Ganzzell-Biokatalysatoren

Entwicklung von *Ustilago* als Chassis für die CO₂-neutrale Itakonatsproduktion

LENA ULLMANN, LARS M. BLANK
INSTITUT FÜR ANGEWANDTE MIKROBIOLOGIE, RWTH AACHEN

The family Ustilaginaceae attracted attention in the field of industrial biotechnology, featuring a versatile product spectrum comprising organic acids (e. g., itaconate), polyols (e. g., erythritol), and extracellular glycolipids. This study focusses on establishing an *Ustilago* biocatalysts to (co-) consume the CO₂-derived substrates acetate and formate, potentially contributing toward a carbon-neutral itaconate production.

DOI: 10.1007/s12268-022-1689-6
© Die Autorinnen und Autoren 2022

■ Heutzutage wird die chemische Industrie zum Großteil von fossilen Rohstoffen dominiert, obwohl diese endlich und zudem umweltschädlich sind. Ein Wandel von erdölbasierten zu nachhaltigen und biologisch

basierten Rohstoffen ist notwendig, da der Bedarf an Nahrungsmitteln, Energie und Chemikalien weltweit steigt. Organische Säuren, z. B. Itakonsäure, können dabei als nachhaltige Alternative zu fossilen Rohstoffen

dienen, da ihre funktionellen Gruppen den Einsatz als Baustein in der chemischen Industrie ermöglichen. Itakonsäure ist eine Plattformchemikalie für verschiedene industrielle Anwendungen in der Kunststoff und Klebstoffindustrie sowie für die Produktion von Biokraftstoffen und hat darüber hinaus das Potenzial, die erdölbasierte Acrylsäure in industriellen Prozessen zu ersetzen, sofern die Produktionskosten ökonomisch kompetitiv sind.

Derzeitig wird Itakonsäure biotechnologisch mithilfe des Pilzes *Aspergillus terreus* hergestellt. Allerdings sind mit der Produktion hohe Kosten verbunden, da eine umfangreiche Prozesskontrolle erforderlich ist, um das filamentöse Wachstum des Pilzes zu kontrollieren. Um die Herausforderungen in der Produktion mit *A. terreus* zu umgehen, liegt der Fokus der Forschung auf der Suche nach

▲ **Abb. 1:** Itakonsäure-Biosyntheseweg in *Ustilago maydis* mit einer Hypothese zur Formiat- und Acetatassimilierung. Der Itakonsäure-Biosyntheseweg wurde modifiziert aus [17, 18]. Hypothetische Acetatassimilierung wurde adaptiert aus dem Bäckerhefemetabolismus [3, 4]. Die Formiatassimilierung über Formiatdehydrogenasen ist bisher für methylotrophe Mikroorganismen bekannt. Diese relativ seltenen Enzyme sind dabei auch in *U. maydis* vorhanden. 2-HP: 2-Hydroxyparaconat; ITT: Itatartarat.

Abb. 2: Itakonsäureproduktion der ausgewählten Ustilaginaceae-Stämme. **A, C,** maximale Itakonsäureproduktion in g/L. **B, D,** Ausbeute ($Y_{P/S}$ [$g_{ItA}/g_{c-Quelle}$]) der Stämme #2229 (*U. maydis* MB215), #2708 (*U. rabenhorstiana* NBRC 8995), #2707 (*U. cynodontis* NBRC 9758), #2706 (*U. cynodontis* NBRC 9727) und #2705 (*U. cynodontis* NBRC 7530) während System-Duetz-Kultivierungsexperimenten [19] mit 1,5 ml MTM (50 g L⁻¹ Glucose, 6,25 g L⁻¹ Ko-Substrat, 0,8 g L⁻¹ NH₄Cl).

alternativen Produzenten. So wurde die Familie der Ustilaginaceae und insbesondere *Ustilago maydis* als natürlicher Produzent identifiziert. Als etablierter Modellorganismus mit effizient entwickelten genetischen Werkzeugen und hefeartigem, einzelligem Wachstum hat der Brandpilz großes Potenzial als industrieller Produktionsorganismus für Itakonsäure. Durch metabolische und morphologische Modifikationen sind *U. maydis*-Stämme verfügbar, die Itakonsäure nahe der theoretischen Ausbeute produzieren [1–3]. Auch der pH-tolerante *U. cynodontis*-Stamm wurde in bisherigen Arbeiten durch Metabolic-Engineering-Methoden verbessert [4]. *U. maydis* ist darüber hinaus als ein Modellorganismus im Bereich der Biotechnologie, Pflanzenpathogenität und Zellbiologie bekannt [5, 6]. Die Familie der Ustilaginaceae weist ebenfalls ein vielfältiges Produktspektrum auf, bestehend aus organischen Säuren (z. B. Itakonat, Malat, Succinat), Polyolen (z. B. Erythritol, Mannitol), Enzymen sowie extrazellulären Glykolipiden [6, 7]. Daher waren die Brandpilze Fokus verschiedener Studien in den letzten Jahren und gewannen gerade im Feld der Biotechnologie an Relevanz. Die verschiedenen Möglichkeiten, molekularbiologisch durch Metabolic Engineering Biokatalysatoren zu entwickeln und zu verbessern, führ-

ten auch zu verbesserten Itakonsäureausbeuten in Kombination mit einer abgestimmten Bioprozessentwicklung.

Metabolic Engineering zielte auf die Überexpression des mitochondrialen Transporters Mtt1 in *U. vetiveriae* [8], die Überexpression des clusterassoziierten Regulators Ria1 in *U. maydis*, die Deletion der Itakonatoxidase *cyp3*, die Verringerung des Nebenproduktspektrums von *U. maydis*, die Erhöhung seiner Itakonatproduktion sowie die heterologe Expression des mitochondrialen Transporters MttA von *A. terreus* in *U. maydis* [1, 2, 9]. Darüber hinaus wurde durch die Deletion von Fuz7 in *U. cynodontis* ein stabiles hefeähnliches Wachstum für mehrere relevante Itakonsäure-Produktionsbedingungen ermöglicht [4]. Es wurden ebenfalls Prozessentwicklungsansätze verfolgt, die sich auf Wachstumsmedien und Fermentationsprozessoptimierung durch gepulste Fed-Batch-Strategien konzentrierten [1, 3, 4]. Dies ist besonders effektiv, wenn es mit einer *in situ*-Extraktion kombiniert wird, wie z. B. mit der reaktiven Calcium-Itakon-Fällung. Die jüngste Studie konzentrierte sich auf ein integriertes Prozessdesign, das zu einem maximalen Itakon-Titer von 220 g L⁻¹ mit einem Gesamtsäuretitert von 250 g L⁻¹ führte, was eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu den zuvor höchsten Itakon-Titern

zeigte, die mit *U. maydis* und mit *A. terreus* erreicht wurden [3].

Dennoch sind Fortschritte in der Biotechnologie und der mikrobiellen Itakonsäureproduktion erforderlich, um erdölbasierte Produkte weiter zu ersetzen. Im Jahr 2011 war die Marktgröße von Itakonsäure mit 41.400 Tonnen und einem Marktwert von 74,5 Millionen US-Dollar relativ gering [10]. Dies wurde durch den vergleichsweise hohen Preis von etwa zwei Dollar pro Kilogramm und die Verfügbarkeit weit günstigerer petrobasierter Alternativen wie Acrylsäure verursacht. Um gegenüber petrobasierten Produkten wettbewerbsfähig zu sein und Zugang zu weiteren Märkten zu erhalten, müssen die Kosten auf rund 0,5 US-Dollar pro Kilogramm gesenkt werden [11]. Unter der Annahme eines Preisrückgangs könnte Itakonsäure Acrylsäure bei der Herstellung von Poly(methylmethacrylat) ersetzen, dessen Produktion erdölbasiert ist und einen Markt im Wert von 11 Milliarden US-Dollar hat [12].

Der Wettbewerb um petrobasierte Produkte ist ein erster Schritt in Richtung der Vision einer Kreislaufwirtschaft. Darüber hinaus ist die Nutzung jedes produktionsseitigen Stroms zur Minimierung von Abfall und letztendlich des CO₂-Fußabdrucks erforderlich. Um eine wirtschaftliche Produktion zu erreichen und mit Produkten aus fossilen Res-

sources konkurrieren zu können, ist es notwendig, kostengünstige Rohstoffe und insbesondere Substrate zu verwenden. Aktuelle biotechnologische Verfahren zur Itakonatproduktion mit *A. terreus* und *U. maydis* basieren auf Kohlenhydraten wie Melasse, Xylose, Arabinose und Glucose. Darüber hinaus ist Glycerin, ein Nebenprodukt aus der Biodieselproduktion, ein alternativer Rohstoff für den Produktionsprozess unter Verwendung von *U. vetiveriae* [8, 13]. Um die Nachhaltigkeit des Produktionsprozesses zu verbessern, wird ein neuer Ansatz mit potenziellen CO₂-abgeleiteten C1- und C2-Verbindungen (Formiat und Acetat) als Ko-Substrate zur Reduzierung des CO₂-Fußabdrucks, möglicherweise in Richtung des übergeordneten Ziels eines kohlenstoffneutralen Produktionsprozesses, verwendet.

Formiat hat kürzlich an Interesse als Kohlenstoffquelle gewonnen, die durch (elektro-)chemische Katalyse leicht aus CO₂ synthetisiert werden kann. Im Gegensatz dazu kann Acetat beispielsweise durch Acetogene aus CO₂ und H₂ in Kombination mit Glucose synthetisiert werden. Darüber hinaus wurde die Forschung zur Energiespeicherung zur Herstellung chemisch stabiler und wertvoller Produkte unter Verwendung von CO₂-Rohstoffen mit Schwerpunkt auf mikrobieller Elektrosynthese (MES) durchgeführt. Daher weisen CO₂-basierte Ko-Substrate ein hohes Potenzial in der Biotechnologie auf. Jedoch ist auch die Verstoffwechselung durch die Mikroorganismen ein wichtiger Punkt, welcher noch tiefergehend untersucht werden muss. Die Acetatassimilierung in Hefen wurde dabei bereits beschrieben.

Acetat gelangt über passive Diffusion und/oder über einen möglichen Acetattransporter in die Zelle [14–16]. Es dient als Substrat für das Enzym Acetyl-CoA-Synthase (ACS) [15], das im Cytosol Acetat in Acetyl-CoA umwandelt [16]. Die Acetat-Assimilierung in *U. maydis* wurde dabei noch nicht genauer untersucht. Ein hypothetischer Stoffwechselweg ist in **Abbildung 1** dargestellt. Dabei repräsentiert jedes Tortenstück ein C-Atom. Blau eingefärbt sind die C-Atome, die potenziell aus Glucose und grün eingefärbt die, die potenziell aus CO₂ stammen können. Diese Hypothese muss jedoch noch mit einem ¹³C-Markierungsexperiment verifiziert werden. Jedoch könnte der Stoffwechselweg in Bäckerhefe Rückschlüsse auf den Stoffwechselweg in *Ustilago* zulassen, da in beiden Organismen das Enzym Acetyl-CoA-Synthase vorhanden ist. Auch die Formiat-Assimilie-

rung wurde in *U. maydis* bisher noch nicht genauer untersucht. Trotzdem findet die vorgeschlagene Formiat-Assimilierung über Formiatdehydrogenasen statt, welche bereits für methylotrophe Mikroorganismen bekannt ist. Diese relativ seltenen Enzyme sind dabei auch in *U. maydis* vorhanden. Im Gegensatz zu den Ko-Substrat-Stoffwechselwegen ist die Itakonsäure-Biosynthese ausgehend von Glucose bereits identifiziert und charakterisiert worden [17, 18]. Hierbei wird Glucose von der Zelle aufgenommen und im Cytoplasma mittels Glykolyse zu Pyruvat umgesetzt. Dieses wird darauffolgend in die Mitochondrien aufgenommen und dort zu Acetyl-CoA umgewandelt. Daraufhin werden Citrat und Oxalacetat im TCA-Zyklus gebildet. Citrat wird zu cis-Aconitat dehydriert, das über den mitochondrialen Tricarboxylattransporter Mtt1 von den Mitochondrien in das Cytosol transportiert wird. Im Cytosol wird cis-Aconitat über das Intermediär trans-Aconitat in Itakonat umgewandelt. Itakonat kann durch Cyp3 weiter in 2-Hydroxyparaconat umgewandelt werden. Die Sekretion von Itakonat und möglicherweise 2-Hydroxyparaconat in das Medium wird durch den Transporter Itp1 gesteuert [17, 18]. Der Formiatabbau über Formiatdehydrogenasen (FDH) ist in allen methylotrophen Mikroorganismen vorhanden. Dabei findet die Oxidationen von Formiat zu CO₂ als eine der Hauptenergiequellen in Form von NADH statt. NAD⁺-abhängige FDHs wurden in allen Hefen der Gattungen *Candida*, *Pichia* und *Hansenula* unter Verstoffwechselung von Methanol gefunden und aus verschiedenen Stämmen isoliert und charakterisiert. Zudem sind sie auch in *U. maydis* vorhanden. Neben nativen Stoffwechselwegen stellen auch synthetische Stoffwechselwege ein wertvolles Werkzeug dar. So wurde beispielsweise bereits ein synthetischer reduktiver Glycinweg als der effizienteste Weg für aerobes Wachstum auf Formiat mit *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert [18].

Ziel dieser Studie war es, Ustilaginaceae-Biokatalysatoren für die Ko-Verstoffwechselung von CO₂-basierten Substraten zur kohlenstoffneutralen Itakonatproduktion zu entwickeln. Acetat und Formiat als Kohlenstoffquellen haben in letzter Zeit mehr Interesse gewonnen, aber ihre Verwendung bleibt eine Herausforderung.

Acetat zeigt Toxizität und hemmende Wirkungen auf viele Mikroorganismen, während selbst die gleichzeitige Nutzung mit Glucose die zugrunde liegenden regulatorischen

Netzwerke des Stoffwechsels in Bezug auf die Glucoseverwertung herausfordert. In dieser Studie wurden 72 Stämme der Ustilaginaceae-Familie auf ihr Wachstumsverhalten und ihre Itakonsäureproduktion in Gegenwart von Acetat und Formiat untersucht (**Abb. 2**).

Dabei wurden die Stämme *U. maydis* MB215 (#2229), *U. rabenhorstiana* NBRC 8995 (#2708) und *U. cynodontis* NBRC 9758 (#2707) als potenzielle Kandidaten für die Acetatverstoffwechselung identifiziert. Für die Nutzung von Formiat als Ko-Substrat wurden *U. cynodontis* NBRC 9727 (#2706) und *U. cynodontis* NBRC 7530 (#2705) herausgestellt. Für ausgewählte Stämme wurde die Itakonsäureproduktion und das Wachstumsverhalten weiter im kleinen Labormaßstab untersucht. Um die Ergebnisse im kleinen Maßstab zu verifizieren, wurden dann ausgewählte kontrollierte Batch-Fermentationen durchgeführt.

Da in dieser Arbeit vielversprechende Produktionswirte untersucht wurden, bietet die adaptive Laborevolution (ALE) eine Strategie, um die Ko-Substrat-Toleranz und -Verwertung weiter zu verbessern. Zur weiteren Optimierung der Produktion und zur Etablierung eines kohlenstoffneutralen Produktionsprozesses bieten die Überprüfung von gentechnisch veränderten *U. maydis*-Stämmen bezüglich ihrer Acetatverwertung und die Etablierung einer kontinuierlichen Substratzugabe im Produktionsprozess weiteres Potenzial. Zudem wird die Ustilaginaceae-Biodiversität mittels 3rd-Generation-Sequenzierungstechnologien (z. B. *long-read nanopore sequencing*) untersucht, um eine Datenbank für zukünftige Versuche zu etablieren. ■

Literatur

- [1] Becker J, Tehrani HH, Ernst P et al. (2021) An optimized *Ustilago maydis* for itaconic acid production at maximal theoretical yield. *J Fungi* 7: 1–14
- [2] Becker J, Tehrani HH, Gauert M et al. (2020) An *Ustilago maydis* chassis for itaconic acid production without by-products. *Microb Biotechnol* 13: 350–362
- [3] Tehrani HH, Becker J, Bator I et al. (2019) Integrated strain- and process design enable production of 220 g L⁻¹ itaconic acid with *Ustilago maydis*. *Biotechnol Biofuels* 12: 263
- [4] Tehrani HH, Tharmasothirajan A, Track E et al. (2019) Engineering the morphology and metabolism of pH tolerant *Ustilago cynodontis* for efficient itaconic acid production. *Metab Eng* 54: 293–300
- [5] Lanver D, Tollot M, Schweizer G et al. (2017) *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nat Rev Microbiol* 15: 409–421
- [6] Geiser E, Wiebach V, Wierckx N, Blank LM (2014) Prospecting the biodiversity of the fungal family Ustilaginaceae for the production of value-added chemicals. *Fungal Biol Biotechnol* 1: 2
- [7] Saika A, Koike H, Fukuoka T, Morita T (2018) Tailor-made mannosylerythritol lipids: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 6877–6884

- [8] Zambanini T, Tehrani HH, Geiser E et al. (2017) Efficient itaconic acid production from glycerol with *Ustilago vetiveriae* TZ1. *Biotechnol Biofuels* 10: 131
- [9] Tehrani HH, Geiser E, Engel M et al. (2019) The interplay between transport and metabolism in fungal itaconic acid production. *Fungal Genet Biol* 125: 45–52
- [10] Weastra (2011) Determination of market potential for selected platform chemicals: Itaconic acid, Succinic acid, 2,5-Furandicarboxylic acid. *BioConSepT* 1–173, http://www.biocconcept.eu/wp-content/uploads/BioConSepT_Market-potential-for-selected-platform-chemicals_report1.pdf
- [11] Teleky BE, Vodnar DC (2019) Biomass-derived production of itaconic acid as a building block in specialty polymers. *Polymers* 11: 1035
- [12] Kuenz A, Krull S (2018) Biotechnological production of itaconic acid – things you have to know. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 3901–3914
- [13] Zambanini T, Kleineberg W, Sarikaya E et al. (2016) Enhanced malic acid production from glycerol with high-cell density *Ustilago trichophora* TZ1 cultivations. *Biotechnol Biofuels* 9: 135
- [14] Machens F, Messerschmidt K, Bar-Even A (2019) Core Catalysis of the Reductive Glycine Pathway Demonstrated in Yeas. *ACS Synth Biol* 8:911–917
- [15] Turcotte B, Liang XB, Robert F et al. (2010) Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res* 10:2–13

- [16] Nielsen J (2014) Synthetic biology for engineering acetyl coenzyme a metabolism in yeast. *mBio* 5:2–4
- [17] Geiser E, Przybilla SK, Friedrich A (2016) *Ustilago maydis* produces itaconic acid via the unusual intermediate trans-aconitate (2016) *Microb Biotechnol* 9:116–126
- [18] Geiser E, Przybilla SK, Engel M et al. (2016) Genetic and biochemical insights into the itaconate pathway of *Ustilago maydis* enable enhanced production. *Metab Eng* 38: 427–435
- [19] Duetz WA, Rüedi L, Hermann R et al. (2002) Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Appl Environ Microbiol* 66: 2641–2646

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Lena Ullmann und Lars M. Blank

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Lars M. Blank
Institut für Angewandte Mikrobiologie
RWTH Aachen
Worringerweg 1
D-52074 Aachen
Lars.Blank@rwth-aachen.de