Nachhaltige biotechnologische Verfahren

Clostriden als nachhaltige Plattform für Chemikalien und Lebensmittel

CHRISTIAN JANKE

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE UND ANGEWANDTE
OEKOLOGIE (IME), AACHEN

Cellulose and carbon dioxide (CO₂) belong to the most promising carbon sources for sustainable processes in the field of industrial biotechnology. Cellulose is the most abundant biological polymer on earth and microbial carbon dioxide consumption represents one possibility to reduce global warming. Clostridial biocatalysts are able to utilize both carbon sources efficiently and offer various ways to develop new industrial processes.

DOI: 10.1007/s12268-021-1596-2
© Der Autor 2021

Die sich schon seit Jahrzehnten ankündigende Klimakrise sorgt in den letzten Jahren ebenfalls im biotechnologischen Bereich für eine breite Suche nach neuen Lösungen für die Entwicklung nachhaltiger Prozesse.

Zu besonders erstrebenswerten biotechnologischen Produkten zählen neben Nahrungsmittelzusätzen (Proteine, Aminosäuren oder Lipide) Alkohole (z. B. Ethanol), Furane, Glycerin(derivate), Kohlenwasserstoffe (z. B.

Isopren, Farnesene oder Squalene), Milchsäure, Succinat, Hydroxypropionsäure und Lävulinsäure (Abb. 1, [1]). Dabei sind Clostridien und ihre biokatalytischen Fähigkeiten vermehrt in den Fokus dieser Anstrengungen gerückt.

Biotechnologie mit Clostridien

Bei Clostridien handelt es sich um eine ökologisch vielfältige und – durch ihre Fähigkeit, Endosporen zu bilden – fast ubiquitär vorkommende Gattung von anaeroben Bakterien [2]. Allgemein bekannt sind die Botulinumtoxine aus dem kosmetischen Bereich, die aus verschiedenen Spezies wie *Clostridium botulinum* stammen. Die neurotoxischen Proteine stellen einen Milliardenmarkt dar. Durch die Impfung gegen Tetanus gehört auch *C. tetani*, der Auslöser des Wundstarrkrampfes, zu den bekannteren Arten. Was Clostridien insgesamt eint, ist ihre Diversität. Hochaktuell sind dabei nicht ihre medizinisch relevanten Vertreter, sondern das biotechnologische Potenzial verschiedener Spezies. Die Tür zu der biotechnologischen Fundgrube clostridialer Biokatalysatoren wurde schon Anfang des letzten Jahrhunderts vom Chemiker Chaim Weizmann, dem später ersten israelischen Staatspräsidenten, aufgetan [3]. Dieser entwickelte mit dem saccharolytischen *C. acetobutylicum* die ABE-Fermentation als ein biotechnologisches Verfahren, um die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol im industriellen Maßstab herzustellen. Nach dem Aufkommen petrochemischer Verfahren verstummte diese Methode für Jahrzehnte. Erst das drohende Versiegen des Öls und die Unkontrollierbarkeit des Klimawandels sorgten für erneutes Interesse an biotechnologischen Verfahren mit Clostridien. Der Nachteil saccharolytischer Clostridien ist die Abhängigkeit der Produktion von Kohlenhydraten, deren Quellen häufig in Konkurrenz zu Nahrungs- und Futtermitteln stehen. Clostridien bieten für diesen Konflikt mehrere Lösungen. Ein nachwachsender Rohstoff wie Cellulose ist durch cellulolytische Clostridien und das

▲ **Abb. 1:** Die Anzahl biotechnologisch herstellbarer Chemikalien ist groß. Es gibt Priorisierungen in Regierungsstrategien auf Chemikalien wie Ethanol (A), Kohlenwasserstoffe wie Isopren (B), Furane (C), Glycerin (D), Milchsäure (E), Succinat (F) und Hydroxypropionsäure (G). Zudem eignen Clostridien sich für Herstellung von industriell relevanten Alkoholen wie Hexanol (H).

Treibhausgas CO₂ als Rohstoff durch acetogene Clostridien nutzbar.

CO₂ als Rohstoff

Die steigende Konzentration von Kohlenstoffdioxid wird für den Klimawandel maßgeblich mit verantwortlich gemacht. Seit Mitte des letzten Jahrhunderts steigt die CO₂-Konzentration in der Erdatmosphäre stetig auf aktuell über 410 ppm. Dieser Wert lag für viele hunderttausend Jahre konstant unter 300 ppm [4] und anthropogene Einflüsse gelten als ursächlich für den sprunghaften Anstieg [5]. Chemische Verfahren zur Absorption von CO₂ aus Prozessgasen und der Luft sowie Umwandlung mittels Katalysatoren – wie in der Fischer-Tropsch-Synthese – sind eine Gruppe an Lösungen zur Senkung der CO₂-Emissionen. Zudem rücken biologische Möglichkeiten für eine moderne Kreislaufwirtschaft wieder in den Fokus. Um einer steigenden CO₂-Steuer von bis zu 55 Euro pro Tonne CO₂ im Jahr 2025 zu entgehen, sind zahlreiche Nutzungsvarianten für CO₂ als Rohstoff weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Acetogene Clostridien sind in der Lage CO-/CO₂-haltige Industrieabgase aus z. B. Stahlwerken als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Sie stellen damit eine Gruppe von Plattformorganismen zur Produktion von Ethanol, 2,3-Butandiol und weiteren Grundchemikalien sowie auch Nahrungsmitteln dar. Die Konversion von CO₂ und CO erfolgt bei Acetogenen über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg (Wood-Ljungdahl-Weg), der als ursprünglicher metabolischer Weg zur Kohlenstofffixierung des LUCA (*last universal common/cellular ancestor*) diskutiert wird [6]. Die industriellen Aktivitäten sind im Zuge der Suche nach effizienten CCU-Prozessen (*carbon capture and utilization*) besonders durch die Firma LanzaTech vorangetrieben worden. Die Fähigkeit von acetogenen Clostridien wie *C. autoethanogenum*, als Teil der Redoxhomöostase Ethanol in einem elektronenverbrauchenden Prozess zu produzieren, führt zur Bildung industriell relevanter Mengen an Produkt aus Stahlwerksabgasen. Die Produktion von Stoffen wie Isopren befindet sich hingegen noch in der frühen Forschungsphase [7].

Isopren aus Cellulose

Cellulose ist das am meisten vorkommende Biopolymer auf der Erde und ein attraktiver nachwachsender Rohstoff. Zu den anaeroben cellulolytischen Vertretern zählt *C. cellu-*

▲ **Abb. 2:** Cellulasen (1) von *Clostridium cellulolyticum* sorgen für den Abbau der Cellulose z. B. aus Holz zum Disaccharid Cellobiose, das für die Energiegewinnung und zur Produktion von Grundchemikalien (z. B. Isopren) und Nahrungsmitteln (Proteine, Aminosäuren, Lipide) genutzt werden kann (2).

lolyticum. Als Molekül mit tausendfach β -1,4-glycosidisch verknüpften β -D-Glucoseeinheiten wird Cellulose von *C. cellulolyticum* zum Disaccharid Cellobiose abgebaut. Die energiereiche Verbindung ist unter anaeroben Bedingungen eine attraktive Kohlenstoffquelle, um Chemikalien und Nahrungsmittel wie Proteine und Aminosäuren zu produzieren (**Abb. 2**). Eine industriell relevante Grundchemikalie ist das volatile Isopren (C₅H₈, 2-Methyl-1,3-butadien), das neben Methan als am häufigsten vorkommenden Kohlenwasserstoff in der Atmosphärenchemie der Erde eine große Rolle spielt. Es wird von Pflanzen jedes Jahr im dreistelligen Millionen-tonnenbereich in die Atmosphäre emittiert. Isopren ist als C₅-Molekül ein Hemiterpen und Ausgangsmolekül für Isoprenkautschuk, das als cis-1,4-Polyisopren in der Reifenindustrie verwendet wird. Die Jahresproduktion der Grundchemikalie liegt bei $0,84 \times 10^6$ Jahrestonnen mit steigender Tendenz als Nebenprodukt petrochemischer Verfahren. Die Synthese von Isopren in Pflanzen erfolgt durch Eliminierung eines Pyrophosphats vom universellen Vorläufer Dimethylallylpyrophosphat, welches in allen Lebewesen über den Mevalonat- oder Methylerythritolphosphatweg synthetisiert wird. Die gigantischen Emissionen der Pflanzen lassen sich bislang nicht großtechnisch einfangen. Das für die Isoprensynthese codierende Gen lässt sich jedoch ebenfalls in Mikroorganismen exprimieren. Die Expression und Aktivität des pflanzlichen Proteins wurde im Rahmen einer Studie in *C. cellulolyticum* erfolgreich getestet [8]. Ohne weitere Optimierungen produzierte der Stamm mit Cellobiose als Kohlenstoffquelle Isopren im Bereich von Mikrogramm pro Liter Kultur. Im Gegensatz zu Alkoholen wie Butanol und

Hexanol gibt es mit der Substanz Isopren aufgrund der hohen Flüchtigkeit keine Toxizitätsprobleme für die Mikroorganismen. Demgegenüber verleitet die niedrige katalytische Effizienz von Isoprensynthasen und vergleichbarer Terpensynthasen dazu, die Generierung synthetischer Varianten für die Eliminierungsreaktion in Betracht zu ziehen. Die artifizialen Enzyme könnten durch Evolution von bestehenden Katalysatoren oder aus einem Pool synthetischer Polypeptide entwickelt werden. Darüber hinaus fehlen für die Schaffung einer Plattform auf Basis von Cellulose weitere Optimierungen, angefangen bei genetischen Elementen mit Möglichkeiten für die logische Verknüpfung für das Design komplexerer, heterologer Produktionswege. Die Effizienz des Celluloseabbaus muss ebenfalls deutlich durch evolutive Methoden und Genomengineering, das durch die Anwendung von CRISPR/Cas9 *in vivo* viel einfacher als jemals zuvor möglich geworden ist, gesteigert werden. Das anaerobe, mesophile Wachstum von *C. cellulolyticum* vereinfacht im Vergleich zu aeroben cellulolytischen Vertretern die Prozessführung und senkt die Kosten.

Zukunft clostridialer Biokatalysatoren

Die Ausschöpfung der Potenziale biologischer Katalysatoren für eine klimafreundliche Kreislaufwirtschaft und CO₂-Nutzung steht gerade erst am Anfang. Aufgrund der Komplexität von biologischen Vorgängen wäre eine engere Verzahnung von Grundlagenforschung und industrieller Anwendung großflächig wichtig, um schneller eine großtechnische Dimension zu erproben. Beispielsweise wurde aus einer acetogenen Spezies aus der Klasse der Clostridia kürzlich das hocheffiziente Enzym HDCR isoliert, dass

CO₂ und H₂ in Ameisensäure umwandelt [9]. Die katalytische Effizienz des Enzyms ist chemischen Katalysatoren ebenbürtig. Die Aktivität der wasserstoffabhängigen CO₂-Reduktase stellt prinzipiell eine Speicherfunktion für Wasserstoff dar. Großtechnische Prüfungen für eine sichere Speicherung stehen allerdings noch aus. Mikroorganismen mit ihrer enzymatischen Ausstattung sind evolutiv extrem anpassungsfähige Lebewesen. Das macht sie nach wie vor in Verbindung mit großen Fortschritten in der synthetischen Biologie zu einer konkurrenzfähigen Alternative zu chemischen Katalysatoren für nachhaltige Prozesse. ■

Literatur

- [1] Bozell JJ, Petersen GR (2010) Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy's "Top 10" revisited. *Green Chem* 12: 539–554
- [2] Durre P (2014) Physiology and sporulation in clostridium. *Microbiol Spectr* 2: TBS-0010-2012
- [3] Ni Y, Sun Z (2009) Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium*

acetobutylicum in China. *Appl Microbiol Biotechnol* 83: 415–423

- [4] Lüthi D, Le Floch M, Bereiter B et al. (2008) High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature* 453: 379–382
- [5] Zeebe RE, Ridgwell A, Zachos JC (2016) Anthropogenic carbon release rate unprecedented during the past 66 million years. *Nat Geosci* 9: 325–329
- [6] Weiss MC, Sousa FL, Mrnjavac N et al. (2016) The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat Microbiol* 1: 16116
- [7] Diner BA, Fan J, Scotcher MC et al. (2018) Synthesis of heterologous mevalonic acid pathway enzymes in *Clostridium ljungdahlii* for the conversion of fructose and of syngas to mevalonate and isoprene. *Appl Environ Microbiol* 84: e01723-17
- [8] Janke C, Gaida S, Jennewein S (2020) The production of isoprene from cellulose using recombinant *Clostridium cellulosoliticum* strains expressing isoprene synthase. *Microbiologyopen* 9: e1008
- [9] Schuchmann K, Müller V (2013) Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase. *Science* 342: 1382–1385

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>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Christian Janke
 Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und
 Angewandte Oekologie (IME)
 Forckenbeckstraße 6
 D-52074 Aachen
 Christian.Janke@ime.fraunhofer.de
www.ime.fraunhofer.de

Hier steht eine Anzeige.

Springer