

Bioelektrochemie

Elektrofermentation von Acetoin

SEBASTIAN BEBLAWY, THEA BURSAC, JOHANNES GESCHER
INSTITUT FÜR ANGEWANDTE BIOWISSENSCHAFTEN, KARLSRUHER INSTITUT
FÜR TECHNOLOGIE (KIT), KARLSRUHE

Electrode-assisted fermentation is a new strategy in anaerobic biotechnology. It can be used for reactions in which the average oxidation state of the end product is higher than the substrate. Here we show two applications of an electrode-assisted fermentation for the anoxic production of acetoin. The presented approaches in *Shewanella oneidensis* and *Escherichia coli* utilize engineered metabolisms to achieve high product yields of roughly 80 percent under strictly anoxic conditions.

DOI: 10.1007/s12268-018-0893-x
© Springer-Verlag 2018

■ In Deutschland wurden im Jahr 2016 organische Grundchemikalien in einem Umfang von mindestens 21 Megatonnen produziert [1]. Die Ausgangsstoffe der chemischen Industrie basieren dabei zu rund 87 Prozent auf Erdöl und Erdgas [2]. Die begrenzte Verfügbarkeit dieser fossilen Ressourcen und die mangelnde Nachhaltigkeit ihrer Nutzung erfordert mittelfristig eine Umstellung indus-

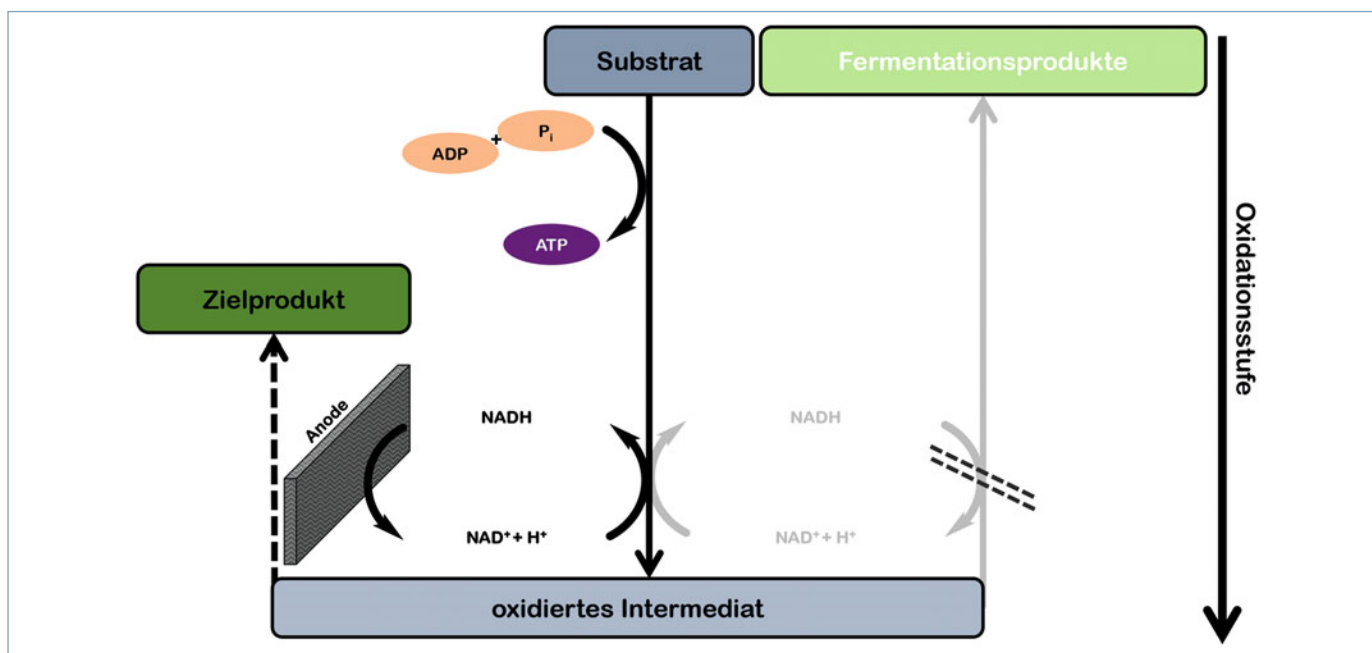
trieller Prozesse hin zu einem biobasierten Wirtschaften. Die biotechnologische Produktion von Basischemikalien eröffnet eine Perspektive, bereits bestehende industrielle Prozesse aus nachhaltigen Rohstoffen zu speisen, ohne die Notwendigkeit eines fundamentalen Umbaus der Infrastruktur. Mikrobielle Fermentationen zur Bereitstellung solcher Chemikalien sind bereits seit

Langem Gegenstand intensiver Forschung [3–5].

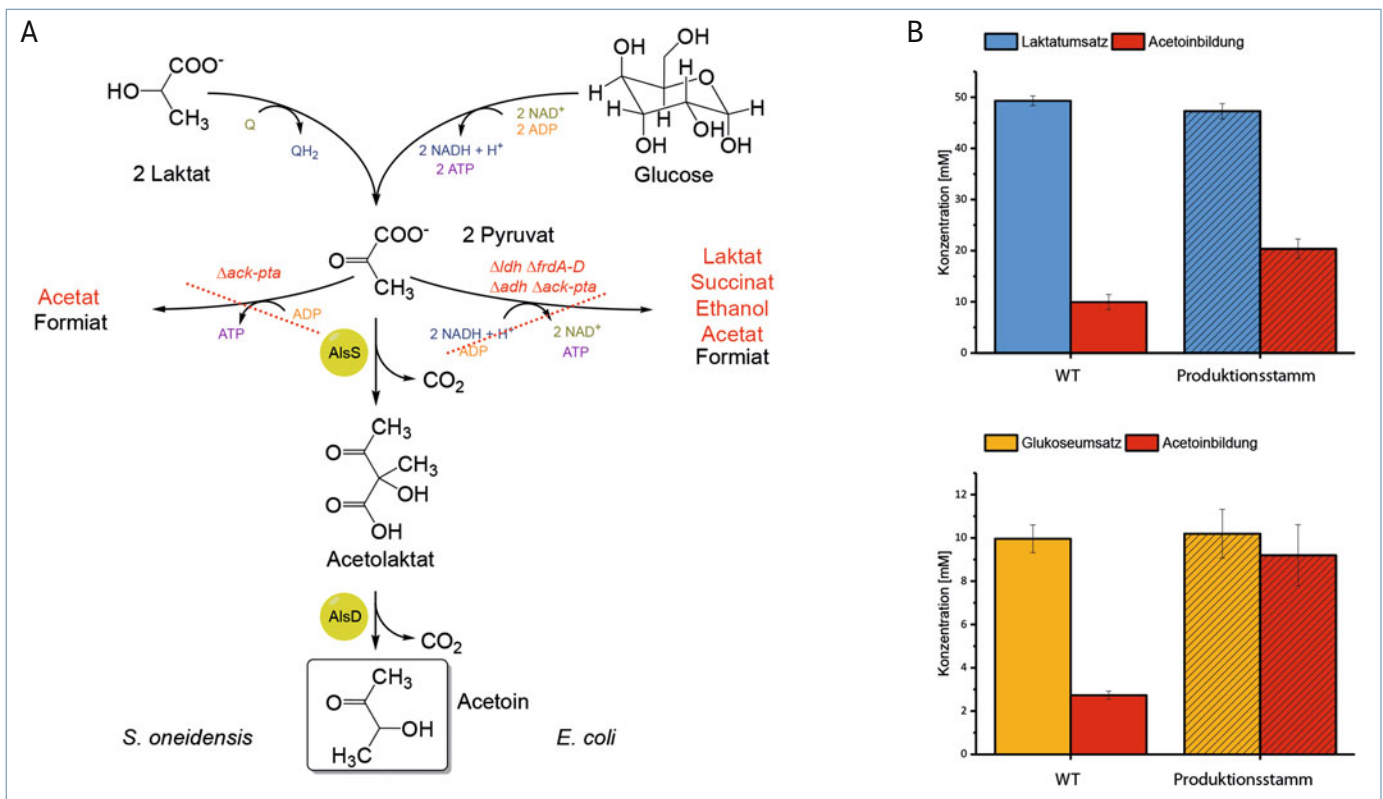
Prinzip der Elektrofermentation

Der hier vorgestellte Ansatz einer elektrodengestützten Fermentation basiert auf der Idee, den metabolischen Überschuss respiratorischer Elektronen durch die Interaktion von Bakterien mit einer Elektrode auszugleichen. Hierdurch können Prozesse realisiert werden, welche bisher auf die stöchiometrische Zugabe von Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff angewiesen waren. Das Prinzip der Elektrofermentation ist in **Abbildung 1** gezeigt. Der biotechnologische Vorteil dieser Elektrofermentation ist, dass die geringere Energieausbeute für die Organismen mit einer geringeren Biomasseproduktion verbunden ist und zudem elektrische Energie als Nebenprodukt anfällt.

Die Fermentation von Acetoin aus gängigen Substraten wie Glukose ohne externen Elektronenakzeptor ist nicht möglich, da dies mit einer Nettofreisetzung an Elektronen verbunden wäre. Als Basischemikalie könnte Acetoin jedoch als Ausgangsstoff für die Syn-



▲ **Abb. 1:** Eine Elektrofermentation integriert zwei Elemente. Zum einen wird der Stoffwechsel eines Produktionsorganismus so modifiziert, dass nur eine Substanz produziert wird. Typischerweise geschieht dies durch Inhibition von konkurrierenden Stoffwechselwegen. Als Folge davon können Redoxäquivalente, wie z. B. NAD⁺, nicht mehr regeneriert werden. Das zweite Element ist der bioelektrochemische Fermenter, welcher eine Elektrode als unerschöpflichen Elektronenakzeptor bereitstellt.



▲ **Abb. 2:** Modifizierter Stoffwechsel der Produktionsstämme. **A,** Genetische Deletionen, sowohl in *Shewanella oneidensis* als auch in *Escherichia coli* steuern den anaeroben Katabolismus in Richtung Pyruvat. Die heterologe Expression von *alsS* und *alsD* aus *Bacillus subtilis* erlaubt die Synthese von Acetoin aus Pyruvat in zwei Schritten. **B, C,** Substratumsatz und Produktbildung im Vergleich zwischen Wildtyp (WT) und Produktionsstamm in *Shewanella oneidensis* (**B**) und in *Escherichia coli* (**C**).

these von anderen einfachen C4-Verbindungen dienen, welche circa 12 Prozent der oben genannten Basischemikalien abdecken [1, 6].

Wir haben kürzlich zwei Ansätze vorgestellt, wie Acetoin unter strikt anoxischen Bedingungen in einer Elektroden-unterstützten Fermentation hergestellt werden kann: ein Redoxmediator-freies System mit *Shewanella oneidensis* als Produktionsorganismus und eines basierend auf *Escherichia coli* mit Methyleneblau als Mediator [7, 8].

Modifikation des Katabolismus

In beiden Projekten wurde der anaerobe Stoffwechsel so verändert, dass native Produkte des Stoffwechsels nicht gebildet werden können (**Abb. 2A**). Hierzu wurde in *S. oneidensis* die Bildung von Acetat als wichtigstes Produkt des Stoffwechsels durch Deletion der Gene für die Acetatkinase (*ackA*) und die Phosphotransacetylase (*pta*) unterbunden. In *E. coli* wurden Gene in vier Loci deletiert, welche für Enzyme der gemischten Säuregärung codieren. Durch den Knock-out der Laktatdehydrogenase (*ldhA*), Fumaratdehydrogenase (*frdA-D*), Alkoholdehydrogenase (*adhE*), Acetatkinase (*ackA*) und Phosphotransacetylase (*pta*) wurde auch hier die Bildung von Neben-

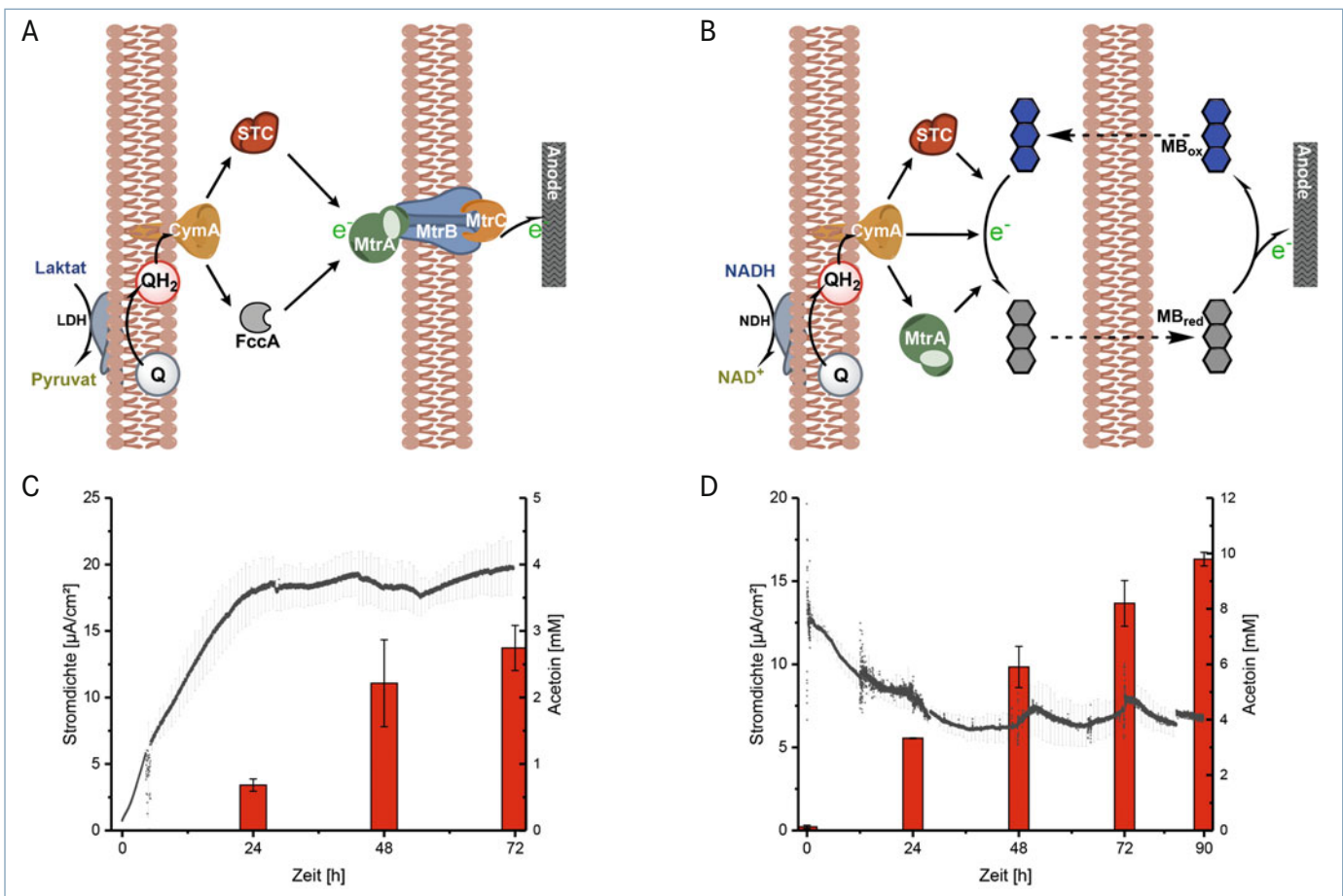
produkten unterbunden. Als zentrales Intermediat reichert sich so in beiden Organismen Pyruvat an. Die Fermentation in *S. oneidensis* geht von Laktat aus, das durch eine membrangebundene Laktatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert wird. Dabei wird Menaquinon reduziert. Im Falle von *E. coli* wird Glukose über die Glykolyse zu Pyruvat oxidiert, wobei pro Mol Glukose zwei Mol NADH gebildet werden. Die heterologe Expression von *alsS* (Acetolaktatsynthase) und *alsD* (Alpha-Acetolaktatdecarboxylase) aus *Bacillus subtilis* erlaubt die Bildung von Acetoin durch eine oxidative Kondensation von zwei Molekülen Pyruvat zu Acetolaktat und eine anschließende Decarboxylierung. Demnach fällt bei der Bildung von einem Mol Acetoin aus zwei Mol Pyruvat in beiden Organismen jeweils ein Überschuss von vier Elektronen an. *S. oneidensis* ist nativ bereits auf einen externen Elektronenakzeptor angewiesen, um den Überschuss im Redoxhaushalt auszugleichen. In *E. coli* wurde diese Eigenschaft mit dem Knock-out der gemischten Säuregärung künstlich erzeugt.

In beiden Organismen wurde durch die Modifikationen im Zentralstoffwechsel eine gesteigerte Produktausbeute für Acetoin

erreicht. Mit Fumarat als Elektronenakzeptor bildet der *Shewanella*-Stamm Acetoin mit einer Ausbeute von 86 statt 40 Prozent im Vorgängerstamm (**Abb. 2B**). In *E. coli* wurde die Ausbeute mit Nitrat als Elektronenakzeptor von 25 auf 90 Prozent des theoretischen Maximums gesteigert (**Abb. 2C**).

Verknüpfung von Stoffwechsel und Anode

S. oneidensis MR-1 ist nativ zur extrazellulären Atmung in der Lage. Hierbei werden respiratorische Elektronen aus dem Menachinonpool in der Zytoplasmamembran auf das membrangebundene *c*-Typ-Cytochrom CymA übertragen. Dieses reduziert ein Netzwerk von periplasmatischen *c*-Typ-Cytochromen, welche unter anderem Elektronen auf den MtrABC-Komplex in der äußeren Membran übertragen. Von dort aus können unlösliche Substanzen, wie z. B. Fe(III)- oder Mn(IV)-Mineralien, als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden. Auf gleichem Weg erfolgt der Elektronentransport in einem bioelektrochemischen System mit einer Anode als terminalem Elektronenakzeptor (**Abb. 3A**). In *E. coli* wurden Teile dieses Systems heterolog exprimiert (CymA, STC und MtrA),



▲ **Abb. 3:** Schema des Elektronentransports in den Produktionsstämmen von *Shewanella oneidensis* (A) und *Escherichia coli* (B) vom Zytoplasma bis zur Anode. In *S. oneidensis* werden respiratorische Elektronen über ein Netzwerk von periplasmatischen *c*-Typ-Cytochromen transportiert. Hauptakteure sind das Tetrahäm-Flavocytochrom FccA sowie die kleinen Tetrahäm-Cytochromen STC. In *E. coli* führt die heterologe Expression der Cytochrome CymA, MtrA und STC zu einem Elektronentransport bis in das Periplasma. Der Kontakt zur Elektrodenoberfläche wird mithilfe des Mediators Methylblau (MB) hergestellt. C, D, Ergebnisse der Elektrofermentation in *S. oneidensis* (C) und *E. coli* (D).

welche einen Elektronentransport bis in das Periplasma ermöglichen. Durch Zugabe von Methylblau, welches membranpermeabel ist und von den exprimierten Cytochromen reduziert werden kann, kann auch in *E. coli* ein elektrischer Kontakt zur Anodenoberfläche hergestellt werden (Abb. 3B). Die Expression der Cytochrome aus *S. oneidensis* steigerte die Reduktionsrate um 78 Prozent [9].

Die bioelektrochemische Fermentation von Acetoin mit *Shewanella* erfolgte mit einer Ausbeute von 78 Prozent und ist damit ähnlich hoch wie unter Fumarat-atmenden Bedingungen. Während des Experimentes wurde ein Durchschnittsstrom von $19,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen, was 53,6 Prozent der metabolisch freigesetzten Elektronen entspricht (Abb. 3C). Für den *E. coli*-Produktionsstamm wurde ein bioelektrochemischer Reaktor mit 15-mal größerem Verhältnis von Elektrodenoberfläche zu Volumen entwickelt, um den Anforderun-

gen der mediatorbasierten Fermentation gerecht zu werden. Die Ausbeute in diesem Experiment lag bei 79 Prozent. Auch in diesem Fall konnte die hohe Effizienz, wie sie unter Nitrat-atmenden Bedingungen beobachtet wurde, reproduziert werden. Die in diesem Experiment aufgezeichnete mittlere Stromdichte lag bei $6,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, was einer Coulomb-Effizienz von 93,4 Prozent entsprach (Abb. 3D).

Evaluation und Ausblick

Ziel dieser Arbeiten war es, konkrete Anwendungen für die Elektrofermentation mit zwei bereits gut charakterisierten Organismen zu zeigen. Dabei bieten beide Systeme unterschiedliche Vorteile. Beiden gemeinsam ist zunächst die hohe Effizienz der Substratkonversion (vergleichbar mit konventionellen Fermentationen [7, 8]).

Im weiteren Verlauf des Projektes wird ein Ziel die Etablierung nachhaltigerer Substra-

te, wie z. B. Glycerin oder Holzhydrolysate, sein. In diesem Bereich vermag das *E. coli*-System dank seines breiteren Substratspektrums seine Stärken auszuspielen. Die Vorteile des *Shewanella*-Systems liegen hingegen auf Seiten des nativ vorhandenen extrazellulären Elektronentransports. Hierdurch kann die zusätzliche metabolische Belastung durch die heterologe Expression eines solchen Systems wie in *E. coli* vermieden werden.

Betrachtet man die Produktivität beider Systeme, so werden relative geringe Raten von maximal zehn Milligramm pro Liter und Stunde erreicht. Konventionelle oxische Fermentationsansätze liegen im Bereich um ein Gramm pro Liter und Stunde [10]. Ziel laufender Arbeiten ist es, diese beträchtliche Lücke zu schließen. Im Fokus stehen hierbei beide Elemente des Elektrofermentationsansatzes, der Produktionsorganismus und die Reaktortechnik.

In beiden vorgestellten Stämmen werden hierzu systembiologische Untersuchungen angestellt, um Engpässe im Metabolismus zu identifizieren. Im Falle des *Shewanella*-Systems ist es von Interesse, die Interaktion mit der Elektrode genauer zu untersuchen. Es sollen genetische Ziele identifiziert werden, welche die Biofilmbildung auf der Anode unterstützen, um den Elektronentransport und die Langzeitstabilität des Systems zu verbessern. In *E. coli* wird auf Basis von Transkriptomdaten versucht, die metabolische Belastung auf den stark beeinträchtigten anaeroben Stoffwechsel zu minimieren.

Die Verbesserung der Reaktortechnik zielt im Falle des *E. coli*-Systems auf eine Minimierung der Mediatordiffusion. Kinetische Daten zeigen eine maximale biologische Methylenblaureduktionsrate, welche 46-mal höher ist, als sie in der Fermentation erreicht wurde. Ein Ansatz ist daher, Elektrolytkonvektion innerhalb der Elektrode zu erzeugen.

In dieser frühen Stufe des Projektes konnte nicht nur die prinzipielle Funktionalität der Systeme gezeigt werden, sondern es ließen sich auch konkrete Arbeitspakete ableiten, welche die Weichen hin zu einer tatsächlichen Anwendung stellen.

Danksagungen

Wir danken dem BMBF (Kennziffer 03SF0496B) für die finanzielle Unterstützung. ■

Literatur

- [1] Statistisches Bundesamt (2017) Fachserie 4, Produzierendes Gewerbe. Reihe 3.1 - 2016, Produktion im produzierenden Gewerbe. Produktion im produzierenden Gewerbe, www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Industrie/VerarbeitendesGewerbe/Konjunkturdaten/IndexProduktion2040210172114.pdf?__blob=publicationFile
- [2] Prognos AG (2017) Die deutsche chemische Industrie 2030 - Update 2015/2016. Verband der chemischen Industrie e. V. (VCI), Frankfurt
- [3] van Haveren J, Scott EL, Sanders J (2008) Bulk chemicals from biomass. *Biofuels Bioprod Biorefin* 2:41-57

[4] Shin JH, Kim HU, Kim DI et al. (2013) Production of bulk chemicals via novel metabolic pathways in microorganisms. *Biotechnol Adv* 31:925-935

[5] Weusthuis RA, Lamot I, van der Oost J et al. (2011) Microbial production of bulk chemicals: development of anaerobic processes. *Trends Biotechnol* 29:153-158

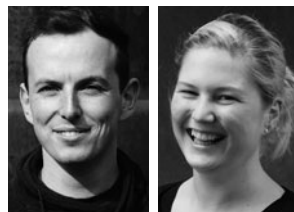
[6] Werpy TA, Holladay JE, White JF (2004) Top Value Added Chemicals from Biomass: I. Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Richland, WA, USA

[7] Bursac T, Gralnick JA, Gescher J (2017) Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnol Bioeng* 114:1283-1289

[8] Förster AH, Beblawy S, Golitsch F et al. (2017) Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Biofuels* 10:65

[9] Sturm-Richter K, Golitsch F, Sturm G et al. (2015) Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresour Technol* 186:89-96

[10] Yang T, Rao Z, Zhang X et al. (2017) Metabolic engineering strategies for acetoin and 2,3-butanediol production: advances and prospects. *Crit Rev Biotechnol* 37:990-1005



Sebastian Beblawy, Thea Bursac und Johannes Gescher (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Johannes Gescher
 Institut für Angewandte Biowissenschaften
 Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
 Fritz-Haber-Weg 2
 D-76131 Karlsruhe
 Tel.: 0721-608-41940
 Fax: 0721-608-41941
johannes.gescher@kit.edu