Universität Rostock Traditio et Innovatio

GEFÖRDERT VOM Bundesministerium für Bildung und Forschung

Sachbericht

Teil I: Kurzbericht

Mikrobielle Biofabriken:

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

(Teilvorhaben A)

Physiologisches Potential thermophiler acetogener Syngasfermentierer und „*Genetic engineering*“

Zuwendungsempfänger: Universität Rostock

Ausführende Stelle: Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie, Prof. Dr. Mirko Basen, Albert-Einstein-Straße 3, 18059 Rostock

Projektleitung: Prof. Dr. Mirko Basen

Förderungskennzeichen: 031B0857A

Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2020 – 31.12.2023

Verfasser des Schlussberichtes/Sachberichtes: Prof. Dr. Mirko Basen

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

Im Zuge der Klimaerwärmung und ansteigender CO_2-Konzentrationen in der Atmosphäre besteht ein hohes gesellschaftliches, ökologisches und industrielles Interesse an der nachhaltigen Nutzung fossiler und nicht-fossiler Kohlenstoffquellen und Energieträger. Synthesegas (Syngas) besteht hauptsächlich aus Wasserstoff (H_2), Kohlendioxid (CO_2) und Kohlenmonoxid (CO), und kann aus industriellen Abgasen sowie durch unvollständige Verbrennung von Biomasse, z. B. landwirtschaftlichen Abfällen im Sinne einer Kreislaufwirtschaft gewonnen werden. Synthesegas ist energie- und kohlenstoffreich und kann als Ausgangsstoff für die Verwertung und Aufwertung durch Mikroorganismen dienen. Der zugrundeliegende Prozess basiert hierbei auf der Umwandlung von Synthesegas durch anaerobe Bakterien zu Plattformchemikalien und Brennstoffen wie Acetat und Ethanol. Die Verwertung von Synthesegas beruht auf einer Reduktion des enthaltenen CO_2 mit Elektronen aus den energiereichen, reduzierten Gasen H_2 und CO_2 durch acetogene Bakterien. Diese nutzen den ältesten bekannten CO_2-Stoffwechselweg, den Wood-Ljungdahl-Weg (Wood-Ljungdahl pathway, WLP) oder reduktiven Acetyl-CoA Weg zur Reduktion von CO_2 zu Acetyl-CoA, welches von den meisten Acetogenen stöchiometrisch zu Acetat konvertiert wird. Acetyl-CoA als „Plattformchemikalie der Zelle“ kann aber als zelluläres Intermediat durch native oder genetisch veränderte Mikroorganismen auch zu anderen Produkten umgewandelt werden u. a. zu Ethanol.

Die Firma Lanzatech hat ein industrielles Verfahren zur Verwertung von Synthesegas entwickelt, in dem ein proprietärer Stamm des mesophilen acetogenen Bakteriums *Clostridium authoethanogenum* verwendet wird, um zurzeit hauptsächlich Ethanol zu produzieren. Bioverfahren bei höherer Temperatur (T_{opt}: 50–80 °C) haben einige Vorteile, z. B. höhere metabolische bzw. enzymatische Raten, erleichterte Diffusion, geringere Kosten für Kühlung zur Abfuhr der Prozesswärme sowie geringere Gefahr der Kontamination mit Umweltbakterien. Weiterhin können volatile Produkte leichter entfernt werden. Im Rahmen des „ThermoSynCon“-Projektes wurde der Fokus auf die Verwertung von Synthesegas durch thermophile Bakterien gelegt. Das Hauptziel des Vorhabens war die Untersuchung der Verwertung von H_2, CO, CO_2 durch bekannte und neuartige hitzeliebende Mikroorganismen, für ein besseres Verständnis der Gasverwertung bei hohen Temperaturen, sowie die Entwicklung von Technologien und genetisch veränderten Stämmen als Plattformorganismen für die industrielle Synthesegasverwertung.

Das Teilvorhaben A) konzentrierte sich auf drei zentrale Aspekte, Anreicherung, Isolierung und physiologische Charakterisierung neuer thermophiler Syngas-Fermentierer (AP 3.1), die Entwicklung und Verbesserung genetischer Werkzeuge für thermophile Syngas-Fermentierer (AP 3.2) sowie das „*Genetic engineering*“ thermophiler Syngasfermentierer (AP 3.3). Zu Beginn des Projektes waren interessanterweise neben den Modellorganismen *Moorella thermoacetica* und *Thermoanaerobacter kivui* nur wenige andere thermophile Acetogene bekannt, so dass ein Fokus auf der Gewinnung und Charakterisierung neuer Isolate lag. Eine simple Methode zur genetischen Modifizierung des Genoms von *T. kivui* wurde in der AG Basen entwickelt und lag zu Projektbeginn vor. Für *M. thermoacetica* wurde in der Literatur ebenfalls eine Methode zur genetischen Veränderung beschrieben. Im Projekt sollten diese Methoden für thermophile Acetogene vereinfacht, ergänzt und verbessert werden, um eine gezielte Steuerung des Metabolismus zu ermöglichen, und letztlich genetisch veränderte Stämme mit verändertem Produktspektrum zu generieren. Insgesamt bestand in der AG Basen eine breite Expertise hinsichtlich der Stoffwechselphysiologie und des

„genetic engineering“ thermophiler Acetogener, die in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern Voraussetzung für die erfolgreiche Umsetzung von Teilvorhaben A) war, als Beitrag zum Gesamtvorhaben - der Entwicklung von thermophilen Acetogenen als Plattformorganismen für eine neue Synthesegas-Fermentation bei hohen Temperaturen.

2. Ablauf des Vorhabens

Die wesentlichen Ziele/Meilensteine der im Projektvorschlag 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 Zusammenhang mit Teilvorhaben A) wurden bisher 5 Manuskripte in wissenschaftlichen Fachzeitschriften und ein weiteres auf einem *pre-print* server publiziert, davon 3 federführend aus Rostock (siehe Berichtsblatt 2-4). Eine weitere Publikation ist in Vorbereitung. Weiterhin erfolgte eine Vorstellung der Ergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen.

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

Zur erfolgreichen Umsetzung des Verbundprojektes „ThermoSynCon“ und zur Erreichung der Projektziele waren Zusammenarbeiten mit drei Projektpartnern (Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main / Prof. Dr. Volker Müller, Bioenergetische Modelle von *T. kivui,* Entwicklung von genetischen Werkzeugen; Georg-August-Universität Göttingen / Prof. Dr. Rolf Daniel, Metagenome von thermophilen acetogenen Anreicherungen, Isolierung, Physiologie und Genomanalyse der acetogenen Isolate, Transkriptomanalyse von *T. kivui* unter unterschiedlichen Bedingungen; Eberhard Karls Universität Tübingen / Prof. Dr. Largus Angenent, Vergleich des Wachstums und der Synthesegasverwertung in Bioreaktoren) notwendig. Die wesentlichen Ergebnisse des Teilhabens A) waren die Anreicherung und Isolierung von neuartigen Acetogenen, und die stoffwechselphysiologische Analyse neuer *Moorella*-Stämme, von denen einige verbessertes Wachstum auf Gasen gegenüber bekannten Stämmen sowie ein besonderes genomisches Potential aufwiesen. Protokolle zur Genetik wurden für einen besonderen Stamm von *M. thermoacetica* etabliert, insbesondere aber wurden Methoden zur Plasmid-basierten Proteinproduktion und zur Identifizierung und Nutzung induzierbarer Promotoren für *T. kivui* entwickelt. In Zusammenarbeit mit allen Projektpartnern wurde *T. kivui* als der vielversprechendste thermophile Modell-und Plattformorganismus für die industrielle Nutzung detailliert untersucht. Genetisch veränderte Stämme von *T. kivui* zur Produktion von Ethanol aus Synthesegas wurden hergestellt und in Zusammenarbeit mit der AG Angenent im Bioreaktor getestet.

Universität Rostock Traditio et Innovatio

GEFÖRDERT VOM Bundesministerium für Bildung und Forschung

Sachbericht

Teil II: Eingehende Darstellung

Mikrobielle Biofabriken:

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

(Teilvorhaben A)

Physiologisches Potential thermophiler acetogener Syngasfermentierer und „*Genetic engineering*“

Zuwendungsempfänger: Universität Rostock

Ausführende Stelle: Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie, Prof. Dr. Mirko Basen, Albert-Einstein-Straße 3, 18059 Rostock

Projektleitung: Prof. Dr. Mirko Basen

Förderungskennzeichen: 031B0857A

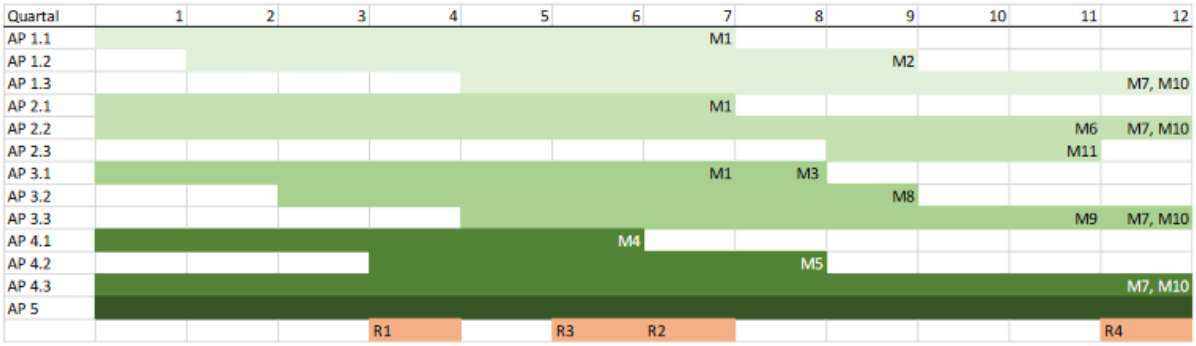
Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2020 – 31.12.2023

Verfasser des Schlussberichtes/Sachberichtes: Prof. Dr. Mirko Basen

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

Übergeordnetes Ziel des Gesamtvorhabens ThermoSynCon war die Evaluierung von genetisch veränderten thermophilen acetogenen Mikroorganismen als Plattformorganismen für eine neue biotechnologische Synthesegas-Verwertung. Hierzu war eine Vielzahl unterschiedlicher experimenteller Ansätze notwendig, die in vier Teilvorhaben in Zusammenarbeit von vier unterschiedlichen universitären Partnern umgesetzt wurden. Der Gantt-Chart (Abb. 1) stellt die geplanten Arbeitspakete in ihrem zeitlichen Verlauf dar.



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

Abbildung 1. Ablaufplan inklusive Meilensteine für alle Partner im Gesamtprojekt. Ursprüngliche Meilensteinplanung für das Verbundvorhaben ThermoSynCon. AP 3(3.1.-3.3) wurde vom Partner AG Basen, Universität Rostock bearbeitet.

Das Teilvorhaben A) wurde im Antrag als Arbeitspaket 3 beschrieben und gliederte sich in drei Untervorhaben (Tab. 1). Die Zuwendungen aus dem Teilvorhaben A), das hier im Weiteren beschrieben ist, 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 3.1–3.3 erfolgreich abzuschließen.

Tabelle 1. Arbeitspakete in Teilvorhaben A)

Arbeitspaket 3.1. abschließende Charakterisierungen neuer Isolate
Arbeitspaket 3.2. *Proof-of-concept* der genetischen Modifikation von *Moorella thermoacetica* und Entwicklung neuer genetische Methoden für *Thermoanaerobacter kivui*
Arbeitspaket 3.3. Evaluierung des biotechnologischen Potenzials genetisch veränderter thermophiler Acetogener

Im Folgenden werden die Arbeitspakete inklusive der Zielstellung und der Ergebnisse dargestellt.

AP 3.1: Anreicherung, Isolierung und physiologische Charakterisierung neuer thermophiler Syngas-Fermentierer

Tabelle 2. Verwendete Probenmaterialien in den Anreicherungen

a. Tierfäkalien wie Kuhdung, Schafs- und Zwerghühnerkot sowie Pferdemist
b. Apfeltrester (Pressrückstände bei der Herstellung von Apfelsaft; vergärt > 30 d)
c. Pansensaft aus Rindern
d. Vorschlamm, Primärschlamm, Proben aus anoxischem BioP-Becken (Rostocker Klärwerk)
e. Grünschnitt, Biokompost (Kompostanlage Parkentin; drei verschiedene Mieten á 50-70 °C, > 1 a)
f. Kompost Kaffeerösterei (Rostock)
g. fermentierte Maissilage, Schweinegülle, Grassilage (Biogasanlage Güstrow; Fermenter > 30 d, 38
h. fermentierte Maissilage, Grassilage (Biogasanlage Groß Bäbelin; Fermenter > 30 d, 38 - 40 °C)
i. fermentierte Triticale-Ganzpflanzensilage, Gras-, Mais-, Getreidesilage (Biogasanlage Burg, Fermenter > 30 d; Substrat, 50 °C.

Ziel des AP 3.1 war es, in Zusammenarbeit mit den Partnern neue thermophile acetogene Syngas-Fermentierer aus der Umwelt anzureichern und zu isolieren. Zu Beginn des Projektes lagen nur wenige thermophile Acetogene in Reinkultur vor (Basen und Müller, 2017). Zur Entwicklung einer auf thermophilen Acetogenen beruhenden Technologie zur Synthesegasverwertung stellen neue Isolate einerseits mögliche neue Produktionsorganismen dar, andererseits erlaubt ihre Untersuchung eine weitere Erschließung des physiologischen und genomischen Potentials der Acetogenese bei hohen Temperaturen. So ist mit Hilfe molekularbiologischer Methoden z.B. der Transfer eines funktionellen Stoffwechselweges aus einem thermophilen Acetogenen in einen Plattformorganismus denkbar.

Zu Beginn des Projektes wurden zunächst Proben zusammengetragen (Tab. 2), die aus Deutschland stammten, um den Zugang zu den genetischen Ressourcen im Folgenden nicht zu erschweren.

Mit Hilfe dieser aus anoxischen, warmen (50 – 80 °C) sowie moderaten (20 – 45 °C) Habitaten gewonnenen Materialien wurden Methoden zur Anreicherung thermophiler Syngasfermentierer an der Universität Rostock getestet und etabliert. Dabei kamen verschiedene Wachstumsbedingungen (u.a. Temperatur, Substratkonzentration, Schütteln, Medienzusammensetzung) mit unterschiedlichen Proben zur Etablierung eines erfolgsversprechenden Protokolls zum Einsatz (Abb. 2).

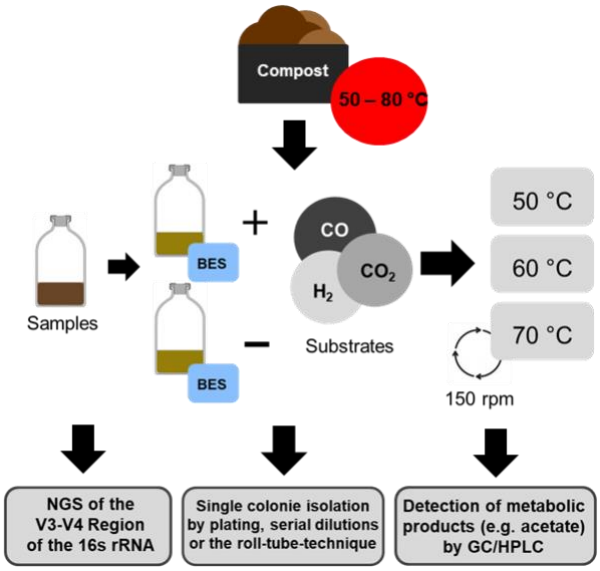


Abbildung 2. Strategie zur Anreicherung, Isolierung und phylogenetischer Identifizierung thermophiler acetogener Bakterien.

Als Substrate wurden H_2:CO_2 (1,5 bar, 66/33; v/v), CO (1,0 bar, in N_2, 50/50; v/v) sowie typische alternative Substrate für Syngas-verwertende Acetogene (Methanol, Formiat, Betain, Laktat, 1,2-Propandiol, 2,3-Butandiol) eingesetzt. Zur Hemmung der Methanogenese wurde Bromoethansulfonat (BES) eingesetzt. Das Wachstum wurde mittels optischer Dichte verfolgt. Die Zunahme der Produkte (organischen Säuren und Alkohole) erfolgte mittels des über Projektmittel beschafften GC, ebenso die Abnahme von H_2 (Abb. 3); sowie über HPLC (Formiat). Der Partner AG Daniel/Universität Göttingen führte die Analyse der mikrobiellen Diversität in einem Teil der Anreicherungen durch. Als wichtigste Parameter zur Identifizierung Acetogener wurde die Bildung von Acetat z.B. aus H_2+CO_2 gaschromatographisch über die Zeit verfolgt (Abb. 3).

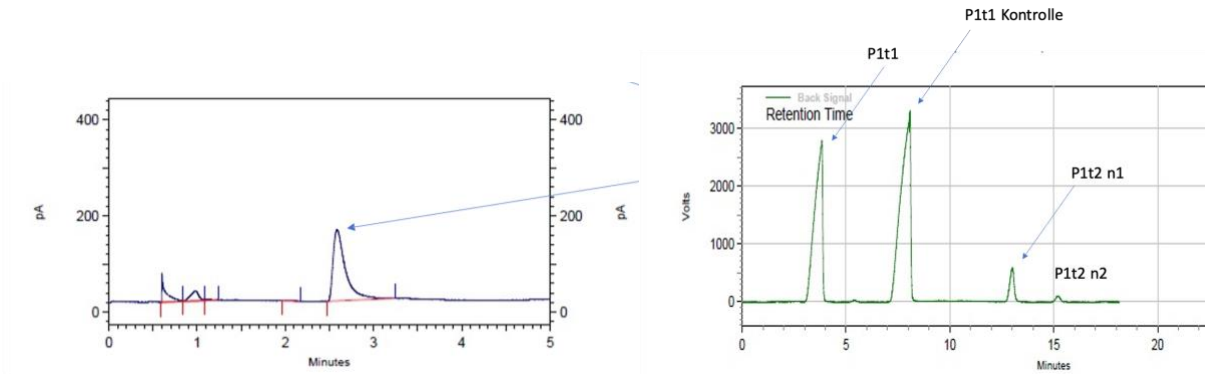
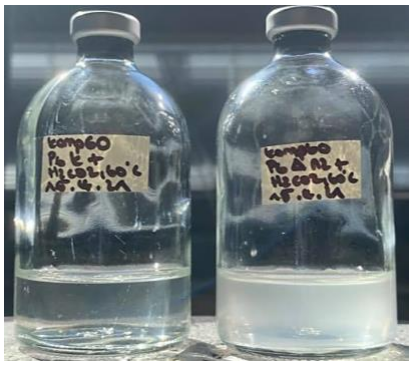


Abbildung 3. Beispiel-Chromatogramm zum Nachweis von Acetat (links) bzw. der Wasserstoffabnahme (rechts) in acetogenen Anreicherungen auf H_2+CO_2 aus dem Kompostwerk Parkentin *(Material e)* bei 60° C. P1t1, Anreicherung, Probenahmezeitpunkt 0 Tage; P1t2, Anreicherung, Probenahmezeitpunkt 7 Tage.

So wurden zum Beispiel mit Proben aus dem Kompostierwerk Parkentin aus Rostock nach 6 Tagen H_2+CO_2 -abhängiges Wachstum, sowie Acetatbildung und Wasserstoffverbrauch gemessen (Abb. 3 und 4).



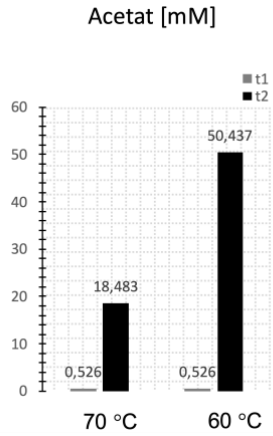


Abbildung 4. Anreicherung Kompost aus dem Kompostierwerk Parketin nach 6 d bei 60 °C. Links: Kontrolle (-1.5 bar H_2:CO_2 (66/33; v/v), Rechts: + 1.5 bar H_2:CO_2 (66/33; v/v). Rechte Abbildung: Acetatbildung nach 6 d, bei 70°C und 60°C (t1=0 d; t2 =6d).

Bei der Isolierung kamen die Agar-Roll-Tube-Technik sowie die Plattenguss-Technik zum Einsatz, wobei bei ersterer das Agar-Medium mit H_2+CO_2 bzw. CO überschichtet wurde, während das Plattengussverfahren für lösliche Substrate verwendet wurde.

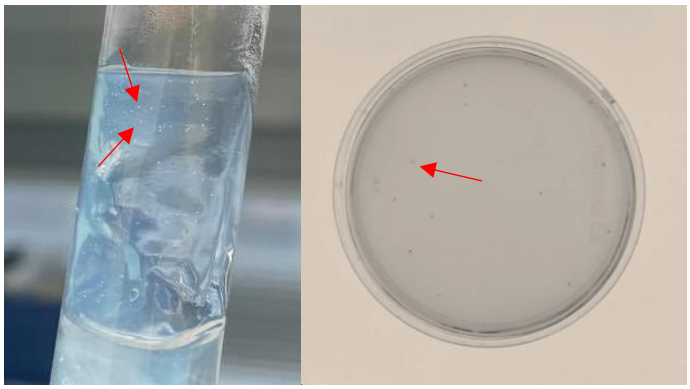


Abbildung 5. Agar-Roll-Tube-Technik (links) und Plattenguß-Technik (rechts) zur Isolierung thermophiler Acetogener / Synthesegasfermentierer mit H_2+CO_2 bzw. mit Methanol. Pfeile – Kolonien.

Mit Hilfe verschiedener Inokula wurden spezifisch thermophile Acetogene angereichert, indem sie unter H_2+CO_2-Atmosphäre oder mit Methanol, Laktat oder Betain und bei Zugabe des Inhibitors 2-Bromethansulfonat (BES) 7–28 Tage lang bei 50 – 80 °C inkubiert wurden. Erfolgreiche Anreicherungen von Acetogenen mit H_2+CO_2 gelangen aus den Proben der Kompostieranlage Parkentin. Dabei konnten in zwei Anreicherungskulturen, Mth_K1 und Mth_K4C, Wachstum und 40 – 50 mM Acetat mittels Gaschromatographie detektiert werden. Aus diesen beiden Anreicherungskulturen wurde die V3-V4 Region des 16S rRNA-Gens mittels PCR amplifiziert und nachfolgend durch Next-Generation-Sequencing analysiert, durchgeführt durch den Partner AG Daniel/Göttingen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bis zu 40 % der angereicherten Bakterien auf Gattungsebene mit bekannten thermophilen Acetogenen verwandt sind, darunter *Moorella sp.* und *Thermoanaerobacter sp.* (Abb. 6). Die Arbeiten zur Isolierung der Mikroorganismen dauern noch an.

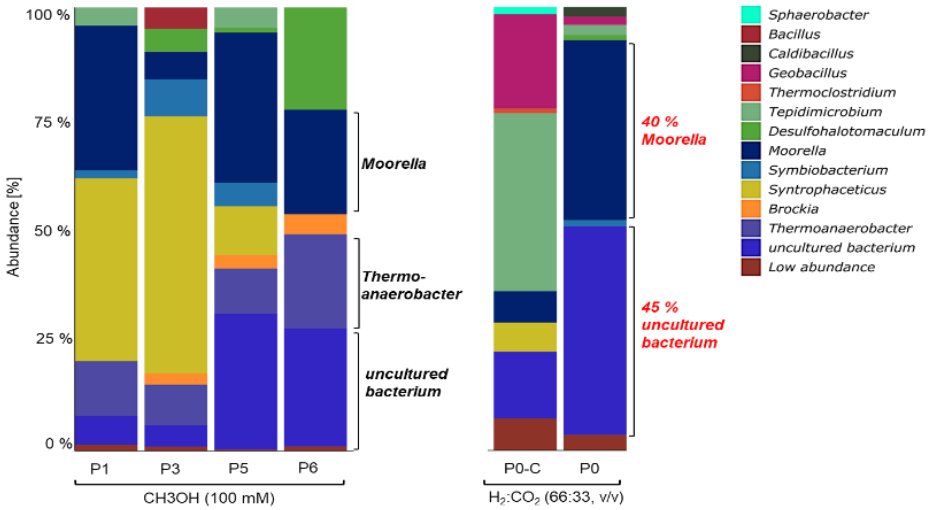


Abbildung 6. NGS-Daten der V3-V4 Region des 16s-rRNA Gens der Anreicherungskulturen Mth_K1 und Mth_K4C, angereichert auf Methanol (links) und unter H_2+CO_2-Atmosphäre (66:33, v/v; rechts).

Aus weiteren Proben konnten weder mit CO noch mit H_2+CO_2 weitere Acetogene angereichert werden. Acetogene Anreicherungen gelangen allerdings mit Betain aus Proben der Biogasanlage sowie der Trockenfermentation und des Kompostierwerkes; mit Laktat aus Proben der Biogasanlage sowie des Kompostierwerkes sowie mit Methanol aus Proben des Kompostierwerkes. Auch in diesen wurde die Diversität mittels *Amplicon-Sequencing* des Partners AG Daniel/Göttingen durchgeführt. Es zeigten sich erneut Taxa, die potentiell acetogen sind (u.a. *Thermoacetogenium* sp.. *Moorella* sp. und *Thermoanaerobacter* sp.). Das bislang einzige Isolat aus den Anreicherungen des Partners Rostock wurde aus einer Anreicherung mit Methanol und dem Inokulum aus dem Kompostierwerk gewonnen. Phylogenetisch ist es der Art *Moorella thermoacetica* zuzuordnen und trägt den Namen *M. thermoacetica* Stamm MBA. Der Partner AG Daniel der Universität Göttingen isolierte sechs weitere thermophile Acetogene, allesamt aus dem Genus *Moorella*. Vier Isolate sind *M. thermoacetica* zuzuordnen, zwei *M. humiferrea* und eines bildet eine neue Art, *M. carbonis*. Die Isolate wurden genomisch und physiologisch charakterisiert, wobei ein Teil der Untersuchungen (u.a. Wachstum auf H_2+CO_2 und die Bestimmung der Fermentationsprodukte) in

Rostock durchgeführt wurden. Die detaillierten Ergebnisse sind im Schlussbericht des Partners Prof. Daniel aufgeführt, und werden als Publikation erscheinen (Böer *et al.* 2024). Daher sei hier nur erwähnt, dass in Zusammenarbeit aller Partner deutliche Unterschiede in der Gasverwertung zwischen den Isolaten beobachtet wurden, und die *M. thermoacetica*-Stämme COM und MBA ein gegenüber dem Typstamm verbessertes Wachstum auf H_2+CO_2 aufwiesen und neben Acetat geringe Mengen Ethanol produzierten.

Insgesamt verdeutlicht die relative geringe Anzahl der Isolate einerseits die generelle Schwierigkeit, thermophile Acetogene anzureichern und zu isolieren. Andererseits ist die Beschreibung einiger neuer *Moorella thermoacetica*-Stämme sowie einer neuen *Moorella*-Art als großer Fortschritt zu werten, weil dadurch der Genpool thermophiler Acetogener deutlich erweitert wurde. Weiterhin existieren sowohl in Rostock (Abb. 6) als auch in Göttingen noch weitere thermophile Anreicherungskulturen mit vielversprechenden neuen Acetogenen, die potentiell nicht dem Genus *Moorella* zuzuordnen sind (vgl. Abschlussbericht des Partners AG Daniel/Göttingen). Die Isolierung dieser Mikroorganismen wird über die Projektdauer hinaus weiterverfolgt.

AP 3.2: Entwicklung und Verbesserung genetischer Werkzeuge für thermophile Syngas-Fermentierer

Ziel des AP 3.2 waren einerseits die Etablierung eines genetischen Systems für *Moorella*-Arten, andererseits die Verbesserung genetischer Werkzeuge für den thermophilen Synthesegasfermentierer *Thermoanaerobacter kivui*.

Moorella thermoacetica

Für verschiedene Stämme von *M. thermoacetica* konnte im Laufe des Projektes ein Verfahren zur Gewinnung von Einzelkolonien über Plattierungsverfahren optimiert werden (Abb. 8). Viele *Moorella*-Stämme zeichnen sich jedoch durch das Vorhandensein von Restriktionsmodifikationssystemen (RMS) aus, die in der Lage sind, anhand des Methylierungsmusters Fremd-DNA zu erkennen und zu hydrolysieren (Jensen *et al.* 2019). Daher wurde ein *M. thermoacetica*-Stamm ausgewählt (DSM12797), der sowohl gut auf H_2+CO_2 wächst als auch nur ein RMS besitzt. Techniken zur *in vitro*-Modifizierung von Plasmid-DNA über zellfreie Extrakte (Matsushima und Baltz 1994; Donahue *et al.* 2000), für DNA-Aufnahme über Transformation und Konjugation wurden im Labor etabliert. Ein Plasmid für die Konjugation mit einem *origin of transfer* und der für die Konjugation essentiellen *tra*-Region wurde hergestellt (Abb. 7).

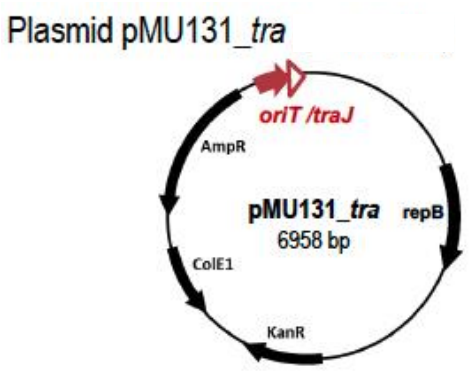


Abbildung 7. Plasmid pMU131_tra für die konjugative Übertragung zwischen *E. coli* S17-1 und *M. thermoacetica* (Friedrichs, 2022). oriT/traJ, origin of transfer und *traJ* für die Konjugation, Amp^R, Amcillin-Resistenz-; Kan^R, Kanamycinresistenzkassette.

Allerdings wurden die weiteren genetischen Arbeiten insbesondere die Selektion von Transformanden dadurch erschwert, dass *M. thermoacetica* DSM12797 nach 3–4 Tagen in Gegenwart von bis zu 1 mg/ml Kanamycin wuchs, wohingegen der Typstamm DSM521 sogar 500 µg/ml ohne Vorinkubation tolerierte (Abb. 8). Eine Erklärung sind mögliche Spontanresistenzen gegenüber Kanamycin. *M. thermoacetica* besitzt nur ein Gen für die 16S rRNA. Kanamycin hemmt die Proteinbiosynthese durch Anheftung an die 30S Untereinheit des Ribosoms, und Mutationen im 16S rRNA-Gen können zu solchen Resistenzen führen (Suzuki *et al.* 1998).

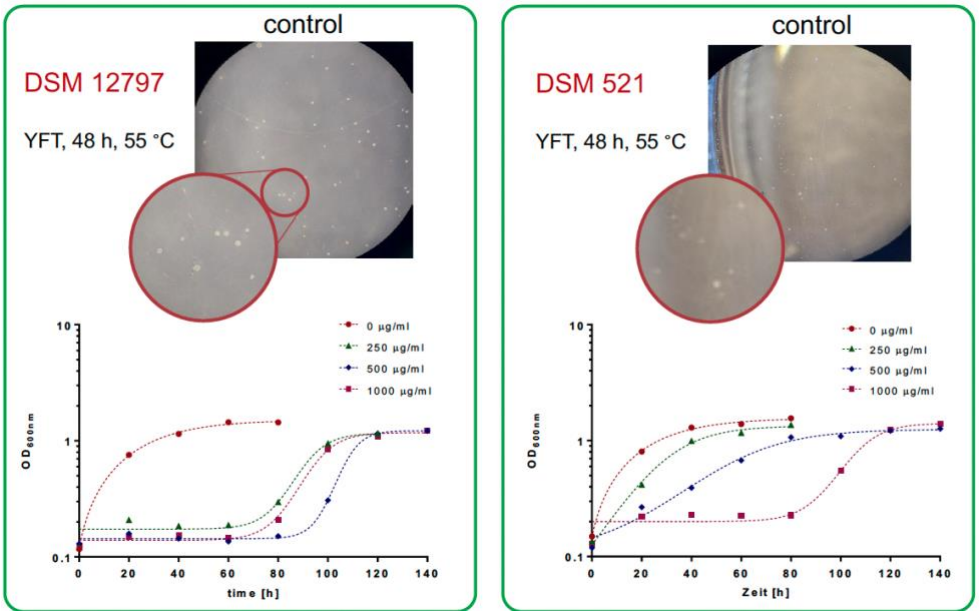


Abbildung 8. Wachstum von *M. thermoacetica* DSM12797 (links) und DSM 521 (rechts) auf YFT-Medium ohne Kanamycin in Agar-Medium (oben) sowie in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Kanamycin in Flüssigkultur (unten).

Zudem wurde im Projektverlauf u.a. durch die physiologischen Arbeiten in AP 3.1 deutlich, dass *Thermoanaerobacter kivui* aufgrund seiner hohen spezifischen Wachstums- und Gasverwertungsrate (Baum *et al.* 2024) besser für die Anwendung in der Biotechnologie geeignet ist, so dass sich weitere genetische Arbeiten auf *T. kivui* konzentrierten. In Konsequent davon ließ sich M8 nur zum Teil erreichen. Es ist jedoch geplant in zukünftigen Studien am Lehrstuhl Mikrobiologie der Universität

Rostock aufgrund des wissenschaftlichen Interesses an *M. thermoacetica* hier anzuknüpfen. Unter anderem sollen Stämme gefunden werden, die Mutationen in den Genen *pyrE* und/oder *pyrF* aufweisen, die für die Pyrimidin-Biosynthese essentiell sind, und die als Ausgangsstämme für genetische Modifikation dienen könnten, ähnlich wie dies bereits für die thermophile Biomasse-abbauende verwandte Art *Caldicellulosiruptor bescii* beschrieben ist (Chung et al. 2012). Darauf aufbauend wird dann ein genetisches System mit *pyrE* oder *pyrF* entwickelt, wie es durch Partner Rostock für *T. kivui* beschrieben ist (Basen et al. 2018).

Thermoanaerobacter kivui

Großer Fortschritt konnte hinsichtlich der Verbesserung der genetischen Werkzeuge für *T. kivui* erzielt werden. In Zusammenarbeit mit Partner Müller/Frankfurt (federführend) konnte ein System zur Produktion von Proteinen in *T. kivui* etabliert werden (Katsyv *et al.* 2021a). Interessanterweise konnten wir zeigen, dass *T. kivui* effiziente Mechanismen zur Aufnahme und Integration fremder DNA besitzt. In einem CO-adaptierten Stamm wurden durch homologe Rekombination mit DNA aus einer verwandten Art, *Thermoanaerobacter* sp. strain X514 Gene zur Thiamin-Verwertung durch Gene zur Verwertung des Zuckers Trehalose ersetzt (Abb. 9, Zeldes *et al.* 2022). Dieser Befund verdeutlicht, dass *T. kivui* prinzipiell gut geeignet für die genetische Modifikation über homologe Rekombination und für Experimente zur adaptiven Laborevolution ist, andererseits aber eine besondere Sorgfalt im Labor notwendig ist, um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden. Die Entwicklung *von genome editing* (CRISPR Cas9) war daher nicht prioritär im Projekt, wird aber in der Zukunft für besondere Zwecke (Beseitigung von Transposasen, CRISPRi) angestrebt.

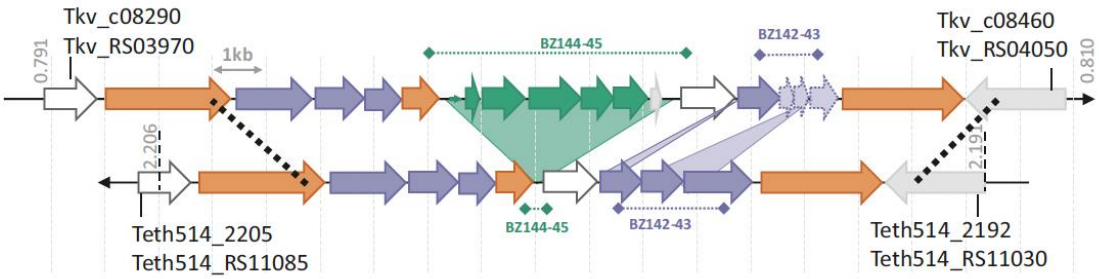


Abbildung 9. Das Gencluster zur Thiamin-Biosynthese (grün) in einem CO-adaptierten Stamm von *T. kivui* (Weghoff und Müller, 2016) wurde über homologe Rekombination mit DNA aus *Thermoanaerobacter* sp. X514 ersetzt. Der Genabschnitt zwischen den homologen Regionen enthielt intakte Gene zur Aufnahme und Verstoffwechselung von Trehalose (orange, lila; Zeldes *et al.* 2023).

Ein besonderer Fokus lag auf der Untersuchung induzierbarer bzw. reprimierbarer Promotoren, weil diese gentechnisch eingesetzt werden können, um Promotoren anderer, essentieller Gene auszutauschen, und damit den Stoffwechsel von *T. kivui* besser zu verstehen bzw. zu regulieren. Weiterhin sollte zur Untersuchung von Promotoren ein Reportergen-Assay entwickelt werden.

T. kivui metabolisiert die Zucker Glukose, Fruktose, Mannose und den Zuckeralkohol Mannitol (Moon *et al.* 2019), wobei Mannitol in einer nicht an Mannitol-adaptierten Kultur erst verstoffwechselt wird, wenn Glukose nicht mehr vorhanden ist (Zeldes *et al.* 2024). Die Gencluster für die Aufnahme und den Umsatz dieser Zucker konnten identifiziert werden, und wir konnten zeigen, dass die Aufnahme transkriptionell reguliert ist. So sind die Gene für den Mannitol-Stoffwechsel (gemessen: *mtlD*) ~20-fach induziert durch Mannitol (Abb. 10), und reprimiert durch andere Zucker, während das *fruk*-Gen aus dem Fruktosestoffwechsel in Gegenwart von Fruktose ~250-fach hochreguliert war, aber nicht durch die Gegenwart anderer Zucker reprimiert wurde.

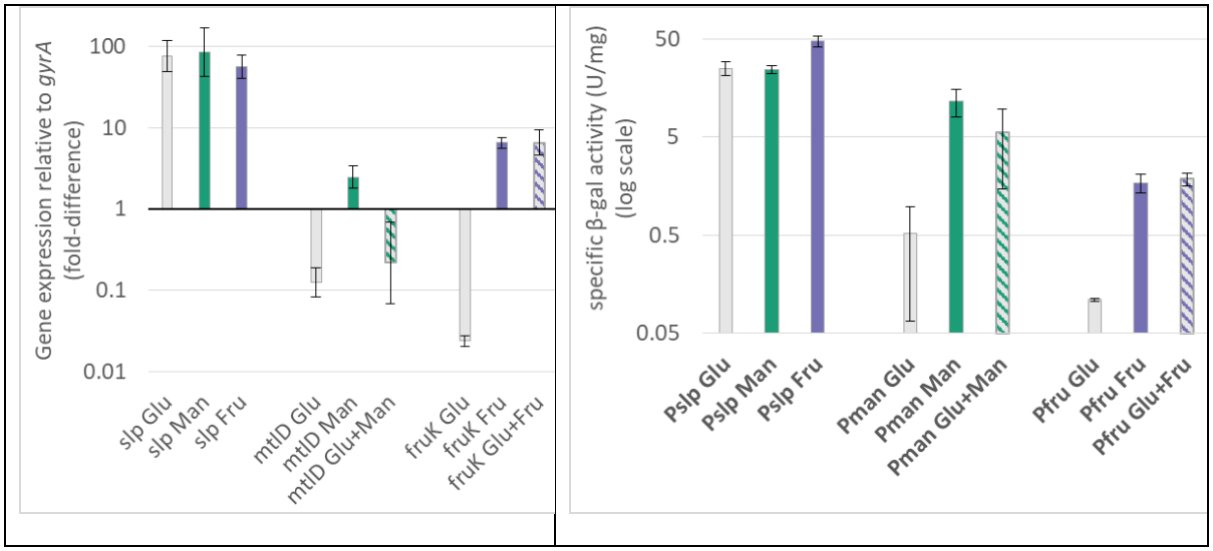


Abbildung 10. Links:Expressionslevel von *mtlD* und *fruK* im Vergleich zum Gyrase-Gen *gyrA* in Abhängigkeit der Gegenwart verschiedener Zucker. Rechts: Aktivität der beta-galactosidase (β-gal) aus *Caldicellulosiruptor bescii* unter Kontrolle der Promotoren P*slp*, P*man* und P*fru* im zellfreien Extrakt von genetisch veränderten Stämmen von *T. kivui*, die mit Glukose (25 mM), Mannitol (25 mM) oder Fruktose (25 mM) gewachsen sind.

Daher wurde begonnen, die Promotoren für diese Operone, P_{man} und P_{fru}, als induzierbare/reprimierbare Promotoren zu studieren. Zunächst haben wir dazu ein Reportergen-Assay etabliert. Dazu wurde eine Beta-Galaktosidase (β-Gal) aus dem thermophilen Bakterium *Caldicellulosiruptor bescii* in das *T. kivui*-Genom eingebracht, da der Organismus über keine β-Gal verfügt. Dabei stand das Gen unter der Kontrolle des starken, konstitutiven Promoters des S-layer Proteins P_{slp}, oder unter der Kontrolle von $P_{man.}$ bzw. P_{fru}. Der zellfreie Extrakt lysierter Zellen aus der spätexponentiellen Phase (OD ~1) des Stammes mit β-gal unter Kontrolle des konstitutiven Promoters P_{slp} wies unter allen Bedingungen (Wachstum mit 25 mM Glukose, Mannitol oder Fruktose) eine hohe Aktivität von 22–47 U mg^{-1} auf. In dem Stamm mit β-gal unter Kontrolle von P_{man} zeigte sich eine 20-fache Stimulierung der Aktivität bei Wachstum auf Mannitol, interessanterweise aber keine Reprimierung bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glukose und Mannitol. Der Einsatz des Promoters P_{fru} bewirkte entgegen den Transkriptstudien hingegen nur eine Aktivität von etwa 20% der durch P_{Slp}

bewirkten Aktivität. Das Reportergen kann also verwendet werden, um Promoterstärken unter unterschiedlichen Bedingungen zu studieren. Um die unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären und die Induktionen zu verbessern, werden beide Promotoren weiter untersucht und optimiert werden. Der Mannitol-induzierbare Promoter P_{man} wurde nachfolgend in einem ersten Ansatz genutzt, um die Expression katabolischer Gene aus *T. kivui* zu untersuchen und den Stoffwechsel zu verändern. Hierbei zeigte sich, dass ein Stamm mit der essentiellen Hydrogenase Ech1 unter der Kontrolle von P_{man} in Abwesenheit des Induktors Mannitol nicht wuchs. Ebenso zeigte ein Stamm mit den Genen des Wood-Ljungdahl-Stoffwechselwegs unter Kontrolle von P_{man} zwar keine komplette Hemmung des Wachstums nur in Gegenwart von Glukose ohne Mannitol, aber eine deutlich verlängerte Verdoppelungszeit (Abb. 11). Zudem akkumulierte dieser Stamm geringe Mengen Formiat, da die HDCR/Formiatdehydrogenase von der Regulierung nicht betroffen war.

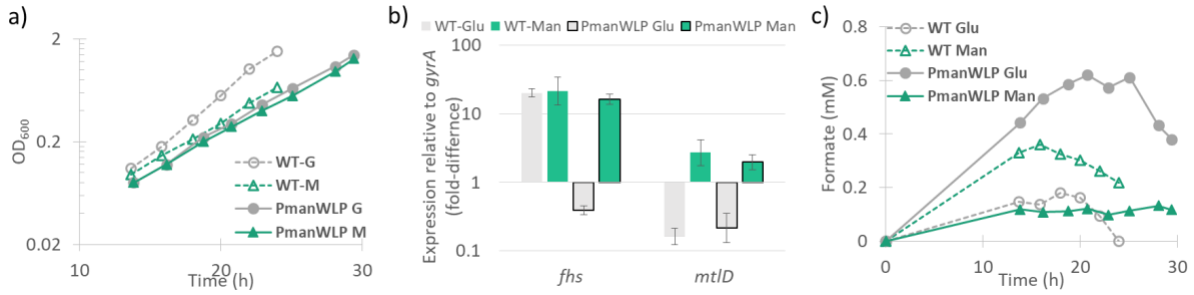


Abbildung 11. Stamm P_{man}WLP zum *knock-down* des Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg. a) Optische Dichte, b) Genexpression and c) Extrazelluläres Formiat in P_{man}WLP, gewachsen mit Glukose (grau) oder Mannitol (grün) (Zeldes et al. 2024).

Insgesamt konnten erfolgreich neuartige Methoden für die genetische Modifizierung des biotechnologisch zurzeit interessantesten thermophilen Acetogenen, *T. kivui*, entwickelt werden, die für zukünftige Grundlagenforschung sowie für die weitere Etablierung als Plattformorganismus für die Syngasfermentation essentiell sind.

AP 3.3: „Genetic engineering“ thermophiler Syngasfermentierer

Ziel dieses Arbeitspaketes war die Entwicklung genetisch veränderter Syngasfermentierer, die systembiologisch untersucht und deren Potential folglich im Bioreaktor getestet werden soll. In Zusammenarbeit mit allen Partnern stellte sich heraus, dass *Thermoanaerobacter kivui* weitaus schneller wächst und eine höhere Umsatzrate besitzt als die thermophilen Isolate aus AP 1.1./2.1/3.1 sowie als die bekannten *Moorella*-Arten. Da zudem die Entwicklung genetischer Werkzeuge für *T. kivui* gegenüber *Moorella*-Arten (siehe AP 3.2) sehr fortgeschritten ist (Basen et al. 2018), wurde sich in AP 3.3 auf die Entwicklung von *T. kivui* als Plattformorganismus fokussiert. Da *T. kivui* hohe Umsatzraten von H_2 + CO_2 bzw. Synthesegas sowie hohe Essigsäuretiter aufweist (von Eysmondt 1990; Deutzmann und Spormann, 2024), jedoch von Natur aus nicht in der Lage ist Ethanol zu produzieren, wurden

Stämme zur Ethanolproduktion etabliert. Ethanol kann in strikt anaeroben Organismen über (mindestens) zwei Wege produziert werden. Zum einen über die Reduktion von Acetyl-CoA mittels Aldehyd- und Alkoholdehydrogenase (ALDH bzw. ADH) sowie zum anderen über die Ferredoxin-abhängige Reduktion von Acetat zu Acetaldehyd (katalysiert durch das Enzym AOR), welches dann durch eine ADH weiter zu Ethanol reduziert wird. Weiterhin können aufgrund der hohen Substratvariabilität der Enzyme verschiedene organische Säuren zu Alkoholen umgesetzt werden (Nissen und Basen 2019, Abb. 12).

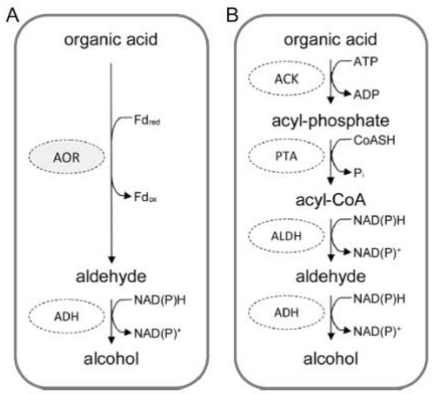


Abbildung 12. Wege der Alkoholbildung aus organischen Säuren (organic acid) bzw. aus Acyl-CoA (Nissen and Basen, 2019).

Als Donor für die Gene zur Alkoholbildung wurde im Projekt ausschließlich die verwandte thermophile Art *Thermoanaerobacter sp.* Stamm X514 verwendet, der ein ähnliches Temperaturoptimum (60 °C vs. 66 °C) besitzt. *Thermoanaerobacter sp*. Stamm X514 produziert Ethanol aus Zuckern und verschiedene Alkohole aus ihren entsprechenden Säuren mit hohen Raten (Abb. 12). Wir konnten in einem unabhängigen Projekt Alkoholdehydrogenasen (ADHs) und die AOR aus *T. sp.* X514 als Enzyme beschreiben und charakterisieren, die putativ an der Ethanolproduktion beteiligt sind (Hitschler und Basen, 2021; Nissen et al. 2024; Abb. 13).

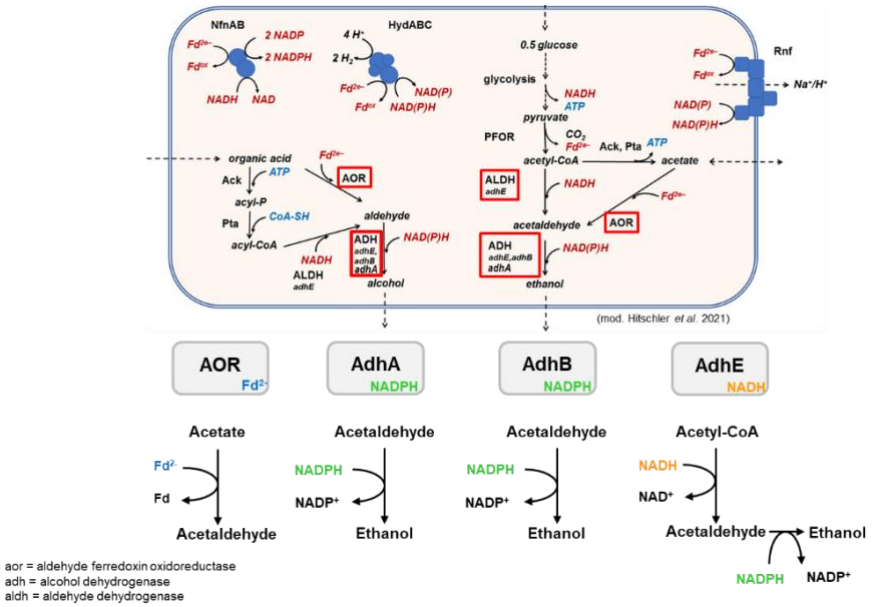


Abbildung 13. Putative Alkoholproduktion in *Thermoanaerobacter sp.* Stamm X514 (mod. nach Hitschler *et al*. 2021).

Die folgenden Gene, welche für diese ADHs kodieren sowie ein Gen, das für die Aldehyd:Ferredoxin Oxidoreduktase (AOR) kodiert, wurden in das Chromosom von *T. kivui* integriert: *adhA* (Teth514_0564), *adhB* (Teth514_0653), die bifunktionelle Aldehyd- und Alkoholdehydrogenase *adhE* (Teth514_0627), *aor* (Teth514_1380). Die Integration erfolgte mit Hilfe eines kürzlich entwickelten genetischen Systems, das auf einer Uracil-Auxotrophie beruht (Basen *et al.* 2018, Abb. 14).

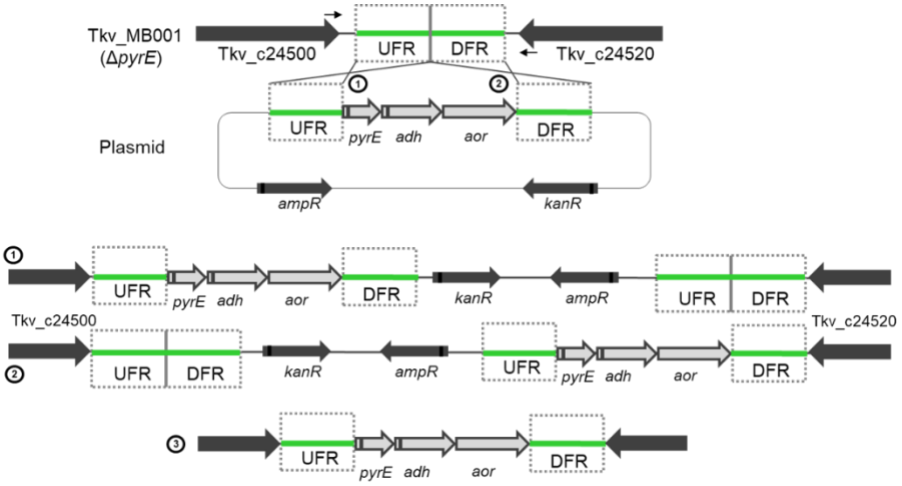


Abbildung 14. Genintegration in *T. kivui* mittels einfach- oder doppelt homologer Rekombination (Basen *et al.* 2018).

Insgesamt wurden sechs verschiedene Stämme gentechnisch erstellt (Abb. 7): Tkv_MB006 (*adh0564/adhA* + *aor*), Tkv_MB007 (*adhE*), Tkv_MB014 (*aor*), Tkv_MB019 (*adhE* + *aor*), Tkv_MB020 (*adhB* + *aor*) und Tkv_MB021 (*adhA*+*adhE*).

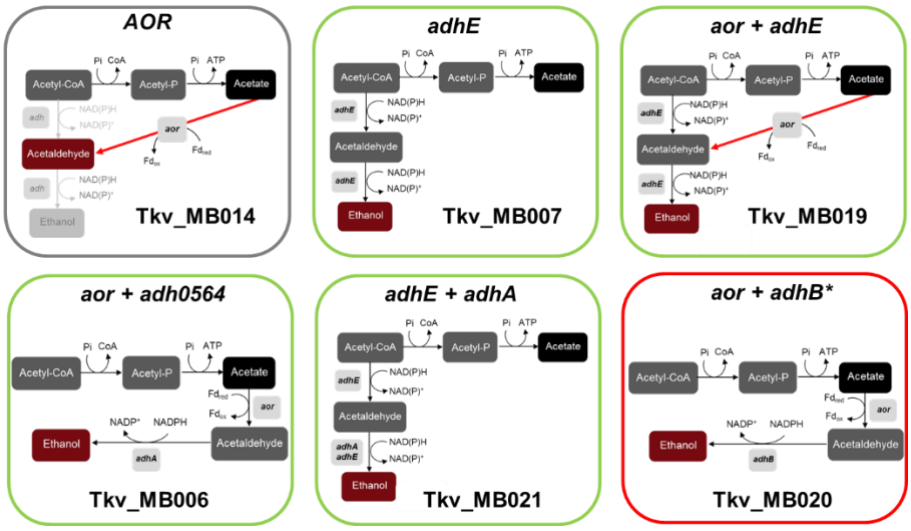


Abbildung 15. Genetisch modifizierte *T. kivui* Stämme (grün, Alkoholproduktion beobachtet; rot, keine Alkoholproduktion). *Adh0564* codiert auch für eine Alkoholdehydrogenase vom AdhA-Typ.

Zunächst konnte verifiziert werden, dass die genetisch modifizierten Stämme Aktivitäten der entsprechenden Enzyme aufwiesen (Abbildung 16). Diese heterologen funktionellen Produktionen

verschiedener Enzyme stellen einen großen Fortschritt in der Etablierung von *T. kivui* sowohl als Produktionsplattform für Enzyme aus Anaerobiern und als auch aus Thermophilen dar (siehe auch Katsyv et al. 2021a, Nissen et al. 2024), da solche speziellen Protein-Produktionssysteme selten sind.

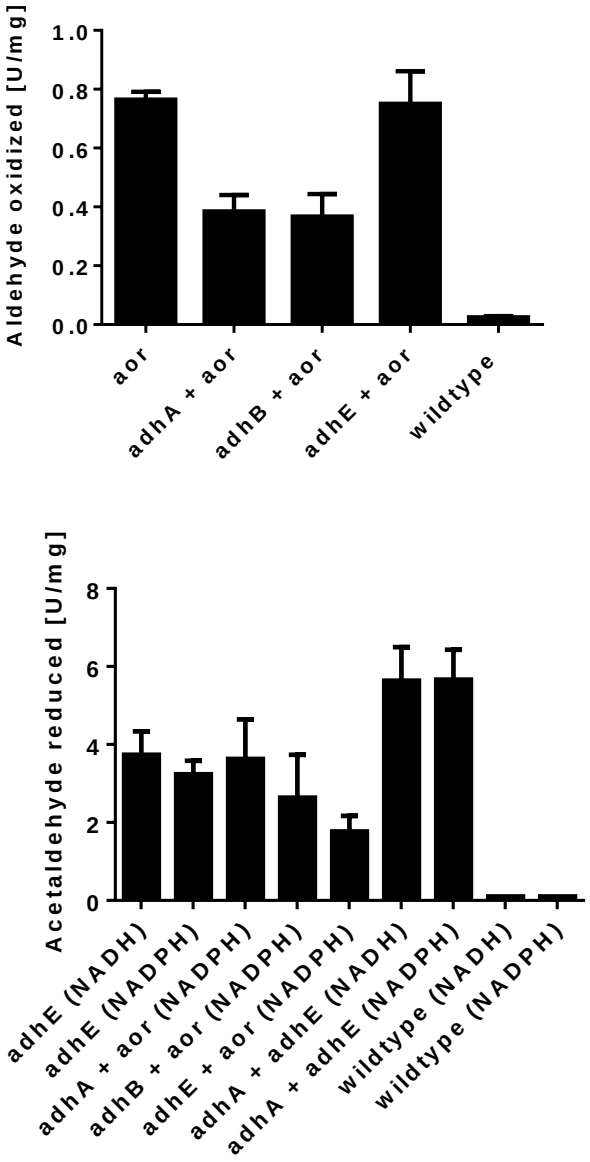


Abbildung 16. Spezifische Enzymaktivität von AOR (oben, Benzylviologen-abhängige Aldehydoxidation) und der ADH (unten, NAD(P)H-abhängige Aldehydreduktion) im zellfreiem Rohextrakt der genetisch veränderten *T. kivui* Stämme (n=3).

Von den genetisch veränderten Stämmen produzierten die vier Stämme Tkv_MB006, Tkv_MB007, Tkv_MB019 und Tkv_MB021 bis zu 22,5 mM (1,05 g L^{-1}) Ethanol aus 3,0 bar Syngas ($CO/H_2/CO_2$, 50:33,5:16,5, v/v) (Abb. 17). Der Stamm Tkv_MB006 besitzt die primäre ADH Adh0564 sowie die AOR und produzierte Ethanol aus verschiedenen Zuckern, sowie mit H_2+CO_2 und bei Wachstum auf Syngas. In den Stamm Tkv_MB007 wurde das Gen für die bifunktionelle ALDH/ADH AdhE integriert. Der Stamm produzierte ebenfalls Ethanol bei Wachstum auf verschiedenen Zuckern sowie mit H_2+CO_2 und

Syngas. Tkv_MB019 trägt sowohl *adhE* als auch *aor* und produzierte ebenso Ethanol bei Wachstum auf Zucker, H_2+CO_2 und Syngas. Tkv_MB021 besitzt eine Kombination aus *adh0564* und *adhE* (kodiert für eine bifunktionelle ALDH/ADH) und produziert auch Ethanol bei Wachstum auf Zucker sowie auf H_2+CO_2 und auf Synthesegas. Der Stamm Tkv_MB020 trägt die Gene für die sekundäre ADH AdhB sowie für die AOR und produzierte keinen Alkohol, obwohl die Enzymaktivität der ADH nachgewiesen wurde (Abb. 16). Bislang wies der Stamm Tkv_MB021 die höchste Ethanolproduktion bei Wachstum auf Glukose, H_2+CO_2 und Synthesegas auf (Abb. 17). Allerdings produzierten alle Stämme in Serumflaschen immer noch Acetat als Hauptprodukt (60–80 mM mit Glukose, 80–110 mM mit Syngas). Die Stämme wurden physiologisch charakterisiert, hinsichtlich des Stoffwechsels wurden Stoffwechselmodelle erstellt, wofür die Expertise des Partners AG Müller/Frankfurt und die Transkriptomanalysen von *T. kivui* bei Wachstum auf unterschiedlichen Gasen, durchgeführt von Partner AG Daniel/Göttingen, essentiell waren. Schließlich wurden die Stämme an den Projektpartner AG Angenent/Tübingen für die Analyse im Bioreaktor übergeben. In den Studien zur Synthesegasverwertung im Bioreaktor stellte sich der Stamm Tkv_MB006 (*aor*+*adhA*) als bester Produktionsstamm heraus, der im Multibioreaktor im kontinuierlichen Modus bei pH 6,5 einen Ethanoltiter von 52 mM erreichte und annähernd ein Ethanol:Acetat-Verhältnis von 1:1 (siehe Schlussbericht Partner AG Angenent). Ein Manuskript hierzu ist in Vorbereitung (Engelhardt *et al.*).

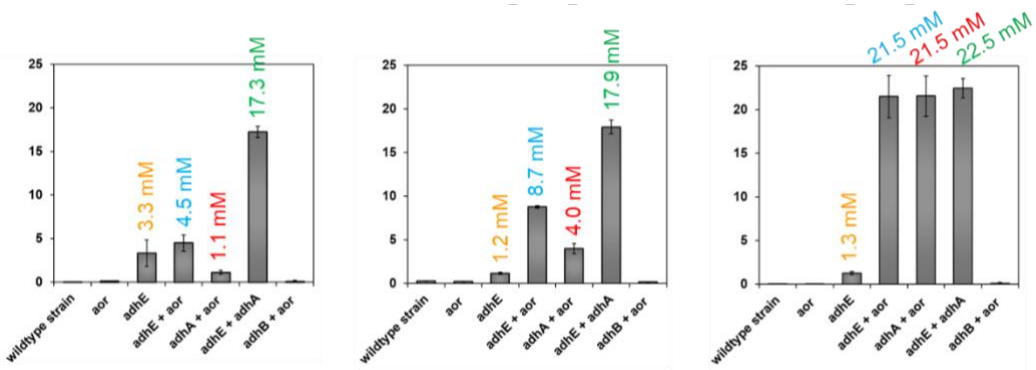


Abbildung 17. Ethanolkonzentration [mM] im Überstand der genetisch veränderten *T. kivui* Stämme bei Wachstum auf 15 mM Glukose (links), H_2+CO_2 (H_2/CO_2, 66:33, v/v, 3 bar; mitte) und Synthesegas (CO/H_2/CO_2, 50:33,5:16,5, v/v, 3 bar; rechts) (n=3).

Zusammengefasst wurden von Partner Basen/Rostock fünf genetisch veränderte Stämme erzeugt, von denen drei signifikante Konzentrationen Ethanol aus Synthesegas produzierten. Die Stämme wurden detailliert enzymatisch, stoffwechselphysiologisch und biotechnologisch untersucht. Damit wurden M7 und M10 über-erfüllt. Da insbesondere der Stamm Tkv_MB006 von großem Potential für eine industrielle Anwendung ist, schließen sich über das Projekt hinaus weitere physiologische und systembiologische Untersuchungen sowie genetische und biotechnologische Optimierungen an.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigste Position des zahlenmäßigen Nachweises waren die aufgewendeten Personalkosten (Pos. 0812) für Frau Lisa Engelhardt (04/20–12/23) sowie für Dr. Maria Lehmann (12/20–11/22). Diese beiden Mitarbeiterinnen haben einen Großteil der Experimente durchgeführt. Zur Durchführung der anspruchsvollen genetischen Experimente war die Einstellung einer erfahrenen Postdoktorandin (Maria Lehmann) notwendig. Frau Engelhardt strebt mit den im Projekt erzielten und zum Teil bereits veröffentlichten Ergebnissen eine Dissertation an der Universität Rostock an. Mit Unterstützung beider Mitarbeiterinnen war es möglich, 5 Master- und 8 Bachelorstudierende am Vorhaben zu beteiligen.

Als zweitgrößte Position sind die Verbrauchsmittel (Pos. 0843) zu nennen. Zur Durchführung des Projektes waren Beschaffungen unter anderem von Gasen, einer Vielzahl von Chemikalien, von Glas- und Plastikware zur Kultivierung, von Mikroorganismen als genetische Ressourcen sowie von Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten notwendig.

Die Investitionsmittel (Pos. 0850) stellen die drittgrößte Position dar. Wie geplant wurde hier ein GC beschafft, der zur Durchführung des Projektes essentiell war. Nur durch diese Beschaffung konnte die eine Vielzahl von Proben auf die Verwertung von Synthesegas und die Produktion von Säuren und Alkoholen untersucht werden. Weiterhin wurden ein PCR Thermocycler sowie – abweichend vom ursprünglichen Zuwendungsbescheid, aber in Abstimmung mit dem Projektträger – Wasserbäder für die Kultivierung der thermophilen Bakterien bei unterschiedlichen Temperaturen beschafft.

Eine kleinere Summe entfiel auf Reisekosten. Die Ergebnisse des Projektes wurden auf nationalen (VAAM-Jahrestagung 2022–2024) sowie internationalen Konferenzen (Gordon Conference on Microbial Basis of C1-metabolism, Southbridge, MA, USA sowie Thermophiles 2023 in Bangor, UK) vorgestellt. Zudem fanden insgesamt 7 Projektreffen statt (Tab. 3), für die ein Teil der Reisemittel eingesetzt wurden. Insgesamt wurden die bewilligten Mittel vollständig genutzt.

Tabelle 3. Liste der Projekttreffen

23.10.2020	online
14.05.2021	online
04.11.2021	online
09.05.2022	online
14.10.2022	Rostock
30.06.2023	Tübingen
01.02.2024	Frankfurt (Abschlusstreffen)

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. Im Rahmen des Teilvorhabens A) wurden aufwändige Anreicherungen und Kultivierungsversuche durchführt, um die Stoffwechselleistungen neuartiger Mikroorganismen zu untersuchen. Dabei kam auch eine Vielzahl analytischer Methoden zur Metabolitbestimmung zum Einsatz, wobei insbesondere Gaschromatographie zur Bestimmung der Stoffwechselprodukte und der Synthesegasverwertung eingesetzt wurde. In der Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern konnte so ein umfassendes Bild der Acetogenese bei hohen Temperaturen gezeichnet werden. Weiterhin wurde das Methoden-Spektrum für thermophile Acetogene, insbesondere für *T. kivui,* erweitert, was umfangreiche und aufwändige risikobehaftete molekulare Untersuchungen bedingte. Weiterhin wurden einige Stämme von *T. kivui* zur Produktion von Ethanol entwickelt, die in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern im Bioreaktor untersucht wurden, und vielversprechendes Potential zur effizienten Produktion von Ethanol aus Synthesegas bei 65 °C zeigten.

Es wurden die wesentlichen und übergreifenden Projektziele erreicht, daher waren die durchgeführten Arbeiten notwendig und angemessen. Ohne die Zuwendung des BMBF wäre die Durchführung des Projekts nicht möglich gewesen.

4. Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Thermophile Acetogene besitzen wie beschrieben ein großes Potential zur Verwertung von Synthesegas zu Brennstoffen und Feinchemikalien. Eine industrielle Nutzung thermophiler Biokatalystoren in der Synthesegasverwertung bietet viele technologische Vorteile gegenüber dem Verfahren bei niedrigeren Temperaturen. Im Teilvorhaben A) wurde ein Beitrag zur Charakterisierung des Repertoires neuer thermophiler Acetogener geleistet. Die erzielten Ergebnisse wurden publiziert und die neuartigen Erkenntnisse können nun zur Nutzung im Modellorganismus *T. kivui* genutzt werden, z.B. über die genetische Integration von Stoffwechselwegen z.B. zur Buttersäureproduktion.

Im Teilvorhaben A) konnte ebenfalls neue Methoden zur genetischen Modifikation von *M. thermoacetica* und insbesondere von *T. kivui* etabliert werden. Insbesondere in letzterem können diese nun für zukünftige grundlegende Studien aber auch zur Steuerung des Stoffwechsels über die gezielte Anschaltung von Genen angewandt werden. 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.

Darüber hinaus wurde das Verständnis der Acetogenese bei hohen Temperaturen durch die effektive und erfolgreiche Zusammenarbeit stark verbessert. Dadurch trug die Förderung von ThermoSynCon zur Bildung eines neuen Netzwerkes bei, 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

In der Gruppe von Ilja Kublanov wurde am Winogradsky Institute of Microbiology in Moskau ein neuer thermophiles acetogenes Bakterium beschrieben, das mit *Thermoanaerobacter kivui* verwandt ist, aber geringere Wachstumsraten mit H_2+CO_2 aufweist. Zudem ist der Stamm obligat autotroph ist, was wissenschaftlich interessant ist, aber die Entwicklung eines genetisch veränderten Plattformorganismus erschwert.

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 H_2 and CO_2 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 CO_2 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 CO_2 by thermophilic microbial electrosynthesis with *Thermoanaerobacter kivui*. Bioresource Technology Reports 25: 101740.

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Im Rahmen des Teilvorhaben A) von ThermoSynCon wurden bereits sechs Publikationen fertiggestellt, von denen fünf akzeptiert oder bereits publiziert sind, eine weitere wurde auf einem preprint server hinterlegt und so bereits vor der Publikation in einer Fachzeitschrift der Öffentlichkeit zugänglich gemacht. Drei der Manuskripte entstanden unter Federführung der Universität Rostock. Eine weitere Publikation befindet sich in Vorbereitung. Zudem wurden zudem 5 Master- und 8 Bachelorarbeiten erfolgreich abgeschlossen.

Liste der Publikationen aus ThermoSynCon

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. *doi.org/10.1007/s00792-021-01247-8*

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. *https://doi.org/10.1007/s00792-021-01251-y*

Zeldes B, Poehlein A, Jain S, Baum C, **Daniel R**, **Müller V**, **Basen M**. 2023. DNA uptake from a laboratory environment drives unexpected adaptation of a thermophile to a minor medium component. **ISME Communications** 3:2. *https://doi.org/10.1038/s43705-022-00211-7*

Baum C, Zeldes B, Poehlein A, **Daniel R**, **Müller V**, **Basen M***. 2024. The energy-converting hydrogenase Ech2 is important for the growth of the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui* on ferredoxin-dependent substrates. **Microbiology Spectrum 12**: e0338-023. *https://doi.org/10.1128/spectrum.03380-23*

Böer T, Engelhardt L, Lüschen A, Eysell L, Yoshida H, Schneider D, **Angenent LT**, **Basen M**, **Daniel R**, Poehlein A. 2024. *Isolation and characterization of novel acetogenic* Moorella *strains for employment as potential thermophilic biocatalysts*. **FEMS Microbiology Ecology** (accepted)

Zeldes B, Mittelstedt S, Baum C, Shakirova A, Poehlein A, **Daniel R**, **Müller V**, **Basen M**. 2024. Knock-down of genes essential for homoacetogenic growth using sugar inducible promoters in the thermophile *Thermoanaerobacter kivui*. ***bioRxiv***. *https://doi.org/10.1101/2024.06.18.598388*

Engelhardt L, Moon J, Yoshida H, Prohaska P, Bull A, **Müller V**, **Angenent LT** and **Basen M.** 2024. *Synthesis gas conversion to ethanol at high temperature by a genetically engineered thermophilic acetogen*. In preparation

Referenzen

Basen M, Müller V. 2017. "Hot" acetogenesis. Extremophiles 21(1): 15-26.

Basen M, Geiger I, Henke L, Müller V. 2018. A genetic system for the thermophilic acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui.* Applied and Environmental Microbiology 84 (3): e02210-17.

Donahue JP, Israel DA, Peek RM, Blaser MJ, Miller GG. 2000. Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation of *Helicobacter pylori*. Molecular Microbiology 37 (5): 1066–1074.

Friedrichs, A. 2022. Physiologische und genetische Untersuchungen zu *Moorella* sp.. Masterarbeit, Universität Rostock.

Jensen TØ, Tellgren-Roth C, Redl S, Maury J, Jacobsen SAB, *et al.* 2019. Genome-wide systematic identification of methyltransferase recognition and modification patterns. Nature Communications 10 (1): 3311.

Katsyv A, Schoelmerich MC, Basen M, Müller V. 2021a. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui.* FEBS Open Bio 11: 1332-1342.

Hitschler L, Nissen LS, Kuntz M, Basen M. 2021. Alcohol dehydrogenases AdhE and AdhB with broad substrate ranges are important enzymes for organic acid reduction in *Thermoanaerobacter* sp. strain X514. Biotechnology for Biofuels 14, 187.

Leigh JA, Mayer F und Wolfe RS. 1981. *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing, acetogenic bacterium. Archives of Microbiology 29:275-280.

Matsushima P, Baltz RH. 1994. Transformation of *Saccharopolyspora spinosa* protoplasts with plasmid DNA modified in vitro to avoid host restriction. Microbiology 140 (1): 139–143.

Moon J, Henke L, Merz N, 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, Basen M. 2019. The emerging role of aldehyde:ferredoxin oxidoreductases in microbially-catalyzed alcohol production. Journal of Biotechnology 306: 105-117.

Nissen LS, Moon J, Hitschler L, Basen M. 2024. A versatile aldehyde:ferredoxin oxidoreductase from the organic acid reducing *Thermoanaerobacter* sp. strain X514. International Journal of Molecular Sciences 25: 1077. *https://doi.org:10.3390/ijms25021077*

Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, Abe C, Makino M, Mizuguchi Y, Taniguchi H. 1998. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. Journal of Clinical Microbiology 36(5):1220-1225.

Weghoff MC und Müller V. 2016. CO Metabolism in the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui*. Applied and Environmental Microbiology 82(8):2312-2319.