

Forschungsbericht BWPLUS

E-Kat-Bio
Extremophile Kathodenbiofilme als Power-to-X
Biokatalysatoren

von

Johannes Gescher, Harald Horn

Karlsruher Institut für Technologie
Institut für Angewandte Biowissenschaften

Engler-Bunte-Institut

Förderkennzeichen: BWCO219002

Laufzeit: 01.12.2018 – 30.04.2020

Die Arbeiten des Baden-Württemberg-Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS) werden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert.

September 2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
1. Zielsetzung des Projektes	7
2. Stand der Technik	8
2.1. Eigene Vorarbeiten	9
3. Methoden und Ergebnisse der Forschungsarbeiten	12
3.1. Entwicklung von Expressionsplasmiden und Produktionsstämmen (Arbeitspaket 1)	12
3.2. Biofilmaufwuchsraten bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten und Partialdrücken (Arbeitspaket 2)	14
3.3. Biofilmaufwuchsraten und Produktivitäten bei variierenden Kathodenpotentialen (Arbeitspaket 3)	16
3.4. Downstream Processing zur Acetoin Aufreinigung (Arbeitspaket 4)	18
3.5. Hochskalierung des Prozesses auf 10 L mit Rauchgas als Substrat (Arbeitspaket 5)	20
3.6. Nachhaltigkeitsanalyse (Arbeitspaket 6)	20
4. Änderung im Projektablauf oder der Zielsetzung im Vergleich zum Projektantrag 21	
4.1. Notwendige Änderungen im Projektverlauf	21
4.2. Erreichbarkeit der Meilensteine & Projektziele	21
4.3. Schwierigkeiten bei der Projektdurchführung	21
4.4. Projektbezogene Veröffentlichungen	22
4.5. Verwertungsaktivitäten	22
5. Quellen	23

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des 10 L Bioelektrosynthesereaktors.....	7
Abb. 2: A) Aufnahme einer von 5 Probenentnahmestellen auf der Insel Sao Miguel. B) Verlauf der Stromdichte in einem sterilen (schwarz) und einem inokulierten bioelektrochemischen System. Die Versuche wurde bei 60°C, pH 3 und einem Kathodenpotential von -350 mV durchgeführt. Den Organismen stand nur Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle zur Verfügung. C) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kathodenfaser. Der weiße Balken markiert 1 µm.....	9
Abb. 3: A) und B) ; Wachstum des <i>K. spormannii</i> Biofilms auf der Kathodenoberfläche bei einem Potential von -531 mV nach 2 und 10 Tagen. Die OCT-Aufnahmen zeigen eine Fläche von 2x8 mm. C) 10 Tage inkubierte Kontrollkathode die genauso inokuliert wurde, aber auf der keine Elektronen für den Organismus zur Verfügung standen. D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Zelle des Biofilms. Das Cytoplasma ist grün gefärbt, Polyhydroxybutyrat-Einschlüsse rot. E) Schematische Übersicht des entwickelten Messstands. F) Bioelektrochemische Auswertung der Kathodeninteraktion. Besiedlung mit <i>K. spormannii</i> führt zu einem verstärkten reduktiven Stromfluss, während der nächstverwandte Organismus dazu nicht in der Lage zu sein scheint.	11
Abb. 4: Wachstum von <i>S. acidocaldarius</i> mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.....	12
Abb. 5: Acetoin-Produktion in einem Zellsuspensionsassay mit einem <i>E. coli</i> -Stamm, der das entwickelte Plasmid trägt und <i>alsS</i> und <i>alsD</i> exprimiert.....	13
Abb. 6: Aus den aufgenommenen OCT-Datensets generierte Höhenprofile an den Positionen A , B und C in zeitlicher Reihenfolge von Tag 1 bis Tag 12. Schwarze Stellen entsprechen der Kathodenoberfläche wohingegen helle Pixel Biofilmstrukturen gleich oder höher 10 µm entsprechen.	15
Abb. 7: Vergleich der aufwachsenden Biovolumina bei -350 und -500 mV vs. SHE über der Zeit.....	17

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Membrandaten (Herstellerangaben und intern gemessene Werte)	18
Tab. 2: Zusammensetzung des Mediums (Angaben pro Liter)	18
Tab. 3: Übersicht über die durchgeführten Versuche	19
Tab. 4: Ergebnisse der Filtrationsversuche zum Acetoin-Rückhalt.....	20

Zusammenfassung

Wesentliche Teile der Industrie sind auf die Verbrennung von Kohlenstoffverbindungen angewiesen, die wiederum große Mengen an CO₂-Abfallströmen produzieren. Ein Ansatz zur Reduktion dieser Emissionen sind neue Technologien zur Abscheidung und Speicherung von Kohlenstoff. Hierzu gehört die mikrobielle Elektrosynthese bei der elektrischer Strom als Energie- und Elektronenquelle für mikrobielles Wachstum dient. Ein Biokatalysator, der in der Lage ist CO₂ zu binden, kann dabei potentiell nicht nur CO₂-Emissionen reduzieren, sondern gleichzeitig wertschöpfende Verbindungen produzieren. Im Projekt E-Kat-Bio sollte ein kathodischer Biofilm in einem entsprechenden Reaktor dazu genutzt werden um,

- CO₂ zu fixieren
- Bioplastik (PHB) zu produzieren
- Und daraus Plattformchemikalien herzustellen.

Für diesen Zweck wurden zwei Stämme ausgewählt, die als Biofilm auf der Kathodenfläche aufwachsen und die genannten Reaktionen katalysieren. Das Knallgasbakterium *Kyrpidia spormannii*, welches in der Arbeitsgruppe Gescher aus einem Elektrosynthesereaktor isoliert wurde, stellt den Primärorganismus des Prozesses dar. Dieses Bakterium nutzt Kohlenstoffdioxid und Elektronen als Kohlenstoff- und Energiequelle und ist in der Lage, daraus Bioplastik (Polyhydroxybuttersäure, PHB) und Biomasse zu produzieren.

Als Sekundärorganismus sollte das Archaeon *Sulfolobus spec* die von *Kyrpidia spormannii* produzierten Komponenten verwerten und daraus Plattformchemikalien produzieren. Als exemplarischer Beweis war die Produktion der vielversprechenden Plattformchemikalie Acetoin das primäre Ziel dieser Studie.

Beide Stämme weisen sehr ähnliche Wachstumsansprüche auf, da sie beide thermoazidophil sind. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für einen reibungslos ablaufenden Prozess und daher auch Hauptaugenmerk bei der Auswahl der Stämme. Das Wachstum der Organismen auf der Kathodenoberfläche wurde quantitativ mithilfe der optischen Kohärenztomographie (OCT) überwacht. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben während des Projektes, dass *Kyrpidia spormannii* die von uns gewählte Plattformchemikalie Acetoin abbaut. Des Weiteren haben wir festgestellt, dass der zweite Stamm, *Sulfolobus acidocaldarius*, auch alleine in der Lage ist, mit einer Kathode als Energie- und Elektronenquelle zu wachsen. Da der Organismus nicht über typische Schlüsselgene für den Elektronenimport verfügt, scheint ein bisher unbekannter Weg für den Elektronenimport vorzuliegen. Aus diesen Gründen wurde die geplante Zwei-Stamm-Strategie in eine Ein-Stamm-Strategie umgewandelt, für die der Stamm *Sulfolobus acidocaldarius* genutzt werden sollte.

Wir konnten zeigen, dass *Sulfolobus* unabhängig von der Überströmungsgeschwindigkeit bei einem Gasgemisch aus 5 % Sauerstoff (v/v) und 95 % Kohlenstoffdioxid (v/v) eine gute Biofilmbildung auf der Kathode aufweist. Dabei sollte, trotz höherer Biomasse-Produktion bei negativeren Potentialen, ein Potential von -350mV vs. SHE nicht unterschritten werden, um die übermäßige Entstehung von Sauerstoff und Wasserstoff zu vermeiden (vgl. 3.3).

Des Weiteren konnte eine erfolgreiche Acetoin-Produktion mit dem konstruierten Expressionsplasmid in einem *E. coli* Teststamm nachgewiesen werden. Die erfolgreiche Expression konnte jedoch im Zielstamm *Sulfolobus* nicht erreicht werden. Als Hauptgrund vermuten wir eine unzureichende Promoteraktivität. Mit mittlerweile verfügbaren Transkriptomdaten des Stammes als Grundlage, soll für die weitere Planung jedoch ein starker nativer Promoter identifiziert werden, der als Ersatz auf das Expressionsplasmid kloniert werden kann.

Daneben haben wir Aufarbeitungsstrategien für die Plattformchemikalie Acetoin erarbeitet. Hierfür wurden verschiedene Membranen im Prozess der Membranfiltration getestet und es konnte ein Acetoin-Rückhalt von bis zu 93% erreicht werden.

Eine Hochskalierung des Prozesses von den Fließzellen in einen 10 L Reaktor war angedacht. Dieses Ziel konnte innerhalb der Projektlaufzeit leider nicht umgesetzt werden und wird baldmöglichst nachgeholt. Zuletzt wurde eine Analyse durchgeführt, um den Prozess hinsichtlich seiner Nachhaltigkeit zu untersuchen. Grundsätzlich ist die Nachhaltigkeit hier vergleichbar mit einer Acetoinproduktion basierend auf Glucose als Substrat. Die Nutzung von erneuerbarem Strom und das *Downstream processing* stellen jedoch die Haupteinflussfaktoren für den hier vorgestellten Prozess dar.

1. Zielsetzung des Projektes

Ziel des Forschungsvorhabens war die Produktion von Acetoin aus CO₂, getrieben über den Prozess der mikrobiellen Elektrosynthese. Dafür sollte ein Biofilm auf einer Kathodenoberfläche angezogen werden, der aus zwei thermoazidophilen Organismen besteht. Der Primärorganismus *Kyrpidia spormannii* nutzt CO₂ und Elektronen als Kohlenstoff- und Energiequelle und produziert daraus Bioplastik (Polyhydroxybuttersäure, PHB) und Biomasse. Der Sekundärorganismus, das Archaeon *Sulfolobus spec.*, soll diese Komponenten verwerten und daraus Acetoin produzieren. *Sulfolobus spec.* hat in etwa die gleichen Wachstumsansprüche wie *K. spormannii* und für diesen Organismus ist ein genetisches System verfügbar. Der Primärorganismus *Kyrpidia spormannii* gehört zur Gruppe der Knallgasbakterien und wurde von uns in einem Zeitraum von 3 Jahren aus einem Elektrosynthesereaktor isoliert, den wir mit Proben aus Geothermalgebieten inokuliert haben. In einem bis zum 30.08.2020 laufenden BMBF-Projekt hatten wir die Möglichkeit erhalten, diesen Organismus genau zu studieren und einen Prozess um diesen Biokatalysator herum aufzubauen. Wir konnten Wachstum des Biofilms auf der Kathodenoberfläche bis zu einer Dicke von ca. 200 µm zeigen. Darüber hinaus ist das Wachstum vermutlich limitiert durch die Verfügbarkeit von Elektronen. Weiterhin haben wir die Möglichkeit erhalten, für den Prozess Bioreaktoren im 10- und 100-L-Maßstab zu bauen. Die Reaktoren sind als Scheibentauchkörper gestaltet, in denen die Kathoden als drehende Scheiben realisiert sind, an denen der Biofilm aufwachsen kann (**Abb. 1**).

Für die Plattformchemikalien-Produktion sollte ein Plasmid für die heterologe Expression der Acetolactatsynthase (AlsS) und der Acetolactatdehydrogenase (AlsD) in *Sulfolobus spec.* entwickelt werden. Um den Vorgang zu beschleunigen, wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Albers an der Universität Freiburg aufgebaut. Dadurch konnte auf Erfahrungen dahingehend zurückgegriffen werden, welche Stämme und Selektionsmarker am besten geeignet sind.

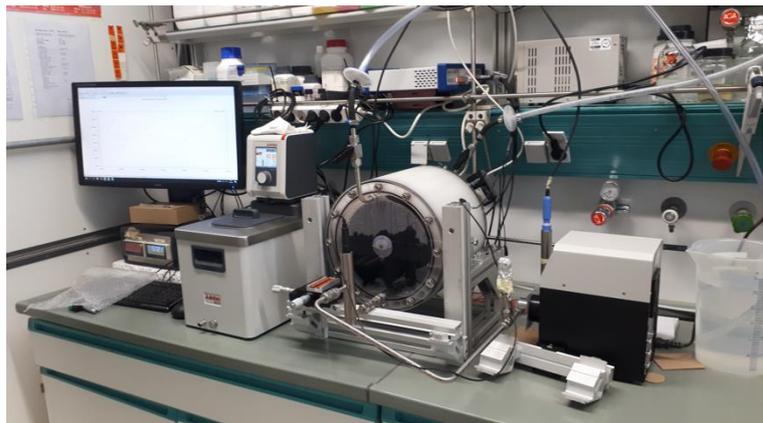


Abb. 1: Aufbau des 10 L Bioelektrosynthesereaktors.

2. Stand der Technik

Kohlendioxid als Rohstoff für die Biotechnologie einzusetzen bedarf autotropher Organismen (wenn nicht nur einzelne Carboxylierungs-Reaktionen wie zum Beispiel von Pyruvat zu Oxalacetat katalysiert werden sollen). Die biologische CO₂-Fixierung ist ein Reduktionsprozess, für den neben den Elektronen auch Energie benötigt wird. Die Energie können biologische Systeme aus Sonnenlicht, aus chemischen Verbindungen und – wie seit kurzem bekannt – direkt aus Strom beziehen.

Die Nutzung von photosynthetisch aktiven Mikroorganismen bietet den Vorteil, dass neben dem Sonnenlicht keine weitere Energiequelle zur Verfügung gestellt werden muss. Allerdings ist der Prozess durch den enormen Flächenaufwand und die Tagessonnenstunden limitiert. Diese Limitation existiert für chemotrophe Systeme nicht. Allerdings kommt als Elektronendonator für autotrophe Prozesse hier fast nur Wasserstoff in Frage. Die Gewinnung von Wasserstoff über *Power-to-gas* Verfahren ist leider immer mit Wandlungsverlusten verbunden. Ein Grund dafür ist das notwendige Überpotential, das an die Elektroden angelegt werden muss, um eine Wasserspaltung zu erreichen. Um trotzdem hohe Stromdichten bei begrenzten Überspannungen ermöglichen zu können, basieren die meisten eingesetzten Elektroden auf Edelmetallen wie z.B. Platin oder Palladium als Katalysator. Damit steigen aber die Kosten der Anlagen aufgrund der Wertigkeit der Materialien. Weiterhin muss bei der Verwendung von Metallkatalysatoren unter Umständen ein erhöhter Aufwand betrieben werden, um eine Vergiftung der Elektroden ausschließen zu können.

Im Jahr 2010 wurde das erste Mal gezeigt, dass Mikroorganismen direkt mit elektrischer Energie als Elektronen- und Energiequelle versorgt werden können (Nevin *et al.*, 2010; Rabaey & Rozendal, 2010; Nevin *et al.*, 2011). Kurz darauf wurde hierfür der Begriff der mikrobiellen Elektrosynthese geprägt. Revolutionär an den gezeigten Versuchen war, dass zur Erhaltung des biologischen Prozesses kein Überpotential verglichen mit der Wasserstoffsynthese über Elektrolyseure notwendig ist. Zusätzlich bestanden die Kathoden aus Graphit, womit der Einsatz teurer Materialien wie Platin umgangen werden konnte. Die biologischen Systeme zeigten darüber hinaus eine enorme Effizienz. Bis zu 86% der in das System eingespielten Elektronen konnten im gewünschten Endprodukt nachgewiesen werden (Nevin *et al.*, 2010). Somit wurde ein Ausgangspunkt für neue biotechnologische Verfahren eingeschlagen, die mit dem Abfallstoff CO₂ und der erneuerbaren Energieform Elektrizität betrieben werden. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass zum Teil eine direkte Interaktion von Hydrogenasen (Wasserstoff erzeugenden Enzymen) mit den Kathoden für eine Produktion von Wasserstoff sorgt, der dann von den Mikroorganismen genutzt wird (Lohner *et*

al., 2014; Deutzmann *et al.*, 2015). Für viele biologische Systeme ist der Vorgang des Elektronenimports aus biologischer Sicht aber immer noch nicht verstanden.

Der Hauptnachteil der mikrobiellen Elektrosynthese ist, dass alle bisher vorgestellten Systeme zwar einen sehr hohen Wirkungsgrad aber sehr niedrige Raum-Zeit-Ausbeuten zeigen. Dieses Problem basiert sicher auf vielen Faktoren, zwei scheinen aber besonders einschlägig zu sein. Erstens gab es mit wenigen Ausnahmen keinen evolutionären Druck, der selektiv auf die Entwicklung einer Gruppe von Organismen hingewirkt hätte, die mit unlöslichen Elektronendonoren interagieren. Damit gestaltet sich die Suche nach solchen Organismen schwierig. Zweitens wurde bisher wenig daran gearbeitet die Interaktion der Organismen mit der Elektrode prozesstechnisch in den Vordergrund zu stellen.

2.1. Eigene Vorarbeiten

Ausgehend von dem beschriebenen Stand der Wissenschaft haben wir uns zum Ziel gesetzt einen Organismus zu isolieren, der in der Lage ist Rauchgas als Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Da Rauchgas heiß ist und eine gewisse Konzentration an Sauerstoff enthält, haben wir uns darauf spezialisiert ein thermophiles Knallgasbakterium zu isolieren.

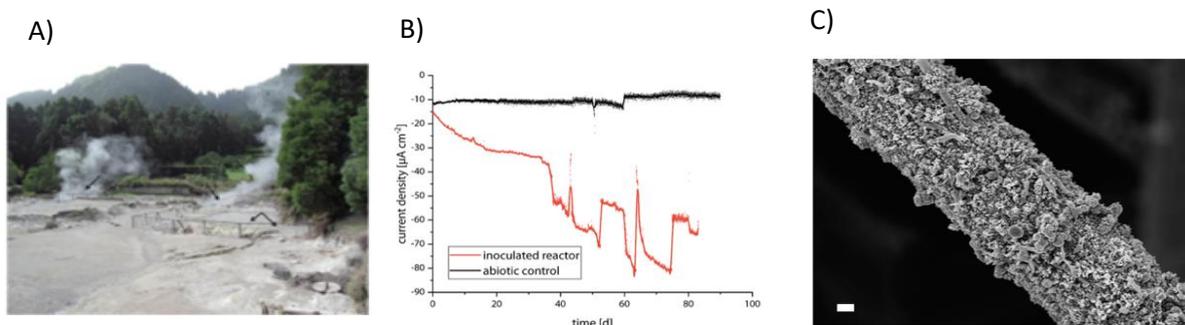


Abb. 2: **A)** Aufnahme einer von 5 Probenentnahmestellen auf der Insel Sao Miguel. **B)** Verlauf der Stromdichte in einem sterilen (schwarz) und einem inokulierten bioelektrochemischen System. Die Versuche wurde bei 60°C , pH 3 und einem Kathodenpotential von -350 mV durchgeführt. Den Organismen stand nur Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle zur Verfügung. **C)** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kathodenfaser. Der weiße Balken markiert $1\ \mu\text{m}$.

Wir haben deshalb Proben in verschiedenen Hydrothermalgebieten entnommen, die neben einer erhöhten Temperatur auch durch einen niedrigen pH-Wert gekennzeichnet waren (Reiner *et al.*, 2018a; Reiner *et al.*, 2018b) (siehe **Abb. 2A**). Mit diesem Probengemisch haben wir bioelektrochemische Zellen beimpft, bei denen wir ein Kathodenpotential von lediglich -350 mV gegen die Standardwasserstoffelektrode angelegt haben. Den Mikroorganismen

stand als einzige Kohlenstoffquelle Kohlendioxid zur Verfügung. Den aufwachsenden Biofilm haben wir mehrmals in neues sterilisiertes Medium eingebracht, um auf solche Organismen zu selektieren, die direkt mit den Elektroden interagieren konnten. Ein Indiz für die Interaktion der Zellen mit der Elektrode ist der Verlauf der Spannungsdichte im System. Der Potentiostat wurde so eingestellt, dass er immer ein Potential von -350 mV hielt. Wenn Organismen auf der Kathode wachsen, dann muss der Potentiostat bei gleichem Potential mehr Elektronen liefern (**Abb. 2B**). Das zeigt sich in einer steigenden reduktiven Stromdichte. Wenn das System Organismen-frei ist, bleibt dieser Effekt aus und es wird nur ein wesentlich geringerer Leerwertstrom gemessen.

Metagenom und Metatranskriptom-Untersuchungen zeigten uns, dass der Biofilm aus einer Mikroorganismengemeinschaft besteht, deren Vertreter zu 75% den Bacteria und zu 25% den Archaea angehören. Wir haben dann versucht einzelne autotrophe Organismen aus dem Biofilm zu isolieren. Aus diesem Bioprospecting Ansatz haben wir den bis dato weltweit einzigen Mikroorganismus isoliert, der in Reinkultur unter thermophilen Bedingungen auf Kathodenoberflächen Wachstum zeigt. Der Organismus *Kyrpidia spormannii* nutzt die Energie zur Produktion von Biomasse und dem Bioplastik Polyhydroxybuttersäure (Reiner *et al.*, 2018a; Reiner *et al.*, 2018b) (**Abb. 3D**).

Interessanterweise scheint der am nächsten verwandte Organismus *Kyrpidia tusciae* nicht bioelektrochemisch aktiv zu sein, da Versuche mit diesem Organismus in einem bioelektrochemischen System nicht zu steigenden reduktiven Strömen führten (**Abb. 3F**). Wir haben Durchflusszellensysteme entwickelt (**Abb. 3E**), die es uns ermöglichen sollten das Wachstum des Organismus in vivo mittels optischer Kohärenztomographie zu beobachten (**Abb. 3 A-C**). Darüber hinaus ermöglichen es uns diese Aufbauten auch, die Fermentation mit Druck zu beaufschlagen, um die Menge an gelöstem Kohlendioxid und Sauerstoff zu steigern. Unser Versuchsaufbau ermöglichte es uns nicht nur das Biofilmwachstum, sondern auch die Notwendigkeit des angelegten Potentials zu zeigen, da wir auf Kontrollkathoden auf denen wir keinen Stromfluss zuließen (*open circuit potential*) kein Biofilmwachstum beobachten konnten.

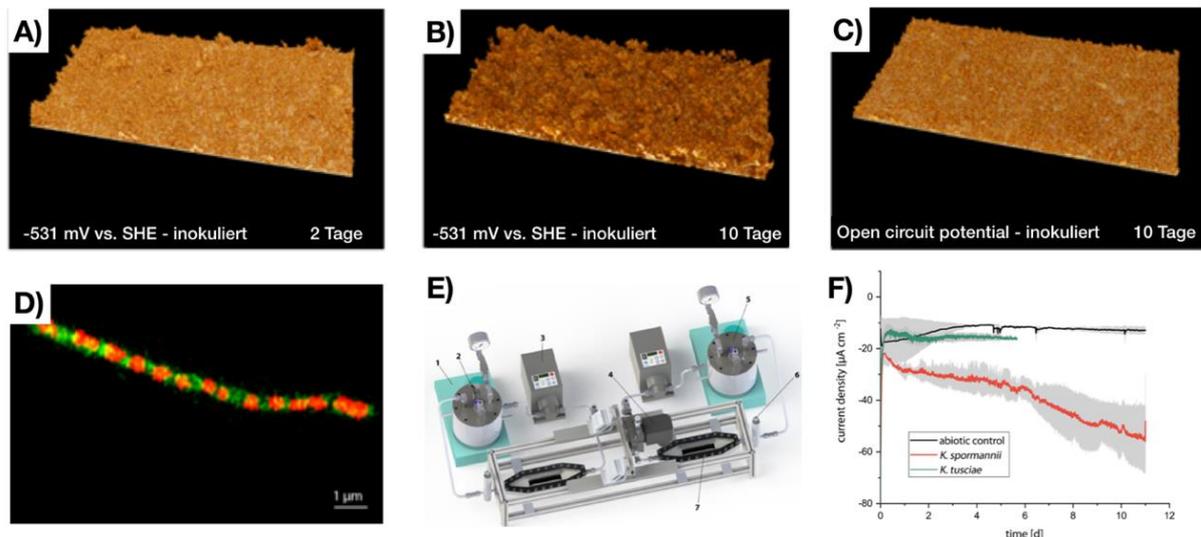


Abb. 3: **A)** und **B)**; Wachstum des *K. spormannii* Biofilms auf der Kathodenoberfläche bei einem Potential von -531 mV nach 2 und 10 Tagen. Die OCT-Aufnahmen zeigen eine Fläche von 2x8 mm. **C)** 10 Tage inkubierte Kontrollkathode die genauso inokuliert wurde, aber auf der keine Elektronen für den Organismus zur Verfügung standen. **D)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Zelle des Biofilms. Das Cytoplasma ist grün gefärbt, Polyhydroxybutyrat-Einschlüsse rot. **E)** Schematische Übersicht des entwickelten Messstands. **F)** Bioelektrochemische Auswertung der Kathodeninteraktion. Besiedlung mit *K. spormannii* führt zu einem verstärkten reduktiven Stromfluss, während der nächstverwandte Organismus dazu nicht in der Lage zu sein scheint.

3. Methoden und Ergebnisse der Forschungsarbeiten

3.1. Entwicklung von Expressionsplasmiden und Produktionsstämmen (Arbeitspaket 1)

In diesem Arbeitspaket sollten Expressionsplasmide für die in Frage kommenden *Sulfolobus* Spezies entwickelt werden. Um hier von genetischen Vorarbeiten mit *Sulfolobus* Stämmen profitieren zu können, haben wir dazu eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Albers an der Universität Freiburg aufgenommen. Aus den Gesprächen wurde klar, dass nur ein Stamm gute Stabilität und Produktivität zeigen kann. Wir haben daher alle weiteren Arbeitspakete mit diesem Stamm (*Sulfolobus acidocaldarius* MW001) durchgeführt.

Mit diesem Stamm haben wir zunächst Wachstumsuntersuchungen durchgeführt, um Bedingungen für eine schnelle Anzucht von Vorkulturen für die bioelektrochemischen Reaktoren zu definieren. Wir haben sechs unterschiedliche Kohlenstoffquellen getestet, von denen der Stamm mit den NZ-Aminen das robusteste Wachstum zeigte (**Abb. 4**).

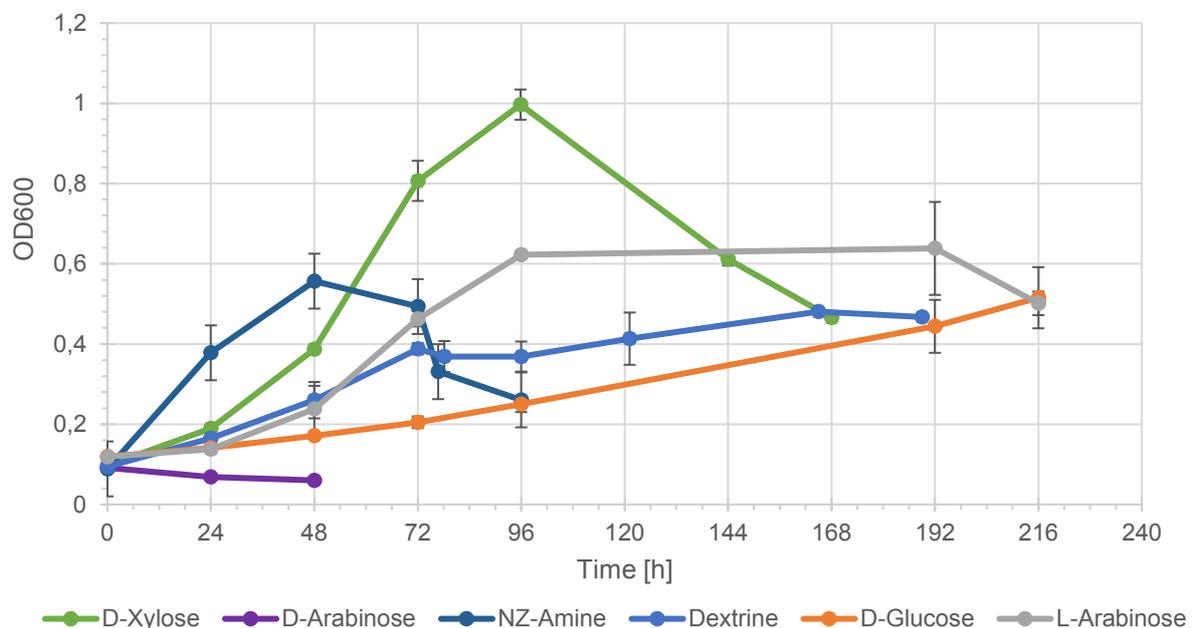


Abb. 4: Wachstum von *S. acidocaldarius* mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.

Ausgehend von einem vor kurzem vorgestellten Enzymset für die thermophile Acetoin Synthese (Jia *et al.*, 2017) haben wir für *S. acidocaldarius* Codon-optimierte Versionen der

Gene designed und bestellt. Die Funktionalität des erstellten Plasmids haben wir daraufhin zunächst in *Escherichia coli* getestet. In einem Zellsuspensionsassay konnten wir hier eine robuste Acetoin-Produktion aus der heterotrophen Kohlenstoffquelle Glucose zeigen (**Abb. 5**). Wir haben daraufhin versucht, das Plasmid in *S. acidocaldarius* zu transformieren. Dies stellte sich als überaus herausfordernd heraus. Schlussendlich war eine Transformation erst mit Hilfe einer neuen Reinstwasserquelle möglich. Erste Expressionsversuche mit dem Arabinose-induzierbaren Promoter zeigten allerdings eine nur sehr geringe Produktivität des Stammes. Die finale Acetoin-Konzentration betrug immer in etwa 1 mM und dieser Wert konnte auch nicht durch eine Steigerung der Induktorkonzentration erhöht werden.

Um zu testen, ob die Expressionsstärke oder die Enzymaktivität für die geringe Acetoin-Konzentration ursächlich sind, haben wir anschließend versucht, eine thermostabile Variante des gelb fluoreszierenden Proteins in *Sulfolobus* zu exprimieren. Das Fluoreszenzsignal war leider nicht oder nur schwach detektierbar. Wir gehen daher von einer zu geringen Promoteraktivität aus. Leider blieb für weitere Promoterstudien keine Zeit. Mittlerweile liegt uns jedoch ein Transkriptom des *Sulfolobus*-Stammes unter Kathodenaufwuchsbedingungen vor. Hiermit ist es uns möglich, starke natürliche Promotoren zu identifizieren, die wir in weiteren Versuchen verwenden würden.

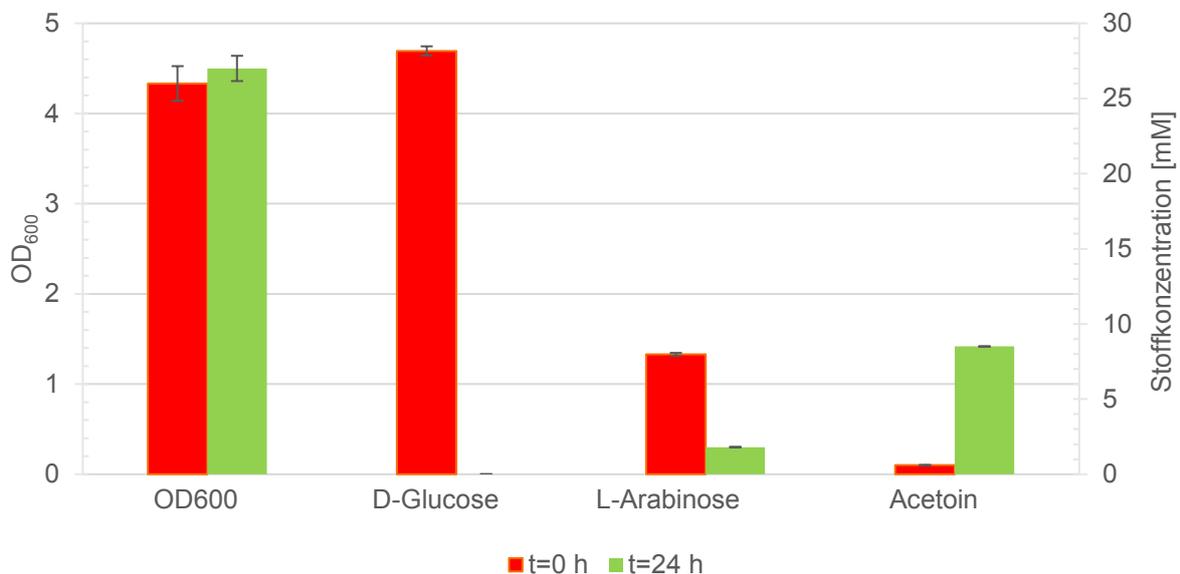


Abb. 5: Acetoin-Produktion in einem Zellsuspensionsassay mit einem *E. coli*-Stamm, der das entwickelte Plasmid trägt und *alsS* und *alsD* exprimiert.

3.2. Biofilmaufwuchsraten bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten und Partialdrücken (Arbeitspaket 2)

Ziel des Arbeitspaketes war es, optimale Strömungs- und Substratbedingungen (CO_2 und O_2) für das Wachstum von *S. acidocaldarius* auf der Kathodenoberfläche zu definieren. Die Prozesskontrolle sollte im Wesentlichen über die quantitative Bildanalyse mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie (OCT) erfolgen.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass *S. acidocaldarius* ein optimales Wachstum bei einem Gasgemisch aus 5 % Sauerstoff (v/v) und 95 % Kohlenstoffdioxid (v/v) zeigt. Daher wurde dieses Gasgemisch auch für die Versuche in den Fließzellen eingesetzt und nicht variiert.

In den bereits publizierten Fließzellen (Hackbarth et al., 2020) können mit geringem Aufwand grundlegende Biofilmparameter ermittelt werden. Dazu werden mittels der optischen Kohärenztomographie (OCT) an ausgewählten Stellen der Kathode 3D-Datensätze des aufwachsenden Biofilms erstellt und ausgewertet. Um das Biofilmwachstum mit den anliegenden Fließgeschwindigkeiten korrelieren zu können, wurden Strömungssimulationen der Fließzelle angefertigt. Die Überströmgeschwindigkeit des Mediums über der Kathode variiert je nach Position, welche wiederum den unterschiedlichen Biofilmstrukturen zugeordnet werden können. Nachfolgend werden nur die Ergebnisse bei einem anliegenden Potential von -350 mV vs. SHE beschrieben (Begründung in Arbeitspaket 3).

Abb. 6 zeigt Höhenprofile der aufgenommenen OCT-Datensätze an ausgewählten Tagen und an den Positionen **A**, **B** und **C**. An Position **A** herrscht die größte Überströmgeschwindigkeit, welche über Position **B** zu Position **C** stetig abnimmt (vgl. (Hackbarth et al., 2020)). In den Höhenprofilen entsprechen schwarze Pixel der Kathodenoberfläche und helle/weiße Pixel Biofilmstrukturen von 10 μm oder höher (siehe Farbuordnung in **Abb. 6** rechts oben). Es ist zu sehen, dass der Biofilm in kleinen Kolonien mit einer durchschnittlichen Höhe von 10-30 μm aufwächst (helle Punkte auf der Kathode), welche über die Zeit immer zahlreicher werden. Dabei spielt es keine Rolle, welcher Überströmung der Biofilm ausgesetzt ist. An jeder Position bilden sich in etwa gleich viele Kolonien und dementsprechend auch ein ähnlich großes Biovolumen (Volumen des Biofilms geteilt durch die aufgenommene Fläche).

Es konnte somit gezeigt werden, dass es unabhängig der Überströmungsgeschwindigkeit zu Biofilmwachstum auf der Kathode kommt (mehr dazu in AP 3).

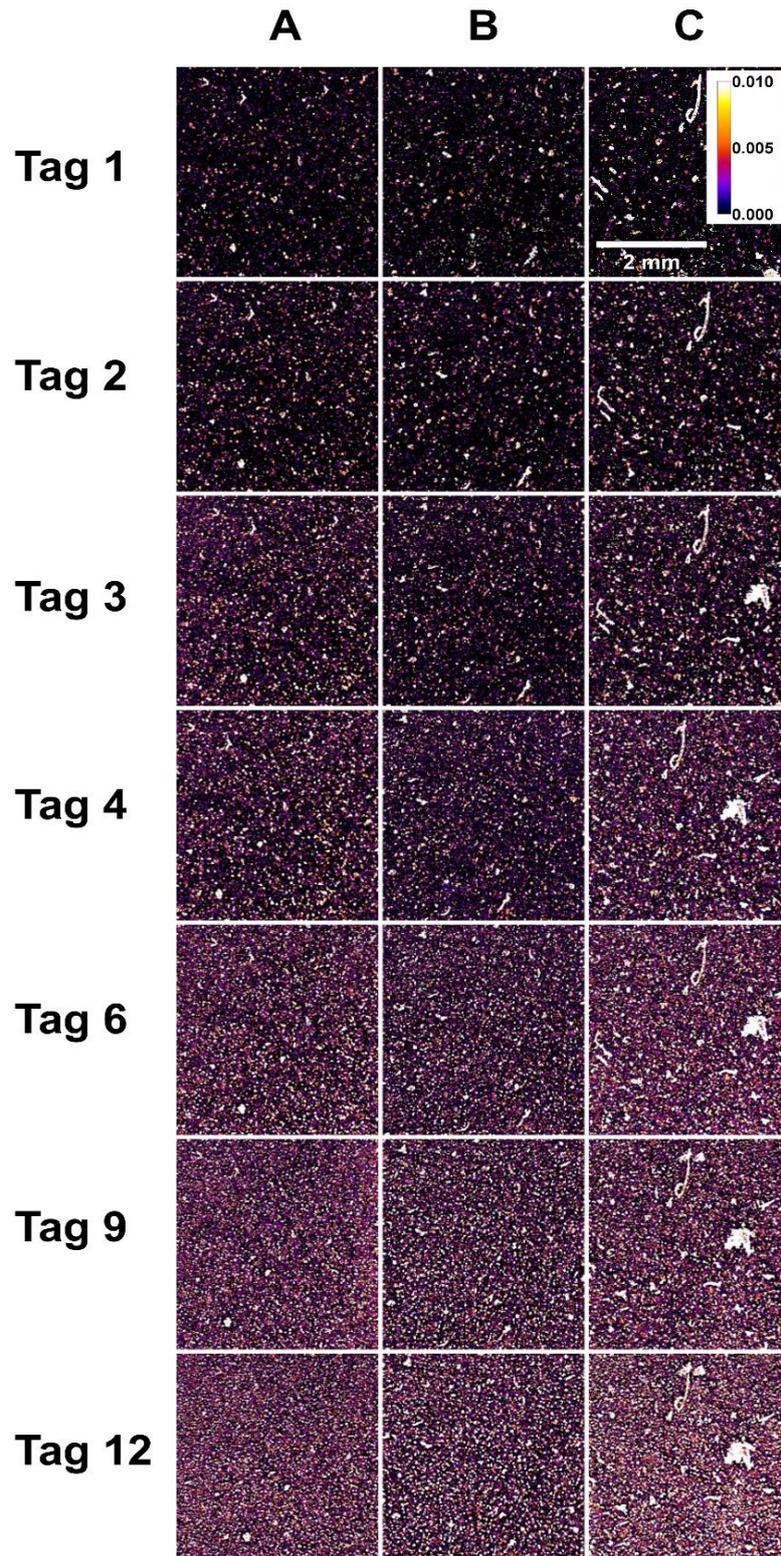


Abb. 6: Aus den aufgenommenen OCT-Datensets generierte Höhenprofile an den Positionen **A**, **B** und **C** in zeitlicher Reihenfolge von Tag 1 bis Tag 12. Schwarze Stellen entsprechen der Kathodenoberfläche wohingegen helle Pixel Biofilmstrukturen gleich oder höher 10 μm entsprechen.

3.3. Biofilmaufwuchsraten und Produktivitäten bei variierenden Kathodenpotentialen (Arbeitspaket 3)

In diesem Arbeitspaket wurden unterschiedliche Potentiale an die Kathode angelegt. Dabei lag der Fokus auf zwei Potentialen und zwar zum einen bei -350 mV vs. SHE und zum anderen bei -500 mV vs. SHE. Bei dem niedrigeren Potential ist bekannt, dass elektroaktive Mikroorganismen bereits auf Kathoden wachsen können und es dient dementsprechend oftmals als Ausgangspotential für Anreicherungen dieser spezialisierten Mikroorganismen. Bei -350 mV vs. SHE hingegen konnte bereits erfolgreich *Kyrpidia spormannii* in den Fließzellen kultiviert werden und es sollte als eine Art Vergleichspotential dienen.

Abb. 7 zeigt das Wachstum von *S. acidocaldarius* aus der gleichen Vorkultur bei den beiden Potentialen -350 mV und -500 mV vs. SHE. Die Daten wurden aus den generierten Höhenprofilen gewonnen.

Wie in AP 2 bereits gezeigt wurde, wachsen über der Zeit stetig mehr Kolonien und somit nimmt auch das Biovolumen auf der Kathode zu, bis zu einem *steady state* ab Tag 12. Für dieses geringere Potential konnte eine typische Wachstumskurve gezeigt werden. Bei einem angelegten Potential von -500 mV vs. SHE kommt es aufgrund des hohen Energieeintrags zu einem schlagartigen Wachstum, welches schon nach Tag 3 ein *steady state* aufzeigt. Auch das höchste Biovolumen ist beim höheren Potential stets höher als das des niedrigeren Potentials. Diese Ergebnisse würden eigentlich für Prozessbedingungen bei einem höheren Potential sprechen, da nach sehr kurzer Zeit schon das maximale Biovolumen erreicht wird. Durch den hohen Anteil an gelöstem Sauerstoff, welcher von *S. acidocaldarius* benötigt wird, kommt es zu einem linearen Anstieg des abiotischen Stromverbrauches über der Zeit. Durch das höhere Potential entsteht automatisch mehr Sauerstoff an der Anode, welcher wiederum an der Kathode reduziert wird. Dadurch steigt der ins System eingebrachte Strom wiederum und es wird noch mehr Sauerstoff an der Anode produziert. Zudem kommt es durch den hohen Eintrag von Energie zur Bildung von elementarem Wasserstoff an der Kathode. Dieses System lässt sich bei einem solch eingestellten Potential schon nach kurzer Zeit nicht mehr regeln und es kommt zu einem unnötig hohen Stromverbrauch ohne ersichtlichen Vorteil (Begründung für AP 2). Zudem lässt sich ein solches System durch ausgasen des entstehenden Sauerstoffs und Wasserstoffs nicht mehr kontrollieren und stellt zudem ein Sicherheitsrisiko durch die Entstehung von Knallgas dar.

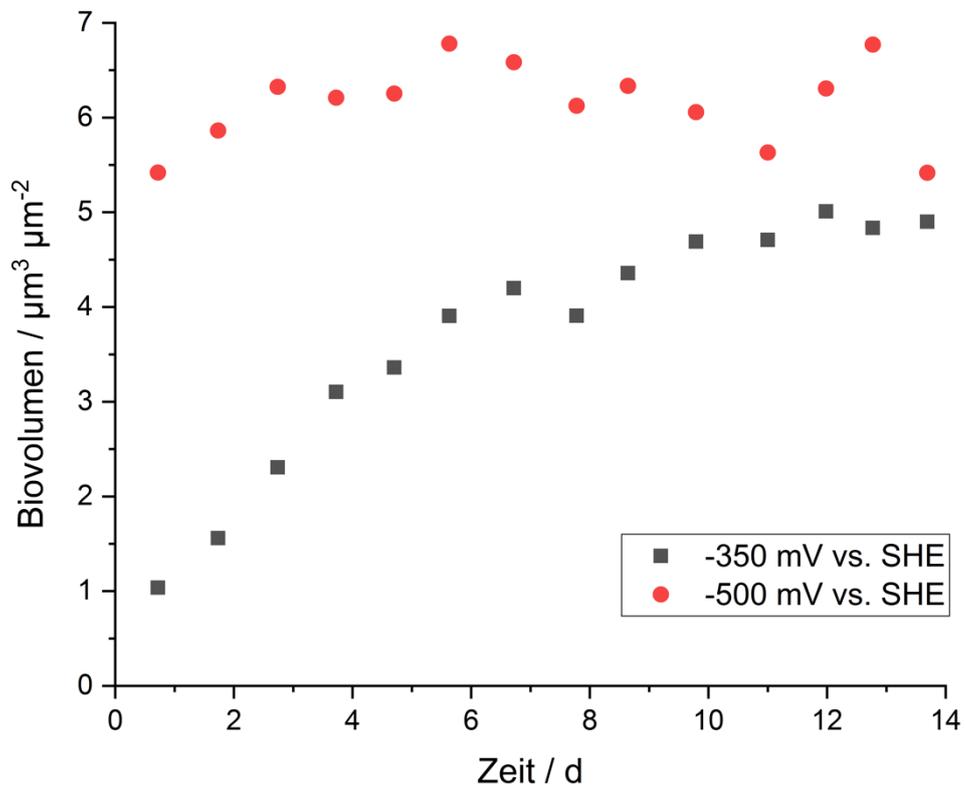


Abb. 7: Vergleich der aufwachsenden Biovolumina bei -350 und -500 mV vs. SHE über der Zeit.

3.4. Downstream Processing zur Acetoin Aufreinigung (Arbeitspaket 4)

Ziel dieses Arbeitspaketes war es, eine maßgeschneiderte Aufreinigungsroutine für das Endprodukt Acetoin zu entwickeln. Aufgrund von positiven Ergebnissen in anderen Arbeitspaketen haben wir uns für eine Aufreinigung mittels Membranfiltration entschlossen. In dieser Arbeit wurden Rührzellen (RZ) des Modells Sterlitech HP4750 der Firma Sterlitech (USA) verwendet. Die RZ waren mit einer Rühreinheit versehen, dabei wurde ein Rührer mit Hilfe eines externen magnetischen Antriebs angetrieben. Bei beiden RZ betrug das Fassungsvermögen 250 mL. Der effektive Durchmesser der verwendeten Membranen war 50 mm. Die RZ wurden mit einem Druckbehälter verbunden, in dem sich die Feed-Lösung befand.

Die Daten der Membranen, die bei dieser Arbeit verwendet wurden, sind in **Tab. 1** dargestellt. Alle verwendeten Membranen werden von Dupont hergestellt und bestehen aus Polyamid.

Tab. 1: Membrandaten (Herstellerangaben und intern gemessene Werte).

¹ Die Rückhaltsbestimmung wurde mit einer Lösung mit 2000 ppm MgSO₄, bei 25°C und 15% Ausbeute gemessen.

² Die Rückhaltsbestimmung wurde mit einer Lösung mit 2000 ppm NaCl, bei 25°C und 15% Ausbeute gemessen.

Membran	NF270	NF90	XLE	BW30LE
Trenngrenze [Da]	300	170	90	90
Rückhalt [%]	>97,0 ¹	98,7 ¹	99,0 ²	99,3 ²

Die Zusammensetzung des *Sulfolobus*-Mediums ist in **Tab. 2** dargestellt.

Tab. 2: Zusammensetzung des Mediums (Angaben pro Liter).

Substanz	Einwaage (g)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3
KH ₂ PO ₄	0,28
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0,25
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,07
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	0,02
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	1,8
Na ₂ B ₄ O ₇ • 10 H ₂ O	4,5
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	1,22
CuCl ₂ • 2 H ₂ O	0,05
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	0,03
VO ₂ SO ₄ • 2 H ₂ O	0,03
CoSO ₄ • 7 H ₂ O	0,01

Da in der Lösung nur Acetoin als organische Substanz vorhanden war, wurde die DOC-Konzentration der Probe gemessen und als Acetoin Konzentration umgerechnet. Die DOC-Konzentration wurde mit dem TOC-Analyzer TOC-VCSN (Shimadzu, Scientific Instruments) bestimmt. Sowohl im Medium als auch im Permeat wurde die elektrische Leitfähigkeit gemessen. Die Messung der elektrischen Leitfähigkeit erfolgte mit dem Gerät MultiP4 der Firma WTW. Bei der elektrischen Leitfähigkeit wurde die Elektrode Tetra Con 325(WTW) als Messsonde verwendet. Es wurde insgesamt 9 Versuche durchgeführt. Die Versuche sind in **Tab. 3** zusammengefasst.

Tab. 3: Übersicht über die durchgeführten Versuche

Versuch	Ziel	Verwendete Membran
1	Membranspülung	NF90
2	Verhalten von Acetoin (z.B. Adsorption, Abbau)	NF90
3	Rückhaltuntersuchung	NF90
4	Membranspülung	BW30LE
5	Rückhaltuntersuchung	BW30LE
6	Membranspülung	XLE
7	Rückhaltuntersuchung	XLE
8	Membranspülung	NF270
9	Rückhaltuntersuchung	NF270

Bei jedem Versuch wurden zwei RZ mit je einer Membran zur Doppelbestimmung verwendet. Zu Beginn jedes Versuches wurden die jeweiligen Membranen mit 250 mL demineralisiertem Wasser ($\beta_{(DOC)} = 0,15 \text{ mg/L}$) bei 20 bar gespült, um möglichst alle vorhandenen Konservierungsstoffe (z.B. Glycerin) aus der Membran zu spülen. Die Versuche wurden bei einem Druck von 20 bar und Raumtemperatur durchgeführt. Die Rührgeschwindigkeit wurde auf 300 Umdrehungen pro Minute eingestellt.

Um eine Vergleichbarkeit der Versuche mit den verschiedenen Membranen zu gewährleisten, wurden die Konzentration von Acetoin im Feed für alle Versuche mit der gleichen Konzentration (10 mmol/L) angesetzt.

Die Versuche zeigen, dass die Adsorption von Acetoin an der Membranfläche sehr gering ist. **Tab. 4** zeigt den durchschnittlichen Rückhalt von Acetoin für alle durchgeführten Versuche.

Tab. 4: Ergebnisse der Filtrationsversuche zum Acetoin-Rückhalt.

Verwendete Membran	Acetoin/DOC Rückhalt [%]	Standardabweichung [%]	Elektr. Leitfähigkeit-Rückhalt [%]
NF90	93	3	92
BW30LE	90	2	90
XLE	87	1	85
NF270	53	6	42

Die Ergebnisse zeigen, dass die Membranfiltration eine hervorragende Möglichkeit bietet, um Acetoin aus dem verwendeten Medium zu gewinnen. Nur NF270 scheint aufgrund der zu hohen Porengröße nicht geeignet zu sein.

3.5. Hochskalierung des Prozesses auf 10 L mit Rauchgas als Substrat (Arbeitspaket 5)

Wir konnten das abschließende Arbeitspaket 5 nicht innerhalb der Projektlaufzeit abschließen, da in einigen Arbeitspaketen mehr Zeit benötigt wurde und der Projektabschluss aufgrund der Covid-19-Situation erschwert wurde. Wir möchten diesen Übertrag des Biofilmwachstums von Fließzellen in den 10 L Reaktor so bald wie möglich nachholen.

3.6. Nachhaltigkeitsanalyse (Arbeitspaket 6)

Der Report zur Nachhaltigkeitsanalyse ist dem Bericht in Anlage beigefügt. Der Bericht vergleicht auch den hier vorgestellten Prozess mit dem sogenannten Bioelectroplast Prozess in dem wir Bioplastik an einer Kathode mit Hilfe von *Kyrpidia spormannii* erzeugen.

Grundsätzlich ist die Nachhaltigkeit vergleichbar mit einer auf Glucose basierten Acetoinproduktion. Allerdings konkurriert unser Prozess nicht mit der Lebensmittelproduktion. Es wird klar, dass die Nutzung von erneuerbarem Strom und das *Downstream processing* die Haupteinflussfaktoren für den Prozess sein werden.

4. Änderung im Projektablauf oder der Zielsetzung im Vergleich zum Projektantrag

4.1. Notwendige Änderungen im Projektverlauf

Zwei Kontrollexperimente führten zu einem veränderten Projektverlauf. Wir konnten zeigen, dass *Sulfolobus acidocaldarius* auch alleine in der Lage ist, mit einer Kathode als Energie- und Elektronenquelle zu wachsen. Dies war eine bahnbrechende Erkenntnis, da dieser Organismus somit über einen völlig neuen Weg des Elektronenimports verfügen muss, denn typische Schlüsselgene für den Elektronenimport sind nicht vorhanden. Gleichzeitig zeigte sich völlig unvorhersehbar, dass *K. spormannii* in der Lage ist, Acetoin zu verstoffwechseln. Statt das Endprodukt zu verändern, haben wir die Zwei-Stamm-Strategie in eine Ein-Stamm-Strategie umgewandelt, da hiermit auch höhere Umsätze erreichbar sein sollten. Wir konnten das Wachstum von *Sulfolobus* auf den Elektroden quantifizieren und eine Acetoin-Produktion zeigen. Diese blieb jedoch hinter den Erwartungen zurück, da der Promoter des Plasmids anscheinend in *Sulfolobus* weniger gut funktionierte als in *E. coli*. Nichtsdestotrotz konnten wir im Rahmen dieses Projektes einen neuen autotrophen Biokatalysator für Bioelektrosynthesen vorstellen und sind momentan dabei, zu verstehen, wie die Elektronenaufnahme funktioniert. Dafür haben wir Transkriptome des Organismus unter verschiedenen Wachstumsbedingungen aufgenommen, die wir momentan auswerten. Die durchgeführte Nachhaltigkeitsbewertung ließ erkennen, dass der Prozess sich in seiner Nachhaltigkeit nicht von Glucose-basierten Umsetzungen unterscheidet und dabei gleichzeitig nicht mit der Nahrungsmittelproduktion konkurriert, weil Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle benutzt wird.

4.2. Erreichbarkeit der Meilensteine & Projektziele

Bis auf die Produktion von Acetoin in *Sulfolobus* und die Hochskalierung des Prozesses auf den 10 L Reaktor konnten alle Projektziele wie geplant erreicht werden.

4.3. Schwierigkeiten bei der Projektdurchführung

Wie bereits unter 4.1 genannt, traten einerseits bei der geplanten Zwei-Stamm-Strategie und andererseits bei der Expression der Gene *alsS* und *alsD* in *S. acidocaldarius* (Arbeitspaket 1) Probleme auf. Ersteres konnte durch Änderung auf eine Ein-Stamm-Strategie gelöst werden.

Die Expression und somit Produktion von Acetoin in *S. acidocaldarius* konnte bis dato nicht stabil erreicht werden und bedarf weiterer Forschung bezüglich eines geeigneten Promoter-Systems.

Des Weiteren verzögerte sich Arbeitspaket 5 (siehe 3.5), auch aufgrund der Situation mit Covid-19. Die hier durchzuführenden Arbeiten werden baldmöglichst nachgeholt.

4.4. Projektbezogene Veröffentlichungen

Eine gemeinsame Publikation mit der Arbeitsgruppe Horn ist in Arbeit.

Die bisherigen Ergebnisse wurden auf der Bioökonomiekonferenz Baden-Württemberg vorgestellt:

Jonas Lapp, Max Hackbarth, Annemarie Schmidt, Johannes Gescher: *Thermophilic electrosynthesis of acetoin in Sulfolobus.*

4.5. Verwertungsaktivitäten

Im Rahmen dieses Projektes konnte erfolgreich ein neuer Stamm für die Bioelektrosynthese zur Verfügung gestellt werden. Wir planen eine Fortführung des Projektes im Rahmen einer Ausschreibung des BMEL: „*Neue Wege der Strom-basierten Konversion von biogenen Rohstoffen und der elektrochemischen Herstellung von biobasierten Produkten (Elektrosynthese)*“.

Aus dem Projekt wird eine Promotion und 1 Masterarbeit hervorgehen.

5. Quellen

- Deutzmann, J.S., Sahin, M., and Spormann, A.M. (2015) Extracellular Enzymes Facilitate Electron Uptake in Biocorrosion and Bioelectrosynthesis. *MBio* **6**: e00496-15.
- Hackbarth, M., Jung, T., Reiner, J.E., Gescher, J., Horn, H., Hille-Reichel, A., and Wagner, M. (2020) Monitoring and quantification of bioelectrochemical *Kyrpidia spormannii* biofilm development in a novel flow cell setup. *Chem Eng J* **390**: 124604.
- Jia, X., Liu, Y., and Han, Y. (2017) A thermophilic cell-free cascade enzymatic reaction for acetoin synthesis from pyruvate. *Sci Rep* **7**: 4333.
- Lohner, S.T., Deutzmann, J.S., Logan, B.E., Leigh, J., and Spormann, A.M. (2014) Hydrogenase-independent uptake and metabolism of electrons by the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *ISME J* **8**: 1673–1681.
- Nevin, K.P., Hensley, S.A., Franks, A.E., Summers, Z.M., Ou, J., Woodard, T.L., *et al.* (2011) Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2882–2886.
- Nevin, K.P., Woodard, T.L., Franks, A.E., Summers, Z.M., and Lovley, D.R. (2010) Microbial electrosynthesis: Feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *MBio* **1**.
- Rabaey, K., and Rozendal, R.A. (2010) Microbial electrosynthesis - Revisiting the electrical route for microbial production. *Nat Rev Microbiol* **8**: 706–716.
- Reiner, J.E., Jung, T., Lapp, C.J., Siedler, M., Bunk, B., Overmann, J., and Gescher, J. (2018a) *Kyrpidia spormannii* sp. nov., a thermophilic, hydrogenoxidizing, facultative autotroph, isolated from hydrothermal systems at São Miguel Island, and emended description of the genus *Kyrpidia*. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 3735–3740.
- Reiner, J.E., Lapp, C.J., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., and Gescher, J. (2018b) Complete genome sequence of *Kyrpidia* sp. strain EA-1, a thermophilic knallgas bacterium, isolated from the Azores. *Genome Announc* **6**.