Gefördert durch:

Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger:	Förderkennzeichen:
Technische Universität München, Professur für Pilz-Biotechnologie in der Holzwissenschaft	**031B01048A**

Vorhabenbezeichnung / Titel:

Maßgeschneiderte biobasierte Inhaltsstoffe für eine wettbewerbsfähige Bioökonomie: Verbundvorhaben „Pilzliche Produktionssysteme zur Verwertung pektinreicher landwirtschaftlicher Reststoffe“

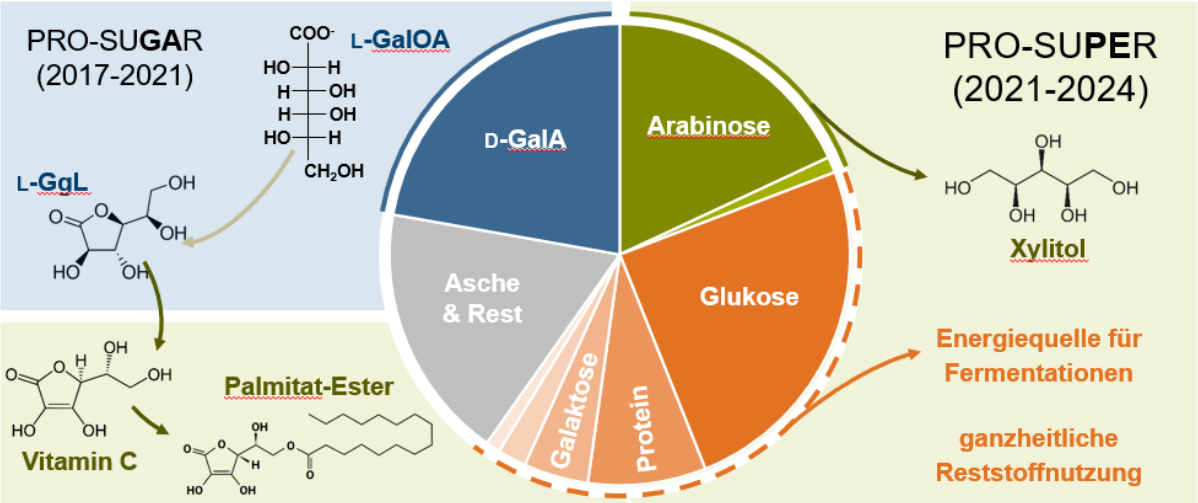
(PRO-SUPER) – Teilprojekt A

Laufzeit des Vorhabens:

01.03.2021 – 31.08.2024

Verantwortliche Autoren:

Marcel Rüllke & J. Philipp Benz



Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031B01048A gefördert.

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

I. Kurzdarstellung

1. Aufgabenstellung

Landwirtschaftliche Reststoffe wie Zuckerrübenschnitzel (*sugar beet pulp*; SBP) fallen jährlich in großen Mengen an, werden aber meist nur zur Energieerzeugung in Biogasanlagen oder als Futtermittel genutzt. Im Vorgängerprojekt PRO-SUGAR wurde ein System entwickelt, das D-Galacturonsäure (D-GalA) aus pektinreicher Zellstoffpulpe (~25% des Gesamtkohlenstoffs) freisetzt und in L-Galactonat (L-GalOA) bzw. L-Galactono-γ-Lacton (GgL) umwandelt. Diese Zwischenprodukte können in der Kosmetik-, Lebens- und Futtermittelindustrie verwendet werden. Um diesen „Waste2Value“ Ansatz weiter auszubauen, wurden in der zweiten Förderphase im Projekt **PRO-SUPER** folgende Ziele angestrebt:

1) Umwandlung von L-GalOA/GgL in L-Ascorbinsäure (L-AA) und Ascorbylpalmitat und
2) Etablierung eines Biokonversionssystems der Pentosen L-Arabinose und D-Xylose zu Xylitol.

Damit sollte nicht nur ~25%, sondern >40% des Kohlenstoffs in SBP für die Herstellung von Produkten mit hoher Wertschöpfung genutzt werden können. Xylitol, eine vom US-Energieministerium als Schlüsselplattformchemikalie benannte Verbindung, ist ein insulinunabhängiger Zuckerersatzstoff. Die gängigen Herstellungsverfahren sind jedoch ökologisch und ökonomisch ineffizient. L-AA ist ein Antioxidans und Vitamin mit breiter Anwendung als Konservierungsmittel und Nahrungsergänzung. Beide Verbindungen sowie Xylitol weisen wachsende Märkte auf.

Die Aufgaben im **Teilprojekt A** fokussierten sich zum einen auf die Optimierung der enzymatischen Hydrolyse von SBP durch den Einsatz von *Aspergillus niger*-Enzymen zur Freisetzung der Pentosen L-Arabinose und D-Xylose. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf der Induktion hydrolytischer Enzyme bei Vorhandensein leicht verstoffwechselbarer Zucker, die die Enzymproduktion durch reprimierende Regulationsmechanismen beeinträchtigen können. Ein weiterer Schwerpunkt lag dann auf der Biokonversion von L-Arabinose zum Endprodukt Xylitol. Während die Produktion aus D-Xylose relativ unproblematisch erfolgen kann, sind ausgehend von L-Arabinose einige extra-Schritte nötig, was herausfordernder ist und daher auch noch nicht in filamentösen Pilzen gezeigt worden war.

2. Voraussetzungen

Die Labore und technischen Einrichtungen der Professur für Pilz-Biotechnologie in der Holzwissenschaft an der TUM verfügen über eine umfassende Infrastruktur zur Arbeit mit filamentösen Pilzen. Sie ermöglichen die genetische Modifizierung (S1-Bereich), biochemische Arbeiten, einschließlich der Nutzung von Plattenlesern, sowie die Kultivierung von Mikroorganismen im Labormaßstab bis 1 L. Zudem sind sie auf die Metabolitanalytik spezialisiert, insbesondere auf die Analyse von Zuckern und Zuckeralkoholen mittels HPAEC-PAD sowie HPLC. In all diesen Bereichen besteht eine langjährige wissenschaftliche Expertise (siehe auch: https://www.lse.ls.tum.de/fungbio/startseite/).

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zu Beginn des Projektes wurde die vorhandene HPAEC-PAD-Analytik (Dionex/Thermo ICS3000) zur hochsensitiven Zuckerquantifizierung unter Eigenbeteiligung durch eine neue Version (Thermo ICS6000) ersetzt, da die alte (schon von einem Vorgänger übernommene) Maschine aus der Wartung fiel und Ersatzteile daher nicht mehr uneingeschränkt zur Verfügung gestanden hätten. Zudem wurde die vorhandene HPLC (Shimadzu CBM-40 mit SPD-M40) mit einer Coregel 801 FA Säule (Concise Separations) erweitert. Diese dient zur Auftrennung von Pentosen und Polyolen und sollte zur schnellen Überprüfung der Umsetzung von L-Arabinose zu Xylitol eingesetzt werden. Alle im Projekt beschriebenen Zuckeranalysen wurden mit einem dieser beiden Geräte gemessen, die damit einen zentralen Baustein der Prozessentwicklung im Teilprojekt A darstellten. Im späteren Verlauf des Projekts wurde zur Reporter-basierten Analyse der genetischen Regulation der Hydrolaseproduktion und für den Katabolismus von Pentosen ein Fluoreszenzmodul des Mikrotiter-Plattenleser (Infinite M200 PRO; Tecan) ausgetauscht.

Da die Einstellung des wissenschaftlichen Mitarbeiters zur Projektbearbeitung erst zum 15.04.2021 erfolgen konnte, verschob sich der ursprüngliche Arbeitsplan um 1,5 Monate. Fristgerecht wurde zum 05.05.2021 ein Kooperationsvertrag aller finanzierten akademischen Partner (TUM-BVT, TUM-WB und GUF) sowie des industriellen (und eigenfinanzierten) Partners Südzucker AG ausgehandelt und abgeschlossen. Aufgrund mehrerer zeitlicher Verzögerungen, verursacht durch die Folgen der Covid-Pandemie und kriegsbedingter Lieferschwierigkeiten, wurde eine kostenneutrale Verlängerung bis zum 31.07.2024 notwendig.

4. Wissenschaftlich-technisches Vorwissen

Xylitol, ein natürlicher Zuckeralkohol, kommt in vielen Pflanzen vor und wird aufgrund seiner ähnlichen Süße zu Saccharose sowie seiner gesundheitlichen Vorteile gegenüber herkömmlichem Zucker zunehmend als alternativer Süßstoff eingesetzt. Die derzeitigen industriellen Produktionsmethoden beruhen jedoch auf der chemischen Hydrierung von D-Xylose, was umweltbelastend ist. Eine effizientere Nutzung von L-Arabinose, einer weiteren häufig vorkommenden Pentose in Agrarreststoffen, könnte die Palette der nutzbaren Rohstoffe erheblich erweitern. Im natürlichen Pentosestoffwechsel von Pilzen werden sowohl D-Xylose als auch L-Arabinose zu Xylitol als Zwischenprodukt umgewandelt.

L-Arabinose ist in hohen Konzentrationen in Zuckerrübenabfällen gebunden, vor allem in Form von Arabinan. Aufgrund begrenzter Möglichkeiten zur Depolymerisierung dieses Zellwandpolymers werden diese Abfallstoffe derzeit vorwiegend als minderwertige Futtermittelzusätze, als Beimischungen in Biogasanlagen oder zur Bodenverbesserung verwendet. Um nicht zu verschimmeln, müssen sie vor der Weiterverwendung getrocknet werden, was zusätzliche Energiekosten verursacht. Eine enzymatische Hydrolyse unter Einsatz hydrolytischer Enzyme könnte diesen Trocknungsschritt überflüssig machen.

Für die Depolymerisierung von Zuckerpolymeren in pflanzlichen Reststoffen bietet sich der Einsatz von Enzymen an. Der niedrige Ligningehalt dieser Materialien macht eine chemische Hydrolyse mit Säuren, Basen oder Lösungsmitteln überflüssig. Der filamentöse Askomyzet *Aspergillus niger* gilt als einer der leistungsfähigsten Mikroorganismen für diese Aufgabe. Er produziert eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme für Pektin und Hemicellulosen, deren Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren positiv und negativ reguliert wird. Ein bekanntes Phänomen mit reprimierendem Charakter ist die Kohlenstoff-Katabolitrepression (*Carbon Catabolite Repression; CCR*), bei der die Präsenz besser verwertbarer Zucker, wie z.B. Glukose, die Expression von Hydrolasen unterdrückt. Da dieser Signalweg den Zielen einer effizienten Produktion entgegensteht, wird er in der biotechnologischen Optimierung von Produktionsstämmen normalerweise durch gezielte Eingriffe unterdrückt. Eine große Unbekannte hierbei ist allerdings der Mangel an schnellen und belastbaren Methoden, den Aktivierungszustand der CCR zu jeder gegebenen Zeit (z.B. im Fermenter) bestimmen zu können.

Um einen Organismus zu entwickeln, der eine hohe hydrolytische Aktivität gegenüber arabinanreichen landwirtschaftlichen Abfällen aufweist und gleichzeitig Xylitol aus der freigesetzten L-Arabinose herstellt und exportiert, kann der Pentosestoffwechsel von *A. niger* gezielt auf der Stufe von Xylitol blockiert werden. Während dies für die Produktion aus D-Xylose bereits in der Vergangenheit gezeigt wurde, war dies für L-Arabinose noch nicht der Fall. Eine gezielte Ausschaltung der drei Gene *xdhA*, *sdhA* und *xkiA*, die Enzyme kodieren, welche für den Abbau von Xylitol notwendig sind, wurde aber als ein vielversprechender Ansatz angesehen, da diese Gene bereits in einer früheren Studie als essenziell für die Xylitol-Degradation identifiziert worden waren. Es wurde prognostiziert, dass eine Kombination aus gezielter Stoffwechselblockade mit Strategien zur verbesserten Sekretion von Xylitol *A. niger* zu einer effizienten Zellfabrik für die nachhaltige Produktion von Xylitol aus arabinanreichen Abfallstoffen machen könnte. Dies würde nicht nur die Nutzung dieser Reststoffe optimieren, sondern auch die Umweltbelastung durch alternative Süßstoffproduktionen erheblich reduzieren.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Zur Umsetzung der Projektziele arbeiteten wie im Vorgängerprojekt PRO-SUGAR drei universitäre Forschungsgruppen der Technischen Universität München und der Goethe-Universität Frankfurt a.M. eng mit einem industriellen Partner zusammen. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Philipp Benz (Technische Universität München, Professur für Pilz-Biotechnologie in der Holzwissenschaft) war für die regulatorische und metabolische Optimierung der *Aspergillus niger*-Stämme verantwortlich. Die metabolische Optimierung der *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Mislav Oreb (Goethe-Universität Frankfurt a.M., Physiologie und Genetik niederer Eukaryoten) übernommen. Für die reaktionstechnischen und verfahrenstechnischen Entwicklungen zeichnete sich der Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz, TUM) verantwortlich. Die Südzucker AG (Dr. Wolfgang Wach) bereicherte das Vorhaben durch das Einbringen seiner industriellen Perspektive und stellte die benötigten Rohstoffe – getrocknete Zuckerrübenschnitzel (mit und ohne Melasse) – in ausreichender Menge und Qualität bereit, welche an die akademischen Partner verteilt wurden, um sicherzustellen, dass alle Gruppen mit identischen Chargen arbeiteten. Eine von der Südzucker AG angefertigte Kosten-Nutzen Analyse des Prozesses wurde in mehreren Projektmeetings besprochen.

Diese enge und flexible Zusammenarbeit mit akademischen und industriellen Partnern trug schon wesentlich zum Fortschritt des Vorgänger-Projekts PRO-SUGAR bei und schuf eine ebenso solide Basis für die weiterführenden Entwicklungen in PRO-SUPER.

II. Eingehende Darstellung

1. Ergebnisse

Auswahl eines geeigneten *A. niger*-Stamms für die Xylitol-Produktion aus arabinanreichen Substraten

Um einen Stamm zu entwickeln, der Xylitol aus arabinanreichen Ausgangsmaterialien produzieren kann, wäre ein Organismus mit der Fähigkeit zur Produktion großer Mengen an Arabinasen vorteilhaft. Daher wurden fünf verschiedene *Aspergillus niger*-Stämme hinsichtlich ihrer Produktion von Endoarabinanase und α-L-Arabinofuranosidase in minimalem Medium (aMM) untersucht, das Arabinan und andere Polysaccharide als Kohlenstoffquelle enthielt.

Die höchsten Aktivitäten der α-L-Arabinofuranosidase, bezogen auf die spezifische Trockengewichtseinheit, wurden bei den Stämmen NRRL3, CBS 513.88 und ATCC 11414 gemessen (Abb. 1A). Im Endoarabinanase-Aktivitätstest erzielte NRRL3 ebenfalls die besten Ergebnisse (Abb. 1B).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde NRRL3 als Basisstamm für die weitere Optimierung zur Xylitol-Produktion in dieser Studie ausgewählt.

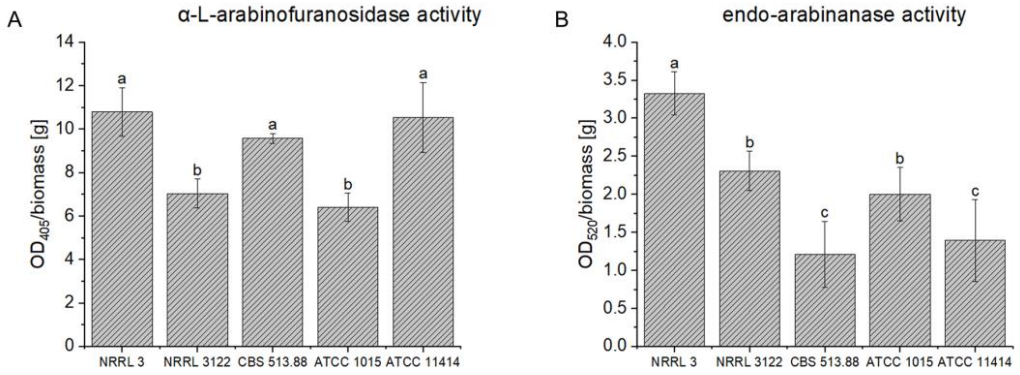


Abbildung 1: Auswahl eines *Aspergillus niger*-Stamms mit der höchsten Arabinanase-Aktivität. Die Produktion von α-L-Arabinofuranosidase (A) und Endoarabinanase (B) wurde in fünf verschiedenen *A. niger*-Stämmen untersucht. Als Medium diente ein angepasstes Minimalmedium (aMM), das Pektin (1 %), Xylan (0,25 %), Arabinan (0,125 %) und Carboxymethylcellulose-Natriumsalz (0,5 %) enthielt. Die Enzymaktivitäten wurden mithilfe kolorimetrischer Tests bestimmt (Megazyme) und als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen wurden mittels eines ANOVA-Tests analysiert (n = 4, p < 0,05) und durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Optimierung der Hydrolaseproduktion in nicht-induzierenden Bedingungen durch Transkriptionsfaktorchimären

Zur Optimierung der Polygalakturonase-Produktion wurden schon im Vorgänger-Projekt PRO-SUGAR konstitutiv aktive Varianten der Transkriptionsfaktoren (TF) GaaR, RhaR, XlnR und AraR durch die Erstellung sogenannter TF-Chimären entwickelt (*noch unpublizierte Daten; Manuskript in Vorbereitung*). Die TF-Chimären bestanden aus Fragmenten von den nativen TF, einer Sequenz für die Zellkernlokalisierung und einer viralen Aktivierungsdomäne (AD). Ihre Aktivität wurde mittels eines Luciferase-Reportergens, das unter der Kontrolle des jeweiligen TF-abhängigen Promoters stand, in einem Mikrotiterplattenformat getestet. Einige dieser generierten Chimären zeigten starke Luciferase-Signale, auch ohne die induzierenden Zucker. In diesem Projektteil wurden die Stämme mit den besten Luciferase-Signalen in nicht induzierten Bedingungen auf Produktion von hydrolytischen Enzymen getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Endo-Xylanasen, Endo-Polygalacturonasen und α-L-Rhamnopyranosidasen signifikant durch die Verwendung von TF-Chimären gesteigert werden konnte. Diese Chimären bestehen aus einem trunkierten Teil der entsprechenden TFs (XlnR, GaaR

und RhaR) sowie einer Aktivierungsdomäne (VP16-AD) aus dem Herpes-Simplex-Virus. Luciferase-Assays zeigten, dass die effizientesten TF-Chimären die native Zink-Cluster-Domäne, die native Dimerisierungsdomäne und die konservierte Middle Homology Region (MHR), welche charakteristisch für Zink-Cluster-Transkriptionsfaktoren ist, enthalten.

Interessanterweise waren die kürzeren Varianten, bei denen die VP16-AD direkt an die MHR fusioniert wurde, in der Hydrolasenproduktion effektiver als längere Varianten, die zusätzliche C-terminale Bereiche jenseits der MHR enthielten, was auf eine C-terminale Regulationsdomäne hinweisen könnte, die unter nicht induzierenden Bedingungen zu Repression führt.

Im Gegensatz dazu konnten für die Produktion von Endo-Arabinasen mittels AraR-TF-Chimären keine vielversprechenden Ergebnisse erzielt werden. Allerdings zeigte sich, dass die Fusion der vollständigen AraR-Domäne mit der VP16-AD die Produktion von Endo-Galacturonasen erhöhen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die multifunktionale Rolle der TFs bei der Regulation von Hydrolasen. Bemerkenswert war auch, dass die Produktion von Endo-Arabinasen durch die GaaR-TF-Chimären (mit einer VP16-AD-Fusion an die MHR) in einem Stamm mit GaaX-Deletion gesteigert wurde. GaaX ist bekannt als Inhibitor von GaaR.

Die gleichzeitige Aktivierung mehrerer TFs ist auch unabhängig von der primären Zielaktivität der Hydrolasen von Interesse. Dies liegt daran, dass synergistische Effekte zwischen den produzierten Enzymen auftreten: Durch eine Hydrolase freigelegte Bindestellen können die Aktivität anderer Hydrolasen fördern. Dieser Effekt führt zu einer beschleunigten und effizienteren Zersetzung komplexer Pflanzenzellwände. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass die Produktion von Hydrolasen in Anwesenheit leicht verwertbarer Kohlenstoffquellen wie Glukose stark herunterreguliert wird. Diese strikte Kohlenstoffrepression könnte die Effizienz der Hydrolasenproduktion in komplexen pflanzlichen Substraten einschränken und erfordert daher eine gezielte Optimierung der Produktionsbedingungen.

Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung eines gezielten Designs von TF-Chimären sowie die Optimierung von Fermentationsbedingungen zur Maximierung der Enzymproduktion.

Die Ergebnisse diese Projekt-Teilbereichs wurden noch nicht publiziert, sind aber Form eines Manuskripts in Vorbereitung: Rüllke M & Schmitz K, Tamayo E, Benz JP: Designing Zinc Cluster Transcription Factor Chimeras for Inducer-Free Gene Activation: Applications in Hydrolase Production and Beyond. *Daher wurden die entsprechende Abbildung 2 nicht in diese Veröffentlichung übernommen.*

Abschwächung der Effekte der Kohlenstoff-Katabolitrepression für eine effizientere Hydrolase Produktion auf komplexen Medien

Die Produktion von industriell wichtigen pflanzlichen Zellwand-Hydrolasen, Sekundärmetaboliten und Toxinen wird durch induzierende und hemmende Signalwege streng reguliert, wobei die Kohlenstoff-Kataboliterepression (CCR) ein zentraler Mechanismus ist. Bei Vorhandensein leicht verfügbarer Kohlenstoffquellen, wie Glukose, stoppen filamentöse Pilze den Abbau schwieriger zu verwertender Substrate, um Energieverschwendung zu vermeiden. Zudem beeinflusst CCR Prozesse wie Wachstum, Hyphenmorphologie, Sporulation, Pathogenität und Symbiose, was die Bedeutung eines tieferen Verständnisses seiner regulatorischen Mechanismen unterstreicht.

Der Hauptregulator der CCR ist der Transkriptionsfaktor CreA/CRE-1, der in Pilzen hochkonserviert ist. Dies betrifft insbesondere Gene, die für Zuckerstoffwechsel, Zuckertransport und den Abbau von pflanzlichen Zellwänden verantwortlich sind. In verschiedenen Pilzarten wurden spezifische Bindungsmotive für CreA/CRE-1 identifiziert. Um die negativen Auswirkungen der CCR bei der industriellen Enzymproduktion zu verringern, wird häufig ein Knock-out von CreA/CRE-1 durchgeführt. Diese Strategie kann jedoch zu weiteren Phänotypen und Fitnessverlusten führen, weshalb molekulare Techniken eingesetzt werden, um dereprimierte Pilzstämme zu erzeugen.

Zur Messung der CCR wurden verschiedene Methoden entwickelt, darunter phänotypische Tests, die jedoch keine präzise Quantifizierung der CCR in Echtzeit ermöglichen und/oder sehr zeit- und arbeitsaufwendig sind.

Aus diesem Grund wurde hier ein Luciferase-basierter Reporter-Assay für CCR entwickelt, der die Gensequenz für Luciferase enthält, gekoppelt mit einem PEST-Signal für einen schnelleren Abbau des Reporters. Dieser Reporter wird durch einen synthetischen Promotor gesteuert, der aus einem minimalen Promotor (PgpdA-min), Tet-On-Aktivatorbindestellen zur induzierbaren Expression und CreA/CRE-1-Bindestellen besteht, um CCR zu messen (Abb. 3A,B).

Um den CCR-Reporter in Bezug auf strengere Kontrolle, höhere Sensitivität und einen breiteren Dynamikbereich zu optimieren, wurde eine Variante des DNA-Bindungsmotivs eingeführt, das in den Promotorregionen von CRE-1-regulierten Genen in *Neurospora crassa* vorkommt (5′-GTGGGG-3′). Es wurden verschiedene Wiederholungszahlen des Bindungsmotivs in den synthetischen Promotor eingeführt und verglichen. Alternierende Bindestellen wurden mit identischen Bindestellen von 5′-GCGGGG-3′ verglichen, wobei 2, 4 oder 8 Wiederholungen durch 5′-AA-3′ getrennt waren (Abb. 3B). Diese Varianten wurden in quantitativen Luciferase-Reporter-Assays getestet (Abb. 3A,C-H). Die achtfache Wiederholung und Alternierung der getesteten Bindestellen führte zu einem empfindlichen CCR-Reporter-Werkzeug, das durch CreA reguliert wird und eine quantifizierbare, glukosekonzentrationsabhängige Hemmung der Lumineszenz zeigt (Abb. 3H).

Anhand dieses Reporters konnten die Einflüsse von unterschiedlichen Monosacchariden auf die CCR getestet werden. Zudem wurde der Einfluss von C-terminal verkürzten CreA Varianten auf die Derepression von CCR evaluiert. Wie bereits gezeigt, wurde der WT-Stamm, der die vollständige CreA-Variante transkribiert, stark inhibiert und zeigte einen schnellen Signalabfall innerhalb von weniger als 1 Stunde nach Zugabe von Glukose (Daten siehe Publikation). Dasselbe wurde für die etwas kürzere Version für CreA(1–345) und CreA(1–281) beobachtet (nach Aminosäure 345 oder 281 abgeschnitten). In diesem Zeitverlauf zeigten Trunkierungsstämme mit CreA-Varianten, die gleich lang oder kürzer als 162 aa waren, sogar höhere Lumineszenzwerte in Glukose im Vergleich zum Hungern, was wahrscheinlich auf eine höhere Energieaufnahme kombiniert mit einer niedrigen oder aufgehobenen Reaktionsfähigkeit der CreA-abhängigen CCR zurückzuführen war. Unerwartet emittierte der Δ*creA*-Stamm eine geringere Lumineszenz in Glukose im Vergleich zu Bedingungen ganz ohne Kohlenstoff, zeigte jedoch immer noch eine klare Derepression im Vergleich zum WT-Stamm. Die Trunkierungen, denen die konservierte Region fehlten, erzeugten Lumineszenzsignale, die nach Zugabe von 0,5% Glukose mit der Hungerbedingung vergleichbar waren, was uns zu der Annahme führte, dass die konservierte Domäne für die CreA-vermittelte Genrepression in *A. niger* essenziell sein könnte.

Um diese Effekte auch im Zusammenhang mit erhöhter hydrolytischer Aktivität in Präsenz von Glukose und Polysacchariden zu testen, wurden die vielversprechendsten Mutanten eingesetzt (Abb. 4A-D). Vor allem die Stämme CreA(1-281) und CreA(1-162) zeigten erhöhte hydrolytische Aktivität in Medium mit Hemizellulose-Bestandteilen und Glukose. Es scheint, dass die Domäne zwischen den Aminosäuren 162 und 281 eine wichtige Rolle in der Repression von CCR-regulierten Genen in Präsenz von Glukose spielt und durch Mutation dieser Domäne weniger reprimierte Stämme zur Produktion von Hydrolasen erzeugt werden können.

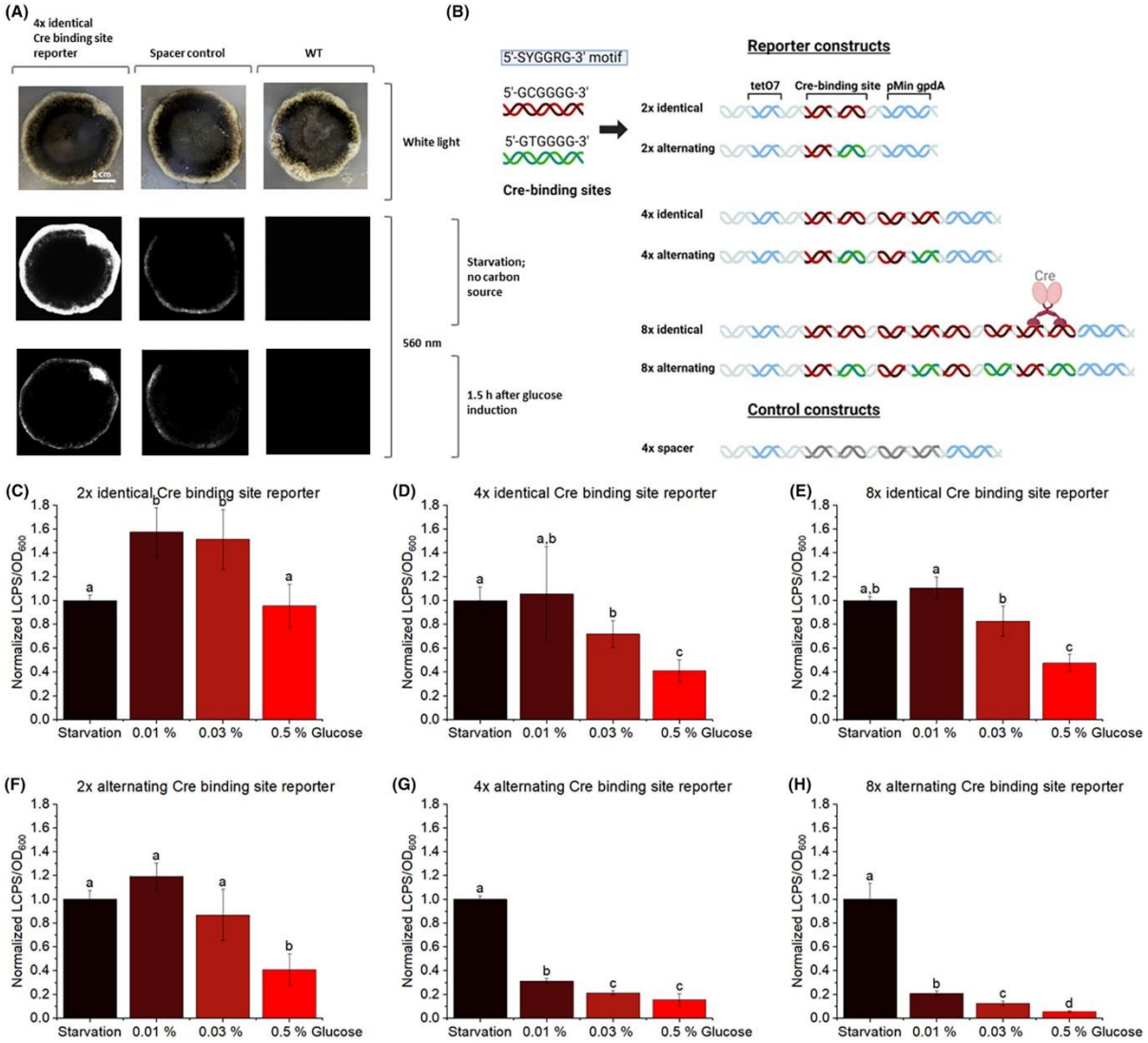


Abbildung 3: Konstruktion und Vergleich des Cre-abhängigen CCR-Reporters mit unterschiedlicher Anzahl und Typen von Cre-Bindungsstellen in *Aspergillus niger*. Ein makroskopischer Luciferase-Assay wurde für Biomasse durchgeführt, die auf festem Medium gewachsen ist. Die Stämme mit dem Reporter-Konstrukt mit 4× identischen Cre-Bindungsstellen sowie dem Spacer-Konstrukt ohne Cre-Bindungsstellen und der WT-Stamm als Kontrolle wurden hinsichtlich ihrer Lumineszenz-Emissionen nach einer 50%igen Glukose-Induktion verglichen. (A) Bilder des Lumineszenzsignals wurden nach 2,5 h Induktion mit Doxycyclin und D-Luciferin in aMM ohne Kohlenstoffquelle und 1,5 h nach Glukose-Induktion aufgenommen. (B) Die Abbildung zeigt die konstruierten Varianten des Cre-Reporters (erstellt mit BioRender.com), die in (A) getestet wurden. Ein Luciferase-Mikrotiterplatten-Assay wurde für sechs verschiedene Luciferase-Reporter-Konstrukte (C–H) mit 2, 4 oder 8 alternierenden und identischen Cre-Bindungsstellen durchgeführt. Nach 6 h Induktion mit Doxycyclin und D-Luciferin in aMM ohne Kohlenstoffquelle wurden unterschiedliche Glukosekonzentrationen (0,01%, 0,03% und 0,5%) hinzugefügt. Die Lumineszenzwerte wurden nach 3,3 h Glukose-Induktion gemessen und auf den Luciferase-Wert unter Hungerbedingungen mit 0,1% Glycerin normalisiert. Der WT-Kontrollstamm wurde zum Normalisieren der Werte benutzt. Verschiedene Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede gemäß einem ANOVA-Test ($n = 3$), $p < 0{,}05$. Die Stämme wurden durch Inokulation eines Transformanten in drei biologischen Replikaten getestet.

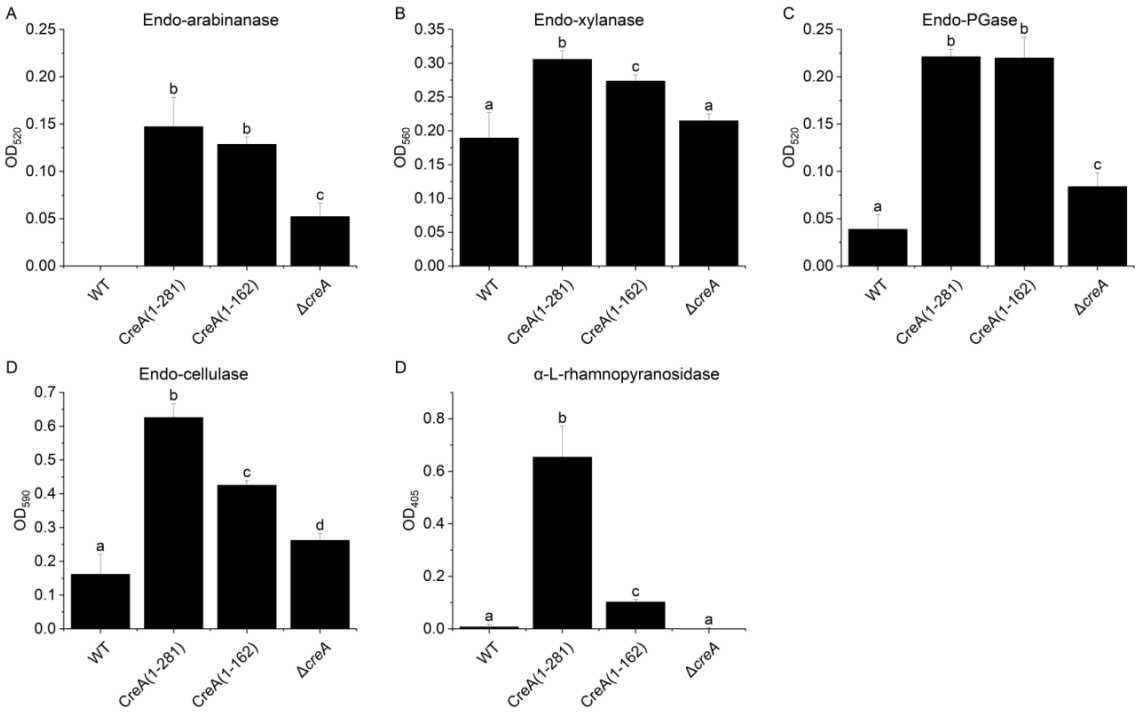


Abbildung 4: Einfluss von CreA-Mutationen in *Aspergillus niger* auf die Produktion von hydrolytischen Enzymen. Die CreA Mutantenstämme wurden in Minimalmedium mit Pektin (1 %), Xylan (0,25 %), Arabinan (0,125 %) und Carboxymethylcellulose (0,5 %) für 96 h bei 250 rpm und 30 °C kultiviert und täglich wurde Glukose zugeführt, um eine ungefähre Konzentration von 0,5 % aufrecht zu erhalten. Die Enzymaktivitäten wurden mithilfe kolorimetrischer Tests bestimmt (Megazyme) und als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Verschiedene Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede gemäß einem ANOVA-Test (n=4), $p<0,05$.

<u>Die Ergebnisse dieses Projekt-Teilbereichs wurden bereits *open access* (OA) publiziert und sind im Detail abrufbar unter:</u>

Rüllke M, Meyer F, Schmitz K, Blase H, Tamayo E, Benz JP (2024) A novel luciferase-based reporter tool to monitor the dynamics of carbon catabolite repression in filamentous fungi. ***Microbial Biotechnology*** 17(9) (https://doi.org/10.1111/1751-7915.70012)

Abstract:

Filamentous fungi with their diverse inventory of carbohydrate-active enzymes promise a holistic usage of lignocellulosic residues. A major challenge for application is the inherent repression of enzyme production by carbon catabolite repression (CCR). In the presence of preferred carbon sources, the transcription factor CreA/CRE-1 binds to specific but conserved motifs in promoters of genes involved in sugar metabolism, but the status of CCR is notoriously difficult to quantify. To allow for a real-time evaluation of CreA/CRE-1-mediated CCR at the transcriptional level, we developed a luciferase-based construct, representing a dynamic, highly responsive reporter system that is inhibited by monosaccharides in a quantitative fashion. Using this tool, CreA/CRE-1-dependent CCR triggered by several monosaccharides could be measured in *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans* over the course of hours, demonstrating distinct and dynamic regulatory processes. Furthermore, we used the reporter to visualize the direct impacts of multiple CreA truncations on CCR induction. Our reporter thus offers a widely applicable quantitative approach to evaluate CreA/CRE-1-mediated CCR across diverse fungal species and will help to elucidate the multifaceted effects of CCR on fungal physiology for both basic research and industrial strain engineering endeavors.

Genetische Modifikationen zur Akkumulation von Xylitol in *Aspergillus niger*

Aspergillus niger verstoffwechselt L-Arabinose zu Xylitol und baut Xylitol auf Weg weiter zu D-Xylulose ab. Dies geschieht durch die Aktivität dreier Dehydrogenasen: XdhA (primäre Reaktion) sowie SdhA und LadA (Nebenreaktionen) (Abb. 5A). Diese Enzyme katalysieren primär die Oxidation von Xylitol, D-Sorbitol bzw. L-Arabitol.

In früheren Studien führte das Ausschalten aller drei Gene (*xdhA, sdhA* und *ladA*) zur Akkumulation von Xylitol bei der Verstoffwechselung von D-Xylose. Allerdings ist LadA essenziell für die Umwandlung von L-Arabinose in Xylitol. Daher wurden in dieser Studie nur die Dehydrogenasen XdhA und SdhA ausgeschaltet, wodurch LadA weiterhin eine Nebenreaktion katalysieren konnte, bei der ein Teil des Xylitols abgebaut wurde. Um die Umwandlung von Xylitol weiter zu reduzieren, wurde daher zusätzlich das Gen *xkiA*, das für die D-Xylulose-Kinase codiert, ausgeschaltet. Dieses Enzym phosphoryliert D-Xylulose und schleust es in den Pentosephosphatweg ein.

Der resultierende Dreifach-Knockout (Δ*xdhA,* Δ*sdhA,* Δ*xkiA*) wurde auf flüssigem und festem Medium getestet, das Glukose, D-Xylose, L-Arabinose, D-Sorbitol oder Xylitol als Kohlenstoffquellen enthielt. Die Wachstumsversuche zeigten, dass das Wachstum des Dreifach-Knockouts auf allen getesteten Kohlenstoffquellen außer Glukose stark reduziert war (Abb. 5B). Dies bestätigt, dass der Stamm keines dieser Pentosen und Polyole mehr als Kohlenstoffquellen nutzen kann.

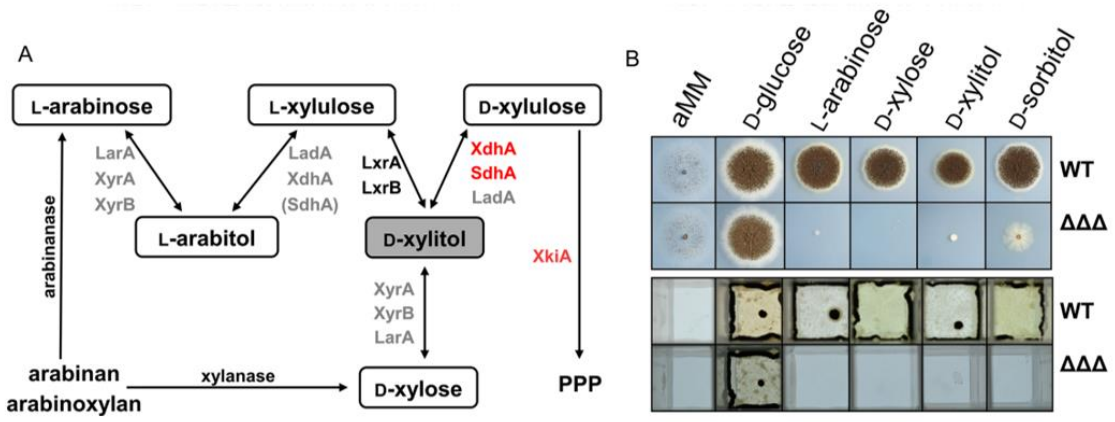


Abbildung 5: Pentose Katabolismus und relevante Gene im Xylitol Abbau und deren Effekte auf das Wachstum in verschiedenen Kohlenstoffquellen. Der Stoffwechselweg des Abbaus von Arabinan und Arabinoxylan zeigt die beteiligten Enzyme, die zur Produktion und zum Abbau von Xylitol führen (A). Enzyme mit bekannter Mehrfachfunktion sind grau markiert, solche mit eindeutiger Funktion schwarz. Für SdhA wurde lediglich eine Nebenaktivität auf L-Arabitol beschrieben (in Klammern). Die Gene für die Enzyme *xdhA*, *sdhA* und *xkiA* wurden gezielt deletiert, um den Abbau von Xylitol zu reduzieren. Diese Enzyme sind in der Abbildung rot hervorgehoben. Der Pentosephosphatweg (PPP), in den D-Xylulose normalerweise eingeschleust wird, ist ebenfalls dargestellt. Der resultierende Dreifach-Knockout (Δ*xdhA,* Δ*sdhA,* Δ*xkiA*, ΔΔΔ) wurde anschließend auf minimalem Medium getestet (B). Dabei wurden sowohl festes als auch flüssiges Medium verwendet. Die Kohlenstoffquellen umfassten Glukose, L-Arabinose, D-Xylose, Xylitol und D-Sorbitol.

Trotzdem wird ein Teil des Xylitols weiterhin durch die L-Arabitol-Dehydrogenase umgesetzt und somit die Ausbeute an Xylitol verringern. In anderen Publikationen wurde eine spezifische Mutation beschrieben, die diese Nebenaktivität der Dehydrogenase unterbinden kann. Diese Mutation wurde daher hier getestet und in Homologe der Dehydrogenase aus verschiedenen Pilzen (*N. crassa, A. niger, Trichoderma longibrachiatum, Penicillium chrysogenum, Pleurotus ostreatus)* eingebracht, was jedoch nicht die erhofften Ergebnisse erbrachte (Abb. 6). Eine komplette Unterdrückung der Xylitol Transformation konnte nicht erreicht werden. Obwohl eine Reduzierung der Xylitol-Dehydrogenase-Aktivität erreicht werden konnte, sank auch die Umsetzungsaktivität von L-Arabitol. Nur in der Dehydrogenase Variante aus *N. crassa* (ncLAD mut) konnte ein verbessertes Verhältnis von L-Arabitol- zu Xylitol-Umsetzung im Vergleich zum WT Enzym (ncLAD WT) erreicht werden.

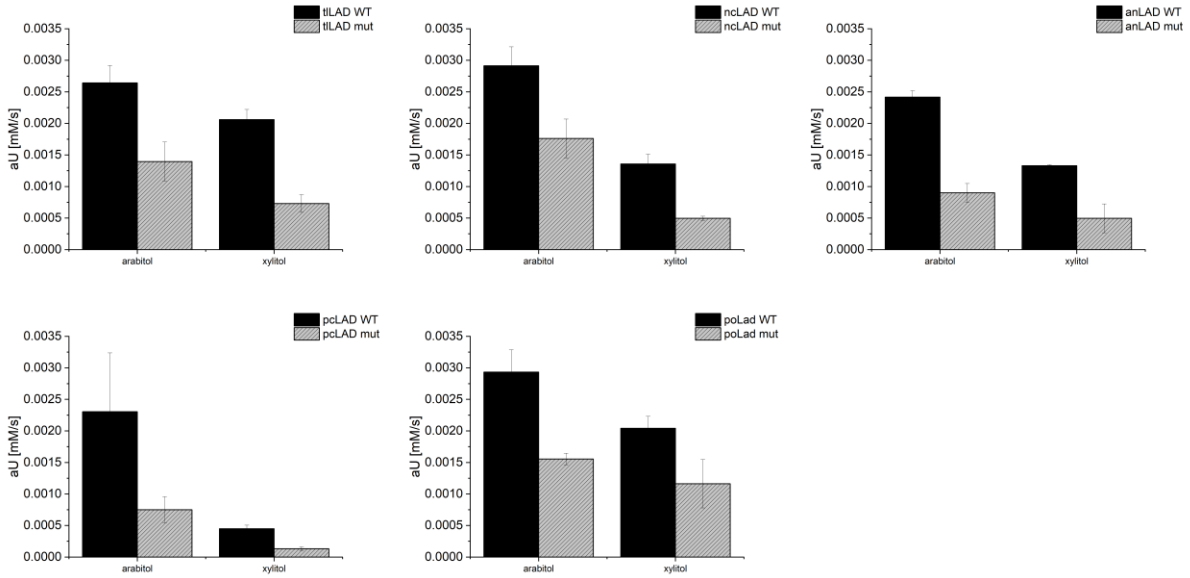


Abbildung 6: Einfluss einer gezielten Punktmutation von Lad auf die Verwertung von L-Arabitol und Xylitol. *Escherichia coli* Lad Expressionsstämme wurden in LB-Medium bei 30 °C und 250 x rpm kultiviert und nach erreichen der OD600 von 0,6–1,0 wurde 0,5 mM IPTG hinzugegen. Die Proben wurden für 3–4 Stunden weiter inkubiert, zentrifugiert und die Pellets in Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0) mit 5 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach Inkubation und Einfrieren über Nacht wurden die Proben aufgetaut, zentrifugiert und die Enzymaktivitäten wurde durch den Umsatz von NADP+ bei 340 nm spektroskopisch analysiert. Arbitrary Units wurden durch mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz berechnet und aufgetragen (n=4).

Freisetzung von Xylitol in das umliegende Medium durch Polyol-Transporter-Expression

Um eine Freisetzung des Xylitols zu induzieren und den Abbau durch die L-Arabitol Dehydrogenase zu unterbinden wurde eine konstitutiv geöffnete Version des Transporters FPS1 ($FPS1_{open}$) aus *S. cerevisiae* unter den Promotoren PtvdA, PmbfA und $PgpdA_{nig}$3gpd-box getestet. Die Triple KO Stämme mit den Expressionskassetten wurden zuerst in Medium mit 1 % Glukose angezogen und nachdem die Glukose nach 99 h verbraucht war, wurde 1 % L-Arabinose hinzugefügt. Die L-Arabinose wurde dann zu Xylitol konvertiert und das Xylitol ins umliegende Medium transportiert, wo es gemessen werden konnte. Stämme mit Konstrukten unter Kontrolle von PtvdA und PmbfA produzierten zu allen Zeitpunkten ähnliche Mengen an Xylitol, was mit ihren eher ähnlichen Expressionsstärken übereinstimmte (Abb. 7A). Der Stamm, der $FPS1_{open}$ unter der Kontrolle des $PgpdA_{nig}$-3gpd-box-Promotors exprimierte, produzierte die höchste Menge an Xylitol und vor allem nahm zu späteren Zeitpunkten die Konzentration von Xylitol nicht so schnell ab wie bei den anderen $FPS1_{open}$-exprimierenden Stämmen.

Da die Regulation von FPS1 in *S. cerevisiae* wichtig für das Überleben in Salzstress ist, wurden die *Fps1* Expressionsstämme in Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl getestet. Es wurde gezeigt, dass die Promotor-Konstrukte PtvdA und PmbfA sich ähnlich verhielten zum Triple-KO-Kontrollstamm (Abb. 7B). FPS1, das unter der Kontrolle des starken $PgpdA_{nig}$-3gpd-box-Promotors exprimiert wird, führte aber zu reduziertem Wachstum in NaCl. Wahrscheinlich führt der konstitutiv offene FPS1-Transporter zum Export von Glycerol, was die Osmotoleranz verringert.

Um die phänotypischen Nebenwirkungen der hohen Expression von *Fps1* zu minimieren, wurde der Triple-KO-Stamm, der die PtvdA-FPS1-Kassette exprimiert, für die Fermentation in größeren Volumina an den Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik in Garching übergeben.

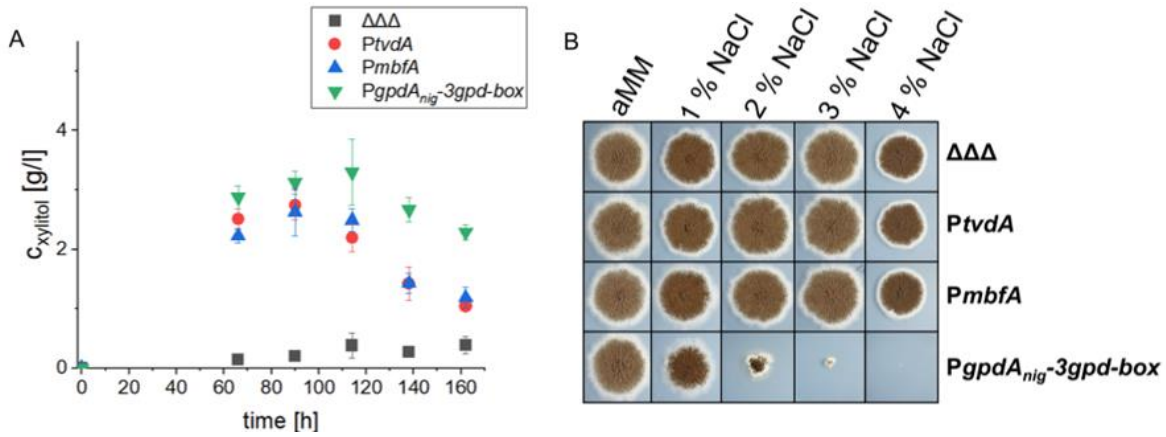


Abbildung 7: Auswirkungen der FPS1$_{open}$-Expressionslevel auf die Xylitol-Erzeugung und Osmostressresistenz von *Aspergillus niger*. Die Xylitolerzeugung des Triple-KO-Hintergrundstamms und von Stämmen, die FPS1$_{open}$ im ΔΔΔ-Hintergrund mit drei unterschiedlichen Expressionsstärken exprimieren, wurde in Schüttelkolbenexperimenten getestet, die 100 ml aMM enthielten. Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung (n=4) angegeben (A). ΔΔΔ = Triple-KO von *xdhA*, *sdhA* und *xkiA*. Die gleichen Stämme wurden hinsichtlich ihrer Wachstumsphänotypen auf festem aMM mit 1 % Glukose und NaCl bei Konzentrationen von 1–4 % verglichen. Bilder wurden nach 6 Tagen aufgenommen (B).

Da CCR auch einen Einfluss auf den Katabolismus von Pentosen hat und somit auch die Produktion von Xylitol beeinflussen könnte wurde der Triple-KO Stamm (Δ*xdhA*, Δ*sdhA*, Δ*xkiA*) mit FPS1$_{open}$ Expression unter PtvdA mit den erfolgversprechendsten CreA-Trunkationen kombiniert und die generierten Stämme in Medium mit L-Arabinose und Glukose kultiviert. Hierbei wäre eine sequenzielle Verstoffwechselung von zuerst Glukose und dann L-Arabinose unterbunden und somit eine schnellere Produktion von Xylitol in den CreA Trunkations-Stämmen erwartet worden. Nach 114 h war dies auch der Fall für den CreA(1-162) Stamm, und die Xylitol-Konzentration im Kulturmedium war hier erhöht. Nach 138 h holte der CreA WT Stamm mit Triple-KO und FPS1$_{open}$-Transporter aber auf und ein Wert von 4,48 g/l Xylitol wurde gemessen (s. Fig. 4 in Rüllke *et al*. 2024 *Microbial Cell Factories*).

Somit konnte durch eine Kombination aus Triple-KO und der Expression von *FPS1*$_{open}$ ein *Aspergillus niger*-Stamm entwickelt werden, der eine **Xylitolausbeute von 44,8 % aus L-Arabinose** erreicht, welche aber durch CreA Mutation keine erhöhte Xylitol-Produktion mehr zeigte. Da die Produktion von Xylitol abhängig von Reduktionsäquivalent ist und diese unter anderem im Glukose-Stoffwechsel erzeugt werden, könnte dies erklären, wieso mehr Xylitol produziert wird, wenn L-Arabinose und Glukose zusammen im Kultivierungsmedium vorhanden sind. Die niedrigere Maximalproduktion von Xylitol in den CreA Trunkations-Stämmen könnte dabei auf verringerten Stoffwechsel und damit Wachstumsraten von den CreA-Mutanten zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse dieses Projekt-Teilbereichs wurden bereits *open access* (OA) publiziert und sind im Detail abrufbar unter:

Rüllke M, Schönrock V, Schmitz K, Oreb M, Tamayo E, Benz JP (2024) Engineering of *Aspergillus niger* for efficient production of D-xylitol from L-arabinose. ***Microbial Cell Factories*** 23 (1) (https://doi.org/10.1186/s12934-024-02526-7)

Abstract:

D-Xylitol is a naturally occurring sugar alcohol present in diverse plants that is used as an alternative sweetener based on a sweetness similar to sucrose and several health benefits compared to conventional sugar. However, current industrial methods for D-xylitol production are based on chemical hydrogenation of D-xylose, which is energy-intensive and environmentally harmful. However, efficient conversion of L-arabinose as an additional highly abundant pentose in lignocellulosic materials holds great potential to broaden the range of applicable feedstocks. Both pentoses D-xylose and L-arabinose are converted to D-xylitol as a common metabolic intermediate in the native fungal pentose catabolism.

To engineer a strain capable of accumulating D-xylitol from arabinan-rich agricultural residues, pentose catabolism was stopped in the ascomycete filamentous fungus *Aspergillus niger* at the stage of D-xylitol by knocking out three genes encoding enzymes involved in D-xylitol degradation (ΔxdhA, ΔsdhA, ΔxkiA). Additionally, to facilitate its secretion into the medium, an aquaglyceroporin from Saccharomyces cerevisiae was tested. In *S. cerevisiae*, Fps1 is known to passively transport glycerol and is regulated to convey osmotic stress tolerance but also exhibits the ability to transport other polyols such as D-xylitol. Thus, a constitutively open version of this transporter was introduced into *A. niger*, controlled by multiple promoters with varying expression strengths. The strain expressing the transporter under control of the PtvdA promoter in the background of the pentose catabolism-deficient triple knock-out yielded the most favorable outcome, producing up to 45% D-xylitol from L-arabinose in culture supernatants, while displaying minimal side effects during osmotic stress. Due to its additional ability to extract D-xylose and L-arabinose from lignocellulosic material via the production of highly active pectinases and hemicellulases, *A. niger* emerges as an ideal candidate cell factory for D-xylitol production from lignocellulosic biomasses rich in both pentoses.

In summary, we are showing for the first time an efficient biosynthesis of D-xylitol from L-arabinose utilizing a filamentous ascomycete fungus. This broadens the potential resources to include also arabinan-rich agricultural waste streams like sugar beet pulp and could thus help to make alternative sweetener production more environmentally friendly and cost-effective.

Weitere Optimierungen zur Steigerung der Xylitol Ausbeute

Zur weiteren Steigerung der Xylitolproduktion wurde untersucht, ob das Einbringen artfremder Enzyme, die den Reduktionsäquivalentpool effizienter nutzen, die Produktivität erhöhen könnte. Da die Umwandlung von L-Arabinose zu L-Arabitol sowie von L-Xylulose zu D-Xylitol NADPH/H^+-abhängig ist, während die Umwandlung von L-Arabitol zu L-Xylulose NADH/H^+ erzeugt, werden insgesamt drei Redoxäquivalente pro Molekül Xylitol verbraucht.

In einem Ansatz wurde eine mutierte, artfremde Variante von LadA aus *Trichoderma longibrachiatum* (tlLad*) verwendet, die $NADP^+$ statt NAD^+ als Cofaktor nutzt und somit NADPH/H^+ regeneriert. Dieser Ansatz führte jedoch nicht zu einer signifikanten Steigerung der Xylitolproduktion. Daher wurde zusätzlich die Expression weiterer artfremder Enzyme untersucht, um den gesamten Redoxäquivalentpool besser auszunutzen. Eingesetzt wurden:

1. Eine mutierte D-Xylose-Reduktase (*XR*) aus *Pichia stipitis*, die auch L-Arabinose reduziert.
2. Eine L-Xylulose-Reduktase (*LXR*) aus *Ambrosiozyma monospora*.
3. Eine D-Xylose-Reduktase (*DXR*) aus *Candida parapsilosis*, wobei alle diese Enzyme NADH/H^+ als Cofaktor verwenden.

Diese wurden in Kombination mit der $NADP^+$-affinen Variante von tlLad* exprimiert. Um mögliche Bottleneck-Effekte zu minimieren, wurden verschiedene Expressionsstärkekaskaden getestet (Abb. 8). Hierbei wurde festgestellt, dass eine signifikante Steigerung der Xylitolproduktion nur dann erreicht wurde, wenn die NADH/H^+-abhängigen Enzyme stark überexprimiert und tlLad* etwas geringer exprimiert wurde. Dieser Effekt war jedoch nur marginal.

Eine mögliche Erklärung für die begrenzte Effizienzsteigerung liegt in der Nebenaktivität von tlLad*, die möglicherweise Xylitol abbauen könnte und somit am wahrscheinlichsten die Produktion limitiert. Darüber hinaus bleibt unklar, ob alle artfremden Enzyme in *A. niger* vollständig funktionell und effizient exprimiert wurden, da dies bislang nicht systematisch getestet wurde. Diese Unsicherheit erschwert die genaue Bewertung der jeweiligen Beiträge der eingesetzten Enzyme zur Xylitolproduktion.

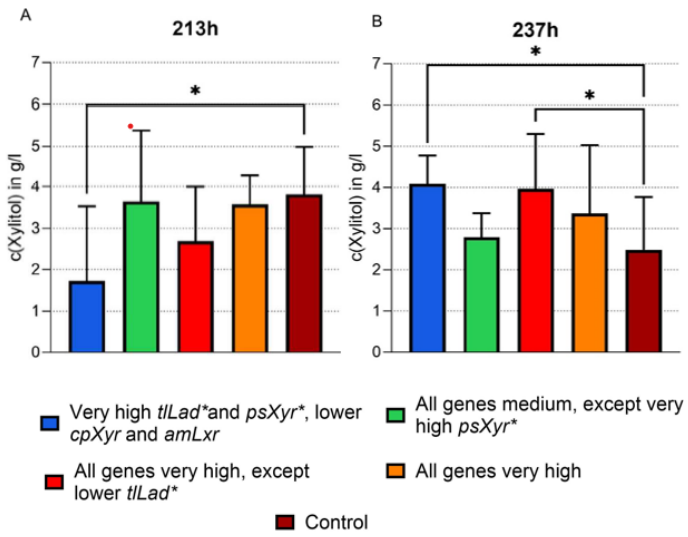


Abbildung 8: Konzentrationen von Xylitol im Überstand von Triple-KO-Stämmen mit mittlerer $FPS1_{open}$-Expression und unterschiedlichen Expressionsmustern orthologer Gene oder leerem backbone. Nach Kultivierung in 100 ml Minimalmedium mit 1 % Glukose für 99 h bei 30 °C und 250 rpm und anschließendem hinzufügen von 1 % L-Arabinose. Durchschnittliche Xylitol-Konzentration nach 213 (A) und 237 h (B) mit signifikanten Unterschieden bei P ≤ 0,05 (*) und P ≤ 0,01 (**) (n=12).

2. Zahlenmäßiger Nachweis

Am Ende der Projektlaufzeit wurden insgesamt **333.653,32 €** ausgegeben, was einer nahezu vollständigen Ausschöpfung der bewilligten Mittel von **336.610,80 €** entspricht. Die Differenz von **2.957,48 €** zeigt eine sehr präzise Budgetplanung und -verwendung. Auch die Eigenleistung wurde mit **21.262,22 €** nahezu vollständig erbracht.

Die Ausgaben verteilten sich hauptsächlich auf Personal- und Beschäftigungskosten, die leicht über den bewilligten Beträgen lagen. Diese Mehrkosten wurden durch Einsparungen in anderen Bereichen ausgeglichen. Besonders deutlich fiel die Unterschreitung bei den Dienstreisen aus, wo nur etwa die Hälfte der vorgesehenen Mittel benötigt wurde. Die Ausgaben für Verbrauchsmittel und Investitionen bewegten sich nahezu exakt im Rahmen der Bewilligungen, ebenso wie die Projektpauschale, die mit einer geringen Abweichung abgeschlossen wurde. Die Vergabe von Aufträgen blieb leicht unter dem geplanten Budget und trug ebenfalls zur Gesamteinsparung bei.

Insgesamt zeigt der Nachweis eine ausgewogene und verantwortungsvolle Mittelverwendung mit nur geringfügigen Abweichungen, die im Rahmen der Projektziele gut nachvollziehbar sind.

3. Notwendigkeit der geleisteten Arbeit

Im Rahmen der „*Nationalen Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030*“ strebt Deutschland den Aufbau einer nachhaltigen, bio-basierten Wirtschaft an. Diese soll nicht nur die Versorgung mit Lebensmitteln sicherstellen, sondern auch die industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe fördern, um hochwertige Produkte für verschiedene Anwendungsbereiche zu erzeugen.

Das Verbundprojekt griff dieses Ziel auf und widmete sich der Herausforderung, landwirtschaftliche Reststoffe durch die Kombination zweier mikrobieller Biokatalysesysteme in eine wirtschaftlich verwertbare Ressource umzuwandeln. Ein besonderer Fokus lag dabei auf Xylitol, einem vielseitig einsetzbaren Produkt mit einer langen Erfolgsgeschichte in der Industrie. Xylitol findet Anwendung in der Lebensmittel- und Gesundheitsbranche und das in dem Projekt entwickelte Verfahren bietet eine umweltfreundlichere Alternative zu herkömmlichen chemischen Verfahren zur Produktion.

Die Entwicklung eines mehrstufigen biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung von Xylitol aus Agrarreststoffen erforderte jedoch eine enge Zusammenarbeit verschiedener Forschungseinrichtungen. Die Expertise der Partner deckte unterschiedliche wissenschaftliche und technologische Bereiche ab,

wodurch die komplexen Anforderungen des Projekts zielgerichtet bearbeitet werden konnten, aber nicht durch eine reine Eigenfinanzierung möglich gewesen wären.

Das interdisziplinäre Verbundprojekt PRO-SUPER wurde durch folgende Forschungseinrichtungen umgesetzt:

- **Prof. Dr. J. Philipp Benz** (TUM, Professur für Pilz-Biotechnologie in der Holzwissenschaft)
- **Dr. Mislav Oreb** (Goethe-Universität Frankfurt, Physiologie und Genetik niederer Eukaryoten)
- **Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz** (TUM, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik)

Dank öffentlicher Förderung konnte die notwendige Zusammenarbeit ermöglicht und die Forschungsarbeiten konsequent gemäß der Projektziele vorangetrieben werden. Die dafür aufgewendeten Ressourcen waren angemessen und wurden zielgerichtet eingesetzt, um alle wesentlichen Aufgaben des Arbeitsplans erfolgreich umzusetzen. Die gewonnenen Ergebnisse stimmen mit den ursprünglichen Zielsetzungen überein.

Durch die Entwicklung innovativer Ansätze zur Nutzung von pflanzlichen Reststoff-Fraktionen aus der Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe leisteten die Partner einen wesentlichen Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit deutscher Unternehmen. Die Forschungsergebnisse stärken nicht nur den Innovationsstandort Deutschland, sondern tragen auch zur Umsetzung der Ziele der „*Nationalen Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030*“ bei.

4. Verwertbarkeit der Ergebnisse

Landwirtschaftliche Reststoffe wie extrahierte Zuckerrübenschnitzel fallen jedes Jahr in großen Mengen an, erzielen jedoch nur einen geringen wirtschaftlichen Wert. Ihre Nutzung beschränkt sich bislang überwiegend auf die Energiegewinnung in Biogasanlagen oder die Verwertung als Futtermittel. Im Rahmen des Verbundprojekts PRO-SUPER wurde ein innovatives und integriertes Laborverfahren entwickelt, das auf zwei genetisch optimierten Mikroorganismen basiert. Diese wurden gezielt für die Enzymproduktion, die Hydrolyse und die Ganzzellbiokatalyse modifiziert, um die Effizienz der Verwertung zu maximieren.

Das Verfahren ermöglichte:

1. **Die effiziente Freisetzung von L-Arabinose**, einem Zellwandbestandteil aus Zuckerrüben-Presspulpe, der etwa 20 % des Gesamtkohlenstoffs enthält. Zusammen mit der im Vorgängerprojekt optimierten Freisetzung von D-Galacturonsäure (~25% des Gesamtkohlenstoffs) wurde so eine Grundlage geschaffen, diesen landwirtschaftlich-industriellen Reststoff deutlich ganzheitlicher sowie nachhaltiger einer zusätzlichen Wertschöpfung zu überführen, als dies aktuell der Fall ist.
2. **Die biokatalytische Umwandlung von L-Arabinose in Xylitol**, ein hochwertiges Produkt mit potenziellen Anwendungen in der Gesundheits- und Lebensmittelindustrie, was bislang fast ausschließlich auf Basis einer chemischen Umwandlung von D-Xylose erfolgt.

Die erzielten Ergebnisse haben einen hohen wissenschaftlichen Neuigkeitswert und wurden bereits in vier (bezogen aufs Gesamtkonsortium: fünf) internationalen, peer-reviewten Fachzeitschriften veröffentlicht. Mehrere weitere Veröffentlichungen sind in Vorbereitung. Zudem wurden die Erkenntnisse auf verschiedenen wissenschaftlichen Konferenzen durch Posterpräsentationen und Vorträge vorgestellt und diskutiert. Weitere Informationen dazu sind auf der Projekt-Homepage verfügbar: https://www.lse.ls.tum.de/fungbio/forschung/projekte/pro-super-1/ .

Obwohl die Ergebnisse vielversprechend sind, ist das Verfahren derzeit noch nicht für eine direkte industrielle Anwendung geeignet. Es existieren jedoch zahlreiche Ansätze und Ideen, die eine Weiterentwicklung ermöglichen könnten, um das Verfahren industriell nutzbar zu machen.

5. Fortschritt bei Anderen

Die mikrobiellen Verfahren zur Nutzung von Agrarreststoffen für die Herstellung chemischer Produkte stehen weltweit im Fokus intensiver Forschung, was sich in der stetig wachsenden Zahl einschlägiger Publikationen widerspiegelt. Ein bedeutender Akteur auf diesem Gebiet ist die niederländische Firma **Cosun (Cosun Biobased Experts & Cosun Beet Company)**, einer der größten industriellen Entwickler von Pektin-basierten Produkten, die auf Zuckerrübenreststoffen basieren. Im Rahmen des EU-geförderten Projekts *Pulp2Value* (Bio-Based Industries Joint Undertaking, www.pulp2value.eu) arbeitet

Cosun an der Gewinnung von Mikrocellulosefasern, L-Arabinose und D-Galacturonsäure aus extrahierten Zuckerrübenschnitzeln. Ziel ist es, Wertschöpfungsketten für diese Nebenprodukte zu entwickeln und aufzubauen.

Ein weiteres Beispiel für die Nutzung von Zuckerrübennebenprodukten bietet das französische Unternehmen **AFYREN (NEOXY)**. Dieses Unternehmen, das unter anderem von der Südzucker AG beliefert wird, nutzt einen biotechnologischen Prozess, der der Biogasgewinnung ähnelt. Anders als bei der Biogasproduktion wird der Prozess jedoch bei der Herstellung von C2-C6-Carbonsäuren gestoppt, die anschließend gereinigt werden. Im Gegensatz zu Ansätzen mit optimierten Hefen oder Pilzen setzt AFYREN auf natürliche Bakterien und verzichtet damit vollständig auf gentechnisch veränderte Organismen (GMOs). Das Verfahren ist darauf ausgelegt, organische Säuren zu gewinnen, jedoch keine Polyhydroxyalkanoate.

Durch die Förderung des deutschen Verbundprojekts PRO-SUPER konnte Deutschland wissenschaftlich und technologisch auf internationaler Ebene konkurrenzfähig bleiben. Besonders der integrative Forschungsansatz des Projekts bietet eine Grundlage, um in diesem wachsenden Feld künftig eine führende Rolle einzunehmen und die Wertschöpfung aus Agrarreststoffen weiter voranzutreiben.

6. Veröffentlichungen

Veröffentlichte wissenschaftliche Publikationen:

1) Knesebeck M, Schäfer D, Schmitz K, Rüllke M, Benz JP, Weuster-Botz D. (2023) Enzymatic one-pot hydrolysis of extracted sugar beet press pulp after solid-state fermentation with an engineered *Aspergillus niger* strain. ***Fermentation***, 9(7), 582. https://doi.org/10.3390/fermentation9070582

2) Rüllke M, Schönrock V, Schmitz K, Oreb M, Tamayo E, Benz JP. (2024) Engineering of *Aspergillus niger* for efficient production of D-xylitol from L-arabinose. ***Microbial Cell Factories***, 23(1):262. https://doi.org/10.1186/s12934-024-02526-7

3) Rüllke M, Meyer F, Schmitz K, Blase H, Tamayo E, Benz JP. (2024) A novel luciferase-based reporter tool to monitor the dynamics of carbon catabolite repression in filamentous fungi. ***Microbial Biotechnology***, 17(9):e70012. https://doi.org/10.1111/1751-7915.70012

4) Knesebeck M, Rüllke M, Schönrock V, Benz JP, Weuster-Botz D (2024) D-Xylitol production from sugar beet pulp hydrolysate with engineered *Aspergillus niger.* ***Microorganisms***, *12*(12), 2489; https://doi.org/10.3390/microorganisms12122489

Geplante Publikationen:

- Rüllke M & Schmitz K, Tamayo E, Benz JP: Designing Zinc Cluster Transcription Factor Chimeras for Inducer-Free Gene Activation: Applications in Hydrolase Production and Beyond (*in Vorbereitung*)
- Rüllke M, Tamayo E, Stolz J, Benz JP: Genomic comparison of two *Aspergillus niger* isolates identifies differences in critical genes involved in polysaccharide degradation and metabolism (*in Vorbereitung*)

Dissertationen:

- Rüllke M (2025): Genetic engineering of *Aspergillus niger* for xylitol production from sugar beet pulp. Dissertation TU München (*in Vorbereitung*)

Abschlussarbeiten:

1) Vorwerk, Franziska (2022): Engineering L-arabitol-dehydrogenases for lower xylitol dehydrogenase side-activity, BSc Pharmazeutische Bioprozesstechnik (TU München)

2) Meyer, Franziska A. (2022): Establishment of a luciferase reporter tool for the quantification of carbon catabolite repression in filamentous fungi, MSc Biologie (TU München)

3) Schönrock, Veronika (2023): *Aspergillus niger* strain engineering for production of xylitol from arabinose, MSc Biologie (TU München)

4) Blase, Hannes (2024): Development of strategies for the derepression of carbon catabolite repression in *Aspergillus niger*, BEng Biotechnologie (Hochschule Offenburg; angefertigt an der TU München)

Beiträge bei Tagungen und Konferenzen:

1) Rüllke M, Schmitz K, Benz JP (2021) PRO-SUPER: Engineering of *Aspergillus niger* for the production of xylitol from sugar beet pulp. Posterpräsentation im Bioökonomie Camp, 30. September-1. Oktober 2021, Online

2) Rüllke M, Meyer F, Schmitz K, Benz JP (2022) PRO-SUPER: Engineering of a reporter tool to quantify carbon catabolite repression in filamentous fungi in real-time. Vortrag auf dem Symposium Molecular Biology of Fungi 2022, 7.-9. September 2022, Kaiserslautern

3) Rüllke M, Meyer F, Schmitz K, Benz JP (2023) PRO-SUPER: Engineering of a reporter tool to quantify carbon catabolite repression in filamentous fungi in real-time. Vortrag auf der 26th European Conference of Fungal Genetics, 4.-8. März 2023, Innsbruck, Österreich

4) Rüllke M, Schmitz K, Stolz J, Benz JP (2023) PRO-SUPER: Genomic comparison of two *Aspergillus niger* isolates identifies differences in critical genes involved in polysaccharide degradation and metabolism. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM), 10.-13. September 2023, Göttingen

5) Rüllke M, Schönrock V, Schmitz K, Benz JP (2024) PRO-SUPER: Engineering of *Aspergillus niger* for efficient production of xylitol from arabinose. Posterpräsentation auf der 32nd Fungal Genetics Conference, 12.-17. März 2024, Pacific Grove, Kalifornien, USA

6) Rüllke M, Meyer F, Thieme N, Karollus A, Gagneur J, Tamayo E, Benz JP (2024) Understanding the dynamics of carbon catabolite repression in filamentous fungi. Vortrag auf der 32nd Fungal Genetics Conference, 12.-17. März 2024, Pacific Grove, Kalifornien, USA

7) Benz JP (2024) Also fungi have a choice: what to eat and whom to meet? Novel tools for studying fungal decisions. Vortrag auf dem Fungal Research Symposium, 3. Mai 2024, DTU, Kopenhagen, Dänemark