

## Gasfermentation

# Carboxydotrophe Knallgasbakterien zur aeroben Nutzung von CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>

DANIEL SIEBERT, BASTIAN BLOMBACH  
PROFESSUR FÜR MIKROBIELE BIOTECHNOLOGIE, CAMPUS STRAUBING FÜR  
BIOTECHNOLOGIE UND NACHHALTIGKEIT, TU MÜNCHEN

**Aerobic carboxydotrophic Knallgasbacteria exhibit the unique feature to utilize CO, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> or mixtures thereof as sole carbon and energy sources in the presence of O<sub>2</sub>. While several industrial off-gases are comprised of such gases, this group of organisms is promising to establish novel value chains via gas fermentation for the sustainable production of chemicals and fuels.**

DOI: 10.1007/s12268-022-1799-1  
© Die Autoren 2022

Die endliche Verfügbarkeit von fossilen Ressourcen und der negative Umwelteinfluss durch deren Verbrauch bedingen die Entwicklung von nachhaltigen Produktionsverfahren im Rahmen der zirkulären Bioökonomie. Die industrielle Biotechnologie kann hier einen wichtigen Beitrag leisten, um Chemikalien und Kraftstoffe aus biogenen Ressourcen oder Abfallströmen herzustellen. Derzeit nutzen industrielle Bioprozesse vornehmlich Zucker als Substrat, was aus ethischen Gründen (Teller-Tank-Diskussion) kritisch zu bewerten ist [1]. Daher sollten zukünftige Prozesse auf Rohstoffen basieren, die nicht als Nahrungsmittel genutzt werden. Industrieabgase emittieren erhebliche Mengen

Treibhausgase in die Atmosphäre und enthalten signifikante Anteile CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> (auch Synthesegas oder Syngas genannt). Die anaerobe Nutzung von C1-Gasen als Substrate hat bereits industrielle Reife erlangt. Dabei werden Abgase aus der Stahlindustrie mit acetogenen Bakterien in Ethanol umgesetzt. Diese Gruppe von Bakterien nutzt den Wood-Ljungdahl-Weg zur Fixierung von CO<sub>2</sub>. Obwohl dieser Weg im Hinblick auf den ATP- und H<sub>2</sub>/Elektronen-Bedarf der effizienteste ist, gilt diese Gruppe anaerober Bakterien als energielimitiert, was die effiziente Produktion längerer oder ATP-fordernder Moleküle erschwert. Zudem reagieren die strikt anaeroben Acetogenen empfindlich auf

Sauerstoff, welcher bei O<sub>2</sub>-haltigen Abgasen zunächst abgereichert werden muss [2]. Abgase, beispielsweise aus der Zementindustrie, enthalten neben CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> auch O<sub>2</sub> (Tab. 1) und können von carboxydotrophen Knallgasbakterien als Kohlenstoff- und Energiequelle zur Biomassebildung genutzt werden. Die aerobe Oxidation von CO liefert eine höhere freie Energie ( $\Delta G^0 = -514$  kJ) und damit eine höhere ATP-Ausbeute im Vergleich zum anaeroben Weg ( $\Delta G^0 = -174$  kJ). Daher sind diese Bakterien interessante Biokatalysatoren für Gasfermentationsverfahren, um O<sub>2</sub>-haltige C1-Abgase direkt in komplexere Produkte der industriellen Biotechnologie umzuwandeln (Abb. 1, [3]).

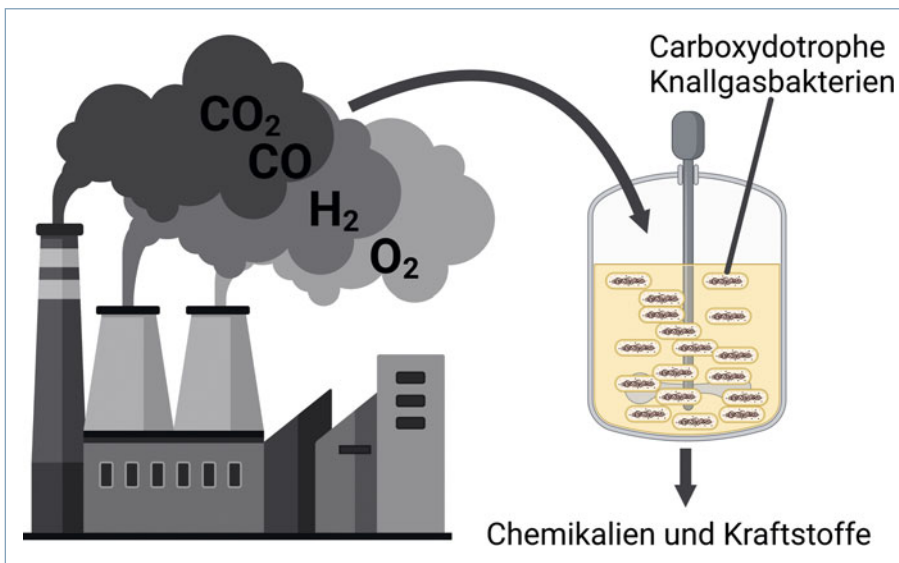
### Physiologie carboxydotropher Knallgasbakterien

Die meisten carboxydotrophen Knallgasbakterien sind Gram-negative Proteobakterien (sowohl  $\alpha$  als auch  $\beta$ ), nicht pathogen, mesophil, neutralophil und obligat aerob. Diese fakultativ autotrophen Bakterien tolerieren bis zu 90 Volumenprozent CO und besitzen eine O<sub>2</sub>-insensitive CO-Dehydrogenase, die aus drei strukturellen Untereinheiten besteht und Eisen-, Molybdän- und Kupfer-abhängig ist [3, 4]. Die Fähigkeit, CO zu oxidieren, unterscheidet diese Gruppe von Mikroorganismen von Knallgasbakterien wie *Cupriavidus necator*. Die Hydrogenasen zur Oxidation von molekularem H<sub>2</sub> enthalten Nickel

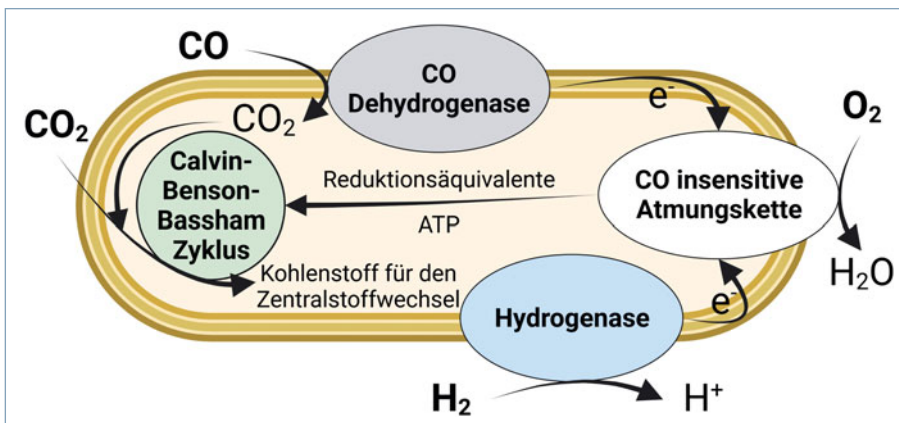
**Tabelle 1:** Mikrobielle Nutzung von Synthesegas. (A) Beispiele für O<sub>2</sub>-haltige industrielle Abgase und (B) relevante Wachstumsparameter von *Afipia carboxidovorans* OM5 und *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1084 [3].

(A) Quelle	O <sub>2</sub> (mol%)	H <sub>2</sub> O (mol%)	CO <sub>2</sub> (mol%)	N <sub>2</sub> (mol%)	CO (ppm)		
Zementwerk	7,5	18,2	17,8	56,5	1200		
Kohle- und Gas-betriebene Kraftwerke	4,4 – 4,5	6,2 – 14,6	7,4 – 12,8	68 – 77	50 – 300		
(B) Organismus	Wachstumsrate (h <sup>-1</sup> )	Verdopplungszeit (h)	q <sub>(CO)</sub>	q <sub>(CO<sub>2</sub>)</sub>	q <sub>(H<sub>2</sub>)</sub>	q <sub>(O<sub>2</sub>)</sub>	Gaszusammensetzung
<i>A. carboxidovorans</i> OM5	0,01	49,5	13,9	-23,0	2,2	4,0	40% CO, 10% CO <sub>2</sub> , 40% H <sub>2</sub> , 8% N <sub>2</sub> , 2% O <sub>2</sub>
<i>H. pseudoflava</i> DSM 1084	0,06	11,6	73,9	-56,2	14,2	31,4	40% CO, 10% CO <sub>2</sub> , 40% H <sub>2</sub> , 8% Ar, 2% O <sub>2</sub>

q<sub>(s)</sub> = Substrat-spezifische Aufnahme in mmol g<sub>CDW</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>



▲ **Abb. 1:** Aerobe Gasfermentation zur Produktion von Chemikalien und Kraftstoffen aus industriellem Abgas mit carboxydrotrophen Knallgasbakterien. Erstellt mit Biorender.com.



▲ **Abb. 2:** Die charakteristischen Elemente des aeroben, autotrophen Metabolismus der carboxydrotrophen Knallgasbakterien: CO wird durch CO-Dehydrogenasen zu CO<sub>2</sub> oxidiert, welches mittels Calvin-Benson-Bassham(CBB)-Zyklus fixiert wird. Elektronen aus der CO- und H<sub>2</sub>-Oxidation fließen in die CO-tolerante Atmungskette zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten und ATP. Erstellt mit Biorender.com.

und Eisen und können sowohl membrangebunden als auch im Cytosol gelöst vorkommen, wobei manche Spezies nur eine Form der Hydrogenasen zu haben scheinen. Elektronen aus der CO- und H<sub>2</sub>-Oxidation fließen in die CO-insensitive Atmungskette zur Bildung von ATP und Reduktionsäquivalenten, welche u. a. für die CO<sub>2</sub>-Fixierung im Calvin-Benson-Bassham(CBB)-Zyklus benötigt werden (**Abb. 2**). In dem wohl am besten beschriebenen Mitglied der carboxydrotrophen Knallgasbakterien, *Afiopia carboxidovorans*, ist die Atmungskette verzweigt. Während Elektronen aus der H<sub>2</sub>- und CO-Oxidation auf Cytochrome mit höherer Affinität zu O<sub>2</sub> als zu CO übertragen werden, fließen

Elektronen aus dem heterotrophen Stoffwechsel auf CO-sensitive Cytochrome. Diese Anpassung liefert letztendlich weniger Energie, ermöglicht aber das Wachstum bei sehr hohen CO-Konzentrationen [3–5]. *A. carboxidovorans* wächst in Minimalmedium mit Verdopplungszeiten von 6–10 h unter heterotrophen und 7–50 h unter autotrophen Bedingungen (**Tab. 1**) und kann heterotroph hauptsächlich organische Säuren, aber keine Zucker verstoffwechseln. Ein schneller wachsender Vertreter dieser Gruppe ist das β-Proteobakterium *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1084, das unter autotrophen Bedingungen Verdopplungszeiten von 7–12,3 h zeigt (**Tab. 1**). Dieses gelb pigmentierte

Bakterium wächst auf verschiedenen organischen Säuren und Zuckern und weist dabei Verdopplungszeiten von bis zu 1,6 h auf. Darüber hinaus kann *H. pseudoflava* CO als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (Verdopplungszeit von 12,3 h), toleriert bis zu 90 Volumenprozent CO ohne Beeinträchtigung des Wachstums oder der Atmung und zeigt hohe biomassespezifische CO- und H<sub>2</sub>-Verbrauchsraten von 73,9 und 14,2 mmol gCDW<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (**Tab. 1**, [3, 6]). Weitere Organismen, die der Gruppe der carboxydrotrophen Knallgasbakterien zuzuordnen sind, sind z. B. *Pseudomonas carboxydohydrogena*, *Zavarzinia compransoris* oder *Methyloversatilis universalis*, welche allerdings bisher nur wenig untersucht worden sind [3, 4].

### Erste gentechnische Werkzeuge stehen zur Verfügung

Nur für *A. carboxidovorans* und *H. pseudoflava* liegen bislang geschlossene und annotierte Genomsequenzen vor [6, 7]. Während bei *A. carboxidovorans* die Gene für den autotrophen Stoffwechsel auf dem Megaplasmid pHCG3 lokalisiert sind, liegen die entsprechenden Gene im Chromosom von *H. pseudoflava* [6, 7]. Transformationsprotokolle wurden etabliert, die es erlauben, sowohl das Expressionsplasmid pBBR1MCS als auch den Vector pK19mobsacB, welcher für markerlose, chromosomale Modifikationen über homologe Rekombination genutzt werden kann, in beide Organismen einzubringen. Es wurden native Promotoren – wie auch der induzierbare P<sub>tac</sub>-Promoter – getestet, um *mCherry* und *gfp* in *A. carboxidovorans* und *H. pseudoflava* unter heterotrophen und autotrophen Bedingungen funktional zu exprimieren [6, 8]. Diese ersten genetischen Werkzeuge wurden genutzt, um heterolog das Gen *agBIS* aus *Abies grandis*, welches für die (E)-α-Bisabolensynthese codiert, in *H. pseudoflava* zu exprimieren. *H. pseudoflava* (pOCEx1:*agBIS*) produzierte unter aeroben Bedingungen das C15-Sesquiterpen (E)-α-Bisabolen aus Syngas. Damit konnte erstmalig ein carboxydrotrophes Knallgasbakterium für die autotrophe Produktion eines komplexen Moleküls genutzt werden [6].

### Fazit und Ausblick

Die Fähigkeit carboxydrotroper Knallgasbakterien, CO-, CO<sub>2</sub>-, H<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-haltige industrielle Abgase zu nutzen, macht diese Organismen zu interessanten Kandidaten, um das Portfolio der industriellen Biotechnologie für

nachhaltige Produktionsprozesse zu erweitern. Obwohl in den 1970er-Jahren mehrere Vertreter isoliert und charakterisiert wurden, ist der Stoffwechsel und seine Regulation unter heterotrophen, aber insbesondere unter autotrophen Bedingungen nicht gut verstanden. Kürzlich konnten erstmalig genetische Werkzeuge etabliert und auf zwei Vertreter dieser Gruppe erfolgreich angewandt werden [6, 8]. Allerdings muss die gentechnische Werkzeugkiste verbessert werden, um eine effiziente Stammkonstruktion realisieren zu können. Eine weitere Herausforderung ist das Scale-up vom Labor- in den Industriemaßstab. Aufgrund der geringen Löslichkeit von  $H_2$  und  $CO$  ist der Massentransfer bei Gasfermentationen generell ein Problem, um die Bakterien ausreichend mit Substrat zu versorgen [9]. Neben der Toxizität von  $CO$  führt die aerobe Gasfermentation mit  $H_2$  und/oder  $CO$  zur Explosionsgefahr, die Produktionsanlagen mit Explosionsschutz erfordert. Eine vielversprechende Lösung zur Überwindung solcher Einschränkungen könnte der Einsatz von aeroben carboxydrotrophen Knallgasbakterien in bioelektrochemischen Systemen sein, die prinzipiell die gasförmigen Verbindungen *in situ* und nach Bedarf bereitstellen können.

ungen *in situ* und nach Bedarf bereitstellen können.

### Danksagung

Einen herzlichen Dank an alle Mitarbeiter/innen, die an den Arbeiten beteiligt waren. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, BL1408/3-1) gefördert.

### Literatur

- [1] Blombach B, Grünberger A, Centler F et al. (2022) Exploiting unconventional prokaryotic hosts for industrial biotechnology. *Trends Biotechnol* 40: 385–397
- [2] Molitor B, Richter H, Martin ME et al. (2016) Carbon recovery by fermentation of  $CO$ -rich off gases - Turning steel mills into biorefineries. *Bioresour Technol* 215: 386–396
- [3] Siebert D, Eikmanns BJ, Blombach B (2022) Exploiting aerobic carboxydrotrophic bacteria for industrial biotechnology. In: Zeng AP, Claassens NJ (Hrsg.) *One-carbon feedstocks for sustainable bioproduction*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 180: 1–32
- [4] Meyer O, Schlegel H G (1983) Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol* 37: 277–310
- [5] Meyer O, Jacobitz S, Krüger B (1986) Biochemistry and physiology of aerobic carbon monoxide-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 39: 161–179
- [6] Grenz S, Baumann PT, Rückert C et al. (2019) Exploiting *Hydrogenophaga pseudoflava* for aerobic syngas-based production of chemicals. *Metab Eng* 55: 220–230
- [7] Volland S, Rachinger M, Strittmatter A et al. (2011) Complete genome sequences of the chemolithoautotrophic

*Oligotropha carboxidovorans* strains OM4 and OM5. *J Bacteriol* 193: 5043

[8] Siebert D, Busche T, Metz AY et al. (2020) Genetic engineering of *Oligotropha carboxidovorans* strain OM5 – a promising candidate for the aerobic utilization of synthesis gas. *ACS Synth Biol* 9: 1426–1440

[9] Takors R, Kopf M, Mampel J et al. (2018) Using gas mixtures of  $CO$ ,  $CO_2$  and  $H_2$  as microbial substrates: the do's and don'ts of successful technology transfer from laboratory to production scale. *Microb Biotechnol* 11: 606–625

**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>.



Daniel Siebert (links) und Bastian Blombach

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Bastian Blombach  
 Professur für Mikrobielle Biotechnologie  
 Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit  
 Technische Universität München  
 Uferstraße 53  
 D-94315 Straubing  
 bastian.blombach@tum.de  
 www.mib.cs.tum.de