

## Nachhaltige biotechnologische Verfahren

# Produktion von Plattformchemikalien durch mikrobielle Biokatalysatoren

MELANIE KNOLL, JANEK WEILER, JOHANNES GESCHER  
INSTITUT FÜR TECHNISCHE MIKROBIOLOGIE, TU HAMBURG

**The application of organic carbon as a biotechnological substrate belongs to the most promising approaches for the substitution of unsustainable production systems. Here, we present *Cupriavidus necator* as production strain for catalyzing the conversion of carbon dioxide, butyrate, acetate and propionate to the platform chemical acetoin. Using genetic engineering and proteomics the optimization of the strain is put into perspective regarding its implementation in a biorefinery context.**

DOI: 10.1007/s12268-022-1761-2  
© Die Autorinnen und Autoren 2022

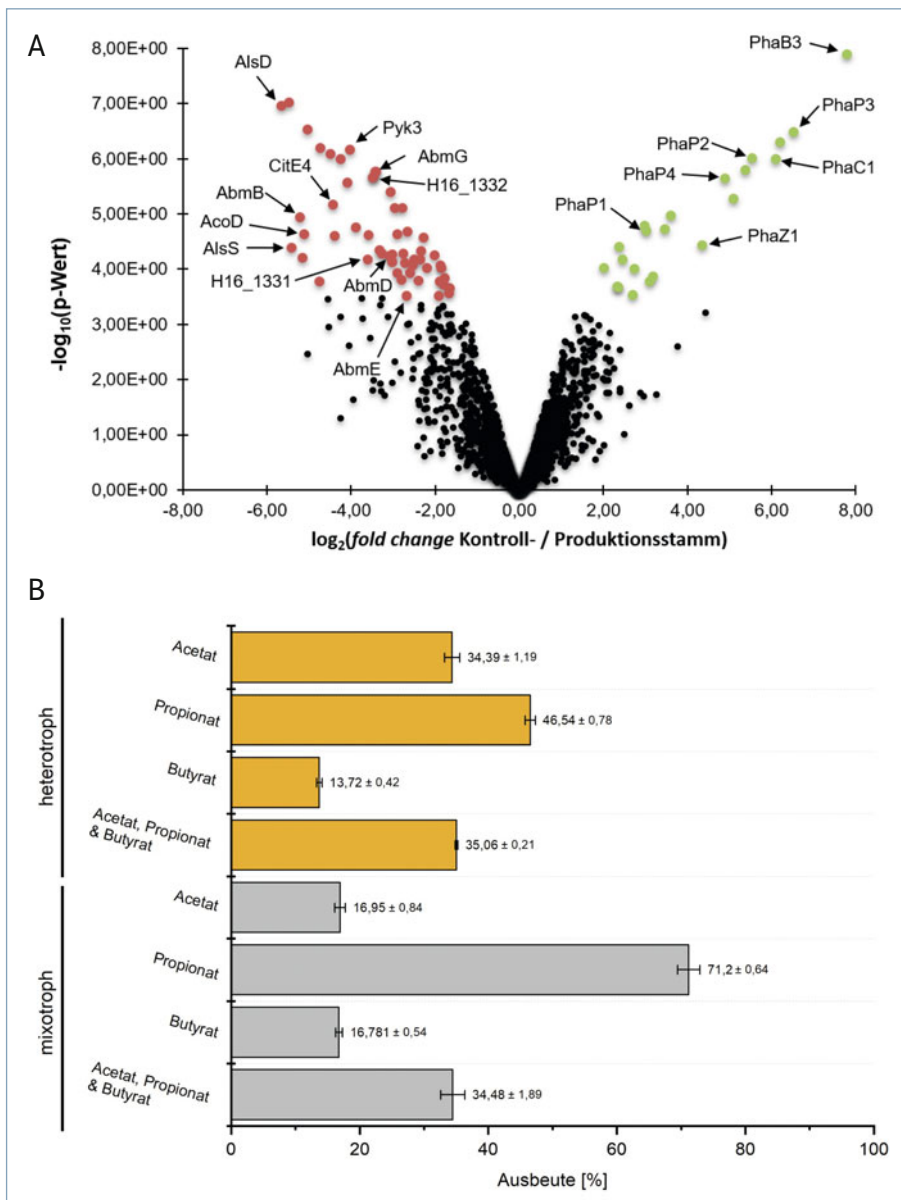
Das 21. Jahrhundert sollte davon geprägt sein, nicht nachhaltige und petrochemisch-basierte Produktionsketten durch umweltschonendere zu ersetzen. Hierfür könnten Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) oder organische Biomasse als Kohlenstoffquelle für Produktionsverfahren Anwendung finden, wobei letztere durch Abfallströme ubiquitär verfügbar sind, jedoch oft in komplexen Mischungen vorliegen. Bislang ist die wirtschaftliche Nutzung dieser Biomasse jedoch nicht auf die Produktion von Plattformchemikalien ausgelegt, sondern beschränkt sich häufig auf die Produktion von Biogas. Dies soll sich durch das Konzept der Bioraffinerie ändern, in welchem Produktionskaskaden etabliert werden sollen, in denen prozesstechnisch eine Veredelung von Biomasse in definierte Chemikalien stattfindet. So kann Biomasse mittels saurer Hydrolyse in besser zugängliche organische Säuren, hauptsächlich Acetat, Butyrat und Propionat, umgesetzt werden. Der Vorteil der sauren Hydrolyse ist, dass der Prozess auch hohe Umsatzraten bei einem wechselnden Substratspektrum erzielt, wodurch verschiedenste Abfallströme als Substrat genutzt werden können. Zusätzlich stellen hierbei H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> Nebenprodukte dar, welche ebenfalls in nachfolgenden Prozessen zur Herstellung von Endprodukten Anwendung finden. Diese Veredelungsprozesse

können durch Mikroorganismen wie *Cupriavidus necator* katalysiert werden, welcher als Knallgasbakterium organische Säuren, aber auch Gase wie H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> umsetzen kann. Mittels *genetic engineering* ist es möglich die Produktion verschiedener Endprodukte durch *C. necator* zu etablieren, sodass ein Teilprozess eines Bioraffinerie-Ansatzes katalysiert werden könnte.

### ***Cupriavidus necator* als Produktionsstamm**

*C. necator* ist seit vielen Jahren bekannt als ein Modellorganismus für die Produktion von Polyhydroxybutyrat (PHB), welches als biologisch abbaubares Plastik verwendet werden kann. Der Stamm ist sehr gut erforscht und genetisch leicht zugänglich. Dies ermöglicht die Produktion von Plattformchemikalien durch genetische Modifikationen, welche essenzielle Enzyme für die Umsetzung der Edukte zur Verfügung stellen. Eine solche Plattformchemikalie ist Acetoin, welche als eine der 30 wichtigsten Substanzen für ein biobasiertes Wirtschaften beschrieben wurde [1]. Acetoin findet Anwendung als Ausgangsstoff für die Polymer-Herstellung sowie als Aromastoff in der Lebensmittelindustrie. Um Acetoin zu produzieren, wurden die nötigen Gene für eine Umsetzung von Pyruvat, einem zentralen Stoffwechselinter-

mediat, über Acetolactat mittels Acetolactat-Synthase (AlsS) und Acetolactat-Decarboxylase (AlsD) zu Acetoin eingebracht. Zusätzlich wurden die *acoABC*-Gene für die Nutzung von Acetoin als Kohlenstoffquelle deletiert, sodass eine Verstoffwechslung des gewollten Endprodukts nicht stattfinden konnte. Des Weiteren wurden die PHB-Synthasen PhaC1 und PhaC2 ausgeschaltet, sodass der Kohlenstofffluss in Richtung der Acetoin- statt der PHB-Synthese geleitet wurde [2]. Bei einer autotrophen Produktion mit H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> wurde durch diese genetische Optimierung eine bislang unübertroffene Kohlenstoffeffizienz von nahezu 100 Prozent erreicht [2]. Ebenfalls hohe Kohlenstoffeffizienzen konnten für Anwendungen unter hetero- und mixotrophen Bedingungen gezeigt werden [3]. Um die Effizienz des Kohlenstoffmetabolismus nachvollziehen zu können, wurde das Proteom des Produktionsstamms mit einem Kontrollstamm, der lediglich die *acoABC*-Deletion sowie das Produktionsplasmid trug, verglichen (**Abb. 1A**). Dadurch konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion der PHB-Synthasen neben AlsS und AlsD auch die Pyruvat-Kinase Pyk3 hochreguliert wurde. Pyk3 katalysiert hierbei die Produktion von Pyruvat, dem Ausgangsstoff zur Produktion von Acetoin, und zeigte eine mehr als 20fache Hochregulierung im Vergleich zum Kontrollstamm. Diese Hochregulierung der drei Schlüsselenzyme zur Acetoin-Produktion resultiert mutmaßlich in der beobachteten hohen Kohlenstoffeffizienz. Hinzukommend wurde eine erhöhte Produktion von AcoD, einem Protein des Acetoin-Abbau-Stoffwechsels, festgestellt, welche durch die erhöhte Konzentration von Acetoin beeinflusst wird, jedoch die Kohlenstoffeffizienz nicht negativ beeinflussen kann, da der Abbau durch die *acoABC*-Deletion unterbrochen wurde. Ein negativer Einfluss auf die Translation der am PHB-Metabolismus beteiligten Enzyme PhaP1, PhaP2, PhaP3 sowie PhaP4 war durch die Deletion der zentralen Synthasen dieses Stoffwechselwegs ebenfalls zu erwarten und konnte belegt werden.



▲ **Abb. 1:** Acetoin-Produktion durch *Cupriavidus necator*. **A**, Häufigkeit der Proteine im Vergleich zwischen Produktions- (rot) und Kontrollstamm (ohne PHB-Synthasen-Deletion, grün). Farblich dargestellte Punkte repräsentieren signifikant erhöhte Häufigkeiten einzelner Proteine. Die Deletion der PHB-Synthasen resultiert in einer erhöhten Expression der Schlüsselenzyme AlsS, AlsD und Pyk3, wodurch eine verbesserte Kohlenstoffbilanz erzielt wird. **B**, Übersicht über Acetoin-Ausbeuten unter hetero- und mixotrophen Bedingungen [3]. Dargestellt sind die Mittelwerte inklusive der Standardabweichungen von Ausbeuten aus drei unabhängigen Replikaten.

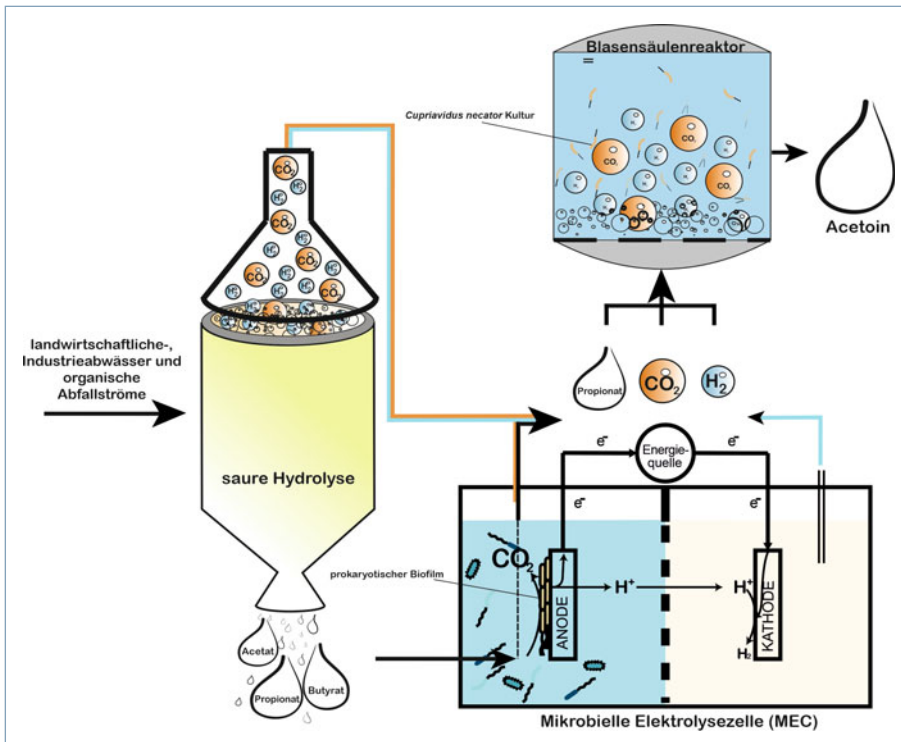
### Mikrobieller Biokatalysator zur Produktion von Acetoin

Zusätzlich wurde dieser Produktionsstamm für die Katalyse eines Teilprozesses einer Biorefinerie zur Veredelung der Endprodukte der sauren Hydrolyse im Labormaßstab etabliert. Entsprechend wurden die drei Hauptkomponenten Butyrat, Propionat und Acetat sowie  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2$  als Substrat zur Verfügung gestellt und die Acetoin-Produktion des Stamms untersucht (**Abb. 1B**). Unter

heterotrophen Bedingungen wurden die organischen Säuren einzeln oder als Gemisch bereitgestellt, während unter mixotrophen Bedingungen zusätzlich  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  zugeführt wurden. Dabei konnte unter heterotrophen Bedingungen für die zeitgleiche Zugabe von Butyrat, Acetat und Propionat eine Kohlenstoffeffizienz von 35,06 %  $\pm$  0,21 nachgewiesen werden, welche im Vergleich zur Effizienz unter mixotrophen Bedingungen von 34,46 %  $\pm$  1,89 als gleichwertig zu

betrachten ist. Wurden Acetat, Butyrat und Propionat jeweils als alleinige Kohlenstoffquelle zur Verfügung gestellt, zeigte lediglich Propionat als Substrat eine erhöhte Acetoin-Ausbeute von 46,54 %  $\pm$  0,78 im Vergleich zum Versuch mit allen drei organischen Säuren. Diese erhöhte Produktion könnte darin begründet sein, dass beim Abbau von Propionat im Vergleich zu Acetat und Butyrat metabolisch Pyruvat entsteht, sodass eine gesteigerte Konzentration des Ausgangsprodukts für den neuen Stoffwechselweg erreicht werden konnte. Unter mixotrophen Bedingungen führte die Zugabe von Propionat ebenfalls zu einer erhöhten Ausbeute von 71,2 %  $\pm$  0,64, während für Butyrat und Acetat jeweils eine Ausbeute von ca. 16 Prozent detektiert wurde. Dabei war besonders auffällig, dass Acetat und Butyrat simultan mit  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  verbraucht wurden, während für Propionat und  $\text{CO}_2/\text{H}_2$  ein diauxischer Verbrauch festgestellt werden konnte [3]. Während beim Abbau von Butyrat und Acetat zwei Moleküle Acetyl-CoA im zentralen Kohlenstoffmetabolismus als Intermediate entstehen, läuft für  $\text{CO}_2$  sowie Propionat der Metabolismus über Pyruvat als intermediärem Produkt ab. Dadurch ist ebenfalls eine erhöhte Substratverfügbarkeit gegeben, was sich in der erhöhten Ausbeute widerzuspiegeln scheint. Da der mixotrophe Prozess für Propionat und  $\text{CO}_2$  diauxisch stattfindet, wird Acetoin erst heterotroph mittels Propionat mit einer Ausbeute von 40 Prozent und anschließend autotroph mit einer Ausbeute von 100 Prozent produziert, sodass über das Experiment hinweg eine Kohlenstoffeffizienz von 70 Prozent erreicht werden konnte. Damit konnte gezeigt werden, dass Propionat für die mixotrophe Produktion von Acetoin nicht nur geeignet ist, sondern auch, dass die organischen Säuren jeweils spezifisch als Edukte zur Produktion unterschiedlicher Endprodukte betrachtet und angewandt werden sollten.

Für die hier vorgestellten organischen Säuren aus der sauren Hydrolyse konnte bereits gezeigt werden, dass sie mittels mikrobieller Elektrolyse umgesetzt werden können, wobei hauptsächlich Acetat und Butyrat metabolisiert werden und Propionat erhalten bleibt [4]. Von den vorgestellten Ergebnissen ausgehend ist ein Folgeprojekt entstanden, in welchem eine Reaktionskaskade (**Abb. 2**) etabliert wird, in der Biomasse mittels saurer Hydrolyse zu Acetat, Butyrat und Propionat umgesetzt wird, wobei anschließend in einer mikrobiellen Elektro-



▲ **Abb. 2:** Schematische Darstellung des vorgestellten Biorefineriekonzepts. Abfallströme werden in der sauren Hydrolyse in organische Säuren gespalten, welche teilweise mittels mikrobieller Elektrolysezelle (MEC) umgesetzt werden. In einem letzten Schritt veredelt *Cupriavidus necator* die entstandenen Intermediate zu der Plattformchemikalie Acetoin.

lysezelle Acetat und Butyrat metabolisiert werden, sodass als Endprodukte Propionat,  $\text{CO}_2$  sowie  $\text{H}_2$  entstehen. Als letzte Stufe des Prozesses soll der hier beschriebene Produktionsstamm diese Ausgangsstoffe veredeln, sodass die Plattformchemikalie für die industrielle Anwendung biogen und nachhaltig produziert zur Verfügung gestellt wird. Dadurch kann eine nachhaltige Produktionskaskade etabliert werden, welche durch weitere Optimierungen und Anschlussprozesse zur Aufreinigung [5] und Weiterverarbeitung

der Produkte in die industrielle Anwendung überführt werden kann.

### Danksagung

Wir danken dem BMBF (Förderkennziffer 031B0365A) für die finanzielle Unterstützung.

### Literatur

[1] Werpy T, Petersen G (2004) Top value added chemicals from biomass: volume 1 – results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Natl Renew Energy Lab, Golden, CO, <https://doi.org/10.2172/15008859>

- [2] Windhorst C, Gescher J (2019) Efficient biochemical production of acetoin from carbon dioxide using *Cupriavidus necator* H16. *Biotechnol Biofuels* 12: 1–11
- [3] Härrer D, Windhorst C, Böhner N et al. (2021) Production of acetoin from renewable resources under heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresour Technol* 329: 124866
- [4] Schmidt A, Sturm G, Lapp CJ et al. (2018) Development of a production chain from vegetable biowaste to platform chemicals. *Microb Cell Fact* 17: 90
- [5] Bommareddy RR, Wang Y, Pearcy N et al. (2020) A sustainable chemicals manufacturing paradigm using  $\text{CO}_2$  and Renewable  $\text{H}_2$ . *iScience* 23: 101218

**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>.



Melanie Knoll, Janek Weiler und Johannes Gescher (v. l. n. r.)

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Johannes Gescher  
 Institut für Technische Mikrobiologie (TMI)  
 Technische Universität Hamburg (TUHH)  
 Kasernenstraße 12  
 D-2 1073 Hamburg  
[johannes.gescher@tuhh.de](mailto:johannes.gescher@tuhh.de)  
[www.gescher-lab.de](http://www.gescher-lab.de)