



Sachbericht

Teil I: Kurzbericht

Mikrobielle Biofabriken:

ThermoSynCon – Entwicklung thermophiler Mikroorganismen als Biokatalysatoren für die Umwandlung von Synthesegas zu Biobrennstoffen und Chemikalien (Teilvorhaben B)

Biochemie und Bioenergetik thermophiler Acetogener

Zuwendungsempfänger: Goethe-Universität Frankfurt

Ausführende Stelle: Goethe-Universität Frankfurt, Institut für molekulare Biowissenschaften, Molekulare Mikrobiologie und Bioenergetik, Prof. Dr. Volker Müller, Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt

Projektleitung: Prof. Dr. Volker Müller

Förderungskennzeichen: 031B0857B

Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2020 – 31.12.2023

Verfasser des Schlussberichtes/Sachberichtes: Prof. Dr. Volker Müller

Ein Verbundvorhaben im Rahmen der BMBF-Fördermaßnahme „Mikrobielle Biofabriken für die industrielle Bioökonomie. Neuartige Plattformorganismen für innovative Produkte und nachhaltige Bioprozesse“. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung und wissenschaftlich-technischer Stand zu Beginn des Vorhabens

Die immer noch zunehmende Erderwärmung mit ihren katastrophalen globalen Folgen für die Menschheit ist vor allem auf die Zunahme der Emissionen an Treibhausgasen wie Kohlendioxid oder Methan zurückzuführen; dringend benötigte Massnahmen schließen also die Verringerung von Treibhausgasemissionen und die Reduktion atmosphärischer Treibhausgaskonzentrationen ein. Während letztere schwierig mikrobiologisch zu katalysieren ist, können Mikroben aber die Emission verringern, indem z. B. CO₂, CO- oder CH₄-haltige industrielle Abgase an Bakterien verfüttert werden, die daraus Zellmaterial (single cell protein) für die Ernährung von Tier und Mensch produzieren oder aber die Gase zu wertvollen Produkten wie Biotreibstoffe, Basischemikalien, Feinchemikalien bis hin zu Polymeren wie Acrylaten oder Bioplastik veredeln. CO₂-Reduktion wird von vielen unterschiedlichen Lebensformen betrieben, von Mikroben bis hin zu Bäumen, aber die Umsetzung von CO ist im Prinzip den Mikroben vorbehalten. Darunter sind insbesondere die strikt anaeroben, acetogenen Bakterien hervorzuheben, die ausgezeichnete biologische Plattformen für die Verwandlung von CO, CO₂ und H₂ darstellen, da die besagten Gase natürliche Kohlenstoff- und Energiequellen für sie sind. Diese Gase sind Teil des Synthesegases, das z. B. Stahlwerken als Abfallstoff anfällt. Einige acetogene Bakterien wachsen auf CO und Synthesegas und produzieren daraus als Endprodukt Acetat, in dem CO zunächst zu CO₂ oxidiert wird. Zwei Mol des entstehenden CO₂ werden dann zu Acetat reduziert. Dieser CO₂-Fixierungsweg ist der energetisch günstigste der heute bekannten sieben Wege der CO₂-Fixierung und in acetogenen Bakterien erlaubt er sogar die Synthese von ATP; Acetogenese ist damit der einzige CO₂-Fixierungsweg, der mit Netto-ATP-Synthese einhergeht.

Einige acetogene Bakterien produzieren neben Acetat auch (geringere Mengen an) Ethanol, Butanol bis hin zu Hexanol; diese eignen sich ganz besonders gut, um Treibhausgase zu Biotreibstoffen umzuwandeln. Allerdings sind acetogene Bakterien energetisch sehr limitiert und können nur wenige Stoffe, deren Herstellung nicht viel ATP benötigt, produzieren und diese dann auch nur in geringen Mengen. Um das Portfolio der aus Kohlenmonoxid und Synthesegas produzierbaren Wertstoffe zu erhöhen, wurden in diesem Verbundprojekt im wesentlichen zwei Ziele verfolgt: die Isolierung neuer thermophiler acetogener Bakterien mit neuen (Produktbildungs-) Eigenschaften und die Schaffung neuer Biosynthesewege zur Herstellung interessanter Wertstoffe in bekannten thermophilen Acetogenen durch *metabolic engineering*. In diesem Kontext war dieses Teilprojekt angesiedelt: die Aufklärung der Biochemie und der Bioenergetik der Stoffwechselwege in den bekannten thermophilen acetogenen Bakterien *Moorella thermoacetica* und *Thermoanaerobacter kivui* und in den Neuisolaten.

2. Ablauf des Vorhabens

Die wesentlichen Ziele/Meilensteine der im Antrag beschriebenen Arbeitspakete wurden erreicht. Durch die Corona-Pandemie verzögerten sich dabei einige Arbeiten, so dass eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung notwendig und im September 2022 bewilligt wurde. Die Arbeitsschritte und Ergebnisse sind im Schlussbericht Teil II (Eingehende Darstellung) im Detail dargestellt. Im Teilvorhaben B) wurden bisher 7 Manuskripte in wissenschaftlichen Fachzeitschriften publiziert. Die Ergebnisse wurden weiterhin auf nationalen wie internationalen Konferenzen vorgestellt, soweit es die Pandemie erlaubte.

3. Wesentliche im Projekt erzielte Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Das Teilprojekt B hatte intensive Zusammenarbeiten mit den Gruppen aus Göttingen und Rostock und regelmäßigen Austausch mit der Gruppe aus Tübingen. Im Verbundprojekt wurden neue thermophile, CO-verwertende acetogene Bakterien isoliert. Im Teilprojekt B haben wir die Biochemie und Bioenergetik der Acetogenese und Nutzung neuer alternativer Elektronenakzeptoren in den bekannten Arten *T. kivui* und *M. thermoacetica* noch detaillierter aufgeschlüsselt und begonnen, die Biochemie und Bioenergetik eines Neuisolates zu untersuchen. In *T. kivui* wurde die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase gereinigt und charakterisiert und steht nun als Hilfsenzym für die enzymatische Ferredoxin-Reduktion zur Verfügung. Die Elektronenüberträger-Spezifitäten aller anderen Redoxenzyme wurde aufgeklärt, mit Ausnahme der Methylen-THF-Reduktase. Alle vier im Genom kodierten potentiellen Ferredoxine wurden gereinigt und charakterisiert und deren Redoxpotentiale wurden bestimmt; nur zwei der potentiellen Ferredoxine interagierten mit den Ferredoxin-abhängigen Enzymen aus *T. kivui* und stehen damit als Elektronenüberträger für *in vitro*-Assays zur Verfügung. Das CO-oxidierende Enzym wurde genetisch und biochemisch als CooS erkannt. Durch diese Untersuchungen haben wir das bioenergetische Modell von *T. kivui* noch weiter verbessern können. Für *M. thermoacetica* wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) als alternativer Elektronenakzeptor erkannt. Interessanterweise werden CO₂ und DMSO simultan reduziert, wodurch der Energieladungszustand der Zellen auch während der CO₂-Reduktion erhöht und die Bildung ATP-intensiverer Produkte möglich wird. Eine NADP-reduzierende Hydrogenase, die auch DMSO reduziert, wurde erkannt, gereinigt und charakterisiert. Obwohl die respiratorischen Enzyme in *M. thermoacetica* noch nicht bekannt sind, konnten wir durch unsere Untersuchungen erste bioenergetische Modell aufstellen. In einem Neuisolat aus der Göttinger Gruppe haben wir die CO-abhängige Wasserstoffbildung als energiekonservierenden Prozess erkannt.



Sachbericht

Teil II: Eingehende Darstellung

Mikrobielle Biofabriken:

ThermoSynCon – Entwicklung thermophiler Mikroorganismen als Biokatalysatoren für die Umwandlung von Synthesegas zu Biobrennstoffen und Chemikalien (Teilvorhaben B)

Biochemie und Bioenergetik thermophiler Acetogener

Zuwendungsempfänger: Goethe-Universität Frankfurt

Ausführende Stelle: Goethe-Universität Frankfurt, Institut für molekulare Biowissenschaften, Molekulare Mikrobiologie und Bioenergetik, Prof. Dr. Volker Müller, Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt

Projektleitung: Prof. Dr. Volker Müller

Förderungskennzeichen: 031B0857B

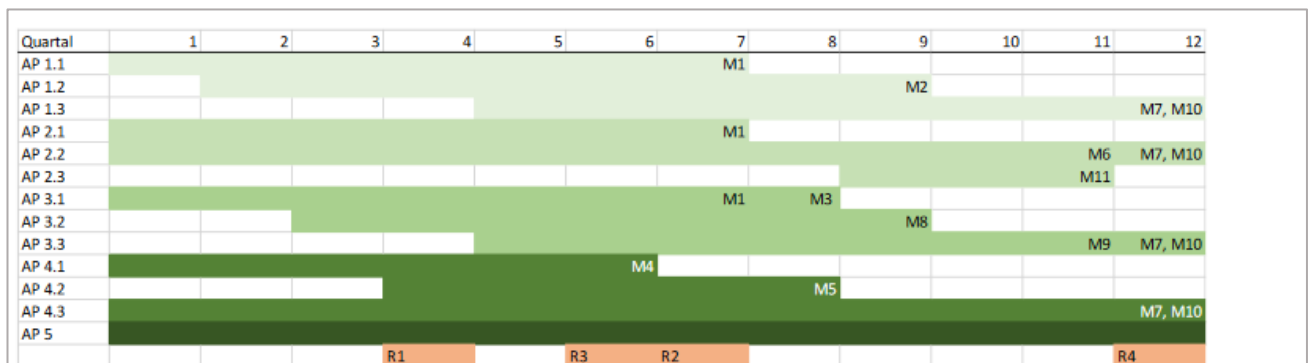
Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2020 – 31.12.2023

Verfasser des Schlussberichtes/Sachberichtes: Prof. Dr. Volker Müller

Ein Verbundvorhaben im Rahmen der BMBF-Fördermaßnahme „Mikrobielle Biofabriken für die industrielle Bioökonomie. Neuartige Plattformorganismen für innovative Produkte und nachhaltige Bioprozesse“. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse

In dem Verbundprojekt sollten neue Kohlenmonoxid-verwertende, anaerobe Bakterien isoliert werden, die besser wachsen und /oder andere Produkte synthetisieren als die bekannten. Zusätzlich sollten die bisher bekannten thermophilen acetogenen Bakterien *Thermoanaerobacter kivui* und *Moorella thermoacetica* biochemisch und bioenergetisch besser charakterisiert werden. Übergeordnetes Ziel war die Evaluierung dieser Organismen als Plattformorganismen für eine neue biotechnologische Synthesegas-Verwertung. Zur Klärung dieser komplexen Frage wurde ein divers aufgestelltes Konsortium mit unterschiedlichen Expertisen zusammengestellt; die Aufgabenverteilung zwischen den Partnern ist im Gantt-Chart (Abb. 1) dargestellt. Unsere Gruppe hat die APs 2.1 - 2.3 bearbeitet:



Erläuterung zur Meilensteinplanung

M1 30 Isolate thermophiler acetogener Bakterien

M2 (Meta)genomsequenzierungen abgeschlossen

M3 Initiale physiologische Charakterisierung 30 neuer Isolate thermophiler acetogener Bakterien abgeschlossen

M4 Abgeschlossene Entwicklung der Reaktortechnologie

M5 Abgeschlossene Evaluierung des Potentials 6 thermophiler Acetogener im Bioreaktor

M6 Abgeschlossene Messung der Schlüsselenzyme von *T. kivui*, *M. thermoacetica* und neuer Isolate

M7 Abgeschlossene Systembiologie der genetisch veränderten Stämme

M8 Etablierung genetischer Methoden für 1–2 Isolate oder 1 Isolat und *M. thermoacetica*

M9 Entwicklung von 2 genetisch veränderten Stämmen abgeschlossen

M10 Abgeschlossene Evaluierung des Potentials der genetisch veränderten thermophilen Acetogenen im Bioreaktor

M11 Bioenergetische Modelle für *T. kivui*, *M. thermoacetica* und mind. 1–2 Isolate

Abb. 1. Ablaufplan inklusive Meilensteine für alle Partner im Gesamtprojekt. Ursprüngliche Meilensteinplanung für das Verbundvorhaben ThermoSynCon. AP 2 (2.1.-2.3) wurde vom Partner AG Müller, Goethe Universität Frankfurt bearbeitet.

Das Teilvorhaben B) wurde im Antrag als Arbeitspaket 2 beschrieben und gliederte sich in drei Untervorhaben:

AP2.1: Anreicherung, Isolierung und physiologische Charakterisierung neuer thermophiler acetogener Syngas-Fermentierer

AP2.2: Biochemische Charakterisierung von *Thermoanaerobacter kivui* und *Moorella thermoacetica* und von im Rahmen des Projektes neu isolierter thermophiler Syngas-Fermentierer

AP2.3: Aufstellung bioenergetischer Modelle von *Thermoanaerobacter kivui* und *Moorella thermoacetica* und von im Rahmen des Projektes neu isolierter thermophiler Syngas-Fermentierer

Die Zuwendungen wurden entsprechend der Zielsetzung im Projektantrag eingesetzt. Corona-bedingt ergaben sich Verzögerungen im Projektablauf, so dass eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung notwendig wurde, um die Arbeiten in den Arbeitspaketen 2.1–2.3 und im Konsortium erfolgreich abzuschließen. Im Folgenden werden die Arbeitspakete inklusive der Zielstellung und der Ergebnisse dargestellt. Projektrelevante Veröffentlichungen sind im Text mit [Zahl], allgemeine Referenzen mit (Autor(en), Jahr) zitiert.

AP 2.1: Anreicherung, Isolierung und physiologische Charakterisierung neuer thermophiler Syngas-Fermentierer

Die Anreicherung neuer, thermophiler Synthesegasverwerter sollte parallel in den Gruppen aus Rostock, Göttingen und Frankfurt erfolgen. In Frankfurt wurde versucht, CO-Verwerter aus Sediment des Kätcheslachparks und aus Böden zu isolieren, ohne Erfolg. Da die Gruppen aus Rostock und Göttingen mehr Expertise auf diesem Gebiet hatten, haben wir uns in Frankfurt vor allem auf unsere Expertise konzentriert, die beiden nächsten Arbeitspakete. In Göttingen und Rostock wurden erst sehr spät neue Isolate erhalten, und in Frankfurt haben wir dann mit der physiologischen und biochemischen Charakterisierung der Isolate begonnen; die Arbeiten sind aber noch nicht abgeschlossen.

AP2.2: Biochemische Charakterisierung von *Thermoanaerobacter kivui* und *Moorella thermoacetica* und von im Rahmen des Projektes neu isolierter thermophiler Syngas-Fermentierer

Für die Erstellung eines bioenergetischen Modells der Acetogenese aus $H_2 + CO_2$ oder CO oder Syngas, aber auch aus Kohlenhydraten ist die Kenntnis der im Stoffwechsel verwendeten Elektronenüberträger essentiell. Dazu haben wir Untersuchungen in zellfreien Extrakten und mit isolierten Enzymen vorgenommen. Weiterhin ist der Stoffwechsel acetogener Bakterien stark energielimitiert, so dass die Bildung „energiebedürftiger“ Produkte wie z. B. Aceton oder auch das komplexe Bioplastik in großen Mengen unmöglich ist. Daher haben wir versucht, die energetischen

Barrieren durch Zugabe zusätzlicher externer Elektronenakzeptoren zu umgehen (Rosenbaum und Müller, 2023).

Thermoanaerobacter kivui. Dieses acetogene Bakterium setzt Hexosen über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMPW) um. Die einzige Redoxreaktion in diesem Weg ist die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, die in unterschiedlichen Mikroorganismen verschiedene Elektronenakzeptoren nutzt. Um den Elektronenakzeptor dieses Enzyms in *T. kivui* zu identifizieren, haben wir Zellen auf Glukose angezogen, in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet und einen Zellextrakt hergestellt. Dieser Zellextrakt war in der Lage, Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu oxidieren; als einziger Elektronenakzeptor wurde NAD^+ genutzt, NADP^+ wurde nur mit 4% der Aktivität genutzt und Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum* wurde gar nicht genutzt [1]. Das im EMPW gebildete Pyruvat wird dann durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) zu Acetyl-CoA und CO_2 umgewandelt. Die PFOR ist aber auch ein Schlüsselenzym für das Wachstum auf C_1 -Verbindungen wie CO_2 oder CO, da sie das über den Wood-Ljungdahl-Weg (WLW) gebildete Acetyl-CoA zu Pyruvat umwandelt und dieses dann in die zentralen Biosynthesewege einschleust. Die PFOR aus Glukose-gezogenen Zellen haben wir bis zur apparenten Homogenität gereinigt und eingehend biochemisch charakterisiert [1]. Durch *peptide mass fingerprinting* haben wir einzelne Peptidfragmente erzeugt und deren Sequenz bestimmt. Mit dieser Sequenzinformation war es eindeutig möglich, *pfor1* als das kodierende Gen zu identifizieren. *pfor1* ist ein solitäres Gen und bildet keine transkriptionelle Einheit mit anderen Genen. Die PFOR nutzt Pyruvat als Elektronendonator und Methylenblau oder Ferredoxin (isoliert aus *Clostridium pasteurianum*) als Elektronenakzeptoren; die Aktivitäten betragen 1,8 U/mg bzw. 27,2 U/mg, waren also mit dem natürlichen Elektronenakzeptor 15fach höher als mit dem artifiziellen. Die Reaktion war abhängig von Thiaminpyrophosphat, Pyruvat, Coenzym A und Ferredoxin. Die pH und Temperaturoptima waren 7,5 und 66 °C. Die chemische Analyse ergab 13,6 Mol Eisen pro Mol Enzym, im Einklang mit der aus der Sequenz vorhergesagten Anzahl von zwei [4Fe-4S]-Zentren [2]. Die Tatsache, dass das Enzym Ferredoxin reduziert, macht es zu einem interessanten Kandidaten für die *in vitro*-Reduktion von Ferredoxin, z. B. für die Bereitstellung von reduziertem Ferredoxin für enzymatische Reduktionen, z. B. von Carbonsäuren zu Aldehyden (Nissen et al., 2024). Daher haben wir nach einem Weg gesucht und gefunden, um das Enzym heterolog zu produzieren und in einem ein-Schritt-Verfahren in großen Ausbeuten zu reinigen. Dazu haben wir das Gen mit einer für eine Flagge kodierenden DNA-Sequenz versehen. Dieses Konstrukt wurde durch ein von der Universität Rostock etabliertes Verfahren in *T. kivui* eingebracht und die Gene wurden dort exprimiert (Basen et al., 2018). Das produzierte Protein konnte dann tatsächlich über die eingebrachte Flagge von sechs Histidin-Resten in einem Schritt über eine Nickel-Matrix bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Das homolog produzierte Enzym hatte die gleichen katalytischen Eigenschaften wie

das nativ gereinigte. Damit haben wir ein Verfahren zur schnellen Herstellung von PFOR aus einem thermophilen Bakterium etabliert.

Im WLW gibt es vier Redoxreaktionen, von zwei Enzymen aus *T. kivui* waren die Elektronenakzeptoren bereits bekannt. So nutzt die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase (CODH/ACS) Ferredoxin als Elektronenüberträger und die Wasserstoff-abhängige CO₂-Reduktase (HDCR) nutzt gasförmigen Wasserstoff (Schuchmann und Müller, 2013; Dietrich et al., 2022). Zur Klärung der Elektronenüberträger-Spezifitäten der anderen Enzyme wurden Zellen von *T. kivui* auf Glukose angezogen, in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, gewaschen und in der French-Press-Zelle aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die Aktivitäten der betreffenden Enzyme im Zellextrakt überprüft [2]. Die Methylen-THF-Dehydrogenase oxidiert Methylen-THF, was aus Formaldehyd und THF durch eine spontane, nicht enzymatische Reaktion hergestellt wird. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Elektronenakzeptoren gestartet. Dabei wurde NADP⁺ mit einer Aktivität von 24,4 U/mg reduziert. Die Reduktion von NAD⁺ oder Ferredoxin (aus *Clostridium pasteurianum*) war vernachlässigbar gering. Damit war NADP⁺ als Elektronenüberträger der Methylen-THF-Dehydrogenase identifiziert [2].

Eine der größten Unsicherheiten in der Beschreibung der bioenergetischen Parameter ist zur Zeit noch die Methylen-THF-Reduktase (MTHFR). Auf Grund genomischer und biochemischer Analysen haben wir vier Klassen von MTHFRs postuliert, die sich in ihrer Untereinheitenzusammensetzung und der Elektronenüberträgerspezifität unterscheiden. Die Reduktion von Methylen-THF mit H₂ oder NADH ist ausreichend exergon, um damit Energie zu konservieren. Typ I- und III-MTHFRs nutzen NADH als Reduktant, diese Enzyme sind aber löslich und nicht direkt in Energiekonservierung involviert (Öppinger et al., 2022). Sie zeigen auch keine Ferredoxin-Reduktion (über Elektronenbifurkation) und sind daher auch nicht indirekt über die Bereitstellung von reduziertem Ferredoxin an der Energiekonservierung beteiligt. Eine mögliche Beteiligung von Typ IV-MTHFR's an der Energiekonservierung, entweder direkt als finales Enzym eines membranständigen Elektronentransports oder indirekt über Elektronenbifurkation, ist Gegenstand von Diskussion und aktiver Forschung und nicht abschließend geklärt. Die MTHFR von *T. kivui* gehört zur Klasse II der MTHFRs und wird durch die Gene *metV* und *metF* kodiert (Hess et al., 2014). Diese Enzyme können weder NADH noch NADPH als Reduktant nutzen; für das Enzym aus *Clostridium formicoaceticum* wurden FADH₂ und reduziertem Ferredoxin als Reduktanten bestimmt (Öppinger et al., 2022). Da der Nachweis einer möglichen Beteiligung von Ferredoxin als Elektronenüberträger im zellfreien Extrakt nicht möglich ist, haben wir das Enzym aus *T. kivui* gereinigt.

Für die Reinigung der MTHFR haben wir auf das oben beschriebene System [1] zur homologen Produktion von Proteinen in *T. kivui* zurückgegriffen. Wir haben zunächst die Gene *metV* und *metF* kloniert, die Expression unter die Kontrolle des S-Layer-Promotors gebracht und *metF* mit einer Sequenz für eine Flagge aus zehn Histidin-Resten versehen, das Konstrukt in *T. kivui* transformiert, die Gene exprimiert und den Komplex über die angebrachte Flagge über Affinitätschromatographie an einer Nickel-Matrix gereinigt. Der gereinigte Komplex enthielt MetV und MetF und katalysierte die Methylviologen-abhängige Reduktion von Methylen-THF mit einem Optimum bei pH 7 und 66 °C. Der Komplex konnte weder NADPH noch NADH als Reduktanten nutzen, auch nicht in Gegenwart von Ferredoxin; eine Elektronenbifurkation auf Ferredoxin konnte nicht nachgewiesen werden. Auch die Rückreaktion war nicht an die Reduktion von NADP⁺, NAD⁺ oder Ferredoxin gekoppelt. Der einzige Elektronenüberträger, der für die Reduktionsreaktion genutzt wurde, war reduziertes Ferredoxin [2]. Damit reihte sich die MTHFR aus *T. kivui* ein in die Reihe anderer Typ II-MTHFRs, für die nur reduziertes Ferredoxin als Elektronenüberträger gefunden wurde. Ob dies tatsächlich der physiologische Elektronendonator ist, ist zweifelhaft. Für unsere bioenergetischen Modelle gehen wir z. Z. davon aus, dass reduziertes Ferredoxin der Elektronendonator für einen membranständigen Elektronentransport mit der MTHFR als Elektronenakzeptor ist; dies bleibt allerdings experimentell zu bestätigen.

Mit der Verwendung von NADPH als Elektronendonator für die Methylen-THF-Dehydrogenase stellte sich die Frage, wie NADP⁺ reduziert wird. Eine Möglichkeit ist über eine Elektronen-bifurkierende NAD⁺-abhängige NADPH-Ferredoxin Oxidoreduktase. Tatsächlich katalysierte der Rohextrakt die NADPH-abhängige Reduktion von NAD⁺, aber nur in Gegenwart von Ferredoxin. Die Aktivität war 40 mU/mg und in Abwesenheit von Ferredoxin konnte keinerlei NADPH-Oxidation nachgewiesen werden. Der Nachweis einer elektronenbifurkierenden Transhydrogenaseaktivität deckt sich mit der Anwesenheit von Genen für eine Nfn-Typ Transhydrogenase im Genom von *T. kivui* (Hess et al., 2014). Die Nfn-Transhydrogenase ist notwendig für die Redox-Balance während des Wachstums auf Glukose [2] (Abb. 1A).

Bei Wachstum auf H₂ + CO₂ ist die Situation anders, da Wasserstoff die ultimative Quelle von Elektronen ist. Genomanalysen zeigten die Anwesenheit von Genen für eine Elektronen-bifurkierende Hydrogenase, deren Elektronenüberträger-Spezifität aber nicht aus den Sequenzdaten abgelesen werden kann. Daher haben wir die kodierenden Gene kloniert und nach obigem Schema den Hydrogenase-Komplex in *T. kivui* produziert und gereinigt. Dadurch wurde das Enzym 424-fach bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das Enzym enthielt alle vorhergesagten Untereinheiten und katalysierte die H₂-abhängige Methylviologen-Reduktion mit 7596 U/mg. Das Enzym enthielt

experimentell bestätigt alle vorhergesagten Eisen- und Schwefel-Atome ([2], Katsyv et al., 2023). Im Gegensatz zur entsprechenden Hydrogenase aus *A. woodii* konnte die Hydrogenase aus *T. kivui* aber nicht NAD^+ , sondern nur NADP^+ mit H_2 als Elektronendonator reduzieren (Schuchmann und Müller, 2012, [2]). Dazu war aber die Anwesenheit von Ferredoxin unbedingt notwendig, ohne Ferredoxin im Test wurde NADP^+ nicht reduziert. Spektroskopische Analysen belegten, dass NADP^+ und Ferredoxin simultan reduziert wurden [2]. Die elektronenbifurkierende Hydrogenase aus *T. kivui* nutzt also NADP^+ , nicht NAD^+ , wodurch bei Wachstum auf $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ die Versorgung der Methylen-THF-Dehydrogenase mit NADPH gewährleistet wird.

T. kivui ist hervorragend geeignet als industrielle Plattform zur Umsetzung von Kohlenmonoxid oder Syngas. Allerdings war das Enzym, das das Substrat CO oxidiert, unbekannt. Im Genom sind die CODH/ACS und eine monofunktionale CO-Dehydrogenase, *CooS*, kodiert. Allgemein wird angenommen, dass die CODH/ACS eine anabole und die *CooS* eine katabole Funktion hat. Um dies zu überprüfen, haben wir versucht, das Gen für die CODH des CODH /ACS-Komplexes (*acsA*) zu deletieren, allerdings ohne Erfolg. Daher müssen wir davon ausgehen, dass *acsA* unter allen getesteten Wachstumsbedingungen essentiell ist. Die Deletion der *cooS* verlief dagegen problemlos und erfolgreich. Die Deletionsmutante wuchs nicht mehr auf CO, katalysierte aber noch CO-Dehydrogenase-Aktivität, wahrscheinlich durch die *AcsA* [3]. Damit war der Beweis erbracht, dass *CooS* für die Oxidation des Substrates CO essentiell ist.

Ferredoxin spielt eine entscheidende Rolle als Elektronenüberträger in der Acetogenese und wird als Elektronenüberträger in der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase-Reaktion sowie der Entwicklung und Oxidation von Wasserstoff und der damit einhergehenden Energiekonservierung genutzt und als Elektronenüberträger für die PFOR. Für unsere Enzymtests haben wir, wie andere in dem Feld auch, immer das Ferredoxin aus dem mesophilen Bakterium *Clostridium pasteurianum* isoliert und genutzt. Da dieses bei höheren Temperaturen, wie 60°C , die in Enzymtests mit Enzymen aus *T. kivui* verwendet werden, weniger aktiv ist, war es natürlich wünschenswert, die Ferredoxine/das Ferredoxin aus *T. kivui* zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Eine Inspektion der Genomsequenz ließ vier potentielle, Ferredoxin-kodierende Gene erkennen (TKV_c09620, TKV_c16450, TKV_c10420 und TKV_c19530). Die vier Gene wurden jeweils mit einer Sequenz, die für eine Histidin-Flagge kodiert, versehen und in *T. kivui* bzw. *Escherichia coli* exprimiert. Die produzierten Proteine wurden über Affinitätschromatographie gereinigt. Der bestimmte Eisen- und Schwefelgehalt stimmte überein mit der Vorhersage, dass TKV_c09620 und TKV_c19530 je zwei 4Fe-4S-Zentren enthalten und TKV_c16450 und TKV_c10420 jeweils eins. Alle vier Proteine zeigten

die für Ferredoxine typischen Absorptionseigenschaften. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Ross Milton, Genf, haben wir die Redoxpotentiale bestimmt zu -386 ± 4 mV, -386 ± 2 mV, -559 ± 10 mV und -557 ± 3 mV für TKV_c09620, TKV_c16450, TKV_c10420 bzw. TKV_c19530. Überprüfungen mit gereinigten Enzymen ergaben, dass TKV_c09620 und TKV_c16450 als Elektronenüberträger von verschiedenen Oxidoreduktasen aus dem acetogenen Stoffwechselweg genutzt werden konnten, während dies für TKV_c10420 bzw. TKV_c19530 nicht der Fall war. Um die physiologische Rolle der untersuchten Ferredoxine zu überprüfen, wurden die entsprechenden Gene jeweils deletiert und der Phänotyp der Mutanten wurde studiert. Die Effekte waren überschaubar, nur das Wachstum aller Mutanten auf Pyruvat oder $H_2 + CO_2$ war leicht retardiert. Eine spezifische Funktion eines bestimmten Ferredoxins war aus diesen Untersuchungen aber nicht zu erkennen. Transkriptionsanalysen belegten dann, dass die Expression von TKV_c09620 in der TKV_c16450-Deletionsmutante erhöht war. Gleichzeitig war die von TKV_c16450 in der TKV_c09620-Deletionsmutante erhöht. Daraus haben wir gefolgert, dass sich TKV_c16450 und TKV_c09620 gegenseitig ersetzen können. Obwohl wir sehr viele Anstrengungen unternommen haben, konnten wir nicht beide Gene, TKV_c16450 und TKV_c09620, gleichzeitig deletieren, woraus wir folgern müssen, dass die Anwesenheit eines dieser Ferredoxine für das Wachstum essentiell ist. Diese Arbeit wurde ebenfalls veröffentlicht [4].

Wachstum unter Produktionsbedingungen geht für Bakterien häufig mit osmotischem Stress einher. Unsere Arbeitsgruppe hat langjährige Erfahrungen in der Untersuchung von osmotischem Stress in unterschiedlichen Bakterien und Archaeen. Die allermeisten Bakterien und Archaeen reagieren auf erhöhten osmotischen Stress mit der Einlagerung von osmotisch aktiven Teilchen, sogenannten kompatiblen Soluten (Zeidler und Müller, 2019). Diese Solute sind organischer Natur und mit dem Stoffwechsel kompatibel, obwohl sie in molaren Konzentrationen in der Zelle angehäuft werden. Die Anhäufung geschieht entweder durch Aufnahme aus dem Medium, wie typischerweise Glycinbetain, oder durch Neusynthese. Bei den synthetisierten Verbindungen unterscheiden wir Verbindungen aus unterschiedlichen Stoffklassen. Diese sind entweder Zucker und Zuckerderivate, Aminosäuren und Aminosäurederivate sowie Ectoine (Zeidler und Müller, 2019). Bei (hyper)thermophilen Organismen werden zum Teil recht ungewöhnliche Verbindungen wie di-myo-Inositol-1,1-Phosphat oder Mannosylglyceramid gefunden. Um die Osmotoleranz von *T. kivui* zu testen, haben wir zunächst Wachstumsexperimente in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an NaCl in mineralischer Nährlösung gemacht. Wachstum wurde bis 600 mM NaCl beobachtet; je höher die NaCl-Konzentration war, desto länger war die Anlaufphase und desto kleiner war die Wachstumsrate. Wir haben dann Zellen in Gegenwart von 600 mM NaCl angezogen, Zellen in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase

geerntet, die Zellen aufgeschlossen, kompatible Solute durch Standardverfahren extrahiert und dann die Extrakte durch NMR auf Vorhandensein von Soluten überprüft; die NMR-Analysen wurden von Frau Prof. Helena Santos, Oeiras, Portugal, mit der wir ein langjährige fruchtbare Zusammenarbeit haben, durchgeführt. Salzabhängig wurden geringe Mengen an Acetat (ungewöhnlich) und Glutamat (gewöhnlich) gefunden, aber vor allem eine neue Verbindung, deren Strukturaufklärung uns immer noch beschäftigt. Diese Verbindung besteht augenscheinlich aus Glutamat und Alanin, die aber nicht-peptidisch miteinander verbunden sind. Um Hinweise auf die Struktur zu erhalten und, vor allem, den Biosyntheseweg aufzuklären, haben wir gehofft, über Transkriptionsanalysen zusammen mit der Göttinger Gruppe die für die Biosynthese kodierenden Gene zu finden. Dies ist uns aber leider nicht gelungen; eine NaCl-abhängige Änderung des Transkriptprofils war leider nicht eindeutig zu erkennen, alle beobachteten Änderungen waren eher im Grundrauschen. Diese Arbeiten werden weiter fortgeführt und zur Zeit versuchen wir, die Verbindung chemisch zu synthetisieren und damit einen Standard für die Strukturaufklärung zu haben.

Moorella thermoacetica. Einer der limitierenden Faktoren bei der Herstellung von höherwertigen Verbindungen aus $H_2 + CO_2$ oder Syngas durch acetogene Bakterien sind die geringen Energieausbeuten (Katsyv und Müller, 2020). Jede zusätzliche Art der Energiekonservierung erhöht signifikant den zellulären Energiespiegel und kann damit das Produktspektrum acetogener Bakterien erweitern. Leider kann *T. kivui* keine alternativen Elektronenakzeptoren sondern ausschließlich CO_2 nutzen. Für *M. thermoacetica* wurde in einer Abstraktsammlung einer Konferenz in 1991 beschrieben, dass es Dimethylsulfoxid (DMSO) als alternativen Elektronenakzeptor nutzen kann; experimentelle Daten waren in dem Abstrakt allerdings nicht enthalten (Beaty und Ljungdahl, 1991). Wir haben an diesen alten Befund angeknüpft und zunächst die Beobachtung bestätigt und dann im Detail analysiert. Wachstum auf $H_2 + CO_2$ und auf Glucose wurden tatsächlich durch DMSO stimuliert und DMSO konnte CO_2 ersetzen. Damit war der Beweis einer energiekonservierenden DMSO-Reduktion in *M. thermoacetica* erbracht. DMSO und CO_2 wurden von *M. thermoacetica* simultan reduziert und die Anwesenheit von DMSO verschob das Produktspektrum; wie erwartet, wurde in Gegenwart von DMSO weniger Acetat gebildet. Die Bildung von Laktat war nicht beeinflusst. Ob die Zunahme der optischen Dichte in Gegenwart von DMSO tatsächlich auf eine membranständige Art der Energiekonservierung (DMSO-Atmung) zurückzuführen ist, wurde an Präparationen von Cytoplasmamembranen untersucht. Dazu wurden Zellen auf Glukose + DMSO angezogen, Membranen wurden präpariert und auf DMSO-Reduktase-Aktivität überprüft. Tatsächlich wurde diese gefunden, nur 13% der Aktivität war im löslichen Cytoplasma zu finden. Eine Inspektion der Genomsequenz ließ dann potentielle Gene, deren Produkte an der DMSO-Reduktion beteiligt sein

könnten, erkennen. DMSO-regulierte Gene haben wir dann in einer Zusammenarbeit mit der Göttinger Gruppe über eine Transkriptomanalyse identifiziert. Diese Analysen erlaubten den Vorschlag eines Arbeitsmodells für die Biochemie der DMSO-Reduktion in *M. thermoacetica*. Weiterhin legen die Experimente den Grundstein zur Verbesserung der Energetik mit dem Ziel, höherwertige Verbindungen zu produzieren [5].

In einer nicht veröffentlichten Masterarbeit haben wir den Laktatstoffwechsel von *M. thermoacetica* für weitere Untersuchungen zur DMSO-Reduktion genutzt. Beim Laktatstoffwechsel in *M. thermoacetica* wird Laktat zu Pyruvat durch eine NAD⁺-abhängige Laktatdehydrogenase oxidiert. Dies ist thermodynamisch ungünstig, da das Redoxpaar Pyruvat/Laktat ($E_0' = -190$ mV) keine Reduktion von NAD⁺ zu NADH ($E_0' = -320$ mV) zulässt. Um die Reaktion dennoch *in vivo* zu ermöglichen, nutzt *M. thermoacetica* einen Elektronen-bifurkierenden Enzymkomplex, EtfABCX, welcher NADH oxidiert und simultan Ferredoxin und Menachinon-7 reduziert, und somit die intrazelluläre Konzentration an NADH verringert (Rosenbaum et al., 2021). Menachinon-7 könnte als Elektronendonator für die MTHFR dienen, wie es auch für die MTHFR von *Sporomusa ovata* postuliert ist (Kremp et al., 2022). Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde *M. thermoacetica* auf Laktat in Gegenwart von DMSO kultiviert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Zellen weiterhin in der Lage sind, sowohl in CO₂/HCO₃⁻-freiem- als auch CO₂/HCO₃⁻-haltigen Komplexmedium Laktat zu oxidieren und DMSO zu reduzieren. Da im Laktatstoffwechsel zwingend der membranständige Elektronenakzeptor Menachinon-7 reduziert wird, kann vermutet werden, dass dieser als Elektronendonator für die DMSO-Reduktase dient. Dies wird unterstützt durch biochemische Analysen. Die DMSO-Reduktaseaktivität war in Zellen, die in Anwesenheit von Laktat + DMSO wuchsen, erhöht (Enzmann, 2024). Gegenwärtig führen wir in Kooperation mit der Göttinger Gruppe Genexpressionsstudien im Rahmen einer Transkriptomanalyse durch, um Einblicke zu erlangen, wie sich die Genexpression im Laktatstoffwechsel in Gegenwart von DMSO ändert.

Anreicherung und Charakterisierung einer nicht-elektronenbifurkierenden NADP⁺-reduzierenden Hydrogenase. Im Genom von *M. thermoacetica* sind zwei cytoplasmatische Hydrogenasen kodiert; eine trimere Elektronen-bifurkierende Hydrogenase und eine hexamere Hydrogenase, die als NADP⁺-abhängig annotiert ist (Pierce et al., 2008). Diese Hydrogenasen sind essenziell im autotrophen Stoffwechsel von *M. thermoacetica*, da sie die H₂-abhängige Reduktion der physiologischen Elektronenakzeptoren NAD⁺, NADP⁺ und Ferredoxin katalysieren (Huang et al., 2012). Im Gegensatz zur Elektronen-bifurkierenden Hydrogenase war die hexamere Hydrogenase nicht charakterisiert. Genexpressionsanalysen zeigten, dass die Gene unter autotrophen Bedingungen verstärkt exprimiert

wurden. Allerdings war der Zellertrag unter autotrophen für eine Aufreinigung des Enzyms zu gering. Wir haben uns daher zunächst angeschaut, unter welchen Wachstumsbedingungen diese Hydrogenase-Gene noch exprimiert werden. Hierbei zeigte sich, dass bei Wachstum auf Glukose + DMSO in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -freiem Komplexmedium die NADP^+ -reduzierende Hydrogenase verstärkt exprimiert wurde, während das Transkriptlevel der Elektronen-bifurkierenden Hydrogenase reduziert war. Somit bot diese Wachstumskondition die Grundvoraussetzung für die chromatographische Aufreinigung des Enzyms. Die NADP^+ -reduzierende Hydrogenase wurde über verschiedene chromatographische Aufreinigungsschritte erfolgreich bis zur apparenten Homogenität angereichert. Durch *peptide mass fingerprinting* haben wir einzelne Peptidfragmente erzeugt und deren Sequenz bestimmt. Mit dieser Sequenzinformation war es eindeutig, dass wir die hexamere Hydrogenase aufgereinigt haben. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Hydrogenase eine molekulare Masse von 389 kDa hat und diese eine hexadimere Architektur besitzt. Auch die spektroskopisch bestimmte Menge an enzymgebundenen Eisen von 58 Mol und einem Mol FMN stimmten mit der bioinformatischen Analyse überein. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass nur NADP^+ als physiologischer Elektronenakzeptor genutzt wurde. Das pH- und Temperaturoptimum lagen bei pH 8 bzw. 60 °C, der K_m für NADP^+ betrug 0,086 mM. Erstaunlicherweise war die Untereinheitenzusammensetzung der aufgereinigten Hydrogenase sehr ähnlich der der Elektronen-bifurkierenden Hydrogenasen. So ist z. B. das Bifurkationsmodul HydBC vorhanden. Warum das Enzym trotzdem keine Elektronenbifurkation katalysiert, kann z. Z. nicht beantwortet werden und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Wir postulierten, dass die fehlende Elektronenbifurkation auf die zusätzlichen Untereinheiten HydDEF in der NADP^+ -reduzierenden Hydrogenase zurückzuführen sein muss [6].

Neue *Moorella*-Stämme. Im Rahmen des Projektes wurden im letzten Jahr doch noch neue thermophile CO-Verwerter angereichert, die alle zur Gattung *Moorella* gehören und von denen wir *Moorella carbonis* gegenwärtig im Labor untersuchen. *M. carbonis* ist ein carboxydotropher Mikroorganismus, der CO zu $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ umsetzt (Böhr et al., 2024). Wir haben zunächst dieses neue Isolat bei uns im Labor in Kultur genommen und mit physiologischen Untersuchungen zum Fruktosestoffwechsel begonnen. Im Rohextrakt, Cytoplasma und in den Membranen wurden die Aktivitäten der Formiatdehydrogenase, CO-Dehydrogenase, H_2 -abhängigen NADP^+ -Reduktion und H_2 -abhängigen Benzylviologenreduktion gemessen. Hierbei konnten wir beobachten, dass die Formiatdehydrogenaseaktivität nicht NAD(P)^+ -abhängig war, sondern nur der artifizielle Elektronenakzeptor Benzylviologen nach Zugabe von Formiat reduziert wurde. Die Aktivität der Formiatdehydrogenase wurde im Rohextrakt und Cytoplasma gefunden, was die Hypothese einer löslichen Formiatdehydrogenase bestätigt. Im Genom von *M. carbonis* konnten die Gene für eine

putative Elektronen-bifurkierende Formiatdehydrogenase gefunden werden. Weitergehende biochemische Studien müssen nun diese Hypothese bestätigen. Anders als *M. thermoacetica* besitzt *M. carbonis* neben einer cytoplasmatischen vermutlich auch eine an den Ech-Komplex gebundene CO-Dehydrogenase. Enzymaktivitätsmessungen mit CO als Elektronendonator und Benzylviologen als Elektronenakzeptor konnten dies bestätigen. Weiterhin konnte im Rohextrakt und im Cytoplasma eine H₂-abhängige Benzylviologenreduktion sowie eine H₂-abhängige NADP⁺-Reduktion gemessen werden. Gegenwärtig adaptieren wir das Bakterium auf CO, um die zu Grunde liegende Physiologie zu untersuchen.

Heterologe Expression von Proteinen aus thermophilen Acetogenen in anderen thermophilen Bakterien. Das aerobe thermophile Bakterium *Thermus thermophilus* zeichnet sich durch eine enorm hohe Kompetenz für die Aufnahme freier DNA aus, jede Zelle in der Kultur nimmt DNA auf. Dabei wird nicht diskriminiert zwischen DNAs verschiedenen Ursprungs, sondern es wird z. B. auch Tabak-DNA aufgenommen (Schwarzenlander und Averhoff, 2006). Frau Prof. Averhoff, ebenfalls in unserer Abteilung tätig, ist eine der führenden Expertinnen auf dem Gebiet der Physiologie, Genetik und Transformation in *T. thermophilus* (Averhoff et al., 2021). Ihre Gruppe hat verschiedene, regulierbare Promotoren zur Genexpression in *T. thermophilus* getestet und dabei den temperaturregulierbaren Promotor des Pilingens *pilA4* gefunden (Kirchner et al., 2023). Um zu überprüfen, ob man damit auch Proteine aus anderen thermophilen Bakterien produzieren kann, haben wir zusammen das *mtlD*-Gen aus *T. kivui*, das das erste Gen des Mannitolabbaus kodiert (Moon et al., 2019), mit einer DNA-Sequenz für eine Histidin-Flagge versehen, vor den *pilA4*-Promotor kloniert und das Plasmid in *T. thermophilus* eingebracht. Zellen wurden bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase angezogen, aufgeschlossen und über eine Ni-NTA-Matrix gereinigt. Im Gegensatz zur vorherigen Produktion in *Escherichia coli* gab es keine Einschlusskörper, was zeigt, dass das Enzym in *T. thermophilus* vollständig löslich ist. Das Enzym war aktiv und reduzierte Fruktose-1-Phosphat mit 800 U/mg, einer Aktivität die des in *E. coli* produzierten Enzyms entspricht [7]. Damit haben wir einen weiteren Expressionswirt für Gene aus thermophilen Acetogenen etabliert, der schnell wächst, für den es eine größere genetische Toolbox gibt und der aerob ist.

AP2.3: Aufstellung bioenergetischer Modelle von *T. kivui* und *M. thermoacetica* und von im Rahmen des Projektes neu isolierter thermophiler Syngas-Fermentierer.

Die oben beschriebenen Experimente sowie Literaturdaten erlauben die Formulierung der folgenden Modelle für die Bioenergetik bei Wachstum auf unterschiedlichen Substraten.

T. kivui. Glukose wird über den EMPW zu Acetat umgewandelt (Abb. 2A). Das produzierte CO₂ sowie die entstandenen Reduktionsäquivalente werden weiter im WLW zu einem weiteren Acetat verstoffwechselt. Fd²⁺ wird durch die Elektronen-bifurkierende Hydrogenase und den Nfn-Komplex oxidiert, um H₂ und NADPH bereitzustellen. H₂ ist der Elektronendonator der HDCR bei der Reduktion von CO₂ zu Formiat. Während des autotrophen Wachstums auf H₂ + CO₂ (Abb. 2B) werden die Reduktionsäquivalente NADPH und Fd²⁺ für den WLW durch die H₂-oxidierende, Elektronen-bifurkierende Hydrogenase bereitgestellt [2]. Sowohl bei Wachstum auf Glukose als auch auf H₂ + CO₂ wird Fd durch den Ech-Komplex mit H₂ als Elektronendonator reduziert. Die endergone Reaktion wird dabei durch einen rückläufigen Elektronentransport ermöglicht, der durch ein über ATP-Hydrolyse erzeugtes elektrochemisches Protonenpotential angetrieben wird. Für die Methylen-THF-Reduktion nehmen wir einen membranständigen Ech-MetFV Komplex an, welcher mehr als ein Proton pro zwei Elektronen (1 + x H⁺/2 e⁻) über die Membran pumpen muss, da sonst netto kein ATP synthetisiert werden würde (Abb. 2).

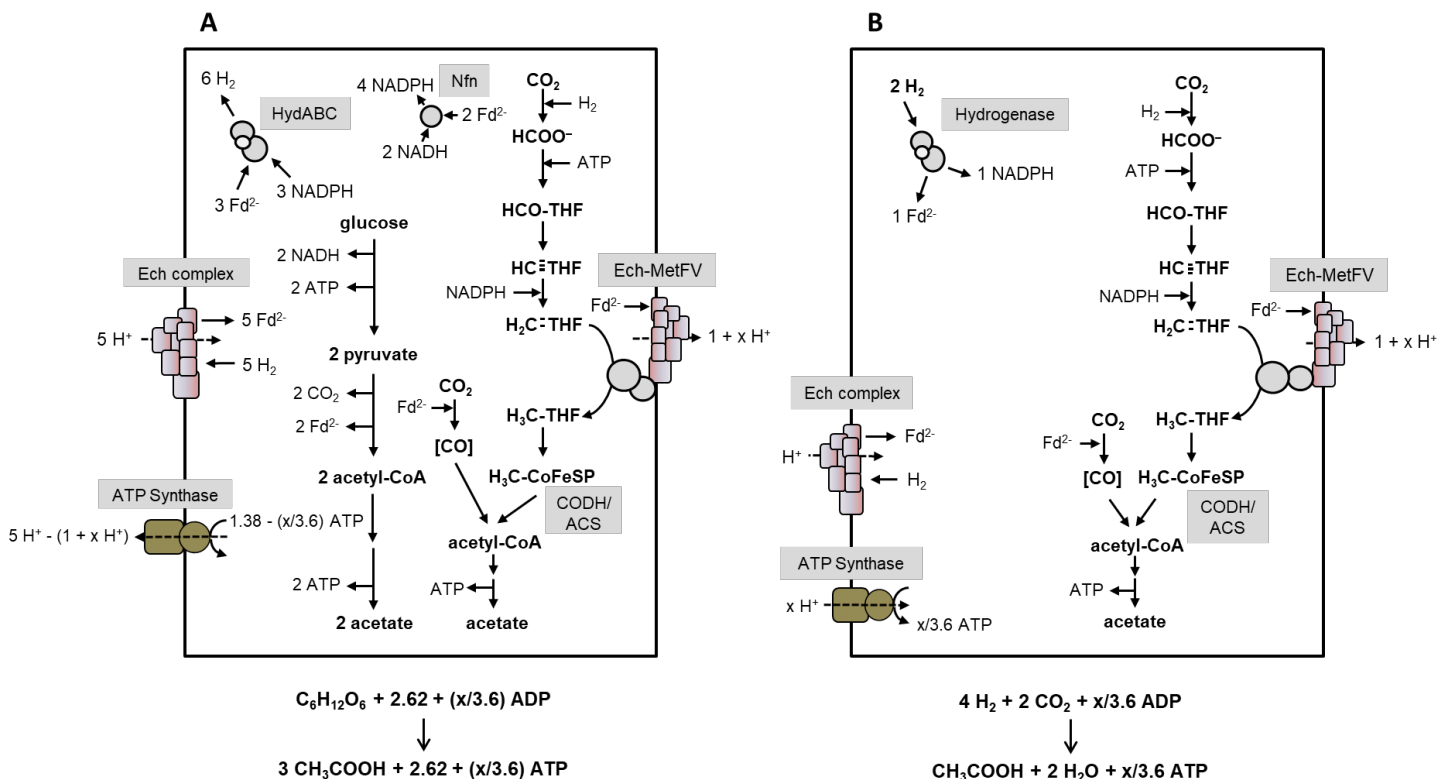


Abb. 2. Biochemie und Bioenergetik der Acetogenese aus Glukose (A) oder H₂ + CO₂ (B) in T. kivui. Angenommene Stöchiometrie: H⁺/ATP = 3.6 (ATP-Synthase), 1 H⁺/2 e⁻ (Ech) und 1 + x H⁺/2 e⁻ (Ech-MetVF). Die ATP-Ausbeute könnte erhöht werden durch x/3.6 ATP. CODH/ACS, CO Dehydrogenase/Acetyl-Coenzyme A Synthase; THF, Tetrahydrofolsäure; Ech, Energy Converting Hydrogenase

Hierbei ist es wichtig anzumerken, dass *T. kivui* zwei Gencluster besitzt, die für Ech-Komplexe mit leicht unterschiedlicher Untereinheitenzusammensetzung kodieren. Der Ech-MetFV Komplex baut einen elektrochemischen H^+ -Gradienten an der Membran auf, welcher die ATP Synthese an der H^+ -abhängigen ATP-Synthase antreibt. Gesamt kann so $2.62 + (x/3.6)$ ATP oder $x/3.6$ ATP pro Acetat aus Glukose oder $H_2 + CO_2$ generiert werden [2].

CO wird durch die monofunktionale CooS oxidiert, dabei wird ausschließlich Ferredoxin reduziert (Abb. 2). Für die Reduktion von 2 Mol CO_2 zu einem Mol Acetat werden 8 Elektronen benötigt, die allesamt zunächst im reduzierten Ferredoxin vorliegen. 1 Mol Ferredoxin geht direkt in den WLW, 3 Mol reduziertes Ferredoxin werden über die Ech-Hydrogenase zu H_2 oxidiert. Davon geht 1 Mol H_2 direkt in den ersten Schritt der CO_2 -Reduktion, die anderen beiden werden über die elektronenbifurkierende Hydrogenase zu 1 Mol NAD^+ und 1 Mol $NADPH$ umgesetzt, die beide in den WLW eingespeist werden (Öppinger et al., 2022). Für weitere Erklärungen, siehe Abb. 2.

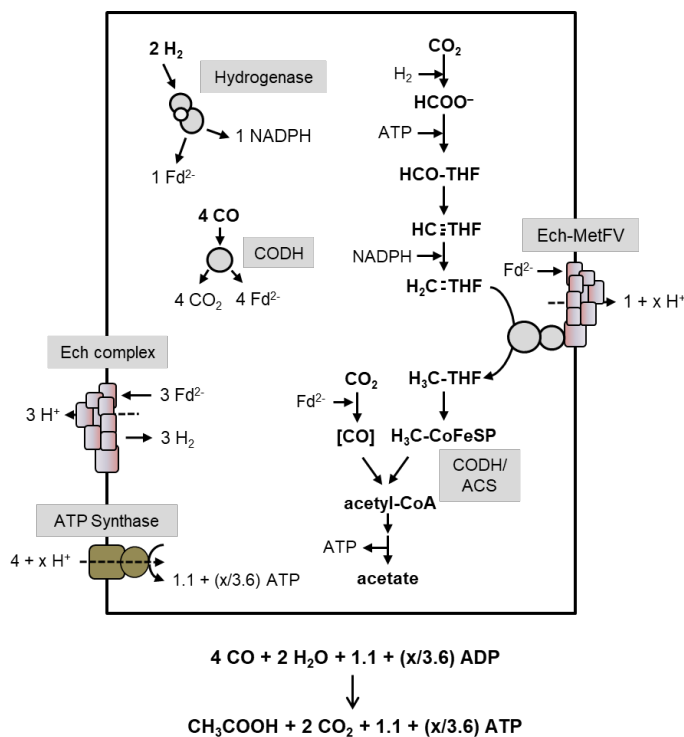


Abb. 3. Biochemie und Bioenergetik der Acetogenese aus CO in *T. kivui*. Für Erklärungen, siehe Text und Abb. 2.

M. thermoacetica. Deutlich unvollständiger bleibt unser Bild der Bioenergetik in *M. thermoacetica*. Die membranständigen, Ionen-translozierenden und damit an der Energiekonservierung beteiligten Enzyme bleiben pure Spekulation. Die folgenden Modelle haben eine ausgeglichene Redox- und Kohlenstoffbilanz und sind Energie-positiv, d. h., es wird netto ATP gebildet. Beim autotrophen Wachstum auf $H_2 + CO_2$ könnte die $NADP^+$ -reduzierende Hydrogenase die Wasserstoffoxidation übernehmen und 4 Mol $NADP^+$ reduzieren (Abb. 4A). Die vier Mol $NADPH$ könnten über Nfn zu zwei Mol $NADH$ und reduziertem Ferredoxin umgesetzt werden. 1.5 Mol $NADH$ geht in den EtfABCX Komplex, um 0.75 Mol reduziertem Ferredoxin und Menachinon zu reduzieren. Davon gehen 0.25 Mol in die $NADH$ -Dehydrogenase (NDH), um 0.25 Mol Ferredoxin zu reduzieren. Das eine Mol Ferredoxin geht dann mit einem zweiten in einen hypothetischen, aus Genomanalysen vorhergesagten Komplex bestehend aus Ech und Formiatdehydrogenase. 0.5 Mol $NADH$ und 0.5 Mol Menachinon reduzieren dann in einer elektronenbifurkierenden /-konfurkierenden Reaktion 1 Mol Methylen-THF. Die einzige Kopplungstelle wäre in diesem Modell ein Ech-Fdh-Komplex, der mehr Ionen translozieren müsste als die NDH konsumiert; nur dann wäre eine Netto-ATP-Synthese zu verzeichnen. Während des Wachstums auf CO wären NDH und Ech-Fd-Komplex beide energiekonservierend, der ATP-Gewinn damit entsprechend höher (unveröffentlichte Daten) (Abb. 4B).

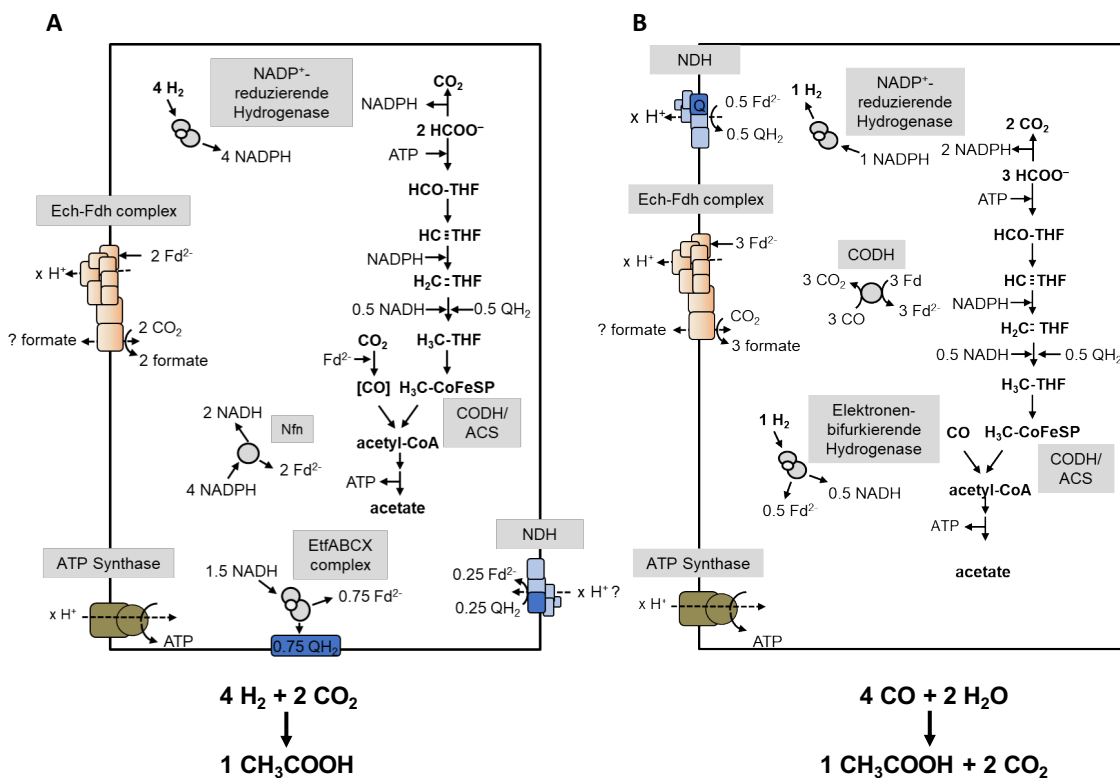


Abb. 4. Modell der Biochemie und Bioenergetik der Acetogenese aus $H_2 + CO_2$ (A) oder CO (B) in *M. thermoacetica*. Für Erklärungen und Abkürzungen, siehe Text und Abb. 2.

Die Hexose **Fructose** wird über den EMPW zu zwei Pyruvat umgewandelt, welches im weiteren Verlauf des Stoffwechsels von *M. thermoacetica* zu zwei Acetat verstoffwechselt wird (Abb. 5). Das produzierte CO_2 sowie die entstandenen Reduktionsäquivalente werden weiter im WLW zu einem weiteren Acetat verstoffwechselt (Drake und Daniel, 2004). Zunächst wird 0,5 Mol Fd^{2-} sowie 0,5 Mol NADH durch die Elektronen-bifurkierende Hydrogenase oxidiert, um H_2 bereitzustellen. Der Ech-Komplex nutzt H_2 als Elektronendonator, um Fd zu reduzieren. Anders als beim autotrophen Stoffwechsel postulieren wir, dass die Formiatdehydrogenase beim Wachstum auf Fructose nicht an den Ech gekoppelt ist. Die endergone, H_2 -abhängige Ferredoxinreduktion wird durch einen rückläufigen Elektronentransport ermöglicht, der durch einen von der Fd^{2-} :Menachinon Oxidoreduktaseaktivität der NDH erzeugtes elektrochemisches Protonenpotential angetrieben wird. Das elektrochemische Potential, welches nicht vom Ech genutzt wird, ermöglicht die Synthese von ATP durch die ATP-Synthase. Das für den WLW benötigte NADPH wird durch den Nfn bereitgestellt. Somit sind alle für den WLW nötigen Reduktionsäquivalente bereitgestellt, um zwei Mol CO_2 zu einem Mol Acetat zu reduzieren.

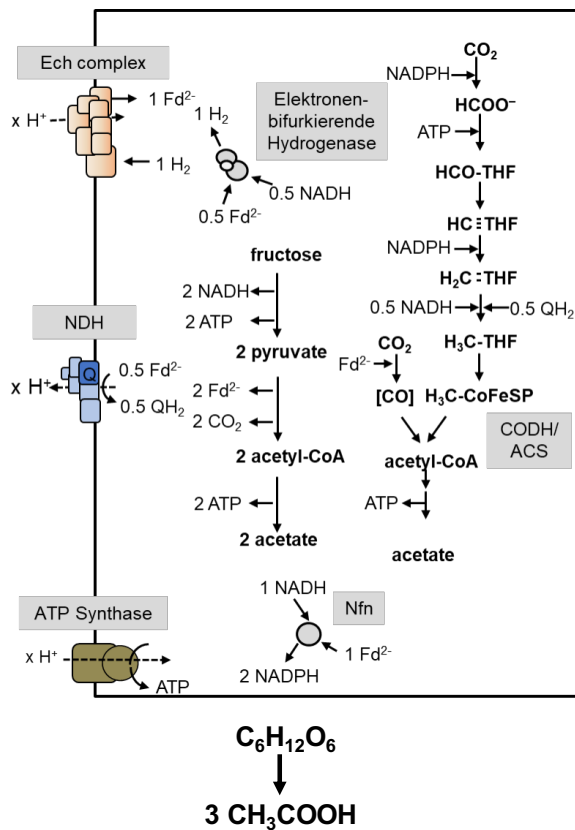


Abb. 5. Modell der Biochemie und Bioenergetik der Acetogenese aus Fructose in *M. thermoacetica*
Für Erklärungen und Abkürzungen, siehe Text und Abb. 2.

Referenzen (nur Arbeiten, die im Rahmen von ThermoSynCon publiziert wurden)

- [1] Katsyv, A., Schoelmerich, M.C., Basen, M., **Müller, V.** (2021) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the thermophilic acetogen, *Thermoanaerobacter kivui*. **FEBS Open Bio** 11 : 1332 -1342.
- [2] Katsyv, A., Jain, S., Basen, M., **Müller, V.** (2021) Electron carriers involved in autotrophic and heterotrophic acetogenesis in the thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. **Extremophiles** 25 : 513-526.
- [3] Jain, S., Katsyv, A., Basen, M., **Müller, V.** (2022) The monofunctional CO dehydrogenase CooS is essential for growth of *Thermoanaerobacter kivui* on carbon monoxide. **Extremophiles** 26 : 4.
- [4] Katsyv, A., Essig, M., Bedendi, G., Sahin, S., Ross, M.D., **Müller, V.** (2023) Characterization of ferredoxins from the thermophilic, acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. **FEBS Journal** 290, 4107-4125
- [5] Rosenbaum, F.P., Poehlein, A., Daniel, R., **Müller, V.** (2022) Energy-conserving dimethyl sulfoxide reduction in the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica*. **Environ. Microbiol.** 24 : 2000-2012.
- [6] Rosenbaum, F.P. and **Müller, V.** (2024) A novel hexameric NADP⁺-reducing [FeFe] hydrogenase from *Moorella thermoacetica*. **FEBS Journal** 291 : 596–608.
- [7] Kirchner, L., **Müller, V.**, Averhoff, B. (2024) A temperature dependent pilin promotor for the production of thermostable enzymes in *Thermus thermophilus*. **Microb. Cell. Fact.** 22:187

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigste Position des zahlenmäßigen Nachweises waren natürlich Personalkosten in Höhe von 200.626,83 €. Die zweitgrößte Position sind die Verbrauchsmittel in Höhe von 53830 €. Darunter fallen Kosten für Gase, einer Vielzahl von Chemikalien, von Glas- und Plastikware zur Kultivierung von Mikroorganismen sowie von Reagenzien sowie für molekularbiologische Arbeiten. Eine kleinere Summe entfiel auf Reisekosten für nationale und internationale Tagungen. Zudem fanden insgesamt 7 Projekttreffen statt, für die ein Teil der Reisemittel eingesetzt wurden. Insgesamt wurden die bewilligten Mittel vollständig genutzt. Eine ausführlicher Verwendungsnachweis ist dem bereits vorliegenden Finanzbericht zu entnehmen.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das Verbundprojekt ThermoSynCon diente der Entwicklung einer Technologie zur nachhaltigen Nutzung von Synthesegas, die auf thermophilen Mikroorganismen als Ganzzell-Biokatalysatoren beruht. Dazu waren unterschiedliche Arbeitspakete erforderlich, von denen hier die APs 2.1-2.3 bearbeitet wurden. Die Bearbeitung dieser APs war absolut notwendig, um das gemeinsame Ziel zu

erreichen. Die geleistete Arbeit war mehr als angemessen: die Arbeiten waren mit insgesamt sieben Veröffentlichungen sehr erfolgreich. Ohne die Zuwendung des BMBF wäre die Durchführung des Projekts nicht möglich gewesen.

4. Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die erzielten Ergebnisse wurden publiziert und die neuen Erkenntnisse können nun genutzt werden, um vorherzusagen, welche Produkte energetisch machbar sind und welche nicht und wie man den energetischen Flaschenhals überwinden kann. Erste Versuche zum *metabolic engineering* in *T. kivui* wurden im Konsortium unternommen. Letztlich wurden mindestens drei genetisch veränderte, Ethanol aus Synthesegas produzierende Stämme von *T. kivui* entwickelt. Die Stämme und die Bioprozesstechnik müssen nun weiterentwickelt werden, um die Prozessparameter zu verbessern und einen der Stämme für die industrielle Anwendung zu optimieren. Die Förderung von ThermoSynCon durch das BMBF führte zur Bildung eines neuen Netzwerkes, das über das Projekt hinauswirken und zur gemeinsamen Beantragung weiterer Folgeprojekte führen wird.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Zur Biochemie und Bioenergetik von *T. kivui* oder *M. thermoacetica* gab es keine anderen Veröffentlichungen. Andere Arbeiten, die das Verbundprojekt betreffen, wurden im Bericht des Sprechers, Prof. Dr. Basen, zusammengefasst und sind hier in Kopie eingefügt:

„Die Beschreibung eines neuen thermophilen acetogenen Bakteriums, das mit *Thermoanaerobacter kivui* verwandt ist, aber geringere Wachstumsraten mit H_2+CO_2 aufweist. Weiterhin ist der Stamm obligat autotroph ist, wodurch die Entwicklung eines genetisch veränderten Plattformorganismus erschwert wird:

Frolov EN, Elcheninov AG, Gololobova AV, Toshchakov SV, Novikov AA, Lebedinsky AV, Kublanov IV
2023. Obligate autotrophy at the thermodynamic limit of life in a new acetogenic bacterium.
Frontiers in Microbiology 14:118573.

In der Gruppe von Yukata Nakashimada von der Hiroshima University (Japan) wurden verschiedene *Moorella*-Stämme zur Produktion unter anderem von Ethanol und Aceton veröffentlicht. Wie oben bereits berichtet, eignen sich *Moorella*-Stämme aus unserer Sicht aufgrund der langsamen Wachstums- und Produktionsraten nur bedingt für industrielle Anwendungen. Die erzielten Titer bewegen sich im niedrigen mM-Bereich.

Kato J, Takemura K, Kato S, Fujii T, Wada K, Iwasaki Y, Aoi Y, Matsushika A, Murakami K, Nakashimada Y. 2021. Metabolic engineering of *Moorella thermoacetica* for thermophilic bioconversion of gaseous substrates to a volatile chemical. *AMB Express* 11: 59

Takemura K, Kato J, Kato S, Fujii T, Wada K, Iwasaki Y, Aoi Y, Matsushika A, Murakami K, Nakashimada Y. 2021. Autotrophic growth and ethanol production enabled by diverting acetate flux in the metabolically engineered *Moorella thermoacetica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 132 (6): 569-574.

Takemura K, Kato J, Kato S, Fujii T, Wada K, Iwasaki Y, Aoi Y, Matsushika A, Morita T, Murakami K, Nakashimada Y. 2023. Enhancing acetone production from H₂ and CO₂ using supplemental electron acceptors in an engineered *Moorella thermoacetica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 136(1): 13-19.

In der Gruppe von Alfred Spormann an der Stanford University (USA) wurde gezeigt, dass *Thermoanaerobacter kivui* DSM2030 anodische Elektronen zur Reduktion von CO₂ zu Acetat nutzt, und dabei hohe Titer von bis zu 490 mM Acetat erzielt. Diese Befunde ergänzen unsere Ergebnisse und untermauern unsere Schlussfolgerung, dass eine biotechnologische Nutzung von *T. kivui* möglich ist.

Deutzmann JS, Spormann AM 2024. High acetate titer obtained from CO₂ by thermophilic microbial electrosynthesis with *Thermoanaerobacter kivui*. *Bioresource Technology Reports* 25: 101740."

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Wie bereits erwähnt, sind aus dem Teil-Projekt sieben Veröffentlichungen hervorgegangen (siehe oben). Zusätzlich war der PI an anderen Veröffentlichungen der Verbundpartner beteiligt.

7. Referenzen

Averhoff, B., Kirchner, L., Pfefferle, K., Yaman, D. 2021. Natural transformation in Gram-negative bacteria thriving in extreme environments: from genes and genomes to proteins, structures and regulation. *Extremophiles* 25: 425-436

Basen M, Geiger I, Henke L, und Müller V. 2018. A genetic system for the thermophilic acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. *Applied and Environmental Microbiology* 84: e02210-02217.

Beaty PS, und Ljungdahl LG. 1991. Growth of *Clostridium thermoaceticum* on methanol, ethanol or dimethylsulfoxide. Annual Meeting of the American Society for Microbiology K-131, 236.

- Böer T, Engelhardt L, Lüschen A, Eysell L, Yoshida H, Schneider D, Angenent LT, Basen M, Daniel R, und Poehlein A. 2024. Isolation and characterization of novel acetogenic *Moorella* strains for employment as potential thermophilic biocatalysts. FEMS Microbiology Ecology (accepted).
- Dietrich HM, Righetto RD, Kumar A, Wietrzynski W, Trischler R, Schuller SK, Wagner J, Schwarz FM, Engel BD, Müller V, und Schuller JM. 2022. Membrane-anchored HDCR nanowires drive hydrogen-powered CO₂ fixation. Nature 607: 823-830.
- Drake HL, und Daniel SL. 2004. Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. Research in Microbiology 155: 869-883.
- Enzmann JD. 2024. Untersuchungen zur DMSO-Oxidoreduktase in *Moorella thermoacetica*. Masterarbeit, Universität Frankfurt.
- Hess V, Poehlein A, Weghoff, MC, Daniel R, und Müller V. 2014. A genome-guided analysis of energy conservation in the thermophilic, cytochrome-free acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. BMC Genomics 15: 1139.
- Huang H, Wang S, Moll J, und Thauer RK. 2012. Electron bifurcation involved in the energy metabolism of the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica* growing on glucose or H₂ plus CO₂. Journal of Bacteriology 194: 3689-3699.
- Katsyv. A., Müller, V. 2020. Overcoming energetic barriers in acetogenic C1 conversion. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8: 621166
- Katsyv A, Kumar A, Saura P, Pöverlein MC, Freibert SA, Stripp S, Jain S, Gamiz-Hernandez AP, Kaila VRI, Müller V, und Schuller JM. 2023. Molecular basis of the electron bifurcation mechanism in the [FeFe]-hydrogenase complex HydABC. Journal of the American Chemical Society 145: 5696-5709.
- Kirchner L, Müller V, und Averhoff B. 2023. A temperature dependent pilin promoter for production of thermostable enzymes in *Thermus thermophilus*. Microbial Cell Factories 22: 187.
- Kremp F, Roth J, und Müller V. 2022. A third way of energy conservation in acetogenic bacteria. Microbiology Spectrum 10: e0138522.
- Moon J, Henke L, Merz N, und Basen M. 2019. A thermostable mannitol-1-phosphate dehydrogenase is required in mannitol metabolism of the thermophilic acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. Environmental Microbiology 21: 3728-3736.
- Nissen LS, Moon J, Hitschler L, und Basen M. 2024. A versatile aldehyde:ferredoxin oxidoreductase from the organic acid reducing *Thermoanaerobacter* sp. strain X514. International Journal of Molecular Sciences 25: 1077.

- Öppinger C, Kremp F, und Müller V. 2022. Is reduced ferredoxin the physiological electron donor for MetVF-type methylenetetrahydrofolate reductases in acetogenesis? A hypothesis. *International Microbiology* 25: 75-88.
- Pierce E, Xie G, Barabote RD, Saunders E, Han CS, Dettern JC, Richardson P, Brettin TS, Das A, Ljungdahl LG, und Ragsdale SW. 2008. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). *Environmental Microbiology* 10: 2550-2573.
- Rosenbaum FP, Poehlein A, Egelkamp R, Daniel R, Harder S, Schluter H, und Schoelmerich MC. 2021. Lactate metabolism in strictly anaerobic microorganisms with a soluble NAD⁺-dependent L-lactate dehydrogenase. *Environmental Microbiology* 23: 4661-4672.
- Schuchmann K, und Müller V. 2012. A bacterial electron bifurcating hydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 287: 31165–31171.
- Schuchmann K, und Müller V. 2013. Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase. *Science* 342: 1382-1385.
- Schwarzenlander C, und Aeverhoff B. 2006. Characterization of DNA transport in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS Journal* 273: 4210-4218.
- Zeidler S, und Müller V. 2019. Coping with low water activities and osmotic stress in *Acinetobacter baumannii*: significance, current status and perspectives. *Environmental Microbiology* 21: 2212-2230.