

Bioengineering

Das unterschätzte biotechnologische Potenzial der Darmmikrobiota

ANDRÉ NEFF, REBECCA LÜCK, MÉLANIE GINDT, UWE DEPPENMEIER
INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE & BIOTECHNOLOGIE, UNIVERSITÄT BONN

The human gut microbiota harbors untapped potential for biotechnological applications. Within the phylum of Bacteroidota, *Phocaeicola vulgatus* stands out as a promising candidate for sustainable production of key platform chemicals like succinate. However, genetic engineering of *Phocaeicola* sp. remains challenging due to its intricate molecular landscape. This study lays the groundwork for manipulating the central carbon pathways in *Phocaeicola vulgatus*, offering insights into overcoming genetic hurdles for increased succinate yields.

DOI: 10.1007/s12268-024-2087-z
© Die Autorinnen und Autoren 2024

Die symbiotische Beziehung zwischen der Darmmikrobiota und dem menschlichen Verdauungstrakt beeinflusst maßgeblich die humane Physiologie und Gesundheit. Dazu zählt die Entwicklung des Immunsystems, der Schutz vor Krankheitserregern und die Verdauung von komplexen Kohlenhydraten aus der Nahrung. Die Phyla Bacillota und Bacteroidota dominieren den menschlichen Dickdarm, wobei Spezies der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* zu den wichtigsten Vertretern der Bacteroidota gehören [1]. Bisherige Studien zur Darmmikrobiota fokus-

sierten 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 [2]. 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 Potenzials für die Produktion der Plattformchemikalie Succinat.

Entwicklung genetischer Werkzeuge für *Phocaeicola vulgatus*

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: dem Shuttle-Vektor pG106 und dem Genom-integrativen Vektor pMM656 (Abb. 1) [3, 4]. 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 [5]. Durch die Kombination des potenten konstitutiven Promotors des Gens der Lactat-Dehydrogenase (*ldh*, *bvu_2499*) und Genen des Zentralstoffwechsels 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 Lactat-Produktion um das Zehnfache gesteigert wurde. Ähnliche Effekte bezüglich der Formiat-Produktion wurden durch die Überproduktion der Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL, *BVU_2880*) in *P. vulgatus* erzielt (Abb. 3A).

Neben der Überproduktion von Enzymen war auch die Deletion von Genen von wichti-

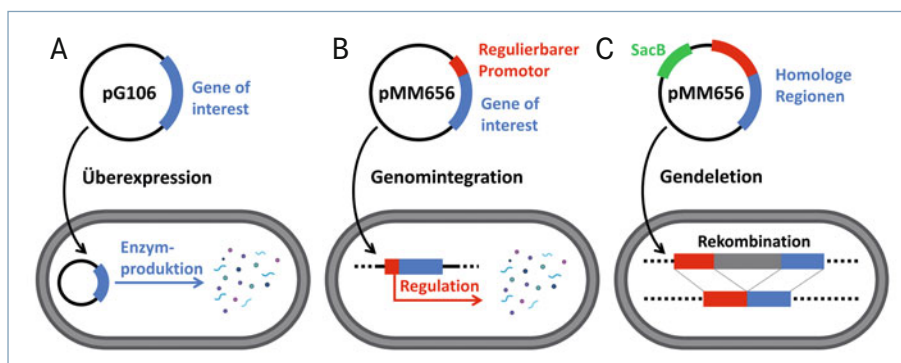


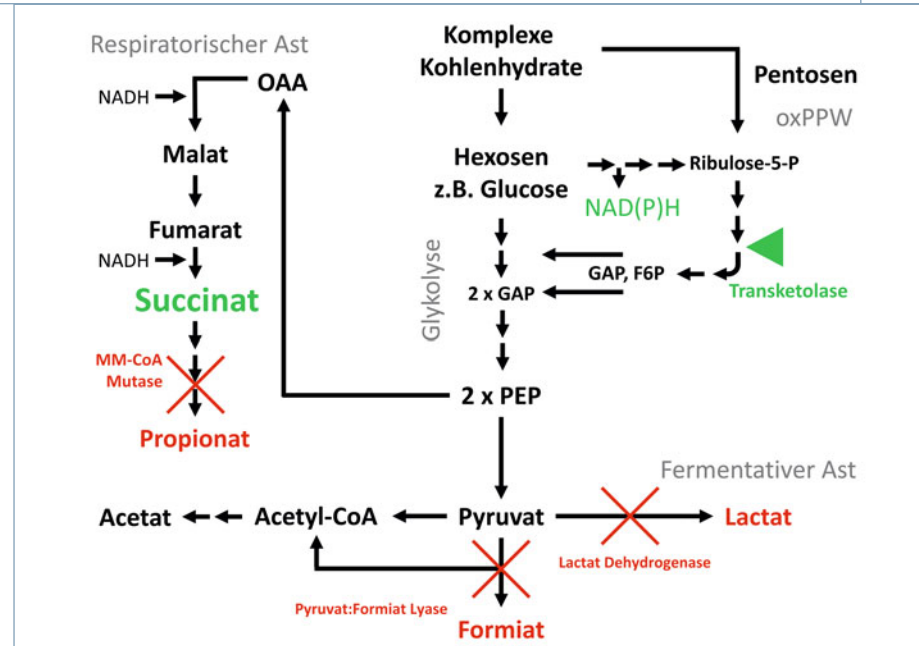
Abb. 1: Schematische Darstellung der genetischen Werkzeuge für *Phocaeicola vulgatus*. **A**, pG106 Shuttle-Vektor: High-Copy-Plasmid für die konstitutive homologe und heterologe Überexpression von Genen in *P. vulgatus*. **B**, Genom-integrativer Vektor pMM656: Über eine NBU2-Integrase wird das Plasmid 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.

ger 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 [6]. Die Kombination des Plasmid-Rückgrats von pMM656 und des *sacB*-Gens ermöglichte die Entwicklung eines modularen Deletionsvektors, welcher sich für die Durchführung einer markerlosen Deletion in *P. vulgatus* eignet. 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 [5].

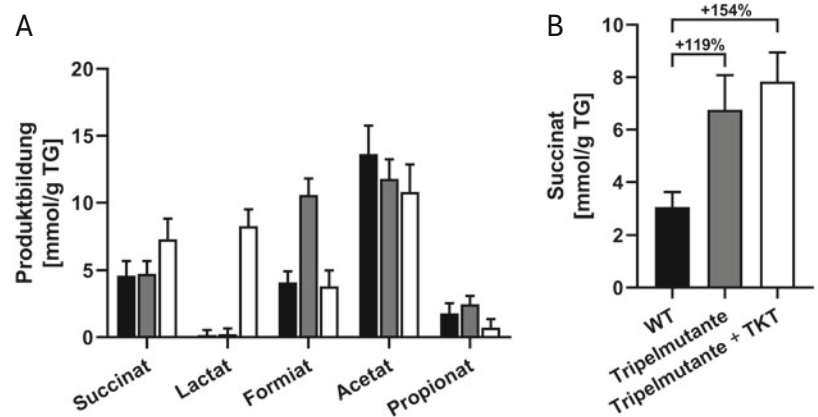
Die Deletionssysteme wurden nachfolgend auf mehrere Gene des Zentralstoffwechsels angewandt, wobei Mutanten erzeugt wurden, die Inulin bzw. Rhamnose nicht mehr verwerten konnten. Die Mutanten dienten nachfolgend für die Aufklärung der Stoffwechselwege zur Verwertung von Fruktanen und zur Synthese von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

Phocaeicola vulgatus als Succinat-Fabrik

Succinat wird vielseitig in der Lebensmittel-, Chemie- und Pharmaindustrie verwendet und ist somit eine der weltweit wichtigsten Plattformchemikalien. Die Verwendungsmöglichkeiten von Succinat umfassen die Produktion von Kosmetika, Reinigungsmitteln, Lösungsmitteln und biobasierten Polymeren wie Polybutylen-Succinat [7]. Angesichts der aktuellen Diskussionen über den Klimawandel und dem zunehmenden Interesse an nachhaltigen Herstellungsprozessen ist ein Wechsel von der herkömmlichen petrochemisch basierten Succinat-Produktion hin zu umweltfreundlichen, biobasierten Herstellungsmethoden erforderlich. Durch die Metabolisierung von nachhaltigen pflanzlichen Polysacchariden produziert *P. vulgatus* von Natur aus große Mengen an Succinat und eignet sich daher als umweltfreundliche Produktionsplattform. Der Organismus kann



▲ **Abb. 2:** Schema des zentralen Kohlenstoffstoffwechsels von *Phocaeicola vulgatus*. Die aus dem Abbau von pflanzlichen Kohlenhydraten resultierenden Zucker-Monomere werden zu kurz-kettigen Fettsäuren umgesetzt, wie Succinat, Propionat, Lactat, Formiat und Acetat. Rot: deletierte Gene und ausgeschaltete Produkte. Grün: überproduzierte Enzyme und Produkte. GAP: Glycerinaldehyd-Phosphat; F6P: Fructose-6-Phosphat; CoA: Coenzym A.



▲ **Abb. 3:** 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 ($\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$; 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.

auch zur CO_2 -Reduktion beitragen, da durch die biologische Produktion von 1 kg Succinat theoretisch 0,37 kg CO_2 fixiert werden, was vor allem aus umwelttechnischer Perspektive einen Vorteil gegenüber dem chemisch basierten Syntheseprozess bedeutet.

Der zentrale Metabolismus von *P. vulgatus* beruht auf einer gemischten Säuregärung wobei neben Succinat auch Acetat, Propionat, Formiat und Lactat produziert werden (**Abb. 2**). 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 Zug 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 Fall zusätzlich Formiat entsteht. Zur Steigerung der Succinat-Ausbeute war es daher notwendig, die Synthese der Nebenprodukte zu verringern oder ganz zu unterbinden (**Abb. 2**).

Dazu wurde zunächst das Gen für die Methylmalonyl-CoA-Mutase (*bvu_0309-10*) in *P. vulgatus* mittels des SacB-Deletionsystems ausgeschaltet. Das entsprechende Enzym ist Bestandteil des Synthesewegs für 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. 3B**).

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. 2**), in der Dreifachmutante von *P. vulgatus* homolog überproduziert. Dieses Vorgehen führte zu einer weiteren Erhöhung des Succinat-Ertrags um 35 % (**Abb. 3B**). Daher repräsentiert die erzeugte Tripel-Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 0309-10 \Delta 2449 \Delta 2880$, ergänzt durch das Plasmid zur Überproduktion der Transketolase, ein geeignetes biotechnologisches Modell für eine nachhaltige und biobasierte Succinat-Herstellung.

In der industriellen Produktion wird Succinat hauptsächlich über eine petrochemische Synthese aus raffiniertem Erdöl hergestellt. Dieser Herstellungsprozess erfordert hohe Temperaturen und Drücke und ist mit komplexen Reinigungsschritten, einem hohen Energieverbrauch und somit auch immensen CO₂-Emissionen verbunden [8]. Aufgrund der massiven Umweltbelastung hat die Herstellung von biobasiertem Succinat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Verschiedene, meist aus dem Pansen isolierte Mikroorganismen wurden

bereits als effiziente Succinat-Produzenten identifiziert und die genetische Manipulation des Stoffwechsels führte schlussendlich zu einer Steigerung der Ausbeuten [9]. Dazu zählen unter anderem *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus succiniciproducens*, *Basfia succiniciproducens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Mannheimia succiniciproducens* und *Vibrio natriegens*. Die hier dargestellten Ansätze zur Optimierung der Succinatproduktion in *P. vulgatus* reiht sich somit in das aktuelle Forschungsgebiet der Synthese von Bio-Succinat ein. ■

Literatur

- [1] Wexler AG, Goodman AL (2017) An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome. *Nat Microbiol* 2: 1–11
- [2] King CH, Desai H, Sylvestry AC et al. (2019) Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PLoS One* 14: e0206484
- [3] Mimm M, Tucker AC, Voigt CA et al. (2015) Programming a Human Commensal Bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to Sense and Respond to Stimuli in the Murine Gut Microbiota. *Cell Syst* 1: 62–71
- [4] Jones KR, Belvin BR, Macrina FL et al. (2020) Sequence and characterization of shuttle vectors for molecular cloning in *Porphyromonas*, *Bacteroides* and related bacteria. *Mol Oral Microbiol* 35: 181–191
- [5] Lück R, 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: 1211–1225

[6] Neff A, Lück R, Deppenmeier U (2023) Expanding the repertoire of counterselection markers for markerless gene deletion in the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus*. *Anaerobe* 81: 102742

[7] Saxena RK, Saran S, Isar J et al. (2017) Production and applications of succinic acid. *Curr Dev Biotechnol Bioeng* 27: 601–630

[8] Zeikus JG, Jain MK, Eklankov P (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 545–552

[9] Dai Z, Guo F, Zhang S et al. (2020) Bio-based succinic acid: an overview of strain development, substrate utilization, and downstream purification. *Biofpr* 14: 965–985

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>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Uwe Deppenmeier
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Universität Bonn
Meckenheimer Allee 168
D-53115 Bonn
udeppen@uni-bonn.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Uwe Deppenmeier

1982–1991 Studium der Biologie und Promotion, Universität Göttingen. 1991–1992 Postdoc an der University of California, Los Angeles. 1992–2003 Wiss. Mitarbeiter und Habilitation im Institut für Mikrobiologie, Universität Göttingen. 2003–2007 Associate Professor an der University of Wisconsin, USA. Seit 2007 Professor für Angewandte Mikrobiologie am Institut für Mikrobiologie & Biotechnologie, Universität Bonn.



André Neff

2014–2019 Biologiestudium an der Universität Bonn. Dort bis 2023 Promotion im Bereich Mikrobiologie unter Anleitung von Prof. Dr. U. Deppenmeier. Seit 2023 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Bonn.



Rebecca Lück

2014–2019 Biologiestudium an der Universität Bonn. Dort bis 2023 Promotion im Bereich Mikrobiologie unter Anleitung von Prof. Dr. U. Deppenmeier. Seit 2023 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für den Schutz terrestrischer Infrastrukturen, Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR), und am Institut für Sicherheitsforschung (ISF), Hochschule Bonn-Rhein Sieg.



Mélanie Gindt

2015–2021 Biologiestudium an der Universität Bonn. Seit 2021 Promotion im Bereich Mikrobiologie unter Anleitung von Prof. Dr. U. Deppenmeier.