



Chemische Fabrik Budenheim KG

**Projekt MeY⁴bioPP – Metabolic engineering of baker's yeast
(*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of long-chain bio-
polyphosphate**

(FKZ 031B0827B)

- Abschlussbericht -

Budenheim, 15.11.2023

Projektlaufzeit: 01.02.2020 – 30.04.2023

Verfasst von:

Chemische Fabrik Budenheim KG, R&D – Dr. Sven Bach, Dr. Daniel Buchold
Rheinstraße 27, 55257 Budenheim

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

Inhaltsverzeichnis

I. Kurzbericht	3
1. Anlass und Zielsetzung des Projektes	3
2. Voraussetzungen an welche angeknüpft wurde	3
3. Planung und Ablauf des Vorhabens.....	4
II. Eingehende Darstellung	6
1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele	6
2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	10
3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	11
4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	11
5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	12
6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses	12

I. Kurzbericht

1. Anlass und Zielsetzung des Projektes

Ziel des Vorhabens in MeY⁴bioPP war es in einer Kooperation des Institutes für Angewandte Mikrobiologie (iAMB) der RWTH Aachens und der Chemischen Fabrik Budenheim GmbH der in einem Vorgänger-Projekt entwickelte Prozess zur PolyP-Hyperakkumulations in Backhefe (*S. cerevisiae*) aus dem Abfallstrom Rapspresskuchen durch Metabolic Engineering finanziell wettbewerbsfähig zu machen. Das Ziel bestand darin, langketiges bio-PolyP (d.h. > 60 P-Untereinheiten) mit hoher Ausbeute und großem Anteil pro Gramm Biomasse herzustellen. Dabei wurden zwei Strategien verfolgt: Zum einen sollte eine Hefe Stammsammlung mit 4.500 Einzeldeletionen gescreent werden, um Gene mit Einfluss auf die PolyP-Produktion zu identifizieren (AP 1.2). Dafür bestand die Herausforderung darin, die bestehende Hyperakkumulationsmethode für ein Hochdurchsatzscreening anzupassen (AP 1.1). Zusätzlich sollte mittels Metabolic Engineering die Bäckerhefe *S. cerevisiae* genetisch verändert werden (AP2), um die polyP Produktion zu verbessern.

2. Voraussetzungen an welche angeknüpft wurde

Polyphosphat (PolyP) ist das lineare, nicht verzweigte Polymer von Orthophosphat (Pi) und kommt in allen lebenden Organismen vor [1]. PolyP ist biologisch abbaubar und besitzt aufgrund seiner Molekularstruktur einzigartige physiochemische Eigenschaften. Kurzkettiges PolyP eignet sich aufgrund der Hydroxylgruppen zur pH-Stabilisierung. Die Fähigkeit zur Komplexierung von Kationen und die bakteriostatische Aktivität von PolyP nehmen mit der Kettenlänge zu. All diese Eigenschaften machen PolyP für eine Vielzahl von Anwendungen unersetzlich [2].

Derzeit wird PolyP chemisch durch eine Kondensationsreaktion von reinem Pi unter sehr hohen Temperaturen synthetisiert. Der größte Teil des industriell verwendeten Phosphates hat seinen Ursprung aus Phosphaterzen. 70 % des globalen Phosphatkommens befinden sich in Marokko und der Westsahara [3]. 85 % des global abgebauten Phosphates wird in Düngemittel verwendet [4]. Die Verwendung von Pi zur Steigerung der Ernteerträge ist unvermeidlich geworden, um das Wachstum der menschlichen Bevölkerung bewältigen zu können [5, 6]. Letztendlich wird Phosphat in Gewässer ausgespült und gelangt stark verdünnt in die Meere. Der Phosphatkreislaufs schließt sich erst nach Millionen von Jahren, wenn sich Phosphatgestein durch Sedimentation von phosphathaltigen Substanzen und bildet sich anschließenden durch geochemische Prozesse erneut. Aus diesem Grund ist Pi-Gestein eine begrenzte fossile Ressource, die, im Gegensatz zu fossilem Öl, nicht ersetzt werden kann. Bei der derzeitigen Verbrauchsrate an Phosphatgestein werden die Phosphatreserven in 100 bis 300 Jahren erschöpft sein. Deshalb müssen Strategien zur Minimierung des

Phosphatverbrauchs und zum Phosphatrecycling aus ungenutzten Phosphorabfallströmen entwickelt werden, um das menschliche Leben auf der Erde zu erhalten.

Die biotechnologische PolyP-Synthese mit *S. cerevisiae* in kleinskaligen Schüttelreaktoren am Institut für Angewandte Mikrobiologie (iAMB) wird durch eine Kultivierungsstrategie erreicht, die als PolyP-Hyperakkumulation bezeichnet wird und den höchsten berichteten PolyP-Gehalt von 28 % PolyP (als KPO₃) im Zelltrockengewicht ergab. Von diesen Zellen wurden zum ersten Mal natürliche PolyP-reiche Hefeextrakt hergestellt [7, 8]. Die biotechnologische PolyP-Synthese wurde weiter modifiziert, um das Recycling von Phosphat aus landwirtschaftlichen Pflanzenabfällen hin zu PolyP mit Lebensmittelqualität zu ermöglichen. Dies wurde als Schritt in Richtung einer angestrebten Pi-Kreislaufwirtschaft betrachtet, da der in den Pflanzenabfällen gebundene Phosphor aus Düngemitteln stammt. Um PolyP aus unreinen biologischen Proben zu charakterisieren, etablierte das iAMB enzymatische Verfahren zur Quantifizierung von PolyP und zur Bestimmung der durchschnittlichen Kettenlänge [9, 10]. Außerdem wurde ein neuer Goldstandard für die analytische PolyP-Extraktion etabliert [11]. Die bislang angewandten Kultivierungsstrategien produzierten ebenso kurzkettige PolyPs (d.h. <40 P-Untereinheiten) wie die chemische Industrie. Das MeY⁴bioPP-Verfahren beabsichtigt daher die biotechnologische Produktion von langkettigem Bio-PolyP (>60 P-Untereinheiten) als neuartiges Produkt mit einer hohen Ausbeute und zu unerreichten Anteilen an der Biomasse. Der Produktionsstamm *S. cerevisiae* wird durch Metabolic Engineering modifiziert, um diese Ziele zu erreichen.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zur Umsetzung des Verfahrens wurde damit begonnen die bestehende Hyperakkumulationsmethode für ein Hochdurchsatzscreening anzupassen. Die Kultivierungsstrategie wurde in 96-Multititerplatten übertragen und die vorhandene Extraktionsmethode angepasst. Diese war zu Beginn des Vorhabens sowohl für den Hochdurchsatz als auch für das Material der Mikrotiterplatten nicht geeignet. Eine neue Extraktionsmethode wurde entwickelt, welche Zellen im Hochdurchsatz aufschließen kann, ohne weder die PolyP-Menge als auch die Kettenlänge zu beeinflussen. Ebenfalls zeigte sich, dass der Farbstoff JC-D7 für das Hochdurchsatzscreenen von Stammsammlungen sehr geeignet ist, da durch diesen eine schnelle semiquantitative Einschätzung PolyP Menge in verschiedenen Stämmen möglich war.

Parallel wurden PolyP-hydrolysierende Enzyme und Pi-Exporter in der Bäcker Hefe CEN.PK113-7D deletiert. Durch die Deletion der vakuolären Polyphosphatasen konnte die PolyP Kettenlänge von 10 P-Einheiten auf 30 P-Einheiten verdreifacht werden. Eine vergleichbare Kettenlänge konnte ebenfalls mit der Deletion der Gene *Ppn2*, *Pho91* und *Syg1* erzielt werden. Dabei hatte allerdings weder eine Einzeldeletion des *Pho91* noch von *Syg1*

einen Effekt auf die PolyP Produktion. Auch den PolyP-Gehalt in den Zellen konnte in diesen beiden Mutanten von 5 % PolyP (als KPO₄ pro Zelltrockengewicht) auf ~30 % PolyP gesteigert werden.

Die Chemische Fabrik Budenheim KG nahm eine physikochemische Charakterisierung der Bio-Polyphosphate vor.

Fachliteratur

Die verwendete Literatur ist dem angehängten Literaturverzeichnis zu entnehmen.

II. Eingehende Darstellung**1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele****Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den angegebenen Zielen:****AP 1.1 Downscaling einer PolyP-Hyperakkumulationsmethode**

Das Projektes beginnt mit dem Downscaling des Protokolls für die PolyP-Hyperakkumulation in 12-, 24-, 48- oder 96-Multititerplatten, um einen höheren Durchsatz zu ermöglichen. Die Herstellung von polyP-reichen Zellen besteht aus drei Prozessschritten: Zellmassenproduktion, Pi-Hunger und Pi-Füttern. Diese drei Schritte werden derzeit in 1 L, 1 L bzw. 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Bei einem so geringen Durchsatz dauert die Prüfung von 10 S. cerevisiae-Stämmen in Doppelkultivierungen zwei Wochen. Daher werden alle drei Prozessschritte auf Multititerplatten herunterskaliert.

Zunächst wurden 96-deepwell Mikrotiterplatten mit verschiedenen S. cerevisiae Stämmen inkuliert. Die Stämme VH 2.200 und ausgewählte Stämme (Mutanten der Stämme BY4741 und BY4742) der Einzeldeletion-Stammsammlung EUROSCARF wurden zur Kultivierung in diesen Mikrotiterplatten genutzt. Die Akkumulation von PolyP in Mikrotiterplatten konnte erfolgreich umgesetzt werden. Allerdings zeigte sich, dass die üblicherweise verwendete Phenol/Chloroform-Methode zur PolyP-Extraktion aus Hefezellen nicht für Hochdurchsatz-Tests geeignet ist. Die Mikrotiterplatten waren nicht phenolbeständig und die Trennung der wässrigen und der organischen Phase war ebenfalls nicht sauber möglich, da die üblicherweise genutzte Trennschicht nicht in den Mikrotiter-Maßstab überführt werden konnte. Daher wurden andere Extraktionsmethoden analysiert und verglichen. Dabei war ein Zellaufschluss und PolyP-Extraktion mittels Ultraschalles in Verbindung mit einem Lysepuffer aus Lithium-Aacetat und SDS am erfolgreichsten. Im direkten Vergleich mit dem Phenol/Methanol-Protokoll ergaben sich ähnliche Titer und Ausbeuten im standardisierten Labormaßstab. Auch in Mikrotiterplatten war die Extraktion durch Ultraschall erfolgreich. Eine eigenständig konstruierte Apparatur ermöglichte die parallele Extraktion von bis zu 96 Proben. Es stellte sich heraus, dass die Extraktionsleistung unabhängig von der gewählten Well-Position der Mikrotiterplatte hoch ist. Die zuverlässige Hochdurchsatz-Extraktion von PolyP-haltigem Zellmaterial stellte einen Schlüsselerfolg auf dem Weg zur Downskalierung der Gesamtmethode dar.

Im Zuge dieser Downskalierung wurde der Fluoreszenzfarbstoff JC-D7 für die PolyP-Detektion getestet. Dieser Farbstoff erwies sich als sehr spezifisch für den PolyP-Nachweis. Im Vergleich zu der vorhandenen Analytik bestehen aus zwei enzymatischen Assays zur PolyP-Mengen- und Kettenlängen-Bestimmung ließ sich dieser Farbstoff allerdings nicht für einen quantitativen Nachweis des PolyPs verwenden, da das Fluoreszenzsignal sowohl von der PolyP Menge als auch der Kettenlänge abhängig war. Jedoch lässt sich eine semiquantitative Einschätzung des PolyP-Gehaltes treffen, sodass dieser Farbstoff zum

Vorscreenen einer großen Anzahl von Stämmen sehr geeignet ist. Ein weiterer Vorteil des Farbstoffes gegenüber der bestehenden Analytik war das einfache Protokoll und der verringerte zeitliche Aufwand von nur 1 h. Proben von Stämmen, die sich im Screening basierend auf dem Fluoreszenzfarbstoff als vielversprechende in Bezug auf die PolyP-Akkumulierung herausstellen, können anschließend detaillierter mit dem enzymbasierten Assay analysiert werden.

Durch diverse Verzögerungen, u.a. auch durch die COVID19 Pandemie und die über einen längeren Zeitraum vakante Stelle des PostDocs konnte das Downscaling zwecks Screenings erst gegen Ende des Projekts fertiggestellt werden, was Verzögerungen der nachfolgenden APs 1.2 und 1.3 zur Folge hatte.

AP 1.2 Testung einer Stammbank von 4.500 Mutanten mit Einzelgendaletionen

Anschließend an das Downscaling wird eine Einzelgendaletions-S. cerevisiae-Bibliothek mit 4.500 Stämmen (die bereits am Institut verfügbare EUROSCARF-Sammlung) auf Deletionen untersucht, die den gewünschten Phänotyp (d. h. längere PolyP-Kettenlänge, höherer PolyP-Gehalt und hohe Pi-Ausbeute) erzeugen. Die Prüfung aller 4.500 Stämme wäre der ideale Fall.

Das Screenen der Stammsammlung EUROSCARF mittels JC-D7 Färbung konnte abgeschlossen werden. Die Auswertung der Daten der 4.500 Stämme ist zum jetzigen Zeitpunkt noch in Arbeit. Von den 4.500 Stämmen konnten 483 Stämme schon ausgeschlossen werden, da diese in der Voranzucht oder der eigentlichen Kultivierung nicht in hinlänglicher Weise wachstumsfähig waren. Es wird erwartet, dass die Daten bis Ende des Jahres 2023 ausgewertet sein werden und somit die Ergebnisse vorliegen werden. Außerdem wurden einzelne Stämme probeweise auf die Eignung zur PolyP-Akkumulierung mit der herkömmlichen, auf Enzym Assays basierenden Methode getestet.

Aufgrund der nun etablierten Screening-Methode wird im bewilligten Nachfolgeprojekt (IndYPoP) eine Stammsammlung industrieller Hefen durchmustert, um weitere potentiell hyperakkumulierende Stämme zu identifizieren (vgl. I.4).

AP 1.3 Global transcription machinery engineering von PHO4 und PHO2

Um die Optimierung des Expressionsgrades vieler Gene auf einmal zu ermöglichen, wird gTME der Transkriptionsfaktoren PHO4 und PHO2, die die Transkription von Pho-gesteuerten Genen induzieren, durchgeführt. Vielversprechende Mutanten werden physiologisch charakterisiert, um wachstumshemmende Mutationen herauszufiltern. Variationen beider Gene werden durch eine fehleranfällige PCR erzeugt. Die Genbibliothek wird in die Mutanten ΔPHO4 und ΔPHO2 eingeführt. Anschließend werden die Stämme auf den gewünschten Phänotyp getestet.

Das global transcription machinery engineering (gTME) von PHO4 und PHO2 konnte aus verschiedenen Gründen nicht mehr durchgeführt werden. Zunächst bedingt das Durchmustern der Vielzahl der Mutanten eine Screening-Methode, wie sie in AP1.1 etabliert wurde. Da dies erst gegen Ende der Projektlaufzeit zuverlässig gewährleistet werden konnte, stand nicht mehr ausreichend Zeit zur Verfügung, um das gTME durchzuführen (vgl. AP 1.1).

Des Weiteren war die PostDoc Stelle über einige Zeit vakant, da sie nicht adäquat besetzt werden konnte, was eine Verzögerung einiger AP zur Folge hatte.

AP 2 Entwicklung eines *S. cerevisiae* Stamms mit verbesserter PolyP-Kettenlänge, Titer und Ausbeute

Parallel zu den Arbeitspaketen 1.1 – 1.3 wird auch das Arbeitspaket 2 bearbeitet. AP 2 beschäftigt sich mit dem rationalen Design eines *S. cerevisiae*-Stamms. Die Ziele sind: Deletion der polyP-hydrolysierenden Enzyme *PPX1*, *PPN1* & 2 und des vakuolären Pi-Exporteurs *PHO91* (AP 2.1), Überexpression der Pi-Transporter *PHO84* und *PHO89* (AP 2.2) und Überexpression des PolyP-Synthesekomplexes VTC und der Vakuolen ATPase (AP 2.3). Darüber hinaus wird der Pho-Regulierungspfad durch Überexpression von *IPK1*, *IP6K*, *PHO81*, *PHO4* und *PHO2* modifiziert, um eine künstlich erhöhte Pi-Hungerreaktion hervorzurufen (AP 2.4).

Dieser Abschnitt fasst die Arbeitspakete AP 2.1 – 2.4 zusammen. Da der bisher verwendete Stamm *S. cerevisiae* VH2.200 polyploid ist und bisher nicht sequenziert ist, wurde für die Stammoptimierung der *S. cerevisiae* Stamm CEN.PK113-7D verwendet. Dieser Stamm ist gut bekannt, haploid und ein häufig verwendet Laborstamm. Die Gendeletion der PolyP-hydrolysierenden Enzyme (*Ppn1p*, *Ppn2p* und *Ppx1p*) und die Pi-Transporter *Pho91p* und *Syg1p* wurden mittels des CRISPR/Cas9 Systems durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde der Effekt der Einzelgendeletionen auf die PolyP-Akkumulierung untersucht. Hierbei hatte nur die Deletion der Polyphosphatase *Ppn1p* einen Anstieg des PolyP-Gehaltes und der Kettenlänge zur Folge. Der Gehalt konnte von 5 % PolyP (als KPO₃) in Zelltrockengewicht (w/w) auf 19 % und die Kettenlänge von 10 Pi-Einheiten auf 24 Pi-Einheiten gesteigert werden. Einzeldeletionen der anderen Gene hatten keinen oder nur geringen Effekt auf die PolyP-Ausbeute. Anschließend wurden die Gendeletionen kombiniert und ebenfalls den Effekt auf die PolyP-Akkumulierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass auch die meisten Kombinationen keinen Effekt auf die PolyP-Produktion hatten. Allerdings konnte der PolyP-Gehalt durch eine Kombination der Deletionen der Polyphosphatasen *Ppn1p* und *Ppn2p* von 5 % PolyP (als KPO₃) in Zelltrockenmasse (w/w) zu 23 % polyP gesteigert werden. Auch die durchschnittliche Kettenlänge konnte dadurch von 10 P-Einheiten zu 27 P-Einheiten erhöht werden. Durch kombinierte Deletionen der Gene *Ppn2*, *Pho91* und *Syg1* konnte ebenfalls der PolyP-Gehalt von 5 % auf 22 % gesteigert werden. Auch konnte hier die Kettenlänge deutlich verbessert werden.

Die Hefestämme CEN.PK Δ *Ppn1* und CEN.PK Δ *Ppn1*, *Ppn2* wurden anschließend im 1 L Maßstab kultiviert und das produzierte PolyP aufgereinigt. Diese wurde hinsichtlich der Gegenionen-Zusammensetzung durch die Chemische Fabrik Budenheim KG analysiert. Durch die Deletionen zeigte sich keine Änderung der Gegenionen im Vergleich zum gentechnisch unveränderten Wildtyp-Stamm.

An der Überexpression der Pi-aufnehmenden Transporter wurde gearbeitet. Die Gene der Transporter Pho87p, Pho90p, Pho89p und Pho84p wurden mit dem vorgeschalteten starken konstitutiven TEF-Promoter Plasmid-basiert ebenfalls in den *S. cerevisiae* Stamm CEN.PK113-7D eingebracht. Alle vier Stämme zeigten keine deutliche Steigerung der polyP Produktion und der Pi-Aufnahme. Bei eingehenderen Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass die Gene auf den Plasmiden nicht abgelesen wurden. In parallelen Untersuchungen konnte allerdings auch festgestellt werden, dass die Transporter unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen keinen limitierenden Faktor zur PolyP Produktion sind, da die stark produzierenden CEN.PK Mutanten auch wesentlich mehr Pi aufnahmen als der Ursprungs Stamm. Die Überexpression der Transporter wurde daher nicht weiterverfolgt.

Die Manipulation der Pho-Regulierungspfad erwies sich als schwierig, da die Effizienz des verwendeten CRISPR/Cas9 Systems hierbei nicht sonderlich hoch war. Es konnte daher keine Mutanten mit den gewünschten Überexpression bzw. Deletionen generiert werden. Es wurde allerdings an der Etablierung eines anderen CRISPR/Cas9 Systems gearbeitet, welches vielversprechend ist.

Verschiedenes

Zusätzlich zu der beschriebenen Arbeit wurden PolyP-reiche *S. cerevisiae* VH2.200 Zellen mittels Transelektronenmikroskopie (TEM) untersucht, um die Größe der Vakuole während der PolyP-Hyperakkumulation zu analysieren. Mittels dieser Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob durch das akkumulierte PolyP die Vakuole den gesamten Raum der Zelle bereits einnimmt oder eine Steigerung generell noch möglich ist. Anhand der Mikroskop-Bilder konnte die Vakuole und der Zellkern der Hefen erkannt werden. Die Größe der Vakuolen der Kultur war sowohl nach der Hungerphase als auch nach der Pi-Fütterphase sehr heterogen. Nach der Pi-Fütterung gab es einige Zellen mit stark vergrößerter Vakuole, welche fast den gesamten Zellraum einnahm. Vakuolen in anderen Zellen hatten keine Veränderung der Größe. Die Menge an PolyP in den Zellen kann daher theoretisch noch weiter gesteigert werden. Allerdings ließ sich keine Aussage darüber treffen, ob die gesamte Vakuole mit PolyP gefüllt ist, da das PolyP nicht sichtbar gemacht werden konnte.

Zu Beginn des Vorhabens wurden außerdem technische Waschwässern als ungenutzter Phosphat-Abfallstrom für die Produktion von Polyphosphaten für den technischen Gebrauch untersucht. Dabei stammten die verwendeten Waschwasser von der Chemischen Fabrik Budenheim KG. Dieses Experiment war ein Vorversuch, um durch die Bestimmung der Kinetik der Kettenlängenbildung zu verstehen, in welcher Art und Weise die Elongation der Kettenlänge abläuft. Die Hypothese, dass zu einem früheren Zeitpunkt die Kettenlänge deutlich höher ist, bevor sie durch hydrolysierende Enzyme gekürzt wird, hat sich dabei nicht

bestätigt. Außerdem wurde untersucht, ob die Wahl der P_i-Quelle die Bildung der Kettenlänge beeinflusst. Wenn verschiedene P_i-Quelle zu unterschiedlichen Kettenlängen führen, würde das Ziel einer verbesserten Kettenlänge als zentrales Thema des Projekts massiv beeinflusst werden. Es zeigte sich jedoch, dass unabhängig von der P_i-Quelle ähnliche Kettenlängen erzielt werden.

AP 3.1 Anwendungstestung des Bio-PolyP

Die Chemische Fabrik Budenheim KG erarbeitete und etablierte Anwendungstests für bio-PolyP. Mit diesen ist es möglich, polyphosphatreiche Hefeextrakte auf ihre Performance in der Fleischbearbeitung zu untersuchen und direkt zu vergleichen mit Polyphosphaten in freier Form. Die Versuche zeigten eine direkte Korrelation des Wasserbindevermögens mit dem Anteil an Polyphosphat in den Proben. Die eingesetzten Phosphatgemische definierten einen Standard, der als Referenz für die Anwendungstests an polyphosphatreichen Hefeextrakten dienen wird.

Die analytischen Methoden, welche zur Charakterisierung von polyphosphatreichen Hefeextrakten notwendig sind, wurden von Budenheim weiter verfeinert: ICP-OES zur Elementanalyse sowie HPIC zur Bestimmung der einzelnen Phosphatspezies (Ortho-, Pyro, Tri- und Polyphosphat). Entsprechende Messvorschriften wurden etabliert.

Eine Elementaranalyse eines bio-PolyP wurde von Budenheim durchgeführt und lieferte vielversprechende Ergebnisse. Keine akkumulierten Mengen an Schwermetallen konnten detektiert werden.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der Großteil des Budgets wurde für Personal sowie Verbrauchsmaterialien aufgewandt. Die Kalkulation der Personal- und Sachmittel erfolgte gewissenhaft und ökonomisch sinnvoll. Die Komplexität der Fragestellungen und Methodik erforderte qualifiziertes Personal mit entsprechendem Wissen und Fertigkeiten. Hierzu wurde am iAMB ein Doktorand und ein Postdoc mit den anfallenden Arbeiten und Fragestellungen betraut.

Reisemittel wurden überwiegend für die Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen veranschlagt, sowie die Teilnahme an Workshops, bei denen u.a. auch die Ergebnisse dieses Projekts vorgestellt wurden.

Weitere Erläuterungen und Begründungen sowie detaillierte Budgetmodifizierungen sind den entsprechenden Anträgen der Budgetmodifizierungen sowie den Zwischenberichten zu entnehmen.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Polyphosphat (PolyP) ist das lineare unverzweigte Polymer des Monomers (Ortho-) Phosphat (P_i). PolyP besitzt einzigartige Eigenschaften, die es für eine Vielzahl von Anwendungen in der Trinkwasser-, Lebensmittel-, Agrar-, Technik- und Pharmaindustrie unersetzlich machen. Derzeit wird PolyP chemisch durch Erhitzen und damit Kondensieren von P_i synthetisiert. Diese chemische Synthese basiert auf P_i , das aus geologischen P_i -Erzreserven gewonnen wird, die in 100 bis 300 Jahren erschöpft sein werden. Daher müssen Strategien für einen minimierten P_i -Verbrauch und das P_i -Recycling aus ungenutzten P_i -Abfallströmen entwickelt werden.

Der Prozess in einem Vorgänger-Projekt entwickelte Prozess zur PolyP-Hyperakkumulations in Backhefe (*S. cerevisiae*) ist sowohl durch die bereits etablierte chemische Synthese als auch durch die Produktion von nur kurzkettigem PolyP noch nicht wettbewerbsfähig. Während des Projektes MeY⁴bioPP sollte daher durch Metabolic Engineering der Prozess wirtschaftlich gemacht werden, indem das neuartige Produkt langkettiges Bio-PolyP (d.h., > 60 P-Untereinheiten) erzeugt werden soll und den Titer und die Ausbeute zu erhöhen. Ebenfalls sollte die Menge an PolyP auf einen bisher unerreichten Anteil der Biomasse gesteigert werden.

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

Die Ergebnisse dieses Projektes haben vielschichtigen Nutzen und lassen sich vor allem für die Steigerung der PolyP Produktion in industriell relevanten Hefestämmen nutzen. Das Downscaling der Kultivierungsstrategie lässt sich nutzen, um weitere Hefe oder ähnliche Stammsammlungen zu analysieren. Dadurch lässt sich das generierte Wissen auch auf andere Organismen übertragen. Der Einsatz des JC-D7 Farbstoffes vereinfacht den schnellen Nachweis von PolyP und wird mittlerweile schon in anderen Projekten auch auf weitere Mikroorganismen übertragen und mit den in Hefen generierten Daten verglichen.

Es wurde erfolgreich eine zweite Förderphase des Projekts beantragt, in dem über drei Projektjahre die Produktion von PolyP in industriell relevanten Hefestämmen vorangetrieben und intensiviert werden soll. Die Chemische Fabrik Budenheim KG wird dort als assoziierter Projektpartner (ohne Förderung) auftreten. Neuer Projektpartner wird das Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - Hans-Knöll-Institut sein. Außerdem wir die Versuchsanstalt der Hefeindustrie e.V. als begleitender Partner in beratender Tätigkeit fungieren. Es wird erwartet, dass innerhalb der drei Projektjahre eine industrielle und wirtschaftliche Machbarkeit gezeigt werden kann, sodass ein Transfer in den industriellen Sektor anschließend möglich ist. Basierend auf den generierten Ergebnissen wurden weitere Projekte beantragt.

Die Ergebnisse werden/wurden zudem in der Dissertation von Jana Fees und in Publikationen (siehe II.6) verwendet.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Ein Fortschritt auf dem Gebiet der PolyP-Produktion mit Hefen bei anderen Stellen ist unseres Wissens nicht erzielt worden. Es fand ein reger Austausch und die Planung einer Kollaboration mit einer Arbeitsgruppe der Massey University, Neuseeland, statt, die PolyP mittels Algen akkumulieren. Erzielte PolyP-Titer mit Algen sind jedoch weitaus geringer als die der Hefen. Andere Arbeitsgruppen, die weltweit an PolyP in unterschiedlichsten Organismen forschen, betrachten vornehmlich die zelluläre und physiologische Funktion des PolyPs und sind nicht darauf aus, möglichst hohe Titer zu erzielen.

Die großtechnische chemische Synthese von PolyP ist hinlänglich der Kettenlänge unseres Wissens immer noch begrenzt auf bis zu 40 P-Untereinheiten. Des Weiteren wird die energieintensive chemische Synthese aufgrund steigender Energiepreise weniger kosteneffizient, weshalb eine biotechnologische Produktion, besonders natürlich mit >40 P-Untereinheiten, attraktiver wird.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Im Rahmen von MeY⁴bioPP wurden von Seiten des iAMBs bereits ein Paper veröffentlicht [12], zwei weitere Artikel sind in Arbeit [13, 14]. Außerdem wurden zwei Poster und vier Vorträge auf (inter-)nationalen Konferenzen vorgestellt bzw. gehalten [15–22]. Zudem wird die angestellte Doktorandin des iAMBs, Jana Fees, ihre Dissertation in Kürze einreichen. Diese wird anschließend verteidigt und veröffentlicht.

Literaturverzeichnis

- [1] Denoncourt A, Downey M. 2021. Model systems for studying polyphosphate biology: a focus on microorganisms. *Current genetics* 67(3):331–346. doi: 10.1007/s00294-020-01148-x.
- [2] Kulakovskaya TV, Vagabov VM, Kulaev IS. 2012. Inorganic polyphosphate in industry, agriculture and medicine: Modern state and outlook. *Process Biochemistry* 47(1):1–10. doi: 10.1016/j.procbio.2011.10.028.
- [3] Stephen M. Jasinski. 2023. Mineral Commodity Summaries - Phosphate Rock. <https://pubs.usgs.gov/periodicals/mcs2023/mcs2023-phosphate.pdf>.
- [4] 2019. World fertilizer trends and outlook to 2022. doi: 10.4060/ca6746en.
- [5] Rittmann BE, Mayer B, Westerhoff P, Edwards M. 2011. Capturing the lost phosphorus. *Chemosphere* 84(6):846–853. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.001.

- [6] Cordell D, Drangert J-O, White S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19(2):292–305. doi: 10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009.
- [7] Christ JJ, Blank LM. 2019. *Saccharomyces cerevisiae* containing 28% polyphosphate and production of a polyphosphate-rich yeast extract thereof. *FEMS yeast research* 19(3). doi: 10.1093/femsyr/foz011.
- [8] Herrmann KR, Fees J, Christ JJ, Hofmann I, Block C, Herzberg D, Bröring S, Reckels B, et al. 2023. Biotechnological production of food-grade polyphosphate from deoiled seeds and bran. *EFB Bioeconomy Journal* 3:100048. doi: 10.1016/j.bioeco.2023.100048.
- [9] Christ JJ, Blank LM. 2018. Enzymatic quantification and length determination of polyphosphate down to a chain length of two. *Analytical biochemistry* 548:82–90. doi: 10.1016/j.ab.2018.02.018.
- [10] Christ JJ, Willbold S, Blank LM. 2019. Polyphosphate Chain Length Determination in the Range of Two to Several Hundred P-Subunits with a New Enzyme Assay and ³¹P NMR. *Analytical chemistry* 91(12):7654–7661. doi: 10.1021/acs.analchem.9b00567.
- [11] Christ JJ, Blank LM. 2018. Analytical polyphosphate extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical biochemistry* 563:71–78. doi: 10.1016/j.ab.2018.09.021.
- [12] Fees J, Christ JJ, Willbold S, Blank LM. 2023. Biotechnological production of polyphosphate from industrial wash water. *Biotechnology and bioengineering* 120(2):456–464. doi: 10.1002/bit.28274.
- [13] Fees J, Greven L, Buhl EM, Blank LM. Yeast strain development for enhanced polyphosphate production. *in preparation*.
- [14] Deitert A, Fees J, Mertens A, Nguyen Van D, Maares M, Haase H, Blank LM, Keil C. A fluorescence assay for assessment of yeast inorganic polyphosphate using JC-D7. *in preparation*.
- [15] Fees J, Deitert A, Baier M, Demling P, Blank LM. 2023. Biotechnological polyphosphate production by *Saccharomyces cerevisiae* using phosphate-rich waste streams. FEBS Workshop 2023 - Polyphosphate: The Actual Biology of an Ancient Polymer, 09.-12.05.2023, Cadiz, Spain.
- [16] Fees J, Christ JJ, Buchold D, Bach S, Blank LM. Biotechnologisches Upcycling von industriellem Waschwasser zu Polyphosphat. Deutsche Phosphor-Plattform DPP e.V., 24.09.2020, Frankfurt a. M., Germany.
- [17] Demling P, Fees J, Deitert A, Blank LM. Establishing a circular phosphate economy – Polyphosphate production in *Saccharomyces cerevisiae*. Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering, 23.-25.05.2022, Mainz, Germany.

- [18] Fees J, Blank LM. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of long chain biopolyphosphate. 4th Phosphorus in Europe Research Meeting (PERM), 02.06.2021, online.
- [19] Fees J, Blank LM. Contributions to a circular phosphate economy - Polyphosphate production in *Saccharomyces cerevisiae*. Beneficiation of Phosphates IX, 05.- 10.06.2022, Helsinki, Finland.
- [20] Demling P, Fees J, Christ JJ, Blank LM. Production of polyphosphate-rich yeast extract as a novel food additive. 2nd VH Online Yeast Conference (2nd VHOYC), 13.-14.09.2021, online.
- [21] Demling P, Fees J, Deitert A, Jensen PE, Worberg A, Sudarsan S, Blank LM. Bioprocess development for the production of polyphosphates with novel applications. Recent Advances in Fermentation Technology (RAFT) 14, 06.- 09.11.2022, Orlando, FL, USA.
- [22] Demling P, Jensen PE, Worberg A, Sudarsan S, Blank LM. Establishing a circular phosphate economy – Polyphosphate production in *Saccharomyces cerevisiae*. - Innovation for Biomanufacturing - Next Generation Cell-Factories and Process Development, 16.06.2022, Lyngby, Denmark.