

## Flexible Bioproduktion

# Knallgasbakterien – neue Synthesewege mit *Cupriavidus necator*

SOFIA MILKER, CINDY KUNZE, ANNE SYDOW, CORA KRONER, DIRK HOLTSMANN  
 DECHEMA-FORSCHUNGSINSTITUT, INDUSTRIELLE BIOTECHNOLOGIE, FRANKFURT A. M.

Climate change and the finite nature of fossil fuels raise the need for the fixation of CO<sub>2</sub> and conversion into traditionally petroleum-derived chemicals. With *Cupriavidus necator* as an easily genetically modifiable biocatalyst, a wide range of products, e. g. polymers, platform chemicals, biofuels, and terpenes, can be accessed. The wide range of applications as well as a prominent example of electrochemical α-humulene production from CO<sub>2</sub> are promising developments towards a bio-based society.

DOI: 10.1007/s12268-018-0920-y  
 © Springer-Verlag 2018

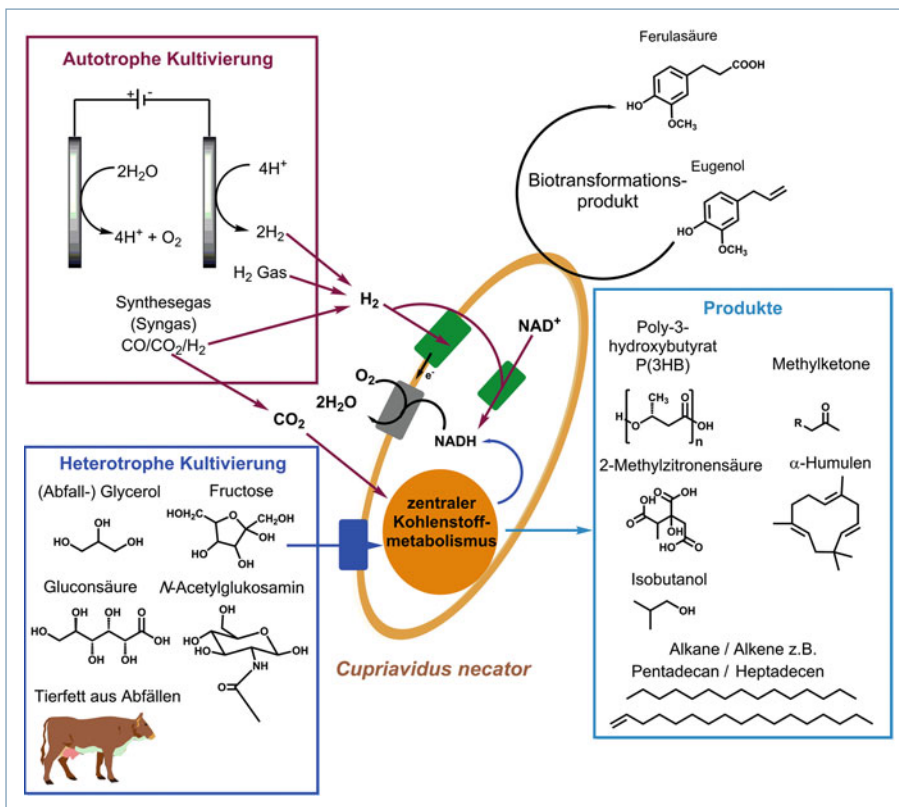
■ Vor dem Hintergrund des Klimawandels stellt sich vermehrt die Frage nach der möglichen stofflichen Nutzung von CO<sub>2</sub>-Emissionen. Da gleichzeitig fossile Brennstoffe end-

lich sind, wird zudem nach einer Möglichkeit gesucht, erdölbasierte Produktionsprozesse mit Prozessen aus nachwachsenden Rohstoffen zu ersetzen.

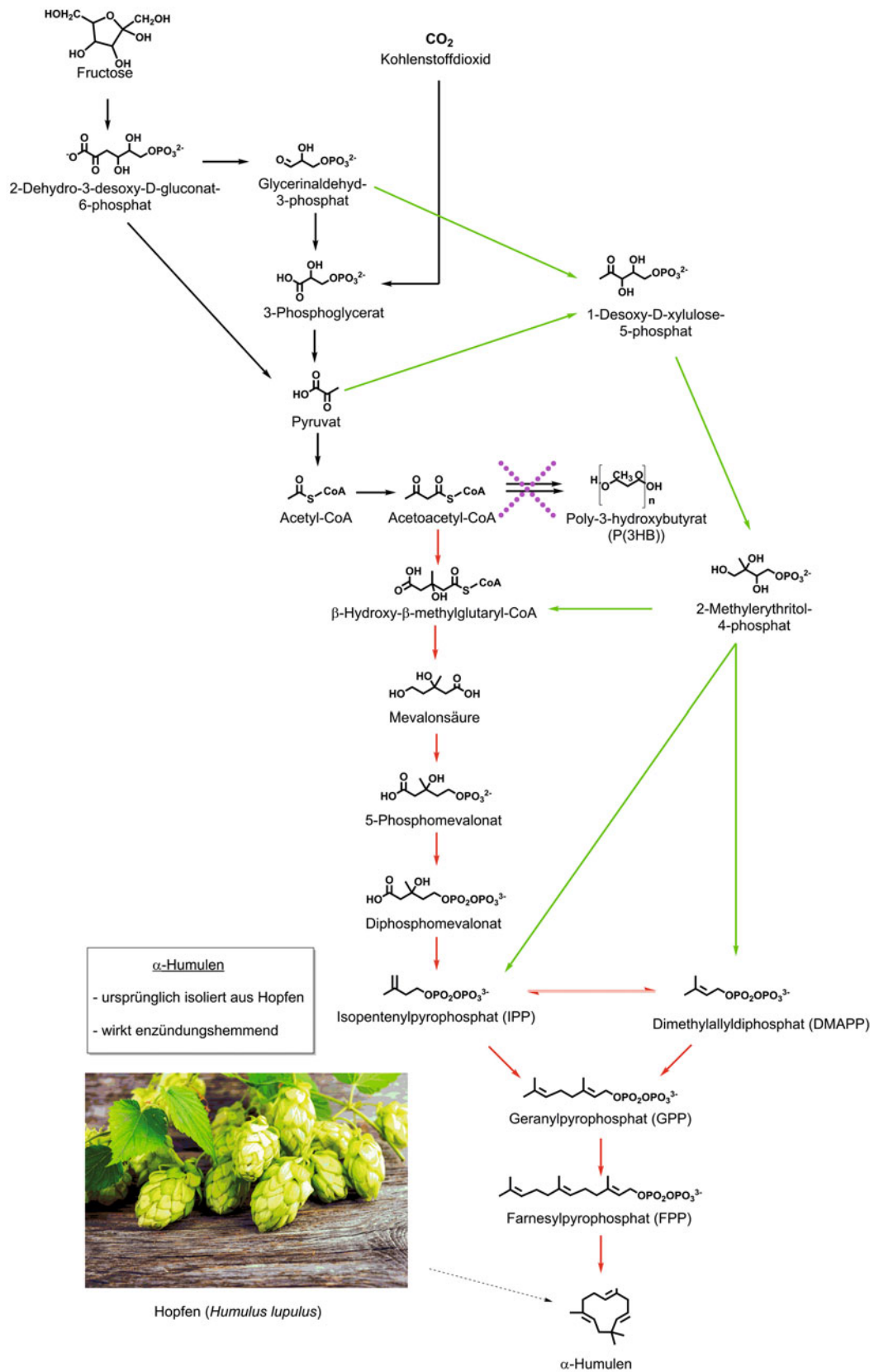
### Universelle Substratverwertung mit *Cupriavidus necator*

Das Gram-negative Bakterium *Cupriavidus necator* (früher: *Ralstonia eutropha*) könnte die Antwort auf beide Problemstellungen sein. Dieses „Knallgasbakterium“ ist in der Lage, viele verschiedene Kohlenstoffquellen zu verwerten. Neben klassischen Kohlenstoffquellen, wie Zuckern (Fructose, N-Acetylglucosamin), organische Säuren (Gluconsäure) und Fettbestandteilen (Glycerol), verstoffwechselt dieser Mikroorganismus auch anorganische Kohlenstoffquellen wie Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) über den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus. Für diese Art des Wachstums benötigt *C. necator* neben CO<sub>2</sub> auch Sauerstoff (O<sub>2</sub>) als terminalen Elektronenakzeptor und Wasserstoff (H<sub>2</sub>) als Energiequelle (Abb. 1). Für eine mögliche Anwendung von *C. necator* ist dabei besonders interessant, dass sich der benötigte Wasserstoff und Sauerstoff mithilfe von Strom an Elektroden durch Wasserelektrolyse erzeugen lassen. Der Strom kann dabei unter anderem aus der Überschussproduktion von erneuerbaren Energien wie Wind und Solarenergie stammen. Der Wasserstoff wirkt dann als Elektronendonator für *C. necator* und wird kontinuierlich an der Elektrode erzeugt. Diese Vorgehensweise, die als indirekter Elektronentransfer bezeichnet wird, ist eine der drei Arten des extrazellulären Elektronentransfers [1].

Neben reinen Gasen und Gasmischungen aus CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> wird zunehmend auch die Nutzung von Synthesegas angestrebt, da dieses effizient sowohl aus nachwachsenden als auch aus fossilen Brennstoffen gewonnen werden kann. Synthesegas enthält große Mengen an Kohlenstoffmonoxid (CO), das von *C. necator* nicht natürlicherweise verstoffwechselt werden kann. Andere Bakterien, wie *Oligotropha carboxidovorans*, sind in der Lage, CO als Kohlenstoffquelle zu verwenden. In einer 2017 erschienenen Studie wurde



▲ **Abb. 1:** Kultivierung von *Cupriavidus necator* auf autotrophen und heterotropen Substraten führt zu einer Vielzahl an möglichen Produkten. Bei der autotrophen Kultivierung dienen Gasmischungen aus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>, Synthesegas oder CO<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub>-Erzeugung an Elektroden als Substrate. Mögliche heterotrophe Substrate sind Zucker, organische Säuren und Fette. Die Produktpalette reicht von Polymeren wie Poly-3-hydroxybutyrat (P(3HB)) zu Terpenen wie α-Humulen.



▲ **Abb. 2:** α-Humulonproduktion aus Fructose oder CO<sub>2</sub> mittels eines rekombinanten Mevalonatstoffwechselweges (MVA, rot) und eines nativen Methylerythritol-4-phosphat-Stoffwechselweges (MEP, grün) in *Cupriavidus necator*. CO<sub>2</sub> wird über den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus assimiliert, und die Fructose wird über den Entner-Doudoroff-Stoffwechselweg abgebaut. Der Polyhydroxybutyrat(PHB)-negative Stamm sorgt für eine Umleitung des Flusses zu α-Humulon [10].

*C. necator* genetisch modifiziert, indem die zum Abbau von CO benötigten Gene aus dem *cox*-Gencluster von *O. carboxidovorans* OM5 in *C. necator* eingebracht wurden. Mittels <sup>13</sup>C-markiertem CO wurde gezeigt, dass der neue *C. necator*-Stamm in der Lage war, CO als Kohlenstoffquelle aus Synthesegasgemischen zu verwenden [2]. Durch diese Arbeiten konnte das Substratspektrum erheblich erweitert werden (Abb. 1).

### Vielseitige Stoffwechselprodukte

Neben dieser hohen Flexibilität auf der Substratseite können auch vielfältige Stoffwechselprodukte mit *C. necator* erzeugt werden. Einige der Synthesen nutzen die natürlichen Stoffwechselwege des Bakteriums, wie die Herstellung von Polyhydroxybuttersäure (P(3HB)), einem Polyhydroxyalkanoat (PHA), das als Biokunststoff Verwendung findet. Dieses Polymer wird als natürlicher Speicherstoff in der *C. necator*-Zelle eingelagert und kann bis zu 70 Prozent der Gesamtzellmasse ausmachen [3]. In den 1970er-Jahren wurden dann Stämme erzeugt, die nicht mehr in der Lage waren, das unverdauliche PHA zu synthetisieren, um somit den Mikroorganismus als potenzielle proteinreiche Nahrungsquelle (*single cell protein*) zu verwenden [4].

Mithilfe von neuen genetischen Werkzeugen, wie z. B. geeigneter Expressionsplasmide, die stabil in den *C. necator*-Stamm eingebracht werden können [5, 6], wurde die heterologe Expression von wirtsfremden Enzymen ermöglicht. Für das Einbringen von Plasmiden in *C. necator* wurde dabei neben der bereits etablierten Transformationsmethode der Konjugation [6] auch die Elektroporation verwendet [7]. Die Konjugationsmethode benötigte unabhinglich die Transformation eines geeigneten Plasmids in konjugationsfähige *Escherichia coli*, um dann das Plasmid in *C. necator* einbringen zu können. Aufgrund der natürlichen Resistenz von *C. necator* gegenüber dem Antibiotikum Gentamicin konnte dann auf die *C. necator*-Zellen in der Mischkultur aus *C. necator* und *E. coli* selektiert werden. Die Elektroporationsmethode ermöglichte hingegen eine direkte Transformation von *C. necator* mit dem gewünschten Plasmid ohne weitere, zeitintensive Zwischenschritte.

Basierend auf der Grundlage der molekularbiologischen Fortschritte konnten einzelne Enzyme in *C. necator* gezielt zu einem heterolog exprimierten Stoffwechselweg zusammengeführt werden. So wurde die Umwandlung von Eugenol zu Ferulasäure

mittels Expression von drei Enzymen aus Pseudomonaden katalysiert. Dabei wurden nach 20 Stunden Reaktionszeit Konzentrationen von 18 mM Ferulasäure mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von bis zu 2,9 mmol pro Liter und Stunde produziert. Für die Produktion industriell wichtiger Stoffe befasste sich die Mehrzahl der bisherigen Arbeiten weiterhin mit der gezielten Manipulation des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *C. necator*. So wurden unter anderem Methylketone, 2-Methylcitronensäure, Alkane/Alkene [8] und verschiedene Alkohole, wie beispielsweise Isopropanol, hergestellt, dessen Produktion mit Endkonzentrationen von 9,8 Gramm pro Liter (bei Berücksichtigung der Isopropanolverdunstung sogar 16 Gramm pro Liter) durch die Deletion des P(3HB)-Syntheseweges und die Überexpression wirtseigener GroESL-Chaperone erreicht wurde [9]. Die Chaperone sorgten dabei für eine erhöhte Isopropanoltoleranz von *C. necator*.

Eine vor Kurzem veröffentlichte Studie zeigte, dass die rekombinante Produktion des Terpens  $\alpha$ -Humulen in *C. necator* nicht nur auf heterotrophen Kohlenstoffquellen möglich ist, sondern auch bei autotrophen Wachstum auf CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> gebildet wird (Abb. 2, [10]). Durch die Kopplung von CO<sub>2</sub>-Begasung mit der elektrochemischen Erzeugung von H<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> aus Wasser konnte die Produktion von  $\alpha$ -Humulen zusätzlich in einem bioelektrochemischen System gezeigt werden. Dieses System ist das erstmalige Beispiel für die heterologe chemolithoautotrophe Produktion von Terpenen aus CO<sub>2</sub> und Strom.

### Ausblick

Die hohe Substrat- wie auch Produktflexibilität in Kombination mit hohen Ausbeuten und Produktivitäten machen *C. necator* zu einem wichtigen Produktionsstamm in der Biotechnologie. Die zukünftige Forschung wird sich verstärkt auf das Scale-up von Gasfermentationen und bioelektrochemischen Prozessen fokussieren. Auch die Nutzung weiterer Substrate (z. B. Reststoffe aus der Lebensmittelverarbeitung) und gezielte Optimierung der Produktbildung werden das Anwendungsspektrum von *C. necator* erweitern.

### Danksagung

Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeiten im Rahmen des Tandemprojektes „Mikrobielle

Elektrosynthesen“ (FKZ: 031A226) und im Rahmen des Projektes „Flexible Bioproduktion mit *Cupriavidus necator* (BioFlex)“ (FKZ: 031B0347A). ■

### Literatur

- [1] Sydow A, Krieg T, Mayer F et al. (2014) Electroactive bacteria-molecular mechanisms and genetic tools. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8481–8495
- [2] Heinrich D, Raberg M, Steinbüchel A (2017) Studies on the aerobic utilization of synthesis gas (syngas) by wild type and recombinant strains of *Ralstonia eutropha* H16. *Microb Biotechnol*, doi: 10.1111/1751-7915.12873
- [3] Ishizaki A, Tanaka K, Taga N (2001) Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO<sub>2</sub>. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:6
- [4] Raberg M, Voigt B, Hecker M et al. (2014) A closer look on the polyhydroxybutyrate- (PHB-) negative phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. *PLoS One* 9:1–11
- [5] Gruber S, Hagen J, Schwab H et al. (2014) Versatile and stable vectors for efficient gene expression in *Ralstonia eutropha* H16. *J Biotechnol* 186:74–82
- [6] Sydow A, Pannek A, Krieg T et al. (2017) Expanding the genetic tool box for *Cupriavidus necator* by a stabilized L-rhamnose inducible plasmid system. *J Biotechnol* 263:1–10
- [7] Tee KL, Grinham J, Othusitse AM et al. (2017) An efficient transformation method for the bioplastic-producing ‘Knallgas’ bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Biotechnol J* 12, doi: 10.1002/biot.201700081
- [8] Raberg M, Volodina E, Lin K et al. (2017) *Ralstonia eutropha* H16 in progress: applications beside PHAs and establishment as production platform by advanced genetic tools. *Crit Rev Biotechnol* 0:1–17
- [9] Marc J, Grousseau E, Lombard E et al. (2017) Over-expression of GroESL in *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic isopropanol production. *Metab Eng* 42:74–84
- [10] Krieg T, Sydow A, Faust S et al. (2018) CO<sub>2</sub> to terpenes: autotrophic and electroautotrophic  $\alpha$ -humulene production with *Cupriavidus necator*. *Angew Chemie Int Ed* 57:1–5



Anne Sydow, Cora Kroner, Cindy Kunze, Sofia Milker und Dirk Holtmann (v. l. n. r.)

### Korrespondenzadresse:

Dr.-Ing. Dirk Holtmann  
DECHEMA-Forschungsinstitut  
Industrielle Biotechnologie  
Theodor-Heuss-Allee 25  
D-60486 Frankfurt a. M.  
Tel.: 069-7564-610  
Fax: 069-7564-388  
holtmann@dechema.de