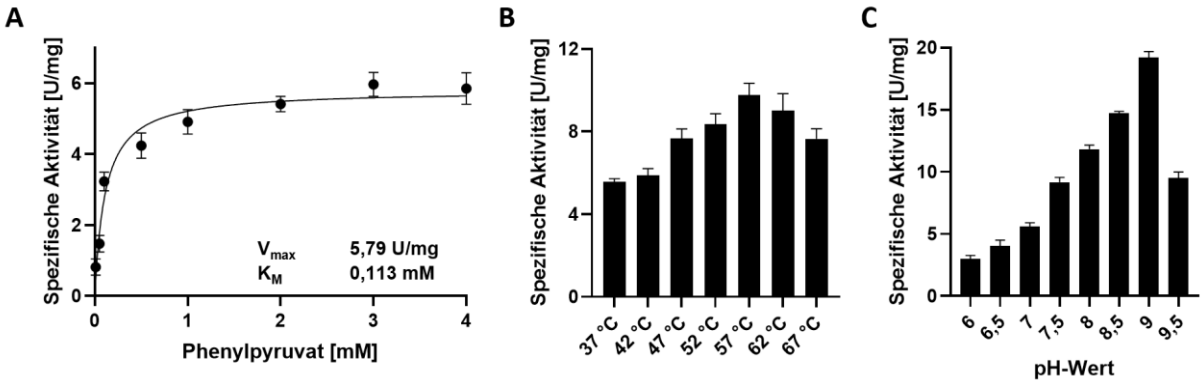

Abb. 8: Charakterisierung der Indolpyruvat Oxidoreductase (BVU_2273/2274). [A] Michaelis-Menten-Kinetik zur Ermittlung des K_M – und V_{max} -Werts der Indolpyruvat Oxidoreductase aus *P. vulgatus* in Abhängigkeit der eingesetzten Phenylpyruvat-Konzentration. [B] Aktivitätsbestimmung der Indolpyruvat Oxidoreductase bei verschiedenen Temperaturen und einem pH-Wert von 7. [C] Aktivitätsprofil der Indolpyruvat Oxidoreductase bei variierendem pH-Wert. Das pH-Aktivitäts-Spektrum wurde unter Verwendung des McIlvaine-Puffersystems generiert. Die Experimente wurden für jeden Messpunkt zweimal durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Um den kritischen Reaktionsschritt für die Bildung von Phenylessigsäure durch die Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) zu bestätigen, wurde ein Kombinationsassay

durchgeführt, bei dem sowohl die Indolpyruvat Oxidoreduktase (BVU_2273/2274) als auch die Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) gleichzeitig eingesetzt wurden (Abb. 9).

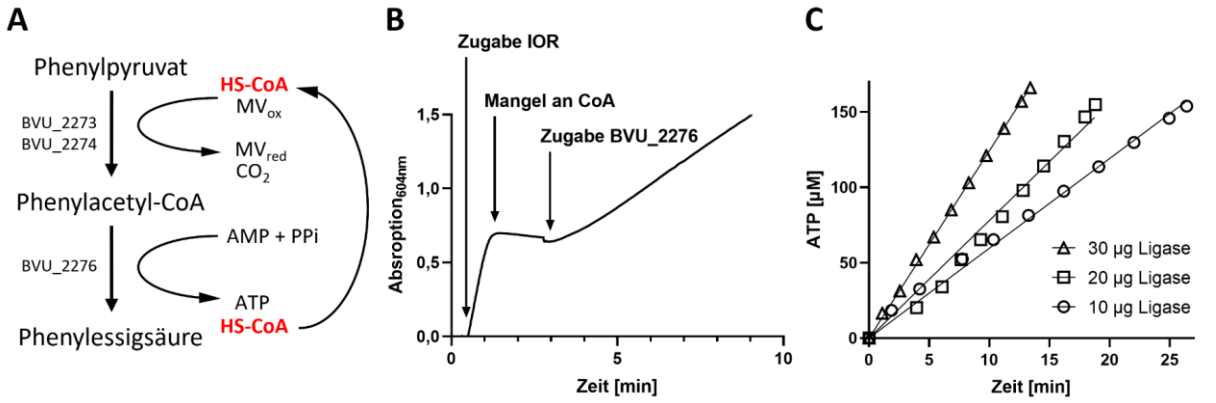

Abbildung 9: Kombinationsassay der Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) mit der Indolpyruvat-Oxidoreduktase (BVU_2273/2274) aus *P. vulgatus*. [A] Schematische Darstellung der Reaktion im Kombinationsassay mit der IOR (BVU_2273/2274) und der Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) aus *P. vulgatus*. [B] Qualitative Messung der Enzymaktivität der Phenylacetyl-CoA Ligase für die Produktion von Phenylessigsäure, messbar durch die Reduktion von Methylviologen. Zunächst wurde dem Assay das Substrat Coenzym A in limitierter Konzentration (50 µM) zugeführt. Nach der vollständigen Umsetzung von Coenzym A zu Phenylacetyl-CoA stoppte die Reaktion. Durch die Zugabe der Phenylacetyl-CoA Ligase konnte erneut eine Reduktion von Methylviologen gemessen werden. [C] Nachweis der ATP-Bildung im Kombinationsassay mit verschiedenen Konzentrationen der Phenylacetyl-CoA Ligase.

Die Bildung von Phenylessigsäure unter Konservierung von Energie in Form von ATP konnte somit nachgewiesen werden. Anhand der Freisetzung von ATP wurde eine spezifische Aktivität der Phenylacetyl-CoA Ligase von 2,5 U/mg ermittelt. Um diesen Stoffwechselweg direkt im Organismus nachzuweisen wurde *P. vulgatus* mit Phenylalanin als Substrat kultiviert. Durch die nachweisliche Bildung von Phenylessigsäure ließ sich die Funktionalität des Stoffwechselzweigs eindeutig bestätigen (Abb. 10). Es folgten weitere Versuche um die Produktion von Phenylessigsäure zusätzlich zu erhöhen. Die homologe Überproduktion der Aminotransferase BVU_2275 mithilfe des Shuttle-Vektors pG106 in *P. vulgatus* steigerte die Menge an Phenylalanin, welche maximal in den Stoffwechselzweig eingeschleust werden konnte. Dies führte zu einer vierfach höheren Ausbeute an Phenylessigsäure (Abb. 10 A, B).

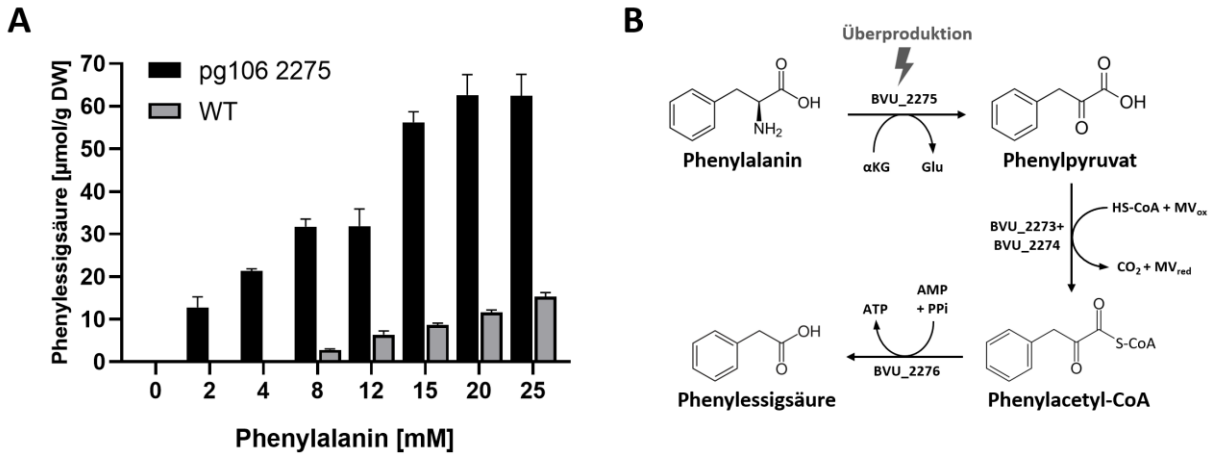

Abbildung 10: Synthese von Phenylessigsäure in *P. vulgatus.* [A] Vergleich der gebildeten Menge an Phenylessigsäure zwischen *P. vulgatus* Wildtyp und der Plasmid-tragenden Variante *P. vulgatus* pG106 2275. [B] Schematische Darstellung des Phenylalanin-Stoffwechsels mit Hinblick auf die Bildung von Phenylessigsäure. Analyse der Phenylessigsäure-Konzentrationen erfolgte über HPLC. Als Probenmaterial wurde Überstand von Kulturen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die Kultivierung erfolgte in 50 ml DMMG-Medium mit zusätzlicher Supplementation von Phenylalanin in verschiedenen Konzentrationen.

In *P. vulgatus* konnte über bioinformatische Analysen eine potenzielle Ammoniak-Lyase für aromatische Aminosäuren identifiziert werden. Diese Enzymklasse setzt die Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Histidin zu den respektiven Produktion Cumarsäure, Zimtsäure und Urocaninsäure um.

Versuche mit aufgereinigtem BVU_1010 konnten bestätigen, dass das Enzym BVU_1010 aus *P. vulgatus* mit Phenylalanin und Tyrosin als Substrat arbeitet, obwohl es als Histidin-Ammoniak Lyase annotiert wurde. Entsprechend der Enzymklasse bildet BVU_1010 mit Phenylalanin als Substrat Zimtsäure, und mit Tyrosin als Substrat Cumarsäure. Histidin wird als Substrat nicht umgesetzt (Abb. 11).

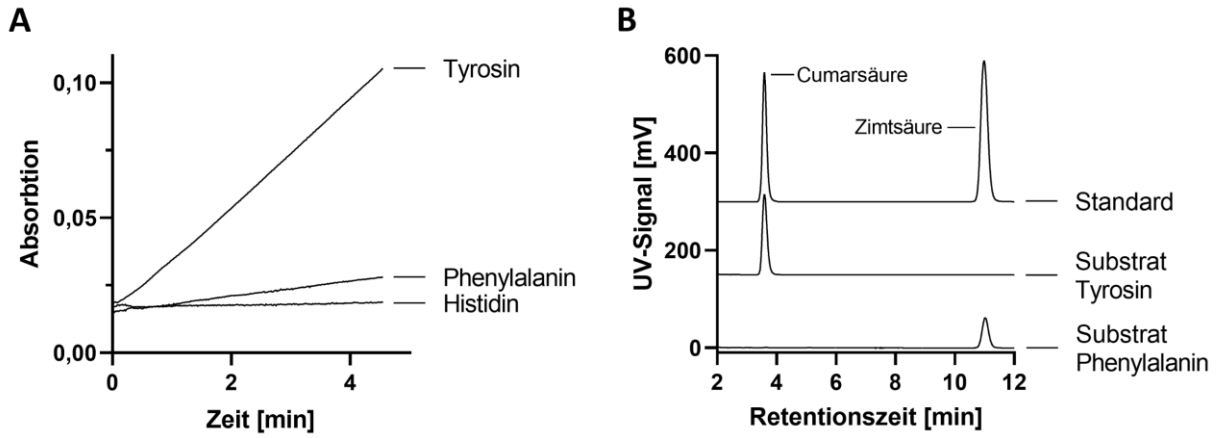

Abbildung 11: Produkt- und Substratspektrum der Histidine Ammonia Lyase aus *P. vulgatus*. [A] Qualitative Analyse des Substratspektrums von BVU_1010. Das Enzym arbeitet primär mit Tyrosin, akzeptiert jedoch auch Phenylalanin als Substrat. Aktivität mit Histidin konnte nicht festgestellt werden. [B] Qualitativer Nachweis des Produktspektrums von BVU_1010. Entsprechend der Erwartungen setzt das Enzym Tyrosin zu Cumarsäure und Phenylalanin zu Zimtsäure um.

Im Rahmen weiterführender Untersuchungen wurden Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten von BVU_1010 mit Phenylalanin und Tyrosin untersucht (Abb. 12). Dabei wurde festgestellt, dass die Affinität von BVU_1010 zu Tyrosin um den Faktor 1000 höher ist als die Affinität von BVU_1010 zu Phenylalanin. Somit konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem Enzym um eine Tyrosin Ammoniak Lyase handelt.

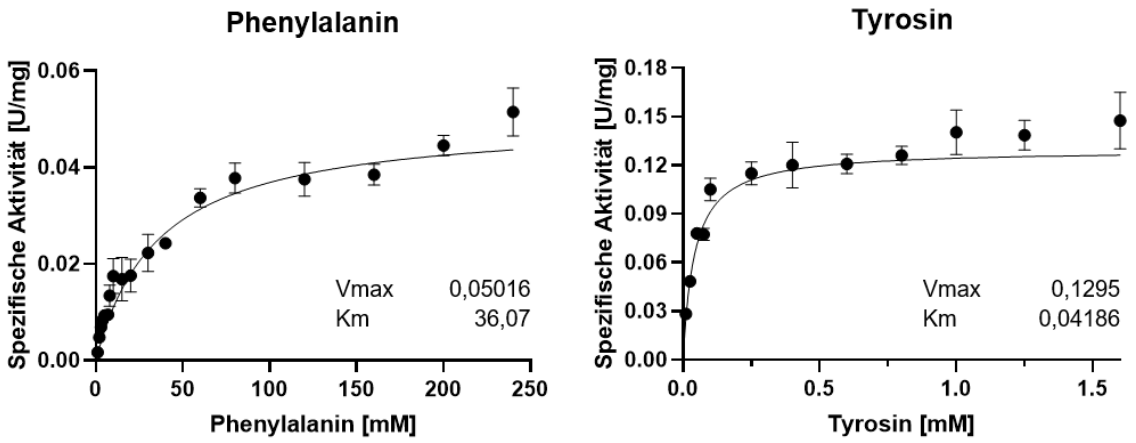

Abbildung 12: Charakterisierung der Ammonia Lyase (BVU_1010) aus *P. vulgatus*. BVU_1010 akzeptiert sowohl Tyrosin und in geringem Umfang auch Phenylalanin als Substrat. Die Aktivitäts- und Affinitätswerte zeigen deutlich, dass es sich bei dem Enzym primär um eine Tyrosin Ammonia Lyase handelt.

Die ermittelten kinetischen Parameter charakterisieren das Enzym BVU_1010 eindeutig als Tyrosin-Ammoniak Lyase (TAL) mit geringer Phenylalanin-Ammoniak-Lyase-Aktivität. Jedoch stellt die geringe maximale Aktivität für eine biotechnologische Anwendung dieses Enzyms ein Problem dar. Obwohl BVU_1010 eine eindeutige TAL-Aktivität mit hoher Affinität zu Tyrosin aufwies, ist das Enzym aufgrund der niedrigen Umsatzrate eher ungeeignet für die Anwendung in der Cumarsäure-Produktion.

AP 4.5: Ausschaltung von Abbau-Enzymen von Phenylessigsäure-Derivaten

Um die Ausbeute an Phenylessigsäure in *P. vulgatus* zusätzlich zu erhöhen ist die Identifizierung und Ausschaltung von Enzymen notwendig, welche Phenylessigsäure verstoffwechseln könnten. Abgesehen von der Phenylacetyl-CoA Ligase konnten auch nach bioinformatischen Analysen keine weiteren Enzyme *P. vulgatus* identifiziert werden, welche mit Phenylessigsäure arbeiten. Daher wurde untersucht, ob die Phenylacetyl-CoA Ligase ebenfalls zur Rückreaktion von Phenylessigsäure zu Phenylacetyl-CoA befähigt ist. (Abb. 13).

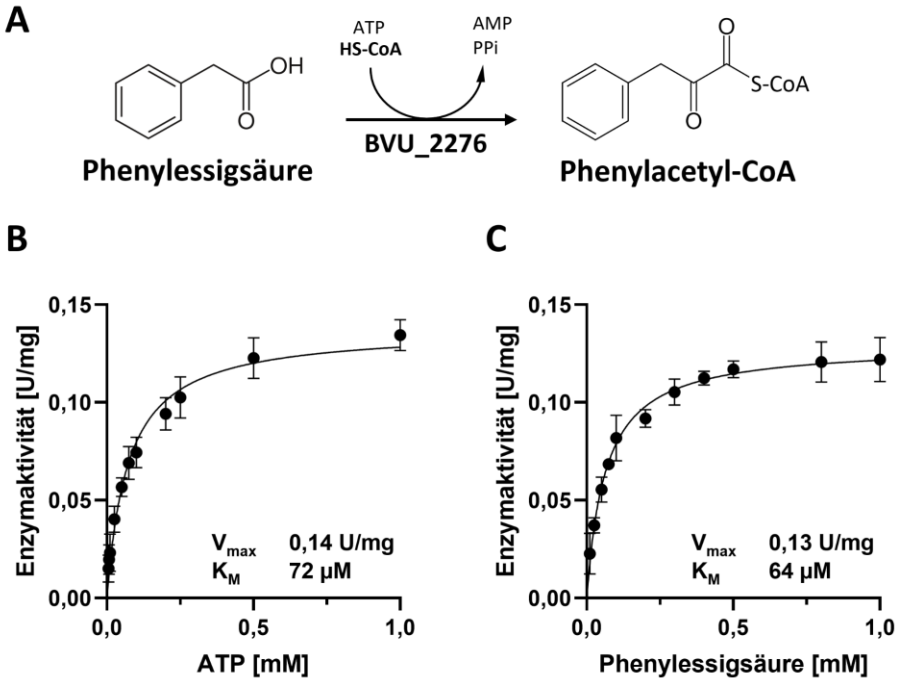

Abbildung 13: Gegenreaktion der Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) zur Analyse des Abbaus von Phenylessigsäure. [A] Reaktionsgleichung der katalysierten Reaktion der Phenylacetyl-CoA Ligase BVU_2276 aus *P. vulgatus*. [B] Michaelis-Menten Kinetik für die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} für das Substrat ATP. [C] Michaelis-Menten Kinetik für die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} für das Substrat Phenylessigsäure.

Die Analyse der Gegenreaktion legte offen, dass die primäre Reaktion der Phenylacetyl-CoA Ligase die Bildung von Phenylessigsäure darstellt. Unter optimalen Bedingungen erreichte die Phenylacetyl-CoA Ligase maximale spezifische Aktivität von 0,14 U/mg. Diese Aktivität lagt somit deutlich unter der Aktivität für die Reaktion in Richtung Phenylessigsäure, welche 2,5 U/mg betrug. Somit konnte festgestellt werden, dass die primäre Reaktion der Phenylacetyl-CoA Ligase die Bildung von Phenylessigsäure unter biotechnologischen Bedingungen begünstigt, und daher kein nennenswerter Abbau von Phenylessigsäure durch dieses Enzym zu erwarten ist.

Weitere dedizierte Proteine, welche für den Abbau von Phenylessigsäure in *P. vulgatus* verantwortlich sind, konnten nicht identifiziert werden. In Wachstumsexperimenten mit Phenylessigsäure als Substrat konnte zusätzlich gezeigt werden, dass *P. vulgatus* diese Verbindung nicht metabolisiert. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei Phenylessigsäure um ein Stoffwechselendprodukt von *P. vulgatus* handelt, welches kein Bestandteil von nachfolgenden metabolischen Prozessen ist.

Literatur:
1) Schwalm ND, Eduardo A. Groisman E.A. 2017. Trends Microbiol 25: 1005-16. 2) Hill 1995. Eur J Cancer Prev 4: 353-8. 3) Tan et al. 2019. Food Res Int 116: 637-44. 4) Werpy & Petersen 2004. Top value added chemicals from biomass. Washington,D.C: US Department of Energy. 5) www.marketsandmarkets.com/PressReleases/succinic-acid.asp. 6) Kim et al. 2017. Biotechnol J 12(2). doi: 10.1002/biot.201600701. 7) Ahn et al. 2018. J Ind Microbiol Biotechnol 45: 555-66. 8) Okino et al. 2008. Appl Microbiol Biotechnol 81:459-64. 9) Gao et al. 2016. Biotechnol Biofuels 9: 179. 10) Cimini et al. 2019. Biotechnol Biofuels 12: 22. 11) Salvachúa et al. 2016. Bioresour Technol 214: 558-66. 12) Russell et al. 2013. Mol Nutr Food Res 57: 523-35. 13) Smith & Macfarlane 1996. J Appl Bacteriol 81: 288–302. 14) Franke & Deppenmeier 2018. Mol Microbiol 109: 528-40. 15) Wolin EA et al. (1963) J Biol Chem 238:2882–2886. 16) Ravcheev, DA et al. (2013) BMC genomics, 14, 1-17. 17) Neff A, Lück R, Gindt M, Deppenmeier U (2024) BIOspektrum 01.24: 52-54. DOI: 10.1007/s12268-024-2087-z. 18) Lück

R and Deppenmeier U (2022) Appl Microbiol Biotechnol. 106(3):1211-1225. doi: 10.1007/s00253-022-11777-6. 19) Neff A, Lück R, Hövels M, Deppenmeier U (2023) Anaerobe 81:102742. doi: 10.1016/j.anaerobe.2023.102742. 20) King CH et al. (2019) PLoS One 14(9):e0206484. doi: 10.1371/journal.pone.0206484. 21) Jones KR et al. (2020) Mol Oral Micro Biol 35:181–191. https://doi.org/10.1111/omi.12304. 22) Mimee M et al. (2015) Cell Syst 1:62–71. https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.06.001

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigste Position war sicherlich die Vergütung der wissenschaftlichen Mitarbeiter. Hier sind Herr Dr. André Neff (02/20 – 05/23), Frau Dr. Rebecca Lück (02/20 – 02/23) und Frau Natalie Hager (03/23-11/23) zu nennen. Diese Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen haben einen Großteil der beschriebenen Experimente durchgeführt und haben maßgeblich an der Erstellung der Manuskripte zur Veröffentlichung mitgearbeitet. Herr Neff und Frau Lück haben im Rahmen dieses Projekts promoviert. Die Investitionsmittel wurden wie geplant genutzt, um ein HPLC-System mit entsprechenden Trennsäulen zu beschaffen. Ohne diese Geräte wären die Arbeiten nicht möglich gewesen. Unter Position 0843 (sonstige allg. Verw. Ausgaben.) fallen Ausgaben für Gase, Chemikalien, Chromatographie-Materialien, Materialien für molekularbiologische und proteinchemische Untersuchungen, Einmalplastikwaren und Kosten für Sequenzierungen.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Im Rahmen dieses Projektes wurden große Fortschritte in Bezug auf genetische Methoden zur Steuerung des Stoffwechsels von Spezies der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* gemacht. Ein metabolisches Design kann jetzt durchgeführt werden, was von großem Vorteil für die Optimierung von biotechnologischen Anwendungen ist, aber auch im medizinischen Bereich von Bedeutung sein könnte (Stichwort Darmmikrobiom). Zudem wurden Stämme konstruiert, die eine dreifach höhere Succinat-Ausbeute im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Der Stoffwechselprozess zur Bildung von Phenolsäuren wurde aufgeklärt. Alle im Antrag verfassten Arbeitspakete wurden umfassend analysiert und die formulierten Meilensteine und Ziele des gesamten Teilprojektes wurden in großem Maße erreicht.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Stämme der Abteilung Bacteroidota besitzen die inhärente Fähigkeit zum Abbau von komplexen pflanzlichen Polysacchariden und gelten somit als attraktive Bio-Fabriken für nachhaltige und umweltbewusste biotechnologische Synthesen. Pflanzliche Polysaccharide fallen als äußerst günstiges Abfallprodukt in landwirtschaftlichen Ressourcenflüssen an und bieten daher immenses Potenzial für die Einspeisung in neuartige Verwertungsketten.

Die Entwicklung und Etablierung der beschriebenen Methoden zur genetischen Modifikation, vor allem das Deletionssystem für *P. vulgatus*, eröffnen neue Optionen für die Entwicklung von maßgeschneiderten Mikroorganismen, welche für die klimaschonende Produktion von Bulk-Chemikalien wie Succinat und Phenolsäuren eingesetzt werden können. Anhand von *P. vulgatus* als Modellorganismus wurde das Potenzial von Bacteroidota-Stämmen als Produktionsorganismen weitreichend dargestellt. Die Anwendung der genetischen Methoden ermöglichten die Generierung eines *P. vulgatus* Stamms, welcher nur noch Succinat und Acetat als Stoffwechselendprodukte bildet. Darauf aufbauend kann mittelfristig ein äußerst

potenter Succinat-Produzent erzeugt werden. Bezüglich der Phenolsäure-Produktion wurde ein bisher nicht beschriebener Stoffwechselweg in *P. vulgatus* als Repräsentant der Gattungen *Phocaeicola* und *Bacteroides* identifiziert, welcher zur mikrobiellen Produktion von Phenylessigsäure beansprucht werden kann. Dank der neuen genetischen Werkzeuge kann dieser Stoffwechselweg mittelfristig als Einstieg für eine Alternative zu bisherigen mikrobiellen Produktionsplattformen bieten.
Darüber hinaus besitzen die entwickelten genetischen Elemente eine sehr geringe Hürde um diese auf weitere Bacteroidota-Stämme auszuweiten. Somit wachsen die Chancen für Ressourcen- und Klimaschonende Produktionsprozesse, und schaffen so Nischen für neue Syntheseplattformen für Unternehmen, die ihren CO_2-Fußabdruck und Umweltauswirkungen reduzieren möchten.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Keine.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Gindt M, Neff A, Lück R, Deppenmeier U (2024) Genetic optimization of the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus* for enhanced succinate production**.** Appl. Microbio. Biotechnol (accepted for publication).

Neff A, Lück R, Gindt M, Deppenmeier U (2024) Das unterschätzte biotechnologische Potenzial der Darmmikrobiota. BIOspektrum 01.24: 52-54. DOI: 10.1007/s12268-024-2087-z.

Neff A. (2024) Erweiterung der genetischen Werkzeuge für das Darmbakterium *Phocaeicola vulgatus* zur Untersuchung des Katabolismus und des Phenolsäure-Stoffwechsels (Doctoral dissertation, Universitäts-und Landesbibliothek Bonn). https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5-74641.

Neff A, Lück R, Hövels M, Deppenmeier U. (2023) Expanding the repertoire of counterselection markers for markerless gene deletion in the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus*. Anaerobe 81:102742. doi: 10.1016/j.anaerobe.2023.102742.

Lück R and Deppenmeier U (2022) Genetic tools for the redirection of the central carbon flow towards the production of lactate in the human gut bacterium *Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus.* Appl Microbiol Biotechnol. 106(3):1211-1225. doi: 10.1007/s00253-022-11777-6.

Lück R (2023) Biotechnologische Produktion der Plattformchemikalie Succinat durch das Darmbakterium *Phocaeicola vulgatus* (Doctoral dissertation, Universitäts-und Landesbibliothek Bonn). https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5-71862

Garschagen LS, Franke T, Deppenmeier U (2021) An alternative pentose phosphate pathway in human gut bacteria for the degradation of C5 sugars in dietary fibers. FEBS J. 288: 1839–1858. doi: 10.1111/febs.1551